

**UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG
VON CYCLOOXYGENASE-INHIBITOREN AUF DIE
ENTSTEHUNG DER ARTERIOSKLEROSE**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang von Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Julia Metzner

aus Frankfurt am Main



Frankfurt am Main (2006)

(D30)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Professor Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Professor Dr. Dr. Gerd Geißlinger
Professor Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 14.02.2007

Für Niklas Samuel

*“We must remember that the absence of evidence
is not the evidence of absence.”
Professor Dr. G. A. FitzGerald*

1	Einleitung	1
1.1	Die Arteriosklerose	2
1.1.1	Der Aufbau arterieller Gefäße	3
1.1.2	Die Arteriogenese.....	4
1.2	Nichtsteroidale Antiphlogistika	8
1.2.1	Die Cyclooxygenasen.....	8
1.2.2	Der Prostanoid-Stoffwechselweg als Angriffspunkt von NSAIDs.....	9
1.2.3	Die Entwicklung selektiver COX-2-Inhibitoren.....	12
1.2.4	Das Nebenwirkungsprofil von Coxiben	13
1.2.5	COX-abhängige und -unabhängige Mechanismen.....	16
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Prüfsubstanzen.....	20
2.1.2	Antikörper gegen atherogene Markerproteine.....	20
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.4	Puffer und Lösungen	23
2.1.5	Primer.....	27
2.1.6	Geräte und Materialien.....	28
2.2	Tierexperimentelle Methoden.....	29
2.2.1	Versuchsdesign.....	29
2.2.1.1	Versuchstiere.....	29
2.2.1.2	Versuchsgruppen.....	29
2.2.2	Entnahme von organischem Material	30
2.2.2.1	Urinkollektion	30
2.2.2.2	Blutentnahme	30
2.2.2.3	Gewebeentnahme	30
2.2.3	Genotypisierung	31
2.2.4	Pharmakokinetik.....	31
2.2.5	Blutanalytik	32
2.3	Molekularbiologische Untersuchungen.....	33
2.3.1	RNA-Extraktion	33
2.3.1.1	RNA-Extraktion aus Gewebeproben.....	33
2.3.1.2	RNA-Extraktion aus arteriellen Plaques.....	33
2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	34
2.3.3	RT-PCR Analytik.....	34
2.3.4	Agarosegel-Elektrophorese	34
2.3.5	Isolierung von Mikrosomen aus Lebergewebe.....	35
2.3.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	35
2.3.7	HMG-CoA-Reduktase-Aktivitätsmessung.....	35

2.3.8	Urinanalytik.....	36
2.3.8.1	Prostacyclin-Analyse.....	36
2.3.8.2	Thromboxan-Analyse.....	36
2.3.9	Herstellung von Gefrierschnitten.....	36
2.3.9.1	<i>In situ</i> -Proteomikanalysen nach MelTec.....	36
2.3.9.2	Immunhistochemie mittels Fluoreszenz.....	37
2.3.10	Histologische Färbung.....	37
2.3.10.1	Lipid- und Zellkernfärbung mit Sudan-Rot und Hämatoxylin/Eosin.....	37
2.3.10.2	Goldner-Färbung.....	37
2.3.10.3	Elastica-van-Gieson-Färbung.....	38
2.3.11	Quantifizierung arterieller Plaques.....	38
2.3.12	<i>In situ</i> -Proteomikanalysen von proatherogenen Proteinen.....	38
2.3.13	Immunfluoreszenz-Färbung von COX-2 in atherogenen Plaques.....	39
2.3.14	Plaque-RNA Analytik.....	40
2.3.14.1	Lasermikrodissektion.....	40
2.3.14.2	Synthese von cDNA.....	40
2.3.14.3	Quantitative TaqMan™ RT-PCR-Analytik.....	41
2.3.15	Statistik.....	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Entwicklung und Charakterisierung atherogener Plaques.....	43
3.1.1	Histologische Untersuchung der Aorta.....	43
3.1.2	<i>In situ</i> -Proteomikanalysen von atherogenen Proteinen.....	45
3.2	Pharmakokinetische Untersuchung von Celecoxib.....	47
3.3	Gewichtskontrolle und Gesundheitszustand der Versuchstiere.....	48
3.4	Urin-Analytik: Effektivität und Selektivität der COX-2-Inhibitoren.....	50
3.5	Quantifizierung der Plaques.....	51
3.6	Quantitative Analyse der COX-2-Expression in atherogenen Plaques.....	53
3.6.1	COX-2-mRNA-Expressionsanalyse mittels Lasermikrodissektion und Taq Man™ RT-PCR.....	53
3.6.2	COX-2-Protein-Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz.....	54
3.7	Plasma-Analytik: Effekte von COX-Inhibitoren auf Blutfettwerte.....	55
3.8	Analyse von Proteinen des Cholesterinstoffwechsels.....	56
3.8.1	HMG-CoA-Reduktase Aktivitäts-Assay.....	56
3.8.2	RNA-Analytik von HMG-CoA-R, ACAT, CYP 7a und LDL-R.....	57
4	Diskussion	59
4.1	Charakterisierung der Plaques und der atherogenen Proteine.....	59
4.2	Klinisch relevante Plasmakonzentrationen und die Verträglichkeit der NSAIDs.....	62
4.3	Prostacyclin- und Thromboxan A ₂ -Biosynthese in der Arteriosklerose.....	63

4.4	(Anti-) atherogene Effekte von selektiven COX-2-Inhibitoren.....	64
5	Zusammenfassung	68
6	Anhang	VIII
6.1	Abkürzungsverzeichnis	VIII
6.2	Literaturverzeichnis	XI
6.3	Veröffentlichung und Tagungsbeitrag	XXI
6.4	Eidesstattliche Erklärung	XXI
6.5	Lebenslauf.....	XXII
6.6	Danksagung.....	XXIII

1 Einleitung

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) spielen für die Behandlung von akuten und chronischen Entzündungen und Schmerzen eine entscheidende Rolle. Sie hemmen die Synthese von Prostaglandinen durch Inhibition des Enzyms Cyclooxygenase (COX) und reduzieren dadurch Entzündungsreaktionen, Schmerzen, mildern Schwellungen und wirken fiebersenkend. Bisher sind zwei Isoformen der COX bekannt. Die COX-1 wird konstitutiv in fast allen Geweben exprimiert und ist überwiegend für die Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen verantwortlich, wie z. B. im Magen zur Protektion der Magenschleimhaut, in der Niere zur Erhaltung des renalen Blutflusses und in Blutplättchen zur Regulation der Thrombozytenaggregation. Neben einer konstitutiven COX-2-Expression in einigen Organen wie Niere, Gehirn und Rückenmark ist die COX-2 hauptsächlich als ein durch Entzündung und Gewebeverletzung induzierbares Enzym beschrieben worden. Traditionelle NSAIDs hemmen nichtselektiv sowohl die COX-1 als auch die COX-2 und zeigen häufig unerwünschte Wirkungen vor allem im Magen-Darm-Trakt, die auf eine Hemmung der COX-1 zurückgeführt werden. Deshalb wurden selektive COX-2-Inhibitoren (Coxibe) entwickelt, die Entzündungen und Schmerzen lindern sollten, ohne dabei die physiologischen Funktionen der COX-1-abhängigen protektiven Prostaglandine zu beeinträchtigen. Klinische Studien bestätigten, dass die meisten selektiven COX-2-Inhibitoren die gastrointestinalen Nebenwirkungen traditioneller NSAIDs deutlich reduzieren, wovon insbesondere Patienten profitieren, die aufgrund von chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis, eine Langzeittherapie benötigen. Im Laufe der klinischen Studien traten jedoch auch unter selektiven COX-2-Inhibitoren unerwünschte Arzneimittelwirkungen speziell im kardiovaskulären Bereich (Hypertonie, Herzinfarkt) auf. Insbesondere führten die Ergebnisse der APPROVE-Studie (*Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX Trial*), die zeigten, dass unter Rofecoxib (selektiver COX-2-Inhibitor) das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen zunimmt, zu Diskussionen über die Sicherheit der neuen Medikamente. Da besonders Patienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis, welche die Hauptzielgruppe für die Verabreichung von Coxiben darstellen, eine Prädisposition für kardiovaskuläre Erkrankungen, vor allem für Arteriosklerose, aufweisen.

Bisher sind die molekularen Mechanismen, die zu den kardiovaskulären Ereignissen führen, nicht aufgeklärt und es ist nicht erwiesen, ob alle Coxibe die gleichen Wirkungen ausüben können. Die Theorie eines Klasseneffekts, der auf einer Verschiebung des COX-1/COX-2-Gleichgewichts beruht, konnte noch nicht vollständig bestätigt werden. Es wird postuliert, dass Coxibe durch selektive COX-2-Inhibition das Thromboxan A₂-Prostacyclin-Gleichgewicht zugunsten des Thromboxans A₂, welches einen potenten Thrombozytenaktivator und -aggregator darstellt, verschieben. In einer klinischen Studie (ADAPT; *Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial*) wurde jedoch auch für den nichtselektiven COX-Inhibitor Naproxen eine Erhöhung des Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse festgestellt. Diese Beobachtung deutet auf einen klassenübergreifenden Effekt hin, durch

den möglicherweise alle NSAIDs das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen können. Auf der anderen Seite zeigten Untersuchungen an humanen Arterien eine vermehrte COX-2-Expression in atherogenen Plaques, so dass einige Coxibe und traditionelle NSAIDs ebenso einen protektiven Effekt auf die Entwicklung der Arteriosklerose ausüben könnten. Die Frage, ob NSAIDs in einer Langzeittherapie anti- oder proatherogene Wirkungen aufzeigen und dadurch das Risiko für die Entwicklung schwerwiegender kardiovaskulärer Erkrankungen senken oder erhöhen, wurde bisher nicht zufrieden stellend beantwortet. Im Vordergrund dieser Arbeit stand daher die Untersuchung der Effekte der COX-2-selektiven NSAIDs Rofecoxib und Celecoxib und des nichtselektiven NSAIDs Naproxen auf die Entstehung und Entwicklung der Arteriosklerose, was an einem Mausmodell experimentell erforscht wurde.

1.1 Die Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist eine entzündliche Erkrankung und stellt den chronisch fortschreitenden Prozess der arteriellen Veränderung der Gefäßwand dar, die als Verdickung und Verhärtung mit Elastizitätsverlust sowie als Einschränkung des Gefäßlumens in Erscheinung tritt (Ross 1999). Durch die Entwicklung atherogener Plaques und deren möglicher Ruptur und einer dadurch bedingten Thrombenbildung führt die Arteriosklerose zur Einengung des Gefäßlumens bis hin zu einem vollständigen Gefäßverschluss (Libby 2002). Die Entwicklung arterieller Veränderungen erfolgt durch einen schleichenden Prozess und kann jahrelang symptomlos verlaufen, bis sie sich durch Ischämie, Thromboseentwicklung, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt oder Schlaganfall mit zum Teil letalem Ausgang manifestiert. Dadurch ist die Arteriosklerose für die Manifestation von arteriellen Durchblutungsstörungen verantwortlich und steuert zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen bei, zu denen bspw. die periphere arterielle Verschlusskrankheit, die chronische ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt, die Herzinsuffizienz, der plötzlicher Herztod und der Schlaganfall zählen. In den westlichen Industrieländern gilt die Arteriosklerose als Hauptursache für Frühinvalidität und vorzeitigen Tod (Millonig et al. 2002). Bevorzugte Gefäße für arteriosklerotische Veränderungen sind die Koronararterien, Brustaorta, Femoralarterien, *Arteria carotis interna* und die Hirnstammarterien. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit wird dabei durch chronische Entzündungen wie bei der rheumatoiden Arthritis, durch Übergewicht, Hypertonie, *Diabetes mellitus*, Hyperurikämie, Rauchen sowie durch genetische Disposition weiter gefördert. Ein dauerhaft erhöhter Cholesterin- und LDL-Plasmaspiegel (LDL; *low-density lipoprotein*), mit gleichzeitig erniedrigtem HDL-Plasmaspiegel (HDL; *high-density lipoprotein*) stellt zusätzlich einen sehr potenten Risikofaktor für die Entstehung und Progression der Arteriosklerose dar (Assmann et al. 1996; von Birgelen et al. 2004). Eine Kumulation von Risikofaktoren bewirkt einen multiplikativen Effekt auf die Inzidenz

kardiovaskulärer Erkrankungen (Assmann et al. 1992), was in der PROCAM (*Prospective Cardiovascular Münster*)-Studie gezeigt wurde.

1.1.1 Der Aufbau arterieller Gefäße

Die Wände aller Arterien bestehen prinzipiell aus drei Schichten (Abb. 1.1.A): Aus der Intima, der inneren, dem Blutstrom zugewandten Schicht, die aus Endothelzellen besteht, eine Barrierefunktion erfüllt und am transzellulären Stofftransport beteiligt ist; aus der *Membrana elastica interna* und der Media, welche sich aus spiralförmig angeordneten glatten Muskelzellen und elastisch vernetzten Fasern zusammensetzt und die Hämodynamik durch Kontraktion bzw. Dilatation beeinflusst. Nach außen abgrenzend aus der Adventitia, die hauptsächlich aus Bindegewebe besteht und zur Versorgung der Arterienwand Gefäßnerven und kleinste Blutgefäße führt, die bis in die Media eindringen. Bei der Entwicklung von Arteriosklerose kommt es zu arteriellen Veränderungen in der Intima und Media, die sich als arteriosklerotische Plaques manifestieren (Abb. 1.1.B) und zu einem zunehmenden Verschluss des arteriellen Gefäßes führen.

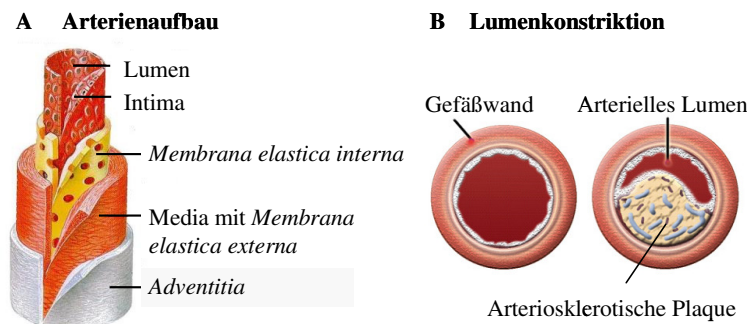


Abbildung 1.1: Aufbau von Arterien und Lumenkonstriktion eines Gefäßes durch Plaques. Arterien bestehen, von innen nach außen gesehen, aus der Intima, der aus elastischen Fasern bestehenden Media und aus der bindegewebshaltigen Adventitia (A). Das Gefäßlumen wird durch arteriosklerotische Plaques, welche aus aktivierten Endothelien, Makrophagen und eingewanderten glatten Muskelzellen bestehen, verringert und der Blutstrom lokal vermindert (B). (Darstellung nach „dtv-Atlas der Anatomie, Band 2“, 1986; Georg Thieme-Verlag.)

1.1.2 Die Arteriogenese

Die Entwicklung arteriosklerotischer Plaques bzw. die Pathogenese der Arteriosklerose ist ein komplexer und noch nicht vollständig aufgeklärter Vorgang. Als gesichert gilt, dass arteriosklerotische Veränderungen eine irreversible Gefäßschädigung bis hin zum vollständigen Gefäßverschluss mit tödlichem Verlauf nach sich ziehen können. Zur potentiellen Aufklärung der Arteriogenese lassen sich zwei Hypothesen heranziehen, die „Response-to-injury“-Hypothese nach Russel Ross (Ross et al. 1973) und die „Lipoprotein-induced atherosclerosis“-Hypothese nach Leonard Joseph Goldstein (Goldstein et al. 1977). Eine Endothelschädigung (Ross 1993; Fosslien 2005) und die Modifikation von LDL, welches von Makrophagen aufgenommen wird (Goldstein et al. 1987), führen zu der Einleitung und Progression der Arteriosklerose. Die Plaquebildung lässt sich dabei schematisch in vier Stadien unterteilen:

1. Die Induktion arterieller Veränderungen erfolgt u.a. durch Verletzungen des Endothels und Modifikation von LDL, was zur Ausbildung einer frühen Läsion, dem sog. „Fatty-Streak“ oder dem sog. Xanthoma, führt.
2. Bei anhaltender Entzündungsantwort erfolgt die Ausbildung einer fortgeschrittenen stabilen Plaquestruktur durch Akkumulation von Makrophagen, die sich durch Aufnahme von oxidiertem LDL (oxLDL) zu Schaumzellen wandeln.
3. Durch intra- und extrazelluläre Signale wird eine fibröse Kappe durch proliferierende und aus der Media wandernde Muskelzellen gebildet und die Plaques weiter vergrößert.
4. Wird dieser Vorgang nicht unterbrochen, kann es zur Ruptur einer Plaquestruktur kommen, welche ein kardiovaskuläres Ereignis zur Folge haben kann.

Im Folgenden wird der komplexe Prozess der Arteriosklerose, der in der Abbildung 1.2 schematisch dargestellt ist, genauer beschrieben. Lokale mechanische Einwirkungen wie schwankende Scherkräfte und Wirbelbildung (Nagel et al. 1994; Gimbrone 1999; Dancu et al. 2004) können eine Schädigung des Endothels verursachen, was durch zusätzliche Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, hohe Glukosewerte oder Hypertonie begünstigt wird. Die resultierende Endotheldysfunktion induziert eine Entzündungsreaktion, bei der Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) aktiviert werden und zur Expression proinflammatorischer Proteine wie COX-2 (Cyclooxygenase 2), iNOS (induzierbare NO-Synthase) oder TNF $_{\alpha}$ (Tumornekrosefaktor alpha) führt. Intrazellulär folgt der endothelialen Dysfunktion eine Störung der homöostatischen Eigenschaften des Endothels, wobei die Barrierefunktion gestört und die Permeabilität insbesondere für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile erhöht wird. Zudem werden Endothelzellen aktiviert und die Expression von Adhäsionsproteinen eingeleitet. Darunter ist vor allem das P-Selektin an der Einleitung und Progression von Veränderungen der Gefäßwand *in vivo* beteiligt, indem die Adhäsion von Monozyten,

neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten und Thrombozyten an Endothelien induziert wird (Bogen et al. 1994). Weitere Adhäsionsproteine wie ICAM (*intracellular adhesion molecule*), VCAM (*vascular cell adhesion molecule*), PECAM (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*), Integrine, E- sowie L-Selektin sind ebenfalls in der frühen Phase der Arteriosklerose bedeutsam (Nakashima et al. 1998) und leiten die Adhäsion von Leukozyten und deren Migration ein.

Entscheidend für die Einleitung und Progression der Arteriosklerose ist neben einer Endothelschädigung die Modifikation und Einwanderung von LDL-Partikeln in die Intima, wo diese weiter u.a. durch Oxidation zu oxLDL chemisch modifiziert werden (Navab et al. 2004). Das oxLDL fungiert als Stimulator der entzündlichen Signaltransduktion in umliegenden Endothelzellen und fördert die Freisetzung von Chemokinen wie MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) und M-CSF (*monocyte colony stimulating factor-1*) und von Cytokinen wie Interleukin (IL)-1 und IL-8. Zudem fördert oxLDL die Internalisierung von Monozyten in die arterielle Wand und ebenfalls deren Differenzierung zu reifen Makrophagen, welche oxLDL über den „Scavenger“-Rezeptor weiter aufnehmen (Han et al. 1998). Die durch Chemokine und Cytokine aktivierten Makrophagen exprimieren ihrerseits proinflammatorische Proteine. Dazu zählen COX-2 (Schonbeck et al. 1999), 5-Lipoxygenase (LO) (Qiu et al. 2006) und 15-LO (Hiltunen et al. 1995; Bocan et al. 1998), Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9 und MMP-12 (Luttun et al. 2004), Cytokine, TNF α , IFN- γ (*interferone gamma*) und Wachstumsfaktoren wie PDGF (*platelet derived growth factor*) und TGF- β (*transforming tumor growth factor beta*). Auf diese komplexe Weise stimulieren Makrophagen als eine der Hauptkomponenten die Entzündungsreaktion in der Arteriogenese. Die anhaltende Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen, welche die Internalisierung nicht steuern können, führt zur Bildung von Schaumzellen, die in der Intima akkumulieren und die Differenzierung einer frühen Läsion zu einer fibrösen arteriosklerotischen Plaque fördern.

Neben aktivierten Makrophagen akkumulieren T-Zellen in der Intima, wodurch eine Aktivierung der humoralen und zellulären Immunantwort eingeleitet wird und fördern dadurch die Entzündungsreaktion sowie die Progression der Arteriosklerose (Hansson et al. 2002).

Extrazellulär folgt auf die Endothelschädigung die Initiation prothrombotischer Ereignisse durch eine Thrombenbildung. Begünstigt wird dieser Prozess durch verlangsamte Blutströmungen und Wirbelbildung sowie durch eine beschleunigte Blutgerinnung. Diese tritt postoperativ, nach Traumen oder bei der arteriellen Verschlusskrankheit sowie bei Adipositas oder erhöhten Glucocorticoid-Spiegeln auf. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis führte die Behandlung mit Glucocorticoiden zu einer beschleunigten Blutgerinnung und es traten im Vergleich zu Patienten mit Osteoarthritis oder ohne chronischen Entzündungskrankheiten vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse auf (Solomon et al. 2003; Watson et al. 2003). Dabei zählten der akute Myokardinfarkt, Schlaganfall und die kongestive Herzinsuffizienz zu den Haupttodesursachen (Maradit-Kremers et al. 2005). Die Einleitung der Blutgerinnung beginnt mit der Freisetzung eines Gewebefaktors (TF; *tissue factor*) und mit der Aktivierung des Hagemann-Faktors an verletzten Gefäßendothelien. Gleichzeitig wird über

Glykoproteine des Typs GP-Ib die Adhäsion von Thrombozyten an die geschädigten Endothelien sowie an freigelegtes Kollagen und akkumulierte Makrophagen veranlasst. Die Aktivierung der Plättchen erfolgt, nachdem Thromboxan A₂ (TXA₂), ADP (Adenosindiphosphat) und Serotonin aus den Granula der Thrombozyten freigesetzt wurde und leitet deren Aggregation über den GP-IIb/IIIa-Rezeptorkomplex ein. Dieser Prozess führt zur Ausbildung eines sog. Abscheidungsthrombus, der auf Plaques aufgelagert zu einem akuten Gefäßverschluss führen kann („Mutschler Arzneimittelwirkungen“, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001).

Cytokine und Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) stimulieren in der Media die Proliferation von glatten Muskelzellen, wodurch diese in die Intima einwachsen, die Gefäßwand verdicken und einen großen Beitrag zur Ausbildung arteriosklerotischer Plaques leisten (Celletti et al. 2001). In Endothelzellen induziert die Caspase-1 Apoptose und leitet dadurch die Ausbildung eines nekrotischen Gebietes in der Intima ein und führt dadurch zur Ausbildung einer fibrösen Kappe, welche die Plaques stabilisiert. Eine Plaque-Ruptur wird schleichend durch proteolytische Enzyme und Metalloproteinasen eingeleitet und bewirkt als finales Ereignis arteriosklerotischer Veränderungen kardiovaskuläre Ereignisse. Durch proteolytische Spaltungen wird die fibröse Kappe zerstört, wodurch es zu einer Thrombenbildung kommt, die, wie oben beschrieben, zu einem akuten Gefäßverschluss führen kann. Falls Mikrokapillaren, welche zur physiologischen Versorgung in die Media ragen, verletzt werden, kann es zu einer internen Thrombenbildung kommen. Nach dem Aufreißen einer Plaque werden diese in den Blutstrom freigesetzt und führen zu einem akuten Gefäßverschluss oder lösen bei intravasaler Verschleppung von Plaquegewebe und internen Thromben Embolien aus. Diese kardiovaskulären Ereignisse können zu einem tödlich Verlauf der Arteriosklerose führen.

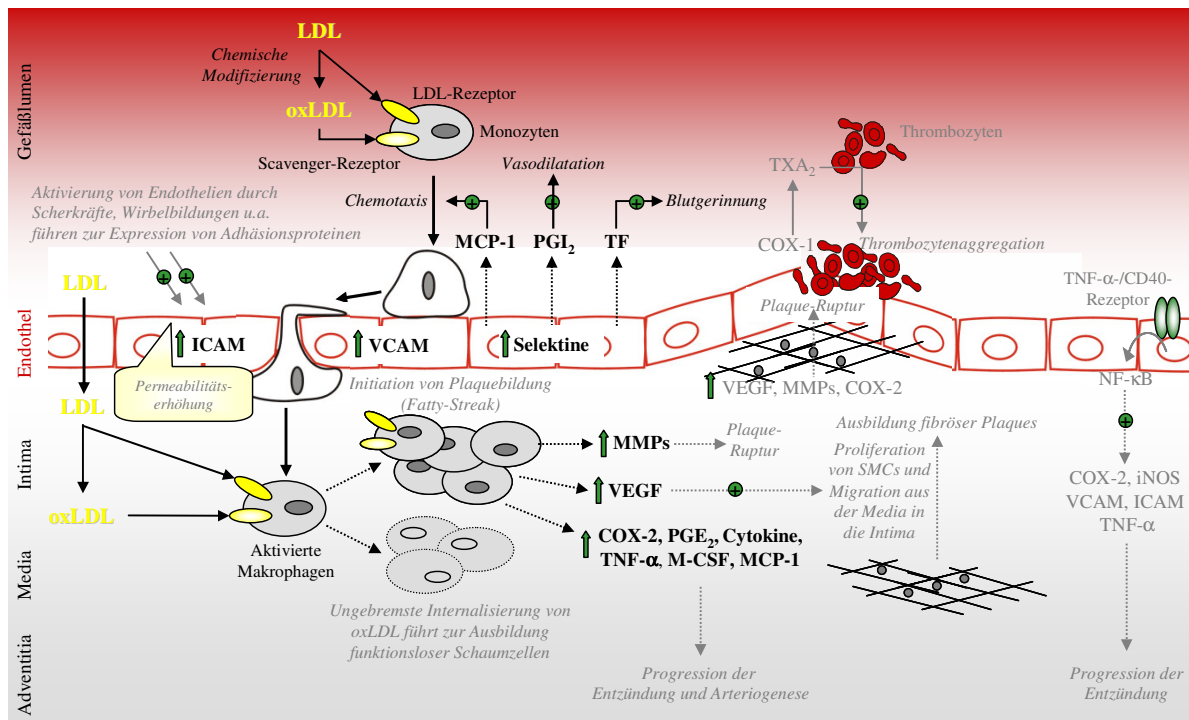


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Pathogenese der Arteriosklerose. Hohe Konzentrationen von LDL-Cholesterin sowie eine Vielzahl anderer Risikofaktoren (Scherkräfte, Wirbelbildungen an Gefäßverzweigungsstellen oder in Folge postoperativer Traumen) tragen zu der Einleitung von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen bei. Besondere Bedeutung kommt hierbei den Makrophagen zu, die LDL und das chemisch modifizierte oxLDL über spezifische Rezeptoren internalisieren können. Eine Endothelschädigung geht mit der Permeabilitäts-erhöhung und Aktivierung einher, wobei Adhäsionsproteine, Cytokine, Gewebefaktoren und COX-2 exprimiert werden. Die Folge ist die Einwanderung von Lipoproteinen und die Einleitung der Chemotaxis, Adhäsion und Penetration von Monozyten. Monozyten reifen innerhalb der Intima zu aktivierten Makrophagen und wandeln sich nach und nach zu Schaumzellen durch Aufnahme von LDL-Partikeln, führen zu Aufquellungen der subendothelialen Region und schließlich zur Ausbildung früher Läsionen. Aktivierte Makrophagen exprimieren ihrerseits eine Vielzahl entzündungsrelevanter Proteine, welche den Prozess der entzündlichen Gefäßveränderung weiter stimulieren und die Migration von SMCs aus der Media in die Intima zur Folge hat, was zur Verdickung der Gefäßwand und zum Elastizitätsverlust führt. Die erhöhte Expression von MMPs in Makrophagen und SMCs erhöht das Risiko einer Plaque-Ruptur. Gefäßschädigungen stimulieren die Einleitung der Blutgerinnung, welches das Risiko für prothrombotische Ereignisse erhöht. NSAIDs könnten durch Inhibition der COX-2-Aktivität den Prozess der Arteriosklerose beeinflussen. (Abkürzungen: LDL: low density Lipoprotein; oxLDL: oxidiertes LDL; ICAM: intracellular adhesion molecule; VCAM: vascular cell adhesion molecule; COX: Cyclooxygenase; PGE₂: Prostaglandin E₂; TXA₂: Thromboxan A₂; TNF_α: Tumornekrosefaktor alpha; PDGF: platelet derived growth factor; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; M-CSF: monocyte colony stimulating factor-1; VEGF: vascular endothelial growth factor; TF: tissue factor; MMPs: Matrix-Metalloproteinasen; IL: Interleukin; CD40: cluster of differentiation 40; NF-κB p50 und NF-κB p65: nuclear factor kappa B mit den Untereinheiten p50 und p65; SMCs: smooth muscle cells; Anmerkung: grüne Pfeile zeigen eine Induktion der Proteinexpression an; grüne Kreise mit + kennzeichnen die Aktivierung einer Reaktion.)

1.2 Nichtsteroidale Antiphlogistika

Zur Therapie von Schmerzen, fieberhaften und entzündlichen Erkrankungen hat der medikamentöse Angriff am Prostanoid-Stoffwechselweg durch Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs; *non-steroidal anti-inflammatory drugs*) große medizinische Bedeutung erlangt. Sie besitzen als Gruppe der nicht-opioiden Analgetika ein breites Wirkungsspektrum, haben daher einen großen Anwendungsbereich und gehören zu den am meisten verwendeten Arzneimitteln. In der Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Osteoarthrose und der rheumatoiden Arthritis gehören NSAIDs zu den Medikamenten der ersten Wahl. Die analgetischen, antiphlogistischen und antipyretischen Wirkungen, die durch NSAIDs erzielt werden, sind auf eine Hemmung der Cyclooxygenase (COX)-Aktivität zurückzuführen (Vane 1971), die Arachidonsäure in Prostanoiden biotransformieren.

1.2.1 Die Cyclooxygenasen

Seit den 90er Jahren werden zwei Isoformen der COX, die COX-1 und die COX-2, unterschieden, welche hauptsächlich in ihrer gewebespezifischen Expression und ihren physiologischen und pathophysiologischen Funktionen verschieden sind (Fu et al. 1990; Vane et al. 1998). Die COX-1 wird als „house-keeping-gene“ in nahezu allen Gewebetypen und Zellen konstitutiv exprimiert und vermittelt die Synthese von physiologisch aktiven Prostaglandinen (PGs), insbesondere von PGE₂ in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes (Kargman et al. 1996; Seibert et al. 1997) und in der Niere sowie von Thromboxan (TX) A₂ in Thrombozyten. Die COX-2 ist hauptsächlich als induzierbares Enzym an pathophysiologischen Prozessen wie Entzündungs- und Schmerzreaktionen beteiligt (Dubois et al. 1998). In nahezu allen Zelltypen ist eine COX-2-Expression durch verschiedene Faktoren wie bakterielles Lipopolysaccharid, Cytokine wie IL-1, IL-2 und TNF α innerhalb weniger Stunden induzierbar (Appleby et al. 1994; McAdam et al. 2000). Eine konstitutive COX-2-Expression konnte in der *Macula densa* der Niere (Harris et al. 1994; Nantel et al. 1999) und der grauen Substanz des Rückenmarkes (Goppelt-Strube et al. 1997) nachgewiesen werden. Eine adaptierte Induktion der COX-2-Expression erfüllt zusätzlich im Wundheilungsprozess eine wichtige Funktion bei der Abheilung von Magengeschwüren (Eckmann et al. 1997). Beide Isoformen der COX sind bifunktionale, membranständige Enzyme des endoplasmatischen Retikulums, die COX-2 ist zusätzlich in der Kernmembran lokalisiert, und beide COX-Isoformen sind sich strukturell ähnlich und besitzen ein gleiches Molekulargewicht von ca. 71 kD (Morita et al. 1995; Kurumbail et al. 1996). Traditionelle NSAIDs inhibieren beide Isoformen, indem sie das aktive Zentrum der Cyclooxygenase reversibel oder irreversibel verändern oder indem sie Arachidonsäure als Substrat kompetitiv verdrängen. Von allen NSAIDs, die medizinisch zur Anwendung kommen, verändert nur Acetylsalicylsäure die COX-1

und die COX-2 durch eine irreversible Acetylierung an Hydroxylgruppen bestimmter Serine. Im aktiven Zentrum der COX-1 wird der Serinrest Ser-530 acetyliert, was in Thrombozyten zu einer irreversiblen Hemmung der Thrombozytenaggregation führt, da sie keinen Zellkern besitzen und das Enzym nicht regenerieren können. Die Acetylierung der COX-2 erfolgt an der Hydroxylgruppe des Serinrestes Ser-516 und resultiert in einer teilweisen Hemmung, wobei die Peroxidaseaktivität erhalten bleibt und es zu einer Oxidation von Arachidonsäure zu 15-HETE (15-Hydroxyeicosatetraensäure) kommt (Lecomte et al. 1994; Mancini et al. 1994). Andere NSAIDs wie Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen inhibieren die Aktivität der COX-1 und COX-2 und treten mit Arachidonsäure durch kompetitive Hemmung um die Bindungstasche der Enzyme in Konkurrenz. Die traditionellen NSAIDs unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Produktivität, eine effiziente Bindung mit dem aktiven Zentrum einzugehen und ihrer Schnelligkeit aus dem COX-Kanal wieder herauszukommen (Selinsky et al. 2001). Diclofenac, ein Essigsäure-Derivat, ist ein häufig verwendetes Antiphlogistikum und ein potenter COX-Inhibitor mit geringer Präferenz für die COX-1. Ibuprofen und Naproxen sind Propionsäure-Derivate, die sich in ihrer COX-Selektivität unterscheiden. Ibuprofen wirkt nichtselektiv auf beide COX-Enzyme, während Naproxen präferentiell die COX-1 hemmt (Van Hecken et al. 2000). Erst kürzlich entwickelte COX-2-selektive Inhibitoren (Coxibe) hemmen durch hoch affine Interaktion mit spezifischen Aminosäureresten in der Seitentasche von COX-2 und einer Blockade der Bindungsstelle von Arachidonsäure hauptsächlich die COX-2. Diese Seitentasche fehlt in der COX-1, so dass COX-2-selektive Inhibitoren nur mit sehr niedriger Affinität an die COX-1 binden (Hinz et al. 2002). Die Interaktionen der NSAIDs mit den COX-Isoformen führen zu der Hemmung der COX-Aktivität und damit zu einer verminderten Synthese von Prostanoiden, wodurch Schmerz- und Entzündungsreaktionen reduziert werden.

1.2.2 Der Prostanoid-Stoffwechselweg als Angriffspunkt von NSAIDs

Prostanoide sind wichtige Mediatoren, welche zahlreiche Funktionen erfüllen. Sie sind an der Muskeltonusregulation in Gefäßzellen, Bronchien und Uterus, an der Säuresekretion im Magen, an der Schleimhautintegrität des Magen-Darmtraktes, an der Wasser- und Natriumretention in der Niere sowie an der Einleitung der Thrombozytenaggregation und an pathophysiologischen Prozessen wie Schmerz-, Fieber- und Entzündungsreaktionen beteiligt. Physiologisch und pathophysiologisch besonders bedeutsam sind die Prostaglandine PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, Prostacyclin (PGI₂; ein bicyclisches Prostaglandin) und TXA₂. Abgeleitet werden Prostanoide bspw. aus der mehrfach-ungesättigten omega-6-C₂₀-Fettsäure Arachidonsäure (AA), welche in die Phospholipide der Zellmembranen eingebaut ist. Anders als andere Mediatoren wie Histamin oder Serotonin, die vesikulär gespeichert werden, entstehen Prostanoide bei Bedarf aus ihrer Vorstufe (Abb. 1.3). Die Synthese der Prostanoide beginnt mit der Freisetzung der Arachidonsäure (AA; *all-cis*-5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure) durch die Phospholipase A₂ (PLA₂), welche durch physiologische extrazelluläre

Stimuli wie Cytokine, Histamin, Lipopolysaccharid (LPS) oder auch zellschädigende Noxen aktiviert wird. Die anschließende Biotransformation erfolgt in einer zweistufigen Reaktion durch die bifunktionalen Cyclooxygenasen, welche Arachidonsäure durch ihre Cyclooxygenase-Aktivität in das instabile, zyklische Endoperoxid Prostaglandin G₂ (PGG₂) umsetzen und dieses durch ihre Peroxidaseaktivität in die alkoholische Verbindung Hydroxyendoperoxid Prostaglandin H₂ (PGH₂) oxidieren. Als letzter Schritt in der Prostanoid-Biosynthese erfolgt die Umwandlung von PGH₂ durch gewebespezifische Synthesen.

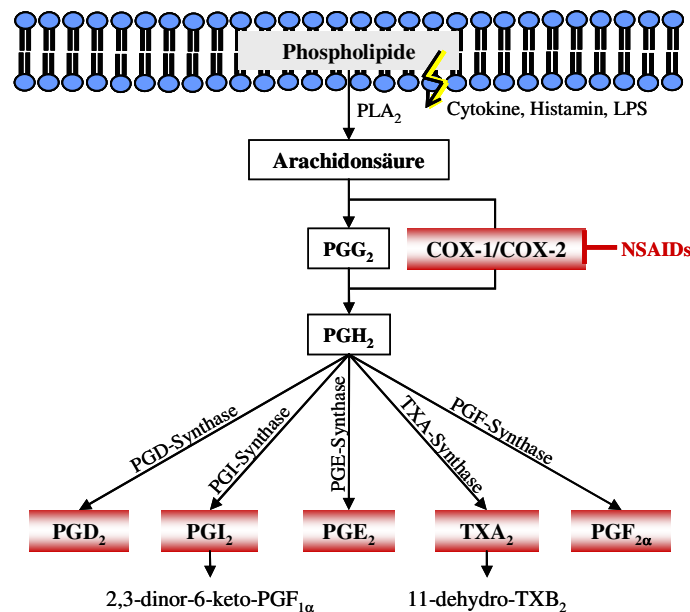


Abbildung 1.3: Biosynthese von Prostanoiden. Durch Cytokine, Histamin oder LPS (Lipopolysaccharid) erfolgt eine Stimulierung der Phospholipase A₂ (PLA₂), welche aus zellmembranständigen Phospholipiden Arachidonsäure (AA) freisetzt. Diese wird von Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) über Prostaglandin G₂ (PGG₂) in Prostaglandin H₂ (PGH₂) biotransformiert. Durch gewebspezifische Synthesen erfolgt die Bildung von Prostaglandinen (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂) und Thromboxan A₂ (TXA₂). PGI₂ und TXA₂ werden im Gewebe in ihre stabilen Metabolite 2,3-dehydro-6-keto-PGF_{1α} bzw. 11-dehydro-TXB₂ umgewandelt. Die Aktivität der COX wird durch NSAIDs gehemmt.

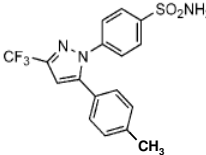
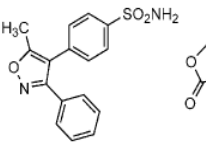
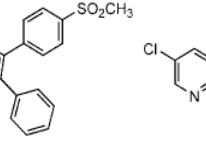
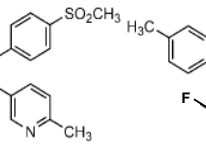
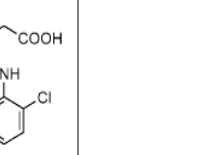
Die Effekte der Prostanoiden werden hauptsächlich durch extrazelluläre G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt und wirken direkt auf die synthetisierende Zelle oder auf umliegendes Gewebe (Forman et al. 1996). Dabei erfüllen die einzelnen Prostanoiden eine Vielzahl verschiedener physiologischer Funktionen und besitzen unterschiedliche pathophysiologische Bedeutungen. PGE₂ bspw. erfüllt eine Vielzahl von gewebspezifischen physiologischen Funktionen und hemmt im Magen die Magensaft- und Bikarbonatsekretion der Mukosa, steigert die Mukosadurchblutung und wirkt daher Ulzerationen protektiv entgegen (Takeuchi et al. 1999). In der Niere ist PGE₂ an der Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion beteiligt und reguliert die Reninausschüttung, den renalen Blutfluss und damit die Durchblutung der Niere, die glomeruläre Filtrationsrate und die Salz- sowie Wasserretention (Freeman et al. 1984; Wolf et al. 1999). In der Schwangerschaft führt PGE₂ zu

verstärkter Uteruskontraktion und kann pharmakologisch zur vorübergehenden Offenhaltung des Ductus arteriosus Botalli zur Steigerung der pulmonalen Durchblutung bei Neugeborenen eingesetzt werden (Loftin et al. 2001). Pathophysiologisch ist PGE₂ an der Einleitung und Verstärkung von Entzündungs- und Schmerzprozessen beteiligt. Dabei wird es in entzündlichem sowie in verletztem Gewebe und im Rückenmark vermehrt synthetisiert und bewirkt eine Ausschüttung von proinflammatorischen Stimuli sowie eine Sensibilisierung von Nozizeptoren (Beiche et al. 1996). Im Hypothalamus erfolgt eine PGE₂-Synthese, die mit der Modulation von Fieberprozessen in Verbindung gebracht wird (Cao et al. 1998; Matsumura et al. 1998). PGE₂ wird ebenfalls von vaskulären Endothelzellen, die durch verschiedene Stimuli aktiviert werden, synthetisiert, erhöht die vaskuläre Permeabilität und wirkt vasodilatierend, wodurch eine Blutdrucksenkung hervorgerufen wird. Eine gegenläufige Wirkung erzielt PGE₂ in der glatten Muskulatur von Bronchien und des Gastrointestinaltrakts, wo eine Kontraktion erreicht wird. PGD₂ wird hauptsächlich in Nerven- und Mastzellen synthetisiert und bewirkt eine Vasodilatation und Vasokonstriktion sowie antiinflammatorische Effekte (Stenson et al. 1983). Im Gastrointestinaltrakt und Uterus wird durch PGD₂ eine Erschlaffung der glatten Muskulatur und in den Bronchien eine Vasokonstriktion hervorgerufen. Es besitzt thrombotisch wichtige Eigenschaften, durch Regulation der Thrombozytenaggregation. PGF_{2α} hat vasokonstriktorische Eigenschaften und erhöht den Blutdruck. Hauptsächlich wird PGF_{2α} im Uterus synthetisiert und ist an der Ovulation und Luteolyse beteiligt (Sugimoto et al. 1997), bewirkt eine Kontraktionen der glatten Muskulatur im Uterus und hat dadurch besondere Bedeutung für Geburt und Nachgeburtsabgang (Allport et al. 2001). In der glatten Muskulatur von Bronchien und Gastrointestinaltrakt wird ebenfalls eine Kontraktion verursacht. Die Synthese von PGI₂ findet unter anderem in Gefäßendothelzellen statt, wo es als Gegenspieler des TXA₂ antithrombotisch und vasodilatierend wirkt und für die Erhaltung des homöostatischen COX-Gleichgewichts bedeutsam ist (Moncada et al. 1976; FitzGerald et al. 1983). In der Magenschleimhaut sorgt PGI₂ für eine ausreichende Blut- und damit Nährstoffversorgung (Konturek et al. 1980). Es hat eine geringe Halbwertszeit und wird innerhalb von Minuten zu dem stabilen Metaboliten 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} biotransformiert, welcher im Urin nachweisbar ist (Whittaker et al. 1976; Ylikorkala et al. 1985). TXA₂ wird in Thrombozyten ausschließlich über die COX-1-Aktivität synthetisiert und bewirkt als Aktivator der Blutplättchen eine Thrombozytenaggregation und besitzt dadurch prothrombotische Eigenschaften. TXA₂ wird innerhalb von Sekunden in den stabilen Metaboliten 11-dehydro-TXB₂ biotransformiert, welcher im Urin nachgewiesen werden kann (Needleman et al. 1976; Ciabattoni et al. 1990).

1.2.3 Die Entwicklung selektiver COX-2-Inhibitoren

Die Behandlung mit NSAIDs führt häufig zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wobei hauptsächlich gastrointestinale Störungen wie Ulzerationen, Perforationen, Blutungen, Blutgerinnungsstörungen, Funktionsstörungen der Nieren und eine Abnahme der Uterusmotilität auftreten (Simon 1996; Goppelt-Struebe et al. 1997; de Leval et al. 2000). Patienten, die aufgrund chronischer Entzündungskrankheiten wie rheumatoider Arthritis oder Osteoarthritis auf eine Langzeittherapie mit NSAIDs angewiesen sind, waren von den beschriebenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen, die teilweise tödlich verliefen, am stärksten betroffen (Armstrong et al. 1987; Singh et al. 1999). In den Vereinigten Staaten von Amerika sterben jährlich 16500 Patienten, die mit NSAIDs behandelt werden, an gastrointestinalen Erkrankungen (Singh et al. 1999; Wolfe et al. 1999). Das Auftreten der Nebenwirkungen wurde zum Großteil auf die Hemmung der COX-1-abhängigen physiologischen Prostaglandin-Synthese durch traditionelle NSAIDs zurückgeführt. Die Entwicklung von selektiven COX-2-Inhibitoren (Coxibe) erhielt daher zur medikamentösen Langzeittherapie von Schmerz- und Entzündungskrankheiten eine besondere klinische Relevanz. Nach tierexperimentellen und ersten klinischen Studien war man davon ausgegangen, dass die COX-2-selektiven Inhibitoren aufgrund verminderter gastrointestinaler Risiken sicherer aber genauso wirksam wie die bisher verwendeten NSAIDs sind und damit eine Verbesserung bezüglich der Behandlung von chronischen Entzündungserkrankungen darstellen. Coxibe zeigten in klinischen Studien hinsichtlich der Schmerzlinderung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis ein vergleichbares Wirkspektrum wie herkömmliche traditionelle NSAIDs (Bombardier et al. 2000; Bingham 2002) aber weniger gastrointestinale Nebenwirkungen (Chan et al. 1995; Silverstein et al. 2000; Schnitzer et al. 2004). Gegenwärtig sind in Deutschland zur Behandlung von chronischen Schmerzen und entzündlichen Systemerkrankungen die selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib (Celebrex[®]) seit Mai 2000 und Etoricoxib (Arcoxia[®]) seit September 2004 zugelassen und auf dem Markt verfügbar. Ein weiterer, stärker COX-2-selektiv wirkender COX-2-Inhibitor ist Lumiracoxib, das sich in Deutschland zurzeit in der klinischen Prüfung befindet. In Großbritannien ist Lumiracoxib (Prexige[®]) zur Behandlung der Arthrose, von rheumatoider Arthritis und Dysmenorrhö schon zugelassen. Einen Überblick über alle bisher entwickelten Coxibe, die sich strukturell, in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften und ihrer COX-2-Selektivität unterscheiden, zeigt Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1: Pharmakologische und pharmakokinetische Eigenschaften von COX-2-selektiven Inhibitoren.

Substanz: Handelsname:	Celecoxib Celebrex®	Valdecoxib Bextra®**	Rofecoxib VIOXX®***	Etoricoxib Arcoxia®	Lumiracoxib Prexige(G)®#
Struktur:	Sulfonamide		Methylsulfonsäuren		Arylessigsäure
					
Hersteller:	Pfizer	Pfizer	Merck	Merck	Novartis
$\frac{IC_{50} COX-1}{IC_{50} COX-2}$ ##	7,6	30	35	106	~515
orale Bioverfügbarkeit:	40-80 %	ca. 80 %	ca. 90 %	ca. 100%	ca. 100%
Proteinbindung:	97 %	98 %	85 %	92 %	>99 %
Halbwertszeit $t_{1/2}$ [h]:	8-11	ca. 8	ca. 17	20-30	3-6
Tagesdosis bei RA* [mg]:	200-400	10	12,5-25	90	100-200
Indikationsgebiet (laut Zulassung):	Schmerzen, OA, RA (2000); FAP (2004)	Schmerzen, OA, RA (2004)	OA, RA, akute Gichtarthritis (1999)	Schmerzen, OA, RA (2004)	Schmerzen, OA, RA (2003)

Abkürzungen: FAP: familiäre adenomatöse Polyposis, OA: Osteoarthritis, RA: Rheumatoide Arthritis; **Anmerkungen:** * mittlere empfohlene Tagesdosis zur Behandlung der RA; ** Valdecoxib wurde im April 2005 vom Markt genommen, *** Rofecoxib wurde im September 2004 vom Markt genommen; # Lumiracoxib ist zurzeit nur in Großbritannien zugelassen; ## Das IC_{50} -Verhältnis und damit die COX-2-Selektivität jeder Substanz wurde in humanen *in vitro*-Vollblut-Assays ermittelt (nach Riendeau). **Literaturverweis:** (Steinbach et al. 2000; Riendeau et al. 2001; Burian et al. 2003; Esser et al. 2005)

1.2.4 Das Nebenwirkungsprofil von Coxiben

Obwohl die gastrointestinalen Nebenwirkungen der traditionellen NSAIDs bei den meisten COX-2-selektiven Inhibitoren reduziert waren, erwiesen sich die Coxibe in klinischen und epidemiologischen Studien sowie in Einzelfallberichten jedoch nicht als nebenwirkungsfrei. Wie bei traditionellen, nichtselektiven NSAIDs wurden auch bei Coxiben renale Dysfunktionen beschrieben und es trat eine Verringerung der glomerulären Filtrationsrate und eine gesteigerte Wasser- und Natriumretention auf (Catella-Lawson et al. 1999; Rossat et al. 1999), die zu peripheren Ödembildungen und zu einer Zunahme des intravasalen Blutvolumens führte. Es wird angenommen, dass die dadurch bedingte Vasokonstriktion der peripheren Widerstandsgefäße eine Hypertonie bewirkt (Whelton et al. 2001; Whelton et al. 2002) und welche als letzte Konsequenz auf die Behandlung mit Coxiben das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Herzrhythmusstörungen, Herzinfarkten oder Schlaganfällen erhöhen könnte (Solomon et al. 2002; Graham et al. 2005; Johnsen et al. 2005). Zusätzlich führten

einige COX-2-selektiven Inhibitoren zu der Entwicklung schwerer Hautreaktionen, die unter Valdecoxib teilweise lebensbedrohlich verliefen (Deutsches Ärzteblatt, Jg. 102, Heft 15, 2005). Die Arzneimittelbehörden empfahlen aufgrund dieser unerwünschten Wirkungen auf das renale und kardiovaskuläre System, Anwendungsbeschränkungen in die Packungsbeilagen der Coxibe aufzunehmen und am Patienten eine individuelle Nutzen-Risikoabschätzung durchzuführen.

Im September 2004 wurde Rofecoxib von der Herstellerfirma weltweit freiwillig vom Markt genommen, nachdem in einer klinischen Placebo-kontrollierten Studie (APPROVe-Studie; *Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX Trial*) als Zwischenergebnis bei Patienten mit kolorektalen Adenomen unter Rofecoxib ein Anstieg des kardiovaskulären Risikos gegenüber Placebo zu verzeichnen war (Bresalier et al. 2005). Rofecoxib sollte in der APPROVe-Studie über einen Zeitraum von 3 Jahren an Patienten mit Kolonkrebs zur Überprüfung des Rezidivs adenomatöser Polypen untersucht werden. Schon früher gab es Hinweise auf das mögliche Auftreten kardiovaskulärer Effekte wie eine erhöhte Rate für Myokardinfarkte, die durch selektive COX-2-Inhibition hervorgerufen werden sollen. In der VIGOR-Studie (*VIOXX Gastrointestinal Outcomes Research Study*), die zur Überprüfung der gastrointestinalen Toxizität von Rofecoxib durchgeführt worden war, wurde bei Patienten mit rheumatoider Arthritis unter Rofecoxib im Vergleich zu Naproxen und Placebo eine deutliche Erhöhung der Rate für kardiovaskuläre thrombotische Ereignisse nach neunmonatiger Behandlung beobachtet (Bombardier et al. 2000; Mukherjee et al. 2001). Dieser Effekt war zunächst einer kardioprotektiven Wirkung des Naproxens zugeschrieben worden (Bombardier et al. 2000), was aber klinisch nicht nachgewiesen werden konnte (Juni et al. 2004). In der Placebo-kontrollierten Alzheimer Präventionsstudie ADAPT (*Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial*) wurde an Patienten mit familiärer Prädisposition für Morbus Alzheimer Erkrankung die Wirksamkeit von Celecoxib im Vergleich zu Naproxen überprüft. Dabei zeigte sich auch für das nichtselektive NSAID Naproxen ein erhöhtes kardiovaskuläres Potential im Vergleich zu Celecoxib oder Placebo (Johnsen et al. 2005). Seitdem wurde die Sicherheit nicht nur von selektiven COX-2-Inhibitoren sondern von allen Medikamenten dieser Substanzklasse bezüglich des Herz-Kreislaufsystems diskutiert. Die Frage, ob das Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse alleine durch Coxibe (Klasseneffekt) oder generell durch alle NSAIDs (Gruppeneffekt) erhöht wird, bleibt bisher unbeantwortet. Um die Frage zu klären wurden Ergebnisse aus weiteren Placebo-kontrollierten klinischen Studien rückblickend ausgewertet. Die zu betrachtenden Endpunkte, die durch die Medikamente ausgelöst werden sollten, wurden von der APTC (*Anti-platelet Trialists' Collaboration*) festgelegt. Dabei wurde das Auftreten von plötzlichem Herztod, nicht-tödlich verlaufendem Herzinfarkt und Hirnschlag als schwerwiegender kardiovaskulärer Effekt definiert (Matchaba et al. 2005). Zur Übersicht ist in Tabelle 1.2 das Design einzelner klinischer Studien dargestellt, die zur Beleuchtung des kardiovaskulären Risikos selektiver COX-2-Inhibitoren dienen und im Folgenden kurz beschrieben werden.

Tabelle 1.2: Studiendesign der klinischen Studien zur Sicherheitsprüfung von nichtselektiven NSAIDs und selektiven COX-2-Inhibitoren.

Studie	Studienziel	Substanzen	Aspirin	Patientenkollektiv
VIGOR	GI-Toxizität	Rofecoxib 50 mg Naproxen 2x500 mg	nein	~8000 mit RA
APPROVe	Rezidiv adenomatöser Polypen	Rofecoxib 25 mg Placebo	erlaubt	~2600 mit Kolonkarzinom
ADAPT	Prävention Neurodegenerativer Erkrankung	Celecoxib 2x200 mg Naproxen 2x220 mg Placebo	erlaubt	~2500 mit familiärer Morbus Alzheimer
CLASS	GI-Toxizität	Celecoxib 2x400 mg Ibuprofen 3x800 mg Diclofenac 2x75 mg	erlaubt (< 325 mg)	~8000 mit OA oder RA
PreSAP	Prävention kolorektaler adenomatöser Polypen	Celecoxib 400 mg Placebo	erlaubt	~1500 mit Kolonkarzinom
APC	Prävention kolorektaler adenomatöser Polypen	Celecoxib 2x400 mg, Celecoxib 2x200 mg, Placebo	erlaubt	~2000 mit Kolonkarzinom
TARGET	GI- und kardiovaskuläre Toxizität	Lumiracoxib 400 mg Naproxen 2x500 mg Ibuprofen 3x800 mg	erlaubt/ nein	~18000 mit OA

Anmerkung: In einigen Studien war das kardiovaskuläre Risiko unter der Einnahme von Coxiben (grau unterlegt) oder einem traditionellen NSAID (dunkelgrau unterlegt) erhöht. **Abkürzungen:** ADAPT: *Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial*; APC: *Adenoma Prevention with Celecoxib Trial*; APPROVe: *Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX Trial*; CLASS: *Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*; GI: Gastrointestinaltrakt; OA: Osteoarthritis; PreSAP: *Prevention of Spontaneous Adenomatous Polyps Trial*; RA: Rheumatoide Arthritis; TARGET: *Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial*; VIGOR: *VIOXX Gastrointestinal Outcomes Research Study*.

Celecoxib ist in Europa seit Mai 2000 von der Europäischen Arzneimittelbehörde zur Behandlung von chronischen Schmerz- und Entzündungskrankheiten zugelassen und wurde seither in verschiedenen Studien untersucht. Die Sicherheit von Celecoxib gegenüber Ibuprofen und Diclofenac bezüglich der gastrointestinalen Toxizität war in der CLASS-Studie (*Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*) an Patienten mit Osteoarthritis oder Rheumatoider Arthritis untersucht worden. Nach einem sechsmonatigen Untersuchungszeitraum wurde unter Celecoxib im Vergleich zu Ibuprofen und Diclofenac keine signifikante Risikoerhöhung für kardiovaskuläre Ereignisse festgestellt (Silverstein et al. 2000). Dieser Effekt war möglicherweise auf die erlaubte Komedikation von niedrig-dosiertem Aspirin zur kardiovaskulären Prophylaxe (≤ 325 mg/Tag) zurückzuführen. In zwei weiteren Placebo-kontrollierten Studien war Celecoxib an Patienten mit Kolonkrebs bezüglich der Wirksamkeit und Sicherheit bei der Prävention des Rezidivs adenomatöser Polypen untersucht worden. Die APC-Studie (*Adenoma Prevention with Celecoxib Trial*) wurde jedoch vorzeitig abgebrochen, nachdem in den mit Celecoxib behandelten Gruppen mehrere Todesfälle aufgrund kardiovaskulärer Effekte aufgetreten waren (Solomon et al. 2005). Dagegen war in der PreSAP-Studie (*Prevention of Spontaneous Adenomatous Polyps*) (Arber et al. 2006) unter Celecoxib kein signifikanter Anstieg des

kardiovaskulären Risikos zu verzeichnen (Solomon et al. 2006). Möglicherweise verursachte in der APC-Studie die zweimalige Gabe von Celecoxib eine gleichförmige, anhaltende COX-2-Inhibition und führte dadurch eher zu kardiovaskulären Effekten als die Einmaldosierung von Celecoxib in der PreSAP-Studie. Als restriktive Maßnahme wurden die Produktinformationen für Celecoxib geändert und Gegenanzeigen sowie Warnhinweise in die Packungsbeilagen aufgenommen, um das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse einzuschränken. Zur Überprüfung der gastrointestinalen und kardiovaskulären Toxizität von Lumiracoxib gegenüber Ibuprofen und Naproxen wurde die TARGET-Studie (*Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial*) an Patienten mit Osteoarthritis durchgeführt. Nach einer 12-monatigen Behandlungsdauer waren bezüglich der kardiovaskulären Sicherheit unter Lumiracoxib im Vergleich zu Ibuprofen und Naproxen keine statistisch signifikanten Unterschiede aufgetreten (Farkouh et al. 2004; Hawkey et al. 2004; Schnitzer et al. 2004). Für die Überprüfung der kardiovaskulären Sicherheit von Valdecoxib sind keine Daten aus Langzeit-Studien verfügbar. Jedoch zeigten Ergebnisse aus einer Meta-Analyse (CABG-Studie; *Coronary Artery Bypass Graft*), einen signifikanten Anstieg des Risikos für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse unter Parecoxib/Valdecoxib (Nussmeier et al. 2005). Patienten erhielten nach einer Bypass-Operation gegen postoperative Schmerzen Parecoxib (Prodrug von Valdecoxib, das als einziges Coxib intravenös appliziert werden kann) und/oder Valdecoxib oder Placebo. Im Februar 2005 war Valdecoxib von der Herstellerfirma nach Empfehlung der Europäischen Arzneimittelbehörde aufgrund der kardiovaskulären Problematik vom Markt genommen worden. Das Studiendesign, Patientenkollektiv und das Untersuchungsziel der durchgeführten Studien unterscheiden sich stark voneinander, so dass aus den bisherigen Beobachtungen eine generelle Aussage über die Gefahr für schwerwiegende kardiovaskuläre Komplikationen unter NSAIDs nicht getroffen werden kann. Zum Schutz der Patienten haben die europäischen Arzneimittelbehörden eine Neubewertung aller Coxibe hinsichtlich ihres Potentials erlassen, das Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen zu erhöhen und schwere Hautreaktionen auszulösen.

1.2.5 COX-abhängige und -unabhängige Mechanismen

NSAIDs bewirken eine Vielzahl von molekularbiologischen Veränderungen, die in ihrer Summe zu kardiovaskulären Ereignissen führen könnten. Zunächst war man von einem rein COX-abhängigen Mechanismus ausgegangen, der als Klasseneffekt bezeichnet wird, bei dem eine Verschiebung des homöostatischen COX-1/COX-2-Gleichgewichts erfolgt. Selektive COX-2-Inhibitoren hemmen die COX-2-vermittelte Synthese von vasoprotektivem PGI₂ in vaskulären Endothelzellen, ohne die COX-1-vermittelte prothrombotische TXA₂-Synthese in Blutplättchen zu beeinflussen. Auf diese Weise könnte das homöostatische COX-Gleichgewicht zugunsten prothrombotischer Effekte verschoben werden (FitzGerald 2003; Fitzgerald 2004). Als Folge würde die Entstehung von Arteriosklerose, die Ausbildung von Thromben, Gefäßverengungen und damit verbunden das Auftreten von Herzinfarkten

begünstigt werden. *In vitro*-Tests zeigten, dass in unstimulierten Endothelzellen vaskuläres PGI₂ vornehmlich über die konstitutive COX-1-Aktivität vermittelt wird (Liou et al. 2000). Eine COX-2-Expression wird jedoch durch Cytokine (Schildknecht et al. 2004), Cholesterin (Smith et al. 2002) und Scherkräfte (Topper et al. 1996; Ogasawara et al. 2001) induziert, so dass in stimuliertem Gewebe die Synthese von vaskulären PGI₂ überwiegend COX-2-vermittelt erfolgt. Diese Induzierbarkeit des COX-2-Enzyms erklärt die mögliche Relevanz einer Verschiebung des homöostatischen Gleichgewichts bei Langzeitbehandlungen mit selektiven COX-2-Inhibitoren. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, die eine Vielzahl von Risikofaktoren sowie eine induzierte vaskuläre COX-2-Expression aufzeigen, könnte bei einer Langzeittherapie mit selektiven COX-2-Inhibitoren eine Verschiebung des Gleichgewichts von PGI₂ und TXA₂ zugunsten prothrombotischer Effekte bedeutsam sein. Diese wäre jedoch alleine betrachtet nicht ausreichend, die kardiovaskuläre Problematik zu erklären.

Da in klinischen Studien nicht für alle Coxibe das gleiche Nebenwirkungsprofil gezeigt werden konnte und auch unter nichtselektiven NSAIDs kardiovaskuläre Effekte auftraten (Johnsen et al. 2005), wurde auf die Beteiligung COX-unabhängiger Mechanismen geschlossen. Anhand von *in vitro*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Acetylsalicylsäure COX-unabhängig in hohen Dosen die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs; *vascular smooth muscle cells*) durch Induktion einer Zellzyklusblockade inhibiert (Marra et al. 2000) und in ApoE-defizienten Mäusen *in vivo* die Entstehung von Arteriosklerose verminderte (Paul et al. 2000). In *in vitro*-Untersuchungen an glatten Muskelzellen, die durch Ballondilatation oder Stent-Implantation geschädigt wurden, führte Celecoxib zu einer Hemmung der Proliferation und verhinderte die neointimale Hyperplasie (Connolly et al. 2002). In Arterien von Ratten, die zuvor gezielt angioplastisch geschädigt wurden, reduzierte Celecoxib die intimale Verdickung der Gefäßwand, während Acetylsalicylsäure keinen Effekt ausübte. Anhand von proteinbiochemischen Analysen konnte dieser Effekt von Celecoxib auf die vaskulären Zellen einer COX-unabhängigen Inhibierung des Proteinkinase B (PKB/Akt)-Signalweges *in vivo* zugeschrieben werden (Yang et al. 2004). Darüber hinaus verlangsamte Celecoxib den Entzündungsprozess nach Schädigung von vaskulären glatten Muskelzellen, indem die Expression von MCP-1 in Makrophagen inhibiert wurde (Wang et al. 2005) und somit die Einleitung der Arteriosklerose und die Migration sowie Penetration von Monozyten durch die Gefäßwand sowie ihre Transformation in aktivierte Makrophagen verhindert wurde (Boring et al. 1998; Aiello et al. 1999). Zusätzlich inhibierte Celecoxib, nicht aber Rofecoxib, in humanen arteriellen Endothelzellen die Expression des Gewebefaktors TF (*tissue factor*), welcher bei der Blutgerinnung nach Gewebeverletzungen und an arteriosklerotischen Veränderungen maßgeblich beteiligt ist. Dieser Effekt erfolgte COX-unabhängig über die Inhibierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) (Steffel et al. 2005; Steffel et al. 2005). Celecoxib, nicht aber Rofecoxib, führte in humanen Endothelzellen (HUVECs; *human umbilical vein endothelial cells*) konzentrationsabhängig zu einer Hemmung der Proliferation und induzierte dosisabhängig Apoptose (Niederberger et al. 2004). Dieser Mechanismus

könnte dazu führen, dass Celecoxib *in vivo* eine endotheliale Dysfunktion auslösen könnte, welche mit der Einleitung der Arteriogenese in Verbindung gebracht wird (Ross 1999). In einer klinischen Studie führte jedoch eine zweimal tägliche Gabe von 200 mg Celecoxib über einen Zeitraum von zwei Wochen bei Probanden zu einer signifikanten Verkleinerung des Plasmaspiegels an CRP (C-reaktives Protein) und oxLDL (Chenevard et al. 2003). Auf diese Weise könnten selektive COX-2-Inhibitoren mit einem protektiven Potential verbunden werden, da chronische Entzündungen sowie oxidativer Stress reduziert und dadurch die Risiken für kardiovaskuläre Erkrankungen verkleinert werden.

Diese Ergebnisse lassen auf COX-unabhängige Mechanismen schließen, über die NSAIDs unterschiedliche Effekte hervorrufen und sich protektiv oder negativ auf das kardiovaskuläre System auswirken könnten. Zudem lässt sich schlussfolgern, dass substanzspezifische Effekte hervorgerufen werden und diese von der chemischen Struktur der verwendeten COX-Inhibitoren abhängig sind (Zhu et al. 2002). Diese Heterogenität innerhalb der Klasse der Coxibe könnte klinisch relevant insbesondere für Patienten mit Arteriosklerose und rheumatoider Arthritis sein. Welche der *in vitro* gezeigten COX-abhängigen und COX-unabhängigen Effekte *in vivo* favorisiert werden und wie sich diese auf die Effektivität der Arzneimittel auswirken, bleibt bislang ungeklärt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In mehreren klinischen Studien wurde sowohl für einzelne Coxibe (Rofecoxib, Celecoxib) als auch für traditionelle NSAIDs (Naproxen) eine erhöhte Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen festgestellt, wobei die durchgeführten Studien nicht dem direkten Vergleich der Wirkungen von NSAIDs auf das kardiovaskuläre System oder der Arteriogenese dienten. Die Ergebnisse führten zu der Frage, ob die gesamte Medikamentengruppe der NSAIDs oder die Coxibe alleine zur Initiation von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beitragen oder ob substanzspezifische Unterschiede bezüglich der kardiovaskulären Effekte bestehen könnten.

Eine andere Hypothese wurde aus den COX-abhängigen antiphlogistischen Eigenschaften der NSAIDs abgeleitet. Da bekannt ist, dass die Arteriosklerose wie die rheumatoide Arthritis eine entzündliche Erkrankung darstellt und COX-2 in arteriosklerotischen Plaques vermehrt exprimiert wird, könnte eine selektive COX-2-Inhibition einen positiven Effekt auf das Herz-Kreislauf-System ausüben. Daten aus *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen lieferten Hinweise, dass durch NSAIDs sowohl negative als auch positive Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System erzielt wurden. Die grundsätzliche Frage, ob NSAIDs eine pro- oder antiatherogene Wirkung oder sogar eine Remission der arteriosklerotischen Erkrankung *in vivo* erzielen, ist derzeit nicht geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, Effekte der selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib und des nichtselektiven NSAIDs Naproxen auf die Entstehung und Progression der Arteriosklerose *in vivo* mit Hilfe des ApoE knock-out Mausmodells zu untersuchen. Aufgrund ihrer genetischen Disposition entwickeln diese Mäuse nach Gabe einer fettreichen Diät in kurzer Zeit arteriosklerotische Plaques. Die Größe dieser atherogenen Läsionen sowie die Expression proinflammatorischer Proteine in den Plaques, insbesondere von COX-2, wurden bei NSAIDs-behandelten ApoE-defizienten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen gemessen. Darüber hinaus wurden die Blutfettwerte sowie die Expression verschiedener, in der Cholesterinbiosynthese wichtiger Enzyme analysiert und verglichen. Die Ergebnisse sollten neue Erkenntnisse darüber liefern, welchen direkten Einfluss die untersuchten Substanzen auf das Herz-Kreislauf-System besitzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Prüfsubstanzen

Celecoxib wurde als 100 mg Hartkapseln von der Firma Pfizer bezogen. Die Gebrauchslösung wurde einmal wöchentlich als Suspension mit einer Konzentration von 100 mg/5 ml Wasser hergestellt, in dem die Hartkapseln geöffnet und der Inhalt in Wasser suspendiert wurde. Rofecoxib wurde als eine Sorbitol-Lösung mit der Konzentration von 25 mg/5 ml von der Herstellerfirma Merck bezogen und den Versuchstieren verabreicht. Die Gebrauchslösung von Naproxen wurde hergestellt, indem 40 mg Naproxen in 5 ml Wasser mit 10 % Erdnussöl und 1 % Tween suspendiert wurde. Alle Gebrauchslösungen wurden bei 4 °C gelagert und einmal wöchentlich erneuert.

Wirkstoff, Name/Firma:	Ansatz der Suspensionen:	Indikationsgruppe:
Celecoxib, Celebrex [®] , Pfizer	20 mg/ml Celecoxib in H ₂ O	selektiver COX-2 Inhibitor
Rofecoxib, VIOXX [®] , Merck	5 mg/ml Rofecoxib in Sorbitol-Lösung	selektiver COX-2 Inhibitor
Naproxen, Sigma	8 mg/ml Naproxen in H ₂ O 10 % Erdnussöl 1 % Tween [®] 20	nichtselektiver COX-Inhibitor mit COX-1-Präferenz

2.1.2 Antikörper gegen atherogene Markerproteine

Name (alternative Bezeichnung):	Zelluläre Expression bspw. in:
CD40 (TNF Rezeptor 5)	Makrophagen, Endothelzellen und VSMCs
CD54 (ICAM-1)	aktivierte T- und B-Zellen, Monozyten und Endothelzellen
COX-1	ubiquitär und konstitutiv exprimiert in Magenschleimhaut, Thrombozyten und Endothelzellen
COX-2	konstitutiv exprimiert in Niere und Gehirnzellen; induzierbar in fast allen Zelltypen, wie Endothelzellen, Makrophagen, glatte Muskelzellen u.a.
NF-κB p50 und NF-κB p65	ubiquitär in kernhaltigen Zellen
VEGF	aktivierte Makrophagen, Gefäßendothel, glatte Muskelzellen
PGI ₂ -S	Gefäßendothel

Die Antikörper gegen COX-1, COX-2 (Cayman Chemical; Ann Arbor, USA), PGI₂-S, VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg), NF-κB p50 und NF-κB p65 (Dianova, Hamburg) wurden kommerziell erworben. Die übrigen Antikörper wurden freundlicherweise von der Firma MelTec (MelTec GmbH & Co. KG, Magdeburg) zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller, Ort
Agarose NEE0	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumthiocyanat	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
APS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Borsäure	Merck KgaA, Darmstadt
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt
CHAPS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt
Celecoxib	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Coomassie brillant blue G-250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DAPI	AppliChem GmbH, Darmstadt
1kb plus DNA-Standard	Invitrogen, GmbH, Karlsruhe
D(+)-Glucose	Merck KgaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
DNA-Größenstandard (1 kb plus DNA-Ladder)	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Merck KgaA, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
EDTA (Idranal [®] III)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Eindeckelmedium	Dako Cytomation AG, Zug, Schweiz
Eosin-S	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Erdnussöl	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Essigsäure 100 %	Merck KgaA, Darmstadt
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fast-Green-Lösung	Merck KgaA, Darmstadt
Ficoll [®] 400	Serva, Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Fluoromount	Serva, Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Gefriermedium	Jung, Leica Microsystems, Bensheim
Glucose-6-Phosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Glycerol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Heparin-Natrium (Liquemin [®] N 25000)	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
¹⁴ C-HMG-CoA	Amersham Pharmacia Biotech, USA
Isofluran (Forene [®])	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Isopropanol 100 %	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt

Substanz	Hersteller, Ort
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Magermilchpulver (Nutaflor [®])	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt
Methanol 100 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Mevalonolacton	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
³ H-Mevalonolacton	Perkin Elmer
Naproxen	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Natriumacetat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Natriumhydrogencarbonat	Merck KgaA, Darmstadt
Pefabloc [®] SC	Biogene-Alexis GmbH, Grünberg
Phenol „ultrapure“	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Phosphorsäure 85 %	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
PMSF	Perbio Science GmbH, Bonn
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Primersequenzen	BioSpring, Frankfurt am Main
Rofecoxib	MSD Sharp&Dohme GmbH, Haar
Safranin-O	Merck KgaA, Darmstadt
Salzsäure, rauchend	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Scintillationsflüssigkeit	Quicksafe A, Zinsser Analytik, Frankfurt am Main
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Sudan IV	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Sudan B	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
TEMED	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Trichloressigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Merck KgaA, Darmstadt
Tween [®] 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Xylencyanol FF	AppliChem GmbH, Darmstadt

2.1.4 Puffer und Lösungen

Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol FF 15 % Ficoll® 400 in H ₂ O
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung Konzentration im Gel: 0,05 µl/ml
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris/HCl; pH 8 bei RT 1 M Borsäure 25 mM EDTA

Phosphatpuffer

PBS-Puffer	1,7 M NaCl 34 mM KCl 111 mM Na ₂ HPO ₄ ×2 H ₂ O 18,4 mM KH ₂ PO ₄ <i>ad</i> 1 l H ₂ O; pH 7,4 bei 4 °C
------------	--

Extraktion von RNA

RNA-Reagenz (TRI-Reagenz)	800 mM Guanidiniumthiocyanat 400 mM Ammoniumthiocyanat 0,1 mM Natriumacetat 5 % Glycerol <i>ad</i> 1 l H ₂ O 1 kg geschmolzenes Phenol „ultrapure“ <i>ad</i> 2,6 l H ₂ O; <i>q.s.</i> Essigsäure auf pH 5 bei RT
DEPC-H ₂ O	0,1 % Diethylpyrocarbonat <i>ad</i> 1 l H ₂ O über Nacht bei 37 °C rühren und 2x bei 120 °C autoklavieren

Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Bradford-Reagenz	0,01 % Coomassie brilliant blue G-250 0,04 % Ethanol (abs.) 10 % Phosphorsäure (85 %) <i>ad</i> 500 ml H ₂ O
------------------	--

Isolation von Mikrosomen

Homogenisationspuffer (1x)	50 mM Tris pH 7,4 1,15 % KCL 1 mM EDTA 5 mM Glucose <i>ad</i> 50 ml H ₂ O
Lysispuffer	10 ml Homogenisationspuffer 0,1 mM DTT 12 µl/ml PIM-Stocklösung 1 mM PMSF 10 nM Okadainsäure
PIM-Stocklösung	1 mg/ml je Protease-Inhibitor: Aprotinin, Antipain, Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin, Trypsin-Inhibitor

Analyse der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität

Kaliumphosphatpuffer	0,5 M KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Assaypuffer	50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 5 mM DTT 5 mM EDTA 0,2 M KCl <i>ad</i> 1 ml H ₂ O
Substratpuffer (5x)	500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 88 mM Glucose-6-Phosphat 10 mM NADPH-Tetra-Natriumsalz 30 µM DTT
HMG-CoA-Gemisch	0,414 mM HMG-CoA 3,34 mM Kaliumphosphatpuffer pH 5,5 0,7 U/Rkt. Glc-6-Phosphat-Dehydrogenase 0,025 µCi/Rkt. ¹⁴ C-HMG-CoA
Mevalonolacton-Gemisch	40 µl von 1 M Mevalonolacton 0,01 µl. ³ H-Mevalonolacton <i>ad</i> 400 µl H ₂ O

Histologische Färbung

Sudan-Rot-Lösung	50 % Aceton 25 % Ethanol (abs.) 1 % Sudan IV
Fast-Green-Lösung	1 % Farbstoff Fast-Green in H ₂ O
Safranin-O-Lösung	1:9 Verhältnis aus Safranin-O und 3% Essigsäure

Immunhistochemische Fluoreszenz-Färbung

Primär-AK-Lösung	0,5 µg/ml COX-2 (<i>rabbit, anti-mouse</i>) in PBS
Sekundär-AK-Lösung	1:400 Alexa Fluor [®] 488 (<i>goat, anti-rabbit</i>) in Ziegenserum/PBS
Blocking-Reagenz	150 µl Ziegenserum in 10 ml PBS
DAPI-Färbelösung	0,3 µM DAPI in PBS
Sudan-B-Lösung	0,03 % Sudan-Schwarz in 70 % Ethanol

Lasermikrodissektion

Lysispuffer	1 % β-Mercaptoethanol in RLT-Puffer (Qiagen)
-------------	--

Reverse Transkription (c-DNA-Synthese)

RT-Reaktionsansatz	0,5 µg/µl Oligonukleotide (500 µg /ml Oligo (dT) ₁₂₋₁₈) 3 ng RNA 0,5 pmol/µl dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ad 12 µl H ₂ O
„First-Strand“-Pufferlösung	1x „First-Strand“-Puffer 0,01 µmol/µl DTT 40 U/Rkt. RNase-Inhibitor
Reverse Transkriptase	200 U/Rkt. „Super Script [™] II RNase H“- Reverse Transkriptase
RNase-Lösung	2 U/Rkt. <i>E. coli</i> RNaseH

Genotypisierung der ApoE^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse

RT-PCR Reaktionsansatz	1x PCR Puffer 2 mM MgCl ₂ 0,2 mM dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 0,5 µM oIMR 180 0,5 µM oIMR 181 0,5 µM oIMR 182 0,0125 U/µl <i>Taq</i> -DNA-Polymerase 20 ng DNA <i>ad</i> 12,2 µl H ₂ O
------------------------	---

RT-PCR-Analyse von RNA aus Leber zur Analyse des Cholesterinstoffwechsels

RT-PCR Reaktionsansatz	1x PCR Puffer 1x Q-Solution H ₂ O mit 2,5 mM MgCl ₂ 0,2 µM Primer Fw 0,2 µM Primer Rv 400 µM dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 1 U/Rkt. HotStar- <i>Taq</i> - DNA-Polymerase Enzym Mix 1 µg RNA <i>ad</i> 25 µl H ₂ O
------------------------	---

Quantitative TaqManTM RT-PCR von COX-2 in arteriosklerotischen Plaques

Reaktionsansatz für COX-2	0,5x Absolute [®] QPCR SYBR [®] Green Mix 375 pg DNA-Template 0,4 µM COX-2 Fw 0,4 µM COX-2 Rv <i>ad</i> 25 µl H ₂ O
Reaktionsansatz für 18S rRNA	0,5x Absolute [®] QPCR ROX Mix 0,05x Pre-developed Assay Reagent (Applied Biosystems) 375 pg DNA-Template <i>ad</i> 25 µl H ₂ O

2.1.5 Primer

Die Oligonukleotide, die für die PCR-Analysen eingesetzt wurden, waren mit Hilfe des Programms „Primer 3“ (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) erstellt worden. Als Auswahlkriterium für einen geeigneten, genspezifischen Primer dienten folgende Parameter: die Primerlänge (20 bp); der Guanin/Cytosin-Gehalt (mindestens 20 %); die Schmelztemperatur (im Bereich von 59-63 °C), die Größe des amplifizierten DNA-Produkts (150-200 bp) und das Überspannen der Primer von mindestens einer Exon-Intron-Grenze in der Ziel-DNA-Sequenz. Die geeigneten Oligonukleotide wurden von der Firma BioSpring (Frankfurt) synthetisiert und bezogen.

Primer	Sequenz	T _{Annealing} [°C]	Größe [bp]
oIMR 0180 Fw oIMR 0181 Rv	5'-GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG-3' 5'-TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C-3'	72	155
oIMR 0180 Fw oIMR 0182 Rv	5'-GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG-3' 5'-GCC GCC CCG ACT GCA TCT-3'	72	245
COX-2 Fw COX-2 Rv	5'-GCA GTT GTT CCA GAC AAG CA-3' 5'-AAG GGG ATG CCA GTG ATA GA-3'	55	193
HMG-CoA-R Fw HMG-CoA-R Rv	5'-TGG AGA TCA TGT GCT GCT TC -3' 5'-GCG ACT ATG AGC GTG AAC AA -3'	55	247
ACAT-2 Fw ACAT-2 Rv	5'-CCA CCA CCT TGG ACA GTT CT -3' 5'-AGC CCT TGA TGA CTG ATT GG -3'	55	190
CYP 7a Fw CYP 7a Rv	5'-ACA CCA TTC CTG CAA CCT TC -3' 5'-GCT GTC CGG ATA TTC AAG GA-3'	55	231
LDL-R Fw LDL-R Rv	5'-TGC CTC ACA GAA GTC GAC AC-3' 3'-ATA CCA TGT GGC TGC TCC TC-5'	54	233
Aktin Fw Aktin Rv	5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3' 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3'	55	290

2.1.6 Geräte und Materialien

Gerät/Material	Hersteller, Ort
ABI Prism [®] 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
BioPhotometer [®] UV-VIS-Spektrophotometer	Eppendorf, Hamburg
Cell-Dyn [®] 3500 Spektrophotometer	Unipath Corporation, Mountain View, USA
Chromatographiemembran (Silicagel imprägnierte Glasfaserplatte [20x20 cm])	Pall Corporation, Life Science Group, Ann Arbor, USA
DNA-Thermo Cycler	Eppendorf, Hamburg
Flüssigkeits-Scintillationszähler	Packard, Canberra, USA
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E600	Nikon GmbH, Düsseldorf
Kryotom CM 3050	Leica, Wetzlar
LC/MS/MS API 4000 Tandem-Massenspektrometer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Lichtmikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf
LMD	Leica AS LMD System
Lucia Image base 4.6-Software	Jencons-PLS, Forest Row, UK
Microtiter [®] -Platte	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Motif-Analyzer Version 1.0	MelTec GmbH & Co. KG, Magdeburg
Nano-Drop ND-1000 UV-VIS-Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Optima [®] TLX-Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
PET-Folienbeschichtete Metallobjektträger	Leica, Wetzlar
QuantityOne [®] -Software	Bio-Rad, München
Roche/Hitachi 917 Spektrophotometer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rotor TLA-45	Beckmann Coulter, Krefeld
SDS-Software 1.7	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Spectrafluor Plus [®] -Instrument	Tecan, Crailsheim
SPSS 12.01	SPSS GmbH Software, München
Sub-Cell [®] GT Agarose Gelelektrophorese-System	Bio-Rad, München
Super-Frost-Plus Poly-L-Lysierte Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Ultraschallstab Sonifier [®] 230 Branson	Ultraschall und Labortechnik; G. Heinemann, Stuttgart
UV-Meter Gel Doc [®] Geldokumentationssystem	Bio-Rad, München
WinNonLin 4.1-Software	Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA
X-Fluor [®] -Software	Tecan, Crailsheim

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Versuchsdesign

2.2.1.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden nur an weiblichen Mäusen durchgeführt, um vom Geschlecht abhängige Effekte auszuschließen. Für die hausinterne Zucht wurde ein Zuchtpaar von der Firma Jackson Laboratorien (Bar Harbour, Maine USA) bezogen, das für das Gen Apolipoprotein E homozygot defizient war ($ApoE^{-/-}$; B6.129P2- $ApoE^{tm1Unc}$) und mit C57 BL/6 Wildtyp-Tieren mindestens für sechs Generationen rückgekreuzt waren. Die Kontrollstudien wurden an weiblichen Wildtyp-Mäusen des Typs C57 BL/6, die von derselben Firma bezogen wurden, durchgeführt. Zur Überprüfung der Depletion wurden Genotypisierungen mittels RT-PCR durchgeführt (siehe 2.2.3). Ein repräsentatives Ergebnis dieser genotypischen Untersuchung zeigt Abbildung 2.1. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur $22 \pm 0,5$ °C; Hell-/Dunkelzyklus 6/18 Uhr) und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Alle Experimente waren von der zuständigen Tierethikkommission in Darmstadt genehmigt worden.

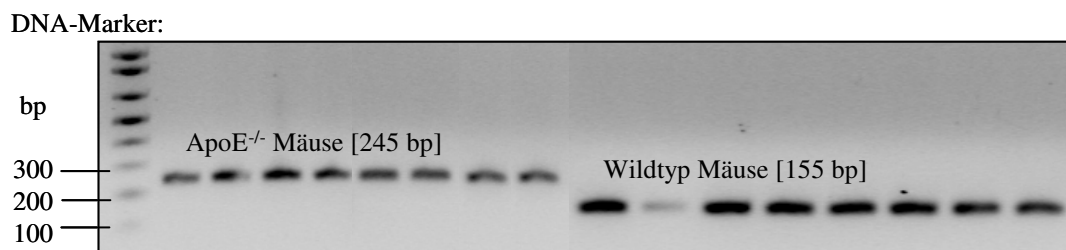


Abbildung 2.1: Genotypisierung: Die Depletion des Gens Apolipoprotein E ($ApoE$) wurde mittels PCR-Analysen nachgewiesen. Fragmentgrößen mit 245 bp wurden für homozygot $ApoE$ -defiziente Mäuse und mit 155 bp für homozygote Wildtypen erhalten.

2.2.1.2 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden im Alter von sechs Wochen in zwei Hauptgruppen unterteilt, die entweder eine fettreiche atherogene Nahrung (Western Diät: 21 % Gesamtfett, 0,15 % Cholesterin; Harlan Winkelmann, Borcheln) oder normales Futter (0,5 % Gesamtfett, 0,022 % Cholesterin) erhielten. Jede Hauptgruppe wurde in vier Untergruppen geteilt, die in folgende Behandlungsgruppen gegliedert wurden (Tab. 2.1): unbehandelte Kontroll-, Celecoxib-, Rofecoxib- und Naproxengruppe. Die Pharmaka wurden zweimal täglich über eine Knopfkanüle oral appliziert (Abb. 2.2). Die Behandlungsdauer betrug 16 Wochen mit fünfmaliger Gabe pro Woche.

Tabelle 2.1: Versuchsschema.

Behandlungs-Untergruppen		Dosierung pro Tag*	
Hauptgruppen	Atherogene Diät	Unbehandelt/Diät	-
		Celecoxib/Diät	2x25 mg/kg KG
		Rofecoxib/Diät	2x10 mg/kg KG
		Naproxen/Diät	2x10 mg/kg KG
	Normales Futter	Kontrolle	-
		Celecoxib	2x25 mg/kg KG
		Rofecoxib	2x10 mg/kg KG
		Naproxen	2x10 mg/kg KG

*KG: Körpergewicht.



Abbildung 2.2: Orale Applikation eines Pharmakons. Die Pharmaka wurden oral über eine 100 µl-Spritze mit Hilfe einer Schlundsonde fünfmal pro Woche, bei zweimal täglicher Gabe, appliziert.

2.2.2 Entnahme von organischem Material

2.2.2.1 Urinkollektion

Von den Versuchstieren, die über 16 Wochen nach entsprechendem Studiendesign behandelt worden sind, wurde über einen Zeitraum von 24 h Urin gesammelt. Dafür wurden die Mäuse einzeln in Stoffwechsellkäfige gesetzt und erhielten freien Zugang zu Futter und Wasser. Der 24h-Urin wurde über eine Trichtervorrichtung in 4 °C gekühlten Behältern gesammelt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Urinproben bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Blutentnahme

Im Alter von 22 Wochen wurden die Versuchstiere mit Isofluran tief narkotisiert und getötet. Das Blut wurde durch Herzpunktion über den linken Ventrikel entnommen. Zur Abtrennung von Plasma wurde das heparinisierte Blut bei 4000x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und das Plasma bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Gewinnung von Serum wurde das bei RT agglutinierte Blut bei 3000x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und das Serum bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung verwahrt.

2.2.2.3 Gewebeentnahme

Den Mäusen wurden nach tiefer Narkotisierung mit Isofluran und Tötung durch finale Herzpunktion folgendes Gewebe entnommen: Schwanzspitze, Leber und Herz mit anhängender *Aorta thoracica*.

Das Gewebe wurde in PBS-Puffer gespült und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Versuchsdurchführung wurden die Gewebeprobe bei -80 °C gelagert.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen und für die Analyse der Plaque-RNA wurde das Herz mit anhängender Aorta vor der Entnahme über den linken Ventrikel mit eiskaltem PBS-Puffer perfundiert, um das Blut auszuspülen. Anschließend wurde das Gewebe in Gefriermedium eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Versuchsdurchführung bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Genotypisierung

Zur Überprüfung der ApoE-Deletion wurden die verwendeten Versuchsmäuse genotypisiert. Hierfür wurde aus einem ca. 0,6 cm langen, amputierten Schwanzstück DNA mittels DNeasy-Tissue-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert und die DNA-Konzentration gemessen.

Die Genotypisierung erfolgte über PCR-Analysen in definierten Zyklen in einem DNA-Thermo Cycler. Die Initialisierung der *Taq*-DNA-Polymerase erfolgte bei 94 °C für 3 min. Darauf folgten 35 Zyklen mit 1 min bei 94 °C zur Denaturierung der DNA, 1 min bei 68 °C zur Primer-Annealing-Reaktion und 1 min bei 72 °C zur Amplifizierung. Nach einer finalen Extension für 10 min bei 72 °C wurde die PCR durch Erhitzen der DNA auf 94 °C für 3 min beendet. Die Größen der amplifizierten DNA-Fragmente wurden über eine 1,5 % (w/v) Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Die Amplifizierung erfolgte durch spezifische Primerpaare: oIMR 180/oIMR 182 für die ApoE knock-out-DNA lieferte ein Fragment mit 245 bp; oIMR 180/oIMR 181 für die Wildtyp-DNA lieferte das Genprodukt ApoE^{+/+} mit einer Größe von 155 bp (siehe Kap. 2.2.1.1, Abb. 2.1).

2.2.4 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik beschreibt den zeitlichen Verlauf der Arzneimittelkonzentration im Blut und verschiedener Körpergeweben. Mit Hilfe von Konzentrationsmessungen eines Pharmakons im Blutplasma ist es möglich auf der Basis von Modellvorstellungen eine mathematische Beschreibung des Konzentrations-Zeitverlaufs abzuleiten. Dadurch lässt sich eine Aussage über den Einfluss eines Organismus auf Resorption, Metabolisierung, Verteilung und Ausscheidung eines applizierten Arzneistoffes treffen und ein optimales Dosierschema des Pharmakons erstellen.

Das optimale Dosierungsschema für Celecoxib wurde durch Messung der Celecoxib-Konzentration in Mausplasma ermittelt. Im Alter von 6 Wochen wurde weiblichen Mäusen des Typs C57 BL/6 eine Einzeldosis Celecoxib (25 mg/kg KG) oral verabreicht und Blut zu definierten Zeitpunkten zwischen 0 und 800 min nach der Applikation über retrobulbäre Punktion bzw. finale Herzpunktion entnommen und heparinisiert. Zur Plasmagewinnung wurde das Blut bei 4000x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und bis zur Analytik bei -80 °C verwahrt. Die Konzentrationsbestimmungen von Celecoxib erfolgten mittels High-Performance-Liquid-Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

(HPLC-MS/MS) an einem API 4000 Tandem-Massenspektrometer mit kombinierter Flüssigchromatographie und wurden von Herrn Dr. Ronald Schmidt im Analytiklabor am Institut für Klinische Pharmakologie durchgeführt. Die pharmakokinetische Auswertung der Celecoxib-Plasmakonzentrationen erfolgte mit dem Computerprogramm „Win Non Lin 4.1“, wobei die Datenberechnung nach dem Ein-Kompartimenten-Modell erfolgte.

2.2.5 Blutanalytik

Im heparinisierten Blut-Plasma wurden die Konzentrationen von Cholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin und Triglyceriden mit Hilfe von enzymatischen kolorimetrischen Testverfahren gemessen. Die Plasma-Analysen erfolgten mit 1:10 in Wasser verdünnten Plasmaproben in einem Konzentrationsbereich von 3-800 mg/dl bei 25 °C. Das Gesamtcholesterin wurde spektrometrisch nach der von Roche validierten Cholesterin CHOD-PAP-Analyse (CHOD-PAP; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemessen. HDL-Cholesterin wurde gesondert mit einem homogenen enzymatischen kolorimetrischen Testverfahren unter Verwendung eines HDL-C plus Kits (HDL-C plus 2^{te} Generation, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben gemessen. Die Triglycerid-Messung erfolgte spektrometrisch nach der von Roche validierten GPO-PAP-Analyse (GPO-PAP; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Dabei wurden Cholesterinester oder Triglyceride durch Cholesterinesterasen oder Lipasen und freies Cholesterin durch Cholesterinoxidasen enzymatisch in Δ^4 -Cholesteron oder Glyceride und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gespalten. Das gebildete H_2O_2 reagierte durch Peroxidase vermittelter Reaktion mit 4-Aminophenazon und Phenol zu einem Farbstoff, dessen Farbintensität der Cholesterin- oder Triglyceridkonzentration direkt proportional ist und photometrisch gemessen wurde. Die LDL-Konzentration wurde näherungsweise über die Friedewald-Formel über folgenden mathematischen Zusammenhang errechnet (Friedewald et al. 1972):

$$\text{LDL - Konzentration [mg / dl]} = \frac{\text{Gesamtcholesterin} - \text{HLD} - \text{Triglyceridwert}}{5}$$

Der Triglyceridwert geteilt durch fünf entspricht dabei annäherungsweise dem Wert des vLDL-Cholesterins. Diese Gleichsetzung ist jedoch nur gültig, wenn die Triglyceridkonzentrationen nicht über 400 mg/dl liegen.

2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

2.3.1 RNA-Extraktion

2.3.1.1 RNA-Extraktion aus Gewebeproben

Die RNA aus Gewebeproben wurde mittels der Chomczynski-Methode mit RNA-TRI-Reagenz (siehe 4.1.4) und Chloroform extrahiert (Chomczynski et al. 1987; Chomczynski 1993). Im RNA-Reagenz sind Guanidiniumthiocyanat, welches Protein- und RNasen inaktiviert, und saures Phenol enthalten, welches die Isolierung von Proteinen und DNA in einer Phase ermöglicht. Nach Zugabe von Chloroform entsteht ein Dreiphasensystem, in dem die RNA in der oberen, wässrigen Phase angereichert ist, während sich Proteine und DNA in der Phenol und der Interphase befinden. Die RNA kann auf diese Weise leicht extrahiert und mit Alkohol gefällt werden. Die tief gefrorenen Leberproben wurden mit einem Mörser unter Flüssigstickstoff zerrieben. 200 mg der Leberproben wurden in einem Gefäß mit 500 µl RNA-Reagenz versetzt, durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl Chloroform erfolgte die Extraktion. Die Proben wurden geschüttelt, 10 min bei RT inkubiert und für 15 min bei 12000x g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war eine Dreiphasentrennung zu beobachten. Die obere RNA-enthaltende Phase wurde abpipettiert und in ein frisches RNase-freies Gefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 250 µl reinem Isopropylalkohol, fünfminütiger Inkubation und Zentrifugation über 8 min bei 14000x g und 4 °C. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, erneut zentrifugiert, bei RT getrocknet und in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Bei schlechter Löslichkeit wurde die RNA-Lösung bei 55 °C für 10 min erhitzt. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch ermittelt.

2.3.1.2 RNA-Extraktion aus arteriellen Plaques

Die RNA wurde unter Verwendung eines Kits zur RNA-Isolierung (RNeasy-Mikro Kit; Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus den über Lasermikrodissektion (LMD) ausgeschnittenen Plaques isoliert und ein DNase-Verdau durchgeführt. Die Qualität und Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Mit diesem Aufreinigungsverfahren wurden 1-5 ng/µl Gesamt-RNA je Versuchstier isoliert. Die RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und durch eine TaqMan[™] RT-PCR quantitativ analysiert.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren (DNA, RNA) erfolgte spektrophotometrisch an einem BioPhotometer[®] in einer Quarzküvette oder einem Nano-Drop ND-1000 UV-VIS-Spektrophotometer. Als Kriterium für die Verunreinigung der Nukleinsäure-Proben mit Proteinen oder Phenolresten wurde der Quotient der Absorptionen bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA und RNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Bei einem A260/A280-Verhältnis von 1,8 bis 2,0 konnte von einer reinen Nukleinsäure-Lösung ausgegangen werden. Die Konzentration der Nukleinsäure wurde nach dem Lambert-Beer-Gesetz aus der gemessenen Absorption bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und dem Nukleinsäure-Koeffizienten errechnet. Für einen Absorptionswert mit $OD(A260)=1$ entspricht die Konzentration doppelsträngiger DNA 50 µg/ml, einzelsträngiger DNA 33 µg/ml und die Konzentration einzelsträngiger RNA 40 µg/ml.

2.3.3 RT-PCR Analytik

Zur Quantifizierung der RNA bestimmter Gene wurde mit der aus Mausgewebe gewonnenen RNA mit entsprechenden Primern (siehe 2.1.5) eine *one-step* RT-PCR (Qiagen) durchgeführt. Die reverse Transkription erfolgte bei 50 °C für 30 min, worauf die Initialisierung der *Taq*-DNA-Polymerase bei 94 °C für 15 min folgte. Der Dreiphasen-PCR-Zyklus wurde bei 94 °C für 1 min gestartet (Denaturierung), worauf die Primer-Anlagerung bei entsprechender spezifischer Hybridisierungstemperatur für 1 min folgte (Annealing) und mit der DNA-Synthese bei 72 °C für 1 min abschloss (Extension). Dieser Dreiphasen-Zyklus wurde 25-30 Mal wiederholt und die PCR mit der finalen Extension bei 72 °C für 10 min beendet. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 % (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und deren Größe durch Vergleich mit einem DNA-Größenstandard ermittelt.

2.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Nach jeder RT-PCR wurden die amplifizierten DNA-Produkte über eine Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Die Agarose wurde unter Erhitzen in 1x TBE-Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromid zugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml), die Lösung in die Gelkammer eines Sub-Cell[®] GT Agarose Gelelektrophorese-Systems gegossen und der Geltaschenkamm eingesetzt. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen des mit 1x TBE-Puffer überdeckten Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 80 V, bis die Bromphenolblau-Bande $\frac{3}{4}$ der maximalen Laufstrecke auf der Gelfläche erreicht hatte.

Anschließend wurde die DNA mittels UV-Meter detektiert und die Intensitäten der Produkte mit der Software „Quantity One[®]“ densitometrisch ausgewertet.

2.3.5 Isolierung von Mikrosomen aus Lebergewebe

Die bei -80 °C eingefrorenen Lebern wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und von dem erhaltenem Pulver je eine Mikrospatelspitze zu 500 µl vorgelegtem eiskaltem Lysispuffer gegeben und durchmischt. Die Aufbereitung der Lebermikrosomen erfolgte auf Eis. Die Leberproben wurden mittels Ultraschall (Stoßleistung: 3-4, Arbeitszyklus: 30-40 %, Dauer: 15 sek) homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden bei 1500x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde für 1 h bei 100000x g und 4 °C zentrifugiert. Das mikrosomenhaltige Pellet wurde in 100 µl Assaypuffer resuspendiert und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Die Proteinproben wurden mit Wasser verdünnt. Als Proteinstandard diente eine BSA-Lösung mit Proteinkonzentrationen im Bereich 0-50 µg/ml. Auf einer 96-well Microtiter[®]-Platte (Hansson et al. 2006) wurden jeweils 50 µl der verdünnten Proteinlösungen bzw. der Standards vorgelegt und anschließend mit jeweils 200 µl des Bradford-Reagenzes gemischt. Nach 2 min erfolgte die photometrische Auswertung durch Messung der Absorption bei 595 nm.

2.3.7 HMG-CoA-Reduktase-Aktivitätsmessung

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Cholesterinbiosynthese ist die Reduktion von 5-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA (HMG-CoA) zu Mevalonat durch die HMG-CoA-Reduktase (HMG-CoA-R). Die Aktivität dieses Enzyms kann gemessen werden, indem man den Umsatz von C¹⁴ markiertem HMG-CoA zu Mevalonat bestimmt. Für diese HMG-CoA-Reduktase-Aktivitätsmessung wurden 150 µg Mikrosomen aus der Leber eingesetzt und mit Assaypuffer auf ein Endvolumen von 70 µl gebracht. Im Folgenden wurden zu jeder Probe 20 µl Substratpuffer und 10 µl HMG-CoA-Gemisch pipettiert und die radioaktive Lösung bei 37 °C für 90 min inkubiert. Zum Fällen des Reaktionsproduktes wurden 10 µl 32 %-iger HCl zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Mevalonolacton-Gemisch, das als interner Standard eingesetzt wurde, und Inkubation bei 37 °C für 90 min. Das radioaktive Reaktionsgemisch wurde nach der Inkubationszeit bei 1500x g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde schrittweise auf eine gebackene Chromatographiemembran (im Trockenschrank bei 80 °C für 90 min) aufgetragen. Die

chromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte in einem Laufpuffer aus Benzol und Aceton im Mischungsverhältnis 1:1 für 30 min. Nach dem vollständigen Abdampfen des Laufpuffers wurden die Messbereiche der Membran ausgeschnitten und in vorbereitete Röhrchen mit jeweils 10 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben. Die Messung der radioaktiven Signale erfolgte in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler.

2.3.8 Urinanalytik

2.3.8.1 Prostacyclin-Analyse

Die Halbwertszeit von PGI_2 im Plasma beträgt 60 min, in Pufferlösung dagegen nur 2-3 min (Ylikorkala et al. 1985). Daher wurde die Produktion von PGI_2 über den im Urin stabilen Metaboliten 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ im 24-h-Sammelurin unter Verwendung eines Correlate-EIA™ 2,3-dinor-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ Kits (Assay Designs Inc., Ann Arbor, USA) nach Herstellerangaben ermittelt. Die Proben wurden 1:5 verdünnt und im Konzentrationsbereich von 8-2000 pg/ml gemessen.

2.3.8.2 Thromboxan-Analyse

Unter physiologischen Bedingungen wird TXA_2 mit einer Halbwertszeit von ca. 40 Sekunden über TXB_2 zu seinem Hauptmetaboliten 11-dehydro-Thromboxan B_2 (11-dehydro- TXB_2) umgewandelt (Ciabattini et al. 1990). Daher wurde im 24-h-Sammelurin die Konzentration von 11-dehydro- TXB_2 unter Verwendung eines Correlate-EIA™ 11-dehydro- TXB_2 Kits (Assay Designs Inc., Ann Arbor, USA) nach Herstellerangaben ermittelt. Die Proben wurden 1:100 verdünnt und im Konzentrationsbereich von 10-10000 pg/ml gemessen.

2.3.9 Herstellung von Gefrierschnitten

Das in Gefriermedium eingebettete Herz mit anhängender *Aorta thoracica* wurde am Kryotom unter konstanten Temperaturbedingungen (Objekt: -19 °C; Umgebung: -20 °C) geschnitten. Es wurden 8 µm dicke, arterielle Gefrierschnitte erstellt und auf Objektträgern blockweise aufgenommen.

2.3.9.1 *In situ*-Proteomikanalysen nach MelTec

Für immunhistochemische *in situ*-Proteomikanalysen nach MelTec wurden 8 µm dicke Gefäßschnitte auf silanisierte Deckgläser innerhalb eines Ringes mit einem Durchmesser von 1 cm aufgebracht. Die

Gefrierschnitte wurden für 2 min in Aceton fixiert und bei RT für 15 min getrocknet. Bis zum Transport auf Trockeneis erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

2.3.9.2 Immunhistochemie mittels Fluoreszenz

Für die immunhistochemische Untersuchung der COX-2 Expression wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte auf Objektträgern aufgenommen und in Aceton bei -20 °C für 1 min fixiert. Die Schnitte wurden bei RT für 1 h getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.10 Histologische Färbung

2.3.10.1 Lipid- und Zellkernfärbung mit Sudan-Rot und Hämatoxylin/Eosin

Die Gefrierschnitte wurden zur histologischen Untersuchung mit Sudan-Rot-Lösung zur Anfärbung von Lipiden und mit Hämatoxylin zur Anfärbung der Zellkerne behandelt. Die Gefrierschnitte wurden in 50 % Ethanol für 2 min eingelegt und anschließend für 12 min in der Sudan-Rot-Lösung gefärbt. Der Überschuss an Lösung wurde durch Waschen in 50 % Ethanol für 2 min entfernt. Nach erneutem Waschen in Wasser für 1 min erfolgte die Kernfärbung in der Hämatoxylin-Lösung für 15 min. Bis zum gewünschten Färbeargebnis wurden die Gefäßschnitte in alkalischem Wasser eingelegt (5 min) und gegebenenfalls mit Eosin gegen gefärbt. Dazu wurden die Gefrierschnitte in 95 %-igem Alkohol für 30 sek eingelegt und anschließend in der Eosin-Lösung für 1 min gefärbt. Die Schnitte wurden zum Dehydrieren zweimal für jeweils 2 min in 95 %-igem Alkohol, in absolutem Alkohol und in Xylol eingelegt. Nach dem Trocknen oder Dehydrieren wurden die Gefäßschnitte mit einem harzhaltigen Einbettungsmedium eingedeckelt und am Lichtmikroskop beurteilt.

2.3.10.2 Goldner-Färbung

Die Schnitte wurden in einer Reihe von Lösungen eingelegt: Weigert's Eisenhämatoxylin für 2 min, Spülen in fließendem Wasser für 10 min; Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin für 5 min, Abspülen in 1%-iger Essigsäure; Differenzieren in Molybdätophosphorsäure-Orange bis zur völligen Entfärbung des Bindegewebes. (für 5 min), in 1 %-iger Essigsäure kurz spülen; Gegenfärbung mit Lichtgrün (bzw. Anilinblau) für 5 min, Auswaschen in 1 %-iger Essigsäure für 5 min; Entwässern in abs. Alkohol und in Xylol fixieren. Abschließend Eindeckeln in einem harzhaltigen Einbettungsmedium. (Diese Lösungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Christoph Rennè aus dem Institut für Pathophysiologie zu Verfügung gestellt)

2.3.10.3 Elastica-van-Gieson-Färbung

Die Gefrierschnitte wurden für 3 min in einer Fast-Green-Lösung eingelegt und in einer 3 %-igen Essigsäure-Lösung eingebracht. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in einer Safranin-O-Lösung eingelegt und mit Wasser gespült. Die Schnitte wurden in einer zweistufigen Alkoholreihe dehydriert, mit Xylol fixiert und mit einem harzhaltigen Einbettungsmedium eingebettet.

2.3.11 Quantifizierung arterieller Plaques

Als Maß für arteriosklerotische Veränderungen wurde die Einschränkung des Gefäßlumens durch arterielle Plaques an Querschnitten der *Aorta thoracica* ermittelt. Die arteriellen Einschränkungen wurden von jeweils 5-10 Tieren jeder Behandlungsgruppe untersucht. Die 10 µm dicken Gefrierschnitte wurden histologisch beurteilt und die Plaquegröße mit Hilfe des Computerprogramms „Lucia Image 4.6“ analysiert. Die mittlere Plaquegröße berechnete sich aus der gemessenen Fläche des arteriosklerotischen Plaques und der totalen inneren Gefäßfläche über folgenden mathematischen Zusammenhang:

$$\frac{\text{Plauefläche} \cdot 100\%}{\text{Gesamtgefäßfläche}} = \text{prozentuale Plaquegröße}$$

Bei jedem Versuchstier wurden arteriosklerotische Plaques über einen Bereich von 800 µm gemessen und die mittlere prozentuale Plaquegröße aus 8 Analysen ± SEM bestimmt.

2.3.12 *In situ*-Proteomikanalysen von proatherogenen Proteinen

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden durch *in situ*-Proteomikanalysen nach der Methode der Multi-Epitope-Ligand-Kartography (MELK)-Technologie (MelTec) (Schubert 2003; Schubert et al. 2006) in Zusammenarbeit mit der Firma MelTec (MelTec GmbH & Co. KG, Magdeburg) an kryostatischen Gefäßschnitten durchgeführt. Untersucht wurden Proteine in arteriosklerotischen Plaques von unbehandelten ApoE-defizienten Mäusen, die über 16 Wochen atherogenes Diätfutter erhalten hatten (Antikörperliste, siehe Kapitel 2.1.2).

Die MELK-Technologie basiert prinzipiell auf folgendem Messverfahren (Abbildung 2.3): Ein Antikörper (0,5 µg/ml), der an einen Fluoreszenzfarbstoff (FITC) gekoppelt wurde, wird auf die Gewebeprobe aufgetragen und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird an einem Fluoreszenzmikroskop ein Bild aufgenommen und der Farbstoff anschließend vollständig gebleicht. Diese Ausbleichung stellt den wichtigsten Schritt in der MELK-Technologie dar, weil auf diese Weise bis zu 100 Folgefärbungen mit anderen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern an derselben Probe vorgenommen werden können. Nach dem Bleichen wird erneut ein Fluoreszenzbild aufgenommen,

um Falschfärbungen durch übertragene Fluoreszenzsignale oder Interferenzen innerhalb der Antikörper auszuschließen. Der folgende MELK-Durchlauf beginnt wieder mit der Inkubation der Probe mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper, worauf die Probe gewaschen und ein Fluoreszenzbild erstellt wird. Das spezifische Antikörpersignal wird komplett gebleicht und die Probe kann erneut mit einem neuen Antikörper inkubiert werden. Dieser Prozess wird so oft wiederholt, bis alle Antigene innerhalb der Gewebeprobe nachgewiesen wurden, die von Interesse sind. Über die MELK-Datenanalyse mittels dem „Motif-Analyzer“ und dem IMARIS-Softwareprogramm werden Datenbilder in Falschfarben erstellt, welche das Proteinnetzwerk in den Plaques repräsentieren, um verschiedene Antigene direkt miteinander vergleichen zu können.

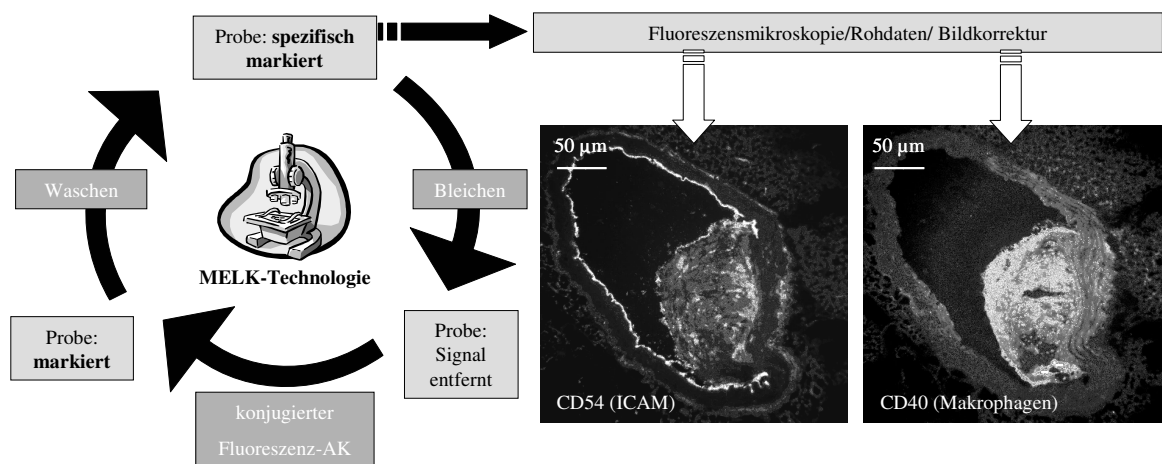


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der MELK-Technologie. Versuchsabfolge zur immunhistochemischen Analyse von atherogenen Proteinen in Plaques nach der Multi-Epitop-Ligand-Kartographie (MELK-Technologie): die Probe wird gebleicht, mit spezifischem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper (AK) inkubiert, zum Entfernen von überschüssigem AK gewaschen und die spezifische Färbung der Probe am Fluoreszenzmikroskop detektiert. An einer Probe folgten weitere Durchläufe mit Bleichen, Inkubation, Waschen und Aufnahme. Anhand der Rohdaten werden computergesteuerte Bildkorrekturen vorgenommen und die endgültigen Ergebnisse der *in situ*-Proteomikanalyse erhalten: bspw. für ICAM (CD54) und Makrophagen (CD40) in Gewebeschnitten der Aorta einer unbehandelten ApoE-defizienten Diätmaus.

2.3.13 Immunfluoreszenz-Färbung von COX-2 in atherogenen Plaques

Die fixierten Gefrierschnitte wurden in PBS aufgetaut und zweimal für jeweils 5 min in PBS-Puffer gewaschen. Unspezifische, negativ geladene Bindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation in Ziegen Serum bei RT blockiert. Die Hybridisierungsreaktion des COX-2-Antikörpers wurde über Nacht bei 4 °C vorgenommen. Hierfür wurde eine COX-2-Antikörperlösung in PBS-Puffer mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml hergestellt. Die Schnitte wurden in PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Spezies-spezifischen Alexa Fluor® 488-gekoppelten Sekundärantikörper (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA) mit einer Verdünnung von 1:800 in Ziegen Serum für 1 h bei RT ohne Lichtexposition inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-

Puffer für jeweils 5 min erfolgte die Zellkernfärbung mit DAPI. Die Gefrierschnitte wurden für 5 min in der DAPI-Färbelösung (0,3 μ M) exponiert und in PBS-Puffer erneut gewaschen. Anschließend erfolgte zur Reduktion der Autofluoreszenz der elastischen Fasern eine einminütige Inkubation in der Sudan-Schwarz-Lösung (0,03 % Sudan B), worauf die Schnitte dreimal in PBS-Puffer für jeweils 5 min gewaschen wurden. Abschließend wurden die Objekte mit wässrigem „Dako Cytomation“-Medium eingedeckelt. Die COX-2- und die Kernfärbung wurde an einem Nikon Fluoreszenzmikroskop beurteilt. DAPI besitzt ein Absorptionsmaximum von 358 nm und ein Emissionsmaximum von 461 nm, während Alexa Fluor[®] 488 ein Absorptionsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 519 nm besitzt. Dadurch leuchten mit DAPI angefärbte Zellkerne blau und COX-2 exprimierende Zellen, durch die Alexa Fluor[®] 488-COX-2 Antikörperkomplexe, grün.

2.3.14 Plaque-RNA Analytik

2.3.14.1 Lasermikrodissektion

Zur gezielten Analyse von RNA in arteriosklerotischen Plaques wurden arterielle Plaques in der *Aorta thoracica* mittels Lasermikrodissektion (LMD) ausgeschnitten und die RNA-Expression über quantitative RT-PCR analysiert. Hierfür wurden die Gefrierschnitte an einem Rotationsmikrotom mit einer Schnittdicke von 14 μ m auf folienbeschichtete PET-Metallobjektträgern aufgezogen, in Aceton bei -20 °C für 1 min fixiert und bei 40 °C auf einer Wärmeplatte für 5 min getrocknet. Die Metallobjektträger wurden am „Leica AS LMD“-System aufgelegt und die arteriosklerotischen Plaques über einen computergesteuerten UV-Laserstrahl ausgeschnitten. Qualitätsstudien (Burbach et al. 2003) haben gezeigt, dass die Plaque-RNA über einen Zeitraum von 60 min bei RT unter RNase freien Bedingungen stabil ist, so dass in unabhängigen, einstündigen Sitzungen je Versuchstier ca. 70 Plaques ausgeschnitten wurden. Die Plaques wurden in 30 μ l Lysispuffer gesammelt und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.3.14.2 Synthese von cDNA

Die reverse Transkription der aus arteriosklerotischen Plaques isolierten Gesamt-Plaque-RNA wurde mit einem „Super Script[™]II RNase H⁻ Reverse Transcriptase“-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) in 20 μ l Volumen durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, anschließend auf Eis gelagert und kurz abzentrifugiert. Von der „First-Stand“-Pufferlösung wurden 7 μ l zu jedem Reaktionsansatz pipettiert und bei 42 °C für 2 min inkubiert. Zu jeder Probe wurde das Enzym Reverse Transkriptase zugegeben und bei 42 °C für 50 min inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem das Enzym durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min inaktiviert wurde. Abschließend erfolgte ein

RNA-Verdau durch Zugabe von *E. coli* RnaseH bei 37 °C für 20 min. Die cDNA-Proben wurden bis zur anschließenden quantitativen Analyse bei -20 °C gelagert.

2.3.14.3 Quantitative TaqMan™ RT-PCR-Analytik

Die Quantifizierung der COX-2-mRNA in arteriosklerotischen Plaques erfolgte über quantitative TaqMan™ RT-PCR an einem „ABI Prism® 7700 Sequence Detection System“ (ABI Prism® 7700 SDS) mit dem Programm „Sequence Detector version 1.7“. Die Messung erfolgte in einer Triplet-Bestimmung. 18S-rRNA diente bei der Quantifizierung als interner Standard. Das Prinzip der quantitativen TaqMan™-RT-PCR beruht auf der Detektion der Fluoreszenz und erfolgt nach jedem PCR-Zyklus. In diesem Versuch erfolgte die Markierung von COX-2-DNA durch SYBR-Green und von 18S-rRNA durch fluoreszenzspezifische Sonden. Das emittierte Fluoreszenzsignal ist zu der Konzentration der amplifizierten DNA proportional.

Die Messungen wurden mit speziellen kommerziell erhältlichen Absolute® QPCR Mix-Kits (Abgene, Hamburg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die COX-2-Expressionsanalyse diente als Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green, der in dem Mix enthalten war (Absolute® QPCR SYBR® Mix, Abgene, Hamburg). Für die quantitative Analyse der 18S-rRNA wurde ein Mix aus PDAR (*predeveloped assay reagent*) verwendet, der als Fluoreszenzfarbstoff VIC enthalten hatte (Absolute® QPCR ROX Mix, Abgene, Hamburg). Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Die Aktivierung der *Taq*-Polymerase erfolgte bei 95 °C für 15 min; die Denaturierung wurde bei 95 °C für 15 sek durchgeführt und die Primer-Anlagerung sowie Extension erfolgte bei 60 °C für 1 min. Dieser Zwei-Phasen-Zyklus wurde 40 Mal durchlaufen, bis die Reaktion durch Abkühlen auf 4 °C beendet wurde. Die Berechnung der relativen mRNA-Menge erfolgte nach der komparativen C_T -Methode. Dabei wird ein Schwellenwert festgelegt (C_T -Wert), bei dem die DNA-Amplifikation sich in der exponentiellen Phase befindet („Fit-Point“-Methode, Abb. 2.4). Der Amplifizierungszyklus, bei dem dieser Schwellenwert erreicht wird, dient als Grundlage für die Berechnung der relativen mRNA-Mengen. Der C_T -Wert für die COX-Signale wurde mit dem 18S-rRNA C_T -Wert korreliert, um Schwankungen in der Ausgangskonzentration der eingesetzten RNA auszugleichen (Bildung der Differenz ΔC_T aus C_T -Werten für COX-2 und 18S-rRNA).

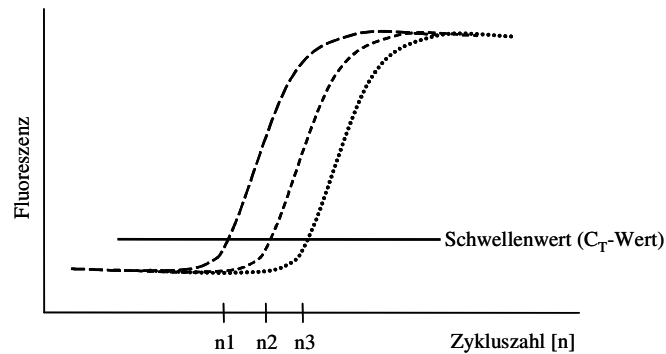


Abbildung 2.4: PCR-Quantifizierung mittels der Fit-Point-Methode des TaqMan™-Instrumentes. Zur Berechnung der in den Proben enthaltenen relativen Mengen an COX-2-mRNA wurde die Amplifizierung von COX-2 und die des Referenzgen 18S-rRNA gemessen und mit der „Fit-Point“-Methode des TaqMan™-Instrumentes analysiert. Dabei wird eine horizontale Linie in die exponentielle Phase des gemessenen Fluoreszenzsignals gelegt, so dass an den Schnittpunkten der Fluoreszenzsignale verschiedener Proben (C_T -Werte) die gleiche Fluoreszenzintensität und somit die gleiche momentane DNA-Menge vorliegt, welche allerdings bei einer unterschiedlichen Anzahl von Zyklen erreicht wurde.

Der Gehalt an COX-2-mRNA in den behandelten Tieren wurde anschließend auf den Gehalt in unbehandelten Kontrolltieren (als 1 festgelegt) bezogen. Die erhaltenen $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden pro Gruppe gemittelt und die relative DNA-Konzentration errechnet. Die DNA-Menge ließ sich näherungsweise über den folgenden mathematischen Zusammenhang berechnen:

$$\text{relative COX-2 Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}.$$

Zur Herleitung der Formel und zur genauen Erklärung der komparativen C_T -Methode sei auf das Handbuch von ABI Prism® 7700 SDS verwiesen.

2.3.15 Statistik

Alle Berechnungen erfolgten mit den Softwareprogrammen Microsoft Excel® 2002 und SPSS™ Version 12.01 für Windows 2000. Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Die Signifikanz wurde mittels einer univariaten Analyse der Varianz (One-Way-ANOVA) errechnet. Dabei wurde die Homogenität der Varianzen überprüft und die Signifikanz der Parameter mit einem Post-Hoc-Test unter Verwendung einer Bonferroni α -Korrektur bzw. Dunnett T3 (bei Berechnung der Gewichtszunahmen der Tiere) für multiple Vergleiche ($\alpha=0,05$) über One-Way-ANOVA analysiert. Die Signifikanz p wurde in den graphischen Darstellungen wie folgt gekennzeichnet: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung und Charakterisierung atherogener Plaques

3.1.1 Histologische Untersuchung der Aorta

Die Entwicklung früher Läsionen wurde in der *Aorta thoracica* von ApoE-defizienten Mäusen, die über 9, 12 und 16 Wochen atherogenes oder normales Futter erhalten hatten, histologisch verfolgt. Nach 9 bzw. 12 Wochen konnten, unabhängig von der Fütterung, in der *Aorta thoracica* keine auffälligen Veränderungen in der Arterienwand festgestellt werden. Es wurden keine Plaques ausgebildet, die Intima der Aorta war gleichmäßig dick entwickelt und die elastischen Fasern zeigten einen geraden und ununterbrochenen Verlauf (Abb. 3.1).

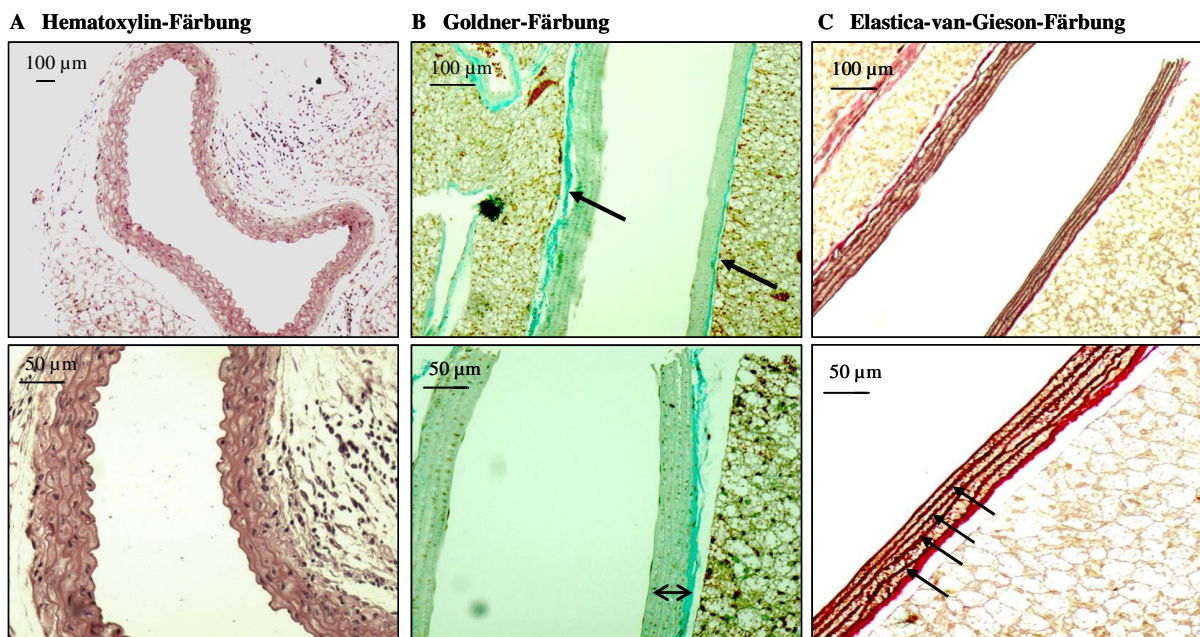
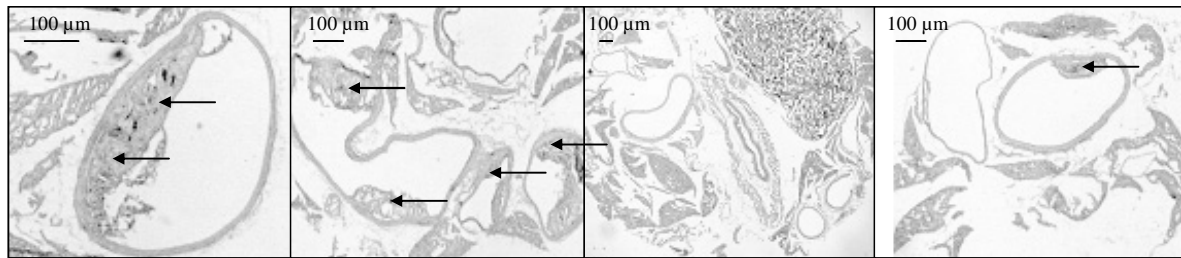


Abbildung 3.1: Immunhistologische Färbung. Repräsentative histologische Färbung der *Aorta thoracica* von unbehandelten ApoE^{-/-} Mäusen nach 12 Wochen atherogener Diät. A) Differenzierung der Zellkerne und elastischen Fasern durch Hämatoxylin/Eosin (Färbung der Zellkerne blau, elastische Fasern und Bindegewebe rot; Querschnitt); B) Darstellung der Basalmembran (→) nach der Methode von Goldner (Grünfärbung der Basalmembran; Längsschnitt), wodurch die Dicke der Arterienwand hervorgehoben wurde (↔) und C) differenzielle Anfärbung der elastischen Fasern (→) nach Elastica-van-Gieson (Rotfärbung der elastischen Fasern; Längsschnitt).

Erst nach der 16-wöchigen Behandlung mit atherogener Diät konnten in der *Aorta thoracica* von ApoE-defizienten Mäusen arteriosklerotische Plaques histologisch nachgewiesen werden, während Versuchstiere, die normales Futter erhalten hatten, keine Plaques entwickelt hatten (Abb. 3.2.A). Die Gefäß einschränkungen in der *Aorta thoracica* der Diät-Mäuse waren am größten in dem vom Herzen aufsteigenden Teil der Aorta (*Aorta ascendens*), im Aortenbogen und den direkten Ästen des *Arcus aortae*. In dem absteigenden Teil der Aorta (*Aorta descendens*) waren teilweise kleinere Plaques

nachzuweisen. In Wildtyp-Mäusen, die als Vergleichsgruppe untersucht wurden, waren in keinem Bereich der Aorta Plaques ausgebildet worden, unabhängig vom Futtertyp und der Fütterungsdauer (Abb. 3.2.B). Aufgrund dieser Voruntersuchungen wurden die Mäuse bei allen folgenden Versuchsreihen über 16 Wochen behandelt und die quantitative Plaque-Analyse an Gefrierschnitten der *Aorta ascendens* durchgeführt.

A ApoE^{-/-} atherogene Diät



B Wildtyp atherogene Diät

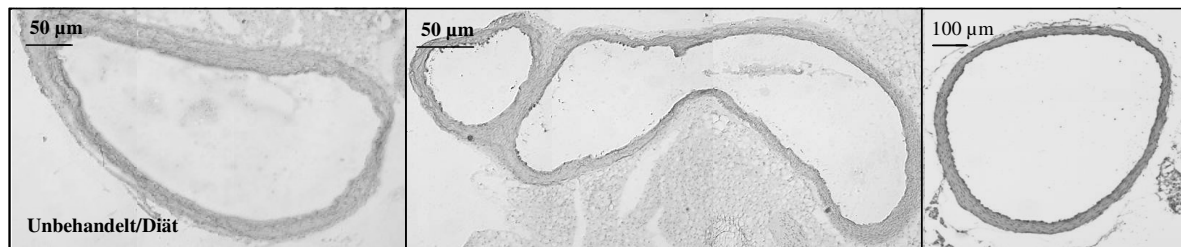


Abbildung 3.2: Plaqueentwicklung in der *Aorta thoracica*. An Gefäßquerschnitten der Aorta von ApoE-defizienten (A) und Wildtyp-Mäusen (B), die über 16 Wochen atherogenes Futter erhalten hatten, wurde die Plaqueentwicklung in der *Aorta ascendens* (links), in den direkten Äste des *Arcus aortae* und dem Aortenbogen (mittig) sowie in der *Aorta descendens* (rechts) histologisch untersucht. Plaques sind mit einem Pfeil gekennzeichnet (→).

Differenzielle histologische Färbungen mit Hämatoxylin und Sudan-Rot erlaubten eine nähere Charakterisierung der Plaques (Abb. 3.3). Nach Fütterung der Mäuse mit atherogener Diät markierten die Plaques ein frühes Stadium der Arteriosklerose. Es handelte sich um frühe Läsionen, sog. „Fatty Streaks“, die auch als Xanthoma bezeichnet werden und sich innerhalb der Arterienwand der *Aorta thoracica* entwickelt hatten. Sie zeichneten sich als zellreiche und mit Fettansammlungen hervortretende Regionen aus und verursachten eine lokale Aufquellung der Intima. Die Zellkerne der Endothelien ragten charakteristisch knöpfchenartig in das Gefäßlumen hinein.

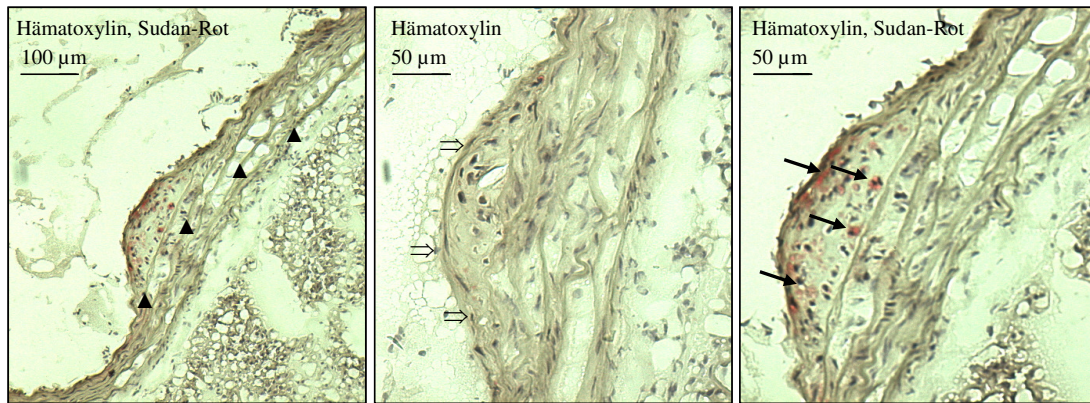


Abbildung 3.3: Histologie einer arteriosklerotischen Plaque. Repräsentative histologische Färbungen der Morphologie von Plaques in der *Aorta thoracica* von ApoE-defizienten Mäusen, die 16 Wochen lang atherogenes Futter erhalten hatten: Elastische Fasern (▲); Anfärbung der Zellkerne von Endothelzellen mit Hämatoxylin (⇒), Sudan-Rot-Färbung lipidreicher Zellen (→).

3.1.2 *In situ*-Proteomikanalysen von atherogenen Proteinen

Zur weiteren Untersuchung der arteriosklerotischen Plaques wurde eine *in situ*-Proteomikalanalyse mittels Multi-Epitope-Ligand-Kartography (MELK)-Technologie (MelTec) durchgeführt (schematischer Ablauf siehe Methodenteil 2.3.12; Abb. 2.3). Durch dieses Analyseverfahren wurden Proteine charakterisiert, die an der Arteriogenese beteiligt sind. Gefrierschnitte der *Aorta thoracica* von unbehandelten ApoE-defizienten Diät-Mäusen (n=3) wurden auf die Expression von 8 verschiedenen Proteinen untersucht. Bei allen Schnitten wurden die Zellkerne mit Propidiumjodid gefärbt und die elastischen Fasern waren durch Autofluoreszenz ebenfalls immer nachweisbar. Die immunhistochemischen Fluoreszenzsignale wurden nachträglich mit Falschfarben markiert, wobei die Farbeinstellungen der einzelnen Proteine so gewählt wurden, dass die Intensitäten der Immunfluoreszenzsignale nicht verfälscht wurden. Die Auswertung erfolgte anhand des Computerprogramms „MelTec Motif-Analyzer“.

Die Abbildung 3.4 zeigt ein repräsentatives Ergebnis für die Färbung folgender Proteine, die in den Plaques und der darunter befindlichen Gefäßwand nachgewiesen wurden: Aktive Makrophagen, die den Oberflächenmarker CD40 repräsentieren, waren ausschließlich im Plaque und in der darunter liegenden Arterienwand zu finden; COX-1 (zusätzlich im gesamten Gefäßendothel) und COX-2 exprimierende Zellen lagen hauptsächlich im Plaque und unterhalb der betroffenen Region in der Media vor; CD54 (ICAM), das von Endothelzellen exprimiert wird, war gleichmäßig in der Intima verteilt; potentiell transkriptionsaktive Zellen, welche den Transkriptionsfaktor NF- κ B p50 und NF- κ B p65 exprimieren, wurden innerhalb der atherogenen Plaques gefärbt; PGI₂-S lag innerhalb des Plaques, aber verstärkt unterhalb der Plaqueregion in der Media vor und VEGF konnte, als Marker von bspw. aktivierten Makrophagen und Endothelzellen, in der Plaqueoberfläche und innerhalb der

Plaqueregion gefärbt werden. Die *in situ*-Proteomikanalyse nach der MELK-Technologie lieferte somit Hinweise auf atherogene Proteine, die möglicherweise an der Veränderung von Gefäßwänden beteiligt sind und kann so als Grundlage für weitere qualitative Untersuchungen von atherogenen Proteinen in Gefrierschnitten der *Aorta thoracica* dienen.

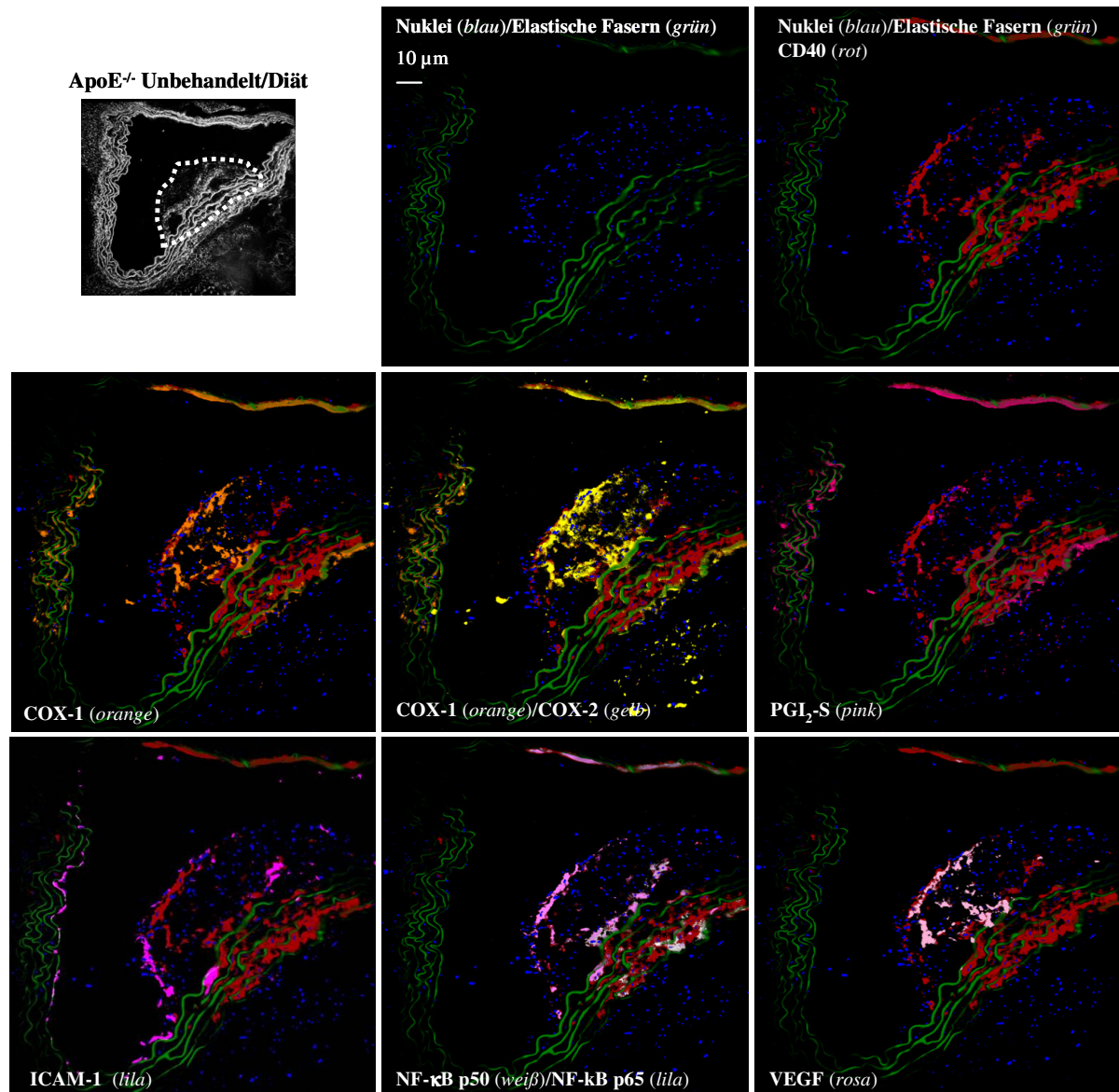


Abbildung 3.4: MELK-*in situ*-Proteomikanalyse von atherogenen Proteinen. Die Immunfluoreszenz-Färbungen von Proteinen in atherogenen Plaques von unbehandelten ApoE^{-/-} Diät-Mäusen wurden mittels dem MelTec Motif-Analyzer ausgewertet und in willkürlich gewählten Farben dargestellt: CD40, aktive Makrophagen (rot), Zellkerne und elastische Fasern (grün) sind in allen Abbildungen zur besseren Orientierung dargestellt, COX-1 (orange), COX-2 (gelb), PGI₂-S (pink), ICAM-1 (lila), NF-κB p50 (weiß)/NF-κB p65 (lila) und VEGF (rosa).

3.2 Pharmakokinetische Untersuchung von Celecoxib

Für die Erstellung eines korrekten Dosierungsschemas wurden in Vorversuchen pharmakokinetische Untersuchungen von Celecoxib vorgenommen. Die Methode zur Bestimmung der Celecoxib-Plasmakonzentrationen mittels LC-MS/MS-Messung war an unserem Institut für humanes Plasma oder Rattenplasma etabliert (Brautigam et al. 2001). Diese Methode war von Herrn Dr. Ronald Schmidt zur Analyse von Celecoxib in Mausplasma erweitert worden.

Celecoxib wurde als Einzeldosis von 25 mg/kg Körpergewicht (KG) den Versuchsmäusen (C57BL/6; weiblich) oral verabreicht und Blut zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch retrobulbäre und finale Herzpunktion entnommen. Die Celecoxib-Plasmakonzentrationen wurden über die erweiterte LC-MS/MS-Analyse ermittelt. Aus den erhaltenen Werten wurde ein Konzentrations-Zeitverlauf-Diagramm erstellt und ein pharmakokinetisches Profil angefertigt (Abb. 3.5). Die Celecoxib-Plasmakonzentrationen unterlagen starken interindividuellen Schwankungen bezüglich der Resorption und Elimination, außerdem war anhand des Kurvenverlaufes ein schneller Abfall der Celecoxib-Konzentration erkennbar. Bei Gabe einer Celecoxib-Einzeldosis mit 25 mg/kg KG wurde nach 45 min eine mittlere maximale Plasmakonzentration mit $c_{\max}=1780$ ng/ml ($5 \mu\text{M}$) erreicht. Als pharmakokinetische Parameter wurde die Eliminationshalbwertszeit von Celecoxib im Mausplasma mit $t_{1/2}=1,85$ h bestimmt. Dies bewirkt, dass Celecoxib nach ca. 8-10 h vollständig aus dem Plasma eliminiert ist. Für die *in vivo*-Untersuchungen wurde daher eine zweimal tägliche Dosierung mit 25 mg/kg KG angewandt, um klinisch relevante Plasmaspiegel zu erreichen. Für die Dosiswahl von Rofecoxib und Naproxen lagen bereits Hinweise aus der Literatur vor. Daher wurden hier nur stichprobenartig pharmakokinetische Analysen durchgeführt und die Plasmakonzentrationen mittels LC-MS/MS-Messung bestimmt. Hierfür wurde Rofecoxib bzw. Naproxen bei Mäusen mit einer Einzeldosis von jeweils 10 mg/kg KG oral verabreicht. Von den Rofecoxib-Mäusen (n=5) wurde Blut im Abstand von 30 Minuten durch retrobulbäre Punktion (dreimal pro Maus) und zum Schluss über Herzpunktion entnommen. Nach der Applikation von Rofecoxib war innerhalb der ersten 30 Minuten eine maximale Plasmakonzentration mit 233 ng/ml ($0,74 \mu\text{M}$) erreicht worden. Rofecoxib wurde den Mäusen in den folgenden *in vivo*-Untersuchungen zweimal täglich verabreicht. Naproxen-behandelten Mäusen (n=6) wurde Blut 3 h nach der oralen Applikation durch finale Herzpunktion entnommen und die mittlere Naproxen-Plasmakonzentration mit $c=21,6 \mu\text{g/ml}$ ($94 \mu\text{M}$) bestimmt. Für die weiteren *in vivo*-Experimente wurde Rofecoxib und Naproxen wie Celecoxib aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeiten zweimal täglich appliziert.

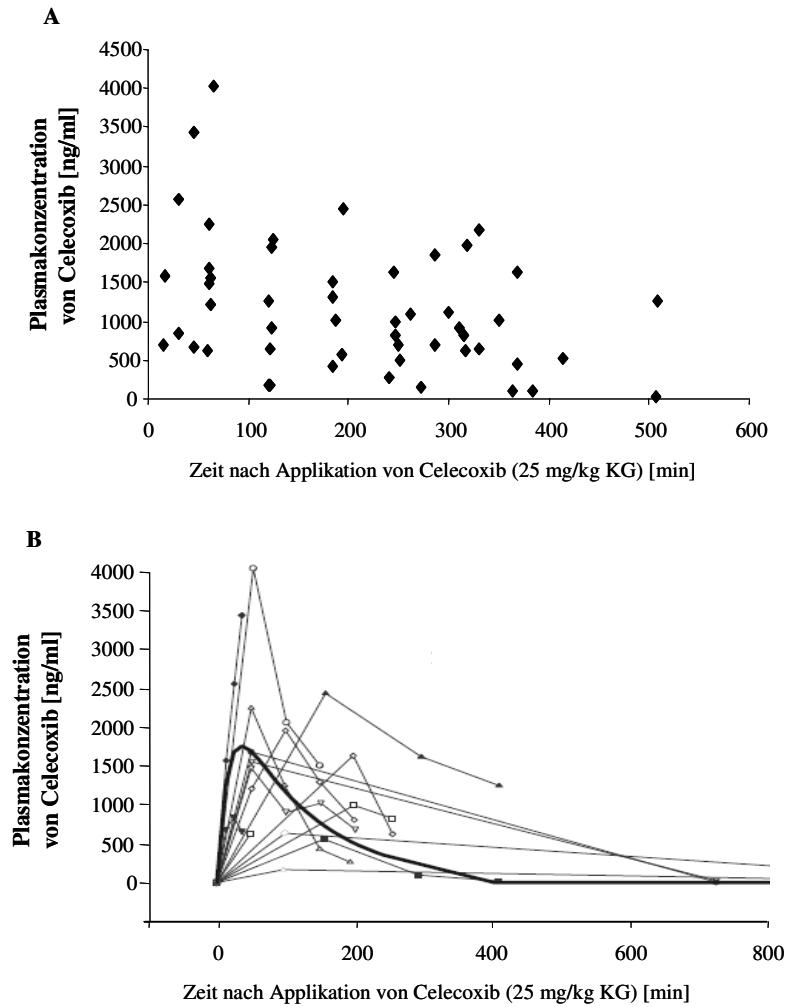


Abbildung 3.5: Celecoxib-Plasmakonzentrationen in der Maus. Wildtyp-Mäusen (n=14) wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (n=3-4 pro Maus) Blut nach oraler Applikation von Celecoxib (Einzeldosis: 25 mg/kg KG) durch retrobulbäre Punktion und finale Herzpunktion entnommen. Die Celecoxib-Plasmakonzentrationen wurden mittels LC-MS/MS-Analyse bestimmt und Konzentrations-Zeitkurven angefertigt (A). Ein pharmakokinetisches Profil wurde anhand des mittleren Konzentrations-Zeitverlaufes für Celecoxib erstellt (B).

3.3 Gewichtskontrolle und Gesundheitszustand der Versuchstiere

Die Versuchsmäuse wurden einmal pro Woche gewogen und pro Gruppe die mittlere Gewichtszunahme im Verlauf der Behandlungsdauer von 16 Wochen bestimmt (Tab. 3.1). Die mit Rofecoxib behandelten ApoE-defizienten Diät-Mäuse nahmen verglichen mit den unbehandelten Diät-Mäusen, statistisch signifikant weniger an Gewicht zu (56 %). In der Gruppe der ApoE-defizienten Mäuse, die normales Futter erhalten hatten, war die Gewichtszunahme bei den mit Celecoxib (65 %) oder mit Rofecoxib (34 %) behandelten Tieren im Vergleich mit Kontrolltieren statistisch signifikant geringer. Beim Vergleich der Naproxen-behandelten Mäuse mit den Kontrollmäusen traten keine

statistisch signifikanten Unterschiede im Körpergewicht auf. In der Gruppe der Wildtyp-Mäuse kam es unabhängig von der Behandlungsform zu keinerlei signifikanten Unterschieden in der Gewichtszunahme. Innerhalb der Gruppe von ApoE-defizienten Mäusen, die mit Rofecoxib behandelt wurden, waren vereinzelt Fälle aufgetreten, bei denen Mäuse im Kopf- und Nackenbereich sowie am Bauch ihr Fell verloren hatten. In der Diätgruppe war ebenfalls bei Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit Rofecoxib oder Naproxen an einzelnen Tieren ein partieller Fellverlust zu beobachten. Vor Ablauf der Versuchsdauer von 16 Wochen waren insgesamt vier Versuchstieren gestorben und drei Tiere vom Versuch ausgeschlossen worden. Betroffen waren eine normal gefütterte, mit Rofecoxib behandelte ApoE-defiziente Maus und drei mit Naproxen behandelte ApoE-defiziente Diät-Mäuse, die wegen Verdacht auf Niereninsuffizienz vorzeitig getötet werden mussten (nach tierärztlicher Begutachtung durch Herrn Dr. A. Theissen).

Tabelle 3.1: Gewichtskontrolle und Gesundheitszustand der Mäuse.

Gruppe	Behandlung	Anzahl n	Gewichtszunahme ± SD [g]	Relative Gewichtszunahme [%]	Anzahl n		
					Vorz. Tod	Haarausfall	
ApoE ^{-/-} Mäuse	Atherogene Diät	Unbehandelt/Diät	9	4,89 ± 1,36	100	-	-
		Celecoxib/Diät	13	4,77 ± 1,59	97,55	-	-
		Rofecoxib/Diät	18	2,72 ± 2,47	55,68 *	1	3
		Naproxen/Diät	12	3,67 ± 1,67	75,00	-	-
	Normales Futter	Kontrolle	18	5,44 ± 1,76	100	-	-
		Celecoxib	11	3,55 ± 1,81	65,12 *	-	-
		Rofecoxib	17	1,82 ± 1,59	33,49 ***	-	5
		Naproxen	11	4,18 ± 1,08	76,81	3	-
Wildtyp-Mäuse	Atherogene Diät	Unbehandelt/Diät	5	6,80 ± 1,10	100	-	-
		Celecoxib/Diät	5	8,40 ± 3,85	123,53	-	-
		Rofecoxib/Diät	8	6,00 ± 1,85	88,24	-	2
		Naproxen/Diät	8	7,75 ± 2,25	113,97	-	2
	Normales Futter	Kontrolle	4	10,00 ± 2,31	100	-	-
		Celecoxib	5	8,40 ± 1,10	84,00	-	-
		Rofecoxib	8	6,00 ± 1,74	60,00	-	-
		Naproxen	8	7,75 ± 1,80	75,50	-	-

Anmerkung: Angabe der statistischen Signifikanz mit * p≤0,05; *** p≤0,001. Abkürzungen: SD: Standardabweichung; Vorz. Tod: vorzeitiger Tod.

3.4 Urin-Analytik: Effektivität und Selektivität der COX-2-Inhibitoren

Zur Untersuchung der Effektivität und Selektivität der angewendeten Substanzen wurden die Urinspiegel der COX-2-vermittelten PGI₂- und der COX-1-vermittelten TXA₂-Synthese analysiert. Hierfür wurden im 24-h-Sammelurin aller Versuchstiere mittels ELISA-Test die Konzentrationen von 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} und 11-dehydro-TXB₂, welche die stabilen Metabolite von PGI₂ bzw. TXA₂ im Urin darstellen, gemessen und die relativen Konzentrationsunterschiede bestimmt (Abb. 3.6). Im Vergleich zu den Kontrolltieren (auf 100 % gesetzt) war die Synthese von 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} in ApoE-defizienten Diät-Mäusen, die mit Celecoxib, Rofecoxib oder Naproxen behandelt wurden, statistisch signifikant reduziert. Bei normal gefütterten Mäusen war unter allen drei eingesetzten NSAIDs die PGI₂-Synthese gehemmt, die aber nur unter Naproxen statistisch signifikant war. Die COX-1-vermittelte Synthese von 11-dehydro-TXB₂ wurde durch Celecoxib und Rofecoxib unabhängig vom Futtertyp nicht beeinflusst. Naproxen verminderte die TXA₂-Synthese statistisch signifikant in beiden Behandlungsgruppen der ApoE-defizienten Mäuse.

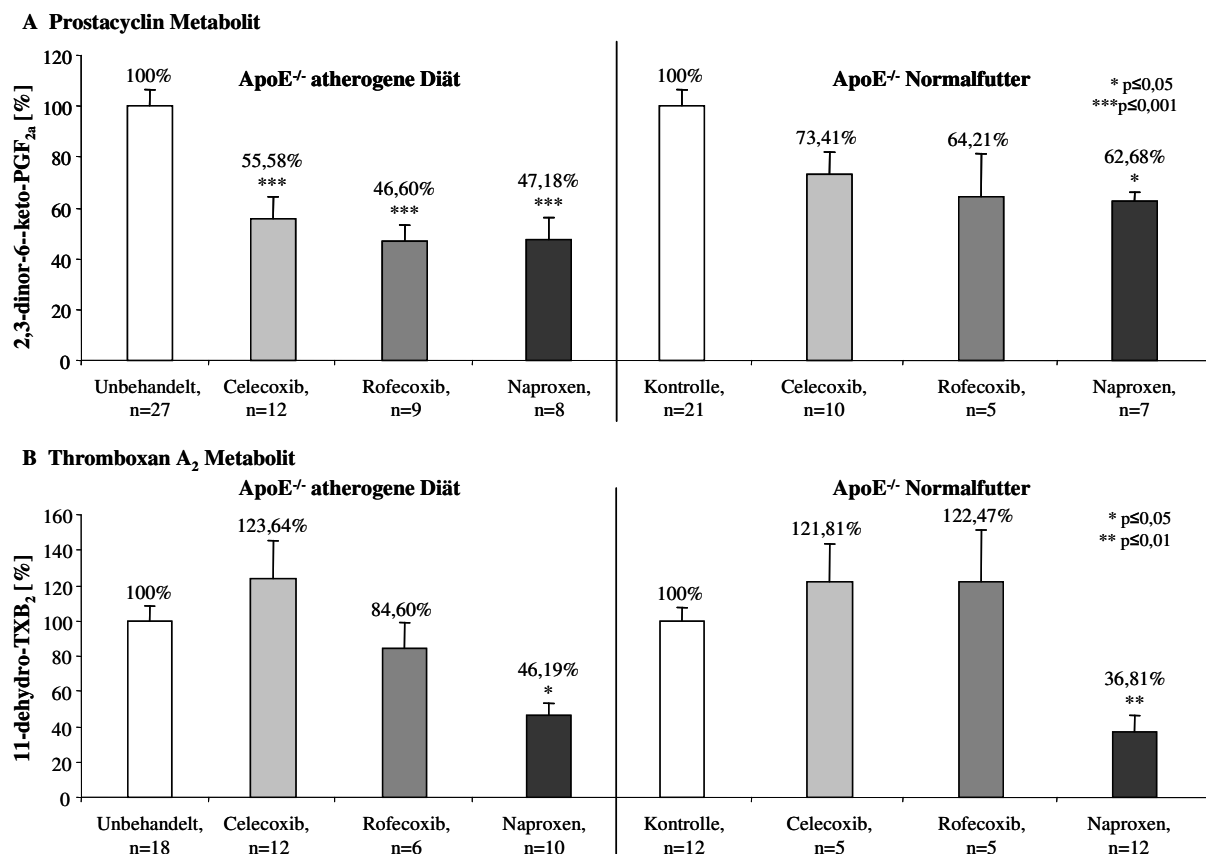
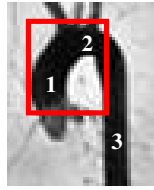


Abbildung 3.6: Urin-Analyse von Prostacyclin und Thromboxan A₂. Mittels ELISA-Analysen wurden die Konzentration von 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} (A) und 11-dehydro-TXB₂ (B) im 24-h-Sammelurin von ApoE-defizienten Mäusen, die für 16 Wochen atherogene Diät (links) oder Normalfutter (rechts) erhalten hatten, bestimmt. Die Kontrollgruppen wurden als 100 % gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM in (%).

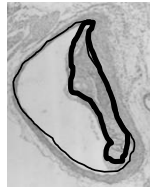
3.5 Quantifizierung der Plaques

Zur Untersuchung der Effekte von NSAIDs auf die Entstehung der Arteriosklerose wurden die Plaquegrößen in der *Aorta thoracica* analysiert. Von ApoE-defizienten Mäusen wurden Gefrierschnitte im Bereich der *Aorta ascendens* und dem *Arcus aortae* hergestellt, mit Hämatoxylin und Sudan-Rot histologisch gefärbt und die Plaquegröße quantifiziert (Abb. 3.7). Die Messung erfolgte verblindet mit Hilfe der Lucia-Image-Software, wobei die Gesamtfläche des Gefäßlumens und die Flächen der Plaques ermittelt wurden. Intimale Aufquellungen waren in die Berechnung der Plaquegröße einbezogen worden. Die Gesamtfläche des Gefäßlumens wurde auf 100 % gesetzt und die relative Plaquegröße über den ganzen Aortenabschnitt pro Gruppe ermittelt (Formel Abb. 3.7.A). Die Histologie der Aorta ist für alle Behandlungsgruppen in der Abbildung 5.7.B repräsentativ dargestellt. Für die graphische Darstellung der relativen Plaquegrößen wurden die Mittelwerte \pm SEM jeder Gruppe verwendet (Abb. 3.7.C). Alle Versuchsmäuse, die atherogenes Diätfutter erhalten hatten, wiesen starke Gefäßeinschränkungen auf, die nach Behandlung mit Celecoxib [(24,5 \pm 1,5) %; p=0,24] und Rofecoxib [(25,4 \pm 3,9) %; p=0,37] tendenziell kleiner waren als in der unbehandelten Kontrollgruppe [(35,4 \pm 3,8) %]. Die Behandlung mit Naproxen führte zu keinen messbaren Veränderungen der Plaquegröße [(33,4 \pm 4,0) %]. Die gemessenen Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. ApoE-defiziente Kontrollmäuse, die normales Futter erhalten hatten, entwickelten keine Veränderungen in der Aorta. Interessanterweise führte eine Behandlung mit Celecoxib in 4 von 5 Mäusen und mit Rofecoxib in 3 von 5 Mäusen zur Entwicklung von Plaques in der Aorta, während unter Naproxen keine arteriosklerotischen Veränderungen gemessen werden konnten. Die mittleren Plaquegrößen betragen unter Celecoxib (6,5 \pm 2,4) %; (p=0,007) und unter Rofecoxib (3,7 \pm 1,6) %; (p=0,25).

A Gefrierschnittherstellung



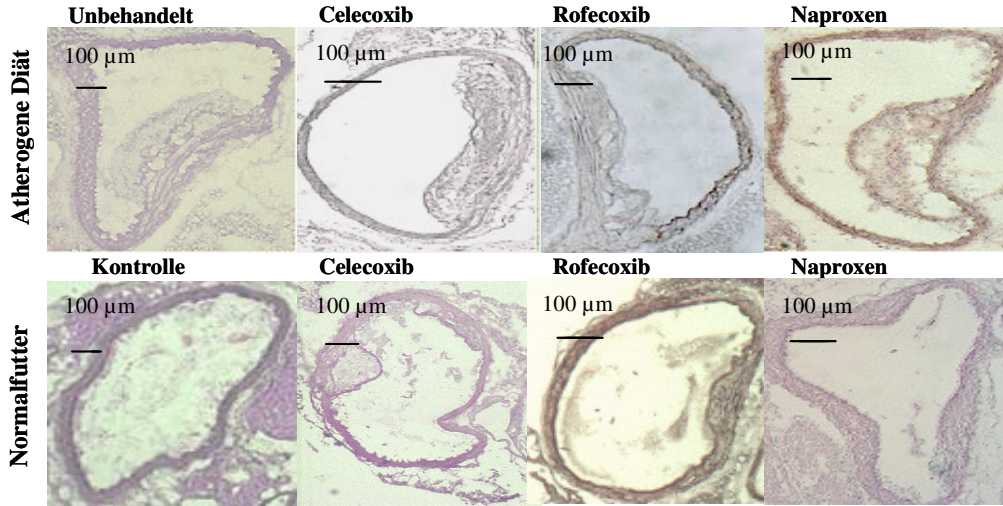
Aorta thoracica, mit:
 (1) *Aorta ascendens*,
 (2) *Arcus aortae* und
 (3) *Aorta descendens*.



Gefrierschnitt der *Aorta ascendens*.

$$\text{Plaquegröße in \%} = \left(\frac{\text{Plaquefläche} \cdot 100 \%}{\text{Gesamtgefäßfläche}} \right)$$

B Histologische Färbung



C Quantifizierung der Plaques

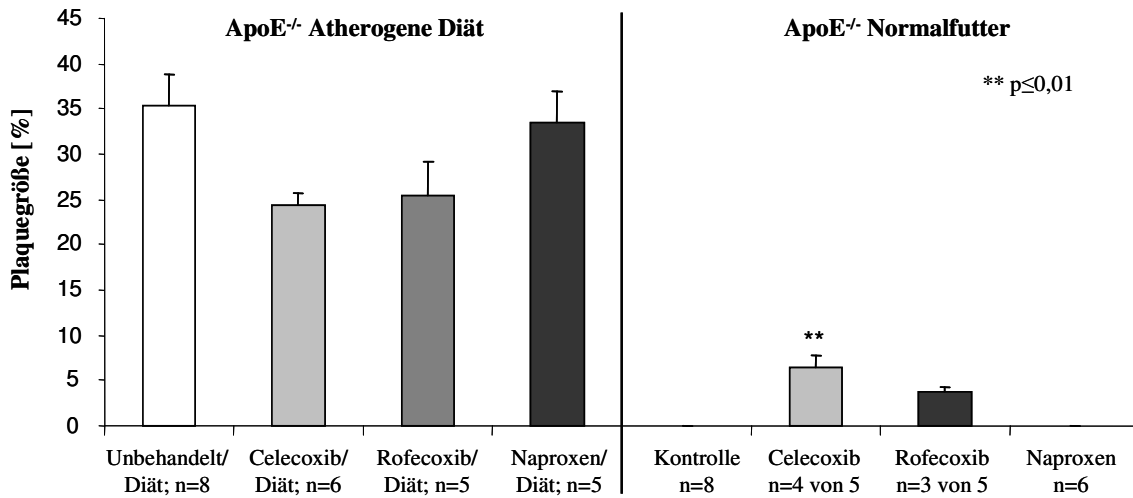


Abbildung 3.7: Quantifizierung der Plaquegröße. Von der *Aorta thoracica* wurden im Bereich der *Aorta ascendens* und dem *Arcus aortae* Gefrierschnitte mit einer Dicke von 10 µm hergestellt und die Plaquegrößen mittels der Lucia-Image-Software quantifiziert (A). Repräsentatives Ergebnis der histologischen Färbungen der Gefäßschnitte mit Hämatoxylin und Sudan-Rot zur morphologischen Begutachtung von jeder Behandlungsgruppe (B). Die relative Plaquegröße wurde über die angegebene Formel in A als Plaquegröße ± SEM in % bestimmt (C).

3.6 Quantitative Analyse der COX-2-Expression in atherogenen Plaques

3.6.1 COX-2-mRNA-Expressionsanalyse mittels Lasermikrodissektion und TaqMan™ RT-PCR

Zur quantitativen Analyse der COX-2-Expression wurde diese auf mRNA-Ebene in arteriosklerotischen Plaques von unbehandelten und mit Celecoxib, Rofecoxib oder Naproxen behandelten ApoE-defizienten Diät-Mäusen untersucht (Abb. 3.8). Hierfür wurden mittels Lasermikrodissektion (LMD) Gewebeariale ausgeschnitten und die RNA mittels quantitativer TaqMan™ RT-PCR analysiert. Die relative COX-2-mRNA-Expression wurde über die komparative Methode ermittelt (siehe Methodenteil 2.3.14.3). In allen Behandlungsgruppen war COX-2 in den Plaques nachweisbar. Nach einer Behandlung der ApoE-defizienten Diät-Mäuse mit Celecoxib [(113 ± 31) %] oder Rofecoxib [(162 ± 51) %] nahm die COX-2-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe [(100 ± 9) %] und Naproxen-Gruppe [(91 ± 18) %] tendenziell zu. Die Konzentrationsunterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

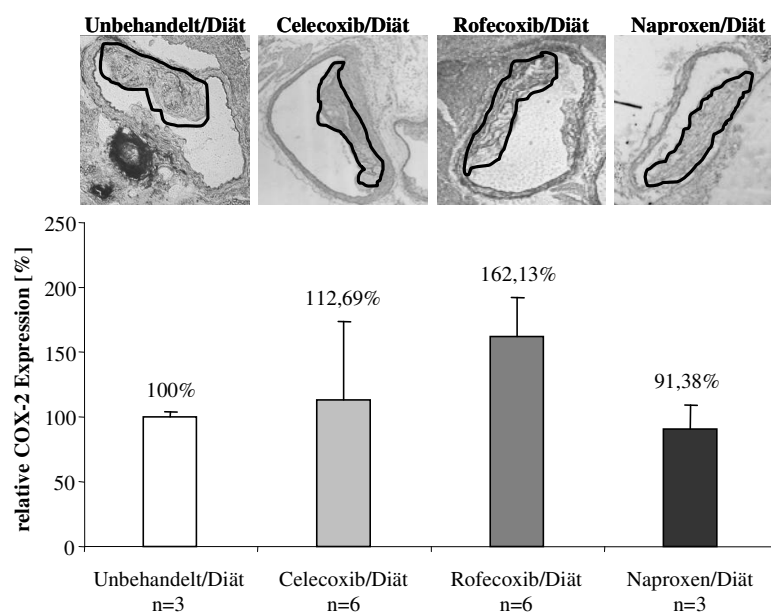


Abbildung 3.8: Quantitative Analyse der COX-2-mRNA-Expression. Aus 14 µm dicken Gefrierschnitten von Diät-Mäusen wurden arteriosklerotische Plaques mittels Lasermikrodissektion wie angezeichnet ausgeschnitten (oben). Die Plaque-RNA wurde isoliert und die COX-2-mRNA-Expression wurde mittels TaqMan™ RT-PCR über die komparative Methode $2^{-\Delta\Delta CT}$ quantifiziert (unten). Die COX-2-Konzentrationen der unbehandelten Tiere wurden dabei auf 100 % gesetzt. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche. Angabe der relativen COX-2-mRNA-Konzentration ± SEM in %.

3.6.2 COX-2-Protein-Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz

Neben der mRNA- wurde die Protein-Expression von COX-2 in Plaques an Gefrierschnitten der *Aorta thoracica* von ApoE-defizienten Diät-Mäusen mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 3.9). In den Plaques aller Behandlungsgruppen war eine COX-2-Expression nachzuweisen. Die Zellkerne aller Zellen wurden mittels DAPI angefärbt, um COX-positive von COX-negativen Zellen unterscheiden zu können. Die Autofluoreszenz der elastischen Fasern der Arterie sind in allen Färbungen zur besseren Orientierung erhalten worden. Die Bilder zeigen repräsentativ Fluoreszenz-Färbungen von COX-2-exprimierenden Zellen innerhalb der angezeigten Plaqueregion. Eine statistisch signifikante Änderung der COX-2-Expression durch Celecoxib, Rofecoxib oder Naproxen verglichen mit den unbehandelten Kontrollen konnte jedoch in diesem Modell nicht nachgewiesen werden.

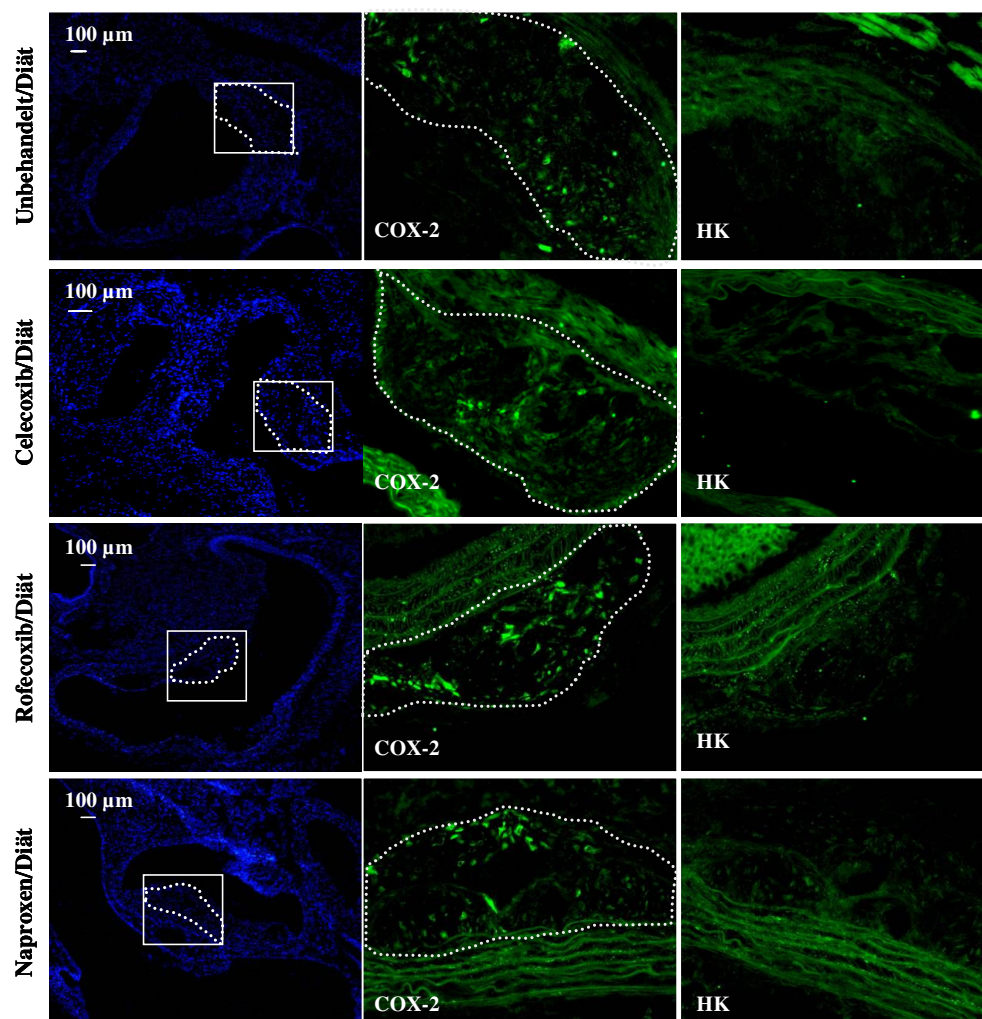


Abbildung 3.9: Quantitative Analyse der COX-2-Protein-Expression mittels Immunfluoreszenz. Repräsentative Färbung COX-2-exprimierender Zellen (mittig). Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt (links). Am Fluoreszenz-Mikroskop wurden die Gefäßschnitte unter Anregung der entsprechenden Wellenlängen mit Hilfe des „Nikon Kappa Image Base“-Photoprogramms aufgenommen (20- und 80-fache Vergrößerung; DAPI 365 nm, Blau; COX-2 Alexa Fluor 488 nm, Grün). Die Kontrollfärbungen (rechts) dienen als Hintergrundkontrolle und zeigen ausschließlich eine autofluoreszente Strahlung der elastischen Fasern und des Bindegewebes. (Abkürzungen: COX-2: Cyclooxygenase-2; HK: Hintergrundkontrolle.)

3.7 Plasma-Analytik: Effekte von COX-Inhibitoren auf Blutfettwerte

Die Messung der Blutfettwerte diente zur Darstellung des atherogenen Risikos und zum Aufdecken potentieller Effekte von NSAIDs auf den Lipidblutspiegel. Die mittleren Plasmawerte für Triglyceride, Cholesterin, LDL und HDL wurden bei jeder Gruppe tabellarisch (Tab. 3.2) und graphisch dargestellt (Abb. 3.10). ApoE-defiziente Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen höhere Lipidblutspiegel für Cholesterin, LDL aber auch für HDL auf. Die Fütterung mit atherogener Diät führte in allen Behandlungsgruppen zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Plasmawerte von Cholesterin, LDL aber auch HDL, was auf die Depletion des Gens ApoE zurückzuführen ist. In der Gruppe der ApoE-defizienten Diät-Mäuse unterschieden sich die Lipidkonzentrationen in den einzelnen Behandlungsgruppen statistisch nicht signifikant. Es konnte lediglich eine tendenzielle Zunahme der Cholesterin-, LDL- und HDL-Spiegel nach der Behandlung mit Celecoxib und Rofecoxib festgestellt werden. In Wildtyp-Mäusen, die atherogenes Diätfutter erhalten hatten, waren nach Naproxen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen die Triglycerid- und LDL-Konzentration statistisch signifikant erhöht. In der normal gefütterten Gruppe der Wildtyp-Mäuse waren statistisch signifikante Erhöhungen in den Triglycerid-, Cholesterin- und LDL-Plasmaspiegel unter Rofecoxib und Naproxen verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe messbar.

Tabelle 3.2: Plasma-Lipidkonzentration.

Gruppe	Behandlung	Anzahl n	Plasmakonzentration ± SEM [mg/dl]				
			Triglyceride	Cholesterin	LDL	HDL	
ApoE ^{-/-} Mäuse	Atherogene Diät	Unbehandelt/Diät	20	98,00 ± 4,72	988,50 ± 50,34	707,25 ± 37,86	261,65 ± 22,99
		Celecoxib/Diät	10	87,00 ± 12,73	1185,00 ± 119,75	772,60 ± 79,55	395,00 ± 51,23
		Rofecoxib/Diät	7	92,50 ± 10,13	1143,75 ± 89,68	728,88 ± 75,34	396,38 ± 55,34
		Naproxen/Diät	9	102,22 ± 13,95	1015,56 ± 89,18	671,78 ± 44,69	323,33 ± 54,98
	Normalfutter	Kontrolle	15	76,00 ± 5,06	306,00 ± 16,75	196,80 ± 17,40	85,20 ± 13,24
		Celecoxib	5	33,75 ± 10,45	266,25 ± 14,89	182,25 ± 11,85	105,38 ± 13,14
		Rofecoxib	6	49,17 ± 4,47	380,00 ± 28,67	231,83 ± 12,32	138,50 ± 21,18
		Naproxen	5	52,00 ± 7,16	307,20 ± 42,65	190,40 ± 35,66	106,40 ± 26,53
Wildtyp-Mäuse	Atherogene Diät	Unbehandelt/Diät	5	52,50 ± 5,45	122,50 ± 4,15	12,00 ± 4,06	100,00 ± 0,00
		Celecoxib/Diät	5	74,00 ± 6,07	132,00 ± 9,12	19,20 ± 6,16	98,00 ± 5,22
		Rofecoxib/Diät	5	110,00 ± 5,66	134,00 ± 10,81	54,00 ± 4,35	58,00 ± 12,13
		Naproxen/Diät	5	112,00 ± 1,79	132,00 ± 5,93	31,60 ± 1,99	78,00 ± 5,22
	Normalfutter	Kontrolle	5	58,00 ± 8,67	48,00 ± 1,79	5,80 ± 2,41	32,00 ± 3,35
		Celecoxib	5	54,00 ± 3,58	36,00 ± 4,56	4,40 ± 1,71	26,00 ± 2,19
		Rofecoxib	5	120,00 ± 9,38	82,00 ± 7,16	26,00 ± 1,88	32,00 ± 5,22
		Naproxen	5	122,00 ± 4,38	90,00 ± 4,90	27,60 ± 1,04	38,00 ± 3,35

Abkürzungen: SEM: Standardabweichung vom Mittelwert (*standard error of the mean*); LDL: *low-density lipoprotein*; HDL: *high density lipoprotein*.

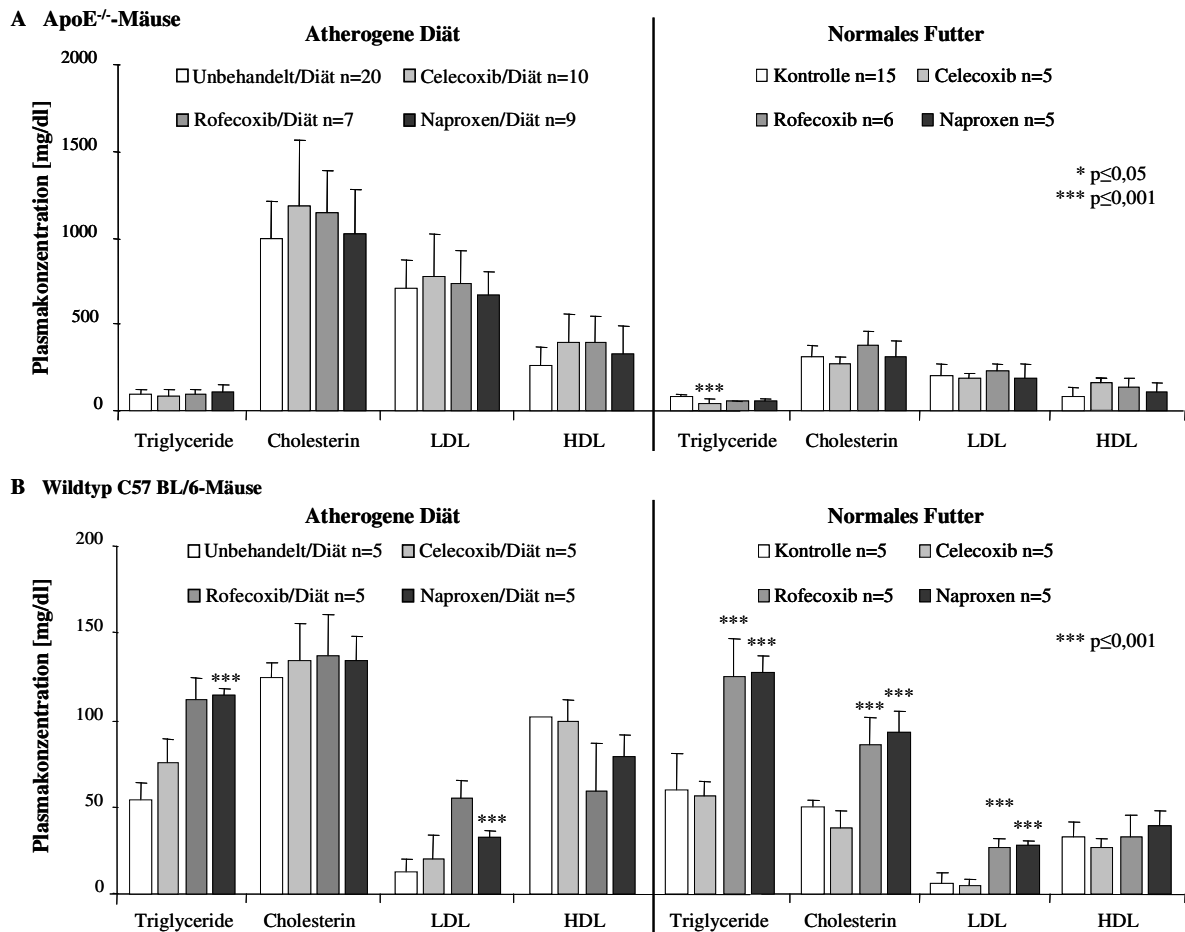


Abbildung 3.10: Plasma-Analyse von Blutfettwerten. Die Konzentrationen von Triglyceriden, Cholesterin, LDL und HDL wurden spektrophotometrisch im Plasma von ApoE^{-/-} (A) und Wildtyp-Mäusen (B) nach 16 Wochen Fütterung mit atherogener Diät (grau unterlegt, linke Darstellung) oder normalem Futter (rechte Darstellung) bestimmt. Darstellung der Werte als gemittelte Plasmakonzentration ± SD.

3.8 Analyse von Proteinen des Cholesterinstoffwechsels

3.8.1 HMG-CoA-Reduktase Aktivitäts-Assay

Die Analyse der Blutfettwerte zeigte, dass unter der Langzeit-Behandlung mit Celecoxib und Rofecoxib die Plasmakonzentrationen von Cholesterin, LDL und HDL tendenziell anstiegen. Aufgrund dieser Befunde wurde zusätzlich auf Proteinebene untersucht, ob Coxibe einen direkten Einfluss auf den Cholesterinstoffwechsel haben und dadurch das atherogene Risiko potentiell erhöhen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Cholesterinbiosynthese ist die Reduktion von 5-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA (HMG-CoA) zu Mevalonat durch die HMG-CoA-Reduktase (HMG-CoA-R). Die Aktivität von HMG-CoA-R wurde in Mikrosomen aus Lebergewebe von behandelten und unbehandelten ApoE-defizienten Mäusen gemessen (Abb. 3.11). In der Literatur gab es Hinweise auf eine circadiane Abhängigkeit dieses Enzyms (Ness et al. 2005), so dass im Vorfeld

die Aktivitätsunterschiede an Leberproben getestet wurden, die in der Nacht (2 Uhr) oder am Tag (14 Uhr) aus Mäusen entnommen worden waren (Abb. 3.11.A). Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, so dass die folgenden Untersuchungen an Mäusen vorgenommen werden konnten, die tagsüber getötet wurden. Die Behandlung der Versuchstiere mit Celecoxib, Rofecoxib oder Naproxen führte zu keinen Veränderungen der HMG-CoA-R-Aktivität in den Versuchstieren, die normales Futter erhalten hatten (Abb. 3.11.B). In der Gruppe der Diät-Mäuse war unter Celecoxib verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe ein schwacher statistisch signifikanter Anstieg der HMG-CoA-R-Aktivität nachzuweisen.

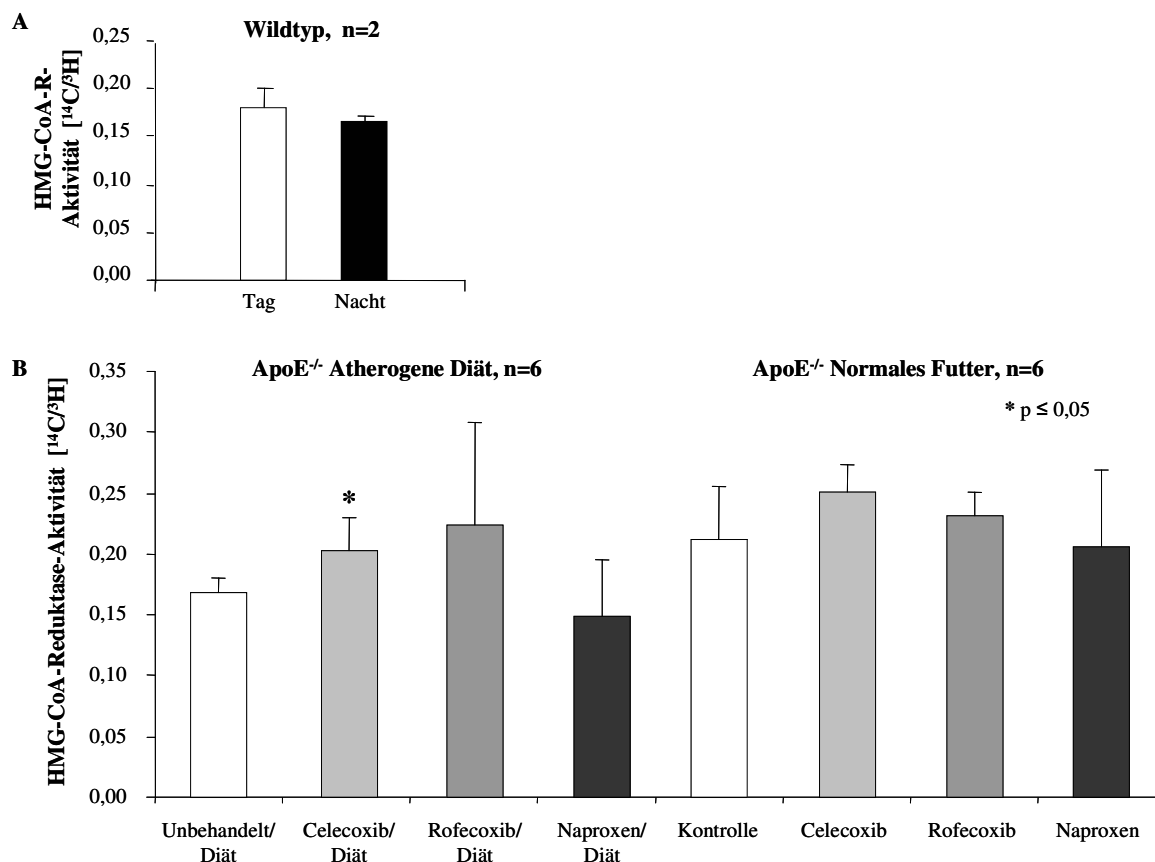


Abbildung 3.11: HMG-CoA-Reduktase-Aktivitäts-Assay. In Wildtyp-Mäusen, die am Tag oder in der Nacht getötet wurde, zeigten sich keine circadiane Unterschiede in der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase (A). In ApoE^{-/-} Mäusen, die atherogene Diät (links) oder normales Futter (rechts) erhalten hatten, wurde die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in Lebermikrosomen gemessen. Von jeweils n=6 Tieren wurde der HMG-CoA-R Aktivitäts-Assay in vier unabhängigen Messungen durchgeführt (B). Angegeben ist der Mittelwert ± SD in %.

3.8.2 RNA-Analytik von HMG-CoA-R, ACAT, CYP 7a und LDL-R

Um die Effekte der Coxibe auf die Blutfettwerte weiter zu untersuchen, wurden auf RNA-Ebene die Konzentrationen von Proteinen aus Leberproben, die am Cholesterinstoffwechsel beteiligt sind, mittels RT-PCR analysiert. Folgende Proteine wurden auf mRNA-Ebene in ApoE-defizienten Mäusen, die

atherogene Diät oder normales Futter erhalten hatten, untersucht: HMG-CoA-R, welches als Schlüsselenzym den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Cholesterinbiosynthese katalysiert; Acylcholesterin-Acyltransferase (ACAT), welche freies Cholesterin in Cholesterinester überführt, die als Lipidtröpfchen in der Leber oder der Haut gespeichert werden; Cytochrom P450 7a (CYP 7a), welches Cholesterin in der Leber zu Gallensäure abbaut und LDL-Rezeptoren (LDL-R), welche die zelluläre Cholesterinaufnahme steuern und dadurch das atherogene Risiko direkt beeinflussen. Unabhängig von der Behandlung waren keine statistisch signifikanten Änderungen der RNA-Expression von den untersuchten Proteinen aufgetreten (Abb. 3.12). Die relative Konzentration der HMG-CoA-R nahm nach Behandlung mit NSAIDs in Diät-Mäusen tendenziell ab und in Mäusen mit normalem Futter nach Celecoxib und Rofecoxib zu (Kontrollmäuse jeweils auf 100 % gesetzt). Niedrigere Spiegel an absoluter HMG-CoA-R-Konzentration wurden in Diät-Mäusen verglichen mit Normalfutter-Mäusen ermittelt.

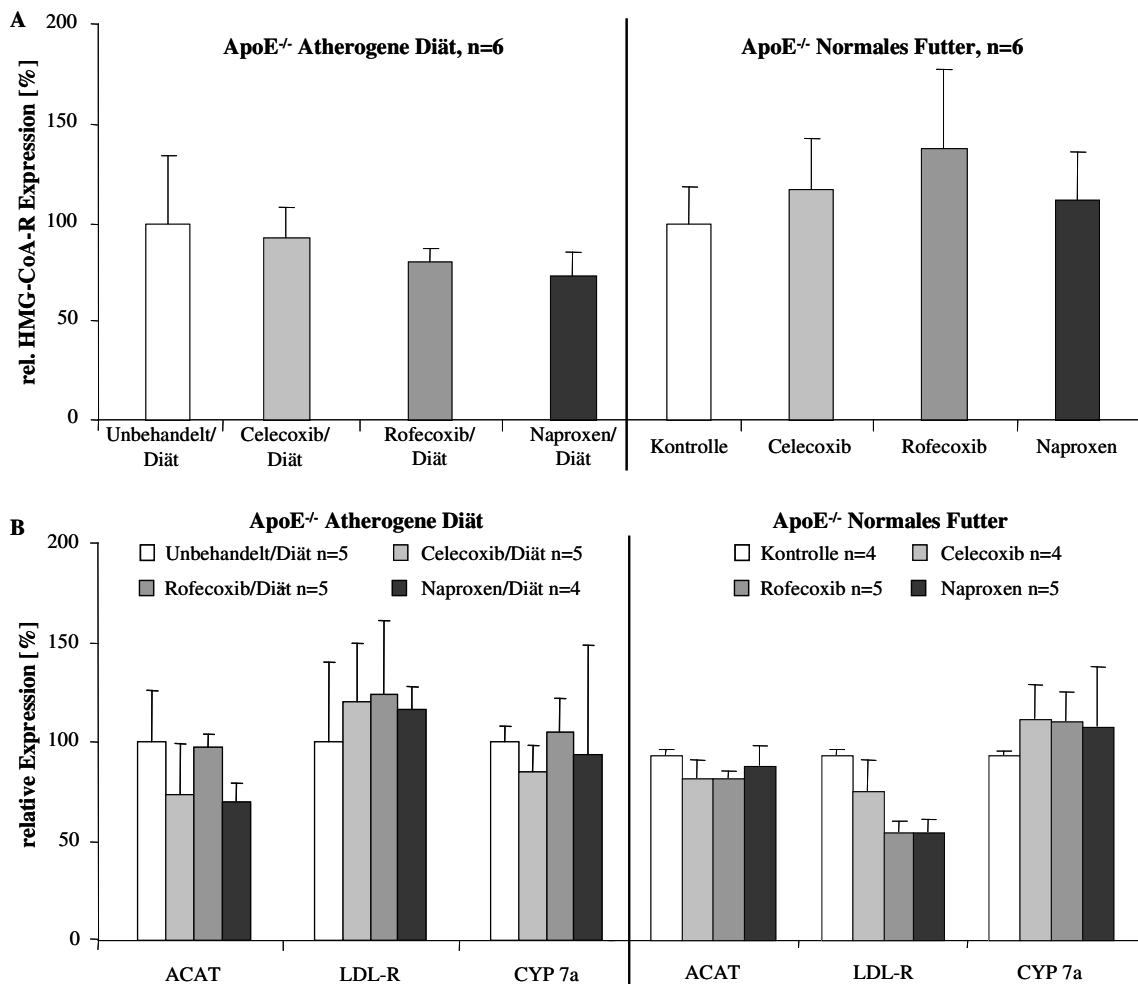


Abbildung 3.12: RT-PCR-Analytik von Cholesterinstoffwechsel-Proteinen. Die relative Expression von HMG-CoA-R wurde mittels one-step RT-PCR in Leberproben von ApoE^{-/-} Mäusen, die atherogene Diät oder normales Futter erhalten hatten, quantifiziert (A). RNA aus Leber von ApoE^{-/-} Mäusen, mit atherogener Diät (links) oder normalem Futter (rechts), wurde mittels RT-PCR analysiert und die relativen Expressionen von Acylcholesterin-Acyltransferase (ACAT), *low density* Lipoprotein-Rezeptor (LDL-R), und Cytochrom P450 7a (CYP 7a) in den behandelten Mäusen als prozentuale Änderung verglichen mit den unbehandelten Kontrollmäusen ermittelt (B). Angegeben ist der Mittelwert ± SD in %.

4 Diskussion

Nach der Marktrücknahme einiger Coxibe (Rofecoxib, Valdecoxib) stehen die NSAIDs bezüglich ihrer kardiovaskulären Sicherheit im Fokus kontroverser Diskussionen. In verschiedenen klinischen Studien wurde ein erhöhtes Risiko für thrombotische Ereignisse unter einigen Coxiben sowie traditionellen NSAIDs beobachtet (Bombardier et al. 2000; Bresalier et al. 2005; Johnsen et al. 2005; Solomon et al. 2005; Kearney et al. 2006). Im Zusammenhang mit den kardiovaskulären Nebenwirkungen, die insbesondere unter Coxiben bei Langzeitbehandlungen von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Osteoarthrose aufgetreten waren, wurden die Effekte von NSAIDs bei arteriosklerotischen Erkrankungen neu überdacht. Diese chronischen Entzündungserkrankungen sind an sich mit einer verkürzten Lebenserwartung verbunden, wobei schwerwiegende kardiovaskuläre Erkrankungen wie akuter Myokardinfarkt, Schlaganfall oder Herzinsuffizienz als Haupttodesursache gelten (Wolfe et al. 2003) und arteriosklerotische Veränderungen vermutlich eine Rolle spielen. Bis jetzt ist noch nicht geklärt worden, ob die Behandlung mit Entzündungshemmern den Status der Arteriosklerose verschlechtert oder verbessert, da in dieser Hinsicht bisher keine klinischen Studien durchgeführt wurden. Auf der einen Seite könnten NSAIDs durch Hemmung der vaskulären Entzündung und durch Inhibition der COX-2-Aktivität in den Plaques protektive Eigenschaften bezüglich der Initiation und Progression der Arteriosklerose haben. Andererseits könnte durch den Einsatz COX-2-selektiver Inhibitoren das homöostatische COX-1/COX-2-Gleichgewicht zwischen pro- und antithrombotischen Faktoren zur Seite prothrombotischer Ereignisse verschoben werden. In mehreren Studien wurden die Wirkungen von NSAIDs auf die Arteriosklerose in Tier-Modellen untersucht, lieferten jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Dabei bewirkten die verwendeten Substanzen sowohl proatherogene als auch antiatherogene Effekte, die durch gesteigerte bzw. verminderte Plaquegrößen gekennzeichnet waren, oder nahmen keinen Einfluss auf die Plaques (Burleigh et al. 2002; Bea et al. 2003; Rott et al. 2003; Burleigh et al. 2005). Diese inkonsistenten Beobachtungen wurden auf das unterschiedliche Studiendesign zurückgeführt, das sich in der Behandlungsdauer, dem Maus-Modell, in der Diätzusammensetzung und in der Darreichungsform der Pharmaka voneinander unterschied. Die Analyse der genauen Wirkungen von NSAIDs auf die Arteriosklerose und dabei insbesondere auf den Prozess der Initiation und der Progression bleibt daher relevant.

4.1 Charakterisierung der Plaques und der atherogenen Proteine

Die Effekte von ausgewählten NSAIDs auf das vaskuläre System wurden anhand von *in vivo*-Untersuchungen an einem transgenen Mausmodell untersucht. Dazu wurde das in der Literatur beschriebene experimentelle ApoE knock-out Mausmodell gewählt, da bei diesen Mäusen

Arteriosklerose durch fettreiche Nahrung spontan induziert werden kann (Zhang et al. 1992). Nakashima et al. beschrieben die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques in ApoE-defizienten Mäusen über einen Zeitraum von 0 bis 40 Wochen (Nakashima et al. 1994). Die arteriellen arteriosklerotischen Läsionen von ApoE-defizienten Mäusen sind morphologisch mit denen in humanen Arterien vergleichbar (Xu et al. 2001; Rikitake et al. 2002).

Die ApoE-defizienten Mäuse entwickelten nach einer 16-wöchigen Fütterung mit atherogener Diät im Alter von 22 Wochen Arteriosklerose, was durch histologische Färbungen an Gefrierschnitten der Aorta nachgewiesen wurde. Die Wildtyp-Mäuse entwickelten dagegen keine Arteriosklerose, was unabhängig von der Behandlung war. ApoE-defiziente Kontroll-Mäuse, die normales Futter erhalten hatten, bildeten ebenfalls keine Plaques aus. Der Zeitpunkt der Beobachtung sowie die Morphologie der Plaques führten zu der Annahme, dass die atherogenen Plaques, die in den ApoE-defizienten Diät-Mäusen nachgewiesen wurden, ein frühes Stadium der Arteriosklerose markieren. Die frühen intimalen Läsionen, sog. „Fatty Streaks“ oder intimale Xanthoma, bestehen morphologisch hauptsächlich aus Makrophagen, die zunehmend modifiziertes LDL über den „Scavenger“-Rezeptor aufnehmen, sich in Schaumzellen umwandeln und im subendothelialen Bereich akkumulieren (Virmani et al. 2000). Anhand von *in situ*-Proteomikanalysen mittels MELK-Technologie wurden in den frühen Läsionen der ApoE-defizienten Diät-Mäuse proinflammatorische und für die Arteriogenese relevante Proteine charakterisiert. Zu diesen zählten CD40, COX-1, COX-2, PGI₂-S, ICAM, NF-κB p50, NF-κB p65 und VEGF. Diese Proteine wurden von Makrophagen, B-Lymphozyten, VSMCs (VSMCs; *vascular smooth muscle cells*) und aktiviertem Endothel exprimiert und sind mit der Einleitung der Arteriogenese schon früher in Verbindung gebracht worden (Hansson 1998; Hansson et al. 2002). CD40 ist ein Oberflächenmarker von bspw. B-Lymphozyten, aktiviertem Endothel und von Makrophagen, die bei der Initiation arteriosklerotischer Prozesse eine besondere Rolle spielen (Gerrity 1981; Lee et al. 1999; Lutgens et al. 1999). Makrophagen tragen aktiv zur Progression der Arteriosklerose bei, indem sie eine Vielzahl von atherogenen Proteinen und Entzündungsmediatoren exprimieren (Millonig et al. 2002). Die Bindung des CD40-Liganden CD154 an den CD40-Rezeptor führt in Makrophagen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, B- und T-Zellen zur Einleitung der Transkription einer Vielzahl von Genen. Dies führt zur Expression von Mediatoren, die an der Arteriogenese beteiligt sind. Dazu gehören u.a. Adhäsionsproteine, Cytokine, Matrix-Metalloproteinasen und Gewebefaktoren, welche die Arteriogenese weiter fördern. In Endothelzellen wurde über CD40-CD154 die Proteinexpression von VEGF eingeleitet (Flaxenburg et al. 2004), was in unstabilen arteriosklerotischen Plaques humaner Koronararterien Angiogenese induzierte und Apoptose inhibierte (Chen et al. 2005). In Mäusen führte die Blockade der CD40-CD154-vermittelten Aktivierung von Makrophagen zu einer Inhibition der Progression der Arteriosklerose in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen (Mach et al. 1998) und führte über die Ausbildung von fibrösen Kappen zur Stabilisierung der Plaques in ApoE-defizienten Mäusen (Lutgens et al. 2002). Eine Inhibition des CD40-Signaltransduktionsweges wird daher als Möglichkeit für einen neuen klinischen Angriffspunkt

diskutiert, wodurch die Destabilisierung von Plaques sowie deren Ruptur verhindert und der Status der Arteriosklerose allgemein verbessert werden soll. In der Literatur wird beschrieben, dass in einem späten Stadium der Arteriosklerose Makrophagen keine COX-2 mehr exprimieren, weil sie zu funktionslosen Schaumzellen umgewandelt wurden (Burleigh et al. 2002; Linton et al. 2004), so dass davon ausgegangen werden konnte, dass das gewählte Studiendesign zur Ausbildung früher intimaler Läsionen mit aktiven, COX-2-exprimierenden Makrophagen führte. Proteinexpressionen von COX-1 und COX-2 wurden in humanen Arterien nachgewiesen, wobei COX-1 vornehmlich in gesunden Endothelien und SMCs exprimiert wurde, während COX-2 ausschließlich von Zellen, die in atherogenen Läsionen akkumuliert waren, wie Endothelzellen, SMCs, Monozyten und Makrophagen exprimiert wurde (Baker et al. 1999). Die MELK-Analysen bestätigten, dass in den Plaques markierte COX-2 hauptsächlich von Makrophagen, VSMCs und Endothelien exprimiert wurde. COX-2 induziert die Synthese von proinflammatorischen Prostaglandinen und ist dadurch an der Unterhaltung des Entzündungsstatus bei der Arteriosklerose von Bedeutung. In den atherogenen Plaques der ApoE-defizienten Mäuse wurde sowohl COX-1 als auch COX-2 exprimiert, was den Entzündungscharakter der gefundenen arteriellen Veränderungen bestätigte. Des Weiteren wurde an Gefrierschnitten der Aorta von ApoE-defizienten Mäusen eine verstärkte Expression von ICAM im Endothel oberhalb der Plaqueregion gezeigt. ICAM wird in der frühen Phase der Arteriogenese hauptsächlich von Endothelien exprimiert, induziert die Adhäsion von Leukozyten und fördert dadurch den Krankheitsverlauf der Arteriosklerose (Nakashima et al. 1998). In ApoE-defizienten Mäusen führte die zusätzliche Deletion des Gens für ICAM zu einer signifikanten Reduktion atherogener Plaques (Kitagawa et al. 2002). NF- κ B spielt bei Entzündungserkrankungen eine besondere Rolle und reguliert in der Arteriosklerose die induzierbare Transkription einer Vielzahl von Genen, die für entzündungsrelevante Proteine kodieren. NF- κ B wurde in den ApoE-defizienten Mäusen innerhalb der Plaques als Heterodimer aus p50 und p65 gefärbt und wurde in humanen atherogenen Plaques ebenfalls nachgewiesen (Brand et al. 1996). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Plaque-Charakterisierungen und der *in situ*-Proteomikanalysen, dass die Behandlung der ApoE-defizienten Mäuse mit atherogener Diät zur Entwicklung früher Läsionen in der Aorta führten und Proteine in den Plaques exprimiert wurden, die für die Pathogenese der Arteriosklerose bedeutsam sind. Damit waren mit dem gewählten Studiendesign die Grundvoraussetzungen erfüllt, um die Effekte der COX-2-selektiven Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib und des nichtselektiven NSAIDs Naproxen auf die frühen Veränderungen der Arteriogenese zu untersuchen.

4.2 Klinisch relevante Plasmakonzentrationen und die Verträglichkeit der NSAIDs

Die orale Behandlung der Versuchstiere erfolgte mit Celecoxib, Rofecoxib und Naproxen in Dosierungen, mit denen klinisch relevante Plasmakonzentrationen erreicht wurden. Für Celecoxib wurde mit einer Dosis von 25 mg/kg KG als maximale Plasmakonzentration 5 µmol/l erreicht. Verglichen mit Literaturdaten (1,4-7,7 µmol/l nach Dosierungen von 100-800 mg Celecoxib) sind diese Werte klinisch relevant (McAdam et al. 1999; Davies et al. 2000). Die Halbwertszeit von Celecoxib betrug im Mausplasma 2 h und ist verglichen mit der Halbwertszeit im humanen Plasma mit 8-11 h (Burian et al. 2003) sehr kurz, so dass eine Applikation der Substanz zweimal täglich vorgenommen wurde. Für Rofecoxib wurde mit einer Dosis von 10 mg/kg KG eine Plasmaspitzenkonzentration von 0,74 µmol/l erreicht, was mit humanen Plasmakonzentration (0,97 µmol/l) nach einer Dosis von 25 mg vergleichbar war (Fachinformation Mai 2004, VIOXX[®], Suspension 5 mg/ml, Merck) und somit ebenfalls im klinisch relevanten Konzentrationsbereich lag. Nach der oralen Applikation von Naproxen mit einer Dosis von 10 mg/kg KG wurden Plasmakonzentrationen von 94 µmol/l ermittelt. Im humanen Plasma wurden mit $c_{\max} = 35-40 \mu\text{g/ml}$ bei einer Einmaldosis von 250 mg Naproxen vergleichsweise höhere maximale Plasmakonzentrationen (152-174 µmol/l) nach 2-4 h gemessen (Fachinformation Februar 2005, Proxen[®], Roche). Als therapeutisch wirksame Plasmakonzentration von Naproxen wird in derselben Fachinformation 15 µg/ml als erforderlich angesehen, was 65 µmol/l entspricht und zeigte, dass die ermittelten Plasmakonzentrationen in der Maus in einem pharmakologisch relevanten Bereich lagen. Für Naproxen wurden keine höheren Dosierungen aufgrund der gastrointestinalen Toxizität und des langen Behandlungszeitraums von 16 Wochen angewendet. Die Behandlungen der Versuchsmäuse erfolgten mit 2x25 mg/kg KG für Celecoxib und jeweils 2x10 mg/kg KG für Rofecoxib und Naproxen. Vereinzelt waren unerwünschte Effekte nach einer Behandlungsdauer von 4-10 Wochen aufgetreten, die als Gewichtsreduktion, Fellverlust, vorzeitiges Versterben oder Ausschluss aufgrund renaler Funktionsstörungen dokumentiert wurden. Unter der Behandlung mit Rofecoxib nahmen ApoE-defiziente Mäuse beim Vergleich mit den unbehandelten Kontrollmäusen statistisch signifikant weniger an Gewicht zu. In der gleichen Behandlungsgruppe wurde ein partieller Fellverlust an ApoE-defizienten Mäusen beobachtet, der ebenfalls bei Wildtyp-Mäusen unter Rofecoxib oder Naproxen aufgetreten war. In der Literatur wurden solche Auffälligkeiten an Versuchstieren nach einer Langzeitbehandlung mit NSAIDs bisher nicht beschrieben. Aufgrund von Niereninsuffizienz mussten vereinzelt Mäuse, die mit Naproxen oder Rofecoxib behandelt wurden, vorzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen werden. Die chronische COX-1-Inhibition unter Naproxen und die chronische COX-2-Inhibition unter Rofecoxib führte zu der Unterdrückung der Synthese von protektiven Prostanoiden, insbesondere von PGE₂, welche an der Aufrechterhaltung der Nierenfunktion beteiligt sind und wurde

schon früher mit Nierenfunktionsstörungen in Verbindung gebracht (Schwartz et al. 2002; Stichtenoth et al. 2005).

4.3 Prostacyclin- und Thromboxan A₂-Biosynthese in der Arteriosklerose

Thromboxan (TXA₂) und Prostacyclin (PGI₂) sind zwei der wichtigsten Vertreter der Prostanoiden, die im kardiovaskulären System eine bedeutende Rolle spielen. In Patienten mit Arteriosklerose wurden im Vergleich zu gesunden Probanden höhere Konzentrationen an TXA₂ und PGI₂ gemessen, die auf eine gesteigerte Biosynthese durch COX-1 in Thrombozyten und durch induzierte COX-2 in Endothelzellen zurückzuführen war (FitzGerald et al. 1984; Belton et al. 2000). In früheren Untersuchungen an ApoE-defizienten Mäusen führte die Blockade des TXA₂-Signalweges durch Deletion des TXA₂-Rezeptor-Gens (TP) zu einer Verlangsamung der Arteriogenese, während die Blockierung des PGI₂-Signalweges durch Deletion des PGI₂-Rezeptor-Gens (IP) die Progression der Arteriosklerose förderte (Kobayashi et al. 2004). Die Ergebnisse unterstützten die Hypothese, dass TXA₂ prothrombotische und proatherogene Eigenschaften besitzt, während PGI₂ als dessen Gegenspieler insbesondere bei der frühen Einleitung arterieller Veränderungen antiatherogen auf den Prozess der Arteriosklerose wirken kann. Eine selektive Inhibition der COX-1, wie durch Acetylsalicylsäure, verringert die TXA₂-Synthese und hemmt die Thrombozytenaggregation, so dass kardioprotektive und antiatherogene Effekte erreicht werden, während selektive COX-2-Inhibitoren die Synthese von TXA₂ unbeeinflusst lassen und die induzierte COX-2-vermittelte Synthese von PGI₂ hemmen (Catella-Lawson et al. 1999; McAdam et al. 1999). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass selektive COX-2-Inhibitoren das physiologische Gleichgewicht zwischen vasoprotektivem PGI₂ und prothrombotischem TXA₂ stören und zugunsten prothrombotischer Effekte verschieben, wodurch die Arteriosklerose verschlechtert, die Entwicklung von Thrombosen gefördert und schließlich das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöht wird (FitzGerald 2003).

Zur Analyse der Effektivität und Selektivität der Substanzen wurden die Metabolite von PGI₂ und TXA₂ im Maus-Urin untersucht. Celecoxib, Rofecoxib und Naproxen reduzierten die Konzentrationen von 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} in allen ApoE-defizienten Mäusen, wobei die Abnahme der PGI₂-Metabolit-Konzentration in den Diät-Mäusen statistisch signifikant war. Celecoxib und Rofecoxib hatten keinen Einfluss auf die COX-1-vermittelte 11-dehydro-TXB₂-Synthese sowohl in den ApoE-defizienten Diät-Mäusen als auch in den Kontrollmäusen, was die COX-2-Selektivität dieser Coxibe bestätigt und mit Literaturdaten übereinstimmt (McAdam et al. 1999; Praticò 2000). Naproxen reduzierte in den ApoE-defizienten Mäusen statistisch signifikant die Synthese der COX-1-vermittelten TXA₂- und der COX-2-vermittelten PGI₂-Metabolite, was durch Daten einer früheren Studie bereits belegt war (Capone et al. 2004). Zusammenfassend wurden durch die durchgeführte

Urin-Analytik sowohl die Effektivität als auch die zu erwartende Selektivität der eingesetzten Substanzen nachgewiesen.

4.4 (Anti-) atherogene Effekte von selektiven COX-2-Inhibitoren

Als Maß der Effekte von NSAIDs auf die Entwicklung und Progression der Arteriosklerose wurden insbesondere Lumenkonstriktionen und Plaquegrößen quantitativ in der Aorta untersucht. Die Gruppe der ApoE-defizienten Diät-Mäuse entwickelten im Vergleich zu den Kontrollmäusen mit normalem Futter statistisch signifikant arteriosklerotische Lumenkonstriktionen. Die Plaques erreichten eine Größe bis zu 35 % der gesamten Gefäßfläche, d.h. 64 % des Gefäßlumens blieben für den Blutstrom geöffnet. Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille für laminare, nicht-turbulente Strömungen ist die Stromstärke proportional der vierten Potenz des Röhrenradius und kann zur Verdeutlichung der medizinischen Relevanz der arteriellen Lumenkonstriktion für den Blut-Kreislauf näherungsweise herangezogen werden. Die Langzeitbehandlung über 16 Wochen mit Celecoxib und Rofecoxib führte in der Gruppe der ApoE-defizienten Diät-Mäuse lediglich zu einer tendenziellen Reduktion der Plaqueflächen im Vergleich zu den unbehandelten Diät-Mäusen. Unter Naproxen war dieser Effekt nicht zu beobachten. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die COX-2-vermittelte Entzündungsreaktion unter Naproxen als nichtselektiver COX-Inhibitor nicht ausreichend unterdrückt wurde, um einen protektiven Effekt auf die Arteriogenese zu bewirken. Diese Hypothese wird durch Daten aus der Gruppe Burleigh et al. gestützt, welche den Effekt von Rofecoxib (selektiver COX-2-Inhibitor) und Indomethacin, welches präferenziell die COX-1 inhibiert, auf LDL-R-defiziente Mäuse untersuchte. Beide Substanzen führten zu einer Reduktion der Plaquegrößen, unterschieden sich in ihrer Wirkung jedoch nicht statistisch signifikant (Burleigh et al. 2002). In der Gruppe um Pratico et al. führte die Behandlung mit Indomethacin bei LDL-R-defizienten Mäusen zu einer Reduktion der Arteriosklerose, während unter Nimesulid (COX-2-Präferenz) (Warner et al. 1999) lediglich eine tendenzielle Reduktion nachgewiesen wurde (Pratico et al. 2001). Daraus wurde geschlossen, dass sowohl die COX-1- als auch die COX-2-vermittelte Prostanoidsynthese für die Arteriogenese bedeutsam sind. Die geringfügige Verbesserung der Arteriosklerose, die unter Celecoxib und Rofecoxib bei den in dieser Arbeit untersuchten ApoE-defizienten Diät-Mäusen erreicht wurde, ist möglicherweise auf eine Verlangsamung der Arteriogenese durch Inhibition der induzierten COX-2-Aktivität und damit auf antiinflammatorische Effekte zurückzuführen. Frühere experimentelle *in vivo*-Studien, die an verschiedenen Maus-Modellen durchgeführt wurden, um den Effekt von selektiven COX-2-Inhibitoren auf die Arteriosklerose zu untersuchen, führten nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Dabei wurden sowohl protektive als auch proatherogene oder gar keine Effekte beobachtet. Diese Ergebnisse müssen jedoch aufgrund der unterschiedlichen genetischen Hintergründe der Versuchstiere, der verschiedenen Stadien der Arteriosklerose, der unterschiedlichen Behandlungsdauer

sowie der Behandlungsform und unterschiedlicher Diätzusammensetzungen differenziert betrachtet werden. Rofecoxib reduzierte in LDL-R-defizienten Mäusen die Entwicklung früher atherogener Läsionen. Diese protektive Wirkung zeigte sich in Doppelmutanten mit zusätzlicher COX-2-Depletion noch deutlicher (Burleigh et al. 2002). Die Behandlungsdauer mit Rofecoxib (2x10 mg/kg KG) betrug in dieser Studie sechs Wochen, was in einer signifikanten Reduktion der Plaquegrößen innerhalb der proximalen Aorta resultierte. In ApoE-defizienten Mäusen wurde unter Rofecoxib und Indomethacin ebenfalls ein protektiver Effekt auf die Entwicklung früher arteriosklerotischer Läsionen nachgewiesen. Dabei wurden ApoE-defiziente Mäuse über acht Wochen einmal täglich mit 5 mg/kg KG Rofecoxib oder 2,5 mg/kg KG Indomethacin behandelt. Die quantitative Plaqueanalyse zeigte eine signifikante Verringerung der Lumenkonstriktion innerhalb der proximalen Aorta (Burleigh et al. 2005). In ApoE-defizienten Mäusen führte die achtwöchige Behandlung mit einem selektiven COX-2-Inhibitor (SC-236) zu keinen Veränderungen der Plaquegröße in frühen Läsionen (Belton et al. 2003). Celecoxib sowie MF Tricyclic, ein weiterer COX-2-selektiver Inhibitor, zeigten keinen Effekt auf die Morphologie sowie auf die Plaquegröße bei fortgeschrittener instabiler Arteriosklerose in ApoE-defizienten Mäusen (Olesen et al. 2002; Bea et al. 2003). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass COX-2-Inhibitoren bei der Einleitung der Arteriogenese eine bedeutende Rolle spielen könnten und ihre protektiven Wirkungen möglicherweise über antiinflammatorische Effekte erzielen. In dem gewählten Versuchsdesign dieser Arbeit wurden die Mäuse mit einer sehr fettreichen Diät (21 % gegenüber 4, 15,8 oder 19,5 % Fettgehalt (Belton et al. 2003; Burleigh et al. 2005; Burleigh et al. 2005)) über einen relativ langen Zeitraum von 16 Wochen behandelt. Möglicherweise hätten die unter den Coxiben gezeigten Effekte nach einem längeren Behandlungszeitraum und unter Fütterung einer weniger fettreichen Diät stärker hervortreten können.

In den ApoE-defizienten Kontrollmäusen, die normales Futter erhalten hatten, führte die genetische Prädisposition alleine nicht zur Entwicklung von Arteriosklerose. Interessanterweise löste aber die Behandlung mit Celecoxib oder Rofecoxib bei einigen Mäusen die Ausbildung intimaler Läsionen aus, die in den mit Naproxen-behandelten Mäusen nicht aufgetreten sind. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu dem tendenziellen protektiven Effekt, der in ApoE-defizienten Diät-Mäusen unter Celecoxib und Rofecoxib zu beobachten war. Es ist bereits gezeigt worden, dass LDL-R- und PGI₂-Rezeptor (IP)-defiziente Mäuse größere arterielle Plaques entwickelten als alleinige LDL-R-defiziente Mäuse (Egan et al. 2004). Diese Beobachtung wurde auf die fehlende Synthese des vasoprotektiven PGI₂ durch die IP-Deletion und die gesteigerte Thrombozytenaktivität zurückgeführt, die sich in der Konzentration von TXA₂ im Urin widerspiegelt und die Entwicklung früher intimaler Läsionen erleichtert (Cheng et al. 2002). Möglicherweise reichte der in dieser Arbeit unter Celecoxib und Rofecoxib resultierende tendenzielle Anstieg des TXA₂ aus, um den Prozess der Arteriosklerose in den ApoE-defizienten Mäusen mit Normalfutter einzuleiten. Dabei wäre eine Beteiligung von COX-unabhängigen Mechanismen denkbar, wie die Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren oder die Einleitung von Apoptose (Grosch et al. 2001; Niederberger et al. 2001; Tegeder et al. 2001;

Niederberger et al. 2003), welche die Arteriogenese initiierten. Celecoxib (hoch dosiert) induzierte *in vitro* in HUVECs Apoptose, was aber nicht für Rofecoxib gezeigt werden konnte (Niederberger et al. 2004). Möglicherweise könnte Celecoxib in den untersuchten ApoE-defizienten Mäusen über eine Endotheldysfunktion zur Initiation der Arteriogenese geführt haben.

Zur weiteren Untersuchung wurden die COX-2-Expression in den Plaques und die Blutfettwerte analysiert, um mögliche Hinweise auf atherogene Effekte der NSAIDs zu finden. Dabei wurde die COX-2-Expression untersucht, weil sie für die Pathogenese der Arteriosklerose klinisch relevant ist und eine verstärkte Expression in Makrophagen symptomatischer Plaques in humanen arteriellen Gefäßschnitten nachgewiesen wurde (Schonbeck et al. 1999; Cipollone et al. 2001). Aufgrund der gesteigerten COX-2-Expression in atherogenen Plaques wird eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes durch selektive COX-2-Inhibition als möglich angesehen. Die quantitative Analyse der COX-2-Expression in den Plaques ApoE-defizienter Mäuse wurde mittels Lasermikrodissektion (LMD) vorgenommen, die in Kombination mit quantitativer RT-PCR eine geeignete Methode darstellt, den Gehalt an bestimmter mRNA aus kleinen definierten Gewebearealen zu quantifizieren (Burbach et al. 2003). Die relative COX-2-Expression in den isolierten Plaques aus ApoE-defizienten Diät-Mäusen unterschied sich nach der Behandlung mit Celecoxib, Rofecoxib oder Naproxen statistisch nicht signifikant. Die zusätzlich durchgeführten Untersuchungen der COX-2-Proteinexpression in den Plaques mittels Immunfluoreszenz lieferten keinen Hinweis auf einen Einfluss der NSAIDs auf die Proteinexpression. Während die Aktivität der COX-2 durch NSAIDs inhibiert wurde, was an den PGI₂-Metabolitkonzentrationen im Urin nachzuweisen war, wurde die Proteinexpression in den Plaques nicht verändert. In der Gruppe Bea et al. führte die Behandlung von ApoE-defizienten Mäusen mit Celecoxib über einen Zeitraum von 15 Wochen zu einer Inhibierung der COX-2-Aktivität und ebenfalls zu keiner Änderung der COX-2-Expression in den Plaques (Bea et al. 2003). Um den proatherogenen Einfluss von Celecoxib, Rofecoxib und Naproxen weiter zu analysieren, wurde der Lipidblutspiegel der Versuchstiere untersucht. Die ApoE-defizienten Diät-Mäuse wiesen erwartungsgemäß gegenüber den Kontroll- und den Wildtyp-Mäusen statistisch signifikant höhere Blutfettwerte auf. Apolipoprotein E (ApoE) ist als Oberflächenprotein von Lipoproteinen an dem Transport von Nahrungsfetten beteiligt und stellt einen Liganden für den LDL- sowie Chylomikron-Remnant-Rezeptor dar. Beide Rezeptortypen sind am Abtransport von Lipoproteinen aus dem Blut beteiligt, wodurch ApoE eine entscheidende Rolle an der Homöostase des Cholesterins spielt. Bei den knock-out Mäusen führte daher die Deletion des Gens ApoE zu der starken Akkumulation von Cholesterin und Lipoproteinen im Plasma und führte damit zur Entwicklung arteriosklerotischer Plaques (Nakashima et al. 1994). In zahlreiche Studien, die an ApoE- oder LDL-R-defizienten Mäusen durchgeführt wurden, konnte nach der Behandlung mit selektiven COX-2-Inhibitoren keine Veränderung der Blutfettwerte beobachtet werden (Praticò 2000; Burleigh et al. 2002; Olesen et al. 2002; Egan et al. 2004). In den Analysen dieser Arbeit wurden bei ApoE-defizienten Diät-Mäusen minimale Unterschiede gefunden. Dabei waren tendenziell höhere

Plasmakonzentrationen für Cholesterin, LDL und HDL nach der Behandlung mit Celecoxib oder Rofecoxib nachgewiesen worden. Möglicherweise initiierten die Coxibe eine tendenzielle Erhöhung der HDL-Spiegel über COX-unabhängige Effekte, was in den Diät-Mäusen zusätzlich zur Atheroprotektion unter Celecoxib und Rofecoxib beigetragen haben könnte. HDL besitzt protektive Eigenschaften, da es am reversen Cholesterin-Transport aus arteriosklerotischen Plaques zur Leber beteiligt ist (von Eckardstein et al. 2000). In einer Studie an ApoE-defizienten Mäusen wurde unter einem selektiven COX-2-Inhibitor ebenfalls ein erhöhter HDL-Spiegel beobachtet (Olesen et al. 2002), der aber gemessen an den Plaquegrößen keinen Einfluss auf die Arteriosklerose hatte. Des Weiteren war der Einfluss der NSAIDs auf den Cholesterin-Stoffwechsel untersucht worden. Dabei zeigte sich unter Celecoxib ein minimaler, statistisch signifikanter Anstieg der HMG-CoA-Reduktase (HMG-CoA-R)-Aktivität, dem aber vermutlich keine physiologische Bedeutung zukommt. Bei dem höheren Angebot an Cholesterin und Fett durch die atherogene Diät wird die Proteinexpression von HMG-CoA-R über einen negativen Rückkopplungsmechanismus gesenkt, so dass die Rate der Cholesterin-Biosynthese sinkt (Ness et al. 2004) und die Aktivität möglicherweise als kompensatorischer Effekt zunimmt. Die Untersuchung der Proteinexpression von relevanten Proteinen, die am Cholesterin-Stoffwechsel beteiligt sind wie HMG-CoA-R, ACAT, CYP 7a und LDL-R, zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede. Celecoxib und Rofecoxib als selektive COX-2-Inhibitoren und das Naproxen als nichtselektives NSAID scheinen das atherogene Risiko durch einen Angriff am Cholesterin-Stoffwechsel nicht zusätzlich zu erhöhen. Diese Beobachtung ist für älter Patienten relevant, die aufgrund chronischer Entzündungskrankheiten auf die Behandlung mit NSAIDs angewiesen sind und zusätzlich atherogene Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, erhöhte Glukosewerte, Hypertonie u.a. aufzeigen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der COX-2-selektiven NSAIDs Celecoxib und Rofecoxib sowie des traditionellen nichtselektiven NSAIDs Naproxen auf die Entstehung und Entwicklung von Arteriosklerose in ApoE-defizienten Mäusen untersucht. Befunde über kardiovaskuläre Risiken dieser Medikamentengruppe sowie die Beobachtung, dass COX-2 in arteriosklerotischen Plaques exprimiert wird, ließen sowohl die Hypothese von pro- als auch von antiatherogenen Wirkungen zu.

Zunächst wurde die Funktionsfähigkeit des Versuchsdesigns nachgewiesen. In den Aorten von Diät-gefütterten ApoE-defizienten Mäusen entwickelten sich im Alter von 22 Wochen Plaques, in denen typische atherogene sowie proinflammatorische Proteine exprimiert wurden. Die Effektivität und Selektivität der jeweiligen NSAIDs wurde durch Messung der Urinkonzentration relevanter Metabolite nachgewiesen, die aus der COX-2-vermittelten PGI₂- und der COX-1-vermittelten TXA₂-Synthese stammten. Erwartungsgemäß hemmten sowohl die Coxibe als auch Naproxen die Synthese von PGI₂, während die TXA₂-Produktion nur unter Naproxen reduziert wurde. Im Vergleich zu Kontrolltieren führte die chronische Behandlung mit Celecoxib und Rofecoxib tendenziell zu kleineren Plaques in der Aorta von diätgefütterten ApoE-defizienten Mäusen. In den Plaques wurde die Proteinexpression von COX-2 durch die Behandlung mit den NSAIDs nicht beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der Plaques in den Aorten eher durch eine Hemmung der COX-2-Aktivität oder durch COX-unabhängige Effekte als über eine Inhibition der COX-2-Proteinexpression zustande kommt. Die Blutfettwerte wurden durch die eingesetzten NSAIDs nicht verändert, was den Daten aus der Literatur entspricht. ApoE-defiziente Mäuse, die normales Futter erhalten hatten und mit Celecoxib oder Rofecoxib behandelt wurden, entwickelten vereinzelt intimale Läsionen, während Kontrolltiere oder Naproxen-behandelte Mäuse in keinem Fall Plaques zeigten. Diese Ergebnisse könnten einen Hinweis dafür liefern, dass durch Coxibe COX-unabhängige Effekte ausgelöst werden, welche die Arteriogenese einleiten.

Die umfangreichen Untersuchungen lassen auf eine unterschiedliche Beteiligung von NSAIDs bei der Arteriogenese schließen. Dabei scheinen die selektiven COX-2-Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib eine andere Rolle als Naproxen, dem nichtselektiven COX-2-Inhibitor, zu spielen. In ApoE-defizienten Diät-Mäusen wurde die Arteriosklerose durch Celecoxib und Rofecoxib über COX-2-abhängige Mechanismen inhibiert, wobei der Effekt vermutlich durch den stärker ausgeprägten Effekt der Hypercholesterinämie überlagert war. In den Kontroll-Mäusen (mit Normalfutter) dagegen könnte die Arteriogenese unter Celecoxib und Rofecoxib durch COX-unabhängige Mechanismen eingeleitet worden sein. Dabei scheint das Stadium der Arteriosklerose eine wichtige Rolle zu spielen. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass Coxibe die Initiation der Arteriosklerose eher begünstigen, während bei weiter fortgeschrittenen Plaques tendenziell antiatherogene Effekte zu beobachten waren, die möglicherweise auf die entzündungshemmenden Eigenschaften der Substanzen

zurückzuführen sind. Nachdem jedoch diese Effekte bisher nur in Maus-Modellen beobachtet und untersucht wurden, bleibt die Frage, wie NSAIDs thrombotische Ereignisse im Patienten auslösen, weiterhin offen. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass unter Rofecoxib schon nach kurzer Behandlungsdauer Herzinfarkte ausgelöst werden können (Levesque et al. 2006). Weitere Daten deuten daraufhin, dass NSAIDs über COX-unabhängige Mechanismen dazu führen, dass sogar nach dem Absetzen des Medikament auf lange Sicht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung kardiovaskuläre Erkrankungen bestehen bleibt (Merck, APPROVe Report 2006; unter www.merck.com). Die genauen Mechanismen dieser Langzeiteffekte von NSAIDs auf das vaskuläre System sind zurzeit nach wie vor unklar. Abschließend kann jedoch aufgrund der aktuellen Datenlage vermutet werden, dass Coxibe eine Schädigung von vaskulären Zellen verursachen können und das Risiko für kardiovaskuläre Effekte eher erhöhen als antiatherogene Effekte zu erzeugen und die Arteriosklerose zu verbessern.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
abs.	absolut
ACAT	Acetyl-Coenzym A-Acyl-Transferase
<i>ad</i>	auf
ADAPT	<i>Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of Variance</i>)
APC	<i>Adenoma Prevention with Celecoxib Trial</i>
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
APPROVE	<i>Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX Trial</i>
APS	Ammoniumpersulfat
APTC	<i>Anti-platelet Trialists' Collaboration</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare (<i>base pair</i>)
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
°C	Grad Celsius
Caspase	Cysteiny-Aspartase
CD-Marker	<i>Marker of clusters of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CHOD	Cholesterinoxidase
CLASS	<i>Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study</i>
COX	Cyclooxygenase
C _T	Zyklus-Schwellenwert (<i>Cycle threshold</i>)
CYP 450	Cytochrom P450
CYP 7a	Cytochrom P450 7 alpha
Da	Dalton
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGLA	Dihomo- γ -Linolensäure
DH	Dehydrogenase
dl	Deziliter
DMARDs	<i>Disease Modifying Antirheumatic Drugs</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreit
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatetraensäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPA	Eicosapentaensäure
EtOH	Ethanol
g	Gramm
<i>g</i>	Erdgeschwindigkeitskonstante

FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FLAP	<i>5-LO Activating Protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GPO	Glycerin-Peroxidase
Glc	Glucose
Glp	Glykoprotein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HETE	Hydroxyeicosatetraensäuren
HMG-CoA-R	Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Coenzym A Reduktase
H ₂ O	<i>Aqua purificata</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HpETE	Hydroperoxyeicosatetraensäuren
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
5-HT	Serotonin
HUVECs	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i>
IHC	Immunhistochemie
IFN-γ	Interferon γ
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
kb	Kilobasenpaare
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
LC/MS/MS	<i>Liquid Chromatography with Mass determination</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDL-R	<i>Low Density Lipoprotein-Receptor</i>
LMD	Lasermikrodissektion
LO	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LX	Lipoxine (<i>Lipoxygenase interaction products</i>)
M	Molarität (mol/l)
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
M-CSF	<i>Monocyte Colony Stimulating Factor-1</i>
MelTec	<i>Multi-Epitope-Ligand-Technology</i>
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar (mmol/l)
μM	Mikromolar (μmol/l)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid oxidiert/reduziert
NF-κB p50/p65	<i>Nuklearfactor kappa B subunit p50/p65</i>
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	<i>Non-steroidal anti-inflammatory Drugs</i>
OA	Osteoarthrose

OD	Optische Dichte (Absorption bei bestimmter Wellenlänge)
oxLDL	oxidiertes LDL
PARP	<i>Poly [ADP] Ribose Polymerase protein</i>
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDAR	<i>Pre-Developed Assay Reagent</i>
PECAM,	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
PDGF	<i>Platelets Derived growth Factor</i>
PET	Polyethylen
pg	Pikogramm
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostacyclin
PGI ₂ -S	Prostacyclin-Synthase
pH	pH-Wert (<i>pondus hydrogenii</i>)
PIM	Protease-Inhibitor-Mix
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PROCAM	<i>Prospective Cardiovascular Münster</i>
Primer Fw	<i>Primer Forward</i>
Primer Rv	<i>Primer Reverse</i>
q.s.	soviel wie nötig, lat.: <i>quantum satis</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
Rkt.	Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real time PCR</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfat</i>)
sek	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>Standard Error of the Mean</i>)
Ser	Serin
SMCs	<i>Smooth Muscle Cells</i>
sog.	so genannt
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solution</i>
TARGET	<i>Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-β	Transformationsfaktor β (<i>Transforming tumor Growth Factor beta</i>)
TNF _α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
U	Einheit (<i>Unit</i>)
UV	Ultraviolette elektromagnetische Strahlung
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vgl.	vergleiche
VIGOR	<i>VIOXX Gastrointestinal Outcome Research Study</i>
VIS	Sichtbare (<i>visible</i>)elektromagnetische Strahlung
vLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
z.T.	zum Teil

6.2 Literaturverzeichnis

- Aiello, R. J., P. A. Bourassa, et al. (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(6): 1518-25.
- Allport, V. C., D. Pieber, et al. (2001). "Human labour is associated with nuclear factor-kappaB activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal'." Mol Hum Reprod **7**(6): 581-6.
- Appleby, S. B., A. Ristimaki, et al. (1994). "Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene." Biochem J **302** (Pt 3): 723-7.
- Arber, N., C. J. Eagle, et al. (2006). "Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps." N Engl J Med **355**(9): 885-95.
- Armstrong, C. P. and A. L. Blower (1987). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs and life threatening complications of peptic ulceration." Gut **28**(5): 527-32.
- Assmann, G. and H. Schulte (1992). "Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Munster study." Am J Cardiol **70**(7): 733-7.
- Assmann, G., H. Schulte, et al. (1996). "High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport." Atherosclerosis **124** Suppl: S11-20.
- Baker, C. S., R. J. Hall, et al. (1999). "Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(3): 646-55.
- Bea, F., E. Blessing, et al. (2003). "Chronic inhibition of cyclooxygenase-2 does not alter plaque composition in a mouse model of advanced unstable atherosclerosis." Cardiovasc Res **60**(1): 198-204.
- Beiche, F., S. Scheuerer, et al. (1996). "Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation." FEBS Lett **390**(2): 165-9.
- Belton, O., D. Byrne, et al. (2000). "Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis." Circulation **102**(8): 840-5.
- Belton, O. A., A. Duffy, et al. (2003). "Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis." Circulation **108**(24): 3017-23.
- Bingham, C. O., 3rd (2002). "Development and clinical application of COX-2-selective inhibitors for the treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis." Cleve Clin J Med **69** Suppl 1: S15-12.
- Bocan, T. M., W. S. Rosebury, et al. (1998). "A specific 15-lipoxygenase inhibitor limits the progression and monocyte-macrophage enrichment of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the rabbit." Atherosclerosis **136**(2): 203-16.
- Bogen, S., J. Pak, et al. (1994). "Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo." J Exp Med **179**(3): 1059-64.
- Bombardier, C., L. Laine, et al. (2000). "Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group." N Engl J Med **343**(21): 1520-8, 2 p following 1528.
- Boring, L., J. Gosling, et al. (1998). "Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." Nature **394**(6696): 894-7.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brand, K., S. Page, et al. (1996). "Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion." J Clin Invest **97**(7): 1715-22.
- Brautigam, L., G. Vetter, et al. (2001). "Determination of celecoxib in human plasma and rat microdialysis samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **761**(2): 203-12.
- Bresalier, R. S., R. S. Sandler, et al. (2005). "Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial." N Engl J Med **352**(11): 1092-102.
- Burbach, G. J., D. Dehn, et al. (2003). "Quantification of layer-specific gene expression in the hippocampus: effective use of laser microdissection in combination with quantitative RT-PCR." J Neurosci Methods **131**(1-2): 83-91.
- Burian, M. and G. Geisslinger (2003). "[Clinical pharmacology of the selective COX-2 inhibitors]." Orthopade **32**(12): 1078-87.
- Burleigh, M. E., V. R. Babaev, et al. (2002). "Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice." Circulation **105**(15): 1816-23.
- Burleigh, M. E., V. R. Babaev, et al. (2005). "Inhibition of cyclooxygenase with indomethacin phenethylamide reduces atherosclerosis in apoE-null mice." Biochem Pharmacol **70**(3): 334-42.
- Burleigh, M. E., V. R. Babaev, et al. (2005). "Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice." J Mol Cell Cardiol **39**(3): 443-52.
- Cao, C., K. Matsumura, et al. (1998). "Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor." Brain Res Mol Brain Res **56**(1-2): 45-56.
- Capone, M. L., S. Tacconelli, et al. (2004). "Clinical pharmacology of platelet, monocyte, and vascular cyclooxygenase inhibition by naproxen and low-dose aspirin in healthy subjects." Circulation **109**(12): 1468-71.
- Catella-Lawson, F., B. McAdam, et al. (1999). "Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids." J Pharmacol Exp Ther **289**(2): 735-41.
- Celletti, F. L., J. M. Waugh, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression." Nat Med **7**(4): 425-9.
- Chan, C. C., S. Boyce, et al. (1995). "Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach." J Pharmacol Exp Ther **274**(3): 1531-7.
- Chen, F., P. Eriksson, et al. (2005). "Apoptosis and angiogenesis are induced in the unstable coronary atherosclerotic plaque." Coron Artery Dis **16**(3): 191-7.
- Chenevard, R., D. Hurlimann, et al. (2003). "Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease." Circulation **107**(3): 405-9.
- Cheng, Y., S. C. Austin, et al. (2002). "Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2." Science **296**(5567): 539-41.
- Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." Biotechniques **15**(3): 532-4, 536-7.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.

- Ciabattoni, G., P. Patrignani, et al. (1990). "Radioimmunoassay of 11-dehydrothromboxane B2." Methods Enzymol **187**: 34-42.
- Cipollone, F., C. Prontera, et al. (2001). "Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability." Circulation **104**(8): 921-7.
- Connolly, E., D. J. Bouchier-Hayes, et al. (2002). "Cyclooxygenase isozyme expression and intimal hyperplasia in a rat model of balloon angioplasty." J Pharmacol Exp Ther **300**(2): 393-8.
- Dancu, M. B., D. E. Berardi, et al. (2004). "Asynchronous shear stress and circumferential strain reduces endothelial NO synthase and cyclooxygenase-2 but induces endothelin-1 gene expression in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 2088-94.
- Davies, N. M., A. J. McLachlan, et al. (2000). "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor." Clin Pharmacokinet **38**(3): 225-42.
- Deutsches Ärzteblatt, Jg. 102, Heft 15, 15. April 2005. "COX-2-Inhibitoren. Pfizer nimmt Bextra vom Markt."
- de Leval, X., J. Delarge, et al. (2000). "Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition." Curr Med Chem **7**(10): 1041-62.
- Dubois, R. N., S. B. Abramson, et al. (1998). "Cyclooxygenase in biology and disease." Faseb J **12**(12): 1063-73.
- Eckmann, L., W. F. Stenson, et al. (1997). "Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production." J Clin Invest **100**(2): 296-309.
- Egan, K. M., J. A. Lawson, et al. (2004). "COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice." Science **306**(5703): 1954-7.
- Esser, R., C. Berry, et al. (2005). "Preclinical pharmacology of lumiracoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2." Br J Pharmacol **144**(4): 538-50.
- Farkouh, M. E., H. Kirshner, et al. (2004). "Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), cardiovascular outcomes: randomised controlled trial." Lancet **364**(9435): 675-84.
- FitzGerald, G. A. (2003). "COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease." Nat Rev Drug Discov **2**(11): 879-90.
- Fitzgerald, G. A. (2004). "Coxibs and cardiovascular disease." N Engl J Med **351**(17): 1709-11.
- FitzGerald, G. A., A. K. Pedersen, et al. (1983). "Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease." Circulation **67**(6): 1174-7.
- FitzGerald, G. A., B. Smith, et al. (1984). "Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation." N Engl J Med **310**(17): 1065-8.
- Flaxenburg, J. A., M. Melter, et al. (2004). "The CD40-induced signaling pathway in endothelial cells resulting in the overexpression of vascular endothelial growth factor involves Ras and phosphatidylinositol 3-kinase." J Immunol **172**(12): 7503-9.
- Forman, B. M., J. Chen, et al. (1996). "The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators." Ann N Y Acad Sci **804**: 266-75.
- Fosslien, E. (2005). "Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs." Ann Clin Lab Sci **35**(4): 347-85.

-
- Freeman, R. H., J. O. Davis, et al. (1984). "Role of renal prostaglandins in the control of renin release." Circ Res **54**(1): 1-9.
- Friedewald, W. T., R. I. Levy, et al. (1972). "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge." Clin Chem **18**(6): 499-502.
- Fu, J. Y., J. L. Masferrer, et al. (1990). "The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes." J Biol Chem **265**(28): 16737-40.
- Gerrity, R. G. (1981). "The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions." Am J Pathol **103**(2): 181-90.
- Gimbrone, M. A., Jr. (1999). "Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis." Am J Pathol **155**(1): 1-5.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1977). "Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis." Metabolism **26**(11): 1257-75.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1987). "Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis." Circulation **76**(3): 504-7.
- Goppelt-Struebe, M. and F. Beiche (1997). "Cyclooxygenase-2 in the spinal cord: localization and regulation after a peripheral inflammatory stimulus." Adv Exp Med Biol **433**: 213-6.
- Graham, D. J., D. Campen, et al. (2005). "Risk of acute myocardial infarction and sudden cardiac death in patients treated with cyclo-oxygenase 2 selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: nested case-control study." Lancet **365**(9458): 475-81.
- Grosch, S., I. Tegeder, et al. (2001). "COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib." Faseb J **15**(14): 2742-4.
- Han, J. and A. C. Nicholson (1998). "Lipoproteins modulate expression of the macrophage scavenger receptor." Am J Pathol **152**(6): 1647-54.
- Hansson, G. K. (1998). "Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins." Curr Opin Lipidol **9**(1): 73-5.
- Hansson, G. K. and P. Libby (2006). "The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **6**(7): 508-519.
- Hansson, G. K., P. Libby, et al. (2002). "Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis." Circ Res **91**(4): 281-91.
- Harris, R. C., J. A. McKanna, et al. (1994). "Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction." J Clin Invest **94**(6): 2504-10.
- Hawkey, C. J., M. Farkouh, et al. (2004). "Therapeutic arthritis research and gastrointestinal event trial of lumiracoxib - study design and patient demographics." Aliment Pharmacol Ther **20**(1): 51-63.
- Hiltunen, T., J. Luoma, et al. (1995). "Induction of 15-lipoxygenase mRNA and protein in early atherosclerotic lesions." Circulation **92**(11): 3297-303.
- Hinz, B. and K. Brune (2002). "Cyclooxygenase-2--10 years later." J Pharmacol Exp Ther **300**(2): 367-75.
- Johnsen, S. P., H. Larsson, et al. (2005). "Risk of hospitalization for myocardial infarction among users of rofecoxib, celecoxib, and other NSAIDs: a population-based case-control study." Arch Intern Med **165**(9): 978-84.
- Juni, P., L. Nartey, et al. (2004). "Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis." Lancet **364**(9450): 2021-9.

- Kargman, S., S. Charleson, et al. (1996). "Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts." Gastroenterology **111**(2): 445-54.
- Kearney, P. M., C. Baigent, et al. (2006). "Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials." Bmj **332**(7553): 1302-8.
- Kitagawa, K., M. Matsumoto, et al. (2002). "Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice." Atherosclerosis **160**(2): 305-10.
- Kobayashi, T., Y. Tahara, et al. (2004). "Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice." J Clin Invest **114**(6): 784-94.
- Konturek, S. J., A. Robert, et al. (1980). "Comparison of prostacyclin and prostaglandin E2 on gastric secretion, gastrin release, and mucosal blood flow in dogs." Dig Dis Sci **25**(9): 673-9.
- Kurumbail, R. G., A. M. Stevens, et al. (1996). "Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents." Nature **384**(6610): 644-8.
- Lecomte, M., O. Laneuville, et al. (1994). "Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin." J Biol Chem **269**(18): 13207-15.
- Lee, Y., W. H. Lee, et al. (1999). "CD40L activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndrome." Cardiology **92**(1): 11-6.
- Levesque, L. E., J. M. Brophy, et al. (2006). "Time variations in the risk of myocardial infarction among elderly users of COX-2 inhibitors." Cmaj **174**(11): 1563-9.
- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-74.
- Linton, M. F. and S. Fazio (2004). "Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis." Curr Opin Pharmacol **4**(2): 116-23.
- Liou, J. Y., S. K. Shyue, et al. (2000). "Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells." J Biol Chem **275**(20): 15314-20.
- Loftin, C. D., D. B. Trivedi, et al. (2001). "Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(3): 1059-64.
- Lutgens, E. and M. J. Daemen (2002). "CD40-CD40L interactions in atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med **12**(1): 27-32.
- Lutgens, E., L. Gorelik, et al. (1999). "Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis." Nat Med **5**(11): 1313-6.
- Luttun, A., E. Lutgens, et al. (2004). "Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth." Circulation **109**(11): 1408-14.
- Mach, F., U. Schonbeck, et al. (1998). "Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling." Nature **394**(6689): 200-3.
- Mancini, J. A., G. P. O'Neill, et al. (1994). "Mutation of serine-516 in human prostaglandin G/H synthase-2 to methionine or aspirin acetylation of this residue stimulates 15-R-HETE synthesis." FEBS Lett **342**(1): 33-7.
- Maradit-Kremers, H., P. J. Nicola, et al. (2005). "Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study." Arthritis Rheum **52**(3): 722-32.

- Marra, D. E., T. Simoncini, et al. (2000). "Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p21(Waf1) and p27(Kip1)." *Circulation* **102**(17): 2124-30.
- Matchaba, P., X. Gitton, et al. (2005). "Cardiovascular safety of lumiracoxib: a meta-analysis of all randomized controlled trials > or =1 week and up to 1 year in duration of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis." *Clin Ther* **27**(8): 1196-214.
- Matsumura, K., C. Cao, et al. (1998). "Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies." *J Neurosci* **18**(16): 6279-89.
- McAdam, B. F., F. Catella-Lawson, et al. (1999). "Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1): 272-7.
- McAdam, B. F., I. A. Mardini, et al. (2000). "Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoicosanoid production in inflammation." *J Clin Invest* **105**(10): 1473-82.
- Merck, APPROVe Report 2006; www.merck.com/newsroom/pdf/APPROVe_Study_Summary_Report.pdf; "APPROVe Off-Drug Extension; Preliminary Analyses of Thrombotic Cardiovascular Safety."
- Millonig, G., G. T. Malcom, et al. (2002). "Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study." *Atherosclerosis* **160**(2): 441-8.
- Moncada, S., P. Needleman, et al. (1976). "Prostaglandin endoperoxide and thromboxane generating systems and their selective inhibition." *Prostaglandins* **12**(3): 323-35.
- Morita, I., M. Schindler, et al. (1995). "Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2." *J Biol Chem* **270**(18): 10902-8.
- Mukherjee, D., S. E. Nissen, et al. (2001). "Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors." *Jama* **286**(8): 954-9.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., Schäfer-Korting, M. "Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie", 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.
- Nagel, T., N. Resnick, et al. (1994). "Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells." *J Clin Invest* **94**(2): 885-91.
- Nakashima, Y., A. S. Plump, et al. (1994). "ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree." *Arterioscler Thromb* **14**(1): 133-40.
- Nakashima, Y., E. W. Raines, et al. (1998). "Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(5): 842-51.
- Nantel, F., E. Meadows, et al. (1999). "Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly." *FEBS Lett* **457**(3): 475-7.
- Navab, M., G. M. Ananthramaiah, et al. (2004). "The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL." *J Lipid Res* **45**(6): 993-1007.
- Needleman, P., S. Moncada, et al. (1976). "Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides." *Nature* **261**(5561): 558-60.
- Ness, G. C. and K. R. Gertz (2004). "Hepatic HMG-CoA reductase expression and resistance to dietary cholesterol." *Exp Biol Med (Maywood)* **229**(5): 412-6.

- Ness, G. C. and R. C. Holland (2005). "Degradation of HMG-CoA reductase in rat liver is cholesterol and ubiquitin independent." *FEBS Lett* **579**(14): 3126-30.
- Niederberger, E., C. Manderscheid, et al. (2004). "Effects of the selective COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib on human vascular cells." *Biochem Pharmacol* **68**(2): 341-50.
- Niederberger, E., I. Tegeder, et al. (2003). "Opposite effects of rofecoxib on nuclear factor-kappaB and activating protein-1 activation." *J Pharmacol Exp Ther* **304**(3): 1153-60.
- Niederberger, E., I. Tegeder, et al. (2001). "Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB." *Faseb J* **15**(9): 1622-4.
- Nussmeier, N. A., A. A. Whelton, et al. (2005). "Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery." *N Engl J Med* **352**(11): 1081-91.
- Ogasawara, A., T. Arakawa, et al. (2001). "Fluid shear stress-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by C/EBP beta, cAMP-response element-binding protein, and AP-1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells." *J Biol Chem* **276**(10): 7048-54.
- Olesen, M., E. Kwong, et al. (2002). "No effect of cyclooxygenase inhibition on plaque size in atherosclerosis-prone mice." *Scand Cardiovasc J* **36**(6): 362-7.
- Paul, A., L. Calleja, et al. (2000). "The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Life Sci* **68**(4): 457-65.
- Pratico, D., C. Tillmann, et al. (2001). "Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3358-63.
- Praticò, D. C., Tillmann; Li, Hongwei; FitzGerald, Garret A. (2000). "Endogenous biosynthesis of thromboxane and prostacyclin in 2 distinct murine models of atherosclerosis." *Blood* **96**(12): 3823-3826.
- Qiu, H., A. Gabrielsen, et al. (2006). "Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(21): 8161-6.
- Riendeau, D., M. D. Percival, et al. (2001). "Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2." *J Pharmacol Exp Ther* **296**(2): 558-66.
- Rikitake, Y., K. Hirata, et al. (2002). "Expression of G2A, a receptor for lysophosphatidylcholine, by macrophages in murine, rabbit, and human atherosclerotic plaques." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(12): 2049-53.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." *Nature* **362**(6423): 801-9.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* **340**(2): 115-26.
- Ross, R. and J. A. Glomset (1973). "Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis." *Science* **180**(93): 1332-9.
- Rossat, J., M. Maillard, et al. (1999). "Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects." *Clin Pharmacol Ther* **66**(1): 76-84.
- Rott, D., J. Zhu, et al. (2003). "Effects of MF-tricyclic, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on atherosclerosis progression and susceptibility to cytomegalovirus replication in apolipoprotein-E knockout mice." *J Am Coll Cardiol* **41**(10): 1812-9.
- Schildknecht, S., M. Bachschmid, et al. (2004). "COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells." *Faseb J* **18**(6): 757-9.

-
- Schnitzer, T. J., G. R. Burmester, et al. (2004). "Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial." Lancet **364**(9435): 665-74.
- Schonbeck, U., G. K. Sukhova, et al. (1999). "Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions." Am J Pathol **155**(4): 1281-91.
- Schubert, W. (2003). "Topological proteomics, toponomics, MELK-technology." Adv Biochem Eng Biotechnol **83**: 189-209.
- Schubert, W., B. Bonnekoh, et al. (2006). "Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy." Nat Biotechnol **24**(10): 1270-1278.
- Schwartz, J. I., K. Vandormael, et al. (2002). "Comparison of rofecoxib, celecoxib, and naproxen on renal function in elderly subjects receiving a normal-salt diet." Clin Pharmacol Ther **72**(1): 50-61.
- Seibert, K., Y. Zhang, et al. (1997). "Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues." Adv Exp Med Biol **400A**: 167-70.
- Selinsky, B. S., K. Gupta, et al. (2001). "Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations." Biochemistry **40**(17): 5172-80.
- Silverstein, F. E., G. Faich, et al. (2000). "Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study." Jama **284**(10): 1247-55.
- Simon, L. S. (1996). "Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs." Curr Opin Rheumatol **8**(3): 169-75.
- Singh, G. and G. Triadafilopoulos (1999). "Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications." J Rheumatol Suppl **56**: 18-24.
- Smith, L. H., O. Boutaud, et al. (2002). "Cyclooxygenase-2-dependent prostacyclin formation is regulated by low density lipoprotein cholesterol in vitro." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(6): 983-8.
- Solomon, D. H., R. J. Glynn, et al. (2002). "Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and acute myocardial infarction." Arch Intern Med **162**(10): 1099-104.
- Solomon, D. H., E. W. Karlson, et al. (2003). "Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis." Circulation **107**(9): 1303-7.
- Solomon, S. D., J. J. McMurray, et al. (2005). "Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention." N Engl J Med **352**(11): 1071-80.
- Solomon, S. D., M. A. Pfeffer, et al. (2006). "Effect of celecoxib on cardiovascular events and blood pressure in two trials for the prevention of colorectal adenomas." Circulation **114**(10): 1028-35.
- Steffel, J., A. Akhmedov, et al. (2005). "Histamine induces tissue factor expression: implications for acute coronary syndromes." Circulation **112**(3): 341-9.
- Steffel, J., M. Hermann, et al. (2005). "Celecoxib decreases endothelial tissue factor expression through inhibition of c-Jun terminal NH2 kinase phosphorylation." Circulation **111**(13): 1685-9.
- Steinbach, G., P. M. Lynch, et al. (2000). "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis." N Engl J Med **342**(26): 1946-52.
- Stenson, W. F. and C. W. Parker (1983). "Metabolites of arachidonic acid." Clin Rev Allergy **1**(3): 369-84.

- Stichtenoth, D. O., V. Marhauer, et al. (2005). "Effects of specific COX-2-inhibition on renin release and renal and systemic prostanoid synthesis in healthy volunteers." Kidney Int **68**(5): 2197-207.
- Sugimoto, Y., A. Yamasaki, et al. (1997). "Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor." Science **277**(5326): 681-3.
- Takeuchi, K., H. Ukawa, et al. (1999). "Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E-receptor subtype EP(3)." Gastroenterology **117**(5): 1128-35.
- Tegeder, I., J. Pfeilschifter, et al. (2001). "Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors." Faseb J **15**(12): 2057-72.
- Topper, J. N., J. Cai, et al. (1996). "Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10417-22.
- Van Hecken, A., J. I. Schwartz, et al. (2000). "Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers." J Clin Pharmacol **40**(10): 1109-20.
- Vane, J. R. (1971). "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs." Nat New Biol **231**(25): 232-5.
- Vane, J. R., Y. S. Bakhle, et al. (1998). "Cyclooxygenases 1 and 2." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 97-120.
- Virmani, R., F. D. Kolodgie, et al. (2000). "Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1262-75.
- von Birgelen, C., M. Hartmann, et al. (2004). "Relationship between cardiovascular risk as predicted by established risk scores versus plaque progression as measured by serial intravascular ultrasound in left main coronary arteries." Circulation **110**(12): 1579-85.
- von Eckardstein, A., J. R. Nofer, et al. (2000). "Acceleration of reverse cholesterol transport." Curr Opin Cardiol **15**(5): 348-54.
- Wang, K., K. Tarakji, et al. (2005). "Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, decreases monocyte chemoattractant protein-1 expression and neointimal hyperplasia in the rabbit atherosclerotic balloon injury model." J Cardiovasc Pharmacol **45**(1): 61-7.
- Warner, T. D., F. Giuliano, et al. (1999). "Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7563-8.
- Watson, D. J., T. Rhodes, et al. (2003). "All-cause mortality and vascular events among patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, or no arthritis in the UK General Practice Research Database." J Rheumatol **30**(6): 1196-202.
- Whelton, A., J. G. Fort, et al. (2001). "Cyclooxygenase-2--specific inhibitors and cardiorenal function: a randomized, controlled trial of celecoxib and rofecoxib in older hypertensive osteoarthritis patients." Am J Ther **8**(2): 85-95.
- Whelton, A., W. B. White, et al. (2002). "Effects of celecoxib and rofecoxib on blood pressure and edema in patients > or =65 years of age with systemic hypertension and osteoarthritis." Am J Cardiol **90**(9): 959-63.
- Whittaker, N., S. Bunting, et al. (1976). "The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin)." Prostaglandins **12**(6): 915-28.
- Wolf, K., H. Castrop, et al. (1999). "Inhibition of the renin-angiotensin system upregulates cyclooxygenase-2 expression in the macula densa." Hypertension **34**(3): 503-7.

-
- Wolfe, F., B. Freundlich, et al. (2003). "Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis." J Rheumatol **30**(1): 36-40.
- Wolfe, M. M., D. R. Lichtenstein, et al. (1999). "Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs." N Engl J Med **340**(24): 1888-99.
- Xu, X. H., P. K. Shah, et al. (2001). "Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL." Circulation **104**(25): 3103-8.
- Yang, H. M., H. S. Kim, et al. (2004). "Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, reduces neointimal hyperplasia through inhibition of Akt signaling." Circulation **110**(3): 301-8.
- Ylikorkala, O. and U. M. Makila (1985). "Prostacyclin and thromboxane in gynecology and obstetrics." Am J Obstet Gynecol **152**(3): 318-29.
- Zhang, S. H., R. L. Reddick, et al. (1992). "Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E." Science **258**(5081): 468-71.
- Zhu, J., X. Song, et al. (2002). "Using cyclooxygenase-2 inhibitors as molecular platforms to develop a new class of apoptosis-inducing agents." J Natl Cancer Inst **94**(23): 1745-57.

6.3 Veröffentlichung und Tagungsbeitrag

Metzner, J., Popp, L., Marian, C., Manderscheid, C., Fisslthaler, B., Fleming, I., Busse, R., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2006). „The effects of COX-2 selective and non-selective NSAID`s on the development of early atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice”, (submitted).

Metzner, J., Manderscheid, C., Popp, L., Coste, O., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2006). „The Impact of the COX-2 selective inhibitor celecoxib on the initiation and progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice”, (47. Frühjahrstagung der DGPT, April 04-06, 2006).

6.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Frankfurt am Main, den

Julia Metzner

6.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Julia Metzner, geb. Rothenburger

verheiratet, ein Kind

geboren am 13.05.1975 in Frankfurt am Main

Textorstrasse 41

60594 Frankfurt am Main

Hochschulausbildung

- seit September 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Klinische Pharmakologie (*pharmazentrum frankfurt/ ZAFES* [Zentrum für Arzneimittelforschung, -entwicklung und -sicherheit] an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main; Arbeitsgruppenleiterin: Frau Professor Dr. I. Tegeder (Schmerzforschung)
- 2003 – 2006 Naturwissenschaftliche Promotion am Institut für Klinische Pharmakologie (*pharmazentrum frankfurt/ ZAFES*) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main; Institutsdirektor: Herr Professor Dr. Dr. Gerd Geißlinger.
- 1995 – 2002 Studium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe Universität (Biozentrum) in Frankfurt am Main. Abschluss: Diplom am 10.09.2002. Gesamturteil: „sehr gut“.
Thema der Diplomarbeit: „Gezielte Mutagenese an ausgewählten Aminosäureresten des Cytochrom *c*₅₅₂-Fragments aus *Paracoccus denitrificans*“ unter Anleitung von Herrn Professor Dr. B. Ludwig in der Abteilung Molekulare Genetik.

Schulbildung

- 1986 – 1995 Schillerschule, Gymnasium in Frankfurt am Main
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
Abschluss: Abitur (Note 2,3).
- 1981 – 1986 Grundschule in Frankfurt am Main

6.6 Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. Gerd Geisslinger, Direktor des Instituts für Klinische Pharmakologie und des *pharmazentrums frankfurt/ ZAFES*, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsthemas, die Unterstützung und Förderung meiner wissenschaftlichen Ausbildung sowie die zahlreichen Anregungen, welche meine Arbeit vorangebracht haben.

Herrn Professor Dr. Bernd Ludwig, Leiter des Instituts für Molekulare Genetik, danke ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit sowie die freundliche Betreuung während meiner wissenschaftlichen Ausbildung.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Ellen Niederberger, bei der ich mich für die uneingeschränkte Unterstützung und engagierte Betreuung während aller Phasen meiner Doktorarbeit bedanken möchte. Außerdem warst Du mir stets eine gute Ratgeberin, kritische Begutachterin und geduldige Zuhörerin in allen fachlichen Fragen. Darüber hinaus habe ich Dich als Freundin schätzen gelernt.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die produktive Arbeitsatmosphäre im Labor und die große Hilfsbereitschaft. Hervorheben möchte ich Christine Manderscheid und Dr. Laura Popp, denen ich für die großartige Unterstützung bei dem Fortgang meiner Arbeit danke sowie Dr. Roland Schmidt, der für mich die LC-MS/MS-Analysen durchgeführt hat. Des Weiteren gilt mein Dank allen Kolleginnen und Kollegen aus der Pathologie, der Neuroanatomie und der Physiologie, mit denen ich im Laufe meiner Doktorarbeit zusammen arbeiten durfte und die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Meiner Zimmerkollegin Astrid Janssen und meinen Zimmerkollegen Dr. Achim Schmidtko, Dr. Thorsten Maier und Dr. Ronald Schmidt danke ich für die freundschaftliche Unterstützung, Ermutigung, fachlichen Diskussionen und uneingeschränkte Hilfestellung in allen Fragen sowie für den Kaffeevorrat, die Kekse und die Zeit, die wir außerhalb der Arbeit teilten.

Meiner ganzen Familie danke ich sehr für ihre unermüdliche Unterstützung, ihren liebevollen Einsatz, uns bei der Betreuung von Niklas zu helfen und für die unendliche Geduld sowie Liebe, die sie mir entgegen bringt. Meinem Ehemann Dirk, der unersetzlich an meiner Seite steht, danke ich von Herzen für die Liebe, den Glauben und die Unterstützung zu allen Zeiten. Abschließend ein Dankeswort an meinen Sohn Niklas Samuel, der mein Leben bereichert und mich auf die wesentlichen und schönen Dinge des Lebens aufmerksam macht.