

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung von NO-Naproxen als NO-Donor im Zellkulturmodell

#### 4.1.1 Effekte von NO-Naproxen auf den cGMP-Spiegel

Als sensibler Marker für die NO-Freisetzung einer Substanz kann die Bestimmung des intrazellulären cGMP-Spiegels dienen. Die Nierenepithelzelllinie LLC-PK-1 ist ein etabliertes Zellkulturmodell für Untersuchungen zur Aktivierung des cGMP/Guanylatcyclase-Systems durch organische Nitrate (Bennett et al., 1989; Hinz & Schröder, 1998; Schröder & Schrör, 1990).

In diesem Modell sollte am Beispiel des NO-Naproxens untersucht werden, ob NO-NSAIDs im Zellversuch Stickstoffmonoxid derart freisetzen, dass es zu einer Reaktion mit NO-sensitiven Strukturen wie der löslichen Guanylatcyclase kommt.

LLC-PK-1-Zellen wurden 15 Minuten mit dem Phosphodiesterase-Hemmstoff IBMX (0,5 mM) vorbehandelt. Im Anschluss wurde weitere 15 Minuten mit NO-Naproxen (1-30  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Die Inkubation von LLC-PK-1-Zellen mit NO-Naproxen führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des cGMP-Spiegels. Es konnten bis zu 27fach höhere Konzentrationen im Vergleich zum basalen cGMP-Spiegel unbehandelter Zellen bestimmt werden. Unter den gleichen Bedingungen hatte Naproxen keinen Effekt auf die cGMP-Bildung (Abb. 4).

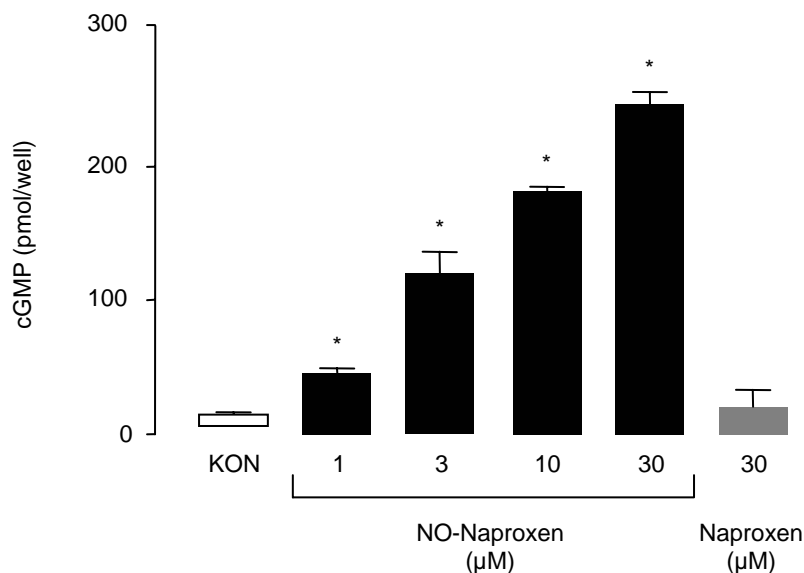


Abb. 4: Effekt von NO-Naproxen auf die cGMP-Bildung in Nierenepithelzellen.

LLC-PK-1-Zellen wurden 15 Minuten mit IBMX vorbehandelt. Im Anschluss wurde 15 Minuten mit NO-Naproxen (1-30  $\mu\text{M}$ ) oder Naproxen (30  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

\*) :  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten.

Das freie NO-Radikal reagiert mit Superoxid rasch zu Peroxynitrit. Die Superoxiddismutase (SOD) baut Superoxid zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff ab. Dadurch verlängert sich bei Vorbehandlung der Zellen mit SOD die Halbwertszeit des freien NO-Radikals (Gryglewski et al., 1986).

Eine 15minütige Vorinkubation mit SOD (15 U/ml) verstärkte die cGMP-Stimulation durch NO-Naproxen um etwa 100 %. Durch Vorbehandlung der Zellen mit Hämoglobin lassen sich hingegen freie NO-Radikale abfangen und NO-vermittelte Effekte blockieren (Martin et al., 1988). Hämoglobin (20  $\mu$ M) senkte den cGMP-Spiegel nahezu auf den Basalwert unbehandelter Zellen (Abb. 5). Beide Substanzen hatten keine Eigeneffekte auf den cGMP-Spiegel.

Diese Versuche verdeutlichen, dass die Erhöhung des cGMP-Spiegels ursächlich auf die Freisetzung von NO zurückzuführen ist.

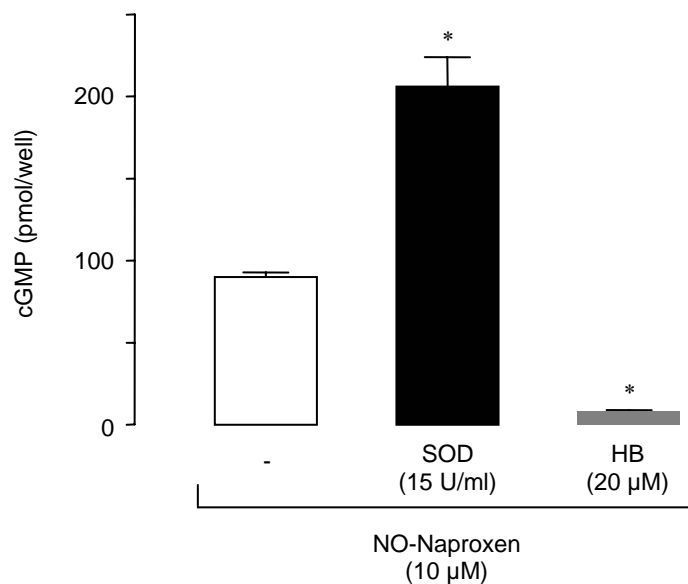


Abb. 5: Effekt von Superoxiddismutase (SOD) und Hämoglobin (HB) auf die cGMP-Stimulation durch NO-Naproxen.

LLC-PK-1-Zellen wurden 15 Minuten mit SOD (15 U/ml) oder HB (20  $\mu$ M) vorbehandelt. Im Anschluss wurde 15 Minuten mit NO-Naproxen (10  $\mu$ M) inkubiert.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (-), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten.

#### 4.1.2 Einfluss einer Vorinkubation mit NO-Donoren auf die cGMP-Stimulation

Über welche Stoffwechselwege NO-NSAIDs bioaktiviert werden, ist noch nicht bekannt. Durch Vorbehandlung von LLC-PK-1-Zellen mit Glyceroltrinitrat (GTN) sollte untersucht werden, ob NO-NSAIDs und organische Nitrate durch die gleichen Enzymsysteme verstoffwechselt werden.

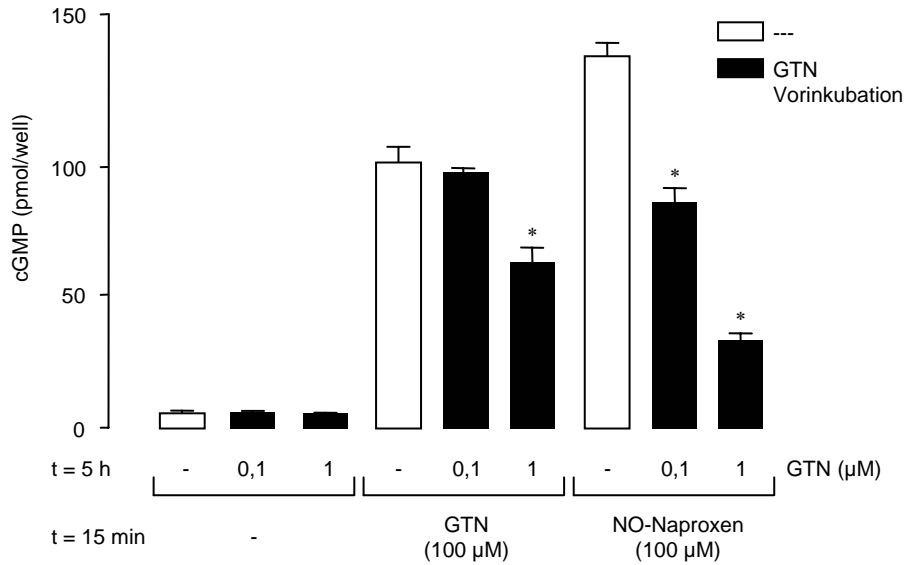


Abb. 6: Effekt einer Vorinkubation mit Glyceroltrinitrat (GTN) auf die anschließende Inkubation mit GTN oder NO-Naproxen.

LLC-PK-1-Zellen wurden 5 Stunden mit GTN (0,1-1  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt. Nach Auswaschen mit PBS wurde 15 Minuten mit IBMX-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit GTN (100  $\mu\text{M}$ ) oder NO-Naproxen (100  $\mu\text{M}$ ) über weitere 15 Minuten.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (-), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten.

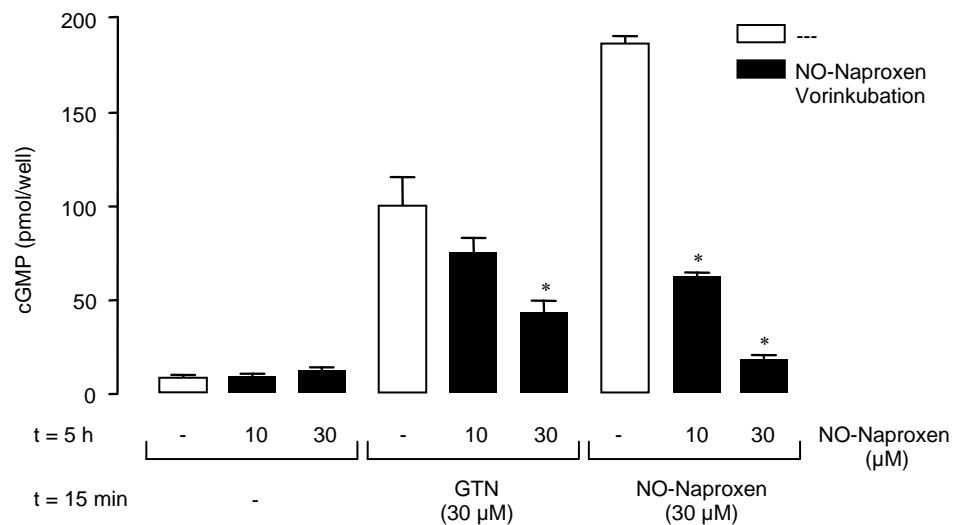


Abb. 7: Effekt einer Vorinkubation mit NO-Naproxen auf die anschließende Inkubation mit GTN oder NO-Naproxen.

LLC-PK-1-Zellen wurden 5 Stunden mit NO-Naproxen (10-30  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt. Nach Auswaschen mit PBS wurde 15 Minuten mit IBMX-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit GTN (30  $\mu\text{M}$ ) oder NO-Naproxen (30  $\mu\text{M}$ ) über weitere 15 Minuten.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (-), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit GTN (0,1-1  $\mu\text{M}$ ) über 5 Stunden schwächte die cGMP-Stimulation einer sich anschließenden Inkubation mit NO-Naproxen oder GTN signifikant ab (Abb. 6). Ebenso reduzierte eine Vorbehandlung mit NO-Naproxen (10-30  $\mu\text{M}$ ) den Anstieg der cGMP-Konzentration durch eine sich anschließende Inkubation mit GTN oder NO-Naproxen (Abb. 7). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Freisetzung von NO aus NO-Naproxen und organischen Nitraten wie GTN über gemeinsame Stoffwechselwege verläuft.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde der Einfluss einer spontan NO-freisetzenden Verbindung untersucht. Der NO-Donor SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin) ist der aktive Metabolit des Koronartherapeutikums Molsidomin und setzt NO unabhängig von enzymatischer Spaltung frei. Durch Ringöffnung geht SIN-1 in SIN-1A über, aus dem sich NO spontan abspaltet (Feelisch, 1998; Polte et al., 1997). Im Gegensatz zu NO-Naproxen und GTN blieb die cGMP-Stimulation durch SIN-1 (10  $\mu\text{M}$ ) bei Vorinkubation der Zellen mit GTN, NO-Naproxen oder SIN-1 selbst unbeeinflusst (Abb. 8).

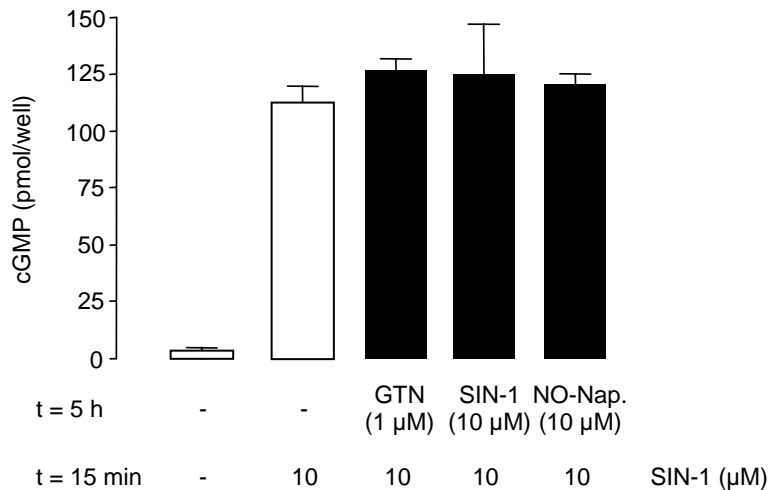


Abb. 8: Effekt einer Vorinkubation mit GTN, SIN-1 oder NO-Naproxen auf die anschließende Inkubation mit SIN-1.

LLC-PK-1-Zellen wurden 5 Stunden mit GTN (1  $\mu\text{M}$ ), SIN-1 (10  $\mu\text{M}$ ) oder NO-Naproxen (10  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt. Nach Auswaschen mit PBS wurde 15 Minuten mit IBMX-haltigem Zellkulturmedium inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit SIN-1 (10  $\mu\text{M}$ ) über weitere 15 Minuten.

\*)  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (-), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten.

### 4.1.3 Zusammenfassung

NO-Naproxen verhält sich im Zellkulturmodell als NO-Donor. Innerhalb von 15 Minuten stimuliert NO-Naproxen konzentrationsabhängig einen Anstieg des cGMP-Spiegels in LLC-PK-1-Zellen. Kontrollversuche mit Naproxen und Vorbehandlung der Zellen mit SOD und Hämoglobin belegen, dass der Effekt dem freigesetzten NO-Radikal zuzuschreiben ist.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NO-Naproxen über Stoffwechselwege bioaktiviert wird, die auch an der Metabolisierung organischer Nitrate wie Glyceroltrinitrat beteiligt sind.

## 4.2 Induktion der Hämoxxygenase-1 durch NO-NSAIDs in Endothelzellen

### 4.2.1 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch NO-NSAIDs

Die zellprotektiven Wirkungen von NO-NSAIDs in oxidativen Stresssituationen lassen eine Beteiligung antioxidativer Proteine vermuten. Eine Vielzahl von Studien belegt eine protektive Wirkung der induzierbaren Hämoxxygenase sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Foresti & Motterlini, 1999). Die bisherigen Ergebnisse charakterisieren die NO-NSAIDs als NO-Donoren im Zellkulturmodell. Die HO-1 ist durch NO-Donoren induzierbar und schützt Endothelzellen vor Schädigung durch oxidativen Stress (Motterlini et al., 1996a; Polte et al., 2000).

Mittels Northern-Blot-Analyse sollte der Frage nachgegangen werden, ob NO-NSAIDs die Transkription des HO-1-Gens in der humanen Endothelzelllinie ECV 304 aktivieren. Dazu wurden die Endothelzellen 8 Stunden mit NO-Naproxen, NO-Flurbiprofen oder NO-Acetylsalicylsäure (NO-ASS) inkubiert.

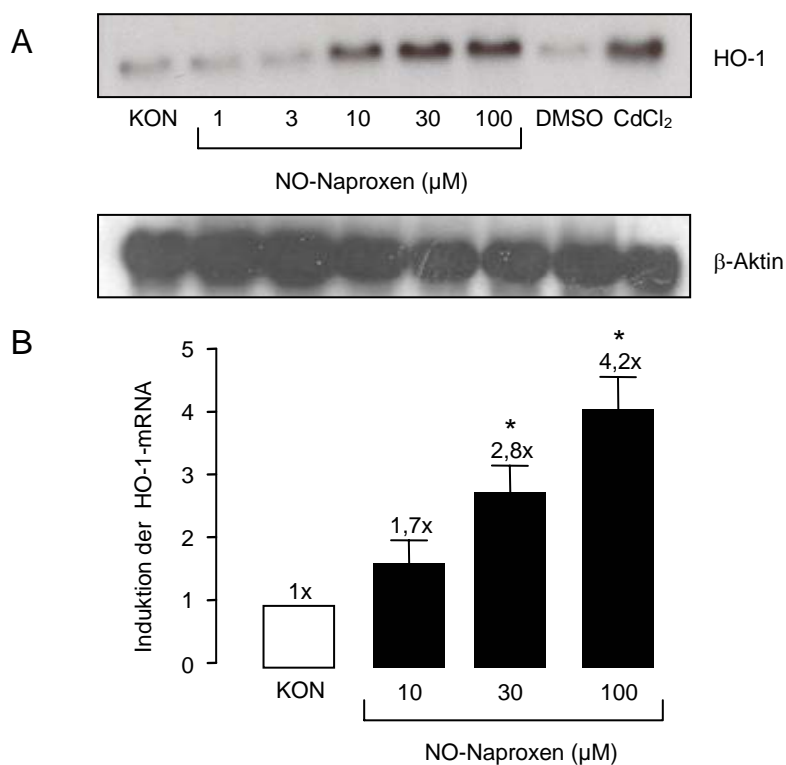


Abb. 9: Effekt von NO-Naproxen auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

(A) Repräsentativer Northern Blot mit β-Aktin-Kontrolle, (B) Densitometrische Auswertung. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit NO-Naproxen (1-100 µM), DMSO (1 µl/ml) oder CdCl<sub>2</sub> (10 µM) inkubiert.

\*): P < 0,05; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SEM von n = 4-6 Einzelexperimenten.

Die Inkubation der Endothelzellen mit NO-Naproxen führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der HO-1-mRNA im Bereich von 10-100 µM (Abb. 9). Mit einer NO-Naproxen-Konzentration von 30 µM war eine signifikante, 2,8fache

Induktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle feststellbar. Mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  war im Durchschnitt eine 4,2fache Stimulation der mRNA-Bildung zu erkennen. Höhere Konzentrationen erbrachten keine weitere Steigerung (ohne Abb.). Als Kontrolle diente eine Inkubation mit dem HO-1-Induktor Cadmiumchlorid ( $\text{CdCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$ ). NO-Naproxen wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die maximale DMSO-Konzentration lag bei 1  $\mu\text{l/ml}$  im Inkubationsansatz. In dieser Konzentration zeigte DMSO keine Eigeneffekte.

Im Gegensatz dazu hatte eine Inkubation mit Naproxen im Konzentrationsbereich bis 300  $\mu\text{M}$  keinen induktiven Effekt auf die HO-1-mRNA-Bildung (Abb. 10).

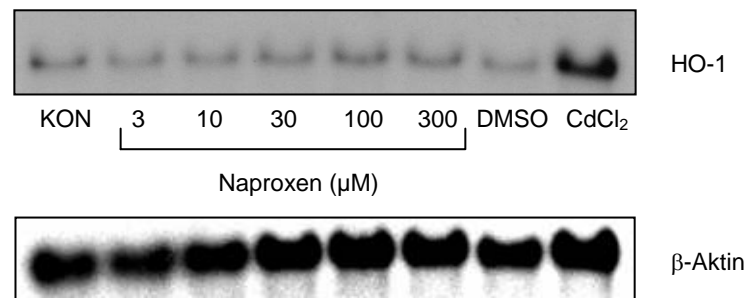


Abb. 10: Effekt von Naproxen auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit Naproxen (3-300  $\mu\text{M}$ ), DMSO (1  $\mu\text{l/ml}$ ) oder  $\text{CdCl}_2$  (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

Darüber hinaus wurden die Endothelzellen mit NO-ASS im Konzentrationsbereich von 10-300  $\mu\text{M}$  inkubiert. Erst ab 100  $\mu\text{M}$  NO-ASS war eine signifikante, durchschnittlich 2,2fache Induktion der HO-1-mRNA gegenüber der unbehandelten Kontrolle detektierbar. Die höchste verwendete Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  stimulierte die HO-1-mRNA-Bildung durchschnittlich 4,1fach (Abb. 11). Noch höhere Konzentrationen erbrachten keine weitere Steigerung (ohne Abb.).

Acetylsalicylsäure (ASS) hatte im Konzentrationsbereich von 300  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$  keinen Effekt auf den HO-1-mRNA-Spiegel (Abb. 11A).

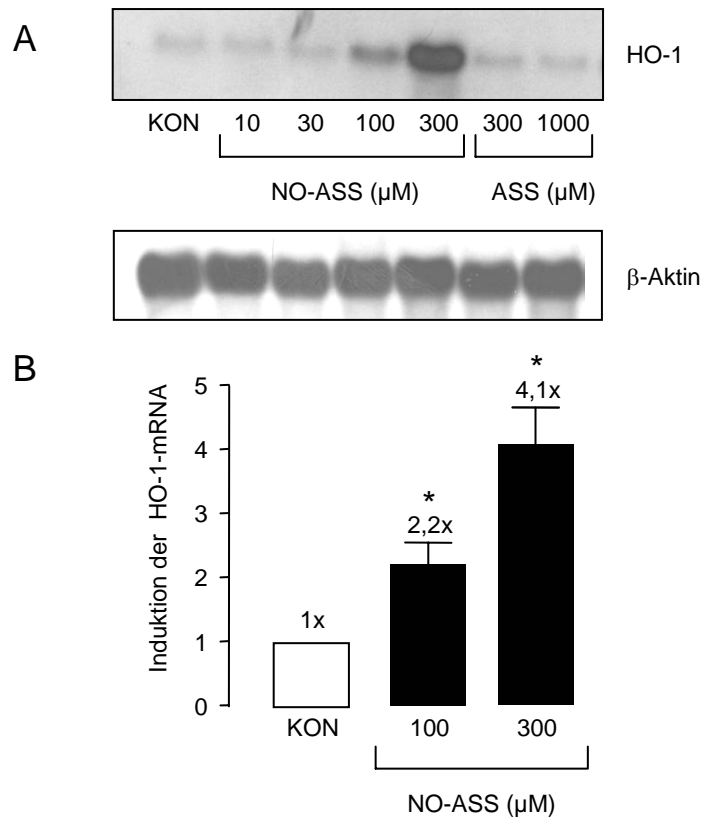


Abb. 11: Effekt von NO-ASS und Acetylsalicylsäure (ASS) auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

(A) Repräsentativer Northern Blot mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle, (B) Densitometrische Auswertung. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit NO-ASS (10-300  $\mu\text{M}$ ) oder ASS (300-1000  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4-6$  Einzelexperimenten.

Als weiteres NO-NSAID wurde NO-Flurbiprofen untersucht. Auch NO-Flurbiprofen aktivierte die Transkription des HO-1-Gens (Abb. 12). Interessanterweise führten im Vergleich zu den anderen untersuchten NO-NSAIDs schon geringe Konzentrationen im Bereich von 0,3-30  $\mu\text{M}$  zu einer Induktion der HO-1-mRNA. Höhere Konzentrationen erbrachten keine stärkere Stimulation (ohne Abb.). Die maximal erreichbare, durchschnittlich 1,9fache Stimulation mit 30  $\mu\text{M}$  NO-Flurbiprofen war deutlich geringer ausgeprägt als bei den Vergleichssubstanzen NO-Naproxen und NO-ASS.

Flurbiprofen hatte im gleichen Konzentrationsbereich keinen induktiven Effekt auf die HO-1-mRNA-Bildung (Abb. 13).



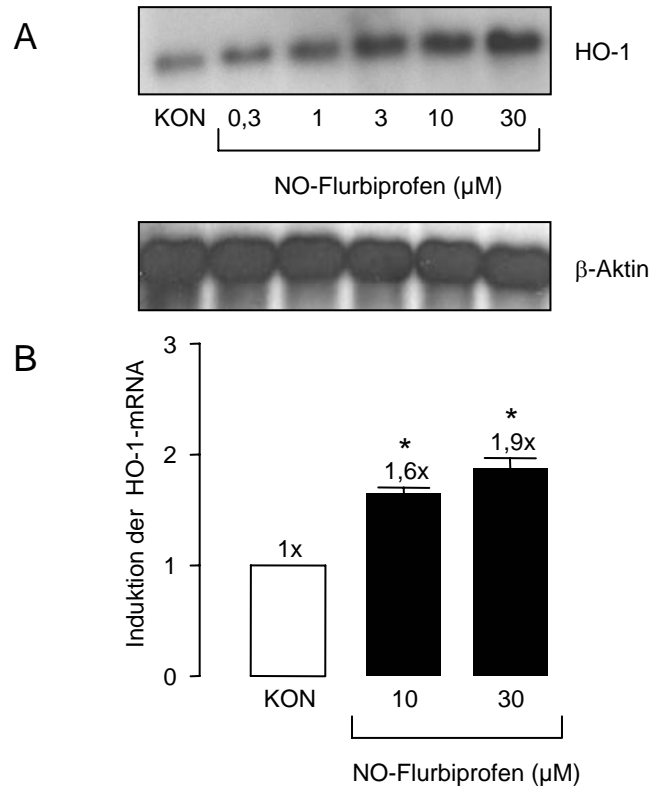


Abb. 12: Effekt von NO-Flurbiprofen auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

(A) Repräsentativer Northern Blot mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle, (B) Densitometrische Auswertung. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit NO-Flurbiprofen (0,3-30  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4-6$  Einzelexperimenten.

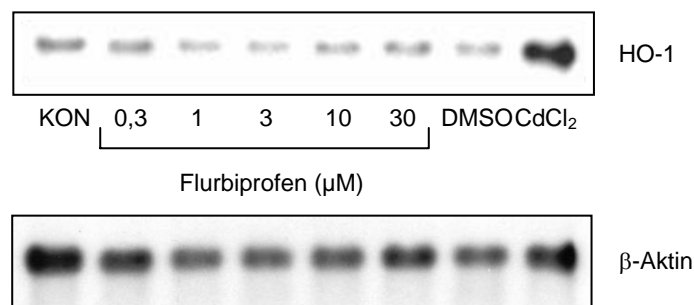


Abb. 13: Effekt von Flurbiprofen auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit Flurbiprofen (0,3-30  $\mu\text{M}$ ), DMSO (1  $\mu\text{l/ml}$ ) oder CdCl<sub>2</sub> (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

#### 4.2.2 Zeitabhängige Induktion der HO-1-mRNA durch NO-ASS

Am Beispiel von NO-ASS wurde außerdem die Bildung der HO-1-mRNA in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Die Endothelzellen wurden mit NO-ASS (300  $\mu$ M) inkubiert.

Bereits nach 4 Stunden Inkubation war HO-1-mRNA im Northern-Blot-Experiment detektierbar. Die mRNA-Konzentration erhöhte sich mit zunehmender Inkubationsdauer und erreichte ihr Maximum im betrachteten Zeitraum nach 8 Stunden (Abb. 14).

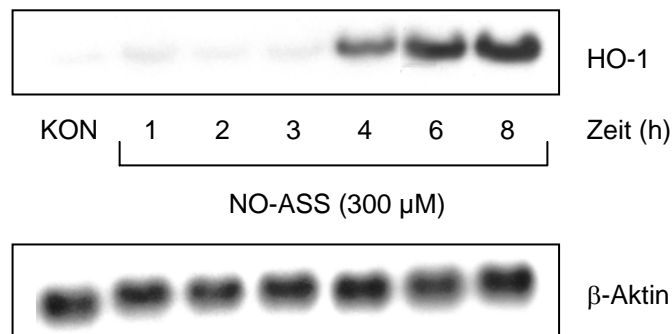


Abb. 14: Zeitverlauf der HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelerperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden bis zu 8 Stunden mit NO-ASS (300  $\mu$ M) inkubiert.

### 4.2.3 Konzentrationsabhängiger Effekt von NO-NSAIDs auf die HO-1-Proteinexpression

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Stimulation der mRNA-Bildung zu einer vermehrten Proteinsynthese der HO-1 führt. Primäre Endothelzellen (PAE) wurden 24 Stunden mit NO-Naproxen oder NO-ASS inkubiert.

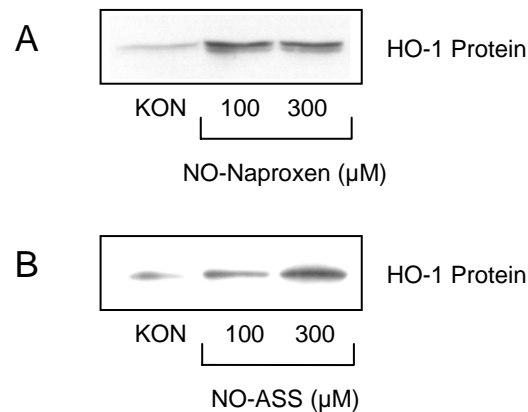


Abb. 15: Effekt von NO-Naproxen (A) und NO-ASS (B) auf die Expression des HO-1-Proteins in Endothelzellen.

(A) Endothelzellen (PAE) wurden 24 Stunden mit NO-Naproxen (100-300 μM) inkubiert. (B) Endothelzellen (PAE) wurden 24 Stunden mit NO-ASS (100-300 μM) inkubiert. Repräsentative Western Blots aus n = 3 Einzelexperimenten.

Aus Abb. 15 ist ersichtlich, dass die NO-NSAIDs die Expression des HO-1-Proteins konzentrationsabhängig stimulierten.

Dabei führte NO-Naproxen in einer Konzentration von 100 μM zu einer signifikanten Steigerung der HO-1-Proteinexpression. Die dreifach höhere Konzentration zeigte keinen stärkeren Effekt (Abb. 15A). Dieses Resultat steht in Einklang mit den Ergebnissen auf transkriptioneller Ebene.

Auch NO-ASS stimulierte die HO-1-Proteinexpression. Wie auf mRNA-Ebene hatte eine Konzentration von 300 μM den stärksten Effekt (Abb. 15B).

#### 4.2.4 Effekt des COX-2-Hemmers Rofecoxib

Zu den Weiterentwicklungen der NSAIDs gehören auch die selektiven Hemmstoffe der COX-2, die Coxibe. Eine Charakterisierung des Wirkprofils der NO-NSAIDs sollte daher auch einen Vergleich mit Coxiben einschließen. Der COX-2-Hemmer Rofecoxib wurde unter gleichen Bedingungen wie die NO-NSAIDs untersucht.

Eine Inkubation humaner Endothelzellen mit Rofecoxib über 8 Stunden hatte keinen Effekt auf die Transkription des HO-1-Gens (Abb. 16). Dieses Ergebnis belegt zusammen mit den Untersuchungen mit NO-freien NSAIDs die Unabhängigkeit des Effektes von einer Hemmung der Cyclooxygenase.

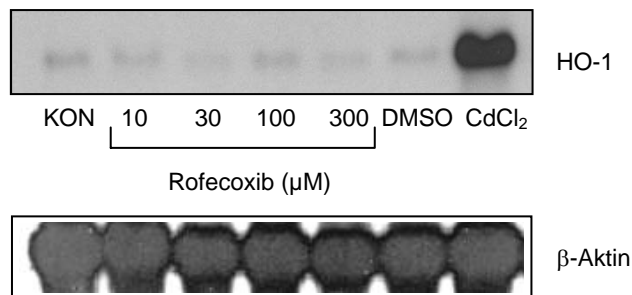


Abb. 16: Effekt von Rofecoxib auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit Rofecoxib (10-300  $\mu$ M), DMSO (1  $\mu$ l/ml) oder CdCl<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) inkubiert.

#### 4.2.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass NO-NSAIDs die Transkription des HO-1-Gens in Endothelzellen konzentrations- und zeitabhängig aktivieren. Die Stimulation der mRNA-Bildung führt zu einer konzentrationsabhängigen Expression des HO-1-Proteins.

Dabei sind die Verbindungen unterschiedlich potent. Bereits bei Inkubation mit 10  $\mu$ M NO-Flurbiprofen oder NO-Naproxen war HO-1-mRNA detektierbar. Die Induktion durch NO-Flurbiprofen erreichte ihr Maximum schon bei einer Konzentration von 30  $\mu$ M und fiel im Vergleich mit den anderen NO-NSAIDs mit 1,9facher Stimulation deutlich geringer aus. Die maximale Stimulation von durchschnittlich 4,2fach war mit 100  $\mu$ M NO-Naproxen zu erreichen. NO-ASS zeigte erst in Konzentration von 300  $\mu$ M eine vergleichbar starke Stimulation. Diese Ergebnisse charakterisieren NO-Naproxen in physiologisch relevanter Konzentration von 100  $\mu$ M als den stärksten Induktor der HO-1-mRNA im Vergleich zu NO-ASS und NO-Flurbiprofen.

Auch in Western-Blot-Experimenten zeigte sich bereits mit 100  $\mu$ M NO-Naproxen eine Stimulation der HO-1-Proteinexpression, die erst mit 300  $\mu$ M NO-ASS vergleichbar stark ausfiel.

Die NO-freien Muttersubstanzen zeigten keine Effekte auf die HO-1-mRNA-Bildung. Ebenso unwirksam war der selektive COX-2-Hemmer Rofecoxib. Diese Ergebnisse belegen, dass die Aktivierung der Transkription ursächlich auf die Freisetzung von NO zurückzuführen ist, nicht auf die Hemmung der COX-Isoenzyme.

### 4.3 Induktion der Hämoxigenase-1 durch NO-NSAIDs in gastralen Epithelzellen

Die vorhergehenden Versuche zeigen eine Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs in Endothelzellen. Diese Effekte können sowohl im kardiovaskulären System als auch in der gastralen Mikrozirkulation von Bedeutung sein. Im Folgenden sollte die Wirkung von NO-NSAIDs in der Magenschleimhaut näher untersucht werden.

Die Integrität der Epithelschicht ist maßgeblich an der Barrierefunktion der Mukosa beteiligt. Mit Hilfe von Northern- und Western-Blot-Analyse wurde der Frage nachgegangen, ob NO-NSAIDs die HO-1 auch im gastralen Epithel induzieren. Als Modell für die Epithelschicht der Magenschleimhaut dienten die humanen gastralen Epithelzelllinien AGS und KATO-III.

#### 4.3.1 Konzentrationsabhängige Induktion der HO-1-mRNA am Beispiel von NO-ASS

Die gastrale Epithelzelllinie KATO-III wurde 8 Stunden mit NO-ASS im Konzentrationsbereich von 30-300  $\mu\text{M}$  oder mit ASS (300  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

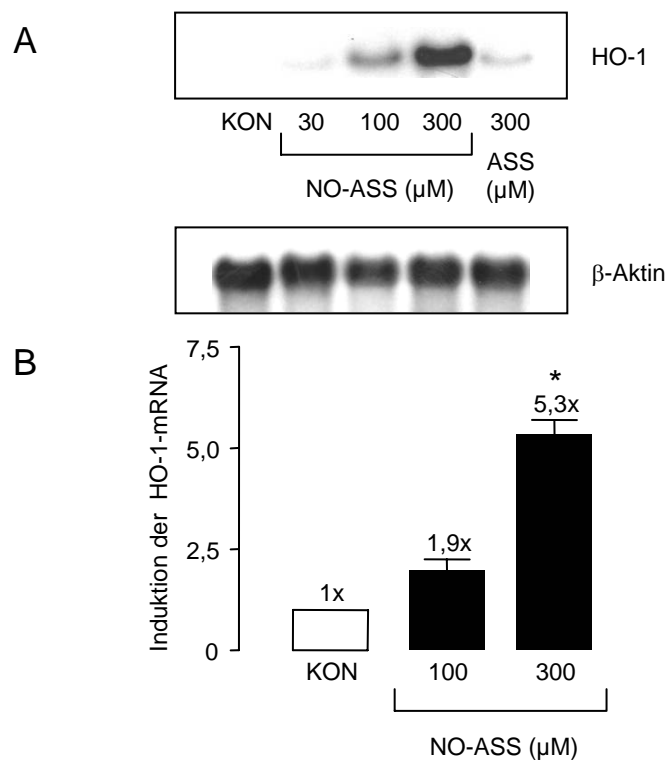


Abb. 17: Effekt von NO-ASS und ASS auf die HO-1-mRNA in gastralen Epithelzellen.

(A) Repräsentativer Northern Blot mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle, (B) Densitometrische Auswertung. KATO-III-Zellen wurden 8 Stunden mit NO-ASS (30-100  $\mu\text{M}$ ) oder ASS (300  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

\*) :  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 4-6$  Einzelexperimenten.

Auch in gastralen Epithelzellen stimulierte NO-ASS die Transkription des HO-1-Gens. Die HO-1-mRNA war ab einer NO-ASS-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  detektierbar. Eine signifikante, durchschnittlich 5,3fache Induktion der HO-1-mRNA gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen war mit 300  $\mu\text{M}$  NO-ASS feststellbar. ASS (300  $\mu\text{M}$ ) hatte keinen Effekt auf die HO-1-mRNA (Abb. 17).

#### 4.3.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von NO-NSAIDs auf die HO-1-Proteinexpression

Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine Inkubation mit NO-NSAIDs in gastralen Epithelzellen die Proteinexpression der HO-1 stimuliert. Die gastrale Epithelzelllinie AGS wurde 24 Stunden mit NO-Naproxen (30-1000  $\mu\text{M}$ ) oder NO-ASS (100-300  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

Die Inkubation mit NO-Naproxen stimulierte die Proteinexpression konzentrationsabhängig. Die maximale Stimulation ist mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  erreicht. Die zehnfach höhere Konzentration erbrachte keine weitere Steigerung (Abb. 18A).

Auch NO-ASS steigerte die Expression des HO-1-Proteins. Dabei ist die maximale Stimulation mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  möglich. Durch die dreifach höhere Konzentration wurde die Proteinexpression nicht mehr stärker aktiviert (Abb. 18B).

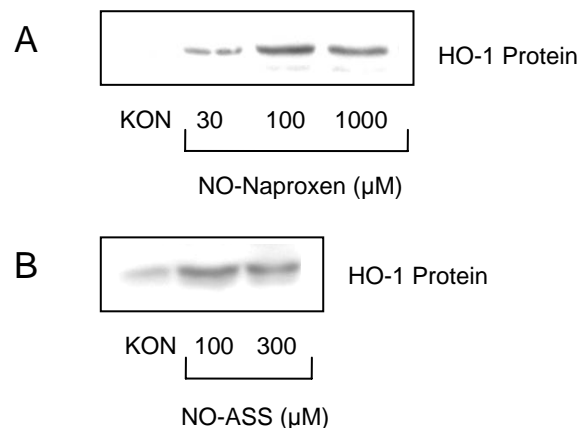


Abb. 18: Effekt von NO-Naproxen (A) und NO-ASS (B) auf die Expression des HO-1-Proteins in gastralen Epithelzellen.

(A) AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit NO-Naproxen (30-1000  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. (B) AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit NO-ASS (100-300  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Repräsentative Western Blots aus  $n = 3$  Einzelexperimenten.

## 4.4 HO-1-Genregulation durch NO-NSAIDs

### 4.4.1 Einfluss von Sauerstoffradikalen

Die HO-1 wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Agenzien induziert. Viele dieser Substanzen verursachen direkt oder indirekt oxidativen Stress (Choi & Alam, 1996; Foresti & Motterlini, 1999). Auch mit dem starken Oxidanz Peroxynitrit, das aus Reaktion von NO mit Superoxid entsteht, wurde eine Induktion der HO-1 in Endothelzellen gezeigt (Foresti et al., 1999).

Es wurde untersucht, ob die Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder der Reaktion zu Peroxynitrit abhängig ist. N-Acetylcystein (NAC) ist eine Vorstufe des endogenen, antioxidativ wirkenden Glutathions. NAC wirkt neutralisierend auf Sauerstoffradikale und inhibierte auch die Induktion der HO-1 durch Peroxynitrit in Endothelzellen (Foresti et al., 1999).

Endothelzellen wurden 15 Minuten mit NAC (10 mM) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit NO-ASS (300  $\mu$ M) inkubiert.

Aus Abb. 19 ist ersichtlich, dass NAC in einer Konzentration von 10 mM keinen Einfluss auf die HO-1-Induktion durch NO-ASS hatte. In der verwendeten Konzentration zeigte NAC keine Eigeneffekte.

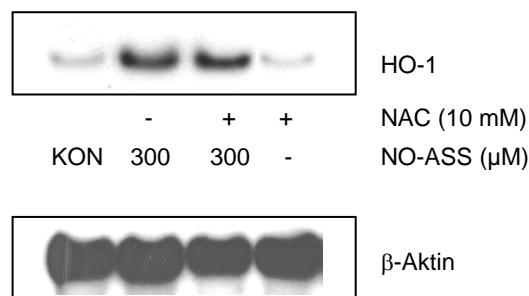


Abb. 19: Effekt des Antioxidanz NAC auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelerperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit NAC (10 mM) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (300  $\mu$ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Die Superoxiddismutase (SOD) baut Superoxid ab und verhindert dadurch die Reaktion mit NO zu Peroxynitrit (Gryglewski et al., 1986).

Endothelzellen wurden 15 Minuten mit SOD (15 U/ml) vorbehandelt. Im Anschluss wurde die Inkubation mit NO-Naproxen (30  $\mu$ M) über 8 Stunden fortgesetzt.

Die Vorbehandlung mit SOD hatte keinen Einfluss auf die HO-1-Induktion durch NO-Naproxen (Abb. 20). SOD zeigte keine Eigeneffekte.

Diese Versuche demonstrieren, dass die NO-NSAID-induzierte Genaktivierung der HO-1 durch NO und nicht durch ROS oder Peroxynitrit vermittelt wird.

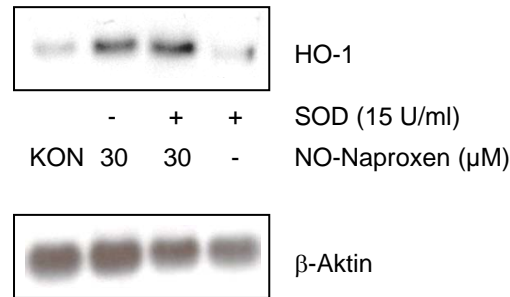


Abb. 20: Effekt der SOD auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-Naproxen in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit SOD (15 U/ml) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-Naproxen (30  $\mu$ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

#### 4.4.2 Einfluss von cGMP-abhängigen Stoffwechselwegen

Wesentliche physiologische Wirkungen von NO werden über eine vermehrte Bildung von cGMP durch Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase vermittelt. Als *second messenger* spielt cGMP eine wichtige physiologische Rolle bei der Regulation von Calcium-Ionenkanälen und Aktivierung von Phosphodiesterasen und Proteinkinasen (Denninger & Marletta, 1999; Waldman & Murad, 1987). Welche Rolle cGMP bei der NO-vermittelten Induktion der HO-1 spielt, ist noch nicht geklärt. Einige Studien zeigen, dass cGMP nicht an der HO-1-Induktion durch spontane NO-Donoren beteiligt ist (Hartsfield et al., 1997; Liang et al., 2000). Andere belegen eine Involvierung von cGMP durch Aktivierung der Guanylatcyclase und der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (Immenschuh et al., 1998; Polte et al., 2000).

Ob cGMP im gleichen Zellkulturmodell wie die NO-NSAIDs die Transkription des HO-1-Gens aktiviert, wurde mit Hilfe des lipophilen, membrangängigen cGMP-Analogons 8-Bromo-cGMP (8-Br-cGMP) untersucht. Die Endothelzellen wurden 8 Stunden mit 8-Br-cGMP (30-1000  $\mu$ M) inkubiert. Als Kontrolle diente der HO-1-Induktor  $\text{CdCl}_2$  (100  $\mu$ M).

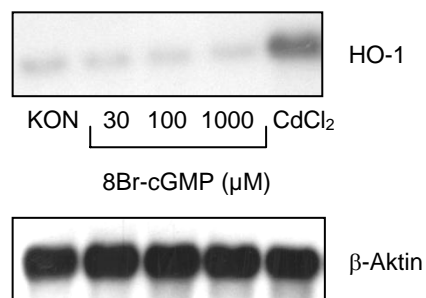


Abb. 21: Effekt von 8-Br-cGMP auf die HO-1-mRNA in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 8 Stunden mit 8-Br-cGMP (30-1000  $\mu$ M) oder  $\text{CdCl}_2$  (10  $\mu$ M) inkubiert.

Die Inkubation mit 8-Br-cGMP hatte keinen Einfluss auf die Transkription des HO-1 Gens in Endothelzellen (Abb. 21).



Zusätzlich wurde der Einfluss eines Inhibitors der löslichen Guanylatcyclase auf die HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs untersucht. Der Hemmstoff 1H-(1,2,4)-Oxadiazol(4,3a)quinoxalin-1-on (ODQ) ist selektiv für die durch NO aktivierbare lösliche Guanylatcyclase. Andere Nukleotid-Synthasen wie die membranständige Guanylatcyclase oder die Adenylatcyclase werden nicht beeinflusst (Brunner et al., 1996). Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit ODQ (10  $\mu$ M) vorbehandelt. Anschließend wurde 8 Stunden mit NO-Naproxen (30-100  $\mu$ M) inkubiert. Aus Abb. 22 ist ersichtlich, dass ODQ keinen Einfluss auf die NO-Naproxen-vermittelte HO-1-Induktion ausübte.

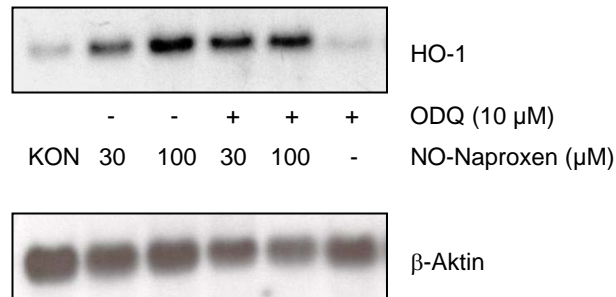


Abb. 22: Effekt von ODQ auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-Naproxen in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit ODQ (10  $\mu$ M) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-Naproxen (30-100  $\mu$ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Darüber hinaus wurde eine Beteiligung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG) untersucht. Proteinkinasen phosphorylieren Proteine und sind dadurch an der Aktivierung genregulatorischer Proteine beteiligt. Um eine mögliche Beteiligung der PKG an der HO-1-Induktion zu untersuchen, wurde der spezifische Hemmstoff KT5823 verwendet (Immenschuh et al., 1998). Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit KT5823 (1  $\mu$ M) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit NO-ASS (100-300  $\mu$ M) inkubiert.

Der PKG-Inhibitor hatte keine Effekt auf die Induktion der HO-1 durch NO-ASS (Abb. 23).

Die Versuche mit 8-Br-cGMP, ODQ und KT5823 in Endothelzellen zeigen, dass die HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs von cGMP als Mediator unabhängig ist.

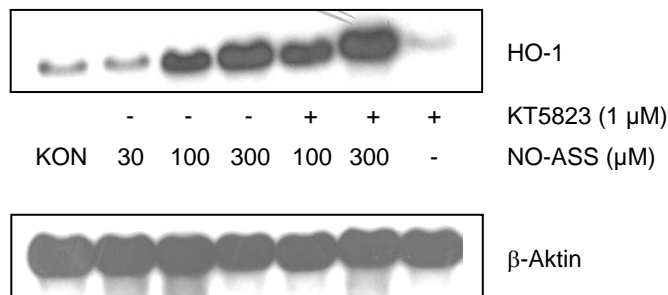


Abb. 23: Effekt des PKG-Inhibitors KT5823 auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit KT5823 (1  $\mu$ M) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (30-300  $\mu$ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

#### 4.4.3 Einfluss des Translationsblockers Cycloheximid

Der Proteinsynthese-Hemmstoff Cycloheximid (CHX) blockiert die Translation von mRNA am Ribosom. Mit Hilfe von CHX sollte untersucht werden, ob die Aktivierung der Transkription des HO-1-Gens eine De-novo-Synthese von Proteinen erfordert.

Endothelzellen wurden 15 Minuten mit CHX (5  $\mu$ g/ml) vorbehandelt. Anschließend folgte eine 8stündige Inkubation mit NO-ASS (100-300  $\mu$ M).

Der Translationsblocker hob die HO-1-Induktion durch NO-ASS nahezu vollständig auf (Abb. 24). Im Durchschnitt waren nur 12,6% der mRNA-Bildung feststellbar, die eine NO-ASS-Konzentration von 300  $\mu$ M in nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte (Abb. 28).

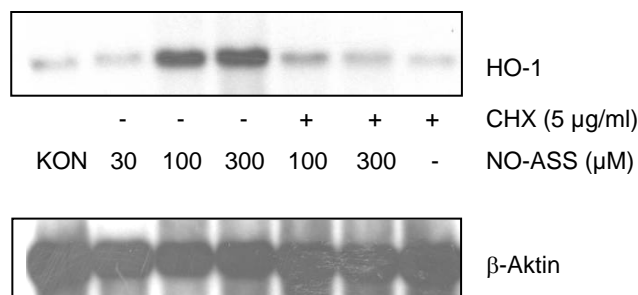


Abb. 24: Effekt des Translationsblockers CHX auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit CHX (5  $\mu$ g/ml) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (30-100  $\mu$ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Dieses Ergebnis spricht für die Beteiligung von neu gebildeten Proteinen an der Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs. Das HO-1-Gen wird also nicht durch direkte Interaktion von NO mit der DNA aktiviert. Die Notwendigkeit einer De-novo-Synthese lässt die Beteiligung so genannter *immediate-early-response* Gene vermuten. Dazu zählen beispielsweise Monomere des Transkriptionsfaktors AP-1,

dessen Involvement in die HO-1-Genaktivierung eine Reihe von Studien postuliert (Camhi et al., 1998; Elbirt et al., 1998; Kiemer et al., 2003; Terry et al., 1998).

#### 4.4.4 Einfluss von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Eine Reihe von Studien konnte zeigen, dass NO in verschiedenen Zelltypen Bestandteile von MAP-Kinase-Signalwegen aktiviert (Jun et al., 1999; Kim et al., 1997a; Lander et al., 1996; Pfeilschifter & Huwiler, 1996).

Auch für die NO-abhängige Induktion der HO-1 wurde eine Beteiligung von MAP-Kinasen demonstriert (Buckley et al., 2003; Chen & Maines, 2000).

Ausgehend von diesen Befunden wurde untersucht, ob MAP-Kinasen an der Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs in Endothelzellen beteiligt sind.

Für die Kinasen p38, JNK und ERK sind spezifische, zellpermeable Inhibitoren erhältlich. Das Pyridinylimidazol-Derivat SB203580 ist ein spezifischer Hemmstoff der MAP-Kinase p38. Durch kompetitive Bindung an die ATP-Bindungsstelle wird die katalytische Aktivität der Kinase gehemmt (Lee et al., 1999).

Endothelzellen wurden 15 Minuten mit SB203580 (45  $\mu$ M) vorbehandelt. Im Anschluss folgte eine Inkubation mit NO-ASS (100-300  $\mu$ M) über 8 Stunden.

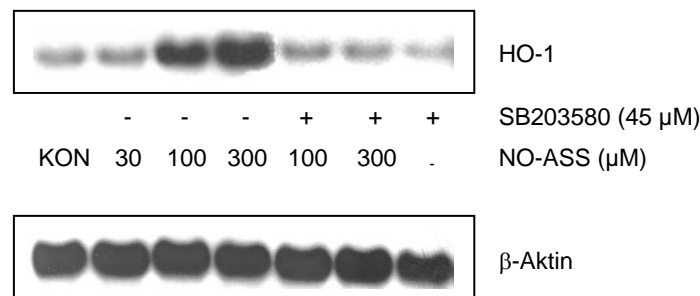


Abb. 25: Effekt des p38-Hemmstoffs SB203580 auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit SB203580 (45  $\mu$ M) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (100-300  $\mu$ M) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Der p38-Inhibitor SB203580 hob den Effekt von NO-ASS auf die HO-1-mRNA weitgehend auf (Abb. 25). Im Durchschnitt waren nur 17,7% der mRNA-Bildung feststellbar, die NO-ASS in einer Konzentration von 300  $\mu$ M in nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte (Abb. 28). SB203580 zeigte in der verwendeten Konzentration keine Eigeneffekte. Dieses Ergebnis belegt eine Beteiligung der MAP-Kinase p38 an der HO-1-Induktion.

Die MAP-Kinasen p38 und JNK werden über gemeinsame Stoffwechselwege aktiviert (Abb. 3). Daher wurde auch eine Beteiligung der Kinase JNK an der HO-1-Induktion durch NO-ASS untersucht. Das Anthrapyrazolon-Derivat SP600125 ist ein spezifischer JNK-Inhibitor. SP600125 ist ebenfalls ein ATP-kompetitiver Hemmstoff der katalytischen Aktivität, der im Zellkulturmodell dosisabhängig die Phosphorylierung von c-Jun hemmt (Bennett et al., 2001).

Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit SP600125 (45  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt und über weitere 8 Stunden mit NO-ASS (100-300  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

Die Vorbehandlung mit SP600125 hob die HO-1-Induktion durch NO-ASS nahezu vollständig auf (Abb. 26). Im Vergleich zu den nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte NO-ASS in einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  die HO-1-mRNA-Bildung nur um durchschnittliche 11,8% (Abb. 28).

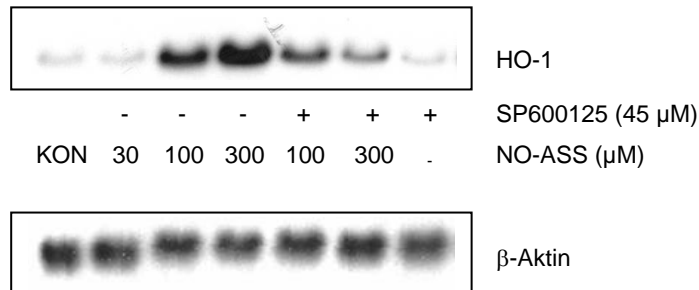


Abb. 26: Effekt des JNK-Hemmstoffs SP600125 auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit SP600125 (45  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (100-300  $\mu\text{M}$ ) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Während der zur Aktivierung von p38 und JNK führende Signalweg vorwiegend durch inflammatorische Cytokine und verschiedene Stressfaktoren stimuliert wird, sind an der Aktivierung der MAP-Kinase ERK vor allem Wachstumsfaktoren beteiligt. Mit PD098059 existiert auch für diesen Signalweg ein spezifischer Inhibitor. Im Unterschied zu den anderen Substanzen ist PD098059 kein kompetitiver Hemmstoff und interferiert weder mit ATP noch mit der Substratbindung. PD098059 beeinflusst nicht die MAP-Kinase ERK selbst, sondern blockiert spezifisch die MAP-Kinase-Kinase, die ERK phosphoryliert.

Wiederum wurden die Endothelzellen 15 Minuten mit PD098059 (45  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt und anschließend 8 Stunden mit NO-ASS (100-300  $\mu\text{M}$ ) inkubiert.

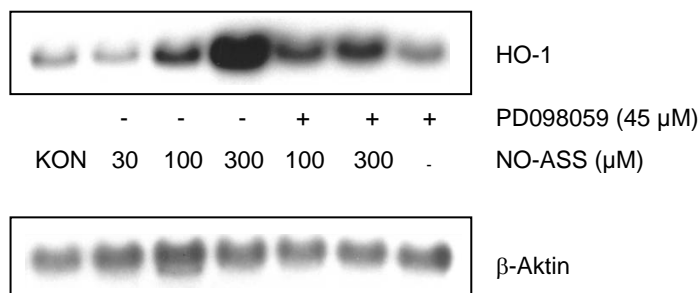


Abb. 27: Effekt des ERK-Hemmstoffs PD098059 auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Repräsentativer Northern Blot aus  $n = 3$  Einzelexperimenten mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit PD098059 (45  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt. Nach Zugabe von NO-ASS (100-300  $\mu\text{M}$ ) wurde die Inkubation über 8 Stunden fortgesetzt.

Bei Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem ERK-Inhibitor PD098059 war ebenfalls eine signifikante Hemmung der HO-1-Induktion durch NO-ASS erkennbar (Abb. 27). PD098059 zeigte in der verwendeten Konzentration keine Eigeneffekte.

Die Hemmung war aber deutlich geringer ausgeprägt als bei Verwendung der p38- und JNK-Inhibitoren. Im Durchschnitt wurden noch 59,2% der HO-1-mRNA gebildet, die NO-ASS in einer Konzentration von 300  $\mu$ M in nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte (Abb. 28). Diese Hemmversuche führen zu der Annahme, dass die MAP-Kinase ERK bei der NO-NSAID-induzierten Genaktivierung der HO-1 auch eine Rolle spielt, die Bedeutung der p38- und JNK-Kinasen scheint aber wesentlich größer zu sein.

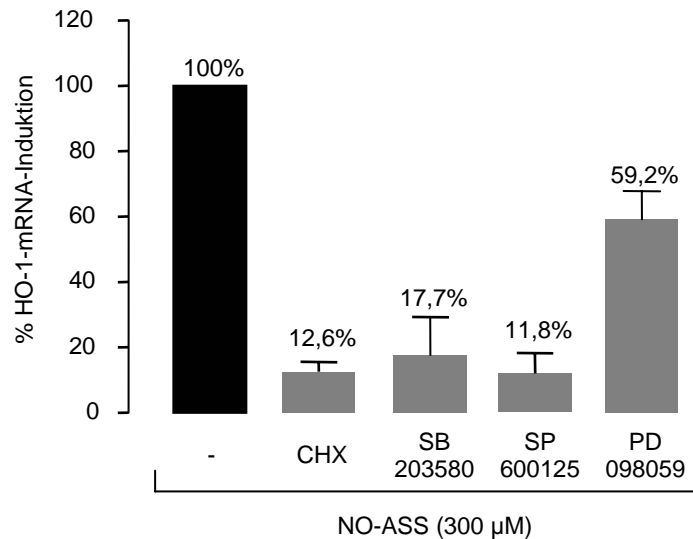


Abb. 28: Effekte von CHX und MAP-Kinase-Inhibitoren auf die HO-1-mRNA-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen.

Densitometrische Auswertung.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten.

#### 4.4.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs in Endothelzellen zeigen, dass die Transkription durch NO-vermittelte Effekte und nicht durch ROS oder Peroxynitrit induziert wird.

Der *second messenger* cGMP scheint bei der Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs nicht beteiligt zu sein.

Mit Hilfe des Translationsblockers CHX konnte gezeigt werden, dass die Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs eine De-novo-Synthese von Proteinen erforderte.

Die Experimente mit spezifischen Inhibitoren von MAP-Kinase-Signalwegen belegen eine Involvierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK bei der Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs. Vor allem die Stress-aktivierten Kinasen p38 und JNK scheinen eine bedeutende Rolle zu spielen.

## 4.5 Effekte der NO-NSAIDs in einem Modell für oxidativen Stress

In einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress wurde untersucht, ob NO-NSAIDs direkt oder indirekt antioxidative Wirkungen zeigen.

Dabei wurden Endothelzellen oder gastrale Epithelzellen mit NADPH inkubiert, wodurch die NADPH-abhängige Oxidase zur Superoxid-Bildung angeregt wird (Griendling et al., 2000; Guzik et al., 2000). Die NADPH-abhängige Oxidase zählt neben der Xanthin-Oxidase zu den im Entzündungsgeschehen hochregulierten Enzymen, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren (Terry et al., 1998).

Die Konzentration an ROS lässt sich mit Hilfe von Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz am Luminometer messen (Li et al., 1998; Tarpey et al., 1999). Die Chemilumineszenz wurde in relativen Lichteinheiten (RLU) bestimmt. Die Stimulation der ROS-Bildung durch NADPH in unbehandelten Kontrollzellen wurde als maximal erreichbarer RLU-Wert ( $RLU_{max}$ ) zu 100% gesetzt.

### 4.5.1 Effekt von NO-Naproxen in Endothelzellen

Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen in PBS resuspendiert und mit NO-Naproxen (3-300  $\mu$ M) sowie NADPH (100  $\mu$ M) und Lucigenin (50  $\mu$ M) inkubiert.

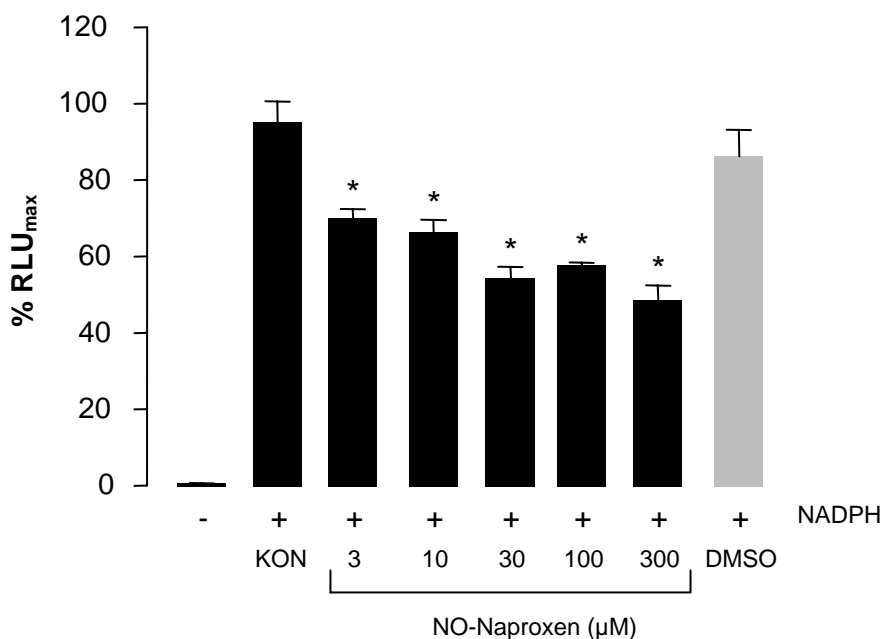


Abb. 29: Direkter Effekt von NO-Naproxen auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen.

ECV-304-Zellen wurden geerntet, in PBS resuspendiert und mit NO-Naproxen (3-300  $\mu$ M) oder DMSO (1  $\mu$ l/ml), NADPH (100  $\mu$ M) und Lucigenin (50  $\mu$ M) 10 Minuten inkubiert.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Die Konzentration an ROS wurde durch direkte Zugabe von NO-Naproxen konzentrationsabhängig reduziert. Bereits in einer Konzentration von 3  $\mu$ M verringerte

NO-Naproxen den ROS-Spiegel im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant. Bei Inkubation mit einer NO-Naproxen-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  war nur etwa 50% der ROS-Bildung detektierbar, die in den unbehandelten Kontrollzellen durch NADPH stimuliert wurde.

NO-Naproxen wurde in DMSO gelöst. Die verwendete DMSO-Konzentration (1  $\mu\text{l/ml}$ ) zeigte keinen signifikanten Effekt (Abb. 29).

Stickstoffmonoxid neutralisiert Sauerstoff- und Hydroxylradikale durch direkte Reaktionen. Mit Superoxid reagiert NO direkt zu Peroxynitrit. Diese Reaktion hemmt die Haber-Weiss-Reaktion, in der sich aus Superoxid und Wasserstoffperoxid unter anderem das hoch reaktive Hydroxylradikal bildet (Wink et al., 1999). Damit wäre die antioxidative Wirkung NO-freisetzender NSAIDs durch direkte Neutralisation von Sauerstoffradikalen erklärbar.

Die Ergebnisse zur Induktion der HO-1 zeigen auch indirekte, potenziell antioxidative Wirkungen der NO-NSAIDs.

Um den Einfluss der Induktion antioxidativer Proteine wie der HO-1 durch NO-NSAIDs zu untersuchen, wurden die Endothelzellen mit NO-Naproxen oder Naproxen 24 Stunden vorinkubiert. Durch die kurze Halbwertszeit und die hohe Reaktivität von NO in biologischen Medien sind direkte neutralisierende Wirkungen durch freie NO-Radikale nach 24 Stunden nicht mehr zu erwarten.

Die Zellen wurden mit PBS ausgewaschen und geerntet. Im Anschluss wurden sie resuspendiert und mit NADPH (100  $\mu\text{M}$ ) und Lucigenin (50  $\mu\text{M}$ ) 10 Minuten inkubiert.

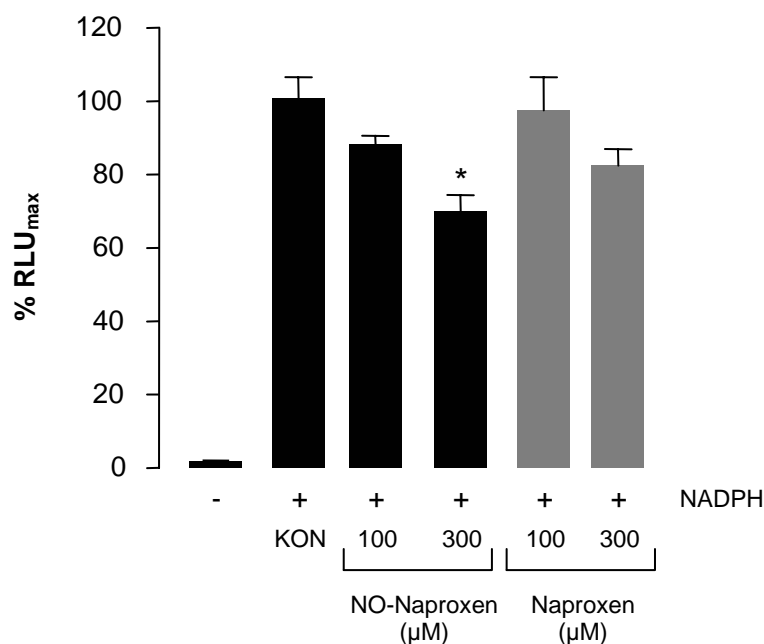


Abb. 30: Effekt von NO-Naproxen und Naproxen auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen.

ECV-304-Zellen wurden 24 Stunden mit NO-Naproxen (100-300  $\mu\text{M}$ ) oder Naproxen (100-300  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Im Anschluss wurde geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100  $\mu\text{M}$ ) und Lucigenin (50  $\mu\text{M}$ ) 10 Minuten inkubiert.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Auch nach 24stündiger Vorinkubation der Endothelzellen reduzierte NO-Naproxen den ROS-Spiegel konzentrationsabhängig (Abb. 30). Mit einer NO-Naproxen-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  zeigte sich eine signifikante Reduktion detektierbarer ROS um etwa 30 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Die Vorinkubation der Endothelzellen mit Naproxen zeigte keine signifikanten Effekte auf die Konzentration an ROS.

#### 4.5.2 Effekte von NO-NSAIDs in gastralen Epithelzellen

Das Modell für oxidativen Stress wurde ebenfalls für die gastrale Epithelzelllinie KATO-III verwendet. Die Inkubationen erfolgten analog zu denen in Endothelzellen mit NO-Naproxen oder Naproxen bzw. NO-ASS oder ASS.

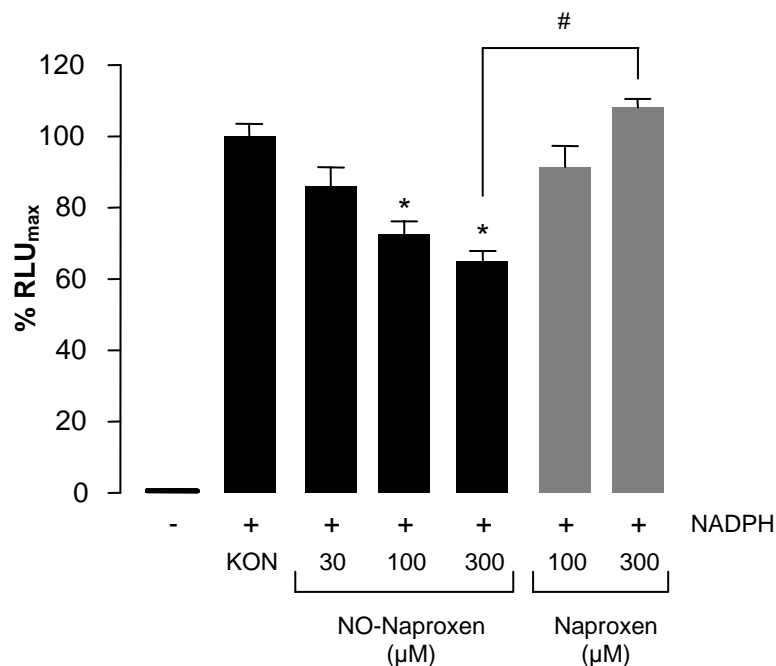


Abb. 31: Effekt von NO-Naproxen und Naproxen auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in gastralen Epithelzellen.

KATO-III-Zellen wurden 24 Stunden mit NO-Naproxen (30-300  $\mu\text{M}$ ) oder Naproxen (100-300  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Im Anschluss wurde geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100  $\mu\text{M}$ ) und Lucigenin (50  $\mu\text{M}$ ) 10 Minuten inkubiert.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#):  $P < 0,05$ ; NO-Naproxen (300  $\mu\text{M}$ ) vs. Naproxen (300  $\mu\text{M}$ ), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Auch in gastralen Epithelzellen senkte eine Vorinkubation mit NO-Naproxen über einen Zeitraum von 24 Stunden die ROS-Spiegel bei Stimulation der Superoxidbildung mit NADPH konzentrationsabhängig (Abb. 31). Erste Effekte wurden ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  sichtbar. Eine signifikante Reduktion des ROS-Spiegels im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  NO-Naproxen war der signifikante Effekt einer etwa 30%igen Reduktion des ROS-Spiegels mit dem in Endothelzellen vergleichbar ausgeprägt. Mit Naproxen zeigten sich keine signifikanten Effekte.



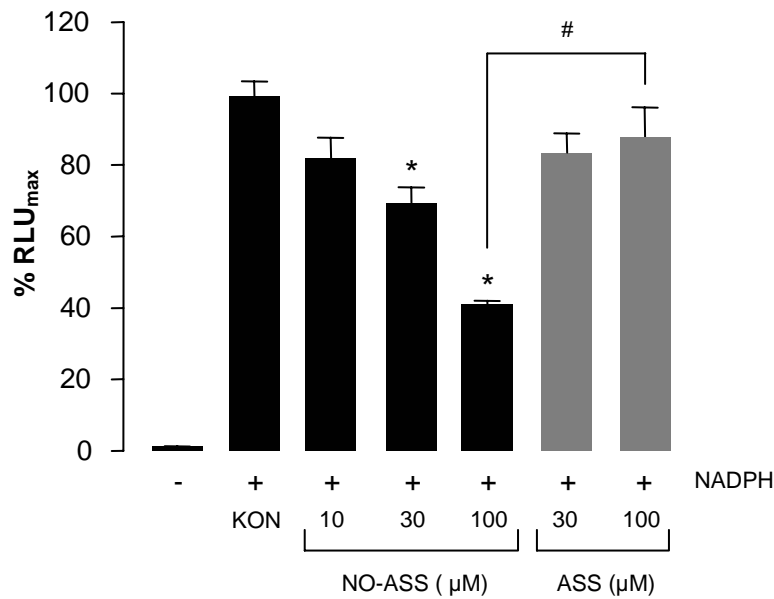


Abb. 32: Effekt von NO-ASS und ASS auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in gastralen Epithelzellen.

KATO-III-Zellen wurden 24 Stunden mit NO-ASS (10-100  $\mu\text{M}$ ) oder ASS (30-100  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Im Anschluss wurde geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100  $\mu\text{M}$ ) und Lucigenin (50  $\mu\text{M}$ ) 10 Minuten inkubiert.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#):  $P < 0,05$ ; NO-ASS (100  $\mu\text{M}$ ) vs. ASS (100  $\mu\text{M}$ ), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Deutlichere Effekte zeigten sich bei Vorbehandlung der KATO-III-Zellen mit NO-ASS oder ASS. Bereits ab 30  $\mu\text{M}$  NO-ASS wurde die Konzentration an ROS signifikant um etwa 30% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen reduziert. Mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  NO-ASS waren nur noch etwa 40% des ROS-Spiegels detektierbar, den NADPH in nicht-vorbehandelten Zellen stimulierte (Abb. 32).

#### 4.5.3 Einfluss des HO-1-Metaboliten Bilirubin

Um eine mögliche Beteiligung der HO-1 an den antioxidativen Effekten der NO-NSAIDs zu analysieren, wurde der Einfluss des HO-1-Metaboliten Bilirubin auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in den verwendeten Zelltypen untersucht.

Die HO-1 wird als antioxidatives Enzym beschrieben (Foresti & Motterlini, 1999; Polte et al., 2000). Die antioxidative Wirkung wird dabei vor allem dem Metaboliten Bilirubin zugeordnet. Eine Reihe von Studien charakterisierte Bilirubin *in vitro* und *in vivo* als direktes Antioxidanz (Clark et al., 2000b; Dore et al., 1999; Stocker et al., 1987).

Die jeweiligen Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, geerntet und in PBS resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit NADPH (100  $\mu\text{M}$ ), Lucigenin (50  $\mu\text{M}$ ) und Bilirubin 10 Minuten inkubiert.

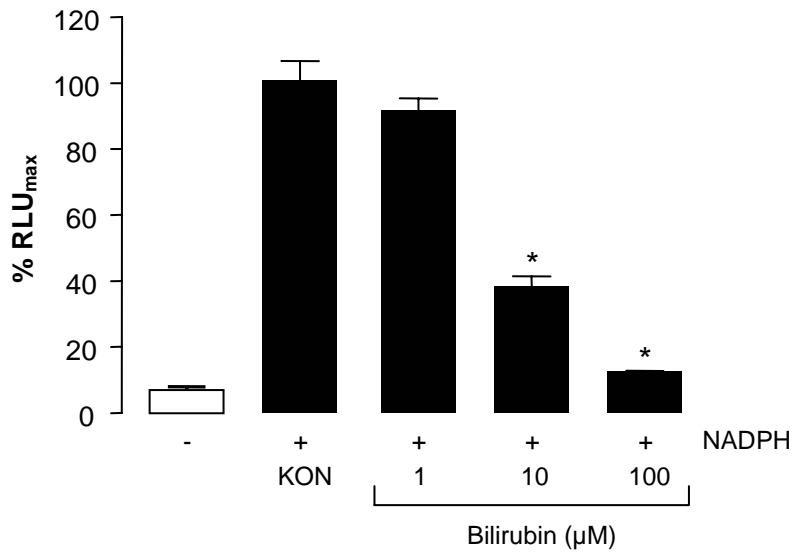


Abb. 33: Effekt von Bilirubin auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen.

ECV-304-Zellen wurden geerntet, in PBS resuspendiert und mit Bilirubin (1-100 µM), NADPH (100 µM) und Lucigenin (50 µM) 10 Minuten inkubiert.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Bilirubin wirkte in Endothelzellen konzentrationsabhängig antioxidativ. Ab 10 µM eingesetzter Konzentration war eine signifikante Reduktion des ROS-Spiegels festzustellen. Eine Bilirubin-Konzentration von 100 µM reduzierte die ROS-Bildung bei Stimulation der NADPH-Oxidase um 90% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 33). Damit wurde der ROS-Spiegel annähernd auf das Niveau nicht-stimulierter Kontrollzellen gesenkt.

Der Einfluss einer Inkubation mit Bilirubin wurde auch in den gastralen Epithelzellen untersucht. Auch in diesem Zellmodell wirkte Bilirubin antioxidativ (Abb. 34). Bereits ab einer Konzentration von 0,3 µM zeigte sich ein signifikanter Effekt auf den ROS-Spiegel. In der höchsten verwendeten Konzentration senkte Bilirubin die Konzentration an ROS bei Stimulation der NADPH-Oxidase um etwa 80% im Vergleich zur Kontrolle.

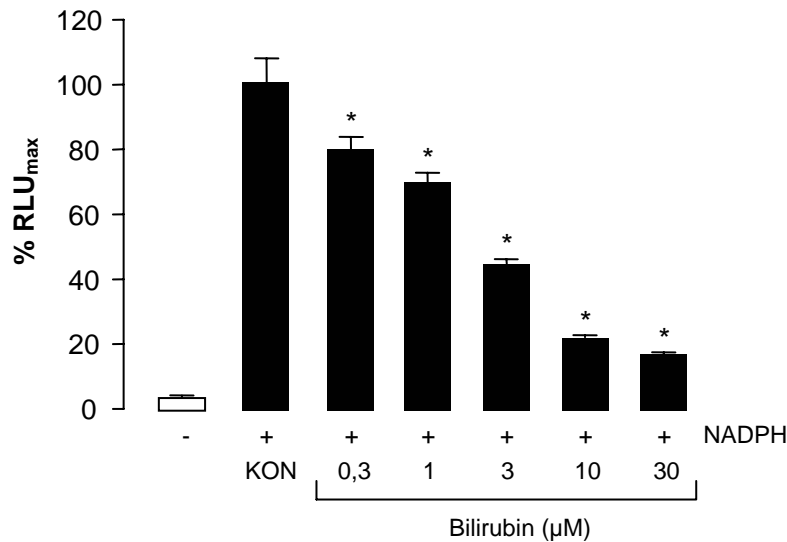


Abb. 34: Effekt von Bilirubin auf die NADPH-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in gastralen Epithelzellen.

KATO-III-Zellen wurden geerntet, in PBS resuspendiert und mit Bilirubin (1-100 µM), NADPH (100 µM) und Lucigenin (50 µM) 10 Minuten inkubiert.

\*) :  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

#### 4.5.4 Einfluss eines Hämoxigenase-Inhibitors auf die antioxidative Wirkung der NO-NSAIDs

Die signifikanten Effekte der NO-NSAIDs auf die Konzentration an freien Sauerstoffradikalen bei 24stündiger Vorbehandlung der jeweiligen Zelllinie sprechen für eine Stimulation antioxidativer Stoffwechselwege. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass NO-NSAIDs die HO-1 in beiden untersuchten Zelltypen induzieren. Auch der HO-1-Metabolit Bilirubin zeigte bereits in niedrigen Konzentrationen signifikante antioxidative Effekte.

Mit Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP) steht ein selektiver Hemmstoff der Hämoxigenase zur Verfügung (Foresti et al., 1999; Petrache et al., 2000; Polte et al., 2000). Durch Vorbehandlung der Endothelzellen mit SnPP sollte der Frage nachgegangen werden, ob die antioxidativen Effekte der NO-NSAIDs ursächlich auf die Induktion der HO-1 zurückzuführen sind.

Die Endothelzellen wurden 15 Minuten mit SnPP (10 µM) vorbehandelt und anschließend mit NO-Naproxen oder NO-ASS über 24 Stunden inkubiert. Die Aufarbeitung und Inkubation zur Messung der ROS-Spiegel wurde wie bei den vorausgegangenen Versuchen durchgeführt.

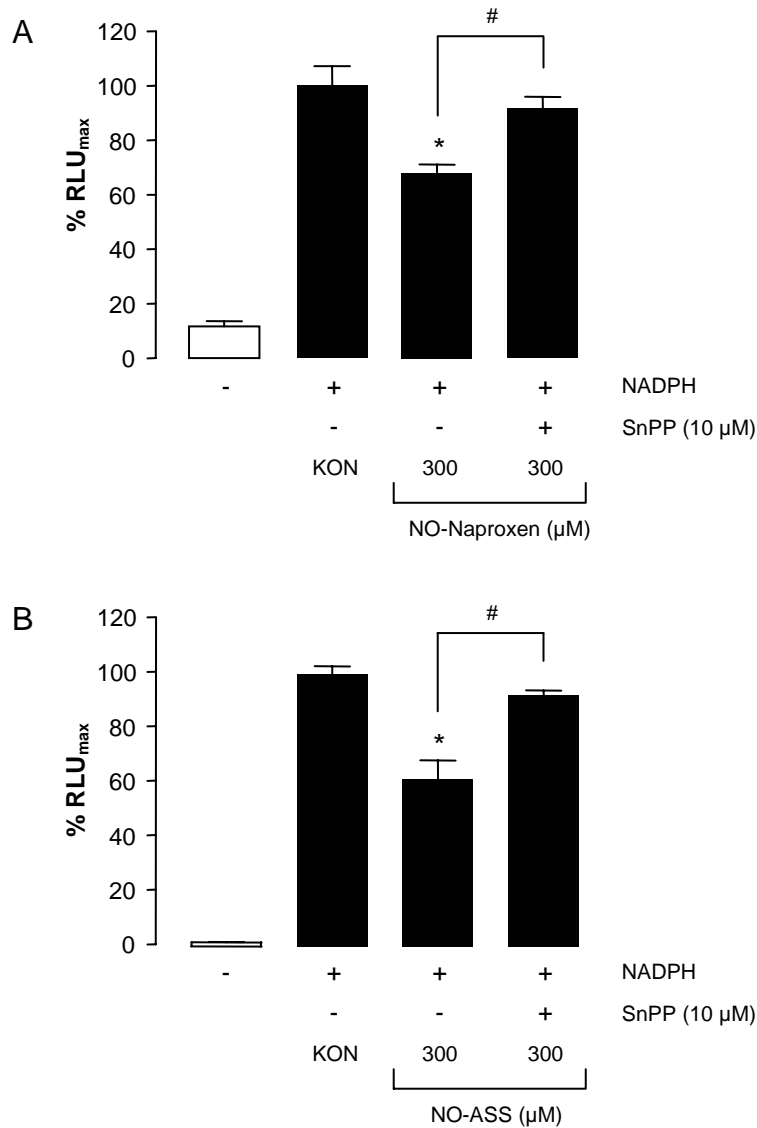


Abb. 35: Einfluss des Hämoxygenase-Inhibitors SnPP auf die Reduktion der NADPH-abhängigen ROS-Bildung durch NO-Naproxen (A) und NO-ASS (B).

ECV-304-Zellen wurden 15 Minuten mit SnPP vorbehandelt und anschließend 24 Stunden mit NO-Naproxen (300 µM) oder NO-ASS (300 µM) inkubiert. Im Anschluss wurde geerntet, in PBS resuspendiert und mit NADPH (100 µM) und Lucigenin (50 µM) 10 Minuten inkubiert.

\*):  $P < 0,05$ ; Inkubation vs. Kontrolle (KON), einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

#):  $P < 0,05$ ; NO-NSAID vs. NO-NSAID + SnPP, einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3-6$  Einzelexperimenten in separaten Zellkulturschalen.

Die Versuche mit SnPP zeigen eine signifikante Aufhebung des NO-NSAID-induzierten Effekts in Endothelzellen durch Hemmung der HO-1-Aktivität. Diese Ergebnisse belegen eindeutig einen kausalen Zusammenhang zwischen der HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs und deren antioxidativer Wirkung bei Inkubation von Endothelzellen über 24 Stunden.

#### 4.5.5 Zusammenfassung

NO-NSAIDs zeigten in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress direkte und indirekte antioxidative Wirkungen. Sowohl bei direkter Zugabe als auch nach 24stündiger Vorinkubation mit anschließendem Auswaschen reduzierten NO-NSAIDs den Anstieg der Sauerstoffradikal-Konzentration bei Stimulation der NADPH-Oxidase.

Der HO-1-Metabolit Bilirubin zeigte im gleichen Modell konzentrationsabhängige antioxidative Effekte. Dieser Befund dokumentiert, dass HO-1-Metabolite unter den gewählten Bedingungen als Mediatoren der NO-NSAID-Effekte in Frage kommen.

Mit Hilfe des Hämoxygenase-Inhibitors SnPP konnte schließlich ein kausaler Zusammenhang zwischen der HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs und deren antioxidativen Wirkungen festgestellt werden.