

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

Direktor: Professor Dr. med. Ertl

**Verbesserung der vaskulären Funktion und Reduzierung der Thrombozytenaktivierung
durch Telmisartan bei Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus.**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stefanie Menninger

aus Bad Neustadt/Saale

Würzburg, März 2012

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

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

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2013

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Diabetes mellitus.....	1
1.1.1 Definition	
1.1.2 Epidemiologie und wirtschaftliche Auswirkungen	
1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	2
1.3 Pathophysiologie kardiovaskulärer Veränderungen bei Diabetes mellitus.....	3
1.3.1 Atherosklerose	
1.3.2 Hyperlipidämie	
1.3.3 Endotheliale Dysfunktion	
1.3.4 Sauerstoffradikale	
1.3.5 Thrombozyten	
1.3.5.1 Thrombozytenaktivierung	
1.3.5.2 Thrombozytenbindung an das Endothel	
1.3.5.3 Veränderungen der Thrombozytenfunktion bei Diabetes mellitus	
1.4 Stickstoffmonoxid.....	13
1.4.1 Stickstoffmonoxid – Aufgaben im Organismus	
1.4.2 Synthese	
1.4.3 Signalwege mit Stickstoffmonoxid	
1.4.4 Einfluss auf den Gefäßtonus	
1.4.5 Stickstoffmonoxid und Atherosklerose	
1.5 Therapeutische Beeinflussung.....	16
2. Methoden.....	19
2.1 Tiere.....	19
2.1.1 Induktion des Diabetes durch Streptozotocininjektion (STZ)	
2.1.2 Behandlung mit Telmisartan	
2.2 Blutdruckmessungen.....	20
2.3 Gefäßreaktivitätsstudien.....	21
2.3.1 Probengewinnung	
2.3.2 Versuchssystem	

2.3.3 Versuchsdurchführung	
2.4 Messung der Superoxidanionenbildung.....	25
2.5 Durchflusszytometrie.....	26
2.5.1 Probengewinnung	
2.5.2 Probenaufbereitung und Messung	
2.6 Deskriptive Parameter der Versuchstiere.....	31
2.6.1 Metabolische Messwerte	
2.6.2 Hämatologische Messwerte	
2.7 Substanzen und Geräte.....	32
2.7.1 Substanzen	
2.7.2 Geräte und Software	
2.8 Statistik.....	33
3. Ergebnisse.....	34
3.1 Blutdruck.....	34
3.2 Dehnungs-induzierte Bioverfügbarkeit von NO.....	34
3.3 Vasomotorische Funktion.....	36
3.3.1 Endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholin	
3.3.2 Endothelunabhängige Relaxation durch 2-(N,N-Diethylamino)-Diazennol- 2-oxid	
3.4 Vaskuläre Sauerstoffradikale.....	39
3.4.1 Lucigenin	
3.4.2 Hydroethidium	
3.5 Thrombozytenaktivierung.....	42
3.5.1 Durchflusszytometrische Aktivitätsmessung des NO/cGMP-Signalwegs	
3.5.2 Aktivierung des Glykoprotein IIb/IIIa	
3.6 Deskriptive Parameter der Versuchstiere.....	44
3.6.1 Metabolische Messwerte	
3.6.2 Hämatologische Messwerte	
4. Diskussion.....	46
4.1 Blutdruck.....	46

4.2 Stickstoffmonoxid und oxidativer Stress.....	46
4.2.2 Endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholin	
4.2.3 Endothelunabhängige Relaxation durch 2-(N,N-Diethylamino)-Diazennitrat- 2-oxid	
4.2.4 Oxidativer Stress	
4.2.5 Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und NO-Bioverfügbarkeit	
4.3 Thrombozytenaktivierung.....	49
4.4 Zusammenhang zwischen Angiotensin II, Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen.....	51
4.5 Zusammenhang zwischen Angiotensin-II-Rezeptor-Blockade und malignen Erkrankungen.....	52
4.6 Schlussfolgerung.....	53
5. Zusammenfassung.....	54
6. Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis.....	55

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AP-1	Activating protein-1
ATII	Angiotensin II
BH4	Tetrahydrobiopterin
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CD62-P	P-Selectin
cGMP	Guanosinmonophosphat
DEANONOate	2-(N,N-Diethylamino)-diazemat-2-oxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	halbmaximale Effektivkonzentration
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Chelator)
ET-1	Endothelin
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FMN	Flavin-Mononucleotid
FSC	Foreward scatter
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HbA1c	Hämoglobin A1c
HDL	High density lipoprotein
HE	Hydroethidium
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Puffer
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
IDDM	Insulinabhängiger Diabetes mellitus
IL-1	Interleukin 1

LDL	Low density lipoprotein
L-NNA	N ^G -Nitro-L-Arginin
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (endothelial, induziert, neuronal)
O ₂ ⁻	Superoxidanion
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derive growth factor
PE	Phenylephrin
PF4	Platelet factor 4
PGI ₂ bzw. PGI ₂	Prostazyklin
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMP	Thrombozytäre Mikropartikel
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAGE	Rezeptoren für AGEs
RNA	Ribonukleinsäure
sGC	NO-sensitive/lösliche Guanylatzyklase
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Side scatter
STZ	Streptozotocin
VASP	Vasodilatatoren stimulierten Proteins
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vaskuläre endotheliale Zellwachstumsfaktoren
VLDL	Very-low-density-lipoprotein
vWF	von-Willebrand-Faktor
WK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definition

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine Gruppe von Erkrankungen des Kohlenhydratstoffwechsels, welche alle mit einem erhöhten Blutzucker einhergehen (1). Die Ursache hierfür liegt in Defekten der Insulinsekretion, der Insulinaktivität oder beidem. Der Typ-1-Diabetes wird durch eine autoimmune β -Zellzerstörung und den daraus folgenden totalen Insulinmangel verursacht. Beim Typ-2-Diabetes dagegen liegt die Schädigung vor allem in der Insulinresistenz der Zielzellen (2). Es gibt verschiedene Diagnosekriterien für die Erkrankung Diabetes mellitus: Ein Nüchternblutzuckerwert von über 126 mg/dl oder ein Kontrollwert von über 200 mg/dl, unabhängig von der letzten Mahlzeit, sind bei Diabetikern zu finden. Zudem kann der HbA1c bestimmt werden, dieser Laborwert steht für die mittleren Blutzuckerwerte der letzten drei Monate. Bei Werten von $\geq 6,5\%$ sollten weitere Untersuchungen folgen. Die Einteilung des Diabetes mellitus erfolgt nach der American Diabetes Association (ADA) in vier Gruppen. Diese Klassifikation ist allgemein anerkannt und basiert auf der jeweiligen Ursache für die Erkrankung (1,2).

1.1.2 Epidemiologie und wirtschaftliche Auswirkungen

Diabetes ist nicht nur ein Problem in Deutschland oder in den westlichen Staaten, die Häufigkeit dieser Erkrankung nimmt weltweit zu (3). Eine Studie ergab, dass die Anzahl der Menschen mit Diabetes voraussichtlich von 171 Millionen im Jahr 2000 auf 366 Millionen im Jahr 2030 ansteigen wird (4). Alleine in Deutschland wurden im Jahr 2007 mehr als 7 Millionen Patienten aufgrund eines Diabetes mellitus ärztlich behandelt und die Prävalenz ist in den letzten Jahren stetig gestiegen (5,6). Zudem muss von einer großen Zahl an undiagnostizierten Diabetesfällen in der deutschen Bevölkerung ausgegangen werden (1,5,7). In der Bundesrepublik leiden ca. 90% der Patienten an einem Typ-2-Diabetes und 5-10% an Diabetes-Typ-1. Die weiteren ätiologischen Formen der Kohlenhydratstoffwechselstörung sind äußerst selten (5). Nicht nur die steigende Anzahl der Diabeteserkrankungen stellt die

Gesellschaft vor große sozio-ökonomische Probleme. Vor allem die langwierige Therapie dieser chronischen Krankheit und die auftretenden Komplikationen sind immense Kostenfaktoren. Für die KoDiM-Studie (Kosten des Diabetes mellitus) wurden 2001 die finanziellen Mittel berechnet, die in Deutschland für einen diabetischen Patienten durch die Krankenkassen aufgewendet werden müssen. Diese betragen im Mittel 5262 € pro Diabetiker (8,9). In der CODE-2-Studie (Costs of Diabetes in Europe – Type 2) wurde gezeigt, dass vor allem die Komplikationen des Diabetes mellitus für einen großen Teil der Kosten verantwortlich sind. Im Rahmen dieser Untersuchung wiesen 72% der Teilnehmer mindestens eine Komplikation auf. Die finanziellen Aufwendungen steigen um bis zu 250% an, wenn bei den Patienten mikro- und makrovaskuläre Spätfolgen des Diabetes auftreten. Im Gegensatz dazu betragen die Ausgaben für Antidiabetika lediglich 7% des gesamten Diabetesbudgets der Krankenkassen (10-12). Die Reduktion der Produktivität durch krankheitsbedingte Arbeitsausfälle hat ebenfalls einen großen Anteil an den Kosten der Diabeteserkrankungen (13).

1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Der erhöhte Blutzuckerspiegel führt neben Veränderungen zahlreicher Stoffwechselfunktionen vor allem zu einer Glykosylierung verschiedener Proteine. Die sogenannten Advanced Glycation Endproducts (AGE) weisen eine veränderte Struktur und Funktion auf. Diese AGEs verursachen Schäden in verschiedenen Organsystemen und können so zu diabetischen Spätkomplikationen führen. Vor allem das kardiovaskuläre System ist von dieser Pathologie betroffen. Durch diese Störungen kommt es hauptsächlich zur ischämischen Herzerkrankung, cerebralem Insult und peripherer arterieller Verschlusskrankheit (14-22). Das Risiko, bei Diabetes mellitus eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln, ist um das Zwei- bis Vierfache gesteigert (23-25). Diese Spätfolge der Kohlenhydratstoffwechselstörung ist die Hauptursache für die gesteigerte Mortalität diabetischer Patienten (26). Im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollpersonen zeigten diese Personen eine 4,4fach erhöhte kardiovaskuläre Todesrate, obwohl sie keinen der klassischen Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie oder Rauchen aufwiesen. Für diese Prognoseverschlechterung sind ein erhöhte Todesrate nach einem Myokardinfarkt, kongestive Herzinsuffizienz und ein verstärktes Auftreten von stillen ischämischen Ereignissen

verantwortlich (27). Diabetiker haben außerdem ein Langzeitrisiko für kardiovaskuläre Ereignisse, welches mit Nicht-Diabetikern mit erlittenem Herzinfarkt vergleichbar ist (28). Zu diesem Ergebnis passt auch die Tatsache, dass das kardiovaskuläre Risiko bereits vor der klinischen Diagnose des Diabetes mellitus signifikant ansteigt (29). Grund für dieses gesteigerte kardiovaskuläre Risiko ist, dass Diabetes die Entstehung und das Voranschreiten der Atherosklerose fördert (26,30-32). Hohe Blutzuckerspiegel, Lipidstoffwechselstörungen und Insulinresistenz bei Diabetes führen zu pathologischen Veränderungen in den Blutgefäßen. Diese Schädigungen betreffen das Endothel, glatte Muskelzellen der Gefäßwände und die Blutplättchen. Bei Diabetes kommt es also zu tiefgreifenden Veränderungen der Gefäßregulation (14).

1.3 Pathophysiologie kardiovaskulärer Veränderungen bei Diabetes mellitus

Die pathophysiologischen Veränderungen in den Blutgefäßen bei Diabetes mellitus führen zu Atherosklerose (14). Hierbei spielen entzündliche Prozesse eine Hauptrolle (33).

1.3.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung, welche sich über Jahrzehnte hinweg entwickelt. Es kommt zu einer punktuellen Verdickung der Intima, aufgrund der Ablagerung von Lipiden und lipidspeichernden Makrophagen (Schaumzellen). Für die Bildung von atherosklerotischen Plaques ist zudem noch die Bildung von kollagenreicher Bindegewebsmatrix notwendig, was schlussendlich zu einer dauerhaften Einengung des Gefäßlumens führt. Die pathophysiologischen Zusammenhänge bei der Entstehung dieser Krankheit sind komplex, denn zahlreiche Vorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene sind daran beteiligt. Zytokine und Wachstumsfaktoren spielen wichtige Rollen in der Atheroskleroseentstehung (34-37). Die ursprüngliche „response-to-injury“-These wurde aufgegeben. Demzufolge sollte der Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Atherosklerose eine Verletzung des Endothels sein, welche zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus abgelagerten Thrombozyten führte. Die Anwesenheit der Wachstumsfaktoren sollte nach dieser Theorie zur Proliferation von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand führen (37,38). Der aktuelle Wissensstand über die Pathophysiologie der Atherosklerose besagt jedoch, dass

die endotheliale Dysfunktion aufgrund schädigender Einflüsse als Ausgangspunkt zu betrachten ist. Die endotheliale Dysfunktion führt bei morphologisch intaktem Endothel zu kompensatorischen Mechanismen, welche die Homöostase der arteriellen Gefäßwand verändern. Die Gefäßpermeabilität wird erhöht und die Anheftung von Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel wird verstärkt (37).

Normalerweise verhindern die Endothelzellen, die Arterien auskleiden, die Adhäsion von Leukozyten. Atherosklerosetrigger, wie fettreiche Ernährung, Rauchen, Bluthochdruck, Übergewicht, Hyperglykämie oder Insulinresistenz, fördern die Expression von Adhäsionsmolekülen durch die Endothelzellen. So können Leukozyten über adhärente, aktivierte Thrombozyten an die arterielle Wand gebunden werden (36,39,40). Eine Ursache für diese Anheftung von Immunzellen ist die Expression des vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) durch die Endothelzellen. An diesem Bindungsprotein können sich Monozyten und T-Lymphozyten anlagern. Die VCAM-1-Expression wird durch eine atherogene Diät gefördert. Es kommt zur Akkumulation von modifizierten Lipoproteinpartikeln in der arteriellen Intima. Die Expression des Bindungsproteins wird durch oxidierte Lipide über einen NF- κ B Signalweg gesteuert. Die Expression kann ebenso durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1b und Tumornekrosefaktor- α gefördert werden (35,36,41,42). Die Monozyten, welche sich an das Endothel angeheftet haben, können anschließend in die Intima der Gefäßwand eindringen. Diese Migration erfolgt mit Hilfe zahlreicher Chemokine, wobei das Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) als wichtigster Modulator identifiziert wurde. Die MCP-1-Sekretion wird durch aktivierte Thrombozyten gefördert (43-45).

Atherosklerotische Läsionen entwickeln sich vor allem in bestimmten Gefäßabschnitten des arteriellen Gefäßnetzes. Vor allem an Stellen mit Verwirbelungen des Blutflusses, also hämodynamischen Besonderheiten, bilden sich Plaques. An diesen Stellen greifen keine antiatherosklerotischen Mechanismen, wie erhöhte NO-Freisetzung, da die durch laminäre Strömung ausgelösten Scherkräfte fehlen (36,37).

Der initiale Schritt der Atheroskleroseentstehung geht nach heutigem Stand der Wissenschaft von den Thrombozyten aus. Die Blutplättchen können auch an unverletztes Endothel binden. Die aufgrund einer endothelialen Dysfunktion aktivierten Endothelzellen exprimieren von-Willebrand-Faktor (vWF) und P-Selectin, welche an Glykoprotein Ib α (GP Ib α) der Thrombozyten binden. Das GPIIb/IIIa ist für die dauerhafte Bindung der Thrombozyten an das Endothel zuständig. Diese Bindung aktiviert die Thrombozyten. Die aktivierten

Thrombozyten sind zuständig für die Rekrutierung weiterer, an der Entstehung der Atherosklerose beteiligten, Zellen, wie zum Beispiel Leukozyten und Monozyten (39,40,46,47).

1.3.2 Hyperlipidämie

Neben der Hyperglykämie zeigt sich bei Diabetes mellitus eine Erhöhung der freien Fettsäuren im Blut. Die Kohlenhydratstoffwechselstörung führt zu einer erhöhten Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe und gleichzeitig ist die Aufnahme durch die Skelettmuskelzellen vermindert (48,49). In die Endothelfunktion wird durch die freien Fettsäuren auf mehreren Wegen eingegriffen. Das Signalezym Proteinkinase C wird aktiviert und hemmt so den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg, die Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen wird gesteigert und es kommt zu einer Dyslipidämie (50-52). Der erhöhte Blutanteil von freien Fettsäuren führt in der Leber zu einer gesteigerten Produktion von Cholesterinestern und Very-low-density-lipoprotein-(VLDL-)Partikeln (21). Die spezifische Hypertriglyceridämie bei Diabetes mellitus entsteht durch eine gesteigerte Bildung von triglyceridreichen Proteinen und deren reduziertem Abbau durch das Enzym Lipoproteinlipase (21,53). Durch diese Hypertriglyceridämie kommt es zu einer Reduzierung von High density lipoprotein (HDL) im Blut und gleichzeitig zu gesteigerten Spiegeln von kleinen, verdichteten, atherogenen LDL-Partikeln (21,53-55). Die endotheliale Dysfunktion bei Diabetes mellitus wird durch die vorhandene Hypertriglyceridämie und das verminderte HDL gesteigert (56,57). Die atherogenen Eigenschaften der Dyslipoproteinämie werden durch einige Besonderheiten des Diabetes mellitus potenziert, denn das veränderte LDL kann bei vorhandener Hyperglykämie zusätzlich glykiert und oxidiert werden (21).

1.3.3 Endotheliale Dysfunktion

Die Blutgefäße werden durch eine einzellige Endothelschicht ausgekleidet. Diese einlagige Zellschicht trennt die thrombogenen Strukturen, wie vWF, Kollagen, Fibronectin, Thrombospondin, Vitronectin und Thrombin der Gefäßwand vom Blutstrom ab. Der Verband der Zellen ist über Oberflächenproteine verbunden und weitgehend impermeabel. Die physiologische Funktion des Endothels beinhaltet neben der Abgrenzung des Blutstroms noch

weitere Aufgaben. Es sezerniert vasoaktive Substanzen, welche die nichtthrombogene Oberfläche des Endothels erhalten, den Gefäßtonus regulieren, Entzündungsreaktion steuern und die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen inhibieren. Einige dieser Stoffe wirken vasodilatatorisch: Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI₂) und Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Für die Vasokonstriktion sind unter anderem Angiotensin II (ATII) und Endothelin (ET-1) zuständig (58).

Vor allem die Wirkung von NO wird im Rahmen der Endothelfunktion seit vielen Jahren intensiv untersucht. Bereits im Jahr 1980 wurde die Existenz eines „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) durch *Furchgott* und *Zawadzki* nachgewiesen. Dieser Stoff wurde mit Hilfe von isolierten Kaninchen-Aorten entdeckt, da es nach Acetylcholinexposition zu einer Vasodilatation der Gefäße kam (59). Die Identifizierung des EDRF als NO erfolgte einige Jahre später durch pharmakologische und biochemische Nachweise (60).

Der Begriff „Endotheliale Dysfunktion“ steht im Allgemeinen für alle Pathologien des Endothels. Dies schließt Veränderungen in den antiinflammatorischen oder antikoagulatorischen Regelkreisen, sowie der Regelung des vaskulären Wachstums und des vaskulären Remodelings mit ein. In der wissenschaftlichen Literatur jedoch wird der Ausdruck endotheliale Dysfunktion häufig für eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit in der Gefäßwand verwendet. Dieser Zustand zeigt sich in einer pathologisch verminderten Vasorelaxation (61).

Es gibt zwei Hauptgründe für den Mangel an NO: Erstens kann die Bildung von NO pathologisch vermindert sein. Zudem besteht die Möglichkeit, dass NO vermehrt abgebaut wird, bevor es seine physiologische Funktion erfüllt. Dieser Abbau erfolgt vorwiegend durch reaktive Sauerstoffmoleküle aufgrund von vermehrtem oxidativem Stress im Rahmen von Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Nikotinabusus und Diabetes (62,63).

Die Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren, bei welchen eine endotheliale Dysfunktion zu finden ist, steigt. Bisher konnte ein Mangel an NO bei Rauchen, Hyperhomocysteinämie, pulmonalem Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Atherosklerose, Hypertonie, Herzinsuffizienz und Diabetes mellitus nachgewiesen werden. Der wissenschaftliche Nachweis dieser verminderten NO-Bioverfügbarkeit erfolgte durch eine verminderte vasodilatatorische Gefäßreaktion bei Acetylcholingabe oder bei erhöhtem Strömungswiderstand im Gefäß (64,65).

1.3.4 Sauerstoffradikale

Der erhöhte Blutzuckerspiegel bei Diabetes mellitus verursacht eine gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffmolekülen, dies ruft eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit hervor (66,67). Als ersten Schritt steigert die Hyperglykämie die Superoxidanionenproduktion durch die mitochondriale Elektronentransportkette (67). Dieses O_2^- verursacht eine zusätzliche Bildung von radikalischen Sauerstoffspezies über mehrere zelluläre Mechanismen (15). Die Proteinkinase C (PKC), welche durch Superoxidanionen aktiviert wird, steigert über die NADPH-Oxidase die Synthese von zusätzlichem O_2^- (65,67,68). Die Superoxiddismutase (SOD) ist für den Abbau von Sauerstoffradikalen zuständig und im physiologischen Zustand ist die SOD-Konzentration sehr viel höher als die Sauerstoffradikalkonzentration. Aufgrund der stark erhöhten O_2^- -Konzentration wird jedoch diese Abbaukapazität der SOD überschritten und aus O_2^- und NO bildet sich das äußerst reaktive Peroxynitrit (69,70). Dieses Peroxynitrit ist in der Lage, Tetrahydrobiopterin, einen Kofaktor der NOS, zu oxidieren. Als Folge daraus kann die NO-Synthase entkoppelt werden (71-73). Entkoppelung bedeutet, dass die NO-Synthase bei vermindertem Tetrahydrobiopterin eine bedeutende Anzahl von Superoxidanionen bildet. Beim NO-Synthesevorgang kommt es dann zum Abbruch der Elektronenkette in der endothelialen NOS. Die Reduktion von Sauerstoff wird unterbrochen, der Synthesevorgang von NO kann nicht vollendet werden und es entsteht O_2^- (74). Diese eNOS-Entkoppelung, welche zu endothelialer Dysfunktion führt, kann bei Patienten mit Diabetes mellitus und in experimentellen Modellen von Diabetes erfasst werden. Sie ist für einen bedeutenden Anteil an diabetesbedingtem oxidativem Stress verantwortlich (65,75). Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und die Inaktivierung von Stickstoffmonoxid werden durch die geschilderten Vorgänge zunehmend intensiviert, wodurch die Entwicklung von kardiovaskulären Pathologien, wie zum Beispiel Atherosklerose, gefördert wird (Abb. 1) (76).

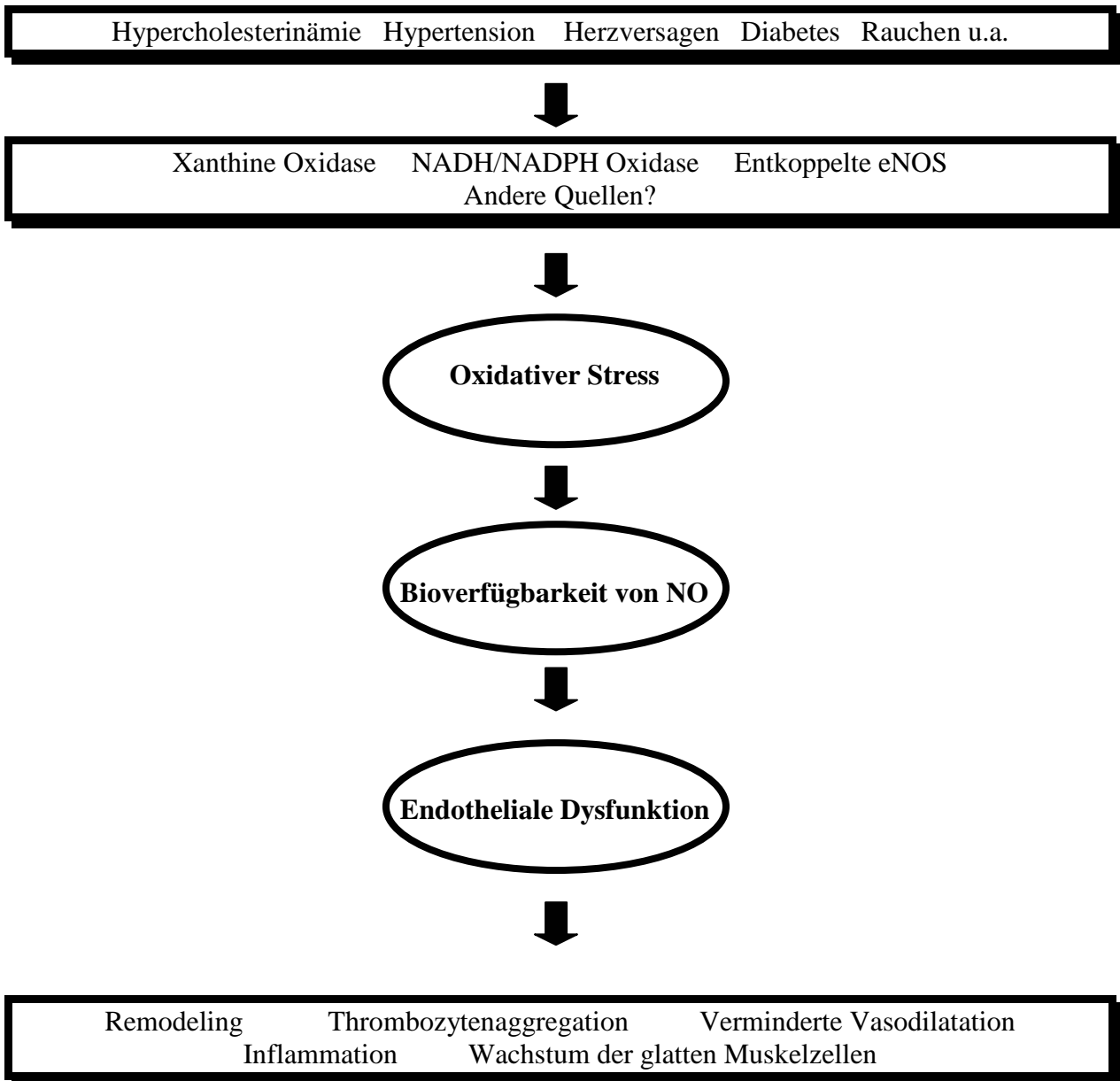


Abbildung 1: Entstehung von durch oxidativen Stress verursachter endothelialer Dysfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen (Modifiziert nach Cai H., Harrison D. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Cir. Res.* 2000;87;840-844.).

Stickstoffmonoxid gehört ebenfalls zu den reaktiven Sauerstoffspezies. Es wirkt in vaskulären Zellen auf das Redoxpotential. Die Wirkungen des NO sind jedoch sehr unterschiedlich und hängen vor allem von der Quantität des Moleküls in der Zelle ab. In geringen Mengen, welche vor allem von der eNOS produziert werden, wirkt es fördernd auf die Synthese der extrazellulären SOD (77). Zudem fördert NO die Hämoxxygenase-I-Expression, die Bilirubin

synthetisiert. Bilirubin ist in der Lage Superoxidanionen abzubauen (70,78,79). Durch die Synthese von O_2^- in den Mitochondrien nimmt auch die Produktion von Advanced glycation end products (AGEs) zu (67). AGEs entstehen durch Oxidation oder eine Glykation, die ohne Enzyme abläuft. Es handelt sich um Proteine oder Lipide, deren chemischer Aufbau verändert wurde (17). Im Rahmen von Alterungsprozessen und in hyperglykämischem Milieu erfolgt die Bildung von AGEs (17,18). Die Anwesenheit dieser veränderten Proteine fördert die Synthese von Sauerstoffradikalen. Die enzymatische intrazelluläre Synthese von O_2^- durch die NADPH-Oxidase wird gesteigert, denn dieses Enzym kann von Rezeptoren für AGEs (RAGE) aktiviert werden (17,19,80). Über weitere Mechanismen sind die AGEs in der Lage, NO direkt zu inaktivieren und die Synthese von Prostazyklin (PGI_2) im Endothel zu verringern. Diese modifizierten Proteine fördern deutlich die Entwicklung der pathologischen Gefäßveränderungen bei Diabetes mellitus (17,18). Ein erhöhter Blutzuckerspiegel steigert ebenfalls die Diacylglycerolsynthese. Dieser second-messenger steigert die Aktivierung der Proteinkinase C, welche durch die NADPH-Oxidase wie bereits beschrieben die Sauerstoffradikalproduktion steigert. Außerdem wird durch die Proteinkinase C noch die Phosphatidylinositol-3-Kinase gehemmt. Dieses Enzym ist für die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase zuständig und durch seine Hemmung kommt es zu einer verminderten NO-Konzentration, also endothelialer Dysfunktion (81-83).

1.3.5 Thrombozyten

Thrombozyten sind gemeinsam mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren bei Verletzungen der Gefäßwand entscheidend für den Verschluss der Läsion und für die Blutstillung verantwortlich (84).

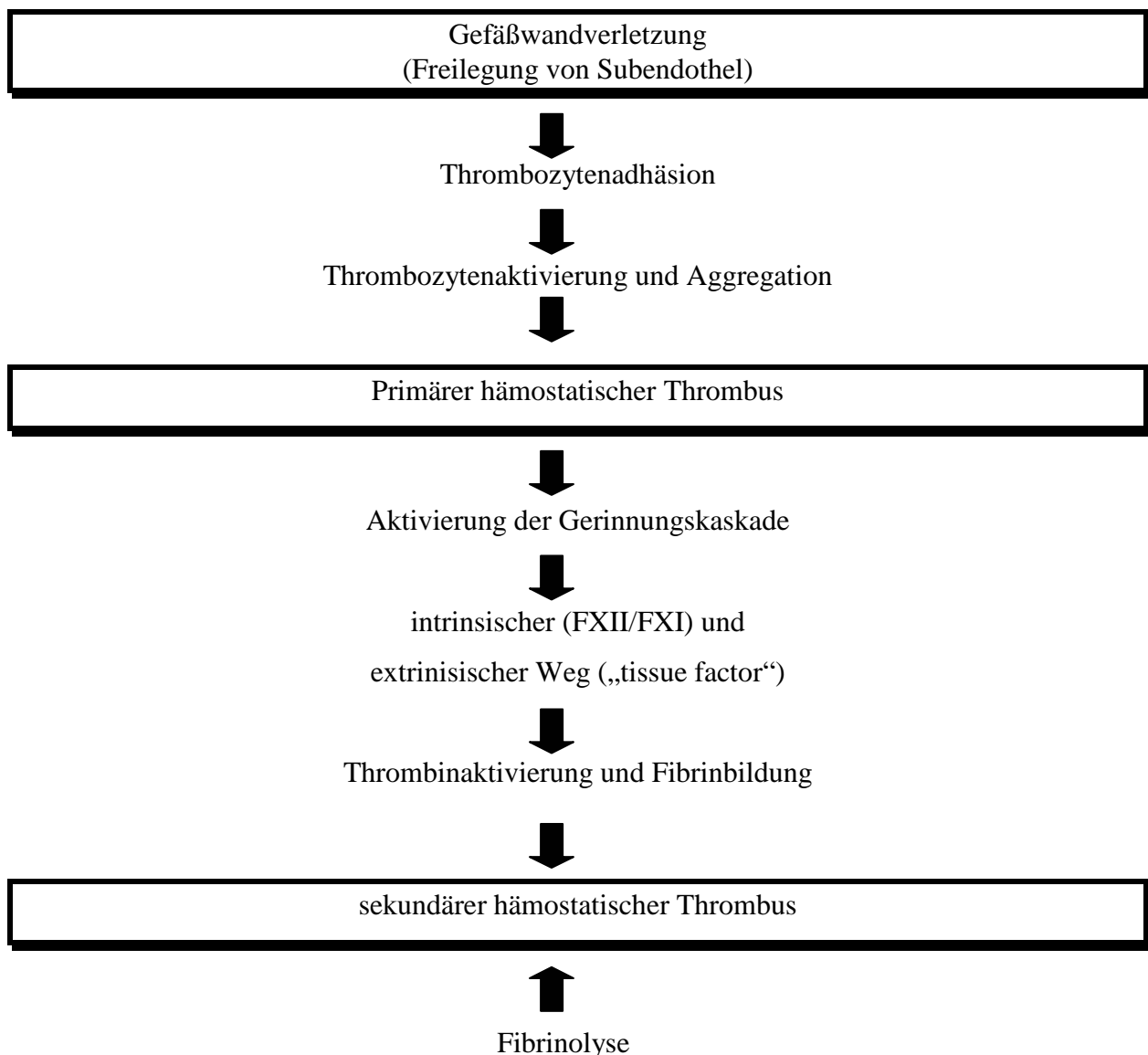


Abbildung 2: Primäre und sekundäre Hämostase. (Modifiziert nach Gawaz, M. Das Blutplättchen. 1999. Stuttgart, Thieme Verlag. S. 2)

1.3.5.1 Thrombozytenaktivierung

Wie bereits bei der Entstehung der Atherosklerose geschildert, sind nach dem heutigen Stand der Wissenschaft die Thrombozyten für den initialen Schritt der Atheroskleroseentwicklung verantwortlich. Endothelzellen, welche aufgrund einer endothelialen Dysfunktion aktiviert sind, exprimieren P-Selectin und vWF und sind so in der Lage, das GP I β der Thrombozyten zu binden. Die GPIIb/IIIa-Bindung, die auf den ersten Kontakt folgt, bindet die Thrombozyten dauerhaft und führt zu einer Aktivierung der Thrombozyten (39,40,46,47).

Über das GPIIb/IIIa werden zudem weitere zirkulierende Thrombozyten gebunden (84). Durch Aktivierung dieses Rezeptors werden von den Thrombozyten zahlreiche Faktoren freigesetzt oder auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert. Es handelt sich um Adhäsionsproteine (unter anderem Fibrinogen), Wachstumsfaktoren, Zytokine und Koagulationsfaktoren. Vor allem den Zytokinen fällt eine zentrale Rolle an der für die Atheroskleroseentstehung notwendigen Monozytenrekrutierung zu (39,46). Die Membranglykoproteine sind Ausgangspunkt verschiedener Signalkaskaden, welche durch den Kontakt der Rezeptoren mit ihren Liganden wie ADP, vWF oder Kollagen in Kontakt kommen. Im Rahmen des Signalweges kommt es zu Ionenveränderungen, Proteinkinaseaktivierung, Polymerisation des Cytoskeletts und Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus. Auf diese Ereignisse folgt die Aktivierung des Glykoproteins Iib/IIIa. Es durchläuft eine sterischen Konformationsänderung und dabei wird eine hoch-affine Bindungsstelle für Liganden mit einer RGD-(Arginin-Glycin-Asparagin)-Sequenz freigelegt. An aktiviertes GPIIb/IIIa binden zum Beispiel Fibrinogen und vWF. Gebundenes Fibrinogen ist also ein Indikator für die Aktivierung der Thrombozyten (84). Im Laufe der Aktivierung kommt es zudem zur Sekretion von proinflammatorischen Substanzen und Exprimierung von Adhäsionsproteinen aus thrombozytären Zellorganellen, unter anderem dem offenen kanalikulären System, den Lysosomen, dem dichten tubulären System und den α -Granula. Alle inflammatorisch bedeutsamen Stoffe werden durch die α -Granula freigesetzt. Es handelt sich dabei unter anderem um PDGF (platelet-derived growth factor), platelet factor 4 (PF4), Interleukin 1 (IL-1), β -Thromboglobulin, CD40L. Diese werden im Vorfeld zum Großteil bereits durch die Megakaryozyten gebildet oder auch durch Endozytose aus dem Blut aufgenommen (85). P-Selectin (CD62-P) wird ebenfalls durch die α -Granula freigesetzt. Er ist ein Rezeptor und ein wichtiger Bestandteil der Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten, welche bei der Atheroskleroseentstehung eine tragende Rolle spielt (84). Im Rahmen der Thrombozytenaktivierung kommt es auch zu einer vermehrten Abschnürung der Thrombozytenplasmamembran. Diese thrombozytären Mikropartikel (PMPs) bewirken die Erhaltung des aktivierten Zustandes der Thrombozyten, da sie zahlreiche Adhäsionsmoleküle und proinflammatorische Faktoren beinhalten (84-86). Ein weiterer Grund für die Thrombozytenaktivierung ist die verminderte NO-Bioverfügbarkeit. Dieser direkte Zusammenhang konnte durch *in-vivo*-Untersuchungen hergestellt werden. Es konnte eine signifikant gesteigerte Thrombozytenaktivierung bei gesunden Versuchsteilnehmern nach

Gabe eines NO-Synthase-Inhibitors nachgewiesen werden, und die Reversibilität dieser Thrombozytenaktivierung durch einen NO-Donor (87). Aktivierte Thrombozyten konnten im Rahmen von zahlreichen Krankheiten nachgewiesen werden. Sie kommen unter anderem bei Hypertension (88-90), Hypercholesterinämie (91,92), peripherer arterieller Verschlusskrankheit (93), cerebralem Insult (91,94), chronischer Herzinsuffizienz (CHF) (95,96), instabiler Angina pectoris (97) und Diabetes (98,99) vor.

1.3.5.2 Thrombozytenbindung an das Endothel

Die Interaktion zwischen Endothelzelle und Thrombozyt geschieht, wie bereits dargestellt, über verschiedene Rezeptoren und Mediatoren. Im physiologischen Fall kommt es zu keiner Bindung der Thrombozyten an das Endothel und der Blutfluß kann ungehindert stattfinden.

Die Strömungsverhältnisse innerhalb der Blutgefäße sind dafür verantwortlich, dass Thrombozyten bevorzugt in die Nähe der Gefäßwände transportiert werden. Durch die irreguläre Form der Thrombozyten können tangentielle Scherkräfte einwirken. Sie werden innerhalb der Blutströmung nach außen, in die Nähe der Gefäßwand getragen, wo das Maximum der Scherkräfte wirkt (100).

Wie bereits erwähnt, gibt es Stellen im Gefäßsystem, an denen es zu Verwirbelungen kommt, was zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit führt. Die endotheliale NO-Synthase wird auch durch die Scherkräfte reguliert, welche im Gefäßsystem herrschen. Hohe NO-Spiegel werden durch normale laminäre Scherkräfte ausgelöst. Im Bereich von Plaques oder Gabelungen jedoch führen erhöhte Kräfte zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit. Dieser niedrige NO-Pegel führt unter anderem zu einer Thrombozytenaktivierung und hieraus resultierend zu einer Bindung an das Endothel (36,37,87,101).

1.3.5.3 Veränderungen der Thrombozytenfunktion bei Diabetes mellitus

Im Rahmen einer diabetischen Stoffwechsellage sind Thrombozyten empfindlicher gegenüber aktivierenden Einflüssen. Dies zeigt sich durch eine gesteigerte Adhäsionsbereitschaft, vermehrte Zahl an GPIIb/IIIa auf der Oberfläche, gesteigerte Synthese von Sauerstoffradikalen und Prostanoiden, verstärkte cytosolische Calciumbereitstellung, gefüllte und reaktive α -Granula, gesteigertes Plättchenvolumen, vermehrte Glykosylierung von

Membranglykoproteinen, modifizierte Membranfluidität und gesteigerte Bindung von Fibrinogen (102-107). Die Hyperglykämie führt, wie bereits erwähnt, zur Ausbildung von AGEs und fördert damit über die RAGE die endotheliale Dysfunktion (20). Über diese verminderte NO-Bioverfügbarkeit kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung der Thrombozyten (36,37,87,101). Der erhöhte Blutzucker ist jedoch nicht der einzige Grund für eine Thrombozytendysfunktion im Rahmen eines Diabetes mellitus, denn selbst bei noch gesunden Risikopersonen für einen Insulin-abhängigen Diabetes (IDDM) ist eine Dysfunktion der Thrombozyten nachweisbar, ohne dass erhöhte Blutzuckerwerte nachgewiesen werden können (108).

1.4 Stickstoffmonoxid

1.4.1 Stickstoffmonoxid – Aufgaben im Organismus

Eine zentrale Aufgabe von Endothelzellen ist die Synthese von Stickstoffmonoxid. Bereits im Jahr 1980 entdeckten *Furchgott* und *Zawadzki* einen Stoff, der zur Vasodilatation führte, dies hatte die Benennung als „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) zur Folge. Die Substanz konnte als NO identifiziert werden (59,109-112). Dieses Molekül hat maßgebliche Bedeutung bei inter- und intrazellulären Signalkaskaden im Rahmen der Gefäßhomöostase. Zu seinen Aufgaben gehören die Regelung der Gefäßwandspannung, Hemmung der Leukozytenadhäsion am Endothel und der Aktivierung von Thrombozyten sowie die Regulation des Zellzyklus (Proliferation, Apoptose) von Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Es moduliert zudem das Oxidationsgleichgewicht in der Zelle und im Rahmen der unspezifischen Abwehr wird NO von Makrophagen freigesetzt (70,113-117).

1.4.2 Synthese

Für die Synthese von NO ist die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) zuständig. Es gibt mehrere Isoenzyme: die neuronale nNOS, die induzierbare iNOS und die endotheliale eNOS (118). Das freie Radikal Stickstoffmonoxid entsteht durch alle drei Isoformen über die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO (119,120). Als Kofaktoren benötigt die NOS unter anderem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH),

Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Flavin-Mononucleotid (FMN) (120). Die synthetisierte Menge von NO bewegt sich bei eNOS in der Größenordnung nanomolar und ist abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration und Stimulation. Das Isoenzym iNOS ist in der Lage, NO im mikromolaren Bereich zu produzieren und wird durch Stimulation von außen angeregt, zum Beispiel durch Zytokine und mikrobielle Stoffe. Zudem erfolgt die Synthese der iNOS calciumunabhängig. Aufgrund dieser Mengenunterschiede in der Syntheseleistung wird vorrangig die iNOS verantwortlich gemacht für die zytotoxischen Wirkungen des Sauerstoffradikals Stickstoffmonoxid (70,113,118). Die eNOS wird über zwei Wege angeregt: Zum einen kann die Syntheseleistung über Rezeptoren gesteigert werden und zum anderen über laminäre Schubspannung. Die Rezeptoren auf der Endothelzelle werden durch Liganden, wie Acetylcholin, aktiviert und steigern über eine Signalkaskade die Produktion von NO in der Endothelzelle (70,121). Die laminäre Schubspannung ist ein mechanischer Auslöser für die Synthesesteigerung. Es handelt sich hierbei um ziehende und reibende Kräfte, welche auf die Gefäßwände einwirken. Diese Scherkräfte werden durch den Blutfluss hervorgerufen (122). Die Endstrecke beider Signalkaskaden führt zur Phosphorylierung der eNOS, Zielstruktur ist die Aminosäure Serin1179. Daraufhin dissoziiert die eNOS von der Plasmamembran und wird gleichzeitig aktiviert. Die Bildung von NO beginnt (70,121).

1.4.3 Signalwege mit Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid wird von den Endothelzellen sezerniert und wirkt auf benachbarte Strukturen. Die glatten Gefäßmuskelzellen befinden sich direkt unter der Endothelschicht. Im Gefäßlumen erreicht NO zunächst die Thrombozyten, welche flussbedingt am Endothel entlang strömen. Durch Diffusion überwindet NO die Zellmembran und erreicht im Zytosol die lösliche Guanylatzyklase (70,117,120,123). NO gelangt zu seiner Zielstruktur aufgrund seiner hohen Affinität zu Häm-Gruppen. Das Enzym NO-sensitive/lösliche Guanylatzyklase (sGC) besitzt eine solche Häm-Gruppe (117). Die Aktivierung des Enzyms erfolgt mittels der chemischen Bindung von Stickstoffmonoxid an den Protoporphyrinring der sGC. Das Enzym katalysiert die chemische Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) in den second messenger Guanosinmonophosphat (cGMP) (113,117,124). Über dieses Protein werden unter anderem verschiedene Proteinkinasen aktiviert und Transportproteine in der Plasmamembran gelenkt.

Auf diesem Weg wird das Signal von NO in der Zelle weitergeleitet und cGMP ist der wesentliche Vermittler im Rahmen dieser Signalkaskade (70,117).

1.4.4 Einfluss auf den Gefäßtonus

Für die Vasodilatation der Blutgefäße spielt NO eine bedeutende Rolle. Es ist der Antagonist zur sympathischen Vasokonstriktion und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (125). Innerhalb der glatten Gefäßmuskelzellen führt die durch NO angeregte cGMP-Bildung zur Aktivierung von Proteinkinasen, Ionenkanälen und Phosphodiesterasen. Unter anderem kommt es zu einem Calciumabfall. Diese Ionenspiegelveränderung erfolgt durch die aktivierte Proteinkinase G (PKG) und spannungsabhängige Calciumkanäle, welche direkt durch cGMP gehemmt werden (124,126-129). Die Aktivierung der Proteinkinase G führt zur Phosphorylierung von Proteinen im sarkoplasmatischen Retikulum, speziell von Calcium-abhängigen Kaliumkanälen. Diese Kanäle transportieren in phosphoryliertem Zustand weniger Calcium in das Zytosol der Muskelzellen und das intrazelluläre Calcium sinkt weiter ab (129-131). Der Calcium-Calmodulin-Komplex und die Myosin-Leichtkettenkinase werden nun aufgrund des gesunkenen Calciums vermindert gebildet. Daraus folgt, dass die Phosphorylierungsreaktion der regulatorischen Myosin-Leichtketten sinkt. Auf diesem Weg wird die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen blockiert und es kommt zu einer Vasorelaxation (70,132).

1.4.6 Stickstoffmonoxid und Atherosklerose

Stickstoffmonoxid ist für verschiedene Mechanismen verantwortlich, welche antiatherosklerotisch wirken (125,133). Es vermindert die Adhäsion, Aggregation und letztendlich die Aktivierung von Thrombozyten (127,134). Im Rahmen der Thrombozytenaktivierung kommt es zur Phosphorylierung des durch Vasodilatoren stimulierten Proteins (VASP). Diese Phosphorylierung geschieht NO-abhängig und ist ein wichtiger Schritt in der Regulation der Thrombozytenaktivierung (132,135). Zudem ist sie verantwortlich für die Hemmung der Bindung zwischen Fibrinogen und dem GP IIb/IIIa der Thrombozyten (136,137). Die NO/cGMP-abhängige Proteinkinase G phosphoryliert VASP an der Aminosäure Serin 239 und 157 und beeinflusst so das Zytoskelett des Thrombozyten,

welcher daraufhin nicht am Endothel binden oder aktiviert werden kann (135,138-141). Auf diesem Weg wird ein wichtiger Teil der Atheroskleroseentstehung blockiert, denn neben der Adhäsion der Thrombozyten wird durch die fehlende Aktivierung auch die Leukozytenadhäsion entscheidend erschwert. Die Adhäsion an Endothelzellen und die Migration von Leukozyten durch die Endothelschicht wird zudem durch MCP-1 beeinflusst, dessen Expression durch NO reduziert wird (40,134,142-144). Weiterhin sind zahlreiche Adhäsionsproteine aufgrund von NO-Wirkungen in der Plasmamembran der Leukozyten in geringerer Anzahl vorhanden. Dies trifft unter anderem zu bei P-Selectin und VCAM-1 (125,145,146). Auch die Durchlässigkeit der Endothelschicht für Makromoleküle, die Lipoproteinansammlung in der Blutgefäßwand sowie für Low density lipoprotein und Cholesterin im Subendothel werden durch NO verringert. Ein weiterer wichtiger Schutzeffekt von NO ist die verringerte Entstehung von oxidiertem LDL. Dieses Lipoprotein wirkt stark atherogen (133,147-151). Auch die Effekte von NO auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwand sind antiatherogen. Der NO/cGMP-Signalweg führt zu einer verringerten Proliferation dieser Zellen und da NO die Aktivierung von Thrombozyten hemmt, werden die Muskelzellen auch nicht von Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten-Granula zur Proliferation oder zur Synthese von Bindegewebsmatrix angeregt (125,152-155). All diese durch NO ausgelösten Mechanismen dienen dem Schutz der Gefäßwand und wirken der Entstehung der Atherosklerose entgegen. Die NO-Bioverfügbarkeit ist also folglich essentiell für ein gesundes vasculäres System (15,70,125,133,144).

1.6 Therapeutische Beeinflussung

Basierend auf dem gesteigerten kardiovaskulären und renalen Risiko diabetischer Patienten, sind also passende pharmakologische Behandlungen nötig, welche Schutz vor diabetischen Komplikationen bieten. Dies ist dringend erforderlich, wenn man sich die ständig steigende Zahl der weltweit neu an Diabetes erkrankten Patienten vor Augen führt (3,4). Ein endokrines System, welches überwiegend die systemische Gefäßhomöostase reguliert, ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Angiotensin II besitzt überdies viele Effekte, welche über seine Wirkung auf den Blutdruck hinausgehen. Unter anderem wurde gezeigt, dass es Gewebeschäden in empfindlichen Organen, zum Beispiel der Niere, fördert (156). Desweiteren hat Angiotensin inflammatorische Effekte. Diese Inflammation durch

Angiotensin II wird vorwiegend durch die gesteigerte Produktion von Sauerstoffradikalen verursacht, deren Folgen für die Atherogenese in der Abbildung 3 zusammenfasst dargestellt werden (157).

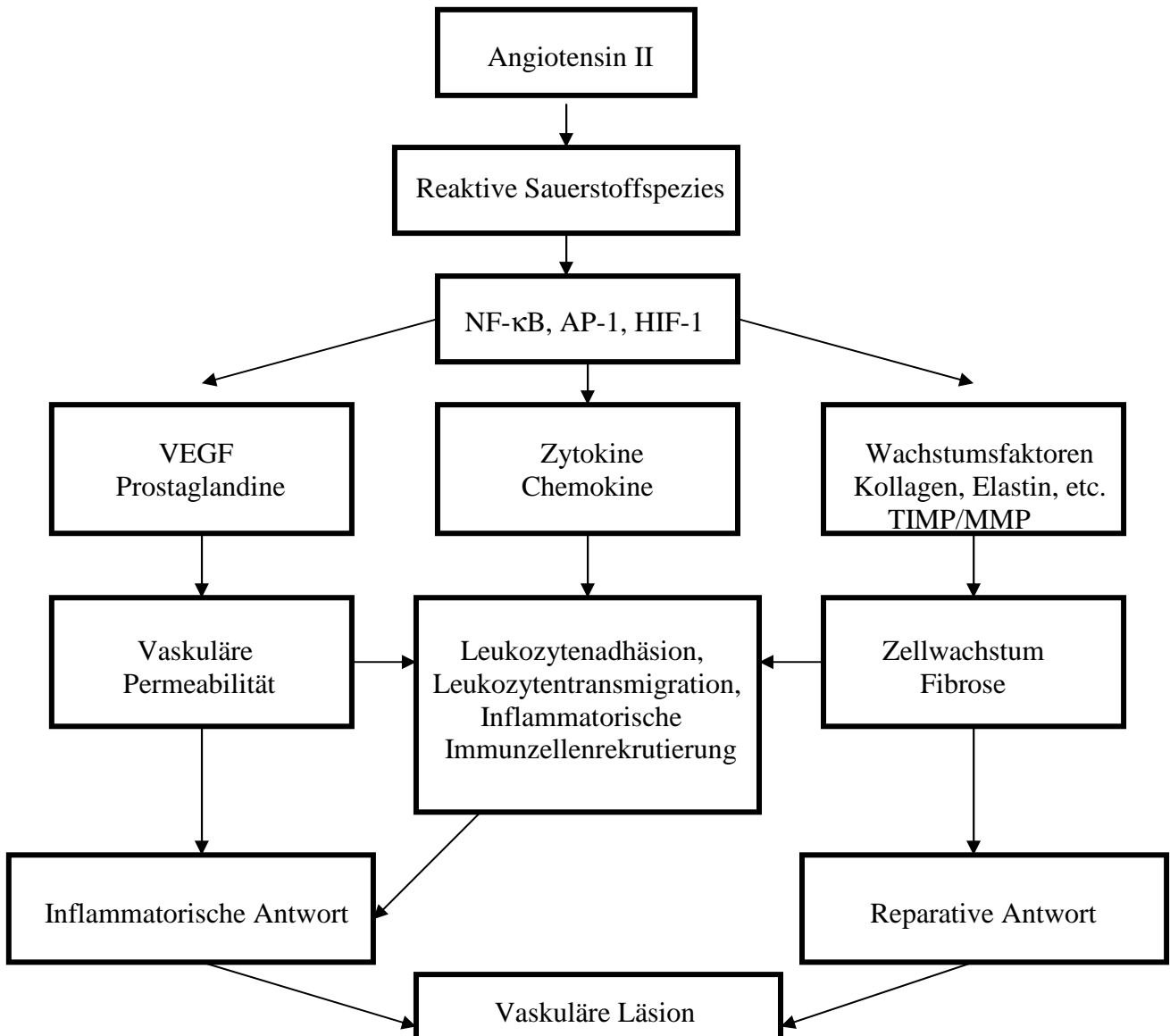


Abbildung 3: Angiotensin II beeinflusst die vaskuläre Permeabilität durch die gesteigerte Produktion von vaskulären endothelialen Zellwachstumsfaktoren (VEGF) und Prostaglandinen. Angiotensin-II-induzierte Aktivierung von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren resultiert in Leukozytenrekrutierung, Zellwachstum und Fibrose. Diese Vorgänge werden durch die Aktivierung von Redox-sensiblen Transkriptionsfaktoren (unter anderem NF-κB, AP-1, HIF-1) über die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies reguliert. Die inflammatorische Antwort ist assoziiert mit reparativen Vorgängen, welche Fibrose und Zellwachstum zur Folge haben. Dysregulation dieser Vorgänge führt zu Gefäßläsionen und strukturellem Remodeling bei Bluthochdruck. (Modifiziert nach Touyz R. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;14:125-131.)

Ein Resultat aus dieser Erkenntnis ist, dass die Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems als Methode vorgeschlagen wurde, um bestimmte Organschäden und kardiovaskuläre Komplikationen bei Patienten mit Diabetes zu reduzieren (156). Etliche Studien haben die Effekte der Hemmung, wie Reduktion der Albuminurie und langsamere Progression der Niereninsuffizienz von Mikroalbuminurie zu Makroalbuminurie, nachgewiesen. Noch wichtiger ist die Tatsache, dass in einigen Endpunktstudien gezeigt werden konnte, dass die antiproteinurischen Effekte von Angiotensin-II-Inhibitoren sich in kardiovaskuläre und nierenprotektive Effekte übersetzen ließen. Sie verzögern die Notwendigkeit von Dialyse und Nierentransplantation um mehrere Jahre. Weiterhin konnte die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität der Patienten reduziert werden. Diese Ergebnisse sind nicht nur alleine auf die blutdrucksenkende Wirkung der RAAS-Inhibitoren zurückzuführen (156,158-161).

Um herauszufinden, welche Effekte, außer der Blutdrucksenkung, zu diesen positiven Ergebnissen führen könnten, untersuchte ich die Auswirkungen von chronischem Angiotensin-II-Antagonismus durch Telmisartan auf die vaskuläre Endothelfunktion und auf die Thrombozytenaktivierung bei Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes.

2. Methoden

Die Untersuchungen an Versuchstieren in dieser Doktorarbeit berücksichtigen die gängige Gesetzgebung zum Umgang mit Versuchstieren sowie die derzeitigen Richtlinien der Universität Würzburg.

2.1 Tiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Wistarratten. Das Ausgangsgewicht der einzelnen Tiere bewegte sich zwischen 250 und 300g. Die Lieferung der Tiere erfolgte durch die Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland. Die Ratten wurden in Käfigen gehalten. Maximal 3 Tiere teilten sich einen Rattenkäfig mit Hochdeckel. Im Tierstall herrschte eine kontrollierte Umgebungstemperatur von 20 – 22 °C und es erfolgte ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Wasser und Formuladiät (Altromin Spezialfutter GmbH, Lage). Die Betreuung der Tiere erfolgte durch eine Tierpflegerin der Universität Würzburg und erfahrenes Laborpersonal.

2.1.1 Induktion des Diabetes durch Streptozotocininjektion (STZ)

Durch die intravenöse Gabe einer Einzeldosis Streptozotocin (10 mg/ml, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde in den Versuchstieren eine Pankreasinselzellzerstörung verursacht und somit eine persistierende Hyperglykämie induziert. Streptozotocin ist ein Nitroseharbstoffderivat, welches aus *Streptomyces achromogenes* isoliert werden kann. Der Stoff weist eine breite antibiotische und antineoplastische Wirkung auf. Das Mittel besitzt stark alkylierende Eigenschaften und es wurde gezeigt, dass Streptozotocin in den Glucosetransport und in die Glucokinasefunktion eingreift. Zudem verursacht es multiple DNA-Strangbrüche und wirkt toxisch auf die Betazellen des Pankreas (162-165).

Streptozotocin wurde in sterilem Natriumcitratpuffer (25 mM, pH 4,5) frisch aufgelöst und dann innerhalb von 10 Minuten verbraucht. Die Ratten erhielten eine einzelne Dosis von 50 mg/kg. Die Gabe erfolgte durch eine intravenöse Injektion über die Vena dorsalis penis. Die Kontrollgruppe der Versuchstiere erhielt eine äquivalente Menge sterilen Natriumcitratpuffers, welcher ebenfalls über die Vena dorsalis penis intravenös verabreicht

wurde. Zwei und vier Wochen nach der Streptocotozingabe führte man eine Blutzuckerkontrolle der Ratten durch. Die Blutprobe hierfür ist durch Anritzen der Schwanzvene, mittels eines Skalpells, entnommen und auf einen Blutzuckerteststreifen übertragen worden. Für die Glucosemessung wurde ein One-Touch Blutzuckermessgerät (ASCENSIA Elite, Bayer-Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) verwendet. Als ausreichende Hyperglykämie wurden stichprobenartige Blutzuckerwerte von >20 mM (ca. 360 mg/dl) zwei und vier Wochen nach Streptozotocingabe definiert. Im Fall, dass diese Glucosewerte nicht erreicht wurden, erfolgte der Ausschluss des Tieres aus der Untersuchung.

2.1.2 Behandlung mit Telmisartan

Die diabetischen Ratten wurden an Tag 14 zufällig der Placebogruppe oder der Telmisartangruppe zugeteilt. Ab diesem Zeitpunkt erhielten die Tiere der Telmisartangruppe 10 mg/kg pro Tag Telmisartan (Bayer Leverkusen, Deutschland) mittels einer Schlundsonde. Der Wirkstoff lag in Tablettenform vor und wurde deshalb zunächst gemörsert und in Wasser aufgelöst. Dieses Gemisch wurde sofort gewichtsadaptiert an die Versuchstiere verabreicht. Die Tiere der Placebogruppe erhielten eine äquivalente Menge an Wasser mit der Schlundsonde. Die letzte Dosis des Medikamentes erhielten die Versuchstiere 24 Stunden vor den geplanten Versuchen, um akute Effekte der Prüfsubstanz auszuschließen.

Nach zwei Wochen Telmisartangabe wurden der Blutdruck, die vasomotorische Funktion und die Thrombozytenaktivierung bei den Versuchstieren gemessen.

2.2 Blutdruckmessungen

Der systolische Blutdruck der Versuchstiere wurde nichtinvasiv durch die „Tail-cuff-Methode“ gemessen. Bei dieser Methode wird die Manschette des Blutdruckmessgerätes auf suprasystolische Werte aufgeblasen. Der Blutfluss distal der Manschette wird durch eine optische Infrarotmessung, ähnlich der Pulsoxymetrie, erfasst. Der systolische Blutdruckwert ist dann erreicht, wenn eine Messung der Pulswelle nach der Okklusion wieder möglich ist. Methodisch bedingt können keine diastolischen Werte erfasst werden. Es wurde eine beheizte Messeinheit (LE-5007, Foer Medical Instruments) verwendet. Die Wärmekammer ist notwendig, da dies eine Hyperämie in der Schwanzarterie erzeugt. Die Ratten wurden

während der Behandlungsphase trainiert und es wurden wiederholt Testläufe der Blutdruckmessung durchgeführt, um die Tiere an das Verfahren zu gewöhnen, so sollte eine stressbedingte Verfälschung der Werte verhindert werden. Die Ratten wurden in die Messkammer, eine Plexiglasröhre, gesetzt und die Blutdruckmanschette am Schwanz angebracht. Bei der Messung wurden mindestens 20 aufeinander folgende reproduzierbare systolische Blutdruckwerte erfasst. Der durchschnittliche systolische Blutdruck dieser 20 Werte wurde in die Analyse eingeschlossen.

2.3. Gefäßreaktivitätsstudien

2.3.1 Probengewinnung

Eine tiefe allgemeine Anästhesie wurde bei den Tieren durch den Gebrauch von Isofluran (Forene®, Abbot GmbH&Co. KG, Wiesbaden) induziert. Die Verabreichung des Narkosemittels erfolgte über einen Verdampfer (VAPRO 19.3 von Dräger, Lübeck) mit entsprechender Absaugvorrichtung. Die ausreichende Narkosetiefe war dann erreicht, wenn das Tier bei spontaner Atmung eine vollständige Abwesenheit von Schmerzreaktionen zeigte. Nun wurde die Abdominalhöhle des Versuchstieres eröffnet und die Blutentnahme erfolgte durch die direkte Punktion der Vena cava inferior, welche nach Durchtrennung der oberflächlichen Muskelschichten durch ein Verlagerung der Darmschlingen zur Seite freigelegt werden konnte. Zunächst erfolgte die Blutentnahme eines Citratröhrchens, welches 3,8% Natriumcitrat enthält. Des Weiteren wurde eine EDTA-Blutprobe entnommen, um ein kleines Blutbild und eine Blutzuckermessung durchzuführen. Nach der Blutentnahme für die durchflusszytometrischen Messungen wurde die Aorta thoracalis der Versuchstiere entfernt. Zunächst wurden Herz, Lunge und der Ösophagus entfernt und der gesamte Verlauf der Aorta thoracalis dargestellt. Nach der Durchtrennung des Aortenbogens wurde das Gefäß bis zum Diaphragma von der Wirbelsäule abpräpariert. Zug und Druck wurden hierbei vermieden. Die entfernte Aorta wurde sofort in 4°C kalter Krebs Henseleit-Lösung (NaCl 118,4 mM, NaHCO₃ 25 mM, CaCl₂ 1,6 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, Glukose 11,1 mM, Diclofenac 1 µM, pH 7,4) gegeben und anschließend mit dieser Lösung durchspült. Dies war notwendig, um vorhandene Blutreste aus dem Gefäß zu entfernen. Die Zugabe von Diclofenac erfolgte, um die Prostazyklin-Bildung zu inhibieren. Nun wurde die Aorta

vorsichtig unter einem Mikroskop von verbliebenem Fett- und Bindegewebe gereinigt und der thorakale Abschnitt in drei Millimeter breite Ringe geschnitten. (166,167)

2.3.2 Versuchssystem

Die Messungen wurden mit einem Organbad der Firma Föhr-Medical-Instruments (Seeheim) vorgenommen (Abb.4).



Abbildung 4: Organbad mit parallelen Einzelkammern. Abgebildet sind zudem die zentrale Pufferversorgung und die Begasung der Organkammern.

Die Organkammern wurden mit je 5 ml Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt und während der Versuchsdurchführung wurde in diese Pufferlösung (37°C, pH 7,4) Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) eingeleitet. Für die Gefäßringe befanden sich in jeder Kammer eine feste und eine bewegliche Aufhängevorrichtung, welche mit einem isometrischen Kraftaufnehmer (Scaime SAS, Annemasse, Frankreich) verbunden war. Die Gewebeprobe wurde zwischen diesen beiden Drähten fest eingespannt (Abb. 5 und 6).

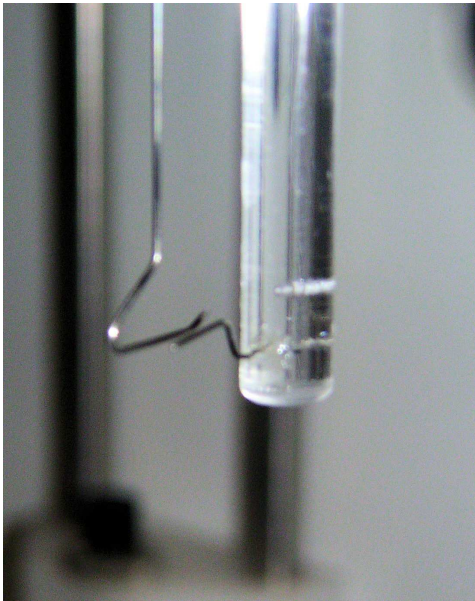


Abbildung 5: Detailansicht einer Gefäßaufhängung.

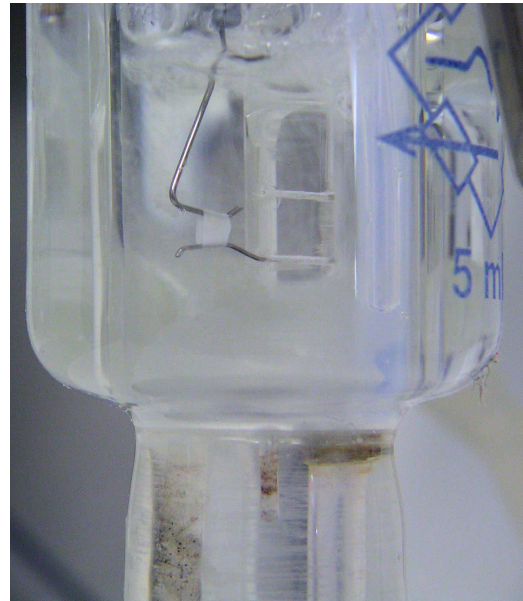


Abbildung 6: Detailansicht einer Organkammer mit aufgespanntem Aortenring.

Über den Brückenmessverstärker MIO-05xx (Föhr-Medical-Instruments, Seeheim) wurden die Tonusveränderungen der Gefäßringe wahrgenommen und dann direkt an einen PC übermittelt und mithilfe der Vitrodat-Software (Föhr-Medical-Instruments, Seeheim) digital aufgezeichnet.

2.3.3 Versuchsdurchführung

Zunächst erfolgte die Aufhängung der Aortenringe in den Organkammern. Auf die Erhaltung der Endothelschicht wurde dabei besonders geachtet. Anschließend wurde eine passive Vorspannung von 2g über 30 Minuten angelegt, um den Spannungszustand zu generieren, dem die Gefäßringe in ihrer physiologischen Umgebung ausgesetzt sind. Die Aufzeichnung der Tonusveränderungen erfolgte nach dem Erreichen eines stabilen Gleichgewichtes durch die Zugabe verschiedener Substanzen. Je nach Versuchsprotokoll wurden vasokontraktile und vasorelaxierende Stoffe in die Organkammern gegeben. Ziel dieses Versuchs war die Ermittlung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven (WK) der Substanzen durch die Zugabe kumulativer Einzeldosen.

Die Gefäßringe wurden generell zunächst auf Funktion, intakte Muskelschicht und unversehrte Endothelschicht überprüft. Hierzu erfolgte die mehrfache Kontraktion der Aortenringe durch Kaliumchlorid (50 mM und 100 mM), bis reproduzierbare Kontraktionen gemessen werden konnten.

Daraufhin wurde eine maximale Kontraktion durch Phenylephrin (1 μ M) ausgelöst. Nach Testen der Endothelfunktion mit Acetylcholin (1 μ M) wurden die Gefäße ausgewaschen. Anschließend wurde die Konstriktion der verschiedenen Aortenringe mithilfe kumulativer Konzentrationen Phenylephrins auf ein vergleichbares Level gebracht. Nachdem diese Kontraktion stabil messbar war, wurde mit steigenden Konzentrationen von Acetylcholin (0,1 nM bis 10 μ M) eine ansteigende Dilatation hervorgerufen. Nach jeder Substanzgabe wurde die Einstellung eines stabilen Spannungsplateaus abgewartet, bevor die nächste Konzentration gegeben wurde. Nach Beendigung eines jeden Versuchs erfolgte zunächst das gründliche Auswaschen der zugegebenen Substanzen, so dass wieder eine stabile Ausgangslage des Gefäßtonus erreicht wurde.

Anschließend wurden die Aortenringe auf ungefähr 20% der maximalen Konstriktion vorkontrahiert. Dies erfolgte mit niedrigen, stufenweise zunehmenden Konzentrationen von Phenylephrin. Nach erneutem Erreichen eines stabilen Spannungsplateaus erfolgte die Zugabe von N^G-Nitro-L-Arginin (100 μ M), einem NO-Synthase-Inhibitor. Wie bereits erwähnt, hat Stickstoffmonoxid eine sehr kurze Halbwertszeit, weshalb unmittelbare Nachweisverfahren sehr kompliziert sind. Aus diesem Grund ist es einfacher, indirekte Nachweisverfahren zu nutzen. Unter anderem kann, wie in dieser vorliegenden Arbeit, die gesteigerte NO-Synthese nach isometrischer Gefäßdehnung im Organbad genutzt werden. *In vitro* wird dieser Synthesanstieg durch die gleiche Signalkaskade verursacht, welche *in vivo* durch Schubspannung, also unter intraluminalen Fluss, verursacht wird. Die zusätzliche Kontraktion durch die Zugabe des NO-Synthase-Inhibitors, welcher das durch die vorhergehende Kontraktion freigesetzte NO neutralisiert, kann als ein Marker der physiologischen, dehnungsinduzierten, Ca²⁺-unabhängigen NO-Bildung angesehen werden (122,168).

Nach 45 Minuten N^G-Nitro-L-Arginin (L-NNA) wurde wiederum mit PE (1 μ M) eine maximale Konzentration ausgelöst und nun die relaxierende Antwort auf den endothelunabhängigen Vasodilatator 2-(N,N-Diethylamino)-diazennolat-2-oxid

(DEANONOate, Alexis Biochemicals, San Diego, CA) in Anwesenheit von N^G-Nitro-L-Arginin gemessen. Die Konzentration dieser Substanz wurde in den Organkammern beginnend mit 0,1 nM bis auf 10 µM gesteigert. Dieser NO-Donor verfügt über eine [N(o)NO]-Gruppe und gehört zur Gruppe der Diazeniumdiolate. Viele dieser Stoffe zerfallen spontan in wässrigen Medien und setzen hierbei NO frei (169). Die nun registrierte Relaxation gibt Auskunft über die Sensitivität der glatten Gefäßmuskulatur gegenüber NO.

2.4 Messung der Superoxidationenbildung

Die diaphragmanahen Aortenabschnitte (Breite 5 Millimeter) wurden für die Messung der Superoxidproduktion verwendet. Zum einen erfolgte der Nachweis der vaskulären Superoxidbildung durch Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz (170-172). Lucigenin wird durch den Kontakt mit Superoxidationen zu einem Zwischenprodukt umgewandelt, welches beim Zerfall Lichtquanten freisetzt. Diese Lichtemissionen wurden in einem Luminometer (Wallac, Freiburg, Deutschland) gemessen (173). Diese Lumineszenzmessung erfolgte während der Inkubation der Geweberinge mit Lucigenin (5 µM) in einem HEPES-modifizierten Krebspuffer (pH 7,40). Das spezifische Chemolumineszenzsignal ist als Zählrate pro Minute (counts per minute) pro Milligramm Trockengewicht des Gefäßringes (cpm/mg) angegeben worden (167).

Der oxidierende fluoreszierende Farbstoff Hydroethidium wurde für die Bewertung der *in situ* Produktion von Superoxidationen verwendet. Der Farbstoff kann die Zellmembran passieren und wird im Zytoplasma, wenn Sauerstoffanionen vorhanden sind, zu Ethidiumbromid oxidiert. Dieser Stoff lagert sich nun durch Interkalation an der DNA an (174-176). Für dieses Experiment wurden die Aortenringe unfixiert in Tissue Tek Compound eingebettet, um sie in Form zu halten. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels Kryotom wurden 10 µm Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger gegeben. Der Farbstoff Hydroethidin (2 µM) konnte nun dem Gewebe topisch appliziert werden. Anschließend erfolgte der Schutz jeder Probe mit einem Deckglas. Die Platten wurden nun in einer lichtgeschützten, befeuchteten Kammer bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Bilder der Versuchsreihe wurden mit einem Bio-Rad MRC 1024 konfokalen Laserscan-Mikroskop

angefertigt, welches mit einem Krypton/Argon Laser ausgestattet ist. Die Fluoreszenzbestimmung erfolgte mit einem 585-nm-long-pass-Filter. Die Aortenringe von diabetischen Tieren und Kontrollgewebe wurden parallel verarbeitet und fotografiert. Die Lasereinstellung war identisch bei der Bilderstellung von diabetischen Ratten und Kontrolltieren. (167,171)

Die quantitative Analyse der Hydroxyethidium-Fluoreszenz wurde mit der Software NIH ImageJ durchgeführt.

2.5 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können zahlreiche Eigenschaften von Zellen oder Zelltypen bestimmt werden. Das Verfahren findet Anwendung in der Routinediagnostik und der Forschung. Die erhobenen Daten sind qualitativer und quantitativer Natur. Unter anderem können prinzipiell Proben aus Vollblut, Knochenmark, Liquor oder Urin untersucht werden. Einige bestimmbare Werte sind Zellgröße, zytoplasmatische Komplexität, DNA, RNA und eine große Anzahl an membrangebundenen und intrazellulären Proteinen. Vor allem die Entwicklung von mit Fluorochromen markierten monoklonalen Antikörpern macht diese vielfältigen Anwendungen der Durchflusszytometrie möglich. Im Inneren eines Durchflusszytometers passieren die Zellen einzeln eine monochromatische Lichtquelle, im Normalfall einen Laser. So werden für diese Zellen oder Fluorochrome charakteristische optische Signale erzeugt und durch Detektoren registriert (Abb.7) (177,178).

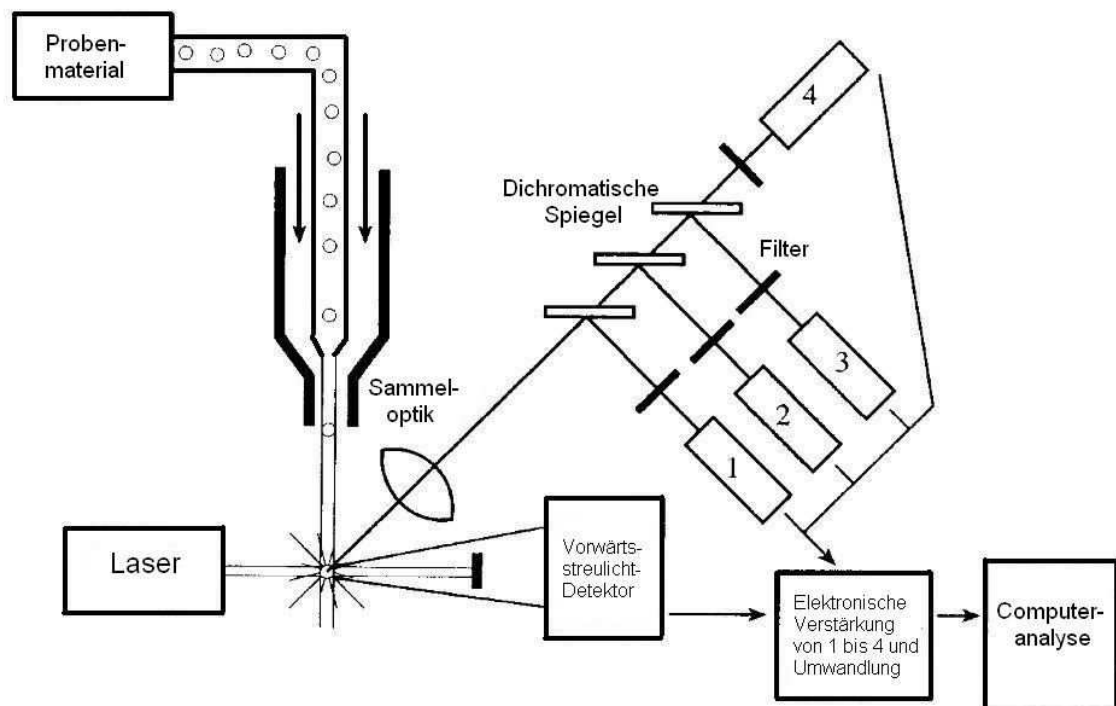


Abbildung 7: Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie. Das Probenmaterial wird an einem Laser vorbeigeleitet. Die optischen Signale werden durch einen Vorwärtsstreulichtdetektor, einen Seitwärtsstreulichtdetektor (1) und multiple Fluoreszenzemissionsdetektoren (2-4) gesammelt. Die Signale werden verstärkt und in digitale Form umgewandelt für die Analyse und die Anzeige auf einem Computerbildschirm. (Modifiziert nach Brown, Clinical Chemistry, 2000)

Für diese Arbeit ist der Nachweis von thrombozytären Membranglykoproteinen und deren intrazellulären Effektorproteinen wichtig. Es wurde ausschließlich mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-konjugierten Antikörpern gearbeitet. Die Bestimmung der Thrombozytenpopulation erfolgte durch die spezifischen optischen Phänomene, welche bei einem Laserstrahl mit der Wellenlänge von 488 nm entstehen. Die Zellgröße wird anhand des Vorwärtsstreulichtes („forward scatter“, FSC, Lichtbeugung) bestimmt. Das Seitwärtsstreulicht („side scatter“, SSC, Lichtbrechung und Reflexion) dagegen ist abhängig von der Komplexität der Zelle beziehungsweise ihrer Granularität. Bei der durchflusszytometrischen Messung kann mit Hilfe von FITC-markierten Antikörpern zusätzlich noch die Intensität der Fluoreszenz gemessen werden. In einem Messdurchgang können so drei Messwerte gleichzeitig bestimmt werden.

Die registrierten Lichtphänomene werden digitalisiert und anhand von Diagrammen dargestellt. Die „forward scatter“ und „side scatter“ werden gegeneinander aufgetragen. Ein Thrombozyt wird also durch einen Punkt im Diagramm dargestellt und aufgrund seines charakteristischen Vorwärts- und Seitwärts-Streuverhaltens identifiziert (159). Die Fluoreszenzintensität wird in einem Histogramm auf der Abszisse logarithmisch dargestellt, wobei die Ordinate die Anzahl der FITC-markierten Zellen wiedergibt.

Die durchflußzytometrischen Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einem FACSCalibur (Becton-Dickinson) bei niedriger Flussrate angefertigt. Es wurden zuvor „Thrombozyten-Gates“ festgelegt und bei jeder Zählung wurden 20.000 Thrombozyten gezählt (Abb.8).

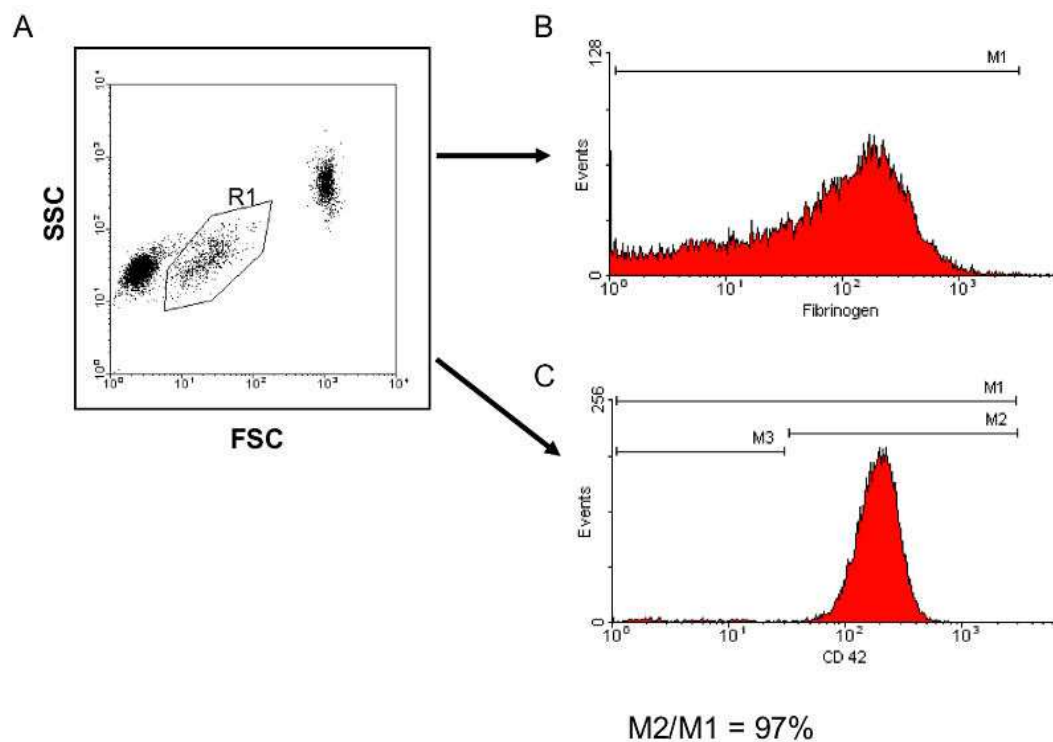


Abbildung 8: Identifikation der Thrombozyten basierend auf ihrem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (A). Anschließend Messungen (Histogramme) wurden ausschließlich in dem begrenzten Bereich R1 durchgeführt. Die mittlere Fluoreszenzintensität der spezifischen Antikörper wurde berechnet und graphisch dargestellt (B). Um zu verifizieren, dass R1 in hoher Reinheit Thrombozyten enthält, wurden separate Proben mit einem Antikörper gegen das thrombozytenspezifische Antigen CD42 markiert (C). Der Prozentwert der CD42positiven Zellen wurde berechnet durch die Division von M2 durch M1. (Modifiziert nach Schafer, J Physiol Pharmacol., 2010)

2.5.1. Probengewinnung

Die Blutentnahme erfolgte, wie bereits oben erwähnt, durch die direkte Punktion der Vena cava inferior. Die Blutentnahmeröhrchen von Sarstedt enthielten 3,8% Natriumcitrat.

2.5.2 Probenaufbereitung und Messung

Die entnommenen Citrat-Blutproben wurden mit PBS (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -frei, angereichert mit D-Glucose [5,5 mmol/L] und 0,5%BSA) verdünnt. Dieses verdünnte Vollblut wurde mit FITC-markierten-Antikörpern angefärbt, um thrombozytengebundenes Fibrinogen und die *in vivo* Phosphorylierung des durch Vasodilatoren stimulierten Phosphoproteins (VASP) in Thrombozyten zu detektieren (Abb.9) (96,166).

Um das thrombozytengebundene Fibrinogen zu messen, wurde die Probe mit einem FITC-markierten Anti-Fibrinogen-Antikörper (WAK-Chemie, Bad Soden, Deutschland) bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der Thrombozyten durch Methanol-freies Formaldehyd (1,5%) für 10 min bei Raumtemperatur. Die Messung erfolgte an einem Becton-Dickinson FACSCalibur bei niedriger Flussrate. Der Fibrinogenleerwert, also die unspezifische Bindung des Antikörpers, wurde willkürlich auf eine mittlere Fluoreszenz von 10 eingestellt. Die gemessene Fluoreszenz des Leerwertes wurde dann bei der graphischen Darstellung von den Ergebnissen der Telmisartan- und Placeboproben optisch subtrahiert. Die Thrombozytenpopulation wurde anhand ihres charakteristischen Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes identifiziert. In separaten Messungen mit einem thrombozytenspezifischen Antikörper (CD42d) wurde die Reinheit (>95% CD42 positiv) der so definierten Population verifiziert. Bei der Messung sind jeweils 20.000 Blutplättchen mit der CELLQuest software, Version 3.1f, ausgewertet worden.

Die basale VASP-Phosphorylierung ist assoziiert mit der Wirkung endothelialer endogener Thrombozyteninhibitoren wie NO. Das VASP ist ein essentieller Regulator der Hemmung von Thrombozytenaktivierung und der Bindung von Fibrinogen an GP

IIB/IIIa. (87,101) Das VASP ist intrazellulär lokalisiert und erfordert daher eine andere Vorgehensweise zur FITC-Markierung. Das Citratblut wird im ersten Arbeitsgang mit Methanol-freiem Formaldehyd (1,5%) 5 Minuten lang fixiert. Als nächstes wird die Probe mit PBS verdünnt und mit Triton X100 (2%Finalkonzentration) über 10 Minuten permeabilisiert. Nach einer weiteren Verdünnung mit PBS wird die Probe in 2 Teile geteilt. Nun erfolgt die Inkubation mit dem FITC-markierten Antikörper gegen phosphoryliertes VASP Serin¹⁵⁷ (5C6 Antikörper [500µg/mL] nanoTools Antikörpertechnik GmbH & Co. KG, Teningen, Deutschland) bei Raumtemperatur für 45 Minuten.

Weiterhin erfolgte noch die Aufbereitung einer speziellen Kontrollprobe. Der FITC-gekoppelte Antikörper wurde hierzu vor dem eigentlichen Färbvorgang mit einem spezifisch blockierenden Phospho-Peptid mindestens 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Eine ausreichend hohe Dosis des Phospho-Peptids ist wichtig zur Absättigung der Antikörper. Diese Kontrollen zeigen die unspezifische Bindung des Antikörpers an und man ordnet dieser Fluoreszenz bei der durchflusszytometrischen Messung willkürlich den Wert 10 zu. So kann die unspezifische Antikörperbindung bei den verschiedenen Versuchsgruppen berücksichtigt werden. Bei der Messung wurden ebenfalls jeweils 20.000 Thrombozyten mit der CELLQuest software, Version 3.1f, ausgewertet.

Thrombozytenfärbungen für die Durchflusszytometrie

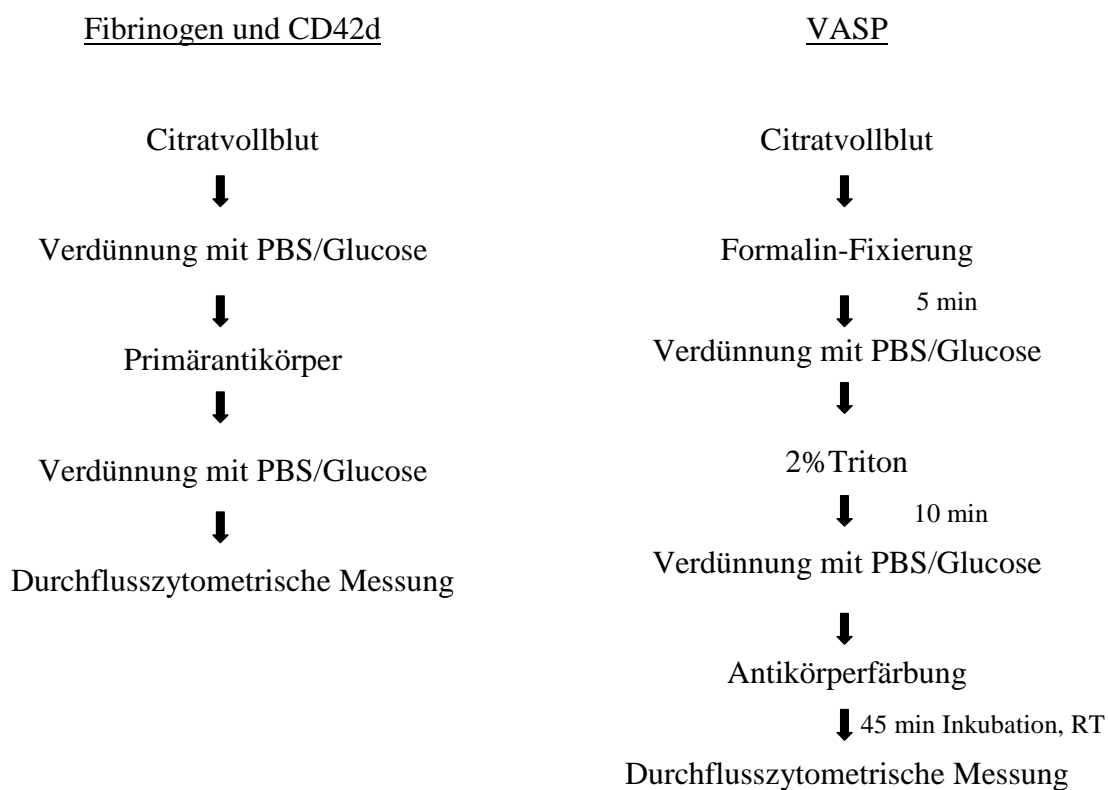


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Thrombozytenfärbungen für die durchflusszytometrischen Messungen.

2.6 Deskriptive Parameter der Versuchstiere

2.6.1 Metabolische Messwerte

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde beim narkotisierten Tier vor der Organentnahme bestimmt. Die Blutzuckerbestimmung erfolgte zweimal, bei der ersten Messung nach 2 Wochen direkt aus der Schwanzvene und bei der zweiten Messung nach 4 Wochen aus entnommenem EDTA Blut.

2.6.2 Hämatologische Messwerte

Die laborchemische Bestimmung eines kleinen Blutbildes erfolgte aus dem EDTA-Röhrchen. Die Messung erfolgte durch den automatischen veterinärtauglichen Durchflusszytometer (Sysmex XT 2000iV, *Sysmex*, Norderstedt, Deutschland). In der Auswertung wurden die Leukozyten- und die Thrombozytenzahl erfasst.

2.7 Substanzen und Geräte

2.7.1 Substanzen

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in der höchstmöglichen Reinheit von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

Telmisartan (zur Verfügung gestellt von der Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)

Isofluran (Forene®, Abbot GmbH&Co. KG, Wiesbaden)

2-(N,N-Diethylamino)-diazenolat-2-oxid (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland)

Tissue Tek Compound Einbettmedium (Weckert Labortechnik, Kitzingen, Deutschland)

FITC-markierten Anti-Fibrinogen-Antikörper (WAK-Chemie, Bad Soden, Deutschland)

FITC-markierter monoklonaler CD42d-Antikörper (BD Biosciences, San Jose, USA)

FITC-markierten Antikörper gegen phosphoryliertes VASP Serin¹⁵⁷ (5C6 Antikörper [500µg/mL] nanoTools Antikörpertechnik GmbH & Co. KG, Teningen, Deutschland)

Blockierendes Peptid phospho-VASP Serin¹⁵⁷ (5C6 Antikörper, nanoTools Antikörpertechnik GmbH & Co. KG, Teningen, Deutschland)

2.7.2 Geräte und Software

One-Touch Blutzuckermessgerät (ASCENSIA Elite, Bayer-Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland)

FACSCalibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA), inklusive CELLQuest software, version 3.1f

Verdampfer VAPRO 19.3 (Dräger, Lübeck, Deutschland)

Organbad (Föhr-Medical-Instruments, Seeheim, Deutschland)

Isometrischen Kraftaufnehmer (Scaime SAS, Annemasse, Frankreich)
DC-Brückenmessverstärker MIO-05xx (Föhr-Medical-Instruments, Seeheim, Deutschland)
VitrodatWin-Software (Föhr-Medical-Instruments, Seeheim, Deutschland)
Luminometer (Wallac, Freiburg, Deutschland)
MRC 1024 konfokales Laserscan Mikroskop, Krypton/Argon Laser, 585-nm-long-pass-Filter
(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Nager-Blutdruckmessgerät LE-5007 (Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland)
Sysmex XT 2000, Vollblutanalysator (Sysmex, Norderstedt, Deutschland)

2.8. Statistik

Alle Daten, falls nicht anders angegeben, sind Mittelwerte +/- Standardfehler. Als „n“ wird die unterschiedliche Anzahl von Experimenten bzw. die Anzahl unterschiedlicher Gefäßringe in den Gefäßreaktivitätsstudien bezeichnet. Die Gefäßspannung wurde in Gramm erfasst und die Relaxierung wurde als prozentuale Spannungsveränderung zur Vorkontraktion angegeben. Die statistischen Auswertungen der Wirkungskurven erfolgten mittels „repeated measure ANOVA“, gefolgt von einem Tukey-Kramer multiple-comparisons-Test. Die Superoxidbildung wurde durch ANOVA analysiert, gefolgt von einem Tukey-post-hoc-Test, falls geeignet. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Blutdruck

Der systolische Blutdruck der Versuchstiere wurde gemessen. Die Durchschnittswerte dieser Werte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

	Kontrolle	STZ Placebo	STZ Telmisartan
Systolischer Blutdruck [mmHg]	126 ± 3	135 ± 6	109 ± 2 ##

P < 0,01 vs STZ Placebo

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der systolischen Blutdruckwerte der Versuchstiere. n= 10 bis 16 .

Der systolische Blutdruckwert wurde durch die Telmisartanbehandlung signifikant gegenüber den placebobehandelten Tieren gesenkt, was auf eine ausreichende Wirksamkeit des Medikamentes *in vivo* schließen lässt.

3.2 Dehnungsinduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid

Wie bereits dargestellt, ist der direkte Nachweis von NO sehr schwierig. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit die Verknüpfung von NO-Synthese und physikalischen Einflüssen auf die Gefäßwand genutzt. Physiologisch wird eine Steigerung der NO-Produktion durch Schubspannung induziert. *In vitro* wird dieser Synthesanstieg durch isometrische Kontraktionen von Aortenringen im Organbad verursacht, die eine identische Signalkaskade aktivieren. Durch die Zugabe eines NO-Synthase-Inhibitors wird dieser Signalweg unterbrochen. Die zusätzliche Konstriktion aufgrund des NO-Synthase-Inhibitors, welcher das durch die vorhergehende isometrische Kontraktion freigesetzte NO neutralisiert, kann als ein Marker der physiologischen, dehnungsinduzierten, Ca²⁺-unabhängigen NO-Bildung angesehen werden.

Die Gefäßringe wurden hierzu im Organbad mittels Phenylephrin auf ähnliche Kontraktionsstufen von ungefähr 20% der Maximalkontraktion vorgespannt, um eine gesteigerte isometrische Dehnung zu simulieren. Durch die Hemmung der NOS wurde

anschließend eine Vasokonstriktion ausgelöst. Die verstärkte Konstriktion ist ein Maßstab für die NO-Freisetzung, die durch die Vorkonstriktion mit Phenylephrin, also die gesteigerte isometrische Dehnung, verursacht wird.

Die Tiere der diabetischen STZ-Placebogruppe zeigten eine signifikant verminderte Kontraktion bei der Verwendung von N^G-Nitro-L-Arginin. Dieser Unterschied zur Kontrollgruppe ist durch die verminderte NO-Bioverfügbarkeit in diabetischen Tieren zu erklären. Durch die Telmisartanbehandlung war die resultierende Kontraktion wieder mit der Kontrollgruppe vergleichbar (Abb. 10). Die Bereitstellung von NO konnte durch die Behandlung also normalisiert werden.

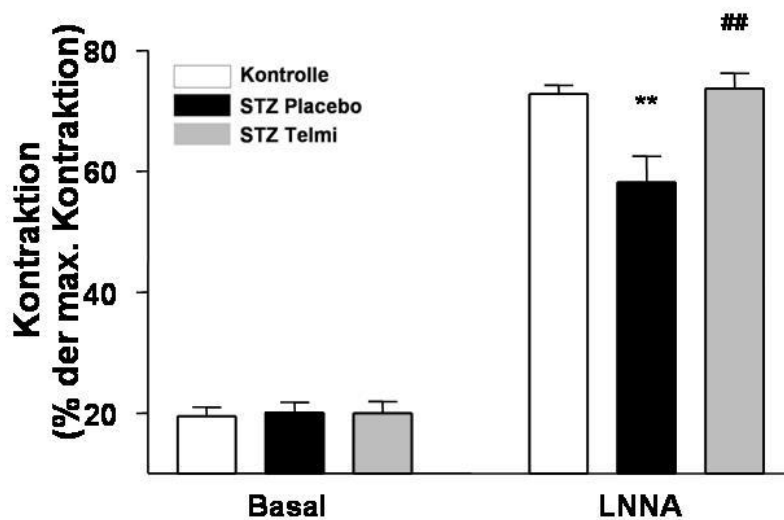


Abbildung 10: Spannungsvermittelte NO-Bioverfügbarkeit in vorkontrahierten Aortenringen (ca. 20% der maximalen Konstriktion). Die Messung erfolgt indirekt, über eine zusätzliche Vasokonstriktion aufgrund des hinzugegebenen NOS-Inhibitors L-NNA (100 μ M). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 10 bis 16. ** P<0,01 vs. Kontrolle; ## P<0,01 vs. STZ Placebo.

3.3 Vasomotorische Funktion

3.3.1 Endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholin

Mittels der Gabe von Acetylcholin in steigenden Konzentrationen wurde die NO-Produktion durch die Calcium-abhängige Aktivierung der endothelialen NO-Synthase und die Reaktion der Aorten auf Stickstoffmonoxid bestimmt. Acetylcholin induziert eine endothelabhängige Gefäßrelaxation. Die Gefäßringe wurden hierzu im Organbad mittels Phenylephrin auf ähnliche Kontraktionsstufen vorgespannt. Daraufhin wurde Acetylcholin in steigenden Konzentrationen hinzugefügt.

Die ermittelten Messwerte wurden in einer Konzentrations-Wirkungskurve graphisch dargestellt. Die endotheliale Dysfunktion bei den diabetischen Placebotieren zeigte sich durch die verspätete und unvollständige Relaxation gegenüber den Kontrolltieren bei steigenden Acetylcholinkonzentrationen. Durch die Telmisartanbehandlung glich sich die endotheliale Funktion beinahe vollständig der von Kontrolltieren an. Die NO-Produktion wurde durch Telmisartan also signifikant verbessert (Abb. 11).

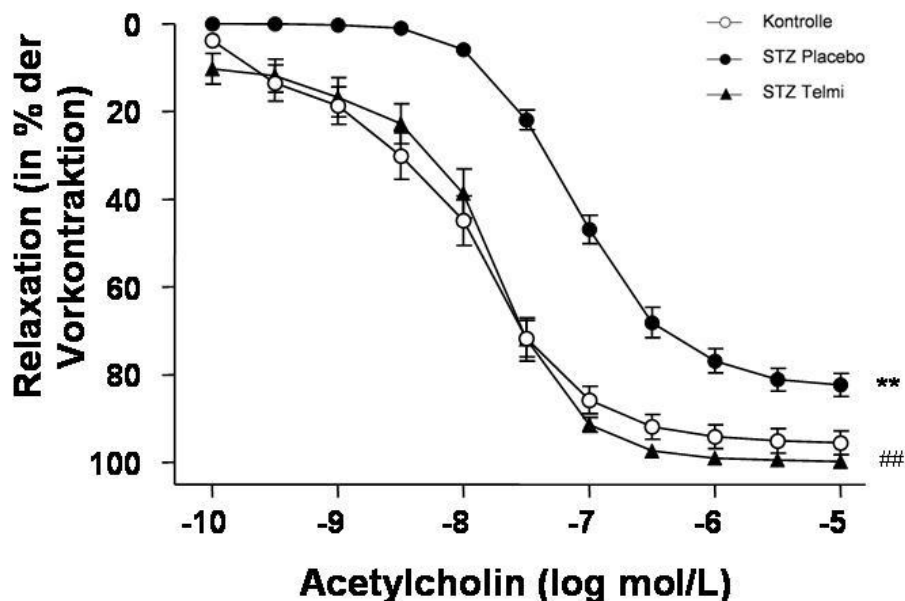


Abbildung 11: Konzentration-Wirkungs-Kurven der endothelabhängigen, NO-vermittelten Relaxation ausgelöst durch Acetylcholin bei Kontroll-, STZ-Placebo- und STZ Telmisartantieren. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 10 bis 16 verschiedene Tiere. ** P<0,01 vs. Kontrolle; ## P<0,01 vs. STZ Placebo.

Des Weiteren wurde die halbmaximale Effektivkonzentration für Acetylcholin bestimmt. Die Konzentration, welche 50% der maximalen Relaxation verursacht, wird als EC_{50} bezeichnet. Dieser Wert war bei der STZ-Placebogruppe signifikant gesteigert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die Telmisartanbehandlung hingegen konnte die EC_{50} signifikant gegenüber den Placebotieren reduziert werden. Dies verdeutlicht nochmals die Verbesserung der endothelialen Funktion durch Telmisartan (Abb. 12).

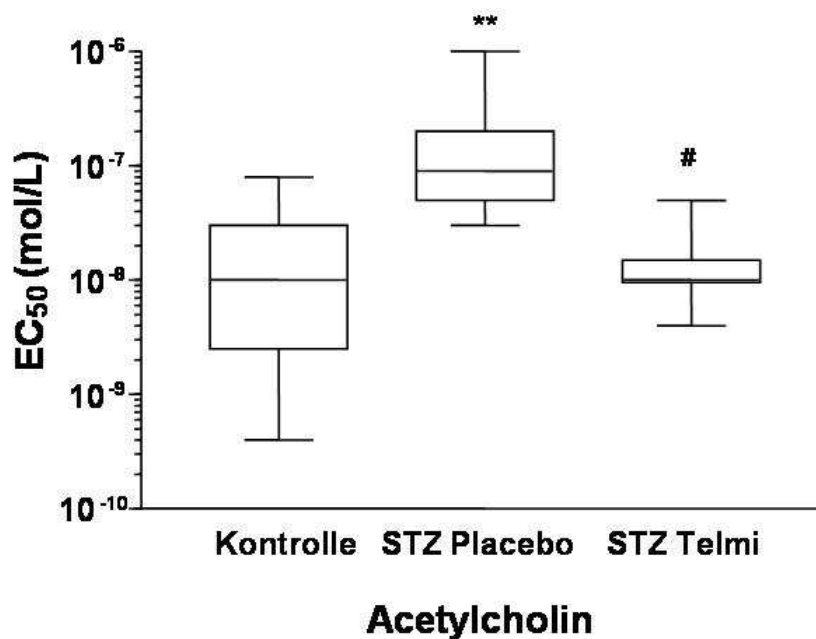


Abbildung 12: Graphische Darstellung der EC_{50} . ** $P < 0,01$ vs. Kontrolle; # $P < 0,05$ vs. STZ Placebo.

3.3.2 Endothelunabhängige Relaxation durch 2-(N,N-Diethylamino)-Diazemat-2-oxid

Für die Ermittlung der endothelunabhängigen Gefäßrelaxation wurde der NO-Donor DEA-NONOate eingesetzt. Die Gefäßringe wurden hierzu ebenfalls im Organbad mittels Phenylephrin, in Anwesenheit des NO-Synthase-Inhibitors N^G -Nitro-L-Arginin, auf ähnliche Kontraktionsstufen vorkontrahiert. Anschließend wurde DEA-NONOate in steigenden Konzentrationen hinzugefügt. Die ermittelten Messwerte wurden in einer Konzentrations-Wirkungskurve graphisch dargestellt. Die zunehmende NO-Inaktivierung in der Gefäßwand sowie die verminderte Empfindlichkeit der glatten Muskulatur in Bezug auf NO zeigte sich

durch eine deutliche Rechtsverschiebung der STZ-Placebokurve im Vergleich zur Kurve der Kontrolltiere. Die Relaxierung der Aortenringe trat verspätet ein. Letztlich erreicht die Placebokurve die komplette Relaxierung, obwohl eine diabetische Stoffwechsellage vorlag, wenn die Konzentration exogen zugeführten NOs hoch genug war (Abb. 13).

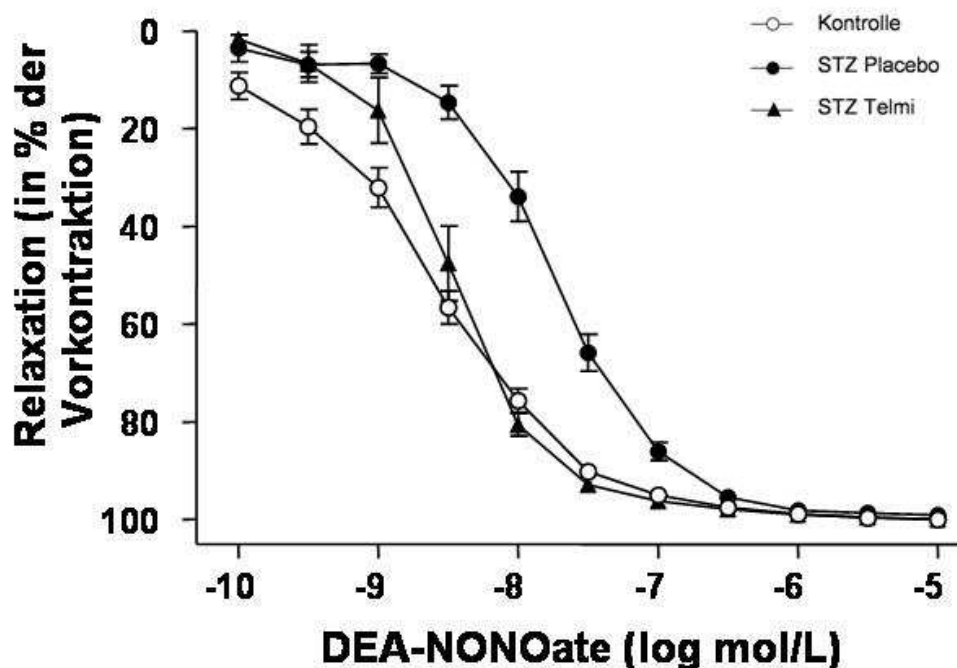


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der endothelunabhängigen Relaxation ausgelöst durch den NO-Donor DEA NONOate bei Kontroll-, STZ-Placebo- und STZ Telmisartantieren. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 10 bis 16 verschiedene Tiere.

Zudem wurde auch für DEA-NONOate die halbmaximale Effektivkonzentration bestimmt. Dieser Wert war bei der STZ-Placebogruppe signifikant gesteigert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das bedeutet, es waren höhere Konzentrationen des Agonisten notwendig, um den beabsichtigten Effekt auszulösen. Durch die Telmisartanbehandlung hingegen konnte die EC₅₀ signifikant reduziert werden gegenüber den Placebotieren. Dies verdeutlicht nochmals die verzögerte Wirkung von NO in der STZ-Placebogruppe und die Auswirkung einer Telmisartantherapie auf die endothelunabhängige Gefäßrelaxation (Abb. 14).

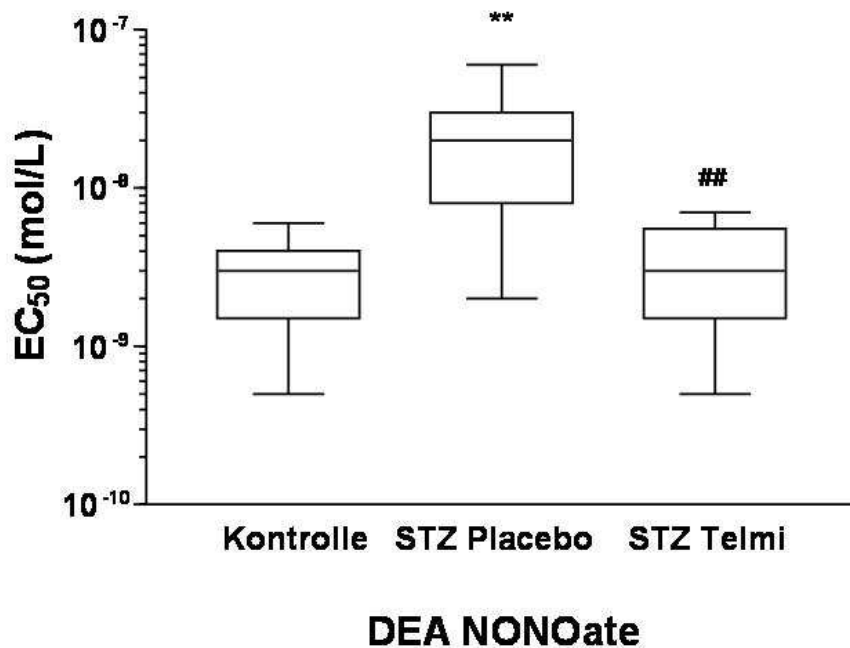


Abbildung 14: Graphische Darstellung der EC₅₀. ** P<0,01 vs. Kontrolle; ## P<0,01 vs. STZ Placebo.

3.4 Vaskuläre Sauerstoffradikale

Reaktive Sauerstoffradikale sind bei Diabetes mellitus einer der Hauptgründe für die verminderte NO-Sensitivität infolge einer gesteigerten Inaktivierung von NO. In dieser Hinsicht sind die Auswirkungen einer Telmisartanbehandlung auf diese reaktiven Sauerstoffspezies von Interesse.

3.4.1 Lucigenin

Die aortale Superoxidproduktion wurde durch lucigeningesteigerte Chemilumineszenz gemessen. Es wurden Kontroll-, Placebo- und Telmisartantiere untersucht. In den Aorten der diabetischen Placebotiere ergab sich eine signifikant gesteigerte Lumineszenz gegenüber den nicht-diabetischen Kontrolltieren. Durch die Telmisartanbehandlung normalisierte sich die Lumineszenz, also die Superoxidproduktion. Die Reduktion durch Telmisartan war signifikant im Vergleich zu der Placebogruppe (Abb. 15).

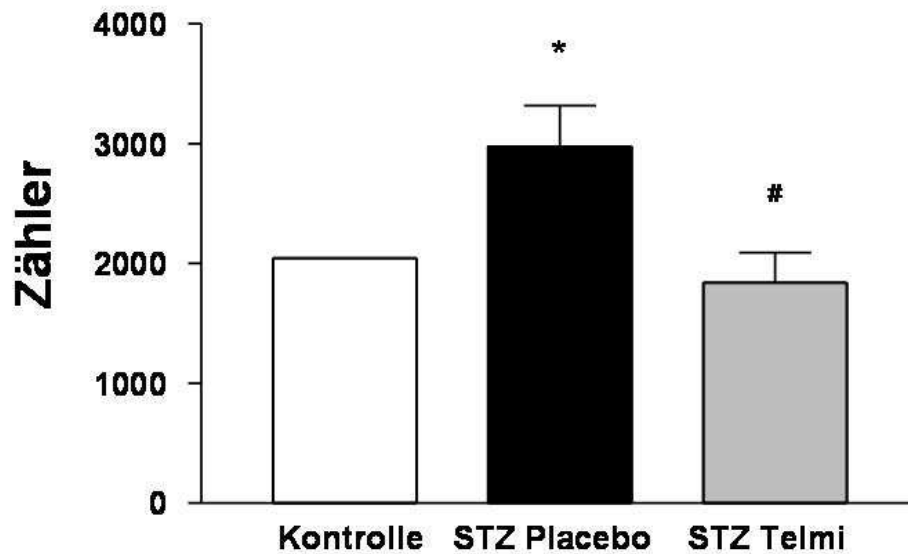


Abbildung 15: Superoxidproduktion in Aortenringen, gemessen durch lucigeninverstärkte Chemolumineszenz. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 6 bis 10 verschiedene Tiere. * P<0,05 vs. Kontrolle, # P<0,05 vs. STZ Placebo.

3.4.2 Hydroethidium

Der Fluoreszenzfarbstoff Hydroethidium (HE) wurde für die Messung der *in situ* Produktion von Superoxid verwendet. Repräsentative mikrotopographische Bilder der Superoxidbildung in Gefäßringen zeigen eine gesteigerte Signalintensität bei diabetischen Placeboratten im visuellen Vergleich zur Hydroethidiumfluoreszenz bei Kontrolltieren. Durch die Behandlung mit Telmisartan reduzierte sich diese Fluoreszenz und damit auch die *in situ* Produktion von Superoxid deutlich gegenüber den Placebotieren (Abb.16).

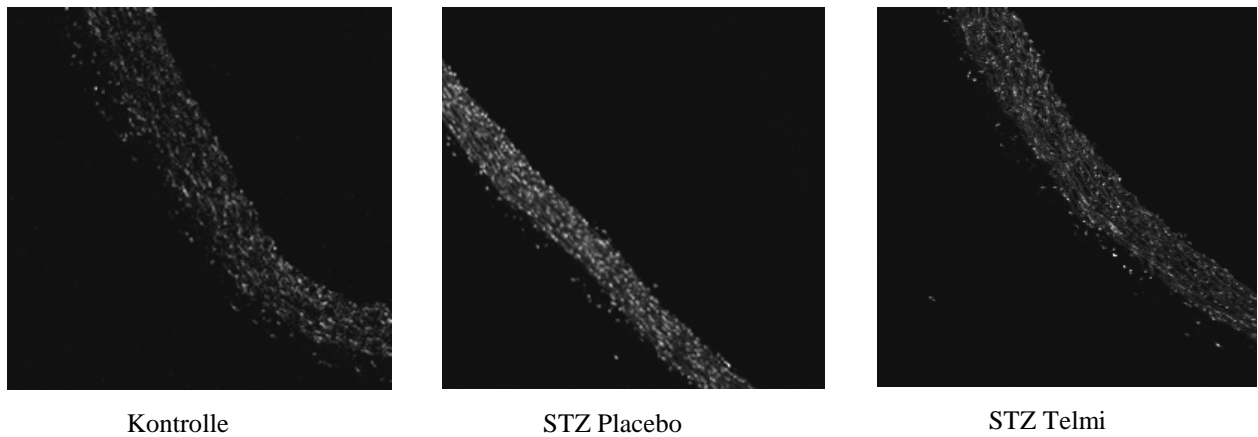


Abbildung 16: Repräsentative mikrotopographische Bilder von 10 µm dicken Aortenringen. Die Superoxidbildung wurde visuell durch die Inkubation mit dem fluoreszierenden Hydroethidium dargestellt.

Bei der quantitativen Analyse der Hydroxyethidiumfluoreszenz wurden diese visuellen Ergebnisse bestätigt. Die Fluoreszenzintensität bei diabetischen Placebotieren war signifikant gegenüber den Kontrolltieren gesteigert. Weiterhin ergab sich für die Telmisartantiere eine signifikante Verminderung der Fluoreszenz und damit des oxidativen Stresses gegenüber den Placebotieren (Abb. 17).

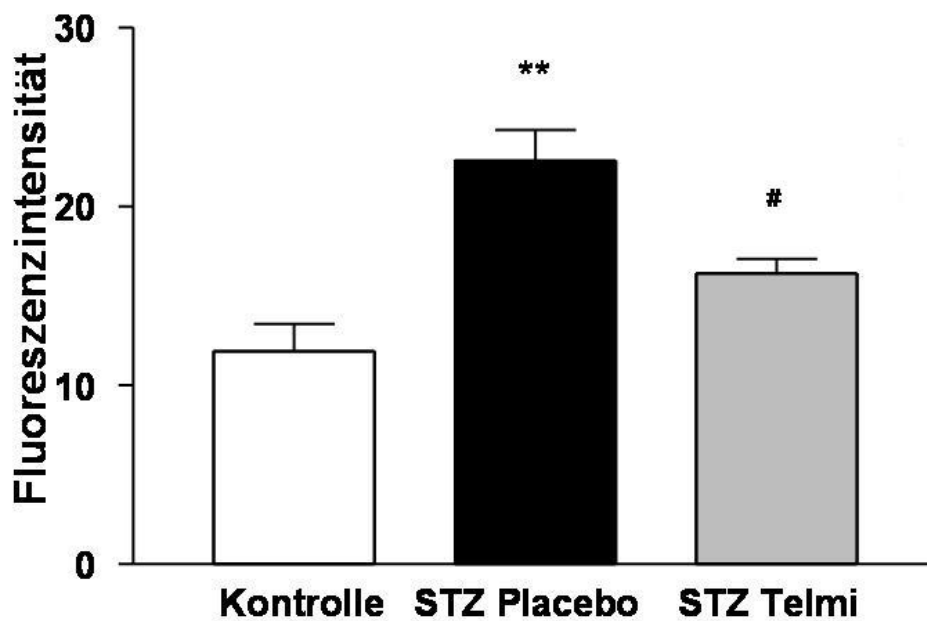


Abbildung 17: Superoxidproduktion in Aortenringen, gemessen durch Hydroxyethidiumfluoreszenz. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 6 bis 10 verschiedene Tiere. ** P<0,01 vs. Kontrolle, # P<0,05 vs. STZ Placebo.

3.5 Thrombozytenaktivierung

3.5.1 Durchflusszytometrische Aktivitätsmessung des NO/cGMP-Signalwegs

Um die Aktivität des NO/cGMP-Signalwegs in Thrombozyten zu ermitteln, wurde die basale Phosphorylierung des VASP im Vollblut gemessen. Die Aktivität dieses intrazellulären Proteins steht, wie bereits erwähnt, in direktem Zusammenhang mit dem thrombozytären NO/cGMP-Signalweg. Die basale VASP-Phosphorylierung an Serin 157 war signifikant bei placebogefütterten diabetischen Ratten gegenüber der Kontrollgruppe abgeschwächt. Die VASP-Messungen zeigten bei der Telmisartangruppe mit der Kontrollgruppe vergleichbare Werte, die Funktion des NO/cGMP-vermittelten Signals wurde also verbessert (Abb. 18).

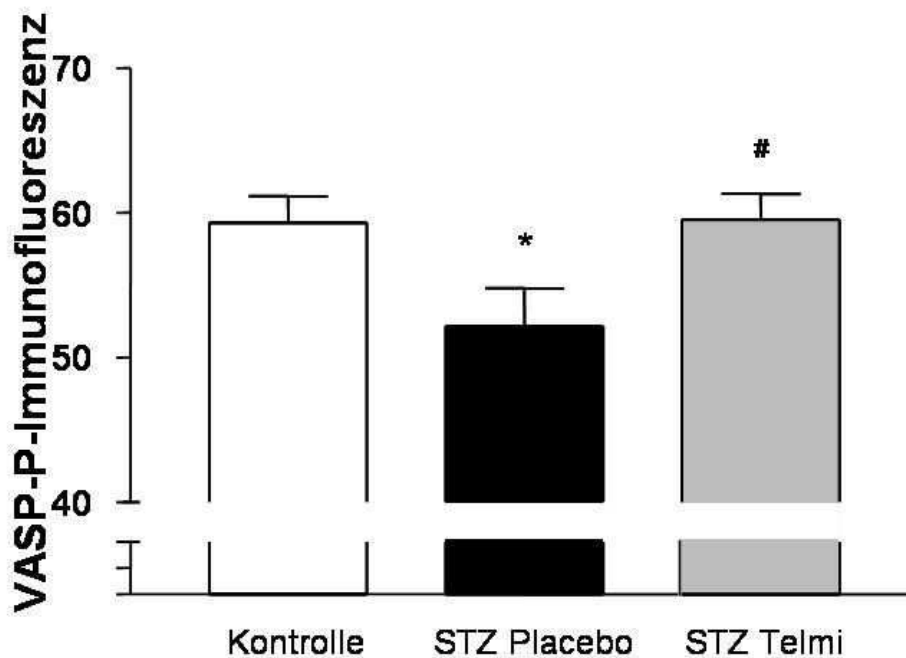


Abbildung 18: Messung der Phosphorylierung des VASP im Vollblut unter Verwendung eines FITC-markierter Antikörpers. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der NO-Bioverfügbarkeit *in vivo*. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 10 bis 16 verschiedene Tiere. * P<0,05 vs. Kontrolle; # P<0,05 vs. STZ Placebo.

3.5.2 Aktivierung des Glykoprotein IIb/IIIa

Die Thrombozytenaktivierung wurde anhand von an ihrer Oberfläche gebundenem Fibrinogen gemessen. Für die Durchflusszytometrie wurde ein FITC-markierter Anti-Fibrinogen-Antikörper verwendet, dessen Signalstärke im thrombozytenspezifischen Gate untersucht wurde. Auf diese Weise wurde spezifisch das thrombozytengebundene Fibrinogen gemessen. Das Ausmaß der *in vivo* Plättchenbindung von Fibrinogen steht für den Aktivierungszustand des Glycoprotein IIb/IIIa.

Das thrombozytengebundene Fibrinogen war in der Gruppe der placebobehandelten diabetischen Tiere gegenüber den Kontrolltieren signifikant gesteigert. Durch die chronische Behandlung mit Telmisartan glich sich die Fibrinogenfluoreszenz jedoch der Kontrollgruppe an, so dass von einer signifikanten Reduktion der Aktivierung des Glycoprotein IIb/IIIa ausgegangen werden kann (Abb. 18).

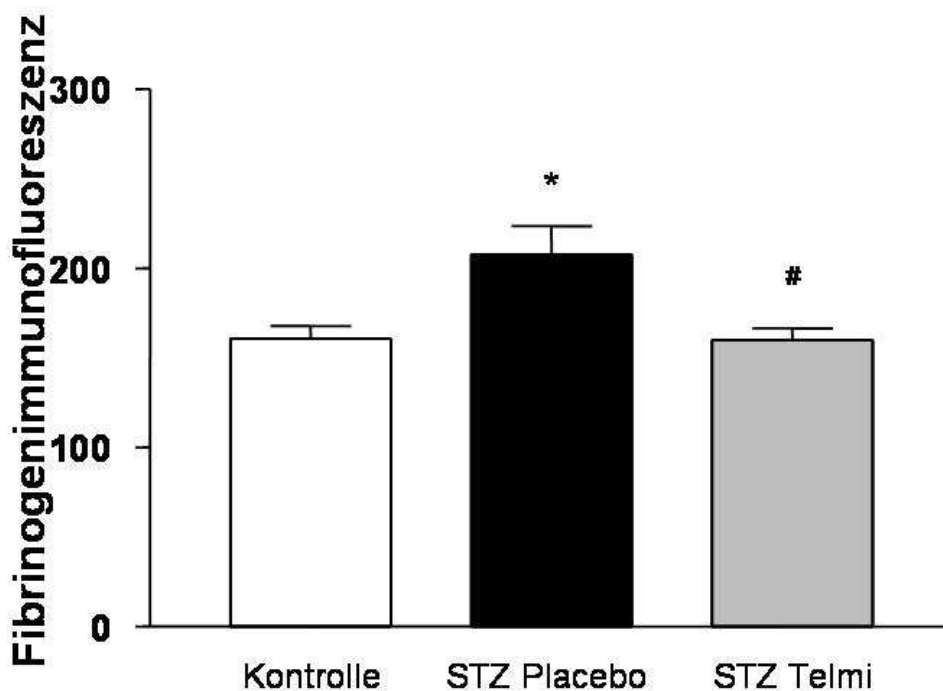


Abbildung 18: Messung der Thrombozytenaktivierung anhand von gebundenem Fibrinogen unter Verwendung eines FITC-markierten Anti-Fibrinogen-Antikörpers. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 10 bis 16 verschiedene Tiere. * P < 0,05 vs. Kontrolle; # P < 0,05 vs. STZ Placebo.

3.6 Deskriptive Parameter der Versuchstiere

Die Betrachtung der Telmisartanwirkung auf den Organismus wurde durch die Erhebung verschiedener deskriptiver Daten weiter vertieft.

3.6.1 Metabolische Messwerte

Das Körpergewicht der Versuchstiere lag initial zwischen 250 und 300 Gramm. Im Verlauf der vierwöchigen Diabeteserkrankung zeichnete sich ein deutlicher Unterschied in der Gewichtsentwicklung der diabetischen Tiere zur Kontrollgruppe ab. Das Körpergewicht dieser STZ-Tiere fiel deutlich im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Als Voraussetzung für die Zuteilung zur Telmisartan- oder Placebogruppe musste der Blutzuckerspiegel der Ratten über 360 mg/dL liegen. Bei der finalen Blutentnahme ergaben sich in der Telmisartan- und Placebogruppe Werte, welche deutlich über dem geforderten Blutglucosespiegel lagen. Siehe Tabelle Nummer 2.

	Kontrolle	STZ Placebo	STZ Telmisartan
Körpergewicht [g]	354 ± 5.6	243 ± 3.6**	260 ± 6.9**
Blutzucker [mg/dL]	141 ± 7	501 ± 11**	486 ± 20**

** P < 0,01 vs Kontrolle

Tabelle 2: Körpergewicht und Blutzuckerwerte der Versuchstiere.

Körpergewicht und Blutzucker der Versuchstiere wurden durch die Behandlung mit Telmisartan nicht signifikant verändert.

3.6.2 Hämatologische Messwerte

Im Blut der Versuchstiere wurden noch die Thrombozyten- und Leukozytenzahl bestimmt. Die genauen Ergebnisse der drei Vergleichsgruppen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

	Kontrolle	STZ Placebo	STZ Telmisartan
Thrombozytenzahl (x 1000 μl^{-1})	660 + 40	545 + 47	729 + 55
Leukozytenzahl (x 1000 μl^{-1})	5,5 + 0,4	4,9 + 0,5	5,2 + 0,4

Tabelle 3: Thrombozytenzahl und Leukozytenzahl im Vollblut der Versuchstiere.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der verschiedenen Tiere bei Leukozyten- oder Thrombozytenzahl. Allerdings ist eine deutliche Reduzierung der Thrombozytenzahl in der STZ Placebogruppe, also der diabetischen Tiere ohne Telmisartanbehandlung, zu erkennen.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die positive Wirkung einer Telmisartantherapie auf die Thrombozytenaktivierung sowie auf die endotheliale Funktion nachgewiesen werden.

4.1 Blutdruck

Der systolische Blutdruckwert konnte durch die Behandlung mit Telmisartan signifikant gegenüber den placebobehandelten Tieren gesenkt werden. Die Werte der STZ-Placebotiere betragen im Durchschnitt 135 mmHg, wogegen der systolische Blutdruck der Telmisartantiere sich im Mittel bei 109 mmHg einpendelte. Die Hemmung des Renin-Angiotensin Systems (RAAS) führt also zu einer signifikanten Absenkung des Blutdrucks. Diese blutdrucksenkende Wirkung des RAAS-Antagonismus konnte bereits in zahlreichen Studien festgestellt werden und diese Medikamente sind aus diesem Grund ein etablierter Bestandteil der Therapie gegen Hypertonie (179-182). Frühere Studien haben gezeigt, dass die Hemmung des RAAS die endotheliale Funktion in erkrankten Ratten verbessert. Im Gegensatz dazu konnte eine antihypertensive Behandlung mit Wirkstoffen wie Hydralazin, welche zu einer vergleichbaren Blutdrucksenkung führte wie ein ACE-Inhibitor oder ein Angiotensin II Antagonist, die endotheliale Funktion nicht verbessern (183-186).

4.2 Stickstoffmonoxid und oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist ein Hauptgrund für die reduzierte NO-Bioverfügbarkeit bei Diabetes mellitus (187). Es fanden sich in den Untersuchungen dieser Arbeit eine signifikant höhere Bildung von Superoxid in aortalen Segmenten diabetischer Ratten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Zudem war die Reaktion glatter Muskelzellen auf exogenes NO signifikant abgeschwächt, was zu der reduzierten endothelabhängigen Relaxierung beigetragen hat. Beide Effekte wurden aufgehoben unter dauerhafter Behandlung mit Telmisartan.

4.2.1 Schubspannungsvermittelte Bioverfügbarkeit von NO

Die physiologische, dehnungsinduzierte Ca^{2+} -unabhängige NO-Bildung konnte indirekt über die Konstriktion aufgrund eines NO-Synthase-Inhibitors bestimmt werden (122,168). Bei diesem Versuch zeigten die diabetischen STZ-Placebotiere eine signifikant verminderte Kontraktion. Dieser Unterschied zur Kontrollgruppe ist ein Indiz für die verminderte NO-Bioverfügbarkeit in diabetischen Tieren. Durch die Telmisartanbehandlung war die resultierende Kontraktion wieder mit der Kontrollgruppe vergleichbar. Die Bereitstellung von NO konnte durch die Behandlung also normalisiert werden.

4.2.2 Endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholin

Die Calcium-abhängige NO-Produktion durch die eNOS und deren Auswirkungen auf die vasomotorische Funktion der Gefäße wurden anhand von steigenden AcetylcholinKonzentrationen im Organbad bestimmt (70,121). Die diabetischen Placebotiere zeigten eine verspätete und unvollständige Vasodilatation, also eine signifikante Verminderung der NO-Produktion. Die Funktion bei den Telmisartantieren hingegen, glich sich wieder vollständig der von Kontrolltieren an. Auch die halbmaximale Effektivkonzentration zeigte signifikante Veränderungen in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Durch den Angiotensin-II-Rezeptorblocker Telmisartan verbesserte sich also die NO-Produktion bzw. die NO-Wirkungsweise auf die vasomotorische Funktion gegenüber den STZ-Tieren signifikant.

4.2.3 Endothelunabhängige Relaxation durch 2-(N,N-Diethylamino)-Diazennolat-2-oxid

Die endothelunabhängige Vasodilatation konnte mit Hilfe des NO-Donors DEA-NONOate bestimmt werden (125,126,169). Bei den STZ-Placebotieren zeigten sich eine zunehmende NO-Inaktivierung und eine verminderte Empfindlichkeit der glatten Muskulatur in Bezug auf NO. Es wurde eine vollständige, jedoch verzögerte, Relaxierung der Gefäße erreicht, trotz einer diabetischen Stoffwechsellaage. Diese

Verschiebung der Kurve zeigt die Sensitivitätsreduktion gegenüber NO. Telmisartantiere und Kontrolltiere zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der vasodilatierenden Reaktion auf DEA-NONOate.

Für die halbmaximale Effektivkonzentration konnten signifikante Veränderungen festgestellt werden. Die EC50 war bei der STZ-Placebogruppe signifikant gesteigert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Telmisartanbehandlung hingegen führte zu einer signifikanten Reduzierung der EC50 gegenüber den Placebotieren.

4.2.4 Oxidativer Stress

4.2.5 Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und NO-Bioverfügbarkeit

Die atherosklerotischen Komplikationen sind die Ursache einer beträchtlichen Zunahme von Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Diabetes mellitus. Die Abweichungen im Metabolismus, welche durch diese Kohlenhydratstoffwechselstörung induziert werden, führen zu gesteigertem oxidativem Stress und einer vaskulären Dysfunktion. Aus diesem Grund sind Diabetiker für die Entwicklung und das Voranschreiten einer Atherosklerose prädisponiert (14).

In mehreren Studien wurde die Rolle der sogenannten NO-Synthase-Entkoppelung untersucht. Dies ist ein dysfunktionaler Zustand der NO-Synthase, welcher aktiv zur Superoxidbildung bei Diabetes beiträgt und letztendlich die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen fördert (75,188,189). In diabetischen Mäusen ist die endotheliale Dysfunktion mit der Oxidation des essentiellen eNOS Kofaktors Tetrahydrobiopterin vergesellschaftet, wodurch es aufgrund von Peroxinitritbildung zu einem spezifischen Verlust der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit kommt (190,191).

Ein ähnlicher Mechanismus der gesteigerten Superoxidproduktion wird durch den Angiotensin-II-Signalweg aktiviert. Bei erhöhten Angiotensin-II-Spiegeln kommt es zu gesteigertem oxidativem Stress durch O₂-Produktion der glatten Muskelzellen über eine Aktivierung der NADH/NADPH-Oxidase (192-194). Dies verdeutlicht, weshalb der Angiotensin-II-Antagonismus durch Telmisartan die vaskuläre Funktion positiv verändert. Das Medikament steigert nicht einfach die NO-Bildung, wodurch weiterhin

die Peroxynitrit-Bildung angefacht würde, sondern reduziert die Superoxidbildung und stabilisiert dadurch die vaskuläre Funktion durch die Reduktion der NO-Ausspülung.

Die Tatsachen allerdings, dass wir die von der eNOS abgeleiteten Superoxidgeneration nicht ausschließen können, und dass das homogene transmurale Signal in den Hydroxyethidium-Bildern ohne ein deutlich hervortretendes Signal erscheint, weisen zusammen mit dem substantiellen Anstieg der Vasokonstriktion durch N^G-Nitro-L-Arginin bei vorgespannten Aortenringen darauf hin, dass die Hauptquelle des Superoxids nicht das Endothel ist. Dies spricht gegen eine signifikant abgekoppelte endotheliale NO-Synthase in dieser Studie.

Zusammengefasst deuten diese Resultate darauf hin, dass NO bei Diabetes weiterhin durch die eNOS produziert, aber inaktiviert wird, bevor es die glatten Muskelzellen relaxieren kann.

In der Tat wird diese Erkenntnis durch die klar ersichtlichen, nach rechts verschobenen Ergebnisveränderungen in der Dosisantwort auf exogenes NO gestützt. Die Reaktion der Aortenringe auf 2-(N,N-Diethylamino)-diazolat-2-oxid zeigt also die reduzierte Sensitivität der glatten Muskelzellen auf NO an. Dies trägt zum Phänomen der reduzierten Vasorelaxation durch einen endothelabhängigen Agonisten bei.

4.3 Thrombozytenaktivierung

Die Thrombozytenaktivierung wurde anhand von gebundenem Fibrinogen und der basalen Phosphorylierung des VASP gemessen (96,166).

Das thrombozytengebundene Fibrinogen, also die Aktivität des GP IIb/IIIa, war in der Gruppe der placebobehandelten diabetischen Tiere gegenüber den Kontrolltieren signifikant gesteigert. Durch die chronische Behandlung mit Telmisartan fiel die Fibrinogenfluoreszenz jedoch wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe ab, so dass von einer signifikanten Reduktion der Aktivierung des Glycoprotein IIb/IIIa ausgegangen werden kann.

Die VASP-Phosphorylierung an Serin 157 war bei placebogefütterten diabetischen Ratten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant abgeschwächt. Durch den dauerhaften Angiotensin-II-Antagonismus mit Telmisartan wurden diese Vorgänge bei diabetischen Tieren jedoch verhindert. Die VASP-Messungen zeigten bei der Telmisartangruppe

wieder mit der Kontrollgruppe vergleichbare Werte, die Funktion des NO/cGMP-vermittelten Signals wurde also verbessert.

Diabetiker haben ein gesteigertes Risiko für eine frühzeitige Atherogenese. Die Atherosklerose, für deren Entstehung, wie bereits erwähnt, Thrombozyten mitverantwortlich sind, ist häufig bereits bei Patienten mit nicht klinisch-manifestem Diabetes vorhanden. Ein sehr frühes Zeichen der Atherosklerose ist die endotheliale Dysfunktion (32,195). Diese Beobachtungen zeigen sich klinisch anhand der Erkenntnis, dass Typ-2-Diabetiker ohne vorheriges kardiovaskuläres Ereignis, ein Herzinfarktrisiko aufweisen, das genauso hoch ist, wie bei einer Person mit einem vorangegangenen Herzinfarkt (28). Aktivierte Thrombozyten sind also ein Hauptgrund für die Morbidität und Mortalität von Diabetikern, da sehr viele Patienten an kardiovaskulären atherothrombotischen Ereignissen versterben (196). Es konnte gezeigt werden, dass die Thrombozytenaktivierung einen der initialen Schritte der Atheroskleroseentwicklung darstellt. Weiterhin konnte noch gezeigt werden, dass die Hemmung der Aktivierung und Adhäsion der Thrombozyten die Leukozytenadhäsion inhibiert und somit auch die Plaqueentwicklung (38,40). In einer weiteren Studie konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass Angiotensin II die Aktivierung der Thrombozyten durch den Angiotensin-II-Rezeptor bei niedriger Dosis begünstigt. Diese Aktivierung kann durch eine Angiotensin-II-Rezeptorblockade, zum Beispiel durch Telmisartan, inhibiert werden. Ist Angiotensin II jedoch in höheren Konzentrationen vorhanden, gehen diese steigernden Effekte durch die Aktivierung des Angiotensin-II-Rezeptors Typ 2, welcher antagonisierende Wirkung auf die Thrombozytenaktivierung hat, verloren (197,198). In dieser Studie wurde ein weiterer Wirkmechanismus des Angiotensin-II-Rezeptors Typ 1 aufgezeigt, dessen Antagonisierung für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, die mit einer Hypertonie vergesellschaftet sind, einen klinischen Nutzen bietet. Eine antihypertensive Therapie, die einen Angiotensin-II-Rezeptor Typ-1-Antagonist beinhaltet, führt zu einer verbesserten Widerstandskraft der Gefäße gegen arterielles Remodeling bei diabetischen Bluthochdruckpatienten (199,200). Neben der Normalisierung der vaskulären Funktion verbessert Telmisartan ebenfalls die basale Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins, welches als Indikator für die NO-Bioverfügbarkeit oder der NO-Bioaktivität angesehen wird. Zudem binden Thrombozyten diabetischer Ratten, die mit Telmisartan behandelt

wurden, weniger Fibrinogen an ihrer Oberfläche. Dies spricht für eine reduzierte Aktivierung von Thrombozyten *in vivo*. Schäfer *et al.* haben anhand eines diabetischen Mausmodells gezeigt, dass die Verhinderung einer endothelialen Dysfunktion davor schützt, dass zirkulierende Thrombozyten aktiviert werden und dass die direkte Stimulation der Guanylatcyclase durch NO die Thrombozytenaktivierung in diabetischen Ratten umkehrt (101,201).

Die Therapie mit einem Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist hat also zahlreiche positive Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion bei diabetischen Patienten. Zahlreiche Studien belegen diese Effekte.

4.4 Zusammenhang zwischen Angiotensin II, Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen

Es gibt Hinweise auf eine Verknüpfung zwischen endothelialer Dysfunktion, verminderter Glucosetoleranz und Angiotensin II. Die reduzierte Glucosetoleranz ist ein Vorbote von Diabetes mellitus sowie koronarer Herzkrankheit. Über die Anregung von Mechanismen, welche die Entwicklung von Diabetes fördern, kann sich Angiotensin II negativ auswirken. Das kardiovaskuläre System wird sensibilisiert für die ungünstigen Effekte des RAAS, was sich in gehäuftem Auftreten von arterieller Verschlusskrankheit und linksventrikulärer Hypertrophie bei diabetischen Patienten zeigt, sogar bei normalen Lipidspiegeln und Blutdruckwerten (202,203). Durch hohe Insulinspiegel bei verminderter Glucosetoleranz wird das RAAS und das kardiale sympathische System aktiviert (204,205). Der Zusammenhang zwischen Angiotensin II und Diabetes konnte in einer großen Anzahl klinischer Studien über den Gebrauch von Angiotensin-II-Rezeptor Typ-1-Antagonisten gezeigt werden: Es kam zu einer signifikanten Reduzierung der Neuentwicklung eines Diabetes mellitus. Der sekundäre Endpunkt Diabetes war deutlich seltener als im Vorfeld angenommen (206,207). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der chronische Angiotensin-II-Antagonismus durch Telmisartan die Thrombozytenaktivierung und die vaskuläre Dysfunktion bei experimentellem Diabetes positiv beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Arbeit können nicht auf den Angiotensin-II-Antagonismus im Allgemeinen bezogen werden, da lediglich die Wirkung von Telmisartan untersucht wurde. Denn Telmisartan kann als

einzigster Angiotensin-II-Antagonist als partieller Agonist des PPAR γ -Rezeptors fungieren. Dies ist auf seine einzigartige Strukturbeschaffenheit zurückzuführen (208). Telmisartan verbessert über den PPAR γ -Rezeptor die Insulinsensitivität bei nichtdiabetischen hypertensiven Patienten und wirkt ebenfalls positiv auf die Insulinresistenz und die metabolischen Parameter bei Diabetikern Typ II. Dies sind Effekte, die Telmisartan von Irbesartan, ebenfalls ein Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist, unterscheidet (209-214). Die speziellen Wirkungen von Telmisartan über den PPAR γ -Rezeptor sollten weiter untersucht werden. Durch diese Substanz scheint gleichzeitig die Möglichkeit zur Prävention und Behandlung von Diabetes und von kardiovaskulären Erkrankungen zu bestehen. Da diese Erkrankungen häufig kombiniert auftreten, könnte es ein ideales Medikament für diese Patientengruppen darstellen. Diese Hypothese sollte noch intensiver untersucht werden. Die positiven Wirkungen von Telmisartan beschränken sich zudem nicht auf Patienten mit Diabetes mellitus Typ II. Das Medikament normalisiert nahezu den oxidativen Stress und die Endothelfunktion bei Diabetes Typ I (215).

4.5. Zusammenhang zwischen Angiotensin-II-Rezeptor-Blockade und malignen Erkrankungen

In einer kürzlich veröffentlichten Metaanalyse zu Sartanen ist diese Wirkstoffgruppe mit einem leicht erhöhten Krebsrisiko verknüpft. In der Nachbeobachtungszeit, die im Mittel über 4 Jahre erfolgte, stieg das Risiko einer Krebsneuerkrankung signifikant von 6 auf 7,2% an, vor allem für Bronchialkarzinome (0,9 anstatt 0,7%). Im Gegensatz dazu sind die Todesfälle im Rahmen von Krebserkrankungen nicht signifikant erhöht, sie stiegen von 1,6 auf 1,8%. Über 85% der Studienteilnehmer erhielten Telmisartan (216). In einigen experimentellen Studien gibt es Hinweise darauf, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System auf Angiogenese, Zellwachstum und Progression von malignen Erkrankungen einwirkt. Hierbei scheinen speziell Angiotensin II Typ 1 und Typ 2 Rezeptoren beteiligt zu sein (217). Jedoch konnte in weiteren großen Metaanalysen, unter anderem mit über 320.000 Teilnehmern, die Annahme, dass das Krebsrisiko durch Angiotensin-Rezeptorblocker gesteigert wird, widerlegt werden. In

diesen Studien wurden der Zusammenhang zwischen der Einnahme von antihypertensiven Medikamenten beziehungsweise Sartanen und Krebs untersucht (218,219). Lediglich bei Patienten, die gleichzeitig mit Sartanen und ACE-Hemmern therapiert wurden, konnte in einer Metaanalyse das gesteigerte Krebsrisiko nicht ausgeschlossen werden (218).

4.6 Schlussfolgerung

Die endotheliale Dysfunktion und Aktivierung von Thrombozyten, welche durch Diabetes mellitus gefördert wird, kann durch die Dauertherapie mit dem Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist Telmisartan positiv beeinflusst werden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die positiven Auswirkungen des Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten Telmisartan auf die endotheliale Funktion und Thrombozytenaktivierung bei Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus. In Gefäßreaktivitätsstudien, Luminometer- und Fluoreszenzmessungen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die Wirkungen des Medikamentes überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass sich durch Telmisartan die NO-Bioverfügbarkeit verbessert, welche maßgeblich für die endotheliale Funktion verantwortlich ist und durch Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der eNOS und dehnungsinduzierte, Ca^{2+} -unabhängigen NO-Bildung beeinflusst wird. Positiv wird des Weiteren die Sensitivität der glatten Gefäßmuskelzellen gegenüber NO beeinflusst, was zur Vasodilatation führt. Die atherosklerosefördernde Superoxidbildung wird zusätzlich reduziert. Es erfolgten außerdem Messungen von thrombozytengebundenem Fibrinogen, dementsprechend der GP IIb/IIIa-Aktivität, und der VASP-Phosphorylierung, demzufolge dem NO/cGMP-Signalweg, in Thrombozyten durch FITC-markierte Antikörper mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Es wurde gezeigt, dass die Thrombozytenaktivierung, die für den initialen Schritt der Atherosklerose verantwortlich gemacht wird, durch Telmisartan verringert wird. Alle Messungen wurden vergleichend in einer Kontroll-, Placebo- und Telmisartangruppe durchgeführt.

Die beobachtete Blutdrucksenkung ist, nach früheren Betrachtungen, nicht alleine verantwortlich für die verbesserte endotheliale Funktion, welche bei dem Einsatz von AT-II-Antagonisten beobachtet wird. Telmisartan wirkt, laut einer Studie, als einziger AT-II-Antagonist als partieller PPAR γ -Rezeptor, so dass Insulinresistenz und metabolische Parameter verbessert werden. Über diese Wirkungen beeinflusst Telmisartan auch die endotheliale Funktion und die Thrombozytenaktivierung. Zur Reduktion von vaskulären Komplikationen bei Diabetes mellitus erscheint Telmisartan aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als sinnvolle medikamentöse Therapie.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Robert Koch Institut. Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 24 Diabetes mellitus. 2005.
- (2) American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 1:S62-S67.
- (3) King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 1998;21(9):1414-1431.
- (4) Wild S, Roglic G, Green A *et al*. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-1053.
- (5) diabetesDE. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2010. 2010.
- (6) Hauner H., Koester I., Ferber von L. Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland 1998-2001. *Dtsch Med Wochenschr*. 2003;2632-2638.
- (7) Rathmann W, Haastert B, Icks A *et al*. High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: Target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia*. 2003;46(2):182-189.
- (8) Koster I, Hauner H, von Ferber L. [Heterogeneity of costs of diabetic patients: the Cost of Diabetes Mellitus Study]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2006;131(15):804-810.
- (9) Koster I, von Ferber L, Ihle P *et al*. The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany--the CoDiM study. *Diabetologia*. 2006;49(7):1498-1504.
- (10) Jonsson B. Revealing the cost of Type II diabetes in Europe. *Diabetologia*. 2002;45(7):S5-12.
- (11) Massi-Benedetti M. The cost of diabetes Type II in Europe: the CODE-2 Study. *Diabetologia*. 2002;45(7):S1-S4.
- (12) Williams R, Van Gaal L, Lucioni C. Assessing the impact of complications on the costs of Type II diabetes. *Diabetologia*. 2002;45(7):S13-S17.
- (13) American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007. *Diabetes Care*. 2008;31(3):596-615.
- (14) Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002;287(19):2570-2581.

- (15) Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*. 2003;108(12):1527-1532.
- (16) Luscher TF, Creager MA, Beckman JA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *Circulation*. 2003;108(13):1655-1661.
- (17) Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.
- (18) Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci*. 2004;76(7):715-730.
- (19) Tan KC, Chow WS, Ai VH *et al*. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25(6):1055-1059.
- (20) Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res*. 2003;93(12):1159-1169.
- (21) Sniderman AD, Scantlebury T, Cianflone K. Hypertriglyceridemic hyperapob: The unappreciated atherogenic dyslipoproteinemia in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 2001;135(6):447-459.
- (22) Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH *et al*. Primary prevention of coronary heart disease: Guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association. *Circulation*. 1998;97(18):1876-1887.
- (23) Fox CS, Coady S, Sorlie PD *et al*. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA*. 2004;292(20):2495-2499.
- (24) Preis SR, Pencina MJ, Hwang SJ *et al*. Trends in cardiovascular disease risk factors in individuals with and without diabetes mellitus in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2009;120(3):212-220.
- (25) Haffner SM. Coronary heart disease in patients with diabetes. *N Engl J Med*. 2000;342(14):1040-1042.
- (26) Nathan DM, Meigs J, Singer DE. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: How sweet it is ... or is it? *Lancet*. 1997;350 Suppl 1:SI4-SI9.
- (27) Scherthaner G. Cardiovascular mortality and morbidity in type-2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996;31 Suppl:S3-13.

- (28) Haffner SM, Lehto S, Ronnema T *et al.* 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(4):229-234.
- (29) Hu FB, Stampfer MJ, Haffner SM *et al.* Elevated risk of cardiovascular disease prior to clinical diagnosis of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25(7):1129-1134.
- (30) Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation.* 1979;59(1):8-13.
- (31) Mazzone T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet.* 2008;371(9626):1800-1809.
- (32) Wagenknecht LE, Zaccaro D, Espeland MA *et al.* Diabetes and progression of carotid atherosclerosis: the insulin resistance atherosclerosis study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(6):1035-1041.
- (33) Pradhan AD, Ridker PM. Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *Eur Heart J.* 2002;23(11):831-834.
- (34) Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1685-1695.
- (35) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868-874.
- (36) Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):456S-460S.
- (37) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-126.
- (38) Huo Y, Schober A, Forlow SB *et al.* Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2003;9(1):61-67.
- (39) Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3378-3384.
- (40) Massberg S, Brand K, Gruner S *et al.* A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med.* 2002;196(7):887-896.
- (41) Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest.* 2001;107(3):255-264.
- (42) Libby P, Plutzky J. Inflammation in diabetes mellitus: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Am J Cardiol.* 2007;99(4A):27B-40B.

- (43) Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T *et al.* Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*. 1998;98(12):1164-1171.
- (44) Gawaz M, Brand K, Dickfeld T *et al.* Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2000;148(1):75-85.
- (45) Gu L, Okada Y, Clinton SK *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998;2(2):275-281.
- (46) Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: Partners in crime. *Circ Res*. 2005;96(6):612-616.
- (47) Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*. 2003;1(9):1897-1905.
- (48) Kelley DE, Simoneau JA. Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1994;94(6):2349-2356.
- (49) Nurjhan N, Consoli A, Gerich J. Increased lipolysis and its consequences on gluconeogenesis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1992;89(1):169-175.
- (50) Dresner A, Laurent D, Marcucci M *et al.* Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999;103(2):253-259.
- (51) Inoguchi T, Li P, Umeda F *et al.* High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000;49(11):1939-1945.
- (52) Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I *et al.* Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells. *Circ Res*. 1999;84(9):1085-1094.
- (53) Cummings MH, Watts GF, Umpleby AM *et al.* Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in NIDDM. *Diabetologia*. 1995;38(8):959-967.
- (54) Sniderman A, Thomas D, Marpole D, Teng B. Low density lipoprotein. A metabolic pathway for return of cholesterol to the splanchnic bed. *J Clin Invest*. 1978;61(4):867-873.

- (55) Dimitriadis E, Griffin M, Owens D *et al.* Oxidation of low-density lipoprotein in NIDDM: its relationship to fatty acid composition. *Diabetologia*. 1995;38(11):1300-1306.
- (56) de Man FH, Weverling-Rijnsburger AW, van der LA *et al.* Not acute but chronic hypertriglyceridemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation: reversal after lipid-lowering therapy by atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(3):744-750.
- (57) Kuhn FE, Mohler ER, Satler LF *et al.* Effects of high-density lipoprotein on acetylcholine-induced coronary vasoreactivity. *Am J Cardiol*. 1991;68(15):1425-1430.
- (58) Russo G, Leopold JA, Loscalzo J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(5):259-269.
- (59) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-376.
- (60) Moncada S, Radomski MW, Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol*. 1988;37(13):2495-2501.
- (61) Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87(10):840-844.
- (62) Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: A critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II27-II33.
- (63) De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van d, V *et al.* Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000;130(5):963-974.
- (64) Meredith IT, Anderson TJ, Uehata A *et al.* Role of endothelium in ischemic coronary syndromes. *Am J Cardiol*. 1993;72(8):27C-31C.
- (65) Hink U, Li H, Mollnau H *et al.* Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001;88(2):E14-E22.
- (66) Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation*. 2001;103(12):1618-1623.
- (67) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404(6779):787-790.
- (68) Cosentino F, Eto M, De Paolis P *et al.* High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells:

- Role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. 2003;107(7):1017-1023.
- (69) Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(4-5):385-391.
- (70) Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2003;1(10):2112-2118.
- (71) Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263(3):681-684.
- (72) Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002;109(6):817-826.
- (73) Laursen JB, Somers M, Kurz S *et al*. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001;103(9):1282-1288.
- (74) Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem*. 2001;276(18):14533-14536.
- (75) Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D *et al*. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105(14):1656-1662.
- (76) Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):562-571.
- (77) Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M *et al*. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*. 2000;105(11):1631-1639.
- (78) Durante W, Kroll MH, Christodoulides N *et al*. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1997;80(4):557-564.
- (79) Maines MD. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:517-554.
- (80) Wautier MP, Chappey O, Corda S *et al*. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(5):E685-E694.
- (81) Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest*. 1991;87(5):1643-1648.

- (82) Inoguchi T, Xia P, Kunisaki M *et al.* Insulin's effect on protein kinase C and diacylglycerol induced by diabetes and glucose in vascular tissues. *Am J Physiol.* 1994;267(3 Pt 1):E369-E379.
- (83) Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB *et al.* Inhibition of protein kinase C β prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ Res.* 2002;90(1):107-111.
- (84) Gawaz, M. Das Blutplättchen. 1999. Stuttgart, Thieme Verlag.
- (85) Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14(1):18-22.
- (86) Nomura S, Suzuki M, Katsura K *et al.* Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 1995;116(2):235-240.
- (87) Schafer A, Wiesmann F, Neubauer S *et al.* Rapid regulation of platelet activation *in vivo* by nitric oxide. *Circulation.* 2004;109(15):1819-1822.
- (88) Lip GY. Hypertension, platelets, and the endothelium: The "thrombotic paradox" of hypertension (or "Birmingham paradox") revisited. *Hypertension.* 2003;41(2):199-200.
- (89) Blann AD, Nadar S, Lip GY. Pharmacological modulation of platelet function in hypertension. *Hypertension.* 2003;42(1):1-7.
- (90) Nityanand S, Pande I, Bajpai VK *et al.* Platelets in essential hypertension. *Thromb Res.* 1993;72(5):447-454.
- (91) Cerwinka WH, Granger DN. Influence of hypercholesterolemia and hypertension on ischemia-reperfusion induced P-selectin expression. *Atherosclerosis.* 2001;154(2):337-344.
- (92) Surya II, Akkerman JW. The influence of lipoproteins on blood platelets. *Am Heart J.* 1993;125(1):272-275.
- (93) Kokschi M, Zeiger F, Wittig K *et al.* Coagulation, fibrinolysis and platelet P-selectin expression in peripheral vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001;21(2):147-154.
- (94) Yamazaki M, Uchiyama S, Iwata M. Measurement of platelet fibrinogen binding and p-selectin expression by flow cytometry in patients with cerebral infarction. *Thromb Res.* 2001;104(3):197-205.
- (95) Gibbs CR, Blann AD, Watson RD, Lip GY. Abnormalities of hemorheological, endothelial, and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and beta-blocker therapy. *Circulation.* 2001;103(13):1746-1751.

- (96) Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann S *et al.* Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition. *Thromb Haemost.* 2003;89(6):1024-1030.
- (97) Gurbel PA, Kereiakes DJ, Dalesandro MR *et al.* Role of soluble and platelet-bound P-selectin in discriminating cardiac from noncardiac chest pain at presentation in the emergency department. *Am Heart J.* 2000;139(2 Pt 1):320-328.
- (98) Ouvina SM, La Greca RD, Zanaro NL *et al.* Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. *Thromb Res.* 2001;102(2):107-114.
- (99) Tschoepe D, Roesen P, Schwippert B, Gries FA. Platelets in diabetes: The role in the hemostatic regulation in atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost.* 1993;19(2):122-128.
- (100) Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV *et al.* Platelets and shear stress. *Blood.* 1996;88(5):1525-1541.
- (101) Schafer A, Alp NJ, Cai S *et al.* Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(9):1720-1726.
- (102) Sobol AB, Watala C. The role of platelets in diabetes-related vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000;50(1):1-16.
- (103) Li Y, Woo V, Bose R. Platelet hyperactivity and abnormal Ca(2+) homeostasis in diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(4):H1480-H1489.
- (104) Rabini RA, Staffolani R, Fumelli P *et al.* Decreased nitric oxide synthase activity in platelets from IDDM and NIDDM patients. *Diabetologia.* 1998;41(1):101-104.
- (105) Tschoepe D, Roesen P, Esser J *et al.* Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost.* 1991;17(4):433-438.
- (106) Sharpe PC, Trinick T. Mean platelet volume in diabetes mellitus. *Q J Med.* 1993;86(11):739-742.
- (107) Papanas N, Symeonidis G, Maltezos E *et al.* Mean platelet volume in patients with type 2 diabetes mellitus. *Platelets.* 2004;15(8):475-478.
- (108) Tschoepe D, Driesch E, Schwippert B, Lampeter EF. Activated platelets in subjects at increased risk of IDDM. DENIS Study Group. Deutsche Nikotinamid Interventionsstudie. *Diabetologia.* 1997;40(5):573-577.
- (109) Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3(9):2007-2018.

- (110) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9265-9269.
- (111) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension.* 1988;12(4):365-372.
- (112) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524-526.
- (113) Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S193-S201.
- (114) Anderson TJ. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fail Rev.* 2003;8(1):71-86.
- (115) Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284(1):R1-12.
- (116) Sessa WC. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100 Suppl 1:15-18.
- (117) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315-424.
- (118) Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 1999;43(3):509-520.
- (119) Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153(3):1251-1256.
- (120) Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:175-195.
- (121) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399(6736):601-605.
- (122) Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: Mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(5):677-685.
- (123) Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: Mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res.* 2002;55(2):250-260.
- (124) Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci.* 2009;14:1-18.

- (125) Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000;190(3):244-254.
- (126) Russwurm M, Koesling D. NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J.* 2004;23(22):4443-4450.
- (127) Massberg S, Sausbier M, Klatt P *et al.* Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med.* 1999;189(8):1255-1264.
- (128) Pfeifer A, Klatt P, Massberg S *et al.* Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.* 1998;17(11):3045-3051.
- (129) Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ *et al.* Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994;368(6474):850-853.
- (130) Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K *et al.* Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature.* 2000;404(6774):197-201.
- (131) Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M *et al.* Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ Res.* 1999;84(2):210-219.
- (132) Murad F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med.* 2006;355(19):2003-2011.
- (133) Honing ML, Morrison PJ, Banga JD *et al.* Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 1998;14(3):241-249.
- (134) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(13):5193-5197.
- (135) Eigenthaler M, Nolte C, Halbrugge M, Walter U. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem.* 1992;205(2):471-481.
- (136) Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P *et al.* Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem.* 1994;225(1):21-27.
- (137) Hauser W, Knobloch KP, Eigenthaler M *et al.* Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated

- phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(14):8120-8125.
- (138) Massberg S, Gruner S, Konrad I *et al*. Enhanced *in vivo* platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood*. 2004;103(1):136-142.
- (139) Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol*. 2001;62(9):1153-1161.
- (140) Bearer EL, Prakash JM, Manchester RD, Allen PG. VASP protects actin filaments from gelsolin: An *in vitro* study with implications for platelet actin reorganizations. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2000;47(4):351-364.
- (141) Schafer A, Burkhardt M, Vollkommer T *et al*. Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(3):397-405.
- (142) Tsao PS, Wang B, Buitrago R *et al*. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation*. 1997;96(3):934-940.
- (143) Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res*. 1995;76(6):980-986.
- (144) Schafer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008;6(1):52-60.
- (145) Gauthier TW, Scalia R, Murohara T *et al*. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(10):1652-1659.
- (146) Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation*. 1996;94(7):1682-1689.
- (147) Cardona-Sanclemente LE, Born GV. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on the uptake of LDL and fibrinogen by arterial walls and other organs of the rat. *Br J Pharmacol*. 1995;114(7):1490-1494.
- (148) Draijer R, Atsma DE, van der LA, van Hinsbergh VW. cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ Res*. 1995;76(2):199-208.

- (149) Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J *et al.* Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett.* 1993;334(2):170-174.
- (150) Goss SP, Hogg N, Kalyanaraman B. The effect of nitric oxide release rates on the oxidation of human low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1997;272(34):21647-21653.
- (151) Seccia M, Perugini C, Albano E, Bellomo G. Inhibition of Cu²⁺-induced LDL oxidation by nitric oxide: a study using donors with different half-time of NO release. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220(2):306-309.
- (152) Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res.* 1996;79(4):748-756.
- (153) Fukuo K, Hata S, Suhara T *et al.* Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 1996;27(3 Pt 2):823-826.
- (154) Dubey RK, Jackson EK, Luscher TF. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin I receptors. *J Clin Invest.* 1995;96(1):141-149.
- (155) Fukumoto S, Koyama H, Hosoi M *et al.* Distinct role of cAMP and cGMP in the cell cycle control of vascular smooth muscle cells: cGMP delays cell cycle transition through suppression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 activation. *Circ Res.* 1999;85(11):985-991.
- (156) Burnier M, Zanchi A. Blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: a key therapeutic strategy to reduce renal and cardiovascular events in patients with diabetes. *J Hypertens.* 2006;24(1):11-25.
- (157) Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005;14(2):125-131.
- (158) Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D *et al.* Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2001;345(12):861-869.
- (159) Schafer A, Vogt C, Fraccarollo D *et al.* Eplerenone improves vascular function and reduces platelet activation in diabetic rats. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61(1):45-52.
- (160) Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR *et al.* Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2001;345(12):851-860.
- (161) Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint

- reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002;359(9311):1004-1010.
- (162) Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res*. 2002;512(2-3):121-134.
- (163) Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*. 1969;48(11):2129-2139.
- (164) Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2005;22(4):359-370.
- (165) Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res*. 2007;125(3):451-472.
- (166) Schafer A, Fraccarollo D, Eigenthaler M *et al*. Rosuvastatin reduces platelet activation in heart failure: role of NO bioavailability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):1071-1077.
- (167) Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann SK *et al*. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2003;58(3):655-662.
- (168) Fleming I, Bauersachs J, Schafer A *et al*. Isometric contraction induces the Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(3):1123-1128.
- (169) Fitzhugh AL, Keefer LK. Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the "NONOates". *Free Radic Biol Med*. 2000;28(10):1463-1469.
- (170) Bauersachs J, Bouloumie A, Mulsch A *et al*. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: Changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res*. 1998;37(3):772-779.
- (171) Schafer A, Galuppo P, Fraccarollo D *et al*. Increased cytochrome P4502E1 expression and altered hydroxyecosatetraenoic acid formation mediate diabetic vascular dysfunction: Rescue by guanylyl-cyclase activation. *Diabetes*. 2010;59(8):2001-2009.
- (172) Hecker M, Preiss C, Schini-Kerth VB, Busse R. Antioxidants differentially affect nuclear factor kappa B-mediated nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1996;380(3):224-228.
- (173) Skatchkov MP, Sperling D, Hink U *et al*. Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;254(2):319-324.

- (174) Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 1994;55(2):253-258.
- (175) Miller FJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD *et al.* Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res.* 1998;82(12):1298-1305.
- (176) Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol.* 1990;47(5):440-448.
- (177) Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem.* 2000;46(8 Pt 2):1221-1229.
- (178) Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B *et al.* The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: A view from Stanford. *Clin Chem.* 2002;48(10):1819-1827.
- (179) Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: Pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm.* 2007;13(8 Suppl B):9-20.
- (180) Epstein BJ. Aliskiren and valsartan combination therapy for the management of hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2010;6:711-722.
- (181) Gnudi L, Goldsmith D. Renin angiotensin aldosterone system (RAAS) inhibitors in the prevention of early renal disease in diabetes. *F1000 Med Rep.* 2010;2.
- (182) Ibrahim MM. RAS inhibition in hypertension. *J Hum Hypertens.* 2006;20(2):101-108.
- (183) Berkenboom G, Brekine D, Unger P *et al.* Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and endothelial function of rat aorta. *Hypertension.* 1995;26(5):738-743.
- (184) Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation.* 2000;101(14):1653-1659.
- (185) Clozel M, Kuhn H, Hefti F. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and of hydralazine on endothelial function in hypertensive rats. *Hypertension.* 1990;16(5):532-540.
- (186) Mukai Y, Shimokawa H, Higashi M *et al.* Inhibition of renin-angiotensin system ameliorates endothelial dysfunction associated with aging in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(9):1445-1450.

- (187) Landmesser U., Harrison D.G., Drexler H. Oxidant stress-a major cause of reduced endothelial nitric oxide availability in cardiovascular disease. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006;(62):13-19.
- (188) Alp NJ, Mussa S, Khoo J *et al.* Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. *J Clin Invest.* 2003;112(5):725-735.
- (189) Kalinowski L, Dobrucki LW, Brovkovich V, Malinski T. Increased nitric oxide bioavailability in endothelial cells contributes to the pleiotropic effect of cerivastatin. *Circulation.* 2002;105(8):933-938.
- (190) Cai S, Khoo J, Mussa S *et al.* Endothelial nitric oxide synthase dysfunction in diabetic mice: importance of tetrahydrobiopterin in eNOS dimerisation. *Diabetologia.* 2005;48(9):1933-1940.
- (191) Pannirselvam M, Verma S, Anderson TJ, Triggle CR. Cellular basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic (db/db -/-) mice: role of decreased tetrahydrobiopterin bioavailability. *Br J Pharmacol.* 2002;136(2):255-263.
- (192) Mollnau H, Wendt M, Szocs K *et al.* Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res.* 2002;90(4):E58-E65.
- (193) Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA *et al.* Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension.* 1998;32(2):331-337.
- (194) Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T *et al.* Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996;97(8):1916-1923.
- (195) Hunt KJ, Williams K, Rivera D *et al.* Elevated carotid artery intima-media thickness levels in individuals who subsequently develop type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(10):1845-1850.
- (196) Resnick HE, Harris MI, Brock DB, Harris TB. American Diabetes Association diabetes diagnostic criteria, advancing age, and cardiovascular disease risk profiles: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care.* 2000;23(2):176-180.
- (197) Utsugisawa K, Kizawa H, Nagane Y *et al.* Biphasic effects of angiotensin II and receptor antagonism on aggregability and protein kinase C phosphorylation in human platelets. *Thromb Haemost.* 2005;94(5):1012-1018.
- (198) Ding YA, MacIntyre DE, Kenyon CJ, Semple PF. Angiotensin II effects on platelet function. *J Hypertens Suppl.* 1985;3(3):S251-S253.

- (199) Savoia C, Touyz RM, Endemann DH *et al.* Angiotensin receptor blocker added to previous antihypertensive agents on arteries of diabetic hypertensive patients. *Hypertension*. 2006;48(2):271-277.
- (200) Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT1 angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;30(1):75-83.
- (201) Schafer A, Flierl U, Kobsar A *et al.* Soluble guanylyl cyclase activation with HMR1766 attenuates platelet activation in diabetic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2813-2818.
- (202) Rocchini AP, Moorehead C, DeRemer S *et al.* Hyperinsulinemia and the aldosterone and pressor responses to angiotensin II. *Hypertension*. 1990;15(6 Pt 2):861-866.
- (203) O'Keefe JH, Wetzel M, Moe RR *et al.* Should an angiotensin-converting enzyme inhibitor be standard therapy for patients with atherosclerotic disease? *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(1):1-8.
- (204) Watanabe K, Sekiya M, Tsuruoka T *et al.* Relationship between insulin resistance and cardiac sympathetic nervous function in essential hypertension. *J Hypertens*. 1999;17(8):1161-1168.
- (205) Tuck ML, Bounoua F, Eslami P *et al.* Insulin stimulates endogenous angiotensin II production via a mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 2004;22(9):1779-1785.
- (206) Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH, Jr. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(5):821-826.
- (207) Andraws R, Brown DL. Effect of inhibition of the renin-angiotensin system on development of type 2 diabetes mellitus (meta-analysis of randomized trials). *Am J Cardiol*. 2007;99(7):1006-1012.
- (208) Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI *et al.* Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension*. 2004;43(5):993-1002.
- (209) Benndorf RA, Rudolph T, Appel D *et al.* Telmisartan improves insulin sensitivity in nondiabetic patients with essential hypertension. *Metabolism*. 2006;55(9):1159-1164.
- (210) Rong X, Li Y, Ebihara K *et al.* Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia*. 2010.

- (211) Fuke Y, Fujita T, Satomura A *et al.* Alterations of insulin resistance and the serum adiponectin level in patients with type 2 diabetes mellitus under the usual antihypertensive dosage of telmisartan treatment. *Diabetes Technol Ther.* 2010;12(5):393-398.
- (212) Younis F, Stern N, Limor R *et al.* Telmisartan ameliorates hyperglycemia and metabolic profile in nonobese Cohen-Rosenthal diabetic hypertensive rats via peroxisome proliferator activator receptor-gamma activation. *Metabolism.* 2010;59(8):1200-1209.
- (213) Derosa G, Cicero AF, D'Angelo A *et al.* Telmisartan and irbesartan therapy in type 2 diabetic patients treated with rosiglitazone: effects on insulin-resistance, leptin and tumor necrosis factor-alpha. *Hypertens Res.* 2006;29(11):849-856.
- (214) Derosa G, Fogari E, D'Angelo A *et al.* Metabolic effects of telmisartan and irbesartan in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome treated with rosiglitazone. *J Clin Pharm Ther.* 2007;32(3):261-268.
- (215) Ceriello A, Piconi L, Esposito K, Giugliano D. Telmisartan shows an equivalent effect of vitamin C in further improving endothelial dysfunction after glycemia normalization in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30(7):1694-1698.
- (216) Sipahi I, Debanne SM, Rowland DY *et al.* Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: Meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Oncol.* 2010;11(7):627-636.
- (217) Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: A new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(7):293-299.
- (218) Bangalore S, Kumar S, Kjeldsen SE *et al.* Antihypertensive drugs and risk of cancer: Network meta-analyses and trial sequential analyses of 324,168 participants from randomised trials. *Lancet Oncol.* 2011;12(1):65-82.
- (219) The ARB Trialists Collaboration. Effects of telmisartan, irbesartan, valsartan, candesartan, and losartan on cancers in 15 trials enrolling 138,769 individuals. *J Hypertens.* 2011;29(4):623-635.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Entstehung von durch oxidativen Stress verursachter endothelialer Dysfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen. (Modifiziert nach Cai H., Harrison D. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Cir. Res.*2000;87;840-844.).....8
- Abbildung 2: Primäre und sekundäre Hämostase. (Modifiziert nach Gawaz, M. Das Blutplättchen. 1999. Stuttgart, Thieme Verlag, S. 2).....10
- Abbildung 3: Angiotensin II beeinflusst die vaskuläre Permeabilität durch die gesteigerte Produktion von vaskulären endothelialen Zellwachstumsfaktoren (VEGF) und Prostaglandinen. Angiotensin-II-induzierte Aktivierung von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren resultiert in Leukozytenrekutierung, Zellwachstum und Fibrose. Diese Vorgänge werden durch die Aktivierung von Redox-sensiblen Transkriptionsfaktoren (unter anderem NF- κ B, AP-1, HIF-1) über die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies reguliert. Die inflammatorische Antwort ist assoziiert mit reparativen Vorgängen, welche Fibrose und Zellwachstum zur Folge haben. Dysregulation dieser Vorgänge führt zu Gefäßläsionen und strukturellem Remodeling bei Bluthochdruck. (Modifiziert nach Touyz R. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;14;125-131.....17
- Abbildung 4: Organbad mit parallelen Einzelkammern. Abgebildet sind zudem die zentrale Pufferversorgung und die Begasung der Organkammern.....22
- Abbildung 5: Detailansicht einer Gefäßaufhängung.....23
- Abbildung 6: Detailansicht einer Organkammer mit aufgespanntem Aortenring.....23
- Abbildung 7: Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie. Das Probenmaterial wird an einem Laser vorbeigeleitet. Die optischen Signale werden durch einen

Vorwärtsstreulichtdetektor, einen Seitwärtsstreulichtdetektor (1) und multiple Fluoreszenzemissionsdetektoren (2-4) gesammelt. Die Signale werden verstärkt und in digitale Form umgewandelt für die Analyse und die Anzeige auf einem Computerbildschirm. (Modifiziert nach Brown, Clinical Chemistry, 2000).....27

Abbildung 8: Identifikation der Thrombozyten basierend auf ihrem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (A). Anschließende Messungen (Histogramme) wurden ausschließlich in dem begrenzten Bereich R1 durchgeführt. Die mittlere Fluoreszenzintensität der spezifischen Antikörper wurde berechnet und graphisch dargestellt (B). Um zu verifizieren, dass R1 in hoher Reinheit Thrombozyten enthält, wurden separate Proben mit einem Antikörper gegen das thrombozytenspezifische Antigen CD42 markiert (C). Der Prozentwert der CD42positiven Zellen wurde berechnet durch die Division von M2 durch M1. (Modifiziert nach Schafer, J Physiol Pharmacol., 2010).....28

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Thrombozytenfärbungen für die durchflusszytometrischen Messungen.....31

Abbildung 10: Spannungsvermittelte NO-Bioverfügbarkeit in vorkontrahierten Aortenringen (ca. 20% der maximalen Konstriktion). Die Messung erfolgt indirekt, über eine zusätzliche Vasokonstriktion aufgrund des hinzugegebenen NOS-Inhibitors L-NNA (100 μ M). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 10 bis 16 verschiedene Tiere. ** P<0,01 vs. Kontrolle; ### P<0,01 vs. STZ Placebo.....35

Abbildung 11: Konzentration-Wirkungs-Kurven der endothelabhängigen, NO-vermittelten Relaxation ausgelöst durch Acetylcholin bei Kontroll-, STZ-Placebo- und STZ Telmisartantieren. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 10 bis 16 verschiedene Tiere. ** P<0,01 vs. Kontrolle; ### P<0,01 vs. STZ Placebo.....36

Abbildung 12: Graphische Darstellung der EC₅₀. ** P<0,01 vs. Kontrolle; # P<0,05 vs. STZ Placebo.....37

Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der endothelunabhängigen Relaxation ausgelöst durch den NO-Donor DEA NONOate bei Kontroll-, STZ-Placebo- und STZ Telmisartantieren. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 10 bis 16 verschiedene Tiere.....	38
Abbildung 14: Graphische Darstellung der EC ₅₀ . ** P<0,01 vs. Kontrolle; ## P<0,01 vs. STZ Placebo.....	39
Abbildung 15: Superoxidproduktion in Aortenringen, gemessen durch lucigeninverstärkte Chemolumineszenz. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 6 bis 10 verschiedene Tiere. * P<0,05 vs. Kontrolle, # P<0,05 vs. STZ Placebo....	40
Abbildung 16: Repräsentative mikrotopographische Bilder von 10 μ m dicken Aortenringen. Die Superoxidbildung wurde visuell durch die Inkubation mit dem fluoreszierenden Hydroethidium dargestellt.....	41
Abbildung 17: Superoxidproduktion in Aortenringen, gemessen durch Hydroxyethidiumfluoreszenz. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 6 bis 10 verschiedene Tiere. ** P<0,01 vs. Kontrolle, # P<0,05 vs. STZ Placebo.....	41
Abbildung 18: Messung der Phosphorylierung des VASP im Vollblut unter Verwendung eines FITC-markierten Antikörpers. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der NO-Bioverfügbarkeit <i>in vivo</i> . Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 10 bis 16 verschiedene Tiere. * P<0,05 vs. Kontrolle; # P<0,05 vs. STZ Placebo.....	42
Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der systolischen Blutdruckwerte der Versuchstiere. n= 10 bis 16 verschiedene Tiere.....	34
Tabelle 2: Körpergewicht und Blutzuckerwerte der Versuchstiere.....	44
Tabelle 3: Thrombozytenzahl und Leukozytenzahl im Vollblut der Versuchstiere.....	45

Danksagung

Ich danke allen, auf deren Hilfe und Mitarbeit ich mich während der Ausarbeitung dieser Doktorarbeit verlassen konnte.

Hierzu zählen besonders die Mitarbeiter der AG Bauersachs und meine Mitdoktoranden, welche einen großen Anteil an der netten und kollegialen Atmosphäre während der Laborarbeiten hatten.

Vor allem möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die andauernde Unterstützung während meiner Doktorarbeit und meines Studiums bedanken.

Zum Abschluss danke ich Herrn Prof. Dr. Johann Bauersachs und PD Dr. Andreas Schäfer für die gute Betreuung und die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe tätig zu sein.

Lebenslauf

1. Persönliche Daten

Stefanie Menninger
Hauptstraße 70, 97618 Hollstadt/Deutschland
Geburtsdatum: 01.03.1980 in Bad Neustadt/Saale
Familienstand: ledig

2. Schulbildung

09/1986 – 07/1992	Grundschule Hollstadt/Heustreu
09/1992 – 07/1996	Werner von Siemens-Realschule Bad Neustadt/S.
09/2000 – 06/2003	Bayernkolleg Schweinfurt/Abitur

3. Hochschulstudium

2003 - 2010	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Ärztliche Prüfung am 09.06.2010. Approbation als Ärztin erteilt am 29.06.2010.
-------------	--

4. Praktische Erfahrungen im medizinischen Bereich

08/2003 - 09/2003 02/2004 - 03/2004	Pflegepraktikum (3 Monate) in den Fachgebieten Innere Medizin (Kreiskrankenhaus Mellrichstadt) und Intensivmedizin (St.-Josefskrankenhaus, Schweinfurt).
08/2006 – 10/2006	Famulaturen: 2 Monate Famulatur in den Fachgebieten Nephrologie und Diabetologie, Dr. Blum und Dr. Sommer, Bad Neustadt, Facharztpraxis mit Dialyseeinrichtung.
02/2008 – 04/2008	2 Monate Famulatur im Bereich Kardiologie am Universitätsklinikum Würzburg, Station Morawitz, PD Dr. med. Ritter.
02/2009 – 06/2009	Praktisches Jahr: PD Dr. med. Franco Salomon, Innere Abteilung, Spital Lachen, Schweiz.
06/2009 – 10/2009	Dr. John Doyle, Chirurgische Abteilung, Portiuncula Hospital, Ballinasloe, Irland.
10/2009 – 01/2010	Dr. med. Johannes Herrmann, Klinik für Kinder und Jugendliche, Leopoldina Krankenhaus, Schweinfurt.
03/2008 – 01/2009	Studentische Hilfskraft, Prof. Dr. M. Warmuth-Metz, Abteilung für Neuroradiologie, Universitätsklinikum Würzburg, Referenzzentrum für Neuroradiologie der GPOH bei Hirntumoren im Kindesalter.

06/2007 Freiwillige Helferin bei der Teddyklinik Würzburg,
Prof. Dr. med. Christian Speer, Universitäts-
Kinderklinik Würzburg.

5. Berufserfahrungen

8/1996 – 06/2000 Sparkasse Bad Neustadt/Saale: Ausbildung zur
Bankkauffrau, sowie anschließende 1 1/2 –jährige
Tätigkeit als Kundenberaterin in einer Zweigstelle
dieser Bank.

07/2000 – 09/2000 ExpoBank Hannover: Kundenberaterin.

12/2010 - heute Caritaskrankenhaus Bad Mergentheim, Innere Medizin
Assistenzärztin

Hollstadt, März 2012

Stefanie Menninger