

Aus der

Medizinischen Klinik und Poliklinik I, Kardiologie, Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

und dem

Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**Das Schwefelwasserstoff-freisetzende Aspirinderivat ACS14 zeigt
starke antithrombotische Effekte *in vitro* und *in vivo***

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

An der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franziska Fochler

aus

Hof/Saale

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Florian Krötz
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Christoph Bidlingmaier Prof. Dr. med. Bernd Engelmann Prof. Dr. med. Erhard Hiller
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Joachim Pircher
Dekan der Medizinischen Fakultät:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	07.05.2015

Die Stufen

*Wie jede Stufe welkt und jede Jugend
Dem Alter weicht, blüht jede Lebensstufe,
Blüht jede Weisheit auch und jede Tugend
Zu ihrer Zeit und darf nicht ewig dauern.
Es muss das Herz bei jedem Lebensrufe
Bereit zum Abschied sein und Neubeginne,
Um sich in Tapferkeit und ohne Trauern
In andre, neue Bindungen zu geben.
Und jedem Anfang wohnt ein Zauber inne,
Der uns beschützt und der uns hilft, zu leben.*

*Wir sollen heiter Raum um Raum durchschreiten,
An keinem wie an einer Heimat hängen,
Der Weltgeist will nicht fesseln uns und engen,
Er will uns Stuf` um Stufe heben, weiten.
Kaum sind wir heimisch einem Lebenskreise
Und traulich eingewohnt, so droht Erschlaffen,
Nur wer bereit zu Aufbruch ist und Reise,
Mag lähmender Gewöhnung sich entrafen.*

*Es wird vielleicht auch noch die Todesstunde
Uns neuen Räumen jung entgegen senden,
Des Lebens Ruf an uns wird niemals enden...
Wohlan denn, Herz, nimm Abschied und gesunde!*

Herrmann Hesse

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Aspirin und seine Wirkung auf Thrombozyten	1
1.1.1	Aspirin.....	1
1.1.2	Thrombozyten.....	1
1.1.3	Thrombozytenaktivierung und arterielle Thrombose	3
1.1.4	Aspirin in kardiovaskulären Erkrankungen.....	4
1.2	Schwefelwasserstoff-freisetzendes Aspirin	5
1.2.1	Schwefelwasserstoff.....	5
1.2.2	Schwefelwasserstoff-freisetzende NSAIDs.....	6
1.2.3	ACS14	8
2	FRAGESTELLUNG	10
3	MATERIAL UND METHODEN.....	11
3.1	<i>In vitro</i> und <i>ex vivo</i> Versuche.....	11
3.1.1	Thrombozyten- und Blutspender	11
3.1.2	Thrombozytenaggregation im Vollblut	11
3.1.2.1	Thrombozytenaggregation in humanem Vollblut.....	11
3.1.2.2	Thrombozytenaggregation in murinem Vollblut	12
3.1.3	Plasmatische Gerinnung.....	12
3.1.4	Gewinnung isolierter Thrombozyten	13
3.1.5	Kompetitiver Enzymimmunoassay	13
3.1.5.1	Thromboxan B ₂ Enzymimmunoassay	14
3.1.5.2	cAMP Enzymimmunoassay	15
3.1.6	Durchflusszytometrie.....	15
3.1.6.1	Messung der Thrombozytenvitalität in isolierten humanen Thrombozyten.....	16
3.1.6.2	Quantifizierung von Oberflächenmolekülen auf isolierten humanen Thrombozyten.....	16
3.1.7	Adenosintriphosphat Chemilumineszenz Assay	17
3.1.8	Western Blotting.....	17
3.1.8.1	Herstellung von Thrombozytenlysaten.....	17
3.1.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration der Thrombozytenlysate ..	18
3.1.8.3	Gelelektrophorese	19
3.1.8.4	Blotting	20
3.1.9	Lactatdehydrogenase Assay	21
3.1.10	Kleines Blutbild	22
3.2	Tierversuche.....	22

3.3	<i>In vivo</i> Versuche	23
3.3.1	Verabreichung von Aspirin und ACS14	23
3.3.2	Anästhesie	23
3.3.3	Rückenhautkammerimplantation	24
3.3.4	Katheterisierung A. carotis	25
3.3.5	Intravitalmikroskopische Beobachtung der arteriolären und arteriellen Thrombose	26
3.3.5.1	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	26
3.3.5.2	Light-dye Technik und arterioläre Thrombose	26
3.3.6	Arterielle Thrombose A. carotis.....	27
3.3.7	Blutungszeit	30
3.4	Statistische Analysen	30
4	ERGEBNISSE	31
4.1	Thrombozytenaggregation im humanen Vollblut	31
4.2	Plasmatische Gerinnung in humanem Vollblut	34
4.3	Thromboxanfreisetzung aus stimulierten humanen Thrombozyten	36
4.4	Thrombozytenvitalität	37
4.5	Thrombozytenaggregation in murinem Vollblut	38
4.6	Thromboxankonzentration im Urin behandelter Tiere.....	39
4.7	Blutungszeit behandelter Tiere.....	40
4.8	Toxizität von ACS14.....	41
4.9	Untersuchung der arteriolären Thrombusbildung in der Rückenhaut	42
4.10	Untersuchung der arteriellen Thrombusbildung in der A. carotis	44
4.11	Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und Fibrinogenbindung auf humanen Thrombozyten	46
4.12	Sekretion von Molekülen aus den Granula humaner Thrombozyten.....	49
4.13	Intrazelluläre cAMP-Konzentration in humanen Thrombozyten	51
4.14	Phosphorylierung von VASP in humanen Thrombozyten	51
5	DISKUSSION.....	53
5.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen und deren Therapie	53

5.2	Wirkung von ACS14 auf COX-abhängige und -unabhängige Signalwege im Vergleich zu Aspirin.....	54
5.2.1	Methodische Aspekte der Thrombozytenaggregometrie	54
5.2.2	Thrombozytenhemmung durch Aspirin und ACS14	55
5.3	Toxizität.....	56
5.4	Reversibilität der Thrombozytenhemmung durch ACS14	57
5.5	Die Effekte von ACS14 <i>in vivo</i>.....	57
5.5.1	Vergleich von ACS14 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	57
5.5.2	Blutungszeit	58
5.5.3	Die Untersuchung der arteriolären und arteriellen Thrombose in der Mikrozirkulation der Rückenhaut und der A. carotis	59
5.6	Molekulare Mechanismen der Thrombozytenhemmung durch ACS14	61
5.6.1	Die Wirkung von ACS14 auf den Fibrinogenrezeptor	61
5.6.2	Die Effekte von ACS14 auf die Freisetzung der Inhaltsstoffe der Granula	63
5.7	Klinische Relevanz.....	63
6	ZUSAMMENFASSUNG	66
7	ANHANG.....	69
7.1	Chemikalien	69
7.2	Abkürzungen	72
7.3	Literaturverzeichnis	74
7.4	Publikationen	82
7.5	Danksagung	84

1 EINLEITUNG

1.1 Aspirin und seine Wirkung auf Thrombozyten

1.1.1 Aspirin

Acetylsalicylsäure (Aspirin) ist weltweit eines der am meisten eingesetzten Medikamente. Bereits im antiken Griechenland wurde der Saft von Weidenrinden zum Fieber senken und als Schmerzstiller verwendet. In den 1950er Jahren wurde erstmals beobachtet, dass Aspirin das Risiko einer koronararteriellen Thrombose reduzieren kann [1] und gegen Ende der 1960er Jahre wurde die hemmende Wirkung von Aspirin auf die Thrombozytenaggregation beschrieben [2-4]. Aspirin inhibiert irreversibel die Cyclooxygenasen und damit die Thrombozytenaggregation. Zusätzlich wirkt es schmerzstillend, antirheumatisch, fiebersenkend und antientzündlich [5]. Heute kommt es vor allem auf dem Gebiet der kardiovaskulären Erkrankungen als Thrombozytenaggregationshemmer zum Einsatz. Den weitaus größten Anteil nimmt hierbei die Sekundärprävention nach bereits stattgehabten Ereignissen wie Myokardinfarkt, Apoplex oder peripher arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) ein. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass Aspirin nach Myokardinfarkt sowohl das Risiko erneuter Ereignisse als auch die Mortalität signifikant reduzieren kann [6-8]. Aufgrund seines raschen Wirkeintritts ist Aspirin auch wesentlicher Bestandteil bei der Therapie akuter Ereignisse wie beispielsweise des akuten Koronarsyndroms [9]. Zudem wird es als Thrombozytenaggregationshemmer bei interventionellen Eingriffen wie der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) eingesetzt und dient nach Stentimplantationen der Prophylaxe von Stentthrombosen. Im Rahmen der Primärprävention der koronaren Herzkrankheit wird es zur medikamentösen Therapie bei Patienten mit hohem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse eingesetzt [10].

1.1.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind kleine, kernlose Blutzellen, die durch Abschnürung von ihren Vorläuferzellen den Megakaryozyten unter dem Einfluss von Thrombopoietin aus Niere und Leber im Knochenmark entstehen. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurde erstmalig beschrieben, dass Thrombozyten diejenigen Blutbestandteile sind, welche eine verletzte Gefäßwand detektieren können, sich am Ort der Verletzung anheften und dort einen Thrombus bilden [11]. Sie zirkulieren für ca. 5 - 9 Tage im Blut, bevor sie mittels Phagozytose in der Milz oder von den Kupfferzellen der Leber abgebaut werden [12].

Die physiologische Konzentration liegt zwischen 150.000 - 400.000/ μ L. Trotz Kernlosigkeit enthalten sie zahlreiche zytoplasmatische Organellen wie Mitochondrien, verschiedene Granula, Mikrotubuli, Aktinfilamente, Glykogen als Energiequelle und ein komplexes Membransystem. Vor allem die Granula mit ihren Inhaltsstoffen sind wesentlich an der Funktionsvermittlung bei der Aktivierung der Thrombozyten beteiligt. So enthalten die sogenannten *dense*-Granula verschiedene proaggregatorische Faktoren wie Adenine (ATP, ADP), Guanine (GTP, GDP), Amine (Serotonin, Histamin) und Kationen (Calcium, Magnesium). Die α -Granula beinhalten Adhäsionsmoleküle (Fibronectin, von Willebrand Faktor (vWF), Thrombospondin), Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF, VEGF), Faktoren des Gerinnungssystems (Fibrinogen, Faktor V, VII, IX, XIII) und der Fibrinolyse (Plasminogen, Protein S, PAI-1), proinflammatorische Zytokine (Interleukin 1 β (IL-1 β)), Chemokine (PF4, RANTES) und Adhäsionsmoleküle (P-Selectin, Integrin α Ib β 3) [12, 13]. Den Durchmesser von 1 - 3 μ m im ruhenden Zustand können Thrombozyten auf bis zu 6 μ m bei vollständiger Aktivierung vergrößern. Während Funktionsverluste (Thrombozytopathie) oder eine reduzierte Anzahl (Thrombozytopenie) der Thrombozyten eine gesteigerte Blutungsneigung zur Folge haben, führt andererseits deren verstärkte Aktivierung zu arteriellen Thrombosen und den daraus resultierenden Komplikationen wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder peripher arterieller Verschlusskrankheit (pAVK). Somit sind Thrombozyten für die adäquate Aufrechterhaltung der körpereigenen Hämostase entscheidend [14].

Zusätzlich zeigte sich in den letzten Jahren, dass Thrombozyten an inflammatorischen Prozessen und der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen beteiligt sind [12, 15-17]. Bereits im Stadium der endothelialen Dysfunktion interagieren sie mit dem Gefäßendothel und können dabei ebenso wie Leukozyten auf aktiviertem Endothel rollen. Unter Bedingungen mit hohen Scherkräften sind P-Selectin und sein Gegenrezeptor P-Selectin Glykoprotein 1 (PSGL-1), sowie GPIb und vWF für die primäre Adhäsion der Thrombozyten am Gefäßendothel verantwortlich [16-22]. Durch Freisetzung ihrer zahlreichen intrazellulären Mediatoren, wie den Chemokinen Chemokin Ligand 4 (CXCL4, ehemals platelet factor 4, PF4) und Chemokin Ligand 5 (CCL5, ehemals RANTES), den Zytokinen Interleukin 1 β (IL-1 β), transforming growth factor (TGF- β) und CD40 Ligand (CD-40L) oder dem Wachstumsfaktor platelet derived growth factor (PDGF) interagieren sie mit Neutrophilen und Monozyten. Letztere rollen zunächst auf dem Endothel, bevor sie in die Gefäßwand einwandern und dort zu Makrophagen differenzieren, welche sich im Verlauf zu lipidhaltigen Schaumzellen entwickeln. Es entstehen arteriosklerotische Plaques, bei deren Ruptur es zur Thrombozytenadhäsion und Bildung eines Thrombus kommt. Verschließt dieser das Gefäß vollständig, führt dies zu Komplikationen kardiovaskulärer Erkrankungen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit [16-22].

1.1.3 Thrombozytenaktivierung und arterielle Thrombose

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten in einem ruhenden Zustand im Blut und ihre Aktivierung wird durch das intakte Endothel der Gefäßwand verhindert. Dabei fungiert das Endothel selbst als Barriere zwischen Blut und proaggregatorischen Faktoren des Subendothels. Zudem synthetisiert und sezerniert es Thrombozyten-hemmende Faktoren wie die Autakoide Stickstoffmonoxid (NO; früher: *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF)), Prostaglandin I₂ oder die Gruppe der sogenannten *endothelium-derived hyperpolarizing factors* (EDHF). Zu letzterer zählen beispielsweise als Derivat der Arachidonsäure die Epoxy-Eicosatriensäure (EET), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Kohlenmonoxid (CO) [23, 24] oder Schwefelwasserstoff (H₂S) [25], welche das thrombozytäre Membranpotential über Calcium-abhängige Kaliumkanäle zu beeinflussen scheinen. In den letzten Jahren konnte in unserer Gruppe gezeigt werden, dass die Hemmung dieser endothelialen Faktoren oder von Kaliumkanälen zu verstärkten Thrombozyten-Endothel-Interaktionen und arteriellen Thrombosen *in vivo* führt [26-30]. NO, was aus Endothelzellen durch biochemische (Thrombin, Serotonin, ADP, Acetylcholin) oder mechanische Stimuli (hohe Scherkräfte) freigesetzt wird, übt seine hemmenden Effekte auf Thrombozyten über einen cGMP-abhängigen Signalweg aus [31, 32]. Prostaglandin I₂ als Hauptmetabolit der Arachidonsäureverstoffwechselung in Endothelzellen vermittelt seine Wirkung in Thrombozyten über cAMP-abhängige Signalwege [31]. Diese beiden cyclischen Nukleotide (cAMP/cGMP) gelten als Inhibitoren von Thrombozytenadhäsion, -sekretion und -aggregation und vermitteln ihre Wirkung über verschiedene Mechanismen wie die Regulierung der Myosin-Leichtketten-Kinase, das Zytoskelett oder die von ihnen aktivierten Proteinkinasen [32]. Beide Signalwege (cAMP, cGMP) führen zu einer verminderten Ca²⁺-Mobilisierung in den Thrombozyten und verringern die Freisetzung von Signalmolekülen aus den Granula, welche für weitere Rekrutierungs-, Aktivierungs- und Aggregationsvorgänge benötigt würden [31, 32].

Kommt es zur Verletzung des Gefäßendothels mit Freilegung der subendothelialen Matrix werden die Thrombozyten innerhalb von Sekunden aus dem zirkulierenden Blut an den Ort der Gefäßverletzung rekrutiert und bilden dort ein Thrombozytenaggregat. Dies geschieht durch vielfältige direkte oder indirekte Interaktionen zwischen den Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten und den Proteinen der subendothelialen Matrix wie Collagen, Fibronectin, Laminin oder Thrombospondin. Unter Bedingungen mit hohen Scherkräften wie beispielsweise in Arteriolen, kleinen oder stenosierten Arterien werden die ersten Schritte der Thrombozytenadhäsion durch die Interaktion zwischen dem Collagen des Subendothels, dem löslichen von Willebrand Faktor (vWF) des Blutes und dem Glykoprotein GPIb/V/IX-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche vermittelt [33]. Infolgedessen kommt es durch weitere Interaktionen des subendothelialen Collagens mit den Rezeptoren α₂β₁-Integrin und Glykoprotein GPVI auf Seiten der Thrombozyten zu deren fester Adhäsion an die verletzte Gefäßwand. Die daraus resultierende Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führt zur Formänderung mit Oberflächenvergrößerung und Sekretion weiterer prothrombotischer Faktoren aus

den Thrombozyten. Bei den freigesetzten Signalmolekülen handelt es sich um auto- und parakrine Mediatoren wie Adenosindiphosphat (ADP) und Serotonin aus den *dense*-Granula oder Thromboxan A_2 , welches nach Aktivierung durch die COX-1 aus Arachidonsäure gebildet und sezerniert wird. Diese bewirken über die Bindung an ihre entsprechenden membranständigen Rezeptoren die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten an den Ort der Gefäßverletzung mit Größenzunahme und Stabilisierung des primären Thrombozytenaggregats. Gemeinsamer Endpunkt der die Thrombozyten-aktivierenden Signalwege ist die Überführung des Integrins $\alpha IIb\beta 3$ in einen aktivierten Zustand und die Bindung von Fibrinogen an diesen. Parallel dazu kommt es durch die Phospholipide der Thrombozytenmembran zur Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Bildung der Serinprotease Thrombin, welche durch Abspaltung der Fibrinopeptide Fibrinogen zu Fibrinmonomeren hydrolysiert. Diese Fibrinmonomere polymerisieren, vernetzen über Faktor XIII Thrombozyten und sind damit für die Ausbildung eines stabilen Thrombus verantwortlich [14, 34-38].

1.1.4 Aspirin in kardiovaskulären Erkrankungen

Acetylsalicylsäure (Aspirin) ist weltweit das am meisten eingesetzte Medikament zur Thrombozytenhemmung. Seine Wirkung entfaltet Aspirin durch die Acetylierung der Aminosäure Serin 529 im katalytischen Zentrum der Cyclooxygenase 1 (COX-1), wodurch es zur irreversiblen Hemmung des Enzyms kommt. In Thrombozyten wird Arachidonsäure nicht mehr zu Thromboxan A_2 umgesetzt, was zu einer verminderten Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten und deren anschließender Aggregation führt. Da es sich bei Thrombozyten um kernlose Zellen handelt, können diese im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen keine neuen Proteine synthetisieren. Die Aspirin-induzierte Hemmung der COX-1 besteht somit für die restliche Lebenszeit der Thrombozyten von bis zu 10 Tagen. Die COX-1 ist ein konstitutiv in den meisten Zellen exprimiertes Enzym und somit wird neben der Thromboxan A_2 -Synthese in Thrombozyten die Synthese der zellprotektiven Prostaglandine (PG) D_2 , E_2 , F_2 und I_2 in Endothelzellen, Magenmukosa und Niere inhibiert.

Neben der irreversiblen Hemmung der TxA_2 -Synthese in Thrombozyten kommt es durch die verminderte Produktion der Prostaglandine zu unerwünschten Effekten in anderen Geweben. Von klinischer Relevanz sind gastrointestinale Nebenwirkungen wie Magenblutungen oder Ulzerationen. Hervorgerufen werden diese durch die verminderte Produktion von Prostaglandin E_2 (PGE_2) in den Magenzellen und glatten Muskelzellen des Magens. Unter physiologischen Bedingungen inhibiert PGE_2 die Säuresekretion in den Belegzellen des Magens, fördert die Durchblutung der Magenschleimhaut und stimuliert zum Schutz vor Magensäure die Bikarbonat (HCO_3^-)-Sekretion aus den Epithelzellen des Magens. Zudem kann es zur Verschlechterung der Nierenfunktion mit verminderter Natriumausscheidung, Ödemen und arterieller Hypertonie kommen. Dies ist besonders

bei Patienten mit aktiviertem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wie arterieller Hypertonie, Leberzirrhose, Herz- oder Niereninsuffizienz relevant. Hier dient das vasodilatierende PGE₂ der Aufrechterhaltung der Nierenfunktion, welches der Vasokonstriktion durch Angiotensin II entgegenwirkt.

Für die Langzeittherapie im Sinne der Sekundärprävention zeigte sich in Studien, dass Dosen von 75 - 100 mg täglich effektiv für die antithrombozytäre Therapie sind, während in Akutsituationen eine Initialdosis von mindestens 500 mg indiziert ist, um eine ausreichende Thrombozytenhemmung zu erreichen [10, 39].

Das Isoenzym COX-2 ist konstitutiv exprimiert in einigen Zellen des Gefäßsystems wie z.B. Endothelzellen und durch auto- und parakrine Freisetzung von Prostaglandinen v.a. Prostaglandin I₂ an der Regulation der Gefäßfunktion beteiligt. Zusätzlich scheint die Regulation der COX-2 von lokalen Entzündungsreizen abhängig zu sein und die Expression wird durch proinflammatorische Mediatoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Lipopolysaccharid reguliert. Dies geschieht vor allem in Zellen, die selbst an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, wie beispielsweise Makrophagen oder Monozyten. Die COX-2 zeigt eine deutlich geringere Affinität für die Aspirinwirkung, weshalb v.a. bei *low-dose* Aspirintherapie (75 - 100 mg/Tag) kaum Effekte auf die Prostaglandinsynthese zu beobachten sind [39, 40].

1.2 Schwefelwasserstoff-freisetzendes Aspirin

1.2.1 Schwefelwasserstoff

Schwefelwasserstoff (H₂S) ist ein farbloses Gas mit einem charakteristischen Geruch nach faulen Eiern. Jahrelang galt H₂S als industrieller Schadstoff mit hoher berufsbedingter Gesundheitsgefahr. Es entsteht unter anderem bei Fäulnisprozessen, in Gaswerken oder Erdölraffinerien und kann sich in Abwasserkanälen von Fabriken oder dem Boden vulkanischer Gebiete ansammeln. Dennoch ist die Annahme, dass H₂S nützliche Effekte haben könnte, nicht neu. Seit Jahrhunderten wurden H₂S-haltige Bäder zur Schmerz- und Entzündungsreduktion, zur Stärkung des Immunsystems oder zur Verbesserung der Durchblutung angewendet. Zusammen mit Stickstoff (NO)- und Kohlenmonoxid (CO) zählt H₂S zu den endogen synthetisierten Gasotransmittern. Diese werden vom Körper selbst synthetisiert, können über Membranen diffundieren und besitzen eine kurze Halbwertszeit. H₂S wird in geringen Konzentrationen vom Körper selbst aus L-Cystein durch die Enzyme Cystathion-γ-Lyase (CSE) und Cystathion-β-Synthase (CBS) hergestellt und erreicht Serumspiegel von ca. 30 - 100 µM. Während diese Gasotransmitter in physiologischen Konzentrationen nützlich sind, können sie in höheren Konzentrationen schädlich für den Organismus sein und beispielsweise die Atmung

beeinträchtigen [41-46]. Die Effekte von H₂S auf den Stoffwechsel sind vielfältig. In einer Studie, in der Neuronen oxidativem Stress ausgesetzt wurden, zeigte H₂S antioxidative Eigenschaften. Die Behandlung mit H₂S schützte die Neurone vor dem Zelltod durch Erhöhung ihrer intrazellulären Glutathionkonzentration [44, 47, 48].

Zusätzlich konnten in mehreren Studien kardioprotektive Effekte von H₂S beobachtet werden [49, 50]. Es konnte gezeigt werden, dass H₂S glatte Muskelzellen relaxieren kann und somit vasodilatierende und Blutdruck-senkende Eigenschaften besitzt. Die Relaxation der glatten Muskelzellen scheint durch die Aktivierung ATP-abhängiger K⁺-Kanäle und die daraus resultierende Hyperpolarisation der Zellen hervorgerufen zu werden. H₂S gehört somit zur Gruppe der *endothelium-derived hyperpolarizing factors* (EDHF) [25]. Zusätzlich wird die H₂S-induzierte Vasodilatation über eine Hemmung der Aktivität der Phosphodiesterase und die damit verbundene Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration vermittelt [51]. Übereinstimmend damit konnte in einer tierexperimentellen Studie mit Mäusen beobachtet werden, dass ein Mangel an H₂S mit erhöhten Blutdruckwerten und einer verminderten Endothel-abhängigen Vasodilatation einhergeht [52-57]. In einem Ischämie-Reperusions-Model wirkte sich H₂S protektiv auf Infarktgröße und linksventrikuläre Funktion aus [58, 59].

Neben kardiovaskulären Effekten zeigte H₂S antiinflammatorische Eigenschaften [57, 60, 61] wie reduzierte Leukozytenadhäsion an das Gefäßendothel [62] durch verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten (LFA-1) und Endothelzellen (ICAM-1), sowie eine reduzierte Leukozytenextravasation und Ödembildung [62, 63]. Zusätzlich wird beschrieben, dass H₂S in Makrophagen die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Hochregulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermindern kann [64] und in LPS-stimulierter Mikroglia die TNF- α Bildung reduzieren kann [60]. Die Rolle von H₂S bei inflammatorischen Prozessen ist allerdings noch nicht hinreichend untersucht. Neben den antiinflammatorischen werden auch proinflammatorische Eigenschaften für H₂S beschrieben, wie beispielsweise die Hochregulation von Zytokinen und Chemokinen in humanen Monozyten bei Sepsis oder eine verstärkte Leukozytenadhäsion in jejunalen Blutgefäßen [57].

1.2.2 Schwefelwasserstoff-freisetzende NSAIDs

Seit mehreren Jahren wird versucht die herkömmlichen Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs; deutsch: NSAR für Nicht-steroidale Anti-Rheumatika) so zu modifizieren, dass deren Nebenwirkungsrate vor allem bezüglich der gastrointestinalen Toxizität verringert wird.

Zu Beginn der 1990er Jahre wurden zunächst Stickstoffmonoxid (NO)-freisetzende NSAIDs entwickelt, bestehend aus dem ursprünglichen NSAID (z.B. Aspirin, Diclofenac, Naproxen, Flurbiprofen), welches über eine Esterbindung mit einem NO-freisetzenden Rest verbunden wurde

[65, 66]. Die Untersuchungen von NO bezüglich seiner Wirkung auf den Organismus begannen in den frühen 1980er Jahren und seine Rolle als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) wurde entdeckt. Dafür erhielten 1998 die drei Forscher Murad, Furchgott und Ignarro den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Neben der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur zeigte NO antithrombozytäre und immunmodulatorische Eigenschaften [44, 53, 67]. Andererseits kann NO durch seine reaktiven Eigenschaften zellschädigende Effekte vermitteln. Unter Bedingungen von oxidativem Stress kann es mit Superoxiden reagieren, woraus die Bildung toxischer Metabolite wie Peroxynitrit resultiert [54, 68], welche verschiedenste Zellbestandteile nitrieren, nitrosieren oder oxidieren können. Die Folgen sind mitochondriale Dysfunktion, DNA Schäden, verstärkte Expression von Oberflächenmolekülen oder Apoptose [69].

In den ersten Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit NO-freisetzenden NSAIDs (NO-Aspirin, -Naproxen, -Flurbiprofen, -Diclofenac) weniger gastrointestinale Läsionen zur Folge hatte. In diesen Studien inhibierten sowohl das herkömmliche wie auch das NO-freisetzende NSAID die Synthese des magenprotektiven Prostaglandin E₂ gleichwertig [70-72]. Verantwortlich für die durch NO-NSAIDs vermittelten gastroprotektiven Effekte scheinen vielmehr eine verminderte Leukozyten-Endothel-Interaktion in der Mikrozirkulation des Magens, sowie eine gesteigerte Mukusproduktion zu sein. Zusätzlich vermittelten die NO-NSAIDs antiinflammatorische Effekte durch eine reduzierte Produktion von Zytokinen wie Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-18, Interferon γ und TNF α , welche COX-unabhängig aber NO-abhängig zu sein scheinen [43, 65]. Bezüglich Aspirin konnte in einer im Jahr 2004 an gesunden Probanden durchgeführten Studie beobachtet werden, dass die Behandlung mit einem NO-freisetzenden Aspirin verglichen mit dem ursprünglichen Aspirin das Auftreten gastrointestinaler Läsionen deutlich reduzieren konnte. Zusätzlich inhibierte das NO-Aspirin die Thrombozytenfunktion gleichwertig zu Aspirin gemessen an der Arachidonsäure-induzierten Aggregation und der Thromboxan A₂ Freisetzung. Im Jahr 2007 musste die Weiterentwicklung des NO-Aspirins eingestellt werden, da sich einer seiner Metabolite (NCX4015) in *in vitro* Studien als mutagen erwies [43, 73].

In den letzten 20 Jahren deutete sich zunehmend an, dass Schwefelwasserstoff (H₂S) von medizinischem Interesse sein könnte, da es nahezu alle positiven Eigenschaften von NO zu besitzen scheint, es allerdings im Rahmen der weiteren Verstoffwechslung nicht zur Bildung toxischer Metabolite wie Peroxynitrit kommt. Vielmehr scheint H₂S durch seine antioxidativen Eigenschaften die schädlichen Auswirkungen von Peroxynitrit auf den Organismus minimieren zu können [74]. Somit ist in den letzten 10 Jahren mit H₂S ein weiterer endogen synthetisierbarer Gasotransmitter Gegenstand für die Weiterentwicklung von NSAIDs geworden. Ähnlich den NO-NSAIDs wurden H₂S-freisetzende NSAIDs entwickelt, bestehend aus dem ursprünglichen NSAID in Verbindung mit einem Dithiolethionmolekül. In ersten tierexperimentellen Studien mit einem H₂S-freisetzenden Diclofenac konnten im Vergleich mit dem herkömmlichen Diclofenac nach mehrtägiger oraler

Behandlung weniger gastrointestinale Mukosaschäden beobachtet werden. Im Verlauf führte dies schließlich zu einer Reduktion an gastrointestinalen Blutungen [63]. Zudem zeigte dieses H₂S-freisetzendes Diclofenac im Vergleich zu Diclofenac eine stärkere antiinflammatorische Wirkung in einem systemischen Inflamationsmodell (LPS-induzierter endotoxischer Schock) mit deutlich reduzierten Plasmakonzentrationen der proinflammatorischen Moleküle TNF α und IL-1 β , sowie erhöhte Plasmalevel des antiinflammatorischen IL-10 [41, 43, 75, 76].

1.2.3 ACS14

Bei ACS14 handelt es sich um ein Schwefelwasserstoff (H₂S)-freisetzendes Aspirinderivat mit der chemischen Formel 2-acetyloxybenzoic acid 4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5-yl)phenyl Ester. Diese Verbindung besteht aus einem Aspirinmolekül, welches über eine Esterbindung mit einem Dithiolethion-Molekül (ADTOH) verbunden ist [77]. Letzteres enthält drei Sulfhydrylgruppen, aus welchen H₂S freigesetzt werden kann [75, 77].

In kinetischen und metabolischen Tierversuchsreihen zeigte sich, dass ACS14 zu folgenden Endprodukten verstoffwechselt wird: Salicylsäure, ADTOH und ACS21, einer H₂S-freisetzenden Salicylsäure (Abbildung 1.1). Sowohl nach intravenöser als auch intraperitonealer Verabreichung von ACS14 an Nagetiere konnte ein deutlicher Anstieg des im Blut zirkulierenden H₂S beobachtet werden, welcher bis zu 24 Stunden nachweisbar war [77, 78].

In den ersten tierexperimentellen Versuchsreihen verminderte ACS14 im Vergleich zu Aspirin nach wiederholter oraler Verabreichung in ähnlichem Ausmaß das Plasmalevel des Cyclooxygenaseproduktes Thromboxan B₂. Zudem konnten weniger gastrointestinale Ulzerationen beobachtet werden. Ursächlich hierfür scheint die Fähigkeit von ACS14 zu sein, durch die Freisetzung von H₂S in das zelluläre Reduktions-Oxidations-System eingreifen zu können. So konnten erhöhte Glutathion (GSH)-Konzentrationen, sowie eine verstärkte Expression der Hämoxygenase-1 (HO-1) gemessen werden. Für letztere ist beschrieben, dass sie die Magenmukosa gegenüber oxidativem Stress schützen und die Ulkusheilung fördern kann [77]. Übereinstimmend dazu zeigte eine kürzlich veröffentlichte Studie, dass die zusätzliche Gabe des H₂S-Donors NaHS vor Aspiringabe die Rate der durch Aspirin verursachten Magenschäden signifikant reduzieren kann [79].

In einer weiteren tierexperimentellen Studie wirkte sich die Behandlung mit ACS14 positiv auf Blutdruck und Blutzucker bei metabolischem Syndrom aus. Hier wurde mittels Depletion von Glutathion ein metabolisches Syndrom mit arterieller Hypertonie und Hyperglykämie induziert. Durch Behandlung mit ACS14 konnten im Vergleich zu Aspirin für Blutdruck und Blutzucker nahezu die Werte gesunder Tiere erreicht werden. Außerdem wurde mittels Acetylcholin die Endothel-abhängige

2 FRAGESTELLUNG

Angesichts der Bedeutung von Aspirin für die Medizin wurde in der vorliegenden Studie untersucht, inwiefern der neue Wirkstoff ACS14 die Thrombozytenaggregation im Vergleich zu Aspirin in isolierten Thrombozyten *ex vivo* und im Tierversuchsmodell *in vivo* hemmen kann.

Das Ziel der vorliegenden Studie war deshalb die Untersuchung folgender Themen:

- Hemmt ACS14 wie Aspirin die Thrombozytenaggregation?
- Beeinflusst die Behandlung mit ACS14 Entstehung und Progression arteriolärer und arterieller Thromben *in vivo*?
- Was sind die Mechanismen der antithrombozytären Wirkung von ACS14?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 *In vitro* und *ex vivo* Versuche

3.1.1 Thrombozyten- und Blutspender

Die Blutabnahme erfolgte aus der Ellenbeugevene (V. cubitalis) gesunder Probanden, welche eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben hatten und keine auf die Thrombozytenfunktion wirkenden Medikamente in den letzten 10 Tagen eingenommen hatten. Die Studie erfüllt die Kriterien der *Deklaration von Helsinki*.

3.1.2 Thrombozytenaggregation im Vollblut

Die Thrombozytenaggregation wurde im Vollblut mittels Impedanzaggregometrie unter Verwendung des Multiplate (multiple platelet functional analyzer) Assays gemessen. Das Messprinzip beruht darauf, dass sich Thrombozyten nach Aktivierung an Drähte anheften. Durch die Anheftung erhöht sich der elektrische Widerstand an den Drähten. Die Änderung des elektrischen Widerstands wird kontinuierlich über 6 Minuten gemessen und als mean arbitrary units (AU) ausgedrückt.

3.1.2.1 Thrombozytenaggregation in humanem Vollblut

Die Blutabnahme erfolgte in Hirudin (13 µg/mL) enthaltende Röhrchen (Sarstedt), um Veränderungen an der physiologischen Calciumkonzentration zu verhindern. Die entnommenen Blutproben ruhten für mindestens 30 Minuten, um die Wirkung endothelial freigesetzter Prostaglandine abklingen zu lassen, und wurden innerhalb von 30 bis 180 Minuten nach Abnahme analysiert. Jede Testzelle wurde mit 300 µL Vollblut befüllt, mit 300 µL Natriumchlorid-Lösung (0.9 %; 37 °C) verdünnt und im Anschluss mit verschiedenen Konzentrationen Aspirin, ACS14 oder NaHS bei 37 °C unter konstantem Verrühren (800/min) mit einem Polytetrafluorethylen-beschichteten magnetischen Rührstab inkubiert. Zur Aggregationsinduktion wurden Arachidonsäure, Thrombin Receptor Activating Protein (TRAP), Adenosindiphosphat (ADP) oder Collagen verwendet. Hierfür wurden die vom Hersteller bezogenen Substrate, welche als Pulver in Glasflaschen vorliegen, mit je 1 mL Aqua dest. gelöst und in der für das klinische Monitoring eingesetzten Konzentration (Arachidonsäure (0.5 mmol/L),

TRAP (32 $\mu\text{mol/L}$), ADP (6.5 $\mu\text{mol/L}$) und Collagen (3.2 $\mu\text{g/mL}$)) unter konstantem Verrühren (800/min) bei 37 °C den Proben hinzugefügt.

3.1.2.2 Thrombozytenaggregation in murinem Vollblut

Für die Messung der Thrombozytenaggregation in murinem Vollblut war das Vorgehen ähnlich dem Versuchsablauf der humanen Thrombozytenaggregation. Nachdem die Tiere an 6 aufeinanderfolgenden Tagen mit Aspirin, ACS14 oder Trägersubstanz gefüttert worden waren, erfolgte 2 bis 4 Stunden nach der letzten Gabe die Blutabnahme mittels kardialer Punktion bei anästhesierten Mäusen mit einer 27 G Punktionsnadel. Um die Koagulation zu verhindern wurde den Blutproben Hirudin (13 $\mu\text{g/mL}$) hinzugefügt. Die Analyse der Proben erfolgte analog zu humanen Proben. Als Agonisten wurden Arachidonsäure und ADP verwendet.

3.1.3 Plasmatische Gerinnung

Die plasmatische Gerinnung wurde mittels Thrombelastometrie untersucht. Hierbei werden im Vollblut die Gerinnungseigenschaften des Blutes, die Festigkeit des entstehenden Thrombus und dessen anschließende Auflösung für das intrinsische wie auch das extrinsische Koagulationssystem analysiert. Im Unterschied zur Impedanzaggregometrie werden bei der Thrombelastometrie die Thrombozyten nicht direkt mittels Agonisten wie Arachidonsäure, ADP, TRAP oder Collagen aktiviert, sondern indirekt nach Induktion des extrinsischen oder intrinsischen Gerinnungssystems. Damit kann der Einfluss der humoralen Gerinnungsfaktoren des Plasmas auf die Aggregation untersucht werden. In den mit Vollblut befüllten Messküvetten befindet sich ein zylindrischer Stempel, welcher sich während der Messung dreht. Solange noch keine Gerinnung eingesetzt hat, ist diese Bewegung uneingeschränkt möglich, und wird mit Beginn der Gerinnung zunehmend verlangsamt. Diese kinetischen Veränderungen werden optisch erfasst und über die gesamte Analysezeit aufgetragen.

Die Blutabnahme erfolgte in 10 % Natriumcitrat (0.11 mol/L) enthaltende Blutentnahmeröhrchen. Für die Messung wurden in das Probengefäß je 20 μl Calciumchlorid (200 mmol/L) zur Recalcifizierung und des entsprechenden Aktivierungsreagenz vorgelegt. Zur Aktivierung des intrinsischen Signalwegs wurde partielles Thromboplastin-Phospholipid aus Kaninchenhirn verwendet und für den extrinsischen Signalweg rekombinantes Gewebethromboplasmin. Nach Zugabe von 300 μL Citratblut (3.13 %), welches zuvor mit Aspirin oder ACS14 inkubiert worden war, und der Vermischung mit den Aktivierungsreagenzien, wurde das Probengefäß in der Messposition angebracht und die plasmatische Gerinnung über mindestens 20 Minuten gemessen. Aufgezeichnet wurden die Zeit von Stimulation bis

zum Beginn der Thrombusbildung (Clotting Time; CT) und die Zeit vom Beginn der Thrombusbildung bis zur Formierung eines stabilen Thrombus (Clot Formation Time; CFT). Letztere ist unter anderem abhängig von der Thrombozytenfunktion.

3.1.4 Gewinnung isolierter Thrombozyten

Die Blutabnahme erfolgte in 10 % Natriumcitrat (0.11 mol/L) enthaltende Blutentnahmeröhrchen, um die Koagulation zu verhindern. Zunächst wurde Plättchen reiches Plasma (PRP) hergestellt. Hierfür wurde das Vollblut bei 340 G für 15 Minuten zentrifugiert. Das PRP wurde erneut bei 600 G für 10 Minuten in Gegenwart von Ilomedin (2 ng/mL) zentrifugiert und die Thrombozyten in einem Calcium-freien Resuspensionspuffer (siehe Tabelle 3.1) resuspendiert. Die erforderliche Thrombozytenkonzentration wurde für jedes Experiment nach Zählung mit einem Coulter Counter (Coulter Z2, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) eingestellt.

Tabelle 3.1 Thrombozytenresuspensionspuffer ohne Calcium

NaCl	138 mmol/L
KCl	2.7 mmol/L
NaHCO ₃	12 mmol/L
NaH ₂ PO ₄	0.4 mmol/L
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1 mmol/L
D-Glucose	5 mmol/L
Hepes	5 mmol/L
pH 7.35	

3.1.5 Kompetitiver Enzymimmunoassay

Bei einem kompetitiven Enzymimmunoassay handelt es sich um ein antikörperbasiertes Verfahren, um beispielsweise Proteine, Hormone oder Toxine in einer Probe (Serum, Urin, etc.) nachzuweisen. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass die zu analysierende Probe mit einem gegen das gesuchte Antigen gerichteten Antikörpern und einer zweiten Lösung inkubiert wird, welche ein kompetitives markiertes Antigen enthält. Beide, gesuchtes und kompetitives Antigen, konkurrieren um die Bindung am Antikörper, wobei die Bindung von Letzterem umso geringer ist, je höher die Konzentration des gesuchten Antigens in der Probe ist. Durch Zugabe eines Reporterenzym kommt es zu einem Farbumschlag, der photometrisch gemessen werden kann. Dieser ist invers proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens in der Probe. Gleichzeitig wird auch eine Standardreihe mit

bekannten Konzentrationen des gesuchten Antigens erstellt, anhand derer die Konzentration in den Proben berechnet werden kann.

3.1.5.1 Thromboxan B₂ Enzymimmunoassay

Thromboxan A₂ (TxA₂) wird in Thrombozyten nach deren Aktivierung aus Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase 1 (COX-1) gebildet. Unter physiologischen Bedingungen besitzt TxA₂ eine Halbwertszeit von ungefähr 30 Sekunden, weshalb es für Messzwecke ungeeignet ist. Aus diesem Grund wurde sein inaktiver und stabiler Metabolit Thromboxan B₂ (TxB₂) gemessen, welcher durch nicht-enzymatische Hydratation entsteht und letztlich fast ausschließlich über den Urin ausgeschieden wird. Das im Blut befindliche TxA₂ wird hauptsächlich aus Thrombozyten freigesetzt und somit dient die Messung der TxB₂-Konzentration in den Überständen stimulierter Thrombozyten und im Urin von Mäusen als Maß für die Hemmung der COX-1 in Thrombozyten, wie sie beispielsweise durch Aspirin hervorgerufen wird.

Thromboxan B₂ Konzentration im Überstand stimulierter Thrombozyten

Isolierte Thrombozyten in einer Konzentration von 100.000/μL wurden mit Aspirin oder ACS14 in äquimolarer Konzentration behandelt und mit Arachidonsäure oder Thrombin für 3 Minuten stimuliert. Durch anschließende Zugabe von Indomethacin (10 μg/mL) und die damit verbundene Hemmung der COX-1 und COX-2 wurde die weitere Bildung von TxA₂ inhibiert. Zur Abtrennung der zellulären Anteile wurde die Thrombozytensuspension bei 3.000 G zentrifugiert. Es erfolgte die sofortige Analyse der zellfreien Suspension oder die Aufbewahrung bei -80 °C. Für die Bestimmung der TxB₂-Konzentration wurde ein TxB₂ EIA Kit (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland) verwendet. Die Analyse der Proben erfolgte in Duplikaten und gemäß Herstellerangaben. Zur photometrischen Messung bei 405 nm wurde ein SpectraFluor (Tecan, Crailsheim, Deutschland) benützt.

Thromboxan B₂ Konzentration im Mausurin

Die Gewinnung der Urinproben von Mäusen erfolgte durch Punktion der Blase mit einer 29 G Spritze bei anästhesierten Tieren, welche zuvor an 6 aufeinanderfolgenden Tagen mit Aspirin oder ACS14 behandelt worden waren. Nach Abnahme wurden die Proben unverzüglich mit Indomethacin (10 μg/mL) versetzt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Die Messung der TxB₂-Konzentration im Urin wurde analog zur Konzentrationsmessung in den Überständen stimulierter

Thrombozyten mittels des TxB₂ EIA Kits (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland) durchgeführt. Zudem wurde mittels eines enzymatischen Kreatinin Detection Kits (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland) die Kreatininkonzentration in den Urinproben gemessen. Kreatinin als Nierenretentionsparameter wird in der Labormedizin als Bezugsgröße für quantitative Messgrößen verwendet, um den Konzentrierungsgrad des Urins zu berücksichtigen.

3.1.5.2 cAMP Enzymimmunoassay

Die Messung der intrazellulären Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erfolgte mittels eines Enzym Immunoassay Kits (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) in Lysaten isolierter humaner Thrombozyten. Hierfür wurden 400.000.000 isolierte Thrombozyten mit ACS14 behandelt und anschließend mittels des im Kit enthaltenen Puffers lysiert. Die Proben wurden entweder sofort untersucht oder bei -80 °C aufbewahrt. Die Analyse der Proben erfolgte in Duplikaten und gemäß Herstellerangaben. Die photometrische Messung bei 630 nm wurde mit einem SpectraFluor (Tecan, Crailsheim, Deutschland) durchgeführt.

3.1.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren zur Analyse der Eigenschaften von Zellen. Während die Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren, gibt die Streuung des Lichts Informationen über deren Zellgröße (forward scatter (FSC)), und deren innere Komplexität, wie beispielsweise das Ausmaß der Granulation (sideward scatter (SSC)). Zudem besteht die Möglichkeit Fluoreszenzfarben zu messen. Nach Inkubation von Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern, ist die im Anschluss gemessene Fluoreszenz ein Maß für die Menge des gesuchten Antigens auf der Zelloberfläche. Die Durchflusszytometrie wurde zur Quantifizierung der Thrombozytenvitalität durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials und der Caspaseaktivität verwendet. Zudem wurden die Oberflächenexpression des aktivierten Integrins α IIb β 3 und P-Selectin sowie die Bindung von Fibrinogen auf der Zelloberfläche der Thrombozyten gemessen. Die entsprechende Fluoreszenz wurde mit einem FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA) gemessen, die Ergebnisse mit der FACSDiva Software (Becton Dickinson, USA) analysiert und die Medianwerte der Fluoreszenz ausgewertet.

3.1.6.1 Messung der Thrombozytenvitalität in isolierten humanen Thrombozyten

Als Marker für die Thrombozytenvitalität wurde das mitochondriale Membranpotential mittels JC-1 Fluoreszenz gemessen. Der Hintergrund dieser Methode besteht darin, dass der positiv geladene Farbstoff JC-1 in gesunden Zellen in die negativ geladene mitochondriale Matrix eindringt und ab einer gewissen Konzentration dort akkumuliert. Diese JC-1 Aggregate werden durch UV-Licht zur Emission im roten Wellenlängenbereich (585/590 nm; PE-Fluoreszenz) angeregt. In apoptotischen Zellen dagegen verbleibt der Farbstoff im Zytoplasma, wo er in monomerer Form grün leuchtet mit einem Absorptionsmaximum bei 510/527 nm.

Als weiteres Maß für die Thrombozytenvitalität wurde die Caspaseaktivität mittels eines Poly Caspase Assay Kits (Immunochemistry, Bloomington, USA) gemessen. Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, dass das nicht toxische FLICA™ FAM-VAD-FMK Reagenz die Zelle permeabilisiert und danach an aktivierte Caspasen, wie sie in apoptotischen Zellen vorzufinden sind, irreversibel bindet. Das im Anschluss gemessene Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur intrazellulären Caspaseaktivität.

Für beide Versuche wurden isolierte Thrombozyten (Konzentration 300.00/μL) zunächst mit äquimolaren Konzentrationen von Aspirin oder ACS14 inkubiert. Zusätzlich wurden einige Proben mit A23187 inkubiert, um eine Positivkontrolle für apoptotische Zellen zu erhalten. Für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials wurden die Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 inkubiert und für die Caspaseaktivität mit dem FLICA™ FAM-VAD-FMK Reagenz. Nach erneuter Zentrifugation bei 600 G für 10 Minuten wurden die Überstände verworfen, die Thrombozyten in 400 μL Calcium-freien Resuspensionspuffer resuspendiert und die entsprechende Fluoreszenz (JC-1: 585/590 nm und 510/527 nm; Caspaseaktivität: 510/527 nm) gemessen.

3.1.6.2 Quantifizierung von Oberflächenmolekülen auf isolierten humanen Thrombozyten

Isolierte Thrombozyten in einer Konzentration von 25.000.000/mL wurden mit äquimolaren Konzentrationen Aspirin oder ACS14 behandelt. Für die Messung der Oberflächenexpression von P-Selectin und des aktivierten Fibrinogenrezeptors (Integrin αIIbβ3) wurden die Thrombozyten mit Thrombin oder ADP für 3 Minuten bei 37 °C stimuliert. Danach erfolgte die Inkubation mit APC-markiertem P-Selectin- (1:40), FITC-markiertem PAC-1-Antikörper (1:20) oder den entsprechenden Isotypkontrollen für 30 Minuten bei 37 °C im Dunkeln.

Für die Untersuchung der Fibrinogenbindung wurden die mit Aspirin oder ACS14 behandelten Thrombozyten zunächst mit APC-markiertem Fibrinogen (150 μg/mL) für 10 Minuten bei 37 °C im

Dunkeln inkubiert und anschließend mit Thrombin oder ADP für 3 Minuten bei 37 °C stimuliert. Alle Proben wurden wie oben beschrieben analysiert.

3.1.7 Adenosintriphosphat Chemilumineszenz Assay

Als Maß für die Freisetzung aus den *dense*-Granula wurde die Konzentration von Adenosintriphosphat (ATP) in den Überständen stimulierter Thrombozyten mittels des Chemilumineszenz Assays ermittelt. Hierfür wurden Thrombozyten in einer Konzentration von 250.000/μL mit äquimolaren Konzentrationen Aspirin oder ACS14 behandelt und daraufhin mit Luciferin-Luciferase Reagenz (0.2 μmol/L, 2000 U/mL jeweils) für 5 Minuten inkubiert, bevor die Stimulation mit Thrombin erfolgte. Bei der Reaktion von Luciferin mit ATP und Sauerstoff (O₂) kommt es zur Bildung von Oxyluciferin, welches sich in einem elektronisch angeregten Zustand befindet. Durch Emission eines Photons geht Oxyluciferin in den Grundzustand über. Das bei dieser Reaktion entstehende Licht wurde über 10 Minuten kontinuierlich mit einem LB 9507 Luminometer (Berthold, Deutschland) aufgezeichnet und die ATP-Konzentration der Proben anhand einer Standardreihe berechnet.



3.1.8 Western Blotting

Western Blotting ist ein Analyseverfahren, um einzelne Proteine in einer Probe zu ermitteln. Zunächst erfolgt die Auftrennung denaturierter Proteine nach der Länge ihrer Polypeptidkette und ihrer Ladung in Proteinbanden mittels Gelelektrophorese. Im Anschluss werden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo sie mittels spezifischer Antikörper gegen das gesuchte Zielantigen detektiert werden können. Diese Methode wurde verwendet, um die Menge des phosphorylierten Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) aus Thrombozyten zu bestimmen.

3.1.8.1 Herstellung von Thrombozytenlysaten

Isolierte humane Thrombozyten (400.000/μL) wurden mit äquimolaren Konzentrationen Aspirin oder ACS14 behandelt. Als Positivkontrolle für die Bildung von phosphoryliertem VASP (pVASP) wurden einige Thrombozytensuspensionen mit Ilomedin (5 nmol/L) inkubiert. Daraufhin wurden die Proben unverzüglich auf Eis gekühlt und die Thrombozyten für 10 Minuten mit 4 °C-kaltem Lysispuffer

aufgelöst (Tabelle 3.2). Zur Abtrennung des Zellabfalls wurden die Lysate für 10 Minuten bei 10.000 G und 4 °C zentrifugiert. Es erfolgte die sofortige Analyse oder die Aufbewahrung bei -20 °C.

Tabelle 3.2 Puffer zur Lyse von isolierten humanen Thrombozyten

KH ₂ PO ₄	20 mM
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	1 mM
Pefablock	1 mM
Leupeptin	1 µM
Pepstatin	1 µM
NaF	50 mM
Na ₄ O ₇ P ₂	40 mM
Na ₃ VO ₄	2 mM
Ph 7.3	

3.1.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der Thrombozytenlysate

Die Messung der Proteinkonzentration der Thrombozytenlysate erfolgte mittels eines Bicinchoninsäure (engl.: bicinchoninic acid, BCA) Protein Assay Reagent Kit. Grundlage dieser Methode ist die Biuretreaktion, bei welcher Cu²⁺ in alkalischem Medium von Proteinen zu Cu¹⁺ reduziert wird. Durch Zugabe von BCA kommt es zu einer dunkelvioletten Verfärbung der Lösung, hervorgerufen durch die Chelatbildung zwischen zwei BCA-Molekülen mit einem Cu¹⁺-Molekül. Dieser Farbumschlag wird photometrisch bei 562 nm gemessen. Für die Messung wurden 10 µL des zu untersuchenden Thrombozytenlysats pro Aushöhlung in einer 96 Mikrotiterplatte vorgelegt und danach 200 µL der BCA-Lösung (hergestellt nach Herstellerangaben) hinzugefügt. Alle Proben wurden als Triplikate gemessen. Zusätzlich wurde eine Proteinverdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA; 2 mg/mL in destilliertem Wasser) neben den zu untersuchenden Lysaten gemessen, um eine Standardkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen zu erhalten. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Proben bei 550 nm mit einem SpectraFluor (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen.

Die Proteinkonzentration wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

$$f(x) = m x + b$$

Für die Berechnung der Proteinkonzentration in μg der Probe muss oben stehende Gleichung nach x aufgelöst werden. Dabei stehen m für die Steigung der Standardkurve, b für den y-Achsenabschnitt und $f(x)$ für den gemessenen Absorptionswert.

3.1.8.3 Gelelektrophorese

Die Thrombozytenlysate mit einem Proteingehalt von 25 - 40 μg wurden mit Probenpuffer vermischt und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Danach erfolgte deren Auftrennung in einem 10 % Polyacrylamidgel (SDS-PAGE = Sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis) bestehend aus einem 4 % Sammelgel und einem 10 % Trenngel, welche von Laufpuffer umgeben wurden (Zusammensetzung von Gel und Puffer sind in Tabelle 3.3.1 und 3.3.2 aufgeführt). Gleichzeitig mit den Thrombozytenlysaten wurde ein gefärbter Größenmarker als Referenz für die Proteingröße aufgetrennt. Der Strom wurde mit 35 mA angelegt und die Auftrennung Proteine erfolgte bis die Ersten den Rand des Gels erreichten.

Tabelle 3.3.1 Gel für Elektrophorese

Trenngel (10 %)	
Destilliertes H ₂ O	20 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	12.5 mL
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 % (w/v)	0.5 mL
Acrylamid/Bisacrylamid 30 % / 0.8 % (w/v)	16.6 mL
Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)	0.25 mL
TEMED	0.025 mL

Sammelgel (4 %)	
Destilliertes H ₂ O	6 mL
Tris 0.5 M pH 8.8	2.5 mL
SDS 10 % (w/v)	0.1 mL
Acrylamid/Bisacrylamid 30 % / 0.8 % (w/v)	1.3 mL
Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)	0.05 mL
TEMED	0.01 mL

Für beide Gellösungen wurden zunächst H₂O, Tris, Acrylamid/Bisacrylamid vermischt, bevor SDS, Ammoniumpersulfat und TEMED hinzugefügt wurden. Um das Trenngel vor Austrocknung während der Polymerisation zu schützen, wurde es an der Oberkante mit Butanol bedeckt, welches genauestens mit destilliertem Wasser ausgespült wurde, bevor das Sammelgel an dessen Stelle gegossen wurde.

Tabelle 3.3.2 Puffer für Elektrophorese

Probenpuffer	
Tris HCl pH 6.8	0.0625 M
SDS	2 %
Glycerin	10 %
Bromphenolblau	0.005 %
Mercaptoethanol	100 mM
Laufpuffer	
Tris Base	24.76 mM
Glycin	191.82 mM
SDS	3.46 mM

3.1.8.4 Blotting

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels semi-dry Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurden die Nitrozellulosemembran und das Filterpapier in Transferpuffer eingelegt (Tabelle 3.4) und in folgender Reihenfolge in einer Kassette aufeinandergeschichtet: Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier. Die Kassette wurde in die entsprechende Halterung des Blotgerätes eingesetzt und die Proteine nach Anlage eines elektrischen Feldes von 50 Volt für 2 Stunden auf die Membran übertragen, wobei sie ihre zuvor auf dem Gel erhaltene Anordnung beibehalten haben. Auf dieser Membran können die gesuchten Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

Hierfür wurde die Membran zunächst mit 5 % (w/v) BSA (phospho-VASP-Antikörper) oder 2.5 % (w/v) Milchpulver (VASP-Antikörper) in TBS/T für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt, womit eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran verhindert wird. Die Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper (phospho-VASP- (1:1000 in 5 % BSA), VASP-Antikörper (1:1000 in 2,5 % Milchpulver) erfolgte bei 4 °C über Nacht. Die ungebundenen Anteile der Erstantikörper wurden durch 3-maliges 5-minütiges Waschen mit TBS/T entfernt. Danach wurde die Membran für 1 Stunde mit dem entsprechenden Zweitantikörper (Anti-Hase; 1:5000 in TBS/T; konjugiert mit Meerrettichperoxidase) bei Raumtemperatur inkubiert. Dessen ungebundene Anteile wurden

wiederum durch den oben genannten Waschschrift entfernt. Die enzymatische Aktivität wurde nach Zugabe eines Chemilumineszenz Detection Kits für Meerrettichperoxidase gemäß Herstellerangaben mit einem Biolumineszenz Detection System an einer Digitalkamera (Sequoia) gemessen und mit WASABI Software ausgewertet.

Tabelle 3.4 Puffer für Blotting

Transferpuffer	
Glycin	39 mM
Tris-Base	48 mM
SDS	0.037 %
Methanol	10 %

Tris buffered saline (TBS)	
Tris-Base	2.42 g
NaCl	5.844 g
Destilliertes H ₂ O	Ad 1000 mL

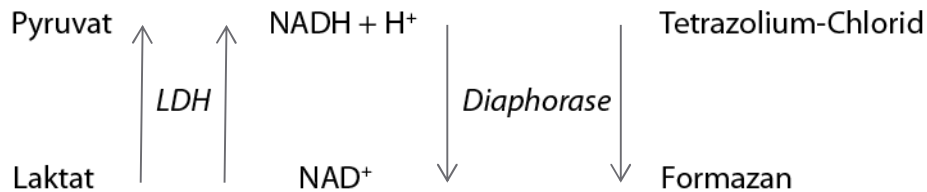
Tris buffered saline mit Tween (TBS/T)	
TBS	1 x
Tween 20	0.1 %
pH 7.6	

Puffer zum Blocken	
Bovine serum albumine (BSA)	5 % in TBS/T

3.1.9 Lactatdehydrogenase Assay

Als Maß für Zellschaden wurde die Konzentration der Lactatdehydrogenase (LDH) im Serum von unbehandelten und behandelten (Aspirin oder ACS14 für 6 Tage) Mäusen gemessen. Bei der LDH handelt es sich um ein Enzym, welches Bestandteil in allen Zellen des Organismus ist. Bei Hämolyse oder Gewebsschädigung kommt es zur Freisetzung aus den Zellen und damit zu einer erhöhten Aktivität, welche in Blut, Plasma oder Serum laborchemisch nachgewiesen werden kann. Die Blutentnahme erfolgte 2 bis 4 Stunden nach letzter Behandlung mittels kardialer Punktion mit einer 27 G Spritze bei anästhesierten Tieren. Das Vollblut wurde für 15 Minuten zur Gerinnung stehen

gelassen und anschließend zum Erhalt des Serums bei 3.000 G für 10 Minuten zentrifugiert. Bis zur weiteren Analyse wurde das Serum bei -80 °C aufbewahrt. Für die Messung der LDH-Konzentration im Serum wurde ein LDH Detection Kit (Cayman, Ann Arbor, USA) verwendet.



Im ersten Schritt katalysiert LDH die Reduktion von NAD⁺ zu NADH und H⁺ durch die Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Danach reduziert die Diaphorase mittels NADH und H⁺ Tetrazolium-Chlorid zu Formazan. Es kommt zu einem Farbumschlag, der bei 490 nm mit einem SpectraFluor (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen wurde. Die LDH-Konzentration der Proben wurde mittels Standardreihe mit folgender Formel ermittelt:

$$f(x) = mx + b$$

wobei nach x aufgelöst werden muss, um die LDH-Konzentration in U/L zu erhalten. m ist die Steigung der Standardkurve, b der y-Achsenabschnitt und $f(x)$ der gemessene Absorptionswert.

3.1.10 Kleines Blutbild

Die Anzahl der verschiedenen Blutzellen in murinem Vollblut wurde mit einem Beckman Coulter Counter (Coulter Z2, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) gemessen. Hierfür wurden die Tiere für 6 Tage mit äquimolaren Dosen Aspirin oder ACS14 behandelt und 2 bis 4 Stunden nach der letzten Gabe erfolgte die Blutentnahme bei narkotisierten Tieren durch kardiale Punktion mit einer 27 G Nadel. Diese enthielt 10 % Natriumcitrat (0.11 mol/L), um eine Koagulation des Blutes zu verhindern. Die Analyse erfolgte direkt im Anschluss.

3.2 Tierversuche

Alle tierexperimentellen Versuchsreihen wurden an Wildtyp (WT) C57-BL/6 Mäusen durchgeführt, welche von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Die Tiere wurden in der

Tierhaltung des Physiologischen Instituts München in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Sie konnten sich frei in ihren Käfigen bewegen und hatten ungehinderten Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Umgebungstemperatur betrug 24 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 %. Alle Experimente wurden nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern in Übereinstimmung mit den Paragraphen § 1, § 2 und § 2a des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt. Die Studie erfüllt die Kriterien der europäischen Richtlinie *Directive 2010/63/EU* des Europäischen Parlaments.

3.3 In vivo Versuche

3.3.1 Verabreichung von Aspirin und ACS14

Für alle Versuchsreihen wurde den Tieren Aspirin, ACS14 oder die entsprechende Menge an Trägerflüssigkeit oral verabreicht. Dies erfolgte mit einer speziellen für Fütterungszwecke geeigneten Edelstahlnadel von Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland). Aspirin und ACS14 wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (Konzentration 0.5 mol/L) und danach 1:10 in der Trägersubstanz Carboxymethylcellulose 0.5 % (w/v) verdünnt. Die den Tieren verabreichte Dosis betrug für Aspirin 23 mg/kg Körpergewicht (KG) und für ACS14 50 mg/kg KG, was einer äquimolaren Konzentration entspricht. Die gewählte Dosis entsprach den in der Literatur verwendeten Konzentrationen [77, 79, 80]. Die Medikamentengabe fand jeden Tag an 6 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils zur gleichen Uhrzeit statt, bevor am letzten Tag 2 bis 4 Stunden nach der letzten Fütterung die Narkose für die entsprechenden Versuche eingeleitet wurde.

3.3.2 Anästhesie

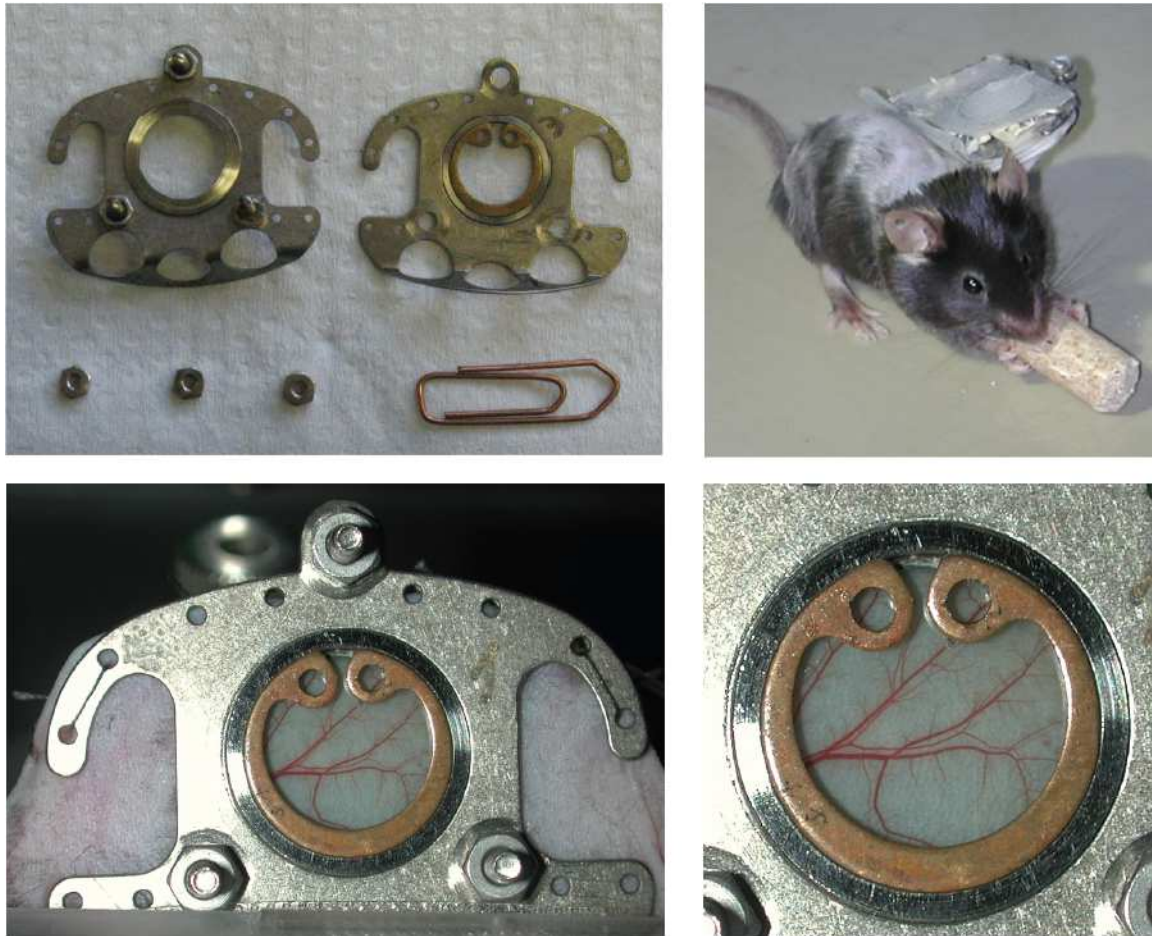
Alle chirurgischen Interventionen wurden unter Verwendung von Fentanyl (0.05 mg/kg Körpergewicht (KG)), Medetomidinhydrochlorid (0.5 mg/kg KG) und Midazolam (5 mg/kg KG) in Kurzzeitanästhesie durchgeführt. Die Anästhetika wurden dafür in Natriumchlorid 0.9 % (w/v) verdünnt und intraperitoneal verabreicht. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Tiere mit einer Überdosis Natrium-Pentobarbital (2 g/kg KG) getötet.

3.3.3 Rückenhautkammerimplantation

Das Rückenhautkammermodell wurde am Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München, Deutschland, entwickelt. Es handelt sich dabei um ein etabliertes Modell zur Untersuchung der Mikrozirkulation bei Mäusen und anderen Nagetieren [83].

Nach Anästhesie der Mäuse (siehe 3.3.2) erfolgte die Enthaarung der Tiere am Rücken zunächst mechanisch mit einem Rasierer (Aesculap) und danach chemisch mit Enthaarungscreme (Pilcamed, Schwarzkopf). Um die Augen während der Versuchszeit vor Austrocknung zu schützen, wurden sie mit Dexpanthenol Heilsalbe (Roche Deutschland, Grenzach-Whylen, Deutschland) bedeckt. Nach Hautdesinfektion mit 70 %-igem Ethanol wurden die subkutanen Gefäße mittels Diaphanoskopie dargestellt und eine speziell für diesen Versuch aus Titan hergestellte Kammer bestehend aus zwei inversen Platten implantiert. Die Kammer, sowie alle chirurgischen Instrumente (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) wurden vor Beginn der Intervention sterilisiert. In der Kammer bildet ein zirkuläres Fenster den Rahmen für ein Deckglas (\varnothing 11.7 mm, Menzel, Braunschweig, Deutschland). Dieses Glas bedeckt ein kreisrundes Hautareal, worunter zuvor die Haut der einen Seite der Rückenhaut entfernt wird, so dass sich die Haut der gegenüberliegenden Seite mittels Adhäsion am Deckglas anlegen kann. Dies ermöglicht die makro- als auch mikroskopische Beobachtung der Blutgefäße der Rückenhaut (Abbildung 3.1). Die folgenden Versuchsreihen wurden mindestens 24 Stunden nach Implantation der Kammer durchgeführt. Diejenigen Tiere, bei welchen der Blutfluss in den Arteriolen der Rückenhaut nicht den regulären Flussbedingungen (verlangsamt, umgekehrte Flussrichtung) entsprach oder bei welchen sich eine Entzündung oder Implantations-bedingte Artefakte unter dem Deckglas zeigten, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

Abbildung 3.1



Rückenhautkammermodell

Die Rückenhautkammer besteht aus zwei inversen Titanplatten. Ein zirkuläres Fenster bildet den Rahmen für ein Deckglas, durch welches die Mikrozirkulation beobachtet werden kann. Das Modell wurde für die Beobachtung der arteriolen Thrombose nach phototoxisch induziertem Gefäßschaden verwendet. Im rechten oberen Bild ist eine Maus mit implantierter Rückenhautkammer zu sehen.

3.3.4 Katheterisierung A. carotis

Die A. carotis wurde 24 Stunden nach Implantation der Rückenhautkammer katheterisiert, um eine exakte Dosis des fluoreszierenden Farbstoffs Fluoreszein-Isocyanat (FITC)-Dextran applizieren zu können.

Die Katheterisierung wurde unter der oben beschriebenen Anästhesie durchgeführt. Hierfür wurde die rechte A. carotis communis von umliegendem Gewebe getrennt und ein 20 cm langer Polyethylenkatheter (0.28 mm Innendurchmesser, 0.61 mm Außendurchmesser; SIMS Portex, UK), der zuvor an einen Ende verdünnt worden war, kardialwärts ungefähr 0.5 cm in die A. carotis communis eingeführt. Dieser wurde sowohl am Gefäß selber als auch am umliegenden Gewebe mit einem nicht-resorbierbaren Seidenfaden (5-0, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) befestigt.

3.3.5 Intravitalmikroskopische Beobachtung der arteriolären und arteriellen Thrombose

3.3.5.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde unter Verwendung eines modifizierten Auflicht-Fluoreszenz Mikroskops (Zeiss Axiotech Vario, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt. Das für die Fotoaktivierung benötigte Fluoreszenzlicht wurde mittels einer 100 W Quecksilberlampe (Fluovac HBO100, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) erzeugt und der Wellenlängenbereich unter Verwendung des für den Versuch entsprechenden Filtersatzes eingegrenzt. Die Aufzeichnung der Bilder und Videosequenzen erfolgte mit einer Digitalkamera (AxioCam HSm, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) (Abbildung 3.2 A)

3.3.5.2 Light-dye Technik und arterioläre Thrombose

Thrombusbildung und Gefäßverschlusszeit wurden in den Arteriolen der Rückenhaut mittels *light-dye* Technik untersucht. Diese Methode beruht auf der Photoaktivierung eines fluoreszierenden Farbstoffs (Fluoreszein-Isocyanat (FITC)-Dextran) durch Fluoreszenzlicht. Dabei kommt es zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), welche das Endothel an der dem Fluoreszenzlicht exponierten Stelle schädigen. Das Ausmaß der Endothelschädigung ist abhängig von der Intensität des applizierten Fluoreszenzlichts und der Dosis des fluoreszierenden Farbstoffs. Im Verlauf kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten an das geschädigte Endothel bis zur Ausbildung eines Thrombus, welcher als Aussparung im fluoreszierenden Plasma sichtbar wird, und das Gefäß im Verlauf vollständig verschließen kann (Abbildung 3.2 B).

Die thrombotische Gefäßverschlusszeit wurde in den Arteriolen der Rückenhautkammer von unbehandelten oder mit Aspirin oder ACS14 behandelten Tieren untersucht. Während der gesamten Versuchsdauer befanden sich die Mäuse in speziellen Plexiglasröhren, um Bewegungen der Tiere zu

verhindern. Die Rückenhautkammer wurde auf einer selbst angefertigten Plexiglasplatte fixiert, welche auf dem Mikroskopisch angebracht wurde. Nach Abnahme des Deckglases von der Rückenhautkammer und während der gesamten Versuchsdauer wurde das Gewebe mit den zu beobachtenden Gefäßen mit auf 37 °C vorgewärmter Superfusionslösung (Tabelle 3.5) superfundiert. Es folgte die Injektion von 4 µl/g Körpergewicht (KG) 5 % FITC-Dextran (MW 150.000 kDa; Exzitationsmaximum $\lambda = 490$ nm, Emissionsmaximum $\lambda = 520$ nm) über den in der A. carotis liegenden Katheter. Pro Tier wurden 4 - 5 Schädigungsstellen in Arteriolen aufgesucht, welche einen Ausgangsdurchmesser von mindestens 40 µm hatten. Die Photoaktivierung von FITC-Dextran erfolgte mittels Exposition des entsprechenden Gefäßabschnitts unter oben genannter Fluoreszenzlichtquelle mit entsprechendem Filtersatz (Anregung 450 - 490 nm, Emission 515 nm; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) und Wasserobjektiv mit 40-facher Vergrößerung. Von Beginn der Schädigung bis zum vollständigen thrombotischen Verschluss der Arteriole wurden Videosequenzen (Belichtungszeit 5 Millisekunden) aufgezeichnet. Bei fehlendem vollständigem Gefäßverschluss betrug die maximale Aufnahmezeit 6 Minuten.

Tabelle 3.5 Superfusionslösung

NaCl	118 mmol/L
KCl	4.8 mmol/L
CaCl ₂	2.5 mmol/L
MgSO ₄	1.2 mmol/L
NaHCO ₃	25 mmol/L
KH ₂ PO ₄	1.2 mmol/L
pH 7.4	

3.3.6 Arterielle Thrombose A. carotis

Die arterielle Thrombose wurde in der A. carotis untersucht. Hierfür wurde der Endothelschaden chemisch mittels externer Applikation von Eisenchloridlösung (FeCl₃) induziert. Zur Visualisierung der Entstehung des Thrombus wurde der fluoreszierende Farbstoff Dihexyloxacarbocyanin Jodid (DiOC₆) verwendet. Dieser grün-fluoreszierende Farbstoff ist permeabel für alle Zellen und lagert sich aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften in den Membranen von Zellorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien ein. Dadurch kann die Anheftung der Thrombozyten am Ort der Endothelschädigung beobachtet werden (Abbildung 3.2 C).

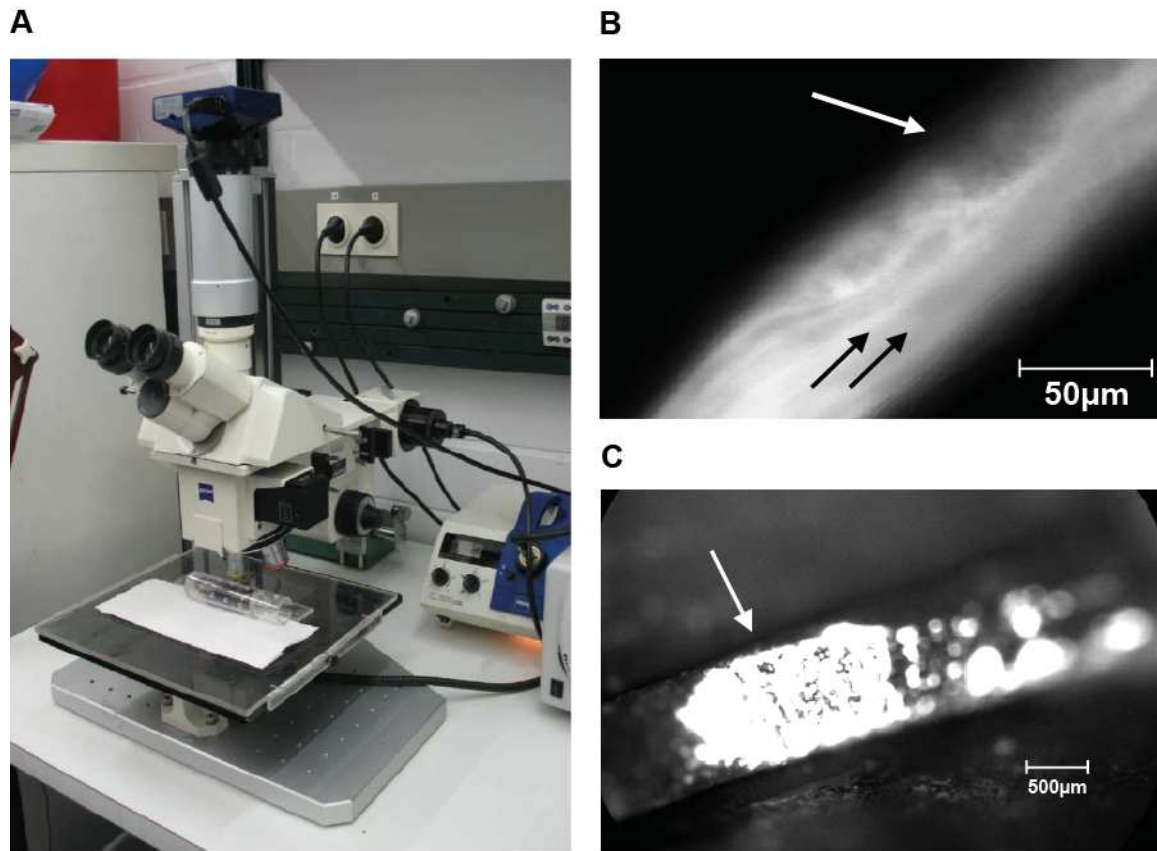
Die folgenden chirurgischen Interventionen wurden unter der oben beschriebenen Kurzzeinnarkose (siehe 3.3.2) durchgeführt. Zuerst erfolgte die Katheterisierung der linken V. jugularis, um eine genaue Dosis

DiOC₆ verabreichen zu können. Das Vorgehen war ähnlich dem der Katheterisierung der A. carotis communis. Die rechte V. jugularis wurde von umliegendem Gewebe getrennt und ein 20 cm langer Polyethylenkatheter (0.28 mm Innendurchmesser, 0.61 mm Außendurchmesser; SIMS Portex, UK), der zuvor an einen Ende verdünnt worden war, kardialwärts ungefähr 0.5 cm in die Vene eingeführt. Dieser wurde sowohl am Gefäß selber als auch am umliegenden Gewebe mit einem nicht-resorbierbaren Seidenfaden (5-0, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) befestigt.

Im Anschluss wurde die rechte A. carotis communis von ihrer Bifurkation 1 cm kardialwärts von umgebenden Gewebsschichten getrennt.

Danach wurde der Farbstoff DiOC₆ (Konzentration 100 µmol/L; Dosis 5 µl/g KG; Exzitationsmaximum $\lambda = 482$ nm, Emissionsmaximum $\lambda = 504$ nm) über den Katheter der V. jugularis injiziert. Dieser zirkulierte für 10 Minuten zur Äquilibration im Blut. Für die externe Endothelschädigung wurde ein Filterpapier (Whatman paper 1 mm²) mit Eisenchloridlösung (2 µl von 10 % FeCl₃) getränkt und für 2 Minuten auf die zuvor freigelegte A. carotis platziert. Nach Abnahme des Filterpapiers wurde die A. carotis mit Kochsalzlösung (NaCl 0.9 %) abgespült und die Thrombusbildung über 30 Minuten mit oben genanntem Fluoreszenzmikroskop mit entsprechendem Filtersatz (Anregung 475 nm, Emission 530 nm; Zeiss AxioTech Vario, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) und Objektiv mit 20-facher Vergrößerung beobachtet. Pro Sekunde wurde ein Bild (Belichtungszeit 40 Millisekunden) aufgenommen und die Thrombusgröße anhand des Fluoreszenzsignals jedes einzelnen Bildes mit der AxioVision 4.7 imaging software (Carl Zeiss) berechnet und in einem Beobachtungszeit-Thrombusgröße-Diagramm dargestellt. Letztlich wurde die kumulative Thrombusgröße über 30 Minuten berechnet, dargestellt als area under the curve (AUC).

Abbildung 3.2



Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

(A) Für die Intravitalmikroskopie wurde ein spezielles Mikroskop verwendet, welches mit einer Digitalkamera verbunden war. Dies ermöglichte die Dokumentation der Versuchsreihen mittels Foto- oder Videoaufnahmen. Während der Versuchsdauer wurden die Mäuse in einer Plexiglasröhre auf dem Mikroskoptisch befestigt, um Bewegungen der Tiere während der Beobachtungszeit zu vermeiden. **(B)** In der Mikrozirkulation der Rückenhaut zeigte sich nach der Injektion von FITC-Dextran und Endothelschädigung mittels *light-dye* Technik der wachsende Thrombus als dunkle Aussparung (weißer Pfeil) des fluoreszierenden Blutplasmas. Die schwarzen Pfeile geben die Flussrichtung in der Arteriole an. **(C)** In der A. carotis konnte nach der Injektion von DiOC₆ und Endothelschädigung durch FeCl₃ die Entstehung des Thrombus als fluoreszierende Fläche dargestellt werden (weißer Pfeil).

3.3.7 Blutungszeit

Die Blutungszeit wurde mittels Tail-Bleeding-Methode untersucht. Dabei wird die Zeit gemessen, bis eine Blutung nach Verletzung vollständig sistiert. Sie untersucht die primäre Hämostase und ist damit abhängig von Funktion und Anzahl der Thrombozyten. Nach Einleitung der Narkose (siehe 3.3.2) wurde ein 5 mm Segment des Schwanzes mit einem Skalpell abgetrennt. Dieser wurde danach unverzüglich in 0.9 %-ige Kochsalzlösung (37 °C) getaucht und die Zeit bis zum Stillstand der Blutung gemessen, maximal jedoch für 10 Minuten.

3.4 Statistische Analysen

Alle statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung von Sigma Plot 11/Sigma Stat 3.5 durchgeführt. Bei normalverteilten Daten wurde der t-test zum Vergleich von 2 Gruppen verwendet und der ANOVA Test zum Vergleich mehrerer Gruppen. Zum Vergleich zweier nicht normalverteilter Gruppen wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet und für mehrere nicht normalverteilte Gruppen ANOVA on ranks. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung vom Mittelwert dargestellt. Die Ergebnisse wurden als signifikant erklärt, wenn die Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0.05$ war.

4 ERGEBNISSE

4.1 Thrombozytenaggregation im humanen Vollblut

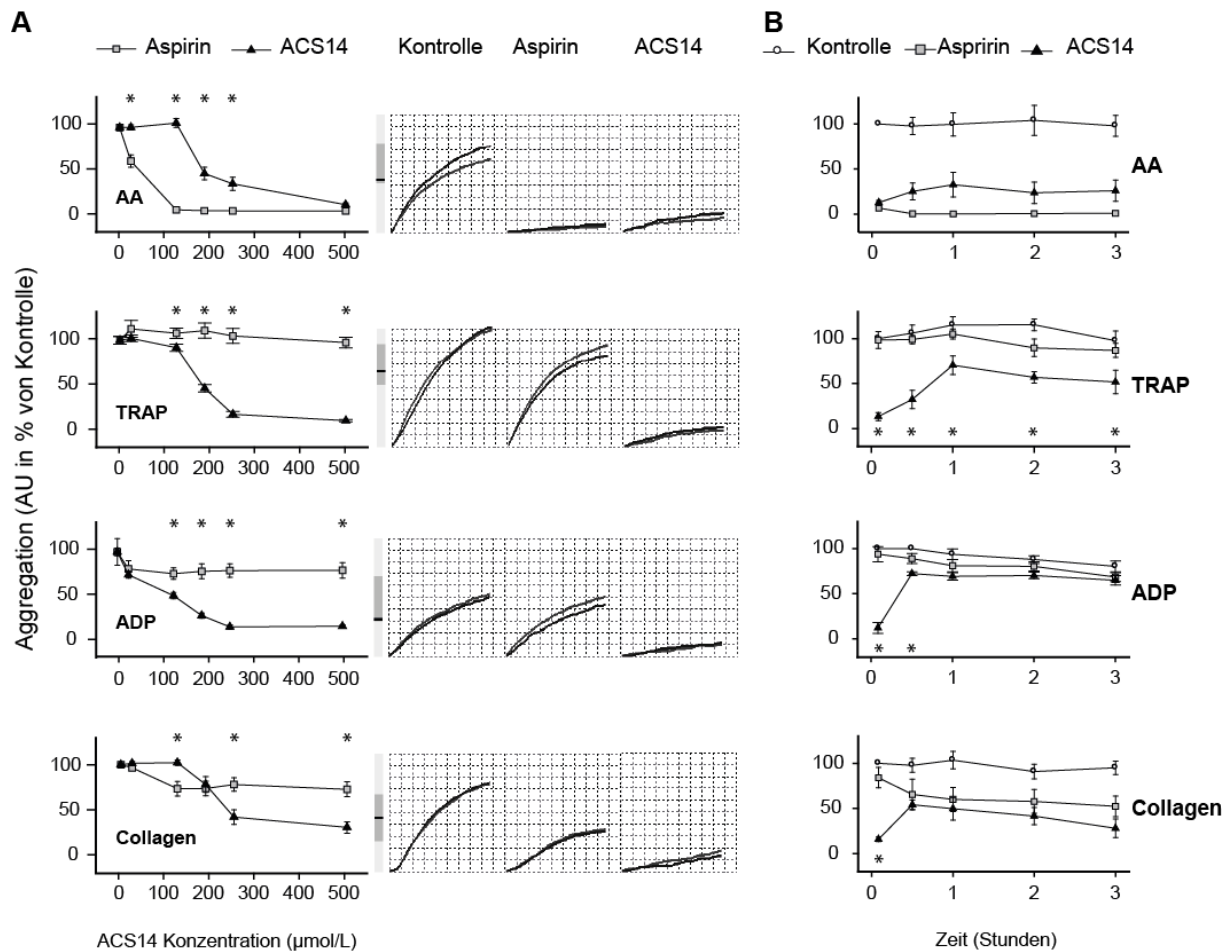
Der Einfluss von ACS14 auf die Thrombozytenaggregation wurde mittels Impedanzaggregometrie im Vollblut nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen ACS14 (25 - 500 $\mu\text{mol/L}$) untersucht. Nach 5-minütiger Inkubationszeit zeigte ACS14 eine dosisabhängige Hemmung der Arachidonsäure (0.5 mmol/L)-, Thrombin (Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP)) (32 $\mu\text{mol/L}$)-, Adenosindiphosphat (ADP) (6.5 $\mu\text{mol/L}$)- und Collagen (3.2 $\mu\text{g/mL}$)-abhängigen Aggregation (Abbildung 4.1.1 (A)).

Die Thrombozyten-hemmende Wirkung von ACS14 wurde mit der durch eine äquimolare Konzentration von Aspirin (500 $\mu\text{mol/L}$) hervorgerufenen Hemmung verglichen. Während Aspirin nur eine Reduktion der Arachidonsäure- sowie teilweise der Collagen-abhängigen Aggregation zeigte, führte ACS14 zusätzlich zu einer Inhibition der TRAP- und ADP-abhängigen Aggregation. Es zeigte sich, dass für eine gleichwertige Hemmung der Arachidonsäure-abhängigen Aggregation höhere Dosen von ACS14 als von Aspirin benötigt wurden (Abbildung 4.1.1 (A)).

Als nächstes wurde die Reversibilität der Wirkung von ACS14 auf die Thrombozytenaggregation untersucht. Dazu wurde Vollblut mit Aspirin oder ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$) für bis zu 3 Stunden inkubiert und die Aggregation zu verschiedenen Zeitpunkten (0.5, 1, 2, 3 Stunden) gemessen. Während die hemmenden Effekte von ACS14 auf die Aggregation im TRAP-, ADP- und Collagen-abhängigen Signalweg nach 30 Minuten rückläufig waren, zeigte sich die Aggregationshemmung im Arachidonsäure-abhängigen Signalweg bis zur maximal untersuchten Inkubationszeit von 3 Stunden in den ACS14- wie in den Aspirin-behandelten Proben gleichermaßen reduziert (Abbildung 4.1.1 (B)).

Um zu untersuchen, ob der hemmende Effekt von ACS14 auf die Thrombozytenaggregation durch die schnelle Freisetzung von Schwefelwasserstoff (H_2S) aus dem Molekül hervorgerufen wird, wurden Aggregationsmessungen nach Inkubation von Vollblut mit verschiedenen Konzentrationen des H_2S -Donors Natriumhydrogensulfat (NaHS) (0 - 1000 $\mu\text{mol/L}$) durchgeführt. Die Behandlung mit NaHS allein führte zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Aggregation nach Stimulation mit Arachidonsäure (0.5 mmol/L), TRAP (32 $\mu\text{mol/L}$), ADP (6.5 $\mu\text{mol/L}$) oder Collagen (3.2 $\mu\text{g/mL}$). Diese Aggregationshemmung durch NaHS war qualitativ ähnlich, quantitativ deutlich geringer ausgeprägt verglichen mit derjenigen nach Behandlung mit einer äquimolaren Konzentration (500 $\mu\text{mol/L}$) ACS14 (Abbildung 4.1.2).

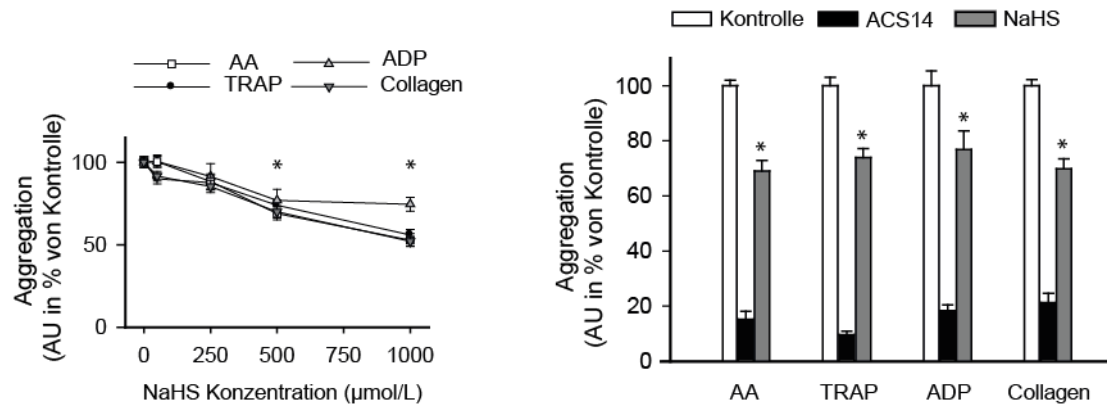
Abbildung 4.1.1



Untersuchung der Thrombozytenaggregation in humanem Vollblut mittels Impedanzaggregometrie

(A) Die Behandlung mit steigenden Konzentrationen ACS14 (25 - 500 $\mu\text{mol/L}$, 5 Minuten, 37 $^{\circ}\text{C}$) führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Aggregation nach Stimulation mit Arachidonsäure (AA) (0.5 mmol/L), TRAP (32 $\mu\text{mol/L}$), ADP (6.5 $\mu\text{mol/L}$) oder Collagen (3.2 $\mu\text{g/mL}$). Im Vergleich dazu hemmte Aspirin in äquimolarer Konzentration (500 $\mu\text{mol/L}$) nur die Arachidonsäure- und teilweise Collagen-abhängige Aggregation. Beispielaggregationskurven für Aspirin und ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$) in der rechten Spalte. * $P < 0.05$ vs. Aspirin und Kontrolle; $n = 12$; ANOVA **(B)** Nach Inkubationszeiten von bis zu 3 Stunden mit Aspirin oder ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$; 37 $^{\circ}\text{C}$) nahm die Thrombozyten-hemmende Wirkung von ACS14 im TRAP-, ADP- und Collagen-abhängigen Signalweg nach 30 Minuten ab, während die Hemmung im Arachidonsäure-abhängigen Signalweg für ACS14 wie für Aspirin unverändert blieb. * $P < 0.05$ vs. Aspirin; $n = 5$; ANOVA

Abbildung 4.1.2



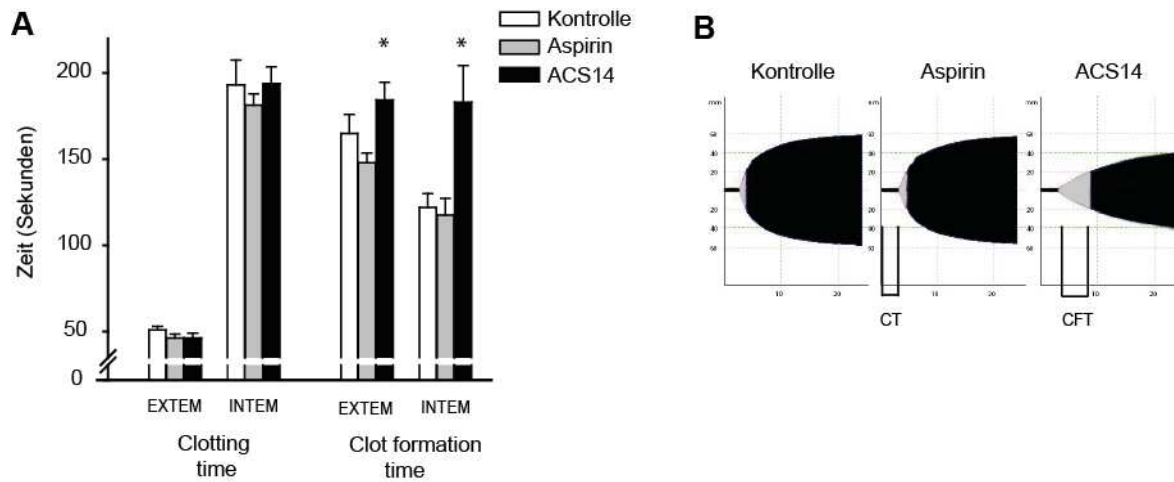
Untersuchung der Thrombozytenaggregation in humanem Vollblut mittels Impedanzaggregometrie

Inkubation von Vollblut mit steigenden Konzentrationen des H₂S-Donors NaHS (0 - 1000 µmol/L) führte nach Stimulation mit Arachidonsäure (0.5 mmol/L), TRAP (32 µmol/L), ADP (6.5 µmol/L) und Collagen (3.2 µg/mL) zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Aggregation. Verglichen mit einer äquimolaren Dosis ACS14 (500 µmol/L) war diese schwächer ausgeprägt. *P<0.05 Kontrolle; n=5; ANOVA on Ranks

4.2 Plasmatische Gerinnung in humanem Vollblut

Mittels Thrombelastometrie wurde untersucht, ob die Behandlung von Vollblut mit ACS14 zusätzlich zur Thrombozytenaggregation auch die plasmatische Gerinnung beeinflusst. Nach Behandlung von Vollblut für 5 Minuten mit äquimolaren Konzentrationen (500 µmol/L) Aspirin oder ACS14 zeigte sich die Zeit von der Stimulation bis zum Beginn der Thrombusbildung (Clotting Time (CT)) für den extrinsischen und intrinsischen Signalweg unverändert gegenüber den Kontrollen. Dagegen war die Zeit von dem Beginn der Thrombusbildung bis zu einer Thrombusstärke von 20 mm (Clot Formation Time (CFT)) in den ACS14-behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollen und Aspirin-behandelten Proben signifikant verlängert, sowohl im extrinsischen (184 +/- 10 Sekunden vs. 148 +/- 6 Sekunden bei Aspirin) als auch im intrinsischen Signalweg (183 +/- 21 Sekunden vs. 118 +/- 10 Sekunden; *P<0.05, n=12; Abbildung 4.2).

Abbildung 4.2



Untersuchung der plasmatischen Gerinnung in humanem Vollblut mittels Thrombelastometrie

(A) Die Behandlung mit Aspirin oder ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$; 5 Minuten) führte sowohl im extrinsischen als auch im intrinsischen Signalweg zu keiner Veränderung der Clotting Time gegenüber Kontrollen. Im Gegensatz dazu kam es zu einer signifikanten Verlängerung der Clot Formation Time für ACS14 behandeltes Vollblut im extrinsischen und intrinsischen Signalweg. **(B)** Repräsentative Thrombelastographen für Kontrollen, Aspirin- oder ACS14-behandeltes Blut.

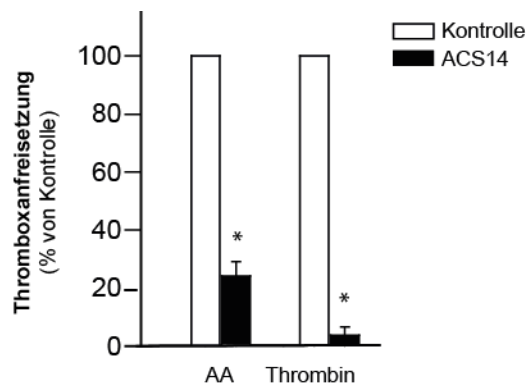
CT: Clotting Time; CFT: Clot Formation Time; EXTEM: extrinsisches Gerinnungssystem; INTEM: intrinsisches Gerinnungssystem

* $P < 0.05$ vs. Aspirin und Kontrolle; $n = 12$; ANOVA

4.3 Thromboxanfreisetzung aus stimulierten humanen Thrombozyten

Als Maß für die Hemmung der Cyclooxygenase 1 (COX-1) in Thrombozyten wurde nach deren Behandlung mit äquimolaren Konzentrationen (500 $\mu\text{mol/L}$ für 10 Minuten; 37 °C) Aspirin oder ACS14 die Konzentration von Thromboxan B₂ (TxB₂) in den Überständen stimulierter Thrombozyten gemessen. Dabei handelt es sich um den stabilen Metaboliten des aus stimulierten Thrombozyten freigesetzten Thromboxan A₂. Nach Stimulation mit Arachidonsäure (0.1 mmol/L) oder Thrombin (0.2 U/mL) zeigte sich, dass die Vorbehandlung der Thrombozyten mit ACS14 die TxB₂-Konzentration auf 24 \pm 5 % für Arachidonsäure und 4 \pm 3 % für Thrombin im Vergleich zu unbehandelten Thrombozyten verminderte. Aspirin in äquimolarer Konzentration reduzierte die TxB₂-Spiegel nahezu vollständig (n=4; Abbildung 4.3).

Abbildung 4.3



Messung der Thromboxan B₂ (TxB₂) Konzentration in den Überständen isolierter humaner Thrombozyten mittels Enzymimmunoassay

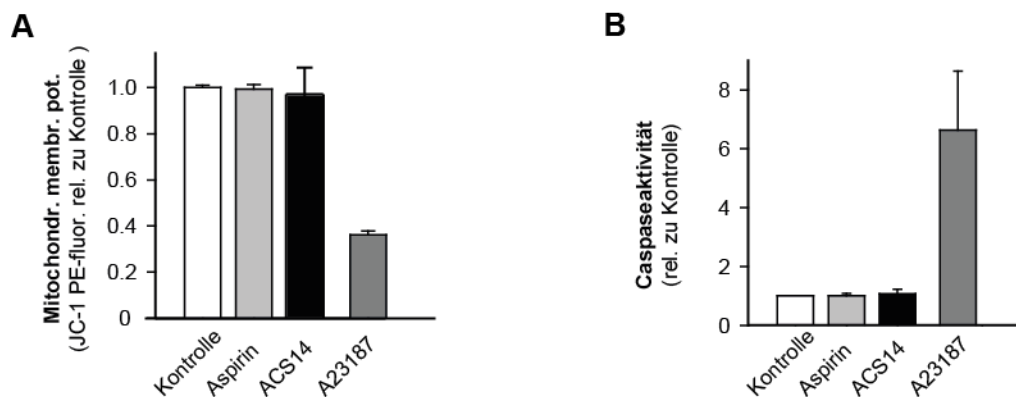
Behandlung mit ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$; 10 Minuten) führte nach Stimulation der Thrombozyten mit Arachidonsäure (AA) (0.1 mmol/L) oder Thrombin (0.2 U/mL) zur Reduktion der TxB₂-Konzentration in den Überständen isolierter humaner Thrombozyten.

*P<0.05 vs. Kontrolle; n=4; Mann-Whitney-U-Test

4.4 Thrombozytenvitalität

Als Parameter für die Thrombozytenvitalität wurden das mitochondriale Membranpotential und die Caspaseaktivität in isolierten humanen Thrombozyten nach Behandlung mit Aspirin oder ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$; 10 Minuten; 37 °C) gemessen. Dabei zeigte sich, dass weder Aspirin noch ACS14 das mitochondriale Membranpotential oder die Caspaseaktivität der Thrombozyten im Vergleich zu den Kontrollen veränderten (Abbildung 4.4).

Abbildung 4.4



Messung des mitochondrialen Membranpotentials und der Caspaseaktivität in isolierten humanen Thrombozyten mittels FACS Analyse

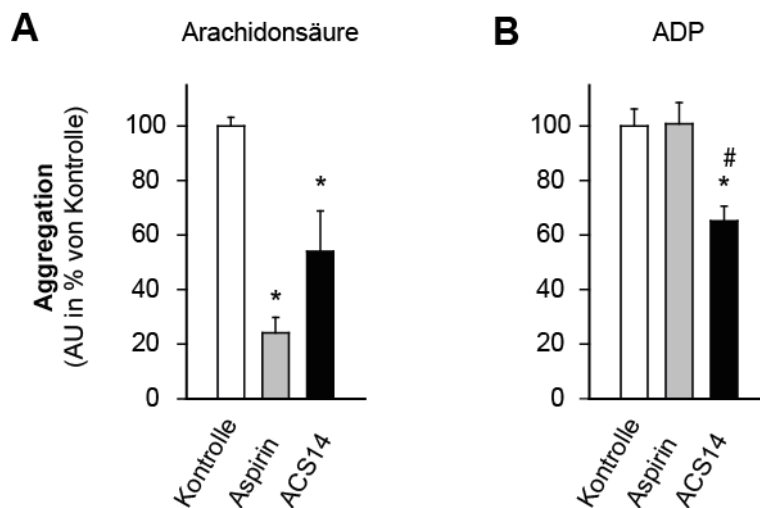
(A) Behandlung mit ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$; 10 Minuten) führte zu keiner signifikanten Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials gemessen mittels JC-1 Fluoreszenz, wie auch **(B)** der Caspaseaktivität. A23187 (10 $\mu\text{mol/L}$) wurde als Positivkontrolle verwendet, um einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials oder eine Aktivierung der Caspasen zu induzieren.

n=4

4.5 Thrombozytenaggregation in murinem Vollblut

Zunächst wurde untersucht, ob ACS14 nach repetitiver oraler Gabe ähnliche hemmende Effekte auf die Aggregation von murinen Thrombozyten hat, wie sich dies nach einmaliger Behandlung von humanen Thrombozyten zeigte. Nach oraler Behandlung der Tiere an 6 aufeinanderfolgenden Tagen mit Aspirin (23 mg/kg KG/Tag) oder ACS14 (50mg/kg KG/Tag) zeigte sich in beiden Gruppen eine Hemmung der Arachidonsäure (0.1 mmol/L)-abhängigen Aggregation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt war in der Aspirin-Gruppe stärker ausgeprägt als in der ACS14-Gruppe, allerdings ergab sich kein signifikanter Unterschied (24 \pm 5 % vs. 54 \pm 15 % zu Kontrollen; $P=0.13$; $n=6$; Abbildung 4.5 (A)). Im Gegensatz zu Aspirin reduzierte ACS14 zudem die ADP (13 μ mol/L) abhängige Aggregation (65 \pm 5 % zu Kontrollen; $*P<0.05$; $n=6$; Abbildung 4.5 (B)).

Abbildung 4.5



Untersuchung der Thrombozytenaggregation in murinem Vollblut mittels Impedanzaggregometrie nach Behandlung der Tiere an 6 aufeinanderfolgenden Tagen mit Aspirin oder ACS14

(A) Nach Stimulation der Aggregation mit Arachidonsäure (0.1 mmol/L) war diese in beiden Behandlungsgruppen signifikant reduziert verglichen mit den Kontrolltieren. **(B)** ACS14 reduzierte zusätzlich die ADP (13 μ mol/L)-induzierte Aggregation im Gegensatz zu Aspirin.

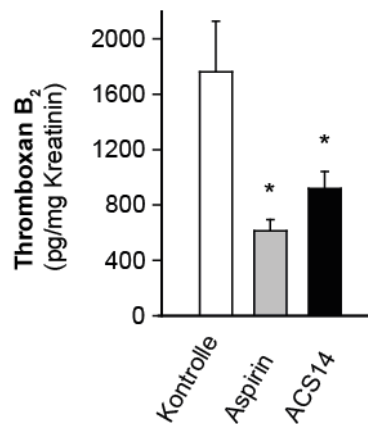
AU: mean arbitrary units

* $P<0.05$ vs. Kontrolle; # $P<0.05$ vs. Aspirin; $n=6-7$ Tiere/Gruppe; ANOVA

4.6 Thromboxankonzentration im Urin behandelter Tiere

Als Maß für die Effektivität der COX-1 Hemmung wurde die Thromboxan B₂ (TxB₂) Konzentration im Urin behandelter Tiere analysiert. TxB₂ ist der stabile Metabolit des aus Thrombozyten freigesetzten Thromboxan A₂ (TxA₂) und wird hauptsächlich über den Urin ausgeschieden. Nach Behandlung der Tiere an 6 aufeinanderfolgenden Tagen mit Aspirin (23 mg/kg KG/Tag) oder ACS14 (50 mg/kg KG/Tag) konnte in beiden Behandlungsgruppen (Aspirin, ACS14) eine signifikante Reduktion der TxB₂-Spiegel im Urin beobachtet werden (612 +/- 196 pg/mg Kreatinin für Aspirin, 920 +/- 300 pg/mg Kreatinin für ACS14 und 1760 +/- 900 pg/mg Kreatinin für Kontrollen; n=6-7 Tiere/Gruppe; Abbildung 4.6).

Abbildung 4.6



Messung der Thromboxan B₂ (TxB₂) Konzentration im Urin behandelter Tiere mittels Enzymimmunoassay

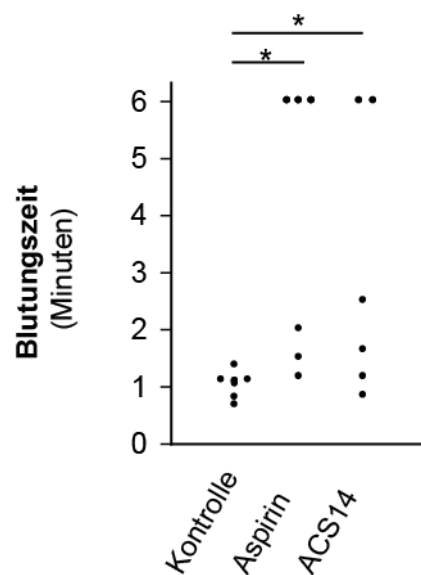
Die Ausscheidung von TxB₂ im Urin war nach 6-tägiger Behandlung der Tiere mit Aspirin (23 mg/kg KG/Tag) oder ACS14 (50 mg/kg KG/Tag) signifikant reduziert im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

*P<0.05 vs. Kontrolle; n=6-7 Tiere/Gruppe; ANOVA

4.7 Blutungszeit behandelter Tiere

Die Blutungszeit zeigte sich in beiden Behandlungsgruppen, Aspirin (23 mg/kg KG/Tag für 6 Tage) und ACS14 (50mg/kg KG/Tag für 6 Tage), signifikant verlängert im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (227 +/- 60 Sekunden für Aspirin, 181 +/- 58 Sekunden für ACS14 vs. 60 +/- 6 Sekunden für Kontrollen; n=6 Tiere/Gruppe; Abbildung 4.7). Allerdings zeigte sich kein Unterschied zwischen Aspirin und ACS14.

Abbildung 4.7



Messung der Blutungszeit mittels der Tail-Bleeding-Methode

Die Behandlung der Mäuse mit Aspirin (23 mg/kg KG/Tag) oder ACS14 (50 mg/kg KG/Tag) an 6 aufeinanderfolgenden Tagen führte zu einer signifikanten Verlängerung der Blutungszeit verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Aspirin und ACS14.

*P<0.05 vs. Kontrolle; n=6; ANOVA on Ranks

4.8 Toxizität von ACS14

Als Maß für die Toxizität wurden Blutbilder sowie die Konzentration der Lactatdehydrogenase (LDH) im Serum untersucht, um Auswirkungen der Therapie auf die zellulären Bestandteile des Blutes zu erkennen. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren, Aspirin (23mg/kg KG/Tag für 6 Tage) und ACS14 (50mg/kg KG/Tag für 6 Tage)-behandelten Tieren hinsichtlich Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl festgestellt werden. Auch die Konzentration von LDH im Serum, ein Marker für Hämolyse oder Gewebeschaden, zeigte keine Veränderungen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1

	Kontrolle	Aspirin	ACS14
WBC (10 ³ /μL)	2.9 +/-0.8	2.4 +/-0.4	2.8 +/-0.6
Hct (%)	45 +/-4	47 +/-4	45 +/-3
Plt (10 ³ /μL)	1266 +/-64	1275 +/-158	1311 +/-254
LDH (U/L)	19 +/-7	20 +/-6	17 +/-4

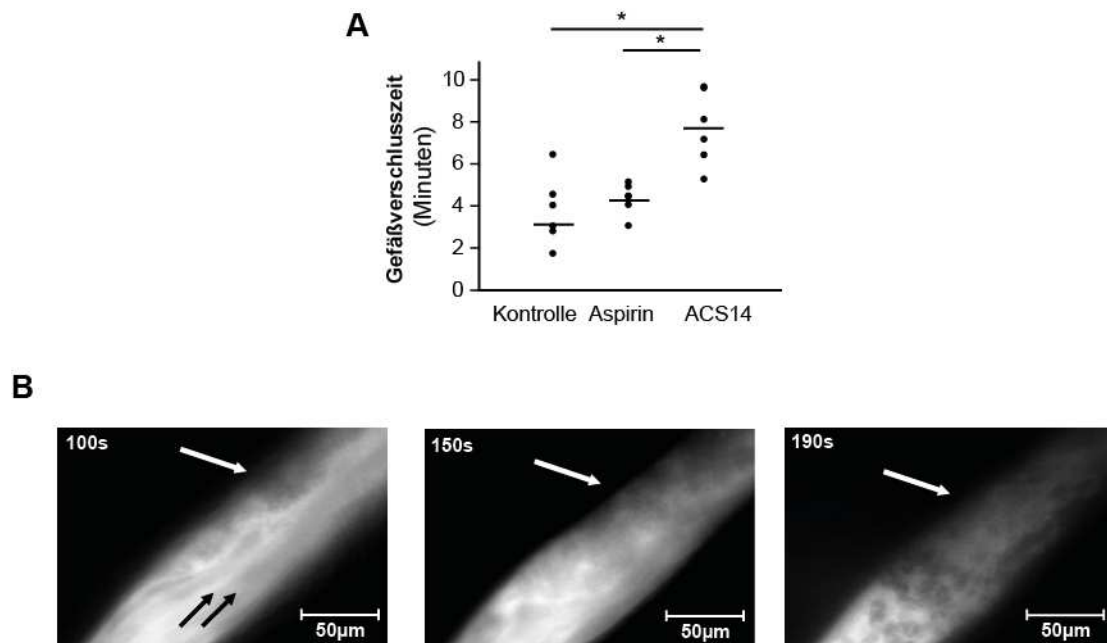
Analyse des murinen Vollbluts mittels eines Coulter Counters. Die Messung der LDH-Konzentration erfolgte im murinen Serum durch ein LDH Detection Kit

WBC: Leukozytenzahl; Hct: Hämatokrit; Plt: Thrombozytenzahl; LDH: Lactatdehydrogenase

4.9 Untersuchung der arteriolären Thrombusbildung in der Rückenhaut

Um zu untersuchen, inwiefern die Behandlung mit ACS14 die Thrombusbildung in Arteriolen der Rückenhaut beeinflusst, wurde die arterioläre Gefäßverschlusszeit nach Endothelschädigung gemessen. Der Endothelschaden wurde mittels *light-dye* Technik in den Arteriolen der Rückenhaut induziert. Die 6-tägige Behandlung mit Aspirin (23 mg/kg KG/Tag) führte zu keiner signifikanten Veränderung der arteriolären Gefäßverschlusszeit verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe (223 +/- 40 Sekunden für unbehandelte Kontrollen vs. 258 +/- 18 Sekunden für die Aspiringruppe; n=6). Im Gegensatz dazu verlängerte die Behandlung mit ACS14 (50mg/kg KG/Tag; 6 Tage) diese signifikant auf 459 +/- 43 Sekunden (n=6; $P<0.05$; Abbildung 4.8).

Abbildung 4.8



Messung der arteriölen Gefäßverschlusszeit im Rückenhautkammermodell nach Endothelschädigung mittels Photoaktivierung von Fluoreszein-Isocyanat (FITC)-Dextran (*light-dye* Technik)

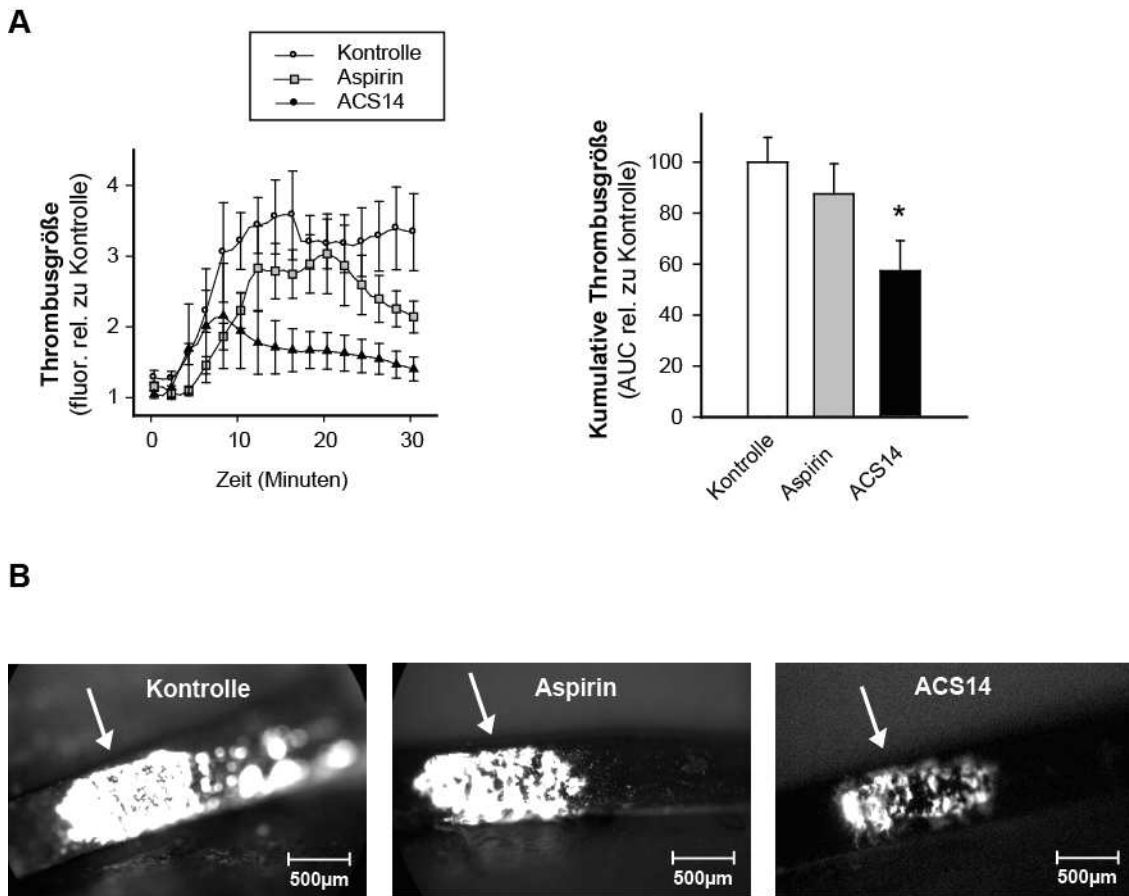
(A) Die Behandlung der Tiere mit ACS14 (50mg/kg KG/Tag; 6 Tage) verlängerte die arteriöle Gefäßverschlusszeit signifikant im Vergleich zur Aspirin (23mg/kg KG/Tag; 6 Tage)- und Kontrollgruppe. **(B)** Die Bilder zeigen die Entstehung eines Thrombus in einer Arteriole der Rückenhaut nach Endothelschädigung mittels *light-dye* Technik. Der weiße Pfeil zeigt den nach Endothelschädigung entstehenden Thrombus, welcher als Aussparung des fluoreszierenden Plasmas zu erkennen ist. Dieser wächst im Zeitverlauf und verschließt schließlich das Gefäß vollständig, so dass der Blutfluss sistiert. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung des Blutflusses an.

* $P < 0.05$ vs. Aspirin und Kontrolle; $n = 5-6$ Tiere/Gruppe; ANOVA

4.10 Untersuchung der arteriellen Thrombusbildung in der A. carotis

Nach der Untersuchung der arteriolären Thrombusbildung wurde zusätzlich die arterielle Thrombusbildung in der A. carotis nach Schädigung mit Eisenchlorid (FeCl_3) analysiert. Bei den Tieren, welche mit ACS14 (50 mg/kg KG/Tag; 6 Tage) behandelt worden waren, war das Wachstum des Thrombus nach Endothelschädigung über die Beobachtungszeit deutlich geringer ausgeprägt verglichen mit unbehandelten oder Aspirin (23 mg/kg KG/Tag; 6 Tage)-behandelten Tieren. Insgesamt zeigte die ACS14-Behandlungsgruppe eine signifikant geringere kumulative Thrombusgröße, welche für die 30-minütige Beobachtungszeit berechnet wurde (57 +/- 12 % für ACS14 vs. 88 +/- 12 % für Aspirin; $P < 0.05$; $n = 5-6$ Tiere/Gruppe; Abbildung 4.9). In der Aspiringruppe konnte ungefähr 20 Minuten nach Endothelschädigung eine verminderte Thrombusstabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

Abbildung 4.9



Untersuchung der Thrombusbildung in der A. carotis nach Eisenchlorid (FeCl_3)-Schädigung

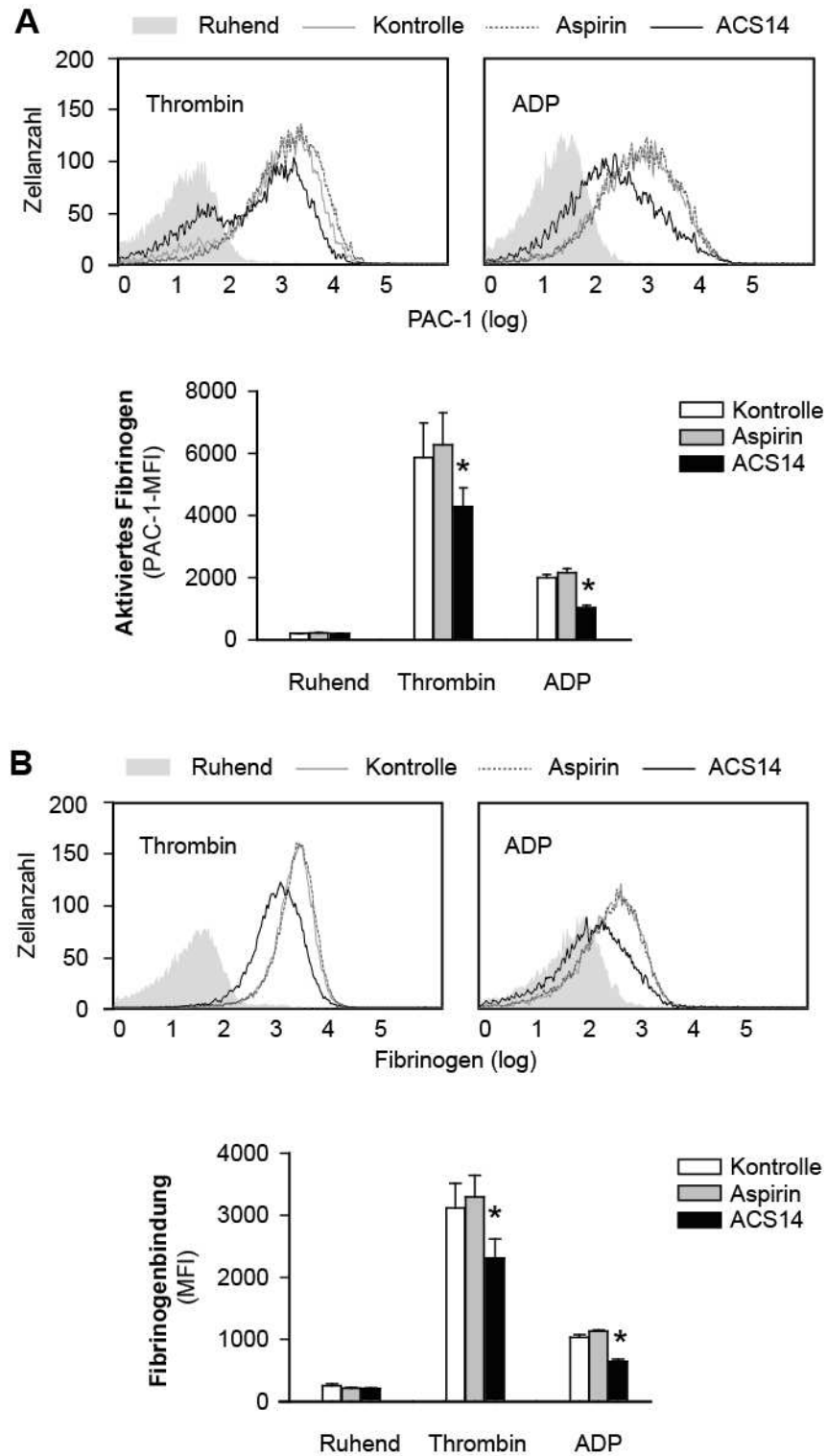
(A) Die Behandlung mit ACS14 (50mg/kg KG/Tag; 6 Tage) führte zu einer signifikant reduzierten Thrombusbildung in der A. carotis nach FeCl_3 -Schädigung im Gegensatz zu Aspirin (23 mg/kg KG/Tag), sowie zu einer signifikant verminderten kumulativen Thrombusgröße für den 30-minütigen Untersuchungszeitraum. In der Aspiringruppe zeigte sich eine verminderte Thrombusstabilität mit Reduktion der Thrombusgröße nach 20 Minuten. **(B)** Die Bilder zeigen repräsentative Aufnahmen des Thrombus (weißer Pfeil) in der A. carotis 10 Minuten nach Schädigung im Kontroll-, Aspirin- und ACS14-behandelten Tier. Für die Visualisierung des Thrombus wurden die Blutzellen zuvor mit dem fluoreszierenden Farbstoff (DiOC_6) angefärbt.

* $P < 0.05$ vs. Aspirin und Kontrolle; $n = 5-6$ Tiere/Gruppe; ANOVA

4.11 Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und Fibrinogenbindung auf humanen Thrombozyten

Die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors (Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$) auf der Thrombozytenoberfläche stellt die gemeinsame Endstrecke aller auf die Aggregation aktivierenden Signalwege dar. Auf aktivierten Thrombozyten befindet sich dieser Rezeptor durch Konformationsänderungen in einem aktivierten Zustand und kann demzufolge Fibrinogen binden. Verglichen mit Aspirin führte nur die Behandlung von isolierten Thrombozyten mit ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$ für 10 Minuten; 37 °C) nach Stimulation mit Thrombin (0.2 U/mL) oder ADP (5 $\mu\text{mol/L}$) zu einer signifikanten Reduktion des aktivierten Fibrinogenrezeptors Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ auf der Zelloberfläche. Dementsprechend zeigte nur die Behandlung mit ACS14 eine signifikant verminderte Bindung von Fluoreszenz-markiertem Fibrinogen auf Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin (0.2 U/mL) oder ADP (5 $\mu\text{mol/L}$). In ruhenden Thrombozyten veränderten weder Aspirin noch ACS14 die basale Oberflächenexpression des Fibrinogenrezeptors sowie die Fibrinogenbindung (n=6; Abbildung 4.10).

Abbildung 4.10



Messung der Oberflächenexpression des aktivierten Fibrinogenrezeptors Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ und der Fibrinogenbindung auf isolierten humanen Thrombozyten mittels FACS Analyse

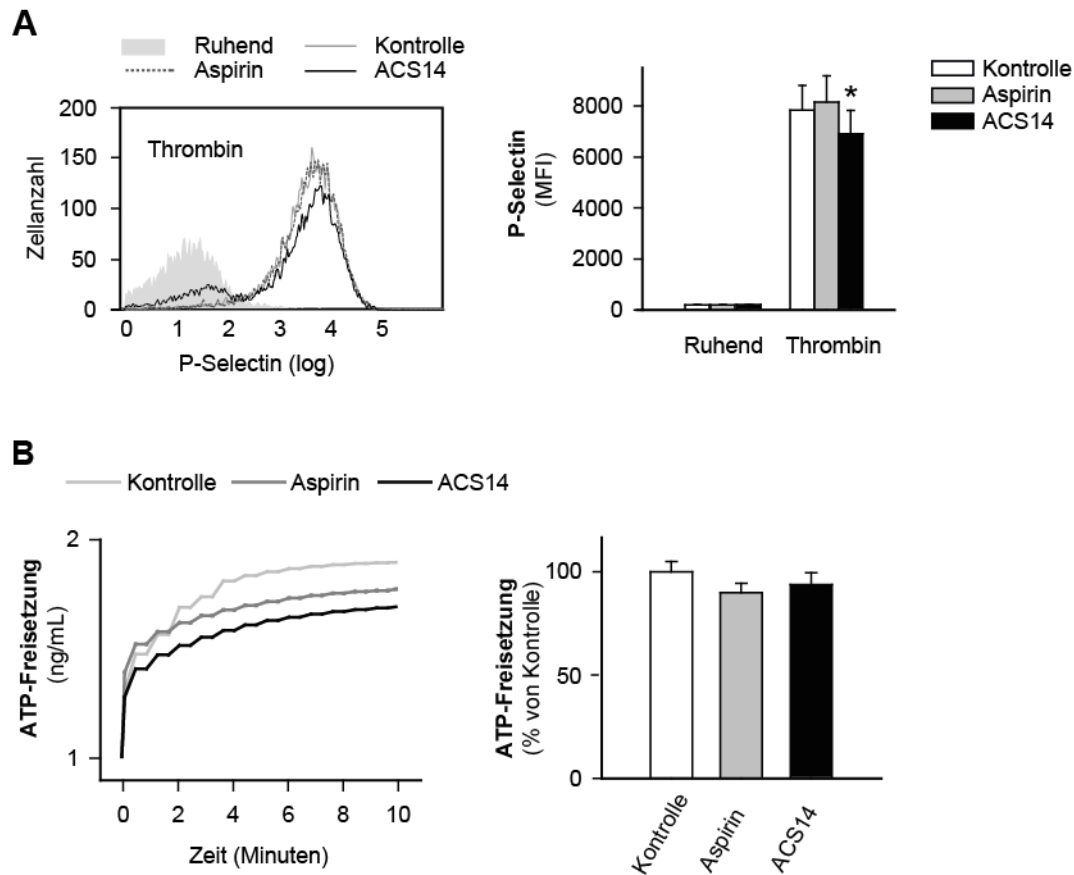
(A) Die Behandlung mit ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$; 10 Minuten) führte zu einer signifikanten Reduktion der Aktivierung des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta 3$ nach Stimulation mit Thrombin (0.2 U/mL) oder ADP (5 $\mu\text{mol/L}$), sowie demzufolge zu einer **(B)** signifikant reduzierten Fibrinogenbindung.

MFI: Mean fluorescence intensity; * $P < 0.05$ vs. Aspirin oder Kontrolle; $n=6$; ANOVA one way

4.12 Sekretion von Molekülen aus den Granula humaner Thrombozyten

Außerdem wurde untersucht, ob ACS14 die Freisetzung der Inhaltsstoffe aus den α - und *dense*-Granula nach Thrombozytenaktivierung beeinflusst. Als Maß für die Freisetzung aus den α -Granula wurde die Oberflächenexpression von P-Selectin mittels FACS Analyse gemessen. Stellvertretend für die *dense*-Granula wurde die Konzentration des aus aktivierten Thrombozyten sezernierten Adenosintriphosphats (ATP) durch Chemilumineszenz gemessen. Nach Stimulation mit Thrombin (0.2 U/mL) zeigte sich eine leichte Reduktion der Oberflächenexpression von P-Selectin auf den mit ACS14 (500 μ mol/L für 10 Minuten; 37 °C) behandelten Thrombozyten. In Bezug auf die Menge des freigesetzten ATP nach Stimulation mit Thrombin (0.05 U/mL) konnte kein Unterschied zwischen Kontrollen, Aspirin oder ACS14 (500 μ mol/L für 10 Minuten; 37 °C) Behandlung festgestellt werden (Abbildung 4.12).

Abbildung 4.12



Messung der Oberflächenexpression von P-Selectin auf isolierten humanen Thrombozyten mittels FACS Analyse sowie der ATP-Freisetzung aus isolierten humanen Thrombozyten mittels Chemilumineszenz Assay

(A) Während ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$ für 10 Minuten) zu einer leicht reduzierten Oberflächenexpression von P-Selectin (α -Granula) nach Stimulation mit Thrombin (0.2 U/mL) führte, war **(B)** die Freisetzung von ATP aus den *dense*-Granula nach Thrombinstimulation (0.05 U/mL) unverändert im Vergleich zu Kontrollen und Aspirin.

MFI: Mean fluorescence intensity

* $P < 0.05$ vs. Aspirin oder Kontrolle; $n = 6$; ANOVA one way

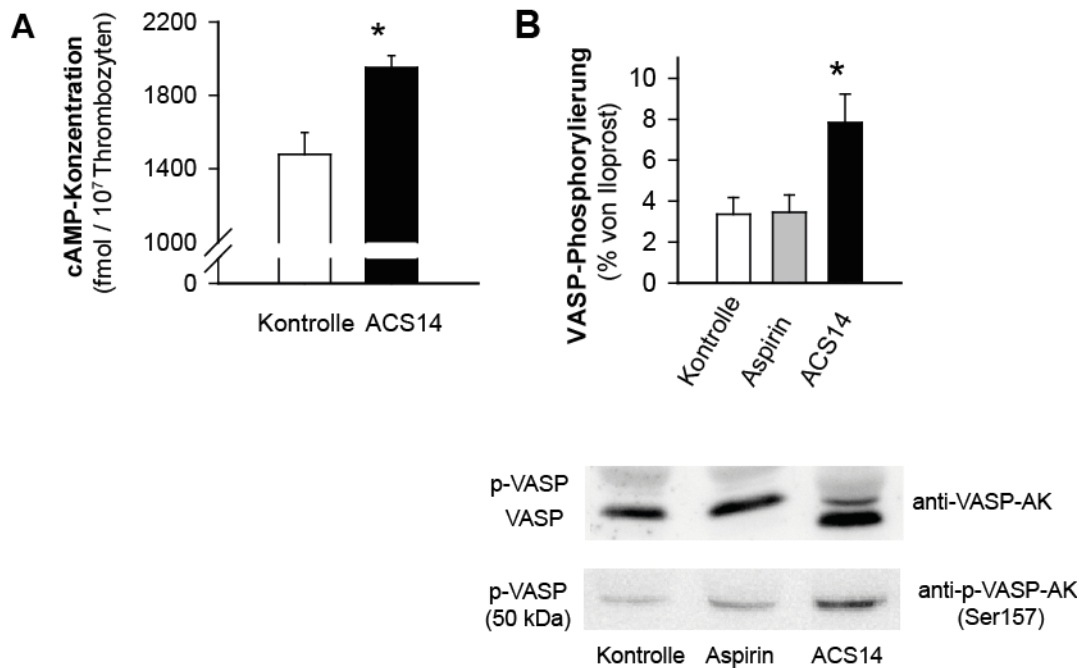
4.13 Intrazelluläre cAMP-Konzentration in humanen Thrombozyten

Für Schwefelwasserstoff (H_2S), welcher aus ACS14 freigesetzt wird, konnte in anderen Zellen gezeigt werden, dass er die intrazellulären Konzentrationen von cyclischen Nukleotiden beeinflussen kann [51, 84]. Diese sind potente physiologische Inhibitoren der Thrombozytenaggregation. Im Folgenden wurde die intrazelluläre Konzentration von cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) aus isolierten humanen Thrombozyten mittels ELISA gemessen. Dabei zeigte sich, dass diese nach Behandlung mit ACS14 ($500 \mu\text{mol/L}$ für 10 Minuten bei 37°C) gegenüber den unbehandelten Kontrollen erhöht war ($1950 \pm 66 \text{ fmol}/10^7$ Thrombozyten vs. $1497 \pm 118 \text{ fmol}/10^7$ Thrombozyten in Kontrollen; $P < 0.05$; $n=6$; Abbildung 4.13 (A)).

4.14 Phosphorylierung von VASP in humanen Thrombozyten

Zusätzlich wurde die Konzentration des phosphorylierten intrazellulären Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (pVASP) in isolierten humanen Thrombozyten mittels Western Blot Analyse gemessen. VASP kann durch die Aktivierung der Proteinkinase A phosphoryliert werden, welche wiederum durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentrationen aktiviert wird. Durch die Phosphorylierung am Serin 157 kommt es zu Konformationsänderungen des VASP und damit zu einer Zunahme des Molekulargewichts von 46 kDa auf 50 kDa, was als zusätzliche Bande in der Western Blot Analyse sichtbar wird (Anti-VASP-Antikörper, Abbildung 4.13 (B), oberer Beispielblot). Mittels des anti-phospho-VASP-Antikörpers für Serin 157 erfolgte die Quantifizierung der intrazellulären Konzentration des phosphorylierten Proteins, welche nach Behandlung mit ACS14 ($500 \mu\text{mol/L}$ für 10 Minuten bei 37°C) mehr als 2-fach erhöht war ($8 \pm 1 \%$, $P < 0.05$, $n=6$; Abbildung 4.13 (B)), während Aspirin in äquimolarer Dosis zu keiner Erhöhung verglichen mit den Kontrollen führte ($3 \pm 1 \%$ von der Positivkontrolle Iloprost). Als Positivkontrolle für die Bildung von phospho-VASP diente Iloprost.

Abbildung 4.13



Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration und des Phosphorylierungsgrades von VASP

(A) Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde in Lysaten isolierter humaner Thrombozyten mittels ELISA gemessen. ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$; 10 Minuten) führte zu einer signifikanten Erhöhung verglichen mit Kontrollen. **(B)** Der Grad der VASP-Phosphorylierung wurde in isolierten humanen Thrombozyten mittels Western Blot Analyse ermittelt. Die Beispielblots zeigen die charakteristischen Proteinbanden für VASP (46 kDa) und phospho-VASP (50 kDa). ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$; 10 Minuten) führte zu einer deutlichen Phosphorylierung des Proteins, sichtbar an der zusätzlichen Bande im anti-VASP-Blot. In der Quantifizierung führte ACS14 (500 $\mu\text{mol/L}$; 10 Minuten) zu einer signifikanten Erhöhung des Phosphorylierungsgrades von VASP im Gegensatz zu Kontrollen und Aspirin in äquimolarer Dosis.

VASP: Vasodilatator-stimuliertes Protein

* $P < 0.05$ vs. Aspirin oder Kontrolle; $n = 6$; t-Test für A, ANOVA one way für B

5 DISKUSSION

5.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen und deren Therapie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die führende Todesursache in der westlichen Welt. Ihre Behandlung und Prävention ist deshalb nicht nur von wissenschaftlichem, sondern auch wirtschaftlichem Interesse. Das Verständnis der Pathophysiologie und die Entwicklung neuer medikamentöser Therapien ist die Grundlage dafür, dass unser Gesundheitssystem auch in Zukunft diese Herausforderung bewältigen kann.

Grundlage für die Entstehung dieser Erkrankungen ist meist eine Kombination aus genetischer Prädisposition und individuellen Risikofaktoren wie Adipositas, Dyslipidämie, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus oder Nikotinabusus. Allein oder in Kombination auftretend begünstigen diese im Verlauf die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion auf deren Grundlage sich arteriosklerotische Gefäßveränderungen bilden können. An Stellen arteriosklerotischer Plaques kann es zur Plaqueruptur mit Aktivierung von Thrombozyten und Ausbildung von Thrombozytenaggregaten kommen, welche bis zum vollständigen Gefäßverschluss führen können.

Therapieansätze zur Verlangsamung von Entstehung und Progression der Arteriosklerose sind zum einen die Modifikation individueller Risiken wie Gewichtsreduktion, Ernährungsumstellung, sportliche Betätigung oder Nikotinkarenz; zum anderen stehen zur Hemmung der Thrombozytenfunktion und zur Behandlung von Dyslipidämien oder arterieller Hypertonie verschiedene medikamentöse Therapieansätze zur Verfügung. Zur Behandlung der Dyslipidämien werden bevorzugt Statine eingesetzt, welche die endogene Cholesterinsynthese hemmen und dadurch die atherogenen Plasma-LDL (low-density-lipoprotein)-Spiegel reduzieren, sowie die antiatherogenen Plasma-HDL (high-density-lipoprotein)-Spiegel erhöhen. Weitere Effekte sind unter anderem eine verbesserte Endothelfunktion, Plaquestabilität, Entzündungshemmung oder ein vermindertes Thromboserisiko und somit in der Langzeittherapie eine reduzierte Gesamtmortalität. Im Rahmen der Hypertoniebehandlung werden bevorzugt ACE-Hemmer eingesetzt, welche die Synthese des vasokonstriktorisch wirkenden Angiotensin-II hemmen. Diese vermindern die Angiotensin-II-induzierte Myoarthhypertrophie bei hypertensiver Herzkrankheit und das Myokardremodeling nach Herzinfarkt. Da Thrombozyten eine der Hauptfunktionen bei der Entstehung arterieller Thrombosen einnehmen, ist eine adäquate antithrombozytäre Therapie ein entscheidender Bestandteil des Therapieregimes bei Arteriosklerose. Hierfür gilt Aspirin seit vielen Jahren als Medikament der ersten Wahl, da es nachweislich das Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall oder peripher arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) verringern und folglich die Lebensqualität und das Überleben der Patienten verbessern kann [8].

5.2 Wirkung von ACS14 auf COX-abhängige und -unabhängige Signalwege im Vergleich zu Aspirin

5.2.1 Methodische Aspekte der Thrombozytenaggregometrie

Die Thrombozytenaggregometrie ist ein labortechnisches Verfahren zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion. Im klinischen Alltag dient sie vor allem dem Monitoring der Therapie mit antithrombozytären Medikamenten (Aspirin, P2Y₁₂-ADP-Rezeptor-Antagonisten). Zudem ermöglicht sie die Detektion von Störungen der Thrombozytenfunktion, welche durch angeborene (Bernard-Soulier-Syndrom, Glanzmann-Thrombasthenie, etc.) oder erworbene (hämatologische Erkrankungen, chronische Leber-/Niereninsuffizienz, antithrombozytäre Antikörper, etc.) Defekte hervorgerufen werden können [85].

Zur Messung der Thrombozytenaggregation gibt es unterschiedliche Verfahren. In dieser Arbeit wurden zwei Assays verwendet, welche nach unterschiedlichen Messprinzipien die Aggregation untersuchen. Einerseits die im Jahr 1963 von Born entwickelte Licht-Transmissionsaggregometrie (LTA) zur Untersuchung der Aggregation im Plättchen reichen Plasma (PRP) und andererseits die von Cardinal im Jahr 1979 vorgestellte Impedanzaggregometrie zur Aggregationsdiagnostik im Vollblut. Bei der LTA wird nach Gewinnung des PRP mittels Zentrifugation das Ausmaß der Aggregation durch Zunahme der Lichttransmission nach Aggregatbildung im PRP turbidometrisch quantifiziert. Dagegen misst die Impedanzaggregometrie die Zunahme des elektrischen Widerstandes an zwei Sensordrähten während der Thrombozytenaggregation. Bei beiden Verfahren kann durch Zugabe von Agonisten wie ADP, Arachidonsäure, Collagen oder Thrombin die Aggregation induziert und gleichzeitig die Untersuchung mehrerer Signalwege durchgeführt werden.

Die LTA ist aufgrund der Gewinnung von PRP zeitaufwendiger und es werden größere Probenmengen vom Spender benötigt [86]. Bis heute gilt die LTA als Goldstandard zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion und wurde in vielen Studien als Referenzmethode herangezogen [87]. Mehrere Untersuchungen zeigten, dass eine mittels LTA gemessene starke Aggregation nach stattgehabter perkutaner Koronarintervention (PCI) mit adäquater antithrombozytärer Therapie einen Risikofaktor für wiederholte ischämische Ereignisse darstellt [88-90].

Das Verfahren der Impedanzaggregometrie wurde in den letzten Jahren durch Entwicklung des Multiplate Analyzer standardisiert, wodurch es zunehmend von klinischer Relevanz geworden ist: In einer Studie, die den Einfluss einer Clopidogrel-Resistenz auf Stentthrombosen nach PCI untersucht hat, konnte gezeigt werden, dass Patienten, die gemäß Multiplate als *low*-responder für Clopidogrel eingestuft wurden, ein 10x erhöhtes Risiko einer Stentthrombose hatten [91]. In einer anderen Studie wurde die Thrombozytenaggregation von Patienten vor herzchirurgischen Eingriffen gemessen und beobachtet, dass denjenigen Patienten, deren Thrombozyten nur schwach nach Stimulation mit ADP

aggregierten, mit höherer Wahrscheinlichkeit postoperativ Thrombozytenkonzentrate transfundiert werden mussten [92].

5.2.2 Thrombozytenhemmung durch Aspirin und ACS14

Die Wirkung von Aspirin auf Thrombozyten wird durch die irreversible Hemmung der Cyclooxygenase (COX) vermittelt, wodurch die Synthese von Thromboxan A₂ (TxA₂) aus Arachidonsäure inhibiert wird. Dieser Effekt wird an einer nahezu vollständigen Hemmung der Arachidonsäure-abhängigen Aggregation ersichtlich. Neben Arachidonsäure gibt es noch eine Vielzahl anderer Faktoren wie beispielsweise ADP, Collagen oder Thrombin, welche über die Bindung an ihre entsprechenden membranständigen thrombozytären Rezeptoren und die Aktivierung intrazellulärer Signalwege zu Thrombozytenaktivierung und Aggregation führen.

In unseren Aggregationsstudien mit ACS14 zeigte sich, dass dessen Wirkung nicht auf die Arachidonsäure-abhängige Aggregation und damit die Hemmung der COX limitiert ist. Im Gegensatz zu Aspirin führte die Behandlung von Thrombozyten mit ACS14 zusätzlich zu einer dosisabhängigen Hemmung der ADP-, Collagen- und Thrombin-induzierten Aggregation. Diese Signalwege werden durch Aspirin nicht (ADP, Thrombin) oder lediglich in geringem Ausmaß (Collagen) beeinflusst.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, wodurch diese breiten, antithrombozytären und COX-unabhängigen Effekte von ACS14 hervorgerufen werden. ACS14 enthält neben dem Aspirinmolekül ein Dithiolethion, aus dessen Sulfhydrylgruppen Schwefelwasserstoff (H₂S) freigesetzt werden kann [77, 78]. Um herauszufinden, welchen Einfluss H₂S alleine auf die Thrombozytenaggregation ausübt, wurden Aggregationsstudien mit dem H₂S-Donor NaHS durchgeführt. NaHS führte zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Arachidonsäure, ADP, Collagen oder Thrombin. Im Vergleich der Aggregationshemmung durch NaHS mit derjenigen durch ACS14 war erstere qualitativ ähnlich, quantitativ aber deutlich geringer ausgeprägt. Bei der Arachidonsäure-abhängigen Aggregation kann die stärkere Hemmung durch ACS14 im Vergleich zu NaHS durch das Aspirinmolekül des Wirkstoffs erklärt werden. Im Gegensatz dazu scheint die stärkere Aggregationshemmung durch ACS14 im ADP-abhängigen Signalweg durch andere Mechanismen bedingt zu sein. Die Zugabe von Aspirin zum H₂S-Donor NaHS führte nach Stimulation mit ADP zu keiner verstärkten Hemmung der Aggregation verglichen mit NaHS alleine. Dadurch kann der stärkere antithrombozytäre Effekt von ACS14 bei der ADP-abhängigen Aggregation als COX-unabhängig angesehen werden und scheint durch die verbleibenden Sulfhydrylgruppen des Wirkstoffs hervorgerufen zu werden.

Bereits in früheren Studien konnte durch ähnliche H₂S-freisetzende Moleküle (Anethol Dithiolthion (ADT)-Molekül) eine Thrombozytenhemmung und eine verminderte Thromboxan B₂-Konzentration im Plasma nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten beobachtet werden [93].

Als Maß für die Hemmung der COX-1 kann die Arachidonsäure-abhängige Aggregation hergenommen werden. Um die Effektivität der COX-1 Hemmung exakter zu quantifizieren, wurde in dieser Studie die Thromboxan B₂-Konzentration in den Überständen stimulierter Thrombozyten gemessen. ACS14 reduzierte nach Stimulation mit Arachidonsäure die TxB₂-Konzentration in vergleichbarem Ausmaß wie Aspirin. Allerdings wurden für entsprechende Effekte auf die COX-1 Hemmung und damit die TxB₂-Konzentration höhere Dosen von ACS14 im Gegensatz zu Aspirin benötigt. Aufgrund der Resultate pharmakologischer Studien könnte ein möglicher Grund für die verminderte Hemmung der COX-1 durch ACS14 sein, dass ACS14 sehr schnell zu ACS21 deacetyliert wird [77, 78].

5.3 Toxizität

Die starken hemmenden Effekte von ACS14 auf verschiedene Aktivierungssignalwege der Thrombozyten werfen die Frage auf, inwiefern es sich dabei eventuell um unspezifische oder schädliche Wirkungen des Wirkstoffs auf Thrombozyten handeln könnte. Toxische Effekte des Wirkstoffs wurden in dieser Studie anhand von zwei verschiedenen Messungen mittels Durchflusszytometrie untersucht, für welche in Studien gezeigt werden konnte, dass sie als Marker für Thrombozytenvitalität gelten [94, 95]. Hierfür wurde das mitochondriale Membranpotential gemessen, welches Aussagen über die Vitalität der Mitochondrien oder den Einfluss von Medikamenten auf deren Funktion ermöglicht und damit indirekt den Zustand der Thrombozyten erfasst. Zudem wurde der Aktivitätsgrad intrazellulärer Caspasen bestimmt, welche den programmierten Zelltod auslösen. Diese können von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise oxidativem Stress, Infektionen oder auch Medikamenten aktiviert werden.

Für die tierexperimentellen Versuchsreihen wurden als Marker für toxische Effekte von ACS14 die Blutbilder und die Serumkonzentration der Lactatdehydrogenase (LDH) behandelter Tiere untersucht. In allen Untersuchungen ergab sich kein Anhalt, dass ACS14 toxische Effekte auf Zellen im Allgemeinen oder Thrombozyten ausübt. Dieser Ausschluss potenziell toxischer Wirkungen von ACS14 auf Zellen ist von erheblicher Bedeutung, da durch die Ankopplung des H₂S-freisetzenden Moleküls an Aspirin unerwünschte Nebenwirkungen wie beispielsweise die gastrointestinale Toxizität verringert werden sollen.

5.4 Reversibilität der Thrombozytenhemmung durch ACS14

Durch die irreversible Hemmung der Cyclooxygenase 1 (COX-1) durch Aspirin, sowie die mangelnde Fähigkeit der Thrombozyten das Enzym neu synthetisieren zu können, dauert die hemmende Wirkung von Aspirin auf die Thrombozytenaggregation die verbleibende Lebenszeit der Thrombozyten an. Doch inwieweit handelt es sich bei den Effekten von ACS14 auf die Thrombozytenaggregation um irreversible oder reversible Wirkungen? Hierfür wurden Aggregationsmessungen nach Behandlungszeiten von 0,5, 1, 2 und 3 Stunden mit ACS14 durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Arachidonsäure- und damit COX-1-abhängige Aggregation über die gesamte Versuchsdauer gleichermaßen supprimiert blieb, wogegen es bei der TRAP-, ADP- und Collagen-abhängigen Aggregation nach einer Behandlungszeit von mehr als 30 Minuten wieder zu einer langsamen Zunahme der Aggregation kam. Damit bleibt die irreversible Hemmung der COX-1 auch im neuen Wirkstoff ACS14 erhalten, während sich die COX-unabhängigen Mechanismen von ACS14 als teilweise reversibel erweisen. Ein möglicher Grund für die Reversibilität der COX-unabhängigen Mechanismen könnte sein, dass diese am ehesten durch den aus dem Wirkstoff freigesetzten Schwefelwasserstoff (H_2S) bewirkt werden. Wie pharmakodynamische Studien gezeigt haben, erfolgt dessen Freisetzung vor allem in der ersten Zeit nach Verabreichung [77]. Aufgrund dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass die zusätzlichen Effekte von ACS14 auf die Hemmung der Thrombozytenfunktion am ehesten durch die Freisetzung des H_2S aus den Sulfhydrylgruppen hervorgerufen werden.

5.5 Die Effekte von ACS14 *in vivo*

5.5.1 Vergleich von ACS14 *in vitro* und *in vivo*

Nach der Untersuchung der Effekte von ACS14 auf humane Thrombozyten wurde dessen Wirkung auf murine Thrombozyten *in vivo* analysiert. Im Gegensatz zu den Aggregationsmessungen an humanen Thrombozyten wurde für die tierexperimentellen Studien nicht eine einmalige, sondern eine repetitive orale Gabe von ACS14 oder Aspirin an 6 aufeinanderfolgenden Tagen gewählt. Grundlage hierfür war das Behandlungsschema vormals durchgeführter Untersuchungen an Nagetieren, in denen eine 6-tägige orale Behandlung mit ACS14 im Vergleich zu Aspirin zu weniger gastrointestinalen Läsionen führte [77, 80].

Als Maß für die Effektivität der COX-Hemmung wurde die Konzentration von Thromboxan B_2 (TxB_2) im Urin der Tiere nach oraler Behandlung mit ACS14 oder Aspirin gemessen, da TxB_2 als stabiles Endprodukt der Metabolisierung von Thromboxan A_2 hauptsächlich über den Urin ausgeschieden wird. Entsprechend den Daten aus den humanen Thrombozyten reduzierte die orale Behandlung mit

Aspirin oder ACS14 die TxB_2 -Spiegel im Urin der Mäuse deutlich. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Resultaten früherer Studien, in welchen ACS14 nach oraler Gabe an Ratten die Plasmakonzentration von TxB_2 vergleichbar zu Aspirin reduzierte [77, 80].

Analog zu den Ergebnissen der Aggregationsmessungen an humanen Thrombozyten zeigte sich, dass auch die orale Behandlung von Mäusen mit ACS14 die Arachidonsäure- und damit COX-abhängige Thrombozytenaggregation hemmt. Im Gegensatz zu Aspirin führte ACS14 in murinen Thrombozyten zusätzlich zu einer Hemmung der ADP-abhängigen Aggregation.

Insgesamt bleiben nach mehrtägiger oraler Behandlung mit ACS14 die COX-abhängigen und -unabhängigen Effekte von ACS14 auf Thrombozyten erhalten, womit die Wirkung von ACS14 auf murine Thrombozyten derjenigen auf humane Thrombozyten entspricht.

5.5.2 Blutungszeit

Die breite antithrombozytäre Wirkweise von ACS14 auf COX-abhängige und -unabhängige Mechanismen wirft die Frage auf, ob ACS14 stärker als Aspirin die Thrombozytenaggregation oder Blutungszeit beeinflussen könnte. Analysiert wurde die Blutungszeit mit der sogenannten tail-bleeding Methode, welche eine häufig angewandte Methode zur Messung der Blutungszeit darstellt. Es handelt sich dabei um ein einfaches Verfahren Veränderungen der Blutungszeit beispielsweise durch Medikamente, Thrombozytopenien oder -pathien zu erkennen. Allerdings ist es im wissenschaftlichen Austausch oft nicht einfach die Ergebnisse mit verschiedenen Laboren zu vergleichen, da es schwierig ist, die Versuchsbedingungen zu standardisieren. Zu den Variablen zählen die Anästhesie mit inhalativen (Isofluran) oder intravenösen Narkotika (Ketamin, Pentobarbiturate), sowie die Art der Verletzung des Schwanzes (Durchtrennung bei einer definierten Entfernung von der Spitze, bei einem definierten Durchmesser oder die alleinige Inzision der Schwanzvenen). Zudem kann die Blutungszeit zwischen verschiedenen Mausstämmen, dem Geschlecht oder Alter der Tiere variieren [96]. Wir haben in unserer Studie deshalb versucht, weitestgehend einheitliche Bedingungen zu schaffen. Zur Vermeidung versuchstechnischer Fehler wurden für die Messung der Blutungszeit Zeitablauf, Anästhesie und Art der Schnittverletzung genau definiert und die Behandlungsgruppen (Aspirin, ACS14, Kontrollen) hinsichtlich Geschlecht und Alter der Tiere vergleichbar zusammengestellt. Dabei zeigte sich, dass die Blutungszeit in beiden Behandlungsgruppen (Aspirin, ACS14) gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe deutlich verlängert war. ACS14 führte allerdings zu keiner Verlängerung der Blutungszeit gegenüber Aspirin.

Vor dem Hintergrund, dass neben der gastrointestinalen Toxizität das erhöhte Blutungsrisiko durch Aspirin oft zu Limitationen der Therapie führt, ist dieses Ergebnis von entscheidender Bedeutung für ACS14. Denn die erwünschte Hemmung von Thrombozytenaktivierung und -aggregation bedeutet

andererseits, dass es im Fall von Verletzungen oder Operationen aufgrund der verminderten Ausbildung eines stabilen Thrombus zu erhöhten Blutverlusten kommen kann [7, 97-100].

5.5.3 Die Untersuchung der arteriolären und arteriellen Thrombose in der Mikrozirkulation der Rückenhaut und der A. carotis

Die führende Indikation für Aspirin ist die Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall oder periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Diesen liegt oft eine Plaqueruptur zugrunde, an deren Stelle es zur Ausbildung arterieller Thromben kommen kann. Deshalb ist es eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Studie, inwieweit die Behandlung mit ACS14 im Vergleich zu Aspirin die Entstehung arterieller Thromben nach Endothelschädigung beeinflusst. Diese wurde anhand von zwei Modellen untersucht, wobei zunächst die Bildung arteriolärer Thromben in der Mikrozirkulation der Rückenhaut der Maus beobachtet wurde. Zusätzlich wurde die arterielle Thrombusbildung in der Makrozirkulation der A. carotis untersucht. Der Grund für die Untersuchung der arteriellen Thrombose in kleinen und großen Gefäßen ist, dass mit dem Rückenhautkammermodell die kleinen Gefäße der Mikrozirkulation untersucht werden. Auch wenn bereits in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass Ergebnisse aus der Mikrozirkulation mit der Pathophysiologie und den klinischen Beobachtungen in größeren Gefäßen korrelieren [26, 27, 30, 101, 102], so können diese nicht uneingeschränkt auf die Situation in großen Arterien übertragen werden.

Voraussetzung für die Entstehung eines arteriolären oder arteriellen Thrombus ist die Verletzung des Endothels. In der Literatur sind dafür verschiedene Verfahren beschrieben, wobei die Endothelschädigung chemisch, photochemisch, elektrisch, mechanisch von intraluminal, mittels Laser oder Ligatur des Gefäßes induziert werden kann [103, 104]. Die Art der Gefäßverletzung sollte dabei an Versuchsbedingungen wie Gefäßgröße oder zu beantwortende Fragestellung angepasst werden. Beispielsweise sind Gefäßligatur oder mechanischer Schaden von intraluminal Verfahren, die eher für die Schädigung in großen Arterien als in den Arteriolen der Rückenhaut geeignet sind.

Für die A. carotis wurde die chemische Schädigung des Gefäßes mittels Eisenchlorid (FeCl_3) gewählt, weil es sich dabei um ein vielfach in Studien angewandtes und bewährtes Verfahren zur Untersuchung der arteriellen Thrombose in großen Gefäßen handelt [105-107]. Durch lokale Applikation dieses toxischen Agens ist allerdings keine selektive Schädigung des Endothels möglich, vielmehr kommt es zur Schädigung aller Zellen, die damit in Kontakt kommen. Um das Wachstum des Thrombus nach Schädigung beobachten zu können, wurde den Tieren vor Versuchsbeginn der fluoreszierende Farbstoff DiOC₆ intravenös injiziert, welcher sich in den Membranen aller zellulären Bestandteile des Blutes einlagert. Dadurch kann der entstehende und wachsende Thrombus als fluoreszierendes Signal an der Gefäßwand sichtbar gemacht werden.

Für die Untersuchung der arteriolen Thrombose in der Rückenhaut wurde die sogenannte *light-dye* Technik verwendet und in unserer Arbeitsgruppe neu etabliert. Dieses Verfahren beruht auf der Schädigung des Endothels durch Phototoxizität, welche durch Exposition des fluoreszierenden Farbstoffs FITC-Dextran unter Fluoreszenzlicht und die daraus entstehenden Sauerstoffradikale (ROS) vermittelt wird. Es handelt sich dabei um einen lokalen Prozess, welcher am Ort der Lichtexposition stattfindet. Die entsprechende Dosierung des Fluorochroms sowie die Intensitätseinstellung des Lichts ermöglichen es, die Versuchsbedingungen an die jeweilige Fragestellung anzupassen. Der Umfang der Endothelschädigung reicht dabei von subklinischer endothelialer Dysfunktion bis zur vollständigen Endothelschädigungen mit Ausbildung eines arteriolen Thrombus, der zum vollständigen Verschluss des Gefäßes führen kann [104]. Das zuvor applizierte FITC-Dextran verbleibt im Plasma und der Thrombus wird als dunkle Aussparung ausgehend vom Endothel sichtbar. Die Beobachtung der Auswirkungen von Aspirin und ACS14 auf Entstehung und Progress der arteriolen Thrombose erfolgte in der Mikrozirkulation der Rückenhaut mittels Intravitalmikroskopie. Dazu wurde das Rückenhautkammermodell der Maus verwendet. Dieses Modell eignet sich nicht nur für die Beantwortung zu Fragestellungen der Mikrozirkulation, sondern findet seine Anwendung in verschiedensten Untersuchungen zu Tumorwachstum, Angiogenese oder Inflammation. Die Intravitalmikroskopie ermöglicht dabei eine genaue Beobachtung der Vorgänge in den kleinen Gefäßen der Rückenhaut, sowie die Anfertigung von Aufnahmen hoher Qualität. Dadurch können geringfügige Veränderungen von Blutfluss, Thrombozyten-/Leukozyten-Endothelinteraktionen oder Entstehung von Thromben erkannt und präzise ausgewertet werden [83, 108, 109].

Nach phototoxisch induziertem Endothelschaden in den Arteriolen der Rückenhautkammer verlängerte die vorherige orale Behandlung mit ACS14 im Gegensatz zu Aspirin die Zeit bis zum vollständigen Gefäßverschluss durch einen Thrombus signifikant. In der A. carotis zeigten die mit ACS14 behandelten Tiere im Vergleich zu den mit Aspirin behandelten Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum eine deutlich reduzierte Thrombusgröße. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit Aspirin lediglich gegen Ende der 30-minütigen Versuchsdauer zu einer leichten Abnahme von Thrombusgröße und -stabilität verglichen mit den Kontrolltieren.

Nach diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, was ursächlich für den stärkeren hemmenden Einfluss von ACS14 auf die Entstehung der arteriolen und arteriellen Thrombose sein könnte. In Anbetracht der Ergebnisse aus unseren Aggregationsstudien an humanen und murinen Thrombozyten zeigte ACS14 im Vergleich zu Aspirin nicht nur eine Hemmung der COX-abhängigen und durch Arachidonsäure-induzierten Aggregation, sondern zusätzlich eine Hemmung der COX-unabhängigen Signalwege (ADP, Collagen, Thrombin). Nach Verletzung des Endothels kommt es zur Expression einer Vielzahl von thrombogenen Faktoren der subendothelialen Matrix, von welchen neben Laminin, Fibronectin, Tissuefactor oder Thrombospondin, Collagen den wohl potentesten Thrombozytenaktivator darstellt [105]. Die Interaktionen zwischen dem subendothelialen Collagen

und den Thrombozyten sind multipel, einerseits indirekt über den löslichen vWF des Blutes, andererseits direkt durch Bindung an die entsprechenden thrombozytären Rezeptoren [14]. Zusätzlich zu Collagen gehört Thrombin, welches nach Expression des Tissuefactors gebildet wird, zu den initialen Thrombozytenaktivatoren am Ort der Endothelverletzung. Collagen und Thrombin führen im Verlauf über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege zur Sekretion auto- und parakrin wirkender Substanzen aus den Granula. Unter diesen sind besonders ADP und TxA₂ an der Rekrutierung weiterer Thrombozyten und deren anschließender Anheftung an den primären Thrombus beteiligt. Durch die Hemmung der COX-unabhängigen Signalwege beeinflusst ACS14 im Gegensatz zu Aspirin zusätzlich die durch Collagen und Thrombin vermittelte primäre Adhäsion an die verletzte Gefäßwand. Ferner kann ACS14 verglichen mit Aspirin das Wachstum des Thrombus vermindern, indem es darüber hinaus die ADP-abhängige Rekrutierung weiterer Thrombozyten inhibieren kann.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Schädigung des Endothels durch die bei der Photoaktivierung des Fluorochroms entstehenden Sauerstoffradikale (ROS) hervorgerufen wird. Diese Sauerstoffradikale beeinflussen das zelluläre Reduktions-Oxidations-System und spielen bei einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Entstehung von Arteriosklerose oder Zellschädigung eine wichtige Rolle. Für Schwefelwasserstoff und ACS14 im Besonderen konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass beide durch Erhöhung der intrazellulären Glutathionlevel in das zelluläre Reduktions-Oxidations-System eingreifen können und so die Zelle vor den schädlichen Auswirkungen von freien Sauerstoffradikalen schützen können [77-80]. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass ACS14 nach *light-dye*-induziertem Endothelschaden seine hemmende Wirkung auf die Entstehung eines Thrombus nicht nur auf thrombozytärer, sondern auch auf endothelialer Ebene vermittelt.

Durch die verminderte Thrombusgröße in der A. carotis durch ACS14 im Vergleich zu Aspirin wird ersichtlich, dass der stärkere hemmende Effekt von ACS14 auf die arterioläre Thrombose im *light-dye* Modell nicht nur durch mögliche endotheliale Effekte des Wirkstoffs hervorgerufen wird, sondern am ehesten auf die starke Rolle der Thrombozyten bei der Thromboseentstehung zurückzuführen ist.

5.6 Molekulare Mechanismen der Thrombozytenhemmung durch ACS14

5.6.1 Die Wirkung von ACS14 auf den Fibrinogenrezeptor

Es stellte sich Frage, wodurch die breiten antithrombozytären Effekte von ACS14 hervorgerufen werden. Durch die hemmende Wirkung von ACS14 auf COX-abhängige und -unabhängige Signalwege liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um einen zentralen Mechanismus der Thrombozytenaktivierung handeln könnte. Von entscheidender Bedeutung ist hier der

Fibrinogenrezeptor $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin, dessen Überführung in einen aktivierten Zustand als gemeinsamer Endpunkt der verschiedenen Aktivierungswege (beispielsweise ADP, Collagen, Thromboxan A_2 , Thrombin) angesehen werden kann. Im Anschluss kann Fibrinogen gebunden werden, was die Voraussetzung für die Quervernetzung der Thrombozyten und damit die Entstehung eines stabilen Thrombus ist [15, 34, 38]. Die FACS-Analysen zeigten, dass lediglich die Behandlung mit ACS14 zu einer Reduktion des aktivierten Fibrinogenrezeptors $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin auf der Zelloberfläche der Thrombozyten führte. Übereinstimmend damit zeigten mit ACS14, nicht aber mit Aspirin, vorbehandelte Thrombozyten nach Stimulation mit ADP oder Thrombin eine verminderte Bindung von Fluoreszenz-markiertem Fibrinogen.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, wodurch die verminderte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin nach Behandlung mit ACS14 bedingt sein könnte. ACS14 könnte einerseits direkt durch Interaktion mit dem Rezeptor selbst oder indirekt über intrazelluläre Signalwege dessen Überführung in einen aktivierten Zustand beeinflussen. Hierzu wurden die intrazellulären Konzentrationen von cAMP und phosphoryliertem VASP untersucht, wobei nur die Behandlung mit ACS14 beide signifikant erhöhen konnte. Diese beiden Moleküle können nach aktueller Studienlage den intrazellulären Signalweg zur Überführung des Fibrinogenrezeptors $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin in einen aktivierten Zustand beeinflussen. An diesem Signalweg sind neben cAMP noch cGMP, die Proteinkinasen PKA und PKC oder der intrazelluläre Calciumspiegel beteiligt [14, 36]. Für H_2S alleine ist bereits beschrieben, die Konzentrationen der intrazellulären cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP erhöhen zu können, indem es einerseits deren Abbau durch Hemmung der intrazellulären Phosphodiesterase vermindern sowie deren Bildung durch Aktivierung der Adenylatzyklase steigern kann [51, 84]. cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A, welche neben intrazellulären Effektoren wie Transkriptionsfaktoren oder Ca^{2+} -Kanälen das Vasodilator-stimulated Protein (VASP) phosphorylieren kann [110, 111]. Es konnte gezeigt werden, dass diese cAMP-abhängige-Proteinkinase-vermittelte Phosphorylierung von VASP eine verminderte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin bewirkt und auf diese Weise die Thrombozytenaggregation hemmen kann [112]. Damit scheint ein möglicher molekularer Mechanismus für die antithrombozytäre Wirkung von ACS14 gefunden zu sein, welcher nach heutigen Erkenntnissen wahrscheinlich durch die H_2S -abhängige Beeinflussung der intrazellulären Phosphodiesterase und Adenylatzyklase hervorgerufen wird.

In der Literatur werden für H_2S -freisetzende Substanzen weitere Effekte wie beispielsweise die Modifikation von Thiolgruppen beschrieben, womit Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten beeinflussen werden können. Diese Thiolgruppen finden sich beispielsweise im Fibrinogenrezeptor $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin, im ADP-Rezeptor P2Y_{12} oder im Collagenrezeptor GP VI [113-115]. Mögliche Interaktionen von ACS14 auf die Thiolgruppen dieser Rezeptoren sind noch nicht hinreichend

erforscht und stellen zukünftig sicher einen interessanten Ansatzpunkt für die weitere Charakterisierung der antithrombozytären Wirkung von ACS14 dar.

5.6.2 Die Effekte von ACS14 auf die Freisetzung der Inhaltsstoffe der Granula

Neben der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin ist die Sekretion der Inhaltsstoffe aus den α - und *dense*-Granula wesentlicher Bestandteil der auto- und parakrinen Thrombozytenaktivierung. Während die Integrinaktivierung Voraussetzung für Quervernetzung und Thrombusbildung der Thrombozyten ist, führen die aus den *dense*-Granula sezernierten Moleküle wie ADP, ATP oder Serotonin zu Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten. Die Inhaltsstoffe der α -Granula sind an Adhäsion, Gerinnung, Fibrinolyse, inflammatorischen Prozessen oder Interaktionen zwischen Thrombozyten, Monozyten oder Endothelzellen beteiligt [13].

Als Marker für die Inhaltsstoffe der *dense*-Granula wurde die Freisetzung von ATP aus stimulierten Thrombozyten gemessen, wobei kein Unterschied zwischen den mit Aspirin oder ACS14 behandelten Thrombozyten beobachtet werden konnte. Bei der Messung der Oberflächenexpression von P-Selectin, welches aus den α -Granula sezerniert wird, verminderte ACS14 im Gegensatz zu Aspirin nach Thrombinstimulation die Dichte von P-Selectin auf der Thrombozytenoberfläche. Bei inflammatorischen und arteriosklerotischen Prozessen ist P-Selectin wesentlich an den Interaktionen von Thrombozyten mit Endothelzellen und Leukozyten über den Gegenrezeptor Glykoprotein (PSGL-1) beteiligt. Durch die verminderte Oberflächenexpression von P-Selectin besitzt ACS14 eventuell zusätzlich zu den antithrombozytären noch antiinflammatorische Effekte, welche sich positiv auf Entstehung und Progression arteriosklerotischer Läsionen auswirken können.

5.7 Klinische Relevanz

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind mit ca. 40 % die führende Todesursache in der westlichen Welt, wobei die Prävalenz dieser Erkrankungen mit zunehmendem Alter ansteigt. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung und dem damit verbundenen demographischen Wandel der Bevölkerungsstruktur hin zu einer Alterung der Gesellschaft wird die adäquate Behandlung dieser Erkrankungen in Zukunft eine noch zentralere Rolle in unserem Gesundheitssystem einnehmen.

Seit vielen Jahren gilt Aspirin als Standardtherapie vor allem für die Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder pAVK. Auch wenn es sich bei Aspirin um ein bewährtes Medikament handelt, so ist die Therapie andererseits mit Nebenwirkungen verbunden, von denen besonders gastrointestinale Ulzerationen und Blutungen von klinischer Bedeutung sind. Zusätzlich zeigte sich in den letzten Jahren, dass die alleinige antithrombozytäre

Therapie mit Aspirin bei einigen Patienten mit stattgehabtem Ereignis nicht ausreicht, die Entstehung erneuter arterieller Thrombosen zu verhindern. Um das Ziel der antithrombozytären Therapie - die Vermeidung kardiovaskulärer Komplikationen - zu erreichen, wurden Wirkstoffe entwickelt, welche die Thrombozytenaktivierung unabhängig vom Arachidonsäure-abhängigen Signalweg beeinflussen können. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die Aktivierung der Thrombozyten ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen aktivierenden Faktoren, deren Bindung an ihre entsprechenden membranständigen Rezeptoren und der daraus resultierenden Induktion intrazellulärer Signalkaskaden ist.

Von Bedeutung im klinischen Gebrauch sind die Antagonisten des P2Y₁₂-Rezeptors, welche die Wirkung des aus den *dense*-Granula freigesetzten Adenosindiphosphats (ADP) durch Blockade des ADP-Rezeptors hemmen. Dazu zählen die oralen Thienopyridine (Ticlopidin, Clopidogrel, Prasugrel), welche nach hepatischer Metabolisierung zu einer irreversiblen Hemmung des P2Y₁₂-ADP-Rezeptors führen, sowie die nicht-Thienopyridine (Ticagrelor, Cangrelor), welche zu einer direkten, reversiblen Hemmung des Rezeptors führen. In einer Vielzahl von Studien (CURE, PCI-CURE, COMMIT/CCS-2, CLARITY-TIMI 28) zeigte sich, dass die zusätzliche Gabe von Clopidogrel zu Aspirin im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms (ACS) oder einer perkutanen koronararteriellen Interventionen (PCI) das Risiko kardiovaskulärer Komplikationen (Myokardinfarkt, Schlaganfall, kardiovaskulärer Tod, Reokklusion nach koronarer Stentimplantation) signifikant reduziert. Nachteilig für die Therapie mit Clopidogrel ist die individuelle Effektivität der Wirksamkeit aufgrund von Interaktionen mit anderen Medikamenten (Cytochrom (CYP)450 3A4 Interaktionen) oder von genetischen Polymorphismen des Cytochrom CYP2C19 und des P2Y₁₂-ADP-Rezeptors. Prasugrel, Ticagrelor und Cangrelor führten im Vergleich zu Clopidogrel in den jeweiligen Studien (TRITON TIMI-38, PLATO, CHAMPION) zwar zu signifikant weniger kardiovaskulären Komplikationen, allerdings kam es auch vermehrt zu Blutungskomplikationen. Für Prasugrel und Ticagrelor ergab sich ein Vorteil gegenüber Clopidogrel, weil diese in pharmakodynamischen Studien stärkere antithrombozytäre Effekte, eine geringere individuelle Variabilität bezüglich der Wirkung auf Thrombozyten, sowie einen schnelleren Wirkungseintritt zeigten, weshalb beide zunehmend bevorzugt bei ACS und PCI verabreicht werden [33, 37, 116].

Eine noch stärkere Hemmung der Thrombozytenaggregation bewirken die Inhibitoren des Fibrinogenrezeptors α IIb β 3-Integrin (Tirofiban, Abciximab), da sie die Thrombozytenaggregation unabhängig vom Aktivierungsreiz inhibieren. Sie verhindern die Bindung von Fibrinogen an den Fibrinogenrezeptor α IIb β 3-Integrin und beeinflussen damit die Quervernetzung der Thrombozyten und die Bildung von Thrombozytenaggregaten. Mehrere Studien (EPIC, EPILOG, CAPTURE, PARAGON, PRISM, etc.) zeigten, dass nur deren gezielter Einsatz mittels parenteraler Therapie während des klinischen Aufenthalts bei ACS mit nachfolgender PCI von Vorteil bezüglich der Vermeidung kardiovaskulärer Komplikationen ist [33, 117].

In der klinischen Erprobung befinden sich derzeit Inhibitoren des Thrombin-Rezeptors PAR-1, sowie des Thromboxan A₂-Rezeptors [33, 35, 117].

Durch die antithrombozytäre Wirkung dieser Medikamente steht der gewünschten Reduktion kardiovaskulärer Komplikationen ein erhöhtes Risiko für blutungsbedingte Komplikationen gegenüber. Dies führt nicht selten zu Limitationen der Therapie, weshalb der Einsatz dieser Medikamente an die individuelle Situation des Patienten angepasst werden sollte. Durch Modifikation herkömmlicher Therapeutika wie Aspirin mittels Gasotransmittern (NO, CO, H₂S) wird versucht, diese hinsichtlich ihrer antithrombozytären Wirkweise und ihrer gastrointestinalen Komplikationen zu verbessern. Hierzu wurde in dieser Studie die Wirkweise des Schwefelwasserstoff (H₂S)-freisetzenden Aspirinderivats ACS14 untersucht. Aufgrund der Ergebnisse aus den vorliegenden Untersuchungen zu den Effekten von ACS14 auf die Thrombozytenfunktion ergeben sich in Zukunft vielleicht neue Möglichkeiten die antithrombozytäre Therapie zu verbessern. Als Vorteil von ACS14 gegenüber Aspirin kann die verminderte gastrointestinale Toxizität angesehen werden, welche in mehreren tierexperimentellen Studien beobachtet werden konnte [77, 79, 80]. Bezüglich der antithrombozytären Eigenschaften konnten wir zeigen, dass ACS14 durch die Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden neben der Hemmung COX-abhängiger Signalwege zusätzlich zu einer Hemmung COX-unabhängiger Signalwege führt. Durch die verminderte Oberflächenexpression von P-Selectin auf aktivierten Thrombozyten nach Behandlung mit ACS14 können zudem antiinflammatorische und antiatherosklerotische Effekte für ACS14 vermutet werden.

Das Schwefelwasserstoff-freisetzende Aspirinderivat ACS14 hat demnach das Potential zukünftig vielleicht eine Rolle in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen als antithrombozytäres Medikament einzunehmen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems mit ihren Folgen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall oder peripher arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) sind die führende Todesursache in der westlichen Welt. Auf der Grundlage arteriosklerotischer Gefäßveränderungen kommt es nach Plaqueruptur zur Adhäsion von Thrombozyten mit Ausbildung arterieller Thromben, welche letztlich zum vollständigen Gefäßverschluss führen können. Ein Hauptbestandteil der medikamentösen Therapie ist Aspirin, welches durch seine irreversible Hemmung der Cyclooxygenase (COX) in Thrombozyten deren Aktivierung und Aggregation hemmt. Verbunden mit der Aspirintherapie sind unerwünschte Wirkungen, von welchen vor allem die gastrointestinale Toxizität von klinischer Bedeutung ist. In den letzten 20 Jahren wurde deshalb versucht, die gastrointestinale Nebenwirkungsrate von Aspirin durch dessen Modifikation mit Gasotransmittern wie Stickstoff-, Kohlenmonoxid oder Schwefelwasserstoff (H_2S) zu verringern. Bei letzterem handelt es sich um ein Schwefelwasserstoff (H_2S)-freisetzendes Aspirinderivat (ACS14), welches in dieser Studie im Vergleich zu Aspirin bezüglich seiner Wirkung auf Thrombozytenaktivierung, -aggregation und arterielle Thrombose untersucht wurde.

Zuerst wurden Aggregationsmessungen mittels Impedanzaggregometrie durchgeführt. Hier führte Aspirin lediglich zu einer Hemmung der Arachidonsäure- und damit COX-abhängigen Aggregation, wohingegen die Behandlung mit ACS14 zusätzlich die Aggregation nach ADP-, Collagen- und Thrombinstimulation inhibierte. Damit zeigte ACS14 im Gegensatz zu Aspirin eine Hemmung der COX-unabhängigen Signalwege. Im Anschluss durchgeführte Aggregationsuntersuchungen mit dem H_2S -Donor NaHS zeigten, dass H_2S alleine auch eine Hemmung der Aggregation in allen untersuchten Aktivierungswegen (Arachidonsäure, ADP, Collagen, Thrombin) bewirkt. Diese war qualitativ ähnlich der durch ACS14 hervorgerufenen Aggregationshemmung, allerdings quantitativ deutlich geringer ausgeprägt.

Für die exakte Quantifizierung der Effektivität der COX-Hemmung durch ACS14 wurde die Thromboxan B_2 -Konzentration in den Überständen stimulierter Thrombozyten (Arachidonsäure) gemessen. Diese war nach Behandlung mit ACS14 deutlich erniedrigt, wenngleich höhere Konzentrationen im Vergleich zu Aspirin notwendig waren um entsprechende Effekte zu erzielen.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den Effekten von ACS14 auf die Thrombozytenaggregation um reversible oder irreversible Wirkungen handelt, wurden Aggregationsmessungen nach Behandlungszeiten mit ACS14 von bis zu 3 Stunden durchgeführt. Während die Arachidonsäure-abhängige Aggregation über die gesamte Versuchsdauer gleichermaßen supprimiert blieb, kam es bei der ADP-, Collagen- und Thrombin-abhängigen Aggregation nach 30-minütiger Behandlungsdauer zu

einer Zunahme der Aggregation. Damit bleibt der zentrale Wirkmechanismus von Aspirin - die irreversible Hemmung der COX - auch in dem neuen Wirkstoff ACS14 erhalten.

Mögliche toxische Wirkungen von ACS14 auf die Thrombozytenfunktion wurden mittels Messung des mitochondrialen Membranpotentials als Parameter für die Thrombozytenvitalität und der Aktivität der den Zelltod auslösenden Caspasen untersucht. Beide Parameter zeigten sich nach ACS14-Behandlung unverändert gegenüber unbehandelten Thrombozyten.

Im 2. Teil dieser Studie wurden die Auswirkungen von ACS14 auf die Entstehung arteriolärer und arterieller Thrombosen im Tiermodell untersucht. Vor Beginn der entsprechenden Versuche wurde zunächst die Wirkung von ACS14 und Aspirin auf murine Thrombozyten ermittelt. Analog zu den Aggregationsstudien mit humanen Thrombozyten zeigte sich, dass es nach 6-tägiger oraler Behandlung der Tiere mit ACS14 oder Aspirin in beiden Behandlungsgruppen zu einer Hemmung der Arachidonsäure-abhängigen Aggregation kam. Zusätzlich führte die Behandlung der Tiere mit ACS14 im Gegensatz zu Aspirin zur Inhibition der ADP-abhängigen Aggregation. Die Effektivität der COX-Hemmung wurde durch Messung der TxB_2 -Spiegel im Urin der behandelten Tiere gemessen, welche durch die Behandlung mit Aspirin oder ACS14 deutlich vermindert werden konnten. Potentiell toxische Wirkungen von ACS14 konnten durch die Analyse von Blutbildern als Parameter für die zellulären Bestandteile des Blutes und der Serumkonzentration der Lactatdehydrogenase (LDH) als allgemeiner Parameter für erhöhten Zellzerfall in Blut und Gewebe ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung der arteriolären Thrombose in der Mikrozirkulation wurde das Rückenhautkammermodell der Maus verwendet. Dabei wurde nach phototoxisch induziertem Endothelschaden intravitalmikroskopisch die Entstehung eines Thrombus beobachtet und die Zeit bis zum vollständigen thrombotischen Verschluss des Gefäßes gemessen. Während Aspirin in diesem Modell zu keiner Verlängerung der Verschlusszeit gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe führte, verlängerte die Behandlung mit ACS14 im Vergleich zu Aspirin die Gefäßverschlusszeit signifikant.

Zusätzlich wurde der Einfluss von ACS14 auf die Entstehung der arteriellen Thrombose in der A. carotis nach chemisch induzierter Gefäßverletzung mittels Eisenchlorid-Superfusion (FeCl_3) untersucht. Im Gegensatz zu Aspirin verminderte lediglich die Behandlung mit ACS14 die Thrombusgröße während der 30-minütigen Beobachtungszeit.

Trotz dieser breiten antithrombozytären Wirkungen von ACS14 führte die Behandlung zwar zu einer Verlängerung der Blutungszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe, doch war diese nicht länger als nach Aspirinbehandlung.

Schließlich wurde untersucht, welche Mechanismen der antithrombozytären Wirkung von ACS14 zugrunde liegen könnten. Es zeigte sich, dass nur die Behandlung mit ACS14 die Überführung des Fibrinogenrezeptors $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin in einen aktivierten Zustand reduziert. Übereinstimmend dazu führte nur die Behandlung mit ACS14 zu einer verminderten Adhäsion von Fluoreszenz-markiertem

Fibrinogen an aktivierte Thrombozyten. Um herauszufinden, wodurch die verminderte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin bewirkt wird, wurden die intrazelluläre Konzentration des zyklischen Nukleotids cAMP und der Phosphorylierungsgrad von VASP gemessen. Im Gegensatz zu Aspirin führte ACS14 zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, sowie zu einer deutlichen Zunahme des phosphorylierten VASP.

Letztlich wurde die Freisetzung von Inhaltsstoffen aus den α - und *dense* -Granula nach Behandlung mit ACS14 analysiert. Bei der ATP-Freisetzung aus den *dense*-Granula konnte kein Unterschied zwischen unbehandelten, Aspirin- oder ACS14-behandelten Thrombozyten festgestellt werden. Hingegen verminderte ACS14 leicht die Oberflächenexpression von P-Selectin (α -Granula).

In der vorliegenden Studie wurde erstmalig die Wirkung des Schwefelwasserstoff-freisetzenden Aspirinderivats ACS14 auf Thrombozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ACS14 ähnlich dem herkömmlichen Aspirin die COX-abhängigen Signalwege hemmt, zusätzlich allerdings COX-unabhängige Signalwege beeinflusst werden. Bezüglich der Entstehung und Progression von arteriellen und arteriolären Thrombosen konnten für ACS14 im Vergleich zu Aspirin deutlich hemmende Effekte beobachtet werden. Ursächlich hierfür können die verminderte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin, sowie erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von cAMP und pVASP nach Behandlung mit ACS14 sein.

7 ANHANG

7.1 Chemikalien

Tabelle 7.1 Puffer und physiologische Lösungen

CaCl ₂	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
D-Glucose	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Glycerin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Hepes	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
KCl	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
MgCl ₂	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tris	Applichem (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 7.2 Chemikalien und Farbstoffe

A23187	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Acrylamid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Albumin (Rinderserum)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
APC-markiertes Fibrinogen (Alexa 647)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
BCA-Reagenz	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Bromphenolblau	Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, UK)
Carboxymethylcellulose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DiOC ₆	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Eisenchlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
FITC-Dextran	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ilomedin	Schering (Berlin, Deutschland)
Indomethacin	Schering (Berlin, Deutschland)
Leupeptin	Schering (Berlin, Deutschland)
Luciferin-Luciferase Reagenz	Chrono-Lume, Probe & go Labordiagnostica GmbH (Osburg, Deutschland)

Lumiol	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Methanol	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcitrat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
NaF	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
$\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Na_3VO_4	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Nitrozellulosemembran	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Pefablock	Roche (Basel, Schweiz)
Pepstatin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Proteingrößenmarker (gefärbt)	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Temed	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tween	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 7.3 Thrombozytenagonisten und Aktivatoren der plasmatischen Gerinnung

Arachidonsäure	Dynabyte (München, Deutschland)
Adenosindiphosphat (ADP)	Dynabyte (München, Deutschland)
Collagen	Dynabyte (München, Deutschland)
Gewebethromboplastin (rekombinant)	Pentapharm AG (Basel, Schweiz)
Thrombin Receptor Activating Protein (TRAP)	Dynabyte (München, Deutschland)
Thromboplastin-Phospholipid (partiell)	Pentapharm AG (Basel, Schweiz)

Tabelle 7.4 Anästhetika

Fentanyl	CuraMED Pharma GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Medetomidinhydrochlorid	Orion Pharma (Espoo, Finnland)
Midazolam	Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)
Natrium-Pentobarbital	Merial GmbH (Halbergmoos, Deutschland)

Tabelle 7.5 Antikörper

APC-markiertes anti-P-Selectin	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
FITC-markiertes PAC-1	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Anti-Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP)	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
Anti-phospho-VASP	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-Hase	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)

7.2 Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ACS14	2-acetyloxybenzoic acid 4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5-yl) phenyl Ester
ADP	Adenosindiphosphat
ADTOH	Dithiolethion
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	aggregation units
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD40L	CD40 Ligand
CD62P	P-Selectin
CFT	Clot Formation Time
cGMP	cyclisches Guaninmonophosphat
CK	Kreatinkinase
CO	Kohlenmonoxid
COX	Cyclooxygenase
CT	Clotting Time
EET	Epoxy-Eicosatriensäure
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarization factor
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GDP	Guanindiphosphat
GSH	Glutathion
GTP	Guanintriphosphat
HO-1	Hämoxygenase-1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
IL-1 β	Interleukin 1 β
LDH	Lactatdehydrogenase
LTA	Licht-Transmissionsaggregometrie

NaHS	Natriumhydrogensulfat
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
NSAR	Nicht-steroidale Anti-Rheumatika
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
pAVK	peripher arterielle Verschlusskrankheit
PCI	Perkutane koronararterielle Intervention
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PF4	Platelet Factor 4, jetzt CXCL4 (Chemokin Ligand 4)
PRP	Plättchen reiches Plasma
PSGL-1	P-Selectin Glykoprotein Ligand 1
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RANTES	CCL5 (Chemokin Ligand 5)
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffradikale
RPA	Residual platelet aggregation
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAP-6	Thrombin Receptor Activating Protein
TxA ₂	Thromboxan A ₂
TxB ₂	Thromboxan B ₂
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand Faktor
WT	Wildtyp

7.3 Literaturverzeichnis

1. Craven, L.L., *Experiences with aspirin (Acetylsalicylic acid) in the nonspecific prophylaxis of coronary thrombosis*. Miss Valley Med J, 1953. 75(1): p. 38-44.
2. Weiss, H.J., L.M. Aledort, and S. Kochwa, *The effect of salicylates on the hemostatic properties of platelets in man*. J Clin Invest, 1968. 47(9): p. 2169-80.
3. Begent, N.A. and G.V. Born, *Comparison of the effects of drugs on the aggregation of hamster platelets in vivo and in vitro*. Br J Pharmacol, 1971. 43(3): p. 580-92.
4. Evans, G., et al., *The effect of acetylsalicylic acid on platelet function*. J Exp Med, 1968. 128(5): p. 877-94.
5. Botting, R.M., *Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses*. J Physiol Pharmacol, 2006. 57 Suppl 5: p. 113-24.
6. Sohn, H.Y. and F. Krotz, *Cyclooxygenase inhibition and atherothrombosis*. Curr Drug Targets, 2006. 7(10): p. 1275-84.
7. Baigent, C., et al., *Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials*. Lancet, 2009. 373(9678): p. 1849-60.
8. Krotz, F., et al., *Prothrombotic potential of NSAID in ischemic heart disease*. Mini Rev Med Chem, 2006. 6(12): p. 1351-5.
9. *Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group*. Lancet, 1988. 2(8607): p. 349-60.
10. Antithrombotic Trialists, C., *Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients*. BMJ, 2002. 324(7329): p. 71-86.
11. Brewer, D.B., *Max Schultze (1865), G. Bizzozzero (1882) and the discovery of the platelet*. Br J Haematol, 2006. 133(3): p. 251-8.
12. Kehrel, B.E., *[Platelets: biochemistry and physiology]*. Hamostaseologie, 2008. 28(5): p. 289-98.
13. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets, 2001. 12(5): p. 261-73.
14. Gibbins, J.M., *Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 16): p. 3415-25.

15. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *Platelets: physiology and biochemistry*. Semin Thromb Hemost, 2005. 31(4): p. 381-92.
16. Lievens, D. and P. von Hundelshausen, *Platelets in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2011. 106(5): p. 827-38.
17. Projahn, D. and R.R. Koenen, *Platelets: key players in vascular inflammation*. J Leukoc Biol, 2012. 92(6): p. 1167-75.
18. van Gils, J.M., J.J. Zwaginga, and P.L. Hordijk, *Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases*. J Leukoc Biol, 2009. 85(2): p. 195-204.
19. Totani, L. and V. Evangelista, *Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. 30(12): p. 2357-61.
20. da Costa Martins, P., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27(5): p. 1023-9.
21. da Costa Martins, P.A., et al., *Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins*. J Leukoc Biol, 2006. 79(3): p. 499-507.
22. van Gils, J.M., et al., *Transendothelial migration drives dissociation of plateletmonocyte complexes*. Thromb Haemost, 2008. 100(2): p. 271-9.
23. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *EDHF: an update*. Clin Sci (Lond), 2009. 117(4): p. 139-55.
24. Fleming, I., *Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s)*. Pharmacol Res, 2004. 49(6): p. 525-33.
25. Tang, G., et al., *H2S Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*. Antioxid Redox Signal, 2013. 19(14): p. 1634-46.
26. Buerkle, M.A., et al., *Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo*. Circulation, 2004. 110(14): p. 2053-9.
27. Krotz, F., et al., *A sulfaphenazole-sensitive EDHF opposes platelet-endothelium interactions in vitro and in the hamster microcirculation in vivo*. Cardiovasc Res. 85(3): p. 542-50.
28. Krotz, F., et al., *Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(3): p. 595-600.
29. Krotz, F., et al., *Depolarization of endothelial cells enhances platelet aggregation through oxidative inactivation of endothelial NTPDase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. 22(12): p. 2003-9.

30. Struthmann, L., et al., *Prothrombotic effects of diclofenac on arteriolar platelet activation and thrombosis in vivo*. J Thromb Haemost, 2009. 7(10): p. 1727-35.
31. Jin, R.C. and J. Loscalzo, *Vascular Nitric Oxide: Formation and Function*. J Blood Med, 2010. 2010(1): p. 147-162.
32. Pohl, U., et al., *Endothelium-dependent phosphorylation of vasodilator-stimulated protein in platelets during coronary passage*. Am J Physiol, 1994. 266(2 Pt 2): p. H606-12.
33. Angiolillo, D.J., M. Ueno, and S. Goto, *Basic principles of platelet biology and clinical implications*. Circ J, 2010. 74(4): p. 597-607.
34. Rivera, J., et al., *Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation*. Haematologica, 2009. 94(5): p. 700-11.
35. Angiolillo, D.J., D. Capodanno, and S. Goto, *Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis*. Eur Heart J, 2010. 31(1): p. 17-28.
36. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. Circ Res, 2006. 99(12): p. 1293-304.
37. Dorsam, R.T. and S.P. Kunapuli, *Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation*. J Clin Invest, 2004. 113(3): p. 340-5.
38. Brass, L.F., *Thrombin and platelet activation*. Chest, 2003. 124(3 Suppl): p. 18S-25S.
39. Campbell, C.L., et al., *Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease: a systematic review*. JAMA, 2007. 297(18): p. 2018-24.
40. Krotz, F., et al., *Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction*. J Vasc Res, 2005. 42(4): p. 312-24.
41. Martelli, A., et al., *Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery*. Med Res Rev, 2012 Nov; 32(6): p. 1093-130.
42. Wallace, J.L., *Building a better aspirin: gaseous solutions to a century-old problem*. Br J Pharmacol, 2007. 152(4): p. 421-8.
43. Fiorucci, S., L. Santucci, and E. Distrutti, *NSAIDs, coxibs, CINOD and H2S-releasing NSAIDs: what lies beyond the horizon*. Dig Liver Dis, 2007. 39(12): p. 1043-51.
44. Kashiba, M., et al., *From O2 to H2S: a landscape view of gas biology*. Keio J Med, 2002. 51(1): p. 1-10.
45. Leslie, M., *Medicine. Nothing rotten about hydrogen sulfide's medical promise*. Science, 2008. 320(5880): p. 1155-7.
46. Kimura, H., *Signaling of Hydrogen Sulfide and Polysulfides*. Antioxid Redox Signal, 2015 Feb 10; 22(5): p. 347-9.
47. Li, L., P. Rose, and P.K. Moore, *Hydrogen sulfide and cell signaling*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2011. 51: p. 169-87.

48. Kimura, Y. and H. Kimura, *Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress*. FASEB J, 2004. 18(10): p. 1165-7.
49. Xie, Y., Zhang, N., Li, L., Zhang, Q., Xie, L., Jiang, H., Li, L., Hao, N., & Zhang, J. , *Hydrogen sulfide reduces regional myocardial ischemia injury through protection of mitochondrial function*. . Molecular Medicine Reports, 2014. 10(4): p. 1907-1914.
50. Hua, W., et al., *Cardioprotection of H₂S by downregulating iNOS and upregulating HO-1 expression in mice with CVB3-induced myocarditis*. Life Sci, 2013. 93(24): p. 949-54.
51. Bucci, M., et al., *Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. 30(10): p. 1998-2004.
52. Yang, G., et al., *H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase*. Science, 2008. 322(5901): p. 587-90.
53. Wang, R., *Toxic gas, lifesaver*. Sci Am, 2010. 302(3): p. 66-71.
54. Lefer, D.J., *A new gaseous signaling molecule emerges: cardioprotective role of hydrogen sulfide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(46): p. 17907-8.
55. Cheng, Y., et al., *Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. 287(5): p. H2316-23.
56. Jiang, B., et al., *Molecular mechanism for H₂S-induced activation of K(ATP) channels*. Antioxid Redox Signal, 2010. 12(10): p. 1167-78.
57. Li, L. and P.K. Moore, *Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air?* Trends Pharmacol Sci, 2008. 29(2): p. 84-90.
58. Osipov, R.M., et al., *Effect of hydrogen sulfide in a porcine model of myocardial ischemia-reperfusion: comparison of different administration regimens and characterization of the cellular mechanisms of protection*. J Cardiovasc Pharmacol, 2009. 54(4): p. 287-97.
59. Szabo, G., et al., *Cardioprotective effects of hydrogen sulfide*. Nitric Oxide, 2011 Aug 1; 25(2): p. 201-10.
60. Hu, L.F., et al., *Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia*. J Neurochem, 2007. 100(4): p. 1121-8.
61. Li, L., M. Bhatia, and P.K. Moore, *Hydrogen sulphide--a novel mediator of inflammation?* Curr Opin Pharmacol, 2006. 6(2): p. 125-9.
62. Zanardo, R.C., et al., *Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation*. FASEB J, 2006. 20(12): p. 2118-20.

63. Fiorucci, S., et al., *Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs*. Gastroenterology, 2005. 129(4): p. 1210-24.
64. Oh, G.S., et al., *Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide*. Free Radic Biol Med, 2006. 41(1): p. 106-19.
65. Fiorucci, S., et al., *Nitric oxide-releasing NSAIDs: a review of their current status*. Drug Saf, 2001. 24(11): p. 801-11.
66. Fiorucci, S. and P. Del Soldato, *NO-aspirin: mechanism of action and gastrointestinal safety*. Dig Liver Dis, 2003. 35 Suppl 2: p. S9-19.
67. Loscalzo, J., *Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis*. Circ Res, 2001. 88(8): p. 756-62.
68. Miller, M.R. and I.L. Megson, *Recent developments in nitric oxide donor drugs*. Br J Pharmacol, 2007. 151(3): p. 305-21.
69. Szabo, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2007. 6(8): p. 662-80.
70. Wallace, J.L., et al., *Nitric oxide-releasing NSAIDs: GI-safe antithrombotics*. IDrugs, 1999. 2(4): p. 321-6.
71. Wallace, J.L., et al., *A diclofenac derivative without ulcerogenic properties*. Eur J Pharmacol, 1994. 257(3): p. 249-55.
72. Wallace, J.L., et al., *Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat*. Gastroenterology, 1994. 107(1): p. 173-9.
73. Fiorucci, S., et al., *Gastrointestinal safety of NO-aspirin (NCX-4016) in healthy human volunteers: a proof of concept endoscopic study*. Gastroenterology, 2003. 124(3): p. 600-7.
74. Whiteman, M., et al., *The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'?* J Neurochem, 2004. 90(3): p. 765-8.
75. Li, L., et al., *Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative*. Free Radic Biol Med, 2007. 42(5): p. 706-19.
76. Wallace, J.L., *Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs*. Trends Pharmacol Sci, 2007. 28(10): p. 501-5.
77. Sparatore, A., et al., *Pharmacological profile of a novel H(2)S-releasing aspirin*. Free Radic Biol Med, 2009. 46(5): p. 586-92.

78. Giustarini, D., et al., *Modulation of thiol homeostasis induced by H₂S-releasing aspirin*. Free Radic Biol Med, 2010. 48(9): p. 1263-72.
79. Liu, L., et al., *H₂S-releasing aspirin protects against aspirin-induced gastric injury via reducing oxidative stress*. PLoS One, 2012. 7(9): p. e46301.
80. Rossoni, G., et al., *Activity of a new hydrogen sulfide-releasing aspirin (ACS14) on pathological cardiovascular alterations induced by glutathione depletion in rats*. Eur J Pharmacol, 2010. 648(1-3): p. 139-45.
81. Zhang, H., et al., *Effect of S-aspirin, a novel hydrogen-sulfide-releasing aspirin (ACS14), on atherosclerosis in apoE-deficient mice*. Eur J Pharmacol, 2012. 697(1-3): p. 106-16.
82. Huang, Q., et al., *Hydrogen sulfide releasing aspirin, ACS14, attenuates high glucose-induced increased methylglyoxal and oxidative stress in cultured vascular smooth muscle cells*. PLoS One, 2014. 9(6): p. e97315.
83. Menger, M.D., M.W. Laschke, and B. Vollmar, *Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber*. Eur Surg Res, 2002. 34(1-2): p. 83-91.
84. Muzaffar, S., et al., *H₂S-donating sildenafil (ACS6) inhibits superoxide formation and gp91phox expression in arterial endothelial cells: role of protein kinases A and G*. Br J Pharmacol, 2008. 155(7): p. 984-94.
85. Scharf, R.E., *Angeborene und erworbene Thrombozytenfunktionsstörungen*. Hämostaseologie, 2003. 23: p. 170 - 180.
86. Velik-Salchner, C., et al., *Point-of-care whole blood impedance aggregometry versus classical light transmission aggregometry for detecting aspirin and clopidogrel: the results of a pilot study*. Anesth Analg, 2008. 107(6): p. 1798-806.
87. Braunwald, E., et al., *Assessing the current role of platelet function testing*. Clin Cardiol, 2008. 31(3 Suppl 1): p. I10-6.
88. Geisler, T., et al., *Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation*. Eur Heart J, 2006. 27(20): p. 2420-5.
89. Matetzky, S., et al., *Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction*. Circulation, 2004. 109(25): p. 3171-5.
90. Hochholzer, W., et al., *Impact of the degree of peri-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement*. J Am Coll Cardiol, 2006. 48(9): p. 1742-50.

91. Sibbing, D., et al., *Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis*. J Am Coll Cardiol, 2009. 53(10): p. 849-56.
92. Rahe-Meyer, N., et al., *Platelet concentrates transfusion in cardiac surgery and platelet function assessment by multiple electrode aggregometry*. Acta Anaesthesiol Scand, 2009. 53(2): p. 168-75.
93. Selley, M.L., et al., *Effect of anethole dithiolthione on human platelet aggregation*. Arzneimittelforschung, 1992. 42(3): p. 318-21.
94. Kraemer, B.F., et al., *Bacteria differentially induce degradation of Bcl-xL, a survival protein, by human platelets*. Blood, 2012. 120(25): p. 5014-20.
95. Grundler, K., et al., *Platelet mitochondrial membrane depolarization reflects disease severity in patients with sepsis and correlates with clinical outcome*. Crit Care, 2014. 18(1): p. R31.
96. Greene, T.K., et al., *Towards a standardization of the murine tail bleeding model*. J Thromb Haemost, 2010. 8(12): p. 2820-2.
97. Patrono, C., *Low-dose aspirin in primary prevention: cardioprotection, chemoprevention, both, or neither?* Eur Heart J, 2013. Nov; 34(44): p. 3403-11.
98. Patrono, C., et al., *Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis*. N Engl J Med, 2005. 353(22): p. 2373-83.
99. Hansen, M.L., et al., *Risk of bleeding with single, dual, or triple therapy with warfarin, aspirin, and clopidogrel in patients with atrial fibrillation*. Arch Intern Med, 2010. 170(16): p. 1433-41.
100. Tamura, T., et al., *Aspirin- and clopidogrel-associated bleeding complications: data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system, AERS*. Int J Med Sci, 2012. 9(6): p. 441-6.
101. Fosbol, E.L., et al., *Cause-Specific Cardiovascular Risk Associated With Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs Among Healthy Individuals*. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2010 Jul; 3(4): 395-405.
102. Gudbjornsson, B., et al., *Rofecoxib, but not celecoxib, increases the risk of thromboembolic cardiovascular events in young adults-a nationwide registry-based study*. Eur J Clin Pharmacol, 2010. 66(6): p. 619-25.
103. Whinna, H.C., *Overview of murine thrombosis models*. Thromb Res, 2008. 122 Suppl 1: p. S64-9.
104. Rumbaut, R.E., D.W. Slaff, and A.R. Burns, *Microvascular thrombosis models in venules and arterioles in vivo*. Microcirculation, 2005. 12(3): p. 259-74.

105. Massberg, S., et al., *A Crucial Role of Glycoprotein VI for Platelet Recruitment to the Injured Arterial Wall In Vivo*. Journal of Experimental Medicine, 2002. 197(1): p. 41-49.
106. Eckly, A., et al., *Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis*. J Thromb Haemost, 2011. 9(4): p. 779-89.
107. MØLLer, F. and M. Tranholm, *A ferric chloride induced arterial injury model used as haemostatic effect model*. Haemophilia, 2010. 16(1): p. e216-e222.
108. Asaishi, K., et al., *Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3*. Cancer Res, 1981. 41(5): p. 1898-904.
109. Endrich, B., A. Goetz, and K. Messmer, *Distribution of microflow and oxygen tension in hamster melanoma*. Int J Microcirc Clin Exp, 1982. 1(1): p. 81-99.
110. Wentworth, J.K., G. Pula, and A.W. Poole, *Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets*. Biochem J, 2006. 393(Pt 2): p. 555-64.
111. Butt, E., et al., *cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets*. J Biol Chem, 1994. 269(20): p. 14509-17.
112. Horstrup, K., 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): p. 21-7.
113. Ball, C., et al., *Glutathione regulates integrin alpha(IIb)beta(3)-mediated cell adhesion under flow conditions*. Thromb Haemost, 2008. 100(5): p. 857-63.
114. Essex, D.W., *The role of thiols and disulfides in platelet function*. Antioxid Redox Signal, 2004. 6(4): p. 736-46.
115. Essex, D.W. and M. Li, *Redox modification of platelet glycoproteins*. Curr Drug Targets, 2006. 7(10): p. 1233-41.
116. Meadows, T.A. and D.L. Bhatt, *Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation*. Circ Res, 2007. 100(9): p. 1261-75.
117. Varon, D. and G. Spectre, *Antiplatelet agents*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 267-72.

7.4 Publikationen

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden in einem wissenschaftlichen Artikel veröffentlicht:

The Hydrogen Sulfide-Releasing Aspirin Derivative ACS14 exerts strong Antithrombotic effects in vitro an in vivo. Pircher J*, **Fochler F***, Czermak T, Mannell H, Kraemer B, Wörnle M, Sparatore A, del Soldato P, Pohl U, Krötz F. ATVB 2012 Sept; 32 (12): 2884-91

* geteilte Erstautorenschaft

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden im Rahmen von Posterpräsentationen oder Vorträgen auf folgenden Kongressen vorgestellt:

The new Hydrogen Sulfide-Releasing Aspirin Derivative exerts strong Antithrombotic effects in vitro an in vivo. **Fochler F.** Doktorandentag des Walter-Brendel-Zentrums der Ludwig-Maximilians-Universität München 2012, München, Deutschland.

The new Hydrogen Sulfide-Releasing Aspirin Derivative exerts strong Antithrombotic effects in vitro an in vivo. Pircher J*, **Fochler F***, Mannell H, Del Soldato P, Pohl U, Krötz F. Joint Meeting of the European Society of Microcirculation (ESM) and the German Society of Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB) 2011, München, Deutschland.

Das neue Schwefelwasserstoff-freisetzende Aspirinderivat ACS14 bewirkt eine hocheffektive Thrombozytenhemmung in vitro und in vivo. **Fochler F.** Doktorandenmesse der Ludwig-Maximilians-Universität München 2011, München, Deutschland. (Prämierter Vortrag)

The new Hydrogen Sulfide-Releasing Aspirin Derivative ACS14 is a strong antiplatelet drug in vitro an in vivo. Pircher J*, **Fochler F***, Mannell H, Del Soldato P, Pohl U, Krötz F. UK Platelet Meeting 2011, Cardiff, UK.

The new Hydrogen Sulfide-Releasing Aspirin Derivative ACS14 is a highly effective platelet inhibitor in vitro an in vivo. Pircher J*, **Fochler F***, Schuhmann C, Mannell H, Del Soldato P, Pohl U, Krötz F. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Kardiologie 2011, Mannheim, Deutschland.

The new Hydrogen Sulfide-Releasing Aspirin Derivative ACS14 is a highly effective platelet inhibitor in vitro an in vivo. Fochler F. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2011, Regensburg, Deutschland.

Weitere Veröffentlichungen als wissenschaftliche Artikel:

Site directed vascular gene delivery by ultrasonic destruction of magnetic nanoparticle coated microbubbles. Mannell H, Pircher J, Fochler F, Stampnik Y, Räthel T, Gleich B, Plank C, Mykhaylyk O, Dahmani C, Wörnle M, Ribeiro A, Pohl U, Krötz F. Nanomedicine 2012 (8); 1309-18

7.5 Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Prof. Dr. med. Ulrich Pohl, dem Vorstand des Walter-Brendel Zentrums, Institut für Experimentelle Medizin, für die Möglichkeit, dieses Projekt in einem ausgezeichneten wissenschaftlichen Rahmen durchführen zu dürfen.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Florian Krötz, meinem Arbeitsgruppenleiter und Doktorvater, der mich zum wissenschaftlichen Arbeiten inspiriert und von Anfang an immer unterstützt hat. Durch seine langjährige Erfahrung und sein Wissen hat er entscheidende Hilfestellungen und Ratschläge für meine Arbeit gegeben. Zudem möchte ich mich für das kritische Lesen dieser Arbeit bedanken.

Zu größter Dankbarkeit fühle ich mich meinem Betreuer Dr. med. Joachim Pircher verpflichtet, der mich über die Jahre hinweg exzellent durch alle Höhen und Tiefen einer experimentellen Doktorarbeit begleitet hat. Er hatte immer wieder neue Ideen und Lösungen für Probleme, wodurch die Arbeit schließlich zu dem wurde, was sie heute ist. Auch ihm möchte ich meinen Dank für das kritische und konstruktive Lesen dieser Arbeit aussprechen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. rer. nat. Hanna Mannell, die meine Arbeit immer unterstützt hat, bei Problemen zuhörte und durch ihre große wissenschaftliche Erfahrung viele Vorschläge für meine experimentellen Studien hatte.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Ramona Mettler, unserer MTA, die stets bereitwillig ausgeholfen und nie die Geduld verloren hat.

Ein weiterer Dank gilt meinen Mit-Doktoranden der AG Krötz, Stefan Alig, Daniel Chaudhry, Thomas Czermak, Katharina Gründler, Elisabeth Koch und Yvonn Stampnik für Diskussionen, Unterstützung, Rat und angenehme Stunden.

Auch bei allen übrigen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich herzlich für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Besonderer Dank geht an meine beiden jetzigen Chefs, Prof. Dr. med. Sebastian Kerber und Prof. Dr. med. Thomas Deneke, die mir optimale Bedingungen für meine zukünftige Ausbildung zur Kardiologin schaffen und immer bereitwillig für Diskussionen und anregende Gespräche zur Verfügung stehen.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für die Unterstützung während dieser Zeit und die offenen Ohren in schweren Stunden. Sie haben mich immer ermutigt, diesen Weg zu gehen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden, die oft auf mich verzichten mussten, immer Verständnis hatten und mir in meiner Freizeit geholfen haben wieder Kraft und Energie zu tanken. Insbesondere danke ich Barbara und Cornelia für die anregenden Diskussionen, guten Ratschläge und offenen Ohren. Ein weiterer besonderer Dank geht an Thomas, der mich vor allem in der letzten Phase der Fertigstellung entscheidend mit konstruktiven Diskussionen und Ratschlägen begleitet, ermutigt und unterstützt hat.

Eidesstattliche Versicherung

Franziska Fochler

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Das Schwefelwasserstoff-freisetzende Aspirinderivat ACS14 zeigt starke antithrombotische Effekte *in vitro* und *in vivo*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.