

Aus dem  
CharitéCentrum für Chirurgische Medizin  
Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie CCM  
Direktor: Professor Dr. med. Joachim M. Müller

## **Habilitationsschrift**

# **Abbau und Inhibition der Cyclooxygenase: eine Analyse aus Grundlagenforschung, Tierexperiment und Klinik**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Heiko Neuß  
geboren am 18.04.1972 in Flensburg

Eingereicht: Februar 2011  
Dekanin: Professor Dr. med. A. Grütters-Kieslich  
1. Gutachter: Professor Dr. med. E. Neugebauer, Witten/Herdecke  
2. Gutachter: Professor Dr. med. Dr. h.c. W. Hohenberger, Erlangen

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Eigene Arbeiten</b> .....	<b>9</b>
2.1. Die Regulation des COX-2 Proteinabbaus und der Einfluss durch Coxibe.....	9
2.2. Kolonanastomosenheilung unter COX Inhibition im Kaninchenmodell.....	10
2.3. Chirurgische Komplikationen und Schmerzen nach inguinaler/iliakaler LND.....	21
2.4. Chirurgische Komplikationen und Schmerzen nach axillärer LND.....	29
2.5. Parecoxib als präemptives Analgetikum reduziert Schmerzen nach RALND.....	35
<b>3. Diskussion</b> .....	<b>50</b>
3.1. Die COX.....	50
3.2. Die COX in der Grundlagenforschung.....	52
3.3. Die COX im Tierexperiment und in der Klinik.....	54
3.4. Ausblick.....	60
<b>4. Zusammenfassung</b> .....	<b>61</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
<b>6. Danksagung</b> .....	<b>72</b>
<b>Erklärung</b> .....	<b>73</b>

## Abkürzungen

APC	Adenoma prevention with Celecoxib (Studie; Adenom Vorsorge mit Celecoxib)
APPROV	Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx (Studie; Adenom Vorbeugung mit Vioxx)
ASS	Acetylsalicylsäure
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
CD31	Platelet/endothelial cell adhesion molecule (Plättchen/Endothelzellen adhäsions Molekül)
COX	Cyclooxygenase (Isoformen: COX-1, COX-2 und COX-3)
CRL	Cullin-RING Ligasen
CSN	COP9 Signalosom
Cul	Cullin (Cul 1, 2, 3, 4A, 4B, 5 und 7)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FGF	Fibroblastärer Wachstumsfaktor
HeLa	Henrietta Lacks, Zelllinie humaner Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
LND	Lymphonodektomie
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PDGF	Platelet-derived growth factor (Plättchen assozierter Wachstumsfaktor)
PolyUb	Polyubiquitinketten
PONV	Postoperative Nausea and Vomiting (Postoperative Übelkeit und Erbrechen)
PG	Prostaglandin (PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , PGH <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub> )
RALND	Radikale axilläre Lymphonodektomie
RAS	Rat sarcoma, Proto-Onkogen RAS
RILND	Radikale inguinal/iliakale Lymphonodektomie
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
VAS	Visuelle analoge Schmerzskala
VEGF	Vaskulärer epidermaler Wachstumsfaktor
VIGOR	Vioxx gastrointestinal outcomes research (Studie; Vioxx gastrointestinal Outcome Untersuchung)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

## 1. Einleitung

Die Cyclooxygenase (COX) ist ein membranständiges, intrazelluläres Enzym, welches den Arachidonsäureabbau zu Prostaglandin  $H_2$  ( $PGH_2$ ) katalysiert. Im Wesentlichen scheinen zwei Isoformen der COX relevant, die COX-1 und die COX-2. Es handelt sich um globuläre Proteine mit nahezu identischen aktiven Zentren, lokalisiert an der Innenseite mikrosomaler Membranen, im Inneren des endoplasmatischen Retikulums, innerhalb der Kernhülle und des Golgiapparats<sup>1</sup>. Die dreidimensionale Struktur zeigt, dass beide Enzyme einen engen Kanal bilden, wobei der relevante Unterschied der Isoformen (COX-1 und COX-2) im Austausch der Aminosäure an Position 523 ist. In der COX-1 findet sich hier Isoleucin und in der COX-2 das kleinere Valin, wodurch ein Zugang zu einer hydrophoben Seitentasche verbleibt, welche verantwortlich für die Selektivität der COX-2 ist<sup>2</sup>.

Die konstitutive COX-1 kommt nahezu ubiquitär in allen menschlichen Zellen vor. Ihre resultierenden Eicosanoide haben überwiegend physiologische und protektive Funktionen (housekeeping Funktionen). Sie schützen beispielsweise die Magenmukosa, regulieren die Nierendurchblutung, und beeinflussen die Plättchenaggregation im Rahmen der Blutstillung<sup>3,4</sup>. Die COX-2 hingegen ist die induzierbare Isoform, welche erst im entzündeten Gewebe oder in Tumorzellen gebildet und aktiv wird<sup>1,4</sup>. Ihre Induktion erfolgt durch proinflammatorische Zytokine (Tumornekrosefaktor ( $TNF\alpha$ ); Interleukin  $1\alpha$  und  $1\beta$ ) und mitogene Stimuli (epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), vaskulärer epidermaler Wachstumsfaktor (VEGF), fibroblastärer Wachstumsfaktor (FGF))<sup>5</sup>. Ebenso führen Mutationen im Proto-Onkogen RAS (Rat sarcoma) und im Wnt-Signaltransduktionsweg zur Überexpression der COX-2<sup>6</sup>.

Durch die beschriebenen Stimuli wird zunächst Arachidonsäure, durch die Phospholipase  $A_2$ , aus Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt. Die Arachidonsäure wird in den Kanal der COX aufgenommen und zu  $PGG_2$  oxidiert, um anschließend in  $PGH_2$  konvertiert zu werden. Zellspezifische Isomerasen katalysieren im Weiteren die abhängigen Eicosanoide, das  $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ , Prostacyclin  $I_2$  ( $PGI_2$ ) und Thromboxan  $A_2$  ( $TxA_2$ )<sup>7</sup>. Prostaglandine sind Entzündungsmediatoren, die nach akuten oder chirurgischen Traumata sowie in chronischen Erkrankungen, wie der Arthritis, Entzündungen der Haut oder auch dem Asthma bronchiale vermehrt gebildet werden<sup>8-10</sup>.

Die COX ist ein zentrales Enzym in der Genese von Schmerzen, Entzündungen und in der Kanzerogenese. Hierbei ist die COX-2 von besonderem Interesse, da sie in traumatisiertem Gewebe, sowie in Tumorzellen induziert wird, wohingegen die COX-1 sowohl in der Tumorentstehung, im Tumorprogress, als auch in der Schmerzinduktion und Inflammation eine untergeordnete Rolle spielt. In der Niere kommt die COX-2 konstitutiv in der Makula densa vor und bedingt die Produktion von Prostacyclinen, welche wiederum die Reninbildung aktivieren, und so auf den Blutdruck wirken. Zudem findet sich die COX-2 im Rückenmark und nimmt hier auch zentral an der Schmerzregulation teil<sup>3, 4, 11-13</sup>. Somit sind die Cyclooxygenasen und deren Hemmung von besonderem klinischem Interesse.

Analysen von Kopf-Hals Tumoren zeigen eine direkte Korrelation zwischen einer erhöhten COX-2 Expression und einer vermehrten Lymphknotenmetastasierung sowie einer gesteigerten Tumolvaskularisation. Die Neovaskularisation im Tumorgewebe korreliert wiederum mit einem erhöhten PGE<sub>2</sub> Level und der VEGF Expression<sup>14, 15</sup>. In Karzinomen des Magens konnte ebenso eine erhöhte PGE<sub>2</sub> Konzentration in Korrelation zur Invasivität des Primarius, zur Lymphknotenmetastasierung und zu einem erhöhtem VEGF Level aufgezeigt werden<sup>16, 17</sup>.

Im Zentrum der chirurgischen Therapie steht neben der Behandlung der Grunderkrankung ein optimierter perioperativer Behandlungsablauf. Ziel muss die Reduktion von allgemeinen und chirurgischen Komplikationen sein, welche zu einer optimierten *restitutio ad integrum* führen. Postoperativ leiden bis zu 80% der Patienten unter mittelstarken bis starken Schmerzen, welche die Gefahr postoperativer Komplikationen erhöhen. Das operative Trauma führt als Folge der Gewebsverletzung zu akuten Schmerzen und ist in der Regel von einer lokalen Entzündungsreaktion begleitet<sup>18-20</sup>. Durch eine multimodale Therapie, kann der perioperative Verlauf beeinflusst und somit die Rate an Komplikationen reduziert werden. Hierbei nimmt die Schmerztherapie einen besonderen Stellenwert ein<sup>21-23</sup>.

Eines der zuerst eingesetzten COX-Inhibitoren, jedoch mit überwiegendem Einfluss auf die COX-1, war das Aspirin® (Acetylsalicylsäure, ASS) mit analgetischer, antiphlogistischer und antithrombotischer Wirkung. Das Verständnis, dass die COX das zentrale Enzym in der PG-Synthese darstellt, gab die Erklärung für die pharmakologische Wirkung der Acetylsalicylsäure und somit deren Angriffspunkt in der Therapie, jedoch ebenso für ihre Nebenwirkungen.

Die traditionellen nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) fungieren als kompetitive Inhibitoren beider Isoformen<sup>2, 24</sup>. Sie blockieren den Kanal der COX und besetzen reversibel die

Bindungsstelle der Arachidonsäure innerhalb der COX, so dass der enzymatische Abbau zu den Eicosanoiden nicht stattfindet<sup>9, 10</sup>. NSAR finden vor allem einen breiten klinischen Einsatz in der chronischen und akuten Schmerztherapie. Leitliniengerecht wird die Therapie akuter und chronischer Schmerzen entsprechend des Stufenschemas der Weltgesundheitsorganisation (WHO; 1986) durchgeführt. Die NSAR sind das Fundament eines balancierten Analgesieregimes, wobei gastrointestinale Nebenwirkungen und ein erhöhtes postoperatives Blutungsrisiko auch hier vermehrt auftreten<sup>18-20, 25, 26</sup>. Gerade die Gastrototoxizität und das erhöhte Blutungsrisiko, ausgelöst durch die irreversible Hemmung des Thromboxans der Thrombozyten, machen es notwendig, sicherere COX-Inhibitoren zu finden um sie gerade auch in der perioperativen Medizin einsetzen zu können<sup>2</sup>. Mit der selektiven Inhibition der COX-2 sollten die spezifischen Nebenwirkungen, hervorgerufen durch die COX-1 Inhibition, reduziert werden. Somit kamen Ende der 90er Jahre die selektiven COX-2 Inhibitoren (Coxibe) auf den Markt. Im Vergleich zwischen den traditionellen NSAR und den Coxiben konnte eine Reduktion postoperativer Blutungskomplikationen und eine Reduktion neu aufgetretener peptischer Magengeschwüre im Rahmen der Therapie mit Coxiben aufgezeigt werden<sup>27, 28</sup>. Nachdem ein möglicher Anstieg kardiovaskulärer Komplikationen unter Langzeittherapien mit Coxiben auffiel, waren Analysen großer Multizenterstudien notwendig, wie der APPROV (Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx) und der APC (Adenoma prevention with Celecoxib) Studie, um die Evidenz der Komplikationen, durch die selektive COX-2 Hemmung, zu verbessern<sup>29, 30</sup>. Infolge dieser Analysen wurde Rofecoxib (Vioxx) international vom Markt genommen.

Es konnten jedoch nicht im Rahmen aller Studien eine direkte Assoziation zwischen Coxiben und einer erhöhten kardiovaskulären Komplikationsrate aufgezeigt werden. Neben der Wahl des Coxibs scheint die Dosierung des selektiven COX-2 Hemmers und das individuelle Risikoprofil des Patienten die entscheidenden Einflusskriterien zu sein<sup>31, 32</sup>. Dies führte zu der weiterhin kontrovers geführten Diskussion über das Sicherheitsprofil der selektiven COX-2 Hemmer in der Schmerztherapie und Entzündungshemmung und legt eine kritische Indikationsstellung der Coxibe nahe. Somit spielt das individuelle Risikoprofil der Patienten, bei der Wahl für einen selektiven COX-2 Inhibitor in der Analgesie- bzw. entzündungshemmenden Therapie, eine entscheidende Rolle<sup>33, 34</sup>.

Die abhängigen PG aus dem enzymatischen Abbau der Arachidonsäure durch das COX Enzym beeinflussen nicht nur die Genese einer Entzündung und somit die lokale Schmerzentstehung, sie haben zudem Einfluss auf die Angiogenese, die Wundheilung, die Apoptose und die

Karzinogenese<sup>1, 2, 4, 11</sup>. Die Evidenz des Einflusses der COX in der Kanzerogenese, resultiert aus großen epidemiologischen Untersuchungen, die zeigen konnten, dass antiinflammatorische Medikamente, wie NSAR, die Inzidenz und den Progress menschlicher Karzinome bis zu 50 % reduzieren können<sup>35-39</sup>.

Die Neoangiogenese spielt eine Schlüsselrolle in der Kanzerogenese. Die Induktion oder Inhibition der Angiogenese wird über verschiedene Signalwege reguliert. Das Wachstum solider Tumore ist abhängig von der Entstehung neuer Blutgefäße, welche unter anderem den Transport der Nährstoffe gewährleisten. Zudem zeigen Daten eine Korrelation der Neovaskularisation in soliden Tumoren und der Genese von Fernmetastasen<sup>16, 17, 40</sup>.

PGE<sub>2</sub>, synthetisiert aus dem enzymatischen Abbau der Arachidonsäure über die COX, fungiert als Mediator einer Entzündungsreaktion sowie als Modulator von Fibroblasten. Die Freisetzung von PGE<sub>2</sub> im Bereich einer Wunde der Haut oder des Gastrointestinaltraktes bewirkt eine lokale Inflammation und fördert ein lokales Ödem, triggert die lokale Entzündung und bewirkt eine Hyperalgesie<sup>41, 42</sup>. Der reguläre inflammatorische Prozess hat direkte Effekte auf die physiologischen und pathologischen Prozesse im Ablauf der Wundheilung.

Die Wundheilung verläuft prinzipiell in drei überlappenden Phasen. Die initiale Phase, die Inflammations- oder Exsudationsphase, gefolgt von der Granulations- und der Regenerationsphase. Das Resultat dieses Reparaturprozesses ist Narbengewebe, eine Überproduktion von Kollagen, welches den Gewebedefekt überbrückt oder ausfüllt und somit zur Ausheilung bringt. Das Narbengewebe selbst hat, verglichen mit intaktem, ursprünglichem Gewebe, eine reduzierte Festigkeit bis maximal 70%<sup>43, 44</sup>. Schon in der frühen Phase der Wundheilung kommt es zur Induktion der COX-2. Das initiale Trauma mit dem Entzündungsreiz bewirkt, durch die Induktion der Phospholipase, eine Freisetzung der Arachidonsäure aus der Zellmembran. Beides führt zu einem Anstieg der abhängigen Eicosanoide, vor allem des PGE<sub>2</sub>, aus dem enzymatischen, COX abhängigen Abbau der Arachidonsäure. Eine veränderte Wundheilung und eine Veränderung im Ablauf der Inflammation durch den Einfluss einer COX-Inhibition, reduziert die Festigkeit einer Narbe potentiell weiter oder kann zu einer Wundheilungsstörung führen<sup>45</sup>.

Trotz eines relativ breiten klinischen Einsatzes gibt es über den Ablauf der Proteolyse der COX-2 nur wenige Daten<sup>46</sup>. Es wurde bereits gezeigt, dass die COX-2 über das Ubiquitin (Ub)-Proteasom System (UPS) abgebaut wird. Vor dem Proteasom-abhängigen Abbau wird die COX-2 ubiquitiniert<sup>46</sup>. Der Ub-abhängige Proteinabbau über das Signalosom regulierte UPS stellt das

wichtigste proteolytische System in eukaryotischen Zellen dar<sup>47</sup>. Hierbei nimmt das Signalosom eine Schlüsselfunktion als Schaltstelle zwischen Signaltransduktion und Proteolyse ein<sup>48,49</sup>.

Mit der vorliegenden Arbeit soll die COX weiter analysiert und der klinische Einsatz überprüft werden. Aus der Sicht eines Chirurgen, sind die Schmerztherapie und eine mögliche Tumorthherapie im Zusammenhang mit einer COX-Hemmung von besonderer Relevanz. Hier interessiert neben der Effektivität der Therapie insbesondere das Nebenwirkungsspektrum, wobei chirurgische Komplikationen, wie Wundheilungsstörungen oder auch Anastomoseninsuffizienzen insbesondere analysiert werden müssen.

Die Struktur, die Funktion oder auch die Auswirkungen der Inhibition des Enzyms sind in zahlreichen Studien beschrieben<sup>1,4</sup>. Über den Abbau des Proteins ist jedoch nur wenig bekannt, so dass wir uns zunächst mit der Stabilität der COX-2 beschäftigt und dies molekularbiologisch untersucht haben. Ergänzend sollte ein möglicher Einfluss von Coxiben auf die Proteolyse des Enzyms analysiert werden. In einem Tierexperiment über Wund- bzw. Anastomosenheilung am Dickdarm, haben wir uns den möglichen Komplikationen im klinischen bzw. chirurgischen Einsatz der COX Hemmung gewidmet. In der Versuchsplanung galt es, die Isoformen und deren gezielte, selektive Hemmung zu berücksichtigen. Auf dieser Basis wurde ein Coxib (Parecoxib), ein unspezifischer COX Inhibitor (Metamizol) und ein selektiver COX-1 Inhibitor (Resveratrol) analysiert. Die Verumgruppen wurde mittels einer Placebogruppe kontrolliert. Weiterführend war das klinische Ziel im Rahmen standardisierter Operationen mit einem festgelegtem perioperativem Ablauf, der radikalen inguinalen/iliakalen und axillären Lymphonodektomie (LND), eine Analyse über den peripoperativen Einfluss der COX Inhibitoren zu erreichen. Es sollte zunächst die Effektivität der Analgesie überprüft werden. Weiterführend galt es die Komplikationen dieser Eingriffe, welche nachweislich eine hohe Morbidität aufweisen, zu verifizieren. Bei Eingriffen mit einer hohen Komplikationsrate, galt es herauszustellen, ob diese Einfluss auf die Effektivität der Analgesie haben. Aus den Ergebnissen resultierend haben wir eine prospektiv randomisierte, doppelt verblindete Studie zum Einfluss einer präemptiven Analgesie auf den postoperativen Verlauf nach axillärer LND angeschlossen. Neben einer standardisierten Schmerztherapie sollte ein erweiterter Einsatzbereich der Analgesie durch die präemptive Applikation geprüft und kontrolliert werden. Unter der präoperativ begonnene COX-2 Inhibition, sollte ein Anstieg der Morbidität ausgeschlossen werden.

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1. Die Regulation des COX-2 Proteinabbaus und der Einfluss durch Coxibe

Die COX-2 Enzyme werden in Entzündungszellen und neoplastischen Zellen exprimiert. Produkte des katalysierten Arachidonsäureabbaus unterhalten Entzündungen, nehmen Einfluss auf Schmerzen und bewirken eine Neoangiogenese in Tumoren sowie im Rahmen der Wundheilung, so dass die spezifische Inhibition oder auch der Abbau des Enzyms von besonderem klinischem Interesse ist. Es wurde bereits gezeigt, dass die COX-2 über das UPS abgebaut wird. Die Regulation der Ubiquitinierung war jedoch unklar. Ein wichtiger Regulator im Abbau von Proteinen ist das COP9 Signalosom (CSN). Mit dieser Studie wurde der Einfluss des CSN auf den COX-2 Abbau untersucht und analysiert inwieweit Coxibe die Proteolyse der COX-2 beeinflussen.

Wir konnten zeigen dass Curcumin, ein Inhibitor CSN assoziierter Kinasen, den Proteasom-abhängigen Abbau der COX-2 in HeLa Zellen (Zelllinie humaner Epithelzellen eines Zervixkarzinoms – Patientin **Henrietta Lacks**) und Zellysaten beschleunigt, woraus sich eine Funktion des CSN im Abbau der COX-2 ableiten lässt. Mittels eines Glycerolgradienten und einer Immunopräzipitation konnte eine direkte Interaktion der COX-2 mit dem CSN aufgezeigt werden. Die COX-2 ist assoziiert mit einem Molekülkomplex aus dem CSN, Cullin-RING Ub Ligasen und dem 26S Proteasom. Pulldown Experimente mit Flag-COX-2 zeigten zudem, dass Cullin (Cul) 1 und Cul 4 an dem Proteinkomplex beteiligt sind. Cul 1 und 4 sind Bestandteil von Ub Ligasen, welche damit für die Ubiquitinierung der COX-2 verantwortlich sein könnten.

Eine Behandlung der HeLa Zellen mit den selektiven COX-2 Inhibitoren Parecoxib und Valdecoxib führten zu einem beschleunigten COX-2 Abbau, wobei zugleich ein Anstieg an COX-2-Ub zu verzeichnen war. Wir haben daraus geschlossen, dass Parecoxib/Valdecoxib spezifisch mit der COX-2 interagieren, so dass eine Konformation der COX-2 resultiert, welche ubiquitiniert und damit abgebaut wird. Für Celecoxib und Rofecoxib ließ sich dies nicht nachweisen.

Schlussfolgerung: Die COX-2 wird proteasomal abgebaut, wobei das CSN über Cul 1 und 4-Ub Ligasen auf die Ubiquitinierung von COX-2 Einfluss nimmt. Parecoxib/Valdecoxib kann scheinbar eine Konformation der COX-2 herbeiführen, welche einen beschleunigten Ub-abhängigen Abbau ermöglicht.

The ubiquitin- and proteasome-dependent degradation of COX-2 is regulated by the COP9 signalosome and differentially influenced by coxibs.

Heiko Neuss, Xiaohua Huang, Bettina K. J. Hetfeld, Rupal Deva, Petra Henklein, Santosh Nigam, Julian W. Mall, Wolfgang Schwenk, Wolfgang Dubiel

J Mol Med 2007; **85**(9): 961-70.



















## 2.2. Kolonanastomosenheilung unter COX Inhibition im Kaninchenmodell

Aufgrund des breiten Einflusses der COX, speziell der COX-2, in der Inflammation und der Neoangiogenese, sind die unmittelbaren Folgen und die Komplikationen durch eine spezifische oder unspezifische Inhibition der Isoformen, zu analysieren. Hier interessierte uns insbesondere der Einfluss auf die Heilung der Darmnaht. Es wurde untersucht, ob vermehrt Majorkomplikationen, wie eine primäre Insuffizienz der Darmnaht, eine Reduktionen der mechanischen Festigkeit der Anastomose oder ein Einfluss auf die Kapillardichte im Anastomosengebiet durch die Inhibition der COX resultiert. Wir etablierten eine tierexperimentelle Studie am Kaninchenmodell, um die Folgen der COX-Inhibition, mit besonderem Fokus auf die Coxibe, zu untersuchen. Hierzu wurden 80 „New Zealand White“ Kaninchen prospektiv in 4 Gruppen randomisiert, bevor eine Kolonsegmentresektion mit anschließender Anlage einer End-zu End Anastomose vorgenommen wurde. Gruppe 1 (n=20) wurde mit Valdecoxib behandelt, Gruppe 2 mit Metamizol, Gruppe 3 mit Resveratrol, einem COX-1 Inhibitor, und Gruppe 4 mit einem Placebo. Die Anastomosenheilung wurde am 7. postoperativen Tag makroskopisch evaluiert und anschließend eine Berstungsdruckmessung *in vitro*, nach Resektion des anastomosentragenden Darmabschnittes, durchgeführt. Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Färbung der Anastomose zur Identifikation der Neovaskularisation mit einem polyklonalen Antikörper (CD31) angeschlossen, und die Kapillardichte ausgezählt. Im Ergebnis ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Verumgruppen und der Plazebogruppe. Wir folgerten, dass die Anastomosenheilung im Kolon durch eine spezifische oder unspezifische COX-Hemmung im frühen postoperativen Verlauf, entsprechend unserer Versuchsbedingungen, nicht beeinflusst wird.

Effects of cyclooxygenase inhibition on anastomotic healing following large bowel resection in a rabbit model – a randomized, blinded, placebo-controlled trial.

Heiko Neuss, Wieland Raue, Verena Müller, Wilko Weichert, Wolfgang Schwenk, Julian W. Mall

Int J Colorectal Dis 2009; **24**(5): 551-7.













### 2.3. Chirurgische Komplikationen und Schmerzen nach inguinaler/iliakaler LND

Eines der relevanten chirurgischen Einsatzgebiete der COX-Inhibitoren ist die perioperative Schmerztherapie. Im Rahmen des WHO Stufenschemas sind peripher wirksame Analgetika zentraler Bestandteil der systemischen Analgesie. Hier sind die NSAR eines der Hauptvertreter. Zunächst galt es durch eine standardisierte Operation, ein reproduzierbares klinisches Modell zu etablieren, um unsere standardisierte Schmerztherapie und die postoperativen Komplikationen zu evaluieren.

Zwischen 2003 bis 2007 wurden sämtliche chirurgische Patienten unserer Klinik, mit der Indikation für eine radikale inguinale/iliakale Lymphonodektomie (RILND) (n = 103), in einer prospektiven Datenbank, zur Analyse des postoperativen Verlaufes, erfasst. Von 85 (83%) dieser Patienten wurde die Qualität der perioperativen Schmerztherapie mittels einer visuellen analogen Schmerzskala (VAS (0 mm = kein Schmerz; 100 mm = maximaler Schmerz)) bis zum dritten Tag erhoben. Hierbei zeigte sich, dass unsere multimodale Schmerztherapie zu einer suffizienten Analgesie in Ruhe ausreichte (VAS: Median = 20 mm), unter Mobilisation und Provokation (Husten) jedoch nicht (VAS: Median = 50 mm). Die RILND ist ein Eingriff mit einer hohen postoperativen Komplikationsrate (n = 71 (84%) Patienten), so dass diesen Patienten ein besonderes Augenmerk gilt. Wir konnten zeigen, dass diese Patienten signifikant mehr Schmerzen hatten, als Patienten mit einem unauffälligen postoperativen Verlauf ( $p = 0.047$ ). Die Schmerztherapie im Rahmen der RILND muss daher die hohe Komplikationsrate im Rahmen dieses Eingriffes berücksichtigen und die perioperative Analgesie entsprechend ausrichten. Die gewählte Schmerztherapie darf die Komplikationsrate nicht erhöhen, wobei insbesondere Coxibe eine suffiziente Ergänzung sein könnten.

Influence of Surgical Complications on the Level of Pain after Radical Inguinal/Iliacal Lymph Node Dissection.

Heiko Neuss, Christian Reetz, Wieland Raue, Gerold Koplín, Julian W. Mall

Acta Chir Belg. 2010; **110**(3): 308-12.









## 2.4. Chirurgische Komplikationen und Schmerzen nach axillärer LND

Um einen standardisierten operativen und stationären Ablauf zu garantieren, war entsprechend der Patienten mit einer RILND, auch der perioperative Ablauf der Patienten, mit der Indikation für eine radikale axilläre Lymphonodektomie (RALND), nahezu ausschließlich in der Verantwortung eines ärztlichen Teams. Im Rahmen selbiger prospektiver Datenerhebung wurde der perioperative Ablauf und die perioperativen Schmerzen und die verabreichten Analgetika dokumentiert. Auch hier standen die COX-Inhibitoren im Mittelpunkt der Analgesie.

Zwischen 2003 bis 2007 wurden ebenfalls sämtliche chirurgische Patienten unserer Klinik, mit der Indikation für eine RALND (n = 156), in selbiger prospektiver Datenbank zur Analyse des postoperativen Verlaufes, erfasst. Von 111 (71%) dieser Patienten wurden sowohl die postoperativen Schmerzen mittels einer visuellen Analogskala (VAS), als auch die perioperative Schmerztherapie und die Komplikationen erfasst. Es zeigte sich, dass die Patienten unter der verabreichten Schmerztherapie ein akzeptables Schmerzniveau hatten (VAS < 30 mm), wobei die Mobilisation zu einer signifikanten Zunahme der postoperativen Schmerzen führte ( $p < 0.0001$ ). Es fand sich kein statistischer Unterschied bezüglich des postoperativen Schmerzlevels zwischen Patienten ohne (Gruppe 1; n = 23 (21%)) oder mit postoperativen Komplikationen (Gruppe 2; n = 88 (79%)), jedoch war in Gruppe 2 eine signifikant höhere Applikation einer zentralen Bedarfsanalgesie notwendig ( $p = 0.04$ ), so dass nur hierdurch ein akzeptabler Schmerzscore zu erreichen war.

Auch bei der RALND muss die gewählte Schmerztherapie die hohe Komplikationsrate im Rahmen dieses Eingriffes berücksichtigen und die perioperative Analgesie entsprechend ausrichten. Im Folgenden galt es alternative perioperative Therapiekonzepte zu entwickeln, welche beide Patientengruppen suffizient analgetisch abdeckt ohne die Komplikationsrate zu erhöhen.

Postoperative Surgical Complications After Radical Axillary Lymph Node Dissection in Melanoma Disease Result in Increased Pain.

Heiko Neuss, Christian Reetz, Wieland Raue, Gerold Koplín, Julian W. Mall

Int Surg 2010; **95**(2): 166-71.













## 2.5. Parecoxib als präemptives Analgetikum reduziert Schmerzen nach RALND

Vor dem Hintergrund der hohen Morbidität und den damit verbundenen vermehrten Schmerzen im postoperativen Verlauf der RALND, war es unser Ziel, eine verbesserte Schmerztherapie zu etablieren. Zur Analyse einer möglichen Optimierung der Analgesie wurde eine prospektive, randomisierte, doppelt verblindete, Plazebo-kontrollierte Studie zum Vergleich unserer standardisierten postoperativen Analgesie gegenüber einer präemptiven Schmerztherapie durchgeführt. Basis war eine gezielte Inhibition der COX-2 mittels eines spezifischen COX-2 Inhibitors. Parecoxib (40 mg) wurde vor Beginn der Operation appliziert, so dass unter der Intervention schon ein Wirkstoffspiegel im Blut existierte. Hauptzielkriterium war die Reduktion der Schmerzintensität unter Mobilisation am Morgen des ersten postoperativen Tages.

Im Ergebnis zeigte sich, dass Patienten mit einer präemptiven Analgesie (n = 16) signifikant weniger Schmerzen hatten (p = 0.04), weniger Erschöpfung (Fatigue) im postoperativen Verlauf empfanden (p = 0.05) und der zusätzliche Analgetikabedarf war im Vergleich zu den Patienten der Kontrollgruppe (n = 16), reduziert (p = 0.04).

Schlussfolgernd ergab sich hieraus eine Verbesserung des postoperativen Verlaufes durch eine präoperativ beginnende spezifische COX-2 Inhibition mittels Parecoxib. Die Komplikationsrate wurde durch die COX-2 Inhibition nicht erhöht. Somit kann eine präemptive Analgesie mit Parecoxib, speziell bei der Lymphonodektomie (LND), empfohlen werden.

Preemptive Analgesia Reduces Pain After Radical Axillary Lymph Node Dissection.

Heiko Neuss, Gerold Koplín, Oliver Haase, Christian Reetz, Julian W. Mall

J Surg Res. 2010; **162**(1): 88-94.













### 3. Diskussion

#### 3.1. Die COX

In der Genese lokaler sowie systemischer Entzündungsprozesse, akuter Schmerzen aber auch in der Neoangiogenese und Karzinogenese, nimmt die COX eine Schlüsselfunktion ein. Klassische kompetitive Inhibitoren der COX, die NSAR, und die Coxibe haben neben ihrer analgetischen und antipyretischen Wirkung auch Einfluss auf die Kanzerogenese und sind somit Gegenstand aktueller experimenteller und klinischer Studien<sup>3, 4, 50</sup>. NSAR wirken mit unterschiedlicher Selektivität auf die COX-1 und auf die COX-2. Zugleich besitzen sie jedoch, aufgrund ihres zentralen Einflusses im Abbau der Arachidonsäure, ein großes Nebenwirkungsprofil. Die COX katalysieren die Biosynthese von PGH<sub>2</sub>, dem Präkursor der abhängigen Eicosanoide (Prostaglandine und Thromboxan) aus der Arachidonsäure<sup>1, 3, 4, 12</sup>.

Die Produkte der COX-1 haben überwiegend housekeeping Funktionen, deren Hemmung zu den bekannten Nebenwirkungen der NSAR führen. Mit der Entwicklung der Coxibe wurde das Ziel verfolgt, Nebenwirkungen, welche aus der COX-1 Inhibition resultieren, zu reduzieren (gastrointestinale Blutungen, Magengeschwüre etc.), und zugleich eine effektive Analgesie und antipyretische Wirkung am Ort der Noxe zu fokussieren<sup>1</sup>.

Neben der COX-1 und der COX-2 wurde eine weitere COX Isoform – die COX-3 – proklamiert. Ein endgültiger Beweis oder eine genauere Definition stehen derzeit noch aus. Es scheint sich um eine Variante der COX-1 zu handeln. Letztlich sind ihre Produkte an der Regulation von Fieber und Schmerzen beteiligt und kommen vor allem in Zellen des ZNS und des Herzens vor<sup>51</sup>. Acetaminophen (Paracetamol<sup>®</sup>) scheint über eine COX-3 Inhibition zu wirken<sup>52</sup>.

## Die COX in der Kanzerogenese und in der Neoangiogenese

Studien haben gezeigt, dass die COX-2 in zahlreichen Malignomen überexprimiert wird. Hierzu zählen Karzinome des Kolons<sup>53</sup>, der Prostata<sup>54</sup>, der Brustdrüse<sup>12</sup>, des Pankreas, sowie nichtkleinzellige Bronchialkarzinome, Blasen- und Endometriumkarzinome, als auch Karzinome der Haut<sup>4</sup>. Die COX-2 Expression ist umso höher, je besser die Differenzierung des Tumors erhalten ist (Grading). Onkogene, Wachstumsfaktoren und Zytokine stimulieren die Transkription der COX-2<sup>4</sup>. Die COX-1 Expression ist in Malignomen deutlich geringer, als die der COX-2<sup>50</sup>.

In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass NSAR und Coxibe eine chemisch induzierte Karzinogenese inhibieren können, aber nur für Coxibe ließ dies auch klinisch in malignen Tumoren bestätigen<sup>38</sup>. Zusammenfassend zeigen Coxibe das Potential antiproliferativ und apoptotisch in Tumoren zu wirken, sowie anti-angiogen im umgebenden Gewebe<sup>55</sup>. Die Effektivität einer ergänzenden Coxib Applikation, mit der für das jeweilige Malignom standardisierten Chemotherapie, gegebenenfalls mit einer begleitenden Radiotherapie, ist Gegenstand aktueller Studien<sup>56-58</sup>.

Die vielversprechenden anti-angiogenen Effekte der Coxibe in der Tumorforschung legen einen Zusammenhang zwischen Angiogenese und COX-2 Expression nah<sup>55, 59</sup>. Durch die COX-2 werden pro-angiogene Faktoren wie VEGF oder Interleukin 6 und 8 induziert. Die produzierten, COX-2 abhängigen PG bewirken eine Migration sowie eine Proliferation von Endothelzellen im Tumor<sup>55</sup>. Ergebnisse aus *in vivo* Studien zeigen, dass die aus der COX-2 Katalyse resultierenden PG die Neoangiogenese stimulieren und zugleich, dass eine COX-2 Inhibition zu einer verlangsamten Neovaskularisation führt<sup>60</sup>. Tsujii und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die COX-2 pro-angiogene Faktoren in Tumorzellen produziert, wohingegen die COX-1 die Neoangiogenese in gesunden Endothelzellen reguliert<sup>61</sup>.

### 3.2. Die COX in der Grundlagenforschung

Der Ablauf der Proteolyse der COX-2 war bisher nur ansatzweise bekannt. Beschrieben war bereits, dass die COX-2 ein Substrat des UPS darstellt. Vor dem Proteasom-abhängigen Abbau wird die COX-2 ubiquitiniert<sup>46</sup>. Bis zu unseren Analysen gab es weder Daten zu den Ub Ligasen, welche die COX-2 ubiquitinieren, noch über die Regulation des Ablaufes der Proteolyse.

Der Ub-abhängige Proteinabbau über das Signalosom ist das wichtigste proteolytische System in eukaryotischen Zellen<sup>47</sup>. Das Signalosom fungiert als Schaltstelle zwischen Signaltransduktion und Proteolyse<sup>48, 49</sup>. Durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung werden Proteine zum Abbau vorbereitet. Polyubiquitinketten (PolyUb) werden an Proteine konjugiert, wodurch dies als Signal zum Proteinabbau durch das 26S Proteasom erkannt wird<sup>62</sup>. Ub Ligasen oder auch E3s sind Enzyme, welche Proteine ubiquitinieren. Sie determinieren zugleich die Substratspezifität und spielen somit eine Schlüsselrolle in diesem System. Die größte Familie der E3s sind RING-Domän Proteine, welche größtenteils als Multiproteinkomplexe organisiert sind, den so genannten Cul-RING Ligasen (CRL)<sup>63, 64</sup>. Die Familie der Culline setzt sich aus Cul 1, 2, 3, 4A, 4B, 5 und 7 zusammen. Die Aktivität der CRL wird durch das CSN reguliert, einem weiteren Proteinkomplex<sup>65</sup> mit Assoziation zu Enzymen, welche Proteine deneddylieren<sup>66, 67</sup>, deubiquitinieren<sup>68, 69</sup> oder phosphorylieren<sup>70</sup>. Der CSN Komplex bestimmt vor allem durch Kontrolle der Ubiquitinierung die Stabilität zahlreicher regulatorischer Proteine. Die Rolle des CSN in der Regulation der CRL ist bisher nicht vollständig geklärt. Es konnte jedoch das CSN, in einem großen Komplex mit dem 26S Proteasom und den CRL, identifiziert werden<sup>71, 72</sup>. Dieser Superkomplex könnte als proteolytische Einheit im Abbau zahlreicher Substrate fungieren. Durch Hemmstoffe ist man in der Lage, die Funktionen des CSN und des Proteasoms spezifisch zu blockieren. Ein Hemmstoff der CSN assoziierten Kinasen ist das Curcumin. Die proteasomale Proteolyse kann beispielsweise durch MG 132 blockiert werden<sup>73, 74</sup>.

In Zusammenschau der Ergebnisse konnten wir zeigen, dass das CSN Einfluss auf die Stabilität der COX-2 hat (siehe Seite 13, Abbildung 1a, Reihe 2)<sup>75</sup> und dass das CSN die Proteolyse der COX-2 über das 26S Proteasom beeinflusst (siehe Seite 13, Abbildung 1a und d, Reihe 3)<sup>75</sup>. Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass durch Curcumin, als Inhibitor CSN assoziierter Kinasen, die Proteolyse der COX-2 über das Ub System in Abhängigkeit vom 26S Proteasom, beschleunigt wird (siehe Seite 13, Abbildung 1a und d, Reihe 2)<sup>75</sup>. Zudem erbrachten die erhobenen Daten Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen der COX-2 und dem CSN (siehe Seite 15, Abbildung 3)<sup>75</sup>. Die Ubiquitinierung verläuft über CRL, die vermeintlich Cul 1 und/oder Cul 4 enthalten (siehe Seite 15, Abbildung 4)<sup>75</sup>. Zudem scheint die COX-2 eine Verbindung mit dem

26S Proteasom einzugehen, und somit möglicherweise einen Superkomplex mit den CRL und dem CSN zu formen (siehe Seite 15, Abbildung 4)<sup>71, 75</sup>. Die COX-2 scheint an das CSN zu binden und somit durch Phosphorylierung vor der Proteolyse geschützt zu werden. Hemmt man die CSN assoziierten Kinasen (z.B. durch Curcumin) und unterbindet damit die Phosphorylierung, wird die COX-2 durch CRL ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Letztlich könnte die Proteolyse der COX-2 über den oben beschriebenen Superkomplex ablaufen<sup>71</sup>.

#### Einfluss der Coxibe auf die Proteolyse der COX-2

Klinische Studien haben Unterschiede im Nebenwirkungsprofil der verschiedenen Coxibe aufgezeigt<sup>33, 34, 76</sup>. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher nicht vollends verstanden. Wir konnten Unterschiede in der Proteolyse der COX-2 unter Einfluss verschiedener Coxibe aufzeigen<sup>75</sup>.

Durch Parecoxib, aber nicht durch Celecoxib oder Rofecoxib, wurde die Ub-abhängige Proteolyse der COX-2 beschleunigt. *In vivo* wird das Parecoxib in Valdecoxib umgewandelt, welches dann an die COX-2 bindet und sie inhibitiert<sup>77, 78</sup>. Diese Umwandlung findet ebenso *in vitro* in HeLa Zellen statt (siehe Seite 14, Abbildung 2)<sup>75</sup>, wobei Parecoxib und Valdecoxib nahezu identische Effekte im Abbau der COX-2 zeigen. Rofecoxib hemmt die durch Parecoxib induzierte beschleunigte Proteolyse der COX-2 (siehe Seite 17, Abbildung 6)<sup>75</sup>. Die Ergebnisse zeigen, dass durch Parecoxib COX-2 Ub Konjugate vermehrt nachgewiesen werden. Hierdurch lässt sich vermuten, dass Parecoxib eine Konformationsänderung der COX-2 induziert, wodurch die COX-2 besser ubiquitiniert und abgebaut werden kann. Diese Wirkung scheint spezifisch für Parecoxib zu sein.

### 3.3. Die COX im Tierexperiment und in der Klinik

Unsere tierexperimentellen Daten zum Einfluss der COX-1 und der COX-2 Inhibition auf die Defektheilung von Kolonanastomosen ergaben keinen Unterschied zwischen den Verumgruppen (Parecoxib (Coxib), Metamizol (NSAR), Resveratrol (selektiver COX-1 Inhibitor)) oder zur Placebogruppe. Weder die unselektive Blockade beider Isoformen, noch eine selektive Inhibition der COX-1 oder der COX-2 führte zu einer erhöhten Insuffizienzrate der Anastomosen oder zu einer Reduktion der Anastomosenfestigkeit nach sieben Tagen im Kaninchenmodell (siehe Seite 24, Abbildung 2)<sup>79</sup>. Auch aus den Daten zur Neovaskularisation ergab sich kein Unterschied zwischen der unterschiedlichen Inhibition der COX und der Kontrollgruppe.

Unsere klinischen Daten zeigen, dass eine selektive COX-2 Hemmung nicht zu einer erhöhten Defektheilungsrate führte. Weder die Lymphfistelrate, noch die Wundheilungsstörungen waren in der präemptiven Coxib Gruppe erhöht (siehe Seite 45, Tabelle 2)<sup>80</sup>. Somit kann aus unseren Daten die These formuliert werden, dass trotz der selektiven COX-2 Inhibition klinisch keine erhöhte chirurgische Komplikationsrate resultiert.

Prinzipiell verläuft die Heilung von Weichteildefekten, entsprechend der Wundheilung der Haut und Unterhaut, ebenso wie die Anastomosenheilung im Gastrointestinaltrakt in drei Phasen. Man unterscheidet zwischen der akuten Phase (Inflammations- oder Exsudationsphase), der Granulations- bzw. Proliferationsphase und der Regenerationsphase<sup>81</sup>.

Die akute Phase der Wundheilung beginnt bereits zum Zeitpunkt der Gewebeerletzung und dauert 24 - 72 Stunden. Es kommt zu einer Aktivierung der Koagulationskaskade mit einer Chemotaxis von Thrombozyten, Granulozyten und Makrophagen. Wachstumsfaktoren (PDGF: Platelet-derived growth factor) und Eicosanoide (PG und Leukotriene) fördern die lokale Hämostase und Entzündungsreaktion<sup>81, 82</sup>. Klinisch resultiert eine lokale Übererwärmung, Schwellung, Rötung und Schmerzen.

Die Granulationsphase wird dominiert durch eine zunehmende zelluläre Aktivität, ein hieraus bedingtes Anschoppen von extrazellulärer Matrix und somit resultierend der Reparaturprozess des geschädigten Gewebes. Die zweite Phase dauert drei bis sechs Wochen. Fibroblasten fungieren hier als Ausgangszellen für die Synthese von strukturellen Proteinen, für die Reorganisation von Wundmatrix und bedingen eine Wundkontraktion. Mediatoren sind Wachstumsfaktoren und PG<sup>81-83</sup>. Zugleich führen beispielsweise VEGF und FGF zu einem Einsprossen neuer Gefäße, sowie zu einer Anastomosenbildung mit bereits präexistierenden Gefäßen<sup>59</sup>. Auch migrierende Makrophagen tragen zur Neovaskularisation durch das von ihnen produzierte TNF $\alpha$  bei<sup>81</sup>. Aus der extrazellulären Wundmatrix resultierendes Kollagen Typ III

wird in der Regenerationsphase in Kollagen Typ I umgewandelt, wodurch die Wunde überbrückt und stabilisiert wird<sup>82</sup>. Die finale Reparaturphase der Wundheilung dauert sechs bis neun Monate. NSAR inhibieren mit unterschiedlicher Selektivität die COX-1 und die COX-2, woraus eine Reduktion in der Produktion der abhängigen Eicosanoide resultiert. Eine Reduktion der PG bewirkt eine verringerte Permeabilität der Endothelzellen, sowie eine reduzierte Produktion von Hyaluronsäure, welche wichtig in der Proliferationsphase der Wundheilung ist<sup>84, 85</sup>. Zudem wird die Produktion von TxA<sub>2</sub> inhibiert. Hierdurch wird die Plättchenaggregation gehemmt, woraus eine vermehrte Blutungstendenz resultiert. Vor allem in tierexperimentellen Studien konnte eine verringerte Stabilität der Wunden aufgezeigt werden, resultierend aus einem Einfluss auf die Kollagenbildung<sup>81, 86</sup>. Die COX-2 wird selektiv im entzündeten Gewebe produziert, ohne dass die Auswirkungen einer selektiven COX-2 Hemmung verstanden sind. Stimuli der COX-2 sind proinflammatorische Zytokine (TNF $\alpha$ ; Interleukine) und mitogene Stimuli (EGF, VEGF und FGF), also zentrale Elemente der Wundheilungsphasen. Wilgus A. et al. konnten einen Einfluss von Celecoxib, vor allem in der frühen Defektheilung, aufzeigen. Sie schließen durch Veränderungen in der akuten Regeneration auf Langzeiteffekte mit dem Resultat einer insgesamt verschlechterten Wundheilung über alle Phasen<sup>45</sup>. Die Arbeitsgruppe um de Hingh und Mitarbeiter konnten in einem Rattenmodell eine Überexpression der COX-2 in Kolon- und Dünndarmanastomosen nachweisen<sup>87</sup>. Die selektive Inhibition der COX-2 durch Celecoxib führte zu einer verringerten Stabilität der Dünndarm-, jedoch nicht der Dickdarmanastomosen. Große klinische Studien zur Defektheilung unter dem Einfluss von Coxiben fehlen. Die verfügbaren Daten resultieren vor allem aus tierexperimentellen Studien zur Wund- und Anastomosenheilung im Gastrointestinaltrakt oder zur Defektheilung von Magen- und Darmulcera<sup>87-91</sup>.

## Analgesieregime

Im Rahmen zweier unterschiedlicher standardisierter Operationen, der RALND und der RILND, haben wir im Rahmen einer prospektiven Datenerhebung unsere, auf NSAR basierende, postoperative Analgesie analysiert. Die Schmerztherapie wurde auf eine systemische Basisanalgesie mit peripheren Analgetika ausgerichtet. Ergänzend konnten die Patienten zentral wirksame Medikamente abrufen. Die exakten individuellen Dosen wurden durch die Patienten dokumentiert. Die postoperativen Schmerzen wurden mittels einer VAS in Ruhe und unter Belastung erfasst.

Zusammenfassend zeigte sich, dass sowohl die RALND sowie die RILND Eingriffe mit einer erheblichen postoperativen Morbidität sind. Die Rate an chirurgischen Komplikationen lag jeweils bei 80 %. Unsere standardisierte postoperative Schmerztherapie führte zu einem suffizientem Schmerzlevel in Ruhe (VAS < 30 mm), jedoch unter Belastung (Mobilisation oder Husten) kam es zu einem signifikantem Anstieg der Schmerzen. Zudem zeigte sich, dass Patienten mit chirurgischen Komplikationen im postoperativen Verlauf, vor allem am ersten postoperativen Tag, relevant mehr Schmerzen hatten oder mehr Schmerzmittel benötigten, um einen vergleichbaren VAS-Wert zu erreichen, als die Patienten aus der Gruppe mit einem unauffälligen postoperativen Verlauf (siehe Seite 32, Abbildung 3<sup>92</sup> und Tabelle 4, siehe Seite 39)<sup>93</sup>. Die bereits am 1. postoperativen Tag erhöhten VAS-Werte von Patienten mit Komplikationen im Verlauf scheinen in der frühen postoperativen Phase ein mögliches Warnzeichen für spätere Komplikationen zu sein. Umgekehrt könnte eine Kaskade aus systemischen und lokalen Effekten, eine Überexpression von Eicosanoiden aus der COX Katalyse die lokalen Schmerzen vermitteln und somit könnten sekundär, durch die vermehrte COX Aktivität, Komplikationen auftreten.

Vor diesem Hintergrund galt es ein verbessertes perioperatives Schmerzregime zu etablieren. Hierzu wurde eine prospektive, randomisierte, doppelt verblindete Studie zur Analyse einer präemptiven Analgesie (Gruppe 1: 40 mg Parecoxib 2 Stunden vor der Operation), gegenüber der standardisierten postoperativen Schmerztherapie durchgeführt (Gruppe 2).

Die Ergebnisse zeigten, dass Patienten der Gruppe 1 am ersten postoperativen Tag signifikant weniger Schmerzen unter physikalischem Stress (Husten und Mobilisation) hatten. Die Patienten mit einer präemptiven selektiven COX-2 Inhibition benötigten signifikant weniger Analgetika und ihre postoperative Erschöpfung (Fatigue) war weniger ausgeprägt, als bei den Patienten der Kontrollgruppe. Ein Anstieg postoperativer Komplikationen unter der Therapie mit Coxiben

konnte zudem ausgeschlossen werden. Eine Reduktion der Komplikationen wurde durch eine präemptive selektive COX-2 Inhibition aber auch nicht erreicht.

Zur Messung der postoperativen Schmerzintensität ist die VAS eine einfach anzuwendende Methode, die äußerst valide und reproduzierbar ist<sup>94-97</sup>. Eine Veränderung von 5 - 8 mm auf dieser 100 mm langen VAS wird von postoperativen Patienten als Änderung der Schmerzintensität wahrgenommen<sup>97</sup>. Ein akzeptabler Schmerz wird mit einem VAS-Wert  $\leq 30$  mm, ein moderater Schmerz mit einem VAS-Wert von 30 – 50 mm beschrieben, während ein starker Schmerz mit einem VAS von mehr als 50 mm einhergeht. Von chirurgischen Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen wird ein VAS-Wert von weniger als 27 mm als Ziel einer adäquaten Schmerztherapie angesehen<sup>19</sup>. Unsere Patienten zeigten sowohl nach der RALND sowie nach der RILND am ersten postoperativen Tag vor allem nach Mobilisation VAS-Werte  $\geq 30$  mm, woraus wir die Notwendigkeit einer Änderung in unserem perioperativen Regime ableiteten.

Nach den S3 Leitlinien der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften) zur Schmerztherapie gilt, dass bei leichten Schmerzen die alleinige Gabe von Nichtopioiden ausreichend ist, wohingegen bei mittelstarken bis starken Schmerzen Opioide in Kombination mit nichtopioid Analgetika verabreicht werden sollen<sup>26</sup>.

Die von uns eingeschätzten Schmerzen, im Rahmen der RALND, wurden als „leichte Schmerzen“ erwartet. Hingegen wurden die Schmerzen im Rahmen der RILND, mit dem Pararektalschnitt als Zugang für die retroperitoneale Lymphonodektomie, neben der inguinalen Wunde, eher als „leichte“ bis „mittelstarke“ erwartet. Daher umfasste unsere standardisierte Analgesie neben dem NSAR Metamizol, mit der unspezifische COX-1 und COX-2 Hemmung, oder einem Coxib, ergänzend Acetaminophenon (Paracetamol<sup>®</sup>) im Rahmen der RILND<sup>92</sup>. Auf Acetaminophenon haben wir bei der RALND verzichtet<sup>93</sup>. Ein schwaches opioid Analgetikum (Valoron<sup>®</sup>N (Tilidin, Naloxon)) konnte zusätzlich bei Bedarf, im Rahmen unserer Schmerzstudien abgefordert werden<sup>80, 92, 93</sup>.

Im Sinne eines balancierten Analgetikaregimes für postoperative Schmerzen, sollte zur Opioidesparung ein Nichtopioid als Basismedikation eingesetzt werden<sup>98</sup>. Mögliche Nebenwirkungen der Opioide sind Sedierung mit Atemdepression, Pruritus, Schwindel, Übelkeit, Erbrechen, Hemmung der Propulsivmotorik des Darms und Harnretention<sup>99</sup>. Durch die Kombination verschiedener Analgetika konnte eine Reduktion der Opioid bedingten Nebenwirkungen aufgezeigt werden<sup>100, 101</sup>. Hier scheint vor allem ein Einfluss auf den Opioid bedingten Schwindel, auf die postoperative Übelkeit und das Erbrechen (PONV) und die Sedierung möglich<sup>100</sup>. Der spezifische Einfluss der Coxibe erscheint bis dato nicht vollends

geklärt. Die Kombination mehrerer Nichtopioide (Paracetamol und NSAR oder Coxibe) scheint sinnvoll, denn sowohl ein Opioid sparender Effekt als auch eine Reduktion der Nebenwirkungen konnte bereits gezeigt werden<sup>102</sup>.

#### Die Rolle der COX in der Schmerzentstehung und Analgesie

Das Resultat nicht adäquat behandelter Akutschmerzen sind Angst, Schlaflosigkeit, zunehmende Erschöpfung und eine verringerte Motivation. Pathophysiologisch steigert sich hieraus die Gefahr kardialer und pulmonaler Komplikationen und sekundär, über eine verringertes lokales Sauerstoffangebot und einem erniedrigten Blutdruck, ebenso die Gefahr lokaler Wundkomplikationen<sup>18</sup>.

In der lokalen Genese von Schmerzen sind die Prostaglandine E2 (PGE2), PGI2 und das TxA<sub>2</sub> entscheidende Eicosanoide aus der COX-2 Katalyse, welche nach einer Gewebeverletzung und durch Entzündungen vermehrt gebildet werden. PGE2 scheint eine Sensibilisierung peripherer Schmerzrezeptoren zu bedingen, PGI2 und TxA<sub>2</sub> wiederum bedingen eine lokale Vasodilatation, führen somit zu einer Verstärkung der lokalen Inflammation und es resultiert ein verstärkter Schmerz (periphere Sensibilisierung)<sup>103</sup>.

Zentral kann die COX-2 im Rückenmark nachgewiesen werden, wo sie im Rahmen der peripheren Schmerzreaktion und Entzündung vermehrt in den Neuronen des Hinterhorns induziert wird<sup>104</sup>. Es resultiert eine „zentrale Sensibilisierung“ durch eine vermehrte Erregbarkeit der Neurone im Hinterhorn des Rückenmarkes und somit resultiert auch hierdurch ein gesteigerter postoperativer Schmerz<sup>105</sup>.

Die traditionellen NSAR spielen eine entscheidende Rolle in der Analgesie akuter postoperativer Schmerzen und wirken vor allem auf die periphere Sensibilisierung über die COX Inhibition am Ort der Noxe. Hierdurch kann eine sekundäre zentrale Sensibilisierung reduziert werden<sup>18</sup>. Durch die Induktion der COX-2 im verletzten und entzündeten Gewebe, aber eben auch zentral im Hinterhorn des Rückenmarks, kann eine selektive COX-2 Inhibition die periphere und zentrale Sensibilisierung gegenüber Schmerzen spezifisch beeinflussen<sup>106</sup>. Somit könnten gerade die Coxibe als präemptive Analgetika in der Akutschmerztherapie einen Vorteil erbringen und haben dies bereits in Studien bewiesen<sup>18, 105, 107, 108</sup>.

Auch unsere Daten bestätigen dies. Die präoperative Gabe von Parecoxib führte am ersten postoperativen Tag zu einer signifikanten Reduktion der Schmerzen, wobei über den gesamten gemessenen postoperativen Zeitraum die VAS-Werte, im Vergleich zur Kontrollgruppe, deutlich

reduziert waren<sup>80</sup>. Durch den erreichten Wirkstoffspiegel des Parecoxibs unter der Operation, könnte die durch das operative Trauma induzierte COX-2 schon in der frühen Aktivitätsphase peripher und zentral blockiert werden. Es resultiert eine Reduktion der abhängigen Eicosanoide, wodurch eine periphere und zentrale Sensibilisierung ausbleibt. Zusätzlich bewirkt Parecoxib einen beschleunigten Abbau der COX-2, wie unsere Daten aus der Grundlagenforschung belegen<sup>75</sup>, so dass hiermit die verbesserte Analgesie und die Langzeiteffekte erklärbar wären.

Im Rahmen der Analysen zum Einsatz der Coxibe in der Langzeitanwendung, haben sich relevante Ergebnisse bezüglich der begleitenden Komplikationen herausgestellt. Ein Übertragen dieser Ergebnisse auf den Einsatz in der Akutschmerztherapie lassen sich nicht unmittelbar ableiten. Zusammenfassend scheinen Coxibe mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Komplikationen assoziiert zu sein<sup>109</sup>. Zu den großen klinischen Untersuchungen zählt beispielsweise die VIGOR Studie (Vioxx gastrointestinal outcomes research)<sup>33</sup>. Hier wurde über ein fünffach erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Komplikationen durch den Einsatz von Rofecoxib (Vioxx), im Vergleich zu Naproxen, einem klassischen NSAR, berichtet. Die APPROVe Studie (Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx) verglich erstmals Rofecoxib in der Langzeitanwendung mit einem Placebo<sup>30</sup>, wobei sich ebenfalls ein zweifach erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Komplikationen durch den Einsatz eines Coxibs ergab. Die APC Studie (Adenoma prevention with Celecoxib) kam zu ähnlichen Ergebnissen<sup>110</sup>. Metaanalysen zeigen jedoch, dass eine selektive Inhibition der COX-2 in der Langzeittherapie mit einem moderaten Risiko kardiovaskulärer Komplikationen assoziiert ist. Dieses Risiko erscheint jedoch ebenso unter der Applikation von traditionellen NSAR (Diclofenac, Ibuprofen) vorhanden zu sein<sup>109</sup>. Diese Ergebnisse und weiterer randomisierter Studien führten jedoch dazu, dass Vioxx oder auch Valdecoxib (Bextra) ihre Zulassung in der Schmerztherapie verloren haben und vom Markt genommen wurden<sup>111, 112</sup>.

### 3.4. Ausblick

Die pharmakologische Inhibition der COX ist zentraler Bestandteil der perioperativen Schmerztherapie. Durch das ubiquitäre Vorkommen der COX-1 und der Induktion der COX-2 durch das chirurgische Trauma, der Inflammation und der Kanzerogenese bieten sich diverse physiologische und pathophysiologische Ansätze für den Einsatz traditioneller COX Inhibitoren und selektiver Coxibe, sowohl in der Schmerztherapie, aber auch in der additiven Anti-Tumorthherapie. Durch die Klärung der COX-2 Proteolyse und den Einfluss durch Parecoxib auf den COX-2 Abbau erweitert sich das Interpretationsspektrum. Sowohl Kurz- und Langzeiteffekte in der Analgesie, sowie in der Anti-Tumorthherapie können hierdurch neu interpretiert werden. Die gefundenen Unterschiede zwischen den verschiedenen Coxiben sollten bei zukünftigen Studien berücksichtigt und geprüft werden. Es sollten COX-2 Konzentrationen lokal verglichen werden, um somit die klinische Relevanz unserer Grundlagenergebnisse zu ermitteln.

Klinische Effekte durch den Einsatz der traditionellen NSAR sowie der Coxibe konnten wir durch unsere tierexperimentelle Arbeit, große Fallserien und eine randomisierte Studie ergänzen. Wir konnten einen Anstieg postoperativer Komplikationen durch den Einsatz unterschiedlicher COX Inhibitoren nicht nachweisen. Ihr Einsatz in der perioperativen Akutschmerztherapie ist somit gerechtfertigt. Ein spezieller Fokus zukünftiger Analysen sollte weiterhin auf dem perioperativen Einsatz der NSAR und Coxibe liegen. Ein direkter Vergleich in der präemptiven Analgesie ist notwendig, wobei gerade tierexperimentell COX-2 Konzentrationen aus dem Gebiet des chirurgischen Traumas verglichen werden sollten. Eine aufbauende Überprüfung durch weitere klinische Studien erscheint anschließend sinnvoll, wobei insbesondere auf die Komplikationen durch die selektive COX Inhibition zu achten ist.

Von speziellem Interesse ist die perioperative Schmerztherapie bei Tumorpatienten. Sind hier additive Effekte im Sinne einer Anti-Tumorthherapie durch den Einsatz von Coxiben zu erwarten? Hierfür wären Multicenterstudien notwendig, um Langzeitprognosen, das Auftreten von Metastasen und einen Tumorprogress bzw. lokale Rezidivquoten aus großen Fallserien evaluieren zu können.

Die selektive Blockade der COX Isoformen ermöglicht eine gezielte Indikationsstellung in der Schmerztherapie, mit speziellem Fokus auf das individuelle Risikospektrum des Patienten. Durch Untersuchungen der COX in der Kanzerogenese sind hier überlappende Therapieansätze zwischen Schmerztherapie und Anti-Tumorthherapie denkbar.

#### **4. Zusammenfassung**

Die COX ist ein zentrales Enzym in der Genese von Schmerzen, Entzündungen und in der Kanzerogenese. Hierbei ist die COX-2 von besonderem Interesse, da sie in Tumorzellen und im traumatisierten Gewebe induziert wird, wohingegen die COX-1 sowohl in der Tumorentstehung, im Tumorprogress, als auch in der Schmerzinduktion und Inflammation eine untergeordnete Rolle spielt.

In unseren Forschungsarbeiten haben wir uns zunächst mit dem Abbau der COX-2 beschäftigt. Wir konnten zeigen, dass die COX-2 vor der Proteolyse durch Ub markiert wird, um anschließend über das 26S Proteasom abgebaut zu werden, dem wichtigsten proteolytischen System in eukaryotischen Zellen. Die Ubiquitinierung erfolgt über Cul-abhängige Ligasen. Der CSN Komplex beeinflusst den Abbau von Proteinen in der Zelle und ebenso die Proteolyse der COX-2. Die COX-2 bindet an das CSN und wird so vor dem Abbau geschützt. Letztlich scheint die COX-2 Proteolyse über einen Superkomplex aus dem CSN, dem 26S Proteasom und Cul-RING Ligasen abzulaufen. Speziell Parecoxib, anders als Celecoxib oder Rofecoxib, nimmt direkten Einfluss auf den Abbau der COX-2. Parecoxib führt zu einem beschleunigten Ub-abhängigen Abbau der COX-2. Scheinbar kommt es zu einer Konformationsänderung der COX-2 durch Parecoxib, wodurch die COX-2 optimal ubiquitiniert und somit beschleunigt abgebaut wird.

Die Folgen unterschiedlicher COX Inhibitoren, sowohl ein COX-1 - (Resveratrol) und selektiver COX-2 Inhibitor (Valdecoxib), als auch ein unselektives NSAR mit der Blockade beider Isoformen (Metamizol), wurde in einer randomisierten, Plazebo-kontrollierten tierexperimentellen Studie untersucht. Aufgrund der zentralen Funktion der COX in der Defektheilung und Neovaskularisation, haben wir die Anastomosenfestigkeit und Insuffizienzrate nach einer Kolonsegmentresektion im Kaninchenmodell getestet. Ergänzend wurde die Kapillardichte im Bereich der Darmnaht ausgezählt. Wir konnten zeigen, dass keines der Medikamente die Komplikationsrate, die Anastomosenfestigkeit oder die Kapillardichte negativ beeinflusst. Eine Hemmung der COX – selektiv oder nicht selektiv – scheint zu keiner relevanten Änderung der Komplikationen nach Kolonresektionen zu führen. Selbiges kann ebenso auf Basis der folgenden Studien, bezüglich der Wundheilung der Haut, postuliert werden. Im Rahmen zweier standardisierter Operationen, der RILND und der RALND wurde zunächst unsere multimodale systemische Schmerztherapie, basierend auf NSAR, evaluiert. Die postoperativen Schmerzen wurden mittels einer VAS dokumentiert, sowie die exakten Schmerzmitteldosen als auch die Komplikationen im postoperativen Verlauf in einer Datenbank

registriert. Wir konnten zeigen, dass wir ein funktionierendes postoperatives Schmerzmanagement besaßen. Die Komplikationsrate entsprach der, aus den angegebenen Daten der internationalen Literatur. Patienten mit Komplikationen hatten, im Vergleich zu den Patienten ohne Komplikationen, relevant mehr Schmerzen vor allem am ersten postoperativen Tag ( $p = 0.047$ ). Der erhöhte Schmerzlevel könnte ursächlich aus einer vermehrten Induktion der COX-2 resultieren, wodurch eine verstärkte lokale Entzündungsreaktion und periphere Sensibilisierung für Schmerzen resultiert, und somit Komplikationen sekundär wahrscheinlicher werden.

Vor dem Hintergrund der Morbidität der RALND, verbunden mit dem erhöhten Schmerzlevel, vor allem am ersten postoperativen Tag, haben wir im Rahmen einer prospektiven, randomisierten, doppelt verblindeten, Placebo-kontrollierten Studie eine Veränderung unserer multimodalen Schmerztherapie untersucht. Parecoxib wurde 2 Stunden vor der Operation appliziert. Diese präemptive Analgesiegruppe ( $n = 16$ ) wurde mit dem bisherigen standardisierten Analgesiekonzept verglichen ( $n = 16$ ). Wir konnten insgesamt eine Verbesserung im postoperativen Ablauf der Patienten aus der präemptiven Analgesiegruppe feststellen. Die Patienten hatten signifikant weniger Schmerzen im postoperativen Verlauf und speziell am ersten Tag nach der Operation ( $p = 0.04$ ). Auch die postoperative Erschöpfung (Fatigue) war durch die selektive, präemptive COX-2 Inhibition reduziert ( $p = 0.05$ ). Die additive Einnahme von Schmerzmitteln war in der Verumgruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe, verringert. Die Komplikationsrate war in beiden Gruppen gleich. Erklärungen für die reduzierten Schmerzen, durch eine selektive, präemptive COX-2 Inhibition, wäre der Wirkspiegel des Coxibs zum Beginn der chirurgischen Noxe. Die induzierten COX-2 Enzyme werden schon initial blockiert, wodurch die bedingten PG, aus dem katalysierten Abbau der Arachidonsäure, nicht oder verringert gebildet würden, so dass eine periphere und zentrale Sensibilisierung reduziert werden könnte. Zusätzlich führt Parecoxib zu einer beschleunigten Proteolyse der COX-2, was zu einem Langzeiteffekt der präemptiven Analgesie beitragen könnte. Aus den gesammelten Daten kann abgeleitet werden, dass der Abbau und die Inhibition der COX in der klinischen Wirkung eng miteinander verbunden sind. Der Einsatz unterschiedlicher COX Inhibitoren ist chirurgisch, im Rahmen der perioperativen Schmerztherapie, von besonderem Interesse. Neben einem multimodalen Analgesiekonzept, sind vor allem erweiterte Therapieansätze, wie der präemptive Einsatz der Analgetika, eine Möglichkeit postoperative Schmerzmittel zu reduzieren, und zugleich eine effektivere Analgesie zu erzielen, ohne spezifische Komplikationen zu erhöhen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. FitzGerald GA. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; **2**(11): 879-90.
2. Hawkey CJ. COX-2 inhibitors. *Lancet.* 1999; **353**(9149): 307-14.
3. Fujimura T, Ohta T, Oyama K, Miyashita T, Miwa K. Role of cyclooxygenase-2 in the carcinogenesis of gastrointestinal tract cancers: a review and report of personal experience. *World J Gastroenterol.* 2006; **12**(9): 1336-45.
4. Gasparini G, Longo R, Sarmiento R, Morabito A. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? *Lancet Oncol.* 2003; **4**(10): 605-15.
5. Diaz A, Chepenik KP, Korn JH, Reginato AM, Jimenez SA. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1998; **241**(1): 222-9.
6. Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Res.* 2003; **63**(3): 728-34.
7. Urade Y, Watanabe K, Hayaishi O. Prostaglandin D, E, and F synthases. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1995; **12**(2-3): 257-73.
8. Kabashima K, Nagamachi M, Honda T, Nishigori C, Miyachi Y, Tokura Y, et al. Prostaglandin E2 is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. *Lab Invest.* 2007; **87**(1): 49-55.
9. Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, et al. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science.* 2000; **287**(5460): 2013-7.
10. McCoy JM, Wicks JR, Audoly LP. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2002; **110**(5): 651-8.
11. Grosch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst.* 2006; **98**(11): 736-47.
12. Koki AT, Masferrer JL. Celecoxib: a specific COX-2 inhibitor with anticancer properties. *Cancer Control.* 2002; **9**(2 Suppl): 28-35.
13. Mobius C, Stein HJ, Spiess C, Becker I, Feith M, Theisen J, et al. COX2 expression, angiogenesis, proliferation and survival in Barrett's cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2005; **31**(7): 755-9.

14. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia*. 2001; **3**(1): 53-61.
15. Wang D, DuBois RN. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; **101**(2): 415-6.
16. Endo K, Maehara Y, Baba H, Yamamoto M, Tomisaki S, Watanabe A, et al. Elevated levels of serum and plasma metalloproteinases in patients with gastric cancer. *Anticancer Res*. 1997; **17**(3C): 2253-8.
17. Sun WH, Sun YL, Fang RN, Shao Y, Xu HC, Xue QP, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis. *Jpn J Clin Oncol*. 2005; **35**(12): 707-13.
18. Sinatra R. Role of COX-2 inhibitors in the evolution of acute pain management. *J Pain Symptom Manage*. 2002; **24**(1 Suppl): S18-27.
19. Lempa M, Koch G, Neugebauer E, Kohler L, Troidl H. [How much pain is tolerable? Target expectations of surgical patients for pain therapy]. *Chirurg*. 2000; **71**(10): 1263-9.
20. Angster R, Hainsch-Muller I. [Postoperative pain management]. *Anaesthesist*. 2005; **54**(5): 505-31; quiz 32-3.
21. Kehlet H. [Principles of fast track surgery. Multimodal perioperative therapy programme]. *Chirurg*. 2009; **80**(8): 687-9.
22. Schwenk W. [Fast track rehabilitation in visceral surgery]. *Chirurg*. 2009; **80**(8): 690-701.
23. Schwenk W, Brodner G, Neugebauer EA. [Organisation of postoperative acute pain therapy in Germany compared to other European nations - results of a postoperative analgetic therapy observational survey (PATHOS)]. *Zentralbl Chir*. 2008; **133**(3): 297-305.
24. Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol*. 1995; **2**(8): 637-43.
25. AWMF AdWMFeV. <http://www.uni-duesseldorf.de/www/awmf/>. 2010 [cited 2010 19.11.2010]; Available from:
26. AWMF AdWMFeV. <http://leitlinien.net/>. 2010 [cited 2010 19.11.2010]; Available from:
27. Goldstein JL, Eisen GM, Agrawal N, Stenson WF, Kent JD, Verburg KM. Reduced incidence of upper gastrointestinal ulcer complications with the COX-2 selective inhibitor, valdecoxib. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; **20**(5): 527-38.
28. Graff J, Skarke C, Klinkhardt U, Watzer B, Harder S, Seyberth H, et al. Effects of selective COX-2 inhibition on prostanoids and platelet physiology in young healthy volunteers. *J Thromb Haemost*. 2007; **5**(12): 2376-85.

29. Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, Redston M, Solomon SD, Kim K, et al. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med.* 2006; **355**(9): 873-84.
30. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med.* 2005; **352**(11): 1092-102.
31. Solomon DH, Schneeweiss S, Glynn RJ, Kiyota Y, Levin R, Mogun H, et al. Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. *Circulation.* 2004; **109**(17): 2068-73.
32. Arber N, Eagle CJ, Spicak J, Racz I, Dite P, Hajer J, et al. Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N Engl J Med.* 2006; **355**(9): 885-95.
33. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med.* 2000; **343**(21): 1520-8, 2 p following 8.
34. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA.* 2000; **284**(10): 1247-55.
35. Hammamieh R, Sumaida D, Zhang X, Das R, Jett M. Control of the growth of human breast cancer cells in culture by manipulation of arachidonate metabolism. *BMC Cancer.* 2007; **7**: 138.
36. Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000; **342**(26): 1960-8.
37. Shaheen NJ, Straus WL, Sandler RS. Chemoprevention of gastrointestinal malignancies with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Cancer.* 2002; **94**(4): 950-63.
38. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst.* 2002; **94**(4): 252-66.
39. Asano TK, McLeod RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and aspirin for the prevention of colorectal adenomas and cancer: a systematic review. *Dis Colon Rectum.* 2004; **47**(5): 665-73.
40. Hyde CA, Missailidis S. Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int Immunopharmacol.* 2009; **9**(6): 701-15.

41. Sandulache VC, Parekh A, Li-Korotky H, Dohar JE, Hebda PA. Prostaglandin E2 inhibition of keloid fibroblast migration, contraction, and transforming growth factor (TGF)-beta1-induced collagen synthesis. *Wound Repair Regen.* 2007; **15**(1): 122-33.
42. Sehgal R, Kumar VL. Calotropis procera latex-induced inflammatory hyperalgesia--effect of antiinflammatory drugs. *Mediators Inflamm.* 2005; **2005**(4): 216-20.
43. Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, Oates JF, 3rd, Berard CW, Rosen H. The Healing of Rat Skin Wounds. *Ann Surg.* 1965; **161**: 293-308.
44. Brissett AE, Sherris DA. Scar contractures, hypertrophic scars, and keloids. *Facial Plast Surg.* 2001; **17**(4): 263-72.
45. Wilgus TA, Vodovotz Y, Vittadini E, Clubbs EA, Oberyszyn TM. Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. *Wound Repair Regen.* 2003; **11**(1): 25-34.
46. Rockwell P, Yuan H, Magnusson R, Figueiredo-Pereira ME. Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates, and production of the prostaglandin PGE(2). *Arch Biochem Biophys.* 2000; **374**(2): 325-33.
47. Mundt KE, Porte J, Murray JM, Brikos C, Christensen PU, Caspari T, et al. The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase. *Curr Biol.* 1999; **9**(23): 1427-30.
48. Wei N, Chamovitz DA, Deng XW. Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell.* 1994; **78**(1): 117-24.
49. Wei N, Deng XW. Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. *Trends Genet.* 1999; **15**(3): 98-103.
50. Mazhar D, Gillmore R, Waxman J. COX and cancer. *QJM.* 2005; **98**(10): 711-8.
51. Botting R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb Res.* 2003; **110**(5-6): 269-72.
52. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; **99**(21): 13926-31.
53. Maekawa M, Sugano K, Sano H, Miyazaki S, Ushiyama M, Fujita S, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol.* 1998; **28**(7): 421-6.
54. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate.* 2000; **42**(1): 73-8.

55. Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res.* 2002; **62**(3): 625-31.
56. Dicker AP, Williams TL, Grant DS. Targeting angiogenic processes by combination rofecoxib and ionizing radiation. *Am J Clin Oncol.* 2001; **24**(5): 438-42.
57. Gasparini G. Metronomic scheduling: the future of chemotherapy? *Lancet Oncol.* 2001; **2**(12): 733-40.
58. Milas L, Kishi K, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ. Enhancement of tumor response to gamma-radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme. *J Natl Cancer Inst.* 1999; **91**(17): 1501-4.
59. Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res.* 1999; **59**(18): 4574-7.
60. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* 2000; **60**(5): 1306-11.
61. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998; **93**(5): 705-16.
62. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998; **67**: 425-79.
63. Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; **6**(1): 9-20.
64. Willems AR, Schwab M, Tyers M. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta.* 2004; **1695**(1-3): 133-70.
65. Deng XW, Dubiel W, Wei N, Hofmann K, Mundt K, Colicelli J, et al. Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet.* 2000; **16**(5): 202-3.
66. Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, et al. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science.* 2002; **298**(5593): 608-11.
67. Schwechheimer C, Serino G, Callis J, Crosby WL, Lyapina S, Deshaies RJ, et al. Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science.* 2001; **292**(5520): 1379-82.

68. Hetfeld BK, Helfrich A, Kapelari B, Scheel H, Hofmann K, Guterman A, et al. The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol.* 2005; **15**(13): 1217-21.
69. Zhou C, Wee S, Rhee E, Naumann M, Dubiel W, Wolf DA. Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p. *Mol Cell.* 2003; **11**(4): 927-38.
70. Uhle S, Medalia O, Waldron R, Dumdey R, Henklein P, Bech-Otschir D, et al. Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *EMBO J.* 2003; **22**(6): 1302-12.
71. Huang X, Hetfeld BK, Seifert U, Kahne T, Kloetzel PM, Naumann M, et al. Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction. *FEBS J.* 2005; **272**(15): 3909-17.
72. Peng Z, Shen Y, Feng S, Wang X, Chitteti BN, Vierstra RD, et al. Evidence for a physical association of the COP9 signalosome, the proteasome, and specific SCF E3 ligases in vivo. *Curr Biol.* 2003; **13**(13): R504-5.
73. Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, et al. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J.* 2001; **20**(7): 1630-9.
74. Huang MT, Ma W, Lu YP, Chang RL, Fisher C, Manchand PS, et al. Effects of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion. *Carcinogenesis.* 1995; **16**(10): 2493-7.
75. Neuss H, Huang X, Hetfeld BK, Deva R, Henklein P, Nigam S, et al. The ubiquitin- and proteasome-dependent degradation of COX-2 is regulated by the COP9 signalosome and differentially influenced by coxibs. *J Mol Med.* 2007; **85**(9): 961-70.
76. Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, Langford RM, Hoeft A, Parlow JL, et al. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med.* 2005; **352**(11): 1081-91.
77. McMurray RW, Hardy KJ. Cox-2 inhibitors: today and tomorrow. *Am J Med Sci.* 2002; **323**(4): 181-9.
78. Talley JJ, Bertenshaw SR, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ, Kellogg MS, et al. N-[[[5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)-phenyl]sulfonyl]propanamide, sodium salt, parecoxib sodium: A potent and selective inhibitor of COX-2 for parenteral administration. *J Med Chem.* 2000; **43**(9): 1661-3.

79. Neuss H, Raue W, Muller V, Weichert W, Schwenk W, Mall JW. Effects of cyclooxygenase inhibition on anastomotic healing following large bowel resection in a rabbit model--a randomized, blinded, placebo-controlled trial. *Int J Colorectal Dis.* 2009; **24**(5): 551-7.
80. Neuss H, Koplín G, Haase O, Reetz C, Mall JW. Preemptive analgesia reduces pain after radical axillary lymph node dissection. *J Surg Res.* 2010; **162**(1): 88-94.
81. Busti AJ, Hooper JS, Amaya CJ, Kazi S. Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. *Pharmacotherapy.* 2005; **25**(11): 1566-91.
82. Su WH, Cheng MH, Lee WL, Tsou TS, Chang WH, Chen CS, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation? *Mediators Inflamm.* 2010; **2010**: 413238.
83. Muller-Decker K, Hirschner W, Marks F, Furstenberger G. The effects of cyclooxygenase isozyme inhibition on incisional wound healing in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 2002; **119**(5): 1189-95.
84. Dunham BM, Hechtman HB, Valeri CR, Shepro D. Antiinflammatory agents inhibit microvascular permeability induced by leukotrienes and by stimulated human neutrophils. *Microcirc Endothelium Lymphatics.* 1984; **1**(4): 465-89.
85. Murota S, Chang WC, Abe M, Otsuka K. The stimulatory effect of prostaglandins on production of hexosamine-containing substances by cultured fibroblasts. *Prostaglandins.* 1976; **12**(2): 193-5.
86. Haws MJ, Kucan JO, Roth AC, Suchy H, Brown RE. The effects of chronic ketorolac tromethamine (toradol) on wound healing. *Ann Plast Surg.* 1996; **37**(2): 147-51.
87. de Hingh IH, van Goor H, de Man BM, Lomme RM, Bleichrodt RP, Hendriks T. Selective cyclo-oxygenase 2 inhibition affects ileal but not colonic anastomotic healing in the early postoperative period. *Br J Surg.* 2006; **93**(4): 489-97.
88. Blomme EA, Chinn KS, Hardy MM, Casler JJ, Kim SH, Opsahl AC, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition does not affect the healing of cutaneous full-thickness incisional wounds in SKH-1 mice. *Br J Dermatol.* 2003; **148**(2): 211-23.
89. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pajdo R, Drozdowicz D, et al. Classic NSAID and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. *Microsc Res Tech.* 2001; **53**(5): 343-53.
90. Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, Wada K, Uchida T, Noguchi H, et al. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology.* 1997; **112**(2): 387-97.

91. Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest.* 1996; **98**(9): 2076-85.
92. Neuss H, Reetz C, Raue W, Koplín G, Mall JW. Influence of surgical complications on the level of pain after radical inguinal/iliacal lymph node dissection. *Acta Chir Belg.* 2010; **110**(3): 308-12.
93. Neuss H, Reetz C, Raue W, Koplín G, Mall JW. Postoperative surgical complications after radical axillary lymph node dissection in melanoma disease result in increased pain. *Int Surg.* 2010; **95**(2): 166-71.
94. Collins SL, Moore RA, McQuay HJ. The visual analogue pain intensity scale: what is moderate pain in millimetres? *Pain.* 1997; **72**(1-2): 95-7.
95. Dauber A, Ure BM, Neugebauer E, Schmitz S, Troidl H. [The incidence of postoperative pain on general surgical wards. Results of different evaluation procedures]. *Anaesthesist.* 1993; **42**(7): 448-54.
96. DeLoach LJ, Higgins MS, Caplan AB, Stiff JL. The visual analog scale in the immediate postoperative period: intrasubject variability and correlation with a numeric scale. *Anesth Analg.* 1998; **86**(1): 102-6.
97. Sauerland S, Lefering R, Neugebauer EA. The pros and cons of evidence-based surgery. *Langenbecks Arch Surg.* 1999; **384**(5): 423-31.
98. Dahl JB, Rosenberg J, Dirkes WE, Mogensen T, Kehlet H. Prevention of postoperative pain by balanced analgesia. *Br J Anaesth.* 1990; **64**(4): 518-20.
99. Schug SA, Zech D, Grond S. Adverse effects of systemic opioid analgesics. *Drug Saf.* 1992; **7**(3): 200-13.
100. Romsing J, Moiniche S, Mathiesen O, Dahl JB. Reduction of opioid-related adverse events using opioid-sparing analgesia with COX-2 inhibitors lacks documentation: a systematic review. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2005; **49**(2): 133-42.
101. Marret E, Kurdi O, Zufferey P, Bonnet F. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on patient-controlled analgesia morphine side effects: meta-analysis of randomized controlled trials. *Anesthesiology.* 2005; **102**(6): 1249-60.
102. Elia N, Lysakowski C, Tramer MR. Does multimodal analgesia with acetaminophen, nonsteroidal antiinflammatory drugs, or selective cyclooxygenase-2 inhibitors and patient-controlled analgesia morphine offer advantages over morphine alone? Meta-analyses of randomized trials. *Anesthesiology.* 2005; **103**(6): 1296-304.

103. Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, et al. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*. 1997; **388**(6643): 678-82.
104. Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, et al. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*. 2001; **410**(6827): 471-5.
105. Woolf CJ, Chong MS. Preemptive analgesia--treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. *Anesth Analg*. 1993; **77**(2): 362-79.
106. Mannion RJ, Woolf CJ. Pain mechanisms and management: a central perspective. *Clin J Pain*. 2000; **16**(3 Suppl): S144-56.
107. Gan TJ, Joshi GP, Zhao SZ, Hanna DB, Cheung RY, Chen C. Presurgical intravenous parecoxib sodium and follow-up oral valdecoxib for pain management after laparoscopic cholecystectomy surgery reduces opioid requirements and opioid-related adverse effects. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004; **48**(9): 1194-207.
108. Straube S, Derry S, McQuay HJ, Moore RA. Effect of preoperative Cox-II-selective NSAIDs (coxibs) on postoperative outcomes: a systematic review of randomized studies. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005; **49**(5): 601-13.
109. Kearney PM, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson JR, Patrono C. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 2006; **332**(7553): 1302-8.
110. Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, et al. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med*. 2005; **352**(11): 1071-80.
111. Cannon CP, Curtis SP, FitzGerald GA, Krum H, Kaur A, Bolognese JA, et al. Cardiovascular outcomes with etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomised comparison. *Lancet*. 2006; **368**(9549): 1771-81.
112. Laharie D, Droz-Perroteau C, Benichou J, Amouretti M, Blin P, Begaud B, et al. Hospitalizations for gastrointestinal and cardiovascular events in the CADEUS cohort of traditional or Coxib NSAID users. *Br J Clin Pharmacol*. 2010; **69**(3): 295-302.

## **6. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich gerne denjenigen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die mich auf meinem akademischen Weg unterstützt haben, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt und indirekt zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Chef, Herrn Professor Dr. J. M. Müller. Durch die langjährige, motivierende Unterstützung und notwendigen Freiräume war letztlich diese Habilitation nur möglich. Ein ständiger Rückhalt und eine offene, sachbezogene Diskussionskultur haben die wissenschaftliche Arbeit immer begleitet und die Basis für ein motiviertes und erfolgreiches Arbeiten geschaffen.

Zudem gilt Herrn Professor Dr. Dr. B. Böhm und Professor W. Schwenk mein herzlichster Dank. Einerseits als Leiter meiner Arbeitsgruppe, aber vor allem in ihrer wissenschaftlichen Vorbildfunktion und der exzellenten und geduldigen akademischen Ausbildung sowie Unterstützung, haben sie entscheidend meinen wissenschaftlichen Weg geprägt. Ebenso möchte ich sämtlichen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Herrn PD Dr. T. Junghans, Herrn Dr. O. Haase, Herrn Dr. W. Raue, Herrn Dr. G. Koplin, Frau Dr. C. Langelotz, Herrn C. Reetz und Frau Dr. V. Müller und besonders Frau Dr. J. Höflich für ihre tatkräftige Mithilfe danken.

Entscheidenden Anteil an der Habilitation hat Herr PD Dr. J.W. Mall. Durch seine motivierende und freundschaftliche Zusammenarbeit ist dieses Projekt gelungen - vielen Dank!

Ebenso gilt Herrn Professor W. Dubiel und seiner Arbeitsgruppe ein besonderer Dank. Einer motivierenden und tatkräftigen Unterstützung im Labor und allen anschließenden Arbeiten, konnte man immer gewiss sein.

Abschließend gelten meine Gedanken meiner Familie und meinen Freunden. Allen, über einen langjährigen Zeitraum ein Ausmaß an Verständnis abzugewinnen und immer zu erfahren, kann nicht hoch genug geschätzt werden. Ich danke meinen Eltern und Frau Dr. Katja Neuß, dieses Leben an meiner Seite unterstützt und geduldet zu haben. Mein gesamter Freundeskreis war aktiv und/oder passiv in der Habilitation mit einbezogen und musste ebenso ein hohes Maß an Verständnis aufbringen - Danke!

## Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 30.01.2011

.....  
Dr. med. Heiko Neuß