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

Einfluss der Kurzzeittherapie mit dem Cannabinoid-1- Rezeptorantagonisten Rimonabant auf Thrombozytenaktivierung und proinflammatorische Chemokine bei Diabetes mellitus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilans-Universität Würzburg
vorgelegt von
Stefanie Fiedler
aus Burglauer
Würzburg, Juni 2010

Referent : Priv. Doz. Dr. med. Andreas Schäfer

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2011

Die Promovendin ist Ärztin

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis:

1 Einleitung ..... - 1 -
1.1 Diabetes mellitus ..... - 1 -
1.1.1 Definition ..... - 1 -
1.1.2 Epidemiologie ..... - 2 -
1.1.3 Kostenfaktor ..... - 2 -
1.1.4 Pathogenese und Pathophysiologie des Typ 2 Diabetes ..... - 3 -
1.1.5 Spätkomplikationen ..... - 4 -
1.1.5.1 Entstehung der Atherosklerose ..... - 5 -
1.1.6 Therapeutische Ansatzpunkte ..... - 6 -
1.1.6.1 Gewichtsreduktion ..... - 6 -
1.1.6.2 Hyperglykämie und Insulinresistenz ..... - 7 -
1.1.6.3 Dyslipidämie ..... - 7 -
1.1.6.4 Hypertonie und erhöhte thrombozytäre Aktivität ..... - 8 -
1.2 Das Endocannabinoidsystem ..... - 9 -
1.2.1 Vorkommen und Bedeutung ..... - 9 -
1.2.2 Cannabinoid-1-Rezeptor-Antagonisten ..... - 9 -
1.2.2.1 Rimonabant ..... - 10 -
1.3 Studiendesign ..... - 12 -
2 Material und Methoden ..... - 13 -
2.1 Tiere ..... - 13 -
2.2 Vorbereitung ..... - 13 -
2.3 Blutbild ..... - 14 -
2.4 Bestimmung der Chemokine CCL5 (RANTES) und CCL2 (MCP-1) ..... - 15 -
2.5 Durchflusszytometrie ..... - 16 -
2.5.1.1 Fibrinogen ..... - 17 -
2.5.1.2 VASP ..... - 18 -
2.5.1.3 ADP-induzierte P-Selektin Expression ..... - 18 -
2.6 Thrombozytenaggregation ..... - 19 -
2.6.1 Funktionsprinzip ..... - 19 -
2.6.2 Durchführung ..... - 20 -
2.7 Flusskammermodell zur Thrombozytenadhäsionsmessung ..... - 20 -
2.7.1 Vorbereitung der Thrombozytensuspension ..... - 20 -
2.7.2 Durchführung der Thrombozytenadhäsionsmessung ..... - 21 -
2.7.3 Technische Informationen ..... - 21 -
2.8 Substanzen ..... - 21 -
2.9 Statistik ..... - 22 -
3 Ergebnisse ..... - 23 -
3.1 Metabolische Werte ..... - 23 -
3.1.1 Körpergewicht ..... - 23 -
3.1.2 Viscerales Fett ..... - 23 -
3.1.3 Blutglukose ..... - 24 -
3.1.4 HbA_{1c} ..... - 25 -
3.2 Blutwerte ..... - 26 -
3.2.1 Zirkulierende Thrombozyten ..... - 26 -
3.2.2 Leukozytenpopulationen ..... - 27 -
3.3 Serumspiegel von Chemokinen und Lipoproteinen ..... - 28 -
3.3.1 MCP-1 und RANTES ..... - 28 -

3.3.2 Lipoproteine ..... - 29 -
3.4 Marker der Thromboztyenfunktion ..... - 31 -
3.4.1 VASP ..... - 31 -
3.4.2 Thrombozyten-gebundenes Fibrinogen ..... - 32 -
3.5 Marker der Thrombozytenaktivität ..... - 33 -
3.5.1 Oberflächenexpression des P-Selektin ..... - 33 -
3.5.2 Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation ..... - 33 -
3.5.3 Thrombozytenadhäsion an fibrinogenbeschichteter Membran ..... - 34 -
4 Diskussion ..... - 35 -
4.1 Modulation von Gewichtszunahme und Lipidprofil ..... - 35 -
4.2 Rimonabant-induzierte immunologische Veränderungen ..... - 38 -
4.3 Veränderungen der thrombozytären Aktivität durch Rimonabant ..... - 41 -
4.4 Wechselwirkungen mit CB_2 – Rezeptoren und unerwünschte Wirkungen - 44 -
5 Zusammenfassung ..... - 48 -
6 Quellenverzeichnis ..... - 49 -
Abbildungsverzeichnis .....
Abkürzungsverzeichnis .....

1 Einleitung

Eine große Zahl der Bevölkerung leidet heutzutage an so genannten Volkskrankheiten. Ursache solcher Krankheiten sind häufig gesundheitsschädliche Lebensweisen wie z.B. Fehlernährung und Bewegungsmangel. Entsprechend lässt sich das Entstehen solcher Erkrankungen durch Gesundheitsvorsorge beeinflussen und zum Teil sogar verhindern. Zu diesen Volkskrankheiten zählt neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, dem Rheuma, den Depressionen und dem Bluthochdruck auch der Diabetes.[1]

Als Beispiel einer solchen Volks- bzw. Zivilisationskrankheit soll im Folgenden besonders der Diabetes mellitus hervorgehoben werden, mit dessen weiterem Anstieg an Erkrankten in Zukunft zu rechnen ist, besonders in den Industrienationen.[2] Als ursächlich hierfür wird die Tatsache angesehen, dass die Zahl an übergewichtigen Menschen in den letzten 25 Jahren substantiell zugenommen hat. Und dieser Trend lies sich nicht nur in den USA, sondern in den meisten entwickelten Ländern beobachten.[3] Der Grund hierfür scheint in einer vorwiegend sitzenden Lebensweise und einem nahezu unbegrenzten Zugang zu energiereichen Lebensmitteln mit geringem Nährwert zu liegen.[4] Allein in Deutschland findet sich bei 49,6% der über 18 Jährigen ein Body-Mass-Index von über 25,0 kg/m^2[5] und somit per definitionem Übergewicht, was mit einem erhöhten Risiko, an Diabetes mellitus, Koronarer Herzkrankheit, Bluthochdruck, Schlafapnoe und Krebs zu erkranken, einhergeht.[3]

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definition

Der Diabetes mellitus ist definiert als eine durch den Leitbefund chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels. Es liegt entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine verminderte Insulinwirkung oder auch beides zugrunde. Der Typ 1 Diabetes basiert auf einer Zerstörung der Insulin-sezernierenden ß-Zellen des Pankreas mit der Folge eines absoluten Insulinmangels. Im Gegensatz hierzu besteht bei Diabetes mellitus Typ 2 vorwiegend eine Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel, was sich aber auch bis zu einem vorwiegend

sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken kann. Es werden jedoch auch der Gestationsdiabetes, sowie weitere Formen des Diabetes, die unter anderem auf genetischen Defekten, Endokrinopathien oder Infektionen beruhen, unterschieden.[6]
Von einem manifesten Diabetes mellitus wird gemäß der American Diabetes Association ab einem Nüchternblutglukosewert von 110 mg pro Deziliter (6,1 mmol pro Liter) oder höher gesprochen. Dies entspricht Nüchtern-Plasma-Glukose-Werten von 126 mg pro Deziliter (7,0 mmol pro Liter) oder mehr.[7] Circa 90% der Patienten leiden an Diabetes mellitus Typ 2, wohingegen nur 10% einen Typ 1 aufweisen.[8] Aufgrund des häufigen Auftretens des Diabetes Typ 2 wird im Folgenden näher auf diesen eingegangen.

1.1.2 Epidemiologie

Bereits 2001 wurde die Anzahl an Diabetikern weltweit auf 170 Millionen Menschen zwischen 20 und 79 Jahren geschätzt. Die Prävalenz des Diabetes Typ 2 beträgt um die 6%. Allein unter den übergewichtigen hellhäutigen Erwachsenen leiden ca. 4% an Diabetes Typ 2 und 25% weisen eine Glukosetoleranzstörung auf.[8] In Deutschland wurde die Zahl der Patienten, die an Diabetes mellitus leiden im Jahr 2001 auf 5,818 Millionen geschätzt bei 82,3 Millionen Einwohnern (Stand 31.12.2000).[9] Somit leben bereits in Deutschland mehr Diabetiker, als weltweit jährlich Menschen an den Folgen des Rauchens versterben, nämlich 5,4 Millionen.[10] An den Folgen des Diabetes starben im Jahr 2005 laut Angaben des statistischen Bundesamtes in Deutschland insgesamt 24.342 Menschen (9419 Männer und 14923 Frauen).[11] Besorgniserregend erweist sich auch die Tatsache, dass die Inzidenz, d.h. die Rate der Neuerkrankungen, weiterhin im Steigen begriffen ist. Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation zufolge werden somit bis zum Jahr 2030 rund 366 Millionen Menschen an Diabetes mellitus leiden.[9]

1.1.3 Kostenfaktor

Die medizinische und sozioökonomische Kostenlast des Diabetes wird vor allem durch die mit diesem einhergehenden mikro-, und makrovaskulären Komplikationen verursacht, was eine enorme Belastung für die Gesundheitssysteme bedeutet.[8]
Die mittleren jährlichen direkten Kosten eines Diabetikers beliefen sich im Jahre 2001 in Deutschland auf 5.262 Euro. Die zum Vergleich herangezogenen Nicht-Diabetiker verursachten hingegen Kosten in Höhe von 2.775 Euro. Somit beliefen sich die direkten

Diabetes–Exzess-Kosten durchschnittlich auf jährlich 2.507 Euro pro Patient. Hochgerechnet auf die Gesamtzahl der Diabetiker in Deutschland von 5,8 Millionen entstanden im Jahr 2001 direkte Diabetes-Exzess-Kosten in Höhe von 14,6 Milliarden Euro.[12] Ein Großteil hiervon entstand durch stationäre Behandlung (33,7%), Medikamente (22,4%) und ambulante ärztliche Leistungen (12,5%). 15,4 % setzten sich aus Kosten für medizinische Hilfsmittel, andere Heilmittel, Beförderungsmittel und andere ambulante Serviceleistungen zusammen. 3,5% wurden für die Pflege zu Hause und 12,5% für die Langzeitpflege verwandt. Insgesamt wurden 2001 die direkten Kosten des Diabetes mellitus in Deutschland auf 30,616 Milliarden Euro geschätzt.[13] Hinzu kamen noch die indirekten Kosten für Arbeitsunfähigkeit und Frühberentungen von 5.019 Euro pro Patient pro Jahr. Im Vergleich hierzu beliefen sich die Kosten eines Nicht-Diabetikers auf 3.691 Euro im Jahr 2001. Die indirekten Diabetes-Exzess-Kosten auf alle Diabetiker in Deutschland hochgerechnet ergibt somit die Summe von nochmals 7,7 Milliarden Euro an indirekten Kosten 2001.[12] Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kosten für die Behandlung eines Diabetikers im Vergleich zu denen eines Nicht-Diabetikers das 1,6 fache betragen.[13] Alleine für die Behandlung des Typ 2 Diabetes beliefen sich bereits 1999 die geschätzten direkten Kosten in Belgien, Frankreich, Deutschland, Italien, den Niederlanden, Spanien, Schweden und dem Vereinigten Königreich zusammengenommen auf 29 Milliarden Euro pro Jahr, mit steigender Tendenz. Treten zusätzlich zur diabetischen Grunderkrankung (Typ 2) noch kardiovaskuläre Komplikationen auf, steigen die jährlichen Kosten pro Person um zusätzliche 50%, bei Eintreten eines größeren kardiovaskulären Ereignisses sogar um 360%.[2]

1.1.4 Pathogenese und Pathophysiologie des Typ 2 Diabetes

Die Entstehung des Typ 2 Diabetes gründet auf mehreren Faktoren, unter Anderem auf Triggern, wie zum Beispiel mangelnder Bewegung und Überernährung.[8] So entwickelt sich die Mehrzahl der Erkrankungen auf dem Boden eines metabolischen Syndroms, welches sich aus den vier Risikofaktoren stammbetonte Adipositas, Dyslipoproteinämie (Triglyceride↑, HDL-Cholesterin↓), essenzielle Hypertonie und Glukosetoleranzstörung zusammensetzt.[14] Folglich stellt das metabolische Syndrom auf dem Boden des Übergewichts eine Summe von Risikofaktoren für die Entstehung atherosklerosebedingter kardiovaskulärer Erkrankungen und Diabetes mellitus dar.[15]

Genetische Faktoren sind ebenfalls an der Pathogenese beteiligt So erhöht eine positive Familienanamnese das Risiko an Diabetes zu erkranken zusätzlich um das 2-4 fache.[16] Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung des Diabetes mellitus kommt dem Hormon Insulin zu, welches maßgeblich an der Regulation des Blutglukosespiegels beteiligt ist. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Insulinsekretion und Insulinwirkung. Nimmt die Insulinwirkung an der Leber und dem Skelettmuskel ab, wie dies mit zunehmendem Gewicht der Fall ist, steigt zunächst kompensatorisch die Insulinsekretion an, um den relativen Insulinmangel auszugleichen. Dies führt im Mittel zu einer leichten Erhöhung des Nüchterblutglukosewertes und des Blutglukosespiegels zwei Stunden nach Glucoseaufnahme. Die erhöhte Blutglukose wirkt wiederum aufgrund der aus ihr entstehenden Sauerstoffradikale, die die Zelle nur in begrenztem Maße abfangen kann, toxisch auf die Insulin-sezernierenden ß-Zellen des Pankreas und verstärkt den Insulinmangel bei Insulinresistenz. Dieser Circulus vitiosus führt letzten Endes zu zunehmender Hyperglykämie und endet schließlich in einem manifesten Diabetes mellitus. Weitere Ursachen einer Dysfunktion der ß-Zellen stellen auch ein Anstieg freier Fettsäuren, Entzündungsgeschehen, möglicherweise Inselamyloidablagerungen und, wie bereits erwähnt, die Hyperglykämie selbst dar. Synergistisch zu der gestörten Insulinsekretion findet sich Adiponektin, ein Adipositas-spezifisches Protein zur Erhöhung der Insulin-Sensitivität an der Leber, bei Übergewicht oft erniedrigt.[8]

1.1.5 Spätkomplikationen

Ein Großteil der Mortalität und Morbidität der Patienten mit Diabetes mellitus lässt sich auf die Folgen der Atherosklerose zurückführen.[14] Diese manifestiert sich vorwiegend an den Koronararterien, den Arterien der unteren Extremitäten und den Carotiden.[17] Somit sind kardiovaskuläre Erkrankungen verantwortlich für zwei Drittel aller Todesfälle und damit die häufigste Todesursache unter den Diabetikern.[18] Schätzungen zufolge ereignet sich in Deutschland aufgrund des Diabetes alle 12 Minuten ein Schlaganfall, alle 19 Minuten ein Herzinfarkt und eine Amputation und alle 90 Minuten eine Erblindung. Insgesamt unterschiedet man bei den Komplikationen des Diabetes mellitus zwischen einer unspezifischen Makroangiopathie und einer diabetesspezifischen Mikroangiopathie. Zur Makroangiopathie werden die Koronare Herzkrankheit, die periphere arterielle Verschlusskrankheit, die Arterielle

Verschlusskrankheit der Hirnarterien und der ischämische Hirninfarkt gezählt. Dagegen werden bei der diabetischen Mikroangiopathie zwischen der diabetischen Nephropathie, der diabetischen Neuropathie, der diabetischen Retinopathie und dem Diabetischen Fußsyndrom unterschieden. Aber auch außerhalb des Gefäßsystems können sich Schäden z.B. an der Leber im Sinne einer Fettleber manifestieren. Zudem kommt es gehäuft zu Dyslipidämien im Sinne von erhöhten Triglyceriden und eines erniedrigten HDL-Cholesterins. Auf den ganzen Organismus bezogen führt der Diabetes zu einer Resistenzminderung und einem gehäuften Auftreten von bakteriellen Haut- und Harnwegsinfektionen.[14]

1.1.5.1 Entstehung der Atherosklerose

Die beim Diabetes mellitus auftretenden metabolischen Veränderungen wie chronische Hyperglykämie, Insulinresistenz und Dyslipidämie verursachen eine Dysfunktion der arteriellen Gefäße, welche das Auftreten einer Arteriosklerose signifikant erhöht. Dies gründet auf einer beeinträchtigten Zellfunktion vieler verschiedener Zelltypen wie den Endothelzellen, den glatten Muskelzellen und den Thrombozyten. Als entscheidende Veränderung an den Endothelzellen zeigt sich unter anderem eine reduzierte Menge an NO, das in den Endothelzellen gebildet wird und maßgeblich an der Vasodilatation, Thrombozytenaktivierung und der Kontrolle von Entzündungsgeschehen beteiligt ist. Als Folge einer geminderten NO-Menge ergibt sich eine verschlechterte Endothelfunktion, vermehrte Vasokonstriktion, eine erhöhte Entzündungsbereitschaft und eine verstärkte Thromboseneigung.[17] Durch den systemisch entzündlichen Prozess kommt es zu einer Akkumulation von Monozyten bzw. Makrophagen und Lymphozyten in die Intima großer Gefäße und zur Bildung eines Plaque. Rupturiert dieser Plaque beginnt die Akkumulation aktivierter Thrombozyten[19] und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten,[20] was die Okklusion des entsprechenden Gefäßes nach sich ziehen kann und zur Entwicklung atherothrombotischer Erkrankungen der Koronarien, der Hirngefäße oder anderer Gefäße beiträgt.[21;22] Somit spielen aktivierte Thrombozyten und Thrombozyten-Leukozyten/Monozyten-Aggregate eine entscheidende Rolle in der Entstehung der atherosklerotischen Läsion[20] und haben damit großen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität diabetischer Patienten.

1.1.6 Therapeutische Ansatzpunkte

Aufgrund des gehäuften Auftretens des Diabetes mellitus auf dem Boden des so genannten metabolischen Syndroms, zeichnete sich in den letzten Jahren immer deutlicher die Notwendigkeit ab, die Therapie nicht alleine auf den gestörten Glukose- und Insulinhaushalt zu fokussieren, sondern alle Komponenten der metabolischen Dysregulation in die Therapie mit einzubeziehen. So tragen nach derzeitigem Kenntnisstand die dem metabolischen Syndrom zugehörige Hypertonie, die diabetische Dyslipidämie und die durch den Diabetes bedingte erhöhte thrombozytäre Aktivität in gleichen Maßen wie die Hyperglykämie und die Insulinresistenz selbst zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei.[17] Folglich muss eine effiziente Therapie alle diese Komponenten mit einbeziehen, um in bestmöglicher Weise die Entstehung der Arteriosklerose zu verhindern, welche den Grundstein aller kardiovaskulären Spätkomplikationen des Diabetes darstellt.

1.1.6.1 Gewichtsreduktion

Als größter Risikofaktor für die Entstehung eines Diabetes mellitus wird das Übergewicht angesehen. Studien zu Folge weisen dementsprechend ca 80% der Diabetiker Übergewicht auf.[14] Zudem verschlechtert das Übergewicht die mit dem Diabetes mellitus einhergehenden metabolischen und physiologischen Veränderungen, wie die Hyperglykämie, Hyperlipidämie und die Hypertonie. Somit scheint es für übergewichtige Diabetiker nicht nur von entscheidender Bedeutung zu sein, durch eine Gewichtsreduktion die Insulinsensitivität zu verbessern und den Blutzucker positiv zu beeinflussen, sondern auch den metabolischen und pathophysiologischen Veränderungen entgegenzuwirken und das Mortalitätsrisiko zu senken. Lediglich mittels Diät und Verhaltensänderung läst sich ein durchschnittlicher Gewichtsverlust von ca. 8% des initialen Körpergewichts erlangen,[23]was eine Reduktion der totalen Mortalität um bis zu 25% zu Folge haben kann.[24] Somit stellt eine Änderung der Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten zwar die Basis einer Adipositastherapie dar, jedoch kann eine zusätzliche medikamentöse Therapie besonders bei Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko erforderlich sein.[4]

1.1.6.2 Hyperglykämie und Insulinresistenz

Es stehen derzeit vor allem zwei medikamentöse Ansätze zur Wahl, um der diabetischen Hyperglykämie und Insulinresistenz entgegenzuwirken. Zum einen besteht die Möglichkeit, mittels oraler Antidiabetika die Insulinsekretion zu steigern, bzw. die periphere Insulinresistenz zu mindern. Als Beispiele hierfür seien die Glitazone, die Sulfonylharnstoffe und die Glinide genannt. Zum anderen können auch verschiedene Insulinanaloga angewandt werden.[25] Einschränkend muss jedoch ergänzt werden, dass die Behandlung der Hyperglykämie zwar das Risiko mikrovaskulärer Komplikationen wie der Retinopathie und Nephropathie senkt, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf makrovaskuläre Geschehen zeigt.[26;26] Ob jedoch eine medikamentöse Minderung der Insulinresistenz einen positiven Einfluss auf makrovaskuläre Komplikationen hat, kann derzeit zumindest noch nicht für alle Insulinsensitizer konstatiert werden.[17]

Von den 5,818 Millionen Diabetikern in Deutschland im Jahr 2001 erhielten 0,957 Millionen (Prävalenz 1,1%) ausschließlich Insulin, 0,651 Millionen (Prävalenz 0,8%) wurden mit Insulin und oralen Antidiabetika behandelt und 2,581 Millionen (Prävalenz 3,1%) nahmen ausschließlich orale Antidiabetika ein. Als erschreckend erweist sich jedoch die Tatsache, dass 1,629 Millionen (Prävalenz 1,9%) Patienten mit Diabetes mellitus keine glukosesenkenden Medikamente verabreicht wurden.[13]

1.1.6.3 Dyslipidämie

Die mit dem Diabetes mellitus Typ 2 verbundenen Veränderungen im Lipidprofil setzen sich im Wesentlichen aus erhöhten Werten für Triglyceride und der atherogenetisch wirkenden kleinen dichten LDL-Partikeln (= low densitiy lipoproteins) zusammen. Im Gegensatz hierzu findet sich die Menge an atheroprotektiven HDL (= high densitiy lipoproteins) gemindert.[17] Vor allem das Zusammenspiel der erhöhten kleinen dichten LDL- und erniedrigten HDL-Konzentrationen erhöht das Atheroskleroserisiko des diabetischen Patienten. Um diesem Geschehen jedoch entgegenzuwirken, besteht die Möglichkeit einer medikamentösen Therapie mit Statinen, welche aufgrund einer Senkung der LDL-Spiegel ihre vasoprotektive Wirkung entfalten[14] und somit das Risiko kardiovaskulärer Komplikationen um 25% senken.[27] Eine andere Option stellt die Einnahme von Fibraten dar, welche zusätzlich zur Minderung des LDL-Spiegels einen Anstieg[14] des atheroprotektiven HDL[17] bewirken.

1.1.6.4 Hypertonie und erhöhte thrombozytäre Aktivität

Die Hypertonie stellt die Komponente des metabolischen Syndroms dar, durch deren Behandlung das Risiko kardiovaskulärer Komplikationen am effektivsten gesenkt werden kann.[17] Somit bildet die antihypertensive Therapie beispielsweise mittels Diuretika, ACE-Hemmern, Betablockern und Calciumantagonisten wohl die wichtigste Säule in der Behandlung des metabolischen Syndroms.[14]

Des Weiteren zeigte sich in Studien, dass der Diabetes mellitus und die Hyperglykämie mit einer erhöhten thrombozytären Aktivität einhergeht. Diese Tatsache gründet vor allem in einer erhöhten Zahl an zirkulierenden, aktivierten Thrombozyten, in größeren Thrombozyten im Vergleich zu Nicht-Diabetikern, in vermehrten Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche und in einer Hyperreaktivität gegenüber in vitro Stimuli.[28] Diese Thrombozyten besitzen die Fähigkeit sich auch an intaktes Endothel anzulagern und dort proinflammatorische Cytokine und Chemokine (z.B. IL-1ß, RANTES) und CD40-Ligand, welcher ebenfalls entscheidenden Einfluss auf die endotheliale Entzündungreaktion nimmt, freizusetzen.[22;29] Dadurch wird wiederum sowohl im Endothel, als auch in glatten Muskelzellen mit Hilfe des Transkriptionsfaktors NF-κB die Sekretion von chemotaktischen Substanzen, z.B. von „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1), und die Oberflächenexpression von Rezeptoren der Monozytenadhäsion (ICAM-1), hervorgerufen. All dies gipfelt somit in einer Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwandzellen und in der Migration glatter Muskelzellen (Intimaproliferation), beides atherogenetische Prozesse. Somit könnten die Thrombozyten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Umbauvorgänge im Bereich der Gefäßwand einnehmen.[30]

In großen klinischen Studien wurde nun nachgewiesen, dass die Einnahme des Thrombozyteninhibitors Aspirin, welcher die thrombozytäre Cyclooxygenase irreversibel hemmt, das Risiko kardiovaskulärer Geschehnisse, wie Schlaganfall und Herzinfarkt um 15% senkt.[27] Initial dachte man, diese Tatsache gründe darin, dass Aspirin die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB in Endothelzellen hemme und somit frühen Einfluss auf die Atherogenese nehme. Dieser Mechanismus konnte bislang jedoch nur unter der Einnahme hoher Dosen Aspirins beobachtet werden,[30] da Aspirin außerhalb von Thrombozyten nur eine relativ schwache Wirkung erzielt. Einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt in Bezug auf die Atheroskleroseentstehung könnten

GPIIb/IIIa-Inhibitoren darstellen. So zeigte sich im Mausmodell bereits, dass die Inhibierung aktivierter Thrombozyten mittels eines GPIIb/IIIa-Inhibitors das Fortschreiten der Formierung einer atherosklerotischen Läsion beenden kann.[22] Da jedoch diese Medikamentengruppe für die Patienten mit einem deutlich erhöhten Blutungsrisiko verbunden ist und sie nur intravenös verfügbar sind, stellt dies keine Option für die Langzeittherapie dar.

1.2 Das Endocannabinoidsystem

1.2.1 Vorkommen und Bedeutung

Das Endocannabinoidsystem ist entscheidend an der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase von Menschen und Tieren beteiligt. Es besteht aus endogenen Liganden (Anandamide und 2-Archnidonyl-Glycerol, Oleoylethanolamide und einigen anderen N-Acylethanolaminen, Arachidonoylaminosäuren und Monoacylglyceriden),[31] den für ihre Synthese und Abbau zuständigen Enzymen und zwei Typen von G-Protein gekoppelten Cannabnoidrezeptoren (CB1 und CB2).[32;33] Als zukunftsweisend in der Entstehung und Therapie der Adipositas haben sich die Cannabinoid-1-Rezeptoren erwiesen, welche sich in mehreren Hirnregionen, sowie in verschiedenen peripheren Geweben einschließlich Fettgewebe, Gastrointestinaltrakt, Hypophyse und Nebennieren, sympathischen Ganglien, Herz, Lunge, Leber und Harnblase nachweisen lassen.[34] Man fand heraus, dass eine Aktivierung zentraler CB-1-Rezeptoren Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme begünstigt. Des Weiteren zeigten Studien, dass eine Überstimulation des Endocannabinoidsystems bei Fettleibigkeit und nach fettreichem Essen erfolgt. Somit spielt das Endocannabinoidsystem eine entscheidende Rolle in der zentralen Kontrolle von Appetit, Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase.[35] Aber auch eine periphere Wirkung des Endocannabinoidsystems ist anzunehmen. So zeigt sich bei spezifischer Aktivierung von Cannabinoid-1-Rezeptoren in Adipozyten-Kulturen die Lipogenese gesteigert.[36]

1.2.2 Cannabinoid-1-Rezeptor-Antagonisten

Aus der Tatsache, dass sich bei Fettleibigkeit eine Überstimulation des Endocannabinoidsystems nachweisen lässt, bzw. dass sich die Adipositas in dieser

Überstimulation begründet, folgt der logische Umkehrschluss, dass eine Blockade der Cannabinoid-1-Rezeptoren ein neuer Ansatzpunkt in der bariatrischen Therapie sein könnte. An Mäusen, deren CB1-Funktion mittels eines genetischen Defektes ausgeschalten wurde, zeigt sich eine geminderte Nahrungsaufnahme und ein Phänotyp, gekennzeichnet durch geringeres Körpergewicht, geringerer Fettmasse und ein verbessertes metabolisches Risikoprofil, im Vergleich zu Kontrollmäusen ohne diesen genetischen Defekt.[36] Aufgrund dieser viel versprechenden Forschungsergebnisse wurden selektive Cannabinoid-1-Rezeptorantagonisten entwickelt, zu welchen auch Rimonabant zählt.

1.2.2.1 Rimonabant

Patienten mit Adipositas oder einer durch einen Typ-2-Diabetes verursachten Hyperglykämie weisen im visceralen Fettgewebe bzw. Serum höhere Endocannabinoid-Konzentrationen auf als die entsprechenden Kontrollen.[37] Rimonabant, ein selektiver Cannabinoid-1-Rezeptorblocker reduziert hier die Überaktivierung des zentralen und peripheren Endocannabinoidsystems.[38]

1.2.2.1.1 Wirkspektrum

Analog zu den CB1-Knockout-Mäusen bewirkt somit die Gabe von Rimonabant bei Mäusen eine verminderte Nahrungsaufnahme. Zusätzlich zu diesem Effekt zeigen die Versuchstiere ein geringeres Verlangen nach Genussmitteln wie gezuckerten Speisen, Alkohol und Nikotin.[3] Da sich die erlangte Gewichtsreduktion der Mäuse jedoch nicht ausschließlich auf die reduzierte Kalorienaufnahme zurückführen lässt, stellt sich die Frage nach metabolischen Effekten der Cannabinoide bzw. der CB1-Rezeptorblocker an peripherem Gewebe.

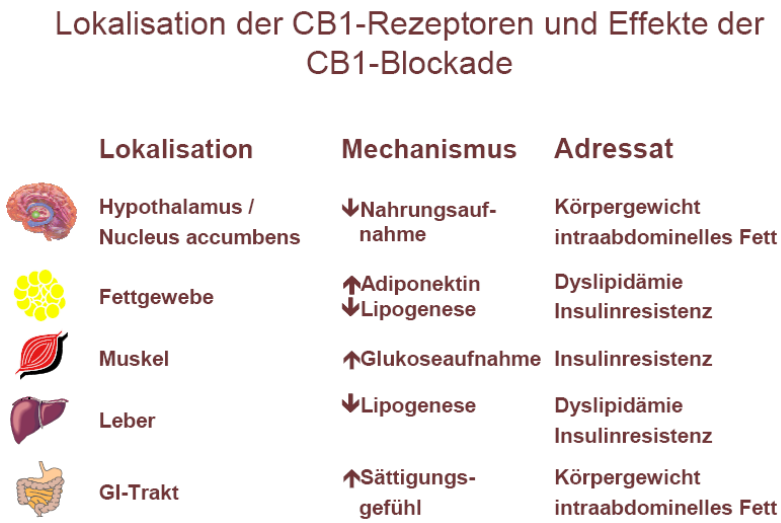

Abbildung 1: Lokalisation der CB1-Rezeptoren und Effekte der CB1-Rezeptor-Blockade

(Quelle: Rimonabant: from A to Z, Sanofi Aventis)

In der Rio-Lipids Studie, in der Rimonabant an übergewichtigen Patienten mit Dyslipidämie getestet wurde, wurde nachgewiesen, dass unter Rimonabant nicht nur eine Reduktion des Taillenumfanges erzielt wird, sondern sich auch die metabolischen Risikofaktoren für Diabetes und kardiovaskuläre Krankheiten unabhängig von der Gewichtsreduktion bessern. So stellt sich bei den Probanden eine Zunahme des HDL-Cholesterins, eine Abnahme der Triglyceride und eine Umverteilung der LDL-Partikel von kleinen dichten zu größeren ein. Weiterhin bessert sich auch die Plasma-Glukose-Insulin-Homöostase,[4] und die HbA_{1C}–Spiegel sanken bei diabetischen Probanden unter der Einnahme von Rimonabant im Vergleich zum Placebo.[37] (Abb.1) Auf welche Weise Rimonabant jedoch im Einzelnen die genannten metabolischen Veränderungen bewirkt, konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Eine Theorie gründet sich in der Tatsache, dass Rimonabant die Sekretion von Adiponektin erhöht,[38] einem möglichen Prädiktor für ein geringeres Risiko für Diabetes und kardiovaskuläre Ereignisse.[4]

1.2.2.1.2 Verträglichkeit

Rimonabant wurde zum Zeitpunkt der Marktzulassung unter kontrollierten Studienbedingungen im Allgemeinen gut vertragen. Die meist genannten unerwünschten Nebenwirkungen wurden als leicht bzw. mittelschwer eingestuft.[38] Mindestens 5% der mit Rimonabant behandelten Patienten gaben Übelkeit, Diarrhö,

Erbrechen, Schwindel, Hypoglykämie und Müdigkeit an. Diese Symptome traten jedoch nur vorübergehend auf und verliefen selbstlimitierend.[37] Als problematisch erwies sich nach Einführung jedoch das gehäufte Auftreten psychiatrischer Nebenwirkungen, wie Depressionen mit zum Teil suizidalen Absichten, Schlafstörungen, Angststörungen und Aggressionen im Vergleich zu Placebo. Folglich waren die Warnhinweise auf mögliche psychiatrische Nebenwirkungen wiederholt geändert und verschärft worden. Da zusätzlich die Wirksamkeit Rimonabants, mitunter aufgrund kurzer Einnahmezeiten, hinter den Erwartungen zurückblieb, sah sich die European Medicines Agency (EMEA) schließlich dazu veranlasst, nur gute zwei Jahre nach der Einführung Rimonabants im Juni 2006, ein Ruhen der Marktzulassung zu empfehlen. Somit zog auch die EMEA der US Food and Drug Administration nach, die ihre Empfehlung für Rimonabant bereits im Juni 2007 zurückgezogen hatte.[39] Als Reaktion auf diese Entwicklungen sah sich Sanofi- Aventis dazu veranlasst, Rimonabant im Oktober 2008 bis auf weiteres vom Markt zu nehmen.

1.3 Studiendesign

Mit dem Wissen, dass eine erhöhte thrombozytäre Aktivität bei Diabetikern einen Grundstein in der Entstehung der Atherosklerose darstellt, untersuchten wir in der folgenden Studie die Auswirkungen des Cannabinoid-1-Rezeptorblockers Rimonabant auf die Thrombozytenaktivität. Angewandt wurde Rimonabant hierbei an jungen männlichen adipösen (obese) Zucker-Ratten mit gestörter Glukosetoleranz. Als Vergleichsgruppe dienten mit Placebo behandelte gleichaltrige, männliche obese Zucker-Ratten und dünne (lean) Zucker-Ratten. Wir versuchten die Wirkweise Rimonabants, durch welche es positiven Einfluss auf kardiometabolische Risikofaktoren nimmt, zu eruieren. Besonderes Augenmerk legten wir hierbei auf die Lipidzusammensetzung, die zirkulierenden Leukozyten und Thrombozyten, sowie auf den Grad der Thrombozytenaktivierung bei den behandelten Tieren. Um ungewollte Wechselwirkungen zwischen Medikamenten zu vermeiden, wurden den Tieren während der Studie keine Medikamente, wie Antikoagulanzien, Lipidsenker oder Antidiabetika, verabreicht, die in Wechselwirkung mit der Wirkung des Rimonabants hätten treten können.

2 Material und Methoden

Der Versuch wurde gemäß dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" durchgeführt, welcher durch die „US National Institutes of Health" (NIH Publication No. 85-23, überarbeitete Form von 1996) herausgegeben wurde.

2.1 Tiere

Von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) wurden sowohl männliche, drei Monate alte „obese" Zucker-Ratten, Modell einer oralen Glukosetoleranzstörung aufgrund der genetischen Mutation (fa/fa), als auch männliche „lean" Zucker-Ratten gleichen Alters mit der genetischen Mutation (Fa/fa) bezogen. Die männlichen „lean" Zucker-Ratten dienten bei dem Versuch als gesunde Kontrollen. Die basalen Blutglukose-Werte der nicht-nüchternen Ratte zeigten sich bei den „Obese"-Zucker-Ratten leicht höher als bei den „Lean"- Zucker- Ratten.

Die Tiere wurden in Käfigen mit einer konstanten Temperatur zwischen 20-22°C und einem 12-Stunden Zyklus zwischen Hell und Dunkel gehalten. Sie erhielten freien Zugang zu Wasser und Futter. Rimonabant wurde über den Zeitraum von zwei Wochen an die männlichen „Obese" Zucker-Ratten verfüttert. Die Dosierung betrug hierbei 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag, gelöst in Gummi arabicum. Verabreicht wurde das Medikament (bezogen von der Firma Sanofi-Aventis, Berlin, Deutschland) mittels Sondenfütterung. Zur Kontrolle wurden über denselben Zeitraum eine Gruppe gleichaltriger „Lean"- und „Obese"-Zucker- Ratten mit Placebo behandelt.

In Studien mit Ratten wurden bereits niedrigere Dosen an Rimonabant verwendet, jedoch deuteten Ergebnisse des Herstellers darauf hin, dass die Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht einen günstigeren Einfluss auf die Zucker-Ratte hat hinsichtlich Gewichtszuwachs und Lipidmodifikation.[40]

2.2 Vorbereitung

Die Tiere wurden zu Beginn der Versuche mittels Isofluran in eine tiefe Allgemeinnarkose versetzt, wobei die Spontanatmung erhalten blieb. Im Anschluss daran wurden sie gewogen und es erfolgte unter völliger Schmerzfreiheit der Ratten die Eröffnung der Bauchhöhle. Nach Freipräparation der Vena cava inferior wurde diese

dann punktiert und das Blut in Röhrchen abgezogen, die entweder mit 3,8% Natrium Citrat oder EDTA gefüllt waren. Zusätzlich erfolgte bei jedem Tier die Messung des Blutglukosegehalts mittels eines handelsüblichen Blutzuckermessgerätes. Im letzten Schritt wurde das viscerale Fett herauspräpariert und abgewogen.

2.3 Blutbild

Anhand von EDTA-antikoaguliertem Blut wurde im Anschluss an die Entnahme sofort ein Differentialblutbild bestimmt, wobei Ratten-spezifische Einstellungen an dem für Tierblut geeigneten Analysator (Sysmex XT-2000iV, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) gewählt wurden. Verglichen werden konnten hierdurch die Anzahl der Monozyten, neutrophilen Granulozyten und die Menge der Thrombozyten zwischen Rimonabant- und Placebo-behandelten Tieren.

Die Analyse im Sysmex 2000iV erfolgte nach den technischen und methodischen Grundlagen der Durchflusszytometrie.[41] Hierbei wurden in Abhängigkeit von der Einstellung bestimmte Zellen oder Zellteile angefärbt und sowohl eine Vorwärtslichtstreuung, als auch eine Seitwärtslichtstreuung detektiert. Je mehr Nukleinsäure hierbei eine Zelle enthält, desto größer fällt die Seitwärtslichtstreuung auf der X-Achse aus. Je größer jedoch die Zelle an sich ist, desto deutlicher auch die Vorwärtslichtstreuung auf der Y-Achse. (Abb.2)

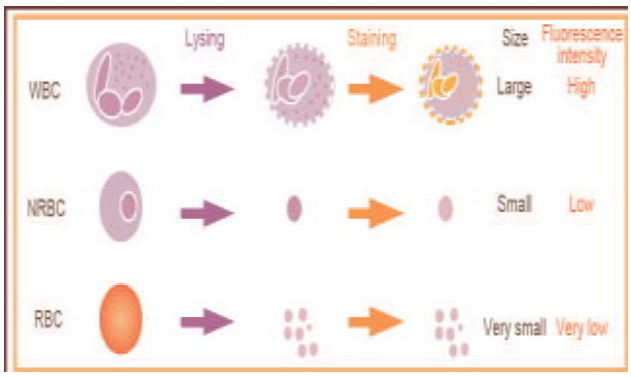

Abbildung 2: Grundlagen der Durchflusszytometrie

Je größer die Menge der Nukleinsäure in einer Zelle, umso größer das seitliche Fluoreszenzsignal auf der X-Achse.

WBC: Leukozyten

NRBC.Retikulozyten

RBC: Erythrozyten

(Quelle: http://www.sysmex.de/files/f1/Image/pic_279/452_NRBCch.pdf)

Die Bestimmung des Differentialblutbildes wurde im „DIFF Kanal“ durchgeführt. Mittels zweier Tenside (STROMATOLYSER-4DL; STROMATOLYSER-4DS)

wurden hier zum einen Erythrozyten und Thrombozyten lysiert und zum anderen die Nukleinsäuren und zytoplasmatischen Organelle der Leukozyten angefärbt. Zudem bewirkte eine in STROMATOLYSER-4DL enthaltene organische Säure die Anfärbung der Granula in den Eosinophilen, was die Abgrenzung von den ansonsten ähnlich erscheinenden Neutrophilen anhand der größeren Seitwärtslichtstreuung ermöglichte. (Abb.3)

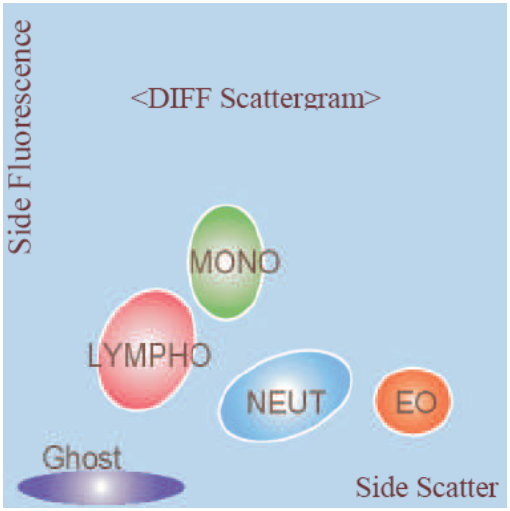

Abbildung 3: Differentialblutbild

Je größer die Lappung der Zellkerne und die Menge an Granula im Zytoplasma, umso größer der „side scatter". Je mehr Nukleinsäure eine Zelle enthält, umso größer die „side fluorescence" .[42]

Ghost: lysierte Zellen

Lympho: Lymphozyten

Mono: Monozyten

Neut: Neutrophile

EO: Eosinophile

(Quelle: http://www.sysmex.de/files/f1/Image/pic_279/diffch.pdf)

Bei der Bestimmung der Thrombozytenzahl wurde immer das thrombozytenspezifische Fluoreszenzsignal im RET-Kanal verwendet. Die Messung fand in diesem Kanal bei 41°C statt, um eine Interaktion mit eventuell vorhandenen Kryoglobulinen zu vermeiden.[42]

2.4 Bestimmung der Chemokine CCL5 (RANTES) und CCL2 (MCP-1)

Die Serumspiegel der Chemokine CCL5 (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted; RANTES) und CCL2 (monocyte chemotactic protein-1; MCP-1) wurden mittels zweier „Enzyme-linked immunoabsorbent assay" (ELISA) bestimmt. (Abb.4) Beide ELISAs, vom Typ MMROO RANTES immunoassay und MJEOO JE/MCP-1 immunoassay, wurden von der Firma R&D Systems in Wiesbaden (Deutschland) bezogen.

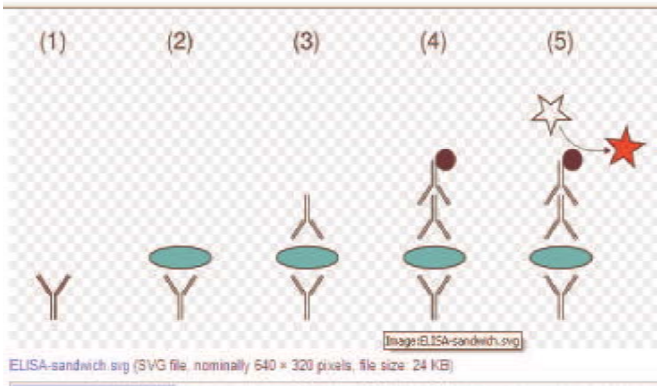

Abbildung 4: Sandwich ELISA.

(1) Mit *coating*-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte; (2) Zugabe der Probe und Inkubation; (3) Zugabe des Detektions-Antikörpers; (4) Zugabe und Komplexbildung des *enzyme-linked* Antikörper - Antigen - Antikörper; (5) Zugabe eines zum Enzym passenden Substrats, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird.

(Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_Immunosorbent_Assay)

2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, wie oben bereits beschrieben, Einzelzellen in Suspension anhand ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften zu identifizieren. Durch Zugabe spezifischer, fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper können die Zellen weiterhin anhand ihrer Oberflächenantigene analysiert werden. Nach dem Einbringen der Zellen in den Meßbereich, detektiert hierbei ein Laserstrahl (Argonlaser) Einzelzellen, die in einem konstanten Fluss an diesem vorbeigeführt werden.[30] Die Wellenlänge des monochromatischen Lichtstrahls beträgt 488nm. Trifft dieses Licht auf die Einzelzelle, sendet diese in Abhängigkeit ihrer Größe, Gestalt und spezifischen Anfärbung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels spezieller Photodioden gemessen werden können. Diese Lichtstreuung ist abhängig von Zellgröße, Membranstruktur und von der Art der intrazellulären Bestandteile (z. B. Vakuolen). Man unterscheidet bei der Lichtstreuung ein Vorwärtsstreulicht, welches Informationen über die Zellgröße gibt und ein Seitwärtsstreulicht, durch welches man Informationen über die Granularität der Zellen erhält. Werden die Zellen vor der Messung mit fluorchromkonjungierten Antikörpern markiert, so erhält man Aufschluss über die Expression von Oberflächenantigenen. In dieser Studie wurden bei jeder Zelle folgende drei Einzelparameter gleichzeitig gemessen: Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und

Fluoreszensignal 1.[30 43] Die dadurch ermittelten Ergebnisse wurden schließlich in einem „DotPlot“ (Punktauftragung) aufgezeigt, wobei die Hauptfluoreszenz durch einen bedeutungslosen Antikörper auf den beliebigen Wert von 10 justiert worden war, bevor Proben mit spezifischen Antikörpern gemessen wurden. Die darauf folgenden Ergebnisse wurden jedoch nur aufgeführt, sofern sie sich in einem definierten Thrombozytenareal (R1) des ursprünglichen DotPlots befanden.

In unserem Versuch wurden demnach Thrombozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen P-Selektin und gegen Thrombozyten-gebundenes Fibrinogen markiert, die ihrerseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjungiert waren, um die spezifischen Veränderungen aktivierter Thrombozyten zu beobachten. Um sicher zu gehen, dass der dargestellte Bereich R1 eine möglichst hohe Reinheit an Thrombozyten aufwies, wurden separate Proben mit Antikörpern gegen das thrombozytenspezifische Antigen CD42 angefärbt. Der Anteil der CD42 positiven Zellen in R1 konnte nun bestimmt werden. Bei allen Versuchen wurde zudem ein Puffer, bestehend aus 100mg BSA, 20mg D-Glukose (5.5mM) und 20ml PBS (Ca^{2+}- und Mg^{2+}-frei) verwendet.

2.5.1.1 Fibrinogen

Um Auskunft über die in vivo Aktivierung der Thrombozyten zu erhalten, wurde die Fibrinogen-Bindung am aktivierten thrombozytären Glykoprotein IIb/IIIa durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Hierzu wurden je 40µl Vollblut in die mit 50µl PBS-Puffer vorgelegten lichtgeschützten Reaktionsgefäße gefüllt und anschließend mit 10µl Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC) markierten Antikörpern für zehn Minuten inkubiert. Ein FITC-markierter Anti-Fibrinogen-Antikörper (WAK-Chemie, Steinbach, Deutschland) diente als Antikörper, um das an aktiviertem GPIIb/IIIa gebundene Fibrinogen darzustellen. Im Anschluss an die Inkubation wurden jeweils 30µl des Ansatzes mit 60µl Puffer verdünnt und mit jeweils 10µl methanolfreiem Formaldehyd für zehn Minuten fixiert. Danach erfolgte die erneute Zugabe von 300µl Puffer. Um einen Leerwert zu erhalten, wurde bei jeder Versuchsreihe eine antikörperfreie Kontrollprobe mit angefertigt. Die Proben wurden bis zur endgültigen Messung bei 4°C gelagert. Durchgeführt wurden die Messungen schließlich bei niedriger Flussrate mit dem BectonDickinson FACSCalibur. Als Software diente die CELLQuest Software, Version 3.1f. Die Thrombozytenpopulation konnte nun aufgrund ihrer spezifischen Vorwärts- und Seitwärtsverteilung identifiziert und ihre Fluoreszenzsignale detektiert

werden. Als Endpunkt der Messung wurden 20.000 gemessene Ereignisse festgelegt. Die Fluoreszenzsignale der ungefärbten Leerprobe wurden willkürlich auf den Wert 10 festgesetzt und bei den Graphen subtrahiert, um unspezifische Bindungen zu eliminieren.

2.5.1.2 VASP

VASP (Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein) kommt in hohen Konzentrationen in Thrombozyten vor. Zudem korreliert ein am Serin^{157}-phosphoryliertes VASP eng mit der Hemmung des Fibrinogen-Rezeptors.[44] Um den Phosphorylierungszustand des VASP zu eruieren, erfolgte zunächst die Fixation von je 100µl Vollblut mit 50µl methanolfreiem Formaldehyd für 5 Minuten. Im Anschluss daran wurden 100µl Puffer zugegeben und die Zellmembranen permeabilisierten mittels 25µl Triton X 100 (0,2%). Es folgte eine 10minütige Inkubationszeit und danach ein weiterer Verdünnungsschritt. Anschließend wurden 200µl des Ansatzes mit 20µl des FITC-markierten Antikörpers gegen phosphoryliertes VASP-Ser^{157} (5C6, Nanotools, Tenningen) inkubiert. Parallel wurde eine weitere Probe angesetzt, um die Fluoreszenz der unspezifischen Bindung zu ermitteln. Hierbei wurde der gleiche FITC-markierte Antikörper benutzt, wobei dieser zuvor allerdings mit einem blockenden Phosphopeptid für mindestens 30 Minuten bei 4°C inkubiert worden war. Beide Proben wurden daraufhin nach einer 45minütigen Inkubationszeit mit dem Antikörper bei Raumtemperatur im FACSCalibur gemessen.

2.5.1.3 ADP-induzierte P-Selektin Expression

Eine weitere Versuchsreihe diente dem Ziel die ADP-induzierte P-Selektin-(CD62P) Expression auf der Thrombozytenoberfläche zu bestimmen. Diese korreliert mit der Thrombozytenreaktivität in vitro. Verwendet wurde hierbei Citrat (3,8%)-Vollblut, welches bei 180g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert wurde. Anschließend erfolgte die Verdünnung des so gewonnenen Plättchenreichen Plasmas (PRP) mit PBS-Puffer auf 250 000 Thrombozyten pro µl. Zusammen mit 60µl Puffer wurden jeweils 20µl des PRPs in lichtgeschützte Reaktionsgefäße gegeben. Danach wurden die Proben zunächst für 10 Minuten mit 5µl ADP zum Erreichen der finalen Konzentrationen von 5, 10, 15 und 20µM stimuliert, bevor der Antikörper gegen P-Selektin hinzugegeben wurde. FITC-markiertes Anti-P-Selektin (BioCytex, Marseille, Frankreich) diente hierfür als Antikörper. Nachfolgende Verdünnungsschritte, die

Fixation mit Formaldehyd, sowie die Messungen der P-Selektin-Expression am FACS-Gerät erfolgten wie bereits unter 2.5.1.1. beschrieben.

2.6 Thrombozytenaggregation

2.6.1 Funktionsprinzip

Um die Stärke der thrombozytären Aggregation auf verschiedene Stimuli zu ermitteln, wurde das turbimetrische Verfahren nach Born benutzt. Anhand dieses photometrischen Messverfahrens kann die Änderung der optischen Dichte einer Partikelsuspension bestimmt werden. Hierzu wird die zu messende Probe in den Messkanal, bestehend aus einer Lichtquelle und einer gegenüberliegenden Photozelle, eingebracht. Die Probe selbst befindet sich in einer gläsernen Messküvette und wird mit Hilfe eines kleinen Rührmagneten bei konstanter Umdrehungszahl (900/min) gerührt (Abb.5). Nach Zugabe verschiedener Stimuli zu plättchenreichem Citratplasma kommt es zur Aggregatbildung. Hierbei gilt: Je stärker die Thrombozytenaggregation, desto mehr nimmt die Trübung der Suspension ab und somit die Lichttransmission zu, welche fortlaufend photometrisch registriert und anschließend als Funktion der Zeit in Form einer Aggregationskurve angezeigt wird. Somit stellt die Änderung der Lichttransmission letztlich das Maß für die Aggregabilität der Thrombozyten dar.[30]

.

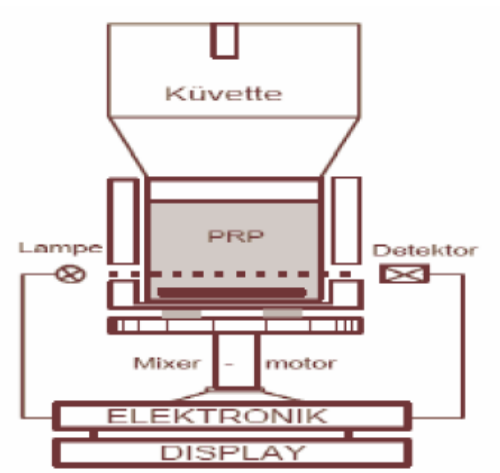

Abbildung 5: Messprinzip der Thrombozytenaggregation
(aus Reuter, HD. Grundlagen und Praxis der Thrombozytenfunktiosdiagnostik. 3,1-172. Köln, Science Data Sopply.)

2.6.2 Durchführung

Das für diesen Versuch benötigte PRP wurde durch die Zentrifugation von Citratblut mit 180g für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewonnen und für 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Daraufhin wurde zunächst plättchenarmes Plasma (PPP) als Referenzprobe gemessen, um die Lichtdurchlässigkeit im Falle einer 100%igen Aggregation festzustellen. Es folgte die Messung der PRP-Suspension ohne Zugabe von Induktoren, was den Nullwert der Lichttransmission ergab. Im Anschluss daran wurde durch Einbringen des Induktors Thrombin in verschiedenen Konzentrationen die Thrombozytenaggregation ausgelöst und mittels eines kommerziell erhältlichen Aggregometers (Platelet aggregation profiler, PAP-8, BioData, Horsham, PA) gemessen.

2.7 Flusskammermodell zur Thrombozytenadhäsionsmessung

Bei diesem Versuch wurden gereinigte Thrombozyten durch eine Flusskammer, bestehend aus einem Metallgehäuse und beschichteten Glasträgern perfundiert, um die Adhäsion der Thrombozyten an einer fibrinogenbeschichteten Membran unter arteriellen Flussbedingungen zu simulieren.

2.7.1 Vorbereitung der Thrombozytensuspension

Es wurde Vollblut zusammen mit einem Citratsäure/Dextrose–Gemisch (ACD: Citratsäure 3,8 mM und Dextrose 125nM; 1ml ACD/4ml Blut) verwandt. Durch Zentrifugation des Vollblutes mit 180g für 10 Minuten wurde thrombozytenreiches Plasma (PRP) hergestellt. Im Anschluss hieran wurde das PRP mit HEPES-modifiziertem Tyroden-Puffer 1 (132mM NaCl, 4mM KCl, 11,9 mM $NaHCO_3$, 0,36 mM NaH_2PO_4, 10mM Glucose, pH6,5; 1ml PRP/3,5ml Puffer 1) verdünnt. Durch eine weitere Zentrifugation (900g, 10 Min.) wurde aus dem PRP dann ein Thrombozytenpellet gewonnen, von welchem der Überstand aus der 2. Zentrifugation abpipettiert wurde. Das Pellet wurde nun in HEPES- modifiziertem Tyroden 2 Puffer (Puffer 1; pH 7,4; 1mM $CaCl_2$; 1mM $MgCl_2$) aufgelöst, so dass eine finale Thrombozytenkonzentration von 100000/µl erreicht wurde. Jeweils 5 ml der Suspension aus gewaschenen Thrombozyten wurden in eine 50 ml Perfusorspritze aufgezogen und für 15 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C gewärmt.

2.7.2 Durchführung der Thrombozytenadhäsionsmessung

Nach dem Reinigen und Verdünnen der Thrombozyten wurde die vorgewärmte Perfusorspritze in den mit der Flusskammer verbundenen Perfusor eingespannt. Die Thrombozyten wurden nun unverzüglich für 10 Minuten bei konstanter Geschwindigkeit durch die Kammer perfundiert. Im Anschluss daran erfolgte mit der gleichen Scherrate für fünf Minuten die Perfusion von HEPES-modifiziertem Tyroden-Puffer. Gemäß eines Protokolls für einen ähnlichen Versuch mit menschlichen Thrombozyten[45] wurde die Adhäsion der Thrombozyten unter arteriellen Flussbedingungen, das heißt bei einer Scherrate von 1000/s, untersucht und die Ergebnisse mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Um Zeit einzusparen, wurde während einer Thrombozytenadhäsionsmessung bereits die Suspension für die folgenden Experimente in konstanten Intervallen vorgewärmt. Und um eine eventuelle Aktivierung oder Erschöpfung der Thrombozyten zu vermeiden und somit gut reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde das Intervall zwischen letzter Zentrifugation und Perfusion durch die Flusskammer auf eine Stunde begrenzt.

2.7.3 Technische Informationen

Verwendet wurde bei diesem Versuch eine aus zwei parallelen Glasplatten bestehende Flusskammer (FCS2, Bioptechs Inc., Butler, PA), welche auf die Plattform eines invertierten Mikroskops (TE 2000-S, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) montiert wurde. Die Deckplatten der Flusskammer waren mit einer definierten Konzentration an Fibrinogen beschichtet worden.

Zur Dokumentation der Thrombozytenadhäsion wurden Bilder mit einer Digitalkamera (DS-2M, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) aus 5-8 unterschiedlichen Blickfeldern (20x Objektiv) aufgenommen.

2.8 Substanzen

Soweit nicht anderweitig angegeben, wurden alle Chemikalien von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) in der am höchsten erhältlichen Reinheit bezogen.

2.9 Statistik

In den Grafiken werden alle Messwerte als arithmetisches Mittel ± SEM angegeben. „n“ gibt hierbei die Anzahl der durchgeführten Versuche bzw. die Anzahl der untersuchten Ratten an. Für die statistischen Vergleiche wurden durchwegs nicht-parametrische Tests verwendet. Bei Gruppen–Vergleichen wurde der Kruskal-Wallis-Test benutzt. Im Falle von signifikanten Ergebnissen wurde ein Student-T-Test angewandt, nachdem die Gleichheit der Varianzen mittels eines Levene`s Test geprüft worden war. Zur Korrektur mehrerer Testverfahren wurde auch die Bonferroni-Methode benutzt. Ein P-Wert ‹ 0,05 wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Metabolische Werte

3.1.1 Körpergewicht

Um die Auswirkungen von Rimonabant auf das Körpergewicht der Ratten beurteilen zu können, wurde jedes Tier nach Einleitung der Narkose zuerst gewogen. Hierbei wiesen die bei Versuchsdurchführung 12-Wochen alten, unbehandelten Obese-Zucker-Ratten (Obese) ein höheres Körpergewicht auf als die altersentsprechenden Lean-Zucker-Ratten (Lean). Durch die zweiwöchige Gabe von Rimonabant (Dosis von 10mg/kg Körpergewicht pro Tag) konnte das durchschnittliche Gewicht der Obese-Zucker–Ratten (Rimo) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Obese) reduziert werden. Trotz dieser Gewichtsreduktion lag das Körpergewicht der mit Rimonabant behandelten Tiere allerdings auch am Ende des Versuchs deutlich über dem der Lean-Zucker-Ratten. (Abb.6)

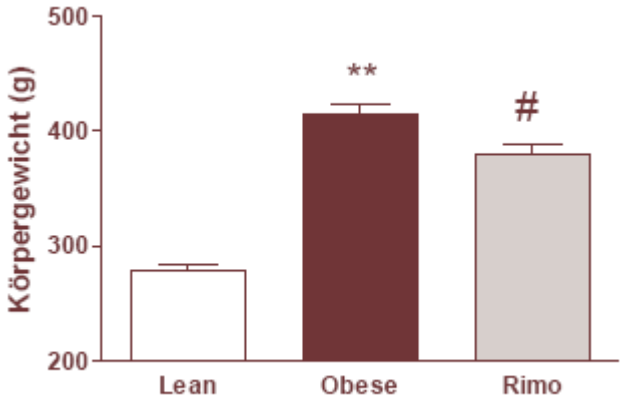

Abbildung 6: Körpergewicht

Körpergewicht der 10 Wochen alten Obese-Zucker-Ratten im Anschluss an die 2-wöchige Gabe von Rimonabant (Rimo) verglichen mit altersentsprechenden Placebo-behandelten Zucker-Ratten (Obese) und Lean-Zuckerraten (Lean). Durch die Einnahme von Rimonabant sank das durchschnittliche Körpergewicht im Vergleich zur Placebo-Gruppe.

Daten entsprechen Mittelwert ± SEM; n = 10-20; ** $P < 0.01$ vs. Lean; $^{\#}$ $P < 0.05$ vs. Obese

3.1.2 Viscerales Fett

Neben dem Gesamtkörpergewicht wurde bei diesem Versuch auch das spezifische Gewicht des visceralen Fettes, als Prädiktor des kardiovaskulären Risikos, bei den Tieren bestimmt. Obwohl sich durch die Gabe von Rimonabant signifikante

Veränderungen am Gesamtgewicht zeigten, konnten hinsichtlich des Anteils des visceralen Fettes keine signifikanten Unterschiede zwischen Rimonabant- und Placebo behandelten Tieren eruiert werden. Beide Tiergruppen hatten in etwa die gleiche durchschnittliche Menge an intraabdominellem Fett. Die Lean-Zucker-Ratten wiesen auch hier eine signifikant geringere Menge an visceralem Fett auf als die Obese-Tiere. (Abb.7)

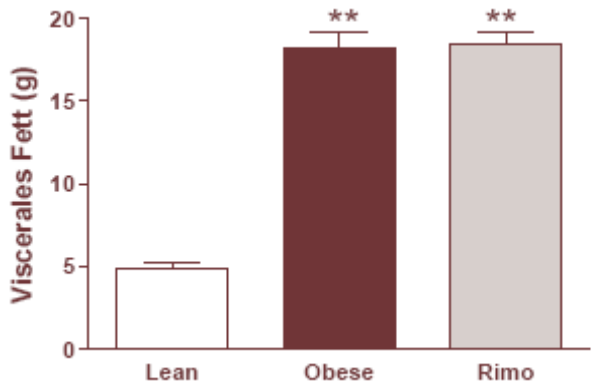

Abbildung 7: Gewicht des visceralen Fettes

Gewicht des visceralen Fettes der 10 Wochen alten mit Rimonabant behandelten Obese-Zucker-Ratten verglichen mit gleichaltrigen Placebo-behandelten Tieren und den Lean-Zucker-Ratten. Rimonabant erbrachte hier keinen signifikanten Effekt. Signifikante Unterschiede zeigten sich nur zwischen den Lean-Zucker-Ratten und beiden Gruppen von Obese-Ratten.

Daten entsprechen Mittelwert ± SEM; n= 10-20; ** P< 0.01 vs Lean.

3.1.3 Blutglukose

Da in dieser Arbeit der Effekt von Rimonabant speziell auf prä-diabetische Tiere untersucht werden sollte, wurde bei jedem Tier ein Teil des gewonnenen Blutes zur Bestimmung des Blutzuckers verwandt. Hinsichtlich der Blutglukosespiegel zeigten sich sowohl zwischen den Rimonabant- und den Placebo-behandelten Obese-Tieren, als auch zwischen den Lean-Ratten und beiden Gruppen von Obese-Zucker-Ratten keine signifikanten Unterschiede, obwohl die basalen Blutglukose-Werte bei den Obese-Ratten gering höher ausfielen als bei den Lean-Ratten. Alle drei Gruppen wiesen jedoch aufgrund ihrer Genetischen Defekte und als Zeichen der Glukosetoleranzstörung hohe Blutglukosewerte im nicht-nüchternen Zustand auf. (Abb.8), auch wenn ein Diabetes im eigentlichen Sinne bei den Tieren nicht besteht.

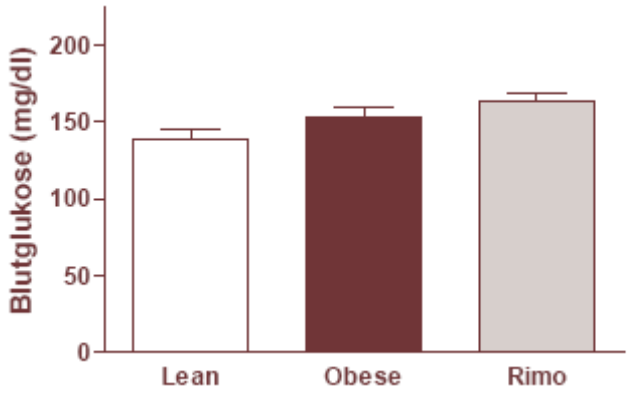

Abbildung 8: Blutglukosewerte

Vergleich der basalen Blutglukosewerte der nicht-nüchternen Ratte zwischen Rimonabant- und Placebo-behandelten Obese-Ratten und den Lean-Zucker-Ratten als Kontrolltieren. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen.

Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n = 10-20.

3.1.4 HbA_{1c}

Das $HbA1_C$ stellt als glykosiliertes Hämoglobin der Erythrozyten einen Marker des Langzeitblutzuckers dar. Demnach gibt es Aufschluss über den durchschnittlichen Blutzuckerwert der letzten acht Wochen,[14] was sich auf die durchschnittliche Lebensdauer der Ratten-Erythrozyten von 50-60 Tagen zurückführen lässt.[46] Analog zu den geringen Unterschieden hinsichtlich der basalen Blutglukose-Werten zwischen den Tiergruppen, konnten jedoch auch bei der Bestimmung des HbA_{1c} keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen, behandelten und unbehandelten Tieren gefunden werden. Allerdings lässt sich hier einschränkend sagen, dass die Placebo-behandelten Obese-Ratten leicht höhere HbA_{1c}–Werte aufwiesen als die Lean-Kontrollen, wogegen sich dieser Umstand bei den mit Rimonabant- behandelten Ratten im Vegleich zu den Kontrollen nicht fand. (Abb.9) Dies könnte somit lediglich auf einen Trend zur Blutzuckersenkung bei jungen Obese-Zucker- Ratten unter Rimonabant- Einnahme hindeuten.

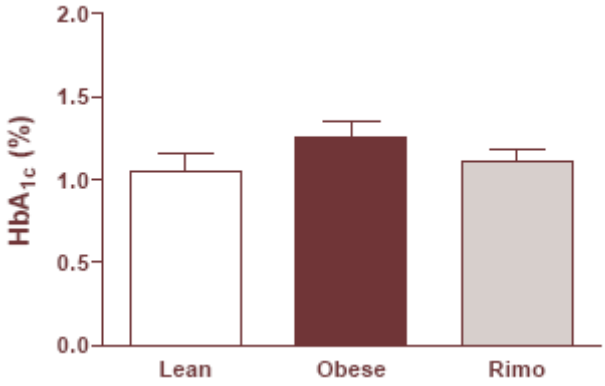

Abbildung 9: HbA_{1c}- Werte

HbA_{1c}–Werte der Rimonabant (Rimo)- und Placebobehandelten (Obese) Tiere im Vergleich zu Lean-Zucker-Ratten. Die Mittelwerte der der drei Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n = 10-20.

3.2 Blutwerte

3.2.1 Zirkulierende Thrombozyten

Wie unter 1.1.6.4 bereits beschrieben, spielen Thrombozyten bei Diabetikern eine nicht unerhebliche Rolle bei der Frühentstehung der Atherosklerose. Da Rimonabant bekanntermaßen das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse mindert, deren Auftreten zumeist im Vorhandensein einer schweren Atherosklerose gründet, wurde untersucht, ob sich Rimonabant auf die Menge der zirkulierenden Thrombozyten auswirkt. Die Anzahl der Thrombozyten unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen den drei Tiergruppen. Dies galt unabhängig davon, ob Rimonabant verabreicht wurde oder nicht. (Abb. 10)

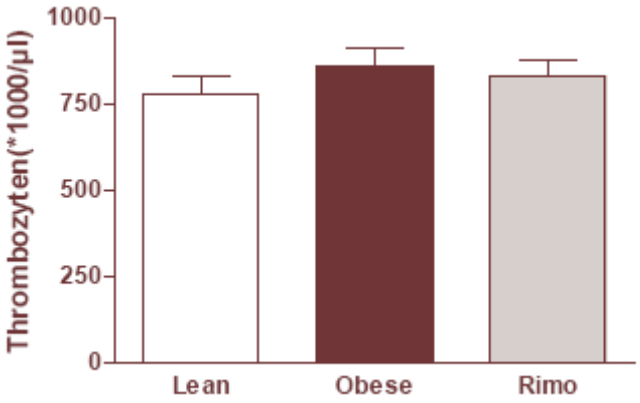

Abbildung 10: Thrombozytenzahl

Anzahl der zirkulierenden Thrombozyten im Blut der verschiedenen Tiergruppen (bestimmt mit dem für Tierblut geigneten Analysator Sysmex XT 2000iV). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Thrombozytenmenge gefunden werden. Daten entsprechen Mittelwert ± SEM; n= 10-20.

3.2.2 Leukozytenpopulationen

Auch die Leukozyten, insbesondere die Untergruppe der Monozyten, leisten durch die Einwanderung in die Gefäßwandzellen ihren Beitrag zur Entstehung der Atherosklerose (vgl.1.1.6.4). Aus diesem Grunde wurden die totale Leukozytenzahl, die Menge der Neutrophilen und die Anzahl der Monozyten bestimmt. Hierbei zeigten sich erhebliche Unterschiede bezüglich der Leukozytenpopulationen. So fiel die totale Leukozytenzahl bei den Obese-Zucker-Ratten, welche Placebo erhalten hatten, höher aus als bei den Lean-Zucker-Ratten. Und nach 2-wöchiger Behandlung mit dem Cannabinoid-1-Rezeptorblocker näherten sich die Werte der Obese-Tiere denen der Lean-Ratten an. (Abb.11)

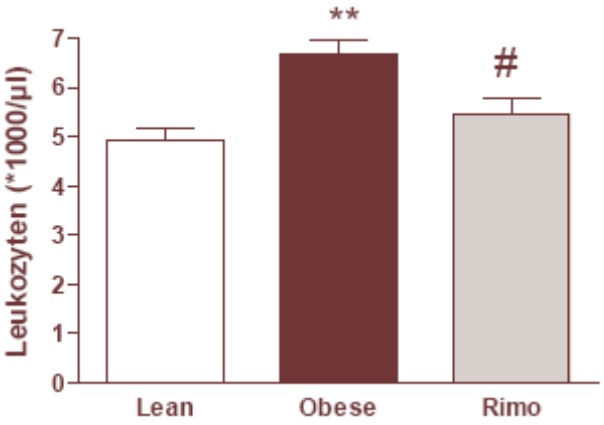

Abbildung 11: Totale Leukozytenzahl
Leukozytenzahl der behandelten (Rimo) und unbehandelten (Obese) Obese-Tiere im Vergleich zu Lean-Kontrollen (Lean). Durch die Behandlung mit Rimonabant zeigten die Obese-Tiere (Rimo) ähnliche Werte wie die Kontrolltiere (Lean).
Daten entsprechen Mittelwert ± SEM; n= 10-20. ** $P < 0.01$ vs. Lean; # $P < 0.05$ vs. Placebo.

In gleicher Weise verhielt sich auch die Menge der zirkulierenden Neutrophilen. (Abb. 12)

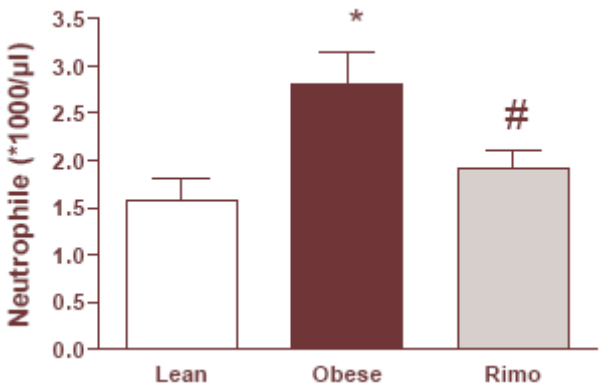

Abbildung 12: Menge der im Blut gemessenen Neutrophilen
Bei den unbehandelten Obese-Zucker-Ratten (Obese) wurde die höchste Neutrophilenmenge der drei Gruppen gemessen.
Daten entsprechen Mittelwert ± SEM; n= 10-20. * $P < 0.05$ vs. Lean; # $P < 0.05$ vs. Placebo.

Ein ebensolcher Trend wie bei der Gesamtzahl der Leukozyten und der Menge der Neutrophilen lies sich auch bei der Zahl der Monozyten erkennen. Auch hier lagen die

Werte der Obese-Tiere ohne Medikamentengabe über den der Lean-Tiere. Unter der Behandlung mit Rimonabant fanden sich dann aber im Vergleich zu den unbehandelten Tieren reduzierte Monozytenzahlen, die nur gering höher als die der Lean-Tiere lagen. (Abb.13)

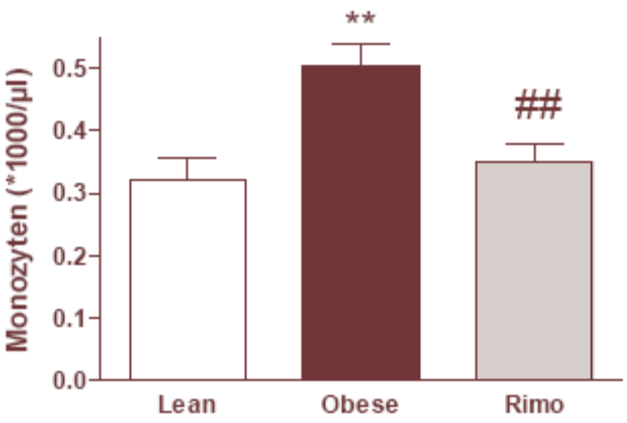

Abbildung 13: Anzahl der Monozyten im Blut.
Durch Rimonabant (Rimo) sank die Monozytenmenge im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Obese) auf eine mit den Kontrolltieren (Lean) vergleichbare Konzentration.
Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n= 10-20. ** $P < 0.01$ vs. Lean, $^{\#\#}$ $P < 0.01$ vs. Placebo.

3.3 Serumspiegel von Chemokinen und Lipoproteinen

3.3.1 MCP-1 und RANTES

Die Chemokine MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1“) und RANTES („Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted“) spielen eine große Rolle in der Entstehung der atherosklerotischen Läsion. Während RANTES unter anderem aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird, erfolgt die Ausschüttung von MCP-1 durch Endothelzellen der Gefäßwand nach Interaktion mit aktivierten Thrombozyten. Beide pro-atherosklerotischen Chemokine stellen einen wesentlichen chemotaktischen Faktor für Monozyten dar,[22;30] was in der Einwanderung der Monozyten in die Gefäßwand gipfelt.[20;47;48] Um ein eventuelles Eingreifen Rimonabants in diesen Signaltransduktionsweg zwischen Thrombozyten und Monozyten zu untersuchen, wurden die Serumspiegel von MCP-1 und RANTES mittels ELISA bestimmt.

Hierbei fanden sich sowohl bei den behandelten, als auch bei den unbehandelten Obese-Tieren die Serumspiegel beider Chemokine im Vergleich zu den Lean-Ratten erhöht. Durch die nur zweiwöchige Verabreichung von Rimonabant konnte keine signifikante Reduktion dieser beiden pro-atherosklerotischen Stoffe erreicht werden. (Abb. 14 u.15)

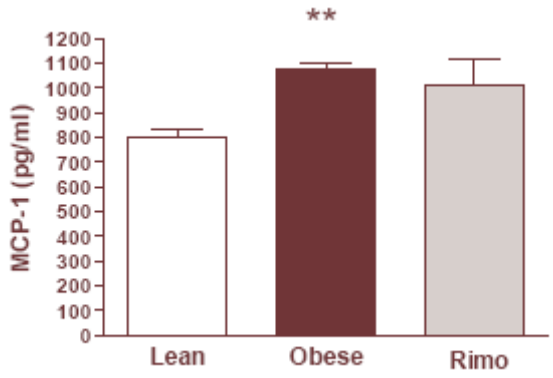

Abbildung 14: Serumspiegel des Chemokins MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)
Die Werte beider Obese-Tiergruppen (Obese und Rimo) lagen signifikant über denen der Kontrolltiere (Lean). Durch Rimonabant konnte keine signifikante Reduktion erreicht werden.
Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n=5,
** P < 0.01 vs. Lean.

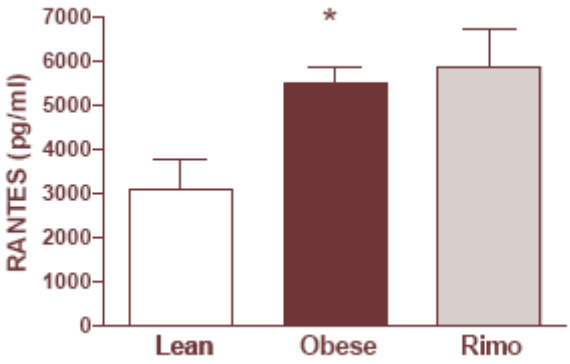

Abbildung 15: Serumspiegel des Chemokins RANTES ("Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted")
Beide Obese-Gruppen wiesen signifikant höhere Werte auf als die Kontrolltiere. Rimonabant bewirkte auch hier keine Reduktion von RANTES.
Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n= 5
* P < 0.05 vs. Lean.

3.3.2 Lipoproteine

Da, wie unter 1.1.6.3. bereits berichtet, auch die Dyslipoproteinämie einen Grundstein in der Atheroskleroseentstehung darstellt, schien es in dieser Arbeit auch von besonderem Interesse, ob Rimonabant das Lipidprofil der diabetischen Ratte positiv beinflussen könne. Es wurden demnach die Serumspiegel für Triglyceride, Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin bestimmt.

Bei der Analyse fanden sich dann die Werte für Triglyceride, Gesamt-Cholesterin und LDL-Cholesterin bei den Obese-Ratten im Vergleich zu den gleichaltrigen Lean-Ratten deutlich erhöht. (Abb.16, 17 u. 18) Nach der zweiwöchigen Gabe von Rimonabant zeigten sich bei den behandelten Tieren die Triglyceridspiegel auf nahezu die Hälfte reduziert im Vergleich zu den nicht Behandelten. (Abb.16) Die Werte des Gesamt- und LDL-Cholesterins blieben dagegen von der Wirkung des Cannabinoid-1-Rezeptorantagonisten unbeeinflusst. (Abb.17 u. 18)

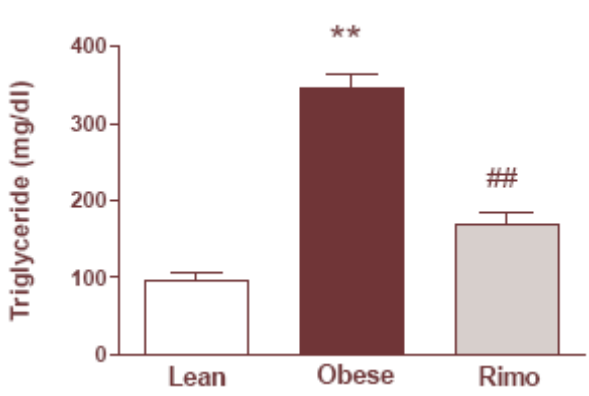

Abbildung 16: Serumspiegel der Triglyceride

Durch die Einnahme von Rimonabant halbierte sich nahezu die Menge der Triglyceride im Serum bei den Obese-Ratten.

Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n=5,

** P < 0.0.1 vs. Lean; ## P < 0.01 vs. Placebo.

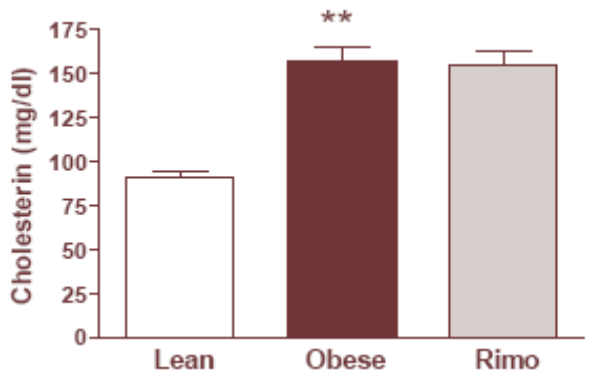

Abbildung 17: Menge des Gesamtcholesterins im Serum

Signifikanter Unterschied zwischen Lean- und Obese-Tieren, dagegen kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren.

Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n=5

** P <0.01 vs. Lean.

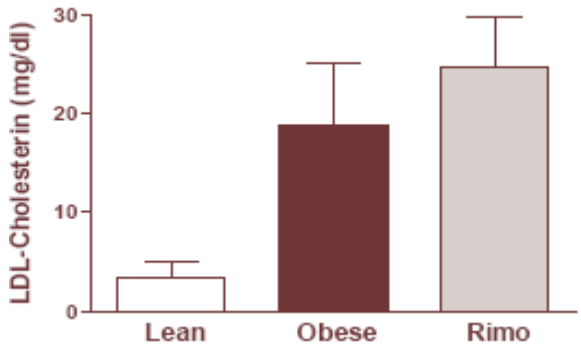

Abbildung 18: LDL- Cholesterinspiegel im Serum

Zwischen den drei Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied eruiert werden. Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n= 5.

Obwohl sich Rimonabant nicht auf die Serumspiegel des Gesamt- und LDL-Cholesterins auswirkte, machte sich die Wirkung des Cannabinoid-1-Rezeptorantagonisten an der Menge des HDL-Cholesterins im Serum bemerkbar. So wiesen zwar die Lean-Kontrollen und die placebobehandelten Obese-Tiere nahezu identische HDL-Spiegel auf, jedoch konnten nach zweiwöchiger Gabe von Rimonabant

bei den behandelten Tieren signifikant erhöhte HDL-Konzentrationen gefunden werden. (Abb.19)

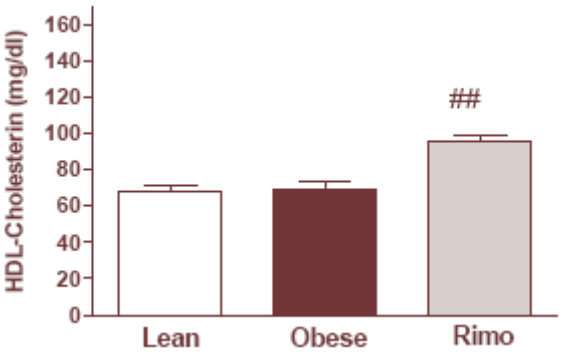

Abbildung 19: HDL-Cholesterinspiegel im Serum

Rimonabant bewirkte in der Obese-Gruppe bereits nach zwei Wochen einen signifikanten Anstieg des HDL-Cholesterins im Vergleich zur placebobehandelten Obese-Gruppe und zur Lean-Gruppe.

Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n= 5, ## P <0.01 vs. Placebo.

3.4 Marker der Thromboztyenfunktion

3.4.1 VASP

VASP spielt in seiner phosphorylierten Form durch Hemmung des Fibrinogenrezeptors eine große Rolle in der Trombozyteninhibition. Deshalb wurde, um die Funktionsfähigkeit und die Aktivität des endogenen Thrombozyten-Inhibitor-Sigaltransduktionswegs zu untersuchen, die Menge des am Ser^{157} phosphorylierten thrombozytären VASP im Vollblut nach Fixation mit Formaldehyd mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass Obese-Ratten eine signifikant erniedrigte VASP-Phosphorylierung und damit eine verminderte Thrombozyteninhibition aufweisen als die Kontrolltiere. Jedoch konnte durch die Anwendung von Rimonabant die Menge des phosphorylierten VASP bei den Obese-Tieren signifikant gesteigert werden, wenn auch nicht auf das Ausmaß der Lean-Tiere. (Abb.20)

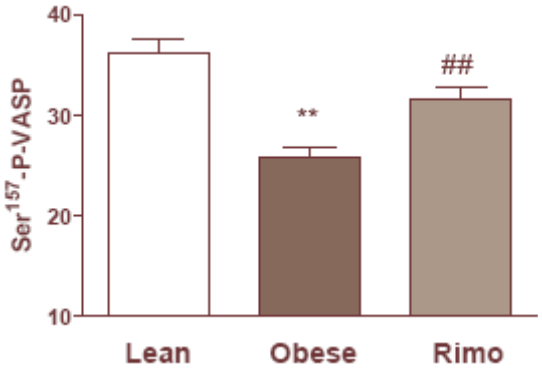

Abbildung 20: Menge des mit Ser^{157} phosphorylierten P-VASP

Obese-Raten wiesen eine signifikant geringere VASP-Phosphorylierung auf als die Kontrolltiere. Durch Rimonabant konnte diese Menge jedoch signifikant gesteigert werden. Daten entsprechen Mittelwert ± SEM. ** $P < 0.01$ vs. Lean, ## $P < 0,01$ vs. Obese, n = 10-20.

3.4.2 Thrombozyten-gebundenes Fibrinogen

Um neben dem Ausmaß der Trombozyteninhibition auch eine Aussage über die Thrombozytenaktivität in vivo treffen zu können, wurde weiterhin die Menge des Thrombozyten-gebundenen Fibrinogens mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dieses steht hierbei in Korrelation zur Aktivität des Glykoprotein IIb/IIIa-Komplexes aktivierter Thrombozyten[30] in unstimuliertem Vollblut. Es konnten allerdings bei diesem Versuch keine signifikanten Unterschiede zwischen Lean- und Obese-Zucker-Ratten und zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gefunden werden (Abb.21), wenngleich ein Trend hin zu geringerer Glykoprotein IIb/IIIa-Komplex-Aktivität bei den behandelten Tieren bestand.

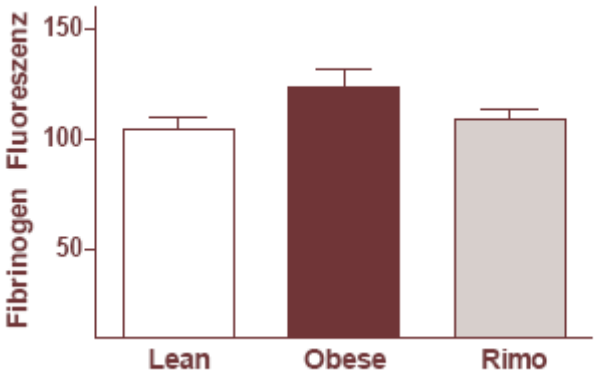

Abbildung 21: Durchflusszytometrische Bestimmung des Thrombozyten-gebundenen Fibrinogens anhand der Fluoreszenzstärke

Hier waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n = 10-20.

3.5 Marker der Thrombozytenaktivität

3.5.1 Oberflächenexpression des P-Selektin

Die Expression des P-Selektin (CD62P) an der Oberfläche von Thrombozyten stellt einen Marker der in vitro Thrombozytenaktivität dar. Um Unterschiede in der Aktivierbarkeit der Thrombozyten herauszufiltern, wurden diese mit 20µM ADP stimuliert und die P-Selektinexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei fand sich bei den Obese-Zuckerraten eine signifikant gesteigerte P-Selektin-Expression als bei den gleichaltrigen Lean-Zuckerratten. Der Cannabinoid-1-Rezeptorblocker Rimonabant zeigte allerdings nach zweichwöchiger Anwendung keine signifikanten Auswirkungen auf die P-Selektin-Expression. (Abb.22))

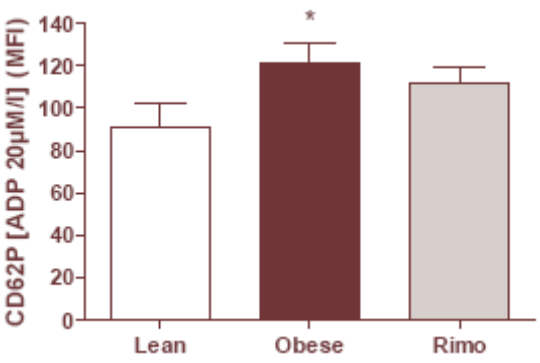

Abbildung 22: P-Selektin-Expression an Thrombozyten nach Stimulation mit 20µM ADP
Die Obese-Zucker-Ratten zeigten im Vergleich zu den Lean-Zucker-Ratten signifikant höhere Werte. Daten entsprechen Mittelwert ± SEM. * $P < 0.05$ vs. Lean, n = 10-20.

3.5.2 Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation

Die Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch externe Stimuli wurde nach Zugabe von Thrombin zu PRP (= plättchenreichem Plasma) im Aggregometer gemessen. Bei einer Konzentration von 0.02 U/ml Thrombin zeigten sich hierbei die größten Aggregationsunterschiede in den drei Tiergruppen. Demnach lagen die Werte der Lean-Zucker-Ratten signifikant unter denen der Obese-Zucker-Ratten. Durch die Einnahme des Medikaments konnte das Ausmaß der Aggregation bei 0.02 U/ml Thrombin bereits nach zwei Wochen im Vergleich zu den Kontrolltieren gesenkt werden, wenn auch nicht signifikant. (Abb.23) Je höher sich allerdings die zugegebene Konzentration an Thrombin belief, desto weniger deutlich fanden sich die genannten Veränderungen.

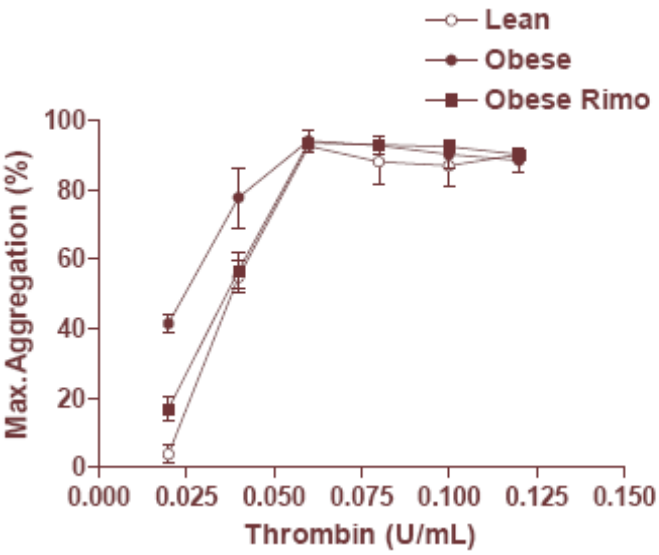

Abbildung 23: Graphische Darstellung der Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit der zugegebenen Thrombinmenge

(Daten erhoben mit dem Platelet aggregation profiler, PAP-8, BioData, Horsham, PA) Daten entsprechen Mittelwert ± SEM, n = 10-20.

3.5.3 Thrombozytenadhäsion an fibrinogenbeschichteter Membran

Um die Adhäsion unstimulierter Thrombozyten an Fibrinogen unter arteriellen Flussbedingungen (1000/s) zu beobachten, wurden gewaschene Thrombozyten durch eine Flusskammer perfundiert. Die Mengen der adhärenten Thrombozyten von unbehandelten Lean- und Obese-Zuckerraten unterschieden sich nicht ganz signifikant voneinander. Die Thrombozyten der Obese-Tiere zeigten eine gering höhere Adhäsion an dem isolierten Fibrinogen als die Kontrolltiere. Nach der Gabe von Rimonabant über den Zeitraum von zwei Wochen wiesen die behandelten Tiere allerdings eine signifikant geringere Menge adhärenter Bluttplättchen an der Fibrinogenmembran auf als die unbehandelten Tiere. (Abb.24)

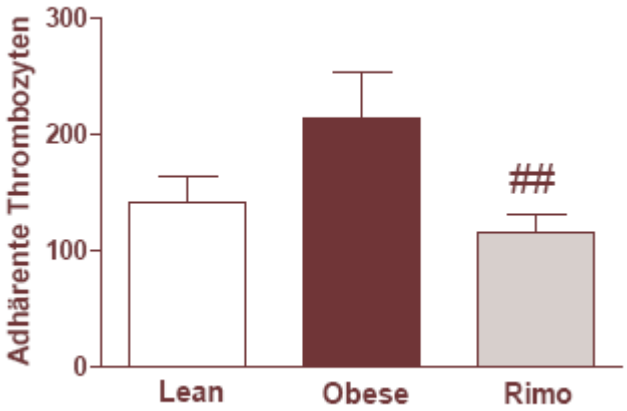

Abbildung 24: Menge der an Fibrinogen adhärenten Thrombozyten unter arteriellen Flussbedingungen (1000 s^{-1})

Rimonabant- behandelte Tiere wiesen eine signifikant geringere Menge adhärenter Thrombozyten auf als die Placebo-behandelten Tiere.

Daten entsprechen Mittelwert ± SEM.

P < 0.01 vs. Placebo, n = 10-20.

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Auswirkungen einer zweiwöchigen Kurzzeittherapie mit dem selektiven Cannabinoid-1-Rezeptorblocker Rimonabant auf junge Obese-Zucker-Ratten, einem etablierten Modell einer oralen Glukosetoleranzstörung. Als Kontrollen dienten bei allen Versuchen je eine Gruppe placebobehandelter Obese-Zucker-Ratten und Lean-Zucker-Ratten, wobei letztere hierbei die Stellung der gesunden Vergleichsgruppe einnahm. Besonderes Augenmerk wurde in den Versuchen auf Veränderungen hinsichtlich kardiovaskulärer Risikofaktoren gelegt. Es zeigte sich demnach, dass sich die Einnahme von Rimonabant positiv auf das Lipidprofil und die Gewichtszunahme der noch im Wachstum begriffenen Zucker-Ratten auswirkt. Ebenso konnte durch dieses Medikament im Vergleich zu Placebo die Menge der im Blut zirkulierenden Monozyten und Neutrophilen gesenkt werden. In gleicher Weise fanden sich bei den behandelten Tieren auch die Spiegel der proatherosklerotisch wirkenden Chemokine MCP-1 und RANTES im Serum vermindert. Zudem erwies sich die Aktivität der Thrombozyten und deren Ansprechen auf Agonisten und physikalische Stimuli nach der Behandlung mit Rimonabant deutlich rückläufig.

4.1 Modulation von Gewichtszunahme und Lipidprofil

Es ist bekannt, dass durch Übergewicht und Diabetes mellitus Veränderungen im Stoffwechsel hervorgerufen werden, die eine vaskuläre Dysfunktion und somit die Entstehung der Atherosklerose begünstigen.[15;17] In der „Rimonabant in obesity“ (Rio)-North America-Studie und auch in der Rio-Europe-Studie wurde bereits gezeigt, dass die Anwendung von Rimonabant über einen Zeitraum von zwei Jahren positiven Einfluss auf diese kardiovaskulären Risikofaktoren und das Gewicht der behandelten Probanden nimmt. In diesen Studien erhielten fettleibige (BMI $\geq$ 30 kg/m^2) oder übergewichtige Patienten (BMI $\geq$ 27 kg/m^2) mit einem kardiovaskulären Risikofaktor (Hypertonie, Dyslipidämie) neben hypokalorischer Diät und der Aufforderung zu mehr physischer Aktivität für ein Jahr entweder Rimonabant (5mg/d oder 20mg/d) oder Placebo.[38;49] Nach dieser einjährigen Anwendung hatten ca. 50,8% der mit Rimonabant 20mg/d behandelten Patienten einen Gewichtsverlust von mindestens 5%, wogegen nur 19,7% der placebobehandelten Probanden dieses Ziel erreichen konnten. Eine

Gewichtsreduktion um mehr als 10% erlangten mit 27,0% deutlich mehr Patienten in der Rimonabant 20mg–Gruppe als in der Placebo-Gruppe (7,8%).[49] Die Ergebnisse bei den mit 5mg Rimonabant behandelten Pobanden fielen hierbei weniger deutlich aus.[34] Auch in Versuchen mit CB1-Knockout Mäusen wurde bereits gezeigt, dass durch ein Ausschalten des Cannabinoid-1-Rezeptors ein schlanker Phänotyp von Mäusen entsteht, der sich nicht alleine durch verminderte Nahrungszufuhr erklären lässt.[4] Analog zu diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Studie bei den mit 20mg Rimonabant/d gefütterten Zucker-Ratten (Rimo) nach zwei Wochen ein signifikant geringeres Körpergewicht beobachtet als bei der entsprechenden Placebo-Gruppe (Obese). Das Gewicht der gesunden Kontrolltiere (Lean) konnte durch die Behandlung jedoch nicht erreicht werden. Einschränkend muss hierbei erwähnt werden, dass sich die 10 Wochen alten Tiere bei den Versuchen in der Wachstumsphase befanden und zudem freien Zugang zur Nahrung erhielten. Demnach darf hier nicht von einer durch die Blockade des CB1-Rezeptors ausgelösten Gewichtsreduktion gesprochen werden. Vielmehr weisen die Ergebnisse auf eine reduzierte Gewichtszunahme während der Wachstumsphase hin. Obwohl neben dem Körpergewicht auch die Menge des visceralen Fettes als Risikofaktor für die Entstehung der Atherosklerose gilt,[50] wurde diese in der gegenwärtigen Studie durch die CB1-Rezeptorblockade nicht signifikant beeinflusst.

Neben Aussagen zur Gewichtsmodulation durch Cannabinoid-1-Rezeptorantagonisten, lassen die Rio-Studien (Rio-North America, Rio-Europe und Rio-Diabetes) auch Rückschlüsse auf Veränderungen im Lipidprofil der Probanden zu, welche nicht alleine durch die eingetretene Gewichtsreduktion zurückzuführen sind. Besonders in der Rio-Lipids-Studie, in der Rimonabant an übergewichtigen, nicht-diabetischen Patienten mit Dyslipidämie getestet wurde, bewirkte der CB1-Rezeptorblocker zum einen eine Abnahme der Triglyceride und zum anderen eine Zunahme des atheroprotektiven HDL-Cholesterins. Veränderungen auf Seiten des proatherosklerotischen LDL-Cholesterins konnten hier nicht beobachtet werden. Die Autoren sprechen jedoch von einem Trend hin zu größeren, weniger atherogenen LDL-Partikeln verglichen mit Placebo.[4;38] In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen konnte auch in der vorliegenden Arbeit durch Rimonabant ein Anstieg in der HDL-Cholesterin-Konzentration und eine Abnahme in der Triglycerid-Konzentration bei den Tieren eruiert werden. Besonderes

Gewicht erhalten diese positiven Auswirkungen auf das Lipidprofil vor dem Hintergrund, dass Dyslipidämie mit erhöhten Triglyceriden und erniedrigten HDL-Cholesterin-Konzentrationen eine der fünf Säulen des metabolischen Syndroms darstellt, welches wiederum als größer Risikofaktor der Atherosklerose gilt.[14] Eine Erhöhung des HDL-Cholesterins wirkt sich schließlich nicht nur atheroprotektiv durch den Cholesterintransport von der Arterienwand zurück zu peripheren Geweben und der Leber aus und vermindert somit den Vorgang der atherosklerotischen Plaqueformation. Es zeigt weiterhin antiatherogene Effekte auf Thrombozyten[51] und fördert die Funktion einiger antioxidativer Enzyme.[52] Die Bedeutung dieser antioxidativen Wirkung wird dadurch verdeutlicht, dass unter Anderem oxidierte LDL-Partikel eine erhöhte thrombozytäre Aktivität bewirken und somit als Gegenspieler des HDL-Cholesterins an den Thrombozyten auftreten. Oxidierte LDL-Partikel wirken zudem chemotaktisch auf Monozyten, sind bei deren Differenzierung zu Makrophagen und an der Entstehung eines lokalen Entzündungsgeschehens im Frühstadium der Atheroskleroseentstehung beteiligt.[51] Wenn sich auch, wie schon bereits in den Rio-Studien konstatiert, in dieser Studie keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Menge des Gesamt-Cholesterins und des LDL-Cholesterins nachweisen ließen, so sind dennoch Veränderungen besonders an der Morphologie der LDL-Partikel nicht ganz auszuschließen. Demnach müssten weitere Untersuchungen bezüglich Veränderungen von kleinen, dichten atherogenen hin zu größeren, weniger atherogenen LDL-Paritikeln und hinsichtlich des Anteils an oxidiertem LDL an der Gesamtmenge des LDL-Cholesterins durchgeführt werden. Letzteres wäre vor allem von Bedeutung, da sich im Kern eines atherosklerotischen Plaques vorwiegend oxidierte LDL-Partikel finden,[53] denen auch Einfluss auf die Präsentation leukozytenspezifischer Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen nachgesagt wird.[54] Somit liegt die Vermutung nahe, dass weniger das native LDL-Cholesterin, als vielmehr dessen oxidierte Form eine zentrale Rolle in der Entstehung der atherosklerotischen Läsion einnimmt.

4.2 Rimonabant-induzierte immunologische Veränderungen

In vielen Studien wurde bislang propagiert, dass Hypercholesterinämie einen Grundstein der Atherombildung darstellt. Allerdings berichten neuere Arbeiten zunehmend darüber, dass neben diesem metabolischen Faktor auch Entzündungsgeschehen an diesem Vorgang teilhaben. So bezeichnet Peter Libby in einer seiner Arbeiten entzündliche Geschehnisse als Verbindungsglied zwischen Hyperlipidämie und Atherogenese. Er beobachtete, dass kurze Zeit nach Beginn einer atherogenen Diät bei Mäusen die Adhäsion von Leukozyten an arteriellen Endothelzellen begann.[52] Demnach bewirke eine bestehende Hypercholesterinämie zunächst eine Aktivierung der Endothelzellen in den großen und mittleren Arterien. Die darauf folgende Aufnahme von LDL-Partikeln in die Intima verursache dann wiederum eine lokale Entzündungsreaktion in der Arterienwand, was zur Einwanderung von leukozytären Zellen führt.[54] Die beschriebene Leukozyteneinwanderung in die Gefäßwand in Verbindung mit Expression proinflammatorischer Cytokine werden nach neuesten Erkenntnissen als entscheidende Charakteristika der frühen Atherogenese angesehen.[52] Unter der Vorstellung, dass Rimonabant in diese frühatherogenen Ereignisse eingreifen könne, wurde die Menge der im Blut zirkulierenden Leukozyten bei den Zucker-Ratten bestimmt. Obwohl sich alle gemessenen Werte innerhalb rattenspezifischer Grenzwerte befanden, ließen sich in der Gruppe der gestörten Glukosetoleranz (Obese) eine signifikant größere Menge an zirkulierenden Leukozyten im Blut nachweisen als bei den entsprechenden Lean-Kontrollen. Jedoch konnte durch die zweiwöchige Gabe des Cannabinoid-1-Rezeptorblockers eine deutliche Senkung der Gesamt-Leukozytenzahl der Obese-Tiere bewirkt werden. Auch wenn die bestimmten Werte alle als Normwerte im Sinne rattenspezifischer Parameter angesehen werden müssen, zeigt sich doch eine mengenmäßige Veränderung der immunolgisch wirksamen Leukozyten und somit ein potentielles Eingreifen in inflammatorische Geschehnisse am Model der gestörten Glukosetoleranz. In gleicher Weise sanken auch die Spiegel der Monozyten und der Neutrophilen unter der Gabe von Rimonabant.

Der Rolle der Monozyten auf dem Weg von Hyperlipidämie über Inflammation zur Atherosklerose widmet die Forschung bis heute besonderes Interesse. Sie stellen als Subgruppe der Leukozyten die Vorläufer der Schaumzellen dar. Diese im Blut befindlichen Monozyten werden über Adhäsionsmoleküle (z.B.VCAM-1) in

entzündlich verändertes Endothel aufgenommen und erlangen dort Charakteristika typischer Gewebsmakrophagen. Sie phagozytieren hier beispielsweise oxidierte Lipoproteine und bilden somit die für den Lipidkern der atherosklerotischen Läsion typischen Schaumzellen, welche durch intrazytoplasmatische Lipdtropfen gekennzeichnet sind. Aber nicht nur Adhäsionsmoleküle spielen eine entscheidende Rolle auf dem Weg der Monozyten in das Endothel. In den letzten Jahren drängte sich eine Gruppe von Chemokinen, darunter das „Monocyte chemoattractic protein-1“ (MCP-1), in den Vordergrund.[52] MCP-1 wird unter anderem in der Gefäßwand unter Einfluss von oxidiertem LDL[54] und aktivierten Thrombozyten gebildet und lässt sich vor allem in makrophagenreichen Arealen der atherosklerotischen Läsion finden.[55] Es wirkt chemotaktisch auf Monozyten und lockt diese zu entzündlichen Geschehnissen.[56] Am Mausmodell zeigte sich bereits bei Hyperlipidämie oder bei Arterienverletzung eine erhöhte MCP-1-Expression an den Mediazellen und erhöhte MCP-1 –Spiegel im Serum und an Thrombozyten, die sich an der beschädigten Gefäßwand befanden.[57] Neben den Chemokinen selbst nehmen auch deren Rezeptoren, so zum Beispiel der „CC-motif chemokine rceptor-2“ (CCR2), Einfluss auf die Entwicklung von Entzündungsprozessen und die Rekrutierung von Immunzellen zum Ort der Inflammation. Demnach wurde an Mäusen mit einer Deletion in der für den MCP-1-Rezeptor CCR2 kodierenden Region nachgewiesen, dass bei Abwesenheit von CCR2 Entzündungsgeschehnisse am Fettgewebe in abgeschwächter Form und unter Einbeziehung einer geringeren Menge von Fettgewebsmakrophagen im Vergleich zu den Kontrolltieren ablaufen.[58] Analog hierzu wiesen CCR2 -/- Mäuse eine geringere Menge an im Blut zirkulierenden Monozyten auf.[59] Weiterhin konnte durch diese Deletion des Chemokinrezeptors eine Verbesserung der Insulinresistenz und somit eine erhöhte Insulinsensitivität der fettleibigen Tiere erreicht werden.[58] Anhand dieser Ergebnisse und mit dem Wissen, dass bei Adipositas in Abhängigkeit von der Menge des Fettgewebes erhöhte Mengen an MCP-1 und CCR2 auftreten, lässt sich deren Bedeutung für die Entwicklung des metabolischen Syndroms und die Entstehung der atherosklerotischen Plaque ableiten. Dementsprechend wurde in dieser Studie, die Wirkung von Rimonabant auf die Menge des Chemokins MCP-1 (CCL2) im Serum mittels ELISA untersucht. Tatsächlich wiesen die fettleibigen Obese-Tiere, wie bereits an übergewichtigen Nagetieren und am Menschen bewiesen,[58] signifikant höhere MCP-

1 Spiegel im Serum auf als die entsprechenden Lean-Kontrollen. Allerdings konnte durch die kurzzeitige Gabe des Cannabinoid-1-Rezeptorblockers keine Reduktion dieses Mediatorstoffes erreicht werden. Dementsprechend scheint Rimonabant, weder über eine Verminderung des LDL-Cholesterins, was zur Freisetzung von MCP-1 beiträgt, noch über eine Reduktion der MCP-1-Menge selbst Einfluss auf metabolische Risikofaktoren und die Entwicklung der atherosklerosespezifischen Läsion zu nehmen. Auch wenn in dieser Arbeit nicht näher auf die Insulinsensitivität eingegangen wird, so ist doch in Anlehnung an die unveränderten MCP-1-Spiegel und in Hinblick auf unveränderte Glukose- und HbA_{1c}–Werte zwischen den Tiergruppen davon auszugehen, dass der Cannabinoid-1-Rezeptorblocker seine Wirkung nicht durch Modulation des Insulin- und Glukosehaushaltes entfaltet. Ebenso muss bei gleich bleibenden MCP-1-Spiegeln auch davon ausgegangen werden, dass die durch Rimonabant verursachte Reduktion der Monozytenmenge im Blut nicht durch dieses Cytokin vermittelt wurde.

Da die Leukozyteneinwanderung in die Gefäßwand einen essentiellen Schritt im Prozess der Atheroskleroseentstehung darstellt und dieser Vorgang, wie bereits in mehreren Studien nachgewiesen, cytokinvermittelt stattfindet, wurde neben dem bereits erwähnten Cytokin MCP-1 auch die Bestimmung des Cytokins RANTES („Regulated on Activated Normal T-Cell Expressed and Secreted) vorgenommen. Cytokine, aber auch Chemokine, stellen proinflammatorische Faktoren dar, die die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen von der Media zur Intima veranlassen und an der Rekrutierung immunmodulatorischer Zellen beteiligt sind und somit einen wichtigen Schritt in der frühen Plaqueentstehung darstellen. Die Sekretion von RANTES erfolgt unter anderem durch Endothelzellen, glatte Muskelzellen, aktivierte T-Zellen, Makrophagen und Thrombozyten.[60] Folglich setzen beispielsweise aktivierte Thrombozyten RANTES frei, welches dann, immobilisiert am Gefäßendothel die Anhaftung der Monozyten triggert.[20] Diese Erkenntnis wurde auch in Versuchen mit RANTES-Rezeptorantagonisten bestätigt. Hier konnte die Anhaftung monozytärer Zellen am Gefäßendothel in Anwesenheit aktivierter Thrombozyten abgeschwächt werden. In unseren Versuchen lies sich zwar bei den Obese-Tieren eine signifikant höhere Serumkonzentration als bei den Lean-Tieren feststellen. Jedoch wurde diese durch die Blockade des CB1-Rezeptors nicht beeinflusst. Hieraus lässt sich analog zu den Ergebnissen hinsichtlich MCP-1 ableiten, dass die zweiwöchige Einnahme von

Rimonabant keinen Einfluss auf frühe cytokingesteuerte Signalwege in der Entstehung der atherosklerotischen Läsion nimmt.

4.3 Veränderungen der thrombozytären Aktivität durch Rimonabant

Die Atherosklerose stellt also eine systemisch entzündliche Erkrankung dar, die durch Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten in der Intima großer Arterien gekennzeichnet ist. Kommt es zu einer Ruptur oder Erosion der Läsion, beginnt die Thrombozytenaktivierung und deren Anlagerung an der Oberfläche der rupturierten Plaque.[22] Thrombozyten besitzen aber auch die Eigenschaft, selbst ohne vorausgegangene Läsion an die Gefäßwand anheften zu können, um dort in aktiviertem Zustand proinflammatorische Cytokine und Chemokine wie RANTES und MCP-1 freizusetzen. Demnach stellen sie die Hauptverantwortlichen für Rekrutierung und Extravasation monozytärer Zellen während der Plaqueformatoin dar.[22] Abgesehen von der Sekretion und der anschließenden Ablagerung thrombozytärer Chemokine am Endothel scheint auch die Präsentation von Chemokinen durch oberflächengebundene Thrombozyten ein neu entdeckter Mechanismus zu sein, durch den die Blutplättchen die Einwanderung von Monozyten im Falle von Gefäßverletzungen steuern können.[57] Neueren Studien zufolge ist die Interaktion zwischen den von Thrombozyten freigesetzten Chemokinen, hierbei insbesondere RANTES, und den nach der Einwanderung am Gefäßendothel adhärenten Monozyten abhängig von der Anwesenheit des Adhäsionsmoleküls P-Selektin.[47] Dieses lässt sich als transmembranöses Glykoprotein endothelialer Zellen und aktivierter Thrombozyten finden[61] und nimmt Einfluss auf die Thrombozyten- und Thrombozyten/Leukozytenadhäsion am Endothel.[62] In Versuchen mit P-Selektin-defizienten Thrombozyten und an Mäusen zeigte sich bereits, dass sowohl die Freisetzung von RANTES, als auch dessen Wirkung auf die Einwanderung monozytärer Zellen durch vorwiegend thrombozytäres P-Selektin vermittelt werden.[57] Es wurde dementsprechend an apoE$^{-/-}$ Mäusen in Abwesenheit von P-Selektin keine Infiltration von Makrophagen und keine neointimale Formation nach künstlich hervorgerufener Gefäßverletzung registriert.[47] Bei unseren Versuchen konnte kein Einfluss des CB1-Rezeptorblockers auf die thrombozytäre P-Selektin-Expression beobachtet werden.

Allerdings wiesen die Obese-Ratten, entsprechend einer erhöhten thrombozytären Aktivität im Stadium der gestörten Glukosetoleranz, eine signifikant größere P-Selektin-Expression nach Stimulation mit 20µM ADP auf als die Lean-Ratten.

Es wurde bereits vielfach berichtet, dass die Interaktion zwischen aktivierten Thrombozyten und dem Endothel mit den darauf folgenden inflammatorischen Reaktionen innerhalb der Gefäßwand substantiell zur Atheroskleroseentstehung beiträgt.[56] Vor allem aktivierte Thrombozyten besitzen wie oben bereits beschrieben die Fähigkeit, über Cytokine chemotaktische und adhäsive Eigenschaften endothelialer Zellen zu verändern[55] und somit zur Entwicklung der atherosklerotischen Läsion beizutragen. [57] Es ist demnach nicht verwunderlich, dass sich vor allem im Blut von Patienten mit instabiler Atherosklerose, KHK oder Hypercholesterinämie eine höhere Konzentration aktivierter Thrombozyten finden lässt, als bei gesunden Vergleichspersonen.[20] Aus diesem Grunde stellen Thrombozyteninhibitoren seit langem einen Bestandteil der antiatherosklerotischen Therapie dar. An Mäusen wurde zudem nachgewiesen, dass die Inhibition aktivierter Thrombozyten mittels Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren der Entwicklung der atherosklerotischen Läsion vorbeugt.[22] Zu den Hauptagonisten für die direkte Aktivierung thrombozytärer Zellen zählen Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin und Collagen.[57] Aber, wie in neueren Studien bekannt wurde, wird deren Wirkung vor allem unter arteriellen Flussbedingungen durch das Vorhandensein diverser Chemokine getriggert. Folglich stellen die Chemokine „Macrophage-Derived Chemokine“ (MDC), „Thymus Activation–Regulated Chemokine“ (TARC) und „Stromal cell-Derived Factor One“ (SDF-1) bei Anwesenheit geringer Mengen ADP potente Agonisten der Thrombozytenaggregation und –adhäsion dar.[63] In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Thrombozyten von Obese-Ratten mit gestörter Glukosetoleranz einer leichteren Aktivierbarkeit unterliegen als die der gesunden Vergleichstiere. Tatsächlich zeigten sie bezüglich einiger Parameter ein erhöhtes Ansprechen auf physische und pharmakologische Stimuli als die Thrombozyten der Lean-Ratten, was teilweise durch die Einnahme von Rimonabant wieder abgeschwächt werden konnte. Auch wenn sich in der Gesamtzahl der Thrombozyten keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen nachweisen ließen, konnte durch Rimonabant die thrombininduzierte Thrombozytenaggregation und die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an fibrinogenbeschichteter Membran gemindert

werden. Dadurch lässt sich vermuten, dass der Cannabinoid-1-Rezeptorblocker aktiv die Ansprechbarkeit thrombozytärer Zellen auf Thrombin reduziert. Somit steht fest, dass sich Rimonabant durch Minderung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch Fibrinogen positiv auf frühe Prozesse in der Atheroskleroseentstehung auswirkt. Neben Versuchen zur Aktivierbarkeit der Thrombozyten, sollte auch die bereits bestehende Aktivität dieser im Vergleich zwischen Lean- und Obese-Tieren und nach Einnahme von Rimonabant erfasst werden. Thrombozytengebundenes Fibrinogen stellt in dieser Hinsicht einen Marker für die Aktivität des GPIIb/IIIa-Aggregationsrezeptors dar. Dieser besitzt lediglich auf aktivierten Thrombozyten die Fähigkeit, Fibrinogen zu binden und somit zu einer Aggregatbildung zwischen den Blutplättchen zu führen.[30] Es konnten diesbezüglich jedoch weder Unterschiede zwischen der Obese- und Lean-Gruppe beobachtet werden, noch konnte Rimonabant in diesen Sachverhalt eingreifen. Faktisch entfaltet Rimonabant seine Wirkung nicht durch Modulation am GPIIb/IIIa. Es fiel jedoch nach zweiwöchiger Einnahme eine nicht signifikant erhöhte Menge an Ser^{157}-phosphorylierten-VASP im Vollblut auf, als bei den placebobehandelten Tieren. Die VASP („vasodilatator stimulated phosphoprotein“) Phosphorylierung spiegelt hier die Integrität thrombozyteninhibitorischer Signalwege, einschließlich des vorherrschenden NO/cGMP Signalwegs, wieder.[62] NO stellt einen Inhibitor der Thrombozytenaktivität, -adhäsion und -aggregation dar. Es wird von der endothelialen NO-Synthetase gebildet und bewirkt über eine cGMP-Erhöhung die Aktivierung cGMP-abhängiger Kinasen, welche die Phosphorylierung von VASP vornehmen. Die VASP-Phosphorylierung korreliert weiterhin eng mit der Inhibition der Fibrinogenbindung am GPIIb/IIIa und damit mit einer verminderten Thrombozytenaggregation. Im Umkehrschluss führt eine Blockade im NO/VASP Signalweg zu erhöhten Spiegeln an P-Selektin und thrombozytengebundenem Fibrinogen, welche beide als Marker einer erhöhten Thrombozytenadhäsion gelten.[64] Analog zu der Beobachtung, dass sich bei Diabetes und Hypercholesterinämie eine gestörte NO-Bioverfügbarkeit findet und somit ein geringerer Grad an phosphoryliertem VASP, zeigten die Obese-Tiere einen geringeren Anteil an Ser^{157}-phosphorylierten-VASP als die gesunden Kontrollen. Da, wie oben bereits beschrieben, die Obese-Ratten nach der Behandlung mit Rimonabant vermehrt phosphoryliertes VASP aufwiesen, kann von einem Eingreifen des CB1-Rezeptorblockers in den NO/cGMP/VASP-

Signaltransduktionsweg ausgegangen werden. Demnach erhöht Rimonabant die Menge des phosphorylierten VASP und trägt damit zur Inhibierung der Thrombozytenaggregation bei, einem wichtigen Schritt zur Vermeidung der Atherogenese.

4.4 Wechselwirkungen mit CB_2 – Rezeptoren und unerwünschte Wirkungen

Auch wenn sich die bisher gezeigten Ergebnisse auf die Cannabinoid-1-rezeptorantagonistische Wirkung Rimonabants beziehen, so ist dennoch eine Interaktion mit anderen Rezeptortypen nicht auszuschließen. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, dass sich Cannabinoid-1-Rezeptoren zwar in großer Anzahl im Gehirn und in peripheren Geweben wie Herz, Leber und Gefäßen befinden, den vorherrschenden Rezeptortyp auf immunologischen und hämatopoetischen Zellen jedoch der CB_2–Rezeptor darstellt.[65] Dies in Verbindung mit dem Wissen, dass Makrophagen keinen CB_1-Rezeptor exprimieren,[66] lässt zumindest den Verdacht aufkommen, dass die beschriebene Reduktion der Monozytenzahl bzw. die immunmodulatorischen Effekte unter Rimonabanteinnahme auf einer agonistischen Wechselwirkung mit dem CB_2-Rezeptor beruht. Im Einklang hierzu zeigte sich in Studien bereits, dass über CB_2-Rezeptor-Stimulation eine Abschwächung sowohl der TNF-α vermittelten Endothelzellaktivierung, als auch der transendothelialen Migration von Monozyten und deren endothelialer Adhäsion bewirkt wird. Weiterhin ist einer Arbeit von Klegeris et al. zu entnehmen, dass vor allem den CB_2-Agonisten anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden, während CB_1-Agonisten bzw. -Antagonisten ihre Wirkung vorwiegend hinsichtlich neuronaler Effekte entfalten.[67] Dies wiederum spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, dass Δ9-Tetrahydrocannabinol, Hauptbestandteil des Cannabis und schwacher CB_1/CB_2-Agonist, sowohl immunsuppressive, als auch psychoaktive Wirkungen aufweist.[65] Es werden demzufolge weitere Studien nötig sein, um Wechselwirkungen zwischen Rimonabant und Cannabinoid-2-Rezeptoren ans Licht zu bringen. Denn zum jetzigen Zeitpunkt steht fest, dass sich die in dieser Studie beobachteten Effekte nicht allein durch die Inhibition des CB_1-Rezeptors begründen lassen.

Die Tatsache, dass Rimonabant neben der gewünschten Wirkung am CB_1-Rezeptor wohl auch mit anderen Cannabinoidrezeptoren, wie den Cannabinoid-2-Rezeptoren, interagiert, deren genaue Funktion bislang nicht vollständig geklärt scheint, zeigt sich unter anderem an dessen Nebenwirkungsprofil. In klinischen Studien traten unter Rimonabanteinnahme neben Übelkeit, Schwindel, Diarrhoe und Schlaflosigkeit[4] auch signifikante psychiatrische Begleiterscheinungen, wie Ängstlichkeit und Depression auf. Ursache dieser unerwünschten Wirkungen auf die Psyche des Menschen könnte ein durch Rimonabant induziertes Ungleichgewicht zwischen den Neurotransmittern Glutamat und GABA, aber auch eine veränderte Aktivität von Anandamide an dessen Rezeptoren im Gehirn sein. Anandamide, ein Ligand des Endocannabinoidsystems, bindet sowohl an CB_1-Rezeptoren, als auch an sogenannten TRPV1- Rezeptoren. Während die Aktivierung Ersterer Ängstlichkeit und Depression abzuschwächen vermag, verhält es sich mit den TRPV1- Rezeptoren in umgekehrter Weise. Durch die Blockade der CB_1-Rezeptoren könnte somit das Gleichgewicht zugunsten der TRPV1-Rezeptoren und somit zugunsten depressiver Verstimmungen verschoben werden.[68] Ein weiterer Erklärungsversuch stützt sich auf die Annahme möglicher Interaktionen Rimonabants mit Cannabinoid-2-Rezeptoren im Gehirn. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde die Anwesenheit von CB_2-Rezeptoren im Gehirn von Ratten und Mäusen nachgewiesen. Durch die Gabe von CB_2-Agonisten und Antagonisten konnten hier Verhaltensänderungen der Tiere hervorgerufen werden.[69] Auch wenn diesbezüglich die aktuellen Forschungergebnisse nur unzureichend sind, stellt diese Erkenntnis zumindest einen neuen Ansatzpunkt zur Erklärung der unerwünschten Wirkungen Rimonabants und unter Umständen für die Entwicklung neuer Psychopharmka dar.

Aufgrund der, wie oben angedeuteten, Tatsache, dass sich unter der Einnahme von Rimonabant das Risiko auf psychiatrische Störungen bei übergewichtigen Patienten nahezu verdoppelte, sah sich Sanofi-Aventis im Oktober 2008 dazu veranlasst, den CB-1-Rezeptorblocker vorerst vom Markt zu nehmen. Im Nachhinein ist es hier vor allem als problematisch anzusehen, dass sowohl präklinische als auch die ersten klinischen Studien zu Rimonabant unter Ausschluss psychiatrisch vorerkrankter Patienten erfolgten (siehe Tab.:1). Somit wurde das Potential, psychiatrische Störungen auszulösen bzw. zu verstärken durch Modulation am CB_1-Rezeptor deutlich

unterschätzt. Erst ab 2008, nachdem sich Rimonabant schon zwei Jahre auf dem Markt befand, wurden Studien veröffentlicht, in denen auch Patienten mit einer positiven psychiatrischen Anamnese eingeschlossen worden waren.[68] Ab diesem Zeitpunkt dann konnte das Risiko für psychiatrische Auffälligkeiten im Vergleich zu Placebo verifiziert werden (siehe Tab.:2), was schließlich zur Marktrücknahme führte.

Studie	Bestand/ Population	Alter der Patienten (Jahre)	Dauer (Monate)	Gruppen	Psychiatrische Patienten
RIO Europe (Van Gaal et al., 2005)	1.507 adipöse Patienten mit oder ohne Ko-morbiditäten (Europa)	18-76	12 Monate	Placebo und Rimonabant 5 oder 20 mg/d	ausgeschlossen
RIO Europe, zweites Jahr (Van Gaal et al., 2008)			12 Monate		
RIO Lipids (Després et al., 2005)	1.036 adipöse Patientenmit unbehandelter Dyslipidämie (8 versch. Länder)	0-70	12 Monate		
RIO North America (Pi-Sunyer et al., 2006)	3.045 adipöse Patienten mit oder ohne Komorbiditäten (Nord Amerika)	18-79	24 Monate		
RIO Diabetes (Scheen et al., 2006)	1.047 adipöse Typ 2 Diabetiker behandelt mit Monotherapie (Europa, Nord- und Süd-Amerika)	18-70	12 Monate		
STRADIVARIUS (Nissen et al., 2008)	839 adipöse Patienten mit metabolischem Syndrom/ Koronararterienerkrankung (Nord Amerika, Europa, Australien)	18-60	18 Monate	Placebo und Rimonabant 20mg/d	eingeschlossen: 25% der Patienten in jeder Gruppe
SERENADE (Rosenstock et al., 2008)	278 Typ 2 Diabetiker behandelt mit Monotherapie (Europa, Nord und Süd Amerika)	≥ 18	6 Monate	Placebo und Rimonabant 20mg/d	eingeschlossen: Depression in der Vorgeschichte
CIRRUS (Rigotti et al., 2009)	755 Raucher (Nord Amerika)	≥ 18	2 Wochen	Rimonabant 20mg/d und Placebo Patch oder Nikotin Patch	eingeschlossen: Depression in der Vorgeschichte und Angst
ADAGIO-Lipids (Després et al., 2009)	799 abdominell adipöse Patienten mit atherogenetischer Dyslipidämie (Europa, Asien, Afrika, Ozeanien, Nord und Süd Amerika)	≥ 18	12 Monate	Placebo und Rimonabant 20 mg/d	eingeschlossen: Depression in der Vorgeschichte

Tabelle 1: Hauptcharakteristika der RIO-, STRADIVARIUS-, SERENADE-, CIRRUS-, und ADAGIO-Lipids-Studie

(aus Moreira, FA, Crippa, JA. The psychiatric side-effects of rimonabant. Rev Bras Psiquiatr. 2009; 31: 145-153.)

Studie	Gruppe (n)	Psychiatrische Störung	Angst	Depression
RIO Europe (Van Gaal et al.,2005)	Placebo (305) Rimonabant (599)	17 (5.6) 47 (7.8)	1 (0.3) 6 (1.0)	4 (1.3) 14 (2.3)
RIO Europe, zweites Jahr (Van Gaal et al.,2008)	Placebo (305) Rimonabant (599)	1 (0.6) 6 (1.7)	0 (0) 0 (0)	1 (0.6) 3 (0.8)
Rio Europe, erstes und zweites Jahr (Van Gaal et al.,2008)	Placebo (305) Rimonabant (599)	18 (5.9) 53 (8.8)	1 (0.3) 6 (1.0)	5 (1.6) 17 (2.8)
Rio Lipids (Després et al.,2005)	Placebo (342) Rimonabant (346)	- -	2 (0.6) 6 (1.7)	2 (0.6) 10 (2.9)
RIO North America (Pi-Sunyer et al.,2006)	Placebo (607) Rimonabant (1219)	14 (2.3) 76 (6.2)	2 (0.3) 12 (1.0)	8 (1.3) 27 (2.2)
RIO Diabetes (Scheen et al.,2006)	Placebo (348) Rimonabant (339)	- -	0 2 (0.6)	3 (0.9) 11(3)
STRADIVARIUS (Nissen et al.,2008)	Placebo (417) Rimonabant (422)	13 (3.1) 40 (9.5)	3 (0.7) 13 (3.1)	5 (1.2) 15 (3.6)
SERENADE (Rosenstock et al.,2008)	Placebo (140) Rimonabant (138)	0 7 (5.1)	0 0	0 3 (2.2)
CIRRUS (Rigotti et al.,2009)	Rimonabant plus Placebo Patch (362) Rimonabant plus Nikotin Patch (367)	20 (5.5) 19 (5.2)	3 (0.8) 5 (1.8)	3 (0.8) 4 (1.1)
ADAGIO- Lipids (Després et al.,2009)	Placebo (395) Rimonabant (404)	- -	4 (1.0) 9 (2.2)	5 (1.3) 8 (2.0)

Tabelle 2: Abbruchrate aufgrund von psychiatrischen Nebenwirkungen

Anzahl der Patienten (und Prozentzahlen), die unter der Einnahme von Placebo oder 20mg Rimonabant die RIO-, STRADIVARIUS-, SERENADE-, CIRRUS- und ADAGIO-Lipids-Studie aufgrund von psychatrischen Nebenwirkungen, v.a. Angst und Depression abbrachen.

(aus Moreira, FA, Crippa, JA. The psychiatric side-effects of rimonabant. Rev Bras Psiquiatr. 2009; 31: 145-153.)

Trotz aller Kritik am Nebenwirkungsprofil von Rimonabant und an dessen vielleicht voreiliger Zulassung auf dem europäischen Markt bleibt jedoch hinzuzufügen, dass die Klasse der Cannabinoid-1-Rezeptorblocker weiterhin ein viel versprechender Ansatz zur Raucherentwöhnung und zur Gewichtsreduktion von übergewichtigen Diabetikern in Verbindung einer Abschwächung kardiovaskulärer Risikofaktoren bleiben. Zwar weisen auch neu entwickelte CB-1- Rezeptorantagonisten, wie Tranabant der Firma Merck oder CP-945,598 der Firma Pfizer, Schwächen hinsichtlich psychiatrischer Nebenwirkungen auf,[68] jedoch zeigt sich ein Trend hin zu wirkungsvolleren und sichereren Medikamenten.

5 Zusammenfassung

Nachdem sich in den verschiedenen Rio („Rimonabant in obesity“) -Studien bereits die Wirksamkeit des Cannabinoid-1-Rezeptorantagonisten Rimonabant durch Gewichtsreduktion und einer Verminderung des kardiovaskulären Risikos bei den untersuchten Patienten gezeigt hatte, stellte sich die Frage nach dem genauen Wirkprinzip. In unserer Arbeit konnten wir anhand von Versuchen an Ratten mit genetisch induzierter Glukosetoleranzstörung nachweisen, dass Rimonabant nicht nur eine Gewichtsreduktion, sondern auch eine Verbesserung des Lipidprofils bewirkt. Konkret fanden sich bei den behandelten Tieren nach zwei Wochen die atherogenetischen Triglyceride vermindert und das atheroprotektive HDL-Cholesterin im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht. Weiterhin konnten verminderte Mengen an Leukozyten, insbesondere der Neutrophilen und der Monozyten, als Zeugnis einer anti-inflammatorischen Wirkung nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich eine geminderte thrombozytäre Aktivität, verdeutlicht durch die reduzierte thrombozytäre Aktivierbarkeit durch Thrombin und die abgeschwächte Adhäsion an Fibrinogen-beschichteten Membranen. Auch lies sich eine Zunahme der VASP-Phosphorylierung als Marker einer gesteigerten Thrombozyten-Inhibition erkennen. Keine signifikanten Wirkungen fanden sich dagegen hinsichtlich des Blutglukosespiegels, des Gesamtcholesterins, der Gesamtzahl der Thrombozyten, und der pro-atherosklerotisch wirkenden Chemokine MCP-1 und RANTES.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass der selektive Cannabinoid-1-Rezeptorantagonist Rimonabant einen viel versprechenden Ansatzpunkt in der Behandlung von übergewichtigen Patienten mit Diabetes mellitus darstellt. Durch die Verbesserung des Lipidprofils, die anti-inflammatorische Wirkung und durch die reduzierte Thrombozytenaktivität, trägt es maßgeblich dazu bei, das kardiovaskuläre Risiko bei dieser Patientengruppe zu senken.

Auch wenn zum jetzigen Zeitpunkt die Nebenwirkungen das positive Wirkspektrum nicht aufwiegen und somit vorerst kein Cannabinoid-1-Rezeptorblocker über eine Marktzulassung verfügt, bleibt diese Medikamentengruppe sicherlich fester Bestandteil zukünftiger Forschungen.

6 Quellenverzeichnis

1. hs-zigr.de. http://www.hs-zigr.de/~wirsing/SM01.02/smws01vo.hml. Internet Communication . 2009.

2. Jonsson,B. Revealing the cost of Type II diabetes in Europe. *Diabetologia*. 2002;45:S5-12.

3. Gadde,KM, Allison,DB. Cannabinoid-1 receptor antagonist, rimonabant, for management of obesity and related risks. *Circulation*. 2006;114:974-984.

4. Despres,JP, Golay,A, Sjostrom,L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*. 2005;353:2121-2134.

5. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/353215607/12801385. 2008.

6. Deutsche Diabetesgesellschaft,2. http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/EBL_Klassifikation_Update_2004.pdf. 2009.

7. Sjostrom,L, Lindroos,AK, Peltonen,M, Torgerson,J, Bouchard,C, Carlsson,B, Dahlgren,S, Larsson,B, Narbro,K, Sjostrom,CD, Sullivan,M, Wedel,H. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med*. 2004;351:2683-2693.

8. Stumvoll,M, Goldstein,BJ, van Haeften,TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005;365:1333-1346.

9. who. http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/_. 2008.

10. merck-pharma. http://www.merck-pharma.de/service/gesundheit-aktuell/tabaktote.htm?archiv=on. 2008.

11. genesis. https://wwwgenesis.destatis.de/genesis/online/dWerteabruf_Page;jsessionid=6A712D 6 6361A1DE80D2CB570DC264BF2.tc1. 2008.

12. Ingrid Köster,DRLvFPDrHHPF. Die Kosten des Diabetes mellitus- Ergebnisse der KoDim-Studie. 2005.

13. Koster,I, von Ferber,L, Ihle,P, Schubert,I, Hauner,H. The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany--the CoDiM study. *Diabetologia*. 2006;49:1498-1504.

14. Dr.med.Ulrich Deuss. Endokrinologie. In: Gerd Herold und Mitarbeiter, editor. Innere Medizin 2006. 2008: 614-639.

15. Eckel,RH. Mechanisms of the components of the metabolic syndrome that predispose to diabetes and atherosclerotic CVD. *Proc Nutr Soc*. 2007;66:82-95.

16. Pierce,M, Keen,H, Bradley,C. Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med*. 1995;12:6-13.

17. Beckman,JA, Creager,MA, Libby,P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002;287:2570-2581.

18. Danaei,G, Lawes,CM, Vander,HS, Murray,CJ, Ezzati,M. Global and regional mortality from ischaemic heart disease and stroke attributable to higher-than-optimum blood glucose concentration: comparative risk assessment. *Lancet*. 2006;368:1651-1659.

19. Ross,R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.

20. 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.

21. Watala,C, Boncler,M, Gresner,P. Blood platelet abnormalities and pharmacological modulation of platelet reactivity in patients with diabetes mellitus. *Pharmacol Rep*. 2005;57 Suppl:42-58.

22. 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.

23. Norris,SL, Zhang,X, Avenell,A, Gregg,E, Schmid,CH, Kim,C, Lau,J. Efficacy of pharmacotherapy for weight loss in adults with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2004;164:1395-1404.

24. Williamson,DF, Thompson,TJ, Thun,M, Flanders,D, Pamuk,E, Byers,T. Intentional weight loss and mortality among overweight individuals with diabetes. *Diabetes Care*. 2000;23:1499-1504.

25. Deutsche Diabetesgesellschaft, 2008. http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/EBL_Dm_Typ2_Update_2008.pdf. 2009.

26. UKPDS Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352:837-853.

27. Solomon,CG. Reducing cardiovascular risk in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2003;348:457-459.

28. Sudic,D, Razmara,M, Forslund,M, Ji,Q, Hjemdahl,P, Li,N. High glucose levels enhance platelet activation: involvement of multiple mechanisms. *Br J Haematol*. 2006;133:315-322.

29. Schafer,A, Bauersachs,J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008;6:52-60.

30. Gawaz,M. Das Blutplättchen- Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart: Georg Thieme verlag, 1999.

31. Lambert,DM, Muccioli,GG. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines in the control of appetite and energy metabolism: emergence of new molecular players. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10:735-744.

32. Henness,S, Robinson,DM, Lyseng-Williamson,KA. Rimonabant. *Drugs*. 2006;66:2109-2119.

33. Boyd,ST, Fremming,BA. Rimonabant--a selective CB1 antagonist. *Ann Pharmacother*. 2005;39:684-690.

34. Van Gaal,LF, Rissanen,AM, Scheen,AJ, Ziegler,O, Rossner,S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*. 2005;365:1389-1397.

35. Bluher,M, Engeli,S, Kloting,N, Berndt,J, Fasshauer,M, Batkai,S, Pacher,P, Schon,MR, Jordan,J, Stumvoll,M. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. *Diabetes*. 2006;55:3053-3060.

36. Cota,D, Marsicano,G, Tschop,M, Grubler,Y, Flachskamm,C, Schubert,M, Auer,D, Yassouridis,A, Thone-Reineke,C, Ortmann,S, Tomassoni,F, Cervino,C, Nisoli,E, Linthorst,AC, Pasquali,R, Lutz,B, Stalla,GK, Pagotto,U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*. 2003;112:423-431.

37. Scheen,AJ, Finer,N, Hollander,P, Jensen,MD, Van Gaal,LF. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet*. 2006;368:1660-1672.

38. Pi-Sunyer,FX, Aronne,LJ, Heshmati,HM, Devin,J, Rosenstock,J. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006;295:761-775.

39. drugs,2. http://www.drugs.com/nda/acomplia_070613.html. 2009.

40. Janiak,P, Poirier,B, Bidouard,JP, Cadrouvele,C, Pierre,F, Gouraud,L, Barbosa,I, Dedio,J, Maffrand,JP, Le Fur,G, O'Connor,S, Herbert,JM. Blockade of cannabinoid CB1 receptors improves renal function, metabolic profile, and increased survival of obese Zucker rats. *Kidney Int*. 2007;72:1345-1357.

41. Rothe G.,SUTA. Zelluläre Diagnostik.Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. 2007.

42. Sysmex. http://www.sysmex.de/files/f1/Image/pic_279/diffch.pdf). 2008.

43. edoc. http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/medizin/lindenau-sabine/HTML/Gesamt-Durchflu.html. 2008.

44. Brich J. Pharmakologie der ADP-Rezeptoren auf humanen Thrombozyten. 2004.

45. 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.

46. Springer. http://www.springerlink.com/content/gkx267344453507h/. 2009.

47. Schober,A, Manka,D, von Hundelshausen,P, Huo,Y, Hanrath,P, Sarembock,IJ, Ley,K, Weber,C. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation*. 2002;106:1523-1529.

48. von Hundelshausen,P, Weber,KS, Huo,Y, Proudfoot,AE, Nelson,PJ, Ley,K, Weber,C. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*. 2001;103:1772-1777.

49. Van Gaal,L, Pi-Sunyer,X, Despres,JP, McCarthy,C, Scheen,A. Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S229-S240.

50. Miyawaki,T, Abe,M, Yahata,K, Kajiyama,N, Katsuma,H, Saito,N. Contribution of visceral fat accumulation to the risk factors for atherosclerosis in non-obese Japanese. *Intern Med*. 2004;43:1138-1144.

51. Siegel-Axel,D, Daub,K, Seizer,P, Lindemann,S, Gawaz,M. Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2008;78:8-17.

52. Libby,P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.

53. Coleman,LG, Jr., Polanowska-Grabowska,RK, Marcinkiewicz,M, Gear,AR. LDL oxidized by hypochlorous acid causes irreversible platelet aggregation when combined with low levels of ADP, thrombin, epinephrine, or macrophage-derived chemokine (CCL22). *Blood*. 2004;104:380-389.

54. Hansson,GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.

55. 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.

56. Dickfeld,T, Lengyel,E, May,AE, Massberg,S, Brand,K, Page,S, Thielen,C, Langenbrink,K, Gawaz,M. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc Res*. 2001;49:189-199.

57. Weber,C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res*. 2005;96:612-616.

58. Weisberg,SP, Hunter,D, Huber,R, Lemieux,J, Slaymaker,S, Vaddi,K, Charo,I, Leibel,RL, Ferrante,AW, Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*. 2006;116:115-124.

59. Tsou,CL, Peters,W, Si,Y, Slaymaker,S, Aslanian,AM, Weisberg,SP, Mack,M, Charo,IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007;117:902-909.

60. Veillard,NR, Kwak,B, Pelli,G, Mulhaupt,F, James,RW, Proudfoot,AE, Mach,F. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res*. 2004;94:253-261.

61. Cherian,P, Hankey,GJ, Eikelboom,JW, Thom,J, Baker,RI, McQuillan,A, Staton,J, Yi,Q. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke*. 2003;34:2132-2137.

62. Li,N, Hu,H, Lindqvist,M, Wikstrom-Jonsson,E, Goodall,AH, Hjemdahl,P. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2702-2708.

63. Gear,AR, Suttitanamongkol,S, Viisoreanu,D, Polanowska-Grabowska,RK, Raha,S, Camerini,D. Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function. *Blood*. 2001;97:937-945.

64. Schafer,A, Alp,NJ, Cai,S, Lygate,CA, Neubauer,S, Eigenthaler,M, Bauersachs,J, Channon,KM. Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1720-1726.

65. Rajesh,M, Mukhopadhyay,P, Batkai,S, Hasko,G, Liaudet,L, Huffman,JW, Csiszar,A, Ungvari,Z, Mackie,K, Chatterjee,S, Pacher,P. CB2-receptor stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H2210-H2218.

66. Chuchawankul,S, Shima,M, Buckley,NE, Hartmann,CB, McCoy,KL. Role of cannabinoid receptors in inhibiting macrophage costimulatory activity. *Int Immunopharmacol*. 2004;4:265-278.

67. Klegeris,A, Bissonnette,CJ, McGeer,PL. Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br J Pharmacol*. 2003;139:775-786.

68. Moreira,FA, Crippa,JA. The psychiatric side-effects of rimonabant. *Rev Bras Psiquiatr*. 2009;31:145-153.

69. Onaivi,ES, Ishiguro,H, Gong,JP, Patel,S, Meozzi,PA, Myers,L, Perchuk,A, Mora,Z, Tagliaferro,PA, Gardner,E, Brusco,A, Akinshola,BE, Hope,B, Lujilde,J, Inada,T, Iwasaki,S, Macharia,D, Teasenfitz,L, Arinami,T, Uhl,GR. Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS One*. 2008;3:e1640.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokalisation der CB1-Rezeptoren und Effekte der CB1-Rezeptor-Blockade ..... - 11 -
Abbildung 2: Grundlagen der Durchflusszytometrie ..... - 14 -
Abbildung 3: Differentialblutbild ..... - 15 -
Abbildung 4: Sandwich ELISA. ..... - 16 -
Abbildung 5: Messprinzip der Thrombozytenaggregation ..... - 19 -
Abbildung 6: Körpergewicht ..... - 23 -
Abbildung 7: Gewicht des visceralen Fettes ..... - 24 -
Abbildung 8: Blutglukosewerte ..... - 25 -
Abbildung 9: HbA_{1c}- Werte ..... - 26 -
Abbildung 10: Thrombozytenzahl ..... - 26 -
Abbildung 11: Totale Leukozytenzahl ..... - 27 -
Abbildung 12: Menge der im Blut gemessenen Neutrophilen ..... - 27 -
Abbildung 13: Anzahl der Monozyten im Blut. ..... - 28 -
Abbildung 14: Serumspiegel des Chemokins MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) ..... - 29 -
Abbildung 15: Serumspiegel des Chemokins RANTES ("Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted") ..... - 29 -
Abbildung 16: Serumspiegel der Triglyceride ..... - 30 -
Abbildung 17: Menge des Gesamtcholesterins im Serum ..... - 30 -
Abbildung 18: LDL-Cholesterinspiegel im Serum ..... - 30 -
Abbildung 19: HDL-Cholesterinspiegel im Serum ..... - 31 -
Abbildung 20: Menge des mit Ser^{157} phosphorylierten P-VASP ..... - 32 -
Abbildung 21: Durchflusszytometrische Bestimmung des Thrombozyten-gebundenen Fibrinogens anhand der Fluoreszenzstärke ..... - 32 -
Abbildung 22: P-Selektin-Expression an Thrombozyten nach Stimulation mit 20µM ADP ..... - 33 -
Abbildung 23: Graphische Darstellung der Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit der zugegebenen Thrombinmenge ..... - 34 -

Abbildung 24: Menge der an Fibrinogen adhärenten Thrombozyten unter arteriellen Flussbedingungen (1000 s^{-1}) ..... - 34 -

Tabelle 1: Hauptcharakteristika der RIO-, STRADIVARIUS-, SERENADE-, CIRRUS-, und ADAGIO-Lipids-Studie ..... - 46 -

Tabelle 2: Abbruchrate aufgrund von psychiatrischen Nebenwirkungen ..... - 47 -

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Citratsäure- Dextrose- Gemisch
ACE	Angiotensin- Converting- Enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
BMI	Body Mass Index
BSA	BSA-Block
Bzw.	beziehungsweise
Ca^{2+}	Calcium
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CB_1	Cannabinoid-1
CB_2	Cannabinoid- 2
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCR2	Short for chemokine (C-C motif) receptor 2
CD62P	P-Selektin
CD40	Cluster of Differentiation 40
CD42	Cluster of Differentiation 42
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CRP	C- reaktives Protein
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMEA	European Medicines Agency
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Gramm
GABA	Gammaaminobuttersäure
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
$HbA1_c$	Glykohämoglobin
HDL	High density lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IL 1ß	Interleukin 1ß
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
Lean	Lean-Zucker-Ratten
LDL	Low density lipoprotein
m^2	Quadratmeter
mg	Miligramm
Mg^{2+}	Magnesium
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
Min	Minute
mmol	miliMol
n	Anzahl
NaCL	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Stickstoff
Obese	Obese-Zucker- Ratten
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	pH- Wert
PPP	platelet poor plasma
PRP	platelet rich plasma
Rimo	Rimonabant behandelte Obese-Zucker-Ratten
Rio	Rimonabant in obesity
s	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean=SEM
Ser^{157}	$Serin^{157}$
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha

TRPV-1	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1, Capsaicin-Rezeptor
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
Vs.	Versus
µl	Mikroliter

Danksagung

Danken möchte ich besonders meiner Familie und meinem Freund, die mich während des gesamten Studiums unterstützt und immer an mich geglaubt haben und ohne deren Motivation diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Herrn Prof. Dr.med. J. Bauersachs danke ich dafür, dass ich Teil seines Teams sein durfte, was mir die Möglichkeit zum Beginn meiner wissenschaftlichen Arbeit bot.

Besonderer Dank geht jedoch an meinen Doktorvater Priv.Doz. Dr.med. Andreas Schäfer, der mir unentwegt mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso danken möchte ich aber auch Herrn Dr.med. Christian Vogt, Frau Meike Leutke, Frau Dr.med. Ulrike Flierl, Frau Dr.med. Corinna Schöpp, Frau Dr.med. Stephanie Pförtsch, Frau Jutta Neumüller, Frau Juliane Jaitner, Frau Sarah Weinberger und Frau Ilona Mell für die Unterstützung bei meinen Versuchen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

. . . . . .

Name	Stefanie Fiedler
Geburtsdatum	19. November 1982
Geburtsort	Bad Neustadt/Saale
Familienstand	ledig

Beruf

. . . . . .

Seit 2009 Assistenzärztin in der Kinderklinik des Leopoldina-Krankenhauses in Schweinfurt

Studium

. . . . . .

2009– 2002 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Frühjahr 2009	Ablegen der 2. Ärztlichen Prüfung
2009 – 2008	Ausarbeitung der Promotionsarbeit im Fachgebiet Innere Medizin: experimentelle Untersuchung der Wirkung des Cannabinoid-1-Rezeptorantagonisten Rimonabant auf Blutgerinnung und metabolische Faktoren der diabetischen Ratte.
	Arbeit als studentische Hilfskraft in der unfallchirurgischen Abteilung

der Rhön-Saale-Klinik in Bad Neustadt an der Saale

- Assistenz vorwiegend bei der Implantation von Knie, - und Hüftgelenksprothesen

2008 – 2007 Praktisches Jahr im Leopoldina-Krankenhaus in Schweinfurt in den Fächern

- Pädiatrie
- Chirurgie
- Innere Medizin

2007 – 2004 Klinisches Studium mit

- Famulatur im Fachgebiet Unfallchirurgie im Gesundheitszentrum Odenwaldkreis GmbH/ Kreiskrankenhaus Erbach
- Famulatur im Fachgebiet Anästhesie im St. Elisabeth Krankenhaus GmbH Bad Kissingen
- Famulatur im Fachgebiet Allgemeinmedizin in der Gemeinschaftspraxis Dr. med. Heinz/Dr. med. Bayer/ Dr. med. Leber, Wollbach
- Teilnahme am kardiovaskulären Praktikum in der Herz- und Gefäßklinik GmbH Bad Neustadt/Saale mit Einblick in die Fachgebiete
  - Kardiologie
  - Herz-Thorax-Chirurgie
  - Anästhesie
  - Radiologie

- Neurologie
- Teilnahme am Wahlpflichtfach Sonographie

2004 – 2002 Vorklinisches Studium mit Abschluss der Ärztlichen Vorprüfung

- Krankenpflegedienst in der Herz- und Gefäßklinik GmbH Bad Neustadt/Saale

Schulbildung

. . . . . .

2002– 1993 Rhön-Gymnasium Bad Neustadt an der Saale: Abitur in den Fächern Latein, Biologie, Religion und Deutsch.

1993– 1989 Grundschule Schönau an der Brend

Würzburg, Juni 2010