

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

# **Die Wirkung von Fractalkine auf Thrombozytenaktivierung und Endotheldysfunktion bei Herzinsuffizienz und Diabetes**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Corinna Schöpp  
aus Berlin

Würzburg, Juli 2009

Referent: Prof. Dr. med. Johann Bauersachs

Koreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Walter

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 8.12.2009

Die Promovendin ist Ärztin

## **Meinen Eltern**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Kardiovaskuläre Erkrankungen</b> .....	<b>1</b>
1.1 Herzinsuffizienz .....	1
1.2 Diabetes mellitus .....	4
<b>2. Endotheldysfunktion</b> .....	<b>6</b>
2.1 Endotheldysfunktion bei Herzinsuffizienz.....	9
2.2 Endotheldysfunktion bei Diabetes mellitus.....	10
<b>3. Thrombozytenaktivierung</b> .....	<b>12</b>
3.1 Thrombozytenaktivierung bei Herzinsuffizienz.....	14
3.2 Thrombozytenaktivierung bei Diabetes mellitus .....	16
<b>4. Interaktion Endotheldysfunktion und Thrombozytenaktivierung</b> .....	<b>16</b>
<b>5. Bedeutung für Atherosklerose</b> .....	<b>19</b>
5.1 Endotheldysfunktion bei Atherosklerose .....	21
5.2 Thrombozytenaktivierung bei Atherosklerose .....	22
<b>6. Rolle von Fractalkine bei Atherosklerose</b> .....	<b>23</b>
<b>7. Fractalkine</b> .....	<b>26</b>
7.1 Das membran-gebundene Chemokin Fractalkine .....	26
7.2 Fractalkine und Leukozyten .....	27
7.3 Fractalkine und Thrombozyten .....	28
7.4 Fractalkine, Leukozyten und Thrombozyten .....	28
7.5 Fractalkine und Endotheldysfunktion .....	29
<b>8. Klinische Relevanz von Fractalkine</b> .....	<b>30</b>
<b>II. METHODEN</b> .....	<b>32</b>
<b>1. Modelle</b> .....	<b>32</b>
1.1 Allgemeines.....	32
1.2 Myokardinfarkt.....	32
1.2.1 Hämodynamik .....	33
1.2.2 Bestimmung der Infarktgrößen .....	33
1.3 Diabetes mellitus Typ 2.....	34
<b>2. Methodik</b> .....	<b>35</b>
2.1 Organbad: Vasomotorik an isolierten Aortenringen .....	35
2.2 Thrombozytenaktivierung in vitro / CX <sub>3</sub> CR1-Expression .....	37
2.3 Aggregometrie.....	38
2.4 Flusskammermodell zur Thrombozytenadhäsionsmessung.....	40
2.5 ELISA.....	42
2.6 Immunhistochemie .....	42
<b>3. Substanzen</b> .....	<b>43</b>

<b>III. ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
<b>1. Herzinsuffizienz.....</b>	<b>44</b>
1.1 Gefäße .....	44
1.2 Thrombozyten .....	53
<b>2. Diabetes mellitus Typ 2.....</b>	<b>55</b>
2.1 Gefäße .....	55
2.2 Thrombozyten .....	57
<b>IV. DISKUSSION.....</b>	<b>61</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>67</b>
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>68</b>
<b>VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>83</b>
<b>VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>85</b>

## **I. EINLEITUNG**

### **1. Kardiovaskuläre Erkrankungen**

Allein im Jahre 2005 starben in Deutschland nach Angaben des statistischen Bundesamtes 367 361 Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen. Das sind über 100 000 Menschen mehr als an Tumorerkrankungen. Damit sind kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache in Deutschland und den meisten anderen westlichen Industrieländern.<sup>1-3</sup> Unter kardiovaskulären Erkrankungen werden verschiedene Krankheitsbilder mit atherosklerotisch-bedingten Veränderungen an Gefäßen zusammengefasst. Besonders häufig sind dabei Herzkranzgefäße, hirnversorgende Gefäße und periphere Arterien betroffen.<sup>4</sup> Komplikationen wie z. B. Herzinfarkt und Schlaganfall gehen mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Als Endkomplikationen vieler kardiovaskulären Erkrankungen tritt eine Herzinsuffizienz ein.<sup>5,6</sup> Bei einer immer älter werdenden Bevölkerung werden die Fälle kardiovaskulärer Erkrankungen in den nächsten Jahren weiter steigen.<sup>2,3</sup> Mit diesen Erkrankungen gehen auch immense Kosten einher: 2004 wurde in Deutschland durchschnittlich 1430 Euro pro Einwohner (65-85jährig) für kardiovaskuläre Erkrankungen ausgegeben. Bei den über 85jährigen waren es sogar 3690 Euro.

Aus diesen Gründen resultiert ein besonderes Interesse der Forschung darin, das Auftreten und die Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen zu minimieren. Als ein Ziel gilt dabei, die Pathomechanismen der Initiation und Progression der Atherosklerose besser zu verstehen, um dort therapeutisch eingreifen zu können.

Ein wichtiger Ansatzpunkt sind dabei auch die Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Wirkung auf die Atherogenese: arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Adipositas, Nikotinabusus, Alter und Diabetes mellitus.<sup>4</sup>

#### **1.1 Herzinsuffizienz**

Als Komplikation kardiovaskulärer Erkrankungen kann es zu einer Minderperfusion von Gefäßen mit einer daraus resultierenden mangelnden Sauerstoffzufuhr in ihrem Versorgungsgebiet kommen. Handelt es sich dabei um einen dauerhaften Zustand, spricht man von einer chronischen Ischämie. Wenn die Herzkranzgefäße betroffen sind, kann dies zu einer ischämischen Herzinsuffizienz führen.<sup>6</sup> Das bedeutet, dass bei normalem

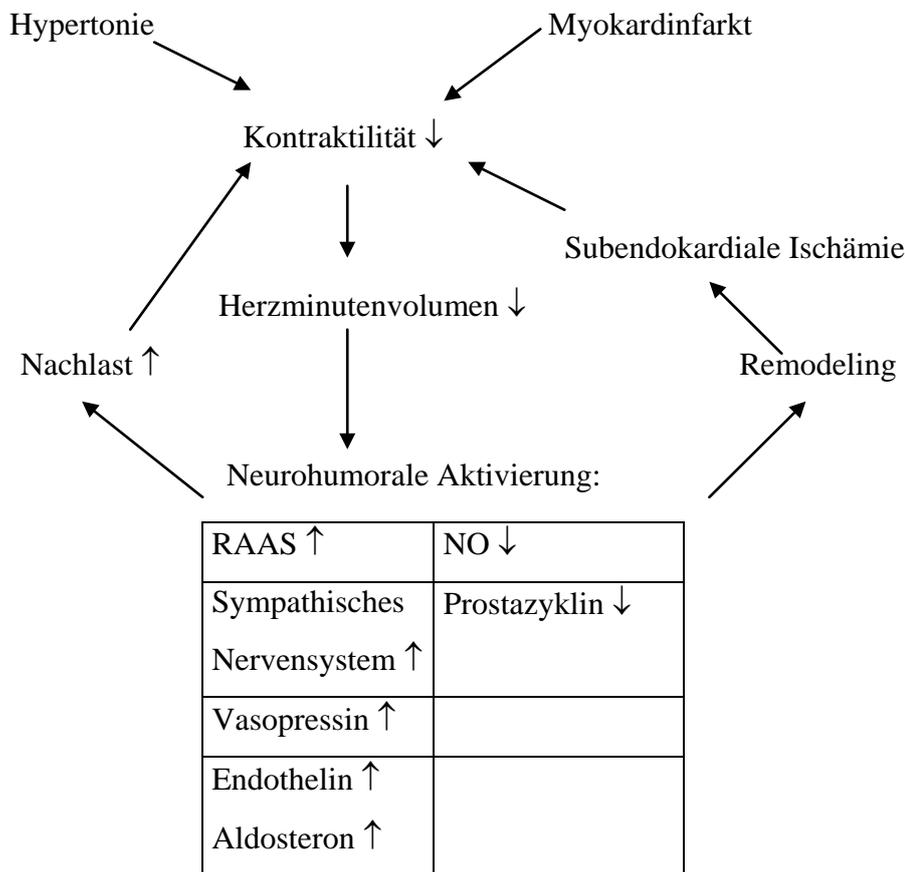
Volumenangebot und Füllungsdruck das Herz nicht mehr in der Lage ist, die peripheren Organe unter Belastung oder gar in Ruhe ausreichend mit Blut zu versorgen. Dieser Zustand entwickelt sich bei der chronischen Herzinsuffizienz (Congestive **H**eart **F**ailure) im Verlauf von Monaten bis Jahren.<sup>7</sup>

Eine der vielen Studien zur Epidemiologie der Herzinsuffizienz ist die Framingham-Studie. Darin zeigte sich, dass Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz in den letzten Jahren angestiegen sind und wohl auch weiter ansteigen werden. Dies liegt zum einen an dem Älterwerden der Bevölkerung, jedoch auch an den verbesserten therapeutischen Maßnahmen bei beispielsweise akutem Myokardinfarkt.<sup>8;9</sup> Die Prävalenz ist wie bei allen kardiovaskulären Erkrankungen stark altersabhängig: unter den 50jährigen sind nur ca. 1% herzinsuffizient, bei den 80jährigen jedoch schon ca.10%.<sup>5;10;11</sup>

Die Lebensqualität wird durch die Herzinsuffizienz stärker beeinträchtigt als durch die meisten anderen chronischen Erkrankungen. Die Morbidität wird höher als bei Tumorerkrankungen eingeschätzt. Nach der Hypertonie ist die Herzinsuffizienz die zweithäufigste der kardiovaskulären Erkrankungen, die zu einer Konsultation in einer Praxis führt.<sup>11</sup> Noch bis vor einigen Jahren war die Prognose der Herzinsuffizienz ähnlich ungünstig wie bei einer Tumorerkrankung. Durch optimale Therapie konnte die Prognose der Herzinsuffizienz deutlich verbessert werden.<sup>12;13</sup>

Eine der Hauptursache für Herzinsuffizienz ist die koronare Herzkrankheit und als deren Komplikation der Myokardinfarkt.<sup>5;6;10;14;15</sup> Durch atherosklerotische Plaques kommt es zu Stenosen in den Koronararterien, was zu einer Minderperfusion der Koronararterien führt. Die Sauerstoffversorgung des Myokards ist dann nicht mehr komplett gewährleistet. Dadurch ist die Myokardperfusion in der Diastole durch den resultierenden Sauerstoffmangel vermindert und die Pumpleistung des Ventrikels unter der Norm.<sup>7</sup> Durch die Abnahme der Ventrikelkontraktilität kommt es zu einem verminderten Herzminutenvolumen. Um dies zu kompensieren und den Blutdruck stabil zu halten, setzt die sogenannte neurohumorale Aktivierung ein: das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und das sympathische Nervensystem werden verstärkt aktiviert.<sup>16;17</sup> Es kommt zu einer vermehrten Synthese von vasokonstriktorisches Substanzen wie z.B. Vasopressin und Endothelin und einer verminderten Synthese von Vasodilatoren wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin. Es besteht eine Imbalance mit Dominanz der vasokonstriktorisches, antinatriuretischen Systeme. Dies führt zu einer gesteigerten peripheren Vasokonstriktion und einer erhöhten

Retention von Natrium und Wasser, was wiederum zu einer erhöhten Vor- und Nachlast führt.<sup>18</sup> Durch Umbau im Myokard (Remodeling) aufgrund mechanischer und neurohumoraler Stimuli kommt es zur Myokardhypertrophie, was bei starker Ausprägung die subendokardiale Perfusion gefährden kann. Eine subendokardiale Ischämie beeinflusst wiederum die Kontraktilität des Herzens negativ.<sup>7;18-20</sup> Durch die chronische Überstimulation mit Katecholaminen werden die  $\beta$ -Rezeptoren am Herzen herunterreguliert.<sup>21</sup> Der positiv inotrope Effekt geht verloren, die periphere Vasokonstriktion und damit die Nachlasterhöhung bleibt erhalten. Es kommt zu einer Verstärkung der Kontraktilitätsminderung und damit zu einer Progression der Herzinsuffizienz (Abb.1). Dieser Circulus vitiosus kann nur therapeutisch unterbrochen werden.<sup>17</sup>



**Abb.1: Pathophysiologie der Herzinsuffizienz:** Durch einen Circulus vitiosus kommt es zu einer weiteren Schwächung der Kontraktilität des Herzmuskels bei Herzinsuffizienz. Die durch eine verminderte Kontraktilität einsetzende neurohumorale Aktivierung bewirkt über das Renin-Angiotensin-System durch eine Vasokonstriktion eine Nachlasterhöhung.

Aufgrund des weiter zu erwartenden Anstiegs der Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz haben die Grundlagenforschung und die daraus resultierenden therapeutischen Ansätze eine zentrale Bedeutung bekommen.

### 1.2 Diabetes mellitus

Ein bedeutender Risikofaktor, der die Mortalität und Morbidität kardiovaskulärer Erkrankungen deutlich erhöht<sup>22;23</sup> und mit einem erhöhten Risiko für Herzinsuffizienz einhergeht<sup>9</sup>, ist Diabetes mellitus. Dabei handelt es sich um eine chronische Stoffwechselerkrankung mit relativem oder absolutem Insulinmangel. Man unterscheidet zwischen zwei Haupttypen: Typ 1-Diabetes, der durch den absoluten Insulinmangel charakterisiert ist, und Typ 2-Diabetes, bei dem neben dem relativen Insulinmangel eine periphere Insulinresistenz im Vordergrund steht.<sup>7;24</sup> Auch die Prävalenz des Diabetes mellitus ist altersabhängig: im Alter < 50 Jahren 1-2% und im Alter > 65 Jahren über 10 %. Prävalenz und Inzidenz sind weltweit ansteigend. So wird es nach Schätzung der WHO im Jahre 2025 300 Millionen Menschen weltweit mit Diabetes geben. Das sind mehr als doppelt so viele wie noch 1995 geschätzt wurde.<sup>25</sup> Dies führt zu einem immensen Kostenaufwand. In der Kodim-Studie wurde gezeigt, dass im Jahre 2001 in Deutschland 3.2 Milliarden Euro für die diabetische Grunderkrankung und 9.6 Milliarden Euro für deren Folgeerkrankung ausgegeben wurde.<sup>26</sup>

Der Typ 1-Diabetes, die wesentlich seltenere Form (10% aller Patienten), tritt idiopathisch oder infolge einer Autoimmunerkrankung auf. Es kommt zu einer irreversiblen Destruktion der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen in den Pankreasinseln. Infolge dessen kommt es zu einem Insulinmangel. Jedoch erst bei einer Zerstörung von ca. 80 % der Inseln treten die Symptome eines Hypoinsulinismus auf. Dann sind die Patienten auf eine exogene Zufuhr von Insulin angewiesen.<sup>24</sup>

Der Typ 2-Diabetes ist die weitaus häufigere Form. Es liegt ein relativer Insulinmangel vor, der jedoch nicht notwendigerweise auf die exogene Zufuhr von Insulin angewiesen ist. Es kommt meist zur Kombination einer gestörten Insulinausschüttung und einer verminderten Insulinempfindlichkeit der Zielorgane.<sup>24</sup> Die Patienten mit Typ 2-Diabetes sind meist übergewichtig. Adipositas kann einen Typ 2-Diabetes auslösen, sie ist jedoch nicht die

Ursache. Durch eine Erhöhung der Konzentration der Fette im Blut sinkt die Glukoseverwertung in Muskel -und Fettgewebe. Dadurch kommt es zu einer Insulinresistenz mit folgender Steigerung der Insulinsekretion. Diese führt jedoch zu einer Herunterregulation der Insulinrezeptoren in der Peripherie, womit die Resistenz weiter zunimmt. Ein sog. Circulus vitiosus, der jedoch durch absinkende Insulinspiegel umkehrbar ist. Auch die Herunterregulation der Rezeptoren ist reversibel.<sup>24;27</sup> Der Typ 2-Diabetes entwickelt sich oftmals auf dem Boden eines metabolischen Syndroms: stammbetonte Adipositas, Dyslipoproteinämie, essentielle Hypertonie und Glukosetoleranzstörung.<sup>27</sup>

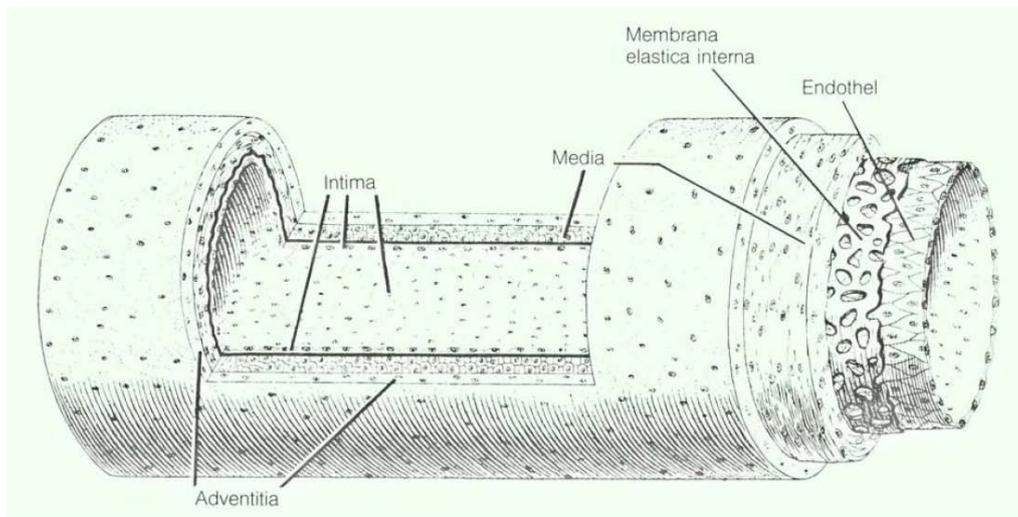
Bei beiden Formen kommt es durch Insulinmangel zu Hyperglykämien. Diese diabetische Stoffwechsellage induziert eine Gefäßdysfunktion, was bei den Patienten zu einer Prädisposition für die Entwicklung und Progression der Atherosklerose führt. Durch Komplikationen der Atherosklerose ist die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität erheblich erhöht. Im Vordergrund stehen hierbei makrovaskuläre Veränderungen, wie z. B. die koronare Herzkrankheit, Karotisstenosen und die periphere arterielle Verschlusskrankheit.<sup>23</sup>

Bei Patienten mit Diabetes ist das Risiko für eine koronare Herzkrankheit 2-4fach gegenüber der Normalbevölkerung erhöht.<sup>28</sup> Weiter erhöht Diabetes mellitus signifikant das Risiko für einen Myokardinfarkt. Zum Vergleich: Diabetiker haben dasselbe Risiko für ein akutes Koronarsyndrom wie Nicht-Diabetiker mit einem vorausgegangenem Infarkt. Die Langzeitprognose nach Myokardinfarkt ist durch Reinfarkte, Herzinsuffizienz und Tod bei Patienten mit Diabetes stärker reduziert.<sup>29</sup>

Dies verdeutlicht, dass die meisten Patienten mit Diabetes an den Komplikationen der Atherosklerose sterben und erfordert eine umfassende präventive Therapie, um das kardiovaskuläre Risiko zu senken.<sup>23</sup> Die Pathogenese der atherosklerotischen Veränderungen bei Diabetes ist noch nicht vollständig geklärt. Bei Typ 2-Diabetes ist die Progression der Atherosklerose beschleunigt und die Wirkung der kardiovaskulären Risikofaktoren verstärkt. Es ist jedoch noch unklar, ob diese Veränderungen als alleinige Folge des Diabetes oder als Folge einer gemeinsamen Störung anzusehen sind, da bei Diagnosestellung meist bereits schon makrovaskuläre Veränderungen vorliegen.

## 2. Endotheldysfunktion

Die Gefäßwand der Arterien ist aus drei Schichten aufgebaut: Intima, Media und Adventitia (Abb.2). Zur Intima als Innenschicht gehört das einschichtige Endothel. Es bildet die innerste Schicht in einem Blutgefäß und hat damit direkten Kontakt mit dem (fließenden) Blut.<sup>30</sup>



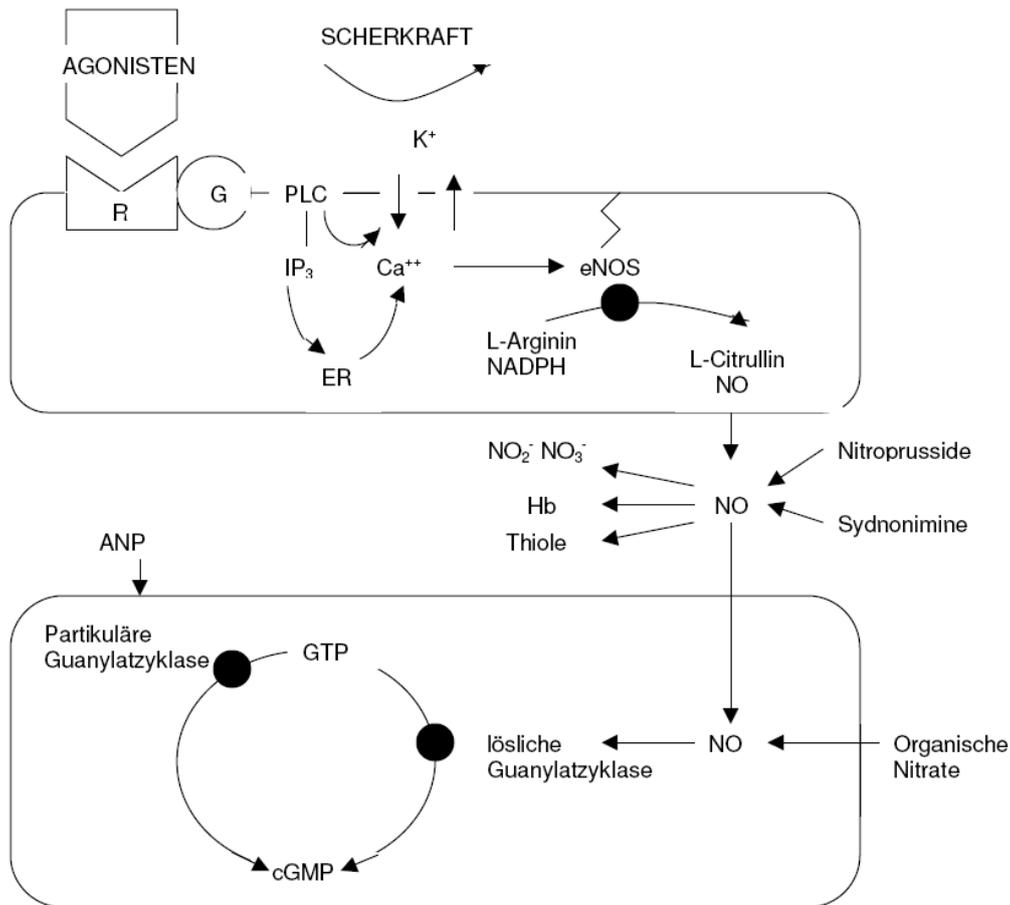
**Abb.2:** Aufbau eines arteriellen Gefäßsystems: Eine Arterie besteht aus Intima, Media und Adventitia. Zur Intima gehört das Endothel.  
*Aus Schiebler et al.: Histologie, 2. Auflage, Springer-Verlag, 12. Kapitel, S.254*

Es ist das größte autokrine, parakrine und endokrine Organ des Körpers mit einer Fläche von etwa 600 m<sup>2</sup> und einem Gewicht von 1,5 kg bei einem 70 kg-Menschen.<sup>31;32</sup> Zur Funktion des Endothels gehört die Regulation des Gefäßtonus durch Sekretion vasoaktiver Substanzen. Weiter spielt es eine wichtige Rolle in der Angiogenese, dem Lipidstoffwechsel, beim Blutfluss, bei der Blutgerinnung und der Leukozytendiapedese.<sup>23;33-38</sup> Zu den vom Endothel synthetisierten Substanzen gehören z.B. EDRF (endothelium-derived relaxing factor), Prostaglandine, Endothelin und Angiotensin II. Diese regulieren Gefäßfunktion und -struktur.<sup>39-41</sup> Die wichtigste vasodilatatorische Substanz<sup>42</sup>, EDRF, wurde als NO (Stickstoffmonoxid) identifiziert.<sup>35</sup> Neben Vasodilatation und Kontrolle der Gefäßmuskelrelaxation verhindert NO die Thrombozytenaktivierung und limitiert die Entzündungsreaktion durch verminderte Leukozytenadhäsion und -migration am Endothel.<sup>41;43</sup> Diese Eigenschaften von NO sind protektiv für das Gefäß und inhibieren den Prozess der Atherogenese.<sup>23;44</sup>

Physiologischerweise wird NO unlimitiert aus der Aminosäure L-Arginin produziert. Das dafür verantwortliche Enzym ist die NO-Synthase. Sie kommt in drei Isoenzymen vor.

Die eNOS (endotheliale NO-Synthase) ist dauerhaft exprimiert, die iNOS (induzierbare NO-Synthase) wird nur auf spezifische Stimuli exprimiert und die nNOS (neuronal NO-Synthase) ist vor allem im Nervensystem dauerhaft exprimiert und durch spezifische Stimuli induzierbar.<sup>45</sup> Die Produktion von NO durch eNOS ist energieabhängig: NADPH wird reduziert. Durch einen Anstieg des cytosolischen Calciums wird die eNOS aktiviert. Zum Calciumanstieg kann es durch eine Vielzahl von Agonisten kommen, z.B. Neurotransmitter (Acetylcholin, Adrenalin, etc) oder Substanzen, die bei Thrombozytenaktivierung -oder aggregation freigesetzt werden (ADP, Thrombin). Die Agonisten bewirken den Calciumanstieg über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und den Phosphoinositol-Signalweg (PLC: Proteinlipase C, IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-trisphosphat, ER: endoplasmatisches Retikulum). Weiter kann die NO-Produktion durch die Scherkraft des Blutflusses Calcium-unabhängig stimuliert werden, abhängig von lokaler Flussrate und Pulsfrequenz (Abb.3). Das produzierte NO wiederum aktiviert die Guanylatzyklase vor allem in der Muskelzelle. Das Produkt cGMP kann über verschiedene Mechanismen eine Vasodilatation herbeiführen. Hier existiert ein negativer Feedback-Mechanismus. Denn cGMP hemmt wiederum den Phosphoinositol-Signalweg. Nach Produktion kann NO jedoch sehr schnell inaktiviert werden - durch Sauerstoff oder freie Sauerstoffradikale. Die biologische Halbwertszeit in vivo beträgt nur 1-30 Sekunden.<sup>31;39</sup>

## EINLEITUNG



**Abb.3:** Darstellung der endothelialen NO-Synthese: NO wird aus der Aminosäure L-Arginin durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) produziert. Die Produktion ist energieabhängig: NADPH wird reduziert. Das produzierte NO wird auch benötigt für die Synthese von Thiolen, Hämoglobin (Hb), Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). NO aktiviert die Guanylatzyklase und es entsteht aus Guanin-5'-Triphosphat (GTP) zyklisches Guanin-3':5'-Monophosphat (cGMP), was über verschiedene Mechanismen zu einer Vasodilatation führen kann.

*Modifiziert nach Diseases of the heart, 2.Auflage, 1996, Kapitel 4, Henderson, Vascular biology, S.45-63*

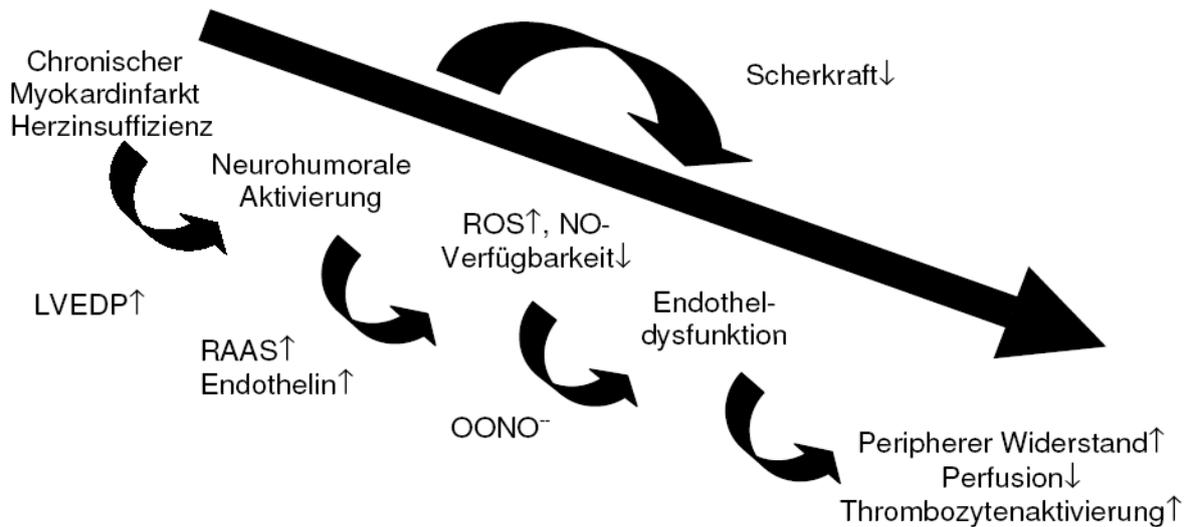
Im physiologischen Zustand ist das Endothel antithrombotisch, d.h. es verhindert die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten. Bei Veränderung des Endothels durch z.B. inflammatorische Prozesse kommt es zu einer verstärkten Hämostase und damit erleichterten Thrombusbildung, Vasokonstriktion und einer vermehren Leukozytenaktivierung. Auch die Adhäsion von Thrombozyten an der intakten Endothelzellschicht ist erleichtert.<sup>46</sup> In diesem Zustand spricht man von einer endothelialen Dysfunktion.<sup>47</sup> Es konnte bewiesen werden, dass dabei die Verfügbarkeit von NO herabgesetzt ist. Diese Erkenntnis ist entscheidend für die Zusammenhänge bei der Entwicklung der Atherosklerose.

### 2.1 Endotheldysfunktion bei Herzinsuffizienz

Auch bei der Herzinsuffizienz hat die endotheliale Dysfunktion eine zentrale Bedeutung bekommen.<sup>48</sup> Eine verminderte Verfügbarkeit endothelialer Vasodilatoren trägt zur Minderperfusion des Myokards und damit zu einer schlechteren linksventrikulären Funktion bei. Peripher kommt es zu einem erhöhten Widerstand in den Gefäßen und damit zu einer erhöhten Nachlast.<sup>44</sup> Die wichtigste Rolle kommt hierbei einer verminderten Verfügbarkeit des endothelialen NO zu.<sup>40</sup>

Physiologischerweise findet eine Regulation der NO-Produktion über die Gen-Expression der eNOS statt. Bei einer verminderten Scherkraft infolge des reduzierten Blutflusses kommt zu einer verminderten gen-regulierten Expression der eNOS und damit zu reduzierten NO-Produktion.<sup>49;50</sup> Zusätzlich kommt es in der Gefäßwand bei CHF vermehrt zu Interaktionen zwischen NO und reaktiven Sauerstoff(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)spezies (ROS= reactive oxygen species), was zu einer verminderten Verfügbarkeit von NO führt – bei normaler oder sogar erhöhter Produktion von NO.<sup>51;52</sup> Bei chronischer Herzinsuffizienz konnte eine erhöhte Produktion von ROS, besonders von Superoxidanionen, in Blutgefäßen festgestellt werden.<sup>51;53-55</sup> Diese können NO abfangen, was zu dem Substrat Peroxynitrit führt. Erhöhte Plasmaspiegel von Peroxynitrit konnten bei Patienten mit CHF nachgewiesen werden und deuten auf den erhöhten oxidativen Stress bei diesen Patienten hin.<sup>55</sup> Gefäßmuskelzellen produzieren als Reaktion auf den Vasokonstriktor Angiotensin II Superoxidanionen. Angiotensin II führt zur vermehrten Expression einer NAD(P)H-abhängigen Oxidase<sup>56-58</sup>, die wiederum Superoxidanionen erzeugt.<sup>51</sup> So kommt es bei erhöhtem Angiotensin II, zu einem Anstieg der Superoxidanionen in der Gefäßwand.<sup>56;57</sup> Man geht davon aus, dass es sich dabei um einen zumindest potentiell lokal Aldosteron-vermittelten Vorgang handelt.<sup>59</sup> Zur Produktion von Aldosteron kommt es durch ein lokales System in den Gefäßzellen.<sup>60</sup> Auch eine Bildung von Angiotensin II direkt in den Gefäßzellen wird berichtet.<sup>61;62</sup> Wie oben beschrieben kommt es bei CHF zur neurohumeralen Aktivierung: Angiotensin II, Aldosteron und Endothelin werden vermehrt ausgeschüttet.

Diese neurohumorale Aktivierung wird als entscheidend für die vermehrte Produktion von Superoxidanionen angesehen, worauf eine verminderte Verfügbarkeit von NO folgt. Dies führt zur endothelialen Dysfunktion bei CHF. Diese Mechanismen stehen im Vordergrund bei der Entwicklung einer optimalen Therapie der Herzinsuffizienz (Abb.4).<sup>48</sup>



**Abb.4:** Schematische Darstellung der Entstehung einer Endotheldysfunktion bei CHF: mögliche Mechanismen, die zu einer endothelialen Dysfunktion bei ischämischer Herzinsuffizienz führen. Zunächst kommt es zu einer Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP), der über die sog. neurohumorale Aktivierung über eine Aktivierung des Renin-Aldosteron-Angiotensin-Systems (RAAS) zu einem Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt. Dies mündet durch eine verminderte NO-Verfügbarkeit durch Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) in einer Endotheldysfunktion  
 Modifiziert nach Bauersachs et Schäfer: *Endothelial Dysfunction in Heart failure: Mechanism and Therapeutic Approaches*, *Current Vascular Pharmacology*, 2004;2, S.115-124

## 2.2 Endotheldysfunktion bei Diabetes mellitus

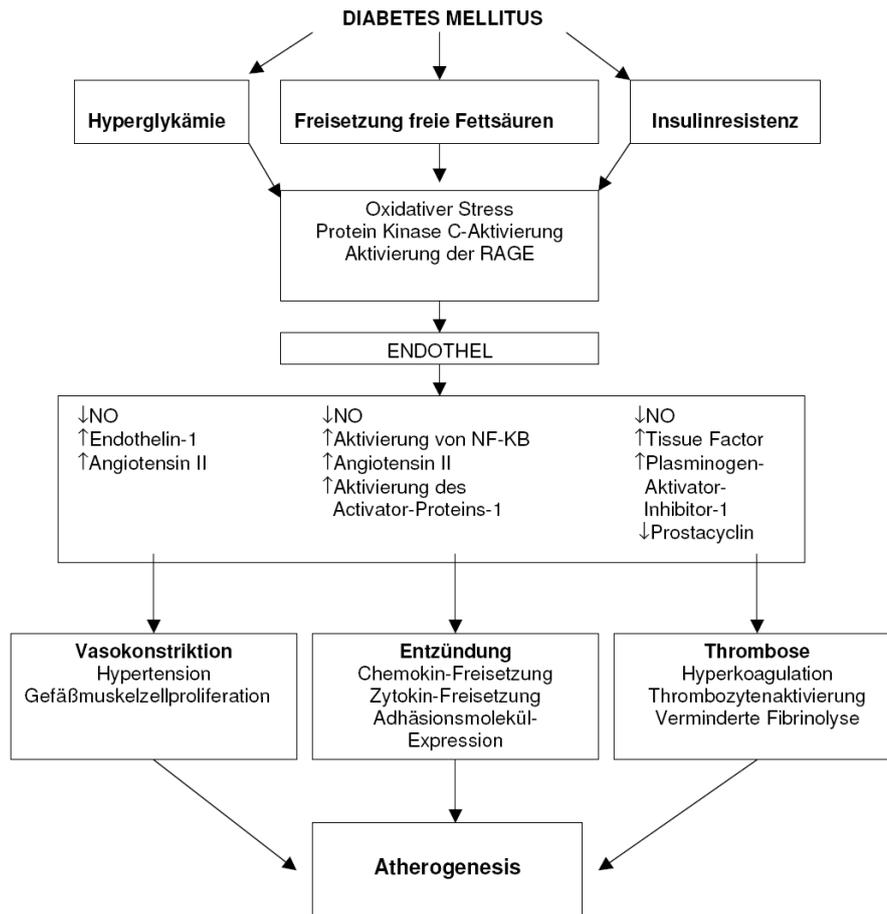
Durch die metabolischen Veränderungen, die mit Diabetes einhergehen, kommt es zu Funktionsveränderungen in bestimmten Zellen des Körpers, vor allem auch dem Endothel. Die Veränderungen betreffen zum einen die Gefäßfunktion bezüglich der Regulation des Gefäßtonus als auch die Sekretion der Endothelzellen.<sup>23</sup> Bei Diabetes kommt es durch einen NO-Mangel zu einer Verschlechterung der Endothel-vermittelten Vasodilatation.<sup>63;64</sup> Hierbei inhibiert die chronische Hyperglykämie die Produktion von NO durch die Blockade der eNOS-Aktivität und erhöht die Produktion von ROS in den Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen.<sup>65</sup> Superoxidanionen fangen direkt NO ab und führen zur Peroxynitritbildung, welches wiederum den essentiellen Ko-Factor der eNOS, Tetrahydrobiopterin, durch Oxidation reduziert. Die hierdurch entkoppelte eNOS produziert daraufhin statt NO Superoxidanionen.<sup>66</sup>

Weiter führt Hyperglykämie zur nicht-enzymatischen Glykosylierung von Proteinen und zur Bildung von sog. „advanced glycosylation endproducts“ (AGE's), die zur Freisetzung von

Wachstumsfaktoren und Zytokinen und zur Proliferation von Zellen führen. Man vermutet, dass dies zur Dysfunktion des Endothels bei Diabetes und dem Prozess der Atherogenese beiträgt.<sup>67-69</sup>

Bei Typ 2-Diabetes kommt es noch durch weitere Mechanismen zu einer reduzierten Verfügbarkeit von NO: die Insulinresistenz führt zu einer gesteigerten Freisetzung von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe<sup>70</sup>, die wiederum die Proteinkinase C aktivieren und die Phosphatidylinositol-3 (PI-3)-Kinase inhibieren. Die PI-3-Kinase ist ein Agonist des eNOS-Signalwegs. Weiter erhöhen freie Fettsäuren die Produktion von ROS. Dies sind direkte Mechanismen, die bei Typ 2-Diabetes zur Hemmung der Produktion von NO und zur Reduktion der Verfügbarkeit des produzierten NOs führen.<sup>71</sup> Durch die Produktion von Peroxynitrit wird die Synthese von Prostacyclin, was vasodilatatorisch und antithrombotisch wirkt, ebenfalls reduziert.<sup>72</sup> Zusätzlich zur Reduktion der vasodilatatorischen Substanzen sind die vasokonstriktorisches bei Diabetes erhöht. Eine wichtige Rolle spielt dabei Endothelin-1, was an den Gefäßmuskelzellen über den ETA-Rezeptor eine Vasokonstriktion bewirkt. Endothelin führt auch zu einer erhöhten Natrium und Wasserretention in der Niere, stimuliert das RAAS und induziert eine Hypertrophie der Gefäßmuskelzellen.<sup>73</sup> Auch andere vasoaktive Substanzen wie z.B. Angiotensin II und vasokonstriktorisches Prostaglandine sind bei Diabetes erhöht.<sup>74;75</sup> Weiter kommt es durch NO-Mangel, erhöhten oxidativen Stress und die Aktivierung der Rezeptoren für AGE's (RAGE) zu einer verstärkten Genexpression verschiedener Mediatoren, die eine zentrale Rolle bei der Atherogenese spielen. Dazu gehören unter anderem Chemokine, die eine Leukozyten-Anlockung an das Endothel bewirken können und proinflammatorische Mediatoren wie Tumornekrosefaktor und Interleukin-1. Dies sind wichtige Veränderungen, die bei Diabetes Atherogenese initiieren können (Abb.5).<sup>67;76;77</sup> Durch die veränderte Sekretionsleistung bei Endotheldysfunktion kommt es auch bei schon bestehenden atherosklerotischen Plaques zu weiteren Komplikationen, wie z.B. die Instabilität dieser Plaques. Bei Diabetes produzieren Endothelzellen Zytokine, die die Kollagensynthese von Gefäßmuskelzellen herabsetzen.<sup>78</sup> Auch die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen, die zum Abbau von Kollagen führen, ist bei Diabetes erhöht.<sup>79</sup> Das Kollagen verleiht jedoch dem atherosklerotischen Plaque die entscheidende Stabilität. Durch vermindertes Kollagen ist die Ruptur der Plaques und damit die Formation von Thromben begünstigt. Es kann schneller und häufiger zu thrombotischen Gefäßverschlüssen kommen. Dieses Risiko wird noch weiter erhöht durch die erhöhte Produktion des prokoagulatorischen Gewebefaktors durch die Endothelzellen bei Diabetes.<sup>80</sup>

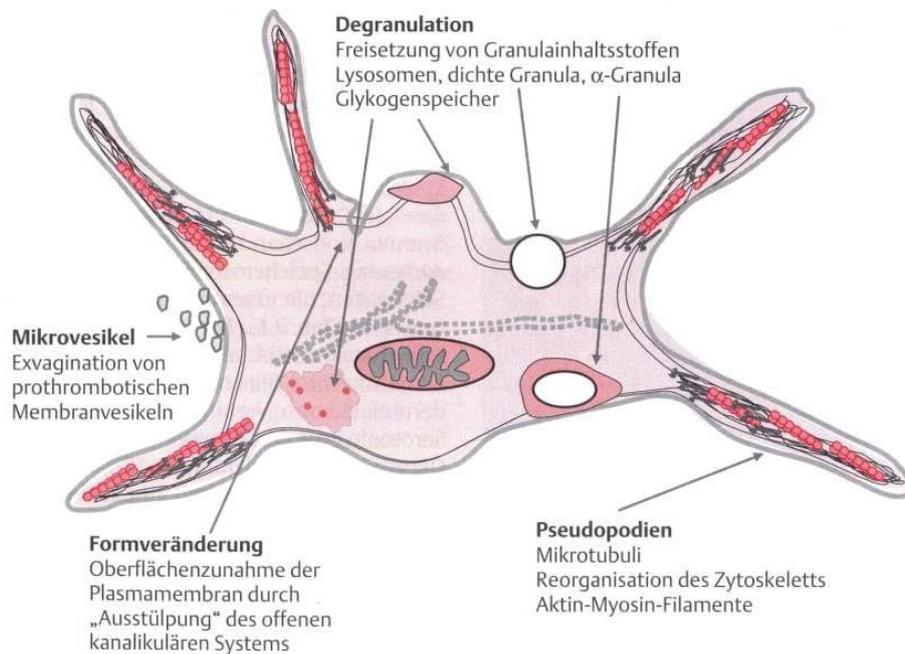
## EINLEITUNG



**Abb.5:** Endotheliale Dysfunktion in Diabetes: Mechanismen, die bei Diabetes Mellitus zu einer Funktionseinschränkung des Endothels mit daraus resultierender Atherogenese führen  
*Modifiziert nach Beckman et al.: Diabetes and Atherosclerosis, JAMA;287, 2002, S.2570-2581*

### 3. Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten (Blutplättchen) sind mit 2-4  $\mu\text{m}$  die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes. Im unaktivierten Zustand weisen die Blutplättchen eine typische diskoide Form mit einer durchschnittlichen Oberfläche von 8  $\mu\text{m}^2$  auf. Bei Aktivierung kommt es zu einer Formveränderung mit Bildung von Pseudopodien, welche Ausstülpungen der Plasmamembran darstellen (Abb.6). Dabei kommt es zu einer Vergrößerung der Oberfläche bis zu 13  $\mu\text{m}^2$ .<sup>81</sup>



**Abb.6:** Aktivierung eines Thrombozyten: durch Bindung des thrombozytären Kollagen-Rezeptors an Kollagen kommt es zur Formveränderung mit Bildung von Pseudopodien, zur Freisetzung von Thromboxan und ADP und zur Aktivierung der GP IIb/IIIa-Rezeptoren  
*Aus Gawaz et al.: Das Blutplättchen, 1. Auflage, Thieme, Thrombozyten und primäre Hämostase, S.4-24*

Ruhende Thrombozyten können durch Adhäsion am Endothel bei der primären Hämostase oder durch lösliche Agonisten wie ADP oder Thrombin aktiviert werden. Dies induziert morphologische und funktionelle Veränderungen im Thrombozyten. Die Aktivierung kann als ein Vorstadium der Aggregation angesehen werden. Der Thrombozyt macht sich sozusagen „bereit“ für die Aggregation. Dieser Zustand ist jedoch im Gegensatz zur Aggregation noch reversibel. Der Aktivierungsprozeß ist sehr komplex. Dabei kommt es zu:

1. Veränderungen metabolischer und biochemischer Mechanismen:

Agonisten der Aktivierung setzen an bestimmten Rezeptoren der Thrombozyten an und bewirken über Signaltransduktionswege die Bildung von Signalfaktoren. Die dabei wichtigsten Enzyme sind Phospholipase C, Phospholipase A<sub>2</sub> und die Adenylatzyklase. Alle drei regulieren das intrazelluläre Calcium. Zwischen intrazellulärer Calcium-Konzentration und Stimulierungsgrad besteht eine direkte Korrelation. Es kommt zur Phosphorylierung wichtiger Signalproteine, zur Steuerung der Degranulation und Aktivierung des Fibrinogenrezeptors. Weiter wird die Bildung von Prostaglandinen wie z.B. Thromboxan A<sub>2</sub> gefördert.

### 2. Formveränderung

Bei Überschreiten einer bestimmten Schwelle intrazellulären Calciums kommt es zur Ausbildung von Pseudopodien. Aktinomyosin bildet einen kontraktilen Apparat. Der Thrombozyt hat nun eine dynamische Form und eine vergrößerte Oberfläche, was eine erhöht Interaktion ermöglicht.

### 3. Aktivierung von Oberflächenrezeptoren

Der ruhende Thrombozyt kann kein Fibrinogen binden. Erst im aktivierten Zustand wird der Aggregationsrezeptor Glykoprotein (GP) IIb/IIIa stimuliert und bildet sog. „Fibrinogentaschen“. Interne Speicher dieser Fibrinogenrezeptoren werden freigesetzt und es erhöht sich die Oberflächendichte an GP IIb/IIIa-Molekülen.

### 4. Veränderungen der Orientierung der Membranphospholipide

Durch diese Veränderung können Gerinnungsfaktoren an der Plasmamembran besser angelagert werden. Es kommt zur Bildung eines katalytischen Prothrombinasekomplexes, der die Thrombinbildung steigert.

Die Aktivierung kann durch eine Reihe löslicher Agonisten, die an spezifischen Rezeptoren auf dem Thrombozyten binden, hervorgerufen werden. Die Rezeptoren sind G-Proteingekoppelt. Die Aktivierung kann durch Adenosin und Prostazyklin gehemmt werden.<sup>81</sup>

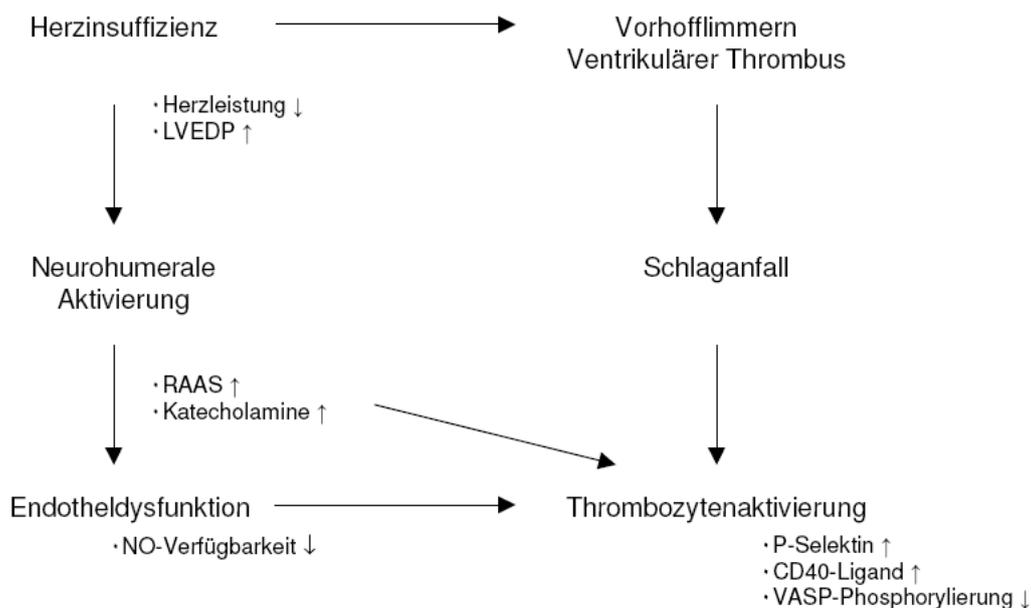
### 3.1 Thrombozytenaktivierung bei Herzinsuffizienz

Das erhöhte Risiko für thromboembolische Komplikationen bei CHF führt man auf einen Zustand der Hyperkoagulabilität zurück.<sup>82</sup> Es konnte eine erhöhte Thrombozytenaktivierung nicht nur bei Herzinsuffizienz-Patienten mit Vorhofflimmern sondern auch bei Patienten im Sinusrhythmus nachgewiesen werden.<sup>83;84</sup> Die endotheliale Dysfunktion mit vermindert freigesetztem NO, welches ein Thrombozyteninhibitor ist, scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen.<sup>82</sup>

Patienten mit CHF erfüllen durch ihre Erkrankung die Risikofaktoren für eine Thrombusbildung, die einst vor mehr als 150 Jahren von Virchow als Trias beschrieben wurde: verlangsamter Blutfluss (durch zu geringes Herzminutenvolumen und Kontraktilität des Herzens), Veränderungen am Gefäß (durch endotheliale Dysfunktion) und Veränderungen der Blutzusammensetzung. Dies führt zu einem prothrombotischen/hyperkoagulablen

Zustand.<sup>85</sup> Die erhöhte Thrombozyten-Aktivierung bei Patienten mit CHF konnte durch vermehrte Anzahl zirkulierender Thrombozytenaggregate und eine gesteigerte Expression von P-Selektin an der Thrombozytenoberfläche im Vergleich zu nicht-herzinsuffizienten Patienten nachgewiesen werden.<sup>84;86</sup> In Studien in den 90er Jahren konnte auch gezeigt werden, dass bei CHF erhöhte Plasmawerte von  $\beta$ -Thromboglobulin, von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibrinogen, Antithrombin-Thrombin-Komplexen und D-Dimeren auftreten. Auch dies könnte eine verstärkte Gerinnung indizieren oder dazu beitragen.<sup>87-89</sup> Eine weitere wichtige Rolle scheint die neurohumorale Aktivierung zu spielen. In einem Tiermodell mit Ratten konnte eine erhöhte Thrombozytenaktivierung bei erhöhtem enddiastolischen linksventrikulären Druck (LVEDP > 15mmHg) nachgewiesen werden.<sup>90</sup> Dies deutet auf eine sehr schwache linksventrikuläre Pumpleistung und eine pulmonale Stauung hin, was wiederum mit einer stark erhöhten neurohumoralen Aktivierung assoziiert ist (Abb 7).<sup>91;92</sup>

Durch medikamentöse komplette Blockade des RAAS als ein wichtiges System der neurohumoralen Aktivierung konnte die linksventrikuläre Funktion und endotheliale Dysfunktion verbessert werden.<sup>93;94</sup> Die Thrombozytenaktivierung konnte sogar verhindert werden.<sup>90</sup> Auch bei Ratten, die trotz RAAS-Blockade keine verbesserte linksventrikuläre Funktion zeigten, wurde eine Normalisierung der endothelialen Dysfunktion und eine Verhinderung der Thrombozytenaktivierung beobachtet.<sup>90</sup>



**Abb. 7: Thrombozytenaktivierung bei CHF:** durch Herzrhythmusstörung oder neurohumorale Aktivierung kommt es bei Herzinsuffizienz zu einer Thrombozytenaktivierung  
Modifiziert nach Schäfer et al.: Platelet activation in heart failure, Clin. Lab., 2004;50, S.559-566

### 3.2 Thrombozytenaktivierung bei Diabetes mellitus

Auch bei Patienten mit Diabetes mellitus konnte eine erhöhte Aktivierung von Thrombozyten nachgewiesen werden.<sup>95</sup> Diese Thrombozyten zeigen eine erhöhte Oberflächenexpression von P-Selektin und Bindung von Fibrinogen an den aktivierten GP IIb/IIIa-Rezeptor. Auch eine erhöhte Expression von GP Ib, was für die Interaktion zum von-Willebrand-Faktor (vWF) wichtig ist, konnte gezeigt werden.<sup>96</sup>

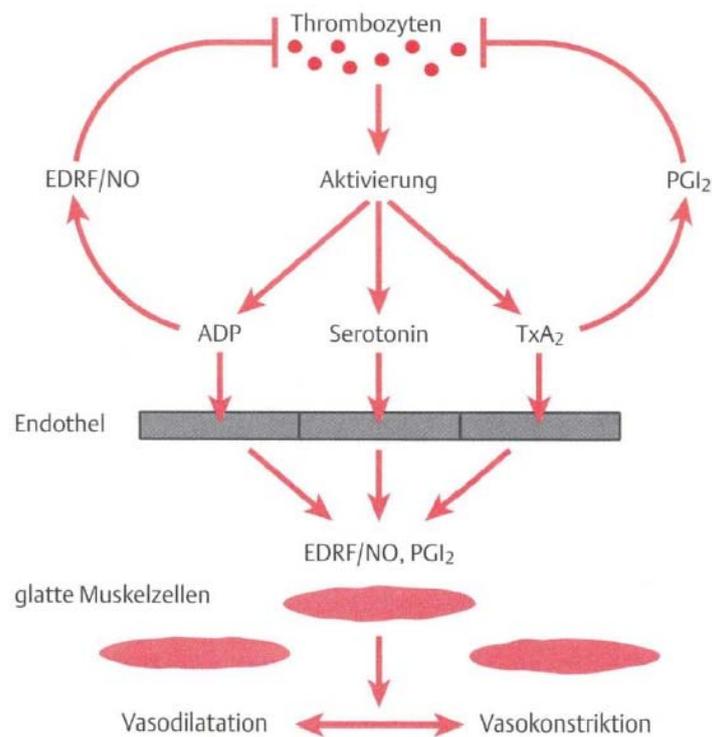
Weiter ist die Anzahl zirkulierender Monozyten-Thrombozyten-Aggregate bei Diabetes erhöht.<sup>97</sup> Auch Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten an extrazellulärer Matrix ist vermehrt.<sup>98</sup> Wie bei Herzinsuffizienzpatienten sind die Plasmaspiegel von Serotonin,  $\beta$ -Thromboglobulin und vWF erhöht.<sup>99;100</sup> Diese Effekte konnten sowohl an Patienten als auch im Tiermodell des manifesten DM festgestellt werden.<sup>101</sup> Jedoch findet man schon bei Patienten mit Inselzell-AK, die noch keinen manifesten DM aufweisen, bei nahen Verwandten von Diabetes mellitus-Patienten sowie bei lediglich verschlechterter Glukosetoleranz eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung.<sup>102;103</sup>

Bei Diabetes kommt es zu einer Dysbalance zwischen Thrombozytenaktivatoren (vWF, Fibrinogen, Thromboxan) und –inhibitoren (NO, Prostazyklin) mit Dominanz der Aktivatoren.<sup>23;96</sup> Dies korreliert mit der Präsenz von Hyperglykämie und Pro-Insulinspaltprodukten.<sup>104</sup> Die Glukosekonzentration im Thrombozyten spiegelt die extrazelluläre Konzentration wieder. Die Aufnahme von Glukose in den Thrombozyten ist insulinunabhängig.<sup>96</sup> Durch erhöhte intrazelluläre Glukosekonzentration kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und erhöhter Superoxidproduktion.<sup>105</sup> Ein NO-Mangel bei Endotheldysfunktion erhöht wiederum die Thrombozytenaktivierung.<sup>106</sup> Dies zeigt den engen Zusammenhang zwischen Thrombozyten und Endothel.

### **4. Interaktion Endotheldysfunktion und Thrombozytenaktivierung**

Sowohl Thrombozytenaktivierung als auch Endotheldysfunktion sind entscheidende Merkmale kardiovaskulärer Erkrankungen. Die direkten Zusammenhänge zwischen den beiden Charakteristika scheinen noch nicht vollständig geklärt zu sein. Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Thrombozytenaktivierung bei einer akuten oder chronischen Inhibition endogenen NO's entsteht. Weiter konnte eine Normalisierung der

Thrombozytenaktivierung durch Wiederherstellung der NO-Produktion im Endothel erreicht werden. Dies zeigt, dass es prinzipiell eine Regulation der Thrombozytenaktivierung durch das endotheliale NO gibt.<sup>107</sup> Physiologischerweise scheint es ein enges Zusammenspiel zwischen Endothel und Thrombozyten zu geben. Das Endothel sezerniert NO und Prostazyklin, was wiederum Hemmstoffe der Thrombozyten sind und einer überschießenden intravasalen Thrombozytenaktivierung entgegenwirken. NO und Prostazyklin regulieren durch Vasodilatation (über Relaxation der Muskelzellen) den Gefäßtonus. Aktivierte Thrombozyten setzen Substanzen wie Serotonin, Thromboxan oder Adeninnukleotide (ADP/ATP) frei, was die Synthese von NO in den Endothelzellen stimuliert. Bei erhöhten NO-Spiegeln kommt es wiederum zu einer vermehrten Synthese von cGMP. Dieser Feedbackmechanismus sorgt für eine Thrombozyteninhibition und eine Vasodilatation (Abb.8).<sup>81</sup>



**Abb.8:** Thrombozytenabhängige Regulation des Gefäßtonus: durch ADP, Serotonin und Thromboxan, das bei Thrombozytenaktivierung ausgeschüttet wird, kommt es am Endothel zur NO- und Prostazyklin-Freisetzung. Diese regeln durch Vasodilatation den Gefäßtonus und sind wiederum potente Hemmstoffe der Thrombozyten

Aus Gawaz et al.: *Das Blutplättchen, 1. Auflage, Thieme, Physiologie des Hämostase, S.1-3*

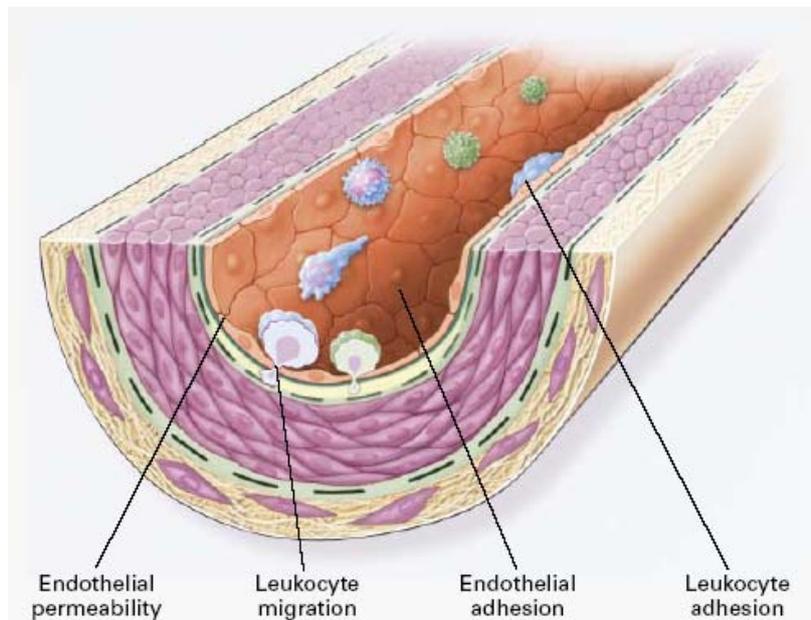
Liegt nun eine endotheliale Dysfunktion vor, ist dieser physiologische Feedbackmechanismus ausser Kraft gesetzt. Durch die für die endotheliale Dysfunktion charakteristische NO-Reduktion kommt es zu einer verminderten Thrombozyteninhibition. Die daraus resultierende Thrombozytenaktivierung stimuliert zwar die Endothelzellen, aber es kommt bei einer Dysfunktion durch die oben beschriebenen Mechanismen zu keiner erhöhten NO-Verfügbarkeit.

Die Fähigkeit von NO, Thrombozytenadhäsion- und aggregation zu inhibieren, konnte in vitro gut charakterisiert werden.<sup>108-112</sup> Als Wirkungsmechanismus des NO konnte cGMP als „second messenger“ im Thrombozyten identifiziert werden.<sup>113</sup> Thrombozyten sind unter physiologischen Flussbedingungen die Blutzellen, die dem Endothel am nächsten sind.<sup>114</sup> Sie können problemlos das von den Endothelzellen produzierte NO aufnehmen. NO führt zu einem Anstieg von cGMP im Thrombozyten, was wiederum zu einer Phosphorylierung des inhibierenden Thrombozyten-Proteins VASP (Vasodilator-stimulated Phosphoprotein) führt.<sup>115;116</sup> Bei kardiovaskulären Erkrankungen kann es nun zu einer gestörten Freisetzung von NO und zu einer gestörten Reaktion seitens der Thrombozyten kommen. Bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen konnte eine reduzierte Reaktivität der Thrombozyten auf NO beschrieben werden.<sup>117;118</sup> Durch Vitamin C wurde die Reaktivität auf NO wieder normalisiert, was impliziert, dass bei dieser NO-Resistenz ein erhöhter oxidativer Stress eine entscheidende Rolle spielt.<sup>119</sup>

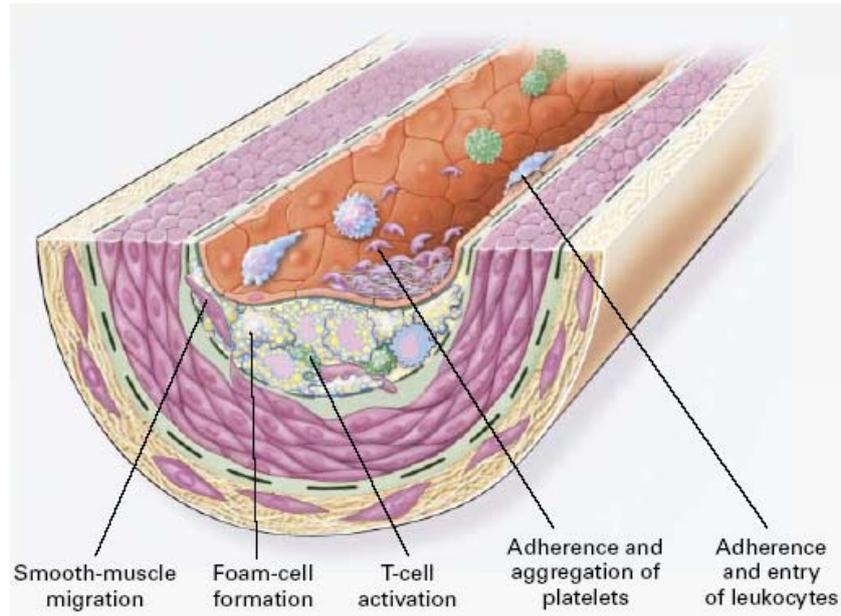
Eine Endotheldysfunktion führt also zur Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten.<sup>120-124</sup> Die Adhäsion via GP I $\alpha$  - vWF und GP IIb/IIIa – Fibrinogen führt zur Freisetzung von ADP, ATP, Serotonin, Thrombin, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Eine inflammatorischen Reaktion des Endothels wie es bei Atherosklerose beschrieben wird, kann durch Zytokine und Wachstumsfaktoren hervorgerufen werden.<sup>125;126</sup> Diese Interaktion zwischen dysfunktionellen Endothelzellen und Thrombozyten könnte für die Initiierung des atherosklerotischen Prozesses von besonderer Bedeutung sein.<sup>81</sup>

## **5. Bedeutung für Atherosklerose**

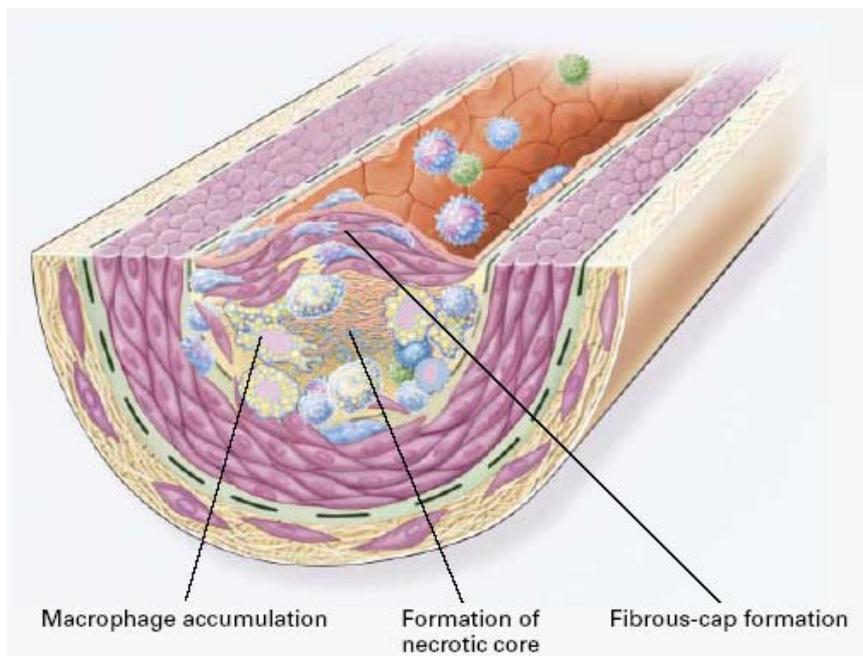
Die Atherosklerose ist die zentrale Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen. Ihre Pathogenese ist sehr komplex und noch nicht vollständig geklärt. Sie beschreibt einen chronisch-progredienten, inflammatorischen Prozess mit einer variablen Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlehydraten, Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. Derzeit geht man von einem Modell aus, in dem man die Atherogenese als zelluläre, entzündlich-proliferative Reaktion der Gefäßwand auf eine chronische Reizung, beziehungsweise Läsion, sieht (Abb. 9,10,11).<sup>4;127-131</sup>



**Abb. 9:** Endotheldysfunktion bei Atherosklerose: erhöhte Endothelpermeabilität, Leukozytenadhäsion und Leukozytenmigration gehören zu den frühesten Veränderungen bei Atherosklerose  
*Aus Ross : Atherosclerosis-an inflammatory disease, NEJM, 1999;340, S.115-126*



**Abb. 10:** Lipidformation bei Atherosklerose: Ablagerung von lipidbeladenen Monozyten, Schaumzellen und T-Lymphozyten, Migration und Proliferation von Muskelzellen und Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten führen zu einem atherosklerotischen Plaque  
*Aus Ross: Atherosclerosis-an inflammatory disease, NEJM, 1999;340, S.115-126*



**Abb.11:** Darstellung einer fortgeschrittenen, komplizierten atherosklerotischen Läsion: durch weitere Leukozytenadhäsion und Formation kommt es zum fortgeschrittenen Plaque mit nekrotischen Anteilen  
*Aus Ross : Atherosclerosis-an inflammatory disease, NEJM, 199;340, S.115-126*

### 5.1 Endotheldysfunktion bei Atherosklerose

Die endotheliale Dysfunktion wird inzwischen als zentraler Schlüssel im Verständnis der Atherogenese gesehen. Bei der sogenannte „response-to-injury“ Hypothese geht man von einer Endothelläsion mit nachfolgender Endotheldysfunktion als erstem Schritt der Atherogenese aus. Durch spezielle Einflüsse wie z.B. freie Sauerstoffradikale bei Diabetes mellitus, Hypertonie oder erhöhte LDL-Plasma-Spiegel verliert das Endothel seine physiologische Funktion.<sup>4</sup> Die Endotheldysfunktion, die aus der Endothelläsion resultiert, führt zu Kompensationsmechanismen, die die physiologischen, homeostatischen Eigenschaften des Endothels verändern.

Das Endothel zeigt eine erhöhte Permeabilität für Blutzellen und -bestandteile. Dies ist vermittelt durch „Platelet-derived growth factor“ (PDGF), Angiotensin II und Endothelin. Weiter kommt es zu einem gesteigerten Adhäsionsvermögen vor allem für Leukozyten und Thrombozyten durch die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen.<sup>4</sup> Dies schließt ein: Leukozytenadhäsionsmoleküle wie L-Selektin und Integrine, Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül 1 (PECAM-1) und Endothelzell-Adhäsionsmoleküle, wie E-Selektin, P-Selektin, Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1).<sup>132-134</sup> Die vermehrte Expression dieser Adhäsionsproteine führt zur Bindung von Monozyten an das Endothel. Die Migration dieser Zellen in die Intima ist vermittelt durch oxidiertes Low density Lipoprotein-Cholesterin (LDL), Monozyten chemotaktisches Protein-1 (MCP-1), Interleukin-8, Thrombozyten-Wachstumsfaktor (PDGF), Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (MCS-F) und Osteopontin.<sup>4</sup> In der Intima kommt es zu einer Ausdifferenzierung der Monozyten zu Schaumzellen, was auch durch die Oxidation von LDL vermittelt wird. Diese Veränderungen werden als sogenannte „fatty streaks“ bezeichnet, die als früheste Läsionen der Atherosklerose gesehen werden.<sup>4</sup> Diese Läsionen findet sich gewöhnlich bei Kindern und jungen Erwachsenen.<sup>135</sup>

Die Endothelläsion induziert auch die prothrombotische Eigenschaft und die Sekretion von vasoaktiven Substanzen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Durch die so ausgelöste Entzündungsreaktion kommt es aufgrund eines autokrinen Mechanismus zur Migration und Proliferation der Gefäßmuskelzellen.<sup>4</sup>

In einem späteren Stadium degenerieren die proliferierten, mit LDL angereicherten Muskelzellen. Es kommt zu einem Umbau der Läsion zum atherosklerotisch spezifischen

fibrösen Plaque. Prinzipiell ist dies ein reversibler Prozess, wenn die auslösende Noxe eliminiert und die Ausdehnung nur begrenzt ist.<sup>4</sup>

### 5.2 Thrombozytenaktivierung bei Atherosklerose

Die Bedeutung der Thrombozyten bei der Atherosklerose hat sich in den letzten Jahren entscheidend gewandelt. Zunächst waren Thrombozyten hauptsächlich wegen der thromboembolischen Komplikationen bei schon manifesten atherosklerotischen Plaques bedeutend. Die Ruptur oder Läsion von Plaques initiieren eine Thrombozytenaktivierung und –aggregation an deren Oberfläche. Durch diese thrombotischen Gefäßverschlüsse kann es zu ischämischen Episoden kommen wie z.B. beim akuten Koronarsyndrom.<sup>136-138</sup>

Untersuchungen an Tiermodellen, besonders bei ApoE<sup>-/-</sup>-knock-out-Mäusen ergaben Hinweise, dass die Thrombozyten bei der Initiierung der Atherosklerose von besonderer Bedeutung sein könnten.<sup>139-141</sup> In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten *in vivo* auch an einem völlig intakten Endothel adhären können.<sup>142-144</sup> Über GPIIb/IIIa binden die Thrombozyten an vWF und P-Selektin am aktivierten Endothel.<sup>145;146</sup> Bei Adhäsion sezernieren die aktivierten Thrombozyten dann Zytokine und Chemokine. Zytokine, wie z.B. CD40L und IL-1 $\beta$  aus Thrombozyten sind für die veränderten, prothrombotischen Eigenschaften des Endothels mitverantwortlich. Es kommt zu einer gesteigerten Oberflächenexpression von VCAM-1 und die Freisetzung von bestimmten Chemokinen, z.B. MCP-1.<sup>147-149</sup> Dies initiiert wiederum eine Rekrutierung von Monozyten und deren Transmigration in die Intima.<sup>148-150</sup>

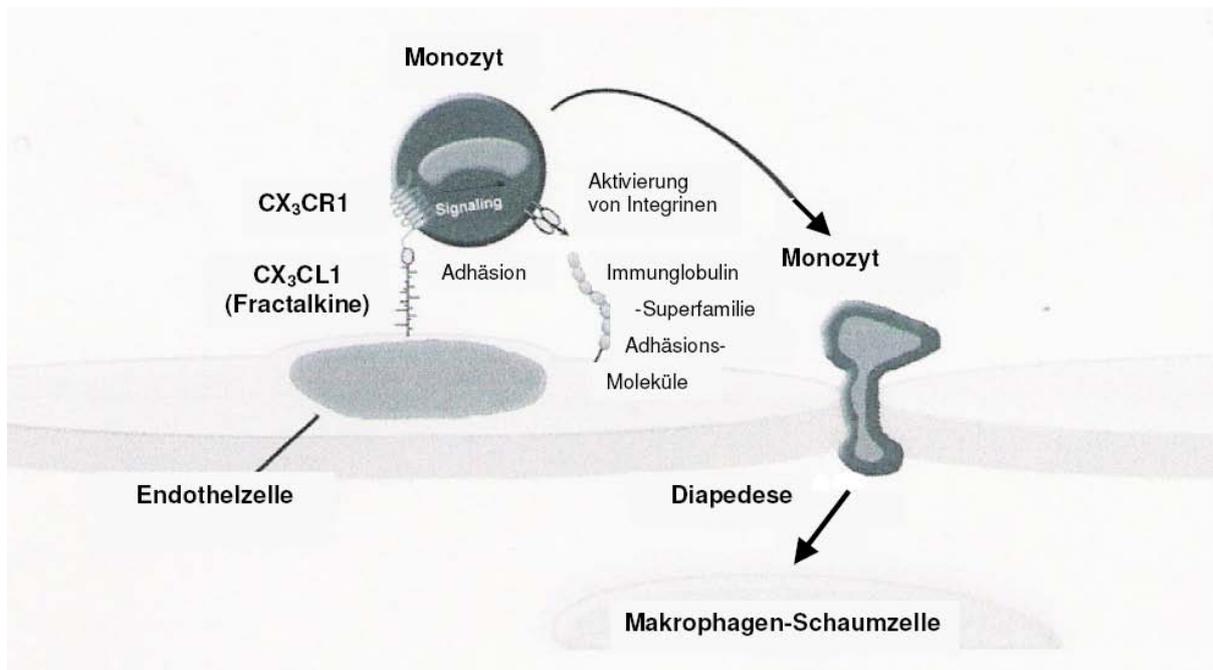
So kann man vermuten, dass es durch die Adhäsion von Thrombozyten am Endothel zu einem Signal kommt, das für Rekrutierung und Einwanderung von Monozyten bei Formierung der atherosklerotischen Läsion verantwortlich ist.<sup>151</sup> Dies ist der bedeutende Prozess zu Beginn der Atherosklerose.<sup>4</sup>

Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen. Mit der Zeit kommt es zu steigender Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothel. Die Anzahl der adhärenen Thrombozyten steigt signifikant an. So ist die Thrombozyten-Endothel-Interaktionen vor der Manifestation atherosklerotischer Plaques beobachtbar. Die nachfolgende Leukozytenadhäsion geht einher mit Aktivierung von NF- $\kappa$ B,

VCAM-1 oder MCP-1<sup>139</sup>, was eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung und Transmigration von Monozyten spielt.<sup>149-152</sup>

### **6. Rolle von Fractalkine bei Atherosklerose**

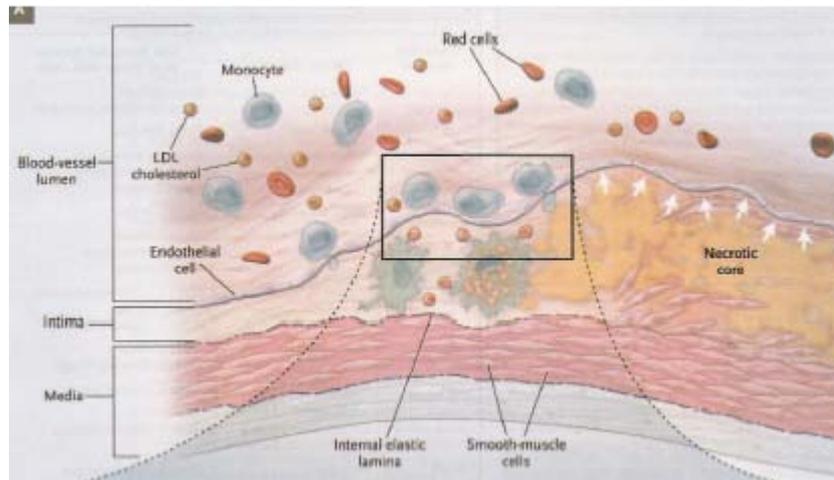
Wie oben beschrieben ist die Infiltration von Monozyten in die Gefäßwand ein früher und essentieller Schritt in der Atherogenese.<sup>4</sup> Es konnten viele Chemokine und Rezeptoren und andere Adhäsionsmoleküle bei diesem Prozess detektiert werden, jedoch nur ein paar wurden bis jetzt als pathologisch eingestuft.<sup>153</sup> Man hat Hinweise darauf, dass Chemokine, insbesondere Fractalkine (CX<sub>3</sub>CL1), dabei eine entscheidende Rolle spielen.<sup>154</sup> Fractalkine ist auf inflammatorischem Endothel exprimiert<sup>155</sup> und kann über seinen Rezeptor (CX<sub>3</sub>CR1) eine Leukozytenadhäsion und -migration induzieren, da Leukozyten den Rezeptor CX<sub>3</sub>CR1 exprimieren.<sup>156-159</sup> Weiter konnte Fractalkine in menschlichen atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden.<sup>160</sup> Durch seine Fähigkeit Monozyten anzuziehen und zu binden sowie durch seine Präsenz in den Endothelzellen liegt der Verdacht nahe, dass Fractalkine eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion von Monozyten und Ausdifferenzierung dieser Zellen zu Schaumzellen spielt.<sup>154</sup> In einem Tiermodell mit ApoE<sup>-/-</sup>-knock out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Fractalkineexpression in den atherosklerotischen Läsionen der Tiere erhöht war. In weiteren Versuchen mit ApoE<sup>-/-</sup>-knock out-Mäusen mit zusätzlich inaktivem CX<sub>3</sub>CR1-Rezeptor konnte nachgewiesen werden, dass es bei diesen Tieren zu einer verminderten Bildung der Atherosklerose (schmalere Läsionen) kommt. Dies bedeutet wiederum, dass Fractalkine mit seinem Rezeptor eine essentielle Bedeutung an der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen haben muss.<sup>154 161</sup> Man stellt sich vor, dass das endothelial exprimierte Fractalkine mit den Monozyten über ihren CX<sub>3</sub>CR1-Rezeptor Kontakt aufnimmt. Über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor kommt es dann zu einer Signalkaskade, die Integrine auf Monozyten aktiviert. Dies führt zu einer Veränderung des Zytoskeletts und stabilen Adhäsion der Monozyten. Weiter tragen aktivierte Integrine zur Diapedese durch Bindung an Adhäsionsmoleküle wie z.B. VCAM-1 und ICAM-1 bei. Fractalkine kann wie andere Chemokine über seinen Rezeptor zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Es wirkt aber nicht nur wie ein Chemokin, sondern potentiell auch als Adhäsionsmolekül (Abb.12).<sup>162</sup>



**Abb.12:** Fractalkine und sein Rezeptor bei der Atherosklerose: Während der Atherosklerose fungiert Fractalkine und sein Rezeptor als Schlüssel zwischen Endothelzellen und dem rekrutiertem Monozyt.

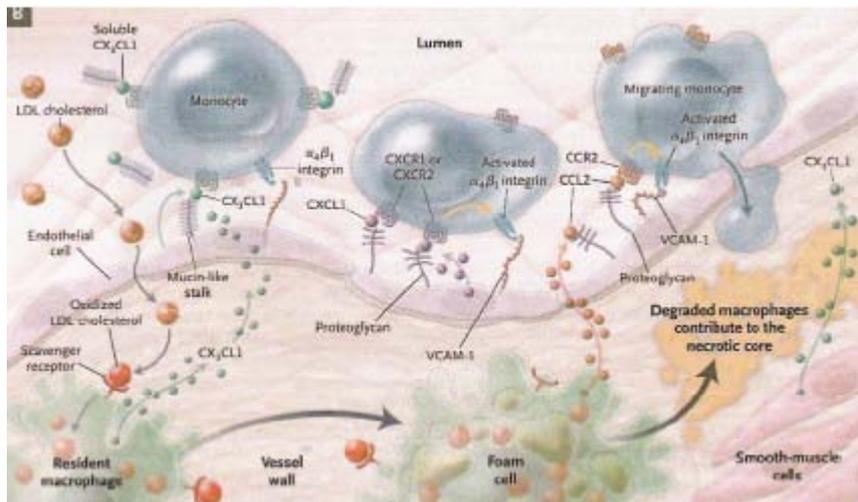
Aus Cybulsky and Hegel: *The Fractalkine receptor CX<sub>3</sub>CR1 is a key mediator of atherogenesis*, *J. Clin. Invest.* 200; 111, S.1118-1120

Durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , welche in atherosklerotischen Läsionen gefunden werden können, exprimieren glatte Muskelzellen vermehrt Fractalkine. In ihrer Nähe kommt es zur Anlagerung von Makrophagen. Ein Zusammenspiel verschiedener proinflammatorischer Zytokine führt also zu einer erhöhten Produktion von Fractalkine durch Muskel- und Endothelzellen (Abb.13,14). Dies spielt wiederum eine direkte Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten in der frühen Entwicklung der Atherosklerose.<sup>154</sup> Auch die Plaquemorphologie unterscheidet sich zwischen ApoE<sup>-/-</sup>-knock out-Mäusen mit oder ohne Fractalkine-Inaktivität. Bei den Mäusen mit aktiven Fractalkine-Rezeptor sind die Plaques heterogener, bei den Mäusen mit inaktivem Fractalkine-Rezeptor scheinen Schaumzellen vorherrschend zu sein.<sup>163</sup>



**Abb.13: Rolle von Chemokinen bei Atherosklerose:** Aufnahme von Monozyten in lipidbeladene Läsionen bei Atherosklerose

Aus Charo and Ransohoff: *The many roles of chemokines and chemokine receptors in Inflammation*, NEJM, 200; 354, S.610-621



**Abb.14: Rolle von Chemokinen bei Atherosklerose:** Präsentation von Chemokinen wie Fractalkine von endothelialen Proteoglykanen während der Atherosklerose und Schlüsselrolle von Fractalkine und seinem Rezeptor zwischen Monozyt und Endothelzelle

Aus Charo and Ransohoff: *The many roles of chemokines and chemokine receptors in Inflammation*, NEJM 200; 354, S.610-621

## **7. Fractalkine**

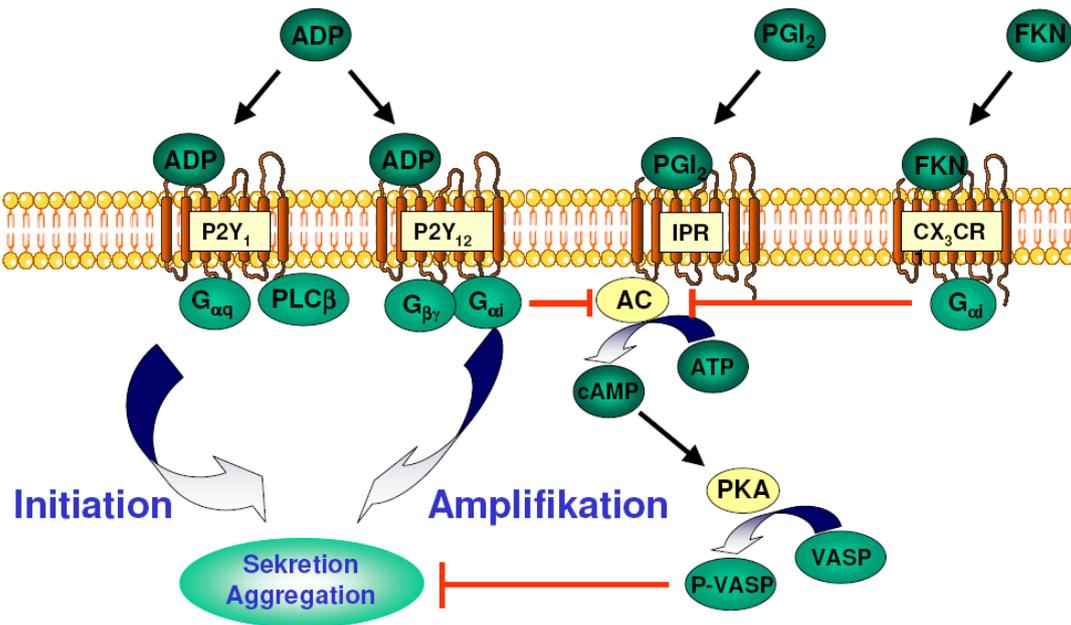
### 7.1 Das membran-gebundene Chemokin Fractalkine

Chemokine sind Zytokine mit chemotaktischer Eigenschaft. Sie sind eine große Gruppe von kleinen Proteinen, die die Chemotaxis bestimmter Zellen und die Regulation von Leukozyten bei der Immunabwehr induzieren. Sie bestehen aus Cystein und Aminosäurenresten (C=Cystein und X=Aminosäurerest). Man kann vier Familien unterscheiden: CXC, CC,C und CX<sub>3</sub>C. Im Jahre 1997 wurde erstmals eine damals neue Klasse von membrangebundenen Chemokinen mit einer CX<sub>3</sub>C-Modifikation beschrieben.<sup>153;164</sup>

Zu dieser Familie gehört als einziges gegenwärtig bekanntes Mitglied Fractalkine: CX<sub>3</sub>CL1. Es unterscheidet sich von den anderen durch eine Polypeptidkette, die die Chemokin-Domäne auf einem ausgedehnten transmembranösen Domäne trägt. Dadurch kann Fractalkine als einziges der Chemokine sowohl membranständig als auch in löslicher Form auftreten.<sup>164</sup>

Der Fractalkine-Rezeptor wurde an verschiedenen Zellen nachgewiesen, vor allem an Leukozyten.<sup>165</sup> Auch Thrombozyten<sup>166</sup> zeigen diesen Rezeptor sowie glatte Muskelzellen, die auf Stimulation mit Fractalkine migrieren. Der Rezeptor ist G-Protein-gekoppelt und durch Pertussistoxin inhibierbar.<sup>157</sup> Fractalkine wird in verschiedenen Geweben wie z.B. Gehirn, Herz, Niere und Lunge exprimiert.<sup>155;164</sup> Seine Expression wird durch pro-inflammatorische Stoffe in Endothelzellen und bei Endothelläsionen vermehrt.<sup>155;167</sup> Eine erhöhte Expression von Fractalkine wurde auch bei Atherosklerose und der koronaren Herzkrankheit nachgewiesen.<sup>168;169</sup> Makrophagen in atherosklerotischen Plaques zeigen ebenfalls eine vermehrte Expression von Fractalkine.<sup>168</sup> Membranständiges Fractalkine bewirkt die Adhäsion von Zellen mit Fractalkine-Rezeptor. Diese Adhäsion benötigt unter bestimmten Scherbedingungen kein Integrin, Calcium oder andere Zellen.<sup>157;170</sup>

Möglicherweise inhibiert der G-Protein-gekoppelte Fractalkine-Rezeptor ähnlich dem G-Protein-gekoppelten ADP-Rezeptor die Adenylatzyklase, die ungehemmt mittels cAMP auf die Proteinkinase A wirkt. Durch diesen Schritt kommt es zur Phosphorylierung von VASP, was wiederum eine Aggregation/Sekretion der Thrombozyten verhindert und bei Hemmung der Adenylatzyklase zu einer vermehrten Aggregation führt (Abb.15).



**Abb.15:** Fractalkine-Rezeptor und sein Signalweg in Thrombozyten: Adenosin-5'-Diphosphat (ADP) aktiviert Thrombozyten durch zwei G-Protein-gekoppelte P2-Rezeptoren, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>. Der G<sub>αq</sub>-gekoppelte P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor initiiert die Thrombozytenaggregation durch Aktivierung von Phospholipase C (PLC $\beta$ ) und Calciummobilisierung (Ca<sup>++</sup>), während der G<sub>αi</sub>-gekoppelte P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor die Aggregation verstärkt und komplettiert. Zusätzlich hemmt der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor die Produktion von zyklischem Adenosin-3':5'-Monophosphat (cAMP) durch die Adenylatcyclase (AC), welche physiologischerweise durch endotheliales Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) aktiviert wird. Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert das vasodilatatorische Phosphoprotein (VASP) und hemmt die thrombozytäre Sekretion und Aggregation. Der G-Protein-gekoppelte Fractalkine-Rezeptor benutzt vermutlich denselben Signalweg wie der ADP-Rezeptor. ATP: Adenosintriphosphat; IPR: Isoprostanrezeptor.

## 7.2 Fractalkine und Leukozyten

Chemokine regulieren die Rekrutierung von Leukozyten bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen, so auch bei Atherosklerose.<sup>153</sup> Immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass auch Fractalkine dabei eine kritische Rolle spielt.<sup>160;168;169;171</sup> Im Blut zirkulierende Leukozyten tragen den Fractalkine-Rezeptor.<sup>156;165</sup> Die inflammatorischen Endothelzellen exprimieren wiederum Fractalkine im artherosklerotischen Plaque, stimuliert durch proinflammatorische Zytokine.<sup>172</sup> Interaktionen zwischen membrangebundenem Fractalkine und seinem Rezeptor auf Leukozyten vermittelt nicht nur die Chemoattraktion, sondern führt auch zur Leukozytenadhäsion. Fractalkine rekrutiert Leukozyten unter niedriger Scherkraft im Blut. Dabei blieb jedoch erstmal unklar, welche Rolle Fractalkine bei der Rekrutierung von

Leukozyten unter starken Flussbedingungen, so wie sie in den meisten atherosklerotischen Arterien herrschen, spielt.<sup>170</sup>

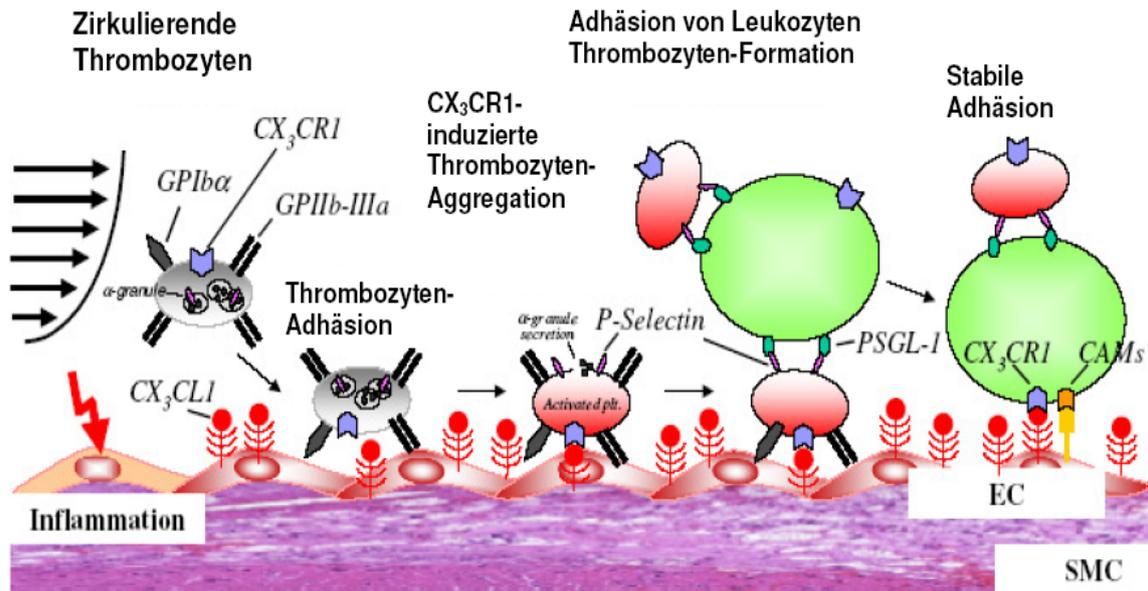
### 7.3 Fractalkine und Thrombozyten

Nach der Charakterisierung des Fractalkine-Rezeptors auf humanen und Ratten-Thrombozyten<sup>166</sup> wurde es interessant zu untersuchen, ob Fractalkine zur Thrombozytenaktivierung und -adhäsion bei kardiovaskulären Erkrankungen beiträgt. Durch Inkubation mit Fractalkine konnte bei in vitro-Stimulationen eine erhöhte P-Selektin-Expression als Marker der Thrombozytenaktivierung gezeigt werden.<sup>173</sup> Das legt nahe, dass Fractalkine auch eine wichtige Rolle bei der vermehrten Thrombogenese kardiovaskulärer Erkrankungen zu spielen scheint.<sup>166</sup> Erhöhte Thrombozytenaktivierung wird sowohl bei Herzinsuffizienz als auch bei Diabetes mellitus beschrieben.<sup>82;95;174</sup> Dies geht bei beiden mit einer endothelialen Dysfunktion und einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit einher. Fractalkine ist wiederum von intaktem Endothel gering exprimiert, jedoch verstärkt bei Endothelläsionen und Atherosklerose.<sup>175</sup> Dies ist ein starker Hinweis, dass Fractalkine gerade bei diesen Erkrankungen die Thrombozytenaktivierung noch verstärken und so zu den thromboembolischen Komplikationen dieser kardiovaskulären Erkrankungen entscheidend beitragen könnte.<sup>167;168</sup>

### 7.4 Fractalkine, Leukozyten und Thrombozyten

Endothelial exprimiertes Fractalkine führt zu einer erhöhten P-Selektin-Expression der adhärennten Thrombozyten, was wiederum eine lokale Rekrutierung von Leukozyten nach sich zieht: ein essentieller Schritt in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen. Diese Leukozytenadhäsion kann durch eine Fractalkine-Antagonisierung bis zu 40% reduziert werden. Interessanterweise waren Thrombozyten immer für eine Fractalkine-vermittelte Leukozytenaktivierung am Endothel notwendig. So konnte durch eine Inhibition der Thrombozytenadhäsion z.B. durch Blockade des Rezeptors GPIIb/IIIa auch die Leukozytenrekrutierung am Endothel reduziert werden. In der Abwesenheit von Thrombozyten scheint das endotheliale Fractalkine unter arteriellen Flussbedingungen nicht

in der Lage zu sein, Leukozyten zu rekrutieren. Die Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche, induziert durch Fractalkine, führt zu Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten. Entscheidend für die Leukozytenaktivierung am Endothel ist also die P-Selektin-Expression von Thrombozyten, welche Fractalkine vermittelt ist. Die Fractalkine-vermittelte Leukozyten-Adhäsion ist demzufolge Thrombozyten-abhängig (Abb.16).<sup>176</sup>



**Abb.16:** Interaktion von Fractalkine, Leukozyten und Thrombozyten: Fractalkine führt zu einer Thrombozytenaktivierung, was wiederum eine Leukozytenadhäsion am Endothel initiiert. Aus Schulz C et al.: *The Chemokine Fractalkine mediates leucocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in whole blood, a critical role for P-Selectin expressed on activated platelets*, *Circulation*, 2007;116, S. 764-773

### 7.5 Fractalkine und Endotheldysfunktion

Zusätzlich zu seiner Rolle als Chemokin und Adhäsionsmolekül induziert Fractalkine eine Endotheldysfunktion durch Stimulation von Sauerstoffradikalen im Gefäß, was zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit führt.<sup>177</sup> Dies könnte ein weiterer Mechanismus sein, durch den Fractalkine an der Bildung atherosklerotischer Läsionen beteiligt ist. Inflammatorische oder aktivierte Endothelzellen exprimieren wiederum den Fractalkine-Rezeptor.<sup>155;167;169;171</sup> Auch kultivierte Endothelzellen, native Endothelzellen und native Gefäßmuskelzellen in gesunden Aorten exprimieren  $CX_3CR1$ . Endothelzellen scheinen also

nicht nur die vorherrschende Quelle von Fractalkine zu sein, sondern sie fungieren auch als Zielzelle für dieses Chemokin. Dementsprechend kommt es durch eine vermehrte Fractalkine-Expression an Endothelzellen zu Thrombozyten-Aktivierung und Leukozyten-Adhäsion sowie durch direkte parakrine Mechanismen zu einer Endotheldysfunktion.<sup>177</sup>

Die Protektion vor Atherosklerose, die bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Fractalkine-Rezeptor beobachtet worden ist<sup>154;161</sup>, ist diesen Ergebnissen zufolge nicht nur der Fractalkine vermittelten Leukozyten-Rekrutierung und der daraus resultierenden Gefäßschädigung zuzuschreiben. Vielmehr konnte nun gezeigt werden, dass Fractalkine einen direkten, leukozytenunabhängigen Gefäßschaden induzieren kann. Dies würde auch die Protektion vor Atherosklerose der ApoE<sup>-/-</sup>-knock out-Mäuse ohne Fractalkine-Rezeptor erklären.<sup>177</sup>

### **8. Klinische Relevanz von Fractalkine**

Zur näheren Charakterisierung der klinischen Bedeutung von Fractalkine und seines Rezeptors für den Menschen, wurden Polymorphismen in den Genen für CX<sub>3</sub>CR1 untersucht. Es sind verschiedene Rezeptorpolymorphismen mit einem reduzierten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, besonders KHK und Akutes Koronarsyndrom durch reduzierte Progression der atherosklerotischen Läsionen, beschrieben. Eine verminderte CX<sub>3</sub>CL1-abhängige Zell-Zell-Adhäsion, inklusive der Chemotaxis der Leukozyten, wurde beobachtet.<sup>178-181</sup> Patienten mit einem I249-Polymorphismus am CX<sub>3</sub>CR1-Gen zeigen eine verbesserte endothelabhängige koronare Vasodilatation, was daraufhin deutet, dass Fractalkine in die Gefäßfunktion eingreift.<sup>181</sup> Bei anderen Polymorphismen des Fractalkine-Rezeptors wie z.B. V249I und T280M kam es zu einem erhöhten Risiko für akute Koronarsyndrome und für Restenosen nach Stenting an den Koronararterien.<sup>182</sup>

Sehr ähnliche Veränderungen wie in der Atherogenese werden auch bei einer akuten Infektion mit *Rickettsia africae* beschrieben. *Rickettsia africae*, der Erreger des afrikanischen Zeckenbissfiebers, ist in der Lage eine Entzündung herbeizuführen und Endothelzellen zu aktivieren, was zu einem prokoagulatorischen Zustand führt. Durch das aktivierte Endothel kommt es zu einer vermehrten Produktion von Fractalkine und über seinen Rezeptor zu einer Thrombozytenaktivierung. Durch einen Antikörper gegen den Fractalkine-Rezeptor konnte eine Reduktion des erhöhten sCD40L-Spiegels nachgewiesen werden.<sup>183</sup>

Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigt eine entscheidende Rolle von Fractalkine bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz. Es konnte eine starke Hochregulation der Genabschnitte, die für Fractalkine kodieren, in einem Tiermodell fünf Tage nach experimentellem Myokardinfarkt bewiesen werden. In Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wurde eine bis zu dreifach erhöhte Fractalkine-Konzentration im Serum in Abhängigkeit der Schwere der Erkrankung gemessen. In vitro-Experimente zeigen eine direkte Wirkung von Fractalkine auf Kardiomyozyten im Sinne einer Hypertrophieförderung. So erscheint eine entscheidende Beteiligung von Fractalkine beim Remodeling sehr wahrscheinlich.<sup>184</sup>

In der vorliegenden Arbeit werden nun die Wirkung des Chemokins Fractalkine auf Thrombozyten und Endothel bei Ratten mit Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus dargestellt. Beides sind Modelle humaner Erkrankungen, die mit einer hohen Mortalität einhergehen und als gemeinsame Grundlage eine Endotheldysfunktion mit daraus resultierender erhöhter kardiovaskulärer Morbidität aufweisen.

## **II. METHODEN**

### **1. Modelle**

#### 1.1 Allgemeines

In unseren Tiermodellen für Herzinsuffizienz wurden männliche Wistar-Ratten (250-300 g; von Harlan-Winkelmann, Borchon, Deutschland) im Alter von 10 Wochen für die CHF-Tiere sowie für ihre Kontrollen verwendet (Abb.17). Als CHF-Modell wurden Ratten benutzt, bei denen durch eine Koronarligatur ein chronischer Myokardinfarkt ausgelöst worden war. Als Typ II-Diabetes-Modell wurden Zucker-Ratten untersucht. Die Tiere des Zucker-Modells waren männlich und 6 Monate alt (300g, Harlan-Winkelmann, Borchon, Deutschland).

Alle Tiere wurden in Käfigen mit höchstens fünf Tieren bei konstanter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter und unterlagen einem 12-stündigen Hell-/Dunkelrhythmus.

#### 1.2 Myokardinfarkt

Zur Erlangung von Ratten mit bedeutsamer CHF wurde das Modell eines chronischen Myokardinfarkts in der Ratte benutzt. Hierzu wurde an männlichen erwachsenen Wistar-Ratten (250-300 g) die beschriebene Methode der Koronarligatur durchgeführt.<sup>185</sup> Zur Durchführung des experimentiellen Myokardinfarkts wurden die Ratten in eine Vollnarkose mit Isofluran versetzt. Nach endotrachealer Intubation wurden die Tiere mit Sauerstoff beatmet. An den auf dem Rücken liegenden Tieren wurde thorakal zunächst das Fell mit einer Schere durchtrennt, die Pektoral Muskulatur stumpf abpräpariert und anschließend der Thorax eröffnet. Nach Durchtrennung der Interkostalmuskulatur und des Perikards konnte das Herz durch vorsichtigen Druck auf die Thoraxwand herausgehoben werden. Dann wurde bei den Infarkt-Tieren mit einem Faden (Prolene Monofil 5.0) eine Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) durchgeführt. Bei den Sham-operierten Tieren wurde keine Ligatur gemacht. Das Herz befand sich dabei nur ca. 30 Sekunden ausserhalb des Perikards. Die Pektoralismuskulatur wurde mittels einer Naht verschlossen und das Fell geklammert. Zur besseren Entfaltung der Lungen wurden die Tiere kurzfristig mit Überdruck beatmet.

Postoperativ wurden die Tiere 6 h überwacht und bei Bedarf mittels Herzdruckmassage reanimiert.



**Abb.17:** Darstellung einer Wistar-Ratte: Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250-300g wurden in dem Modell CHF verwendet

### 1.2.1 Hämodynamik

Die hämodynamischen Messungen wurden zehn Wochen nach Induktion des Infarktes bei den Tieren durchgeführt. Unter Isofluran-Narkose wurden die Tiere gewogen und nach Intubation mit einer Frequenz von 75/min und einem Atemzugvolumen von 2,8 ml beatmet. Nach Einführung eines Polyethylen-Katheters (PE 50) in die rechte Arteria carotis wurde der Katheter in den linken Ventrikel vorgeschoben. Anhand der über einen Mikro-Tip-Katheter (Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA) abgeleiteten Druckkurve konnte die korrekte Lage überprüft werden. Der linksventrikuläre systolische und diastolische Druck sowie die maximale Druckentwicklung wurde während allen Messungen kontinuierlich über die Zeit erhoben. Nach Rückzug des Katheters aus dem linken Ventrikel in die Aorta konnte der systolische und diastolische Druck sowie der aortale Mitteldruck bestimmt werden.

### 1.2.2 Bestimmung der Infarktgrößen

Nach Ende der hämodynamischen Messungen und der Blutentnahme aus der Vena cava inferior für weitere Versuche wurde den Tieren in tiefer Narkose das Herz entnommen. Der linke Ventrikel wurde nach Trennung von den übrigen Kammern in drei transversale Abschnitte Apex, mittlerer Ring und Basis geteilt. Nachdem der ca. 3 mm dicke mittlere Ring

## METHODEN

---

tiefgefroren worden war, wurde er mit einem Mikrotom (Leica CM 1850, Bensheim, Deutschland) in etwa zehn jeweils 5 µm dicke Schnitte geteilt. Diese wurden nach Giseon gefärbt und mittels einer auf einem Mikroskop aufmontierten Scannerkamera (3CCD-IRIS, Sony) eingescannt. Die Vermessung erfolgte mit Hilfe eines digitalisierten Computerprogramms (Sigma Scan pro, Jandel Software). So konnte die Ausdehnung der Infarkt Narbe endo- und epikardial vermessen und zum endo- und epikardialen Umfang in Beziehung gesetzt werden.

In die Studie wurden nur Tiere mit manifester CHF eingeschlossen, was mit einem linksventrikulären end-diastolischen Druck (LVEDP) > 15 mmHg einhergeht. Weitere Globalparameter verdeutlichen die charakteristischen Merkmale der CHF-Tiere gegenüber den Sham-Tieren:

	Sham	CHF
Körpergewicht [g]	371±7	426±11*
MI Größe [% des LV]	-	51.8±2.6
LVEDP [mmHg]	4.3± 0.9	21.2±2.3**
Lungenwasser (µL) (ΔFeucht/Trockengewicht)	1140±80	2650±260**
Thrombozyten [*1000/µl]	834±66	704±69
Leukozyten [*1000/µl]	5.4±0.6	5.0±0.5

Mittelwerte ± SEM von n=8 Tieren, \* p<0.05 vs. Sham, \*\* <0.01 vs. Sham.

### 1.3 Diabetes mellitus Typ 2

Als Tiere dieses Modells dienten Zucker fatty-Ratten. Die Zucker fatty Ratte [fa/fa] wurde erstmals von Dr. L. M. Zucker beschrieben.<sup>186</sup> Sie weisen eine Punktmutation im „fa“-Gen auf, das in der extrazellulären Domäne des Leptinrezeptors liegt. Dies führt beim homozygoten Phänotyp [fa/fa] zu einer Hyperphagie und Obesitas, wohingegen der heterozygote Phänotyp schlank bleibt. Die Obese-Ratten vermeiden aufgrund einer kompensatorischen Hyperinsulinämie zunächst die Ausbildung eines Diabetes mellitus.<sup>187</sup> Im Alter von sechs Monaten entwickeln die Tiere jedoch einen Diabetes mellitus auf dem Boden

## METHODEN

---

eines metabolischen Syndroms, was als Modell des humanen Typ 2 Diabetes dienen kann.<sup>188;189</sup>

Die Tiere der Kontrollgruppe waren 6-Monate alte männliche schlanke Lean-Ratten. Sie unterscheiden sich lediglich im Fehlen der autosomal-rezessiven „fa“-Mutation von ihren obesen Geschwistertieren.

<b>Deskriptive Daten</b>	<b><u>Lean</u></b>	<b><u>Obese</u></b>
Blutglucose (mg/dl)	155 ± 15	270 ± 33 **
Körpergewicht (g)	362 ± 13	614 ± 7 **
Thrombozyten (*1000/μl)	721 ± 50	980 ± 110 *
Leukozyten (*1000/μl)	4.6 ± 0.4	4.9 ± 0.7

Mittelwerte SEM von n=12 Tieren, \* p< 0.05, \*\* p< 0.01 vs. Lean

## **2. Methodik**

### 2.1 Organbad: Vasomotorik an isolierten Aortenringen

Zur Beurteilung der vaskulären Reaktivität wurden im Organbad Kontraktions- und Relaxationsstudien an isolierten Aortenringen durchgeführt. Zu diesen Versuchen wurden Ringe der Aorta thoracalis verwendet. Nach Einleitung einer terminalen Anästhesie mit Isofluran wurde bei den Wistar-Ratten Thorax und Abdomen eröffnet. Nach der Blutabnahme aus der abdominalen Vena cava inferior (direkte Punktion unter Sicht) wurde der Aortenbogen durchtrennt und die Aorta descendens bis zum Diaphragma unter Vermeidung von Druck oder Zug entnommen. Das entnommene Gefäß wurde dann in Krebs-Henseleit-Lösung (NaCl 118,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,6 mM, KCl 4,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM und Glukose 12,0 mM plus Diclofenac 1 μM, pH 7.4, 37 °C) eingelegt und mehrfach intraluminal gespült, um verbliebenes Blut aus dem Lumen zu entfernen. Dann wurde die Aorta unter einem Mikroskop von umliegenden Fett- und Bindegewebe freipräpariert und entweder für eine spätere Western Blot-Analyse eingefroren oder für die sofortige Messung im Organbad in Ringe mit jeweils drei Millimetern Breite geschnitten.

Die Untersuchung der Gefäße erfolgte in mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten Kammern (5 ml) der Organbäder (Föhr-Medical-Instruments, Seeheim, Deutschland, Abb.18). Die Lösung

## METHODEN

---

(37 °C, pH 7.4) unterlag einer ständigen Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> , 5% CO<sub>2</sub>). Nach einer passiven Vorspannung auf 2g und einer 30 minütigen Äquilibration wurde das Kontraktions (Phenylephrin)- und Relaxationsverhalten (endothelabhängig: Acetylcholin; endothelunabhängig: 2-(N,N-Diethylamino)-diazenolate-2-oxide: DEA-NONOate) untersucht. Im Falle der chronischen Stimulation mit Fractalkine wurden die Aortenringe zusätzlich mit 1µg/ml des rekombinanten Chemokins für zwei Stunden unter Lichtschutz inkubiert. Die Aortenringe wurden wiederholt mit KCl kontrahiert (mit einem Maximum von 100 mM) bis reproduzierbare Wirkungen erreicht wurden, bevor mit der Dosis-Wirkungskurve auf Phenylephrin (PE) begonnen wurde. Dann wurden die Ringe mit Phenylephrin auf gleiche Level vorkontrahiert und anschließend die Relaxation auf Acetylcholin und DEA-NONOate (Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz) untersucht. In separaten Experimenten wurden die Aortenringe durch eine niedrige PE-Dosis nur leicht vorkontrahiert (ca. 15-20 % ihrer maximalen Kontraktion), um durch Zugabe des NO-Synthase Inhibitors N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginin (L-NNA, 100 µM, 45 min.), die additive Kontraktion zu messen, was als indirekter Marker der physiologischen, durch Dehnung induzierten, Calcium-unabhängigen NO-Bildung vorbeschrieben ist.<sup>42</sup>



**Abb.18:** Darstellung eines Organbads: In den hier abgebildeten acht Kammern wird jeweils ein Aortenring untersucht. Auf dem Monitor sind in den nachfolgenden Versuchen die Gefäßreaktivität in Kurven dargestellt

### 2.2 Thrombozytenaktivierung in vitro / CX<sub>3</sub>CR1-Expression

Die Ratten wurden mit Isofluran in Vollnarkose gebracht. Bei tiefer terminaler Anästhesie wurden Haut und Peritoneum geöffnet und die abdominelle Vena cava inferior freigelegt. Das Blut wurde durch direkte Punktion der Vene mit einem kommerziell erhältlichen 3ml-Zitratröhrchen (Antikoagulation durch 3.8% Zitrat) abgenommen.

Jeweils 40 µl des Vollblutes wurden dann mit einem Puffer aus phosphat-gepufferten Saline-Lösung (PBS) (ohne Magnesium und Calcium), Glukose (5.5 mM) und bovinem Serum-Albumin (BSA) (0.5%) verdünnt. Die Inkubation erfolgte mit 10 µl FITC-markiertem anti-humanem Fibrinogen-Antikörper (WAK-Chemie, Steinbach, Deutschland) oder Anti-P-Selektin-Antikörper (anti-Ratten CD62P-Antikörper, FITC-markiert, BioCytex, Marseille, Frankreich) für 10 min bei Raumtemperatur. Dann erfolgte die Stimulation mit ADP (1, 5 oder 10 µM) und die Ko-Stimulation mit Fractalkine (1 µg/ml). Nach zehnmütiger Inkubation wurde eine erneute Verdünnung mit PBS-Puffer und die Fixierung der Zellen mit Methanol-freiem Formaldehyde (final 1.5%) für weitere zehn Minuten durchgeführt.

Die Analyse der Zellen erfolgte mittels eines FACScalibur-Durchflusszytometers (Beckton Dickinson, Heidelberg, Abb.19). Die Thrombozytenpopulation konnte hierbei mittels ihres charakteristischen Vorwärts- und Streulichtverhaltens identifiziert und die Fluoreszenz der Antikörper in dieser Population gemessen werden.

Durch Einführung durchflußzytometrischer Methoden Ende der achtziger Jahre wurde die Thrombozytenfunktionsdiagnostik wesentlich weiterentwickelt. Mittels fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörper oder Substanzen können spezifische Veränderungen der aktivierten Plättchenoberfläche charakterisiert werden. In der Durchflusszytometrie werden Einzelzellen analysiert, die in einem konstanten Fluss durch einen Laserstrahl detektiert werden. Das Streulicht und die Intensität der Fluoreszenz wird durch spezifische Photodioden registriert. Dadurch kann die Größe (Vorwärtstreulicht, „forward scatter“), Granularität (Seitwärtstreulicht, „side scatter“) und Oberflächenexpression von Antigenen nach Bindung eines fluorochromkonjugierten Antikörpers (mittlere Immunfluoreszenz) bestimmt werden. Durch Verwendung verschiedener Fluorochrome mit unterschiedlichem Lichtfrequenzspektrum ist es sogar möglich, verschiedene funktionelle Veränderungen der Thrombozytenmembran gleichzeitig zu bestimmen. Wir verwendeten bei diesen Versuchen ausschliesslich Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, Absorption 488 nm, Emission 530 nm, grün) als Fluorochrom.

Es gibt verschiedene thrombozytäre Oberflächenmarker - als Degranulationsmarker gilt P-Selektin. Das Glykoprotein wird ausschließlich auf aktivierten Thrombozyten exponiert, sofern eine Degranulation von  $\alpha$ -Granula stattgefunden hat. Eine erhöhte Bindung von anti-CD62P weist auf eine irreversible Degranulation des Thrombozyten hin. Nur an aktivierten Thrombozyten kommt es zur Bindung von Fibrinogen als notwendiger Schritt für die Aggregation, was mittels Fibrinogen-Antikörper gemessen werden kann.<sup>190-192</sup>



**Abb.19:** Darstellung eines FACS-Geräts: Mittels charakteristischem Verhalten im Vorwärts- und Seitwärtsstreuen wird die Thrombozytenpopulation erkannt

### 2.3 Aggregometrie

Für die Aggregometrie-Versuche wurden aus dem oben beschriebenen Vollblut plättchenreiches Plasma (PRP) hergestellt. Dazu wurde das Vollblut 12 min bei 180g ungebremst bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der plättchenreiche Überstand abpipettiert. Der verbliebene Rest wurde erneut bei 3000g ungebremst, 6 min zu plättchenarmen Plasma (PPP) zentrifugiert. Abschließend wurde das PPP nochmals 2 min bei 14000 g ungebremst zentrifugiert. Das so gewonnene PPP diente als Leerwert für das Aggregometer. Das bei 37°C gelagerte PRP wurde nun mit Puffer (0.02 g BSA, 0.02 g, 200ml Puffer) verdünnt, um eine Thrombozytenanzahl von 300.000/ $\mu$ l im PRP zu erhalten. Das PPP wurde in demselben Verhältnis verdünnt. Nach Abgleich mit dem PPP als Referenzküvette, welches den 100%-Wert der Lichttransmission darstellt, wurden jeweils 300  $\mu$ l des verdünnten PRP zur Analyse ins Aggregometer (PAP 8-E, MöLab, Hilden, Deutschland)

## METHODEN

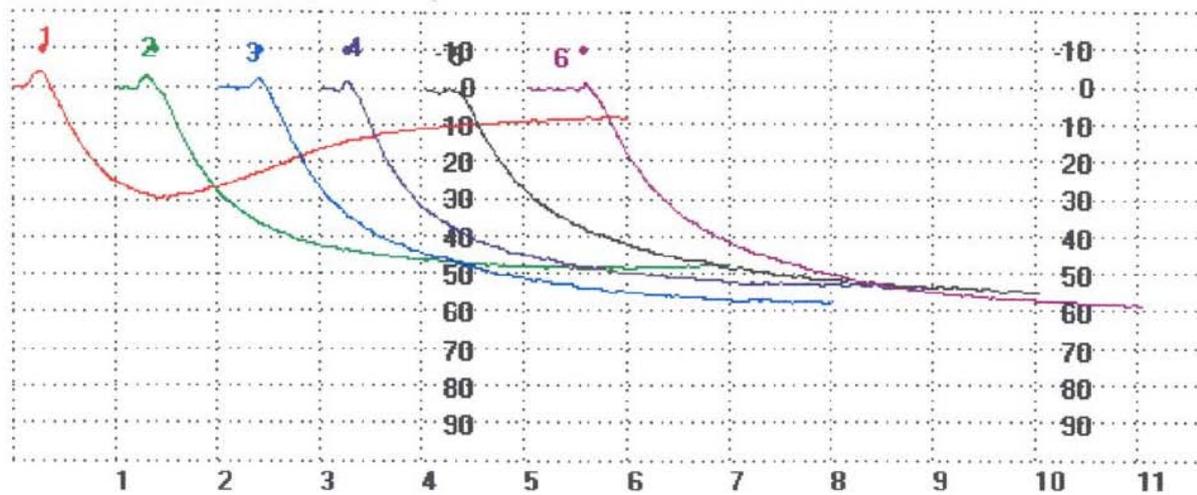
---

gegeben (Abb.20). Das PRP vor Zugabe des Agonisten bezeichnet den Nullwert der Lichttransmission. Nach fünfminütigem konstantem Rühren (900 Umdrehungen/min) wurden in den verschiedenen Kanälen ADP in Gegenwart und Abwesenheit von Fractalkine zu dem verdünnten PRP hinzugegeben. Die Wirkung von ADP auf die Thrombozyten wird in einer Aggregationskurve dargestellt, die sich nach der Lichttransmission verhält. Bei Zunahme der Lichttransmission, z.B. durch aggregierte Thrombozyten, kommt es zum Ansteigen der Aggregationskurve.



**Abb.20:** Darstellung eines Aggregometers: Dieses Modell PAP-8 mit acht Messkanälen der Firma Mölab wurde zur Thrombozytenaggregation-Messung eingesetzt

Bei der ADP-Konzentration, die eine 30-40%-Aggregation hervorrief, schlossen wir noch weitere Versuche mit Fractalkine an. Zunächst erfolgte eine fünfminütige, lichtgeschützte Inkubation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Fractalkine unter Rühren. Dann erfolgte die Zugabe von der ADP-Konzentration, welche zuvor eine 30-40%-Aggregation ausgelöst hatte. Die Aggregationskurven wurden ausgewertet nach Prozentzahl der maximalen Aggregation, Die Aggregation wird als maximale Zunahme der Lichttransmission (Amplitude in %) angegeben (Abb.21).



**Abb.21:** Darstellung einer Aggregationskurve: hier ist eine typische Aggregationskurve eines Kontrolltiers aufgezeichnet. In den Kanälen 1-6 wurden aufsteigende Konzentrationen an ADP hinzugefügt. Im ersten Kanal bei ADP 1  $\mu$ M ist ein Beispiel für eine reversible Aggregation zu sehen

Die Bestimmung der Plättchenaggregation erfolgte nach dem turbimetrischen Verfahren nach Born.<sup>193</sup> Die Methode beruht auf der Eigenschaft, dass die optische Dichte einer Partikelsuspension abhängig von der Partikelzahl und nicht der Größe ist. Durch Zusatz eines Plättchenagonisten zu PRP setzt die Aggregation ein, wenn die Thrombozyten mit einem Rührmechanismus mit konstanter Frequenz in Bewegung gehalten werden. Die voranschreitende Aggregation zeigt sich im Auftreten großer Plättchenaggregate und Zunahme der Lichttransmission. Diese wird fortlaufend photometrisch registriert und in Kurvenform kontinuierlich aufgezeichnet. Aus der Änderung der Lichttransmission leiten sich die Maße für die Aggregabilität der Thrombozyten ab.<sup>81</sup>

#### 2.4 Flusskammermodell zur Thrombozytenadhäsionsmessung

Wie für die Durchflußzytometrie wurde hier nach der gleichen Methode durch direkte Punktion der Vena cava inferior den Ratten Vollblut entnommen. Das Vollblut wurde in Spritzen mit einem Zitratsäure/Dextrose-Gemisch (ACD: Zitratsäure [3.8 mM] und Dextrose [125 mM] mit 1ml ACD und 4ml Blut) abgenommen. Wie für die Aggregometrie wurde durch Zentrifugation des Vollbluts PRP hergestellt (12 min, 180g, ungebremst). Anschließend wurde zu dem PRP der HEPES-modifizierte Tyroden-Puffer 1 (NaCl: 132 mM;

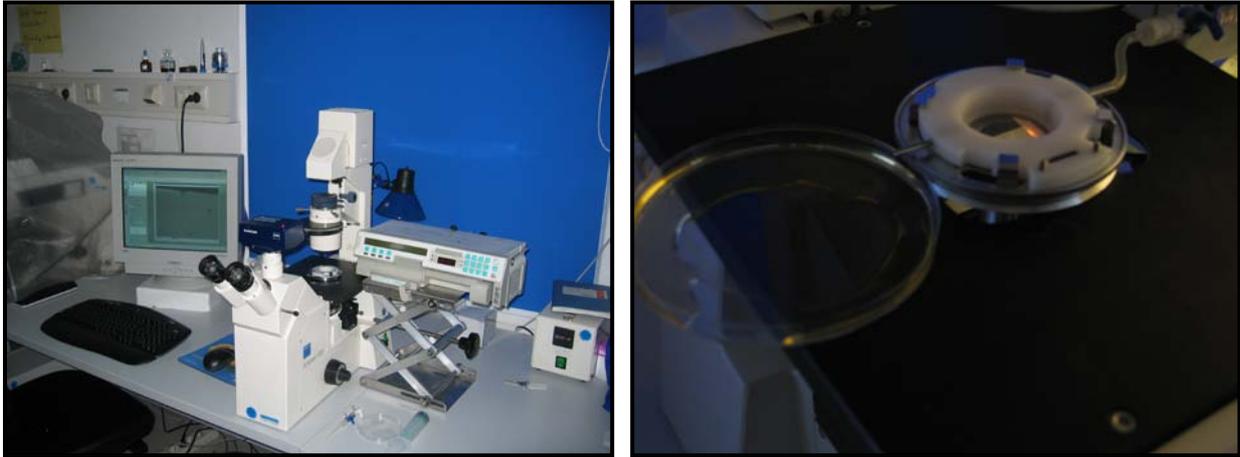
## METHODEN

---

KCl: 4 mM; NaHCO<sub>3</sub>: 11,9 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,36 mM; Glucose: 10 mM; pH 6,5; 1 ml PRP/ 3.5 ml Puffer 1) hinzugefügt. Durch weitere Zentrifugation (900 g, 10 min.) wurde aus dem PRP ein Thrombozytenpellet generiert. Dieses wurde nach Beseitigung des Überstandes aus der zweiten Zentrifugation in HEPES-modifiziertem Tyroden-Puffer 2 (Puffer 1; pH 7,4; CaCl<sub>2</sub>: 1 mM; MgCl<sub>2</sub>: 1 mM) mit einer finalen Thrombozytenkonzentration von 100 000/μl aufgelöst. Diese nun entstandene Suspension aus gewaschenen Thrombozyten wurde in 50 ml-Perfusorspritzen mit jeweils 5 ml aufgezogen und für 15 min im Wärmebad bei 37 °C vorgewärmt. Ein Teil der Proben wurde während dieser Vorwärmphase mit Fractalkine (1μg/ml) inkubiert. Nach dem Vorwärmen wurden die Spritzen in die mit der Flusskammer verbundene automatische Perfusorpumpe eingespannt und mit einer Scherrate von 1000/s durch die Kammer perfundiert. Die Suspension für die folgenden Experimente wurde in konstanten Intervallen während der Messung der Thrombozytenadhäsion vorgewärmt. Zur Vermeidung einer Aktivierung oder Ermüdung der Thrombozyten wurde die Dauer der Verwendung der Thrombozyten jedes einzelnen Tieres auf maximal 1 h nach der letzten Zentrifugation beschränkt. Innerhalb dieses Zeitfensters ließen sich gut reproduzierbare Ergebnisse erzielen.

Zur Beschichtung der Deckplatten der Flusskammer diente das Adhäsionsmolekül, Fibrinogen.<sup>194</sup> Es wurde zur Beschichtung diejenige Konzentration an Adhäsionsmolekülen verwendet, bei der eine optimale Thrombozytenadhäsion erreicht werden kann. In einer so genannten „parallel plate“ Perfusionskammer (FCS-2, Fa. Bioptechs, Butler, PA, USA) mit gut charakterisierten rheologischen Bedingungen wurden Perfusionsstudien mit verschiedenen Oberflächen durchgeführt. Dabei wurde die Perfusion mit einer definierter Scherrate von 1000/s eingestellt, wie sie in gesunden arteriellen Blutgefäßen beschrieben ist.<sup>195</sup>

Die Flusskammer wurde auf ein Invers-Mikroskop gestellt (TE-2000S, Fa. Nikon), um die Interaktion der Thrombozyten mit den Substraten visuell darzustellen (Abb.22). Bei jedem Experiment wurde zu Beginn die Einstellungen und die unperfundierte Flusskammer aufgenommen, um zu jeder einzelnen Messung ein passendes, individuelles Hintergrundbild zu erhalten. Die Bestimmung der fest adhärennten Thrombozyten erfolgte durch das Zählen der Zellen, die nach einer Perfusion von PBS über weitere fünf Minuten noch adhärennt waren.<sup>139</sup>



**Abb. 22:** Darstellung einer Flusskammer: Unter dem Invers-Mikroskop liegt die Flusskammer und ist mittels Schlauch mit einem Perfusor verbunden

### 2.5 ELISA

Die Menge von löslichem Fractalkine im Serum und Urin wurde mittels der Enzymgekoppelten Immunabsorbent Assay ELR-Fractalkine-001 Ratte Fractalkine ELISA Kit (RayBiotech, Inc., Norcross, GA, USA) bestimmt.

### 2.6 Immunhistochemie

Formalin-fixiertes Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und in Scheiben aufgeteilt wie schon beschrieben<sup>171</sup>. Die Stücke wurden entwacht, rehydriert und anschließend die immunhistochemische Färbung für CX<sub>3</sub>CR1 mittels Vectastain ® ABC Kit IgG (PK-6101, Vector laboratories, Burlingame, CA) durchgeführt. Die Scheiben wurden mit dem ersten Antikörper für CX<sub>3</sub>CR1 (rabbit anti-rat CX<sub>3</sub>CR1 TP-501P, Torrey Pines Biolabs, San Diego, CA) für eine Stunde inkubiert. Biotinylierte goat anti-rabbit IgG (Vector) und StreptABComplex/POX (Vector) wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden lokalisiert mittels des DAB Substrate Kit (Dako), gefolgt von einer Anfärbung mit Hamalaun. Ratten-Milzgewebe wurde als positives Testgewebe benutzt. Spezies und Isotyp-angepasste IgGs (Dako) wurden als negative Kontrollen bei Kontroll- und Testgewebe verwendet.

### **3. Substanzen**

Wenn nicht anders benannt, wurden alle Substanzen in höchster Reinheit von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Das für unsere Versuche verwendete Fractalkine ist rekombinantes Fractalkine für Ratten (rrCX<sub>3</sub>CL1; mit der finalen Konzentration von 1µg/ml; R&D Diagnostics, Minneapolis, MN). Der Antikörper ist ein polyklonaler Kaninchen anti-CX<sub>3</sub>CR1-Antikörper von Abcam/Acris (Hiddenhausen, Deutschland).

### **4. Statistik**

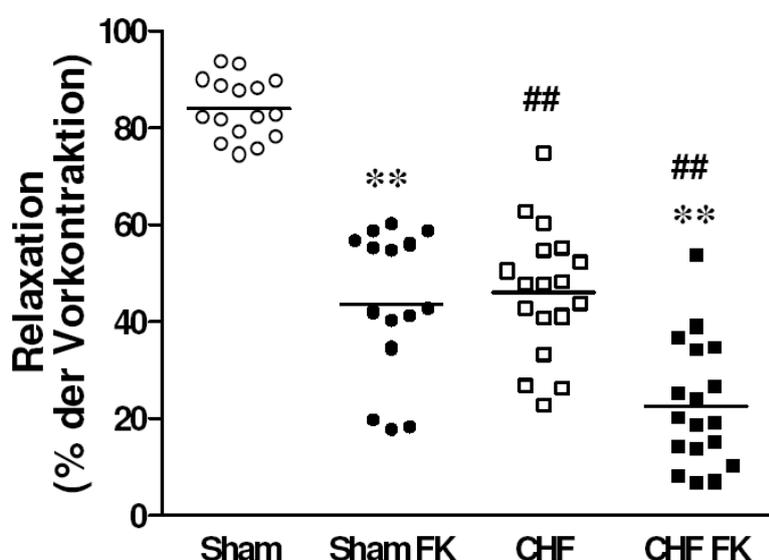
Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler für die Säulen-/ Balkendiagramme und die Kurven angegeben. Kontraktionen wurden in der Einheit Gramm registriert. Die Relaxation wurde prozentual bzw. im Verhältnis zur Vorkontraktion angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA) entweder mittels student's t-test oder durch ANOVA für aufeinander folgende Messungen mit nachfolgend durchgeführten multiplen Tukey-Kramer Vergleichstest durchgeführt.  $P < 0.05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

### III. ERGEBNISSE

#### 1. Herzinsuffizienz

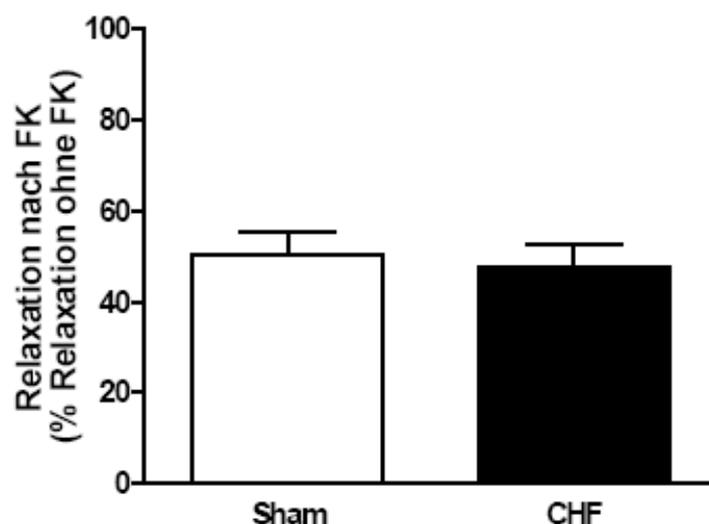
##### 1.1 GefäÙe

Im Organbad wurde die Wirkung von Fractalkine auf die Aortenringe herzinsuffizienter und Sham-operierter Tiere untersucht. Nach einer zweistündigen Inkubation mit Fractalkine (1 µg/ml) relaxierten die Aortenringen der Sham-Tiere signifikant schlechter auf die Maximaldosis von Acetylcholin (ACh, 1 µM). Sie relaxierten dann genauso schlecht wie diejenigen der CHF-Tiere per se relaxierten. Die CHF-Tiere reagierten auf eine Fractalkine-Inkubation mit einer weiteren signifikanten Verschlechterung ihrer Relaxation auf die Maximaldosis von Ach (Abb.23).



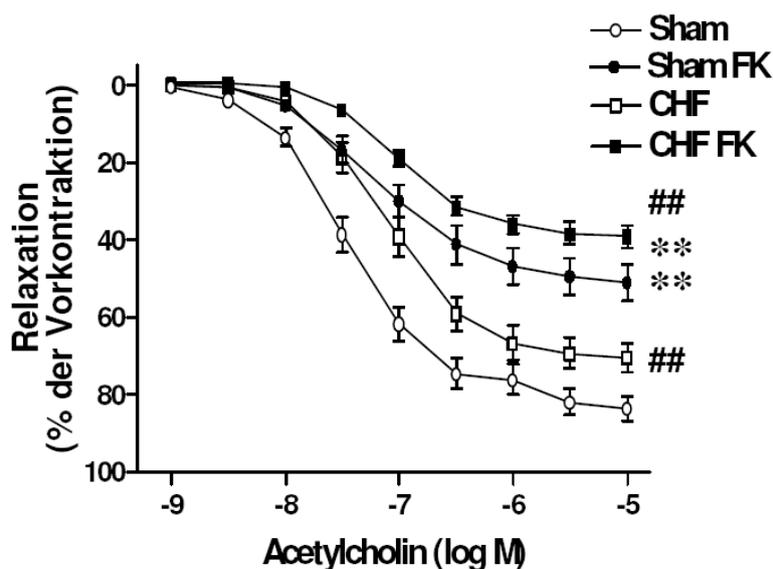
**Abb.23: Endothel-abhängige Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten:** Isolierte, mit Phenylephrin (1 µM) vorkontrahierte Aortenringe werden nach Inkubation mit Fractalkine (FK, 1 µg/ml, 2h) mit Acetylcholin (1µM) maximal relaxiert. Einzelwerte + Mittelwert, \*\* = p<0.01 vs. Unstimuliert, ## = p<0.01 vs. Sham

Die nächste Abbildung zeigt noch einmal die Reduktion der Relaxation auf die Maximaldosis von Acetylcholin der Sham- und CHF-Tieren nach Inkubation mit Fractalkine, dargestellt in einem Balkendiagramm als Prozentzahl der Relaxation ohne Fractalkine. Man sieht deutlich, dass auch die Sham-Tiere nach Fractalkine-Inkubation nur noch ca. 50 % ihrer maximal möglichen Relaxation ohne Fractalkine aufwiesen und Fractalkine auch bei herzinsuffizienten Ratten noch eine weitere Verschlechterung der Endothelfunktion bedingen kann (Abb.24).



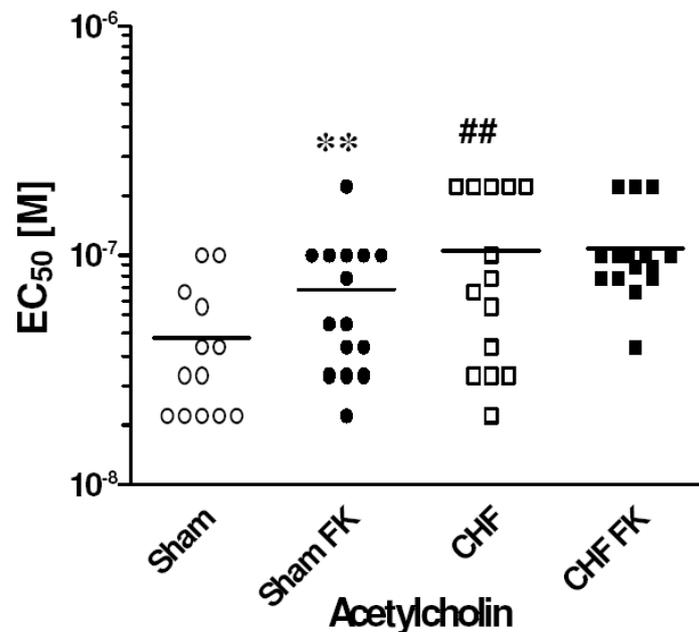
**Abb.24:** Reduktion der Endothel-abhängigen Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Isolierte, mit Phenylephrin (1  $\mu$ M) vorkontrahierte Aortenringe wurden nach Inkubation mit Fractalkine (FK, 1  $\mu$ g/ml, 2h) mit Acetylcholin (ACh, 1  $\mu$ M) maximal relaxiert. Dargestellt ist der Anteil der ACh-induzierten Relaxation in Gegenwart von Fractalkine im Vergleich zu Kontrollringen der jeweiligen Gruppe. Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 8 Tieren

Bei der Gabe von Acetylcholin in aufsteigender Konzentration wird deutlich, dass der oben beschriebene Effekt nicht nur bei einer maximalen Konzentration von ACh auftrat, sondern die Relaxationskurven sich schon früher trennten, d.h. schon bei geringen Dosen von ACh war die Relaxation bei den CHF-Tieren nach Fractalkine-Inkubation deutlich vermindert (Abb.25).



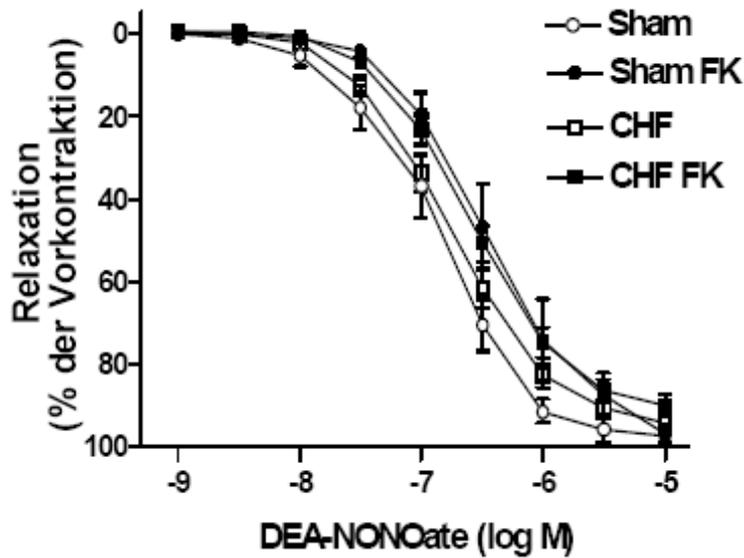
**Abb.25:** Endothel-abhängige Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Isolierte, mit Phenylephrin (1  $\mu$ M) vorkontrahierte Aortenringe wurden nach Inkubation mit Fractalkine (FK, 1  $\mu$ g/ml, 2h) kumulativ mit Acetylcholin (ACh) relaxiert. Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 8 Tieren, \*\* = p<0.01 vs. Unstimuliert, ## = p<0.01 vs. Sham

Betrachtet man die Konzentration von Acetylcholin (ACh) für einen halbmaximalen Effekt ( $EC_{50}$ ), so benötigten die CHF-Tiere per se eine höhere Konzentration an Acetylcholin. Die Sham-Tiere jedoch benötigten nach Fractalkine-Inkubation eine höhere Konzentration an Acetylcholin für eine halbmaximale Relaxation (Abb.26).



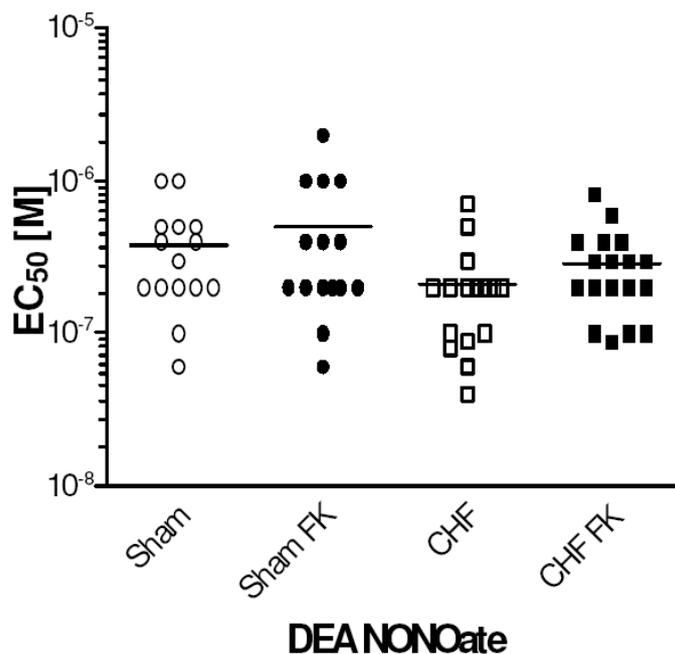
**Abb.26:** Endothel-abhängige Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Konzentration an ACh, die zum Erreichen der halbmaximalen Relaxation ( $EC_{50}$ ) nötig war. Einzelwerte + Mittelwerte, \*\*= $p < 0.01$  vs. Unstimuliert, ##= $p < 0.01$  vs. Sham.

Bei der Endothel-unabhängigen Relaxation nach Gabe des exogenen NO-Donors DEA-NONOate in aufsteigender Konzentration war nur ein geringer Unterschied bei den Sham-Tieren und CHF-Tieren nach Fractalkine-Inkubation in ihrer Relaxation nachweisbar. Dies war deutlicher bei den Sham-Tieren zu erkennen. Ihre Relaxation verschlechterte sich nach Fractalkine-Inkubation. Bei den CHF-Tieren ist dieser Effekt etwas geringer ausgeprägt, wobei diese per se eine etwas reduzierte NO-Sensitivität aufwiesen (Abb.27).



**Abb.27:** Endothel-unabhängige Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Isolierte, mit Phenylephrin (1  $\mu$ M) vorkontrahierte Aortenringe wurden nach Inkubation mit Fractalkine (FK, 1  $\mu$ g/ml, 2h) mit ansteigenden Konzentrationen von DEA-NONOate kumulativ relaxiert. Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 8 Tieren

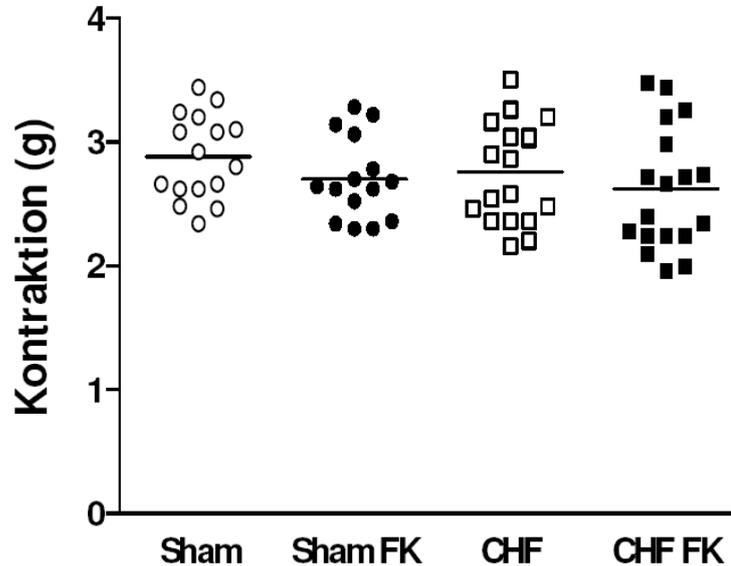
Bei der Konzentration von DEA-NONOate für einen halbmaximalen Effekt ( $EC_{50}$ ) zeigte sich vornehmlich ein Unterschied zwischen den Sham- und den CHF-Tieren. Nach Inkubation mit Fractalkine war der Bedarf bei beiden Tiergruppen an DEA-NONOate nur gering gesteigert (Abb.28).



**Abb.28:** Endothel-unabhängige Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Konzentration an DEA-NONOate, die zum Erreichen der halbmaximalen Relaxation ( $EC_{50}$ ) nötig war. Einzelwerte + Mittelwerte, \*\*= $p < 0.01$  vs. Unstimuliert

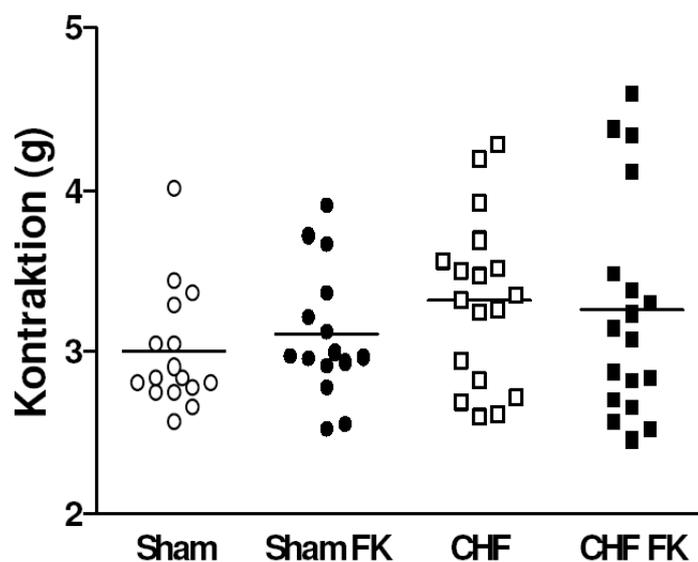
## ERGEBNISSE

Bei der Kontraktion auf die Gabe von  $K^+$  100 mM zeigten sich sowohl bei den Sham-Tieren als auch den CHF-Tieren keine Unterschiede zwischen der Kontraktion vor oder nach Inkubation mit Fractalkine (Abb.29).



**Abb.29:** Kontraktion auf  $K^+$  in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Isolierte Aortenringe wurden wiederholt mit  $K^+$  mit einem Maximum von 100 mM kontrahiert bis gleich-starke Kontraktionen erzielt wurden. Einzelwerte + Mittelwerte.

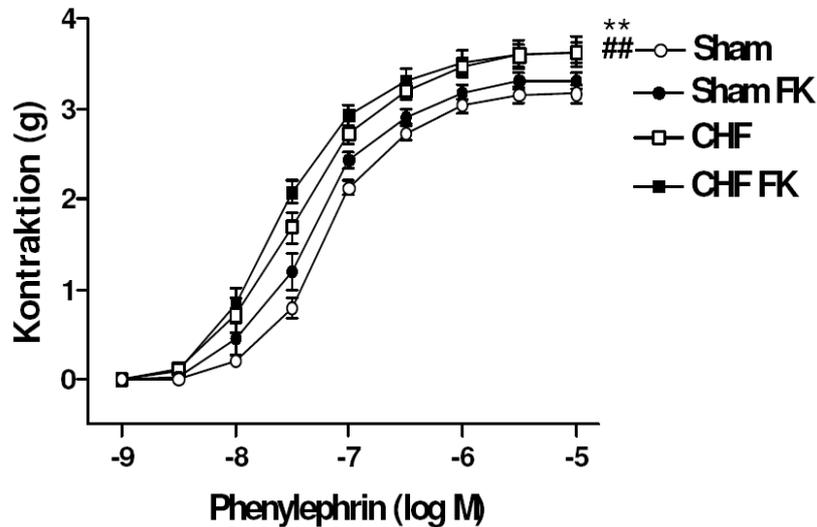
Dies gilt auch für die Kontraktion auf Phenylephrin 1  $\mu$ M. Es konnte eine vergleichbare Vorkontraktion bei den Tieren durchgeführt werden, so dass keine Beeinflussung der Relaxationskurven nach Gabe des Vasokonstriktors vorlag (Abb.30).



**Abb.30:** Kontraktion auf Phenylephrin in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Isolierte Aortenringe wurden mit Phenylephrine 1  $\mu$ M maximal kontrahiert nach Vorinkubation mit Fractalkine (FK, 1  $\mu$ g/ml, 2h). Einzelwerte + Mittelwerte

## ERGEBNISSE

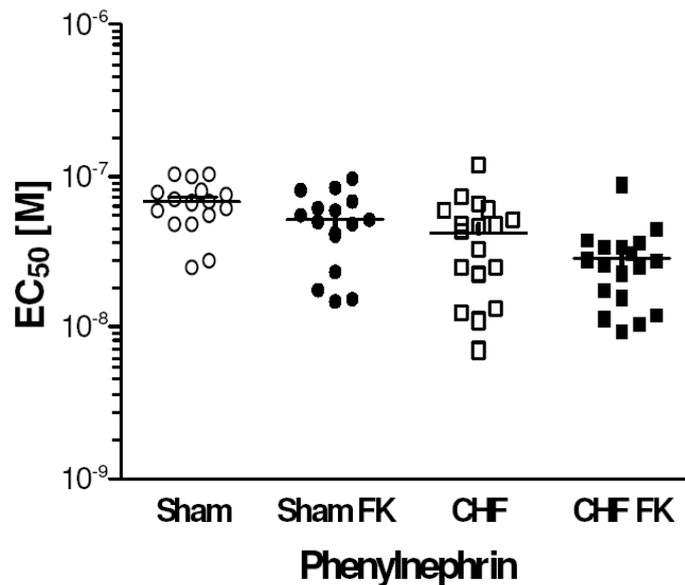
Nach Gabe von Phenylephrin in aufsteigenden Konzentrationen zeigten die CHF-Tiere eine stärkere Kontraktion bei entsprechender Konzentration als die Sham-Tiere. Eine Inkubation mit Fractalkine führt zu einer früheren Kontraktion sowohl der CHF-Tiere als auch der Sham-Tiere (Abb.31).



**Abb.31:** Phenylephrin-induzierte Kontraktion der Aortenringe Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Isolierte Aortenringe wurden nach Vorinkubation mit Fractalkine (FK, 1µg/ml, 2h) mit Phenylephrin in aufsteigender Konzentration kontrahiert. Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 8 Tieren, \*\* = p<0.01 vs. Unstimuliert, ## = p<0.01 vs. Sham

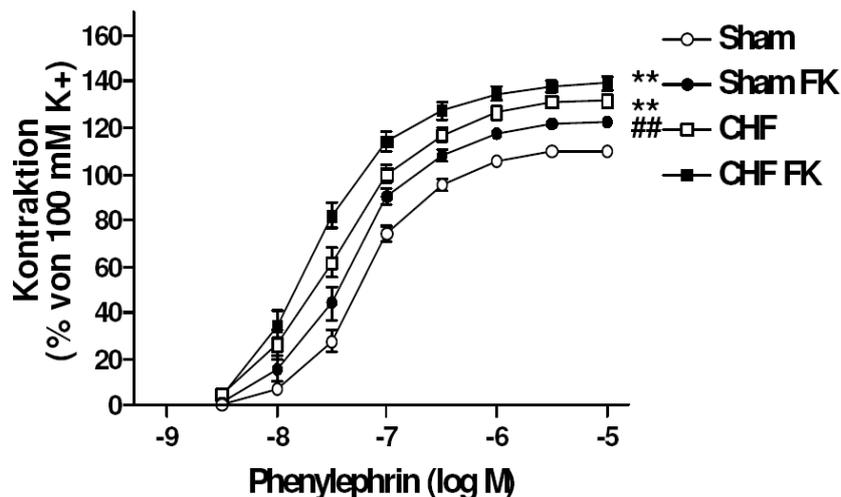
Dieser Trend wird noch einmal deutlicher, wenn man die Konzentration für einen halbmaximalen Effekt ( $EC_{50}$ ) betrachtet. Nach Fractalkine-Inkubation benötigen die CHF-Tiere eine etwas geringere Konzentration an Phenylephrin für eine halbmaximale Kontraktion. Auch die Sham-Tiere zeigten einen Trend zu einer solchen Beeinflussung, wenn auch in geringeren Ausmaß (Abb.32).

## ERGEBNISSE



**Abb.32:** Phenylephrin-induzierte Kontraktion der Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Konzentration an ACh, die zum Erreichen der halbmaximalen Relaxation ( $EC_{50}$ ) nötig war. Einzelwerte + Mittelwerte

Wenn man die Phenylephrin-induzierte Kontraktion nun noch auf das Ansprechen auf eine Rezeptor-unabhängige Depolarisation normalisiert, so zeigt sich dieser Effekt von Fractalkine auf die Kontraktion von Aortenringen von CHF- und Sham-Tieren noch deutlicher. Nach Inkubation mit Fractalkine kontrahierten die CHF-Tiere und auch die Sham-Tiere stärker als ohne Inkubation (Abb.33).

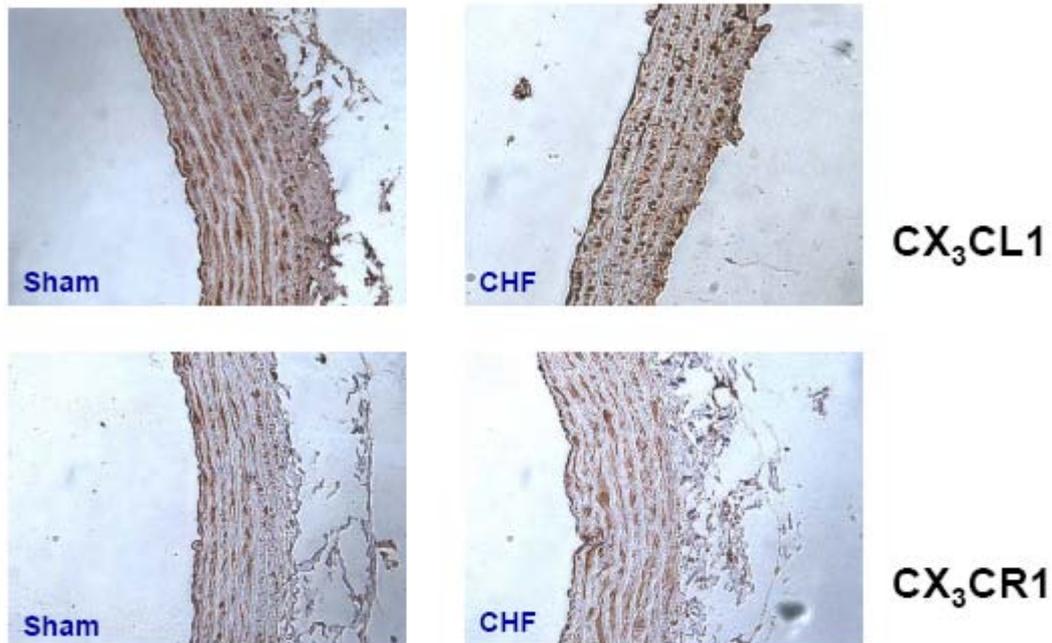


**Abb.33:** Phenylephrin-induzierte Kontraktion der Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Isolierte Aortenringe wurden nach Vorinkubation mit Fractalkine (FK, 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2h) mit Phenylephrin in aufsteigenden Konzentrationen kontrahiert. Dargestellt als Prozentsatz der maximalen Kontraktion auf  $K^+$  100 mM. Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 8$  Tieren, \*\* =  $p < 0.01$  vs. Unstimuliert, ## =  $p < 0.01$  vs. Sham

## ERGEBNISSE

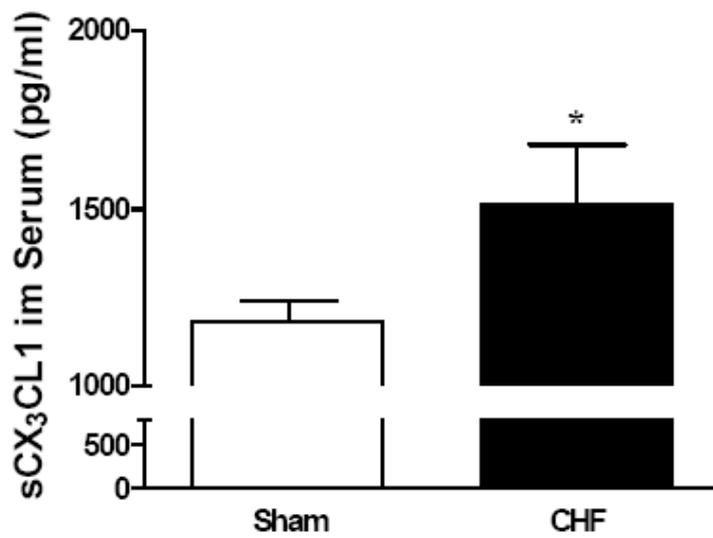
---

Mittels immunhistochemischer Färbung wurde die Expression von Fractalkine ( $CX_3CL1$ ) sowie seines Rezeptors ( $CX_3CR1$ ) in der Aorta von CHF- und Sham-Tieren dargestellt (Abb. 34), da eine Expression des Rezeptors die Voraussetzung für die Wirkung des Liganden ist.

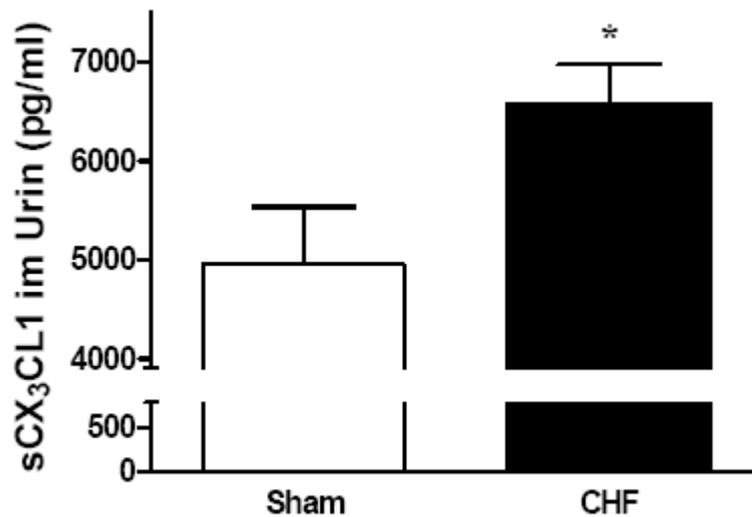


**Abb. 34:** Immunhistochemischer Nachweis des Fractalkine-Liganden ( $CX_3CL1$ ) und des Fractalkine-Rezeptors ( $CX_3CR1$ ) in der Aorta von CHF- und Sham-Tieren: In der oberen Bildreihe ist die Expression des Liganden bei Sham- und CHF-Tieren zu sehen. In der unteren Reihe ist der Rezeptor zu sehen. Bilder in 20facher Vergrößerung

Eine funktionelle Relevanz hätten die oben beschriebenen Effekte (Verstärkung der Endotheldysfunktion bei CHF) von Fractalkine im Falle einer erhöhten Bildung des Liganden  $CX_3CL1$ . Mittels ELISA wurde die Serum-Konzentration (Abb.35) sowie die Urin-Konzentration (Abb.36) von Fractalkine bei Sham- und CHF-Tieren bestimmt. Hier zeigten die CHF-Tiere einen signifikant höheren Fractalkine-Spiegel im Serum und Urin.



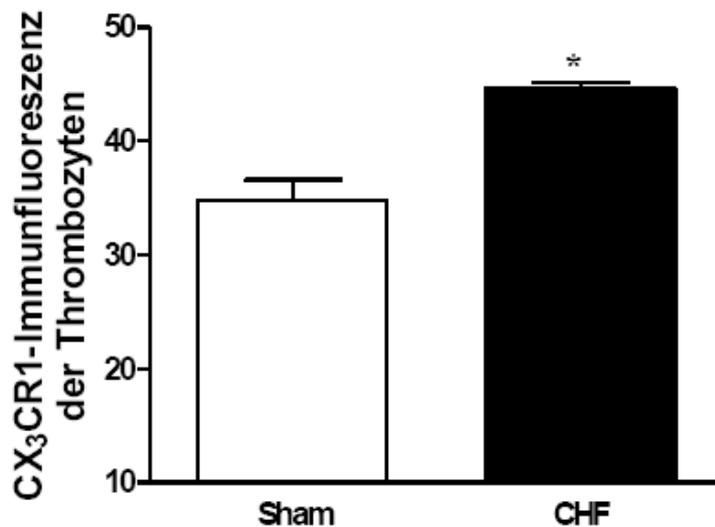
**Abb.35:** Serum-Konzentration von gelösten CX<sub>3</sub>CL1 bei Sham-operierten und herzinsuffizienten (CHF) Ratten: Mittels ELISA konnte die Konzentration von sCX<sub>3</sub>CL1 im Serum bestimmt werden. Mittelwerte ± SEM von n = 10 Tieren, \* = p<0.05 vs. Sham



**Abb.36:** Urin-Konzentration von sCX<sub>3</sub>CL1 bei Sham-operierten und herzinsuffizienten (CHF) Ratten: Mittels ELISA konnte die Konzentration von sCX<sub>3</sub>CL1 im Urin bestimmt werden. Mittelwerte ± SEM von n = 10 Tieren, \* = p<0.05 vs. Sham

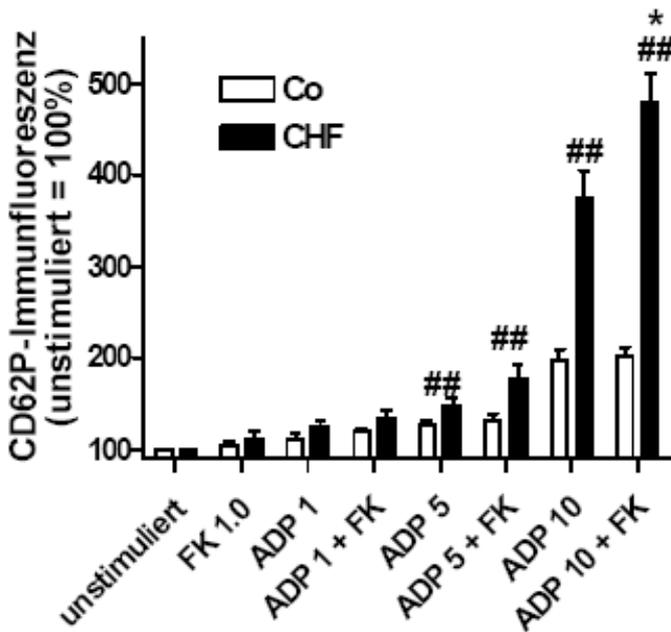
1.2 Thrombozyten

Da Fractalkine zusätzlich zur Induktion einer Endotheldysfunktion<sup>177</sup> auch Thrombozyten aktiviert und zu deren Degranulation führt<sup>166;176</sup>, wurde zunächst die Expression von CX<sub>3</sub>CR1 auf der Oberfläche von Thrombozyten von CHF- und Sham-Tieren untersucht (Abb.37).



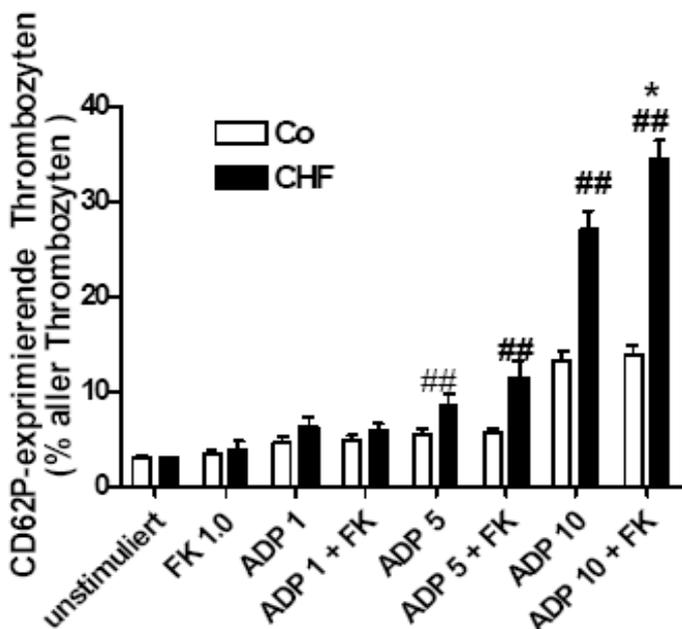
**Abb.37:** Expression des CX<sub>3</sub>CR1-Rezeptors auf der Oberfläche von Thrombozyten der CHF- und Sham-Tiere: Die Expression des Fractalkine-Rezeptors (CX<sub>3</sub>CR1) wurde mittels Durchflusszytometrie auf der Thrombozytenoberfläche gemessen. Mittelwerte ± SEM von n = 8 Tieren, \* = p<0.05 vs. Sham

Die Thrombozyten der CHF-Tieren zeigten in der Durchflusszytometrie eine gesteigerte Reaktivität auf ansteigende Dosen von ADP (1, 5, 10 µM) gegenüber den Sham-Tieren. Bei einer Kostimulation mit Fractalkine wiesen die Thrombozyten von CHF-Tieren eine signifikant erhöhte P-Selektin-Expression nach ADP-Stimulation mit 10 µM auf. Die alleinige Stimulation mit Fractalkine ohne ADP hatte keinen Effekt auf die CD62P-Expression der Thrombozyten von CHF-Tieren und Sham-Tieren. In der folgenden Abbildung ist die mittlere Immunfluoreszenz für P-Selektin aller Thrombozyten dargestellt (Abb.38).



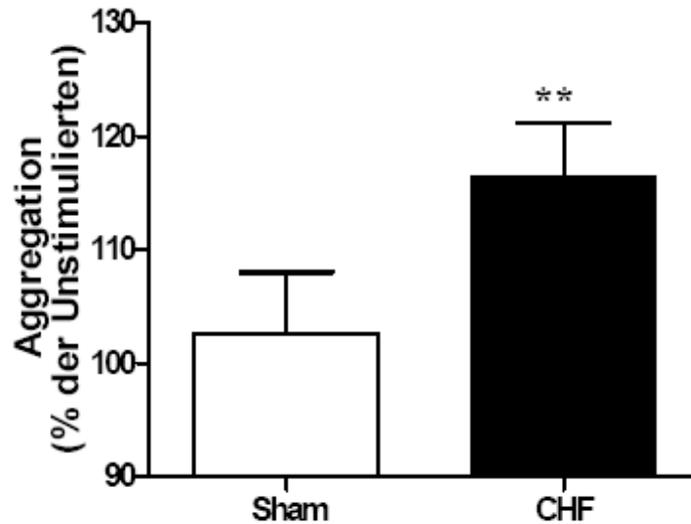
**Abb.38:** ADP-induzierte P-Selektin (CD62P)-Expression auf Thrombozyten Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Einfluss der Fractalkine-Kostimulation auf die P-Selektin-Expression auf Thrombozyten nach Stimulation mit ADP (1, 5, oder 10  $\mu$ M, 10 min.). Mittlere Fluoreszenz  $\pm$  SEM von n = 8 Tieren, \* = p<0.05 vs. Kein Fractalkine, <sup>##</sup> = p<0.01 vs. Sham

Zur Verdeutlichung, dass es sich bei dem oben beschriebenen Effekt nicht nur um einen Effekt in einer sensitiveren Thrombozytensubpopulation handelte, ist in der folgenden Abbildung der Anteil der P-Selektin (CD62P)-positiven Zellen aller Thrombozyten dargestellt. Es konnte wiederum eine signifikante Erhöhung bei den CHF-Tieren nach ADP-Stimulation mit 10  $\mu$ M und Kostimulation mit Fractalkine gezeigt werden (Abb.39).



**Abb.39:** ADP-induzierte P-Selektin (CD62P)-Expression auf Thrombozyten Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Einfluss der Fractalkine-Kostimulation auf die P-Selektin-Expression auf Thrombozyten nach Stimulation mit ADP (1, 5, oder 10  $\mu$ M, 10 min.). Anteil der P-Selektin-positiven Thrombozyten  $\pm$  SEM von n = 8 Tieren, \* = p<0.05 vs. Kein Fractalkine, <sup>##</sup> = p<0.01 vs. Sham

In der Aggregometrie wurden die Thrombozyten der CHF-Tiere und Sham-Tiere mit einer ADP-Konzentration stimuliert, welche per se eine 30-40%-ige Aggregation auslöste. Nach Inkubation mit Fractalkine (1 µg/ml, 5 min.) wurde diese Aggregation bei den CHF-Tieren signifikant verstärkt, während dieser Effekt bei Thrombozyten von Sham-Tieren nicht beobachtet wurde (Abb.40).

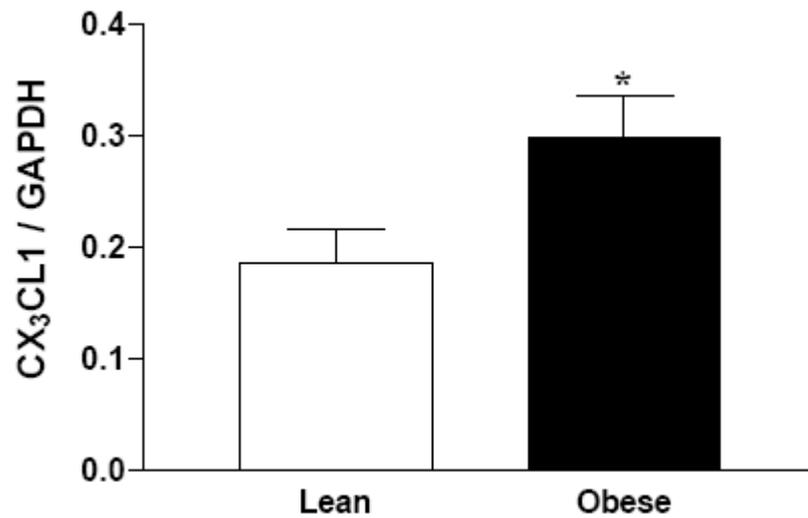


**Abb. 40:** ADP-induzierte Aggregation der Thrombozyten Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten: Einfluss der Fractalkine-Kostimulation auf die Thrombozyten-Aggregation bei Induktion einer 30-40%igen Aggregation mittels ADP. Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 8 Tieren, \*\* = p<0.01 vs. Sham

## **2. Diabetes mellitus Typ 2**

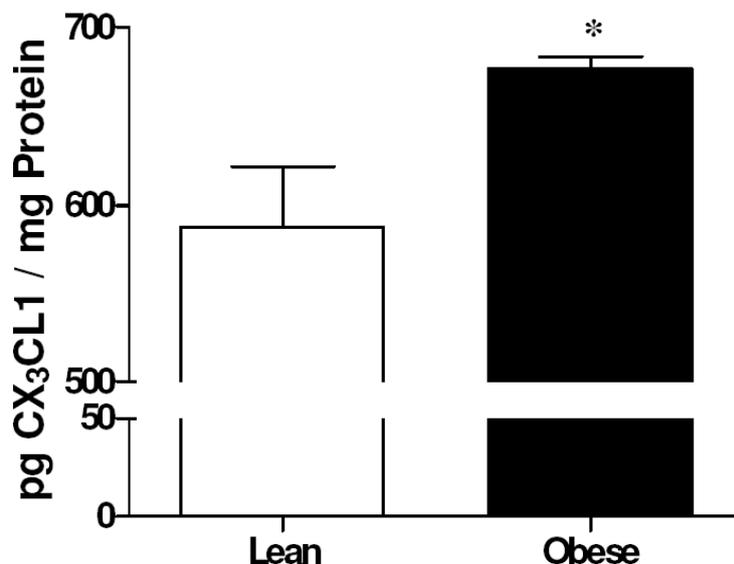
### 2.1 GefäÙe

Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Expression von Fractalkine in der Aorta der Obese- und Lean-Ratten untersucht. Eine signifikant erhöhte Expression von Fractalkine in den Aorten der Obese-Tiere im Vergleich zu den Lean-Tieren wurde deutlich (Abb.41).



**Abb. 41:** Fractalkine-Expression in den Aorten von Obese- und Lean-Ratten: Mittels Western Blot wurde die Fractalkine-Expression in den Aorten von Lean- Ratte gegenüber Obese-Ratten gemessen (normalisiert auf GAPDH-Expression). Mittelwerte  $\pm$  SEM von n=12 Tieren, \*=p<0.05 vs. Lean

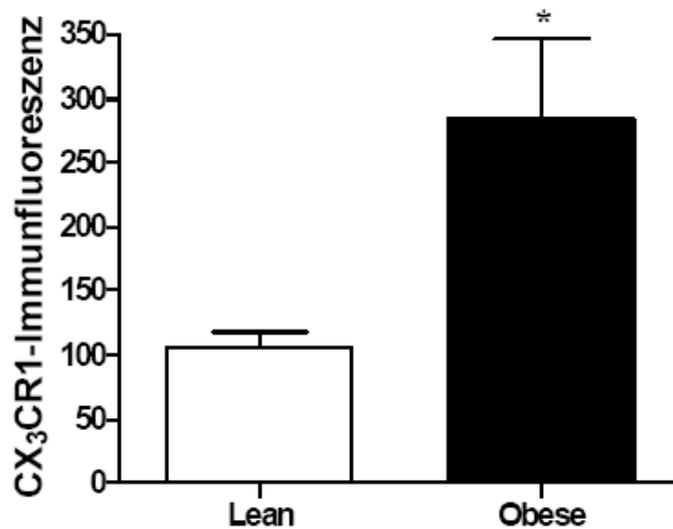
Die Quantifizierung der CX<sub>3</sub>CL1-Expression in der Aorta erfolgte mittels eines Gewebe-ELISA's. Die Obese-Tiere wiesen eine eine höhere Konzentration an Fractalkine (CX<sub>3</sub>CL1) auf (Abb.42).



**Abb.42:** Gewebe-Konzentration von Fractalkine in der Aorta bei Lean- und Obese-Ratten: Mittels ELISA wurde die Konzentration von Fractalkine (CX<sub>3</sub>CL1) in pg / mg Protein bei Lean- und Obese-Ratten bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SEM von n=10 Tieren, \*=p<0.05

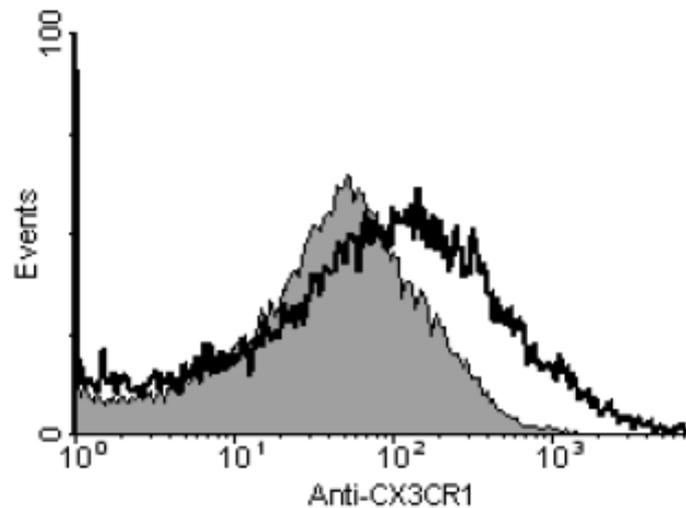
2.2 Thrombozyten

Zunächst wurde ähnlich wie bei den CHF-Tieren die Expression des Fractalkine-Rezeptors (CX<sub>3</sub>CR1) auf der Oberfläche der Thrombozyten von Obese- und Lean-Tieren untersucht. Die Expression konnte mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung des auf der Thrombozyten-Oberfläche exprimierten Fractalkine-Rezeptors bei den Obese-Tieren (Abb.43).



**Abb.43:** Expression des Fractalkine-Rezeptors (CX<sub>3</sub>CR 1) auf Thrombozyten von Lean-und Obese-Ratten: Die Expression des Fractalkine-Rezeptors (CX<sub>3</sub>CR 1) wurde mittels Durchflusszytometrie auf der Thrombozytenoberfläche gemessen. Mittlere Fluoreszenz ± SEM von n = 7-8 Tieren, \*= p<0.05 vs. Lean

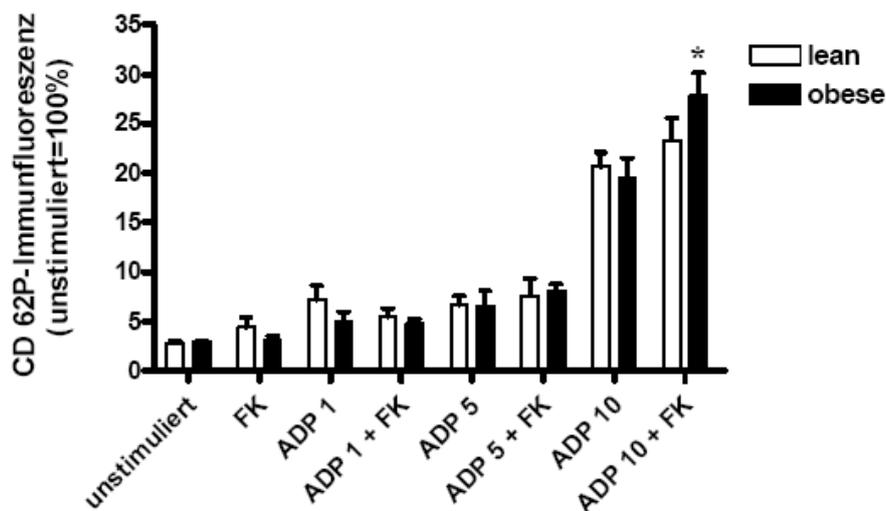
Das zweite Diagramm zur Expression des Fractalkine-Rezeptors zeigte eine typische durchflusszytometrische Kurve mit gezählten Events gegenüber Anti-CX<sub>3</sub>CR1 auf der Thrombozytenoberfläche bei den Obese-Tieren. Hier wurde auch eine verstärkte Expression von CX<sub>3</sub>CR1 auf der Thrombozytenoberfläche von ZDF-Ratten deutlich (Abb.44).



**Abb.44:** Expression des Fractalkine-Rezeptors (CX<sub>3</sub>CR1) auf Thrombozyten von Lean- und Obese-Ratten: Die Expression des Fractalkine-Rezeptors (CX<sub>3</sub>CR1) wurde mittels Durchflusszytometrie auf der Thrombozyten-Oberfläche gemessen (gefüllte Kurve = Lean; offene Kurve = Obese)

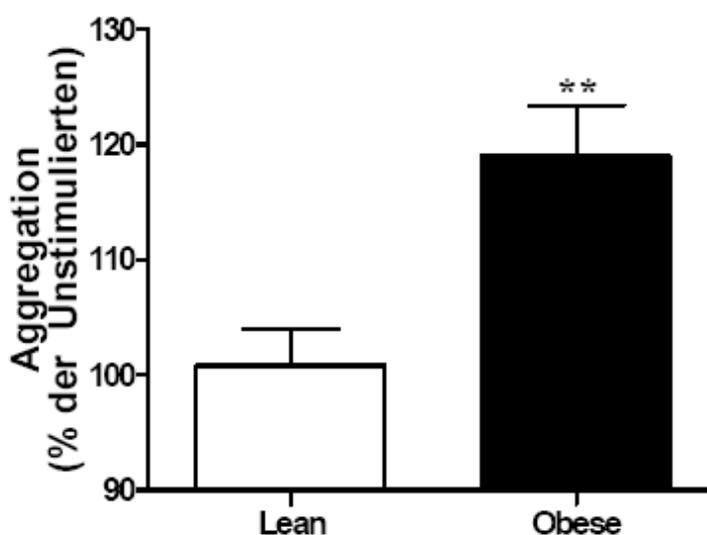
Nachdem auch bei den Obese-Thrombozyten die CX<sub>3</sub>CR1-Expression erhöht war, wurden die Thrombozyten der Lean- und Obese-Ratten nach oben beschriebenem Protokoll vor der ADP-Stimulation mit Fractalkine bzw. Puffer inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach der ADP-induzierten Stimulation die Expression von P-Selektin gemessen. Bei einer Konzentration von ADP 10 µM war der Unterschied signifikant. Die Thrombozyten der ZDF-Tiere zeigten eine durch Fractalkine signifikant verstärkte P-Selektin-Expression bei ADP 10 µM gegenüber den Lean-Tieren. Ein alleiniger Effekt von Fractalkine ohne ADP-Stimulation auf die CD62P-Expression wurde nicht deutlich (Abb.45).

## ERGEBNISSE



**Abb.45:** Effekt von Fractalkine auf ADP-induzierte P-Selektin (CD62P)-Expression auf Thrombozyten von Lean- und Obese-Ratten: Thrombozyten von Lean- und ZDF-Ratten wurden mit Fractalkine (CX<sub>3</sub>CL1) oder Puffer für 5 min. vor der ADP-induzierten Stimulation inkubiert. P-Selektin (CD62P)-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Mittelwerte ± SEM von n=10-12 Tieren, \* =p<0.05 vs. Lean

Auch in der Aggregometrie zeigte sich ein Unterschied nach Fractalkine-Inkubation. Das PRP (300.000 Thrombozyten/μl) von Obese- und Lean-Ratten wurde vor der ADP-induzierten Aggregation mit Fractalkine fünf Minuten inkubiert. Es wurde dann die für eine 40%-Aggregation nötige ADP-Konzentration hinzugegeben. Die Obese-Tiere zeigten nach Inkubation mit Fractalkine eine signifikant stärkere Aggregation gegenüber den Lean-Tieren auf dieselbe ADP-Konzentration (Abb.46).

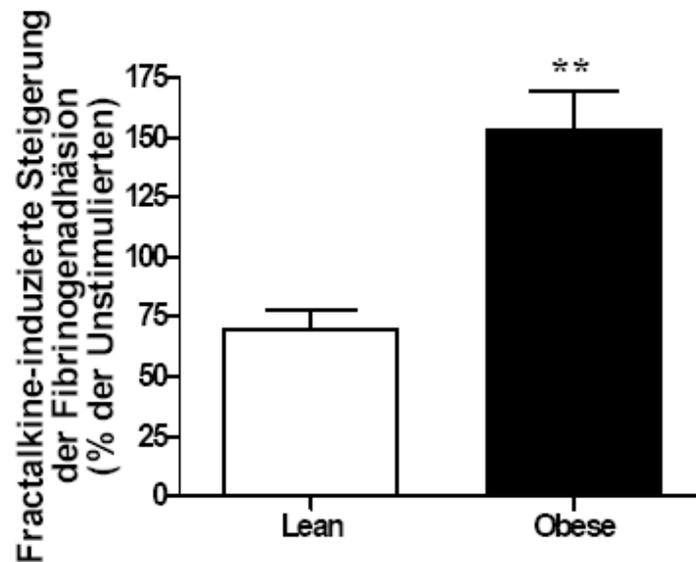


**Abb.46:** Effekt von Fractalkine-Kostimulation auf die ADP-induzierte Thrombozyten-Aggregation: PRP (300.000/μl) von Lean- und Obese-Ratten wurde mit Fractalkine oder Puffer (5 min.) vor der ADP-induzierten Aggregation inkubiert. ADP wurde so titriert dass die nicht Fractalkine-inkubierten Proben eine 40%-ige Aggregation erreichen. Mittlere Aggregation ± SEM von n = 6-9 Tieren, \*\* = p<0.01 vs. Lean

## ERGEBNISSE

---

In der Adhäsions-Flusskammer wurde der Effekt von Fractalkine auf die thrombozytäre Adhäsion an Fibrinogen unter arteriellen Scherkräften (1000/s) untersucht. Die Thrombozyten der Obese-Ratten zeigten nach Stimulation mit Fractalkine eine signifikante Verstärkung der Adhäsion an Fibrinogen im Vergleich zu den Thrombozyten der Lean-Tieren (Abb.47).



**Abb.47:** Effekt von Fractalkine auf Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen bei Lean- und Obese-Ratten: Thrombozyten von Lean- und Obese-Ratten wurden in der Flusskammer mit Fractalkine stimuliert. Fractalkine-induzierte Verstärkung der Fibrinogenadhäsion als % der Unstimulierten  $\pm$  SEM von n = 5 Tieren, \*\* = p < 0.01

### IV. DISKUSSION

In den Tiermodellen für Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus wurde die Wirkung von Fractalkine auf Thrombozyten und Gefäßendothel untersucht. Beiden Modellen ist eine endotheliale Dysfunktion und eine vermehrte Thrombozytenaktivierung gemeinsam, die wiederum mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität einhergeht.

Endotheldysfunktion ist ein frühes charakteristisches Merkmal der Atherogenese. Verschiedene Faktoren führen zu einer Dysbalance zwischen NO und Prostazyklin auf der einen Seite und Superoxidanionen auf der anderen Seite. Diese Veränderungen führen zu einem erhöhten oxidativen Stress und einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit.<sup>52</sup> Die verminderte NO-Verfügbarkeit resultiert in einer reduzierten Gefäßrelaxation und einer erhöhten Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen. Außerdem kommt es durch die verminderte NO-Verfügbarkeit im Gefäßlumen zu einer Herabsetzung der endogenen Thrombozyten-Inhibition.<sup>47</sup> Die Thrombozyten werden empfindlicher für Aktivierung und das entzündlich veränderte Endothel exprimiert vermehrt Adhäsionsmoleküle und synthetisiert vermehrt Thrombozyten-Agonisten.<sup>106;107</sup> Aktivierte Thrombozyten adhären daraufhin am Endothel und veranlassen ein Rekrutment von Leukozyten. Durch Adhäsion am entzündlich veränderten Endothel und der Interaktion mit Thrombozyten sind Leukozyten in der Lage, die Gefäßwand zu infiltrieren und zu transmigrieren, um weitere entzündliche Reaktionen im Endothel zu erleichtern und damit die Atherogenese zu fördern.<sup>4</sup> Eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Thrombozyten, Leukozyten und Endothel spielen Chemokine. Chemokine sind eine große Familie von kleinen Proteinen, die eine Chemotaxis von Zellen induzieren. Das Chemokine Fractalkine ist durch spezielle Mechanismen besonders in der Lage, aktivierte Thrombozyten an das geschädigte Endothel zu binden.<sup>166</sup>

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass Fractalkine zu einer Rekrutierung von Leukozyten an inflammiertem Endothel unter arteriellen Flussbedingungen führt und direkten Einfluss auf Thrombozyten im Sinne einer verstärkten Aktivierung hat.<sup>166;176</sup> Diese durch Fractalkine beeinflusste verstärkte Aktivierung der Thrombozyten, als Marker die verstärkte P-Selektin-Expression, spielen eine Schlüsselrolle im chronischen Prozess der Atherosklerose. Eine weitere frühere Arbeit hat gezeigt, dass Fractalkine in der Lage ist, eine endotheliale Dysfunktion durch Generation von Superoxidanionen mit daraus resultierendem NO-Mangel zu induzieren.<sup>177</sup>

In Mäusen mit einem defizienten Fractalkine-Rezeptor konnte eine signifikante Reduktion der Progression atherosklerotischer Läsionen beobachtet werden.<sup>154;161</sup> Dies legt nahe zu untersuchen, welche Effekte Fractalkine bei Ratten mit Diabetes mellitus hat, da es bei Diabetes mellitus schon zu sehr frühen atherosklerotischen Läsionen kommt.<sup>23</sup>

Die jetzt vorgestellten Ergebnisse untermauern die herausragende Bedeutung von Fractalkine nicht nur bei Atherosklerose, sondern auch bei Herzinsuffizienz. Aus diesem Grund wurde die Wirkung von Fractalkine auf Thrombozyten und Gefäße in diesen beiden Modellen untersucht.

Bei herzinsuffizienten Ratten war als Zeichen der schon bestehenden Endotheldysfunktion bereits vor Inkubation mit Fractalkine die endothel-abhängige Gefäßrelaxation nach Gabe von Acetylcholin vermindert.<sup>48</sup> Diese wurde durch Fractalkine-Einwirkung noch einmal signifikant reduziert. Schon die Sham-Tiere zeigten nach Fractalkine-Inkubation eine neu aufgetretene verschlechterte Relaxation im Sinne einer durch Fractalkine induzierten Endotheldysfunktion. Dieser Effekt auf gesunde Tiere ist bereits beschrieben und wird vornehmlich durch eine vermehrte vaskuläre Superoxidbildung bedingt.<sup>177</sup>

Durch die so verminderte Freisetzung von NO bedingt zeigte sich ausserdem eine Verstärkung der Kontraktion durch Fractalkine bei CHF- und Sham-Tieren. Da die CHF-Tiere per se schon eine stärkere Kontraktion aufweisen, kann auch dies als Zeichen der vermehrten Endotheldysfunktion gewertet werden. Problematisch ist diese verstärkte Kontraktion gerade bei Atherosklerose wegen möglicher thromboembolischer Komplikationen. Durch eine gesteigerte Kontraktion eines atherosklerotisch veränderten Gefäßes kann es zu einer Plaque-Ruptur oder einer Ischämie des nachfolgenden Gefäßabschnittes kommen.

Diese entscheidende Rolle von Fractalkine bei Herzinsuffizienz wurde weiter unterstützt durch die immunhistochemischen Ergebnisse. Es zeigte sich eine deutliche Expression des Fractalkine-Rezeptors und seines Liganden Fractalkine in der Aorta von CHF-Tieren. Daher könnte eine langfristig erhöhte Fractalkine-Konzentration auf das Endothel bei Herzinsuffizienz eingewirkt haben. Die höhere Fractalkine-Konzentration im Serum und Urin bei den CHF-Tieren gegenüber den Sham-Tieren bestätigt diesen Verdacht und zeigt nun auch die Relevanz der oben beschriebenen Effekte durch Fractalkine bei Herzinsuffizienz.

Neben Induktion einer Endotheldysfunktion ist Fractalkine in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren und ihre Aggregation zu verstärken<sup>166;176</sup>. Bei den Thrombozyten der CHF-Tiere

zeigte sich eine signifikant höhere Expression des Fractalkine-Rezeptors (CX<sub>3</sub>CR1) auf der Thrombozyten-Oberfläche.

Die Thrombozyten bei CHF haben per se eine höhere Aktivität und eine verminderte endogene Inhibition<sup>82</sup>, was wiederum zu einer vermehrten Anfälligkeit gegenüber aktivierenden Substanzen wie ADP führt. Die CHF-Tiere weisen eine erhöhte Expression des Fractalkine-Rezeptors auf ihrer Thrombozytenoberfläche auf. Dies führt zu einer größeren Angriffsfläche für Fractalkine. Dementsprechend kam es nach Kostimulation mit Fractalkine und ADP bei den Thrombozyten der CHF-Tiere zu einer signifikant erhöhten Thrombozytenreaktivität. Die Aktivität der Thrombozyten der Sham-Tiere war durch Fractalkine nicht-beeinflussbar. Fractalkine alleine hatte keinen Effekt auf die Aktivität von Thrombozyten der CHF-Tiere oder Sham-Tiere.

Zusammengefasst kann man sagen, dass im Serum und Urin der CHF-Tieren eine höhere Konzentration löslichen Fractalkines als bei den Sham-Tieren messbar war. In den Gefäßen der herzinsuffizienten Tieren zeigt sich eine erhöhte Expression von Fractalkine. Die durch Fractalkine induzierte Endotheldysfunktion führt zu einer verminderten Freisetzung des endogenen Thrombozyteninhibitors NO, folglich sind die Thrombozyten der CHF-Tiere reaktiver. Die Thrombozyten der CHF-Tieren weisen zusätzlich jedoch eine erhöhte Expression des Fractalkine-Rezeptors auf, weshalb sie deshalb auch noch empfänglicher für das bei CHF erhöht zirkulierende Fractalkine sind. Dies führt bei den Thrombozyten der CHF-Tiere zu einer signifikant erhöhten Aktivität. Folglich verstärkt Fractalkine die Endotheldysfunktion und Thrombozytenaktivierung bei Herzinsuffizienz.

Die diabetischen ZDF-Obese-Ratten zeigten eine signifikant erhöhte Fractalkine-Expression in ihrer Aorta im Vergleich zu den nicht-diabetischen Lean-Tieren. Auch in diesem Modell wiesen die Thrombozyten der erkrankten (Obese-)Tiere eine signifikant höhere Fractalkine-Rezeptor-Expression auf als die der Lean-Ratten. Dadurch lässt sich ähnlich wie bei den herzinsuffizienten Ratten die vermehrte Reaktion der Obese-Ratten auf Fractalkine erklären. Eine Kostimulation mit Fractalkine führte auch in diesem Modell zu einer signifikant erhöhten Aktivierung der Thrombozyten durch ADP. Die Thrombozyten der Lean-Ratten sind kaum beeinflusst in ihrer Aktivität durch eine Fractalkine-Kostimulation. Auch hier kann man also bei einer bereits bestehenden erhöhten Thrombozytenaktivierung den Effekt von

Fractalkine im Sinne einer Verstärkung der ADP-induzierten Aktivierung beobachten. Jedoch ist dieser Effekt auch hier nicht allein durch Fractalkine, sondern nur in Anwesenheit von ADP auslösbar. Durch eine Kostimulation mit Fractalkine kommt es bei den Obese-Tieren auch zu einer Verstärkung der Aggregation auf ADP.

Ein weiterer entscheidender Schritt der Atherogenese ist unter anderem die Adhäsion von Thrombozyten am Endothel. Durch den Einfluss von Fractalkine wird die Adhäsion von Thrombozyten der Obese-Ratten an membran-gebundenem Fibrinogen erhöht. Dies verdeutlicht die Bedeutung von Fractalkine: aktivierte Thrombozyten haben per se eine vermehrte Adhäsionsfähigkeit an Endothelzellen<sup>196</sup>. Durch Fractalkine wird dieser für die Atherosklerose entscheidender Schritt noch gesteigert.

Zusammengefasst zeigte sich in den aortalen Gefäßen eine gesteigerte Fractalkine-Expression bei Obese-Ratten. Weiter ist eine verstärkte Aggregation und Thrombozyten-Aktivierung nach Stimulation mit Fractalkine bei den Obese-Tieren nachweisbar. Die Thrombozyten von ZDF-Tieren weisen eine erhöhte Anzahl von Fractalkine-Rezeptoren auf. Durch Fractalkine-Stimulation lässt sich eine verstärkte Fibrinogen-Adhäsion der Thrombozyten von Obese-Tieren induzieren.

Bei unseren zwei Modellen konnten wir also davon ausgehen, dass wie in der Einleitung beschrieben bereits eine Endotheldysfunktion und eine vermehrte Thrombozytenaktivierung bestand.<sup>48;82;106</sup> Die Wirkung des Chemokins Fractalkine hat in den Modellen zu einer Verstärkung zum einen der endothelialen Dysfunktion zum anderen der Thrombozytenaktivierung geführt. Interessanterweise zeigten auch die Kontrolltiere im Herzinsuffizienz-Modell eine eingeschränkte Endothelfunktion nach Fractalkine-Gabe. Dies verdeutlicht, dass Fractalkine nicht nur auf schon geschädigtes Endothel wirkt, sondern auch auch völlig gesundes Endothel in seiner Funktion einschränken kann. Bei schon geschädigtem Endothel ist der Funktionsverlust jedoch noch kritischer, da die Funktionseinbuße aggraviert wird.

Bei der Wirkung von Fractalkine auf Thrombozyten scheint es kaum eine Beeinflussung auf die Thrombozyten von Kontrolltieren zu geben - weder im CHF-Modell noch im ZDF-Modell. Das zeigt, dass Fractalkine vor allem auf die Thrombozyten, die schon aktiviert sind, wirkt. Es scheint bei einer der Fractalkine-induzierten Thrombozytenaktivierung zu einer Hochregulation der Fractalkine-Rezeptoren zu kommen und somit bietet sich eine weitere Angriffsfläche für Fractalkine am aktivierten Thrombozyten, was wiederum zu einer

vermehrten Thrombozytenaktivierung führt. Man kann vermuten, dass dies wie ein Circulus vitiosus wirkt.

Interessanterweise hat Fractalkine in den zwei Modellen zu einer vermehrten Thrombozytenaktivierung geführt, jedoch war immer eine Kostimulation mit ADP notwendig. Dies passt zu dem in der Einleitung beschriebenen Modell des Fractalkine-Rezeptors. ADP bewirkt mittels zweier Rezeptoren eine Thrombozytenaktivierung (P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>). Fractalkine benutzt teilweise denselben Signalweg zur Thrombozytenaktivierung wie ADP (P2Y<sub>12</sub>), da jedoch auch ADP nicht über P2Y<sub>12</sub> alleine wirken kann, geht man nach dem Modell des Fractalkine-Rezeptors davon aus, dass die Aktivierung der Thrombozyten über diesen G-Protein-gekoppelten Fractalkine-Rezeptor bedingt ADP-abhängig ist, und aus diesem Grund die alleinige Gabe von Fractalkine wirkungslos bleibt. Auch kann eine alleinige Aktivierung von P2Y<sub>12</sub> durch ADP bei vorheriger Blockade von P2Y<sub>1</sub> keine Thrombozytenaktivierung initiieren, sondern nur eine bestehende verstärken.

Außerdem konnten wir eine gesteigerte Anzahl von Fractalkinerezeptoren auf Thrombozyten von Obese- und CHF-Tieren nachweisen, was zu der vermehrten Aktivierung durch Fractalkine passt.

Fractalkine scheint gerade bei schon bestehender endothelialer Dysfunktion und Thrombozytenaktivierung wirksam zu sein. Dies würde Fractalkine eine herausragende Rolle bei schon manifester oder sich entwickelnder Atherosklerose zuschreiben. Jedoch konnten wir bei den ZDF-Tieren per se schon eine gesteigerte Expression von Fractalkine in den aortalen Gefäßen nachweisen. Dies könnte darauf hindeuten, dass Fractalkine auch schon bei frühen Prozessen der Atherogenese oder gar in präatherosklerotischen Stadien eine wichtige Rolle spielt.

Bei bestehender endothelialer Dysfunktion und Thrombozytenaktivierung zeigt sich eine gesteigerte Empfindlichkeit für Fractalkine, was zum Beispiel durch eine Hochregulation von Fractalkine-Rezeptoren erklärbar ist, wie wir sie im Modell des Typ 2-Diabetes und bei Herzinsuffizienz auf Thrombozyten nachweisen konnten.

Fractalkine führt in einem Modell für Herzinsuffizienz sowie für Diabetes zu einer Verstärkung der endothelialen Dysfunktion und der Thrombozytenaktivierung führt. Durch eine gesteigerte vaskuläre Expression von Fractalkine sowohl bei Herzinsuffizienz als auch

bei Diabetes mellitus kommt es zu einer weiteren Verstärkung des negativen Einfluss von Fractalkine auf Gefäße und Thrombozyten.

CX<sub>3</sub>CL1/ CX<sub>3</sub>CR1 könnte aus diesem Grund ein neuer und vielversprechender Angriffspunkt für Medikamente in der Therapie von Gefäßkrankheiten sein. Man könnte sich vorstellen, dass eine Blockierung des Fractalkine-Rezeptors zu einer verminderten Formation von atherosklerotischen Läsionen und einer abgeschwächten Thrombozytenaktivierung führen könnte, was wiederum thromboembolische Komplikationen wie Myokardinfarkte, Schlaganfälle oder pAVK verhindern könnte.

Weiter zeigte sich, dass die kardiovaskuläre Expression von Fractalkine nicht nur bei Atherosklerose verstärkt ist, sondern auch bei Herzinsuffizienz. Daher könnte man sich Fractalkine als bedeutsamer therapeutischer Ansatzpunkt in der Therapie der Herzinsuffizienz vorstellen, um deren weitere Progression und Komplikationen einzuschränken.

### **V. ZUSAMMENFASSUNG**

Diabetes mellitus und Herzinsuffizienz gehen mit einer stark erhöhten kardiovaskulären Morbidität einher. Bei beiden Krankheiten besteht eine Endotheldysfunktion und eine verstärkte Thrombozytenaktivierung. Daraus resultieren wiederum frühe atherosklerotische Läsionen bzw. eine Progression der Herzinsuffizienz.

Das Chemokin Fractalkine wurde als Risikofaktor für eine schwere koronare Herzerkrankung beschrieben. Der Fractalkine-Rezeptor ist mit einem erhöhten Atherosklerose-Risiko assoziiert. Auch ist Fractalkine in der Lage, eine Endotheldysfunktion sowie eine Thrombozytenaktivierung zu induzieren bzw. zu verstärken. Es lag daher nahe, den Effekt von Fractalkine auf Endothel und Thrombozyten von Ratten mit Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus zu untersuchen.

Die Expression von Fractalkine wie auch seines Rezeptors war in der Aorta bei Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus gesteigert. Auch das lösliche Fractalkine im Serum war bei beiden Krankheitsmodellen erhöht. Auf der Thrombozytenoberfläche zeigte sich eine stärkere Fractalkine-Rezeptor-Expression. Durch Stimulation mit Fractalkine konnte bei beiden Modellen eine signifikant akzelerierte Thrombozytenaktivierung erzielt werden. Bei den herzinsuffizienten Tieren zeigte sich eine signifikante Verschlechterung der schon bestehenden endothelialen Dysfunktion nach Inkubation mit Fractalkine. Deshalb kann man davon ausgehen, dass Fractalkine eine bedeutende Rolle sowohl für die Atherosklerose bei Diabetes mellitus als auch bei Herzinsuffizienz spielt. Man könnte sich nun Fractalkine und seinen Rezeptor als einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt für die Verhinderung der Progression sowohl atherosklerotischer Läsionen als auch der Inflammation bei Herzinsuffizienz vorstellen. Dadurch wäre eine Reduzierung weiterer atherosklerotischer Komplikationen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall eventuell möglich.

**VI. LITERATURVERZEICHNIS**

1. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med.* 1997;337:1360-1369.
2. Breslow JL. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat Med.* 1997;3:600-601.
3. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997;349:1436-1442.
4. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
5. Lip GY, Gibbs CR, Beevers DG. ABC of heart failure: aetiology. *BMJ.* 2000;320:104-107.
6. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, Sutton GC. Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J.* 1999;20:421-428.
7. Rutishauser W, Hess O. Herz und Koronarkreislauf. In: Klinische Pathophysiologie. Siegenthaler W, ed. 2006. Thieme, Stuttgart; New York.
8. Murray-Thomas T, Cowie MR. Epidemiology and clinical aspects of congestive heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2003;4:131-136.
9. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol.* 1993;22:6A-13A.
10. Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, Grobbee DE. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J.* 1997;18:208-225.
11. McMurray JJ, Petrie MC, Murdoch DR, Davie AP. Clinical epidemiology of heart failure: public and private health burden. *Eur Heart J.* 1998;19 Suppl P:9-16.
12. MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, Chalmers JW, Boyd J, Finlayson A, Redpath A, Pell JP, McMurray JJ. Evidence of improving prognosis in heart failure: trends in case fatality in 66 547 patients hospitalized between 1986 and 1995. *Circulation.* 2000;102:1126-1131.
13. Cowie MR. The prognosis of heart failure: the view from the real world. *Eur Heart J.* 2001;22:1247-1248.
14. Fox KF, Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Gibbs JS, Underwood SR, Turner RM, Poole-Wilson PA, Davies SW, Sutton GC. Coronary artery disease as the cause of incident heart failure in the population. *Eur Heart J.* 2001;22:228-236.
15. Fox KF, Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Poole-Wilson PA, Sutton GC. New perspectives on heart failure due to myocardial ischaemia. *Eur Heart J.* 1999;20:256-262.

16. Packer M. Evolution of the neurohormonal hypothesis to explain the progression of chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1995;16 Suppl F:4-6.
17. Packer M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:248-254.
18. Bauersachs J. Aldosterone antagonism in heart failure: improvement of cardiac remodelling, endothelial dysfunction and platelet activation. *Eur J Clin Invest*. 2004;34:649-652.
19. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:569-582.
20. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999;341:1276-1283.
21. Bristow MR. Myocardial beta-adrenergic receptor downregulation in heart failure. *Int J Cardiol*. 1984;5:648-652.
22. Resnick HE, Shorr RI, Kuller L, Franse L, Harris TB. Prevalence and clinical implications of American Diabetes Association-defined diabetes and other categories of glucose dysregulation in older adults: the health, aging and body composition study. *J Clin Epidemiol*. 2001;54:869-876.
23. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002;287:2570-2581.
24. Silbernagl S. Taschenatlas der Pathophysiologie. 286-290. 2006. Diabetes Mellitus.
25. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 1998;21:1414-1431.
26. Köster I. Ergebnisse der KoDIM-Studie. 2006. Diabetes mellitus.
27. Scherbaum WA. Kohlenhydratstoffwechsel. In: Klinische Pathophysiologie. Siegenthaler W, ed. 2006. Thieme Verlag, Stuttgart; New York.
28. Feskens EJ, Kromhout D. Glucose tolerance and the risk of cardiovascular disease: the Zutphen Study. *J Clin Epidemiol*. 1992;45:1327-1334.
29. 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.
30. Schiebler T. Histologie. 254-261. 2006. Berlin, Springer-Verlag. Gefäße.
31. Henderson AH. Vascular Biology. D.G Julian. 2nd, 45-60. 2006. Saunders. Diseases of the heart.

32. Wight TN. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis*. 1989;9:1-20.
33. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:325-333.
34. Dzau VJ, Gibbons GH, Cooke JP, Omoigui N. Vascular biology and medicine in the 1990s: scope, concepts, potentials, and perspectives. *Circulation*. 1993;87:705-719.
35. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.
36. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*. 1994;330:1431-1438.
37. Gimbrone MA, Jr., Bevilacqua MP, Cybulsky MI. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;598:77-85.
38. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91:3527-3561.
39. Davies MG, Hagen PO. The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg*. 1993;218:593-609.
40. Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:51-60.
41. Verma S, Anderson TJ. The ten most commonly asked questions about endothelial function in cardiology. *Cardiol Rev*. 2001;9:250-252.
42. Fleming I, Busse R. NO: the primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:5-14.
43. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:4651-4655.
44. Drexler H. Endothelium as a therapeutic target in heart failure. *Circulation*. 1998;98:2652-2655.
45. Dawson TM, Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res*. 1998;118:3-11.
46. Reininger AJ, Korndorfer MA, Wurzinger LJ. Adhesion of ADP-activated platelets to intact endothelium under stagnation point flow in vitro is mediated by the integrin alphaIIb beta3. *Thromb Haemost*. 1998;79:998-1003.
47. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*. 2000;89:160-167.

48. Bauersachs J, Schafer A. Endothelial dysfunction in heart failure: mechanisms and therapeutic approaches. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2:115-124.
49. Comini L, Bachetti T, Gaia G, Pasini E, Agnoletti L, Pepi P, Ceconi C, Curello S, Ferrari R. Aorta and skeletal muscle NO synthase expression in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:2241-2248.
50. Smith CJ, Sun D, Hoegler C, Roth BS, Zhang X, Zhao G, Xu XB, Kobari Y, Pritchard K, Jr., Sessa WC, Hintze TH. Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circ Res*. 1996;78:58-64.
51. Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation*. 1999;100:292-298.
52. Bouloumie A, Bauersachs J, Linz W, Scholkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*. 1997;30:934-941.
53. Bauersachs J, Fleming I, Fraccarollo D, Busse R, Ertl G. Prevention of endothelial dysfunction in heart failure by vitamin E: attenuation of vascular superoxide anion formation and increase in soluble guanylyl cyclase expression. *Cardiovasc Res*. 2001;51:344-350.
54. Arimura K, Egashira K, Nakamura R, Ide T, Tsutsui H, Shimokawa H, Takeshita A. Increased inactivation of nitric oxide is involved in coronary endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H68-H75.
55. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, Jeejeebhoy KN. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1352-1356.
56. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996;97:1916-1923.
57. Griending KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:1141-1148.
58. Mollnau H, Wendt M, Szocs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Forstermann U, Meinertz T, Griending K, Munzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*. 2002;90:E58-E65.
59. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*. 2002;40:504-510.

60. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Hatakeyama H, Inaba S, Furukawa K, Mabuchi H, Takeda R. Regulation of aldosterone synthase in human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:2797-2800.
61. Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest.* 1986;78:31-39.
62. Ganten D, Hermann K, Unger T, Lang RE. The tissue renin-angiotensin systems: focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall. *Clin Exp Hypertens A.* 1983;5:1099-1118.
63. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:567-574.
64. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.* 1993;88:2510-2516.
65. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van d, V, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000;130:963-974.
66. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263:681-684.
67. Schmidt AM, Stern D. Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. *Curr Atheroscler Rep.* 2000;2:430-436.
68. Schmidt AM, Stern DM. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:368-375.
69. Thornalley PJ. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand).* 1998;44:1013-1023.
70. Hennes MM, O'Shaughnessy IM, Kelly TM, LaBelle P, Egan BM, Kissebah AH. Insulin-resistant lipolysis in abdominally obese hypertensive individuals. Role of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* 1996;28:120-126.
71. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000;49:1939-1945.
72. Zou M, Yesilkaya A, Ullrich V. Peroxynitrite inactivates prostacyclin synthase by heme-thiolate-catalyzed tyrosine nitration. *Drug Metab Rev.* 1999;31:343-349.
73. Hopfner RL, Gopalakrishnan V. Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia.* 1999;42:1383-1394.

74. Christlieb AR, Janka HU, Kraus B, Gleason RE, Icasas-Cabral EA, Aiello LM, Cabral BV, Solano A. Vascular reactivity to angiotensin II and to norepinephrine in diabetic subjects. *Diabetes*. 1976;25:268-274.
75. Tesfamariam B, Brown ML, Deykin D, Cohen RA. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest*. 1990;85:929-932.
76. Rosen P, Toeller M. Vitamin E in diabetes. Increased oxidative stress and its prevention as a strategy to prevent vascular complications? *Int J Vitam Nutr Res*. 1999;69:206-212.
77. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res*. 1995;76:980-986.
78. Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, Lo SS, Hawa M, Viberti GC, Watkins PJ, Leslie RD, Vergani D. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia*. 1996;39:60-69.
79. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res*. 2001;88:1291-1298.
80. Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, Matsuo M, Sakata T, Miyata T. Activation of tissue factor-induced coagulation and endothelial cell dysfunction in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1114-1120.
81. Gawaz, M. Das Blutplättchen. 2006. Stuttgart, New York, Thieme Verlag.
82. Schafer A, Eigenthaler M, Bauersachs J. Platelet activation in heart failure. *Clin Lab*. 2004;50:559-566.
83. Jafri SM. Hypercoagulability in heart failure. *Semin Thromb Hemost*. 1997;23:543-545.
84. 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.
85. Lip GY, Gibbs CR. Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's triad revisited. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:1424-1426.
86. O'Connor CM, Gurbel PA, Serebruany VL. Usefulness of soluble and surface-bound P-selectin in detecting heightened platelet activity in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1999;83:1345-1349.

87. Jafri SM, Ozawa T, Mammen E, Levine TB, Johnson C, Goldstein S. Platelet function, thrombin and fibrinolytic activity in patients with heart failure. *Eur Heart J.* 1993;14:205-212.
88. Sbarouni E, Bradshaw A, Andreotti F, Tuddenham E, Oakley CM, Cleland JG. Relationship between hemostatic abnormalities and neuroendocrine activity in heart failure. *Am Heart J.* 1994;127:607-612.
89. Lip GY, Lowe GD, Metcalfe MJ, Rumley A, Dunn FG. Effects of warfarin therapy on plasma fibrinogen, von Willebrand factor, and fibrin D-dimer in left ventricular dysfunction secondary to coronary artery disease with and without aneurysms. *Am J Cardiol.* 1995;76:453-458.
90. Schäfer 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.
91. Teerlink JR, Loffler BM, Hess P, Maire JP, Clozel M, Clozel JP. Role of endothelin in the maintenance of blood pressure in conscious rats with chronic heart failure. Acute effects of the endothelin receptor antagonist Ro 47-0203 (bosentan). *Circulation.* 1994;90:2510-2518.
92. Fraccarollo D, Galuppo P, Schmidt I, Ertl G, Bauersachs J. Additive amelioration of left ventricular remodeling and molecular alterations by combined aldosterone and angiotensin receptor blockade after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2005;67:97-105.
93. Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann SK, Tas P, Ertl G, Bauersachs J. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2003;58:655-662.
94. Bauersachs J, Heck M, Fraccarollo D, Hildemann SK, Ertl G, Wehling M, Christ M. Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:351-358.
95. Winocour PD. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes.* 1992;41 Suppl 2:26-31.
96. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2001;24:1476-1485.
97. Kaplar M, Kappelmayer J, Veszpremi A, Szabo K, Udvardy M. The possible association of in vivo leukocyte-platelet heterophilic aggregate formation and the development of diabetic angiopathy. *Platelets.* 2001;12:419-422.
98. Knobler H, Savion N, Shenkman B, Kotev-Emeth S, Varon D. Shear-induced platelet adhesion and aggregation on subendothelium are increased in diabetic patients. *Thromb Res.* 1998;90:181-190.

99. Glassman AB. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Ann Clin Lab Sci.* 1993;23:47-50.
100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. Schafer A, Widder J, Eigenthaler M, Bischoff H, Ertl G, Bauersachs J. Increased platelet activation in young Zucker rats with impaired glucose tolerance is improved by acarbose. *Thromb Haemost.* 2004;92:97-103.
104. Nordt TK, Bode C. Impaired endogenous fibrinolysis in diabetes mellitus: mechanisms and therapeutic approaches. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26:495-501.
105. Assert R, Scherk G, Bumbure A, Pirags V, Schatz H, Pfeiffer AF. Regulation of protein kinase C by short term hyperglycaemia in human platelets in vivo and in vitro. *Diabetologia.* 2001;44:188-195.
106. Schäfer 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.
107. Schäfer 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.
108. Busse R, Luckhoff A, Bassenge E. Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1987;336:566-571.
109. Alheid U, Frolich JC, Forstermann U. Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res.* 1987;47:561-571.
110. Forstermann U, Mugge A, Alheid U, Bode SM, Frolich JC. Endothelium-derived relaxing factor (EDRF): a defence mechanism against platelet aggregation and vasospasm in human coronary arteries. *Eur Heart J.* 1989;10 Suppl F:36-43.
111. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;148:1482-1489.
112. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987;2:1057-1058.

113. Moro MA, Russel RJ, Cellek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, Radomski 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.
114. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 2001;88:756-762.
115. Lamontagne D, Pohl U, Busse R. Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. *Circ Res*. 1992;70:123-130.
116. Pohl U, Nolte C, Bunse A, Eigenthaler M, Walter U. Endothelium-dependent phosphorylation of vasodilator-stimulated protein in platelets during coronary passage. *Am J Physiol*. 1994;266:H606-H612.
117. Woods JD, Edwards JS, Ritter JM. Inhibition by nitroprusside of platelet calcium mobilization: evidence for reduced sensitivity to nitric oxide in essential hypertension. *J Hypertens*. 1993;11:1369-1373.
118. Chirkov YY, Holmes AS, Chirkova LP, Horowitz JD. Nitrate resistance in platelets from patients with stable angina pectoris. *Circulation*. 1999;100:129-134.
119. Ellis GR, Anderson RA, Chirkov YY, Morris-Thurgood J, Jackson SK, Lewis MJ, Horowitz JD, Frenneaux MP. Acute effects of vitamin C on platelet responsiveness to nitric oxide donors and endothelial function in patients with chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;37:564-570.
120. Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*. 1997;23:379-385.
121. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schomig A. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997;96:1809-1818.
122. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schomig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation*. 1996;93:229-237.
123. Lafrenie RM, Podor TJ, Buchanan MR, Orr FW. Up-regulated biosynthesis and expression of endothelial cell vitronectin receptor enhances cancer cell adhesion. *Cancer Res*. 1992;52:2202-2208.
124. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
125. Hawiger J. Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction. *Thromb Haemost*. 1995;74:369-372.
126. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev*. 1989;69:58-178.

127. Capron L. [Is atherosclerosis an infectious disease]. *Rev Med Interne*. 2000;21:499-501.
128. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.
129. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med*. 1992;326:310-318.
130. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*. 1992;326:242-250.
131. Robbie L, Libby P. Inflammation and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;947:167-179.
132. Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand*. 2001;173:35-43.
133. Ley K, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;107:1209-1210.
134. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:842-851.
135. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997;100:2680-2690.
136. Bourgain RH. Coagulation and platelet aggregation in atherosclerosis. *Acta Cardiol Suppl*. 1988;29:121-123.
137. Burns ER, Friedman RJ, Tiell ML, Spaet TH, Stemerman MB. Platelet activity in pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med*. 1976;295:1199-1200.
138. Colman RW. Platelet function in thrombosis and atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol*. 1978;104:421-436.
139. 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.
140. Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14:18-22.
141. 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.

142. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7450-7454.
143. 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.
144. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*. 1999;94:3829-3838.
145. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med*. 1999;190:803-814.
146. Andre P, Denis CV, Ware J, Saffaripour S, Hynes RO, Ruggeri ZM, Wagner DD. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood*. 2000;96:3322-3328.
147. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol*. 2001;154:485-490.
148. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczyk RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391:591-594.
149. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schomig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*. 1998;98:1164-1171.
150. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schomig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2000;148:75-85.
151. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998;2:275-281.
152. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*. 1996;97:1715-1722.
153. Sheikine YA, Hansson GK. Chemokines as potential therapeutic targets in atherosclerosis. *Curr Drug Targets*. 2006;7:13-27.
154. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003;111:333-340.

155. Harrison JK, Jiang Y, Wees EA, Salafranca MN, Liang HX, Feng L, Belardinelli L. Inflammatory agents regulate in vivo expression of fractalkine in endothelial cells of the rat heart. *J Leukoc Biol.* 1999;66:937-944.
156. Chapman GA, Moores KE, Gohil J, Berkhout TA, Patel L, Green P, Macphee CH, Stewart BR. The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium. *Eur J Pharmacol.* 2000;392:189-195.
157. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiya H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91:521-530.
158. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 1998;188:1413-1419.
159. Umehara H, Imai T. Role of fractalkine in leukocyte adhesion and migration and in vascular injury. *Drug News Perspect.* 2001;14:460-464.
160. Lucas AD, Bursill C, Guzik TJ, Sadowski J, Channon KM, Greaves DR. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation.* 2003;108:2498-2504.
161. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debre P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation.* 2003;107:1009-1016.
162. Cybulsky MI, Hegele RA. The fractalkine receptor CX3CR1 is a key mediator of atherogenesis. *J Clin Invest.* 2003;111:1118-1120.
163. Teupser D, Pavlides S, Tan M, Gutierrez-Ramos JC, Kolbeck R, Breslow JL. Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:17795-17800.
164. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997;385:640-644.
165. Inngjerdingen M, Damaj B, Maghazachi AA. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood.* 2001;97:367-375.
166. Schäfer 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.
167. Umehara H, Bloom E, Okazaki T, Domae N, Imai T. Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunol.* 2001;22:602-607.

168. Greaves DR, Hakkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Green FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordon S, Yla-Hertuala S. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:923-929.
169. Damas JK, Boullier A, Waehre T, Smith C, Sandberg WJ, Green S, Aukrust P, Quehenberger O. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2567-2572.
170. Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, Bloom ET, Domae N, Umehara H. CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2000;164:4313-4320.
171. Wong BW, Wong D, McManus BM. Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. *Cardiovasc Pathol.* 2002;11:332-338.
172. Haskell CA, Cleary MD, Charo IF. Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. *J Biol Chem.* 1999;274:10053-10058.
173. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation.* 2000;102:1931-1936.
174. Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications.* 2001;15:44-54.
175. Lucas AD, Chadwick N, Warren BF, Jewell DP, Gordon S, Powrie F, Greaves DR. The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *Am J Pathol.* 2001;158:855-866.
176. Schulz C, Schafer A, Stolla M, Kerstan S, Lorenz M, von Bruhl ML, Schiemann M, Bauersachs J, Gloe T, Busch DH, Gawaz M, Massberg S. Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: a critical role for P-selectin expressed on activated platelets. *Circulation.* 2007;116:764-773.
177. Schäfer A, Schulz C, Fraccarollo D, Tas P, Leutke M, Eigenthaler M, Seidl S, Heider P, Ertl G, Massberg S, Bauersachs J. The CX3C Chemokine Fractalkine Induces Vascular Dysfunction by Generation of Superoxide Anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;1:55-62.
178. Niessner A, Marculescu R, Haschemi A, Endler G, Zorn G, Weyand CM, Maurer G, Mannhalter C, Wojta J, Wagner O, Huber K. Opposite effects of CX3CR1 receptor polymorphisms V249I and T280M on the development of acute coronary syndrome. A possible implication of fractalkine in inflammatory activation. *Thromb Haemost.* 2005;93:949-954.

179. Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara M, Seknadji P, McDermott DH, Debre P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadiere C. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood*. 2001;97:1925-1928.
180. McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, Wilson PW, D'Agostino RB, O'Donnell CJ, Patel DD, Murphy PM. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest*. 2003;111:1241-1250.
181. McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res*. 2001;89:401-407.
182. Niessner A, Marculescu R, Kvakan H, Haschemi A, Endler G, Weyand CM, Maurer G, Mannhalter C, Wojta J, Wagner O, Huber K. Fractalkine receptor polymorphisms V249I and T280M as genetic risk factors for restenosis. *Thromb Haemost*. 2005;94:1251-1256.
183. Damas JK, Jensenius M, Ueland T, Otterdal K, Yndestad A, Froland SS, Rolain JM, Myrvang B, Raoult D, Aukrust P. Increased levels of soluble CD40L in African tick bite fever: possible involvement of TLRs in the pathogenic interaction between *Rickettsia africae*, endothelial cells, and platelets. *J Immunol*. 2006;177:2699-2706.
184. Husberg C, Nygard S, Finsen AV, Damas JK, Frigessi A, Oie E, Waehre A, Gullestad L, Aukrust P, Yndestad A, Christensen G. Cytokine expression profiling of the myocardium reveals a role for CX3CL1 (fractalkine) in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2008.
185. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979;44:503-512.
186. Zucker LM, Antoniades HN. Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology*. 1972;90:1320-1330.
187. Bray GA. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc*. 1977;36:148-153.
188. Plotkin BJ, Paulson D. Zucker rat (fa/fa), a model for the study of immune function in type-II diabetes mellitus: effect of exercise and caloric restriction on the phagocytic activity of macrophages. *Lab Anim Sci*. 1996;46:682-684.
189. Peterson RG. Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. 16-19. 1990. ILAR news32.
190. Michelson AD. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2006;35:67-82.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

191. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*. 1987;70:307-315.
192. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. *Circulation*. 1999;99:E1-E11.
193. Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol*. 1963;168:178-195.
194. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. 1996;84:289-297.
195. Holme PA, Orvim U, Hamers MJ, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, Sakariassen KS. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:646-653.
196. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med*. 1998;187:329-339.

**VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb.1	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	S.3
Abb.2	Aufbau eines arteriellen Blutgefäßes	S.6
Abb.3	Darstellung der endothelialen NO-Synthese	S.8
Abb.4	Schematische Darstellung der Entstehung einer Endotheldysfunktion bei CHF	S.10
Abb.5	Endotheliale Dysfunktion in Diabetes	S.12
Abb.6	Aktivierung eines Thrombozyten	S.13
Abb.7	Thrombozytenaktivierung bei CHF	S.15
Abb.8	Thrombozytenabhängige Regulation des Gefäßtonus	S.17
Abb.8	Endotheldysfunktion bei Atherosklerose	S.19
Abb.10	Lipidformation bei Atherosklerose	S.20
Abb.11	Darstellung einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion	S.20
Abb.12	Fractalkine und sein Rezeptor bei der Atherosklerose	S.24
Abb.13	Rolle von Chemokinen bei Atherosklerose	S.25
Abb.14	Rolle von Chemokinen bei Atherosklerose	S.25
Abb.15	Fractalkine-Rezeptor und sein Signalweg in Thrombozyten	S.27
Abb.16	Interaktion von Fractalkine, Leukozyten und Thrombozyten	S.29
Abb.17	Darstellung einer Wistar-Ratte	S.33
Abb.18	Darstellung eines Organbads	S.36
Abb.19	Darstellung eines FACS-Gerätes	S.38
Abb.20	Darstellung eines Aggregometers	S.39
Abb.21	Darstellung einer Flusskammer	S.40
Abb.22	Endothel-abhängige Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten	S.42
Abb.23	Reduktion der Endothel-abhängigen Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten	S.44
Abb.24	Reduktion der Endothel-abhängigen Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten	S.45
Abb.25	Endothel-abhängige Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten (Dosis-Wirkungs-Kurve)	S.45
Abb.26	Endothel-abhängige Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten (EC <sub>50</sub> -Kurve)	S.46
Abb.27	Endothel-unabhängige Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten	S.47
Abb.28	Endothel-unabhängige Relaxation in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten (EC <sub>50</sub> -Kurve)	S.47
Abb.29	Kontraktion auf K <sup>+</sup> in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten	S.48
Abb.30	Kontraktion auf Phenylephrin in Aortenringen Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten	S.48
Abb.31	Phenylephrin-induzierte Kontraktion der Aortenringe Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten (Dosis-Wirkungs-Kurve)	S.49
Abb.32	Phenylephrin-induzierte Kontraktion der Aortenringe Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten (EC <sub>50</sub> -Kurve)	S.50
Abb.33	Phenylephrin-induzierte Kontraktion (% von 100 mM K <sup>+</sup> ) der Aortenringe Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten	S.50

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abb.34	Immunhistochemischer Nachweis des Fractalkine-Liganden (CX <sub>3</sub> CL1) und des Fractalkine-Rezeptors (CX <sub>3</sub> CR1) in der Aorta von CHF- und Sham-Tieren	S.51
Abb.35	Serum-Konzentration von gelösten CX <sub>3</sub> CL1 bei Sham-operierten und herzinsuffizienten (CHF) Ratten	S.52
Abb.36	Urin-Konzentration von sCX <sub>3</sub> CL1 bei Sham-operierten und herzinsuffizienten (CHF) Ratten	S.52
Abb.37	Expression des CX <sub>3</sub> CR1-Rezeptors auf der Oberfläche der CHF- und Sham-Tiere	S.53
Abb.38	ADP-induzierte P-Selektin (CD62P)-Expression auf Thrombozyten Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten (% aller Thrombozyten)	S.54
Abb.39	ADP-induzierte P-Selektin (CD62P)-Expression auf Thrombozyten Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten	S.54
Abb.40	ADP-induzierte Aggregation der Thrombozyten Sham-operierter und herzinsuffizienter (CHF) Ratten	S.55
Abb.41	Fractalkine-Expression in den Aorten von Obese- und Lean-Ratten	S.56
Abb.42	Gewebe-Konzentration von Fractalkine in der Aorta bei Lean- und Obese-Ratten	S.56
Abb.43	Expression des Fractalkine-Rezeptors (CX <sub>3</sub> CR1) auf Thrombozyten von Lean- und Obese-Ratten (Balkendiagramm)	S.57
Abb.44	Expression des Fractalkine-Rezeptors (CX <sub>3</sub> CR1) auf Thrombozyten von Lean- und Obese-Ratten (Durchflußzytometrie Kurve)	S.58
Abb.45	Effekt von Fractalkine auf ADP-induzierte P-Selektin (CD62P)-Expression auf Thrombozyten von Lean- und Obese-Ratten	S.59
Abb.46	Effekt von Fractalkine-Kostimulation auf die ADP-induzierte Thrombozyten-Aggregation	S.59
Abb.47	Effekt von Fractalkine auf Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen bei Lean- und Obese-Ratten	S.60

**VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosin-Diphosphat
AGE's	engl. advanced glycosylation endproducts
AK	Antikörper
ApoE	Apolipoprotein-E
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BSA	engl. bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>++</sup>	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosin-3':5'-Monophosphat
CD62P	P-Selektin
cGMP	zyklisches Guanin-3':5'-Monophosphat
CHF	engl. congestive Heart Failure, Herzinsuffizienz
CX <sub>3</sub> CL1	Fractalkine
CX <sub>3</sub> CR1	Fractalkine-Rezeptor
DM	Diabetes mellitus
EC	engl. endothelial cell
EC <sub>50</sub>	Konzentration eines Wirkstoffs, bei der die Hälfte des maximal möglichen Effekts erreicht wird
EDF	Endotheldysfunktion
EDRF	engl. endothelium-derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
FK	Fractalkine
FKN	Fractalkine
GMP	Guaninmonophosphat
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
GP-Rezeptor	Glykoprotein-Rezeptor
GTP	Guanin-5'-Triphosphat
Hb	Hämoglobin
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-8	Interleukin 8
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LDL-Cholesterin	engl. low density lipoproteins-Cholesterin
LVEDP	engl. left ventricular end diastolic pressure
MCP-1	engl. macrophage chemotactic protein-1
MCS-F	engl. macrophage colony-stimulating factor-1
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

mM	mmol/l
$\mu$ M	$\mu$ mol/l
NaCl	Natriumchlorid
NAHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat reduziert
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NNOS	neuronale NO-Synthase
NF- $\kappa$ B	engl. nuclear factor $\kappa$ B
ONOO <sup>-</sup>	Peroxyinitrit
PBS	engl. phosphate-buffered saline; NaCl-Phosphatpuffer
PDGF	Platelet-derived growth factor
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül 1
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Konzentration in wässriger Lösung
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PPP	engl. platelet poor plasma
PRP	engl. platelet rich plasma
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAGE	engl. receptor of advanced glycation end products
RIVA	Ramus interventricularis anterior
ROS	engl. reactive oxygen spezie
S.	Seite
SEM	engl. standard error of the mean
SMC	engl. smooth muscle cell
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
VASP	Vasodilator-stimulated Phosphoprotein
VCAM-1	engl. vascular cell adhesion molecule-1
VWF	von-Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel
ZDF	engl. Zucker diabetic fatty

## DANKSAGUNG

---

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Johann Bauersachs, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein Vertrauen und für die Unterstützung dieser Arbeit vielmals danken.

Für die exzellente Betreuung während der Laborarbeiten und Zusammenstellung dieser Arbeit möchte ich Herrn PD Dr. med. Andreas Schäfer herzlich danken.

Ein weiterer Dank geht an meine Doktoranden-Kollegen, u.a. Ulrike Flierl, Christian Vogt und Stephanie Pförtsch, mit denen es stets eine Freude und Bereicherung war, zusammenzuarbeiten. Vielen Dank für Eure Unterstützung.

Für die technische Unterstützung und Assistenz danke ich vielmals Frau Dr. Daniela Fraccarollo, Julia Pfrang und Meike Leutke.

Von Herzen möchte ich zum Schluss meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt haben und mir Mut gemacht haben, die immer ein offenes Ohr hatten und die immer an mich geglaubt haben. Ich danke Ihnen, dass sie mir dieses Studium mit dieser Doktorarbeit ermöglicht haben.

# LEBENS LAUF

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Schöpp  
Vorname: Corinna Ella Maria  
Adresse: Gräfestr.5, 34121 Kassel  
Geburtsdatum: 14.11.1981  
Geburtsort: Berlin

### Ausbildung:

---

1988-1992 Halensee-Grundschule, Berlin  
1992-2001 Evang. Gymnasium zum Grauen Kloster, Berlin  
Abitur 2001  
2001-2002 Auslandsaufenthalt (Praktikum und Sprachkurs) und  
Krankenpflegepraktikum  
Ab 04/2002 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg  
03/2004 1. Ärztliche Prüfung  
06/2008 2. Ärztliche Prüfung mit Erlangung der ärztlichen  
Approbation  
Seit 09/08 Assistenzärztin, Kinderkrankenhaus Park Schönfeld, Kassel

### Famulaturen:

---

09/2004-10/2004 Gynäkologie, Missionsärztliche Klinik, Würzburg  
02/2005-03/2005 Innere Medizin, Martin-Luther-Krankenhaus, Berlin  
08/2006-09/2006 Erwachsenen- und Kinderanästhesie, St. Joseph-  
Klinik, Berlin  
09/2006-10/2006 Kinderarztpraxis Dr. Schöffner, Berlin  
10/2006 Neonatologie, Kinderklinik am Mönchberg, Würzburg

### Praktisches Jahr:

---

02/2007-04/2007 Viszeral- und Herzchirurgie, Sunnybrook HSC,  
Toronto, ON, Kanada (Dr. Christakis)  
04/2007-06/2007 Viszeral- und Gefäßchirurgie, St. Clare´s Mercy Hospital,  
St. John´s, NL, Kanada (Dr.Melvin)  
06/2007-10/2007 Wahlfach Pädiatrie, Universitätskinderklinik Würzburg  
(Prof. Speer)  
10/2007-01/2008 Innere Medizin, Medizinische Klinik I+II der Universität  
Würzburg (Prof. Ertl und Prof. Einsele)

Würzburg, Juli 2009 C.Schöpp

