

## 5. Diskussion

Die Ausführungen zur Diskussion sollen hinsichtlich der beschriebenen Ergebnisse und unter Berücksichtigung der in Kapitel 2 formulierten Fragestellungen abgehandelt werden und gliedern sich in die folgenden Abschnitte:

Zunächst werden die verwendeten Celecoxibkonzentrationen aus pharmakologischer Sichtweise betrachtet.

Im zweiten Teil werden die Ergebnisse aus den Zellkulturexperimenten zusammengefasst und diskutiert. Anschließend erfolgt die Diskussion zum Knochenstoffwechsel und somit zur OPG-Expression der humanen Osteoblasten nach Celecoxibapplikation. Nachfolgend werden die gewonnenen Daten zum Energiemetabolismus der behandelten Zellen zusammengetragen und im Kontext beurteilt.

Schließlich folgen Perspektiven zu möglichen, weiteren und ergänzenden Untersuchungen, die die gezeigten Ergebnisse in ihrer Aussagekraft unterstützen könnten.

### 5.1 Celecoxibkonzentrationen aus pharmakologischer Perspektive

Nach oraler Aufnahme wird Celecoxib relativ langsam resorbiert. Maximale Plasmaspiegel werden zumeist nicht vor Ablauf von 2 h erreicht. Zur Bioverfügbarkeit beim Menschen existieren keine Daten, jedoch lag diese in tierexperimentellen Untersuchungen bei höchstens 40 %. Die Plasmaproteinbindung von Celecoxib beträgt etwa 97 % **(130)**.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Celecoxibkonzentrationen waren 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ . Höchste Plasmaspiegel ( $C_{\text{max}}$ ) wurden bei Patienten erreicht, welche eine tägliche Einmaldosis von 800 mg Celecoxib zur Behandlung der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) einnahmen. Es kam zur signifikanten Abnahme des Polypenwachstums durch Apoptoseinduktion der Tumorzellen. Bei derartigen, protektiv auf das Tumorzellwachstum wirkenden, Celecoxibkonzentrationen ergeben sich  $C_{\text{max}}$ -Level von circa 8  $\mu\text{M}$ . Somit kann die in den Zellkulturexperimenten eingesetzte Celecoxibkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  als klinisch relevant angesehen werden **(74, 130)**.

Viele Arbeitsgruppen beschäftigten sich jedoch auch mit höheren Celecoxibkonzentrationen (bis 150  $\mu\text{M}$ ), um *in vitro* Mechanismen systematisch evaluieren zu können. Durch individuell eingeschränkte Stoffwechselfunktionen, mögliche Nierenfunktionsstörungen oder Substanzwechselwirkungen mit extrazellulärer Matrix, Stromazellen oder mit bestimmten Wachstumsfaktoren, die durch *in vitro* Untersuchungen schwer nachzuahmen sind, kann es demnach zu lokal erhöhten Wirkstoffkonzentrationen des Celecoxibs kommen **(72, 75, 130-137)**.

Celecoxib wird intensiv metabolisiert, wobei die Biotransformation über das Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9) in der Leber erfolgt. Es wurden erhöhte Celecoxibkonzentrationen bei Patienten festgestellt, die einen Mangel oder eine verminderte Funktion dieses Enzyms aufwiesen. Besonders bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen konnte eine veränderte Expression und Aktivität des CYP2C9-Enzyms gezeigt werden **(136)**. Patienten mit RA oder Osteoporose haben, bedingt durch ihr hohes Alter, oftmals auch kardiovaskuläre Begleiterkrankungen. Die Behandlung dieses Patientenkollektivs mit Celecoxib kann daher auch veränderte Plasmaspiegel zur Folge haben. Weiterhin werden diese Patienten wegen des chronischen Krankheitsverlaufes der RA auch längerfristig mit Celecoxib therapiert, was wiederum zu erhöhten Plasmakonzentrationen dieser

Substanz führen kann. Die biologischen Auswirkungen solcher Langzeittherapien sind derzeit allerdings noch nicht untersucht worden. Allgemein stellen Zellkulturexperimente nur kurzfristige Untersuchungsmodelle dar, denen angemessene präklinische Tierexperimente folgen, bevor die entsprechende Dosis in klinischen Studien überprüft wird. In den Experimenten dieser Arbeit wurden die Osteoblasten zwar mit hohen Celecoxibkonzentrationen inkubiert, doch betrug das gewählte Zeitfenster nur einige Stunden. Dadurch lässt sich jedoch das Produkt aus der „Konzentration über die Zeit“ für beide Situationen (*in vitro* versus *in vivo*) vergleichen **(131)**.

Da Celecoxib, wie auch die nichtselektiven NSAIDs, renal eliminiert wird, ist bei eingeschränkter Nierenfunktion zugleich eine kumulationsinduzierte Steigerung der Plasmakonzentration denkbar **(130, 136)**.

Zudem ergaben Untersuchungen in der Zellkultur, dass im Serum befindliche Proteine wie IGF-I an Celecoxib binden und dadurch die Aktivität der Substanz vermindern **(137)**.

Aufgrund der genannten möglichen *in vivo* Bedingungen und Einschränkungen im Zellkultursystem ergibt sich neben der verwendeten Celecoxibkonzentration von 10 µM auch für Celecoxib 50 µM in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis eine nicht zu unterschätzende Bedeutung. Sowohl pharmakodynamische und pharmakokinetische Aspekte als auch Aufklärungen von Nebenwirkungen bei derart hohen Konzentrationen werden Ergebnisse weiterer Studien und Analysen erbringen.

## **5.2 Zellkultur der humanen Osteoblasten und alkalische Phosphatasefärbung**

Die Ergebnisse der Zellkultur zeigten zwischen den MG-63 Osteoblasten und den phOB deutliche Unterschiede in Bezug auf Kinetik und Morphologie. Die MG-63 Osteoblasten waren bereits nach 7 Tagen konfluent und reflektierten nach drei weiteren Tagen eine enorm hohe Zelldichte mit Multilayer-Formation. In der Literatur wird eine Verdopplungszeit von 38 h bei einer logarithmischen Wachstumsrate von 5,3 Zellen/cm<sup>2</sup> angegeben. Dieses schnelle Wachstum konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden, wenngleich keine Berechnungen zur Wachstumskinetik erfolgten. Ferner fanden die beschriebenen Veränderungen des morphologischen Erscheinungsbildes der MG-63 Osteoblasten während der Zellkultur Bestätigung **(93)**.

Die Kultivierung der humanen Osteoblasten erfolgte ohne enzymatische Digestion aus zerkleinerten Spongiosafragmenten von vier verschiedenen Patienten nach methodischer Modifikation von Gundle et al. Die Zellen sollten aus den unbehandelten Fragmenten herauswachsen, um sie vor möglichen enzymatisch verursachten Schäden zu bewahren **(8, 85, 87, 88)**.

Nachdem die Zellen passagiert und als phOB in neue Kulturgefäße ausgesät wurden, konnte bei ihnen ein langsames Zellwachstum als initial festgestellt werden. Owen et al. beobachteten an Osteoblasten der Ratte, dass diese nach Passagierung und Subkultivierung eine gleich bleibende Entwicklungssequenz osteoblastärer Marker in einem jedoch größeren Inkubationszeitraum aufwiesen **(138)**. Somit scheinen sich nach Passagierung der Zellen nicht nur das Zellwachstum allein sondern auch die Differenzierungsphasen, wie Proliferation, Matrixbildung und Matrixmineralisierung, hinauszuzögern.

Die Wachstumskinetik war gegenüber den MG-63 Osteoblasten deutlich verlangsamt. Die jetzt als phOB bezeichneten Zellen erreichten erst nach etwa 11 Tagen Konfluenz. Sowohl interindividuelle Unterschiede als auch die verschiedenen Entnahmeorte der Knochenspongiosa innerhalb des

Patientenkollektivs dürften die uneinheitlichen Wachstumszeiten verursacht haben. So wurde in drei Fällen die Spongiosa des distalen Femur und in einem Fall die Spongiosa des proximalen Femur für die Untersuchungen verwendet. Kasperk et al. beschrieben bereits phänotypische und stoffwechselbezogene intraindividuelle Unterschiede zwischen aus dem Unterkiefer und dem Beckenkamm stammenden Osteoblasten **(139)**.

Für die osteogene Ausdifferenzierung mussten die Zellen noch weitere 10 Tage mit AsAP inkubiert werden **(85, 90)**. AsAP, welches das stabilere Analogon zur Ascorbinsäure darstellt, dient als Co-Faktor für die Hydroxylierung von Prolin und Lysin während der Kollagensynthese **(89)**. Es konnte neben der Multilayer-Formation der Zellen die scheinbare Ausbildung von Knochenmatrix, die geflechtartig imponierte, beobachtet werden. Diese ist wahrscheinlich auf den Zusatz von AsAP zurückzuführen.

Konsistent mit diesen Ergebnissen konnten Siggelkow et al. darüber hinaus zeigen, dass die Zugabe von Ascorbat die Zellproliferation der phOB um das Vierfache steigerte. Innerhalb einer 35 Tage andauernden Inkubationszeit der Zellen zeichnete sich kein Plateau bezüglich der Zellzahl und des totalen DNA-Gehaltes ab **(85)**.

Im Unterschied zur MG-63 Zelllinie formierten sich bei den phOB im fortgeschrittenen Stadium keine Nodules. Insgesamt war das mikroskopische Zellbild der MG-63 Osteoblasten homogener als das der phOB. Bei den phOB konnten auch noch nach 35 Tagen Inkubation einzelne nicht bewachsene Areale beobachtet werden.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass durchaus molekularbiologische Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen bestehen. Zwar wurde der MG-63 Zellklon schon häufig für *in vitro* Untersuchungen des Knochenstoffwechsels genutzt, jedoch bestehen hinsichtlich seiner Proliferation, der Aktivität der alkalischen Phosphatase oder der Expression bestimmter transmembranöser Integrine Unterschiede zum osteoblastischen Phänotyp **(47, 94-97)**. Eine Erklärung für diese Diskrepanzen ist sicherlich die Heterogenität der phOB, bei welcher Osteoblasten auf verschiedenen Stufen der Differenzierungs- und Reifestadien nebeneinander vorliegen. Für die MG-63 Osteoblasten besteht durch den Prozess der malignen Transformation mit ungehemmter Teilungsrate diese Heterogenität nicht mehr. Resultierend kann es zu unterschiedlichen Zellantworten und veränderten intrazellulären Signalkaskaden kommen **(91)**.

Dennoch ist es wichtig, pathophysiologische Vorgänge mit Hilfe von Untersuchungen an Zelllinien durchzuführen. Für die molekularbiologischen Experimente konnte der MG-63 Zellklon die Ergebnisse der phOB bestätigen. Es bestanden in Bezug auf die OPG-mRNA-Expression keine signifikanten Unterschiede zu den phOB. Dies bedeutet jedoch nicht, dass es eine Übereinstimmung im Expressionsmuster für OPG gibt, dennoch konnten gleiche Effekte und Tendenzen aufgezeigt werden. Somit stellte die MG-63 Zelllinie in der vorliegenden Arbeit, stellvertretend für den osteoblastischen Phänotypen, ein adäquates Modellsystem hinsichtlich der OPG-Expression dar. Weiterführende Untersuchungen (Messungen der GLUT-1-mRNA-Expressionen, Sauerstoffverbrauchsmessungen, HIF-1 $\alpha$  Nachweis) konnten entsprechend mit diesem Zellklon vorgenommen werden.

Die phOB wurden mit AsAP behandelt, um die osteogene Differenzierung der Zellen und die Ausbildung einer Knochenmatrix zu ermöglichen. Zum Nachweis des osteogenen Potentials erfolgte die Färbung mit alkalischer Phosphatase (**85, 87**). Der Enzymaktivitätsnachweis war nur unter diesen osteogenen Bedingungen positiv.

Die Arbeitsgruppe um Siggelkow et al. konnte zeigen, dass die Phase der Matrixbildung durch maximale Expression der AP charakterisiert ist. Sie wurde auf mRNA-Ebene humaner Osteoblasten bestimmt. Nach 15tägiger Kultivierung stieg die Expression der AP an und erreichte am 24. Tag ihr Maximum. Da der Nachweis der AP in der vorliegenden Arbeit zum etwa gleichen Zeitpunkt erfolgte (nach circa 20 Tagen), kann mit diesen Ergebnissen ebenfalls auf die Phase der Matrixbildung geschlossen werden. Die Kultivierungsbedingungen von Siggelkow et al. waren dabei denen dieser Arbeit sehr ähnlich (**85**). Bezüglich des eingesetzten Mediums gab es jedoch Unterschiede. So wurde nicht mit MEM- sondern DMEM-Medium, welches mit der vierfachen Menge an Aminosäuren supplementiert ist, gearbeitet.

In den letzten Jahren sind jedoch zunehmend Ergebnisse präsentiert worden, die die AP als Standardmarker der osteoblastären Differenzierungskaskade in Frage stellen. Dies besteht zum einen in der Nachweismethode selbst. So wird bei vielen Untersuchungen indirekt die Enzymaktivität der AP über p-Nitrophenol bestimmt (**89**). Zum anderen werden histologische Nachweisverfahren über Naphtol/Diazoniumsalz-Färbungen verwendet (**139**). Diese Färbemethoden weisen dabei nicht das Protein sondern nur die Enzymaktivität nach, die einerseits zwar hochspezifisch ist, doch andererseits nicht mit der Menge des tatsächlich vorhandenen Proteins korreliert. Ferner wird AP auch von vielen anderen Zelltypen außerhalb der osteoblastären Kaskade exprimiert. Außerdem lassen sich falsch positive Ergebnisse durch andere Enzyme, die das gleiche Substrat umsetzen, nicht sicher ausschließen (**138**).

Ein direkter Nachweis der AP auf mRNA-Ebene mittels Realtime PCR oder aus den Zellkulturüberständen auf Proteinebene mittels ELISA-Verfahren hätte sicherlich eine genauere Aussage über deren Existenz geben können (**85**). Da jedoch der Enzymaktivitätsnachweis nur unter denen mit osteogenem Medium behandelten Zellen positiv ausfiel, kann prinzipiell von osteoblastischen Zellen ausgegangen werden. Primär wichtig war allein die qualitative Aussage über einen positiven AP-Nachweis für das weitere experimentelle Procedere.

### **5.3 Zellvitalität nach Celecoxibapplikation**

Um eine Aussage über die Lebensfähigkeit der inkubierten Zellen nach Substanzapplikation treffen zu können, wurde der Zellvitalitätstest mit Trypanblau durchgeführt. Die mit Celecoxib behandelten MG-63 Osteoblasten zeigten dabei ein zeit- und konzentrationsabhängiges Auftreten des Zelltodes. Ungefähr 6 % der Zellen, die mit Celecoxib 50  $\mu$ M inkubiert wurden, waren nach 24 h signifikant ( $p = 0,031$ ) avital. Celecoxib 10  $\mu$ M erreichte nach 24stündiger Inkubation eine signifikante Sterberate ( $p = 0,031$ ) von etwa 1,5 % Zellen, wenngleich die Zunahme gegenüber dem 6 h Wert deutlicher ausgeprägt war als bei der mit Celecoxib 50  $\mu$ M behandelten Gruppe. Aufgrund der nachfolgend dargestellten Gründe kann das beobachtete Eintreten des Zelltodes nach Celecoxibapplikation als Apoptose-vermittelt betrachtet werden.

Neben ihren entzündungshemmenden Effekten werden selektive COX-2-Inhibitoren auch in der Prävention und Therapie kolorektaler Tumoren eingesetzt (**71, 74, 140**). Ihre antitumorösen Eigenschaften ergeben sich in diesem Zusammenhang sowohl über eine Hemmung der Zellproliferation als auch Apoptoseinduktion. Die präzisen Wirkmechanismen konnten in diesem Zusammenhang jedoch noch nicht endgültig geklärt werden. Swamy et al. untersuchten mit relativ hohen Celecoxibkonzentrationen (50-150  $\mu\text{M}$ ) das Wachstumsverhalten der HCA-7 Zelllinie. Die Zellproliferation, die mit der Trypanblau-Ausschlussfärbung ermittelt wurde, ergab nach 18stündiger Inkubation mit Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  eine Wachstumshemmung von ungefähr 10 %. Darüber hinaus konnte gleichzeitig die Hemmung des COX-2-Proteins und die verminderte Synthese von  $\text{PGE}_2$  gezeigt werden, was einen COX-2-abhängigen Mechanismus vermuten lässt (**72**).

Demgegenüber stehen Ergebnisse von Grösch et al. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Effekte von Celecoxib auf die Überlebensrate, die Zellzyklusverteilung und die Apoptoseinduktion bei drei Kolonkarzinomzelllinien. Die Zelllinien unterschieden sich in ihrer Expression des COX-2-Enzyms. Celecoxib induzierte konzentrationsabhängig bei jeder Zelllinie einen Block der  $G_0/G_1$ -Zellzyklusphase und inhibierte somit den Übergang in die S-Phase. Externe Zugaben von  $\text{PGE}_2$  konnten diesen Zellzyklusblock nicht verhindern. Assoziiert war der Block mit einer abfallenden Expression der Zykline A, B1 und Kinase-1, die normalerweise eine Progression der verschiedenen Zellzyklusphasen erzeugen. Außerdem ergab sich ein Expressionsanstieg der den Zellzyklus hemmenden Proteine  $p21^{\text{Waf1}}$  und  $p27^{\text{Kip1}}$ . Schließlich konnte eine Induktion der Apoptose durch DNA-Fragmentierung und Spaltung des PARP-Proteins mit Nachweis des 29-kDa großen apoptotischen Fragmentes nach Celecoxibbehandlung gezeigt werden. Die Effekte waren unabhängig vom COX-2-Status der Zellen. Somit implizieren diese Ergebnisse, dass die antitumorösen Eigenschaften des Celecoxib von der selektiven COX-2-Hemmung unabhängig sind (**73**).

Andere Forschungsarbeiten analysierten die apoptotische Wirkung von Celecoxib in Prostatakarzinomzellen. Hinsichtlich der Zellvitalität, die mit der Trypanblau-Ausschlussfärbung bestimmt wurde, ergab die Behandlung der Zellen mit Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  nach drei bis vier Stunden eine nahezu 100 %ige Apoptoseinduktion. Celecoxib 10  $\mu\text{M}$  erreichte einen etwa 20 %igen Vitalitätsverlust der Zellen nach 4stündiger Inkubation. Dabei konnte gezeigt werden, dass Celecoxib die Phosphorylierung der antiapoptotischen Kinase Akt blockierte und dadurch die Apoptose einleitete. Die Überexpression von Akt konnte demgegenüber die Zellen vor einer Celecoxib induzierten Apoptose bewahren (**75**).

Um die Fähigkeit selektiver COX-2-Inhibitoren hinsichtlich einer Apoptoseinduktion zu demonstrieren, führten Song et al. eine Strukturaktivitätsanalyse des Celecoxibs durch. Sie arbeiteten mit der Prostatakarzinomzelllinie PC-3, aus der sie mittels Klonierungstechniken Zellklone gewannen, bei denen die Expression der COX-2 unterschiedlich stark ausgeprägt war oder sogar ausblieb. Die Strukturaktivitätsanalyse des Celecoxibs wurde in der Form durchgeführt, indem verschiedene Derivate des Inhibitors synthetisiert und deren apoptotische Aktivität über Zellkernfärbungen, ELISA-Messungen und Westernblotanalysen zur PARP-Proteinspaltung registriert wurden. Die Resultate zeigten, dass die Induktion der Apoptose durch die verschiedenen Celecoxibderivate unabhängig von deren Aktivität der COX-2-Inhibition war. Darüber hinaus war die Induktion der Apoptose der Zellen und Zellklone unabhängig vom Niveau der COX-2-Expression. Die Analysen zur Strukturaktivität von

Celecoxib ergaben keine Korrelation zwischen einer Apoptoseinduktion und einer COX-2-Inhibition. Einige Derivate, die keine COX-2-Inhibition vorwiesen, beförderten sogar die Apoptoseinduktion. Mit diesen Ergebnissen konnte eine Dissoziation zwischen der COX-2-Inhibition und der Apoptoseinduktion durch die strukturelle Modifikation des Celecoxibs nachgewiesen werden **(141)**.

Überträgt man all die aufgezeigten *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse, so würde dies bedeuten, dass Celecoxib durch die proliferationshemmende Wirkung die Osteogenese negativ beeinflusst. In diesem Zusammenhang wurden ebenfalls Untersuchungen publiziert.

Am Kaninchenmodell untersuchten Goodman et al. die Wirkungen des nicht selektiven COX-Inhibitors Naproxen sowie des selektiven COX-2-Inhibitors Rofecoxib auf die Osteoneogenese. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die orale Applikation von Rofecoxib zu einer Hemmung der Osteoneogenese führt und schlossen daraus, dass folglich auch die Frakturheilung verzögert sein könnte **(142)**. Endo et al. analysierten die Wirkung des COX-2-Inhibitors Etodolac bei Femurfrakturen von Ratten und konnten eine signifikant schlechtere Frakturheilung bezüglich der mechanischen Belastbarkeit zeigen **(143)**.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Induktion der Apoptose nach Celecoxibbehandlung lassen sich mit den erwähnten Forschungsarbeiten vergleichen. Dennoch bleibt ein endgültiger Mechanismus, der für die Apoptoseinduktion bei den humanen Osteoblasten verantwortlich gemacht werden kann, offen. In Hinblick auf die Indikation von Celecoxib als hochpotentes Analgetikum bei Frakturen oder postoperativen Schmerzzuständen würde die verstärkte Apoptoseinduktion oder Proliferationshemmung der Substanz für die untersuchten Konzentrationen den Knochenheilungsprozess sicherlich beeinträchtigen. Besonders die Frühphase einer Knochenverletzung ist hierbei bedeutsam, da zu diesem Zeitpunkt die bestmögliche Proliferation der primären Osteoblasten Voraussetzung für eine regelrechte Osteoneogenese ist. Da der proliferationshemmende Effekt von Celecoxib jedoch bei über den vom Hersteller empfohlenen Plasmaspiegeln auftritt, ist ein genereller Verzicht auf dieses Schmerzmittel für den klinischen Alltag aus den dargestellten Ergebnissen nicht herzuleiten **(130)**.

#### **5.4 Einfluss von Celecoxib auf die OPG-Expression humaner Osteoblasten**

OPG wird von Osteoblasten exprimiert. Es verhindert die Differenzierung, Aktivierung und das Überleben von Osteoklasten durch Bindung an RANKL. Durch die neutralisierende Wirkung hemmt OPG die RANKL-assoziierten knochenabbauenden Prozesse in entzündlichen Gelenkerkrankungen wie der RA oder bei der Osteoporose. Ein stabiles Verhältnis von OPG zu RANKL stellt dabei die Voraussetzung für einen ausgewogenen Knochenumsatz („Remodelling“) dar **(62)**. Die Therapie mit Immunsuppressiva wie Glukokortikoiden, Cyclosporin A oder Rapamycin vermindert die Expression von OPG, woraus eine verstärkte Knochenresorption mit konsekutiver Osteoporose resultiert **(45, 53, 54)**.

In der vorliegenden Arbeit wurde die OPG-mRNA-Expression von MG-63 Osteoblasten und phOB nach Applikation von Celecoxib bestimmt. Ferner wurde die OPG-Proteinsekretion der phOB aus den Zellkulturüberständen nach Celecoxibbehandlung ermittelt.

Auf mRNA-Ebene zeigte sich sowohl bei den phOB als auch bei den MG-63 Osteoblasten eine zeit- und konzentrationsabhängige Expressionsveränderung von OPG. Die Behandlung mit Celecoxib 10

$\mu\text{M}$  rief bei beiden Zellpopulationen keine deutlichen Effekte der OPG-Expression im angegebenen Inkubationszeitraum von 24 h hervor. Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  führte dagegen bei den MG-63 Osteoblasten zur 3,6fachen signifikanten ( $p < 0,001$ ) Reduzierung der OPG-mRNA-Expression nach 24 h. Bei den phOB konnte auch eine, wenngleich weniger ausgeprägte, nicht signifikante Abnahme (2,2fach) der OPG-mRNA-Expression nach 24 h beobachtet werden. Zwischen beiden Zellpopulationen bestanden nach statistischer Auswertung mit dem „Mann-Whitney-U-Test“ keine signifikanten Unterschiede. Somit reflektierten die MG-63 Osteoblasten ein adäquates Zellkulturmodell hinsichtlich der OPG-Expressionsuntersuchungen der phOB. Dennoch können die Ergebnisse nicht eins zu eins übertragen werden. In der Zeitkinetik gab es bei beiden Zellpopulationen unterschiedliche Entwicklungen. Diese Tatsache begründet sich sicherlich in den großen interindividuellen Differenzen der OPG-mRNA-Expressionen bei den phOB. Es fand sich bei den vier individuell verschiedenen Ausgangsmaterialien kein einheitliches Expressionsmuster der OPG-mRNA im untersuchten Inkubationszeitraum. Nach Zusammenführung der Einzelexperimente und Errechnung der Mittelwerte konnten jedoch ähnliche Ergebnisse wie bei den MG-63 Osteoblasten bezüglich der OPG-mRNA-Expression annähernd gefunden werden.

Die Ergebnisse zur OPG-Proteinsekretion spiegelten die Veränderungen auf Transkriptionsebene zeitversetzt wider. Die Behandlung mit Celecoxib 10  $\mu\text{M}$  ergab keine eindeutigen Effekte der OPG-Proteinsekretion im untersuchten Inkubationszeitraum. Bei den mit Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  behandelten phOB zeigte sich eine sukzessive Abnahme der OPG-Proteinsekretion, die nach 24 h um das ungefähr 1,6fache gegenüber der Negativkontrolle (DMSO) signifikant ( $p = 0,033$ ) vermindert war. Mit dem erweiterten Nachweis der OPG-Inhibition auf Proteinebene nach Behandlung der Osteoblasten mit Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  kann eine biologische Konsequenz aus dieser Veränderung abgeleitet werden. Demnach scheint Celecoxib die OPG-Expression vorrangig auf Transkriptionsebene zu regulieren und die Protein *de novo* Synthese über diesen Mechanismus zu hemmen. Es kommt zur Beeinträchtigung des Translationsvorganges, was konsekutiv zu einer verminderten Sekretion des OPG-Proteins führt. In der vorliegenden Arbeit diente das Glukokortikoid Dexamethason  $10^{-8}$  M als Positivkontrolle. Die gewonnenen Ergebnisse sollten mit denen von Hofbauer et al. zunächst überprüft werden. Methodisch wurden annähernd die gleichen Zellkulturbedingungen gewählt. Die Analyse der Genexpressionen für OPG nach Dexamethasonbehandlung erfolgte in dieser Arbeitsgruppe jedoch semiquantitativ auf einem Elektrophoresegel und nicht über die relative Quantifizierung im Lightcycler. An einer humanen fötalen Osteoblastenzelllinie (hFOB) zeigten sie, dass Dexamethason  $10^{-8}$  M nach 6- bis 24stündiger Inkubation die Expression der OPG-mRNA um 70 - 90 % reduzierte. Bei der MG-63 Zelllinie ermittelten sie eine Hemmung der OPG-mRNA-Expression um 70 % nach 24 h Inkubation. Diese Daten stimmen mit denen in dieser Arbeit nahezu überein. Die OPG-mRNA-Expression der MG-63 Osteoblasten nahm nach 24stündiger Dexamethasonbehandlung um 73 % ab. Bei den phOB ergab sich jedoch aufgrund der beträchtlichen interindividuellen Unterschiede eine nur 55 %ige Abnahme der OPG-mRNA-Expression. Hofbauer et al. konnten die Verminderung der OPG-Expression auch auf Proteinebene bestätigen. Nach 24stündiger Inkubation der hFOB mit Dexamethason  $10^{-8}$  M ergab sich eine Inhibition der OPG-Proteinsekretion um 88 %. Die in der vorliegenden Arbeit errechneten Daten zur OPG-Proteinsekretion der phOB nach Behandlung mit

Dexamethason  $10^{-8}$  M zeigen auch eine Abnahme von OPG nach 24 h, allerdings nur um 16 %. Wiederum gab es große interindividuelle Differenzen.

Grund für die nur entfernt übereinstimmenden Ergebnisse zur Proteinsekretion ist, dass es sich um zwei unterschiedliche Zellpopulationen handelt (phOB versus hFOB). Ein abnehmender Trend der OPG-Proteinsekretion nach Behandlung mit Dexamethason  $10^{-8}$  M ist für die phOB dennoch erkennbar.

Vergleicht man die Ergebnisse von Hofbauer et al. mit denen dieser Arbeit, so lassen sich Übereinstimmungen bezüglich der OPG-mRNA-Expression finden. Diese bestätigen das etablierte Zellkulturmodell dieser Arbeit als ein repräsentatives *in vitro* System. Die Ergebnisse der Celecoxibwirkungen auf die OPG-Expression erhalten somit einen verstärkten Rückhalt.

Zusätzlich zur Messung von OPG untersuchten Hofbauer et al. auch die RANKL-mRNA-Expression nach Dexamethasonbehandlung. Sie verzeichneten einen Dexamethason-induzierten starken Expressionsanstieg von RANKL und eine 20- bis 40fache RANKL/OPG-Ratio. Durch dieses Ungleichgewicht kommt es *in vivo* zur verstärkten Knochenresorption mit klinischer Ausprägung einer Glukokortikoid-induzierten-Osteoporose.

Da in der vorliegenden Arbeit die RANKL-mRNA-Expressionen jedoch nicht gemessen wurden, lässt sich die Bedeutung der OPG-Expressionsabnahme nach Celecoxib 50  $\mu$ M Behandlung nur begrenzt einschätzen. Aus den gewonnenen Ergebnissen ließe sich vermuten, dass Celecoxib in hohen Konzentrationen die Osteoklastogenese durch die Abnahme der OPG-Expression verstärkt. Somit käme es, wie bei der Dexamethasonbehandlung, zu einer gesteigerten Knochenresorption mit resultierender Osteoporose. Die eindrücklichen Effekte des OPG konnten *in vivo* gezeigt werden, indem das OPG-Gen bei Mäusen ausgeschaltet wurde. Jedes der Tiere entwickelte eine charakteristische Osteoporose mit Knochendichteschwund und hoher Frakturinzidenz **(63)**.

Die Untersuchungen zur OPG-Expression wurden einheitlich an unstimulierten Osteoblasten durchgeführt. In der einschlägigen Literatur konnten nur Daten von stimulierten Zellen gefunden werden, bei denen das OPG/RANK/RANKL-System mit dem Arachidonsäurestoffwechsel in Verbindung gebracht wurde.

Okada et al. berichteten, dass die Expression der COX-2 mit assoziierter Prostaglandinsynthese für eine maximale Knochenresorption notwendig ist, welche ihrerseits durch Vitamin D und PTH hervorgerufen wird. Die Prostaglandine bewirken diesbezüglich eine verstärkte Osteoklastenformation durch die Induktion der RANKL-Expression in Osteoblasten. Experimentell beobachteten sie, dass Mäuse, bei denen beide Allele für die COX-2 ausgeschaltet wurden (COX-2  $-/-$  Mäuse), eine um 60 - 70 % reduzierte Osteoklastenformation gegenüber dem Wildtyp (COX-2  $+/+$  Mäuse) zeigten. Zuvor war die Osteoklastogenese mit Vitamin D und PTH stimuliert worden. Ferner ergab sich eine ausgeprägte Abnahme der PGE<sub>2</sub>-Produktion bei den COX-2  $-/-$  Mäusen. Die herabgesetzte Osteoklastenformation der COX-2  $-/-$  Mäuse war mit einer verminderten Expression von RANKL verbunden, welche durch Applikation von PGE<sub>2</sub> jedoch wieder anstieg. Konsistente Unterschiede der OPG-Expression gab es weder bei den COX-2  $-/-$  Mäusen noch beim Wildtyp. Nachdem die COX-2  $+/+$  Mäuse mit Indomethacin oder dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 behandelt wurden, spiegelten sie die Ergebnisse der reduzierten Osteoklastenformation der COX-2  $-/-$  Mäuse wider **(36)**.



Die Arbeitsgruppe um Liu et al. untersuchte an der Osteoblastenzelllinie MC3T3 und der Makrophagen/Monozyten-Zelllinie RAW 264.7 (Osteoklastenvorläuferzellen) den Einfluss von IL-6 und PGE<sub>2</sub> auf das OPG/RANK/RANKL-System. In Kokulturrexperimenten fanden sie heraus, dass COX-2 und PGE<sub>2</sub> die Osteoklastogenese durch Inhibition der OPG-Genexpression und OPG-Proteinsekretion über die Vermittlung von IL-6 verstärkten. Die Applikation von NS-398 hob im Gegensatz dazu die IL-6- und PGE<sub>2</sub>-induzierten Effekte wieder auf und stimulierte dadurch die OPG-Expression. Sie resümierten, dass selektiven COX-2-Inhibitoren in der Behandlung der RA oder Osteoporose durch den gezeigten Rückgang der Osteoklastogenese über die Hemmung von PGE<sub>2</sub> und IL-6 ein besonderer Stellenwert zukäme **(144)**.

Ferner existieren Untersuchungen zur Peridontitis, die auch eine entzündliche Erkrankung darstellt und häufig zur Zerstörung des Alveolarknochens führt. Sie wird durch verschiedene Bakterien in subgingivalen Plaques verursacht. Choi et al. erforschten, wie diese Bakterien die Osteoklastogenese induzieren. Es zeigte sich eine verstärkte Expression von RANKL und PGE<sub>2</sub> bei gleichzeitig reduzierter OPG-Expression in den Osteoblasten und eine Induktion der Osteoklastogenese in der Kokultur nach der Färbung mit TRAP. Durch Zugabe von rekombinantem OPG konnte die Osteoklastogenese gehemmt werden. Ebenfalls ergab sich nach Behandlung der Zellkultur mit Indomethacin eine Abnahme der Osteoklastenformation um 88 % sowie die Hemmung der RANKL-Expression um 60 - 80 %. Indomethacin konnte darüber hinaus auch die entstandene Negativbilanz der OPG-Expression umkehren. Diese Arbeit bestätigt wiederum die Verbindung des OPG/RANK/RANKL-Systems mit dem Arachidonsäurestoffwechsel, bei welchem eine PGE<sub>2</sub>-abhängige Kaskade zur Induktion der Osteoklastogenese über eine veränderte RANKL/OPG-Ratio führt **(145)**.

Entzündungsreaktionen des Knochens finden auch bei endoprothetischen Gelenksimplantaten zwischen der Knochenoberfläche und dem anliegenden Implantat statt. Wei et al. zeigten bei Fibroblasten, welche sie *in vitro* mit Titaniumpartikeln inkubierten, eine verstärkte Osteoklastogenese. Es kam innerhalb einer Stunde zur Induktion der COX-2 auf Protein- und mRNA-Ebene mit konsekutiv erhöhter PGE<sub>2</sub>-Sekretion und ansteigender RANKL-Expression. Die Veränderung der PGE<sub>2</sub>-Sekretion wurde über den EP4-Rezeptor- und den Proteinkinase A (PKA)-Signalweg erreicht. Nach Applikation von Celecoxib 10 µM nahm die RANKL-stimulierte Expression deutlich ab. Dies beweist wiederum die antiinflammatorischen Eigenschaften selektiver COX-2-Inhibitoren und deren Einflussnahme auf die Balance des OPG/RANK/RANKL-Systems **(146)**.

Einen Anstieg der RANKL/OPG-Ratio in humanen endothelialen Zellen beobachteten auch Collin-Osdoby et al. nach Setzen eines inflammatorischen Stimulus mit TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\alpha$ . Die RANKL/OPG-Ratio stieg an, weil die OPG-Expression abnahm. In der gleichen Studie zeigten Experimente an humanen Knochenmarkszellen, die mit Vitamin D und PTH inkubiert wurden, ein reziprokes Expressionsmuster mit einem initialen OPG-Anstieg, nachfolgender OPG-Abnahme und verzögerter RANKL-Expressionszunahme. Im Gegensatz dazu ergaben sich für die endothelialen Zellen, die ebenfalls mit beiden Substanzen behandelt wurden, keine Veränderungen der Expressionsmuster für OPG und RANKL **(52)**.

Die genannten Forschungsarbeiten lassen vermuten, dass zur Beeinflussung des OPG/RANK/RANKL-Systems verschiedene Stimuli notwendig sind, um dieses mit dem

Arachidonsäurestoffwechsel zu assoziieren. Auch scheinen die Expressionsmuster nach diesen Stimuli für die verschiedenen Zelltypen individuell zu sein und die Regulierung der Expressionen per se über unterschiedliche Mechanismen abzulaufen.

Der in dieser Arbeit erfasste Abfall der OPG-Expression nach Behandlung mit Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  zeigt mit den aufgeführten Arbeiten jedoch keine Übereinstimmung, was einerseits sicherlich in den unterschiedlich verwendeten Methoden begründet liegt. Es wurde mit unstimulierten, in Monokultur befindlichen, Osteoblasten gearbeitet. Weiterhin blieb der Nachweis regulativer Schlüsselenzyme und deren Syntheseprodukte (COX-2; PGE<sub>2</sub>) nach Celecoxibbehandlung aus. Die notwendige Verbindung des OPG/RANK/RANKL-Systems mit dem Arachidonsäurestoffwechsel lässt sich mit den gewonnenen Ergebnissen nicht hinreichend beweisen. Demnach bedarf es breiterer Erklärungsansätze, welche die verringerte OPG-Expression begründen könnten.

Interessanterweise scheint Celecoxib in hohen Dosen (50  $\mu\text{M}$ ) sein antiinflammatorisches Potential durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B zu verlieren. Niederberger et al. wiesen in mit Zymosan-induzierten Gelenkentzündungen der Ratte nach, dass durch Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder auch die COX-2 verstärkt exprimiert werden. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in der Zellkultur. Die Hochregulierung der erwähnten Zytokine könnte somit pathophysiologische Vorgänge, wie sie bei der RA bestehen, unterstützen. Die inflammatorischen Prozesse an der Synovialmembran wären wahrscheinlich intensiver und würden zu einer beschleunigten Destruktion von Knorpel und darunter liegendem Knochen führen (**134**).

In diesem Zusammenhang würde sich auch die verminderte OPG-Expression aus den Ergebnissen der gegenwärtigen Arbeit einreihen lassen. Die Knochenresorption wäre somit nicht nur durch die verstärkte Inflammation vorangetrieben, ferner käme es durch die verminderten OPG-Expressionen zu einer gesteigerten Differenzierung von Osteoklasten und zur Aktivierung der Osteoklastogenese (**62, 81, 82**).

Betrachtet man Patienten mit RA, die schmerztherapeutisch mit Celecoxib behandelt werden, so könnte der Wirkstoff, unter der Annahme der verringerten Expression des osteoklasteninhibitorischen Rezeptors OPG, eine Progression der Erkrankung bewirken. Voraussetzung dafür wären jedoch erreichte Celecoxib-Plasmakonzentrationen von 50  $\mu\text{M}$ . Bei einer Celecoxibkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ , die wohl eher die klinischen Verhältnisse reflektiert, konnten keine Effekte bezüglich der OPG-Expression beobachtet werden (**130**). Demnach bestünde auch keine Kontraindikation für Celecoxib in der Schmerztherapie der RA.

Neben den OPG-Wirkungen im Prozess des Knochenremodellings existieren Hinweise, dass OPG bestimmte Zytokine der TNF-Familie wie TNF- $\alpha$  oder TRAIL bindet und deren Aktivität hemmt (**147**). TRAIL selbst agiert durch Bindung an die Rezeptoren DR4 und DR5, welche zytoplasmatische Todesdomänen enthalten. Dadurch wird die Aktivität von Kaspase-Kaskaden induziert und die Apoptose der Zelle eingeleitet (**148**). Verschiedene Rezeptoren, wie DcR1, DcR2 und auch OPG, binden an TRAIL und bewirken infolgedessen eine Inaktivierung der Apoptosekaskade. *In vitro* Untersuchungen an Brust- und Prostatakrebszellen ergaben, dass diese suffiziente Mengen an OPG produzierten, um sich vor einer TRAIL-induzierten Apoptose zu schützen. Der antiapoptotische Effekt des OPG konnte durch die Zugabe von RANKL aufgehoben werden (**149**). Neville-Webbe et al.

zeigten an der MG-63 Zelllinie, dass die Zellen durch Produktion hoher OPG- Konzentrationen die TRAIL-induzierte Apoptose inhibierten und somit ihr Überleben sicherten. Nach der Elimination von OPG mittels spezifischer Antikörper kehrten sich die Effekte um und die Zellen gingen vermehrt in Apoptose über **(150)**.

Fügt man die Ergebnisse zur Zellvitalität mit denen der OPG-Expressionen nach Celecoxibapplikation aus der vorliegenden Arbeit zusammen, wäre es möglich, dass Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  durch die bewirkte OPG-Expressionsabnahme die erhöhte Apoptoserate der MG-63 Zellen über einen TRAIL-abhängigen Mechanismus erreicht hat. Die schwächer ausgeprägte Apoptoserate der Zellen und die nicht erkennbaren Effekte der OPG-Expression nach Behandlung mit Celecoxib 10  $\mu\text{M}$  würden diese Annahme hinreichend unterstützen. Celecoxib hätte demnach über die OPG-Veränderungen die Zellvitalität reguliert. Die Anwendung selektiver COX-2-Inhibitoren in der Therapie des Kolonkarzinoms, bei der es zur Apoptoseinduktion der Krebszellen kommt, ließe sich auch ergänzend über eine Abnahme der OPG-Expression und nachfolgender TRAIL-Induktion erklären **(71-75, 140, 141)**.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit zeigten Hu et al., dass Celecoxib bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  die Translokation des Glukokortikoidrezeptors in den Zellkern neuronaler PC12-Zellen verstärkt und dadurch einen Anstieg der Rezeptor-vermittelten Genexpression erreicht. Die Signalkaskade erfolgte über die Inhibition der Kinasen p38/MAPK und war zusätzlich mit der spezifischen Hemmung der COX-2 assoziiert. Nach Behandlung der Zellen mit dem Glukokortikoidrezeptorantagonisten RU486 (40  $\mu\text{M}$ ) konnten die Celecoxibwirkungen auf den Glukokortikoidrezeptor aufgehoben werden **(151)**.

In der vorliegenden Arbeit ergab die Behandlung der Osteoblasten mit der Positivkontrolle Dexamethason zum Zeitpunkt von 24 h ähnliche Effekte in der OPG-Regulation wie nach der Applikation von Celecoxib 50  $\mu\text{M}$ . Leider konnten in der aktuellen Literatur keine Arbeiten zur Wirkung von Glukokortikoidrezeptoren auf die OPG-Expression gefunden werden. Allein aus der Annahme, dass Dexamethason den Rückgang der OPG-Expression durch Bindung an den entsprechenden Glukokortikoidrezeptor mit nachgeschalteter Signalkaskade realisiert und Celecoxib *per se* auch die Funktion des Glukokortikoidrezeptor aktiviert, ergibt sich ein gemeinsamer Erklärungsmechanismus für die gleichartigen Substanzwirkungen im untersuchten Zellsystem.

Gu et al. fanden in der Kultur primärer muriner Osteozyten heraus, dass Dexamethason durch Bindung an den Glukokortikoidrezeptor die Apoptose der Zellen induzierte. Die Behandlung der Osteozyten mit RU486 konnte diese Effekte unterdrücken. Demnach wurde der Mechanismus über den Glukokortikoidrezeptor für die Apoptoseinduktion verantwortlich gemacht **(152)**.

Begründet man die Ergebnisse der Zellvitalität mit diesen Fakten, ließe sich die Celecoxib-induzierte Apoptose der MG-63 Osteoblasten durch eine verstärkte Glukokortikoidrezeptorexpression erklären. Dieser Zusammenhang wäre denkbar. Ob die Expressionsveränderungen von OPG nach Celecoxibbehandlung allerdings auch in diese Überlegungen integriert werden können, werden Untersuchungen weiterführender Forschungsarbeiten erbringen müssen.

Die gewonnen Ergebnisse zur OPG-Expression nach Celecoxibapplikation an unstimulierten Osteoblasten können durch verschiedene Signalwege erklärt werden, wenngleich der Nachweis

wichtiger Zwischenmoleküle zur Aufklärung dieser Zusammenhänge notwendig ist. Anhand der gewonnenen Ergebnisse, die mit der aktuellen Literatur diskutiert wurden, scheint eine Verknüpfung des Arachidonsäurestoffwechsels mit dem OPG/RANK/RANKL-System für das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Zellkulturmodell jedoch fraglich.

### **5.5 Einfluss von Celecoxib auf den Energiemetabolismus humaner Osteoblasten**

Zur Bestimmung der Atmungsrate wurde der Sauerstoffverbrauch bei den MG-63 Osteoblasten mit der Clark-Elektrode gemessen. Nach Zugabe von Celecoxib 10  $\mu\text{M}$  zeigten die Zellen bis zum Messzeitpunkt von einer Stunde keine Veränderungen des Sauerstoffverbrauches. Nach 24 h ergab sich jedoch eine etwa 20 %ige Erhöhung der zellulären Atmung.

Nach Applikation von Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  kam es zur sofortigen signifikanten ( $p = 0,031$ ) Steigerung des Sauerstoffverbrauches der MG-63 Osteoblasten um circa 21 %. Dieser Effekt zeigte sich nach 1 h noch deutlicher und erreichte eine um 30,3 % signifikant ( $p = 0,031$ ) verstärkte Atmung. Nach 24 h war mit  $35,81 \pm 3,09 \text{ nmol O}_2/\text{min}/10^7$  Zellen eine etwa 32 %ige signifikante ( $p = 0,008$ ) Steigerung des Sauerstoffverbrauches erreicht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Celecoxib eine zeit- und konzentrationsabhängige Veränderung des Sauerstoffverbrauches erwirkte.

Der Theorie folgend, dass Celecoxib die Erhöhung des Sauerstoffverbrauches durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung erreicht, schlossen sich weiterführende Untersuchungen mit dem Entkoppler FCCP an **(114, 116)**. Diese führten zu der Aussage, dass Celecoxib und FCCP hinsichtlich einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung offenbar gleichartig wirken. FCCP konnte den Sauerstoffverbrauch ohne Anwesenheit von Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  um etwa 75 % durch Entkopplung steigern. Wurden die Zellen jedoch erst mit Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  und anschließend mit FCCP inkubiert, erreichte FCCP nur noch eine circa 53 %ige Erhöhung des Sauerstoffverbrauches durch Entkopplung. Nach Veränderung der Reihenfolge der FCCP- und Celecoxibapplikation auf die MG-63 Zellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  konnte den Sauerstoffverbrauch um etwa 27 % steigern. Wurden die Zellen jedoch erst mit FCCP und anschließend mit Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  inkubiert, erreichte Celecoxib 50  $\mu\text{M}$  nur noch eine circa 18 %ige Erhöhung des Sauerstoffverbrauches durch Entkopplung.

Neben der bekannten Hemmung der Cyclooxygenase konnten viele Forschergruppen während der letzten Jahre zeigen, dass NSAIDs potentielle Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung sind **(116, 153-161)**. Die folgenden aufgeführten Studien zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung waren fast ausschließlich Untersuchungen an isolierten Mitochondrien von Rattenzellen, was sich gegenüber den Experimenten dieser Arbeit unterscheidet. Einerseits wurde mit einer humanen Osteosarkomzelllinie gearbeitet und andererseits erfolgte keine separate Isolierung der Mitochondrien für die Messungen des Sauerstoffverbrauches.

Untersuchungen zur Wirkungsweise des nichtselektiven COX-Inhibitors Diclofenac demonstrierten, dass dieser bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  den Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien um etwa 58% erhöhte. Außerdem wurden spektrophotometrische Analysen mit Safranin, welches an

energiereiche Mitochondrien bindet, durchgeführt. Nach Diclofenacapplikation ergab sich hierbei eine Verschiebung der Bindungsverhältnisse für Safranin, was mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials gleichgesetzt wurde. Dieser Zusammenbruch ist unter anderem für die Wirkungsweise von Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung charakteristisch. Somit stellt Diclofenac einen potentiellen Entkoppler der Atmungskette dar **(160)**.

Ergänzend zu diesen Ergebnissen führten Somasundaram et al. elektronenmikroskopische Untersuchungen an Mitochondrien von Leberzellen der Ratte durch, die zuvor für eine Stunde mit Indomethacin oder DNP behandelt wurden. Die Tatsache, dass die Mitochondrien ein balloniertes und vakuolisiertes Bild nach jeweils beiden Substanzapplikationen zeigten, spricht wiederum für eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Weiterhin stieg auch die Respirationsrate der Zellorganellen konzentrationsabhängig an **(161)**.

Isolierte Mitochondrien aus Thymozyten der Ratte, die mit SC-236, einem Vorläufermolekül des Celecoxib, behandelt wurden, steigerten die Atmungsrate um etwa 370 %. Die eingesetzte Wirkstoffkonzentration war dabei 300  $\mu\text{M}$  **(116)**. SC-236 und Celecoxib sind aus pharmakologischer Perspektive sehr verwandte Wirkstoffe. Da die Plasmahalbwertszeit von SC-236 zu groß war, wurde die Weiterentwicklung dieses Moleküls gestoppt. Chemisch unterscheiden sich SC-236 und Celecoxib nur durch den Substituenten an Position 4 des Phenylrings. Bei Celecoxib bindet an dieser Position eine Methylgruppe, bei SC-236 ein Chloratom.

Insgesamt stellte SC-236 bei den Untersuchungen von Krause et al. einen stärkeren Entkoppler als Diclofenac und Indomethacin dar, deren Wirkungen auf den Sauerstoffverbrauch als Vertreter der nichtselektiven COX-Inhibitoren ebenfalls analysiert wurden **(116)**.

Im induzierten Arthritismodell der Ratte ergab die Applikation des selektiven COX-2-Inhibitors Nimesulid auch eine erhöhte Atmungsaktivität der Mitochondrien durch den Nachweis einer Entkopplung **(154)**.

Neben den Experimenten an Mitochondrien von Leberzellen der Ratte untersuchte die Arbeitsgruppe um Jacob et al. auch humane Mitochondrien. Diese wurden mit Indomethacin behandelt, welches bei niedrig eingesetzten Konzentrationen zur Entkopplung der Atmungskette, jedoch bei hohen Konzentrationen zur Inhibition der Atmung führte. Durch Vergleich mit dem Entkoppler DNP konnten diese Unterschiede sichtbar gemacht werden **(157)**.

Weiterhin konnten Mahmud et al. einen Nachweis zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung nach Applikation konventioneller NSAIDs in Leberzellen der Ratte erbringen. Allerdings blieben bei Flurbiprofen, Nabumeton (ein nichtsaures antiinflammatorisches Vorläufermolekül mit unspezifischer COX-Selektivität) und nichtsauren hochselektiven COX-2-Inhibitoren, denen ein besseres gastrointestinales Sicherheitsprofil zugeschrieben wird, die Entkopplungsmechanismen aus. Die Autoren machten das Ausbleiben der Entkopplung für das Fehlen der negativ geladenen ionisierten Gruppen bei den erwähnten Substanzen verantwortlich **(158)**.

Tribble et al. publizierten ähnliche Ergebnisse. Auch sie zeigten, dass die mitochondriale oxidative Phosphorylierung in Rattenzellen nach Zugabe von Celecoxib nicht entkoppelt werden konnte. Für Indomethacin wurde eine Entkopplung sowohl *in vitro* (mitochondriale Respirationsbestimmung) als auch *in vivo* (elektronenmikroskopische Untersuchung der Mitochondrien) nachgewiesen **(159)**.

Betrachtet man den Einfluss von Entkopplern wie FCCP oder DNP auf den zellulären ATP-Umsatz, so bewirken diese Substanzen durch Verminderung bzw. Zusammenbruch des elektrochemischen Potentials in der inneren Mitochondrienmembran eine Reduktion bzw. ein Ende der ATP-Bildung. Nicht nur die ATP-Bildung selbst wird gestoppt, sondern ATP wird nun auch durch die mitochondriale ATP-Synthase ( $F_1/F_0$ -ATPase) hydrolysiert. Es resultieren neben der Abnahme des ATP/ADP-Quotienten auch Inhibitionen ATP-abhängiger Prozesse. Die  $Na^+K^+$ -ATPase, die bedeutsam für die Aufrechterhaltung der  $Na^+$ -Konzentration über der Plasmamembran ist, wird gehemmt. Somit kommt es zum Anstieg der intrazellulären  $Na^+$  Konzentration und zur Depolarisation der Plasmamembran **(114, 162, 163)**.

*In vitro* Forschungsarbeiten mit den NSAIDs Indomethacin, Piroxicam oder Diclofenac konnten neben dem Nachweis einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung auch die Hemmung der ATP-Synthese, den Zusammenbruch des Membranpotentials sowie eine Hemmung der ATPase-Aktivität in Mitochondrien zeigen **(116, 153, 156, 157)**.

In der vorliegenden Arbeit wurde keine ATP-Messung an den inkubierten Zellen vorgenommen. Aufgrund der erwähnten Publikationen und unter Berücksichtigung des Entkopplungseffektes von Celecoxib kann ebenfalls eine Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthese nicht ausgeschlossen werden.

Demgegenüber wird durch das Einschalten der Glykolyse der ATP-Verlust partiell kompensiert, der bei Entkopplung der Atmungskette entsteht. Die Glykolyse, die mit einem verstärkten Glukosetransport assoziiert ist, stellt nun den energieliefernden Stoffwechselweg für die Zellen dar. Folglich wird die ATP-Homöostase vom Glukosetransport abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die Entkoppler CCCP und DNP den Glukosetransport durch die verstärkte Expression der GLUT-1-mRNA stimulierten **(103, 164, 165)**. Mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit zur GLUT-1-mRNA-Expression können diese Untersuchungen bestätigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergeben, dass die GLUT-1-mRNA-Expression in MG-63 Osteoblasten durch Celecoxib dosis- und zeitabhängig stimuliert wurde. Celecoxib 10  $\mu$ M konnte die Expression der GLUT-1-mRNA nach 24 h um das circa 2fache steigern, wogegen die Inkubation der Zellen mit Celecoxib 50  $\mu$ M eine etwa 25fache signifikante ( $p = 0,03$ ) Expressionserhöhung der GLUT-1-mRNA nach 24 h zeigte.

Die Expression des Glukosetransporters GLUT-1 scheint für die basale Glukoseaufnahme in allen Geweben ubiquitär vorzukommen **(99)**. Jedoch wurden bislang nur wenige Untersuchungen zur Expression der GLUT-1-mRNA in Osteoblasten durchgeführt. Die Arbeitsgruppe um Koike et al. konnte zwar die Expression der GLUT-1-mRNA und des GLUT-1-Proteins in Osteoblasten nachweisen, doch lagen diese Werte beim Vergleich mit Zementoblasten (Zellschicht, die die Außenseite des Dentins von der Zahnwurzel bis zum Zahnhals überzieht) weit unter deren Expressionslevel. Erwähnenswert ist aber, dass sie nicht die Regulation der GLUT-1-mRNA nach Substanzengabe erfassten, sondern die Expressionsveränderungen während der Zelldifferenzierung beobachteten **(166)**.

Bei „Clone 9“-Zellen, einer nicht transformierten Zelllinie der Ratte, konnte nach Zugabe von Azid (Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung) ein 6- bis 10facher Anstieg des Glukosetransportes

innerhalb einer ein- bis zweistündigen Inkubation nachgewiesen werden. Man nahm dabei an, dass GLUT-1-Moleküle unter basalen Bedingungen in der Plasmamembran an Proteine gebunden vorliegen. Diese Proteine maskieren den GLUT-1-Transporter und machen ihn somit inaktiv. Durch die Anwesenheit des Entkopplers resultiert die Dissoziation der gebundenen Proteine vom Transporter und dieser Vorgang führt zur Aktivierung von GLUT-1 **(165)**. Im Gegensatz dazu fanden Harvey et al. keinen Effekt auf die Expression der GLUT-1-mRNA nach Inkubation boviner Blastozysten mit DNP **(167)**.

Weitere Untersuchungen an Leberzellen der Ratte zeigten, dass nach Diclofenac- oder Aspirinzugabe sowohl die Glykogenolyse als auch die Glykolyse stimuliert werden konnten. Gleichzeitig wurde die Glukoneogenese inhibiert. Zusätzlich erfolgten Messungen der Respirationsraten und des Membranpotentials der Zellen. Es kam dabei zu einer starken Zunahme des Sauerstoffverbrauches und zu einem simultanen Abfall des Membranpotentials. Die Stimulation von Glykogenolyse und Glykolyse und dem daraus folgenden Anstieg der Glukosekonzentration wurde demnach einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung durch beide NSAIDs zugeschrieben **(155)**.

Der Vollständigkeit halber sollen die Ergebnisse zur GLUT-1-mRNA-Expression nach Dexamethasonapplikation ebenfalls erwähnt werden. Dexamethason bewirkte in der vorliegenden Arbeit eine etwa 2fache Steigerung der GLUT-1-mRNA-Expression nach 24stündiger Inkubation.

Es ist bekannt, dass Kortikosteroide den Glukosemetabolismus durch Induktion der Insulinresistenz verändern. Untersuchungen an der Osteosarkomzelllinie UMR 106-01 zeigten, dass Dexamethason unter basalen Bedingungen keinen Effekt auf die GLUT-1-mRNA-Expression hatte. Die Substanz stimulierte dagegen die GLUT-1-mRNA-Expression und die GLUT-1-Proteinsekretion nach Behandlung der Zellen mit Insulin durch erhöhte Expression der Insulinrezeptoren. Nach subzellulärer Fraktionierung und Analyse der Fragmente mittels Westernblot ergab sich jedoch eine Umverteilung des Transporters GLUT-1 von der Plasmamembran in intrazelluläre Mikrosomen. Effektiv resultierte somit ein Rückgang der an die Plasmamembran gebundenen GLUT-1-Transporter um 21 %. Demnach schien Dexamethason den basalen Glukosetransport zwar nicht zu verändern, indessen aber durch verstärkte Expression des Insulinrezeptors posttranslational zu schwächen **(168)**.

Zu diesen Resultaten lassen sich mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit keine Aussagen treffen. Da ferner der Nachweis von GLUT-1-Proteinfragmenten ausblieb, kann auch kein Aufschluss über eine posttranslationale Modifikation von GLUT-1 nach Dexamethasonbehandlung erbracht werden.

Die Annahme, dass Dexamethason ebenfalls über den Weg einer Entkopplung der Atmungskette die GLUT-1-mRNA-Expression erhöhe, ist unwahrscheinlich und findet in der aktuellen Literatur bisher keinerlei bestätigende Hinweise. Eher könnte die katabole Wirkung der Glukokortikoide, die auch beim Überstehen längerer Hungerperioden ihre biologische Bedeutung hat, für die erhöhte Expression des Glukosetransporters verantwortlich sein. In extrahepatischen Geweben kommt es demnach zur Stimulation der Proteolyse und gleichzeitig zur Inhibition der Proteinbiosynthese. Die entstehenden Aminosäuren werden in der Leber für die Glukoneogenese genutzt, welche zu einer verstärkten Belastung des Organismus mit Glukose führt (Steroiddiabetes). Schließlich werden Glukosetransporter wie GLUT-1 oder GLUT-4 durch Insulinwirkung verstärkt exprimiert und in die

Plasmamembran eingebaut, um die Glukose für eine anschließende Metabolisierung aufzunehmen **(114)**.

Im untersuchten Modell wäre ein derartiger Mechanismus der GLUT-1-mRNA-Expressionszunahme durch die Wirkung von Dexamethason denkbar.

Die Regulation der GLUT-1-mRNA Expression erfolgt unter anderem über die PI3K-Signalkaskade. Für T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Kostimulation mit CD28 über die PI3K- und Akt-Signalkaskade die Glukoseaufnahme und glykolytische Aktivität zur Aufrechterhaltung des ATP/ADP-Verhältnisses steigerte **(169, 170)**. Über diesen Weg der Immunantwort scheint die CD28 Kostimulation wichtig für den energetischen Ausnahmezustand der Zellen zu sein, der auch im Falle einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung vorherrscht. Die Arbeitsgruppe um Pelletier et al. demonstrierte nach DNP-Inkubation adulter Kardiomyozyten eine Zunahme der Adenosin aktivierten Proteinkinase (AMPK) und eine p38/MAPK-Phosphorylierung, die mit einem 2,3fachen Anstieg der Glukoseaufnahme assoziiert war **(171)**. Dieser Regulationsweg scheint demnach auch in den GLUT-1-mRNA-Expressionsmechanismus nach Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung involviert zu sein.

Darüber hinaus sind Entkoppler auch in der Lage, eine Hypoxie nachzuahmen und erreichen sowohl durch die verstärkte Transkription der GLUT-1-mRNA als auch durch dessen Stabilisierung einen verstärkten Glukosetransport. Bezüglich transkriptionaler Vorgänge erhöht ein 6 kbp großes DNA-Fragment in der Promotorregion des GLUT-1-Gens die Stimulation der GLUT-1-Transkription über einen dualen Mechanismus. Einerseits erfolgt die erhöhte Transkription von GLUT-1 durch eine abfallende Sauerstoffkonzentration und andererseits durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Auch posttranskriptional kommt es zur Verlängerung der Halbwertszeit der GLUT-1-mRNA unter Hypoxie oder nach Entkopplung der Atmungskette **(103, 172, 173)**.

Um den Status einer Hypoxie während der untersuchten Inkubationsperiode nachzuweisen, der zum einen durch die Substanzengabe (im o.g. Sinne nachgeahmte Hypoxie) und zum anderen durch die bereits beschriebene Multilayerformation der Zellen entstehen könnte, wurde HIF-1 $\alpha$  aus den Proteinzelllysaten bestimmt. Dexamethason und Celecoxib verursachten weder zu Beginn noch nach 24stündiger Inkubation die Expression von HIF-1 $\alpha$  bei den MG-63 Osteoblasten. Diese Tatsache lässt die Schlussfolgerung zu, dass unter den Inkubationsbedingungen keine hypoxischen Verhältnisse bestanden und der Sauerstoffgehalt des Mediums nicht weniger als 5 % betrug. HIF-1 $\alpha$  wurde daher offenbar durch proteasomale Degradation über den Ubiquitinweg abgebaut **(108)**.

Untersuchungen von Yu et al. ergaben jedoch, dass HIF-1 $\alpha$  in reoxygenierten Bronchialepithelzellen von Frettchen, die zuvor unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, in weniger als einer Minute degradiert wurde. Darüber hinaus wurde die HIF-1 $\alpha$ -Expression unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen exploriert. Auch hier zeigte sich eine sensitive Stabilisierung (Sauerstoffgehalt des Mediums < 4 %) oder Degradation (Sauerstoffgehalt des Mediums > 7 %) von HIF-1 $\alpha$  **(174)**.

Berücksichtigt man die Zeit zwischen der Trypsinierung der Zellen bis zur Gewinnung der Proteinzelllysate aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, wäre eine mögliche HIF-1 $\alpha$ -



Stabilisierung mit anschließender Degradation theoretisch denkbar gewesen. Da die Zellen jedoch in parallelen Ansätzen mit so genannten „Cellscrapern“ vom Boden der Kulturflaschen abgeschabt wurden und deren Lysate ebenfalls keine HIF-1 $\alpha$ -Expression zeigten, kann ein Einfluss des länger andauernden Trypsinierungsvorganges bezüglich einer Degradation nahezu ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur HIF-1 $\alpha$ -Expression lassen demnach vermuten, dass Celecoxib eine verstärkte Expression der GLUT-1-mRNA über den Entkopplungsmechanismus der oxidativen Phosphorylierung und nicht durch Hypoxie erreicht haben muss.

Die verstärkte Translation von HIF-1 $\alpha$  über die PI3K/AKT/FRAP-Kaskade und die erhöhte Transkriptionsaktivität von HIF-1 $\alpha$  über den RAF/MEK/MAPK-Kinase-Weg führen, wie bereits beschrieben, auch zur Erhöhung der GLUT-1-Expression, doch können diese Mechanismen aufgrund des fehlenden HIF-1 $\alpha$ -Nachweises ausgeschlossen werden **(108)**.

Möglich wäre, dass Celecoxib durch Entkopplung der Atmungskette einerseits und durch die bekannte Inhibition der COX-2 andererseits die Kaskade der HIF-1 $\alpha$ -Expression inaktivierte.

Für die Zelllinien A549 und CaCo-2 konnte gezeigt werden, dass die Induktion des COX-2-Proteins nach IL-1 $\beta$ -Stimulation die Expression von HIF-1 $\alpha$  hoch reguliert. Dieser Mechanismus erfolgte über die Aktivierung des ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Nach selektiver Hemmung der COX-2 durch den Inhibitor NS-398 wurde die Expression von HIF-1 $\alpha$  reduziert. Der ergänzende Nachweis, dass PGE<sub>2</sub> als ein bedeutendes Produkt der COX-2-Enzymaktivität die Expression von HIF-1 $\alpha$  induzierte, unterstützt die Annahme des COX-2-Einflusses bei der Regulation von HIF-1 $\alpha$  **(175)**.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte die Arbeitsgruppe um Zhong et al., die bei der Prostatakrebszelllinie PC3 den Einfluss von NS-398 auf die HIF-1 $\alpha$ -Expression untersuchte. Über einen COX-2/PGE<sub>2</sub>-abhängigen Weg wurde die Syntheseabnahme von HIF-1 $\alpha$  beobachtet. Jedoch fand sich auch ein COX-2/PGE<sub>2</sub>-unabhängiger Mechanismus für die Degradation von HIF-1 $\alpha$  über den Ubiquitinweg, bei dem der Rückgang der HIF-1 $\alpha$ -Expression durch exogen appliziertes PGE<sub>2</sub> nicht wieder induziert werden konnte und sich keine erneute Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  zeigte. Ferner konnte NS-398 die durch Hypoxie induzierte Expression von HIF-1 $\alpha$  reduzieren **(176)**.

Diese Tatsache konnten Palayoor et al. nicht bestätigen. Sie beobachteten keine HIF-1 $\alpha$ -Degradation nach Behandlung von PC3-Zellen mit NS-398. Die NSAIDs Ibuprofen und Diclofenac konnten jedoch sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Inkubationsbedingungen die Expression von HIF-1 $\alpha$  abschwächen und resultierend die HIF-regulierten Proteine VEGF und GLUT-1 in ihrer Expression hemmen **(177)**.

Bezüglich der VEGF-Expressionszunahme untersuchten Jones et al. Gefäßendothelzellen des Magens nach Indomethacin- oder NS-398-Applikation. Dabei machten sie den Expressionsanstieg des Von-Hippel-Lindau-(VHL-)Proteins für die abgeschwächte Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  verantwortlich. Es resultierte die reduzierte Expression von VEGF und dessen Rezeptor **(178)**.

Da bekannt ist, dass HIF den Pathogeneseprozess der RA über eine verstärkte Expression von VEGF mit konsekutiver Förderung der Angiogenese verstärkt, könnten COX-2 Inhibitoren, wie Celecoxib, diesen Prozess durch Degradation von HIF-1 $\alpha$  aufhalten. Auf der anderen Seite können durch das

Ausschalten von HIF-1 $\alpha$  gelenknahe Knorpelzerstörungen und Gelenkschwellungen bei der RA vermieden werden (**105, 108, 110, 112, 113**).

Zu gegensätzlichen Ergebnissen kamen Ito et al., die in einer *in vivo* Studie 71 Patienten mit NSAIDs behandelten. Dabei wurden die Mukosazellen der Magenschleimhaut immunhistochemisch für VEGF und HIF-1 $\alpha$  gefärbt. Zwar korrelierten die VEGF-Expressionen mit denen von HIF-1 $\alpha$ , doch waren die HIF-1 $\alpha$ -Level der Oberflächenepithelien bei Patienten mit NSAID-Einnahme signifikant erhöht (**179**). Diese Ergebnisse zeigen die Diskrepanz zwischen den *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur HIF-1 $\alpha$ -Expression.

Die Resultate dieser Arbeit können die *in vivo* Analysen von Ito et al. nicht bestätigen. Auf der einen Seite wurden verschiedene Methoden verwendet und zum anderen mit unterschiedlichen Zelltypen gearbeitet. Entsprechend sind weiterführende Untersuchungen zur HIF-1 $\alpha$ -Expression nach Applikation von NSAIDs notwendig, um einen erschöpfenden regulatorischen Mechanismus ableiten zu können.

## 5.6 Perspektiven

Die Osteoblastenkultur wurde in dieser Arbeit als Monokultur etabliert und die entsprechenden Parameter analysiert. Zur komplexeren Darstellung des „organotypischen“ Zellsystems würden sich *in vitro* Versuche in der Kokultur (Osteoblasten und Osteoklasten) anbieten. Der entscheidende Vorteil dieses Systems läge darin, dass es aufgrund seiner Orientierung an die Situation des Körpers Untersuchungen zu den vielfältigsten Fragestellungen im Bereich der Knochenzellbiologie unter *in vivo* näheren Bedingungen gestattet.

Die Ergebnisse zur Zellvitalität würden sich mit sensitiveren Färbemethoden wie der Annexin V-Färbung, bei der Annexin an die Oberfläche apoptotischer Zellen bindet und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird, verbessern lassen. Ebenso könnten mit DAPI-Färbungen, durch DNA-bindende Fluorochrome, fragmentierte und kondensierte Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop erkannt und als apoptotisch identifiziert werden (**72, 73**). Spezielle ELISA-Testkits, welche DNA-Histonkomplexe detektieren, könnten ergänzend den Apoptosenachweis der Zellen erbringen. Dabei werden die Histone in Form von Mono- oder Oligonukleosomen, die während der Apoptose anfallen, über Antikörper gebunden und anschließend photometrisch quantifiziert (**75**). Um mögliche Signalkaskaden für die Apoptoseinduktion aufzuklären, wäre hierbei der Nachweis der COX-2 auf Protein- oder mRNA-Ebene hilfreich.

Überträgt man die Ergebnisse der Zellvitalität in der untersuchten Osteoblastenkultur auf *in vivo* Verhältnisse, so ergeben sich im Sinne einer Apoptoseinduktion keine nennenswerten klinischen Konsequenzen. Diese Tatsache lässt sich durch die bisher *in vivo* noch nicht erreichten Plasmakonzentrationen von Celecoxib erklären. Somit würde beispielsweise die akute Einnahme von Celecoxib als Schmerztherapeutikum keinen negativen Einfluss auf den Knochenheilungsprozess haben.

Die Frage nach dem Wirkmechanismus von Celecoxib auf die OPG-Expression bleibt noch offen. Für den Beweis einer Regulation über den Arachidonsäurestoffwechsel wäre der Nachweis von Schlüsselenzymen und deren Syntheseprodukten (COX; Prostaglandine) notwendig.

Weiterhin besteht Unklarheit über eine mögliche Expressionsveränderung des Gegenspielers RANKL nach Celecoxibapplikation in der untersuchten Osteoblastenkultur, was die Aussagekraft der OPG-Veränderungen einschränkt. Erst die Ermittlung der RANKL/OPG-Ratio könnte einen genaueren Aufschluss über die Wirkungsweise von Celecoxib im dargestellten Zellsystem erbringen und somit die Konsequenz und Bedeutung für den Knochenstoffwechsel und den damit verbundenen Krankheitsbildern wie der RA oder der Osteoporose sichtbar werden lassen.

Für einen erschöpfenden mechanistischen Zusammenhang bezüglich des Energiemetabolismus der MG-63 Osteoblasten nach Celecoxibapplikation müssten additiv der mitochondriale ATP-Verbrauch sowie das ATP/ADP-Verhältnis gemessen werden. Damit wäre ein wichtiger Zwischenschritt hinsichtlich der Entkopplungstheorie untersucht. Ferner könnten sowohl Messungen von Glukose und Laktat aus den Zellkulturüberständen als auch der Expressionsnachweis bedeutender Schlüsselenzyme, wie Hexokinase oder Phosphofruktokinase, eine wichtige Aussage zur glykolytischen Aktivität der Zellen erbringen. Der Nachweis eines COX-2-unabhängigen Mechanismus erfordert wiederum eine Aussage zur Expression des COX-2-Enzyms, welches unter Verwendung der Realtime PCR amplifiziert werden müsste.

Insgesamt müssen die Experimente mit größeren Fallzahlen bestätigt und ein verstärkter Fokus auf primäre humane Osteoblasten gelegt werden. Die Patienten sollten idealerweise jung sein (< 50Jahre) und keine rheumatischen Beschwerden haben. Eine Möglichkeit wäre hierbei die Spongiosagewinnung aus dislozierten Frakturen, welche nur operativ adäquat behandelt werden können. Anschließend würden die kultivierten Zellen bei den *in vitro* Versuchen mit Interleukinen, wie IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ , präinkubiert, um entzündliche intra- und interzelluläre Kaskaden in Gang zu setzen. Somit könnten ähnliche Prozesse, wie sie bei der rheumatoiden Arthritis oder Osteoarthritis herrschen, simuliert werden. Für die deutlichere Übertragung der Zellkulturergebnisse auf klinische Verhältnisse wären applizierte Celecoxibkonzentrationen von 0,1  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M anzustreben. Da Medikamente, wie selektive COX-2-Inhibitoren, eher über längere Zeiträume eingenommen werden, würde sich zudem eine Erweiterung des Untersuchungszeitraumes anbieten.

Durch die genannten Verbesserungen könnten die *in vivo* Verhältnisse besser abgebildet, interindividuelle Unterschiede sichtbar und vor allem bedeutende regulatorische Mechanismen in Hinsicht auf die Entstehung rheumatischer Erkrankungen evidenter aufgedeckt und evaluiert werden.