

Killt Kaffee Kopfschmerz? - Einfluss von Koffein auf die COX2 -

Einführung

Koffein als bekannter Wirkstoff aus dem alltäglichen Kaffee findet in der Schmerztherapie Anwendung in verschiedenen Kombinationspräparaten mit NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika). Bisher wird dabei von einem adjuvanten analgetischen Effekt des Koffeins ausgegangen [1].

Im Rahmen der Phar^{MS}school-Projekte wurde die Frage untersucht:

Kann schon der Genuss eines koffeinhaltigen Getränks den Kopfschmerz bekämpfen?

Diese Fragestellung ergibt sich aus folgendem Zusammenhang. Eine Vermutung ist, dass Koffein selbst die Prostaglandin-Synthese über eine Hemmung der COX-2-Neusynthese reduziert [2]. Die COX-2 (Cyclooxygenase 2) als induktives Enzym katalysiert im Rahmen einer Inflammation die Synthese von Prostaglandinen und Thromboxan A₂ aus Arachidonsäure. Als Stimuli für die Expression in Monozyten, Epithel-, Endothelzellen und Mastzellen dienen verschiedene inflammatorische und proinflammatorische Zytokine. NSAR wirken dagegen nur als Inhibitoren der COX, woraus sich die bekannten unerwünschten Wirkungen wie Magengeschwüre oder Hemmung der Thrombozytenaggregation ergeben [1].

Methode

Die Untersuchung des Effektes von Koffein auf die COX-Expression wurde mittels **Fluoreszenzmikroskopie** durchgeführt. Hierfür wurde ein Zellversuch mit HT29-Zellen (humane Coloncarzinomzelllinie), welche die COX-2 nach Induktion exprimieren, verwendet.

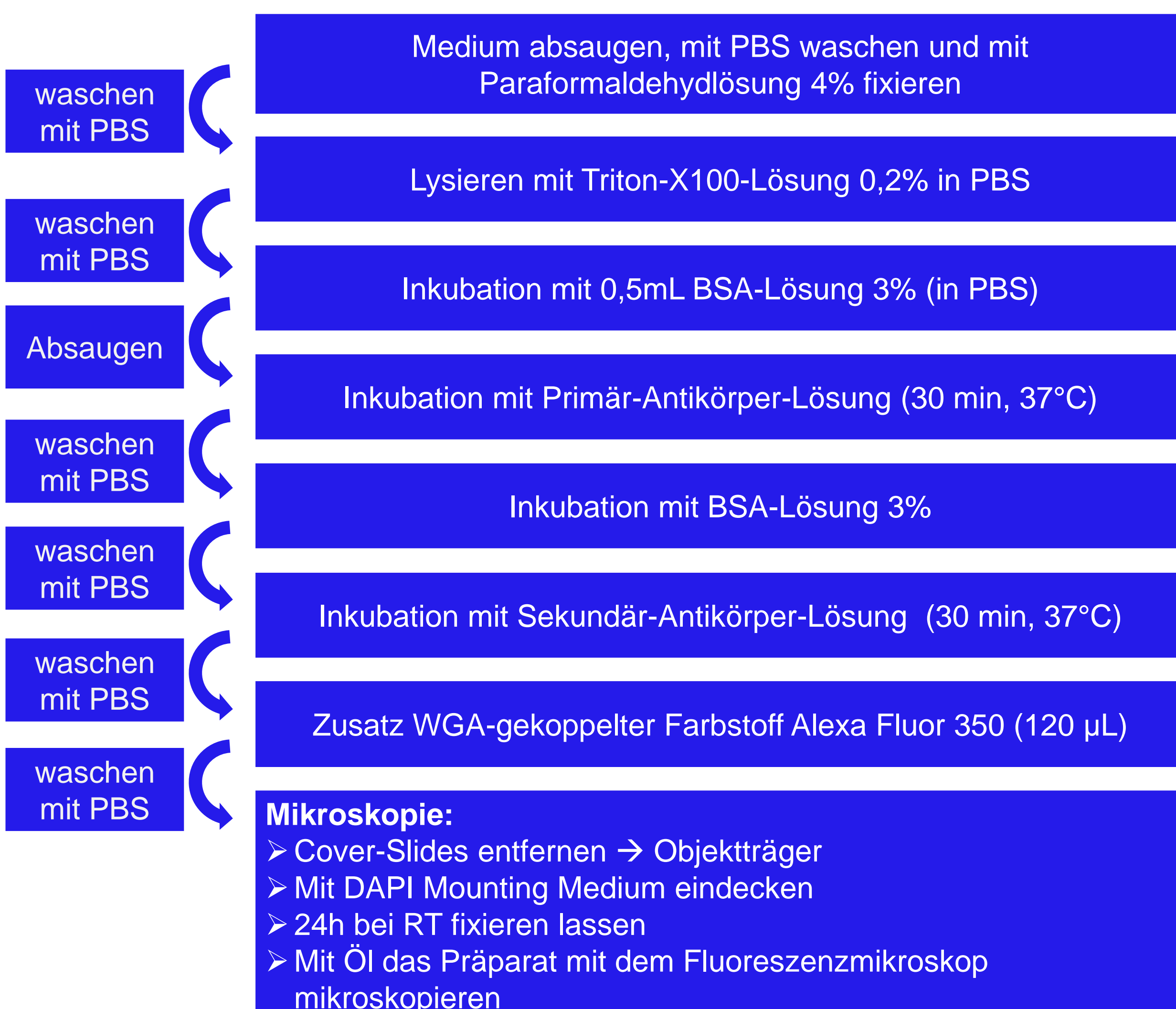
Zur Stimulation der COX-2 wurden 100 ng/mL bzw. 1000 ng/mL Lipopolysacchariden (LPS) zugesetzt. Die Detektion der COX erfolgte mittels Antikörper-Assay in Form einer Fluoreszenzfärbung. Der Zellkern wurde mit DAPI (Diamin-2-phenylindol) und die Zellwand mit Alexa Fluor 350 gekoppelt an Weizenkeimagglutinin (WGA) angefärbt.

- Primär-AK: Human Anti-COX-2 (monoklonaler Mouse IgG2B Clone)
- Sekundär-AK: Alexa Fluor @ 546 gekoppelt an anti-mouse IgG-AK (H+L)

Übersicht: Probenansätze

- 
- 1a) unbehandelte Kontrolle (UK)
 - 1b) LPS 100 ng/mL
 - 1c) LPS 1000 ng/mL
 - 1d) Koffein 10 µM
 - 2a) Koffein 100 µM
 - 2b) Koffein 10 µM + ASS 10 µM
 - 2c) Koffein 10 µM + Paracetamol 10 µM
 - 2d) Koffein 10 µM + Paracetamol 100 µM

Antikörper-Essay und Fluoreszenzfärbung



Ergebnisse

Die vier Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie. Deutlich zu erkennen waren die mittels DAPI-Färbung blau eingefärbten **Zellkerne** und die durch Antikörper-Markierung rot dargestellte **COX-2** im Cytosol.

Die normale Morphologie der Zellen (wie in den Abbildungen 1-4 zu erkennen) wies auf einen physiologischen Zustand hin.

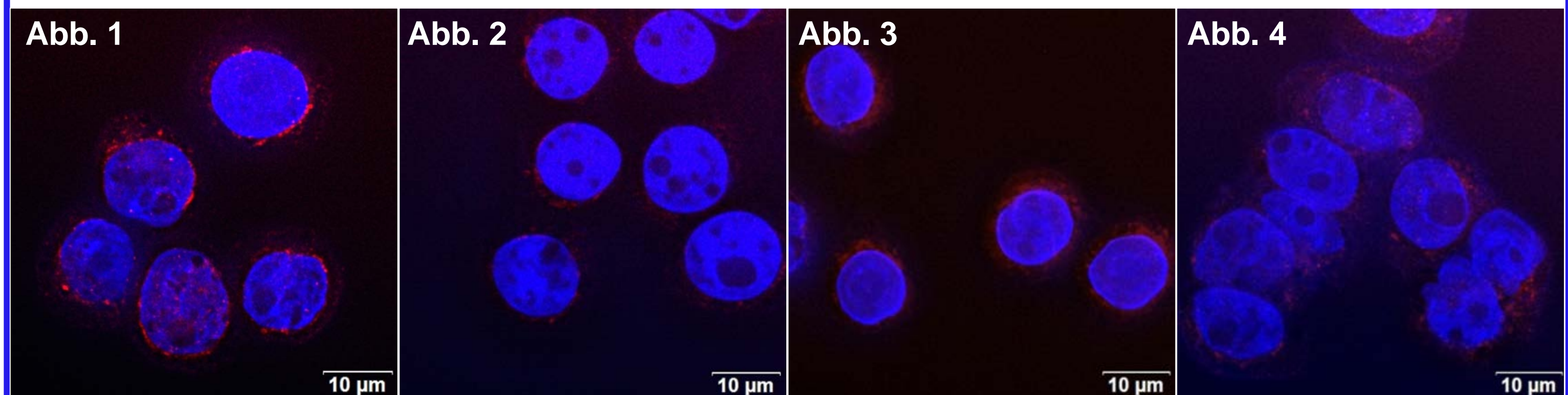


Abb. 1: In der unbehandelten Kontrolle zeigte sich durch die intensiv rote Färbung eine starke Expression der COX-2.

Abb. 2: Im Vergleich dazu war die Probe mit LPS 100 ng/ml weniger stark gefärbt, sodass von einer geringeren COX-2 Expression ausgegangen werden kann.

Abb. 3: Auch die Probe mit 10 µM Koffein zeigt eine geringere Expression der COX-2 als die unbehandelte Kontrolle.

Abb. 4: Beim Zusatz von Paracetamol 10 µM zu Koffein 10 µM ist ein stärkerer Rückgang der COX-2-Expression zu erkennen.

Die Probe mit dem LPS-Zusatz von 1000 ng/ml zeigte morphologisch deutlich vergrößerte und verformte Zellkerne. Auch beim Zusatz von 100 µM Koffein zeigten sich leicht vergrößerte Zellkerne, sowie verkleinerte cytosolische Bereiche. Die Untersuchung mit ASS (10 µM) lieferte analoge Ergebnisse wie die Behandlung mit 10 µM Koffein. Der Zusatz von 100 µM Paracetamol führte zur ähnlichen Expressionsintensität der COX-2 wie mit 10 µM Paracetamol.

Diskussion und Fazit

Die erzielten Ergebnisse decken sich mit den Testergebnissen von Fiebich et al. über den Einfluss von Koffein auf die COX-2 [2].

Die Proben mit dem Koffeinzusatz zeigten in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung eine geringere Expression der COX-2 (vgl. Abb. 3 und 4). Zusätzlich deutete sich ein synergistischer Effekt bei der Kombination von Paracetamol und Koffein an, da eine stärkere Reduktion der COX-2-Expression erkennbar war (vgl. Abb.4). Dies ist wahrscheinlich mit dem noch nicht vollständig geklärten Wirkmechanismus von Paracetamol erklärbar [3].

Bei dem Zusatz von ASS lies sich kein synergistischer Effekt erkennen, da dies als COX-Inhibitor keinen Einfluss auf die Expression der COX-2 ausübt.

Bei der Probe mit 1000 ng/ml LPS ließen die morphologischen Veränderungen der Zellen auf einen cytotoxischen Effekt der LPS-Lösung schließen, die ursprünglich zur Stimulation der COX-2-Expression zugesetzt wurde. In der dort angewendeten Konzentration und bei der langen Inkubationszeit wurden die Zellen einer starken Belastung ausgesetzt, sodass keine Rückschlüsse auf die COX-2-Expression möglich waren.

Auch der Ansatz mit Koffein 100 µM zeigte leichte morphologische Veränderungen. Dies lässt darauf schließen, dass Koffein in diesen Konzentrationen ebenfalls zu cytotoxischen Effekten führt.

Basierend auf diesen Ergebnissen ist davon auszugehen, dass Koffein eine analgetische Wirkung haben kann.

Ausblick:

Zur Präzisierung und Quantifizierung der COX-2-Expression könnte anschließend dieser Versuch mittels Real-Time-PCR weitergeführt werden. Für die Beurteilung der möglichen analgetischen Wirkung des Koffeins basierend auf dessen Einfluss auf die COX wären zusätzliche klinische Studien nötig.

Referenzen

- [1] Geisslinger G et al. Mutschler Arzneimittelwirkungen. 11. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2020
- [2] Fiebich, BL et al., Neuropharmacology 39, 2205-2213 (2000)
- [3] Hinz B, Rausch R. Pharmakon · 5, 41-49 (1/2017)



Danksagung

Wir möchten uns bei unserem Mentor Prof. Dr. Lehr für die Begleitung während der letzten vier Semester bedanken. Ein besonderer Dank gilt außerdem dem gesamten Phar^{MS}school-Koordinationsteam, insbesondere Dr. Stefan Esch für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieses Projektes.