

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

**Einfluss der Langzeittherapie mit dem Endocannabinoid-Rezeptorblocker
Rimonabant auf Thrombozytenaktivierung und proinflammatorische Chemokine
bei Diabetes**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jutta Neumüller

aus Aschaffenburg

Würzburg, Juni 2010

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

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

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2011

Die Promovendin ist Ärztin

1. EINLEITUNG.....	1
1. 1 Übergewicht und Adipositas.....	1
1. 1. 1 Prävalenz von Übergewicht und Adipositas.....	1
1. 1. 2 Definition und Klassifikation der Adipositas	1
1. 1. 3 Pathophysiologie der Adipositas	3
1. 1. 4 Aufgaben des Fettgewebes	3
1. 1. 5 Komorbiditäten der Adipositas.....	4
1. 1. 6 Metabolische Auswirkungen der Adipositas.....	4
1. 1. 6. 1 Das Metabolische Syndrom.....	4
1. 1. 6. 2 Weitere metabolische Veränderungen.....	6
1. 2. Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM)	6
1. 2. 1 Prävalenz des T2DM	6
1. 2. 2 Pathogenese des T2DM.....	7
1. 2. 3 Zusammenhang zwischen T2DM und Adipositas.....	7
1. 2. 4 Zusammenhang zwischen T2DM und kardiovaskulären Ereignissen.....	8
1. 3. Therapeutische Ansätze zur Behandlung von Adipositas in Hinblick auf kardiovaskuläre Faktoren	9
1. 3. 1 Behandlungskonzept der Adipositas	9
1. 3. 2 Beeinflussung von Lebensstiländerungen auf T2DM	10
1. 3. 3 Effekte der Pharmakotherapie auf T2DM und kardiometabolische Parameter 11	
1. 3. 3. 1 Sibutramin	11
1. 3. 3. 2 Orlistat	12
1. 4. Das Endocannabinoid-System.....	12
1. 4. 1 Die Endocannabinoid-Rezeptoren.....	13
1. 4. 1. 1 CB ₁ -Rezeptoren.....	13
1. 4. 1. 2 CB ₂ -Rezeptoren.....	13
1. 4. 2 Der Endocannabinoidrezeptorblocker Rimonabant	14
1. 4. 2. 1 Die Wirkung von Rimonabant an den zentralen CB ₁ -Rezeptoren	15
1. 4. 2. 2 Die Wirkung von Rimonabant an den peripheren CB ₁ -Rezeptoren.....	15
1. 4. 3 Die RIO-Studien	16
1. 4. 3. 1 Die RIO-Europe-Studie	16
1. 4. 3. 2 Die RIO-Nordamerika-Studie	17

1. 4. 3. 3 Die RIO-Lipid-Studie	18
1. 4. 3. 4 Die RIO-Diabetes-Studie.....	18
1. 4. 4 Positive kardiometabolische Veränderungen durch die Rimonabanttherapie.	19
1. 5. Atherosklerose	19
1. 5. 1 Pathogenese der Atherosklerose	19
1. 5. 2 Die Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung der Atherosklerose.....	20
1. 5. 3 Antithrombozytäre Medikamente.....	21
1. 5. 4 Der Einfluss von Rimonabant auf die Thrombozyten	22
2. MATERIAL UND METHODEN.....	23
2. 1 Tiere	23
2. 2 Blutgewinnung	23
2. 3 Blutbild	24
2. 3. 1 Bestimmung der Leukozytensubpopulationen	24
2. 3. 2 Bestimmung der Thrombozytenzahl	25
2. 4 Bestimmung der Chemokine MCP-1 und RANTES.....	26
2. 4. 1 MCP-1	26
2. 4. 2 RANTES.....	27
2. 5 Durchflusszytometrie	27
2. 5. 1 Funktionsweise der Durchflusszytometrie	27
2. 5. 2 Durchführung der Durchflusszytometrie.....	28
2. 5. 2. 1 Bestimmung des Fibrinogen-Rezeptorstatus	29
2. 5. 2. 2. Bestimmung des Phosphorylierungszustandes von VASP.....	29
2. 5. 2. 3 Bestimmung der ADP-induzierten P-Selektin-Expression	30
2. 6 Thrombozytenaggregation.....	30
2. 6. 1 Funktionsweise der Thrombozytenaggregation.....	30
2. 6. 2 Durchführung der Thrombozytenaggregation.....	32
2. 7 Flusskammermodel zur Thrombozytenadhäsionsmessung.....	32
2. 7. 1 Funktionsweise der Flusskammer	32

2. 7. 2 Durchführung des Flusskammerversuchs.....	33
2. 8 Statistik.....	34
2. 9 Reagenzien.....	35
3. ERGEBNISSE.....	36
3. 1 Metabolische Parameter	36
3. 2 Zirkulierende Thrombozyten und Leukozytensubpopulationen.....	37
3. 3 Serumspiegel der Chemokine	40
3. 3. 1 MCP-1	40
3. 3. 2 RANTES.....	41
3. 4 Serumspiegel der Lipoproteine	42
3. 5 Marker der in vivo-Plättchenfunktion	45
3. 5. 1 VASP-Phosphorylierung	45
3. 5. 2 Fibrinogen.....	46
3. 6 In vitro Thrombozytenstimulation, -aggregation und -adhäsion.....	47
3. 6. 1 Thrombozytenstimulation durch ADP.....	47
3. 6. 2 Thrombozytenaggregation.....	48
3. 6. 3 Thrombozytenadhäsion	49
4. DISKUSSION	51
4. 1 Vergleich mit den RIO-Studien.....	51
4. 2 Einfluss von Rimonabant auf metabolische Parameter und Leukozytensubpopulationen im Rahmen der Atherogenese	53
4. 3 Einfluss von Rimonabant auf die Chemokine MCP-1 und RANTES	55
4. 4 Einfluss von Rimonabant auf die Thrombozyten.....	58

4. 5 Alternative Wirkungsweise von Rimonabant am CB₂-Rezeptor	60
4. 6 Nebenwirkungen von Rimonabant	61
5. ZUSAMMENFASSUNG	63
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	64
7. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	67
7. 1 Abbildungsverzeichnis	67
7. 2 Tabellenverzeichnis	67
8. LITERATURVERZEICHNIS	69

DANKSAGUNG

CURRICULUM VITAE

1. Einleitung

1. 1 Übergewicht und Adipositas

1. 1. 1 Prävalenz von Übergewicht und Adipositas

Übergewicht und Fettleibigkeit sind ein stetig wachsendes Problem des 21. Jahrhunderts. Laut Angaben der World Health Organisation (WHO) waren im Jahre 2005 weltweit circa 1,6 Milliarden Erwachsene übergewichtig, mindestens 400 Millionen von ihnen galten als fettleibig. In vielen europäischen Ländern hat sich die Prävalenz von Adipositas seit den 1980er Jahren mindestens verdreifacht. Aktuelle Schätzungen ergeben, dass sich diese Zahlen bis zum Jahre 2015 verdoppeln werden. Dann sollen mehr als 2,3 Milliarden Erwachsene übergewichtig sein, davon mehr als 700 Millionen fettleibig. Der durchschnittliche Body Mass Index (BMI) eines Europäers liegt derzeit bei 26,5kg/m² und ist damit einer der höchsten Werte in den WHO-Regionen.^{1;2}

Erschreckend erscheint auch die Tatsache, dass gerade unter Kindern und Jugendlichen die Tendenz zu Übergewicht und Fettleibigkeit in den letzten Jahren dramatisch zugenommen hat. In Deutschland stieg die Prävalenz für Übergewicht bei Kindern von 8,9% auf 15,7%, und die Prävalenz für Adipositas bei Kindern von 10,1% auf 13,1%. Somit gilt jedes fünfte Kind und jeder dritte Jugendliche hierzulande als übergewichtig.^{1;3}

1. 1. 2 Definition und Klassifikation der Adipositas

Von Adipositas spricht man dann, wenn bei Frauen der Anteil der Fettmasse am Körpergewicht 30% und bei Männern 20% übersteigt.⁴ Die gebräuchliche Maßeinheit um die Fettmasse abzuschätzen und das Körpergewicht zu klassifizieren ist der BMI. Er wird errechnet aus dem Verhältnis des Körpergewichts in Kilogramm zum Quadrat der Körpergröße in Metern (kg/m²). Laut den gängigen WHO-Kriterien wird ein BMI von

25-29,9kg/m² als Übergewicht definiert. Der Begriff Adipositas gilt ab einem BMI von 30kg/m² und lässt sich in drei Untergruppen einteilen (siehe Tab. 1).

Bereits ab einem BMI von 20-22 kg/m² nimmt das Risiko für Adipositas-bedingte Folgeerkrankungen schrittweise zu.¹ Bei einem BMI > 28 kg/m² gilt, im Vergleich zur normalgewichtigen Bevölkerung, ein stark erhöhtes Risiko für Morbidität infolge von Diabetes Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen.

Gewichtsklassifikation (Europa, USA)	BMI (kg/m ²)
Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5-24,9
Übergewicht (Präadipositas)	25,0-29,9
Adipositas Grad I	30,0-34,9
Adipositas Grad II	35,0-39,9
Adipositas Grad III	> 40,0

Tab. 1: Klassifikation von Körpergewicht

Quelle: Herold, G. Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung. 2007. S. 630

Doch die Aussagekraft des BMI hat seine Grenzen, gerade im Bereich zwischen 25 und 30kg/m². Beispielsweise können Sportler ein erhöhtes Körpergewicht aufgrund einer höheren Muskelmasse aufweisen und damit einen erhöhten BMI, bei gleichzeitig geringem Körperfettanteil. Auch sagt der BMI nichts über die Fettverteilung aus. Dabei ist erwiesen, dass gerade die erhöhte Ansammlung von viszeralem Fettgewebe das höchste Risiko für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung oder eines Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) mit sich bringt.⁵ Für die Beurteilung der viszeralen Fettansammlung ist der Taillenumfang ein guter Parameter. Ein Taillenumfang von <94cm bei Männern und <80cm bei Frauen ist normal. Während hingegen ein Taillenumfang von ≥102cm bei Männern und ≥88cm bei Frauen auf ein stark erhöhtes Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen oder eines T2DM hinweist.^{5;6}

1. 1. 3 Pathophysiologie der Adipositas

Die Pathophysiologie der Adipositas ist komplex und multifaktoriell. Sie basiert auf einer positiven Bilanz zwischen aufgenommenen und verbrauchten Kalorien. Hauptfaktoren für die Entstehung von Übergewicht sind eine Fehlernährung einerseits und ein Bewegungsmangel andererseits. In der heutigen Zeit sind vor allem kalorienreiche, kostengünstige, einfach zuzubereitende Fertigprodukte in vielen Haushalten gängige Nahrungsmittel. Während hingegen teurere, aber kalorienärmere Lebensmittel, wie Obst, Gemüse und Vollkornprodukte gerade für sozial schwächere Familien nicht auf dem Tagesplan stehen. Förderlich für Übergewicht ist auch ein Bewegungsmangel, bedingt durch überwiegend sitzende Tätigkeiten, sowie ein verändertes Freizeit- (Fernsehen, Computer) und Transitverhalten (Auto).

Die auffällige familiäre Disposition⁷ lässt darauf schließen, dass bei der Prädisposition von Fettleibigkeit eine genetische Komponente eine Rolle spielt. Bis jetzt konnte allerdings kein einzelnes Gen identifiziert werden, so dass vermutlich eine Genkombination für die Entstehung der Adipositas verantwortlich gemacht werden muss.⁸ Zusätzlich sind Stress, ein niedriger sozioökonomischer Status, endokrine Erkrankungen und bestimmte Medikamente prädisponierend für die Entwicklung von Übergewicht.⁷

1. 1. 4 Aufgaben des Fettgewebes

Das weiße Fettgewebe ist an der Synthese, Speicherung und Freisetzung von Lipiden beteiligt. Das Fettgewebe selbst wird als endokrines Organ angesehen, das mehrere immunmodulierende Faktoren sezerniert, wie beispielsweise Cytokine, Tumornekrosefaktor α , Interleukin-6, Interleukin-1 β , Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, Prostaglandine, Angiotensinogene und Proteine, die die Energiebalance und den Metabolismus regulieren (Adiponektin, Leptin, Resistin).⁶ Es ist ebenfalls eine bedeutende Quelle für inflammatorische Signale, die zur Insulinresistenz führen.⁹

1. 1. 5 Komorbiditäten der Adipositas

Adipositas ist ein heterogener Zustand. Obwohl nicht zwangsläufig jeder Fettleibige unter Komorbiditäten leidet, ist die Adipositas mit einer Reihe von Komorbiditäten assoziiert.⁶ Vor allem das Risiko für chronische Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2, das metabolisches Syndrom und kardiovaskuläre Erkrankungen (Hypertonie, Insult und Koronare Herzerkrankung), ebenso wie Gallenblasenerkrankungen und einige Krebsarten ist besonders hoch. Starke Adipositas kann zu Invalidität und einer erhöhten Mortalität führen. Im Allgemeinen geht man bei starker Adipositas von einer Reduktion der Lebenserwartung um circa 9 Jahre aus.¹⁰ Tabelle 2 zeigt die häufigsten Adipositas-assoziierten Komorbiditäten.

Stark erhöhtes Risiko	Moderat erhöhtes Risiko	Leicht erhöhtes Risiko
Diabetes mellitus Typ 2/ metabolisches Syndrom	Koronare Herzerkrankung	Karzinome (z.B. Mamma, Kolon, Endometrium)
Hypertonie	Herzinsuffizienz	gestörte Fertilität
Dyslipidämie	Hyperurikämie	Polyzystisches ovarielles Syndrom
Schlafapnoe	Gicht	Rückenschmerzen
Gallenblasenerkrankungen	Osteoarthritis	Komplikationen bei der Anästhesie
	Präeklampsie	

Tab. 2: Komorbiditäten der Adipositas

nach Prugger C.: Development of obesity in Germany-prevalence, determinations and perspectives, Dtsche. Med. Wochenschr. 2007;132:892-897

1. 1. 6 Metabolische Auswirkungen der Adipositas

1. 1. 6. 1 Das Metabolische Syndrom

Die viszerale Stammfettsucht ist die Hauptkomponente einer Sammlung von diabetogenen, atherogenen, prothrombogenen und proinflammatorischen metabolischen Anormalitäten, auch bezeichnet als metabolisches Syndrom. Dieses dysmetabolische

Profil ist prädiktiv für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, auch ohne die klassischen Risikofaktoren.⁹

Die abdominale Adipositas spielt eine entscheidende Rolle für die Entstehung des metabolischen Syndroms. In einer aktuellen Studie wurde dargelegt, dass diese mit allen Kriterien des metabolischen Syndroms unabhängig voneinander assoziiert ist.¹¹ Es gibt verschiedene Definitionen des Metabolischen Syndroms, die sich meist nur geringfügig unterscheiden. Eine gängige Definition des metabolischen Syndroms mit besonderem Augenmerk auf die viszerale Adipositas ist die der „International Diabetes Federation (IDF)“ (siehe Tabelle 3).

IDF-Definition	
Taillenumfang $\geq 94\text{cm}$ (m) bzw. $\geq 80\text{cm}$ (w) oder BMI $>30\text{kg/m}^2$ plus ≥ 2 der folgenden Kriterien:	
Nüchtern glukose	$\geq 100\text{mg/dL}$ oder diagnostizierter T2DM
Triglyzeride	$\geq 150\text{mg/dL}$
HDL-Cholesterin	$< 40\text{mg/dL}$ (m) oder < 50 (f)
Hypertension	$\geq 130/ \geq 85$ mmHg

Tab. 3: IDF-Definition des Metabolischen Syndroms

nach Herold, G. Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung. 2007. S. 637

Die Ansammlung von überschüssigem intraabdominalem bzw. viszeralem Fettgewebe ist assoziiert mit einer Insulinresistenz, einer weiteren Hauptkomponenten des metabolischen Syndroms. Diese metabolischen Veränderungen sind wiederum eine Prädisposition für die Entwicklung eines T2DM und/oder einer kardiovaskulären Erkrankung (2-fach erhöhtes Risiko).¹²

Folgende weitere Veränderungen können mit dem metabolischen Syndrom vergesellschaftet sein: ein Anstieg des Apolipoprotein B, das Vorkommen kleiner dichter LDL-Partikel, Hyperurikämie, eine nicht-alkoholinduzierte Fettleber, erhöhte Lebertransaminasen und Gamma-Glutonyltransferase sowie eine Mikroalbuminurie. Je mehr Faktoren dieses Risikoprofils ein Patient für sich beansprucht, desto höher ist das

Risiko für einen Übergang in Diabetes (x20 für > 4RF) oder in eine kardiovaskuläre Erkrankung (x3,5 für > 4RF).¹⁰

1. 1. 6. 2 Weitere metabolische Veränderungen

Des Weiteren ist die abdominale Fettleibigkeit auch mit einem chronischen, leichtgradigen Entzündungszustand assoziiert. Gerade bei Patienten mit zentraler Fettansammlung wurde ein hoher Level von inflammatorischen Cytokinen festgestellt, den so genannten Adipokinen, wie z.B. Interleukin-6 und Tumornekrose-Faktor α . Diese bewirken eine Erhöhung des C-reaktiven Protein (CRP)-Spiegels und sorgen somit für einen proinflammatorischen Zustand. Außerdem können sie zur Insulinresistenz und zu kardiovaskulären Problemen führen, sowie diese verschlechtern. Auch ein reduzierter Adiponektinspiegel steht im Zusammenhang mit dem viszeralen Fettgewebe. Dieses Adipokin ist ebenfalls mit einer gestörten Insulinsensitivität assoziiert. Des Weiteren besteht bei fettleibigen Menschen eine Anfälligkeit für einen prokoagulanten Zustand, unter anderem wegen des erhöhten Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-(PAI-1)-Spiegels, der mit den adipösen, Insulin-resistenten Bedingungen einhergeht. Hohe Level des PAI-1 bewirken eine erniedrigte fibrinolytische Fähigkeit und dadurch ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse.¹³

Adipositas bewirkt auch Veränderungen in kardialen Strukturen und/oder Funktionen. Dies kann zu zahlreichen kardialen Komplikationen, wie z.B. der Koronaren Herzkrankheit, führen.¹³

1. 2. Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM)

1. 2. 1 Prävalenz des T2DM

In den letzten Jahren ist ein stetiger Zuwachs an T2DM-Erkrankungen zu verzeichnen, so dass in diesem Zusammenhang durchaus von einer Pandemie gesprochen werden

kann. Hierfür vorrangig verantwortlich ist unser heutiger Lebensstil mit zu wenig Bewegung und fettreicher, energiereicher Ernährung. Weltweit gibt es derzeit schätzungsweise 195 Millionen Diabetiker. Es ist anzunehmen, dass bis ins Jahr 2030 ein Anstieg auf 366 Millionen Diabetes-Fälle zu verzeichnen ist.¹² Deutschland gehört mit mindestens vier Millionen Erkrankten, bei einer Dunkelziffer von etwa zwei Millionen Betroffenen, zu den europäischen Ländern mit der höchsten Diabeteshäufigkeit. Experten erwarten, dass sich die Zahl der Diabetiker und Diabetikerinnen bis zum Jahr 2020 nahezu verdoppelt, wenn nicht gegengesteuert wird.¹⁴

1. 2. 2 Pathogenese des T2DM

Pathogenetisch liegen dem T2DM zwei Störungen zu Grunde. Zum einen ist beim Typ 2-Diabetiker die postprandiale Insulinsekretion gestört, was zu einer postprandialen Hyperglykämie führt. Zum anderen leiden Diabetiker unter einer Insulinresistenz, für die entweder ein Prärezeptordefekt, ein Postrezeptordefekt oder ein Rezeptordefekt mit Herunterregulierung verantwortlich ist. Die Insulinresistenz wiederum führt zu einer weiteren Verstärkung der Hyperglykämie und damit über Jahre zum so genannten Sekundärversagen des Pankreas.^{4;15}

1. 2. 3 Zusammenhang zwischen T2DM und Adipositas

Eine bekannte Konsequenz der Fettleibigkeit ist eine erhöhte Insulinsekretion. Diese Hyperinsulinämie in Kombination mit einem normalen oder erhöhten Blutzuckerspiegel bei übergewichtigen Personen führt zur Insulinresistenz. Die Insulinresistenz wiederum gilt als Mechanismus für eine Reihe von Krankheitszuständen, einschließlich T2DM, Hypertonus, Dyslipidämie und kardiovaskuläre Erkrankungen.¹⁶ Die Zunahme der Prävalenz von T2DM ist stark zusammenhängend mit der Zunahme der Adipositas. Circa 90% aller T2DM-Fälle sind auf eine Gewichtszunahme zurückzuführen. Des

Weiteren leiden circa 197 Millionen Menschen weltweit an gestörter Glucosetoleranz (IGT), in den meisten Fällen ausgelöst durch Adipositas und dem damit assoziierten metabolischen Syndrom. Auch hier ist eine steigende Tendenz zu erkennen: bis zum Jahr 2025 wird ein Anstieg auf 420 Millionen IGT-Fälle erwartet.¹² Physiologisch gesehen verschlimmert der Prozess des Adipöswordens die Glykämie und die kardiovaskulären Risikofaktoren. Zum einen durch die (viszerale) Fettmasse selbst, zum anderen durch die Sekretion metabolischer Produkte aus den vergrößerten Fettzellen. Beim T2DM ist die Insulinresistenz teilweise der vermehrten Freisetzung von Fettsäuren aus diesen vergrößerten Fettzellen zuzuschreiben. Die sezernierten Fettsäuren werden vermehrt in der Muskulatur und in der Leber gespeichert. Auf Dauer führt dies zur verstärkten Insulinresistenz, Fettleber und Dyslipidämie. Die Kapazität des Pankreas zur Insulinproduktion ist von diesem Übermaß an Fettsäuren ebenfalls beeinträchtigt, was zu einer Verschlimmerung des T2DM führt.¹⁷

1. 2. 4 Zusammenhang zwischen T2DM und kardiovaskulären Ereignissen

Das erhöhte kardiovaskuläre Risiko wird durch den erhöhten Nüchternblutzucker des Typ-2-Diabetikers bedingt. Diese Hyperglykämie kann direkte, schädliche Effekte auf das Gefäßsystem haben. Selbst moderate Blutzuckerspiegel können zur Anhäufung von fortschreitenden glykosylierten Endprodukten führen, die die Struktur und Form von Makromolekülen verändern. Diese glykosylierten Endprodukte sind für eine Reihe von Effekten verantwortlich, einschließlich des Abfangens von Stickstoffmonoxid (NO) und dem Mitwirken an oxidativem Stress, inflammatorischen Prozessen und der Atherogenese. Ein erhöhter PAI-1-Spiegel ist, wie schon erwähnt, für ein erhöhtes thromboembolisches Risiko verantwortlich. Infolgedessen ist Diabetes mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung makrovaskulärer und mikrovaskulärer Erkrankungen assoziiert. Im Vergleich zu Nichtdiabetikern haben T2DM-Patienten ein 2-3fach erhöhtes Risiko einen Myokardinfarkt zu erleiden und somit dasselbe Risiko, wie Myokardinfarkt-Patienten für einen Reinfarkt.^{9;18} Circa 55% der Diabetiker versterben an einem Myokardinfarkt. Bei Diabetikern, die gleichzeitig an einem

Hypertonus leiden, kommt es im Verlauf von 10 Jahren in 20-30% der Fällen zu einem kardiovaskulären Ereignis.⁴

Patienten mit Metabolischem Syndrom inklusive Diabetes haben das höchste Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit. Die Prävalenz von Diabetes ohne Metabolischem Syndrom beträgt nur 13%. Beinahe 87% der Patienten mit Diabetes erfüllen die Kriterien für das Metabolische Syndrom. Eine Studie belegte, dass die Prävalenz für eine KHK bei Erwachsenen >50Jahre, ohne Diabetes oder Metabolischem Syndrom nur 7,5% beträgt, wohingegen sie bei Patienten mit Metabolischem Syndrom und Diabetes mit 19,2% am höchsten liegt.¹³

1. 3. Therapeutische Ansätze zur Behandlung von Adipositas in Hinblick auf kardiovaskuläre Faktoren

1. 3. 1 Behandlungskonzept der Adipositas

Da Adipositas eine chronische und wiederkehrende Erkrankung ist, ist hier eine Langzeitbehandlung erforderlich.

Nach den Richtlinien des National Institutes of Health ist die Therapie der 1. Wahl eine Kombination aus einer niederkalorischen Diät, vermehrter Bewegung und Verhaltenstherapie. Empfohlen wird dies für Patienten mit einem BMI von 25-29.9 kg/m² plus mindestens 2 Komorbiditäten, wie T2DM, KHK, Hypertonie oder mit erhöhtem Taillenumfang. Bei Patienten mit einem BMI von >30kg/m² ist diese Maßnahme unabhängig von den Komorbiditäten zu empfehlen.

Bei Patienten mit einem BMI von 27 bis 29.9kg/m² und Komorbidität kann, nach 6 Monaten erfolgloser kombinierter Lebensstiltherapie, eine pharmakologische Therapie unterstützend eingesetzt werden, ebenso wie bei allen Patienten mit einem BMI ab 30 kg/m².

Operative Maßnahmen zur Gewichtsreduktion wie der Einsatz eines Magenbandes oder die Magenverkleinerung zeigen einen hohen Langzeitgewichtsverlust. Dies sollte aber nur eine Option für schwer adipöse Patienten mit einem BMI ab 35 kg/m² plus Komorbiditäten sein, bzw. für Patienten mit einem BMI ab 40 kg/m².

Es ist wichtig neue Ansätze zu finden, die weniger invasiv, aber genauso effektiv wie die chirurgischen Optionen sind. Optimal wäre eine frühzeitige aggressive Kombination aus Lebensstil-Änderungen und Pharmakotherapie.

1. 3. 2 Beeinflussung von Lebensstiländerungen auf T2DM

T2DM tritt häufig mit einer Reihe von anderen kardiovaskulären und metabolischen Risikofaktoren wie einer abdominalen Adipositas, niedrigem HDL-Cholesterin, hohen Triglyzerid-Konzentrationen und Hypertonie auf.¹⁹ Das Ausmaß, in welchem Diabetes das kardiovaskuläre Risiko erhöht unterstreicht die Bedeutung einer optimalen Diabetes-Therapie. Eine frühzeitige aggressive, multimodale Therapie verspricht den höchsten Erfolg bei der Reduktion des kardiovaskulären und mikrovaskulären Risikos (-50%) und ist zentraler Bestandteil des T2DM-Managements.^{13;19}

Eine solche Therapie umfasst eine Kombination aus Änderung des Lebensstils und pharmakologischer Therapie zur Behandlung von Hyperglykämie, Hypertonie, Dyslipidämie und Mikroalbuminurie.

Eine Metaanalyse von 18 Studien ergab, dass eine Gewichtsreduktion entscheidend zur Verbesserung dieses kardiometabolischen Risikoprofils beiträgt (signifikanter Abfall von LDL, Triglyzeriden und Blutdruck, sowie verbesserter Blutzucker). Des Weiteren ergaben beispielsweise sowohl die Finnish Diabetes Preventing Study (DPS) als auch das US Diabetes Prevention Program (DPP) jeweils eine 58%ige Reduktion der Diabetes-Inzidenz (Typ2) durch intensive Änderung des Lebensstils (Sport, fettarme Ernährung, niedrig-kalorische Ernährung) und einen 5-7%igen Verlust des Ausgangskörpergewichts.

Das DPP zeigte weiterhin, dass eine erhebliche Verbesserung der Inzidenz (-43%) für das Metabolische Syndrom besteht.¹³ Die Effektivität dieses Ansatzes ist unumstritten, unglücklicherweise ist jedoch gerade bei Diabetikern ein Gewichtsverlust oft nur schwer zu erreichen, vor allem da die meisten oralen Antidiabetika einen gewichtssteigernden Effekt haben.¹³

1. 3. 3 Effekte der Pharmakotherapie auf T2DM und kardiometabolische Parameter

Für viele Patienten ist es schwer ihr Gewicht dauerhaft zu reduzieren. Hierbei kann eine medikamentöse Therapie unterstützend zur Lebensstil-Änderung beiwirken. Man unterscheidet hier die Anorektika (Appetitzügler) von den Lipasehemmern. Erstere wirken im zentralen Nervensystem (ZNS), letztere wirken lokal auf Pankreasenzyme. Die beiden einzigen für eine Langzeitbehandlung zugelassenen Medikamente sind der Appetitzügler Sibutramin und der Lipasehemmer Orlistat.

1. 3. 3. 1 Sibutramin

Sibutramin, ein Serotonin- und Noradrenalin-Inhibitor, wirkt als ein Appetitzügler und bewirkt ein schnelleres Sättigungsgefühl. Des Weiteren stimuliert es die Thermogenese und erhöht den Energieverbrauch. Eine Studie ergab eine 3fach erhöhte Gewichtsreduktion im Vergleich zur alleinigen Lebensstil-Änderung. In einem Jahr verloren 63% der Testpersonen >5% ihres Gewichts, 31% verloren sogar >10%.

Die Kombination aus Sibutramin und Lebensstil-Änderung ergab eine 2fach erhöhte Gewichtsreduktion im Vergleich zu einer Monotherapie aus Sibutramin oder alleiniger Lebensstil-Änderung. Bei adipösen Patienten mit T2DM konnten folgende Verbesserungen der metabolischen Parameter nachgewiesen werden: Verbesserung des HbA_{1c}s um 1%, des Nüchtern-glukosespiegels und der Triglyzeridkonzentration. Eine Metaanalyse von 8 Studien zeigte eine Reduktion von Gewicht, Taillenumfang, Nüchtern-glukose, HbA_{1c} und Plasmatriglyzeriden, sowie eine Erhöhung des HDL-Cholesterins.

Als unerwünschter Effekt ergibt sich bei einer Sibutramin-Therapie allerdings eine leichte Erhöhung des Blutdrucks und des Pulses, was bei Patienten mit kardiovaskulärem Risiko kontraindiziert ist.¹³

1. 3. 3. 2 Orlistat

Orlistat reduziert die Fettabsorption indem es Pankreaslipasen bindet und die Hydrolyse von Lipiden zu absorbierbaren Fettsäuren verhindert. Studien zu Orlistat und Lifestyle-Änderung ergaben eine Gewichtsreduktion, eine Reduktion der kumulativen Inzidenz von Diabetes auf 6,2% (gegenüber 9%), eine Taillenumfangsreduktion, eine Reduktion des Gesamt- und des LDL-Cholesterins, sowie eine Blutdrucksenkung. Außerdem zeigte sich eine signifikante Reduktion des HbA_{1c}s und des Nüchterglukosespiegels.

Unerwünschte Nebenwirkungen bei diesem Medikament sind vor allem gastrointestinale Beschwerden (Steatorrhoe, Flatulenz, mangelnder Resorption fettlöslicher Vitamine).¹³

1. 4. Das Endocannabinoid-System

Gerade weil Adipositas als Wegbereiter für kardiometabolische Risiken gilt, ist die Gewichtskontrolle und –reduktion der wichtigste Ansatz für die Änderungen des kardiometabolischen Risikos. Dies ist noch immer eine klinische Herausforderung. Die meisten Behandlungen zielen darauf ab, die bereits durch die Adipositas entstandenen Veränderungen, z.B. T2DM, Hypertonus, Dyslipidämie und kardiovaskuläre Erkrankungen, zu behandeln. Ein neuer, interessanter Ansatz ist das Endocannabinoidsystem und sein selektiver Rezeptorblocker Rimonabant.

Das Endocannabinoidsystem (EC-System) setzt sich zusammen aus 2 Endocannabinoid-Rezeptoren (CB₁ und CB₂), 5 endogenen, lipidähnlichen Liganden (z. B. Anandamide (AEA), 2-Arachidonoyl-Glycerol) und den Enzymen, die an ihrer Biosynthese und ihrem Abbau beteiligt sind.²⁰ Es reguliert die Energiehomöostase des Körpers und ist an der Kontrolle des Essverhaltens und peripherer metabolischer Prozesse beteiligt, z.B. an der Glucosehomöostase und der Lipidhomöostase. Vorläufige Studien haben ergeben, dass bei Adipositas und Diabetes eine Überaktivität des EC-Systems vorliegt, sodass eine Mitbeteiligung desselben am Pathomechanismus der beiden Krankheiten vorstellbar ist.²¹

1. 4. 1 Die Endocannabinoid-Rezeptoren

Die Wirkung der Endocannabinoide wird durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren vermittelt. Es gibt 2 Hauptrezeptoren im Endocannabinoidsystem, den Cannabinoid-Rezeptor Typ I (CB₁) und den Cannabinoid-Rezeptor Typ II (CB₂). Beides sind 7-Transmembran-Rezeptoren. In jüngerer Zeit wird ein dritter Rezeptortyp, mutmaßlich im Hippocampus, postuliert, dieser ist jedoch noch nicht endgültig nachgewiesen.²²

1. 4. 1. 1 CB₁-Rezeptoren

CB₁-Rezeptoren sind G_{i/o}-Proteingekoppelt. Sie kommen in der höchsten Konzentration im Gehirn vor, vor allem in olfaktorischen und in cortikalen Regionen (Neocortex und pyriformer Cortex), im Hippocampus und in der Amygdala, in Basalganglien, in thalamischen und hypothalamischen Kernen, im cerebellären Cortex und in Hirnstamm-Kernen. Peripher sind die CB₁-Rezeptoren in den Nebennieren, den Hoden oder Ovarien, in Adipozyten, im Magenfundus und in vagalen Nervenendigungen, die mit dem Gastrointestinaltrakt verbunden sind, zu finden.

Eine periphere Stimulation senkt die Adiponektin-Produktion in den Adipozyten, eine zentrale Stimulation führt zu erhöhter Nahrungsaufnahme, reduzierten lipogenen Signalwegen in Muskeln und zu erhöhten lipogenen Signalwegen in der Leber und im Gastrointestinaltrakt.¹¹

1. 4. 1. 2 CB₂-Rezeptoren

CB₂-Rezeptoren sind hauptsächlich G₀-gekoppelte Rezeptoren. Sie kommen vor allem im Immunsystem und im hämatopoetischen System vor, lassen sich aber auch im Gehirn, in zirrhotischen Lebern, im Pankreas und im Knochen finden.¹¹

1. 4. 2 Der Endocannabinoidrezeptorblocker Rimonabant

Rimonabant (SR141716; Strukturformel siehe Abb. 1) wurde 2006 von der Firma Sanofi-Aventis unter dem Handelsnamen ACOMPLIA™ auf dem europäischen Markt gebracht. In vitro-Versuche ergaben, dass es sich dabei um einen, für die Blut-Hirn-Schranke durchlässigen, selektiven CB₁-Rezeptor-Antagonisten handelt, der nur geringe oder gar keiner Affinität zum CB₂-Rezeptor oder zu anderen Rezeptoren aufweist. In einigen anderen Studien wird jedoch eine zusätzliche Wirkung als inverser Agonist am Cannabinoid-Rezeptor postuliert.⁸

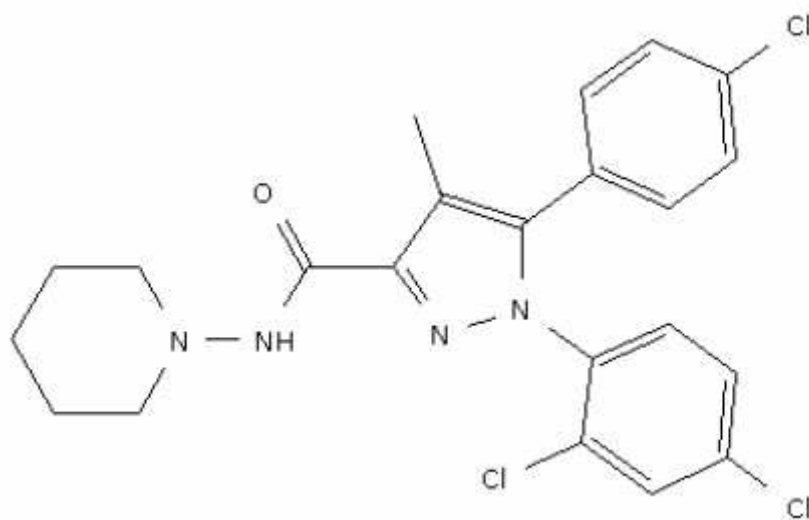


Abb. 1: Strukturformel Rimonabant

http://scienceblogs.com/moleculeoftheday/2007/11/rimonabant_the_antiweed.php

Rimonabant wird nach oraler Aufnahme schnell absorbiert. Die HWZ ist abhängig vom BMI und liegt zwischen 6 und 16 Tagen. Für ein optimales Wirkungsprofil sollten täglich morgens vor dem Frühstück 20mg eingenommen werden. Kontraindikationen für die Einnahme sind Leber- oder Nierenschädigung und schwerwiegende psychische Störungen, z.B. Depressionen. Schwangere oder stillende Frauen, sowie Patienten unter 18 Jahren sollten das Medikament nicht einnehmen.⁹ Zu den aufgetretenen unerwünschten Wirkungen zählen Übelkeit, Diarrhö, Infektionen des oberen Respirationstrakts, sowie depressive Störungen, Funktionsstörungen des Nervensystems und des Gastrointestinaltrakts. Diese unerwünschten Wirkungen waren vor allem unter der 20mg-Dosierung nachweisbar.²⁰

1. 4. 2. 1 Die Wirkung von Rimonabant an den zentralen CB₁-Rezeptoren






Bei der Regulierung der zentralen Nahrungsaufnahme und des Essverhaltens sind mehrere hypothalamische Areale beteiligt. Wegen der hohen Dichte an CB₁-Rezeptoren in diesem Gebiet ist anzunehmen, dass auch das Endocannabinoidsystem bei diesen Vorgängen eine Rolle spielt, vor allem da auch eine vermehrte Nahrungsaufnahme nach dem Konsum von Agonisten, wie z.B. Marihuana, nachgewiesen wurde.

1. 4. 2. 2 Die Wirkung von Rimonabant an den peripheren CB₁-Rezeptoren

An den CB₁-Rezeptoren in Hepatozyten wurden folgende Wirkungen von Rimonabant festgestellt: Durch eine verminderte Expression von SREBP-1C kam es zur Abnahme der Fettsäuresynthese, der Leberverfettung und der Verhinderung einer übermäßigen Gewichtszunahme.

Die Stimulation der CB₁-Rezeptoren an Fettzellen führt zu einer Lipogenese und zur Inhibition der Adiponektin-Produktion. Adiponektin ist ein Zytokin, das potentielle antidiabetische und antiatherosklerotische Eigenschaften hat. Eine CB₁-Rezeptor-Blockade in den Adipozyten führte in Studien zur gesteigerten Adiponektin-Produktion, zur Gewichtsreduktion, zur Abnahme des weißen und braunen Fettgewebes und zur Abnahme des Fettgehaltes in den Adipozyten. Außerdem wurde die Expression der Gene, die an der Fettspeicherung in braunem und weißem Fettgewebe beteiligt sind heruntergefahren. Man vermutet, dass die Lipolyse durch eine Induktion von Enzymen hervorgerufen wurde, die an der zellulären Energiegewinnung und an einem gesteigerten Energieverbrauch beteiligt sind. Dies wäre dem Mechanismus des inversen Agonismus zuzurechnen.⁸

In vivo-Studien an Mäusen zeigten, dass durch die Einnahme von Rimonabant die Nahrungsaufnahme vermindert wird und zusätzlich ein davon weitgehend unabhängiger Gewichtsverlust eintritt. Zu Wirkort und Wirkweise von Rimonabant siehe auch Tabelle 4.

Wirkort	Wirkmechanismus	Auswirkungen
 Hypothalamus/ Nucleus accumbens	↓ Nahrungsaufnahme	Gewichtsverlust, reduzierter Taillenumfang
 Fettgewebe	↑ Adiponektin ↓ Lipogenese	reduziertes viszerales Fettgewebe verbesserte Lipidämie verbesserte Insulinempfindlichkeit
 Muskel	↑ Glukoseaufnahme ↑ O ₂ -Verbrauch	verbesserte Insulinempfindlichkeit
 Leber	↓ Lipogenese	verbesserte Lipidämie verbesserte Insulinempfindlichkeit
 Gastrointestinaltrakt	↑ Sättigung	Gewichtsverlust

Tab. 4: Lokalisation der peripheren CB₁-Rezeptoren und die Wirkung von Rezeptorblockern

nach: Woods SC. Role of the endocannabinoid system in regulating cardiovascular and metabolic risk factors. Am J Med. 2007; 120:S19-25.

1. 4. 3 Die RIO-Studien

Die klinische Wirksamkeit von Rimonabant wurde in 4 klinischen Studien getestet, den sogenannten RIO (Rimonabant in Obesity)-Studien.

1. 4. 3. 1 Die RIO-Europe-Studie

Diese multizentrische, randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie untersuchte die Auswirkungen von Rimonabant auf das Körpergewicht und auf kardiovaskuläre Risikofaktoren. 1507 Patienten mit einem BMI ≥ 30 oder einem BMI > 27 und behandelte oder nicht behandelte Dyslipidämie, Hypertonie oder beidem wurden 1 Jahr täglich mit Placebo, 5mg Rimonabant oder 20mg Rimonabant behandelt. Zusätzlich sollten die Patienten eine leicht hypokalorische Diät (-600kcal/d) einhalten.

Nach 1-jähriger Behandlung mit Rimonabant kam es zu einer anhaltenden, signifikanten Gewichtsreduktion in beiden Rimonabant-Gruppen. Im Hinblick auf die kardiovaskulären Risikofaktoren kam es zu einer signifikanten Verbesserung des Taillenumfangs, des HDL-Cholesterins, der Triglyzeride, des Nüchternglukosespiegels und des Insulinsspiegels. Daraus ergibt sich, dass die 1-jährige Behandlung mit täglich 20mg Rimonabant eine signifikante Wirkung auf die Reduktion des Körpergewichts und die Verbesserung von kardiovaskulären Risikofaktoren hat. Die Therapie mit 5mg Rimonabant zeigte zwar eine signifikante Gewichtsreduktion, aber nur geringen Einfluss auf die metabolischen Parameter.^{8;23}

1. 4. 3. 2 Die RIO-Nordamerika-Studie

Die RIO-Nordamerika-Studie war ebenfalls eine randomisierte, placebokontrollierte, multizentrische Doppelblind-Studie, vom Design her vergleichbar mit der RIO-Europe-Studie. Hier erhielten 3045 adipöse (BMI ≥ 30) oder übergewichtige (BMI > 27 und behandelte oder unbehandelte Hypertonie oder Dyslipidämie) erwachsene Patienten für 1 Jahr entweder Placebo, 5mg Rimonabant oder 20mg Rimonabant. Im Unterschied zur RIO-Europe-Studie wurde jeweils ein Teil der 5mg und 20mg Rimonabant-Gruppen nach einem Jahr für ein weiteres Jahr auf Placebo umgestellt, während der Rest weiterhin Rimonabant erhielt. Die Placebo-Gruppe erhielt im 2. Jahr weiterhin Placebo. Nach einem weiteren Jahr wiesen beide Rimonabant-Gruppen eine signifikant höhere Körpergewichtsreduktion auf als die Placebogruppe. Auch die kardiovaskulären Risikofaktoren (Taillenumfang, HDL-Cholesterin, Triglyzeride, Verhältnis Gesamtcholesterin:HDL-Cholesterin, Nüchterninsulin-Spiegel) reduzierten sich im Vergleich zur Placebogruppe deutlich. Während die Studienteilnehmer, die nach 1 Jahr Rimonabant-Behandlung auf Placebo umgestellt wurden, ihr verlorenes Körpergewicht im 2. Jahr wiedererlangten, behielten die Patienten mit 2-jähriger Rimonabant-Behandlung ihren Gewichtsverlust und die günstigen kardiometabolischen Veränderungen bei.^{8;11}

1. 4. 3. 3 Die RIO-Lipid-Studie

Die metabolischen Veränderungen in der RIO-Europe-Studie gingen über die durch die Gewichtsreduktion zu erwartenden Veränderungen hinaus. Deshalb kann man von einer von der Gewichtsreduktion unabhängigen Wirkweise von Rimonabant ausgehen. In der randomisierten, doppelblinden, plazebokontrollierten RIO-Lipid-Studie wurden Hochrisikopatienten in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko untersucht. Auch hier ergaben sich signifikante Gewichts- und Taillenumfangsreduktionen. Es kam zu deutlichen Verbesserungen des HDL-Cholesterinspiegels, der Triglyzeride, des Gesamtcholesterin:HDL-Verhältnisses, der Glukosetoleranz und des Nüchterninsulinspiegels. Des Weiteren ergaben sich Veränderungen in der LDL-Partikelgröße, ein Anstieg des Adiponektin-Spiegels, und eine Abnahme des Leptin- sowie des CRP-Plasmaspiegels. Direkt Veränderungen des LDL-Cholesterinspiegels wurden nicht festgestellt. Eine Erklärung für die gewichtsunabhängigen Veränderungen könnte der erhöhte Adiponektin-Spiegel sein. Wie bereits angeführt gilt Adiponektin als Prädiktor für ein geringeres Risiko für Diabetes und kardiovaskuläre Ereignisse.^{8:24}

1. 4. 3. 4 Die RIO-Diabetes-Studie

Bei den vorhergehenden Studien wurden Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 nicht zugelassen. Die RIO-Diabetes-Studie war eine randomisierte, plazebokontrollierte Doppelblindstudie, die die Gewichtsabnahme bei Diabetikern unter Rimonabant-Therapie untersuchte. Einschlusskriterien waren ein seit 6 Monaten bestehender, mit Metformin- oder Sulfonylharnstoff-Monotherapie behandelter Diabetes mellitus Typ 2, ein BMI von 27-40kg/m², ein HbA_{1c} von 6,5-10,9% und ein Nüchternblutzucker von 5,55-15,04mmol/l. Nach 1-jähriger Behandlung mit Plazebo, 5mg oder 20mg Rimonabant ergab sich auch hier eine signifikante Gewichtsreduktion und eine Abnahme des Taillenumfangs in beiden Rimonabant-Gruppen. Zusätzlich kam es zu einer anhaltenden Senkung des HbA_{1c}. Auch die übrigen Parameter für das kardiovaskuläre Risiko (HDL, Triglyzeride, Insulin-Resistenz, CRP-Spiegel) verbesserten sich signifikant unter Rimonabant 20mg.^{8:19}

1. 4. 4 Positive kardiometabolische Veränderungen durch die Rimonabanttherapie

Durch Rimonabant-Therapie kam es zu verschiedenen positiven Veränderungen des kardiometabolischen Risikoprofils. Dazu zählen ein Adiponektinanstieg, eine Erhöhung des HDL-Cholesterins, eine Abnahme des Leptinplasmaspiegels und der Triglyzeridkonzentration.

Eine Reduktion der LDL-Konzentration konnte zwar nicht erreicht werden, aber durch Rimonabant kam es zu einer Konversion der kleinen dichten LDL-Partikel, die als eine Komponente des Metabolischen Syndroms gelten, hin zu größeren LDL-Partikeln.

Außerdem wurde durch die Behandlung mit Rimonabant der Spiegel des hochsensitiven CRP gesenkt, der als mäßiger Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen gilt.⁹ Die unter Rimonabanttherapie verbesserte Blutzucker-Regulation hat positive Auswirkungen auf mikrovaskuläre und makrovaskuläre Diabetes-Komplikationen.¹⁹

1. 5. Atherosklerose

Circa 60% der Todesfälle bei Diabetikern sind durch die Koronare Herzkrankheit bedingt. Damit gilt Diabetes mellitus als einer der Hauptrisikofaktoren für die KHK.

Die KHK wird hierbei hervorgerufen durch eine arterielle Minderperfusion der Gewebe aufgrund der Gefäßatherosklerose.

1. 5. 1 Pathogenese der Atherosklerose

Unter Atherosklerose versteht man einen pathogenetischen, über Jahre ablaufenden stenosierenden Prozess an großen und mittelgroßen Arterien, der zu Organischämie oder Infarkt in den entsprechenden Geweben führt.

Ausgangspunkt ist die so genannte endotheliale Dysfunktion der arteriellen Intima. Diese bedingt eine veränderte endotheliale Adhäsions- und Permeabilitätseigenschaft für Plasmabestandteile, eine lokale Produktion von Zytokinen, vasoaktiven Substanzen und Wachstumsfaktoren, sowie eine Veränderung der Leukozyten und Thrombozyten.

Wenn die endotheliale Dysfunktion bestehen bleibt, so kommt es durch den fortgesetzten Entzündungsprozess im weiteren Verlauf zu Lipid-Einlagerungen in die Intima. Diese so genannten „fatty streaks“ sind die ersten pathologisch sichtbaren Veränderungen im Bereich der Gefäßwand. In diese Lipidherde wandern Monozyten/Makrophagen ein, die sich zu Schaumzellen („foam cells“) differenzieren und LDL-Cholesterin speichern. Auch glatte Muskelzellen wandern, angeregt durch Wachstumsfaktoren, unter die Intima. Es kommt zur Intimaproliferation und Atherombildung. Durch weitere Zelleinwanderungen und Proliferationsprozesse bildet sich aus den „fatty streaks“ ein so genannter „komplizierter Plaque“, der das Gefäß zunehmend stenost. Zusätzlich wirken vasokonstriktorisch wirksame Substanzen wie Thromboxan, Endothelin oder Angiotensin II. Das akute Koronarsyndrom wird schließlich durch eine Plaqueruptur oder -ulzeration verursacht. Dabei wird der Plaqueinhalt ins Gefäßlumen verlagert und führt dort zur akuten Thrombosierung des Gefäßes.^{15:25}

1. 5. 2 Die Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung der Atherosklerose

Weitgehend ungeklärt ist der Auslösemechanismus, der für die Monozytenmigration in die Intima verantwortlich ist. Wahrscheinlich spielen die Thrombozyten hierbei eine entscheidende Rolle. Sie enthalten eine hohe Konzentration biologisch aktiver Substanzen (Zytokine, Wachstumsfaktoren), die bei ihrer Aktivierung freigesetzt werden. Gerade im Bereich veränderter Blutgefäße kann es leicht zu einer Thrombozytenaktivierung kommen. Durch die anschließende thrombozytäre Freisetzung von Interleukin-1 und CD40-Ligand wird im Endothel und in den glatten Muskelzellen die Sekretion chemotaktischer Substanzen, wie z. B. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), sowie die Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 induziert. MCP-1 gilt als bedeutender chemotaktischer Faktor für Monozyten. ICAM-1 und VCAM-1 sind wichtige Zelloberflächenmoleküle für die Monozytenadhäsion. Ausschlaggebend für die MCP-1- und die ICAM-1-Induktion ist der Transkriptionsfaktor NF-κB. Sowohl MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 als auch NF-κB konnten vermehrt in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden.

Des Weiteren wird die Einwanderung der glatten Muskelzellen durch einen PDGF-abhängigen Mechanismus von aktivierten Thrombozyten stimuliert. Somit scheinen aktivierte Thrombozyten entscheidend zur Entstehung der Atherosklerose beizutragen. Auch in der Pathophysiologie akuter Koronarsyndrome spielen die Blutplättchen eine entscheidende Rolle. Sie sind nicht nur an der Bildung des thrombotischen Gefäßverschlusses beteiligt, sondern auch an der Mikroembolisation, der Vasokonstriktion, der Plaqueprogression und der systemischen Entzündungsreaktion. Diese Mechanismen sind ausschlaggebend für die Prognose des akuten Koronarsyndroms.²⁶

1. 5. 3 Antithrombozytäre Medikamente

Gängige antithrombozytäre Medikamente, wie Acetylsalicylsäure (ASS) oder GPIIb/IIIa-Antagonisten, haben auf die atherogenen Mechanismen nur geringen Einfluss. Zur antithrombozytären Therapie wird heute standardmäßig niedrigdosiertes ASS verordnet. Hiermit lassen sich gute Ergebnisse beispielsweise bei der Behandlung des akuten Koronarsyndroms oder bei der Sekundärprohylaxe der Koronaren Herzkrankheit erzielen. Allerdings weist eine nicht unerhebliche Zahl an Reinfarkten unter laufender ASS-Therapie auf eine ungenügende thrombozyteninhibierende Wirkung von ASS bei einigen Patienten hin. In hohen Dosen ist ASS eine zusätzliche, hemmende Wirkung auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B nachgewiesen worden. Da dieser die Transkription von beispielsweise MCP-1 und VCAM-1 reguliert, hat ASS somit auch auf chemotaktische und adhäsive Eigenschaften des Endothels Einfluss.²⁶ Allerdings erhöhen sich mit steigender Dosis auch die Nebenwirkungen. Hierbei sind vor allem Malgenulzera, renale und hepatische Funktionsstörungen sowie eine erhöhte Blutungsneigung zu nennen.

GPIIb/IIIa-Antagonisten sind schon auf Grund der Notwendigkeit einer intravenösen Applikation nicht für einen längeren Anwendungszeitraum geeignet. Zudem weisen sie ein deutlich erhöhtes Blutungsrisiko bei den behandelten Patienten auf. Somit sind sie derzeit nur für eine kurzfristige Behandlung einzusetzen.

1. 5. 4 Der Einfluss von Rimonabant auf die Thrombozyten

Es ist bekannt, dass gerade bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren, wie T2DM oder Hypertonus, eine natürliche Hyperaggregabilität und erhöhte basale Aktivierung der Thrombozyten vorliegt.²⁶ Verschiedene Studien haben bestätigt, dass es durch die Behandlung mit Rimonabant neben der Gewichtsabnahme auch zur Verbesserung des kardiometabolischen Risikoprofils kommt. Nun stellt sich unter anderem die Frage, ob Rimonabant auch einen positiven Einfluss auf die Blutplättchen haben kann und somit einen weiteren kardioprotektiven Nutzen bietet.

In der folgenden Studie haben wir die Langzeiteffekte von Rimonabant hinsichtlich des Lipidprofils, zirkulierenden Leukozyten, Thrombozyten und der Thrombozytenaktivierung untersucht. Während jedoch bei den RIO-Studien Patienten als Versuchspersonen fungierten, die aufgrund ihrer Multimorbidität einer (Poly-) Medikation unterlagen, konnten unsere Versuche frei von potenziellen pharmakologischen Wechselwirkungen durchgeführt werden. Verwendet wurden hierfür 6 Monate alte Ratten mit gestörter Glukosetoleranz, welche als gängiges Modell des metabolischen Syndroms etabliert sind.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere

Für die Versuche wurden 6 Monate alte, männliche *Lean* und *Obese* Zuckerratten der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) verwendet. Haltung und Behandlung der Tiere erfolgten gemäß den Richtlinien der NIH publication No. 85-23, in der revidierten Fassung von 1996. Alle tierexperimentellen Versuche waren von der Regierung von Unterfranken genehmigt worden. Die Tiere waren in temperaturkontrollierten Käfigen bei 20-22°C untergebracht und hatten freien Zugang zu handelsüblicher Nahrung und Trinkwasser. Das Hell-Dunkel-Intervall wurde auf 12-Stunden festgelegt. Um Infektionen der Nager zu vermeiden, wurde der Tierstall nur mit einem frischen Kittel, OP-Maske, Überschuhen und Handschuhen betreten. Mittels einer Magensonde wurde einem Teil der *Obese* Ratten über einen Zeitraum von 10 Wochen täglich Rimonabant (10mg/kg Körpergewicht; gelöst in Gummi Arabicum; Sanofi-Aventis, Berlin, Deutschland) verabreicht. In den Auswertungen wurden diese Tiere mit placebobehandelten, altersgleichen *Lean* und *Obese* Zuckerratten verglichen. Die 6 Monate alte *Obese* Zuckerratte gilt als Model für das Metabolische Syndrom/T2DM, basierend auf einer gestörten Glukosetoleranz. Diese wurde durch eine erblich bedingte Genmutation (*fa/fa*) für Adipositas hervorgerufen. Als gesunde Kontrolltiere wurden die heterozygoten *Lean* Zuckerratten (*Fa/fa*) verwendet.

2.2 Blutgewinnung

Mittels des inhalativen Anästhetikums Isofluran wurden die Tiere in den Zustand einer tiefen Narkose versetzt. Beim weiteren Vorgehen waren sie zu jedem Zeitpunkt spontan atmend und ohne Reaktion auf Schmerzreize. Nach der Eröffnung des Abdomens erfolgten die Direktpunktion der Vena cava inferior und die Blutentnahme in handelsübliche 3,8%ige Zitrat- und EDTA-Röhrchen.

2.3 Blutbild

Sofort im Anschluss an die Entnahme wurde anhand des EDTA-antikoagulierten Vollbluts ein Differentialblutbild bestimmt, wobei rattenspezifische Einstellungen an einem für Tierblut geeigneten Analysator (Sysmex XT-2000iV, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) gewählt worden waren. Gemessen wurden hierbei die Anzahl der Leukozyten, der Leukozytensubpopulationen (Monozyten, neutrophile Granulozyten) und der Thrombozyten.

Die Analyse im Sysmex XT-2000iV erfolgte nach den technischen und methodischen Grundlagen der Durchflusszytometrie. Im Unterschied zur normalen Durchflusszytometrie wird am Sysmex XT-2000iV ein zusätzliches Lichtsignal, das Seitwärts-Fluoreszenzsignal, analysiert. Bei diesem Messverfahren dringt ein Reagenz in die Zelle ein, ohne diese zu zerstören, und färbt intrazelluläre Nukleinsäuren an. Hierbei gilt, dass die Seitwärtsstreuung mit dem Nukleinsäuregehalt der Zelle zunimmt.²⁷

2.3.1 Bestimmung der Leukozytensubpopulationen

Die Analyse der Fluoreszenzintensität (side fluorescence, SFL) von intrazellulärer DNA und RNA ermöglicht, zusammen mit der Analyse des Seitwärtsstreulichtes, eine genaue Differenzierung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten (inklusive Basophile) und eosinophile Granulozyten.²⁷

Zur Bestimmung dieses Differenzialblutbildes wird hierfür der „DIFF“-Kanal verwendet. Mittels zweier Tenside (STROMATOLYSER-4DL; STROMATOLYSER-4DS) werden zum einen die Erythrozyten und Thrombozyten lysiert, zum anderen die Nukleinsäuren und zytoplasmatischen Organelle der Leukozyten angefärbt. Gleichzeitig werden die Granula der eosinophilen Granulozyten durch eine, in STROMATOLYSER-4DL enthaltene, organische Säure angefärbt. Dadurch ist die Abgrenzung von den ansonsten ähnlich erscheinenden Neutrophilen anhand der größeren Seitwärtslichtstreuung möglich.²⁸ Siehe auch Abb. 2. 1.

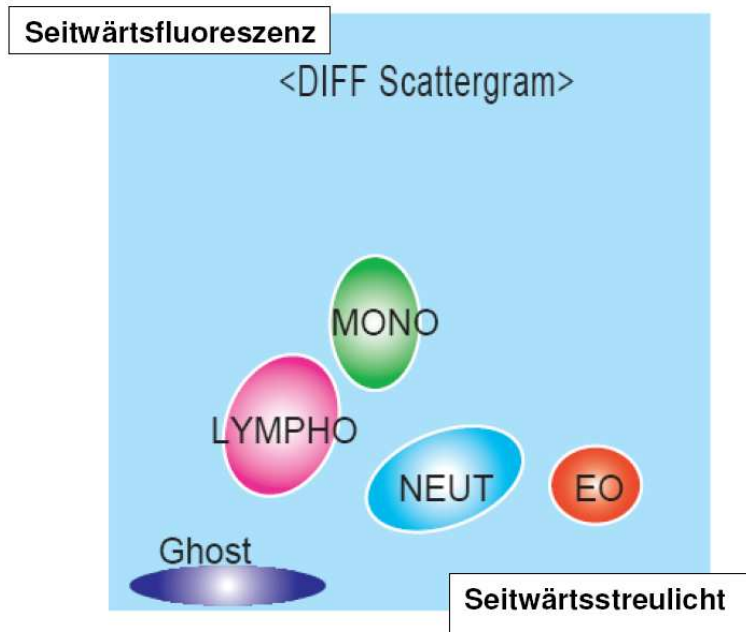


Abb.2.1: Differentialblutbild:

Je größer die Lappung der Zellkerne und die Menge an Granula im Zytoplasma, umso größer das Seitwärtsstreulicht. Je größer der Nukleinsäuregehalt einer Zelle, desto größer die Seitwärtsfluoreszenz.

Ghost: lysierte Zellen, Lympho: Lymphozyten, Mono: Monozyten, Neut: Neutrophile, EO: Eosinophile

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

2. 3. 2 Bestimmung der Thrombozytenzahl

Bei der Bestimmung der Thrombozytenzahl wurde stets das thrombozytenspezifische Fluoreszenzsignal im RET-Kanal verwendet. Um eine Interaktion mit eventuell vorhandenen Kryoglobulinen zu vermeiden, fanden alle Messung bei 41°C statt.²⁹ Zur Bestimmung der Thrombozytenpopulation wurden das Vorwärtsstreulicht und die Seitwärts-Fluoreszenz-Intensität analysiert.³⁰

2. 4 Bestimmung der Chemokine MCP-1 und RANTES

Die Serenspiegel der Chemokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1; CCL2) und RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted; CCL5) wurden mittels „Enzyme-linked immunoabsorbent assay“ (ELISA) bestimmt. Beide ELISAs, vom Typ MMROO RANTES immunoassay und MJEOO JE/MCP-1 immunoassay, wurden von der Firma R&D Systems, Wiesbaden (Deutschland) bezogen. Das hier verwendete Prinzip des Sandwich ELISA basiert auf einer Antikörperbindung an die zu bestimmende Substanz mit anschließender Farbentwicklung über ein Enzymsystem (siehe Abb.2.2).

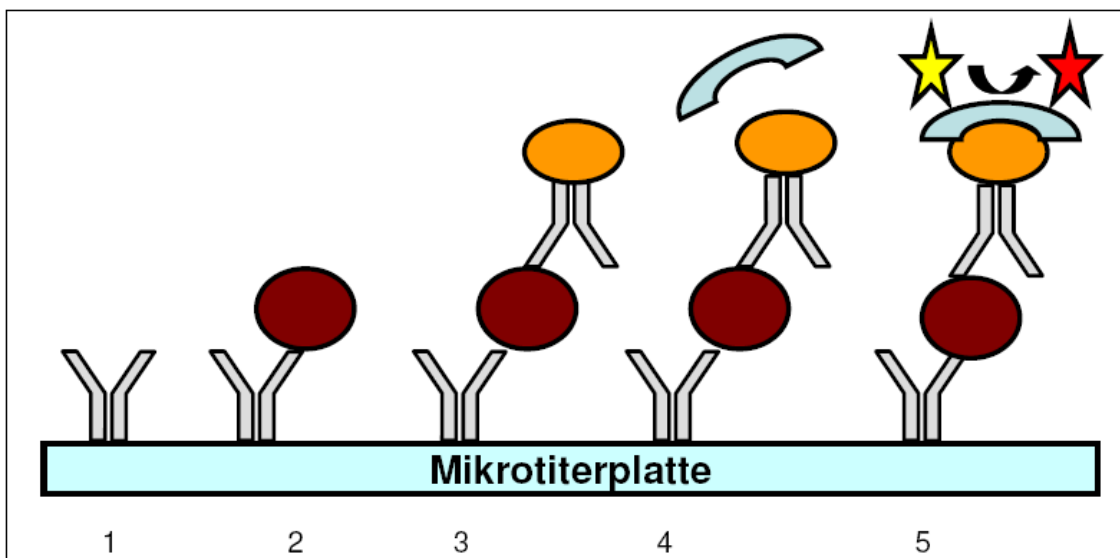


Abb.2.2: Prinzip des Sandwich-ELISA:

(1) Mit Primärantikörper beschichtete Mikrotiterplatte; (2) Zugabe der Probe und Inkubation; (3) Zugabe des Sekundärantikörpers; (4) Zugabe und Komplexbildung des enzymgebundenen Antikörper-Antigen-Antikörper; (5) Zugabe eines zum Enzym passenden Substrats, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird.

modifiziert nach <http://www.bendermedsystems.com/elisa--22>

2. 4. 1 MCP-1

Die hierfür benutzte Mikrotiterplatte war mit einem, für JE/MCP-1 spezifischen, polyklonalem Antikörper beschichtet (Primärantikörper). In die ELISA-Taschen wurde

sowohl der Standard, die Kontrolle, als auch die zu untersuchende Probe pipettiert. Jedes MCP-1 wurde vom immobilisierten Primärantikörper gebunden. Beim anschließenden Waschvorgang wurden alle ungebundenen Substanzen entfernt. Danach wurde ein zweiter, für JE/MCP-1 spezifischer, enzymgekoppelter, polyklonaler Antikörper (Sekundärantikörper) auf die Mikrotiterplatte gegeben. Ein erneuter Waschgang entfernte alle nichtgebundenen Sekundärantikörper. Nun wurde eine Farbstoffsubstratlösung hinzugegeben, die mit dem Enzymgekoppelten Sekundärantikörper reagierte. Die hervorgerufene Enzymreaktion ergab ein blaues Produkt, welches bei Zugabe der Stopp-Lösung in gelb umschlägt. Die Intensität der gemessenen Farbe ist proportional zur Menge des gebundenen MCP-1.³¹

2. 4. 2 RANTES

Dieser Sandwich-ELISA erfolgte analog dem CCL2-Nachweis. Als immobilierter Primärantikörper diente hierbei ein für RANTES spezifischer monoklonaler Antikörper. Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonaler, für RANTES spezifischer enzymgebundener Antikörper benutzt. Auch hier kam es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb.³²

2. 5 Durchflusszytometrie

2. 5. 1 Funktionsweise der Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie lassen sich die Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension analysieren. Bei dieser Methode können die Zellen mittels spezifischer, fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper anhand ihrer Oberflächenantigene charakterisiert werden. Die zu untersuchende Zellsuspension wird dabei über eine Kapillare mit Überdruck in den Messbereich befördert und als Einzelzellen an einem fokussierten Lichtstrahl (Argonlaser) vorbeigeführt. Hier trifft

monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm auf die Einzelzelle, wobei diese in Abhängigkeit ihrer Größe, Gestalt und spezifischen Anfärbung charakteristische Lichtsignale aussendet, die mittels spezieller Photodioden gemessen werden können. Die Lichtstreuung wird dabei von Zellgröße, Membranstruktur und von der Art der intrazellulären Bestandteile (z. B. Vakuolen) beeinflusst. Der größte Teil des Lichtes wird vorwärts gestreut (Vorwärtsstreulicht) und gibt dabei Informationen über die Zellgröße. Durch die Seitwärtstreuung (Seitwärtsstreulicht) erhält man Informationen über die Granularität der Zellen. Eine vorausgegangene Markierung der Zellen mit fluorchromkonjugierten Antikörpern gibt Aufschluss über die Expression von Oberflächenantigenen. Bei der vorliegenden Studie wurden bei jeder Zelle folgende drei Einzelparameter gleichzeitig gemessen: Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht, Fluoreszenzsignal 1.^{26;33} Die Messungen wurden, bei niedriger Flussrate, mit dem Becton Dickinson FACSCalibur durchgeführt. Als Software wurde CELLQuest software, version 3.1f verwendet. Bei 20.000 gemessenen Ereignissen im Thrombozytengate wurde die Messung beendet. Um die Fluoreszenzsignale von unspezifischen Bindungen zu eliminieren, wurden diese mit der ungefärbten Probe auf den Wert 10 eingestellt und bei den Graphen subtrahiert. Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurde die Softwareprogramme WinMDI und Graph Pad Prism 4.0 verwendet.

2. 5. 2 Durchführung der Durchflusszytometrie

Um die spezifischen Veränderungen aktivierter Thrombozyten zu beobachten, wurden im Rahmen dieser Arbeit Thrombozyten mit monoklonalen Antikörpern markiert, die ihrerseits mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren. Für alle Versuche wurde ein Puffer, bestehend aus 20ml Phosphat-gepufferte Saline (PBS; Ca²⁺- und Mg²⁺-frei), 20mg D-Glukose (5.5mM) und 100mg bovinen Serumalbumins verwendet.

2. 5. 2. 1 Bestimmung des Fibrinogen-Rezeptorstatus

Um die *in vivo* Aktivierung von Thrombozyten zu verifizieren wurde mittels spezifischer Antikörper die Fibrinogen-Bindung am thrombozytären GPIIb/IIIa nachgewiesen. Dazu wurden nach der Entnahme je 40µl Vollblut in die mit 50 µl PBS-Puffer vorgelegten lichtgeschützten Röhrchen gegeben und anschließend mit 10µl Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markierten Antikörpern für zehn Minuten inkubiert. Der hierfür verwendete Antikörper war ein FITC-markiertes Anti-Fibrinogen (WAK-Chemie, Steinbach, Deutschland). Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 30µl des Ansatzes mit 60µl Puffer verdünnt und sofort mit jeweils 10µl methanolfreiem Formaldehyd fixiert. Nach fünfminütiger Fixationszeit wurden erneut 300µl Puffer zugegeben. Eine antikörperfreie Kontrollprobe wurde als Leerwert bei jeder Versuchsreihe mit angefertigt. Bis zur anschließenden Messung am FACSCalibur erfolgte eine Lagerung bei 4°C. Anhand ihrer spezifischen Vorwärts- und Seitwärtsverteilung konnte die Thrombozytenpopulation identifiziert und ihre Fluoreszenzsignale analysiert werden.

2. 5. 2. 2. Bestimmung des Phosphorylierungszustandes von VASP

Thrombozyten enthalten hohe Konzentrationen an VASP (Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein). Es ist bekannt, dass ein am Serin-157-phosphoryliertes VASP eng mit der Hemmung des Fibrinogen-Rezeptors korreliert.³⁴ Um den Phosphorylierungszustand zu verifizieren wurden zunächst je 100µl Vollblut mit 50µl methanolfreiem Formaldehyd für 5 Minuten fixiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl Puffer und die Permeabilisierung der Zellmembranen mittels 25µl Triton X 100 (0,2%). Nach einer 10minütigen Inkubationszeit wurde, nach einem erneuten Verdünnungsschritt mit 1000µl PBS, 200µl des Ansatzes mit 20µl des FITC-markierten Antikörpers gegen phosphoryliertes VASP-Ser¹⁵⁷ (5C6, Nanotools, Tenningen) inkubiert. Um die Fluoreszenz der unspezifischen Bindung zu ermitteln, wurde parallel dazu eine weitere Probe angesetzt. In dieser wurde als Reagenz ebenfalls der FITC-markierte Antikörper zugegeben, wobei dieser aber zuvor für mindestens 30 Minuten mit einem blockenden

Phosphopeptid bei 4°C inkubiert worden war. Die Fluoreszenz beider Proben wurde, nach 45minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit dem Antikörper im FACSCalibur gemessen, wobei die mit dem Phosphopeptid/AK-inkubierte Probe als Leerwert diente und auf eine mittlere Fluoreszenzintensität von 10 eingestellt wurde.

2. 5. 2. 3 Bestimmung der ADP-induzierten P-Selektin-Expression

In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die Bestimmung der ADP-induzierten P-Selektin-(CD62)Expression auf der Thrombozytenoberfläche. Diese gilt als Maß für die Thrombozytenreaktivität *in vitro*.²⁶ Zunächst wurde das Zitrat(3,8%)-Vollblut bei 180g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Durch Abpipettieren wurde Plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen, welches anschließend mit PBS-Puffer auf 250 000 Thrombozyten pro μl verdünnt wurde. Jeweils 20 μl des PRPs wurden zusammen mit 60 μl Puffer in lichtgeschützte Reaktionsgefäße gegeben. Nun erfolgte die Stimulation durch Zugabe von jeweils 5 μl ADP in verschiedenen Konzentrationen (finale Konzentrationen: 5, 10, 15 und 20 μM). Nach 10 Minuten wurde der Antikörper gegen P-Selektin hinzugegeben. Hierfür wurde ein FITC-markierter Anti-P-Selectin-Antikörper (BioCytex, Marseille, Frankreich) verwendet. Die anschließenden Verdünnungsschritte, die Fixation mit Formaldehyd, sowie die Messungen der P-Selektin-Expression am FACS-Gerät erfolgten analog der unter 2. 5. 2. 1 beschriebenen Methode.

2. 6 Thrombozytenaggregation

2. 6. 1 Funktionsweise der Thrombozytenaggregation

Zur Ermittlung der Stärke der thrombozytären Aggregation auf verschiedene Stimuli wurde das turbimetrische Verfahren nach Born benutzt. Bei diesem photometrischen Messverfahren wird die Änderung der optischen Dichte einer Partikelsuspension

bestimmt. Ein Messkanal besteht aus einer Lichtquelle und einer gegenüberliegenden Photozelle. Dazwischen befindet sich, in einer gläsernen Messküvette, die jeweilige Probe, die mit Hilfe eines kleinen Rührmagneten mit konstanter Umdrehungszahl (900/min) gerührt wird. Durch Hinzufügen geeigneter Induktoren zum plättchenreichem Zitratplasma kann dann eine Aggregatbildung ausgelöst werden. Bei zunehmender Aggregation nimmt die Trübung der Suspension ab, was folglich von der Messzelle als Zunahme der Lichttransmission registriert und in Kurvenform kontinuierlich aufgezeichnet wird (Abb. 2.3). Die Änderung der Lichttransmission ist letztlich das Maß für die Aggregabilität der Thrombozyten.^{26;35}

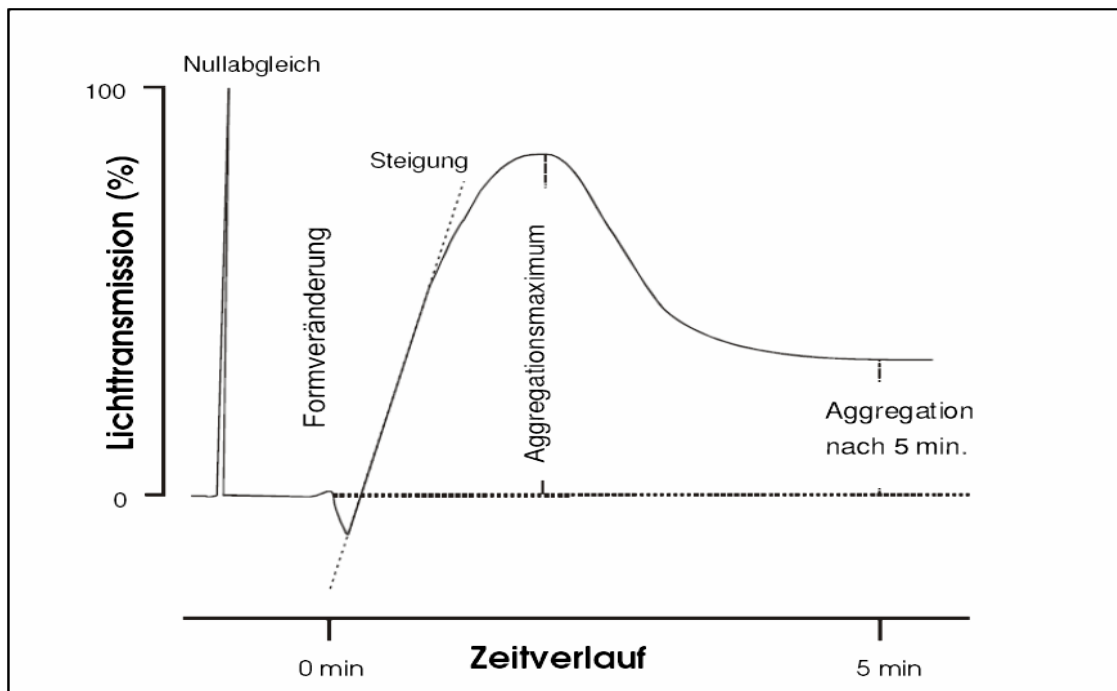


Abb.2.3: Darstellung eines normalen Kurvenverlaufs bei einer Thrombozytenaggregationsmessung. Modifiziert nach Wydymus M. Klinische Bedeutung der Clopidogrel - Resistenz bei Patienten mit koronarer Stentimplantation. 2008

2. 6. 2 Durchführung der Thrombozytenaggregation

Für diesen Versuch wurde zunächst aus dem Zitratvollblut, durch 10-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 180g, und Abpipettieren des Überstandes PRP gewonnen und für 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Um die Lichtdurchlässigkeit im Falle einer 100%igen Aggregation festzustellen, wurde bei Versuchen mit PRP zuvor plättchenarmes Plasma (PPP) als Referenzprobe gemessen. Anschließend wurde die PRP-Suspension ohne Zugabe von Induktoren gemessen. Diese Messung ergab den Nullwert der Lichttransmission. Jetzt wurde die Aggregation durch Einbringen des Induktors Thrombin in verschiedenen Konzentrationen ausgelöst und mittels eines kommerziell erhältlichen Aggregometers (Platelet aggregation profiler, PAP-8, BioData, Horsham, PA) gemessen.

2. 7 Flusskammermodell zur Thrombozytenadhäsionsmessung

2. 7. 1 Funktionsweise der Flusskammer

Um die Thrombozytenadhäsion unter arteriellen Flussbedingungen zu simulieren, wurde das Modell der Flusskammer (Abb. 2.4) verwendet.

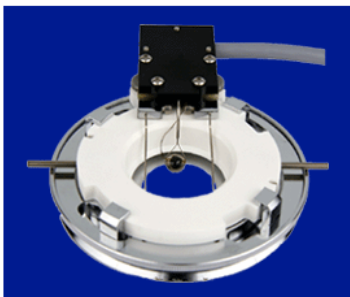


Abb.2.4: Abbildung einer handelsüblichen Flusskammer

Quelle: <http://www.biopetechs.com/Products/FCS2/fcs2.html>

Flusskammerversuche bieten die Möglichkeit dynamische Prozesse der Zell-Zell bzw. Rezeptor-Ligand Interaktion zu untersuchen. Dynamische Flusskammerversuche eignen sich vor allem für die Untersuchung von schnell ablaufenden Zell-Adhäsionen.³⁶ Bei

dieser Methode werden in einem geschlossenen Kammer-System Zellen mit einer definierten Geschwindigkeit über eine beschichtete Oberfläche gespült. Die Kammer besteht aus 2 parallelen Glasplatten. In die Kammer können dünne Platten eingebracht werden, die mit verschiedenen Liganden oder Zellen beschichtet sind. Der Deckel enthält Zu- und Abflussstellen für die Zellproben, die mit einem Schlauchsystem verbunden sind. Um eine definierte Flussgeschwindigkeit zu erreichen, ist die Flusskammer mit einer Perfusorpumpe verbunden. Ein Gummiring legt die Größe der Kammer genau fest. Die Kammer wird auf einem inversen Mikroskop fixiert und der Zellfluss über ein Objektiv beobachtet und mit einer Digitalkamera dokumentiert.^{36;37}

2.7.2 Durchführung des Flusskammerversuchs

Für diesen Versuch wurde Ratten-Vollblut zusammen mit einem Zitratsäure/ Dextrose-Gemisch (ACD: Zitratsäure 3,8 mM und Dextrose 125nM; 1ml ACD/4ml Blut) verwendet. Zur Herstellung des benötigten thrombozytenreichen Plasma (PRP) erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation der Suspension bei 180g. Der anschließenden Verdünnung des PRPs mit HEPES-modifiziertem Tyrode-Puffer 1 (132mM NaCl, 4mM KCl, 11,9 mM NaHCO₃, 0,36 mM NaH₂PO₄, 10mM Glucose, pH6,5; 1ml PRP/3,5ml Puffer1) folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (900g, 10 Min.). Das so gewonnene Thrombozytenpellet wurde, nachdem der Überstand abpipettiert und verworfen worden war, in HEPES-modifiziertem Tyrode-Puffer 2 (Puffer 1; pH 7,4; 1mM CaCl₂; 1mM MgCl₂) aufgelöst, so dass eine finale Thrombozytenkonzentration von 100 000/μl erreicht wurde. Anschließend wurden jeweils 5 ml der Suspension aus gewaschenen Thrombozyten in eine 50ml Perfusorspritze aufgezogen und für 15 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C vorgewärmt. Danach wurde die vorgewärmte Perfusorspritze in den mit der Flusskammer verbundenen Perfusor eingespannt. Im Anschluss daran wurden die Thrombozyten unverzüglich für 10 Minuten bei konstanter Geschwindigkeit durch die Kammer perfundiert. Um arterielle Flussbedingungen zu simulieren, wurde, gemäß eines Protokolls für einen ähnlichen Versuch mit menschlichen Thrombozyten³⁷, die Adhäsion der Thrombozyten bei einer Scherung von 1000/s untersucht. Danach

erfolgte bei gleicher Scherrate eine 5-minütige Perfusion von HEPES-modifiziertem Tyrode-Puffer, um die nicht fest adhärierenden Thrombozyten aus dem Gesichtsfeld des Objektivs zu entfernen.

Für diesen Versuch wurde eine aus zwei parallelen Glasplatten bestehende Flusskammer (FCS2, Bioptechs Inc., Butler, PA/USA) verwendet, welche auf die Plattform eines invertierten Mikroskops (TE 2000-S, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) montiert wurde. Die Deckplatten der Flusskammer waren zuvor mit einer definierten Konzentration an Fibrinogen als Ligand für die aktivierten Thrombozyten beschichtet worden.

Mit einer Digitalkamera (DS-2M, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) wurde aus 5-8 verschiedenen Blickfeldern (20x Objektiv) die Thrombozytenadhäsion dokumentiert.

Während der laufenden Thrombozytenadhäsionsmessung wurde, aus Zeitgründen, bereits die Suspension für die folgenden Experimente in konstanten Intervallen vorgewärmt. Das Intervall zwischen letzter Zentrifugation und Perfusion durch die Flusskammer wurde auf eine Stunde begrenzt. Dadurch konnte einer eventuellen Aktivierung oder Erschöpfung der Thrombozyten vorgebeugt und somit gut reproduzierbare Ergebnisse gewährleistet werden.

2. 8 Statistik

Bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde die Signifikanz mittels einer einseitigen Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) errechnet. Hierbei wurden für die statistischen Vergleiche durchgehend nicht-parametrische Tests verwendet. Um Gruppen zu vergleichen wurde der Kruskal-Wallis Test benutzt. Nachdem die Varianzgleichheit zuvor in einem Levene's Test geprüft worden war, wurde als statistisches Verfahren bei signifikanten Ergebnissen der Student's t-Test verwendet. Um die Mehrfachtestungen zu korrigieren, wurde als Post-Hoc-Test der Bonferroni-Test verwendet. Alle Daten wurden als Mittelwert (mean) \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) beziehungsweise als Einzelwerte + Median dargestellt. Als signifikant unterschiedlich gilt ein p-Wert von $p < 0,05$ (*) und als hochsignifikant ein p-Wert von

$p < 0,01$ (**). Signifikante Unterschiede zwischen *lean* und *obese* Tieren wurden mit * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen *obese* Rimo und *obese* (Plazebo-) Tieren wurden mit # dargestellt.

2. 9 Reagenzien

Soweit oben nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien, in der höchstmöglich erhältlichen Reinheit, von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Metabolische Parameter

In den RIO-Studien konnte bei den Probanden eine signifikante Gewichtsabnahme unter Rimonabanttherapie nachgewiesen werden. In unserer Studie konnte ein derartiger Gewichtsverlust nicht bestätigt werden, wobei jedoch keine Reglementierung der begleitenden Nahrungsaufnahme erfolgte. Alle Versuchstiere wurden regelmäßig wöchentlich gewogen und pro Versuchsgruppe die mittlere Gewichtszunahme im Verlauf der Behandlungsdauer von 10 Wochen bestimmt. Im Vergleich zu den altersentsprechenden *lean* Zuckerratten (Kontrollgruppe), hatten die 6 Monate alten *obese* Zuckerratten (Placebo- und Versuchsgruppe) zu Beginn des Versuchs ein hochsignifikant höheres Körpergewicht. Bei allen Tieren konnte in dem 10-wöchigen Versuchszeitraum eine Gewichtszunahme verzeichnet werden. Verglichen mit den Placebotieren, war diese bei den Versuchstieren nach der 10-wöchigen gewichtsadaptierten Behandlung mit Rimonabant jedoch signifikant geringer (Abb. 3.1).

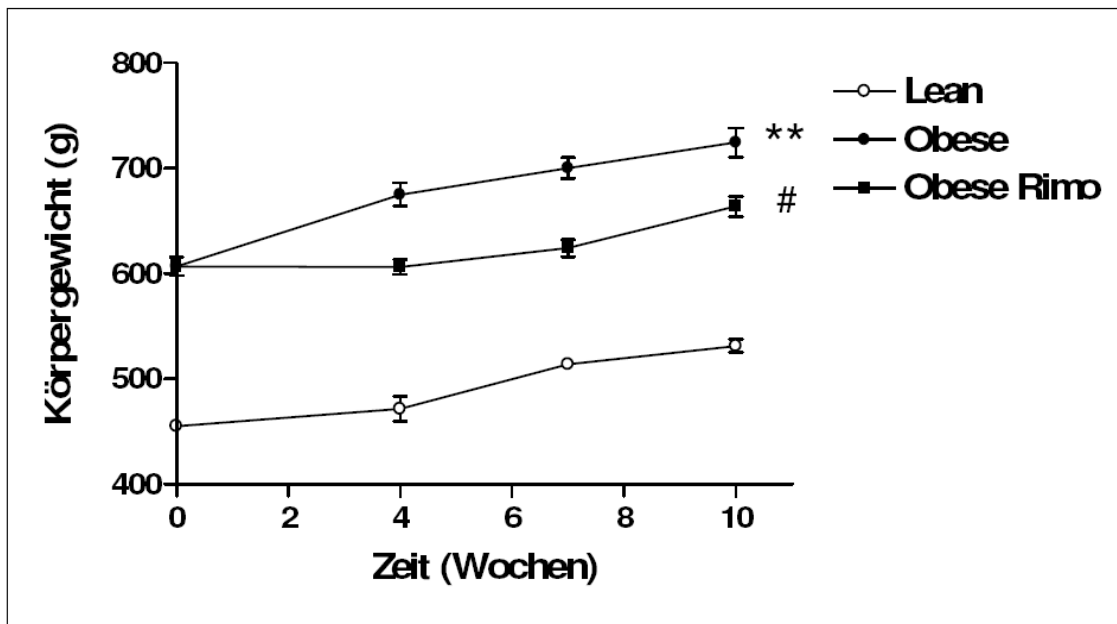


Abb. 3.1: Gewichtsveränderungen in g während eines Zeitraums von 10 Wochen, bei 6 Monate alten *lean* oder *obese* Zuckerratten mit oder ohne 10-wöchiger Rimonabantbehandlung. Mittelwert \pm SEM, $n=10-20$, ** $p<0,01$ versus *lean*, # $p<0,05$ versus *obese* Placebo.

3. 2 Zirkulierende Thrombozyten und Leukozytensubpopulationen

Bei der Pathogenese der Atherosklerose sind mehrere Blutzellpopulationen beteiligt. Im Frühstadium kommt es zur Infiltration der Intima durch Monozyten und neutrophile Granulozyten.³⁸ Aktivierte Thrombozyten sezernieren Interleukine und Chemokine, die entscheidend zur Atheroskleroseprogression beitragen.^{26;39} Um eine Erhöhung der beteiligten Zellpopulationen nachzuweisen, wurden in der vorliegenden Studie die Gesamtleukozytenzahl, die Anzahl der Monozyten und der neutrophilen Granulozyten, sowie der Thrombozyten analysiert. Die quantitative Auswertung des Vollblutes mittels des Analysegerätes für tierische Blutprodukte XT-2000iV-Systemx ergab, dass die Gesamtleukozytenzahl bei den *obese* Ratten höher waren als bei den *lean* Tieren. Durch die Behandlung mit Rimonabant kam es allerdings lediglich zu einer, im Vergleich zu der Placebogruppe, nichtsignifikanten Abnahme dieser Zellpopulationen (Abb. 3.2a)

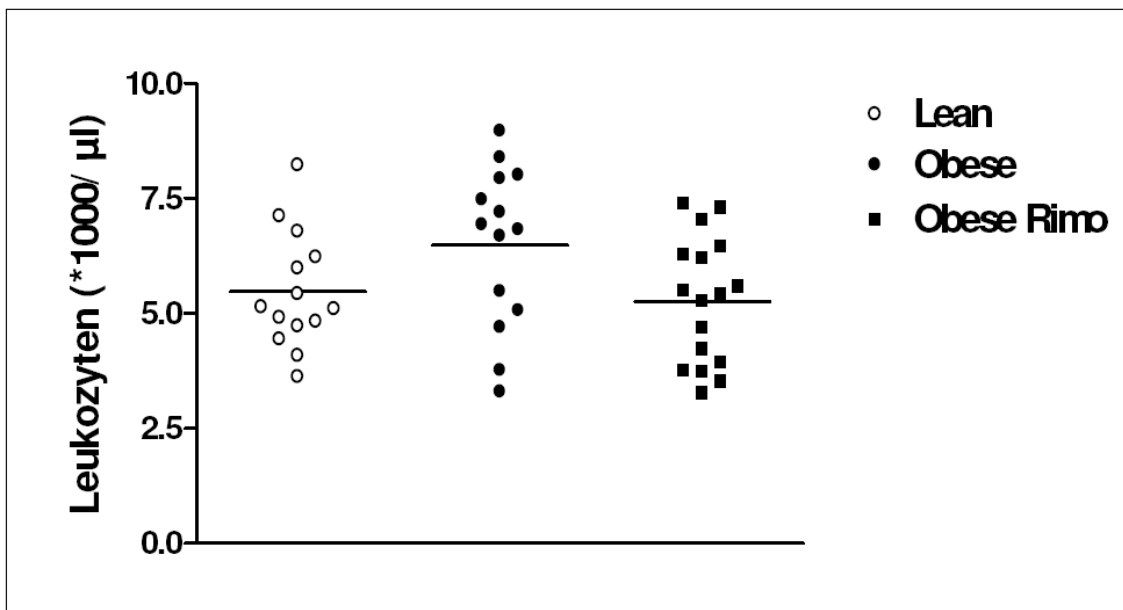


Abb.3.2a: Quantitative Analyse der zirkulierenden Leukozyten im Vollblut von 6 Monate alten *lean*, *obese* und *Rimo obese* Ratten, mit (*obese Rimo*) oder ohne (*lean*, *obese*) 10-wöchiger Rimonabantbehandlung, mittels Systemx XT-2000iV (Blutanalysator für tierische Blutproben). Trend zur Abnahme der zirkulierenden Leukozyten, nach 10-wöchiger Rimonabanteinnahme; Einzelwerte + Median, n=10-20

3. ERGEBNISSE

Auch die Anzahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten war bei den *obese* Ratten höher als bei den *lean* Tieren. Nach Rimonabanttherapie zeigte sich, im Vergleich zur Plazebogruppe, ein Trend zur Abnahme dieser Zellpopulation (Abb. 3.2b).

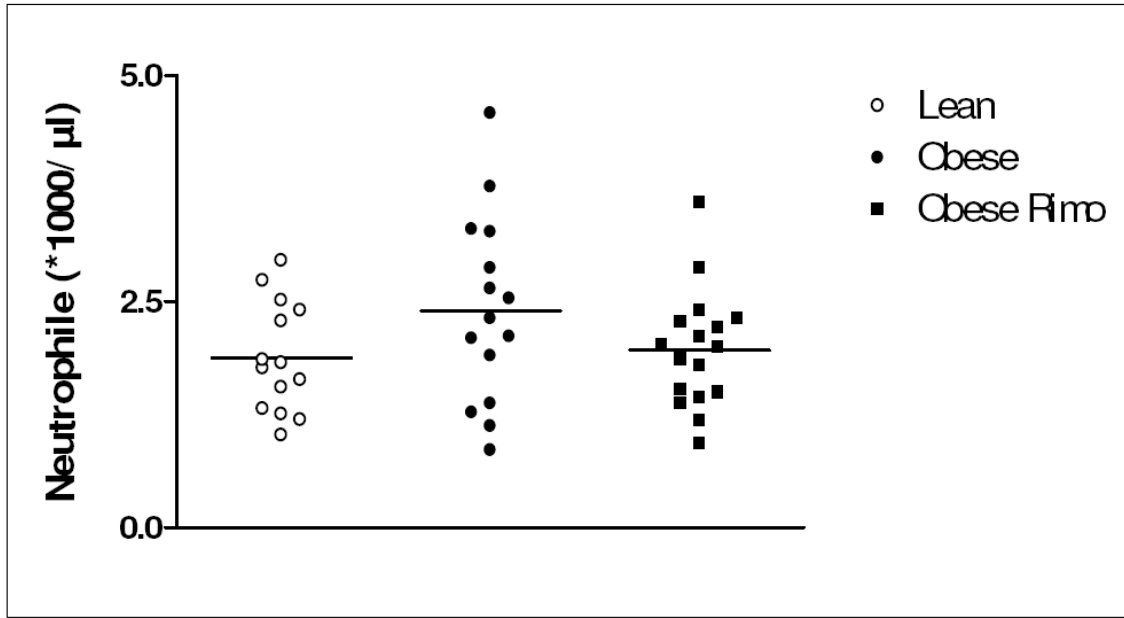


Abb.3.2b: Quantitative Analyse der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten im Vollblut von 6 Monate alten *lean*, *obese* und *Rimo obese* Ratten, mit (*obese Rimo*) oder ohne (*lean*, *obese*) 10-wöchiger Rimonabantbehandlung, mittels Sysmex XT-2000iV (Blutanalysator für tierische Blutproben). Trend zur Abnahme der zirkulierenden Blutzellen nach 10-wöchiger Rimonabanttherapie. Einzelwerte + Median, n=10-20

Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren war die Anzahl der zirkulierenden Monozyten bei den *obese* Ratten signifikant erhöht. Nach 10-wöchiger Rimonabanttherapie konnte dann eine signifikant erniedrigte Anzahl an zirkulierenden Monozyten nachgewiesen werden (Abb. 3.2c).

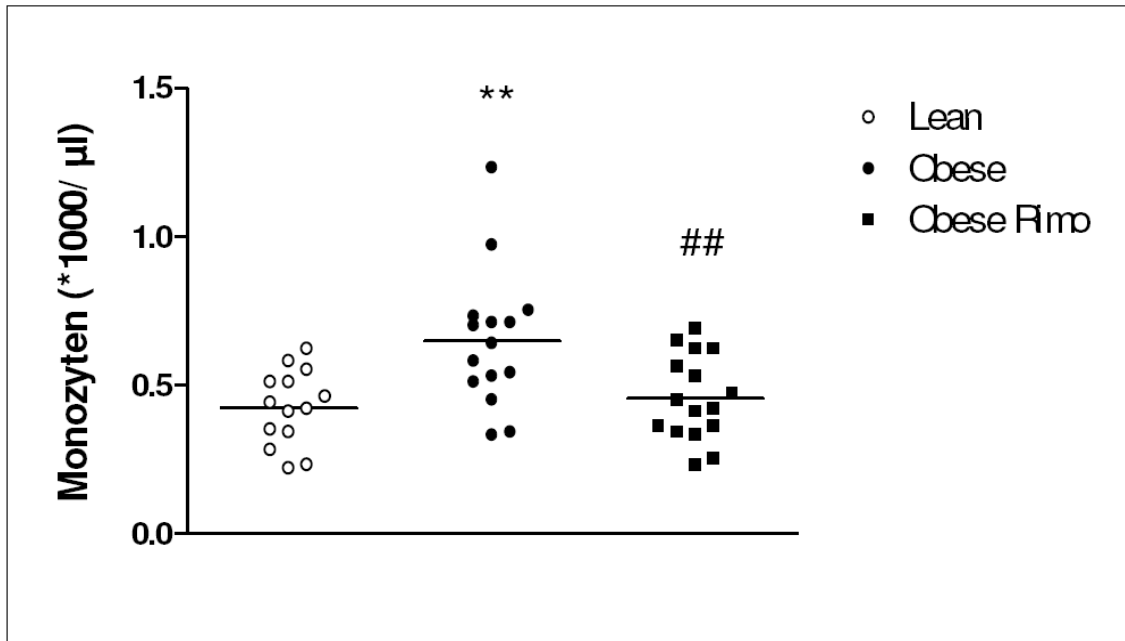


Abb.3.2c: Quantitative Analyse der zirkulierenden Monozyten im Vollblut von *lean*, *obese* und *Rimo obese* Ratten, mit (*obese Rimo*) oder ohne (*lean*, *obese*) 10-wöchiger Rimonabantbehandlung, mittels Sysmex XT-2000iV (Blutanalysator für tierische Blutproben). Signifikante Reduktion der zirkulierenden Monozyten nach 10-wöchiger Rimonabanttherapie. Einzelwerte + Median, n=10-20, **p<0,01 vs. *lean*, ##p<0,01 vs. *obese* Plazebo

Die quantitative Analyse der zirkulierenden Thrombozyten ergab keine signifikanten Unterschiede in den 3 Versuchsgruppen (Abb. 3.2d).

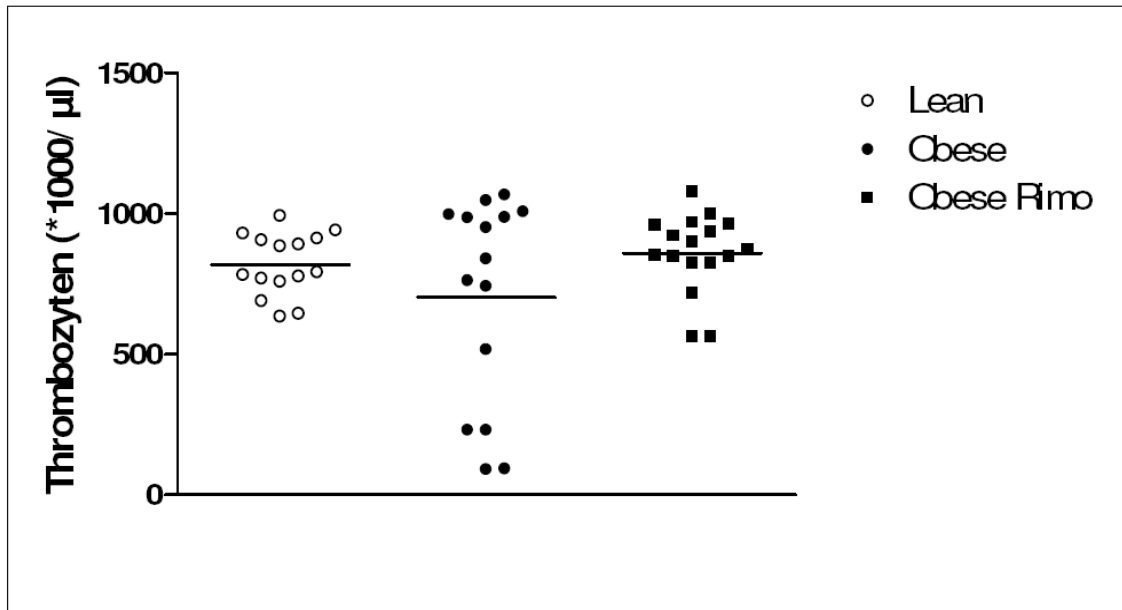


Abb.3.2d: Quantitative Analyse der zirkulierenden Thrombozyten im Vollblut von *lean*, *obese* und *Rimo obese* Ratten, mit (*obese Rimo*) oder ohne (*lean*, *obese*) 10-wöchiger Rimonabantbehandlung, mittels Sysmex XT-2000iV (Blutanalysator für tierische Blutproben). Kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen nach 10-wöchiger Rimonabanttherapie. Einzwerte + Median, n=10-20

3. 3 Serumspiegel der Chemokine

Bei der Entstehung der Atherosklerose spielen verschiedene Chemokine eine besondere Rolle. In dieser Studie wurde die Veränderungen der Chemokin-Serenspiegel von MCP-1 (=CCL2) und RANTES (=CCL5) unter Rimonabanttherapie untersucht.

3. 3. 1 MCP-1

Durch aktivierte Thrombozyten wird aus glatten Muskelzellen und im Endothel MCP-1 freigesetzt. Es gilt als der wichtigste chemotaktische Faktor für die Monozytenmigration und ist besonders häufig in atherosklerotischen Läsionen zu finden.²⁶ Mittels ELISA

wurden die MCP-1-Spiegel gemessen. Im Vergleich zu den *lean* Tieren, war der MCP-1-Spiegel bei *obese* Ratten hochsignifikant erhöht. Der Abfall des MCP-1-Spiegels nach 10-wöchiger CB₁-Blocker-Therapie war hochsignifikant (Abb. 3.3a).

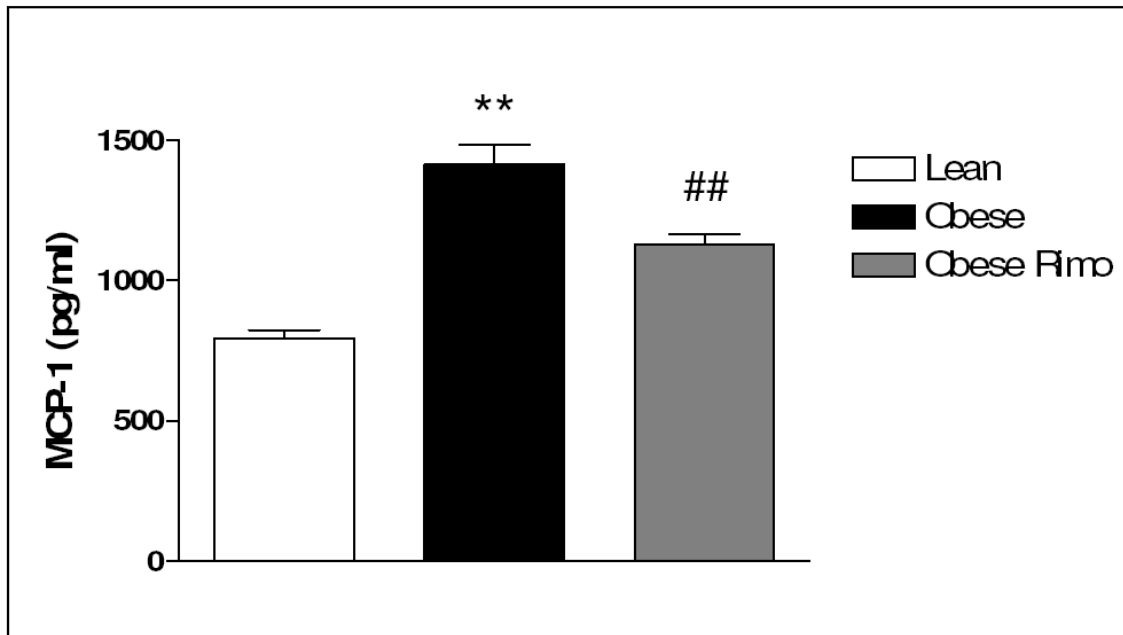


Abb. 3.3a: Mittels ELISA wurden die Serumspiegel des proatherosklerotischen Chemokins MCP-1 im Vollblut 6 Monate alter *lean* und *obese* Zuckerratten, mit (*obese Rimo*) oder ohne (*lean, obese*) 10-wöchiger Rimonabantbehandlung, bestimmt. Mittelwert \pm SEM, n=5, **p<0,01 versus *lean*, ##p<0,01 versus *obese*-Plazebo; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

3. 3. 2 RANTES

RANTES wird in großen Mengen von aktivierten Thrombozyten sezerniert. Dieses Chemokin wirkt als Trigger für die Monozytenrekrutierung in die Endothelwand.³⁹ Auch hier wurden die Chemokinspiegel mittels ELISA bestimmt. Bei *obese* Zuckerratten war der CCL5-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe hochsignifikant erhöht. Im Gegensatz zu den Plazebotieren kam es bei den mit Rimonabant behandelten Tieren zu einem hochsignifikanten Abfall des RANTES-Spiegels (Abb. 3.3b).

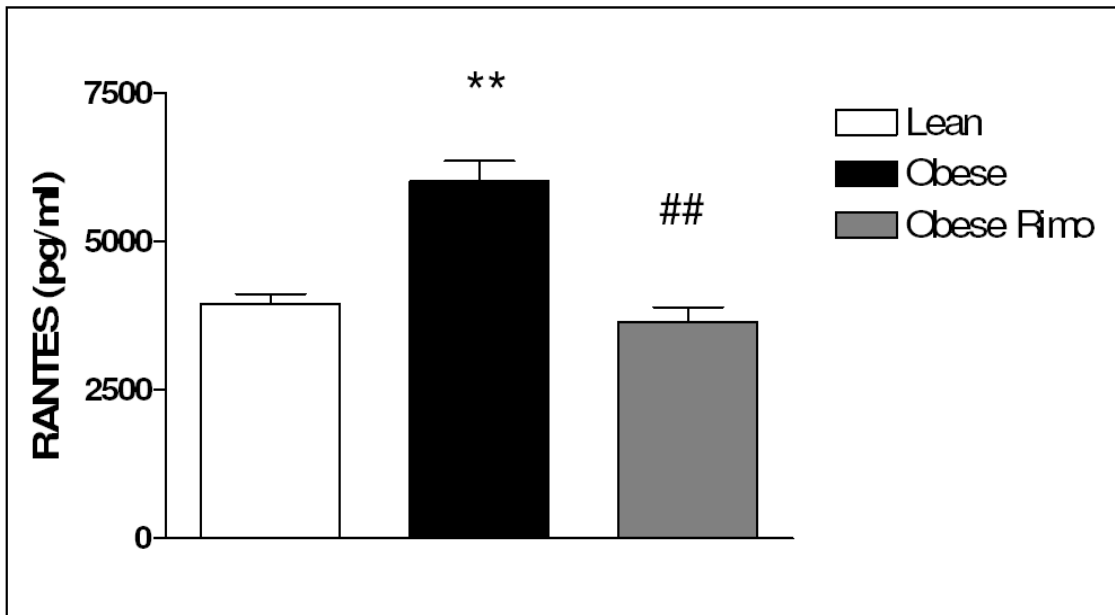


Abb. 3.3b: Mittels ELISA wurden die Serumspiegel des proatherosklerotischen Chemokins RANTES im Vollblut 6 Monate alter *lean* und *obese* Zuckerratten, mit (*obese* Rimo) oder ohne (*lean*, *obese*) 10-wöchiger Rimonabantbehandlung, bestimmt. Mittelwert \pm SEM, $n=5$, ** $p<0,01$ versus *lean*, ## $p<0,01$ versus *obese*-Plazebo; RANTES: regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted

3. 4 Serumspiegel der Lipoproteine

Des Weiteren wurden in dieser Studie die Auswirkungen der Rimonabant-Behandlung auf metabolische Risikofaktoren kardiovaskulärer Krankheiten bei diabetischen Tieren untersucht. Die Analyse des Lipidprofils zeigte bei den *obese* versus *lean* Zuckerratten eine hochsignifikante Erhöhung der Triglyzeride (Abb. 3.4a). Nach erfolgter Rimonabanttherapie war eine hochsignifikante Abnahme zu beobachten.

Auch das Gesamt-Cholesterin war bei den *obese* Tieren hochsignifikant höher als bei den Kontrolltieren. Durch die Einnahme von Rimonabant gelang es diesen Blutfettwert hochsignifikant zu senken (Abb. 3.4b).

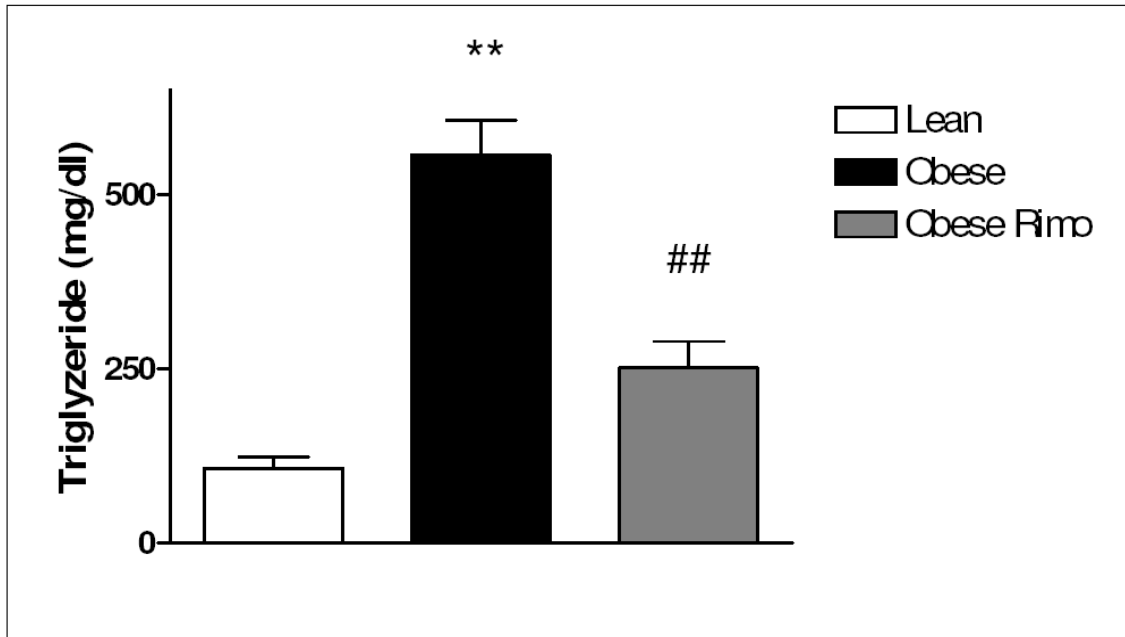


Abb. 3.4a: Bestimmung des Triglyzerid-Spiegels bei 6 Monate alten *lean* und *obese* Zuckerratten, mit (*obese Rimo*) oder ohne 10-wöchiger Rimonabantbehandlung (*lean*, *obese*). Signifikante Abnahme der Triglyzeride nach Rimonabanttherapie. Mittelwert \pm SEM, $n=5$, ** $p<0,01$ versus *lean*, ## $p<0,01$ versus *obese*-Plazebo.

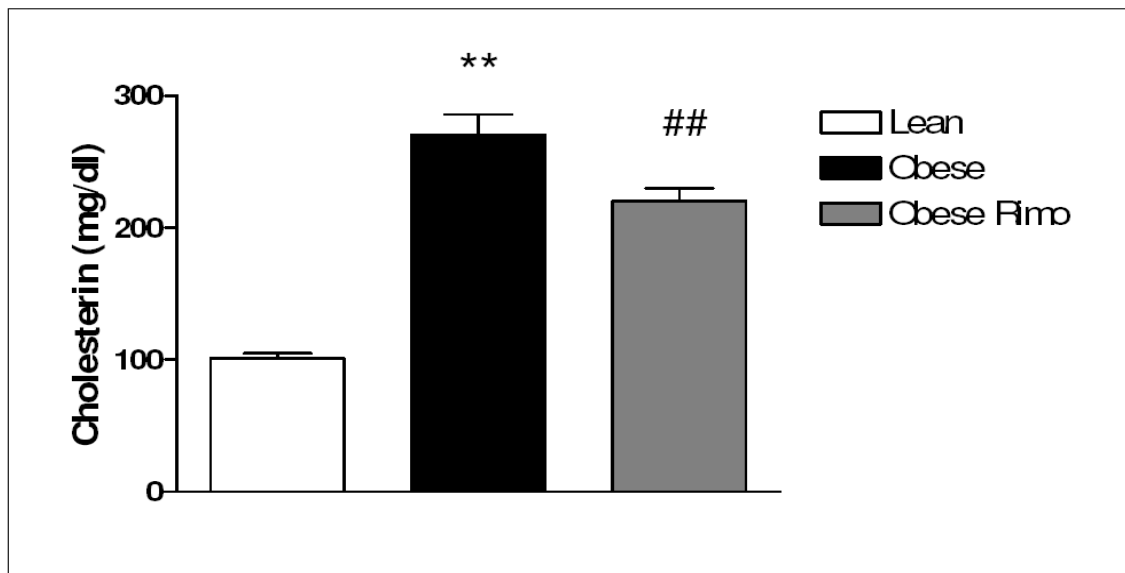


Abb. 3.4b: Analyse des Gesamt-Cholesterin-Spiegels bei 6 Monate alten *lean* und *obese* Zuckerratten, mit (*obese Rimo*) oder ohne 10-wöchiger Rimonabantbehandlung (*lean*, *obese*). Signifikante Abnahme des Gesamt-Cholesterins nach Rimonabanttherapie. Mittelwert \pm SEM, $n=5$, ** $p<0,01$ versus *lean*, ## $p<0,01$ versus *obese*-Plazebo.

3. ERGEBNISSE

Das Low-density lipoprotein Cholesterin (LDL-C) war, verglichen mit den *lean* Ratten, bei den *obese* Ratten hochsignifikant erhöht. Nach erfolgter CB₁-Blocker-Therapie konnte ein signifikanter Abfall des LDL-C verzeichnet werden (Abb. 3.4c).

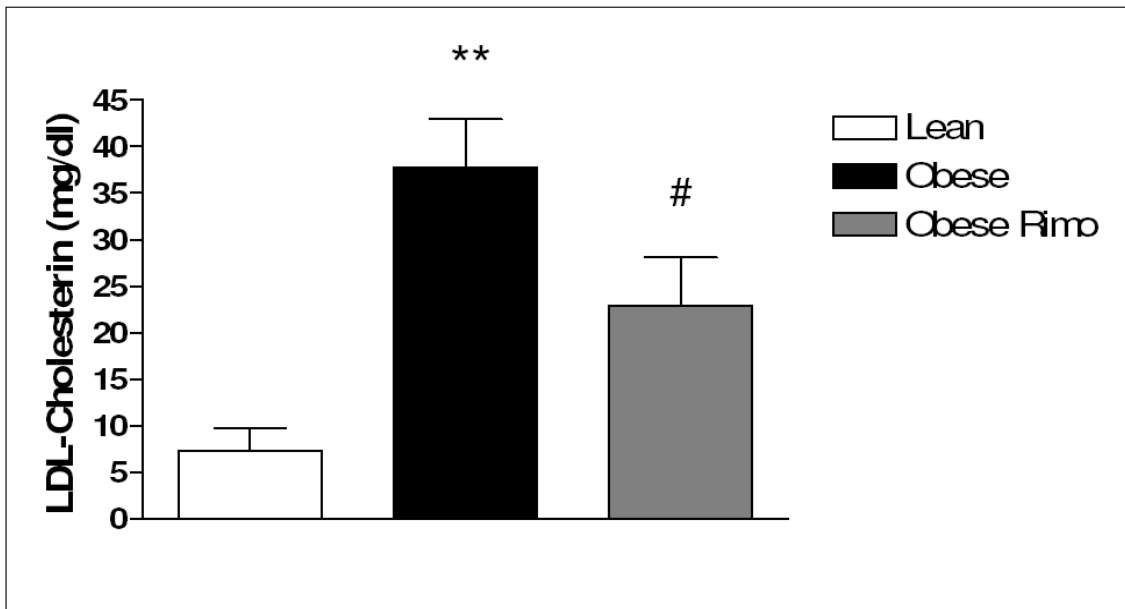


Abb. 3.4c: Analyse des LDL-Cholesterin-Spiegels bei 6 Monate alten *lean* und *obese* Zuckerratten, mit (*obese* Rimo) oder ohne 10-wöchiger Rimonabantbehandlung (*lean*, *obese*). Signifikante Abnahme des LDL-Cholesterins nach Rimonabanttherapie. Mittelwert \pm SEM, n= 5, **p<0,01 versus *lean*, #p<0,05 versus *obese*-Plazebo. LDL-Cholesterin: Low-density lipoprotein cholesterol

Bei der Untersuchung des High-density lipoprotein Cholesterin-Spiegels zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen *lean* und *obese* Tieren. Nach 10-wöchiger Medikamenteneinnahme kam es zu einer, wenn auch nicht signifikanten Erhöhung desselbigen (Abb. 3.4d).

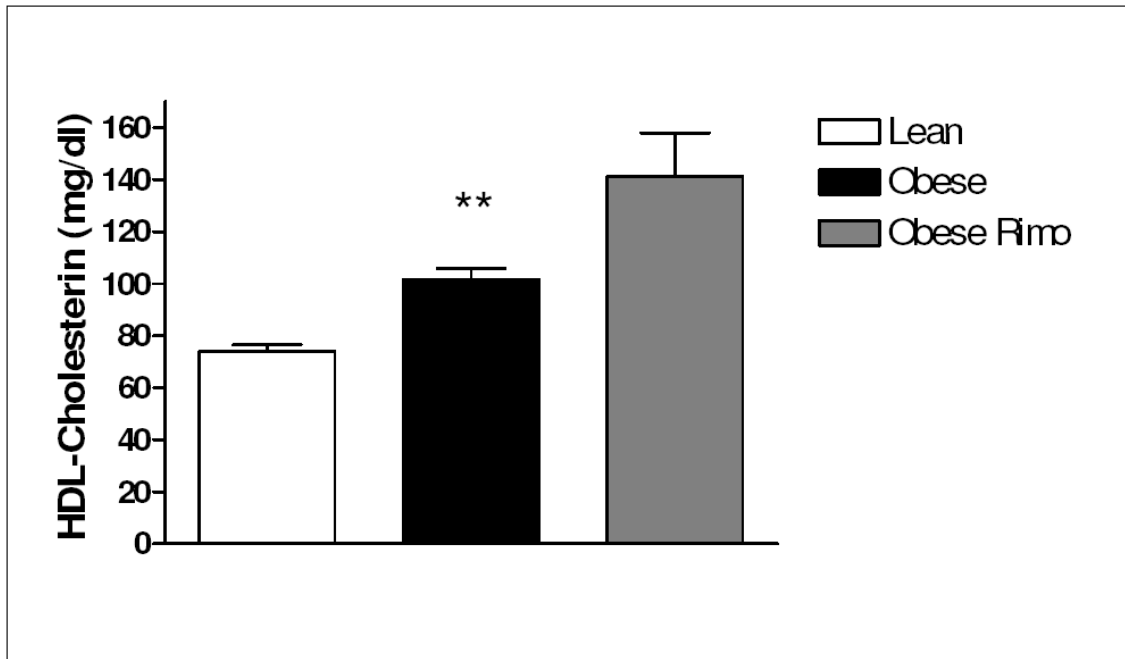


Abb. 3.4d: Analyse des HDL-Cholesterin-Spiegels bei 6 Monate alten *lean* und *obese* Zuckerratten, mit (*obese* Rimo) oder ohne 10-wöchiger Rimonabantbehandlung (*lean*, *obese*). Trend zur Erhöhung des HDL-Cholesterins nach Rimonabanteinnahme. Mittelwert \pm SEM, n=5, **p<0,01 versus *lean*.

HDL-Cholesterin: high-density lipoprotein cholesterol

3. 5 Marker der *in vivo*-Plättchenfunktion

3. 5. 1 VASP-Phosphorylierung

Bei der tonischen Inhibition der Aktivierung von Thrombozyten spielt der Phosphorylierungszustand des thrombozytären VASP eine zentrale Rolle. Er korreliert sehr eng mit der Inhibition der Fibrinogen-Bindung am thrombozytären Fibrinogenrezeptor.^{40;41} Da nur bei aktivierten Thrombozyten eine Bindung an den GPIIb/IIIa-Rezeptor möglich ist, kann der Phosphorylierungszustand des VASP somit

als Marker für die *in vivo* Inhibition der Thrombozyten verwendet werden. Mittels spezieller Antikörper gegen phosphoryliertes VASP wurde im Vollblut die thrombozytäre VASP-Phosphorylierung bestimmt und per FACS analysiert. Gegenüber den *lean* Tieren war bei den *obese* Zuckerratten der basale Phosphorylierungszustand hochsignifikant erniedrigt (Abb. 3.5a). Die nach 10-wöchiger CB₁-Blockade verzeichnete Erhöhung des phosphorylierten VASP war hochsignifikant.

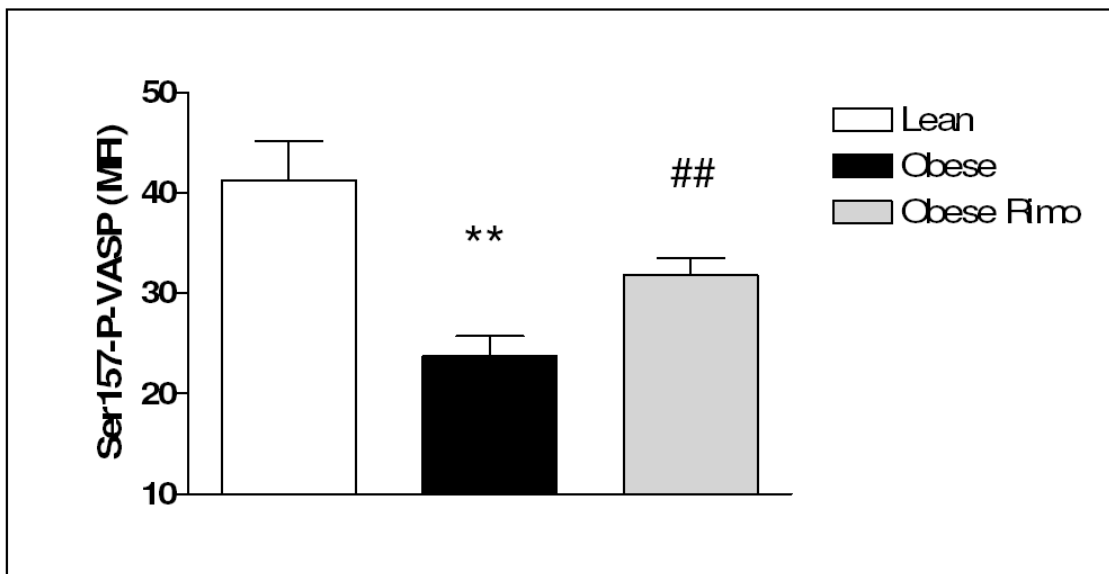


Abb. 3.5a: Durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fluoreszenz des phosphorylierten VASP bei 6 Monate alten *lean* und *obese* Zuckerratten, mit (*obese* Rimo) oder ohne (*lean*, *obese*) 10-wöchiger Rimonabantbehandlung, als Marker für den endogenen Signalweg der Thrombozyteninhibierung. Mittelwert \pm SEM, n=10, *p<0,01 versus *lean*, ##p<0,01 versus *obese*-Plazebo. P-VASP: Phosphorylierung des Vasodilator-stimulierten Phosphoproteins, MFI: mittlere Fluoreszenz-Intensität

3. 5. 2 Fibrinogen

Nur im aktivierten Zustand ist eine Fibrinogen-Bindung an das thrombozytäre GPIIb/IIIa möglich.²⁶ Somit kann man den *in vivo* Aktivierungszustand der Plättchen durch die Fibrinogenbindung nachweisen. In dieser Studie wurde im unstimulierten

Vollblut mittels eines Antikörpers gegen Fibrinogen das gebundene Fibrinogen markiert und durch die FACS-Analyse detektiert. Bei den *obese* Tieren war das an Thrombozyten gebundene Fibrinogen signifikant höher als bei den *lean* Tieren (Abb. 3.5b). Durch die Rimonabanttherapie konnte die Fibrinogenbindung in der Versuchsgruppe im Vergleich zu den Plazebetieren hochsignifikant reduziert werden.

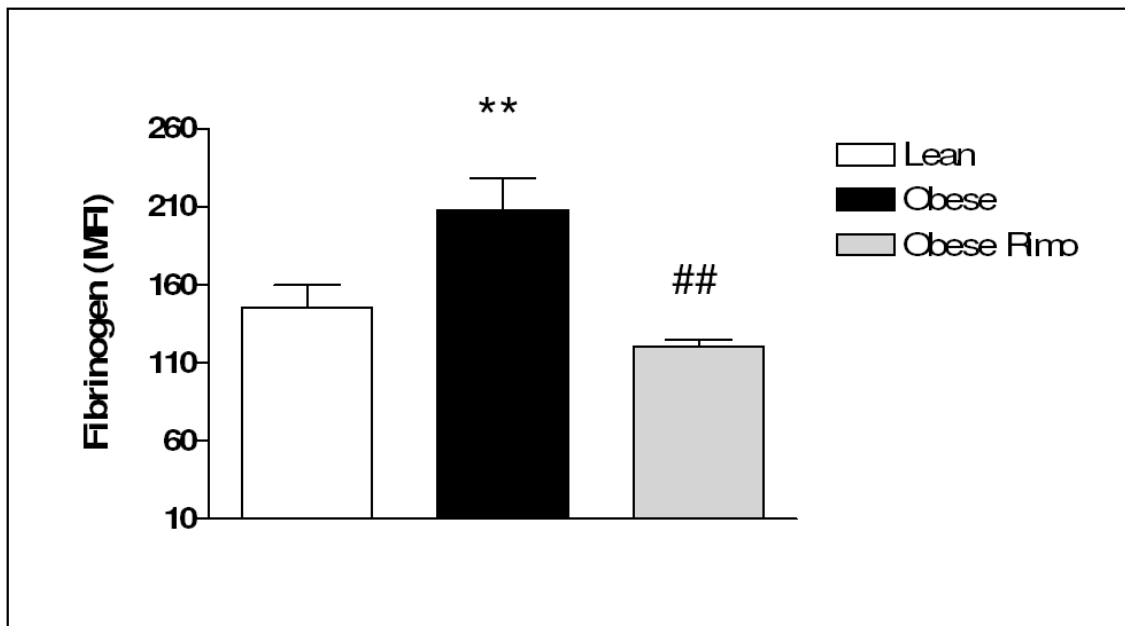


Abb. 3.5b: Durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fibrinogen-Fluoreszenz bei 6 Monate alten *lean* und *obese* Zuckerratten mit (*obese Rimo*) oder ohne (*lean*, *obese*) 10-wöchiger Rimonabantbehandlung als Marker für den Aktivierungszustand der Thrombozyten. Mittelwert \pm SEM, $n=10$, ** $p<0,01$ versus *lean*, ## $p<0,01$ versus *obese*-Plazebo

3. 6 *In vitro* Thrombozytenstimulation, -aggregation und -adhäsion

3. 6. 1 Thrombozytenstimulation durch ADP

Aktiviert Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den Adhäsionsrezeptor P-Selektin.²⁶ Mit der Gabe von verschiedenen ADP-Konzentrationen (5, 10, 15, 20 μ M)

wurde eine *in vitro* Thrombozytenaktivierung erzeugt und die dadurch generierte P-Selektin-Expression auf der Thrombozytenoberfläche mittels Durchflusszytometrie gemessen. Ohne Rimonabantgabe war die P-Selektin-Expression bei den *obese* Tieren signifikant höher als bei den *lean* Tieren. Nachdem den Versuchstieren 10 Wochen Rimonabant gefüttert worden war, war die ADP-induzierte P-Selektin-Expression bei einer ADP-Konzentration von 20 μ M signifikant erniedrigt (Abb. 3.6a). Niedrigere ADP-Konzentrationen (5, 10, 15 μ M) zeigten einen Trend zur reduzierten P-Selektin-Expression, jedoch keine signifikante Reduktion (Daten nicht gezeigt).

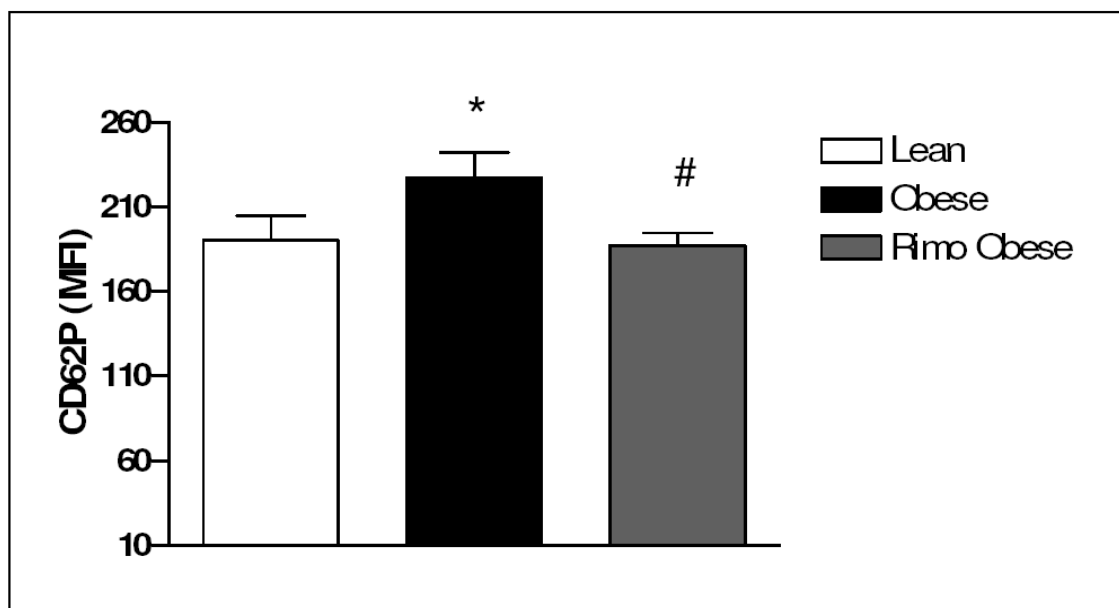


Abb. 3.6a: Durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren P-Selektin-Fluoreszenz bei 6 Monate alten *lean* und *obese* Zuckerratten, mit (*Obese* Rimonabant) und ohne (*lean*, *obese*) Rimonabantbehandlung. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ versus *lean*, # $p < 0,05$ versus *obese* Placebo. CD62P: P-Selektin, MFI: Mittlere Fluoreszenz-Intensität

3. 6. 2 Thrombozytenaggregation

Die Proteaseaktivität des Thrombins bewirkt durch Fibrinogenspaltung die Fibrinbildung und trägt damit zur Thrombozytenaggregation bei.²⁶ Eine *in vitro* Aggregation konnte durch Zugabe von Thrombin zum PRP ausgelöst werden. Bei *obese*

Ratten zeigte sich bei einer Thrombinkonzentration von 0,02 U/ml eine signifikant höhere Thrombin-induzierte Aggregation als bei der Kontrollgruppe (Abb. 3.6b). Nach Rimonabanttherapie konnte bei den Versuchstieren versus Plazebogruppe ein signifikanter Rückgang der Aggregation nachgewiesen werden.

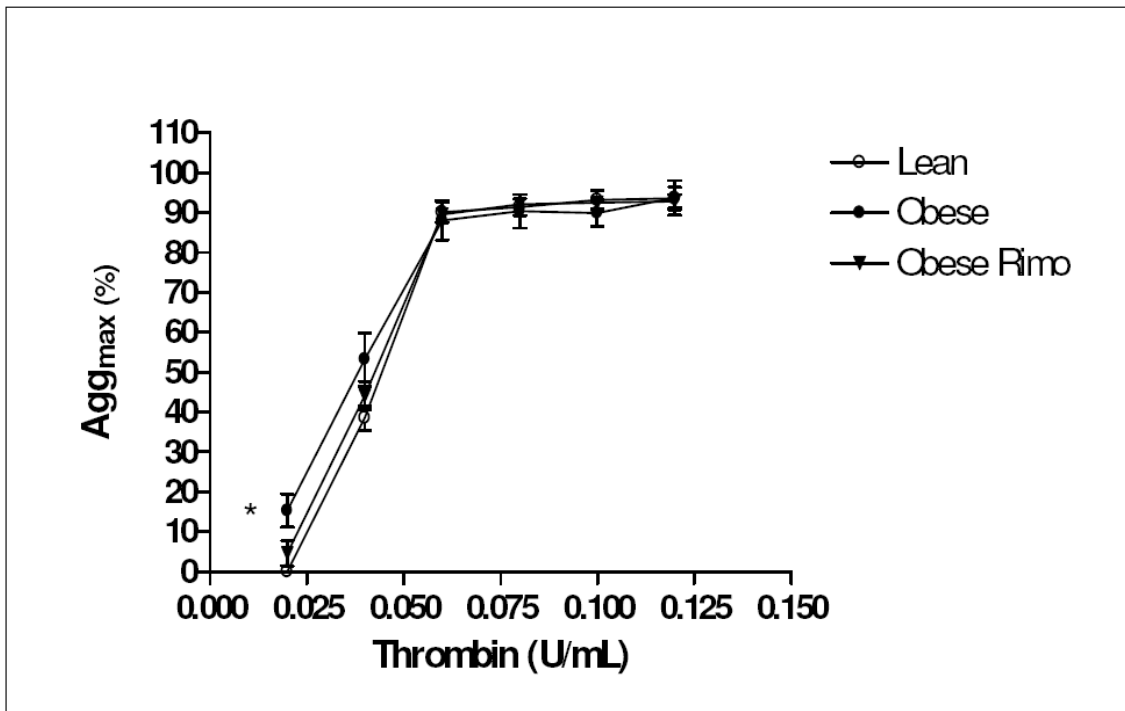


Abb. 3.6b: Thrombininduzierte (0,02 U/ml) Thrombozytenaggregation bei 6 Monate alten *lean* und *obese* Zuckerratten mit (*obese* Rimo) oder ohne (*lean*, *obese*) 10-wöchiger Rimonabantbehandlung. Mittelwert \pm SEM, n= 10, *p<0,05 versus *lean*.

Agg_{max}: maximale Aggregation

3. 6. 3 Thrombozytenadhäsion

Die Adhäsion unter arteriellen Flussbedingungen wurde *in vitro* mit Hilfe der Flusskammer dargestellt. Gewaschene, unstimulierte Thrombozyten perfundierten hierbei durch eine mit Fibrinogen beschichtete Kammer. Obwohl es nur geringe Unterschiede zwischen *lean* und *obese* Tieren gab, konnte nach Rimonabant-

3. ERGEBNISSE

Behandlung eine signifikante Reduktion der adhärierenden Thrombozyten belegt werden (Abb. 3.6c).

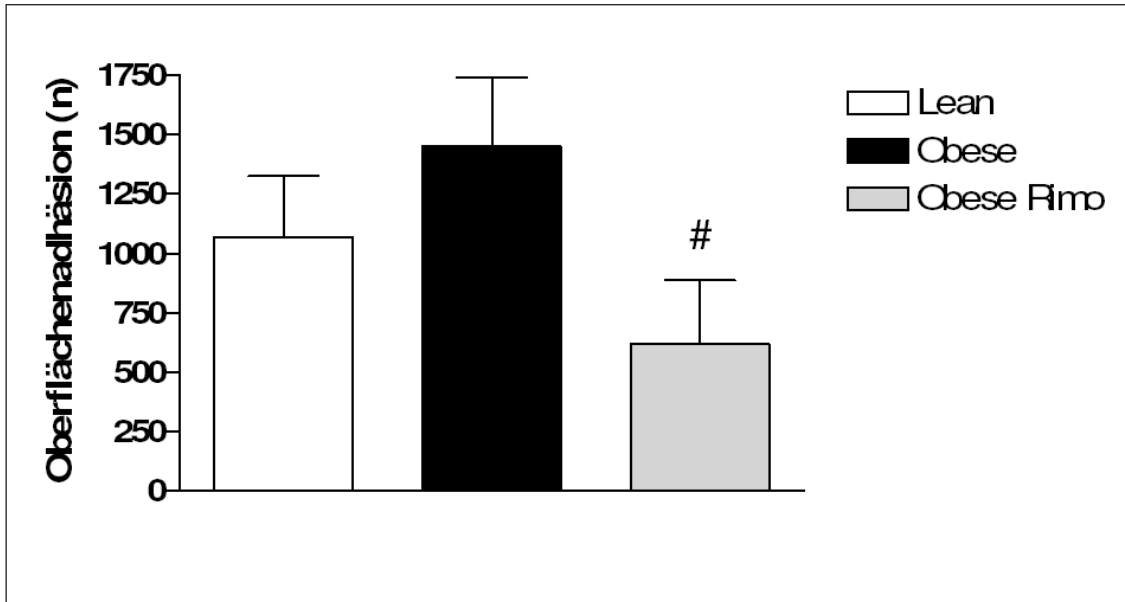


Abb. 3.6c: Adhäsion gewaschener Thrombozyten auf einer fibrinogenbeschichteten Membran unter arteriellen Flussbedingungen bei 6 Monate alten *lean* und *obese* Zuckerratten mit (*obese* Rimo) oder ohne (*lean*, *obese*) 10-wöchiger Rimonabantbehandlung. Mittelwert \pm SEM, $n=10$, $\#p<0,05$ versus *obese* Plazebo.

4. Diskussion

4.1 Vergleich mit den RIO-Studien

In den vier „Rimonabant in obesity“-Studien konnte bei den Probanden durch die Einnahme des Endocannabinoid-Rezeptorblockers Rimonabant neben der Gewichtsreduktion auch eine positive Veränderung des kardiometabolischen Risikoprofils nachgewiesen werden. Allerdings sind diese beobachteten Veränderungen nicht ausschließlich und eindeutig der Wirkung von Rimonabant zuzuordnen. Vor allem die folgenden beiden Gegebenheiten lassen eine Beeinflussung der in den RIO-Studien erzielten Ergebnisse erwarten: Zum einen waren die Versuchsteilnehmer zur Einhaltung einer hypokalorischen Diät angehalten, welche alleine schon zu einer Gewichtsreduktion und Verbesserung des kardiovaskulären Risikoprofils führen kann. Zum anderen unterlagen sie, auf Grund ihrer Multimorbidität gerade im kardiovaskulären und metabolischen Bereich, einer Polymedikation, welche ebenfalls zu Veränderungen in den untersuchten Gebieten beitragen kann. In unserer Studie war es möglich, die Reineffekte des CB₁-Blockers Rimonabant ohne potenzielle pharmakologische Wechselwirkungen oder Beeinflussung durch Lebensstilmodifikationen zu untersuchen. Die hierfür verwendeten 6-Monate alten Zuckerratten gelten als ein etabliertes Model für das metabolische Syndrom, basierend auf einer gestörten Glukosetoleranz. Nach 10-wöchiger Behandlung mit Rimonabant wurden die Tiere auf kardiometabolische Veränderungen untersucht. Wir konnten nachweisen, dass der CB₁-Antagonist sowohl das Gewicht der Tiere, als auch ihr Lipidprofil positiv beeinflusst hat. Bei der Analyse der Blutzellen zeigte sich eine reduzierte Anzahl zirkulierender Monozyten. Eine Aktivierung der Thrombozyten war, ebenso wie deren Empfindlichkeit gegenüber Agonisten oder physikalischen Stimuli, stark herabgesetzt. Auch bei den proatherosklerotischen Chemokinen MCP-1 und RANTES konnte eine signifikante Reduktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur RIO-Diabetes- und zur RIO-Lipid-Studie konnten wir eine Verbesserung des Blutzuckerprofils genauso wenig wie eine Abnahme des viszeralen Fettgewebes durch eine Rimonabantgabe bei den Versuchstieren nachweisen (Daten nicht gezeigt), wobei

weder eine strikte Diät der Tiere noch ein gepaartes Füttern nicht-behandelter Tiere erfolgte.

In allen RIO-Studien waren die Patienten zu einer hypokalorischen Diät mit einem Kaloriendefizit von ca. 600 kcal pro Tag angehalten. Zusätzlich sollten sie während des gesamten Studienzeitraums ihre sportliche Aktivität steigern. Unter Berücksichtigung dieser Kombination aus Lebensstilmodifikation und hypokalorischer Ernährungsweise konnte in den RIO-Studien unter Rimonabant-Medikation eine signifikante Gewichtsreduktion nachgewiesen werden. In einem Studienzeitraum von 2 Jahren betrug der durchschnittliche Gewichtsverlust hierbei 6-6,5%.²³ Die von uns untersuchten 6-Monate alten Zuckerratten hatten uneingeschränkten Zugang zu handelsüblichem, nicht-kalorienreduziertem Futter. Die Auswertung der Gewichtsverläufe über 10 Wochen ergab, dass ohne potenziell beeinflussende Faktoren, wie Ko-Medikation, Lebensstil-Faktoren oder Kalorienrestriktion, Rimonabant keinen Gewichtsverlust in den *obese* Zuckerratten induzieren konnte. Auch konnten wir im Gegensatz zu den RIO-Studien, in denen sich eine signifikante Abnahme des Taillenumfangs zeigte, keine Abnahme der viszeralen Fettgewebsmasse feststellen. Allerdings verringerte der CB₁-Antagonist signifikant die Gewichtszunahme der behandelten *obese* Zuckerratten, die sich zum Zeitpunkt der Studie in einer Lebensphase der Gewichtszunahme befanden. Zudem zeigte sich in den RIO-Studien, dass die maximale gewichtsreduzierende Wirkung erst nach einer Zeitdauer von neun bis 12 Monaten zu Tragen kam. Danach blieb das Gewicht bei weiterer Einnahme stabil beziehungsweise erhöhte sich auf Ausgangswerte, sofern die Rimonabanttherapie durch eine Plazebo-Therapie ersetzt wurde.⁴² In der aktuellen Studie war der angelegte Zeitraum deutlich kürzer als in den RIO-Studien. Lediglich 10 Wochen wurde den Versuchstieren Rimonabant verabreicht. Dieser kürzere Einnahmezeitraum mag eine Erklärung für die fehlende Gewichtsabnahme sein. Auch eine positive Auswirkung auf die viszerale Fettmasse, als Äquivalent für den Taillenumfang, ist bei einem länger angelegtem Untersuchungszeitraum durchaus zu erwarten. Somit war es uns zwar möglich einen stabilisierenden Effekt auf eine potenzielle Gewichtszunahme durch die Einnahme von Rimonabant nachzuweisen – eine Gewichtsreduktion hingegen scheint nur in Kombination mit Diät, Veränderungen der Lebensweise und einer langfristigen Rimonabanteinnahme möglich.

4. 2 Einfluss von Rimonabant auf metabolische Parameter und Leukozytensubpopulationen im Rahmen der Atherogenese

Als Auswahlkriterium für die RIO-Nordamerika- und die RIO-Europe-Studien galt vor allem ein bestehendes Übergewicht der Probanden. Bei der Auswertung der Serumlipidspiegel wurden lediglich HDL-Cholesterin und Triglyzeride berücksichtigt. Beide Parameter unterlagen durch eine Rimonabanttherapie einer positiven Beeinflussung.^{11;23} Bei der RIO-Lipid-Studie hingegen lag ein besonderes Augenmerk auf Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risikoprofil. Hier wurden dyslipämische, adipöse, nichtdiabetische Patienten mit ins Studiendesign eingeschlossen und die Veränderungen ihrer Blutfettwerte analysiert.²⁴ Durch die Behandlung mit Rimonabant konnte in allen drei Studien eine Erhöhung des HDL-Cholesterins, sowie eine Reduktion der Triglyzeride nachgewiesen werden. Auch in unserer Studie konnte diese positiven Veränderungen beider Parameter unter Rimonabant-Einnahme bestätigt werden. Darüber hinaus gelang uns der Nachweis weiterer Beeinflussungen des Lipidstoffwechsels durch Rimonabant: Während die RIO-Lipid-Studie keine Erniedrigung des LDL-Cholesterin-Spiegels zeigte, konnten wir eine signifikante Reduktion des LDL-Cholesterins bei den Versuchstieren nachweisen. Auch war es uns möglich durch Rimonabant eine Reduktion des Gesamtcholesterinspiegels zu erreichen, was in der RIO-Lipid-Studie ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte. In einer 2005 veröffentlichten Studie konnten Poirier *et al.* an einem Maus-Adipositas-Modell ebenfalls eine Rimonabant-bedingte signifikante Reduktion der Triglyzeride und des LDL-Cholesterins, sowie einen mäßigen reduzierenden Effekt auf das Gesamtcholesterin nachweisen.⁴³ Metabolische Faktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese und Progression der Atherosklerose. Gerade LDL-Cholesterin greift in verschiedenster Weise in diese Prozesse ein. Die Atherogenese ist abhängig vom Gleichgewicht zwischen inflammatorischen und antiinflammatorischen Aktivitäten. Dieses Gleichgewicht kann durch die verschiedensten metabolischen Faktoren beeinflusst werden. So konnte in Studien nachgewiesen werden, dass beispielsweise eine Hypercholesterinämie eine lokale Aktivierung der Endothelzellen bewirkt. Hierbei stellt die Infiltration der Intima durch LDL-Cholesterin einen entscheidenden Schritt bei der Entstehung eines initialen Entzündungsprozesses in den Arterien dar. Oxidative und enzymatische Veränderungen des LDL-Cholesterins

bewirken über eine Freisetzung von Phospholipiden eine Aktivierung der Endothelzellen. Die aktivierten Endothelzellen können wiederum mit Blutzellen interagieren und Adhäsionsmoleküle exprimieren.⁴⁴ Eine effiziente Reduktion des LDL-Cholesterins durch die Rimonabant-Einnahme, wie sie von uns nachgewiesen werden konnte, stellt somit einen interessanten Angriffspunkt für die positive Beeinflussung der Atherogenese dar. Auch gelang es uns, einen reduzierenden Effekt auf die Leukozytenzahl durch Rimonabant zu erreichen. Diese Zellpopulation steht ebenfalls im engen Zusammenhang mit der frühen Atherogenese. Ihre Rekrutierung in die atherosklerotischen Läsionen wird durch oxidiertes LDL-Cholesterin getriggert, welches als Antigen fungiert.⁴⁴ Somit ist es möglich, dass Rimonabant nicht nur den LDL-Cholesterin-Gehalt signifikant senken kann, sondern auch in den Prozess der LDL-Oxidation eingreifen und somit eine sehr frühe Phase der Atherogenese positiv beeinflussen kann.

Eine Kohortenstudie des Prince of Wales Hospitals (Chinese University, Hong Kong) untersuchte den Zusammenhang zwischen der Anzahl zirkulierender Leukozyten und mikro- beziehungsweise makrovaskulären Komplikationen bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. Es konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte Leukozyten-Levels, die aber noch innerhalb der Normgrenzen lagen, mit mikro- bzw. makrovaskulären Komplikationen assoziiert waren.⁴⁵ Die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten führt zu einer stetigen Entzündungsreaktion in den atherosklerotischen Plaques, wobei sich die individuelle Leukozytenanzahl durchaus in normalen Grenzen bewegen kann. Ein derartiger, über Jahrzehnte andauernder, niedriggradiger Entzündungszustand ist mit verantwortlich sowohl für die Pathogenese der Atherosklerose als auch des Diabetes. Die entzündete Intima induziert die Einwanderung von zirkulierenden Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen. Letztere wiederum nehmen das überschüssige oxidierte LDL auf und wandeln sich in Schaumzellen um, die als Hauptzellen für die Atherosklerose gelten.⁴⁴ In unserer Studie war die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten bei allen untersuchten Gruppen zwar normwertig, jedoch war sie bei den *obese* Tieren im Vergleich zu den entsprechenden *lean* Kontrollruppen deutlich erhöht. Nach Abschluss der Rimonabantbehandlung hatte die Gesamtleukozytenzahl und im speziellen die der Monozyten deutlich abgenommen. Somit kann durch den Einsatz des Endocannabinoid-Blockers die Entzündungssituation

der Intima reduziert werden und hierdurch eine Progression von Atherosklerose und Diabetes verlangsamt werden. Eine weitere wichtige Zellpopulation bei der Atherogenese sind die Thrombozyten. Sie sind die ersten Zellen, die nach der Endothelaktivierung rekrutiert werden und sind für die weiteren Rekrutierungs- und Aktivierungsvorgänge entscheidend.⁴⁶ Es gelang uns jedoch nicht eine Reduktion der Thrombozytenzahl durch eine Rimonabanttherapie zu erzielen. In diesen wichtigen pathogenetischen Schritt der Atherosklerose scheint der Endocannabinoid-Blocker primär nicht einzugreifen. Allerdings gelang uns der Nachweis, dass Rimonabant eine Aktivierung der Thrombozyten, ebenso wie deren Empfindlichkeit gegenüber Agonisten oder physikalischen Stimuli, stark herabsetzt.

4. 3 Einfluss von Rimonabant auf die Chemokine MCP-1 und RANTES

Eine bedeutende Rolle bei der Leukozytenchemotaxis und -adhäsion, ebenso wie bei der Thrombozytenaktivierung, spielen die verschiedensten Chemokine. Sie wurden bereits bei vielen unterschiedlichen inflammatorischen Erkrankungen nachgewiesen, so auch in atherosklerotischen Läsionen.⁴⁷ Ausgelöst durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, führt die Endothelaktivierung zur Expression von verschiedenen proinflammatorischen Cytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen.⁴⁴ In atherosklerotischen Plaques triggert oxidiertes LDL-Cholesterin die Produktion und Sekretion des „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) in glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Deshalb kann MCP-1 in großen Mengen in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden. MCP-1 ist ein wesentlicher chemotaktischer Faktor für die Rekrutierung von Monozyten in das Endothel der Gefäßwand. Dort kommt es zur Differenzierung in Makrophagen und schließlich, durch LDL-Cholesterineinlagerungen, zur Umwandlung in Schaumzellen, einem entscheidenden Schritt bei der Entwicklung der Atherosklerose.⁴⁴ Dieser pathogenetische Schlüsselmechanismus bei der Atherogenese wurde in den letzten Jahren immer wieder Gegenstand von tierexperimentellen Studien über MCP-1 und seinen Rezeptor CCR2. So konnten Gu *et al.* anhand eines

atherosklerotischen Mausmodells mit Deletion für den LDL-Cholesterinrezeptor einen MCP-1-Mangel nachweisen, welcher zu einer Reduktion der Atherosklerose-Progression führte.⁴⁸ Auch Gosling *et al.* konnten anhand von MCP-1- knock-out-Mäusen dessen entscheidende Rolle bei der Atherogenese belegen.⁴⁹ Eine andere Studie zeigte, dass eine Transplantation von MCP-1-überexprimierenden Knochenmarkszellen eine massive Monozytenmigration in die Arterienwand induzierte und somit die Atherosklerose beschleunigte.⁴⁷ Neuere Studien belegen, dass die MCP-1-Menge proportional zum Ausmaß der Adipositas ist.⁵⁰ Sowohl die MCP-1-Expression im Fettgewebe, als auch die Konzentration des zirkulierenden MCP-1 nimmt bei Fettleibigkeit zu. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MCP-1 eine adipozitäre Expression von proinflammatorischen Genen verursacht und eine insulinabhängige Glucose-Aufnahme verhindert. *Obese* Mäuse mit einer CCR2-Deletion, dem Haupt-Chemokin-Rezeptor für MCP-1, zeigen neben einer Abnahme der Monozytenrekrutierung auch eine verbesserte Insulinresistenz. Die erhöhte Insulinresistenz lässt sich auf einen erhöhten Adiponektin-Spiegel zurückführen, welcher bei Mäusen mit fehlendem MCP-1-Rezeptor zu finden ist.⁵⁰ Somit wird die wichtige Rolle deutlich, die MCP-1 sowohl bei der Atherogenese, als auch beim Metabolischen Syndrom einnimmt. In der aktuellen Studie modulierte Rimonabant auf zwei Arten positiv den inflammatorischen Signalweg in *obese* Zuckerratten. Bei ihnen zeigte sich, trotz gleich bleibendem Fettgewebsanteil, im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine deutliche Erniedrigung des MCP-1-Spiegels. Dieser Effekt lässt sich zum einen darauf zurückführen, dass durch die Rimonabantbehandlung der LDL-Cholesterin-Spiegel erfolgreich reduziert wurde und somit das Substrat für eine endotheliale MCP-1-Produktion genommen wurde. Zum anderen konnte die Anzahl der zirkulierenden Monozyten, die die Hauptzielzellen für MCP-1 darstellen, erfolgreich durch Rimonabant reduziert werden und damit ein Fortschreiten der Inflammation potenziell reduziert werden.

Ein alternativer Weg, der zur MCP-1-Reduktion führt ist über eine Reduktion des Chemokins RANTES möglich. Dieser chemotaktische Faktor ist in der Lage eine endotheliale MCP-1-Bildung zu induzieren.⁵¹ Zudem triggert RANTES ebenfalls das Monozytenrekrutment. RANTES wird von aktivierten Endothelzellen, glatten Muskelzellen, aktivierten T-Zellen und Makrophagen sezerniert. Vor allem aber

sezernieren aktivierte zirkulierende Thrombozyten RANTES in entzündetes Endothelgewebe. Dort induziert es eine endotheliale RANTES und MCP-1-Bildung⁵¹ und führt unter arteriellen Flussbedingungen zu einer Verstärkung der Leukozytenrekrutierung.⁵² Die Arbeiten von Veillard *et al.* zeigten, dass RANTES nicht in normalen Arterien nachzuweisen ist, dafür aber verstärkt in atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden exprimiert wird. Durch Einsatz des RANTES-Antagonisten Met-RANTES konnte die Bedeutung der Interaktion zwischen dem Chemokin und seinen Rezeptoren CCR1 und CCR5 bei der Entstehung der Atherosklerose verdeutlicht werden.⁵³ RANTES selbst triggert die Chemotaxis von Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten in entzündetes Endothel und in atherosklerotisch veränderte Gefäßwände.³⁹ Huo *et al.* gelang es zudem RANTES auf der Oberflächen von Monozyten-Thrombozytenaggregaten nachzuweisen.⁵⁴ Die Bedeutung von RANTES in Bezug auf die Atherogenese wird auch in einer Studie von Braunersreuther *et al.* deutlich: Bei Versuchen mit der [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES-Variante, welche im Gegensatz zur Normvariante nicht an Glykosaminoglykane binden kann, konnten sie nachweisen, dass durch den RANTES-Antagonismus sowohl die MCP-1-Menge als auch die Expression der Chemokin-Rezeptoren CCR2 und CCR5 reduziert wurde. Die Zahl der zirkulierenden Leukozyten nahm ab, ebenso wie deren Rekrutierung in atherosklerotische Plaques. Die inflammatorische Aktivität wurde reduziert, und in fortgeschrittenen Atherosklerose zeigte sich eine Limitation der Plaquebildung.⁵⁵ Durch eine langfristige Gabe von Rimonabant, konnten wir in der aktuellen Studie eine Reduktion des RANTES-Serumspiegels bei *obese* Zuckerratten auslösen. Dies kann zum einen Folge der verminderten Leukozyten- und Monozytenzahlen sein, da beide Zellpopulationen in der Lage sind RANTES zu sezernieren. Auch eine Blockade der RANTES-Sezerinierung wäre hier denkbar. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass Rimonabant eine direkte Wirkung am CCR5-Rezeptor hat, dort als Antagonist wirkt und somit beispielsweise eine endotheliale RANTES und MCP-1-Produktion verringert. Indem die Mediatoren wie MCP-1 und RANTES für proinflammatorische und proatherosklerotische Signalwege durch die Rimonabantbehandlung reduziert werden konnten, erscheint der CB₁-Rezeptorblocker eine interessante Möglichkeit zu sein, die Entzündungssituation in atherosklerotisch geschädigten Gefäßen einzudämmen und das kardiovaskuläre Risikoprofil zu vermindern. Wie bereits erwähnt sind die Hauptzellen,

die RANTES sezernieren können aktivierte Thrombozyten. Folglich ist eine Reduktion von RANTES auch möglich, indem Rimonabant in diesen Signalweg eingreift.

4. 4 Einfluss von Rimonabant auf die Thrombozyten

Zwar konnte die Thrombozytenzahl an sich nicht durch den Endocannabinoidrezeptorblocker beeinträchtigt werden, jedoch gelang es uns ihre Aktivierung auf mehreren Wegen erfolgreich zu vermindern. Mit ihren adhäsiven und sezernierenden Funktionen gelten die Plättchen als ein wichtiger Rekrutierungs-Mechanismus für Leukozyten.^{46;54} Somit wird deutlich, welche entscheidende Rolle sie bei der Pathogenese und Progression von atherosklerotischen Läsionen spielen. Hierzu konnten Massberg *et al.* zeigen, dass aktivierte Thrombozyten gerade in der Anfangsphase der Atherogenese eine zentrale Bedeutung haben. Sie wiesen in einem Modell der beschleunigten Atherosklerose bei Mäusen nach, dass die Inhibierung der aktivierten Thrombozyten durch einen GPIIb/IIIa-Blocker die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen verhindern konnte.⁴⁶ Die Aktivierung der Thrombozyten wurde schon mehrfach beschrieben. Sie erfolgt über verschiedene Mediatoren, wie ADP, Thrombin, Kollagen und andere proinflammatorische Chemokine, beispielsweise Fraktalkin.^{56;57} Die adhäsive und sezernierende Funktion der Plättchen ist P-Selektinabhängig. Beispielsweise gelang es Schober *et al.* nachzuweisen, dass auch die RANTES-Sekretion aus Thrombozyten sowie das Monozyten-Rekrutment P-Selektin abhängige Prozesse sind.⁵⁸ In unserer Studie, konnten wir in *obese* Zuckeratten anhand der vermehrten oberflächlichen P-Selektin-Expression eine erhöhte Empfindlichkeit der Thrombozyten gegenüber physikalischen und pharmakologischen Stimuli feststellen. P-Selektin wird ausschließlich auf aktivierten Thrombozyten exprimiert.²⁶ Durch den Endocannabinoidrezeptorblocker war es möglich eine signifikant erniedrigte P-Selektin-Expression nachzuweisen. Somit ist dem Rimonabant ein hemmender Einfluss auf die Thrombozytenaktivität nachzuweisen. Ebenfalls nur bei aktivierten Thrombozyten ist eine Bindung von Fibrinogen an das thrombozytäre GPIIb/IIIa möglich. Während die *obese* Tiere eine signifikant erhöhte Fibrinogen-Fluoreszenz aufwiesen, konnten die

Thrombozyten der Rimonabant-behandelten Tiere eine signifikant erniedrigte Fibrinogen-Bindungsfähigkeit und damit einen geringeren Aktivierungszustand aufweisen. Aktivierte Thrombozyten können wiederum über aktiviertes GPIIb/IIIa und sein Substrat Fibrinogen in Kontakt mit der Endothelwand treten. Dies führt dazu, dass inflammatorische Veränderungen in den Endothelzellen hervorgerufen werden, die eine Monozytenmigration und eine Intimaproliferation bewirken und somit die Atherogenese begünstigen.²⁶ Es ist denkbar, dass Rimonabant nicht nur den Aktivitätszustand der Thrombozyten beeinflussen kann, sondern direkt am Fibrinogen angreifen kann und dadurch die Bindungsfähigkeit von Fibrinogen so moduliert, dass proatherogenetische Folgereaktionen, beispielsweise an der Gefäßwand, verhindert werden können. Dies zu untersuchen sollte Gegenstand einer weiterführenden Studie sein.

Auch die Ergebnisse der FACS-Analyse des VASP-Phosphorylierungszustandes sind ein weiterer Beleg für die positiven Effekte des CB₁-Blockers auf den Aktivierungszustand von Thrombozyten. Das Protein VASP ist in hohen Konzentrationen in Thrombozyten zu finden. cGMP- und cAMP-erhöhende Substanzen, wie NO und Prostazykline bewirken eine VASP-Phosphorylierung. Phosphoryliertes VASP wiederum ist ein Inhibitor für die Aktivierung von Thrombozyten und für Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktionen, allerdings nur bei intaktem Endothel. Der VASP-Phosphorylierungszustand wiederum korreliert sehr eng mit der Inhibition der Fibrinogen-Bindung am thrombozytären Fibrinogenrezeptor.^{40;41} Massberg *et al.* belegten, dass VASP essentiell für die NO-abhängige Plättcheninhibition ist.⁴⁰ Auch durch pharmakologische Intervention konnte anhand eines diabetischen Tier-Modells gezeigt werden, dass eine Erhöhung des endogenen NO/cGMP zu einer endogenen Plättchen-Inhibition führt.^{59;60} Verbesserte NO/cGMP-Signalwege weisen somit auf eine verbesserte Endothelfunktion hin. Gerade bei Diabetes und sich entwickelnder Atherosklerose aber sind die Endothelfunktion und damit auch die NO-Bioverfügbarkeit deutlich beeinträchtigt, wodurch es früher als bei Gesunden zu einer Thrombozytenaktivierung, Leukozytenadhäsion und Chemokin-Freisetzung kommt.^{61;62} Durch die Behandlung mit Rimonabant gelang es, den Anteil des phosphorylierten VASP bei den *obese* Zuckerratten zu erhöhen. Dies belegt zum einen erneut die positive Wirkung von Rimonabant auf den Aktivierungszustand. zum

anderen gibt es Anlass zur Vermutung, dass diese Effekte über eine Verbesserung der NO-Signalwege zustande gekommen sind. Indem die Thrombozyten mittels Rimonabant größtenteils inaktiv bleiben ist uns ein entscheidender positiver Eingriff in die Initialphase der Atherogenese gelungen. In wie weit dies Auswirkungen auf den Progress der Atherogenese hat, sollte weiter untersucht werden.

Ebenso konnten wir die bei den *obese* Tieren deutlich erhöhte Bereitschaft zur Thrombozytenaggregation und -adhäsion mit dem Endocannabinoidrezeptorblocker erfolgreich vermindern. Für eine erfolgreiche Thrombozytenaggregation sind drei Faktoren entscheidend: Scherkraft, Ca^{2+} und Fibrinogen.²⁶ Somit lässt sich, wie auch schon bei der thrombozytären Aktivierung, die Theorie aufstellen, dass Rimonabant direkt oder indirekt am Fibrinogen-Rezeptor angreifen kann bzw. die Fibrinogen-Sekretion verhindern kann.

4. 5 Alternative Wirkungsweise von Rimonabant am CB₂-Rezeptor

Wie bereits angeführt gibt es zwei verschiedene Arten von CB-Rezeptoren. Als alleiniger Rezeptor für Rimonabant wurde bislang der CB₁-Rezeptor postuliert. Dieser wird vor allem im Gehirn exprimiert, jedoch auch im Fettgewebe, Myokard, Gefäßendothel und in sympathischen Nervenendigungen. Es ist denkbar, dass die von uns beobachteten Veränderungen mit der Modulation der CB₁-Rezeptoren in Fettgewebe und Gefäßendothel einhergehen.

Der CB₂-Rezeptor ist vor allem im lymphatischen Geweben und auf peripheren Makrophagen zu lokalisieren.⁹ Im Immunsystem modulieren die CB₂-Rezeptoren unter anderem die Freisetzung von Zytokinen, die verantwortlich für Entzündungen und für die Regulation des Immunsystems sind. Es konnte gezeigt werden, dass Δ^9 -Tetrahydrocannabinol verschiedene immunologische Funktionen von Makrophagen zu inhibieren vermag. Klegeris *et al.* wiesen beispielsweise kürzlich nach, dass Δ^9 -Tetrahydrocannabinol am leukozytären CB₂-Rezeptor die Cytokin-Freisetzung aus Monozyten reduzieren kann.²⁵ Überraschenderweise konnten diese Effekte nachgewiesen werden, trotz der Tatsache, dass weder Monozyten noch Makrophagen

einen CB₁-Rezeptor exprimieren.⁶³ Somit kann eine agonistische Wirkung Rimonabants über einen CB₂-Rezeptor nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere aktuelle Studie belegt die antiinflammatorischen Eigenschaften des CB₂-Rezeptors: CB₂-Rezeptor-Agonisten verminderten die TNF- α getriggerte NF κ B-Aktivierung sowie die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1. Des Weiteren konnte die MCP-1-Synthese, ebenso wie die Monozyten-Transmigration durch die Endothelwand sowie die Monozyten-Endothel-Adhäsion inhibiert werden.⁶⁴ Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass ein Teil der von uns beobachteten antiinflammatorischen Effekte von Rimonabant nicht allein durch eine Blockade des CB₁-Rezeptors zustande kommen. Vielmehr ist ein alternativer Signalweg mit einer Stimulation der CB₂-Rezeptoren wahrscheinlich. Es lag jedoch hinter den Möglichkeiten dieser Studie die komplexen Mechanismen vollständig aufzuklären, die mittels CB₁- oder CB₂-Blockade zu einer Reduktion des kardiometabolischen Risikoprofils bei sich entwickelnden Diabetes führen könnten. Auch wird in jüngster Zeit immer wieder die Existenz eines weiteren Endocannabinoid-Rezeptors, dem sogenannten CB₃-Rezeptor postuliert. Dieser soll vor allem im Hippocampus exprimiert werden, ein Nachweis gelang jedoch bisher noch nicht.²² Welchen Einfluss er auf die kardiometabolischen Parameter haben könnte sollte Gegenstand weiterführender Forschung sein.

4. 6 Nebenwirkungen von Rimonabant

Endocannabinoide spielen multiple Rollen bei der Regulierung von ZNS-Funktionen. Hauptangriffspunkt des Endocannabinoidrezeptorblockers ist das Gehirn. Mehrere tierexperimentelle Studien belegten den positiven Effekt von Rimonabant bei der Kontrolle der Nahrungsaufnahme, sowie bei Abhängigkeiten von Alkohol, Nikotin und anderen Drogen.⁶⁵ Jedoch wurden multiple Nebenwirkungen verzeichnet, die der Einnahme von Rimonabant zuzuordnen sind. Die häufigste Nebenwirkung war Übelkeit, andere waren beispielsweise Hautreaktionen oder Herz-Kreislaufprobleme. Jedoch ist auffällig, dass etwa 50% der RIO-Studien-Abbrecher psychische

Veränderungen als Gründe für den Studienabbruch nannten. Diese beinhalteten unter anderem Depressionen, Schlafstörungen, Aggressionen und Angstzustände bis hin zu suizidalen Tendenzen.⁶⁵ Dies veranlasste letztendlich die US Food and Drug Administration dazu, die Zulassung für Rimonabant zu verweigern. Die europäische Medizinbehörde verzeichnete derartige psychiatrische Nebenwirkungen bei circa 10% der mit Rimonabant behandelten Patienten, befand jedoch, dass der positive Nutzen die Nebenwirkungen aufwiegt und ließ Rimonabant im Juni 2006 auf dem europäischen Markt zu. Seit der Markteinführung in den EU-Ländern wurde über eine ansteigende Zahl der Nebenwirkungen berichtet. Auch 4 Suizidversuche, die auf die Rimonabant-Einnahme zurückgeführt werden, wurden verzeichnet. Da das Risiko für psychiatrische Störungen doppelt so hoch sei wie unter Placebo zog der Ausschuss für Humanarzneimittel das Medikament im Oktober 2008 zurück.⁶⁶ In der vorliegenden Studie konnten wir beobachten, dass gerade zu Beginn des Behandlungszeitraums einige Tiere ein aggressives Verhalten an den Tag legten. Allerdings war dieser Zustand nur vorübergehend und nach circa 1 Monat verhielten sich die Ratten unauffällig. Dieses Verhalten ist in erster Linie nicht auf die Rimonabant-Wirkung zurückzuführen. Vielmehr spielte hier wohl das Abwehrverhalten gegenüber dem für sie ungewohnte Füttern mit der Nahrungssonde eine Rolle. Nach einer Gewöhnungszeit war das Verhalten unauffällig. Nur ein einziges Tier verhielt sich auch im Verlauf extrem aggressiv. Ob diese Aggressivität auf die Nebenwirkung der Rimonabant-Einnahme zurückzuführen ist, bleibt unklar.

5. Zusammenfassung

Die Volkskrankheit Adipositas zieht eine Reihe von Problemen mit sich. Kritisch ist hierbei, dass sie bislang offiziell nicht als eigenständige Krankheit angesehen wird und nur die Kosten ihrer Komplikationen, hier vor allem Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen, von den Krankenkassen getragen werden. Hier sind also präventive Maßnahmen und ein frühzeitiges, effektives Eingreifen ein entscheidender Ansatzpunkt. Der Endocannabinoidblocker Rimonabant ist hierbei ein viel versprechendes Medikament, mit dem nicht nur die Adipositas an sich, sondern zusätzlich auch ihre weit reichenden Komplikationen im kardiovaskulären Bereich reduziert werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es uns erfolgreich aufzuzeigen, dass Rimonabant auf verschiedenste Weise die Initialphase der Atherogenese positiv beeinflusst. Durch die Einnahme wurde die Zahl der zirkulierenden Monozyten signifikant reduziert. Ein erniedrigter LDL-Cholesterin- und Triglyzerid-Spiegel sowie ein erhöhter HDL-Cholesterin-Spiegel bestätigten den positiven Effekt auf das Lipidprofil der Probanden. Auch die für die initiale Rekrutierung von Thrombozyten und Monozyten wichtigen Chemokine RANTES und MCP-1 konnten erfolgreich reduziert werden. Ein besonderes Augenmerk lag auf dem Aktivitätszustand der Thrombozyten: Mit Rimonabant wurde sowohl die thrombozytäre Aktivierung minimiert als auch ein positiver Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion und -aggregation bestätigt. Folglich reduziert Rimonabant das kardiovaskuläre Risiko, indem es die pro-inflammatorischen und pro-atherosklerotischen Kaskaden vermindert.

Kritisch zu sehen sind die psychiatrischen Nebenwirkungen die sich unter der Rimonabanttherapie zeigten. Hierbei war eine Marktrücknahme zum jetzigen Zeitpunkt sicher sinnvoll. Jedoch sollten die positiven Nutzen, die sich durch Rimonabant erzielen lassen und die von uns bestätigt und entdeckt wurden nicht aus den Augen verloren werden. Es bedarf weiterer Forschungsarbeit, um die genauen Angriffspunkte von Rimonabant aufzudecken und das Präparat so zu modifizieren, dass ein sicheres, nebenwirkungsarmes Medikament als effektive Therapiealternative bei der Behandlung der Fettleibigkeit und ihren assoziierten metabolischen Störungen zur Verfügung stehen kann.

6. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
5C6	Antikörperklone gegen Ser ¹⁵⁷
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AEA	Anandamide
AK	Antikörper
ASS	Acetylsalicylsäure
BMI	Body mass index
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB	Endocannabinoid-Rezeptor
CCL2	monocyte chemoattractant protein-1
CCL5	regulated upon activation, normal T-cell Expressed and Secreted
CCR	Chemokin-Rezeptor 2
CD40	Cluster of Differentiation 40
CD62	P-Selektin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP	Diabetes Prevention Program
DPS	Diabetes Preventing Study
EC-System	Endocannabinoid-System
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
HbA _{1C}	glykosyliertes Hämoglobin
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HWZ	Halbwertszeit
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IDF	International Diabetes Federation
IGT	gestörte Glucosetoleranz
kcal	Kilokalorien
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
l	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
m ²	Quadratmeter
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mM	Millimolar
mmol	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PRP	Plättchenreiches Plasma
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell Expressed and Secreted
RF	Risikofaktor(en)

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RIO	Rimonabant in obesity
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
Ser ¹⁵⁷	Serin an Position 157
SFL	side fluorescence
SREBP-1C	sterol regulatory-element-binding protein-1c
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Strukturformel Rimonabant	S. 14
Abb. 2. 1	Schema Differentialblutbild	S. 25
Abb. 2. 2	Prinzip des Sandwich-ELISA	S. 26
Abb. 2. 3	Kurvenverlauf der Thrombozytenaggregationsmessung	S. 31
Abb. 2. 4	Handelsübliche Flusskammer	S. 32
Abb. 3. 1	Veränderungen des Körpergewichts	S. 36
Abb. 3. 2. a	Analyse der Leukozytenzahl	S. 37
Abb. 3. 2. b	Analyse der Neutrophilenzahl	S. 38
Abb. 3. 2. c	Analyse der Monozytenzahl	S. 39
Abb. 3. 2. d	Analyse der Thrombozytenzahl	S. 39
Abb. 3. 3. a	Serumspiegel des MCP-1	S. 41
Abb. 3. 3. b	Serumspiegel des RANTES	S. 42
Abb. 3. 4. a	Serumspiegel der Triglyzeride	S. 43
Abb. 3. 4. b	Serumspiegel des Gesamtcholesterins	S. 44
Abb. 3. 4. c	Serumspiegel des LDL-Cholesterins	S. 45
Abb. 3. 4. d	Serumspiegel des HDL-Cholesterins	S. 46
Abb. 3. 5. a	Mittlere Fluoreszenz des phosphorylierten VASP	S. 47
Abb. 3. 5. b	Mittlere Fluoreszenz des Fibrinogen	S. 48
Abb. 3. 6. a	Thrombozytenstimulation	S. 49
Abb. 3. 6. b	Thrombozytenaggregation	S. 50
Abb. 3. 6. c	Thrombozytenadhäsion	S. 51

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Klassifikation von Körpergewicht	S. 2
Tab. 2	Komorbiditäten der Adipositas	S. 4

Tab. 3	IDF-Definition des Metabolischen Syndroms	S. 5
Tab. 4	Lokalisation der peripheren CB1-Rezeptoren und Wirkung von Rezeptorblockern	S. 15

8. Literaturverzeichnis

1. World Health Organisation. Adipositas: Eine Herausforderung für die Europäische Region der WHO; Faktenblatt EURO/13/05. 2005. Kopenhagen. 2005.
2. World Health Organisation. Obesity and overweight; Fact Sheet Nr 311. 2006. 2006.
3. Wolfenstetter SB. [Juvenile obesity and comorbidity type 2 diabetes mellitus (T2 DM) in Germany: development and cost-of-illness analysis]. *Gesundheitswesen*. 2006;68:600-612.
4. Herold G. Innere Medizin; Eine vorlesungsorientierte Darstellung. 2007.
5. Despres JP, Tchernof A. Classification of overweight and obesity in adults. *CMAJ*. 2007, Vol.176, No.8 . 2007.
6. Prugger C, Keil U. [Development of obesity in Germany--prevalence, determinants and perspectives]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2007;132:892-897.
7. Hauner H. Übergewicht: Alles halb so schlimm? *Deutsches Ärzteblatt* 40, 639-640. 2009.
8. Xie S, Furjanic MA, Ferrara JJ, McAndrew NR, Ardino EL, Ngondara A, Bernstein Y, Thomas KJ, Kim E, Walker JM, Nagar S, Ward SJ, Raffa RB. The endocannabinoid system and rimonabant: a new drug with a novel mechanism of action involving cannabinoid CB(1) receptor antagonism - or inverse agonism - as potential obesity treatment and other therapeutic use. *J Clin Pharm Ther*. 2007;32:209-231.
9. Kakafika AI, Mikhailidis DP, Karagiannis A, Athyros VG. The role of endocannabinoid system blockade in the treatment of the metabolic syndrome. *J Clin Pharmacol*. 2007;47:642-652.
10. Wierzbicki AS. Rimonabant: endocannabinoid inhibition for the metabolic syndrome. *Int J Clin Pract*. 2006;60:1697-1706.
11. 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.
12. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N.Engl.J.Med*. 356, 213-215. 2007.
13. Lee M, Aronne LJ. Weight management for type 2 diabetes mellitus: global cardiovascular risk reduction. *Am J Cardiol*. 2007;99:68B-79B.

14. Pressestelle Berlin. Gesundheit - 13. November 2006 - Pressemitteilung; Ulla Schmidt zum Weltdiabetestag: Gute Prävention schützt vor Diabetes. 2006.
15. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. Basislehrbuch Innere Medizin; 3. Auflage. 2004.
16. Ofei F. Obesity - a preventable disease. *Ghana Med J.* 2005;39:98-101.
17. Hollander P. Endocannabinoid blockade for improving glycemic control and lipids in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* 2007;120:S18-S28.
18. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998;339:229-234.
19. 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.
20. Bifulco M, Grimaldi C, Gazzo P, Pisanti S, Santoro A. Rimonabant: Just an Anti-obesity Drug? Current Evidence on Its Pleiotropic Effects. *Mol Pharmacol.* 2007.
21. Serrano A, Del A, I, Javier PF, Macias M, Perez-Valero V, Rodriguez dF. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A (Rimonabant) enhances the metabolic benefits of long-term treatment with oleoylethanolamide in Zucker rats. *Neuropharmacology.* 2007.
22. Hajos N, Ledent C, Freund TF. Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience.* 2001;106:1-4.
23. 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.
24. 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.
25. Schafer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2008;6:52-60.
26. Gawaz M. Das Blutplättchen; Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999.

27. XT-2000iV - Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Tierblutanalytik http://sysmex.de/files/articles/Xtra_XT-VET_FFC.pdf
28. Sysmex, Diff Channel; http://sysmex.de/files/f1/Image/pic_279/diffch.pdf
29. Sysmex, RET Channel, http://sysmex.de/files/f1/Image/pic_279/452_retech.pdf
30. XT-2000iV - Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Tierblutanalytik; http://sysmex.de/files/articles/Xtra_XT-VET_FFC.pdf
31. CCL2; <http://www.rndsystems.com/pdf/mje00.pdf>
32. CCL5; <http://www.rndsystems.com/pdf/mmr00.pdf>
33. Durchflusszytometrie; <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/medizin/lindenau-sabine/HTML/Gesamt-Durchflu.html>
34. Brich J. Pharmakologie der ADP-Rezeptoren auf humanen Thrombozyten. 2004.
35. Wydumus M. Klinische Bedeutung der Clopidogrel - Resistenz bei Patienten mit koronarer Stentimplantation. 2008.
36. Maier C. Lösliches CD40L als neuer Ligand des Leukozytenintegrins Mac-1 und seine Bedeutung bei der Atherosklerose sowie methodische Untersuchungen zur Selektion eines Troponin T spezifischen Aptamers zur Myokardischämiediagnostik. 2008.
37. 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.
38. Fischer A. Die Regulation aktivierender und hemmender Signalwege in humanen neutrophilen Granulozyten durch cAMP- und cGMP-erhöhende Vasodilatoren. 2004.
39. 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.
40. Massberg S, Gruner S, Konrad I, Garcia Arguinzonis MI, Eigenthaler M, Hemler K, Kersting J, Schulz C, Muller I, Besta F, Nieswandt B, Heinzmann U, Walter U, Gawaz M. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood*. 2004;103:136-142.
41. Schäfer A. Habilitation. 2008.
42. Blüher M. Effizientes Gewichtsmanagement mit Rimonabant. Thieme Drug Report 2008 . 2008.

43. Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'Connor SE, Janiak P, Herbert JM. The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes Obes Metab.* 2005;7:65-72.
44. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-1695.
45. Rituparna M, Neeraj KA. Atherosclerosis in diabetes mellitus. *Indian Journal of Medical Science* . 2007.
46. 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.
47. Braunersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2007;97:714-721.
48. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998;2:275-281.
49. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest.* 1999;103:773-778.
50. 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.
51. 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.
52. Sheikine YA, Hansson GK. Chemokines as potential therapeutic targets in atherosclerosis. *Curr Drug Targets.* 2006;7:13-27.
53. 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.
54. 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.
55. Braunersreuther V, Steffens S, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Proudfoot A, Mach F. A novel RANTES antagonist prevents progression of established

- atherosclerotic lesions in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1090-1096.
56. 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.
57. Schafer A, Schulz C, Eigenthaler M, Fraccarollo D, Kobsar A, Gawaz M, Ertl G, Walter U, Bauersachs J. Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. *Blood.* 2004;103:407-412.
58. 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.
59. Schafer A, Flierl U, Kobsar A, Eigenthaler M, Ertl G, Bauersachs J. Soluble guanylyl cyclase activation with HMR1766 attenuates platelet activation in diabetic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2813-2818.
60. Schafer A, Fraccarollo D, Vogt C, Flierl U, Hemberger M, Tas P, Ertl G, Bauersachs J. Improved endothelial function and reduced platelet activation by chronic HMG-CoA-reductase inhibition with rosuvastatin in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:1367-1375.
61. 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.
62. Schafer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2008;6:52-60.
63. 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.
64. 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.
65. Gadde KM, Allison DB. Cannabinoid-1 receptor antagonist, rimonabant, for management of obesity and related risks. *Circulation.* 2006;114:974-984.
66. Sanofi-Aventis nimmt Rimonabant in der EU bis auf Weiteres vom Markt; http://www.aerztezeitung.de/praxis_wirtschaft/unternehmen/?sid=517802

Danksagung

Für das erfolgreiche Fertigstellen meiner Doktorarbeit schulde ich vielen Leuten einen besonderen Dank. Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Schäfer bedanken. Er hat mir dieses interessante Forschungsthema zur Verfügung gestellt und mich immer wieder mit seinem Fachwissen, seiner konstruktiven Kritik und seinen vielen Ideen tatkräftig unterstützt.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Prof. Dr. med. Johann Bauersachs, der mir initial überhaupt erst die Möglichkeiten zur Forschung an diesem Projekt zur Verfügung gestellt hat.

Ein großer Dank geht an die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe, die eine erfolgreiche Laborarbeit gewährleisteten. Namentlich sind hier zu erwähnen:

Dr. Ulrike Flierl und Christian Vogt, die mir besonders in der Anfangsphase mit Rat und Tat zur Seite stand und mir eine gute Einarbeitung ermöglichte.

Corinna Schöpp, Stephanie Pförtsch, Juliane Jaitner, Ilona Mell und Sarah Weinberger mit denen ich eine arbeitsintensive, aber sehr schöne und lustige Zeit erlebt habe.

Maike Leutke, die mich mit ihren wertvollen Erfahrungen und Tipps tatkräftig unterstützte. Stefanie Fiedler, die mich immer wieder ermutigt und vorangetrieben hat und mir bis zum Ende mit vielen Anregungen und Ideen zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt haben und ohne die dieses Studium und diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Freunden und Geschwistern bedanken, die mich immer unterstützt und ermutigt haben und die einen wichtigen Ausgleich boten.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Neumüller, Jutta
Geburtsdatum, -ort: 14.03.1983, Würzburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1989-1993 Grundschule Zellingen
1993-2002 Johann-Schöner-Gymnasium Karlstadt
2002 Abitur

Hochschulausbildung:

10/2002-06/2009 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/2004 Ärztliche Vorprüfung
04/2009-06/2009 Staatsexamen
Praktisches Jahr:
08/2007 – 12/2007 Innere Medizin, Franz-Tappeiner-Krankenhaus, Meran (Italien)
12/2007 – 03/2008 Radiologie, Klinikum Aschaffenburg
03/2007 – 07/2008 Chirurgie, Klinikum Aschaffenburg
Promotion:
02/2006 – 09/2006 Experimentelle Arbeit;
Prof. Dr. med. Ertl, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin 1 der Universität Würzburg
Arbeitsgruppe: Privat-Dozent Dr. med. A. Schäfer

Facharztausbildung:

seit 08/2009 Assistenzärztin am Klinikum Aschaffenburg
Schwerpunkt: Radiologie
Leitung: Prof. Dr. med. M. Freund