

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Ertl

**Einfluss der chronischen Aktivierung der Guanylatcyclase auf die Regulation der
Thrombozytenaktivität bei Diabetes mellitus**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ulrike Flierl

aus Würzburg

Würzburg, Februar 2009

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. A. Schäfer

Koreferent: Prof. Dr. med. U. Walter

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2009

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Diabetes – Kardiovaskuläre Bedeutung.....	1
1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	2
1.2.1 Epidemiologie	
1.2.2 Atherosklerose	
1.3 Endotheliale Dysfunktion.....	6
1.4 Thrombozytenaktivierung.....	8
1.5 Interaktion Gefäß – Thrombozyt.....	11
1.6 Besonderheiten der Thrombozytendysfunktion bei Diabetes mellitus.....	12
1.7 Stickstoffmonoxid – NO.....	14
1.7.1 L-Arginin-NO-cGMP-Signalweg	
1.7.2 NO-Defizienz bei Diabetes mellitus	
1.7.3 Therapeutische Beeinflussung des NO/cGMP-Signalwegs	
1.7.4 Ataciguat (HMR 1766)	
2. Methodik.....	23
2.1 Tiere.....	23
2.1.1 Diabetesinduktion durch Streptozotocin (STZ)	
2.1.2 Ataciguat-Behandlung	
2.1.2.1 <i>In vitro</i> -Inkubation	
2.1.2.2 Akut-Gabe	
2.1.2.3 Chronische Verabreichung	
2.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Blutplättchen.....	26
2.2.1 Thrombozytäre Aktivierungsmarker	
2.2.2 Blutentnahme	
2.2.3 Probenaufbereitung für Messungen im Vollblut	
2.2.4 Gewinnung von Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) zu	

	Stimulationszwecken	
2.2.5	Durchflusszytometrische Messung der vorbereiteten Proben	
2.3	Aggregometrische Untersuchung von Thrombozyten.....	35
2.3.1	Probengewinnung	
2.3.2	Probenaufbereitung	
2.3.3	Messung	
2.4	Bestimmung deskriptiver Daten.....	39
2.4.1	Metabolische Parameter	
2.4.2	Hämatologische Parameter	
2.4.3	Milzvolumen / -gewicht	
2.5	Statistik.....	41
3.	Ergebnisse.....	42
3.1	Chronische Effekte von Ataciguat (HMR 1766).....	42
3.1.1	Durchflusszytometrische Messungen <i>in vivo</i>	
3.1.1.1	Aktivitätsbestimmung des cGMP-getriggerten Signalwegs	
3.1.1.2	Bestimmung thrombozytärer Oberflächenaktivierungsmarker	
3.1.1.2.1	Fibrinogen, P-Selectin, CD42d	
3.1.1.2.2	Thrombozytäre Mikropartikel (PMP), Thrombozytenadhäsion an nicht-thrombozytäre Blutzellen (PCA)	
3.1.2	Durchflusszytometrische Messungen <i>in vitro</i>	
3.1.2.1	ADP-induzierte Stimulation von Vollblut	
3.1.2.2	ADP-induzierte Stimulation von PRP	
3.1.3	Aggregometrie	
3.1.3.1	ADP-induzierte Aggregation nativen PRPs	
3.1.3.2	ADP-induzierte Aggregation normierten PRPs	
3.1.3.3	Fractalkine als proaggregatorischer Zusatz	
3.2	Akut-Effekte von Ataciguat.....	56

3.2.1	Durchflusszytometrische Messungen	
3.2.2	Aggregometrie	
3.3	Deskriptive Daten.....	59
3.3.1	Metabolische Parameter	
3.3.2	Hämatologische Parameter	
3.3.3	Milzgewicht / -volumen	
4.	Diskussion.....	64
5.	Zusammenfassung.....	70
6.	Literaturverzeichnis.....	71

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Diabetes - Kardiovaskuläre Bedeutung

Diabetes mellitus wurde früher als eine klassische endokrinologische Erkrankung angesehen. Besonders seit den letzten Jahren richtet sich das Augenmerk aufgrund der guten Beeinflussungsmöglichkeiten des Blutzuckers und der damit verbundenen Reduktion metabolischer Komplikationen auf die heutige Haupttodesursache diabetischer Patienten, dem Auftreten kardiovaskulärer Manifestationen, woran mehr als 75% der Diabetiker letztlich versterben. Sie sind mittlerweile die direkten und indirekten Hauptkostenverursacher dieser Krankheit - sowohl in medizinischer als auch in sozialer Hinsicht ¹. Somit vollzog sich ein Umdenken vom starren kategorialen Einordnen der weit verbreiteten Volkskrankheit hin zur Fokussierung wichtiger damit einhergehender pathologischer Veränderungen.

Nicht zuletzt wegen der bedrohlichen Zunahme der kardiovaskulären Mortalität unter Diabetikern wurde das Interesse der Forschung auf die Zusammenhänge zwischen dieser Erkrankung endokrinologischen Ursprungs einerseits und deren Auswirkungsmechanismen auf Herz und Gefäße andererseits gelenkt.

Patienten mit Diabetes mellitus haben im Vergleich zu nicht-diabetischen Menschen ein bis zu vierfach erhöhtes Risiko, eine kardiovaskuläre Erkrankung, wie zum Beispiel Herzinfarkt oder Schlaganfall, zu erleiden ^{2,3}, wobei die Komplikationsrate nach Herzinfarkt unter Diabetikern gegenüber Nicht-Diabetikern ebenfalls erhöht ist ⁴.

Außerdem ist die 7-Jahres-Inzidenz eines Herzinfarkts unter Patienten, die bereits eine bestehende KHK haben, fast gleichzusetzen mit der von kardial unvorbelasteten Diabetikern ⁵ (Abb.1).

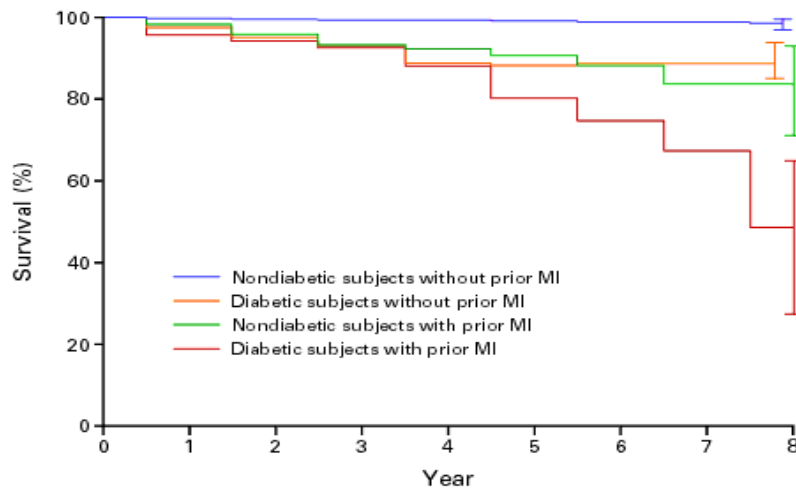


Abb.1: Kaplan-Meier Wahrscheinlichkeitsverteilung des Versterbens an koronarer Herzerkrankung bei 1059 Personen mit Typ II Diabetes mellitus und 1378 nicht-diabetischen Menschen mit oder ohne vorangegangenen Myokardinfarkt (Aus: Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998;339:229-234)

Es gibt viele Hypothesen und Arbeiten, die sich mit den Ursachen dieser Risikoerhöhung beschäftigen, die wesentlich zur vermehrten Hospitalisierung Betroffener beiträgt. Kernpunkte sind die verstärkte Thrombozytenaktivierung in Kombination mit verminderter endogener Plättcheninhibition und die endotheliale Dysfunktion.

1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen

1.2.1 Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen spielen eine herausragende Rolle in Bezug auf Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt. Sie werden wahrscheinlich innerhalb der nächsten 15 Jahre weltweit die Haupttodesursache darstellen. Gründe für die bedrohliche Zunahme werden unter anderem in dem rasanten Anstieg der Inzidenz von Wohlstandskrankheiten wie Diabetes mellitus und Übergewicht gesehen. Bereits jetzt

sind kardiovaskuläre Erkrankungen in Europa die häufigste Todesursache bei Männern unter 65 Jahren und die zweithäufigste bei Frauen ⁶. Unter derartigen Erkrankungen werden hauptsächlich die ischämische Herzerkrankung, Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) subsumiert. Pathophysiologisch gesehen ist die Atherosklerose der gemeinsame Nenner, auf den diese Gefäßkrankheiten gebracht werden können. Angetrieben durch die bedrohlichen Auswirkungen dieser Gefäßveränderungen stellen neue Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese eine große Herausforderung dar, durch medikamentöses Eingreifen an den Schlüsselstellen eine bestmögliche Behandlung, optimalerweise schon von Risikofaktoren, zu erzielen.

1.2.2 Atherosklerose

Wie bereits erwähnt, ist die Atherosklerose der Verursacher sämtlicher kardiovaskulärer Erkrankungen. Hinsichtlich des Verständnisses der Atherosklerose-Entstehung hat sich in letzter Zeit ein enormer Wandel ergeben, weg von der bloßen Lipidakkumulation in der arteriellen Gefäßwand hin zu einer Reihe hochspezifischer zellulärer und molekularer Reaktionen im Rahmen einer entzündlichen Erkrankung ^{7;8}.

Die klassische „*response-to-injury*“-Hypothese, die die Verletzung des Endothels und somit eine Art Schrankenstörung zwischen Blutfluss und Gefäß als den ersten Schritt der Atherosklerose-Entstehung postulierte, wurde durch ein neues Konzept abgelöst. Dieses stellt die endotheliale Dysfunktion, die mit einer erhöhten Permeabilität sämtlicher im Blut gelöster Substanzen durch die Endothelzellen einhergeht, also nicht die strukturelle Beschädigung endothelialer Zellen, in den Mittelpunkt ^{7;9}.

Doch wie kommt es zur Initiierung einer derartigen Inflammation und einer daraus resultierenden endothelialen Dysfunktion?

Zu den mitverantwortlichen Bestandteilen zählt ein erhöhter LDL-Spiegel, die damit verbundene Infiltration der Intima und der anschließenden oxidativen Veränderung des Proteins, welche eine Reihe weiterer Aktivierungsmechanismen nach sich zieht, zum Beispiel die Freisetzung von Phospholipiden, die wiederum Endothelzellen aktivieren ⁶. Daraus ergibt sich ein Teufelskreis, wobei ein Ereignis das andere bedingt. Letztlich stellt die inflammatorische Antwort seitens des Gefäßes die gemeinsame Endstrecke

dar. Hauptkomponente in der Aufrechterhaltung dieser Entzündungsreaktion ist vor allem die Anhäufung von Monozyten / Makrophagen und Lymphozyten in der Intima großer Arterien ¹⁰. Diese Blutzellen können vermutlich durch die Expression spezifischer Rezeptoren, besonders von VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), die typischerweise bei Hypercholesterinämie verstärkt exprimiert werden, zunächst an der Gefäßwand adhären, um anschließend in die Intima zu gelangen.

Lange Zeit war man sich allerdings nicht ganz im Klaren, welche Zellen des Blutes nun wirklich als erste eine Interaktion mit dem Endothel eingehen und die Voraussetzungen für die Adhäsion anderer Zellen schaffen würden. Die Annahme, dass Leukozyten als klassische Entzündungszellen als erstes zur Stelle sein würden, war naheliegend. Diese Hypothese wurde jedoch in einer Veröffentlichung von *Massberg et al.* im Jahre 2002 grundlegend in Frage gestellt. Sie identifizierten Thrombozyten als erste Blutzellen, die am Brennpunkt endothelialer Aktivierung ankommen. Hierbei kristallisierten sich Glykoprotein (GP) Ib α , welches an von Endothelzellen exprimierten vWF (von Willebrand Faktor) und P-Selectin bindet und zum initialen Kontakt unter hohen Scherkräften beiträgt, und GPIIb/IIIa, welches für die dauerhafte Adhäsion am Endothel verantwortlich ist, als essentiell heraus ¹⁰. Durch die Endothelbindung und die damit verbundene Aktivierung der Thrombozyten werden aus den α -Granulae, aus Lysosomen, dem kanalikulären System bzw. dem Cytosol der Blutplättchen eine ganze Reihe von Faktoren sezerniert bzw. exprimiert. Dazu gehören unter anderem Adhäsionsproteine (z.B. Fibrinogen, Fibronectin, vWF, Thrombospondin, Vitronectin, P-Selectin), Wachstumsfaktoren (z.B. RANTES [regulated on activation, T-cell expressed and secreted; CCL5], PF4 [platelet factor 4; CXC4], SDF-1 α [stromal cell-derived factor-1 α ; CXCL12], epithelial neutrophil-activating protein 78 [CXCL5]), Cytokine (z.B. IL-1 β , CD40-Ligand, β -Thromboglobulin) und Koagulationsfaktoren (z.B. Faktor V, Faktor XI, PAI-1, Plasminogen, Protein S). Cytokine, wie CD40L und IL-1 β , bewirken wiederum die verstärkte endotheliale Oberflächenexpression von VCAM-1, ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) und die Ausschüttung von Chemokinen wie MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1; CCL2) und Interleukin-8 (IL-8; CXCL8) seitens des Endothels ^{11;12}. VCAM-1 und MCP-1 sowie das vom aktivierten Endothel exprimierte Fractalkine (CX₃CL1) ¹³⁻¹⁵ spielen für die Monozyten-

Rekrutierung und die darauf folgende Transmigration der Zellen in die Intima eine zentrale Rolle (Abb.2).

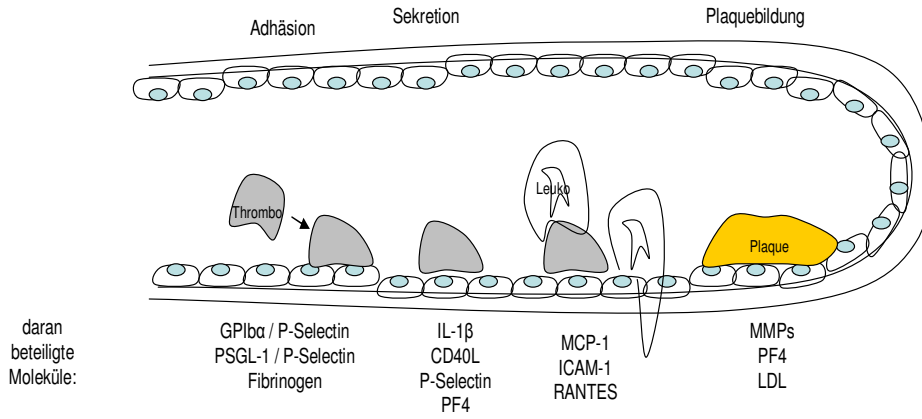


Abb.2: Modell der durch Thrombozyten getriggerten Atherosklerose-Entstehung. Aktivierte Plättchen rollen entlang der endothelialen Einzelzellschicht und adhären dann fest an das Endothel. Dabei setzen sie pro-inflammatorische Komponenten (IL-1 β , CD40L) frei und induzieren einen pro-atherogenen Phänotypen der Endothelzellen. Folglich rekrutieren adhärenente Thrombozyten zirkulierende Leukozyten und veranlassen diese über Rezeptorinteraktionen und parakrine Signalwege zur Transmigration sowie zur Schaumzellformation. (Aus: Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest. 2005;115:3378-3384.)

In den letzten Jahren wird zudem dem CXC-Chemokin SDF-1 α eine immer bedeutendere Rolle zugeschrieben, nicht nur hinsichtlich der Lymphozyten-/Monozyten-Rekrutierung zu Orten vaskulärer Schädigung^{12;16-19}. Erst kürzlich wurden Thrombozyten als die maßgebliche, akute Quelle der SDF-1 α -Sekretion beschrieben, während durch endotheliale Beschädigung luminal freigelegte glatte Muskelzellen (SMC = smooth muscle cells) erst Stunden nach Verlust endothelialer Intaktheit mit der Freisetzung des Chemokins beginnen²⁰ und damit die Rekrutierung von Progenitor-Zellen aus dem Knochenmark zu Reparatur-, Remodeling- und Revaskularisations-Prozessen fördern^{21;22}.

Daneben ist aber auch P-Selectin ein zentrales Glykoprotein, das einerseits, wenn endothelial exprimiert, maßgeblich zur Endothel-Thrombozyten-Interaktion beiträgt, andererseits, bei Expression auf Plättchen, für die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion essentiell ist⁹.

Es lässt sich also ableiten, dass die endotheliale Dysfunktion in Verbindung mit dem Vorhandensein aktivierter Thrombozyten und der daraus resultierenden Sekretion zahlreicher Chemokine zentrale Faktoren in der Entstehung und Aufrechterhaltung vaskulärer Inflammation bzw. Atherosklerose sind^{23;24}.

Diese beiden Faktoren sind die Bindeglieder zwischen Atherosklerose, also kardiovaskulärer Schädigung, und Diabetes.

1.3 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel nimmt eine wichtige Stellung bei der Sicherung der Intaktheit von Gefäßen ein. Die Endothelzellen bilden eine dichte Einzelzellschicht, welche die Gefäßwand auskleidet und den Blutstrom von den thrombogenen Strukturen (unter anderem vWF, Kollagen, Fibronectin, Thrombospondin, Vitronectin, Laminin) des Subendothels trennt. Die Definition endothelialer Intaktheit (= Endothelfunktion) beinhaltet unter anderem die Sekretion vasoaktiver Substanzen zum Erhalt einer nicht-thrombogenen Oberfläche, zur Regulation des Gefäßtonus über Wirkorte an den glatten Muskelzellen der Media, zur Modifikation von Entzündungsreaktionen, zur Inhibition subendothelial gelegener glatter Muskelzellen²⁵ und zur Gewährleistung eines kontinuierlichen Blutflusses. Zu diesen essentiellen Substanzen gehören vasodilatatorisch wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI₂), „Endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF) als auch Mediatoren mit konstriktivem Effekt (Thromboxan A₂ [TxA₂], Angiotensin II [ATII], Endothelin [ET-1]).

Seit etwa 25 Jahren ist NO Gegenstand intensiver Forschung, nicht zuletzt aufgrund der therapeutischen Möglichkeiten, die sich aus dem besseren Verständnis der Herkunft und pleiotropen, protektiven Wirkungsweise dieses Mediators ergaben.

Im Jahre 1980 wurde erstmalig die Bedeutung des endothelialen NO festgestellt, nachdem *Furchgott* und *Zawadzki* anhand isolierter Kaninchen-Aorten die Freisetzung einer vasodilatierenden, endothelabhängigen Substanz als Reaktion auf Acetylcholin(ACh)-Exposition nachgewiesen hatten²⁶. Nach dieser initialen Beobachtung wurde die Substanz zunächst rein deskriptiv „Endothelium-derived

relaxing factor“ (EDRF) genannt, bis genauere Untersuchungen die molekulare Formel identifizierten und eine Änderung der Nomenklatur veranlassten, nämlich vom EDRF hin zum NO²⁷.

Der Ausdruck endotheliale Dysfunktion im weiteren Sinne umfasst also sämtliche pathologische Zustände des Endothels, seien es Störungen des antiinflammatorischen oder antikoagulatorischen Potentials oder Veränderungen in der Regulierung vaskulären Wachstums. Immer öfter wird diese Bezeichnung jedoch spezifisch zum Ausdruck der gestörten endothelabhängigen Vasorelaxation aufgrund der verminderten Bioverfügbarkeit endothelialen NOs verwendet²⁸. Dieser Mangel kann bedingt sein durch eine abgeschwächte NO-Syntheseleistung und / oder durch eine verstärkte NO-Inaktivierung in Folge vermehrten Vorhandenseins oxidativen Stresses (ROS = *reactive oxygen species*) im Rahmen von Hypertension, Hypercholesterinämie, Diabetes und Rauchen²⁹ (Abb.3).

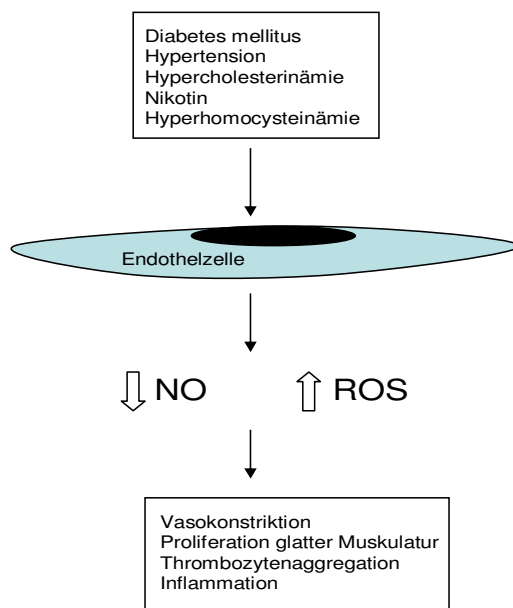


Abb.3: Endotheliale Dysfunktion und NO. Beim Vorliegen klinischer Syndrome, die mit endothelialer Dysfunktion einhergehen, kommt es zu einer verringerten endothelialen NO-Sekretion und / oder zu einer gesteigerten Bildung freier Radikale (ROS = *reactive oxygen species*). Dies resultiert in einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO, wodurch die regulatorischen Funktionen des Endothels gestört werden. NO-Mangel führt zu Vasokonstriktion, Proliferation glatter Muskelzellen, Thrombozytenaggregation und Adhäsion inflammatorischer Zellen. (Aus: Russo

G, Leopold JA, Loscalzo J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:259-269.)

Im klinischen Auftreten werden immer mehr kardiovaskuläre Risikofaktoren identifiziert, die mit eben dieser endothelialen Dysfunktion einhergehen. Dazu gehören Atherosklerose, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Rauchen, Hyperhomocysteinämie, pulmonale Hypertension, Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus³⁰. Verifiziert wurde dieser NO-Mangel unter anderem durch die abgeschwächte vasodilatorische Gefäßantwort auf ACh-Exposition beziehungsweise durch eine reduzierte Fluss-induzierte Relaxation.

1.4 Thrombozytenaktivierung

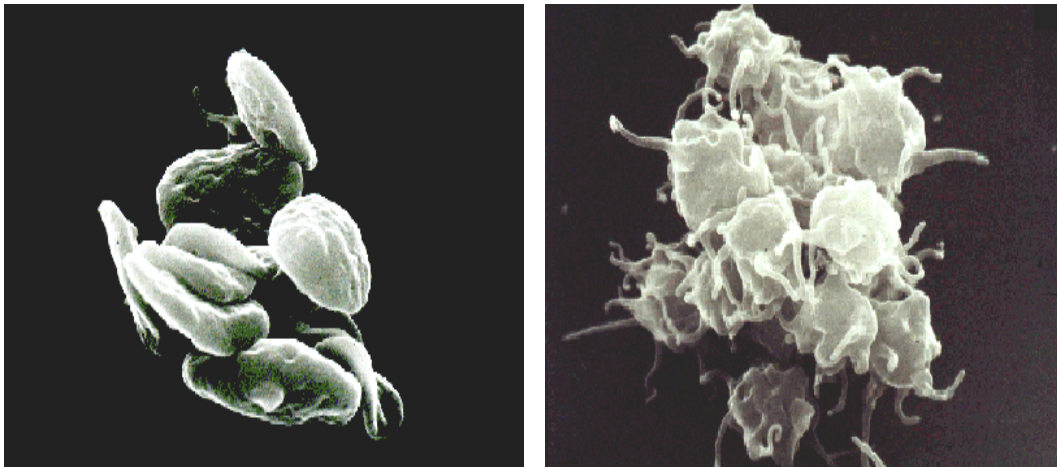


Abb.4: Elektronenmikroskopie – Ruhender Thrombozyt -> Aktivierter Thrombozyt
(www.perfusion.com)

Wie reagieren nun Thrombozyten, die bei traumatischen Einwirkungen auf die Gefäßwand in Verbindung mit löslichen Plasmakomponenten maßgeblich zur Abdichtung der Läsion und Blutstillung beitragen, auf die reduzierte Freisetzung von endogenem NO / PGI₂ und eine endotheliale Dysfunktion, also auf einen kontinuierlichen Verlust der Gefäßwandintegrität, wie sie im Rahmen sämtlicher kardiovaskulärer Erkrankungen auftritt?

Um dies beantworten zu können, mussten zunächst unter anderem folgende Fragestellungen berücksichtigt werden:

a) Inwieweit beeinflusst endothelial gebildetes NO die Thrombozytenfunktion?

Hier ist die sehr kurze Halbwertszeit (HWZ) von NO im physiologischen Umfeld von nur wenigen Sekunden ^{25;31;32}, die begrenzte Plättchenanzahl, die überhaupt in den kritischen Wirkungsbereich des endothelial sezernierten NOs gelangt, und die starke Affinität von Hämoglobin für Stickstoffmonoxid zu berücksichtigen ^{33;34}.

Die zunächst nicht eindeutigen Ergebnisse von *in vitro*-Untersuchungen ³⁵ konnten durch *in vivo*-Demonstrationen geklärt werden. So zeigten Schäfer *et al.* eine signifikante Thrombozytenaktivierung bei gesunden Probanden nach Infusion eines NO-Synthase-Inhibitors und umgekehrt die Reversibilität dieses Aktivierungszustandes durch Gabe eines NO-Donors ³⁶. Also kann davon ausgegangen werden, dass es eine direkte Verbindung zwischen NO-Bioverfügbarkeit und Plättchenaktivierung *in vivo* gibt, die akut auf Störungen reagiert.

b) Kann thrombozytär gebildetes NO das endotheliale Defizit ausgleichen?

Nachdem die Expression einer konstitutiven NO-Synthase (cNOS) in Thrombozyten vermutet worden war ^{37;38;39;40}, folgten Untersuchungen an Plättchen bezüglich ihrer Kapazität, NO freizusetzen. Es gibt einige Ergebnisse darüber, dass sowohl ruhende als auch zum Beispiel durch Kollagen aktivierte Thrombozyten ⁴¹⁻⁴³ messbare Mengen an NO produzieren können ^{42;44}. Andererseits zeigten Schäfer *et al.* durch die selektive Prävention endothelialer Dysfunktion durch die Verwendung GCH (=GTP-Cyclohydrolase-I) -transgener Mäuse, die GCH gezielt im Endothel überexprimieren und vor einer Endotheldysfunktion bei Diabetes mellitus geschützt sind, und der damit verbundenen Aufrechterhaltung endothelialer NO-Bioverfügbarkeit im Diabetes eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaktivierung und somit den ausschlaggebenden Einfluss vor allem endothelialen NOs auf die Plättchenfunktion *in vivo* ⁴⁵. Nun konnte mit Hilfe neuer Protokolle, die eine bessere Aufreinigung von Thrombozyten ermöglichen, gezeigt werden, dass sowohl humane als auch murine Blutplättchen gar keine eNOS beziehungsweise

iNOS exprimieren ⁴⁶. Somit muss davon ausgegangen werden, dass die entscheidende Bedeutung auf die Thrombozytenfunktion dem endothelial gebildeten NO obliegt.

Wie macht sich nun die Aktivierung zirkulierender Thrombozyten bemerkbar?

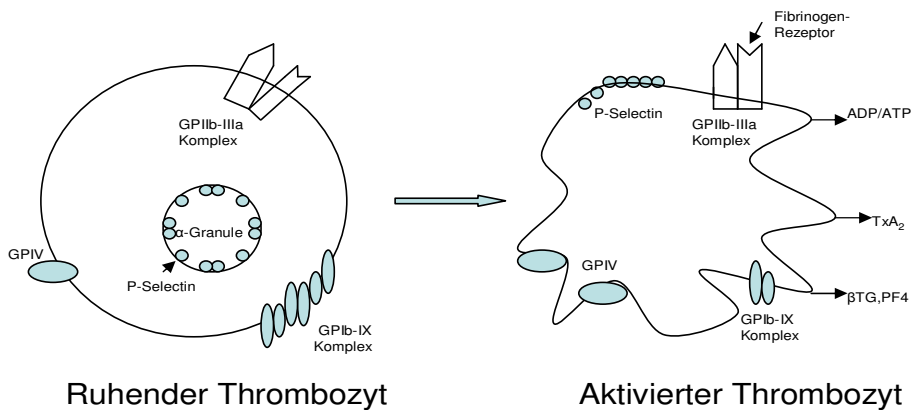


Abb.5: Charakteristische Oberflächenmarker der Plättchenaktivierung: nach Aktivierung erfolgt eine verstärkte Expression von Glykoprotein-(GP-)rezeptoren auf der Zelloberfläche. (Aus: Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24:1476-1485.)

Blutplättchen exprimieren eine ganze Reihe von Membranglykoproteinen, die, wenn sie mit ihren Liganden wie zum Beispiel ADP, vWF oder Kollagen in Kontakt kommen, eine Signalkaskade in Gang setzen, das sogenannte „outside-in signaling“. Dies beinhaltet Ionenveränderungen, Proteinkinaseaktivierung, Polymerisation des Cytoskeletts und Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus. Das alles mündet im „inside-out signaling“, der Aktivierung des Glykoproteins IIb/IIIa, das eine sterische Konformationsänderung vollzieht und dabei eine hoch-affine Bindungsstelle für RGD- (Arginin-Glycin-Asparagin) beinhaltende Liganden, wie Fibrinogen oder vWF, freilegt. Zudem ergeben sich weitere Veränderungen während der Aktivierung, die sich vor allem in der Freisetzung von Adhäsionsproteinen und proinflammatorischen Substanzen aus thrombozytären Zellorganellen äußern (Abb.5). An dieser Freisetzungsreaktion sind unter anderem das offene kanalikuläre System, die Lysosomen, das dichte tubuläre System und insbesondere die α-Granulae beteiligt. Die

α -Granulae beinhalten sämtliche die Inflammation aufrechterhaltende Substanzen, wie PDGF (platelet-derived growth factor), der unter anderem die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen anregt, PF4, IL-1, β -Thromboglobulin, CD40L und viele mehr, die zumeist von Megakaryozyten synthetisiert beziehungsweise zu einem geringeren Teil auch aus dem Blutplasma mittels Endozytose aufgenommen werden ⁴⁷. Ein weiterer essentiell wichtiger Bestandteil der α -Granulae ist das P-Selectin (CD62-P), welches nach der Aktivierung von Plättchen und ihrer konsekutiven Degranulation auf der Oberfläche nachweisbar ist. P-Selectin ist also ein aktivierungsabhängiger Rezeptor, der maßgeblich zur Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion beiträgt ⁴⁸ und unter *in vivo*-Bedingungen rasch wieder von der Thrombozytenoberfläche eliminiert wird ⁴⁹. Zudem ist die vermehrte Bildung von thrombozytären Mikropartikeln (PMPs) ein weiterer Marker für Thrombozytenaktivierung. Sie entstehen durch Abschnürung von der Plättchenplasmamembran und beinhalten viele thrombozytäre Adhäsionsmoleküle und proinflammatorische Faktoren, wodurch sie zur Aufrechterhaltung des Aktivierungszustandes beitragen ^{47;50;51}.

Eine Reihe von Untersuchungen belegen eine Thrombozytenaktivierung u.a. bei pAVK ⁵², instabiler Angina pectoris (AP) ⁵³, chronischer Herzinsuffizienz (CHF) ^{54;55}, Schlaganfall ^{56;57}, Hypercholesterinämie ^{57;58}, Hypertension ⁵⁹⁻⁶¹ und Diabetes ^{62;63}.

1.5 Interaktion Gefäß – Thrombozyt

Wie bereits an anderer Stelle aufgezeigt, findet die Interaktion zwischen Gefäß und Thrombozyten über Mediatoren und Rezeptoren statt, die sowohl seitens des Endothels als auch seitens der Blutplättchen sezerniert bzw. exprimiert werden und im Idealfall einen Zustand ungestörter Zirkulation herstellen.

Warum gelangen nun ausgerechnet Blutplättchen in die unmittelbare Nähe der Gefäßwände, wodurch sie, um einen störungsfreien Blutfluss zu gewährleisten, besonders von der Intaktheit dieser abhängig sind?

Dies hat unter anderem mit dem Blutfluss an sich und den dabei wirkenden Kräften zu tun. Der Transport von Thrombozyten hin zur Gefäßwand erfolgt durch zwei Prozesse, Diffusion und Konvektion. Diffusion bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die

Plättchen wie auch alle anderen zellulären Bestandteile im Blut Brown'sche Eigenbewegungen innerhalb der Hauptflussrichtung ausführen. Konvektion hingegen ist die Bewegung mit der Strömung. Plättchen sind hinsichtlich dieser beiden Parameter aufgrund ihrer geringen Größe von nur 2-4µm⁶⁴ und ihrer irregulären Form⁶⁵ dafür prädestiniert, im Blutfluss zur Peripherie zu gelangen, wo maximale Scherkräfte an der Gefäßwand herrschen.

Durch die Scherkräfte, die auf die Gefäßwände wirken, wird unter anderem auch die endotheliale NO-Synthase reguliert. In Bereichen, an denen normale laminare Scherkräfte herrschen, sind hohe NO-Pegel anzutreffen, während an kritischen Punkten, wie zum Beispiel Gabelungen oder Plaques, an denen durch Verwirbelung des Blutstroms erhöhte Kräfte wirken, eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit vorzufinden ist⁶⁶.

Schlussfolgernd kann man also zusammenfassen, dass ein Defizit in der endothelialen Mediatorfreisetzung direkten Einfluss auf zirkulierende Thrombozyten hat.

1.6 Besonderheiten der Thrombozytendysfunktion bei Diabetes mellitus

Thrombozyten sind bei einer diabetischen Stoffwechsellage besonders gegenüber einer Aktivierung sensibilisiert, was sich unter anderem in erhöhter Adhäsionsbereitschaft, verstärkter Produktion von Prostanoiden und oxidativen Radikalen, verminderter NO-Freisetzung⁶⁷, erhöhter cytosolischer Calciumbereitstellung⁶⁸, beladeneren, reaktionsfreudigeren α -Granulae, größerem Plättchenvolumen⁶⁹⁻⁷¹, vermehrter Anzahl von GPIIb/IIIa, verstärkter Glykosylierung von Membranglykoproteinen, veränderter Membranfluidität und verstärkter Bindung adhäsiver, RGD-beinhaltenender Liganden bemerkbar macht⁷². Zu der thrombozytären Hyperreagibilität tragen sicherlich auch metabolische Parameter bei, die beim Diabetes entgleist sind. Erhöhter Blutzucker ist hier ein starker Stimulus, der die Produktion von Thromboxan und Thrombin fördert und zur verstärkten Entstehung oxidativen Stresses und zur Bildung von AGEs (*advanced glycation end products*) führt. Diese Endprodukte tragen zur verstärkten Plättchenaktivierung und über spezifische Rezeptoren, sogenannten RAGEs (*Receptor for advanced glycation end products*), zur Endotheldysfunktion bei⁷³ (Abb.6).

Doch lässt sich die Thrombozytendysfunktion im Diabetes keineswegs allein auf die metabolische Komponente zurückführen, denn selbst bei gut eingestelltem Blutzucker kann eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung nachgewiesen werden ⁷⁴. Sogar bei gesunden Personen, die ein erhöhtes Risiko haben, einen Insulin-abhängigen Diabetes (IDDM) zu entwickeln, kann man eine vermehrte Plättchendysfunktion feststellen, noch bevor es metabolische Hinweise auf eine Pathologie gibt ⁷⁵.

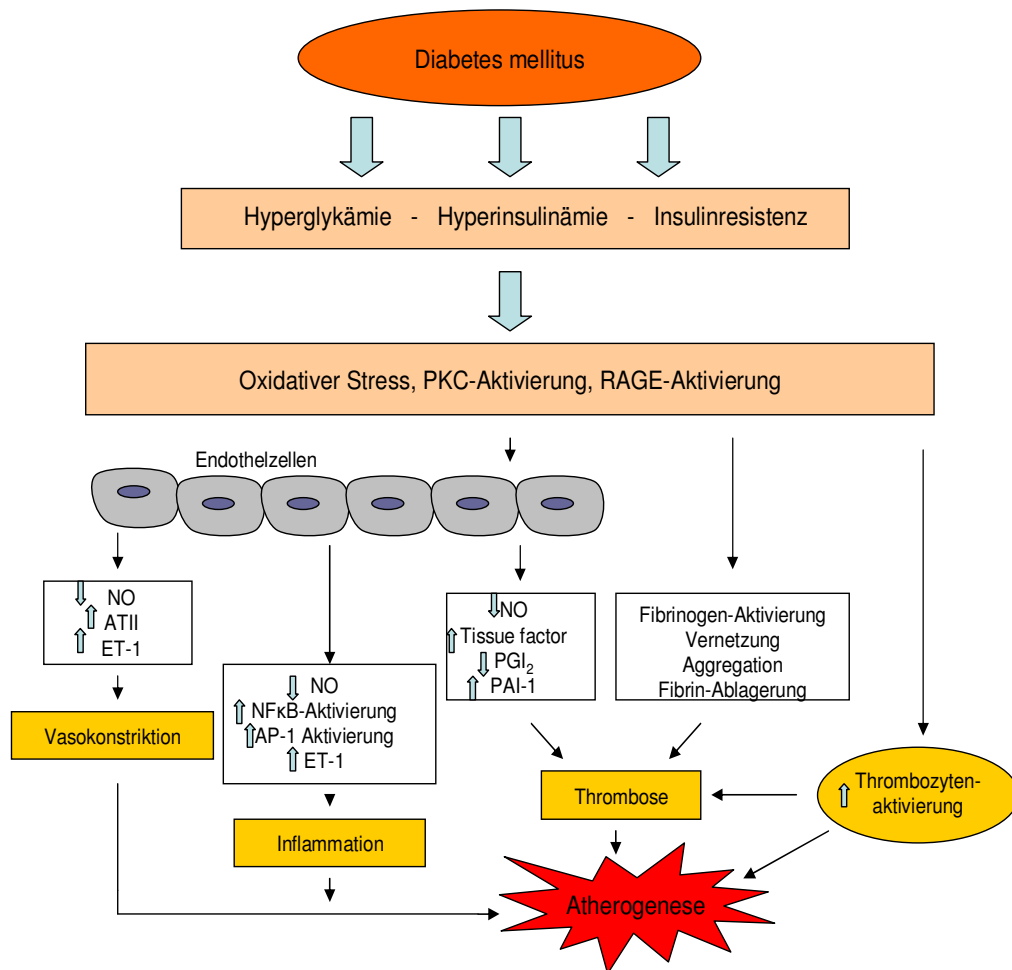


Abb.6: Durch das verstärkte Vorliegen oxidativen Stresses, Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie des Rezeptors für „advanced glycation end products“ (RAGE) führt die im Diabetes mellitus vorliegende metabolische Dysfunktion zur Aktivierung von Endothelzellen und Thrombozyten. Dies resultiert in einem pro-thrombotischen, pro-inflammatorischen Milieu und trägt zur Atheroskleroseentstehung bei. NO = Stickstoffmonoxid; NF-κB = nuclear transcription factor-κB; AP-1 = activator protein-1; PGI₂ = Prostacyclin; PAI-1 = Plasminogen Aktivator Inhibitor-1. (Aus: Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1282-1291.)

1.7 Stickstoffmonoxid – NO

Seit 1980, als unter anderem *Furchgott* und *Zawadzki* die Bedeutung von EDRF / NO auf die endothelabhängige Gefäßtonusregulation postulierten ²⁶, wurden viele weitere physiologische Bereiche beschrieben, in denen dieser Botenstoff wirkt. So beziehen sich die pleiotropen Effekte von NO nicht nur auf die Regulation des Gefäßtonus und des Blutdrucks über das Endothel, vielmehr spielt Stickstoffmonoxid unter anderem auch eine Rolle im ZNS als Neurotransmitter. In der Peripherie ist es an der neurogenen Gefäßdilatation beteiligt und reguliert sämtliche gastrointestinale, pulmonale und urogenitale Funktionen. Es trägt zur Kontrolle der Thrombozytenaggregation und kardialer Kontraktilität bei. Des Weiteren wird es in großer Menge im Rahmen von immunologischen Reaktionen aufgrund seines zytotoxischen Potentials unter anderem von aktivierten Makrophagen freigesetzt ⁷⁶. 1992 wurde es von der Zeitschrift *Science* zum „*Molecule of the year*“ gekürt, und gerade in den letzten Jahren explodiert geradezu die Anzahl der Veröffentlichungen über die Substanz, ganze Symposien und Journaltitel werden ihr gewidmet. Ein weiterer Höhepunkt war die Verleihung des Nobelpreises 1998 an *Furchgott*, *Ignarro* und *Murad* für ihre Verdienste um die Forschung über Stickstoffmonoxid ⁷⁷⁻⁷⁹.

1.7.1 L-Arginin-NO-cGMP-Signalweg

Die verstärkte Forschung nach der genaueren Identifikation von EDRF führte gegen Ende der 80er Jahre zur Entdeckung eines im Gefäß lokalisierten Enzyms, der NO-Synthase (NOS), das NO aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert ⁷⁶. NADPH, Flavin-Mononukleotide (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotide (FAD), Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Calcium-Calmodulin sind Kofaktoren, die für die NO-Synthese benötigt werden.

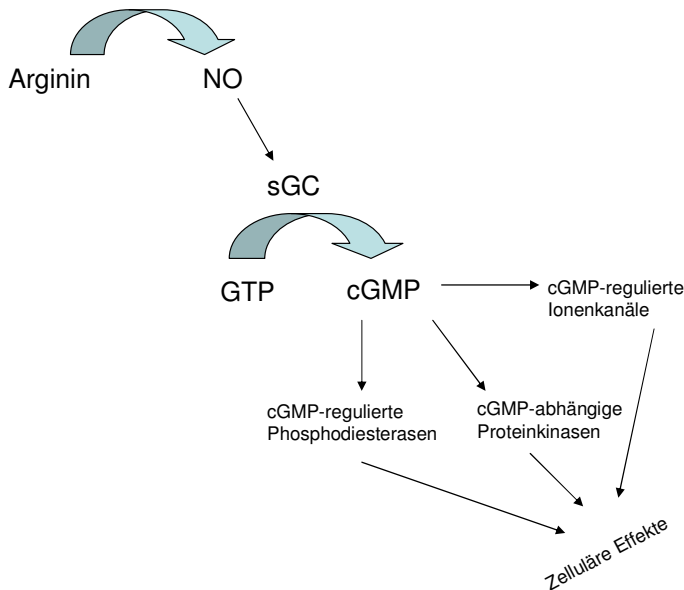


Abb. 7: *L-Arginin-NO-cGMP-Signalkaskade*. NO = Stickstoffmonoxid; sGC = lösliche Guanylatcyclase; GTP = Guanylyl-Triphosphat; cGMP = cyclisches Guanylyl-Monophosphat; (Aus: Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 2003;93:96-105.)

Mittlerweile kennt man drei verschiedene Isoformen des Enzyms, die zu 50% identische Aminosäuresequenzen aufweisen und die von unterschiedlichen Genen auf verschiedenen Chromosomen codiert werden⁸⁰. Zwei davon sind konstitutiv und eine ist durch immunologische Stimuli induzierbar (iNOS / NOS II). Die konstitutive NOS (cNOS), die als Erstes im Endothel entdeckt wurde, wird als eNOS (= NOS III) bezeichnet. Das im ZNS und im peripheren Nervensystem exprimierte Enzym wird nNOS (= NOS I) genannt. Allerdings ist die Einteilung in endotheliale, neuronale und induzierbare NO-Synthasen eine starke Vereinfachung, denn die Ausschließlichkeit der Lokalisation auf den benannten Gewebetypen ist keineswegs gegeben.

Eine Reihe von biochemischen und physikalischen Mediatoren stimuliert die Aktivierung der eNOS im Endothel. Dazu gehören die Ca²⁺-abhängigen Aktivatoren Acetylcholin / Bradykinin, Thrombin, Substanz P und ADP, sowie die Ca²⁺-unabhängig wirkende Schubspannung (*Shear stress*), isometrische und pulsatile Dehnung⁸¹⁻⁸⁵. Gerade diese kontinuierliche Aktivierung der NOS durch den Blutfluss an sich ist im Gefäß physiologisch bedeutsamer als die Calcium-abhängige Stimulation.

NO bleibt bis zu einer Temperatur von -152°C im gasförmigen Zustand ⁸⁶ und diffundiert relativ gut durch biologische Membranen ^{25;31;87}, das heißt es gelangt sowohl in die subendothelial gelegenen glatten Muskelzellen der Gefäße als auch in das Cytosol von Zellen, die endoluminal unmittelbare Nähe zum Endothel haben, also vor allem von Thrombozyten.

Die NO-sensitive Guanylatcyclase, die zur Differenzierung von einer weiteren, membrangebundenen Form auch lösliche oder cytosolische Guanylatcyclase (sGC) genannt wird, ist der wichtigste Rezeptor für NO und befindet sich in relativ hohen Konzentrationen vor allem in glatten Gefäßmuskelzellen, in Thrombozyten, aber auch in Lungen-, Nieren- und Hirngewebe ⁸⁸. Das Enzym hat eine prosthetische Häm-Gruppe, die als Bindungsstelle von NO dient. Dieser NO-Häm-Komplex führt zur Konformationsänderung und resultiert in einem bis zu 200fachen Anstieg der katalytischen Aktivität des Enzyms, nämlich zur Umwandlung von GTP zu cGMP. Der Anstieg von cGMP bewirkt die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen, Ionenkanälen und Phosphodiesterasen ⁸⁹⁻⁹² und führt somit letztlich unter anderem zur Relaxation glatter Muskelzellen ^{93;94} sowie zur Inhibition der Plättchenaggregation ^{95;78;79} (Abb.7/8).

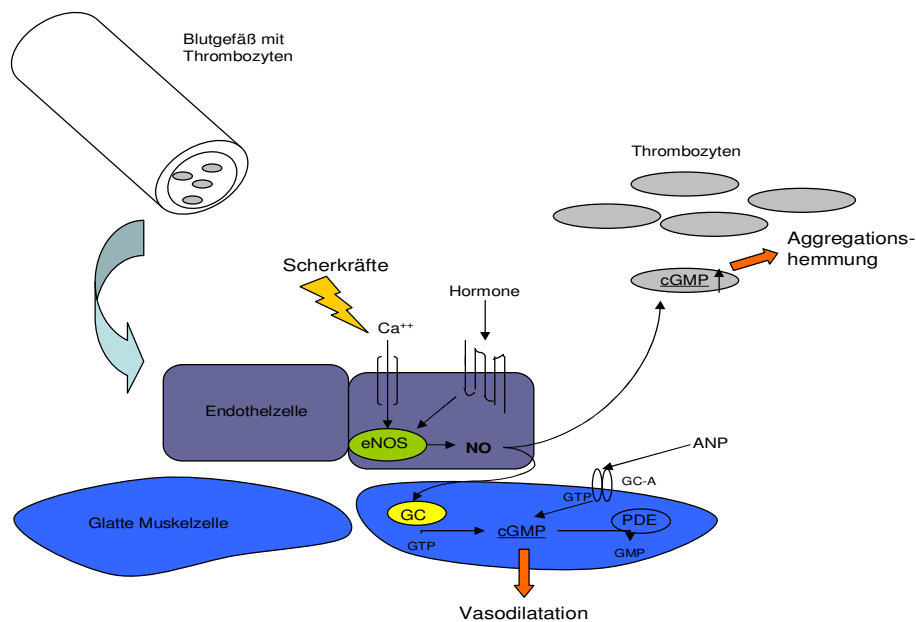


Abb.8: Rolle von cGMP in Gefäßmuskulatur und Thrombozyten

Voraussetzung für die NO-Bindung und die konsekutive Aktivierung der sGC ist allerdings das Vorliegen eines Häm-Eisen (II)-Komplexes, denn sobald das Häm wegfällt beziehungsweise das Häm-Eisen in oxidiertem Zustand [FeIII] vorliegt, kann NO das Enzym nicht mehr aktivieren⁹⁶.

Zusätzlich hat endothelial-gebildetes NO Einfluss auf Leukozyten-Chemotaxis, auf die Expression von vaskulären und leukozytären Adhäsionsmolekülen und letztlich auf die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand^{25;97} (Abb.9).

<u>Zielstrukturen und Wirkungen von NO</u>	
<u>Zielstrukturen</u>	<u>Wirkungen</u>
<i>Endothel</i>	<i>Regulation der Permeabilität</i>
	<i>Inhibition der Leukozytenadhäsion</i>
	<i>Verstärkte Migration</i>
	<i>Erhöhte Proliferation</i>
<i>Glatte Gefäßmuskulatur</i>	<i>Relaxation</i>
	<i>Hemmung der Proliferation</i>
	<i>Verminderte Migration</i>
<i>Thrombozyten</i>	<i>Reduktion der Aktivierung</i>
	<i>Verminderte Aggregation</i>
	<i>Abgeschwächte Adhäsion</i>
<i>Leukozyten</i>	<i>Hemmung der Adhäsion</i>
	<i>Verhinderung von Diapedese</i>

Abb.9: Zielstrukturen und Wirkungen von NO (Aus: Russo G, Leopold JA, Loscalzo J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vasc Pharmacol.* 2002;38:259-269.)

Mit dem durchflusszytometrischen Nachweis der NO / Prostacyclin-abhängigen Phosphorylierung des Phosphoproteins VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein), das in hohen Konzentrationen in Thrombozyten vorhanden ist, wurde es möglich, direkt den Einfluss endothelialen NOs auf Blutplättchen zu bestimmen⁹⁸ (Abb.10). Dies fand auch in dieser Arbeit Anwendung.

VASP ist ein intrazelluläres, 46-50-kD großes Protein, welches eine Schlüsselposition bei den beiden wichtigsten inhibitorischen Signalwegen einnimmt. Die Phosphorylierung von VASP an den Positionen Serin-157, Serin-239 und in geringerem

Ausmaß auch von Threonin-278 als Antwort auf die Einwirkung der durch cyclische Nucleotide regulierten Aktivierungs-Antagonisten NO und Prostacyclin korreliert mit der Plättcheninhibition und geht mit abgeschwächter Fibrinogen-Bindung und verminderter Thrombozytenaggregation einher⁹⁹⁻¹⁰¹.

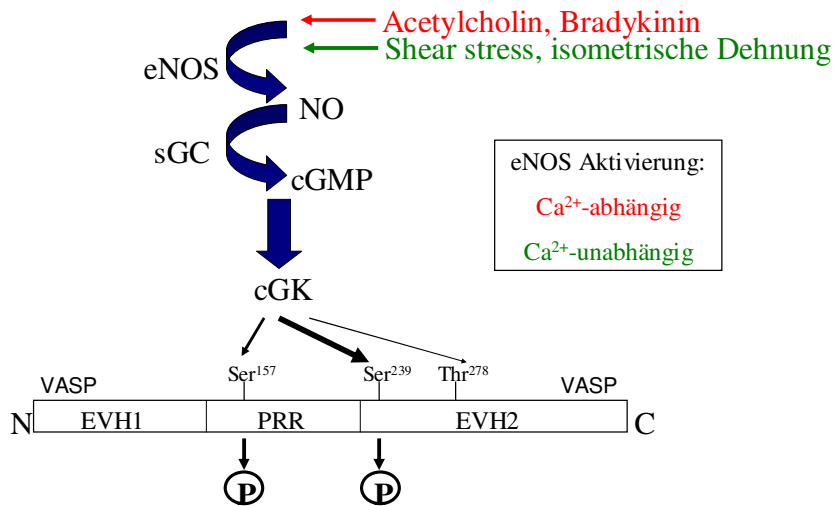


Abb. 10: Mechanismus der VASP-Aktivierung (VASP = Vasodilator-stimulated phosphoprotein)

(Aus: Schafer A, Widder J, Eigenthaler M, Ertl G, Bauersachs J. Reduced basal nitric oxide bioavailability and platelet activation in young spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:2273-2279.)

1.7.2 NO-Defizienz bei Diabetes mellitus

Es sind zahlreiche Faktoren bekannt, die bei Diabetes zu einer verringerten endothelialen NO-Bioverfügbarkeit führen. Zu dieser Reduktion trägt oxidativer Stress bei, insbesondere in Form von Superoxid-Anionen (O₂⁻), welche im Endothel als auch in den glatten perivaskulären Muskelzellen verstärkt gebildet werden¹⁰². Die vermehrte Produktion dieser reaktiven Sauerstoffradikale durch hochregulierte Xanthin- und vor allem NAD(P)H-Oxidasen²⁶ wird durch sämtliche kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und eben Diabetes, wobei in diesem Fall der erhöhte Blutzuckerspiegel eine entscheidende Rolle spielt¹⁰³, verantwortet¹⁰⁴.

Superoxid reagiert bevorzugt mit NO zu Peroxynitrit (ONOO⁻), das wiederum einen essentiellen Kofaktor der eNOS, Tetrahydrobiopterin (BH₄), oxidiert und somit zu einer Veränderung des Enzyms, der sogenannten eNOS-Entkopplung (= *eNOS-uncoupling*) führt. Zu einer solchen Entkopplung kann es auch beim Fehlen des Ausgangssubstrates L-Arginin kommen ^{105;106}.

Trotz einer verstärkten eNOS-Expression im diabetischen Endothel ^{107;108} kommt es durch die Entkopplung, die auch bei anderen Risikofaktoren für Atherosklerose, wie zum Beispiel Bluthochdruck und Hypercholesterinämie zu beobachten ¹⁰⁹ ist, zur Veränderung des Endsubstrates, nämlich vom vasoprotektiven NO hin zur Produktion gefäßschädlichen Superoxids durch die eNOS selbst ¹¹⁰ (Abb.11).

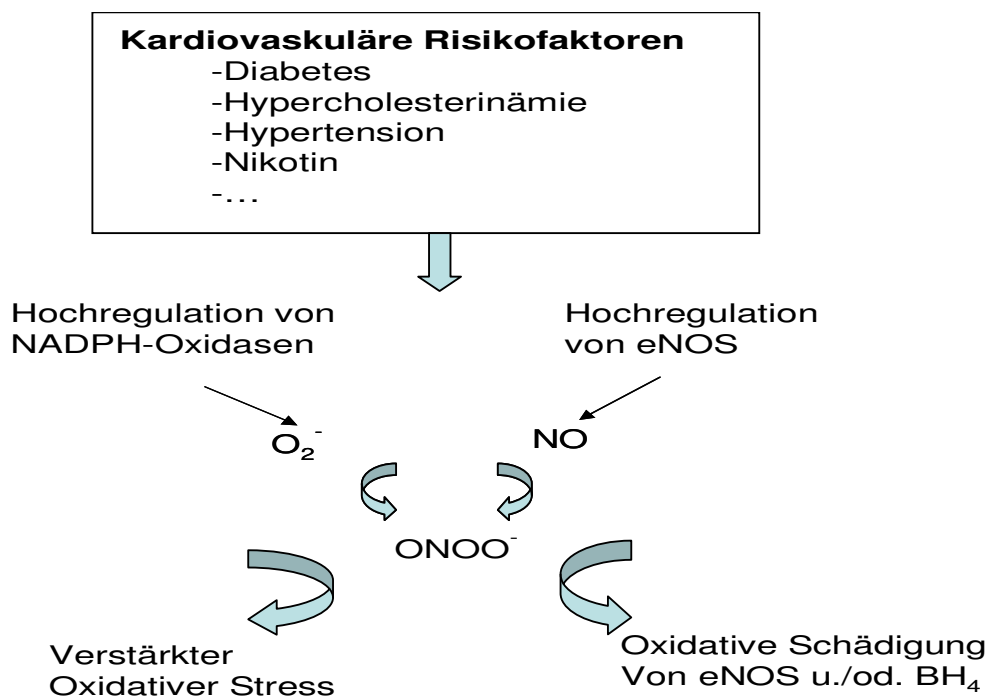


Abb.11: Potentielle Mechanismen durch die kardiovaskuläre Risikofaktoren zu endothelialer Dysfunktion führen. Oft sind sowohl NADPH-Oxidasen als auch eNOS hochreguliert. Deren Produkte fügen sich zu ONOO⁻, welches BH₄ oxidiert bzw. der eNOS direkt oxidativen Schaden zufügt. Auf diese Weise wird die funktionale NOS in ein dysfunktionales, Superoxid-produzierendes Enzym umgewandelt, welches selbst zur vaskulären Schädigung beiträgt. (Aus: Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113:1708-1714.)

1.7.3 Therapeutische Beeinflussung des NO/cGMP-Signalwegs

Wie beschrieben spielt die verminderte Bioverfügbarkeit von NO eine entscheidende Rolle in Bezug auf den Gefäß- und Thrombozytenstatus beim Diabetes mellitus. Daraus ergibt sich die Frage, mit welchen therapeutischen Maßnahmen in das NO-System eingegriffen werden kann.

Die wohl populärsten sGC-aktivierenden Medikamente sind die organischen Nitrate. Sie werden vor allem zur Angina pectoris -Behandlung eingesetzt und substituieren das Defizit an endogenem NO. Als nachteilig erwies sich jedoch bei dieser Therapie das Fehlen klinisch relevanter antithrombozytärer Effekte⁹⁰, sowie die Entwicklung einer Toleranz des NO-Rezeptors nach mehrmaliger Einnahme des Medikaments. Dieser Gewöhnungseffekt ist womöglich bedingt durch Veränderungen bezüglich enzymatischer Metabolisierung, einer verstärkten Inaktivierung von NO durch vermehrte Superoxidbildung¹¹¹ oder anderer entgegensteuernder Mechanismen. Die eben erwähnte Superoxidbildung wird durch das Vorliegen einer Dysfunktion des Enzyms, dem sogenannten „*eNOS uncoupling*“, das in einigen kardiovaskulären Erkrankungen vorliegt, verstärkt. Das Enzym produziert dann selbst Superoxide und zeigt eine vermehrte Produktivität¹¹²⁻¹¹⁴. Deshalb richtet sich die Aufmerksamkeit immer mehr auf eine neue Gruppe von Medikamenten, die die sGC über andere Mechanismen aktivieren können. Die erste Substanz dieser Klasse der sGC-Aktivatoren, YC-1, zum Beispiel hat die Fähigkeit, die sGC NO-unabhängig zu stimulieren beziehungsweise das NO-Restsignal zu verstärken, weshalb YC-1 auch als „*NO-sensitizer*“ bezeichnet wird. Vom Wirkprinzip her sehr ähnlich, von der Potenz jedoch nochmals stärker ist BAY 41-2272. BAY 58-2667 ist ebenfalls ein sGC-Aktivator, der allerdings im Gegensatz zu NO, YC-1 und BAY 41-2272 das Enzym sowohl im oxidierten Zustand als auch ohne das Vorhandensein der Häm-Gruppe aktivieren kann^{90;115}. Vorteile ergeben sich bei diesen Substanzklassen insbesondere bezüglich der antithrombozytären Eigenschaften, da sie durch die Elevation intrazellulärer cGMP-Spiegel zu einer breit gefächerten Inhibition thrombozytärer Funktionen, einschließlich Adhäsion, Degranulation, Aggregation und verminderter Expression proinflammatorischer Oberflächenmoleküle, also zur Prävention der

Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen unter anderem im Diabetes , maßgeblich beitragen.

1.7.4 Ataciguat (HMR 1766)

Ataciguat gehört ebenfalls zur neuen Substanzgruppe direkter sGC-Aktivatoren (Abb.12). Es kann das Enzym, ähnlich wie BAY 58-2667, sowohl unabhängig von NO beziehungsweise unabhängig vom Vorhandensein der Häm-Gruppe als auch im oxidierten Zustand des Eisens [Fe(III)] aktivieren.

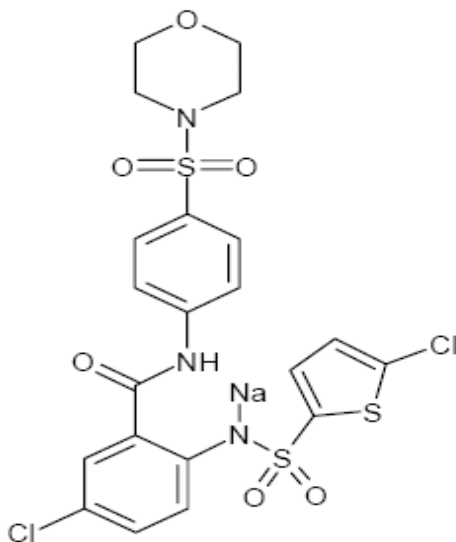


Abb.12: Strukturformel des Anthranilinsäure – Derivates Ataciguat (Aus : Schindler U , Strobel H , Schonafinger K, Linz W, Lohn M, Martorana PA, Rutten H, Schindler PW, Busch AE, Sohn M, Topfer A, Pistorius A, Jannek C, Mulsch A. *Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. Mol Pharmacol. 2006; 69: 1260-1268).*

Eine Arbeit von Witte *et al.* aus dem Jahre 2004 weist bereits auf die Möglichkeit hin, dass genau dieser oxidierte Zustand der sGC, der eine Desensibilisierung gegenüber NO darstellt und zum Beispiel durch vermehrtes Vorhandensein von Sauerstoffradikalen

verursacht sein könnte, im Diabetes für das verminderte Ansprechen von Aortenringen auf exogenes NO in Betracht gezogen werden kann¹¹⁶. Ataciguat ist also eine viel versprechende Substanz, die in pathologischen Veränderungen seitens der Gefäße, speziell beim Vorliegen Häm-oxidierter, desensibilisierter sGC, durch die Möglichkeit des Funktionserhaltes des Enzyms die vorliegende endotheliale Dysfunktion beeinflussen kann.

Wie bereits erwähnt, tragen Thrombozyten maßgeblich zur Entwicklung pathologischer vaskulärer Veränderungen im Diabetes bei. Da auch sie große Mengen an sGC, also potentieller Angriffspunkte für Ataciguat, verfügen, wird im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Ataciguat auf die Thrombozytenaktivierung im Diabetes untersucht.

2. Methodik

2.1 Tiere

Männliche Wistar Ratten (250-300g, Harlan-Winkelmann, Borchon, Deutschland) (Abb.13) wurden in Käfigen gehalten, in denen sie freien Zugang zu Wasser und angemessenem Futter hatten. Die Umgebungstemperatur betrug 20-22°C, ein 12stündiger Tag-Nacht- (= Hell-Dunkel-) Rhythmus wurde eingehalten.



Abb.13: Wistar-Ratte

Der Gebrauch dieser Versuchstiere entspricht internationalen Standards sowie dem deutschen Tierschutzgesetz und wurde vom Tierschutzbeauftragten der Universität Würzburg überwacht.

2.1.1 Diabetesinduktion durch Streptozotocin (STZ)

Durch eine einzelne intravenöse Injektion von Streptozotocin (STZ; 50mg/kg Körpergewicht [KG] i.v.) wurde die Zerstörung der pankreatischen Inselzellen und dadurch eine anhaltende Hyperglykämie erreicht.

STZ (10mg/mL, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde vor der jeweiligen Anwendung frisch in sterilem Natrium-Citrat-Puffer (0.025mol/L, pH 4.5) gelöst und binnen 10 Minuten unter Isofluran-Narkose verabreicht.

Der Blutzuckerspiegel wurde zwei Wochen nach der Injektion durch ein Blutzuckermessgerät Ascensia Elite (Bayer-Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) kontrolliert. Hierfür wurde ein Blutstropfen durch Anritzen des Schwanzes und der darin verlaufenden Vene mittels Skalpell gewonnen. Das Vorhandensein des Diabetes mellitus wurde konstatiert, wenn sowohl der nach 2 als auch der nach 4 Wochen gemessene Blutzuckerspiegel, wobei letzterer kurz nach der finalen Blutentnahme bestimmt wurde, über 20mmol/L (= 360mg/dL) betrug.

Die Einteilung der Tiere in eine Placebo- bzw. Ataciguat-behandelte Gruppe erfolgte randomisiert.

2.1.2 Ataciguat -Behandlung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den Auswirkungen der chronischen Stimulation der sGC durch Ataciguat auf die Thrombozytenaktivierung bei vorliegendem Diabetes. Jedoch ist es naheliegend, in diesem Zusammenhang auch ein Auge auf die etwaigen Auswirkungen nach Akut-Gabe des Medikaments auf Thrombozyten zu werfen, weshalb im Rahmen dieser Arbeit auch einige Versuche zu dieser Fragestellung durchgeführt wurden.

2.1.2.1 *In vitro*-Inkubation

Zur Untersuchung von *in vitro*-Wirkungen von Ataciguat wurde bereits gewonnenes PRP (Herstellung siehe unten) für 5 Minuten mit dem sGC-Aktivator (10 μ mol/L) inkubiert. Anschließend wurden sowohl durchflusszytometrische als auch aggregometrische Messungen durchgeführt.

2.1.2.2 Akut-Gabe

Ob Ataciguat auch nach einmaliger Gabe eine Wirkung zeigen würde, wurde getestet, indem sowohl einigen Kontroll- als auch diabetischen Tieren eine einmalige Dosis des Medikaments verabreicht (10mg/kg Körpergewicht über Schlundsonde) und bereits 2 Stunden später die Blutentnahme, wie weiter unten beschrieben, durchgeführt wurde. Bei einigen dieser Versuche wurde das Material zusätzlich mit dem NO-Donor DEA-NONOate (1µmol/L) 10 Minuten vor der anschließenden Fixation (siehe unten) stimuliert.

2.1.2.3 Chronische Verabreichung

Die Ataciguat-Medikation (Sanofi-Aventis, Frankfurt/Main, Deutschland) mittels Sondenfütterung (10mg/kg Körpergewicht, 2x täglich) wurde nach 2wöchigem Vorliegen des Diabetes begonnen. Dabei wurde ein 12stündiger Abstand zwischen den beiden täglichen Applikationen des Wirkstoffes eingehalten, um einen konstanten Blutspiegel des Medikaments zu erreichen. Nach weiteren zwei Wochen, also nach 2wöchiger Medikamenten-Gabe, wurde durch Blutentnahme aus der Vena cava inferior Material für durchflusszytometrische Messungen gewonnen. Um eine mögliche Beeinflussung der Messergebnisse durch Akut-Effekte der Substanz zu vermeiden, wurde den Tieren letztmalig 12 Stunden vor der Tötung die entsprechende Behandlung verabreicht.

2.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der Blutplättchen



Abb.14: FACSCalibur, Becton Dickinson

Die „FACS“- Analyse (FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorter, Abb.14) gehört heutzutage zu einer der Standardmethoden in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik. Das in den späten sechziger Jahren entwickelte Verfahren ermöglicht es, Einzelzellen bzw. Zellpopulationen nach bestimmten Eigenschaften zu charakterisieren ¹¹⁷. Durch die Verwendung von mit Fluorochromen markierten monoklonalen Antikörpern erfolgt der Nachweis thrombozytärer Membranglykoproteine beziehungsweise intrazellulärer Effektorproteine mittels typischer Absorptions- / Emissionsmuster bestimmter Wellenlängenbereiche. Diese charakteristischen Lichtspektren können durch Laserdetektion der an den Antikörpern gebundenen fluoreszierenden Substanzen erzeugt und erfasst werden. In dieser Arbeit kamen hierbei nur Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierte Antikörper zum Einsatz. Es gibt jedoch ein relativ breites Spektrum an sogenannten Fluorochromen, wovon jedes einen optimalen Detektions-Lichtwellenbereich besitzt. Die Absättigung der Proben durch Antikörper-Hinzugabe wird durch die Wahl hoher Inkubationskonzentrationen erreicht, was dann später bei der durchflusszytometrischen Messung idealerweise ein deutliches Signal zur Folge hat.

Die Charakterisierung der Thrombozytenpopulation als solche erfolgte zunächst durch die Detektion der für diese Zellen typischen Lichtphänomene, die bei einem konstanten Fluss durch einen Laserstrahl (488nm Wellenlänge) durch spezifische Photodioden registriert wurden. Das Vorwärtsstreulicht („*foreward scatter*“, FSC, Lichtbeugung) ist proportional zur Zelloberfläche, stellt also die Zellgröße dar, während das Seitwärtsstreulicht („*side scatter*“, SSC, Lichtbrechung und Reflexion) proportional zur Zellkomplexität oder –granularität ist. Gleichzeitig zu diesen beiden Parametern wird durch die Antikörperfärbung auch noch die Fluoreszenz-Intensität der Zellen gemessen. Hierdurch wird also binnen kürzester Zeit sowohl eine Zellpopulation bestimmt als auch deren Eigenschaften klassifiziert (Abb.15).

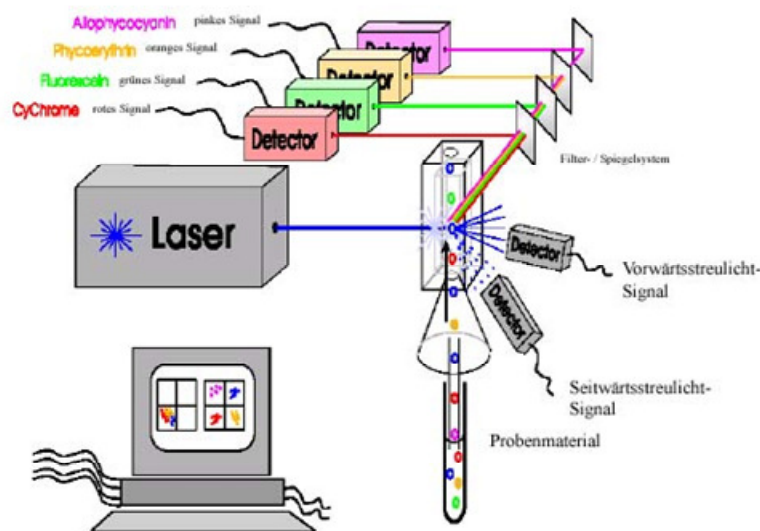
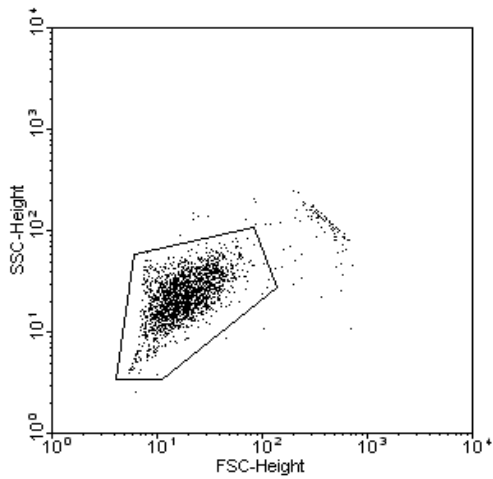


Abb.15: Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie: Charakterisierung einer mit Antikörpern gefärbten Probe: mittels Laserdetektion werden für den jeweiligen Antikörper charakteristische Lichtspektren erfasst und zudem die Zellpopulation durch spezifische Lichtphänomene charakterisiert.

In der Auswertung wurden jeweils zunächst Diagramme erstellt, in denen FSC- und SSC-Intensität gegeneinander aufgetragen wurden. Bei dieser Darstellung entspricht jeder Punkt genau einer Zelle. Gleichzeitig wurden Histogramme generiert, bei denen auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität logarithmisch abzulesen und auf der Ordinate die Anzahl der mit Farbstoff markierten Zellen zu sehen ist (Abb.16).

a)



b)

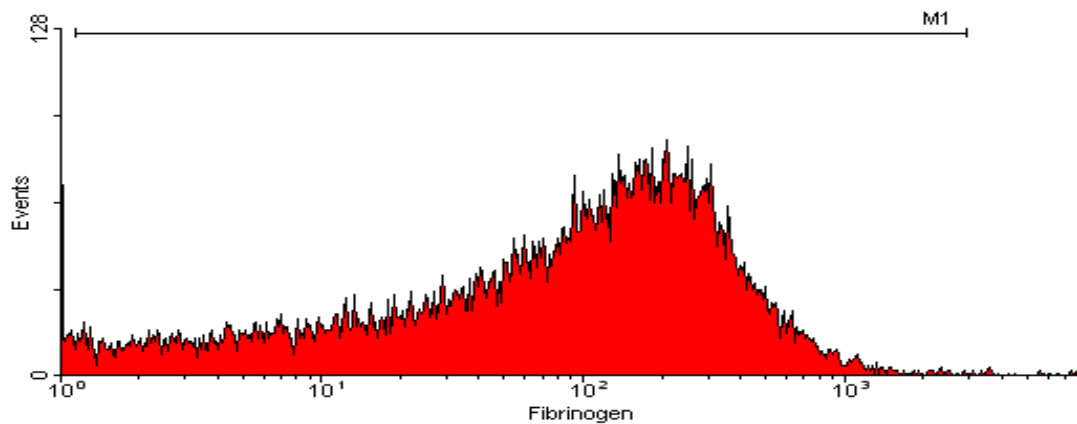


Abb.16: Originalabbildungen von durchflusszytometrischen Auswertungsdiagrammen; a) Dotplot mit Thrombozyten-Gate; b) Histogramm von einer mit Fibrinogen-Antikörper markierten Probe

Alle durchflusszytometrischen Messungen innerhalb dieser Arbeit erfolgten an einem FACSCalibur (Becton-Dickinson) bei niedriger Flussrate. Die zu messende Thrombozytenzahl innerhalb des vorher festgelegten „Thrombozyten-Gates“ wurde auf 20.000 festgelegt.

2.2.1 Thrombozytäre Aktivierungsmarker

Wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist, gibt es eine Vielzahl von Aktivatoren, die an Rezeptoren von Thrombozyten binden und eine initiale Aktivierung auslösen können (Abb.17).

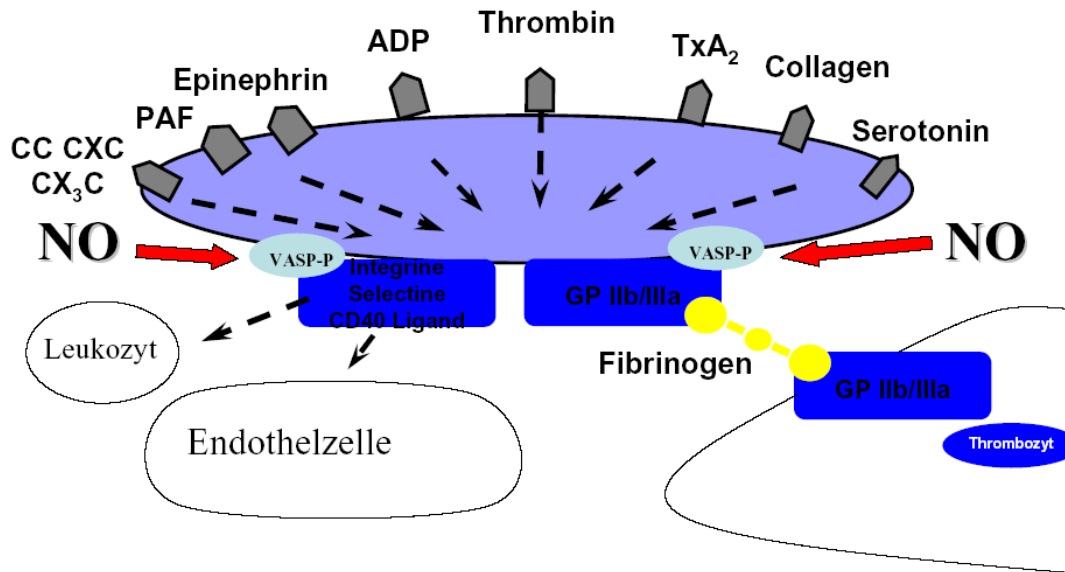


Abb.17: Thrombozytäre Aktivierungsmarker: eine Vielzahl von Aktivatoren ist in der Lage, an bestimmte thrombozytäre Rezeptoren zu binden und eine Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen bzw. eine Konformationsänderung von Rezeptoren und somit eine Plättchenaktivierung hervorzurufen. Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung durch erhöhte Bioverfügbarkeit von NO und daraus resultierender VASP-Phosphorylierung.

Diese Aktivierung resultiert hauptsächlich in zwei Effekten:

1. In der Konformationsänderung von GPIIb/IIIa, das am nicht aktivierten Thrombozyten im niedrigaffinen Funktionszustand vorliegt und somit kein lösliches, plasmatisches Fibrinogen binden kann, hin zum aktivierten, hochaffinen Funktionszustand des Rezeptors. Erst gebundenes Fibrinogen ermöglicht die Brückenbildung zwischen aktivierten Plättchen und eine konsekutive Aggregation.
2. In der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selectin oder CD40-Ligand; durch die Integrin-, Selektin-, bzw. CD40L-Expression wird die Adhäsion an Leukozyten und Endothelzellen ermöglicht, was im Rahmen dieser

Arbeit zur Messung von Thrombozyten-Zell-Aggregaten mit Hilfe der CD42d-Bestimmung genutzt wurde.

Die Abbildung zeigt außerdem die enge Beziehung zwischen Plättchen-Aktivierung und Anwesenheit von NO. Durch eine erhöhte Bioverfügbarkeit von NO und der daraus resultierenden VASP-Phosphorylierung kann demnach die Thrombozyten-Aktivierung beeinflusst werden.

Um die eben beschriebene Abhängigkeit der Aktivierungsmarker vom Ausmaß der VASP-Phosphorylierung zu betrachten, wurde parallel zur VASP-Phosphorylierung auch die Anwesenheit einiger auf der Thrombozytenoberfläche exprimierter Aktivierungsmarker bestimmt:

Fibrinogen als Bindungssubstrat von GPIIb/IIIa, CD62P und CD42d;

Zur Messung des Liganden von GPIIb/IIIa, Fibrinogen, wurde ein spezifischer Antikörper verwendet, durch den ein bereits hochaffiner, aktivierter Zustand des Rezeptors vorausgesetzt werden konnte.

P-Selectin (CD62P) ist ein Glykoprotein, das in den α -Granulae von Thrombozyten intrazellulär vorliegt und während der Sekretion im Rahmen einer Aktivierung an die Membranoberfläche transloziert wird. Durch die Detektion dieses Proteins konnte von einer verstärkten Degranulation ausgegangen werden.

CD42d (GPV) ist ein Bestandteil des CD42a-d-Komplexes, der als Rezeptor für den *von Willebrand Faktor* und Thrombin fungiert. Er vermittelt unter anderem die unter hohen Scherkräften stattfindende Plättchenadhäsion an die subendotheliale Matrix, die bei endothelialer Schädigung freigelegt wird. Während P-Selectin sowie gebundenes Fibrinogen neben Blutplättchen auf unterschiedlichen Zellpopulationen, unter anderem auch auf Endothelzellen, nachzuweisen sind, ist CD42d ein Marker, der nur auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert wird und sich demzufolge zur eindeutigen Identifikation dieser Blutbestandteile eignet.

2.2.2 Blutentnahme

Das Abdomen der Versuchstiere wurde in tiefer Narkose, die mittels Isofluran-Inhalation erreicht wurde, eröffnet. Die Blutentnahme in 3mL-Citrat-Röhrchen (3.8% Natrium-Citrat) erfolgte durch Punktion der Vena cava inferior, die nach Durchtrennung der Muskelschichten und Seitverlagerung der Darmschlingen freigelegt wurde.

2.2.3 Probenaufbereitung für Messungen im Vollblut

Das gewonnene Citrat-Vollblut wurde mit PBS (Ca^{2+} - und Mg^{2+} - frei, angereichert mit D-Glucose [5.5mmol/L] und 0.5% BSA) verdünnt. Insgesamt wurden fünf verschiedene thrombozytäre Marker mittels Zugabe von spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch gemessen (Abb.18).

Die Bestimmung des an den Thrombozyten gebundenen Fibrinogens erfolgte durch 10-minütige Inkubation der entsprechenden Probe mit einem FITC-markierten Anti-Fibrinogen-Antikörper (WAK-Chemie, Bad Soden, Deutschland) bei 37°C.

Um die Expression des Oberflächenproteins P-Selectin zu messen, wurde verdünntes Vollblut mit einem polyklonalen Kaninchen Anti-P-Selectin (CD62P)-Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ebenfalls 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf folgte die Hinzugabe eines Sekundäntikörpers, nämlich eines FITC-markierten Ziegen Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania). Bei den CD62P- gefärbten Proben erfolgte die Präparation einer zusätzlichen, jeweils nur mit dem Sekundäntikörper markierten Vergleichsprobe, um bei der anschließenden durchflusszytometrischen Messung die unspezifische Bindung des jeweiligen Sekundäntikörpers bestimmen zu können.

Außerdem wurde ein Anti-Ratten CD42d monoklonaler FITC-gekoppelter Antikörper (Becton Dickinson) verwendet. CD42d gilt als Plättchen-spezifischer Marker und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Detektion zirkulierender Thrombozyten-Zell-Aggregate (PCA) und thrombozytärer Mikropartikel (PMP) verwendet. Um auch hier die Verfälschung der Messergebnisse durch unspezifische Bindung des Antikörpers zu

vermeiden, wurde eine zusätzliche Kontrolle mit einem FITC-gekoppelten Maus IgG_{2a} monoklonalen Isotyp-Kontroll-Antikörper markiert.

Zusätzlich erfolgte eine *in vitro*-Stimulation einer gesonderten Probe mit ADP (10 μM), um einen etwaigen Anstieg der PCA beziehungsweise PMP detektieren und somit Aussagen zur Reaktivität der Plättchen auf äußere Reize hin treffen zu können. Hierzu wurde ADP in entsprechender Konzentration vor der CD42d-Antikörper-Färbung zum Vollblut hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug 5 Minuten. Anschließend wurde mit den Proben wie bereits beschrieben verfahren.

Nach entsprechender Inkubationszeit der jeweiligen Messproben wurden die in den Vollblutproben enthaltenen Thrombozyten mit Methanol-freiem Formaldehyd (1.5%) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend an einem Becton Dickinson FACSCalibur bei niedriger Flussrate analysiert.

Ein gesondertes Protokoll war für die Vorbereitung von Proben für die anschließende FACS-Messung von phosphoryliertem VASP nötig, da sich dieses Protein im Inneren der Plättchen befindet. Zur intrazellulären Färbung wurden die Blutproben zunächst mit Methanol-freiem Formaldehyd (1.5%) 5 Minuten lang fixiert, dann mit Triton X100 (2% Finalkonzentration) über 10 Minuten permeabilisiert und schließlich mit PBS verdünnt. Nachdem die vorbereitete Probe in zwei Fraktionen aufgeteilt worden war, fand die eigentliche Antikörper-Färbung statt. Hierfür wurde jeweils eine der Proben bei Raumtemperatur 45 Minuten lang mit dem entsprechenden Antikörper markiert.

Dies geschah durch die Zugabe von FITC-markierten Antikörpern gegen phosphoryliertes VASP Ser²³⁹ (16C2 Antikörper [500 μg/mL], nano tools, Tenningen, Deutschland) beziehungsweise gegen phosphoryliertes VASP Ser¹⁵⁷ (5C6 Antikörper [500 μg/mL] nano tools). Zu der 16C2- bzw. 5C6- markierten Probe wurde jeweils eine zugehörige Probe vorbereitet, bei der der jeweilige FITC-gekoppelte Antikörper mit einer absättigenden Dosis eines spezifisch blockierenden Phospho-Peptids mindestens 30 Minuten bei 4°C vorinkubiert worden war. Die Vorbereitung dieser Kontrollen erfolgte, wie auch schon bei der Färbung mit anderen Antikörpern erwähnt wurde, um die unspezifische Bindung, die willkürlich auf eine mittlere Fluoreszenz des Wertes 10 gesetzt wurde, zu berücksichtigen und einen Vergleich zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen zuzulassen.

Thrombozytenfärbungen zur durchflusszytometrischen Analyse

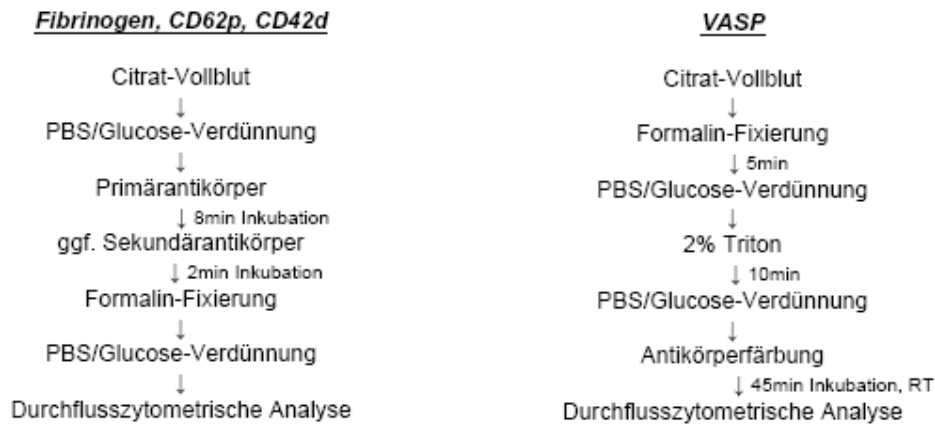


Abb.18: Schema für Thrombozytenfärbungen zur durchflusszytometrischen Analyse

2.2.4 Gewinnung von Thrombozyten-reichem Plasma (platelet rich plasma / PRP) zu Stimulationszwecken

Ein großer Vorteil der durchflusszytometrischen Messung von Vollblutproben ist, dass nur kleinste Mengen an Probenmaterial benötigt werden. Hieraus ergab sich die Gelegenheit, aus dem verbleibenden Vollblut (aus einem ca. 250g schweren Tier gewinnt man durchschnittlich 9mL Blut) zusätzlich PRP herzustellen.

Dies geschah durch Zentrifugation des Citrat-Vollblutes (12min, 180g, Eppendorf-Centrifuge 5415C), das in 1,5mL - Portionen in Eppendorf-Cups aufgeteilt wurde. Danach konnte der Überstand in Form von PRP abpipetiert und in einem 15mL Falcon-Röhrchen gesammelt werden. Vor der *in vitro*-Stimulation wurde eine Inkubations- und Ruhezeit des gewonnenen Materials von 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad berücksichtigt. Zur Detektion der Stimulation des PRP wurden Anti-Fibrinogen und Anti-P-Selectin-Antikörper verwendet.

Vor der jeweiligen Antikörper-Inkubation fand eine Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an ADP (5µM und 10µM) statt. Die Proben, eine unstimulierte und die beiden mit dem Induktor versehenen Proben, befanden sich hierfür in Glasküvetten und wurden durch einen kleinen Magneten bei 37°C 6 Minuten lang gerührt. Danach wurde das Material analog der oben beschriebenen Vollblut-Methode weiterverarbeitet.

Zur Untersuchung von *in vitro*-Wirkungen von Ataciguat auf den Phosphorylierungsstatus von VASP wurde bereits gewonnenes PRP für 5 Minuten mit dem sGC-Aktivator (1µmol/L) inkubiert und zum Teil anschließend zusätzlich mit dem NO-Donor DEA-NONOate (1µmol/L) stimuliert.

2.2.5 Durchflusszytometrische Messung der vorbereiteten Proben

Die Analyse der Proben fand an einem FACSCalibur von Becton Dickinson bei niedriger Flussrate statt. Die Thrombozytenpopulation konnte durch Einstellung eines bestimmten Gates, welches die charakteristische Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht-Eigenschaften dieser Blutzellen berücksichtigte, identifiziert werden. Innerhalb dieses Gates war die Detektion von 20.000 Plättchen nötig, bevor die jeweilige Messung abgeschlossen wurde. Die Analyse der mittleren Fluoreszenz fand unter Benutzung von CELLQuest Software, Version 3.1f statt.

Der Leerwert im Falle von Fibrinogen bzw. die unspezifische Bindung der Antikörper wurde durch entsprechend vorbereitete Proben willkürlich auf eine mittlere Fluoreszenz von 10 eingestellt und letztlich optisch von den eigentlichen Messgraphen subtrahiert. Im Rahmen der Studie erlaubte dies den Vergleich von Blutproben verschiedener Zeitpunkte untereinander.

Zur Bestimmung der Thrombozyten-Zell-Adhäsion (PCA) wurde die Leukozyten- bzw. Erythrozytenpopulation durch die für diese Zellen typische Vorwärts-Seitwärts-Streulicht-Verteilung charakterisiert. Alle CD42d-positiven Ereignisse innerhalb dieser Population wurden als Plättchen-Zell-Aggregate gewertet. Auch hier wurde die Erfassung von 20.000 Zählern innerhalb des Gates als Messendpunkt vorgegeben.

Die Messung von thrombozytären Mikropartikeln (PMP) erfolgte durch die Registrierung aller Zellen in der Vollblutprobe so lange, bis im Plättchen-Gate 20.000 Thrombozyten gezählt wurden. Mikropartikel wurden anschließend durch ein FSC- und SSC-Gate charakterisiert, welches auf jeder Achse kleiner als 10 war, was bedeutet, dass sie außerhalb jeglicher definierter Zellpopulation lagen. Die zweite Voraussetzung, die diese Zellbestandteile erfüllen mussten, war die CD42d-Positivität innerhalb der Mikropartikel-Region. Die Summe der PMP wurde letztendlich prozentual als das

Verhältnis CD42d-positiver Mikropartikel zu allen CD42d-positiven Ereignissen ausgedrückt.

2.3 Aggregometrische Untersuchung von Thrombozyten



Abb.19: 8-Kanal Aggregometer (Mölab, PAP-8E)

Um die Stärke der Aggregation von Thrombozyten auf verschiedene Stimuli zu messen, wurde eine der gebräuchlichsten Methoden angewandt: das Verfahren nach *Born*, 1962 erstmalig beschrieben¹¹⁸. Hierbei wird die Änderung der Lichtdurchlässigkeit der Proben durch Zugabe von aggregationsauslösenden Induktoren genutzt.

Es basiert auf folgendem Prinzip: Durch Verwendung einer geeigneten Referenzprobe, PPP (= platelet poor plasma) bei Versuchen mit PRP (= platelet rich plasma), die in den Messkanal eingebracht wird, wird der optische Wert, also die Lichtdurchlässigkeit im Falle einer 100%igen Aggregation, festgelegt. Das anschließende Einbringen der Partikelsuspension, also der eigentlichen Messprobe, stellt dann zunächst den Nullwert dar.

Ein Messkanal besteht aus einer Lichtquelle und einer gegenüberliegenden Photozelle, zwischen die die jeweilige Probe gestellt wird. Diese befindet sich in einer gläsernen Messküvette und wird von einem kleinen Rührmagneten bei konstanter Umdrehungszahl (900/min) gerührt. Durch Hinzufügen geeigneter Induktoren kann dann eine Aggregatbildung ausgelöst werden. Dabei nimmt die Trübung ab, was

folglich von der Messzelle als Zunahme der Lichttransmission registriert wird (Abb19-21).

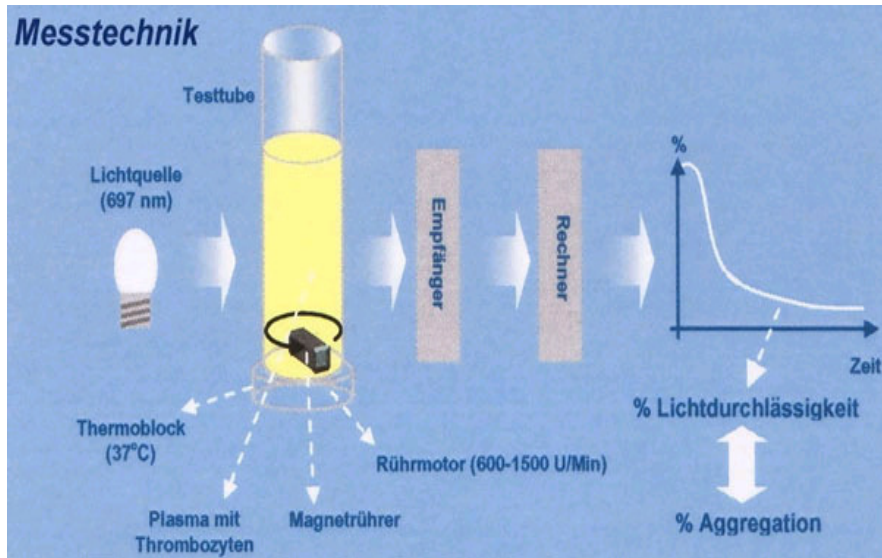


Abb.20: Prinzip der Aggregometrie mittels Lichttransmission (I)

Der Grad der Trübungsänderung der Probe ist letztlich das Maß für die Aggregation, welche über ein Auswertungsprogramm als Funktion der Zeit in Form einer Aggregationskurve zu sehen ist.

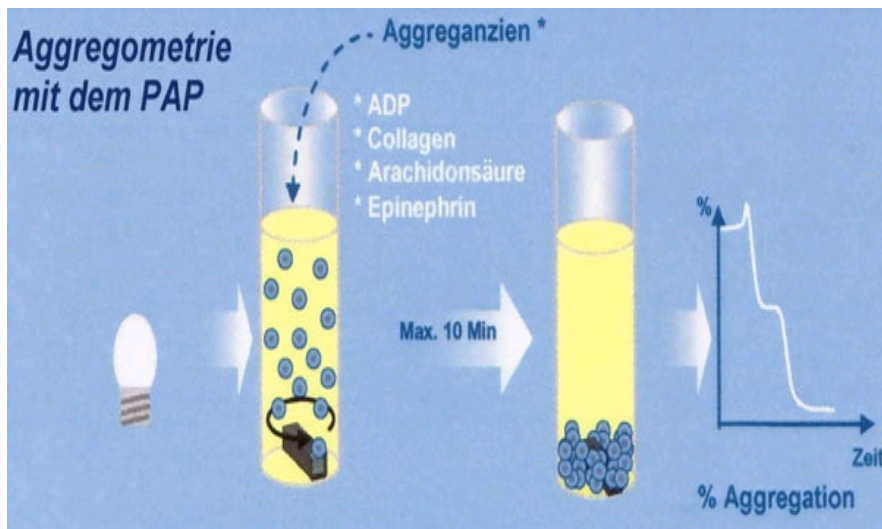


Abb.21: Prinzip der Aggregometrie mittels Lichttransmission (II)

Die Aggregationskurven sind charakteristisch für die jeweilig hinzugefügten Induktoren, sie geben teilweise Aufschluss auf ablaufende Prozesse im Verlauf der Aggregatbildung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ADP als Hauptreagenz verwendet.

Das typische Muster bei Verwendung von ADP als Induktor ist zunächst eine Abnahme der Lichttransmission, ein als „*shape change*“¹¹⁹ bezeichnetes Phänomen, welches auf einer initialen Formänderung der Thrombozyten, nämlich der Ausbildung von Zellausläufern im Rahmen der frühen Aktivierungsphase, beruht. Dieser Vorgang ist nur von kurzer Dauer und geht in die eigentliche primäre, reversible Aggregationsphase über.

Während bei humanen Proben ab einer gewissen ADP-Konzentration eine biphasische Reaktion beobachtet werden kann, das heißt ein Übergang von der primären, noch reversiblen Phase über ein Plateau in eine sekundäre, irreversible Aggregation, kann bei Nagetieren eine sekundäre Aggregation nicht ausgelöst werden^{120;121}.

2.3.1 Probengewinnung

Die Herstellung von PRP für die lichtaggregometrischen Untersuchungen erfolgte analog der bereits beschriebenen Gewinnung von plättchenreichem Plasma zu Stimulationszwecken mit anschließender Rezeptorbestimmung am FACS. Die Zentrifugationsvorgaben lauteten 12 Minuten bei 21°C, 180g, mittelgradiger Beschleunigung und keinerlei Abbremsung, um eine ungewollte Aktivierung des Probenmaterials und somit Präparationsartefakte bestmöglich zu vermeiden. Nach dem Abpipettieren des sich gebildeten Überstandes musste der verbleibende Rest nochmals härter zentrifugiert werden (Eppendorf-Centrifuge 5415C, 6 Minuten, 720g), um den für die Aggregometrie nötigen Leerwert (= PPP) zu generieren. Zur Minimierung möglicher Verunreinigungen der Nullprobe wurde im Anschluss an die zweite Zentrifugation der dadurch gewonnene und separierte Plasmaüberstand nochmals bei 15800g für 2 Minuten zentrifugiert.

2.3.2 Probenaufbereitung

Da sich ein tendenzieller Unterschied sowohl in der Thrombozytengröße (MPV) als auch in der Thrombozytenzahl im Vollblut sowie im daraus gewonnenen PRP zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Tieren abzeichnete, sollte zu Aggregationszwecken die Plättchenzahl auf 500.000/ μ L angeglichen werden. Nachdem die Thrombozytenzahl im PRP durch ein manuell bedienbares Messgerät bestimmt und unverdünntes PRP für die Aggregometrie zur Messung der Aggregation auf drei verschiedene Konzentrationen von ADP zurückbehalten worden war, wurde der Rest mit täglich neu vorbereiteten Tyrode-Puffer (pH 7.4, 0,1% BSA/Glucose) verdünnt. Im gleichen Verhältnis wurde für diese Messungen auch das PPP, das zum Setzen des Nullwertes gebraucht wurde, mit entsprechenden Puffermengen versehen.

Die Verwendung von Puffer anstatt PPP zur Einstellung einer konstanten Plättchenzahl in den Messproben hatte mehrere Gründe:

1. Es zeigte sich kein Unterschied im Ausmaß der maximalen Aggregation bei Proben, die mit Puffer beziehungsweise mit PPP verdünnt und zu denen anschließend die gleiche ADP-Konzentration hinzugegeben wurde.
2. Durch den Gebrauch von Puffer als Verdünnungsreagenz konnte ein größeres Volumen gewährleistet werden, da die Gewinnung von PPP nur begrenzt möglich ist.
3. Eine etwaige artifizielle Verunreinigung der PRP-Proben durch Mediatoren, die beim harten Zentrifugieren bei der Herstellung des PPP des jeweiligen Unterstandes zu Verdünnungszwecken frei werden, sollte vermieden werden.

Zur bestmöglichen Vermeidung inhomogener Verdünnung wurde bei den bereits verdünnten Proben nochmals die Thrombozytenzahl bestimmt. Bei einer Abweichung von mehr als $\pm 15\%$ wurde die jeweilige Messung in der Auswertung nicht berücksichtigt.

2.3.3 Messung

Als Induktoren kamen bei dieser Arbeit hauptsächlich ADP (Sigma, 1,5mM), aber auch Thrombin (Roche, 30U/mL), Collagen (Mölab, 1,9mg/mL) und A23187 (= Calcium-Ionophor, gelöst in Ethanol) versuchsweise zum Einsatz.

Außerdem wurde rekombinantes Ratten-Fractalkine (rrCX₃C, R&D Diagnostics, Minneapolis, MN), ein proaggregatorisch wirkendes Chemokin¹³, zur Vorstimulation von Proben verwendet. Hierzu wurden Proben mit Fractalkine unterschiedlicher Konzentration (1µg/mL bzw. 2µg/mL) unter 5minütigem Rühren inkubiert und anschließend mit der Konzentration ADP versehen, welche bei der vorangegangenen Messreihe des gleichen Tieres eine ca. 40%ige Aggregation ausgelöst hatte.

Alle Messungen wurden an einem 8-Kanal-Aggregometer (Mölab, PAP-8E) durchgeführt. Die Dauer der Messungen war auf 6 Minuten beschränkt, eine 5minütige Inkubationszeit der in den Küvetten befindlichen Proben bei 37°C unter Rühren vor den jeweiligen Messungen wurde berücksichtigt.

Zur Untersuchung von *in vitro*-Wirkungen von Ataciguat auf die Aggregabilität von Thrombozyten wurde bereits gewonnenes PRP für 5 Minuten mit dem sGC-Aktivator (10µmol/L) inkubiert.

2.4 Bestimmung deskriptiver Daten

2.4.1 Metabolische Parameter

Zur Bestimmung des Gewichts wurden die narkotisierten Tiere vor der Tötung gewogen. Außerdem wurde der Blutzucker wie bereits erwähnt zweimalig bestimmt, einmal direkt aus Blut der Schwanzvene und schließlich aus entnommenem Citrat-Blut.

Des Weiteren wurde von jedem Tier Plasma hergestellt, indem zusätzlich zu Citrat auch ein EDTA-gepuffertes Röhrchen abgenommen wurde. Das Blut wurde zentrifugiert (AvantiTM J-25I Centrifuge, Beckman Coulter; 3000g, 10min, 4°C) und der Überstand anschließend abpipetiert. Das gewonnene Plasma wurde in einem Eppendorf-Cup sofort in flüssigem Stickstoff konserviert und in einem -80°C-Kühlschrank aufgehoben.

2.4.2 Hämatologische Parameter

Aus dem EDTA-gepufferten Röhrchen wurde vor der Plasmagewinnung 300µL Material abpipetiert und daraus laborchemisch ein kleines Blutbild angefertigt. Bei diesem gingen sowohl die Leukozyten- sowie die Thrombozytenzahl als auch die Erfassung des mittleren Plättchenvolumens (mean platelet volume = MPV) in die Auswertung ein.

Um zudem einen Überblick über einige Gerinnungsparameter zu erhalten und dadurch eventuell Rückschlüsse auf eine verstärkte Aktivierung bzw. Aggregationsbereitschaft der Plättchen seitens dieser Komponenten ziehen zu können, wurde 1mL vom Citratblut ebenfalls laborchemisch untersucht. Daraus wurden INR (international normalized ratio), PTT (partielle Thromboplastinzeit) und sFbg (im Plasma gelöstes Fibrinogen) bestimmt.

2.4.3 Milzvolumen / -gewicht

An zusätzlichen Werten wurden sowohl das Milzvolumen als auch das Milzgewicht in Relation zum jeweiligen Körpergewicht der einzelnen Tiere bestimmt. Anlass hierfür war ein sich abzeichnender, jedoch nicht signifikanter Unterschied in der Thrombozytenkonzentration zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Tieren (siehe unten – Ergebnisse). Eine Veränderung der Milz als Organ der Blutplättchenspeicherung sowie der Thrombozytenelimination¹²² war in diesem Zusammenhang ein naheliegender Gedanke, der durch diese Messung geklärt werden sollte. Zunächst wurde das Organ beim getöteten Tier entnommen und gewogen. Zur Berücksichtigung des jeweiligen Gesamtgewichts des Tieres wurde dann das Milzgewicht mit diesem in Relation gebracht.

Außerdem wurde das Volumen des Organs bestimmt, indem das Verdrängungsvolumen, das sich beim Einbringen in ein mit 1mL Wasser gefüllten Nunc[®]-Röhrchens ergab, gemessen wurde.

2.5 Statistik

Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind alle Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. „n“ repräsentiert die Anzahl unterschiedlicher Tiere. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Student's-t-Test für paarige oder unpaarige Stichproben oder mit Hilfe der einseitigen Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Chronische Effekte von Ataciguat (HMR 1766)

3.1.1 Durchflusszytometrische Messungen *in vivo*

3.1.1.1 Aktivitätsbestimmung des cGMP-getriggerten Signalwegs

Um dem vermeintlichen Hauptangriffspunkt des verabreichten Medikaments, der löslichen Guanylatcyclase (sGC), Rechnung zu tragen, wurde das Ausmaß der Phosphorylierung des intrazellulären Proteins VASP bestimmt. Dieser Wert korreliert größtenteils mit der Stärke der Aktivität des dazugehörigen NO – cGMP – VASP – Signalwegs (Abb.22).

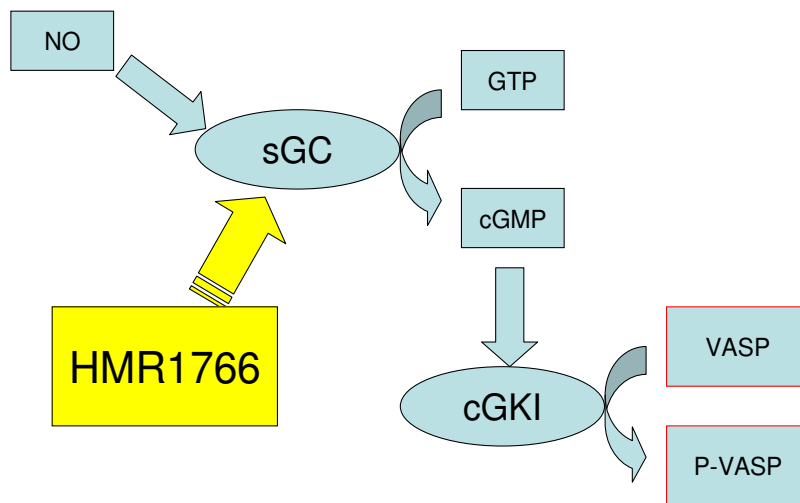
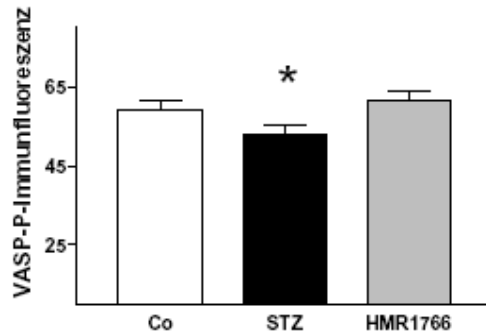


Abb.22: NO – cGMP – VASP - Signalweg

Am aussagekräftigsten ist in diesem Zusammenhang der Phosphorylierungsstatus der Aminosäure Serin an Position 157 und 239.

a)



b)

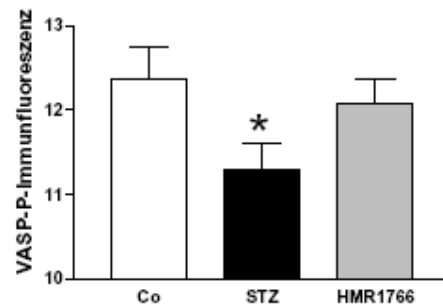


Abb.23: Basale VASP-Phosphorylierung an Position 157(a) und 239 (b) bei Thrombozyten gesunder Kontrolltiere und diabetischer Ratten, die entweder mit Placebo oder mit dem sGC-Aktivator HMR 1766 behandelt wurden; n = 10 – 16; *P<0.05 vs Kontrollen und STZ-HMR1766.

Es konnte gezeigt werden, dass an beiden Positionen eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung bei Ataciguat-behandelten im Vergleich zu Placebo-behandelten diabetischen Tieren vorliegt (Abb.23). Dieses Ergebnis stimmt mit der Ausgangshypothese, nämlich der positiven Beeinflussung der im Diabetes reduzierten Aktivität des NO – cGMP – VASP – Signalwegs, überein.

3.1.1.2 Bestimmung thrombozytärer Oberflächenaktivierungsmarker

Aufgrund der Arbeit mit Blut von Ratten war die Auswahl an Antikörpern zur Darstellung von Oberflächenmarkern thrombozytärer Aktivierung begrenzt. Trotzdem wurde versucht, ein relativ breit gefächertes Spektrum von Aktivierungsmarkern zusammenzustellen, die auf unterschiedliche Weise aktiviert bzw. exprimiert werden.

3.1.1.2.1 Fibrinogen, P-Selectin, CD42d

Eine gesteigerte Fibrinogen-Bindung bei Proben diabetischer Tiere im Vergleich zu gesunden Kontrollen bestätigte zunächst die der Arbeit zugrunde liegende Annahme, nämlich eine gesteigerte Aktivierung von Thrombozyten im Diabetes *per se*.

Der signifikante Rückgang gebundenen Fibrinogens bei Thrombozyten von HMR 1766-behandelten Ratten, der demzufolge mit einer geringeren Expression bzw. mit einem verminderten Aktivierungszustand des Glykoproteins Iib/IIIa gleichgesetzt werden kann, war ein weiterer Hinweis auf die Reversibilität der Plättchenaktivierung durch chronische Stimulation der löslichen Guanylatcyclase. Zusätzlich bestätigte dies, zusammen mit der vorher beschriebenen verstärkten VASP-Phosphorylierung, Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die bereits eine indirekt proportionale Korrelation zwischen diesen beiden Parametern nachgewiesen haben ^{100;123} (Abb.24).

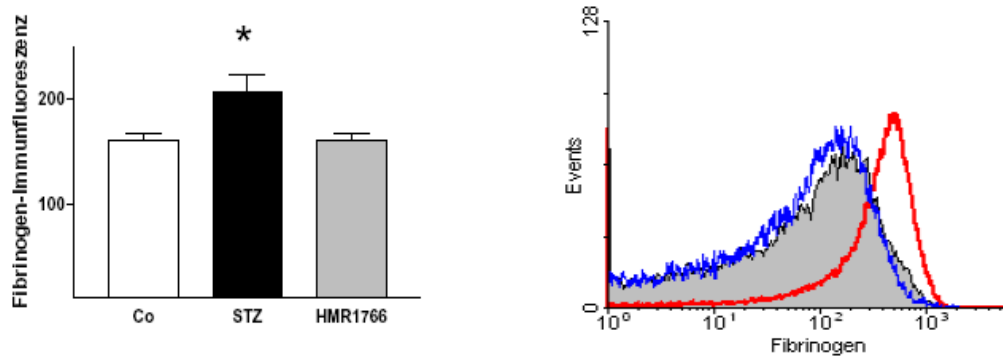


Abb.24: Bestimmung der Thrombozytenaktivierung mittels Ausmaß der Fibrinogenbindung an aktiviertes Glykoprotein Iib/IIIa bei Plättchen nicht-diabetischer Kontrollen und diabetischer Ratten, die entweder mit Placebo oder HMR1766 behandelt wurden; n = 10 – 16; *P<0.05 vs Kontrollen und STZ-HMR1766.

Ein typisches durchflusszytometrisches Histogramm zeigt die Linksverschiebung des mit dem sGC-Aktivators behandelten Tieres (blaue Kurve) im Vergleich mit der Kurve einer diabetischen, nicht behandelten Ratte (rote Kurve). Die graue Fläche repräsentiert die Fibrinogen-Bindung eines Kontrolltieres.

Die Abbildung eines typischen Histogramms einer durchflusszytometrischen Messung veranschaulicht nochmals die deutliche Linksverschiebung der Kurve eines medikamentös behandelten Tieres im Vergleich zu einem Placebo-Tier.

Des Weiteren konnte eine Reduktion der Expression von P-Selectin bei Ataciguat-behandelten Tieren auf das gleiche Niveau gesunder Ratten beobachtet werden. Auch

hier soll die Originalabbildung eines FACS-Histogramms den signifikanten Unterschied verdeutlichen (Abb.25).

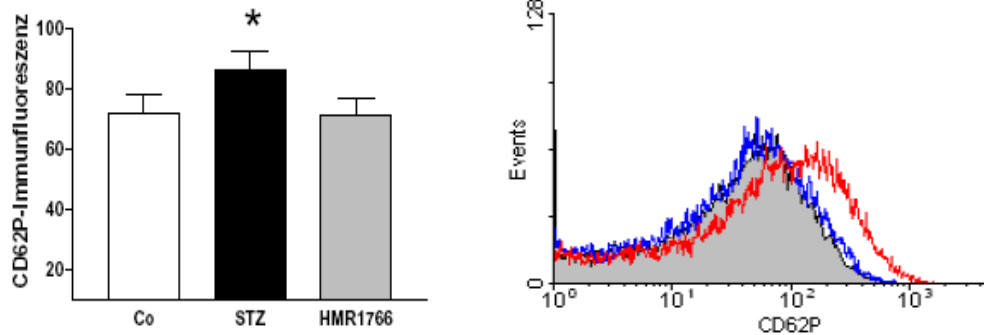


Abb.25.: Bestimmung der Thrombozytenaktivierung mittels Darstellung der Oberflächenexpression von P-Selectin (CD62P) auf Plättchen nicht-diabetischer Kontrolltiere im Vergleich zu diabetischen Ratten, die entweder mit Placebo oder HMR1766 behandelt wurden; $n = 10 - 16$; $*P < 0.05$ vs Kontrollen und STZ-HMR1766.

Eine typische durchflusszytometrische Kurve zeigt wiederum die Linksverschiebung bei der Messung der CD62P-Oberflächenexpression eines mit HMR1766-behandelten Tieres (blaue Kurve) im Vergleich zum diabetischen Tier (rote Kurve). Die graue Fläche repräsentiert die Oberflächenexpression von P-Selectin bei einer Kontrollratte.

Als weiterer thrombozytärer Marker wurde in der Messreihe CD42d betrachtet. Dessen Expression war weder im Diabetes an sich erhöht, noch konnte eine Veränderung durch die Behandlung mit dem sGC-Aktivator festgestellt werden. Jedoch waren Unterschiede in der CD42d-Expression und der mittleren Fluoreszenzstärke bei Thrombozyten von Kontrolltieren zu beobachten. Dies konnte allerdings im Folgenden genutzt werden zur Bestimmung der Adhäsion von Thrombozyten mit anderen Zellen (PCA) und zur Detektion von thrombozytären Mikropartikeln (PMP). Die zugrunde liegende Vergleichbarkeit der basalen Expression und Fluoreszenz bei diabetischen und HMR 1766-behandelten Tieren ließ deshalb eine direkte Gegenüberstellung der darauf aufbauenden Messungen zu, wohingegen die Messungen der Kontrolltiere für diese Auswertung nicht berücksichtigt werden konnten.

3.1.1.2.2 Thrombozytäre Mikropartikel (PMP), Thrombozytenadhäsion an nicht-thrombozytäre Blutzellen (PCA)

Es gibt einige etablierte Möglichkeiten, thrombozytäre Mikropartikel durchflusszytometrisch zu erfassen^{124;125}. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die bereits im Methodikteil beschriebene Variante der Vollblutmessung angewandt (Abb.26).

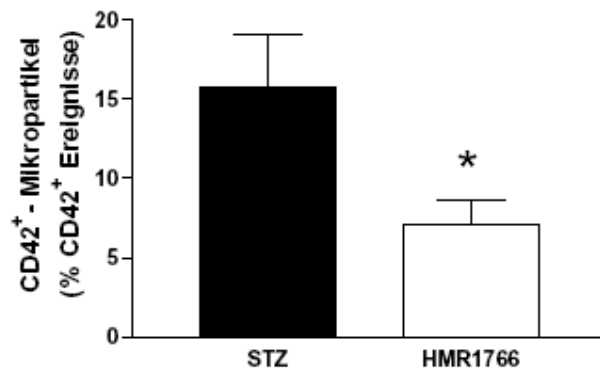


Abb.26: Thrombozytäre Mikropartikelbildung unter *in vivo* -Bedingungen; Prozentuale Angabe CD42⁺ Mikropartikel im Verhältnis aller CD42⁺ Ereignisse in Vollblut; n = 10 – 16; *P<0.05 vs Placebo;

Hinsichtlich des Vorhandenseins thrombozytärer Mikropartikel zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der Betrachtung von Material diabetischer gegenüber Ataciguat-behandelter Tiere. Die deutlich reduzierte Anzahl von PMPs im Vollblut von Tieren, bei denen die lösliche Guanylatcyclase medikamentös chronisch aktiviert wurde, stellte einen weiteren Hinweis auf die mögliche Reduktion des Aktivierungszustandes von Blutplättchen im Diabetes dar. Auch die verminderte Detektion thrombozytärer Zellaggregate mit anderen Zellen, also Erythrozyten und Leukozyten, bei Probenmaterial von HMR 1766-behandelter Ratten im Vergleich zu diabetischen Kontrolltieren kann als verminderte Aktivität von Plättchen unter chronischer Guanylatcyclase-Aktivierung gedeutet werden (Abb.27).

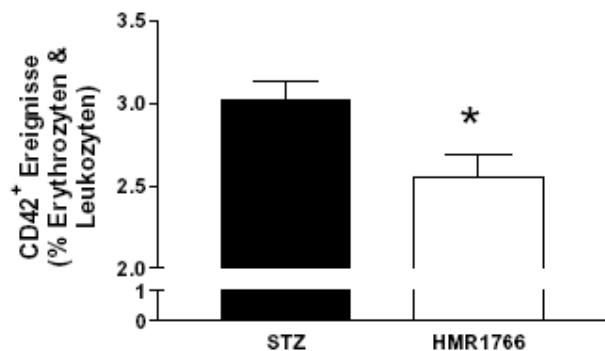


Abb. 27: Thrombozytenaggregation mit nicht-thrombozytären Blutzellen, dargestellt als das Verhältnis CD42⁺ Ereignisse innerhalb der Leukozyten-/Erythrozytenpopulation; n = 10 -16; **P<0.01 vs Placebo;

3.1.2 Durchflusszytometrische Messungen *in vitro*

In vitro –Messungen haben den Nachteil, dass das Probenmaterial vor den jeweiligen Versuchen häufig speziell aufbereitet werden muss und somit nicht mehr im „nativen“ Zustand vorliegt. Es werden also Ergebnisse unter Bedingungen herbeigeführt, die vom ursprünglichen physiologischen Modell entfernt sind. Allerdings bieten aber genau diese Messungen die Möglichkeit, zum Beispiel das Ausmaß der Aktivierbarkeit bzw. der Reaktivität unter vergleichbaren Bedingungen auszuloten.

Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse aus Messungen, bei denen Vollblut bzw. PRP der verschiedenen Tiergruppen mit ADP stimuliert wurde, sind besonders interessant. Eingedenk der Tatsache, dass das Medikament im Vorfeld chronisch verabreicht wurde, also keine Akut-Effekte zu erwarten waren, war es interessant, inwieweit ungeachtet dieses Einwands trotzdem Potential zu unterschiedlichen Reaktionen vorhanden sein würde und, vor allem, in welche Richtung diese gehen würden.

3.1.2.1 ADP-induzierte Stimulation von Vollblut

Die Stimulation von Vollblutproben mit 10µmol/L ADP ergab eine signifikant gesteigerte Bildung von Mikropartikeln seitens der Thrombozyten diabetischer Placebotiere im Vergleich zu Plättchen medikamentös behandelte Tiere (Abb.28).

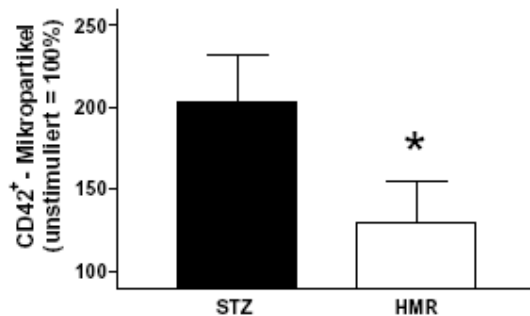


Abb.28: Darstellung der Thrombozytenreaktivität nach chronischer Ataciguat-Behandlung durch Messung der Bildung thrombozytärer Mikropartikel als Reaktion auf ADP-Stimulation (10 µM) im Vergleich zu Material diabetischer Placebotiere; n = 6 – 10; *P<0.05 vs Placebo;

Da diese Messung wieder auf der basalen CD42-Expression der Thrombozyten beruhte, konnte auch hier die nicht-diabetische Kontrollgruppe nicht berücksichtigt werden.

3.1.2.2 ADP-induzierte Stimulation von PRP

Die durch ADP getriggerte Stimulation von Thrombozyten in PRP wurde anhand des Ausmaßes der Expression von P-Selectin bestimmt.

Es zeigte sich eine signifikant verringerte Expression von P-Selectin bei beiden ADP-Konzentrationen bei Material behandelte Tiere im Vergleich zu diabetischen Placebotieren. Die Oberflächenexpression bei Thrombozyten HMR 1766-gefütterter Ratten stellte sich auf dem Niveau der Kontrolltiere ein (Abb.29).

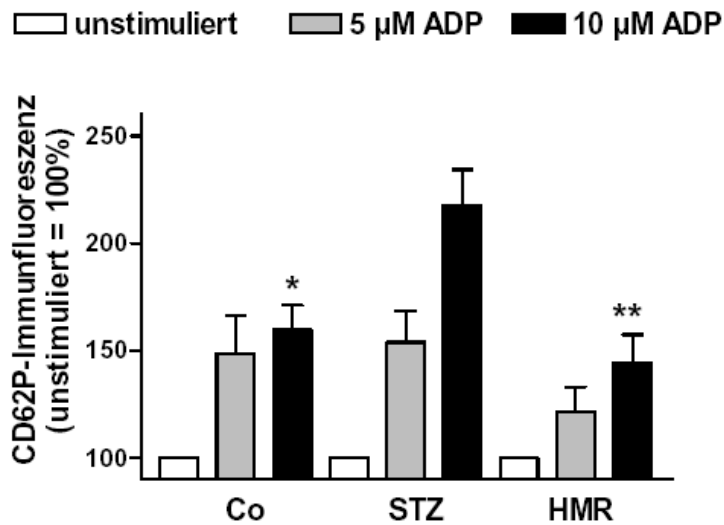


Abb.29: ADP-induzierte P-Selectin (CD62P) Oberflächenexpression im PRP chronisch mit HMR 1766 behandelte Tiere im Vergleich mit Kontroll- und Placebogruppe; $n = 6 - 10$; * $P < 0.05$ vs STZ (10 μ M ADP), ** $P < 0.01$ vs STZ (10 μ M ADP);

Die Ursache für die reduzierte Stimulierbarkeit von Plättchen behandelte Tiere hinsichtlich der P-Selectin-Expression könnte in dem bereits *in vivo* vorliegenden verminderten Aktivitätsstatus der Thrombozyten gesucht werden. Hypothetisch wäre eine gesteigerte Integrität und somit eine größere Aktivierungsschwelle denkbar.

3.1.3 Aggregometrie

Die Etablierung der Aggregometrie zur Diagnostik der Thrombozytenfunktion bei Ratten bedurfte einiger Zeit und ist bis dato unter anderem aufgrund unterschiedlicher Rezeptoren und Aktivierungsmechanismen nur für ADP als Induktor und für PRP als Probenmaterial annähernd standardisiert.

Wesentliche Fragestellungen, die sich im Vorfeld während der Etablierungszeit ergaben und die es zu beantworten galt beziehungsweise die zum Teil noch im Raum stehen, sollen im Folgenden kurz erläutert werden:

Bei der im Methodikteil beschriebenen Gewinnung von PRP stellte sich in der anschließenden Bestimmung der Thrombozytenkonzentration ein Unterschied im Material nicht-diabetischer Kontrolltiere zu Proben diabetischer Placebo-

beziehungsweise diabetischer, behandelter Tiere heraus. Letztere zeigten einen signifikant geringeren Anteil von Thrombozyten im durch Zentrifugation gewonnenen PRP (Abb.30).

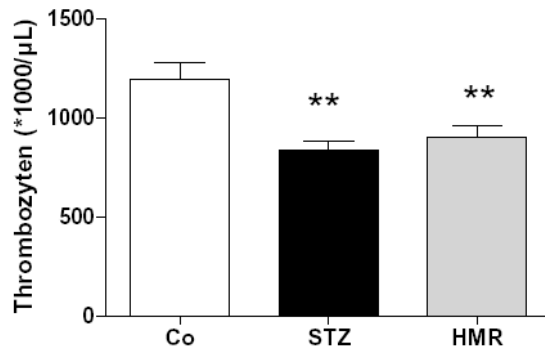


Abb.30: Thrombozytenzahl im PRP der verschiedenen Versuchsgruppen, $n=13-22$; ** $P<0.01$ vs Kontrolle;

Die Ursache dieses Phänomens ist unbekannt. Eine mögliche Erklärung könnte aber das zwischen den Gruppen divergierende Plättchenvolumen bieten (siehe unten). Bei der Zentrifugation würden demnach größere (= aktivierte) Thrombozyten in das Präzipitat zu den anderen Zellbestandteilen des Blutes gelangen und somit beim anschließenden Abpipettieren des Überstandes (= PRP) nicht berücksichtigt werden, wodurch Plättchen verloren gingen. Diese Hypothese konnte teilweise durch die durchflusszytometrisch durchgeführte Bestimmung der Thrombozytenzahl im Unterstand bestätigt werden (Abb.31).

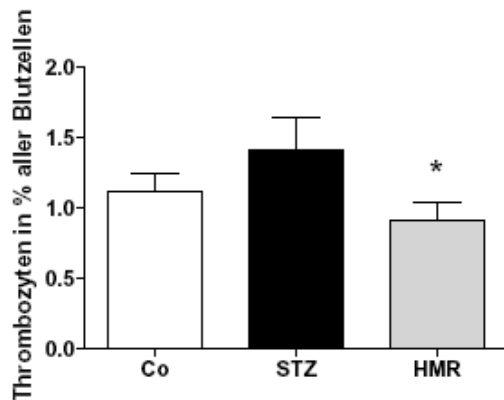


Abb.31: Prozentuale Darstellung des Thrombozytenanteils in Relation zu anderen zellulären Bestandteilen im Unterstand (= zurückbleibendes Material nach stattgefundener Zentrifugation und nach Abpipetieren des Überstandes [= PRP]); $n = 5-12$; * $P < 0.01$ vs STZ;

Allerdings zeigt das Messergebnis lediglich einen erhöhten Plättchenverlust zugunsten des Unterstands für Proben diabetischer Placebotiere, während dies für das Material Ataciguat- behandelte Tiere augenscheinlich nicht zutrifft.

Eine weitere Frage baute auf dem eben geschilderten Problem auf, nämlich inwieweit man durch eine Normierung der Thrombozytenkonzentration durch Verdünnung den Aggregationsverlauf bzw. das Ausmaß der Aggregation beeinflussen würde. Aufgrund dieser Unklarheit wurden sowohl Messungen mit nativem, also unverdünntem, als auch mit auf eine Konzentration von $500.000/\mu\text{L}$ normierten PRPs durchgeführt.

3.1.3.1 ADP-induzierte Aggregation nativen PRPs

Der Kurvenverlauf zeigt einen signifikant stärkeren Aggregationsverlauf bei PRP nicht-diabetischer Kontrolltiere im Vergleich zu diabetischen Placeboratten. Betrachtet man die Proben HMR 1766-behandelte Tiere, so verläuft deren Aggregationskurve im Bereich der Messwerte diabetischer Ratten (Abb.32).

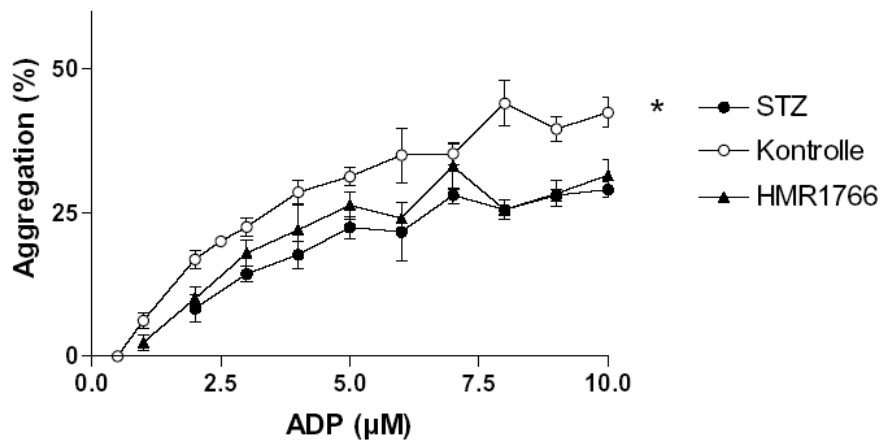


Abb.32: ADP-induzierte Aggregation von unverdünntem PRP der verschiedenen Untersuchungsgruppen; $n = 10-16$, * $P < 0.05$ Kontrolle vs STZ-HMR1766 / STZ;

Dieses Phänomen der verstärkten Aggregabilität von PRP gesunder Kontrolltiere im Vergleich zu diabetischen Ratten ist nicht neu^{126;127}. Die Ursachen hierfür sind nicht genau bekannt und konnten auch im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht werden.

3.1.3.2 ADP-induzierte Aggregation normierten PRPs

Bei auf $500.000/\mu\text{L}$ Thrombozytenzahl angeglichenen PRPs zeigten sich andeutungsweise Unterschiede zwischen den drei Gruppen, die jedoch nicht signifikant sind. Die Verteilung der Aggregationsstärke stellte sich wie bei der Betrachtung nativen Materials dar, die Kontrollen wiesen den stärksten, diabetische Tiere den schwächsten Aggregationsverlauf auf, während die Proben HMR 1766-behandelter Tiere eine Mittelstellung einnahmen (Abb.33).

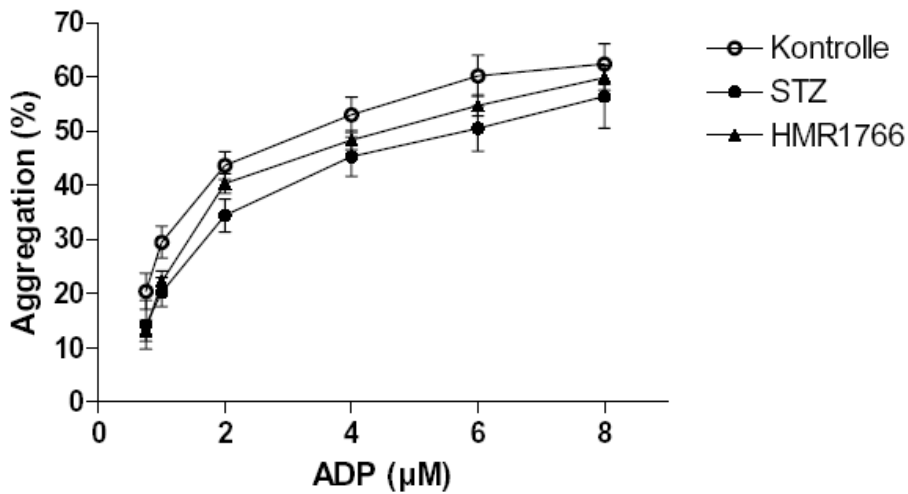


Abb.33: ADP-induzierte Aggregation auf 500.000Thr/ μ L normierten PRPs; Darstellung des Ausmaßes der Aggregation als Reaktion auf verschiedene ADP-Konzentrationen der drei Untersuchungsgruppen; n=12–21;

Die Zunahme der Aggregabilität aller Gruppen war der auffälligste Unterschied, der sich durch die Verdünnung der Proben mit Hepes-Puffer (pH 7,4) ergab (Abb.34).

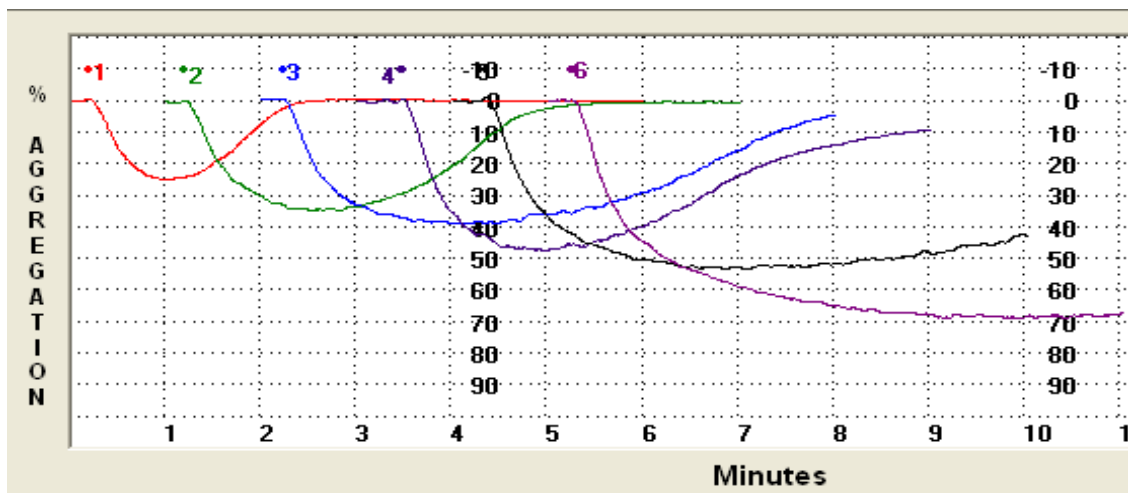


Abb.34: Originalabbildungen von Aggregationskurven eines Kontrolltieres. Vergleich zwischen auf 500.000/ μ L verdünnten und nativen Material. Kurven 1-3: PRP unverdünnt, Stimulation mit 2/4/6 μ M ADP; Kurven 4-6: PRP auf 500.000/ μ L verdünnt, Stimulation mit 2/4/6 μ M ADP.

Auch hierfür bleiben die Ursachen noch zu ergründen, denkbar ist ein stärkerer Aggregationsverlauf aufgrund der größeren Substanzmenge des Induktors, die jedem einzelnen Thrombozyten zur Verfügung steht. Falls diese Annahme zuträfe, würde dies allerdings umgekehrt heißen, dass durch die signifikant höhere Thrombozytenkonzentration bei den unverdünnten Proben nicht-diabetischer Kontrollen eine geringere Aggregation als bei den beiden anderen Gruppen zu beobachten sein müsste, was nicht der Fall war (siehe oben).

Inwieweit das Plasma und darin enthaltene Faktoren, die auf die Aggregation einwirken, Einfluss auf die Messergebnisse haben, könnte unter anderem durch die Wiederholung der Messungen mit gewaschenen Thrombozyten als Probenmaterial geklärt werden. Diese Möglichkeit würde die angewandte Methodik allerdings noch weiter von den physiologischen Gegebenheiten entfernen: Um bei in Puffer gelösten, gewaschenen Thrombozyten noch eine Aggregation durch den Induktor ADP zu erreichen, müssen Substanzen, wie zum Beispiel Fibrinogen, artifiziell zugesetzt werden. Hinzu käme zudem eine durch mehrmaliges Zentrifugieren längere Aufbereitungszeit und höhere Wahrscheinlichkeit zusätzlicher Aktivierung der Plättchen durch die Bearbeitung.

3.1.3.3 Fractalkine als proaggregatorischer Zusatz

Die Ergebnisse der aggregometrischen Messungen geben einige Fragen auf. Durch bereits zugrunde liegende Konstellationen, wie dem nicht eindeutig zu klärenden Phänomen der Veränderung der Ergebnisse durch Verdünnung beziehungsweise des stärkeren Aggregationsverlaufs von Material nicht-diabetischer Kontrollen, konnten die Ergebnisse für das Material Ataciguat-behandelter Tiere nicht wirklich eingeordnet werden.

Sollte die Annäherung an die Kurven der gesunden Kontroll-Ratten als Verbesserung des Thrombozytenstatus durch Behandlung zu deuten sein, obwohl das ja hieße, eine höhere Aggregationsbereitschaft der Plättchen im PRP als positives Resultat zu deklarieren?

Schließlich wurde entschieden, noch eine weitere aggregometrische Messung durchzuführen. Hierbei wurden gleiche Thrombozytenkonzentrationen und gleiche

Aggregationsstärken der verschiedenen Proben generiert, um dann eine etwaige weitere Verstärkung durch Inkubation mit dem Chemokin Fractalkine zu beobachten. Motivation für diesen Versuch lieferten Labor-interne Ergebnisse, die zeigten, dass der Fractalkine-Rezeptor auch auf Blutplättchen exprimiert wird und dass das Vorhandensein von Fractalkine Einfluss auf die Plättchenaktivierung hat und voraktivierte Thrombozyten verstärkt auf Kostimulation mit Fractalkine reagieren¹³.

Bei der Auswertung dieser Messungen, wobei die Zunahme der Aggregation prozentual zum Ausgangswert ausgedrückt wurde, zeigte sich eine signifikant reduzierte Aggregationssteigerung von Proben medikamentös behandelter Tiere auf eine Inkubationskonzentration von 2µg/mL Fractalkine gegenüber diabetischer Placeboratten. Hingegen ergab sich bei dieser Konzentration keine Signifikanz bei den Ergebnissen von Kontrolltieren. Auch bei einer Fractalkinekonzentration von 1µg/mL zeigte sich zwar eine tendenziell geringere Verstärkung der Aggregabilität bei der Placebo- und der HMR 1766- Gruppe gegenüber den Kontrollen, jedoch war diese Beobachtung nicht signifikant (Abb.35).

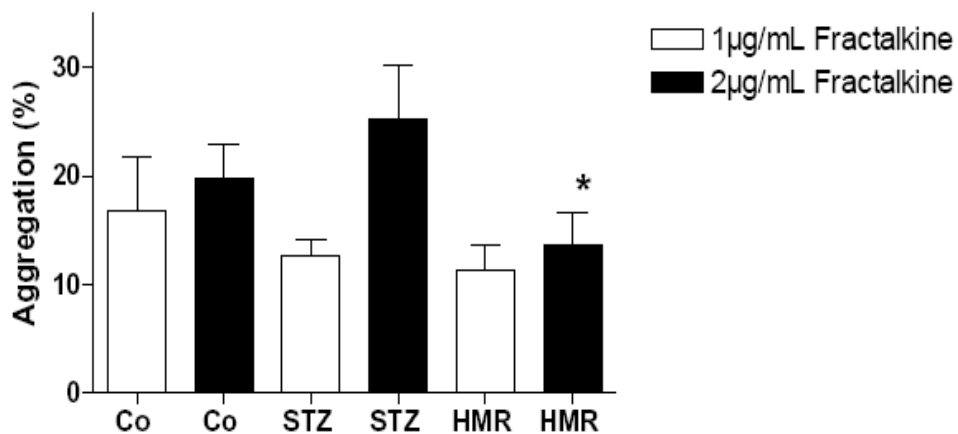


Abb.35: Darstellung der prozentualen Zunahme der Thrombozytenaggregation als Reaktion auf Inkubation mit Fractalkine; Vergleich zwischen Kontroll-, diabetischer Placebo- und diabetischer, mit HMR 1766 -behandelter Gruppe; n=9-15; *P<0.05 vs STZ (2µg/mL Fractalkine);

3.2 Akut-Effekte von Ataciguat

3.2.1 Durchflusszytometrische Messungen

Die durchflusszytometrischen Messungen hinsichtlich der Akut-Effekte von HMR 1766 beruhen alle auf dem Nachweis des Phosphorylierungsstatus von VASP.

Zunächst zeigte die *in vitro* Stimulation von PRP mit dem NO-Donor DEA-NONOate (1 μ mol/L) eine signifikant erhöhte VASP-Phosphorylierung bei Thrombozyten von Kontroll-Tieren, wohingegen der Phosphorylierungsstatus des Proteins bei Plättchen diabetischer Tiere signifikant reduziert war. Dies deutet auf eine deutlich verminderte Sensitivität von Thrombozyten im diabetischen Tiermodell gegenüber exogenem NO hin (Abb.37).

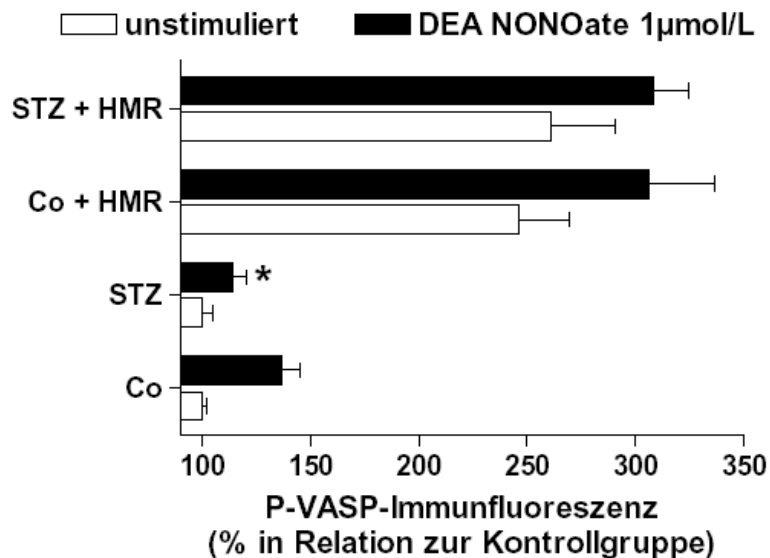


Abb.37: Thrombozytäre VASP-Phosphorylierung nach *in vitro* Stimulation von PRP von Kontrolltieren und diabetischen Ratten mit HMR 1766 (10 μ mol/L) oder DEA-NONOate (1 μ mol/L) oder beidem. n=10–16; Prozentuale Darstellung der Ergebnisse im Vergleich zu unstimulierter VASP-Phosphorylierung; n=5–7; *P<0.05 vs Kontrollen und STZ-HMR 1766.

Die Inkubation von PRP der beiden Vergleichsgruppen mit HMR 1766 (10 μ mol/L) resultierte zum einen in einem verstärkten Phosphorylierungsgrad von VASP verglichen mit dem Ausmaß der vorangegangenen DEA-NONOate-Stimulierung. Zum anderen verbesserte das Medikament die NO-Sensitivität der diabetischen Thrombozyten auf das Niveau des Materials, das von nicht-diabetischen Kontrolltieren gewonnen worden war. Die Ergebnisse durchflusszytometrischer Untersuchungen im Vollblut von Tieren, die 2h zuvor eine einmalige, enteral applizierte Dosis von HMR 1766 erhielten (10mg/kg KG), zeigen, dass das Ansprechen auf NO bei der Betrachtung des VASP-Phosphorylierungsstatus diabetischer, akut behandelter Tiere mit dem Material von unbehandelten Kontrolltieren vergleichbar ist (Abb.38).

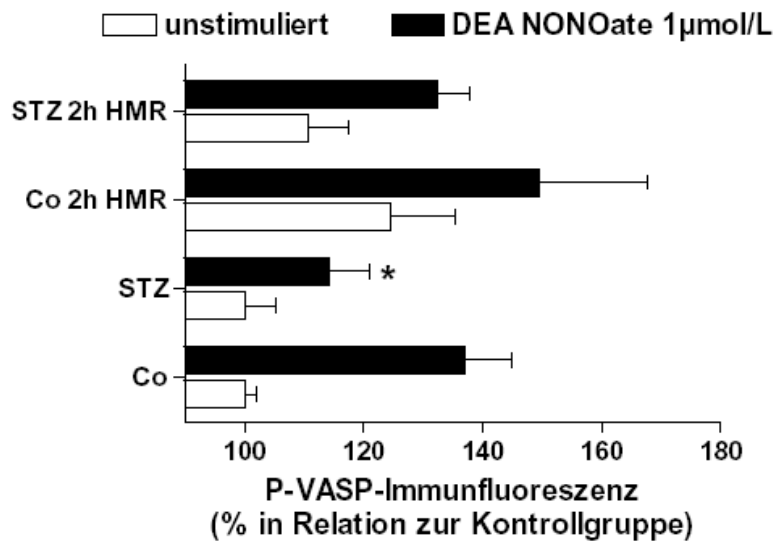


Abb.38: Auswirkung nach einmaliger, vor 2h erfolgter in vivo Gabe von HMR 1766 (10 mg/kg KG) auf NO-Sensitivität bei Thrombozyten diabetischer und nicht-diabetischer Ratten; Prozentuale Darstellung der Ergebnisse im Vergleich zur unstimulierten VASP-Phosphorylierung; n=5-7; *P<0.05 vs Kontrolle und STZ-HMR 1766.

3.2.2 Aggregometrie

Die ADP-induzierte Plättchenaggregation bei PRP diabetischer Ratten, die eine einzelne, enteral verabreichte Dosis von HMR 1766 (10mg/kg KG) 2h vor der finalen Blutentnahme erhielten, zeigte ein signifikant verringertes Ausmaß im Vergleich zu PRP unbehandelter diabetischer Tiere.

Eine 5minütige *in vitro* -Inkubation diabetischen Materials mit HMR 1766 (10 μ mol/L) vor der ADP-getriggerten Induktion der Aggregation resultierte in einer fast vollständigen Unterdrückung der Thrombozytenaggregation (Abb.39).

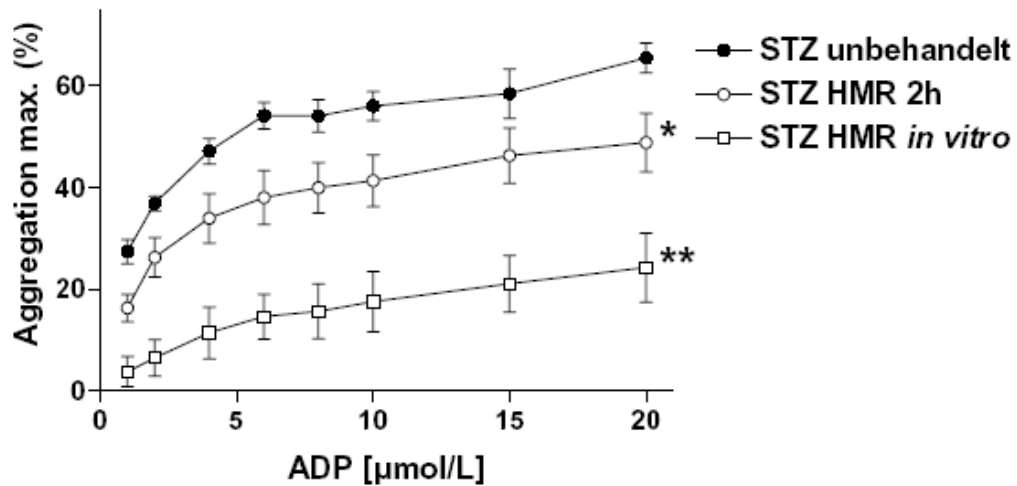


Abb.39: Akute Inhibition der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation in PRP diabetischer Ratten, die eine einmalige Dosis von HMR 1766 2h vor finaler Blutentnahme erhielten und in PRP diabetischer Tiere, welches 5minütig *in vitro* mit HMR 1766 (10 μ mol/L) vor Aggregationsinduktion mit ADP inkubiert wurde; n=8-12, *P<0.05, **P<0.01 vs STZ.

3.3 Deskriptive Daten

Zum Ausschluss bzw. zur Detektion womöglich Einfluss nehmender Faktoren seitens hämatologischer oder metabolischer Komponenten sowie anderer möglicher Einflussgrößen wurden zusätzlich einige andere Parameter bestimmt.

3.3.1 Metabolische Parameter

Da der Blutzuckerspiegel eines der Einschlusskriterien für die Teilnahme an den Experimenten darstellte, sei hier nochmals dokumentiert, dass dieser bei der finalen Blutentnahme bei beiden diabetischen Gruppen deutlich über der geforderten Marke von 360mg/dL lag.

Das initiale Gewicht vor der Einteilung in Placebo-, Kontroll- bzw. Behandlungsgruppe betrug zwischen 300-350g. Im Laufe der 4wöchigen Diabetes-Dauer von Placebo- sowie Behandlungsgruppe zeichnete sich eine deutliche Gewichtsabnahme ab.

	Kontrolle	STZ Placebo	STZ HMR 1766
Blutzucker [mg/dL]	147±5.8	518±9 **	502±11 **
Körpergewicht [g]	354±5.6	244±4 **	245±5 **

**P<0.01 vs Kontrolle

Diese beiden Parameter blieben durch die Gabe des sGC-Aktivators HMR 1766 erwartungsgemäß unbeeinflusst.

3.3.2 Hämatologische Parameter

Hinsichtlich der Thrombozyten- und Leukozytenkonzentration ergaben sich bei den drei zu vergleichenden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass sich eine zwar nicht signifikante, jedoch deutlich geringere Plättchenzahl im Vollblut diabetischer Tiere abzeichnete.

	Kontrolle	STZ Placebo	STZ HMR 1766
Thrombozyten [n*1000/ μ L]	673 \pm 35	599 \pm 43	570 \pm 34
Leukozyten [n*1000/ μ L]	5.6 \pm 0.5	5.1 \pm 0.5	4.8 \pm 0.3
Mittleres Thrombozyten- volumen [fL]	6.02 \pm 0.09	6.23 \pm 0.09	5.97 \pm 0.04 ^{**}

**P<0.01 vs STZ Placebo

Gleichzeitig zur Messung der Thrombozytenzahl wurde die Gelegenheit wahrgenommen, das mittlere Plättchenvolumen zu bestimmen. Anlass hierfür waren unter anderem bestehende Daten und Theorien über veränderte Volumina im Diabetes ^{69,128}.

In der Tat bestätigte sich eine signifikante Diskrepanz im Thrombozytenvolumen diabetischer Tiere im Vergleich zu dem nicht-diabetischer Kontrollratten. Zusätzlich zeigte sich bei den medikamentös behandelten diabetischen Tieren ein Plättchenvolumen, welches auf dem gleichen Niveau gesunder Ratten lag und somit gegenüber der Placebogruppe signifikant reduziert war.

Angesichts der schon bestehenden Arbeiten über Unterschiede im mittleren Thrombozytenvolumen (= MPV) im Diabetes, die auf einen stärkeren Thrombozytenumsatz, auf das Vorliegen unreifer Thrombozyten im Blut beziehungsweise auf einen gesteigerten Aktivierungsgrad von Plättchen bei dieser Krankheit hindeuten, fügt sich die vorliegende Messung in die Reihe der Ergebnisse ein, die einen Rückgang der Thrombozytenaktivität im Diabetes durch die chronische Stimulation der sGC zeigen.

Im Hinblick auf die Gerinnungsparameter INR, PTT und sFbg ergab sich Unerwartetes: Zwar zeigte sich bzgl. des INR kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen, allerdings stellten sich bei der Betrachtung der PTT- und sFbg-Werte signifikante Unterschiede von der Kontrollgruppe zu den beiden diabetischen Gruppen heraus. Diese waren nicht, wie im Vorfeld des Öfteren beschrieben, mit einem gesteigerten Gerinnungsstatus beim Diabetes vereinbar ¹²⁹. Geradezu Gegenteiliges war zu beobachten, nämlich eine signifikante Verlängerung der PTT und ein ebenfalls signifikant verringertes Vorhandensein an löslichem Fibrinogen beim Vorliegen der Krankheit (Abb.40).

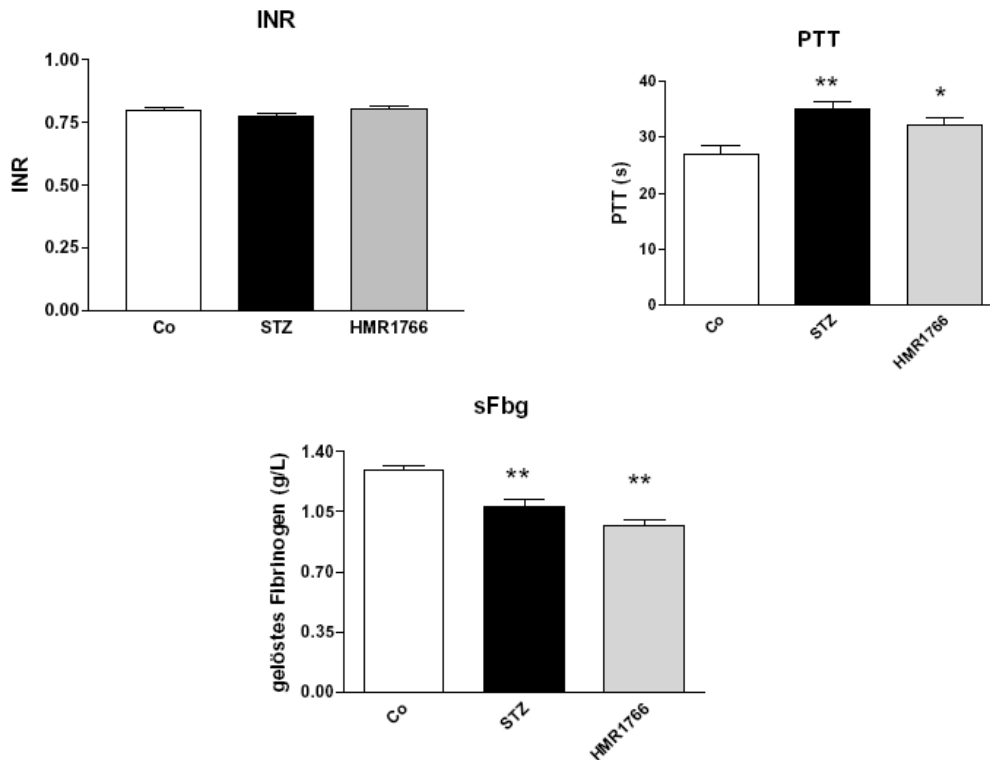


Abb.40: Laborchemische Messung von INR, PTT und löslichem Fibrinogen (sFbg); Vergleich zwischen diabetischer Placebo-, mit HMR 1766-behandelter sowie Kontrollgruppe; n=13-23; PTT: **P<0.01 STZ vs Kontrolle; *P<0.05 STZ-HMR 1766 vs Kontrolle; sFbg: **P<0.01 STZ / STZ-HMR 1766 vs Kontrolle;

Diese zur gängigen Meinung konträren Ergebnisse sind, in sich gesehen, jedoch stimmig und können mit den ebenfalls unerwarteten aggregometrischen Daten in Einklang gebracht werden. Eine Erklärung für dieses Phänomen, das so gar nicht in das bisherige Bild einer verstärkten Koagulation bei diabetischen Patienten passt, muss jedoch noch ergründet werden.

3.3.3 Milzgewicht / -volumen

Die Bestimmung des Milzgewichts beziehungsweise –volumens sollte klären, ob eine Diskrepanz dieser Werte zwischen den verschiedenen Tiergruppen vorliegen würde. Dies würde eine Erklärung für den sich abzeichnenden Unterschied in der Plättchenzahl diabetischer zu nicht-diabetischer Tiere (siehe oben) bieten und die Hypothese festigen, dass eine verstärkte Selektion der großen, teils beschädigten Thrombozyten im diabetischen Krankheitsbild durch die Milz vorliegen und eine Vergrößerung beziehungsweise Gewichtszunahme des Organs zur Folge haben könnte.

Zunächst wurde das Milzvolumen *per se* bestimmt. Hier zeigte sich ein signifikant geringeres Volumen der Organe diabetischer Placebotiere im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Volumina der Milzen der Ataciguat-behandelten Tiere nahmen eine Mittelstellung ein, es zeigte sich jedoch keine Signifikanz zu einer der beiden anderen Gruppen (Abb.41).

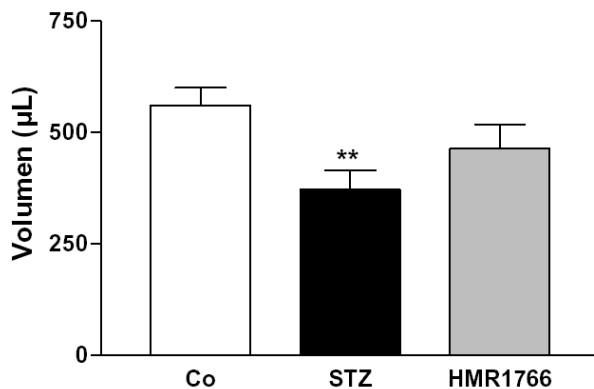


Abb.41: Vergleich der Milzvolumina; n=6–13; **P<0.01 STZ vs Kontrolle;

Um allerdings auch noch das jeweilige Körpergewicht der Tiere zu berücksichtigen, das diabetischer Ratten war ja signifikant geringer als das gesunder Kontrolltiere (siehe oben), wurde dieses mit dem Milzgewicht beziehungsweise –volumen in Relation gesetzt (Abb.42).

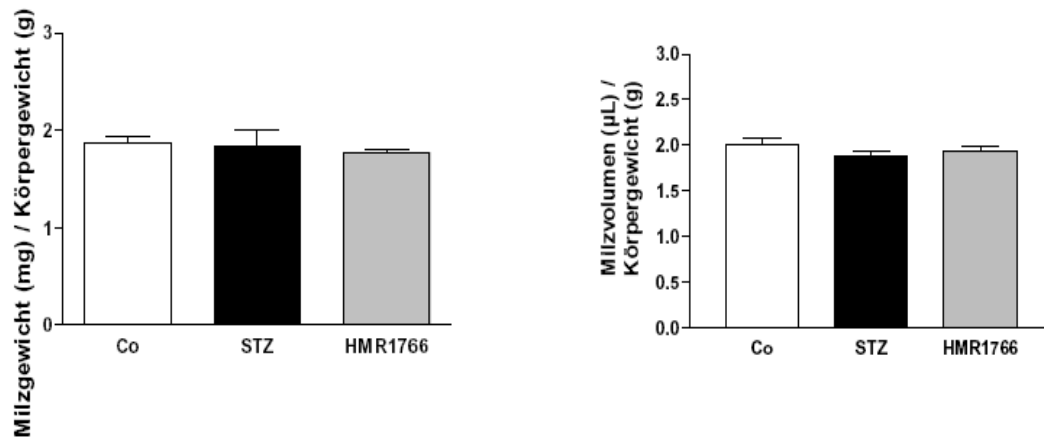


Abb.42: Vergleich des Milzgewichtes bzw. des Milzvolumens in Relation zum jeweiligen Körpergewicht;
n=11–25;

Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, demnach muss oben beschriebene Hypothese eher verworfen werden.

4. Diskussion

Mit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Gabe des sGC-Aktivators Ataciguat (=HMR 1766) bei diabetischen Ratten eine Signalverstärkung des endogenen Thrombozyten-inhibierenden NO/cGMP-Signalwegs bewirkt und darüber die Plättchenaktivierung *in vivo* vermindert wird.

Hierdurch konnte, wie auch schon in Vorarbeiten^{36;130;131} gezeigt, der maßgebliche Einfluss von NO und der dazugehörigen Signalkaskade auf die Thrombozytenaktivierung *per se* belegt werden. Des Weiteren wird die Reversibilität der im Diabetes vorliegenden, verstärkten Thrombozytenaktivierung demonstriert.

Die viel beschriebene reduzierte NO-Bioverfügbarkeit im Diabetes, die zu einer abgeschwächten Signaltransduktion durch den endogenen Thrombozyten-inhibierenden NO/cGMP-Signalweg führt, wird hauptsächlich der endothelialen Dysfunktion und daraus resultierender verminderter Produktion endothelialen NOs zugeschrieben^{110;132-136}. Das konsekutiv gesteigerte Ansprechen von Blutplättchen auf aktivierende Faktoren kann, jedenfalls zum Teil, für das Vorliegen vermehrt aktivierter Thrombozyten beim Diabetes verantwortlich gemacht werden.

Bereits in vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die akute Inhibition der NO/cGMP-Signalkaskade eine Aktivierung zirkulierender Thrombozyten bereits nach kurzer Zeit bewirkt. Dies war sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Nagern der Fall^{36;110}. Eine dauerhafte Unterbrechung des endogenen Thrombozyten-inhibierenden Signalwegs hat eine verstärkte Adhäsion zirkulierender Thrombozyten an intaktem Endothel zur Folge^{99;101}, während der Funktionserhalt dieses Signalwegs im frühen Diabetes eine Thrombozytenaktivierung bei diabetischen Mäusen verhindert¹¹⁰.

Andere Arbeiten weisen zudem auf das Vorliegen einer signifikanten Entkopplung der eNOS, dem Hauptlieferanten endothelialen NOs, im Diabetes hin. Dies resultiert dann in einer durch das entkoppelte Enzym verursachten Superoxid-Radikalbildung^{31;104;109;137;138}. Deshalb rückten initiale Bestrebungen einer Herbeiführung einer Verstärkung der eNOS-Expression bzw. der Aktivitätsverstärkung des Enzyms^{139;140} aufgrund möglicher paradoxer, kontraproduktiver Veränderungen in den Hintergrund. Eine andere Strategie war vonnöten, das oben beschriebene Phänomen der Entkopplung zu umgehen.

Dies kann durch die Verwendung eines direkten sGC-Aktivators, wie zum Beispiel dem Anthranilinsäure-Derivat HMR 1766, welches die häm-oxidierte Form der sGC NO-unabhängig aktiviert, erreicht werden ^{90;141}. Die pharmakologische sGC-Aktivierung bringt antithrombozytäre Eigenschaften mit sich, indem sie den thrombozytären cGMP-Spiegel erhöht. Dieser ist der wichtigste Botenstoff zur Vermittlung NO-getriggelter Effekte in Blutplättchen ¹⁴²⁻¹⁴⁴.

Aufgrund des immensen Wissenszuwachses bezüglich der essentiellen Bedeutung von Stickstoffmonoxid und der Intaktheit der NO-abhängigen Signalkaskade sowie des Wissens um die Dysfunktion dieses Schlüsselweges bei diversen Volkskrankheiten ^{31;76;104;145;146}, der im letzten Jahrzehnt erreicht wurde, gewinnt die Entwicklung NO-unabhängiger sGC-Aktivatoren immer mehr an Bedeutung. Ein von der Wirkungsweise HMR1766-ähnlicher Wirkstoff, BAY 58-2667, der die lösliche Guanylatcyclyase ebenfalls NO-unabhängig und im oxidierten Zustand aktiviert, ist besser untersucht und dessen Effekte mehrfach beschrieben ^{141;147-156}. Allerdings ist auch im Rahmen dieser Arbeiten schwerpunktmäßig die Verbesserung der Gefäßfunktion bei Krankheitsbildern beschrieben, die mit endothelialer Dysfunktion einhergehen. Somit erweitert die vorliegende Arbeit, die sich ja vornehmlich mit der Thrombozytenaktivierung bei Diabetes und deren mögliche Beeinflussung durch medikamentöse Aktivierung der sGC im diabetischen Tiermodell beschäftigt, das Spektrum von der bloßen Fokussierung auf Gefäße hin zu einer ganzheitlicheren Betrachtung der Wirkung und damit zu erreichender Möglichkeiten dieser Medikamentengruppe vor dem Hintergrund einer bestehenden chronischen Erkrankung.

Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass die akute Gabe von HMR 1766 die Plättchenfunktion über den NO/cGMP/VASP-Signalweg verbessert und die Thrombozytenreaktivität vermindert. Die Ergebnisse der *in vitro* und der akuten *in vivo* Experimente legen den Schluss nahe, dass die Stimulierung der sGC durch HMR 1766 bei diabetischen Ratten unabhängig vom Vorliegen einer sGC-Dysfunktion funktioniert. Des Weiteren liefert die vorliegende Studie den ersten *in vivo* – Beweis für die Verbesserung des endogenen, Plättchen-inhibierenden NO/cGMP-Signalwegs durch chronische sGC-Stimulation, was durch die verstärkte VASP-Phosphorylierung und die verringerte Thrombozytenaktivierung bei diabetischen Ratten gezeigt werden konnte. Die chronische sGC-Stimulation unter *in vivo* Bedingungen reduzierte sowohl die

Aktivierung des Glykoproteins IIb/IIIa (was über die Fibrinogenbindung bestimmt wurde) als auch die Degranulation der Plättchen (was anhand verminderter P-Selectin-Oberflächenexpression zum Ausdruck kam). P-Selectin nimmt außerdem bei der Plättchenadhäsion ans Endothel sowie an der Thrombozyten-Leukozyten-Adhäsion eine wichtige Rolle ein^{157;158}. Thrombozyten, die P-Selectin auf der Oberfläche exprimieren, sind an der Interaktion aktivierter Plättchen mit Leukozyten und an der Atheroskleroseentstehung maßgeblich beteiligt^{9;159}. Bereits durchgeführte Studien konstatierten eine mögliche Inhibition von P-Selectin- und CD40-Ligand-Oberflächenexpression durch cAMP / cGMP-abhängige Proteinkinasen¹⁶⁰, deren Aktivierung über das Ausmaß vorliegender VASP-Phosphorylierung dargestellt werden kann¹⁶¹. Im Einklang mit diesen Ergebnissen reduzierte die chronische sGC-Aktivierung durch HMR 1766 die Thrombozytenaggregation mit nicht-thrombozytären Blutzellen und verminderte die Anzahl zirkulierender thrombozytärer Mikropartikel. *In vitro* Versuche mit HMR 1766 zeigten eine gesteigerte sGC-Aktivität, jedoch keine Verbesserung hinsichtlich NO-Sensitivität.

Im Gegensatz dazu verbesserte allerdings die *in vivo* Gabe von HMR 1766 die Sensitivität von Blutplättchen auf exogenes NO. Interessanterweise stellte sich ein ähnliches Muster bei isolierten Aortenringen dieser Tiere dar, bei denen HMR 1766 die Vasorelaxation gegenüber exogenem NO verbesserte und das Vorliegen oxidativen Stresses reduzierte¹⁶². Ein gestörtes Ansprechen von Blutplättchen auf NO ist ein prädiktiver Wert für eine gesteigerte Mortalität und kardiovaskuläre Morbidität bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom¹³¹. Die verbesserte Sensitivität gegenüber NO, die durch die Langzeitbehandlung mit einem sGC-Aktivator im Diabetes erreicht werden kann, könnte demzufolge das Auftreten solcher kardiovaskulärer Komplikationen verringern.

Diabetische Patienten haben ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Atherosklerose und Thrombosen. Die vermehrte Degranulation von Thrombozyten bei Patienten mit Diabetes ist mit einem Fortschreiten der proatherogenen Veränderungen der Gefäßwände assoziiert¹⁶³. Die chronische Aktivierung der sGC durch HMR 1766 bei diabetischen Ratten reduzierte das Ansprechen von Thrombozyten auf ADP. Erhöhte Blutzuckerspiegel wurden bereits als unabhängige Vorhersagewerte für Plättchen-abhängige Thrombosen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung identifiziert¹⁶⁴.

Außerdem lässt sich bereits ein signifikant gesteigertes Vorhandensein thrombozytärer Aktivierungsmarker bei Individuen nachweisen, die lediglich bzgl. des Vorhandenseins von Inselzellantikörpern positiv getestet wurden, noch bevor es zur Manifestation einer diabetischen Erkrankung kam. Dies deutet auf eine bereits in einem sehr frühen Stadium der diabetischen Erkrankung vorliegende Thrombozytenaktivierung hin ⁷⁵. Dieses Phänomen wird im klinischen Alltag dadurch bestätigt, dass tatsächlich Patienten mit Typ 2-Diabetes ohne vorhergegangenen kardiovaskulärem Ereignis annähernd das gleiche Risiko haben, einen Herzinfarkt zu erleiden, wie es bei nicht-diabetischen Patienten, die bereits einen Herzinfarkt hatten, der Fall ist ⁵.

Schlussfolgernd lässt sich ableiten, dass aktivierte Thrombozyten einen wesentlichen Anteil an der gesteigerten Morbidität und Mortalität diabetischer Patienten haben, da die meisten dieser Patienten an kardiovaskulären atherothrombotischen Ereignissen versterben ¹⁶⁵. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Thrombozyten einer der initialen Schritte der Atherogenese ist ^{9;10} und dass die Inhibition der Plättchenaktivierung-/adhäsion sowie der Leukozytenadhäsion der Plaqueentwicklung vorbeugt ¹⁰. Für die Thrombozyten diabetischer Patienten ist eine Vielzahl von Abnormalitäten charakteristisch, unter anderem ein gesteigertes MPV, eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Plättchenoberfläche und ein erhöhtes Potential zur Exkretion von Vasokonstriktoren. Die Ätiologie dieser Abnormalitäten wird sämtlichen Veränderungen, die im diabetischen Milieu vorzufinden sind, zugeschrieben. Diese Veränderungen beinhalten die endotheliale Dysfunktion, die zu einer verringerten endogenen Plättcheninhibition und einer gesteigerten Sensitivität gegenüber thrombozytären Agonisten beiträgt, oxidativen Stress, dem gesteigerten Vorliegen von *advanced glycation end products* (AGEs), die den thrombozytären Metabolismus direkt beeinflussen bzw. Anteil an ungünstigen, strukturellen Veränderungen in den Gefäßwänden haben, sowie dem Vorhandensein einer Entzündungskonstellation.

In dieser Arbeit konnte durch die Verstärkung der NO-vermittelten Plättcheninhibition durch chronische sGC-Aktivierung ein verringertes MPV, eine verminderte Fibrinogenbindung an GP IIb/IIIa und eine verminderte Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls P-Selectin gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten alle darauf hin, dass der Verlust einer chronischen, NO-vermittelten Thrombozyteninhibition zur

gesteigerten Affinität von Plättchen auf aktivierende Stimuli im Diabetes beiträgt und dass diese gesteigerte Affinität medikamentös beeinflussbar ist.

Trotz dieser insgesamt sehr zufriedenstellenden Ergebnisse seitens positiver Beeinflussungsmöglichkeit der gesteigerten Thrombozytenaktivierung im diabetischen Tiermodell durch medikamentöse Aktivierung der sGC bleiben einige Fragen offen, die während dieser Arbeit auftraten. Deren Beantwortung bleibt Spekulation, in einigen Fällen würden ergänzende Untersuchungsmethodiken, die sich teilweise auch schon in der Etablierung befinden, eventuell Antworten liefern.

Aufgrund der auf Tierexperimenten basierenden Arbeit ist man auf das Vorhandensein von Techniken und Substanzen, wie zum Beispiel Antikörpern, angewiesen, die auf diese Gegebenheit abgestimmt sind. Zwar ist das vorliegende Wistar-Rattenmodell weit verbreitet, dennoch gibt es nur eine beschränkte Auswahl an Antikörpern zur Darstellung spezifischer Aktivierungsmarker beziehungsweise zur Detektion bestimmter Zellpopulationen. Bei der vorliegenden Arbeit konnte deshalb hinsichtlich durchflusszytometrischer Versuche nur auf eine begrenzte Anzahl bereits etablierter Aktivierungsmarker zurückgegriffen werden. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Detektion der Adhäsion von Thrombozyten an nicht-thrombozytäre Blutbestandteile betrachtet. Ursprünglich war hier die spezifische Darstellung der Aggregatbildung von Blutplättchen mit Leukozyten vorgesehen. Die Versuche, dies mit einer Zweifachfärbung aus Kombination eines Thrombozyten- und eines Leukozyten-spezifischen Antikörpers zu erreichen, scheiterten an der zu ungenauen Bindung des zuletzt erwähnten Antikörpers an dessen eigentliche Zielgruppe. Somit musste diese Bestrebung verworfen und eine etwas unspezifischere Darstellung der Aktivierung in Kauf genommen werden.

Zudem werden in dieser Arbeit keinerlei plasmatisch vorliegende, thrombozytäre Aktivierungsmarker bestimmt. Man denke nur an die Messung von z.B. Thromboxan-Metaboliten, β -Thromboglobulin, Platelet Factor 4, Serotonin, P-Selectin oder CD40L als zusätzliche Parameter eines im Diabetes vorliegenden verstärkten Aktivierungsmilieus beziehungsweise von im diabetischen Plasma vermehrt vorzufindender Gerinnungsmarker, wie zum Beispiel Prothrombin-Aktivierungs-Fragment 1+2, Thrombin-Anti-Thrombin-Komplexe und Gerinnungsfaktoren [Faktor VII, VIII, XI, XII, von Willebrand Faktor, Kallikrein], *Plasminogen Activator Inhibitor*

Type I (PAI-1) oder dem verminderten Vorliegen von antikoagulatorischem Protein C¹⁶⁶⁻¹⁷⁰. Obwohl zahlreiche Proben an Plasma der verschiedenen Tiergruppen gewonnen und tiefgefroren aufbewahrt wurden, scheiterten die meisten Messungen einerseits an den für Tiermaterial nicht zur Verfügung stehenden Nachweismethodiken, andererseits konnten bei der Anwendung von Nachweisstandards für humanes Material keine standardisierten Normgrenzen als Referenz gefunden werden.

Unklar bleiben bis dato auch die Ergebnisse der Aggregabilitätsmessungen und deren Interpretation. Eigentlich wäre bei dem bereits erwähnten prokoagulatorischen Milieu im Diabetes doch eine konsekutiv gesteigerte Thrombozytenaggregation zu erwarten, wie sie auch schon mehrfach beschrieben wurde¹⁷¹⁻¹⁷³. Allerdings sind die kontroversen Resultate der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten aggregometrischen Messungen nicht neu und somit nicht ganz überraschend. Zwar wird oft von einer verstärkten Aggregabilität im Diabetes berichtet, als Versuchsmaterial werden jedoch durchgehend gewaschene Thrombozyten verwendet. Kommt PRP zum Einsatz, ähneln die Ergebnisse meist den hier vorliegenden^{126;174;175}.

Liegt die beim Diabetes vorherrschende verminderte Aggregabilität von PRP somit an Substanzen, die im Plasma gelöst sind? Dieser Hypothese nachzugehen wäre sehr reizvoll, hätte allerdings den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die günstigen Auswirkungen der chronischen Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch HMR 1766 auf die Regulation der Thrombozytenaktivität im experimentellen Diabetes mellitus.

Es konnte die zugrunde liegende Hypothese eines aktivierten Zustands von Thrombozyten im Diabetes bestätigt und darüber hinaus die Reversibilität dieser Aktivierung durch medikamentöse, direkte, NO-unabhängige, chronische Stimulation der sGC, dem Schlüsselenzym zur Vermittlung endogener NO-Wirkung, gezeigt werden. Hierzu wurden mit Hilfe durchflusszytometrischer Bestimmungen in frisch entnommenem Vollblut verschiedene thrombozytäre Marker analysiert. Zum einen deuteten die Ergebnisse auf eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit beziehungsweise eine verringerte Aktivität des Effektorenzyms im Diabetes und eine gesteigerte Aktivität des Enzyms bei HMR 1766-behandelten Versuchstieren hin, zum anderen konnte ein Rückgang der Expression thrombozytärer Aktivierungsparameter in Richtung des Niveaus gesunder Kontrollen bei Thrombozyten der Tiere gezeigt werden, die den GC-Aktivator erhielten. Darüber hinaus stellte sich eine verminderte Aktivierbarkeit auf externe Stimuli bei *in vitro* Versuchen in Vollblut als auch in PRP heraus. Bei aggregometrischen Untersuchungen mit PRP zeigte sich eine verminderte Aggregation als Reaktion auf Fractalkine-Inkubation und anschließende direkte Stimulation mit ADP bei dem Material HMR 1766 behandelte Tiere. Zur Untersuchung von Akut-Effekten der Substanz wurden Proben gesunder beziehungsweise diabetischer Tiere teils direkt mit dem Medikament inkubiert, und es wurde einmalig medikamentös behandelte Tieren Blut entnommen. Hier stellte sich eine verminderte ADP-induzierte Aggregation bei behandelte Proben heraus, zudem zeigten sich positive Akut-Effekte hinsichtlich der basalen als auch der mit einem NO-Donor stimulierten VASP-Phosphorylierung. Bei der Betrachtung hämatologischer und metabolischer Parameter fiel bei sonst unauffälligen Ergebnissen das MPV auf, das im Diabetes erhöht, nach Behandlung mit dem GC-Aktivator jedoch wieder auf Kontrollwerte reduziert war.

Die vielversprechenden Ergebnisse könnten ein Schritt zur Etablierung dieser Substanz als zukünftiges Medikament zur Prävention beziehungsweise Behandlung kardiovaskulärer Komplikationen bei Diabetes sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Tschoepe D, Menart-Houtermans B. Diabetes mellitus. In: Michelson AD, ed. Platelets. San Diego: Academic Press; 2002: 435-445
2. Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz HM, LaRosa J, Ockene IS, Pearson TA, Reed J, Washington R, Smith SC, Jr. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association. *Circulation*. 1998;97:1876-1887.
3. Haffner SM. Coronary heart disease in patients with diabetes. *N Engl J Med*. 2000;342:1040-1042.
4. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, Mahonen M, Niemela M, Haffner SM, Pyorala K, Tuomilehto J. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group. *Diabetes Care*. 1998;21:69-75.
5. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998;339:229-234.
6. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.
7. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
8. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143.
9. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med*. 2003;9:61-67.
10. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002;196:887-896.
11. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:3378-3384.
12. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res*. 2005;96:612-616.

13. Schafer A, Schulz C, Eigenthaler M, Fraccarollo D, Kobsar A, Gawaz M, Ertl G, Walter U, Bauersachs J. Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. *Blood*. 2004;103:407-412.
14. Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11:15-21.
15. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:34-40.
16. Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, Mericskay M, Gierschik P, Biessen EA, Weber C. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*. 2005;96:784-791.
17. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 1996;184:1101-1109.
18. Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res*. 2000;86:131-138.
19. Weber C, Schober A, Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1997-2008.
20. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. 2006;203:1221-1233.
21. Schober A, Knarren S, Lietz M, Lin EA, Weber C. Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2003;108:2491-2497.
22. Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, Hooper AT, Amano H, AVECILLA ST, Heissig B, Hattori K, Zhang F, Hicklin DJ, Wu Y, Zhu Z, Dunn A, Salari H, Werb Z, Hackett NR, Crystal RG, Lyden D, Rafii S. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med*. 2006;12:557-567.
23. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1897-1905.

24. Lindemann S, Kramer B, Daub K, Stellos K, Gawaz M. Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18:566-573.
25. Russo G, Leopold JA, Loscalzo J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:259-269.
26. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.
27. Moncada S, Radomski MW, Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:2495-2501.
28. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844.
29. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation.* 2004;109:II27-II33.
30. Meredith IT, Anderson TJ, Uehata A, Yeung AC, Selwyn AP, Ganz P. Role of endothelium in ischemic coronary syndromes. *Am J Cardiol.* 1993;72:27C-31C.
31. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart.* 2001;85:342-350.
32. Reichenbach G, Momi S, Gresele P. Nitric oxide and its antithrombotic action in the cardiovascular system. *Cardiovasc Haematol Disorders.* 2005; 5: 65-74.
33. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 2001;88:756-762.
34. Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM, Quyyumi AA. Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation.* 1998;98:17-24.
35. Vallance P, Benjamin N, Collier J. The effect of endothelium-derived nitric oxide on ex vivo whole blood platelet aggregation in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992;42:37-41.
36. Schafer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation.* 2004;109:1819-1822.
37. Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci.* 1995;57:2049-2055.

38. Pigazzi A, Fabian A, Johnson J, Upchurch GR, Loscalzo J. Identification of nitric oxide synthases in human megakaryocytes and platelets. *Circulation*. 1995;92:I-365. Abstract.
39. Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med*. 1995;125:370-377.
40. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol*. 1990;101:325-328.
41. Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest*. 1997;100:350-356.
42. Zhou Q, Hellermann GR, Solomonson LP. Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb Res*. 1995;77:87-96.
43. Malinski T, Radomski MW, Taha Z, Moncada S. Direct electrochemical measurement of nitric oxide released from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;194:960-965.
44. Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. *Circ Res*. 2007;101:654-662.
45. Schafer A, Alp NJ, Cai S, Lygate CA, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1720-1726.
46. Gambaryan S, Kobsar A, Hartmann S, Birschmann I, Kuhlencordt PJ, Muller-Esterl W, Lohmann SM, Walter U. NO-synthase-/NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity. *J Thromb Haemost*. 2008.
47. Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14:18-22.
48. Gawaz M, Thrombozytäre Membranglykoproteine. In: Gawaz M, Das Blutplättchen. Stuttgart: Thieme Verlag; 1999: 30-41.
49. Michelson AD, Barnard MR. Flow Cytometry. In: Michelson AD, ed. Platelets. San Diego: Academic Press; 2002: 297-315
50. Nieuwland R, Sturk A. Platelet-derived microparticles. In: Michelson AD, ed. Platelets. San Diego: Academic Press; 2002: 255-265

51. Nomura S, Suzuki M, Katsura K, Xie GL, Miyazaki Y, Miyake T, Kido H, Kagawa H, Fukuhara S. Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1995;116:235-240.
52. Koksich M, Zeiger F, Wittig K, Siegemund A, Reininger CB, Pfeiffer D, Ruehlmann C. Coagulation, fibrinolysis and platelet P-selectin expression in peripheral vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2001;21:147-154.
53. Gurbel PA, Kereiakes DJ, Dalesandro MR, Bahr RD, O'connor CM, Serebruany VL. Role of soluble and platelet-bound P-selectin in discriminating cardiac from noncardiac chest pain at presentation in the emergency department. *Am Heart J*. 2000;139:320-328.
54. Gibbs CR, Blann AD, Watson RD, Lip GY. Abnormalities of hemorheological, endothelial, and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and beta-blocker therapy. *Circulation*. 2001;103:1746-1751.
55. Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann S, Christ M, Eigenthaler M, Kobsar A, Walter U, Bauersachs J. Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition. *Thromb Haemost*. 2003;89:1024-1030.
56. Yamazaki M, Uchiyama S, Iwata M. Measurement of platelet fibrinogen binding and p-selectin expression by flow cytometry in patients with cerebral infarction. *Thromb Res*. 2001;104:197-205.
57. Cerwinka WH, Granger DN. Influence of hypercholesterolemia and hypertension on ischemia-reperfusion induced P-selectin expression. *Atherosclerosis*. 2001;154:337-344.
58. Broijerssen A, Hamsten A, Eriksson M, Angelin B, Hjendahl P. Platelet activity in vivo in hyperlipoproteinemia--importance of combined hyperlipidemia. *Thromb Haemost*. 1998;79:268-275.
59. Lip GY. Hypertension, platelets, and the endothelium: the "thrombotic paradox" of hypertension (or "Birmingham paradox") revisited. *Hypertension*. 2003;41:199-200.
60. Blann AD, Nadar S, Lip GY. Pharmacological modulation of platelet function in hypertension. *Hypertension*. 2003;42:1-7.
61. Nityanand S, Pande I, Bajpai VK, Singh L, Chandra M, Singh BN. Platelets in essential hypertension. *Thromb Res*. 1993;72:447-454.
62. Ouvina SM, La Greca RD, Zanaro NL, Palmer L, Sasseti B. Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. *Thromb Res*. 2001;102:107-114.

63. Manduteanu I, Calb M, Lupu C, Simionescu N, Simionescu M. Increased adhesion of human diabetic platelets to cultured valvular endothelial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1992;24:539-547.
64. Gawaz M, Thrombozyten und primäre Hämostase. In: Gawaz M, Das Blutplättchen. Stuttgart: Thieme Verlag; 1999: 4-24.
65. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood*. 1996;88:1525-1541.
66. Libby P, Pathophysiology of the Atheroma and Mechanisms of Plaque Rupture. Invited Lecture of Japanese Circulation Society. 2000
67. Rabini RA, Staffolani R, Fumelli P, Mutus B, Curatola G, Mazzanti L. Decreased nitric oxide synthase activity in platelets from IDDM and NIDDM patients. *Diabetologia*. 1998;41:101-104.
68. Li Y, Woo V, Bose R. Platelet hyperactivity and abnormal Ca(2+) homeostasis in diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1480-H1489.
69. Tschoepe D, Roesen P, Esser J, Schwippert B, Nieuwenhuis HK, Kehrel B, Gries FA. Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost*. 1991;17:433-438.
70. Sharpe PC, Trinick T. Mean platelet volume in diabetes mellitus. *Q J Med*. 1993;86:739-742.
71. Papanas N, Symeonidis G, Maltezos E, Mavridis G, Karavageli E, Vosnakidis T, Lakasas G. Mean platelet volume in patients with type 2 diabetes mellitus. *Platelets*. 2004;15:475-478.
72. Sobol AB, Watala C. The role of platelets in diabetes-related vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000;50:1-16.
73. Kelly R, Steinhubl SR. Platelet Dysfunction. In: Marso SP, Stern DM, eds. Diabetes and Cardiovascular Disease. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004: 251-267
74. Tschoepe D, Driesch E, Schwippert B, Nieuwenhuis HK, Gries FA. Exposure of adhesion molecules on activated platelets in patients with newly diagnosed IDDM is not normalized by near-normoglycemia. *Diabetes*. 1995;44:890-894.
75. Tschoepe D, Driesch E, Schwippert B, Lampeter EF. Activated platelets in subjects at increased risk of IDDM. DENIS Study Group. Deutsche Nikotinamid Interventionsstudie. *Diabetologia*. 1997;40:573-577.
76. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-2012.

77. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep.* 1999;19:235-251.
78. Ignarro LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep.* 1999;19:51-71.
79. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep.* 1999;19:133-154.
80. Radomski MW, Palmer RM, Read NG, Moncada S. Isolation and washing of human platelets with nitric oxide. *Thromb Res.* 1988;50:537-546.
81. Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res.* 1996;78:750-758.
82. Busse R, Fleming I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res.* 1998;35:73-84.
83. Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, Busse R. Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res.* 1998;82:686-695.
84. Kuchan MJ, Frangos JA. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1994;266:C628-C636.
85. O'Neill WC. Flow-mediated NO release from endothelial cells is independent of K⁺ channel activation or intracellular Ca²⁺. *Am J Physiol.* 1995;269:C863-C869.
86. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev.* 1997;49:137-142.
87. Willoughby S, Loscalzo J. Vascular control of platelet function. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders. 2002; 432-455.
88. Koesling D, Friebe A. Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999;135:41-65.
89. Russwurm M, Koesling D. NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J.* 2004;23:4443-4450.
90. Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowski K, Haerter M, Heil M, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schramm M, Schroeder W, Schroeder H, Stahl E, Steinke W, Wunder F. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol.* 2002;136:773-783.

91. Walter U. Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1989;113:41-88.
92. Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson WJ, Hofmann F, Koesling D. Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *J Cell Biol.* 2003;160:719-727.
93. Lincoln TM. Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther.* 1989;41:479-502.
94. Mullershausen F, Lange A, Mergia E, Friebe A, Koesling D. Desensitization of NO/cGMP signaling in smooth muscle: blood vessels versus airways. *Mol Pharmacol.* 2006;69:1969-1974.
95. Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol.* 2001;62:1153-1161.
96. Schindler U, Strobel H, Schonafinger K, Linz W, Lohn M, Martorana PA, Rutten H, Schindler PW, Busch AE, Sohn M, Topfer A, Pistorius A, Jannek C, Mulsch A. Biochemistry and pharmacology of novel anthranilic acid derivatives activating heme-oxidized soluble guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol.* 2006;69:1260-1268.
97. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA.* 2002;287:2570-2581.
98. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost.* 1999;82:1145-1152.
99. Massberg S, Gruner S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, Kersting J, Schulz C, Muller I, Besta F, Nieswandt B, Heinzmann U, Walter U, Gawaz M. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood.* 2004;103:136-142.
100. Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fassler R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* 1999;18:37-48.
101. Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F, Hofmann F. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med.* 1999;189:1255-1264.

102. De Vriese AS. Endothelial dysfunction in diabetes. *Brit J Pharm.* 2000; 130: 963-974.
103. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation.* 2003;108:1527-1532.
104. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113:1708-1714.
105. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001;88:E14-E22.
106. Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1551-1557.
107. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 1997;96:25-28.
108. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001;88:E14-E22.
109. Bauersachs J, Schafer A. Tetrahydrobiopterin and eNOS dimer/monomer ratio--a clue to eNOS uncoupling in diabetes? *Cardiovasc Res.* 2005;65:768-769.
110. Schafer A, Alp NJ, Cai S, Lygate CA, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1720-1726.
111. Munzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, Oelze M, Skatchkov M, Warnholtz A, Duncker L, Meinertz T, Forstermann U. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res.* 2000;86:E7-E12.
112. Alp NJ, Mussa S, Khoo J, Cai S, Guzik T, Jefferson A, Goh N, Rockett KA, Channon KM. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. *J Clin Invest.* 2003;112:725-735.

113. Alp NJ, McAteer MA, Khoo J, Choudhury RP, Channon KM. Increased endothelial tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression reduces endothelial dysfunction and atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:445-450.
114. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 2001;103:1282-1288.
115. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 2003;93:96-105.
116. Witte K, Hachenberger J, Castell MF, Vahl CF, Haller C. Nitric oxide-sensitive soluble guanylyl cyclase activity is preserved in internal mammary artery of type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2004;53:2640-2644.
117. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* 2002;48:1819-1827.
118. BORN GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962;194:927-929.
119. Gawaz M. Das Blutplättchen. Funktionsdiagnostik. S.42 -53
120. Macmillan DC, Sim AK. A comparative study of platelet aggregation in man and laboratory animals. *Thromb Diath Haemorrh.* 1970;24:385-389.
121. Nunn B. Some characteristics of mouse platelet aggregation and a comparison of the activity of a range of compounds in mouse and human platelet-rich plasma in vitro. *Thromb Haemost.* 1981;45:1-5.
122. Müller M. Chirurgie für Studium und Praxis. Milz. Medizinische Verlags- u. Informationsdienste. Breisach.2004; S. 254-257
123. Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem.* 1994;225:21-27.
124. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999;30:111-142.
125. Nomura S, Miyazaki Y, Miyake T, Suzuki M, Kawakatsu T, Kido H, Yamaguchi K, Fukuroi T, Kagawa H, Yanabu M. Detection of platelet-derived microparticles in patients with diabetes. *Am J Hematol.* 1993;44:213.

126. Dunbar JC, Reinholt L, Henry RL, Mammen E. Platelet aggregation and disaggregation in the streptozotocin induced diabetic rat: the effect of sympathetic inhibition. *Diabetes Res Clin Pract.* 1990;9:265-272.
127. Queen LR, Paul W, Page CP, Ferro A. Diabetic plasma prevents the increase in platelet aggregation in a rat model of diabetes. *J Physiol.* 2005;
128. Inui Y, Suehiro T, Kumon Y, Hashimoto K. Platelet volume and urinary prostanoid metabolites in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb.* 1994;1:108-112.
129. Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications.* 2001;15:44-54.
130. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 2001;88:756-762.
131. Willoughby SR, Stewart S, Holmes AS, Chirkov YY, Horowitz JD. Platelet nitric oxide responsiveness: a novel prognostic marker in acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2661-2666.
132. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813-820.
133. Stratmann B, Tschoepe D. Pathobiology and cell interactions of platelets in diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2005;2:16-23.
134. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1282-1291.
135. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2001;24:1476-1485.
136. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van d, V, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000;130:963-974.
137. Forstermann U. Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006;62 Suppl 13:5-12.
138. Freedman JE, Loscalzo J. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1183-1188.
139. Li H, Hergert SM, Schafer SC, Brausch I, Yao Y, Huang Q, Mang C, Lehr HA, Forstermann U. Midostaurin upregulates eNOS gene expression and preserves eNOS function in the microcirculation of the mouse. *Nitric Oxide.* 2005;12:231-236.

140. Li H, Junk P, Huwiler A, Burkhardt C, Wallerath T, Pfeilschifter J, Forstermann U. Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;106:2250-2256.
141. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, AK HS, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Muller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Muller-Esterl W, Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest*. 2006;116:2552-2561.
142. Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, Radoski MW, Moncada S. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:1480-1485.
143. Friebe A, Mullershausen F, Smolenski A, Walter U, Schultz G, Koesling D. YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Mol Pharmacol*. 1998;54:962-967.
144. Hobbs AJ, Moncada S. Antiplatelet properties of a novel, non-NO-based soluble guanylate cyclase activator, BAY 41-2272. *Vascul Pharmacol*. 2003;40:149-154.
145. Reichenbach G, Momi S, Gresele P. Nitric oxide and its antithrombotic action in the cardiovascular system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005;5:65-74.
146. Anderson TJ. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fail Rev*. 2003;8:71-86.
147. Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: an old therapeutic target re-visited. *Br J Pharmacol*. 2002;136:637-640.
148. Boerrigter G, Burnett JC, Jr. Nitric Oxide-Independent Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase with BAY 41-2272 in Cardiovascular Disease. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007;25:30-45.
149. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A, Lapp H, Stasch JP, Burnett JC, Jr. Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure. *Hypertension*. 2007;49:1128-1133.
150. Rothkegel C, Schmidt PM, Stoll F, Schroder H, Schmidt HH, Stasch JP. Identification of residues crucially involved in soluble guanylate cyclase activation. *FEBS Lett*. 2006;580:4205-4213.
151. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:755-768.

152. Kalk P, Godes M, Relle K, Rothkegel C, Hucke A, Stasch JP, Hocher B. NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br J Pharmacol.* 2006;148:853-859.
153. Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H, Stasch JP, Gnoth MJ, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation.* 2006;113:286-295.
154. Schmidt P, Schramm M, Schroder H, Stasch JP. Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase. *Eur J Pharmacol.* 2003;468:167-174.
155. Doggrell SA. Clinical potential of nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activators. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005;6:874-878.
156. Gladwin MT. Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. *J Clin Invest.* 2006;116:2330-2332.
157. Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost.* 2001;86:214-221.
158. Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikstrom-Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl P. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2702-2708.
159. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood.* 1998;92:507-515.
160. Schwarz UR, Kobsar AL, Koksich M, Walter U, Eigenthaler M. Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:1399-1407.
161. Schafer A, Burkhardt M, Vollkommer T, Bauersachs J, Munzel T, Walter U, Smolenski A. Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:397-405.
162. Schafer A, Vogt C, Fraccarollo D, Bauersachs J. Improvement of vascular dysfunction in diabetes by chronic guanylyl cyclase activation. *Circulation.* 2005; 112:II-301. Abstract

163. Fateh-Moghadam S, Li Z, Ersel S, Reuter T, Htun P, Plockinger U, Bocksch W, Dietz R, Gawaz M. Platelet degranulation is associated with progression of intima-media thickness of the common carotid artery in patients with diabetes mellitus type 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1299-1303.
164. Shechter M, Merz CN, Paul-Labrador MJ, Kaul S. Blood glucose and platelet-dependent thrombosis in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:300-307.
165. Resnick HE, Harris MI, Brock DB, Harris TB. American Diabetes Association diabetes diagnostic criteria, advancing age, and cardiovascular disease risk profiles: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care.* 2000;23:176-180.
166. Dunn EJ, Grant PJ. Type 2 diabetes: an atherothrombotic syndrome. *Curr Mol Med.* 2005;5:323-332.
167. Torr-Brown SR, Sobel BE. Plasminogen activator inhibitor is elevated in plasma and diminished in platelets in patients with diabetes mellitus. *Thromb Res.* 1994;75:473-477.
168. Sobel BE, Schneider DJ. Platelet function, coagulopathy, and impaired fibrinolysis in diabetes. *Cardiol Clin.* 2004;22:511-526.
169. Bayraktar M, Dundar S, Kirazli S, Teletar F. Platelet factor 4, beta-thromboglobulin and thrombospondin levels in type I diabetes mellitus patients. *J Int Med Res.* 1994;22:90-94.
170. Lim HS, Chong AY, Freestone B, Blann AD, Lip GY. The effect of multifactorial intervention on plasma von Willebrand factor, soluble E-selectin and tissue factor in diabetes mellitus: implications for atherosclerotic vascular disease. *Diabet Med.* 2005;22:249-255.
171. Winocour PD, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Pathways responsible for platelet hypersensitivity in rats with diabetes. I. Streptozocin-induced diabetes. *J Lab Clin Med.* 1986;107:148-153.
172. Murray J, Kaneko JJ, Rucker RB. Experimental diabetes and platelet aggregation in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1983;41:283-291.
173. Fritschi J, Christe M, Lammle B, Marbet GA, Berger W, Duckert F. Platelet aggregation, beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in diabetes mellitus and in patients with vasculopathy. *Thromb Haemost.* 1984;52:236-239.
174. Paul W, Queen LR, Page CP, Ferro A. Increased platelet aggregation in vivo in the Zucker Diabetic Fatty rat: differences from the streptozotocin diabetic rat. *Br J Pharmacol.* 2007;150:105-111.

175. Judge S, Mammen E, Dunbar JC. The effect of streptozocin-induced diabetes on platelet aggregation as determined by impedance aggregometry and platelet secretion: a possible role for nitric oxide. *J Assoc Acad Minor Phys.* 1995;6:100-104.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die für Fragen und Anregungen offen waren und auf deren Hilfe und Beistand ich zählen konnte.

Dies sind im Besonderen die Mitglieder der AG Bauersachs, die im „Container“ (Bau D10) tätig waren beziehungsweise sind, sowie Frau Dr. Anna Kobsar und Herr PD Dr. Martin Eigenthaler aus der Biochemie, die mit Rat und Tat zur Seite standen und in deren Räumen ich tätig sein durfte.

Außerdem möchte ich meinen „Mitdoktoranden“ im Labor, Melinda Hemberger und Christian Vogt für die stets angenehme, lockere Atmosphäre und Zusammenarbeit herzlich danken.

Zudem gilt mein besonderer Dank meiner Familie und Freunden für die Unterstützung. Zu guter Letzt danke ich Herrn Prof. Dr. Johann Bauersachs sowie Herrn PD Dr. Andreas Schäfer für die gute Betreuung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Ulrike Flierl
Steinheilstr. 13
97080 Würzburg

Tel.: 0931-4652831
0162-6935333
E-Mail: Flierl_U@klinik.uni-wuerzburg.de

geb. am 27.04.1982 in Bayreuth
evangelisch
ledig

Schulbildung

1988-1992	Grundschule Pegnitz
1992-2001	Gymnasium Pegnitz
07/2001	Abitur (1,4)

Hochschulstudium

11/2007	Ärztliche Prüfung (2,0) und Approbation
10/2001 – 11/2007	Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
07/2003	Ärztliche Vorprüfung (2,33)
02/2004	Famulatur Klinikum Kulmbach, Chirurgie
06/2005	Famulatur Canterbury Hospital, England, Innere Medizin
07/2005	Famulatur Universitätsklinikum Würzburg, Innere Medizin
02/2006	Praxis-Famulatur Dermatologie, Würzburg
03/2006	Praxis-Famulatur Anästhesiologie, Würzburg
08/2006 – 08/2007	Praktisches Jahr 1.Tertial: Universitätsklinikum Würzburg, Zentrum für Operative Medizin Ninewells Hospital Dundee, Schottland, Chirurgie 2.Tertial:

Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt, Innere Medizin
(Kardiologie, Hämatologie, Gastroenterologie)

3.Tertial:

Universitätsklinikum Würzburg, Anästhesiologie

Berufliche Tätigkeit

Seit 01/2008

Assistenzärztin, Medizinische Klinik I,
Universitätsklinikum Würzburg

Würzburg, Februar 2009