

## 5 Diskussion

NSAIDs gehören weltweit zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten und den gängigsten, frei verkäuflichen Präparaten. Der längerfristige Einsatz von NSAIDs zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen ist jedoch vor allem durch gastrointestinale Komplikationen und eine Störung der Nierenfunktion eingeschränkt (Wallace, 1997). Bei etwa 15-30% der Patienten, die regelmäßig NSAIDs einnehmen, lassen sich endoskopisch Magen-Darm-Ulzera feststellen. Dyspeptische Beschwerden im oberen Gastrointestinaltrakt treten sogar bei bis zu 60% der NSAID-Anwender auf (Laine, 2003). Darüber hinaus erhöhen NSAIDs den Blutdruck und beeinflussen die Wirksamkeit antihypertensiver Therapien. Für Herz-Kreislauf-Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen mangelt es bisher jedoch an wirksamen, weniger riskanten Alternativen.

Die Einnahme von NSAIDs hat sich als Therapie auch zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse etabliert. ASS blockiert bei niedrig dosierter (75-100 mg/Tag), regelmäßiger Einnahme effektiv die  $\text{TxA}_2$ -Synthese durch irreversible Hemmung der COX-1 in den Thrombozyten. In den meisten Geweben bleibt die Bildung der Prostaglandine unbeeinflusst, allerdings nicht im Magen. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse der *US Preventive Services Task Force* betrachtete fünf klinische Studien, in denen ASS zur Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen über 4-7 Jahre eingenommen wurde. Die zusammengefassten Daten dieser Studien zeigen, dass ASS das Risiko für eine koronare Herzkrankheit um 28% senkte. Die Gesamtmortalität blieb allerdings unbeeinflusst. Dies wird unter anderem den gastrointestinalen Komplikationen zugeschrieben. Insbesondere bei älteren Patienten trägt die Häufigkeit gastrointestinaler Blutungen signifikant zur Gesamtmortalität bei (Fiorucci & Del Soldato, 2003; Hayden et al., 2002).

Diese Nebenwirkungen limitieren den Nutzen der NSAIDs als hochwirksame, therapeutisch wertvolle Arzneistoffgruppe. In den letzten Jahren wurden daher verschiedene Strategien verfolgt, die gastrale Toxizität der NSAIDs zu verringern. Der Einsatz von Prodrugs, Magensäure-resistenten Manteltabletten oder Formulierungen, die den Arzneistoff langsam freisetzen, konnte die gastralen Nebenwirkungen nicht signifikant reduzieren (Wolfe et al., 1999). Eine andere Strategie ist die gleichzeitige Gabe von NSAIDs und Misoprostol. Dieses Prostaglandin-Derivat soll bei Hemmung der COX-1 in der Mukosa fehlende Prostaglandine ersetzen. In der *MUCOSA*-Studie reduzierte Misoprostol signifikant das Auftreten gastrointestinaler Komplikationen bei der gleichzeitigen Einnahme von NSAIDs (Silverstein et al., 1995). Allerdings treten auch unter dieser Therapie eine Reihe von Nebenwirkungen auf. Dazu zählen Krämpfe, dyspeptische Beschwerden und bei etwa 11% der Patienten in der *MUCOSA*-Studie eine Diarrhö. Auf Grund eines relativ hohen Kosten-Nutzen-Verhältnisses wird die prophylaktische Gabe von Misoprostol daher oftmals in Frage gestellt (Wallace, 1997).

Zu den weiteren Strategien gehört die Begleittherapie mit Hemmstoffen der Säuresekretion wie Histamin- $(\text{H}_2)$ -Rezeptorantagonisten oder Protonenpumpen-Hemmern. Die  $\text{H}_2$ -Rezeptorantagonisten senken das Risiko für gastrale Ulzera nicht effektiv. Darüber hinaus können sie die Warnsymptome schwerer gastrointestinaler Komplikationen maskieren. Protonenpumpen-Hemmer dagegen fördern die Heilung NSAID-induzierter Ulzera und reduzieren das Risiko für gastrale Blutungen. Außerdem mindern sie dyspeptische Beschwerden (Hawkey & Langman, 2003). Da Protonenpumpen-Hemmer in der Regel gut verträglich sind, wird deren prophylaktische Gabe bei Risikopatienten zusätzlich zur NSAID-Therapie empfohlen (Laine, 2003).

Die 1999 auf den Markt gekommenen Coxibe sollten die Ansprüche an sicherere NSAIDs in der Schmerz- und Rheumatherapie erfüllen und die zusätzliche Gabe eines Protonenpumpen-Hemmers überflüssig machen. Coxibe hemmen selektiv die bei Schmerz und Entzündung induzierte COX-2. Die konstitutiv exprimierte COX-1 in der Magenschleimhaut wird jedoch nicht beeinflusst (FitzGerald & Patrono, 2001; Mitchell & Warner, 1999). Das belegen klinische Studien, in denen das Risiko für gastrointestinale Komplikationen um 50% gesenkt war (Bombardier et al., 2000; Silverstein et al., 2000). Doch auch die Coxibe sind nicht frei von unerwünschten Wirkungen. Die COX-2 wird nicht nur durch proinflammatorische Mediatoren induziert, sondern auch konstitutiv exprimiert. Durch Hemmung von COX-2-Enzymen in der Niere erhöhen Coxibe den Blutdruck und verursachen Ödembildungen (Hawkey & Langman, 2003). Die Hemmung der COX-2 beeinträchtigt die Wundheilung und verzögert die Heilung von Magenulzera (Mizuno et al., 1997; Schmassmann et al., 1998). Bei Hypertonie, Herzinsuffizienz oder eingeschränkter Nierenfunktion ist die Therapie mit Coxiben daher mit dem gleichen Risiko verbunden wie der Einsatz klassischer NSAIDs.

Da Coxibe die COX-1 in den Thrombozyten per se nicht beeinflussen, besitzen sie nicht die positiven antithrombotischen Eigenschaften klassischer NSAIDs. Im Gegenteil scheinen Coxibe das kardiovaskuläre Risiko eher zu erhöhen (Mukherjee et al., 2001). Die *VIGOR*-Studie bestätigte die gastrointestinale Sicherheit des Coxibs Rofecoxib, belegte aber auch ein fünffach höheres Herzinfarkttrisiko im Vergleich zum klassischen NSAID Naproxen (Bombardier et al., 2000). Die *CLASS*-Studie mit Celecoxib lässt sich dahingehend deuten, dass dieses Risiko durch die Begleittherapie mit ASS vermeidbar ist (Silverstein et al., 2000). Eine gleichzeitige Einnahme von ASS könnte jedoch langfristig die gastrointestinalen Vorteile zunichte machen. Bei älteren, multimorbiden Patienten stellt sich daher die Frage, ob eine Schmerztherapie mit Coxiben überhaupt sinnvoll ist.

Die Entwicklung gastroprotektiver NSAIDs ist nach wie vor von großem medizinischem Interesse. Die neueste Weiterentwicklung von NSAIDs sind die dual wirkenden NO-NSAIDs. Diese kombinieren die Hemmung beider COX-Isoenzyme mit einer kontrollierten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Keeble & Moore, 2002).

In der Magenschleimhaut endogen gebildetes NO wirkt mit den Prostaglandinen synergistisch protektiv. Eine Reihe von Studien bestätigt, dass NO bei Hemmung der COX die Funktion der Prostaglandine übernehmen kann. Durch Dilatation der Gefäße hält NO die Durchblutung der Mukosa aufrecht. Am Gefäßendothel hemmt NO die Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten. NO stimuliert zusätzlich die luminale Sekretion von Schleim, Flüssigkeit und Bicarbonat. Außerdem kann NO sowohl Endothel- als auch Epithelzellen direkt vor Schädigung durch prooxidative oder proapoptotische Agenzien schützen (Wallace & Miller, 2000).

Die gleichzeitige Applikation von NO-Donoren und NSAIDs schützte im Tiermodell die Mukosa und beschleunigte die Heilung gastraler Ulzera (Barrachina et al., 1995; Konturek et al., 1993; Kosonen et al., 1999; Lopez-Belmonte et al., 1993). Eine epidemiologische Studie belegte darüber hinaus, dass bei Einnahme konventioneller NO-Donoren das gesteigerte Risiko gastrointestinaler Blutungen durch niedrig dosierte ASS deutlich geringer ist (Lanas et al., 2000). Spontan NO-freisetzende Verbindungen und organische Nitrate wie GTN eignen sich jedoch nicht zur Präventionstherapie. Sie setzen NO schnell und kurzzeitig frei und haben dadurch für diese Indikation unerwünschte blutdrucksenkende Effekte.

NO-NSAIDs sind saure NSAIDs, deren Carboxylgruppe mit einer NO-freisetzenden Gruppe (z.B. Nitrooxybutyl-, Nitrooxymethylphenyl-Gruppe) verestert ist. NO wird aus diesen Verbindungen enzymatisch abgespalten. Die Freisetzung erfolgt daher langsamer und dauert länger an als bei konventionellen NO-Donoren. Im Tiermodell verlief die NO-Freisetzung aus NO-NSAIDs mit niedriger Rate über mehrere Stunden. Die Nitratkonzentrationen im Plasma und der Anstieg der cGMP-Konzentration in Thrombozyten lagen deutlich unter den mit organischen Nitraten wie GTN erreichten

Konzentrationen (Muscara et al., 2001). In der kontrollierten Freisetzung könnte auch die Begründung dafür liegen, warum NO-NSAIDs den systemischen Blutdruck nicht beeinflussen. Im Tiermodell erfolgte keine Blutdrucksenkung durch die Gabe von NO-NSAIDs. Nur bei experimentell hervorgerufener Hypertension senkten NO-NSAIDs den Blutdruck (Muscara et al., 2001; Wallace et al., 1994). Auch in den ersten Humanstudien wurde der Blutdruck durch NO-NSAIDs nicht beeinflusst (Fiorucci et al., 2003; Hawkey et al., 2003).

Da NO-NSAIDs aus zwei aktiven Gruppen bestehen, setzt sich das Wirkprofil aus COX-abhängigen und NO-vermittelten Effekten zusammen. Einige der antiinflammatorischen, analgetischen und antithrombotischen Wirkungen sind nicht mit höheren Konzentrationen der Muttersubstanzen zu erreichen und daher eindeutig der NO-Freisetzung zuzuschreiben (Wallace et al., 2002). Die molekularen Wirkmechanismen der NO-NSAIDs sind allerdings noch nicht vollständig geklärt.

Bisher konnte gezeigt werden, dass einige der Effekte über die NO-abhängige Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und die gesteigerte Bildung des *second messengers* cGMP vermittelt werden.

Über diesen Signalweg dilatieren NO-NSAIDs lokal Blutgefäße und halten die Durchblutung von Geweben aufrecht. So schützen NO-NSAIDs nicht nur Magen und Niere vor ischämischer Schädigung, neuere Studien zeigen auch eine kardioprotektive Wirkung.

In der vorliegenden Arbeit konnte NO-Naproxen als potenter Aktivator des cGMP/Guanylatcyclase-Systems charakterisiert werden. Die verwendeten LLC-PK-1-Zellen stellen ein etabliertes Modell für Untersuchungen an diesem System dar (Bennett et al., 1989; Hinz & Schröder, 1998; Schröder & Schröder, 1990). NO-Naproxen stimulierte in LLC-PK-1-Zellen die cGMP-Bildung konzentrationsabhängig bis zu 27fach über den Basalspiegel. Untersuchungen mit Superoxiddismutase (SOD) und Hämoglobin belegen, dass die Steigerung des cGMP-Spiegels ursächlich auf die Freisetzung von NO zurückzuführen ist. Die SOD wirkt neutralisierend auf Superoxid, das mit NO zu Peroxynitrit reagiert (Wink et al., 1999). Die Vorbehandlung mit SOD verdoppelte den Effekt von NO-Naproxen auf die cGMP-Bildung. Hämoglobin fungiert als NO-Radikalfänger und hob den Effekt von NO-Naproxen nahezu vollständig auf.

Welche Enzymsysteme die Abspaltung von NO aus den NO-NSAIDs katalysieren, bedarf noch der Klärung. Eine Vorinkubation der LLC-PK-1-Zellen mit GTN über 5 Stunden führte zur konzentrationsabhängigen *Downregulation* der NO-Freisetzung sowohl aus GTN als auch aus NO-Naproxen. Ebenso war bei einer Vorinkubation mit NO-Naproxen die NO-Freisetzung aus GTN und NO-Naproxen selbst konzentrationsabhängig reduziert. Diese Kreuzempfindlichkeit zwischen NO-Naproxen und GTN gibt einen Beleg dafür, dass beide Verbindungen über gleiche Stoffwechselwege bioaktiviert werden. Dies steht in Einklang mit einer NO-ASS-Studie im gleichen Modellsystem (Grosser & Schröder, 2000). Für organische Nitrate wie GTN konnte eine Beteiligung von Cytochrom-P450-Enzymen gezeigt werden, die somit auch für die Bioaktivierung der NO-NSAIDs in Frage kommen. (Schröder, 1992; Yuan et al., 1997). Chen et al. identifizierten kürzlich eine mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase, die zur NO-Freisetzung aus GTN beiträgt und auch bei der Bioaktivierung der NO-NSAIDs eine Rolle spielen könnte (Chen et al., 2002b).

NO-NSAIDs wirken ebenfalls über den Mediator cGMP antithrombotisch. So besitzt NO-ASS durch den dualen Wirkmechanismus stärkere antithrombotische Eigenschaften als ASS (Momi et al., 2000). In der initialen Phase der Entstehung einer Thrombose spielen aktivierte Monozyten und Makrophagen eine entscheidende Rolle. Diese Zellen bilden TxA<sub>2</sub> und exprimieren den *tissue factor* (Gewebethromboplastin,

Faktor III). Außerdem setzen sie proinflammatorische Cytokine, Chemotaxine und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei.

Eine Reihe von Studien untersuchte den Wirkmechanismus von NO-ASS als antithrombotischem Agens. NO-ASS hemmte die  $\text{TxA}_2$ -Bildung, die Aktivität des *tissue factors* und die Freisetzung von  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-6 in LPS-stimulierten Monozyten über einen NO- und cGMP-abhängigen Mechanismus. ASS hatte hingegen keine signifikanten Effekte (Minuz et al., 2001). Darüber hinaus inhibierte NO-ASS die Plättchenadhäsion und -aggregation bei Stimulation mit Thrombin. Auch dieser Effekt ist der Freisetzung von NO zuzuschreiben, da er mit Hemmung der COX nicht erreicht werden kann (Lechi et al., 1996).

Bei inflammatorischen Prozessen kommt es zu einer vermehrten Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten am Gefäßendothel. Dies kann zum thrombotischen Verschluss der Gefäße führen. Außerdem setzen aktivierte Leukozyten ROS und Proteasen frei und schädigen die Endothelschicht direkt (Wallace, 1997). An kultivierten Endothelzellen konnte eine Hemmung dieser Prozesse durch NO und cGMP gezeigt werden (Kosonen et al., 1999). Auch NO-NSAIDs reduzierten *in vitro* die Leukozyten-Adhäsion (Wallace et al., 1999). Als Mechanismus wird eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen diskutiert. Inwiefern der Effekt von einer gesteigerten cGMP-Bildung abhängt, ist noch nicht eindeutig geklärt (Wallace et al., 2002).

Einige der antiinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften der NO-NSAIDs sind direkten, cGMP-unabhängigen Effekten von Stickstoffmonoxid zuzuordnen. Als Wirkmechanismus wird die Hemmung einer Enzymfamilie von Proteasen, der Caspasen, postuliert.

Eine direkte Inhibierung der Caspase-Enzyme durch S-Nitrosylierung konnte mit NO-Donoren in Endothelzellen und Hepatozyten demonstriert werden (Dimmeler et al., 1997; Kim et al., 1997c). Am besten untersucht ist die NO-vermittelte Hemmung von Caspase-1 und Caspase-3. Die Caspase-1 ist das IL-1 $\beta$ -konvertierende Enzym, dessen Expression vor allem im Entzündungsgeschehen hochreguliert wird. Die Caspase-3 ist eine so genannte Effektor-Caspase der Apoptose und als solche entscheidend am Zelltod durch proapoptotische Stimuli beteiligt (Kim et al., 1997c).

Im Tiermodell konnten Fiorucci et al. zeigen, dass die orale Gabe von ASS, Naproxen und Flurbiprofen eine zeit- und dosisabhängige Schädigung der Magenschleimhaut induzierte. Diese stand mit einer gesteigerten Apoptoserate und Aktivität von Caspase-Enzymen im Zusammenhang. NO-NSAIDs verursachten hingegen keine Schädigung der Mukosa und hemmten die Aktivität der Caspase-1 und -3. (Fiorucci et al., 1999a; Fiorucci et al., 1999b). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch mit NO-Flurbiprofen in kultivierten Magenzellen (Johal & Hanson, 2000). Außerdem wurde nachgewiesen, dass NO-NSAIDs durch Hemmung der Aktivität von Caspase-1 und -3 Endothelzellen vor  $\text{TNF-}\alpha$ -induzierter Apoptose schützen (Fiorucci et al., 1999b). Eine Hemmung der Caspase-1 konnte auch in LPS-stimulierten Monozyten gezeigt werden. Sie stellt einen COX-unabhängigen, entzündungshemmenden Mechanismus der NO-NSAIDs dar (Fiorucci et al., 2000).

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen am Beispiel des NO-Naproxens klar, dass NO-NSAIDs als potente intrazelluläre NO-Donoren fungieren und damit in der Lage sind, die oben beschriebenen NO- bzw. cGMP-sensitiven Signalwege zu aktivieren.

Diese Arbeit beschäftigt sich außerdem mit einem weiteren möglichen Wirkmechanismus der NO-NSAIDs. Es konnte gezeigt werden, dass NO-NSAIDs durch intrazelluläre Freisetzung von NO die HO-1 in Endothelzellen induzieren.

In den letzten Jahren untersuchte eine Reihe von Studien die HO-1-Induktion durch Stickstoffmonoxid in den unterschiedlichsten Zelltypen. In Endothelzellen stimulierten spontan NO-freisetzende Verbindungen die Proteinexpression und Enzymaktivität der HO-1 (Motterlini et al., 1996a; Polte et al., 2000). In Gefäßmuskelzellen erfolgte mit spontanen NO-Donoren eine konzentrations- und zeitabhängige Stimulation der Transkription des HO-1-Gens (Durante et al., 1997; Hartsfield et al., 1997). Auch in Hepatozyten war mit NO-Donoren sowohl im Zellversuch als auch nach Gabe im Tiermodell ein signifikanter Anstieg der HO-1-mRNA-Konzentration detektierbar (Immenschuh et al., 1998; Motterlini et al., 1996b). Darüber hinaus stimulierte der NO-Donor SNP die mRNA-Bildung, Proteinexpression und Enzymaktivität der HO-1 in Nierenepithelzellen (Liang et al., 2000).

Einige Studien konnten allerdings für bestimmte Prostaglandin-Derivate einen induktiven oder bei einer Induktion der HO-1 synergistisch wirkenden Effekt nachweisen, während NSAIDs die Proteinexpression hemmten (Chen et al., 2002a; Koizumi et al., 1995). Es ist daher von Bedeutung, dass NO-NSAIDs die HO-1 induzieren, obwohl sie gleichzeitig beide COX-Isoenzyme und somit die Prostaglandin-Synthese hemmen. Offensichtlich kommt es aufgrund der NO-freisetzenden Eigenschaften zur HO-1-Induktion auch unter Bedingungen einer gleichzeitig gehemmten Prostaglandin-Synthese.

Die NO-NSAIDs NO-Naproxen, NO-ASS und NO-Flurbiprofen stimulierten im mikromolaren Konzentrationsbereich sowohl die mRNA-Bildung als auch die Proteinexpression der HO-1. Die Transkription des HO-1-Gens wurde konzentrations- und zeitabhängig aktiviert. Der Effekt ist ursächlich auf die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und nicht auf die Hemmung von COX-Enzymen zurückzuführen. Weder die NO-freien Muttersubstanzen noch der selektive COX-2-Hemmer Rofecoxib zeigten einen induktiven Effekt auf die HO-1.

Die klinische Bedeutung der HO-1-Induktion durch NO-NSAIDs könnte sich in einer verbesserten Endothelfunktion und einem geringeren kardiovaskulären Risiko manifestieren. Während klassische NSAIDs und COX-2-Hemmer den Blutdruck erhöhen können, zeigten NO-NSAIDs sowohl im Tiermodell als auch in Humanstudien antihypertensive und protektive Eigenschaften im kardiovaskulären System und in der Niere (Muscara et al., 2000b; Wallace & Del Soldato, 2003). Die hier vorgelegten Ergebnisse lassen erkennen, dass die antioxidativen und vasodilatatorischen Wirkungen der HO-1-Metabolite Bilirubin und CO neben den NO-vermittelten Effekten zum vorteilhaften kardiovaskulären und renalen Profil der NO-NSAIDs beitragen könnten. Dies unterscheidet die NO-NSAIDs deutlich von den Coxiben, die am Beispiel des Rofecoxibs keinen induktiven Effekt auf die HO-1 zeigten und das kardiovaskuläre Risiko durch Erhöhung des Blutdrucks und prothrombotische Effekte erhöhen können (Mukherjee et al., 2001).

Die getesteten NO-NSAIDs waren hinsichtlich der Aktivierung des HO-1-Gens unterschiedlich potent. NO-Naproxen zeigte in Endothelzellen bereits in einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  eine signifikante, etwa 3fache Induktion der HO-1-mRNA. Mit 100  $\mu\text{M}$  NO-Naproxen wurde die Bildung der HO-1-mRNA etwa auf das 4Fache der Konzentration unbehandelter Kontrollzellen gesteigert. Im Vergleich dazu induzierten 100  $\mu\text{M}$  NO-ASS die HO-1-mRNA nur etwa 2fach. Eine Stimulation um das 4Fache war erst mit einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  zu erreichen.

NO-Flurbiprofen hingegen führte schon in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Induktion. Allerdings trat die maximal erreichbare, etwa 2fache Stimulation schon bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  auf. Damit war der Effekt von NO-Flurbiprofen im Vergleich zu NO-Naproxen und NO-ASS deutlich schwächer, obwohl NO-Flurbiprofen und NO-Naproxen die gleiche NO-freisetzende Nitrooxybutyl-Gruppe tragen.

Bei der Expression des HO-1-Proteins nach Inkubation über 24 Stunden zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. Die Aktivierung der mRNA-Bildung führt also auch zu einer gesteigerten HO-1-Proteinexpression. NO-Naproxen stimulierte in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  die Proteinsynthese signifikant. Die dreifach höhere Konzentration erbrachte wie auf mRNA-Ebene keine weitere Steigerung. Ähnlich stark war die Proteinexpression erst bei einer NO-ASS-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  ausgeprägt.

In physiologisch relevanter Gewebe- oder Plasma-Konzentration von weniger als 100  $\mu\text{M}$  zeigte NO-Naproxen somit die stärkste Induktion der HO-1 auf mRNA- und Protein-Ebene in Endothelzellen.

Konzentrationen im mikromolaren Bereich sind auch als lokale Plasma- oder Gewebekonzentrationen *in vivo* zu erwarten und damit von klinischer Relevanz. Die erste Humanstudie mit NO-Naproxen belegte eine Naproxen-Bioverfügbarkeit aus NO-Naproxen von 95%. Bei oraler Gabe von NO-Naproxen oder Naproxen waren die minimalen Plasmakonzentrationen mit etwa 250  $\mu\text{M}$  im *steady state* und die AUC (*area under the curve* = Fläche unter der Blutspiegel/Zeit-Kurve) vergleichbar. Dies spricht für eine ähnliche Resorption beider Verbindungen aus dem Magen. (Hawkey et al., 2003).

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Verbindungen könnten sowohl durch deren Membrangängigkeit als auch durch die Freisetzungskinetik der NO-Gruppe verursacht sein. NO-Naproxen ist ein sehr lipophiles Öl, das als Emulsion zum Einsatz kam. Eine beschleunigte Passage durch Zellmembranen könnte dadurch ermöglicht sein und die überlegene Wirksamkeit von NO-Naproxen im verwendeten Zellkulturmodell erklären. Als NO-freisetzende Gruppe tragen NO-Naproxen und NO-Flurbiprofen eine Nitrooxybutyl-Gruppe, während NO-ASS eine Nitrooxymethylphenyl-Gruppe trägt (Abb. 1). Die Größe dieser Molekülgruppe könnte eine unterschiedliche NO-Freisetzung aus NO-ASS und NO-Naproxen begründen. Im NO-Flurbiprofen-Molekül sind NSAID und Nitrooxybutyl-Gruppe darüber hinaus über einen weiteren *Spacer* verestert. Die damit verbundene Molekülgröße und die zusätzlich erforderliche Esterase-Aktivität könnten eine langsamere Bioaktivierung erklären. Die bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikante Induktion der HO-1 spricht für eine bessere Membrangängigkeit von NO-Flurbiprofen im Vergleich zu NO-Naproxen und NO-ASS. Die insgesamt deutlich niedrigere, maximal erreichbare Stimulation im betrachteten Zeitraum von 8 Stunden weist auf eine verlangsamte Freisetzung von NO hin.

Eine *In-vivo*-Studie mit NO-Flurbiprofen zeigte erhöhte Nitratspiegel sogar im Gehirn nach oraler Gabe. Dieses Ergebnis spricht nicht nur für eine retardierte Bioaktivierung im systemischen Kreislauf sondern auch für eine gute Membrangängigkeit von NO-Flurbiprofen. Im Einklang damit konnte ein Potenzial dieser Verbindung bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen gezeigt werden (Prosperi et al., 2001).

Auch die Ergebnisse auf cGMP-Ebene sprechen für eine bessere Membrangängigkeit und gesteigerte NO-Freisetzung aus NO-Naproxen. Bei Inkubation von LLC-PK-1-Zellen mit 30  $\mu\text{M}$  NO-Naproxen konnte eine bis zu 27fach höhere cGMP-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen bestimmt werden. Eine Versuchsreihe mit NO-ASS im gleichen Zelltyp zeigte in Konzentrationen bis zu 500  $\mu\text{M}$  nur eine maximal etwa 9fache Stimulation der cGMP-Bildung (Grosser & Schröder, 2000). Untersuchungen mit NO-Flurbiprofen ergaben bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  nur eine etwa 3fache, mit 300  $\mu\text{M}$  eine etwa 13fache Steigerung des cGMP-Spiegels (ohne Abb.).

Im Hinblick auf NO-abhängige Effekte zeigte NO-Naproxen in physiologischen Konzentrationen unter 100  $\mu\text{M}$  insgesamt die größte Potenz. Sowohl bei der cGMP-Bildung als auch bei der Induktion der HO-1 auf mRNA- und Proteinebene war mit NO-Naproxen im Vergleich zu NO-ASS und NO-Flurbiprofen die maximale Stimulation am stärksten. Die Korrelation zwischen der an der cGMP-Bildung gemessenen NO-

Freisetzung und der HO-1-Induktion weist noch einmal deutlich auf die kausale Rolle von NO als Mediator hin.

Mit Hilfe der gastralen Epithelzelllinien KATO-III und AGS konnte außerdem festgestellt werden, dass NO-NSAIDs die HO-1 auch in diesem Zelltyp induzieren. Eine NO-abhängige Induktion der HO-1 in gastralen Epithelzellen wird in dieser Arbeit erstmalig dokumentiert.

Am Beispiel von NO-ASS wurde nachgewiesen, dass die Bildung der HO-1-mRNA in gastralen Epithelzellen mit maximal etwa 5facher Stimulation mit den Ergebnissen in Endothelzellen vergleichbar ist. Auch eine gesteigerte Proteinexpression war ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  NO-ASS oder NO-Naproxen festzustellen.

Die HO-1 wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als antiinflammatorisches, antiatherogenes und cytoprotektives Protein charakterisiert (Foresti & Motterlini, 1999; Immenschuh & Ramadori, 2000; Polte et al., 2000). Eine vermehrte Expression der HO-1 könnte Bestandteil des Wirkprofils der NO-NSAIDs sein und einen bislang unbekanntem Wirkmechanismus darstellen.

Diese Hypothese ist anhand dreier wesentlicher Schritte der Schädigung der Magenschleimhaut durch NSAIDs zu begründen:

(1) Die initiale Phase der Mukosa-Schädigung ist ein Entzündungsgeschehen, zu dem die vermehrte Produktion von ROS durch Leukozyten und mukosale Immunzellen beiträgt.

Die HO-1 gilt als ein Modulator entzündlicher Prozesse. Die antiinflammatorische Wirkung wird dabei vor allem dem beim Hämabbau gebildeten CO zugeschrieben. CO hemmt die Freisetzung proinflammatorischer Cytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und steigert die Produktion entzündungshemmender Interleukine (Otterbein et al., 2000; Willis et al., 1996). Wichtige Metabolite des HO-1-Stoffwechsels wirken antioxidativ und können Endothel- und Epithelzellen vor Schädigung durch ROS schützen. In-vitro-Studien zeigten für Bilirubin direkte antioxidative Wirkungen, die die von  $\alpha$ -Tocopherol und Vitamin C übertrafen (Stocker et al., 1987). Die physiologische Relevanz von Bilirubin als Antioxidanz belegt eine Reihe von Tiermodell- sowie Humanstudien (Clark et al., 2000b; Dennery et al., 1995; Mayer, 2000; Schwertner et al., 1994). In Zellkultur schützten 10 nM Bilirubin HeLa-Zellen vor Schädigung durch die 10.000fach höhere Konzentration an Wasserstoffperoxid. Erklärbar ist dies dadurch, dass Bilirubin nicht nur stöchiometrisch mit ROS zu Biliverdin reagiert, sondern durch die Biliverdin-Reduktase in einem Redox-Zyklus regeneriert wird (Baranano et al., 2002). Ebenfalls antioxidative und cytoprotektive Funktion besitzt das Eisenspeicherprotein Ferritin, dessen Translation durch freie Eisenionen stimuliert wird (Balla et al., 1992; Oberle et al., 1999).

(2) Durch Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten sowie deren Aggregation kommt es in der gastralen Mikrozirkulation zu Thrombenbildung und ischämischen Zuständen.

Durch HO-1-Aktivität gebildetes CO reguliert den Tonus der Gefäßmuskulatur und hemmt die Plättchenaggregation. Ähnlich wie NO entfaltet CO diese Wirkungen auch über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (Ryter et al., 2002).

(3) Eine gesteigerte Apoptoserate stört die Integrität der Mukosa durch endotheliale Dysfunktion und Verlust der Barrierefunktion des Epithels. Störungen von Zellwachstum und Angiogenese beeinflussen die Heilung gastrointestinaler Ulzera.

Durch HO-1-Aktivität gebildetes CO wirkt antiapoptotisch. So schützte endogenes CO Endothelzellen vor TNF- $\alpha$ -induzierter Apoptose (Brouard et al., 2002; Brouard et al., 2000). Darüber hinaus spielt die HO-1 eine entscheidende Rolle im Zellwachstum und

bei der Angiogenese. Dies könnte auch bei der Regeneration der Magenschleimhaut von Bedeutung sein (Durante, 2003).

Durch NO-NSAIDs induzierte HO-1 könnte also über die Metabolite Bilirubin und CO sowie eine Stimulation der Ferritin-Synthese durch freie Eisenionen zur gastralen Protektion beitragen.

Inwieweit sich die genomischen Effekte von NO-NSAIDs funktionell tatsächlich als antioxidative Schutzwirkung manifestieren, wurde in der vorliegenden Arbeit in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress untersucht. Im Entzündungsgeschehen ist das Gefäßendothel einer Vielzahl von Oxidanzien ausgesetzt, die durch aktivierte Leukozyten und hochregulierte Enzyme wie die Xanthin-Oxidase und die NADPH-abhängige Oxidase produziert werden (Terry et al., 1998).

Die pathophysiologische Situation des oxidativen Stresses wurde durch Inkubation der jeweiligen Zellen mit NADPH hervorgerufen. Dadurch wird die NADPH-abhängigen Oxidase stimuliert, Superoxid-Radikale zu bilden (Griendling et al., 2000; Guzik et al., 2000).

Am Beispiel des NO-Naproxens konnte gezeigt werden, dass NO-NSAIDs in Endothelzellen antioxidative Eigenschaften schon bei direkter Zugabe zum Inkubationsansatz entfalten. Diese Eigenschaft ist durch direkte Neutralisation von ROS durch NO zu erklären (Wink et al., 1999). Doch die Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs ließ auch die Existenz indirekter, potenziell antioxidativer Eigenschaften vermuten. Da eine Inkubation mit NO-NSAIDs über 24 Stunden zu einer gesteigerten Proteinexpression der HO-1 geführt hatte, wurden die Endothelzellen über diesen Zeitraum mit NO-Naproxen vorbehandelt. Direkte neutralisierende Wirkungen freier NO-Radikale sind aufgrund der kurzen Halbwertszeit und hohen Reaktivität von NO in biologischen Medien nach 24 Stunden ausgeschlossen. Darüber hinaus wurden die Zellen ausgewaschen, um die Substanz zu entfernen.

Auch nach dieser Prozedur konnte eine antioxidative Wirkung von NO-Naproxen in Endothelzellen festgestellt werden, die weder durch direkte Effekte der Substanz noch durch eine neutralisierende Wirkung von NO selbst hervorgerufen sein konnte. Während NO-Naproxen den ROS-Spiegel signifikant senkte, zeigte die NO-freie Muttersubstanz keine Wirkung.

Um die Verhältnisse in der Magenschleimhaut besser untersuchen zu können, wurde das gleiche Zellkulturmodell ebenfalls für gastrale Epithelzellen verwendet. Es zeigten sich auch in diesem Zelltyp indirekte antioxidative Effekte der NO-NSAIDs nach 24stündiger Vorbehandlung und anschließendem Auswaschen der Zellen.

Diese Befunde zeigen klar, dass NO-NSAIDs zu einer lang anhaltenden, dauerhaften Zellprotektion führen, die mit einer Induktion antioxidativer Gene erklärt werden kann.

Durch Behandlung der Zellen mit Bilirubin sollte der Frage nachgegangen werden, ob HO-1-Metabolite unter den gewählten Bedingungen als Mediatoren des antioxidativen Effekts fungieren können. Bei Behandlung von Endothelzellen und gastralen Epithelzellen mit Bilirubin wurden konzentrationsabhängige antioxidative Effekte des HO-1-Metaboliten aufgezeigt. Im niedrigen mikromolaren Bereich reduzierte Bilirubin die Konzentration an ROS bei Stimulation der NADPH-Oxidase nahezu auf das Niveau un behandelter Kontrollzellen. Daher kommt Bilirubin im verwendeten Zellkulturmodell als Mediator antioxidativer Wirkungen in Frage. Die eingesetzten Konzentrationen lagen im oberen Bereich des Referenz-Intervalls für Bilirubin-Plasmaspiegel, der sich in Humanstudien als präventiver Faktor für die koronare Herzkrankheit zeigte (Mayer, 2000).

Darüber hinaus konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen indirekten antioxidativen Effekten von NO-NSAIDs und einer Induktion der HO-1 in Versuchen mit dem Hämoxygenase-Inhibitor Zinn-Protoporphyrin IX (SnPP) festgestellt werden. Eine



Vorbehandlung von Endothelzellen mit SnPP hob den antioxidativen Effekt einer 24stündigen Inkubation mit NO-Naproxen oder NO-ASS zu einem signifikanten Teil wieder auf. Dieses Ergebnis belegt eindeutig eine ursächliche Beteiligung des HO-1-Stoffwechsels an der antioxidativen Wirkung der NO-NSAIDs.

Die HO-1 kommt nicht nur als Mediator der protektiven Effekte der NO-NSAIDs in Frage. In einem Tiermodell für Arthritis bewirkte die Behandlung mit NO-Naproxen im Vergleich zu Naproxen eine stärkere Schmerzhemmung (Cicala et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie mit NO-ASS in einem Hyperalgesie-Modell (al-Swayeh et al., 2000). Die Mechanismen dafür sind bisher nicht geklärt. Interessanterweise entfaltete durch HO-1-Aktivität endogen gebildetes CO in einem Tiermodell für die Hypersensitivität von Nocizeptoren eine schmerzhemmende Wirkung (Steiner et al., 2001). In mit dem HO-1-Gen transfizierten Endothelzellen ging eine Stimulation des Enzyms mit einer Abnahme der COX-Aktivität und damit der Bildung Schmerzmediierender Prostaglandine einher (Haider et al., 2002).

Die Minderdurchblutung der Magenschleimhaut ist nicht nur ein initialer Schritt bei der NSAID-induzierten Schädigung. Sie tritt ebenfalls während des haemorrhagischen oder endotoxischen Schocks auf. Auch unter diesen Umständen konnte gezeigt werden, dass NO-NSAIDs eine protektive Wirkung besitzen (Wallace et al., 1995). Dies legte die Vermutung nahe, dass NO-NSAIDs in ischämischen Situationen auch kardioprotektive Wirkungen entfalten könnten. In der Tat bewirkte die Gabe von NO-NSAIDs in Tiermodellen für Ischämie und Reperfusion eine Reduktion der Myokard-Schädigung sowie der Infarktgröße. Diese Effekte waren NO-abhängig, unter ASS oder selektiven COX-Hemmern fiel die Schädigung des Herzmuskels schwerwiegender aus (Rossoni et al., 2002). NO-ASS und NO-Flurbiprofen reduzierten ferner die Restenoserate nach Ballondilatation oder perkutaner transluminaler Angioplastie (Maffia et al., 2002; Napoli et al., 2001). Als Mechanismus wird eine NO-abhängige Hemmung der Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur und der Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen postuliert. Interessanterweise war NO-ASS sowohl bei Gabe vor als auch nach der Angioplastie wirksam. Die beste Wirkung wurde durch eine Vorbehandlung über eine Woche erreicht (Napoli et al., 2001). Dies lässt vermuten, dass eine so genannte Präkonditionierung des Gewebes beteiligt ist. Bei diesem Phänomen kommt es durch bestimmte Agenzien zu einer Hochregulation defensiver Hitzeschockproteine. Die HO-1 (HSP32) und das HSP70 sind Hitzeschockproteine, die durch NO stimulierbar sind (Kim et al., 1997b; Polte et al., 2000). Die vermehrte Expression dieser Proteine verleiht dem Gewebe Widerstand (Foresti & Motterlini, 1999).

Eine Induktion der endothelialen HO-1 durch NO-NSAIDs, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, könnte diese klinischen Beobachtungen erklären. Im Tiermodell verbesserte eine Induktion der HO-1 durch Hämin 24 Stunden vor einer Ischämie die Myokard-Funktion und verringerte die Infarktgröße bei Reperfusion der isolierten Herzen. Auch exogen in nanomolaren Konzentrationen zugeführtes Bilirubin zeigte ähnliche kardioprotektive Wirkungen (Clark et al., 2000b). Die Herzen transgener Mäuse mit kardialer Überexprimierung der HO-1 waren *ex vivo* in Abhängigkeit von der HO-1-Konzentration vor oxidativer Schädigung durch Ischämie und Reperfusion geschützt. *In vivo* zeigte sich eine deutlich reduzierte Infarktgröße (Yet et al., 2001). Die Autoren postulieren einen Schutz des Herzens durch Induktion der HO-1. Damit könnte die stressfreie Induktion der HO-1 durch therapeutische Maßnahmen einen großen Stellenwert erlangen.

In einer Vielzahl von klinischen und experimentellen Studien zeigen sich folglich Übereinstimmungen zwischen dem Wirkprofil der NO-NSAIDs und den Effekten einer HO-1-Induktion. Diese Befunde belegen, dass Metabolite des HO-1-Stoffwechsels potenziell als Mediatoren von NO-NSAID-Effekten in Frage kommen.

Die HO-1 ist ein Stressprotein und wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Agenzien induziert. Die meisten besitzen die Eigenschaft direkt oder indirekt oxidativen Stress zu verursachen (Choi & Alam, 1996; Foresti & Motterlini, 1999).

Die HO-1-Induktion durch den spontanen NO-Donor SperminNONOat in Gefäßmuskelzellen ist von einer Sauerstoffradikal-Bildung abhängig, da das Antioxidanz NAC den Effekt inhibierte (Hartsfield et al., 1997). Die Effekte der NO-Donoren SNP, SIN-1 und SNAP hingegen wurden durch NAC nicht beeinflusst (Durante et al., 1997). Außerdem minderte NAC die HO-1-Induktion durch SNP auch nicht in HeLa-Zellen (Chen & Maines, 2000).

Daher stellte sich die Frage, ob die Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs auf einer vermehrten Bildung freier Sauerstoffradikale beruht. Auch das starke Oxidanz Peroxynitrit, das aus Reaktion von NO mit Superoxid entsteht, wurde als Induktor der HO-1 in Endothelzellen beschrieben. Foresti et al. zeigten eine Aufhebung der Peroxynitrit-induzierten HO-1-Proteinexpression durch NAC (Foresti et al., 1999).

Anhand einer Vorbehandlung der Endothelzellen mit NAC wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Aktivierung der Transkription des HO-1-Gens durch NO-NSAIDs weder durch Sauerstoffradikale noch durch Peroxynitrit stimuliert wird. Darüber hinaus beeinflusste eine Vorbehandlung der Zellen mit SOD die HO-1-Induktion nicht. Dies beweist zusätzlich die Unabhängigkeit des Effekts von einer Peroxynitrit-Bildung, da die SOD Superoxid-Radikale neutralisiert. Diese Ergebnisse belegen eine stressfreie und NO-abhängige Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs.

Eine Vielzahl von Studien beschäftigte sich bis heute mit der NO-abhängigen Induktion der HO-1 durch konventionelle NO-Donoren. Insbesondere der Signalweg zur Genaktivierung ist nach wie vor ungeklärt. Auch für die NO-NSAIDs stellte sich die Frage, welche Wege der Signaltransduktion in Frage kommen.

Lipton et al. demonstrierten die Freisetzung von freiem Häm aus Hämoproteinen durch NO (Lipton et al., 1993). Damit wäre eine Stimulierung der HO-1 über erhöhte Substratspiegel möglich. In Fibroblasten und HeLa-Zellen wurde eine Stabilisierung der HO-1-mRNA durch den langsam freisetzenden NO-Donor DETA/NO (Halbwertszeit bis zu 15 Stunden) gezeigt. Mit dem schnell freisetzenden NO-Donor SperminNONOat blieb dieser Effekt in HeLa-Zellen aus und war in Fibroblasten deutlich schwächer ausgeprägt (Bouton & Demple, 2000). Untersuchungen mit NO-NSAIDs und dem Transkriptions-Inhibitor Actinomycin D zeigten in den in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen hingegen keine Stabilisierung der mRNA bei Vorstimulierung der HO-1 mit Cadmium (ohne Abb.).

Der *second messenger* cGMP ist Hauptmediator der physiologischen Effekte von Stickstoffmonoxid. Auf Grundlage der starken cGMP-Stimulation durch NO-NSAIDs wurde untersucht, ob die HO-1-Induktion von cGMP als Mediator abhängig ist. Zunächst induzierte das lipophile, membrangängige cGMP-Analogon 8-Br-cGMP die Transkription der HO-1 weder in Endothelzellen noch in gastralen Epithelzellen. Da die Membrangängigkeit modifizierter cyclischer Nukleotide stark variieren kann, folgten weitere Untersuchungen (Schröder et al., 1990). Das Oxadiazolquinoxalin-Derivat ODQ ist ein selektiver Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase, der keine Effekte auf die membranständige Guanylatcyclase oder die Adenylatcyclase besitzt (Brunner et al., 1996). Andere Studien mit spontanen NO-Donoren belegen schon in niedrigeren Konzentrationen eine Hemmwirkung auf die HO-1-Proteininduktion (Polte et al., 2000). Die Genaktivierung der HO-1 durch NO-Naproxen wurde hingegen nicht gehemmt.

Signaltransduktionsprozesse durch cGMP werden in erster Linie durch Aktivierung von Proteinkinasen vermittelt. Um eine mögliche Beteiligung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G zu untersuchen, wurde der spezifische Inhibitor KT5823 verwendet (Durante et al., 1997; Immenschuh et al., 1998). Auch KT5823 inhibierte die NO-Naproxen-induzierte Genaktivierung der HO-1 nicht.

Die Experimente mit 8-Br-cGMP und den selektiven Inhibitoren der löslichen Guanylatcyclase sowie der Proteinkinase G belegen, dass cGMP an der Signaltransduktion nicht beteiligt ist. Vergleichbare Ergebnisse zeigten Studien in Gefäßmuskelzellen, Hepatozyten und Endothelzellen mit konventionellen NO-Donoren und cGMP-Analoga (Durante et al., 1997; Hartsfield et al., 1997; Kim et al., 1995; Motterlini et al., 1996a). Dies steht im Widerspruch zu anderen Studien, die eine Induktion des HO-1-Proteins über cGMP-abhängige Signalwege beschreiben (Immenschuh et al., 1998; Kiemer et al., 2003; Polte et al., 2002). Eine Erklärung dafür ist zunächst in der Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme zu suchen, deren Expressionsverhalten stark variieren kann (Hartsfield et al., 1999). Darüber hinaus wurden Substanzen verwendet, die NO spontan und in hohen Konzentrationen freisetzen. Außerdem wurden mit Protein- und mRNA-Analysen unterschiedliche Ebenen der Induktion betrachtet.

In den letzten Jahren zeigte eine Reihe von Studien, dass NO in verschiedenen Zellsystemen Bestandteile des MAP-Kinase-Signalweges aktiviert (Abb. 3). Die MAP-Kinasen bilden eine Familie von Proteinkinasen, die durch Wachstumsfaktoren, inflammatorische Cytokine und Stressfaktoren aktiviert wird (Arbabi & Maier, 2002; Davis, 1993; Widmann et al., 1999). Interessanterweise induziert eine Vielzahl der MAP-Kinase-aktivierenden Stimuli auch die HO-1 in den unterschiedlichsten Zelltypen. Es ist allgemein anerkannt, dass Mitglieder der MAP-Kinase-Familie in verschiedenen Zelltypen durch den gleichen Stimulus sowohl aktiviert als auch inhibiert werden können (Chen & Maines, 2000). NO aktivierte in Mesangial- und T-Zellen den JNK-Signalweg und die Phosphorylierung von c-Jun sowie den ERK-Signalweg (Callsen et al., 1998; Lander et al., 1996; Pfeilschifter & Huwiler, 1996). In Nierenepithelzellen stimulierte NO die Kinase JNK und in Makrophagen die Kinasen JNK und p38, nicht aber die Kinase ERK (Jun et al., 1999; Kim et al., 1997a). In Endothelzellen wurde eine Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, p38 und ERK mit spontanen NO-Donoren festgestellt (Buckley et al., 2003; Parenti et al., 1998; Pfeilschifter & Huwiler, 1996). Im Gegensatz dazu wurde in B-Lymphozyten eine inhibierende Wirkung von NO auf die MAP-Kinase JNK beschrieben (So et al., 1998).

Die MAP-Kinasen werden auch als möglicher Signaltransduktionsweg für eine Induktion der HO-1 diskutiert. Eine Vielzahl von Studien belegt die Beteiligung an der HO-1-Induktion vor allem durch Stressfaktoren in verschiedenen Zellsystemen (Alam et al., 2000; Elbirt et al., 1998).

Insbesondere in Endothelzellen war die HO-1-Induktion durch Reoxygenierung nach Anoxie von der Aktivität der Kinasen JNK, p38 und ERK abhängig (Zhang et al., 2002). Außerdem induzierte das kardiovaskuläre Hormon ANP die HO-1 über JNK- und ERK-abhängige Signalwege (Kiemer et al., 2003).

Ein direkter Zusammenhang zwischen der NO-abhängigen Induktion der HO-1 und der Aktivität von MAP-Kinasen in Endothelzellen konnte von Buckley et al. gezeigt werden. Die Induktion der HO-1-Proteinexpression durch SperminNONOat wurde durch spezifische Inhibitoren der MAP-Kinasen p38 und ERK konzentrationsabhängig gehemmt (Buckley et al., 2003). Chen und Maines zeigten in HeLa-Zellen eine Beteiligung der Kinasen p38 und ERK, nicht aber JNK an der Induktion der HO-1-mRNA durch spontane NO-Donoren (Chen & Maines, 2000).

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass MAP-Kinasen in die Genregulation der HO-1 durch NO-NSAIDs involviert sind. Untersuchungen mit spezifischen, zellpermeablen Inhibitoren der Kinasen JNK, p38 und ERK ergaben, dass die HO-1-Induktion durch NO-ASS mit allen drei Inhibitoren signifikant gehemmt wurde. Eine fast vollständige Aufhebung des Effektes war mit den Inhibitoren des JNK- und p38-Signalweges zu erreichen.

Ein spezifischer Inhibitor der MAP-Kinase p38 ist das Pyridinylimidazol-Derivat SB203580. Die katalytische Aktivität der Kinase wird durch kompetitive Bindung von SB203580 an die ATP-Bindungsstelle gehemmt (Lee et al., 1999). Die MAP-Kinase p38 ist Teil des Signalweges, der überwiegend durch inflammatorische Cytokine und Stressfaktoren induziert wird. Durch Phosphorylierung aktiviert p38 Transkriptionsfaktoren und regulatorische Proteine, die im Entzündungsgeschehen, bei der Apoptose sowie bei Zellproliferation und Entwicklung eine Rolle spielen. Der gleiche Signaltransduktionsweg führt auch zur Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK). Diese Serin/Threonin-Proteinkinase wird auch als Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) bezeichnet. Sie wird unter anderem durch inflammatorische Cytokine, Endotoxine, UV-Licht und Hypoxie induziert. JNK phosphoryliert das Protein c-Jun, welches als Bestandteil dimerischer Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielt. Das Anthrapyrazolon-Derivat SP600125 ist ein spezifischer, ATP-kompetitiver Inhibitor für JNK. SP600125 hemmt im Zellkulturmodell dosisabhängig die Phosphorylierung von c-Jun (Bennett et al., 2001).

In Endothelzellen wurde der Einfluss beider Inhibitoren auf die HO-1-Induktion durch NO-ASS untersucht. SB203580 hob die dosisabhängige Induktion durch NO-ASS weitgehend auf. Im Durchschnitt lag die Hemmung bei etwa 80%. SP600125 zeigte mit etwa 90% eine noch stärkere Hemmung der HO-1-Induktion durch NO-ASS.

Die MAP-Kinase ERK wird überwiegend durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Auch für diese Kinase wurde mit PD098059 ein spezifischer Inhibitor verwendet. Im Unterschied zu den beiden anderen MAP-Kinase-Inhibitoren beeinflusst PD098059 nicht die Kinase ERK selbst. Vielmehr hemmt PD098059 spezifisch die MAP-Kinase-Kinase, welche ERK phosphoryliert und aktiviert. Die Hemmung ist nicht kompetitiv, PD098059 interferiert weder mit ATP noch mit der Substratbindung (Alessi et al., 1995). Der ERK-Inhibitor zeigte ebenfalls eine signifikante Wirkung auf die HO-1-Induktion durch NO-ASS in Endothelzellen. Mit einer etwa 40%igen Hemmung war der Effekt aber nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den Inhibitoren der Stress- und Cytokin-aktivierten Signaltransduktionswege. Damit scheint dieser Signalweg eine den Kinasen JNK und p38 untergeordnete Rolle zu spielen.

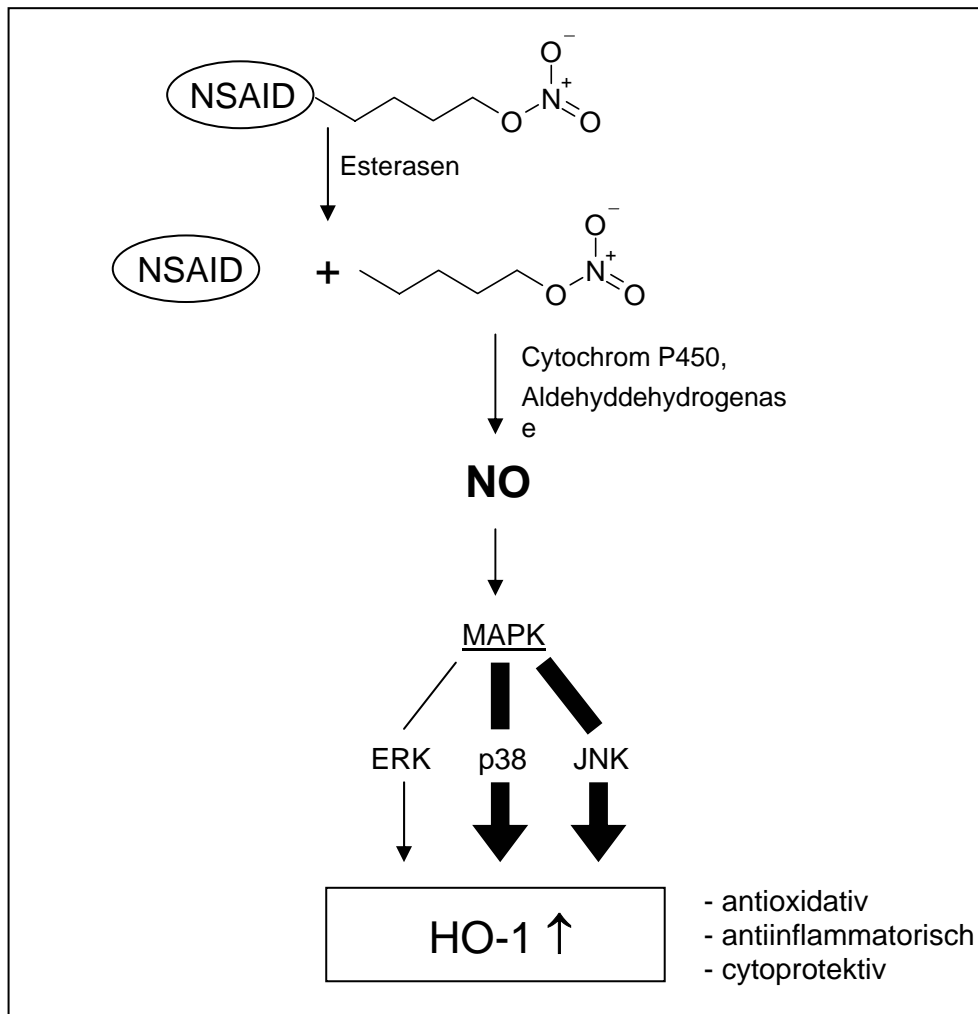


Abb. 36: Induktion der HO-1 durch NO-NSAIDs

Die Untersuchungen mit dem Translationsblocker Cycloheximid gaben einen Hinweis darauf, dass die Genaktivierung der HO-1 durch NO-NSAIDs nicht durch direkte Interaktion von NO mit der DNA induziert wird. Die nahezu vollständige Aufhebung des Effekts von NO-ASS demonstriert, dass eine innerhalb kurzer Zeit stimulierbare De-novo-Synthese von Proteinen erforderlich ist.

Als Proteine, die die Aktivierung der Transkription des HO-1-Gens regulieren, wurden in den letzten Jahren vor allem die Transkriptionsfaktoren AP-1 und Nrf2 diskutiert (Alam et al., 2003; Buckley et al., 2003; Lee et al., 2000). Darüber hinaus wurden in der Promotorregion des HO-1-Gens verschiedener Spezies unter anderem Bindungsstellen für AP-2, NF $\kappa$ B sowie Interleukin- und Prostaglandin-Derivate gefunden (Choi & Alam, 1996; Koizumi et al., 1995; Lavrovsky et al., 1994).

Die starken Effekte des JNK-Inhibitors deuten auf eine Beteiligung von c-Jun an der Genaktivierung durch NO-NSAIDs hin. Dieses Protein kann sowohl als Bestandteil von AP-1-Dimeren als auch durch Dimerisierung mit Nrf2 mit *Antioxidant-Responsive-Elements* in der Promotorregion des HO-1-Gens interagieren (Alam et al., 1999; He et al., 2001).

In humanen Endothelzellen führte die pharmakologische Hemmung der AP-1-Aktivität zu einer verminderten HO-1-Induktion durch Cytokine und ANP (Kiemer et al., 2003;

Terry et al., 1998). In Hepatomzellen verhinderten dominant-negative Mutanten von c-Jun die Aktivierung des HO-1-Promotors durch Arsenit (Elbirt et al., 1998).

In verschiedenen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass Nrf2 eine Induktion der HO-1 vermittelte (Alam et al., 1999; Alam et al., 2000; He et al., 2001; Ishii et al., 2000). Interessant ist dabei auch, dass Häm als natürliches Substrat der HO-1 deren Induktion in Nierenepithelzellen durch Stabilisierung des Nrf2-Proteins aktivierte (Alam et al., 2003).

Erst kürzlich zeigten Buckley et al. in Endothelzellen, dass der NO-Donor SperminNONOat in Abhängigkeit von den MAP-Kinasen p38 und ERK sowohl die Translokation von Nrf2 in den Zellkern als auch die HO-1-Proteinexpression induzierte. Eine Beteiligung der Kinase JNK wurde nicht untersucht (Buckley et al., 2003).

Da NO-NSAIDs im Gegensatz zu konventionellen NO-Donoren für genregulatorische Studien aufgrund des dualen Wirkprinzips eher ungeeignet sind, wurden diese Effekte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die Hemmversuche mit den MAP-Kinase-Inhibitoren und Cycloheximid in Endothelzellen lassen aber eine weitreichende Übereinstimmung mit den Studien zur Genaktivierung der HO-1 durch Nrf2 und AP-1-Elemente im gleichen Zelltyp erkennen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass NO-NSAIDs Stickstoffmonoxid intrazellulär freisetzen. Dadurch kommt es zur Aktivierung NO-sensitiver Strukturen wie der löslichen Guanylatcyclase. Über die Bildung des *second messengers* cGMP werden eine Vielzahl der beschriebenen Wirkungen der NO-NSAIDs vermittelt.

Darüber hinaus wurde erstmalig belegt, dass NO-NSAIDs über NO-abhängige Prozesse die HO-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in Endothelzellen und gastralen Epithelzellen induzieren. Diese Effekte werden weder über cGMP noch durch Bildung von ROS oder Peroxynitrit mediiert. Vielmehr konnte eine Abhängigkeit von den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen p38, JNK und ERK gezeigt werden.

Darüber hinaus zeigten NO-NSAIDs in einem Zellkulturmodell für oxidativen Stress direkte und indirekte antioxidative Wirkungen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen den indirekten antioxidativen Effekten und der Induktion der HO-1 konnte ebenfalls belegt werden.

Diese Ergebnisse charakterisieren die NO-NSAIDs als potente Induktoren antioxidativer und antiinflammatorischer Stoffwechselwege. Die Induktion der HO-1 ist ein neuartiger Wirkmechanismus, der ursächlich an protektiven Effekten von NO-NSAIDs in der Magenschleimhaut, der Niere und im kardiovaskulären System beteiligt sein könnte.