

Aus dem Bereich Innere Medizin III  
Klinische Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Einfluss des Thrombin-Inhibitors Dabigatran auf die  
endotheliale Funktion und die Atherogenese am Modell der  
ApoE<sup>-/-</sup>-Maus**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der **Universität des Saarlandes**

2014

vorgelegt von: Mario Tobias Kratz  
geboren am 05.01.1987  
in Homburg/Saar

Inhalt.....	Seite
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>- 9 -</b>
2.1 Einführung.....	- 9 -
2.1.1 Endotheliale Dysfunktion.....	- 9 -
2.1.2 Die Genese der Atherosklerose .....	- 9 -
2.2 Die Gerinnungskaskade .....	- 10 -
2.3 Fragestellung.....	- 14 -
<b>3 Material und Methodik.....</b>	<b>- 15 -</b>
3.1 Materialien.....	- 15 -
3.1.1 Verwendete Substanzen .....	- 15 -
3.1.2 Lösungen .....	- 16 -
3.1.3 Geräte und Zubehör .....	- 17 -
3.1.3.1 Versuchsübergreifend.....	- 17 -
3.1.3.2 Isometrische Spannungsmessung an isolierten Geweben im Organbad .....	- 17 -
3.1.3.3 Histologie .....	- 17 -
3.1.4 Software.....	- 17 -
3.1.4.1 Bestimmung der Vitalparameter.....	- 17 -
3.1.4.2 Isometrische Spannungsmessung im Organbad .....	- 17 -
3.1.4.3 Histologie .....	- 18 -
3.1.4.4 Statistische Auswertung.....	- 18 -
3.2 Methodik.....	- 18 -
3.2.1 Versuchstiere .....	- 18 -
3.2.2 Tierhaltung .....	- 19 -
3.2.3 Tierfütterung.....	- 19 -
3.2.4 Studienprotokoll .....	- 19 -
3.2.5 Erhebung der Kreislaufdaten.....	- 20 -
3.2.6 Erhebung der Dabigatran-Plasmakonzentration mittels HEMOCLOT .....	- 21 -
3.2.7 Isometrische Spannungsmessung an isoliertem Gewebe im Organbad .....	- 21 -
3.2.7.1 Anästhesie und Organentnahme .....	- 21 -

3.2.7.2	Versuchsablauf .....	- 22 -
3.2.8	Histologische Untersuchungen.....	- 27 -
3.2.8.1	Kryotomie.....	- 27 -
3.2.8.2	Mikroskopie.....	- 27 -
3.2.8.3	Ölrot-O-Färbung.....	- 27 -
3.2.8.4	Sirius Red-Färbung.....	- 28 -
3.2.8.5	Dihydroethidium-Färbung.....	- 29 -
3.2.8.6	Immunfluoreszenzfärbung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS).....	- 30 -
3.2.8.7	Quantifizierung von Stickstoffmonoxid (Diaminofluoreszein-Färbung).....	- 32 -
3.3	Statistische Auswertung .....	- 33 -
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>- 34 -</b>
4.1	Einfluss des Thrombin-Inhibitors Dabigatran auf die endotheliale Funktion im Modell der ApoE-Knockout Maus .....	- 34 -
4.1.1	Gerinnungsparameter und Plasmakonzentration .....	- 34 -
4.1.2	Vitalparameter.....	- 35 -
4.1.3	Verbesserung der Endothelfunktion durch Dabigatran.....	- 36 -
4.1.4	Histologische Untersuchungen an Aorten unter Behandlung mit Dabigatran.....	- 38 -
4.1.4.1	Reduktion atherosklerotischer Läsionen .....	- 38 -
4.1.4.2	Reduktion des fibrotischen Remodelling .....	- 40 -
4.1.4.3	Geringere Last an radikalen Sauerstoffspezies .....	- 42 -
4.1.4.4	Gesteigerte Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) .....	- 44 -
4.1.4.5	Gesteigerte endotheliale Stickstoffmonoxidfreisetzung.....	- 46 -
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>- 49 -</b>
5.1	Zusammenfassung.....	- 52 -
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>- 53 -</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen</b> .....	<b>- 62 -</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>- 68 -</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>- 69 -</b>

# Verwendete Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE <sup>-/-</sup>	Apolipoprotein E Knockout
aqua dest.	destilliertes Wasser
BP	blood pressure
°C	Grad Celsius
C.I.	colour index
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAF (DA)	Diaminofluoreszein (Diazetat)
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dTT	Diluted thrombin time (verdünnte Thrombinzeit)
ED <sub>50</sub>	50 %-Effektivdosis
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-synthase
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
g, kg, mg, µg	Gramm, Kilogramm (10 <sup>3</sup> Gramm), Milligramm (10 <sup>-3</sup> Gramm), Mikrogramm (10 <sup>-6</sup> Gramm)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoffsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	high pressure liquid chromatography
Hz, kHz	Hertz, Kilohertz (10 <sup>3</sup> Hertz)
IgG	Immunglobulin G
l, dl, ml, µl	Liter, Deziliter (10 <sup>-1</sup> Liter), Milliliter (10 <sup>-3</sup> Liter), Mikroliter (10 <sup>-6</sup> Liter)
λ	Wellenlänge
L-Arg	L-Arginin
LDL	low density lipoprotein
L-NAME	N <sub>ω</sub> -Nitro-L-Arginin-Methylester
log	dekadischer Logarithmus
M,	Molar (mol pro Liter),
mM, µM, nM	Millimolar (10 <sup>-3</sup> mol/l), Mikromolar (10 <sup>-6</sup> mol/l), Nanomolar (10 <sup>-9</sup> mol/l)
m, mm, µm, nm	Meter, Millimeter (10 <sup>-3</sup> Meter), Mikrometer (10 <sup>-6</sup> Meter), Nanometer (10 <sup>-9</sup> Meter)
M <sub>3</sub>	muskarinerges Acetylcholinrezeptor Typ 3
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mol, mmol,	Stoffmenge ( $6,02 \cdot 10^{23}$ Teilchen), Millimol ( $10^{-3}$ mol),
$\mu$ mol, nmol	Mikromol ( $10^{-6}$ mol), Nanomol ( $10^{-9}$ mol)
MW	Mittelwert
N, mN	Newton, Millinewton ( $10^{-3}$ Newton)
n	Anzahl der Experimente
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
n. s.	nicht signifikant
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hydroperoxidanion
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PBS	phosphate buffered saline
PGA <sub>2</sub>	Prostaglandin A <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s, ms	Sekunde, Millisekunde ( $10^{-3}$ Sekunden)
SCN <sup>-</sup>	Thiocyanat-Anion
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
VLDL	very low density lipoprotein
Vol %	Volumenprozent
WT	Wildtyp

# 1 Zusammenfassung

Dabigatran ist ein in jüngster Zeit entwickeltes orales Antikoagulans, welches Thrombin direkt inhibiert. Dieser Gerinnungsfaktor und die durch ihn stimulierten Rezeptoren spielen, aber auch neben ihren gerinnungsrelevanten Effekten, für die Entwicklung einer Atherosklerose eine wichtige pathophysiologische Rolle. Daher wurde die Wirkung der direkten Thrombinhemmung mit Dabigatran auf die Endothelfunktion und die Genese einer Atherosklerose in einem hypercholesterinämischen Mausmodell (ApoE<sup>-/-</sup>-Maus) untersucht.

Wildtyp- und ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit einer cholesterinreichen Diät sowie mit Dabigatran (900 mg/kg Körpergewicht) oder Placebo über einen Zeitraum von 12 Wochen gefüttert. Die Wildtyp-Tiere (WT, C57/B6J) dienten als Kontrollgruppe. Die endotheliale Funktion der Aortenringe wurde durch pharmakologische Stimulation mittels Carbachol (endothelabhängig) und Glyceroltrinitrat (endothelunabhängig) ermittelt. Die Größen der atherosklerotischen Gefäßläsionen wurden mit Hilfe der Ölrot-Färbung, die vaskulären Kollagengehalte mittels Sirius-Red-Färbung und die Veränderungen der Produktion an freien Radikalen (ROS) durch semiquantitative Immunhistochemie mit Dihydroethidium bestimmt. Anhand der DAF-Färbung (Diaminofluorescein) konnte der intrazelluläre Gehalt von NO gemessen werden. Die Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) wurde mittels semiquantitativer Immunhistochemie bestimmt.

Die Behandlung mit Dabigatran verringerte die atherosklerotische Plaquelast (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran:  $3 \pm 0,7$  % der ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle,  $p = 0,00002$ ), verringerte den Kollagengehalt (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran:  $29,4 \pm 5,9$  % der ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle,  $p = 0,003$ ) und die ROS-Produktion in der DHE-Färbung (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran:  $50,7 \pm 4,1$  % der ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle,  $p = 0,00003$ ). Außerdem verbesserte sich in ähnlichem Maße die Endothelfunktion (ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle  $42,6 \pm 2,7$  % der Phenylephrin-induzierten Kontraktilität; ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran  $62,9 \pm 3,3$  % der Phenylephrin-induzierten Kontraktion,  $p = 0,001$ ) unter Zugabe von 100  $\mu$ M Carbachol. Des Weiteren zeigten sich bei den Tieren, die mit Dabigatran behandelt wurden, ein Anstieg der eNOS-Expression (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran:  $+33,4 \pm 1,8$  % der ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle,  $p = 0,006$ ) und

eine höhere intrazelluläre NO-Konzentration (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran: +11,9 ± 0,9 % der ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle, p = 0,00002), als Marker der endothelialen Funktion.

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine direkte Thrombinhemmung mit Dabigatran die endotheliale Funktion verbessert, den Gehalt an vaskulärem NO und der endothelialen NO-Synthase (eNOS) steigert und die atherosklerotische Plauegröße, den vaskulären Kollagengehalt sowie den oxidativen Stress im hypercholesterämischen Mausmodell reduziert. Die pathophysiologischen Wirkungen der thrombinvermittelten Wirkungen auf die Gerinnung und die Genese der Atherosklerose wurden hier erstmalig experimentell gezeigt und können für die zukünftige Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine entscheidende Bedeutung haben und müssen in klinischen Untersuchungen prospektiv und randomisiert geprüft werden.

## Abstract

The recently developed oral anticoagulant dabigatran is directly inhibiting thrombin. Thrombin and subsequent stimulation of thrombin receptors are suggested to be involved in the pathogenesis of atherosclerosis. We investigated the effects of direct thrombin inhibition on atherosclerosis and endothelial function in a hypercholesterolemic mouse model with accelerated atherosclerosis after serum cholesterol elevation with Western diet exposure (ApoE<sup>-/-</sup>-mice).

Wildtype and ApoE<sup>-/-</sup>-mice were treated with a cholesterol-rich diet for 12 weeks and dabigatran (900mg/kg body weight) or placebo. Wildtype (WT, C57/B6) mice served as control. Endothelial function of aortic rings was assessed by pharmacological stimulation with carbachol (endothelium-dependent) using glyceroltrinitrate (endothelium-independent) as control. Atherosclerotic lesion formation was evaluated with Oil Red staining and vascular collagen content was determined by Sirius Red staining. Modulation of reactive oxygen species (ROS) production was determined by semiquantitative immunohistochemical staining with dihydroethidium. The amount of intracellular NO was evaluated with Diaminofluorescein diacetate staining. The adjustment of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was determined by semiquantitative immunohistochemical staining.

Treatment with dabigatran attenuated atherosclerotic plaque formation (ApoE<sup>-/-</sup>-dabigatran: 3 ± 0.7 % of ApoE<sup>-/-</sup>-control, p = 0.00002), decreased aortic collagen content (ApoE<sup>-/-</sup>-dabigatran: 29.4 ± 5.9 % of ApoE<sup>-/-</sup>-control, p = 0.002) and ROS production in DHE-staining (ApoE<sup>-/-</sup>-dabigatran: 40.5 ± 3.3 % of ApoE<sup>-/-</sup>-control, p = 0.00003) in parallel to an improvement of endothelial function (ApoE<sup>-/-</sup>-control 42.6 ± 2.7 vs. ApoE<sup>-/-</sup>-dabigatran 62.9 ± 3.3 % of phenylephrine-induced contraction, p = 0.001) at 100 μM carbachol. Furthermore, by animals treated with Dabigatran, the eNOS was upregulated (ApoE<sup>-/-</sup>-dabigatran: 33.4 ± 1.8 % of ApoE<sup>-/-</sup>-control, p = 0.006) and they had a higher concentration of intracellular NO (ApoE<sup>-/-</sup>-dabigatran: 11.9 ± 0.9 % of ApoE<sup>-/-</sup>-control, p = 0.00002) as a marker for endothelial function.

This investigation has shown that direct thrombin inhibition improved endothelial

function, increased the amount of intracellular NO and eNOS, reduced atherosclerotic lesion size, vascular collagen content and oxidative stress in hypercholesterolemic atherosclerosis. Interference with the coagulation system might provide therapeutic means to modify atherosclerotic disease progression beyond anticoagulation.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Einführung**

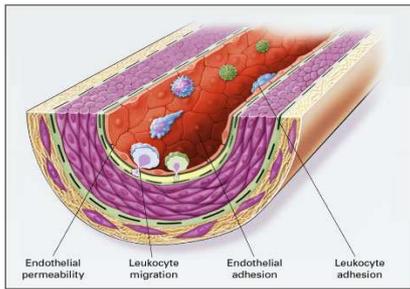
#### **2.1.1 Endotheliale Dysfunktion**

Die endotheliale Dysfunktion ist eine wichtige, vaskuläre Funktionsstörung, welche prognostisch bedeutsam für die Genese einer Atherosklerose ist und als ihre Frühform angesehen wird <sup>1,2</sup>. Dabei können verminderte Freisetzung von endothelialen Vasodilatoren (wie Stickstoffmonoxid), vermehrte Bildung von Vasokonstriktoren, aber auch eine verringerte Empfindlichkeit der glatten Muskelzellen gegenüber Endothel-eigenen Vasodilatoren ursächlich für den Funktionsverlust sein <sup>3,4</sup>. Darüber hinaus haben die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonus, Nikotinabusus, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus und die mit diesen Risikofaktoren in Verbindung stehenden pathophysiologischen zellulären Mechanismen, wie z. B. oxidativer Stress, endothelschädigende Effekte <sup>2,5-9</sup>. Diese Riskofaktoren reduzieren die Synthese und Freisetzung von endothelialelem NO und sind somit Ausgangspunkt vieler pathologischer Prozesse in der Pathogenese atheromatöser Gefäßwandveränderungen <sup>10</sup>.

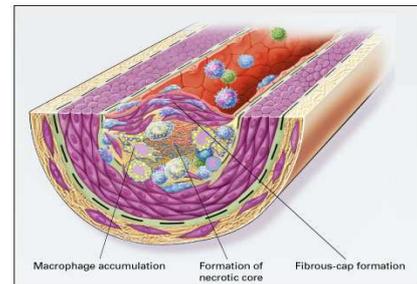
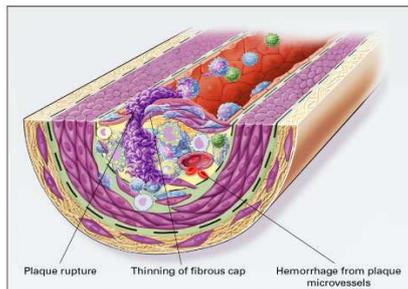
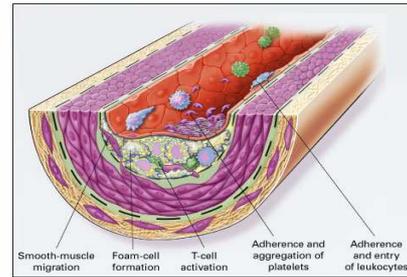
#### **2.1.2 Die Genese der Atherosklerose**

Die endotheliale Dysfunktion stellt den Beginn der Entwicklung einer generalisierten Atherosklerose dar. Dabei scheinen insbesondere LDL-Cholesterin und sein oxidatives Produkt (ox-LDL) ursächlich für die Genese der Atherosklerose zu sein (siehe Abb. 2.1). Denn die Exposition des Endothels gegenüber Cholesterin und anderen Risikofaktoren führt zu einer Verschlechterung der Endothelfunktion und mündet somit in ein Frühstadium der Atherosklerose. Im weiteren Verlauf kommt es, durch den Verlust der endothelialen Integrität, zu einer Invasion von Leukozyten und es bilden sich „Fatty-Streaks“ aus. Monozyten wandern dabei in subendotheliale Gefäßschichten ein, phagozytieren abgelagerte Lipide und differenzieren sich zu sogenannten Schaumzellen, welche proinflammatorische Mediatoren sezernieren. Folglich wird das weitere Einwandern von Makrophagen und T-Zellen, aber auch die Invasion und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, begünstigt und es kommt so zur Ausbildung einer atherosklerotischen Plaque <sup>11</sup>.

## Endotheliale Dysfunktion



## Oxidativer Stress



## Instabile Plaque

## Fortgeschrittene Plaque

**Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Genese einer generalisierten Atherosklerose**

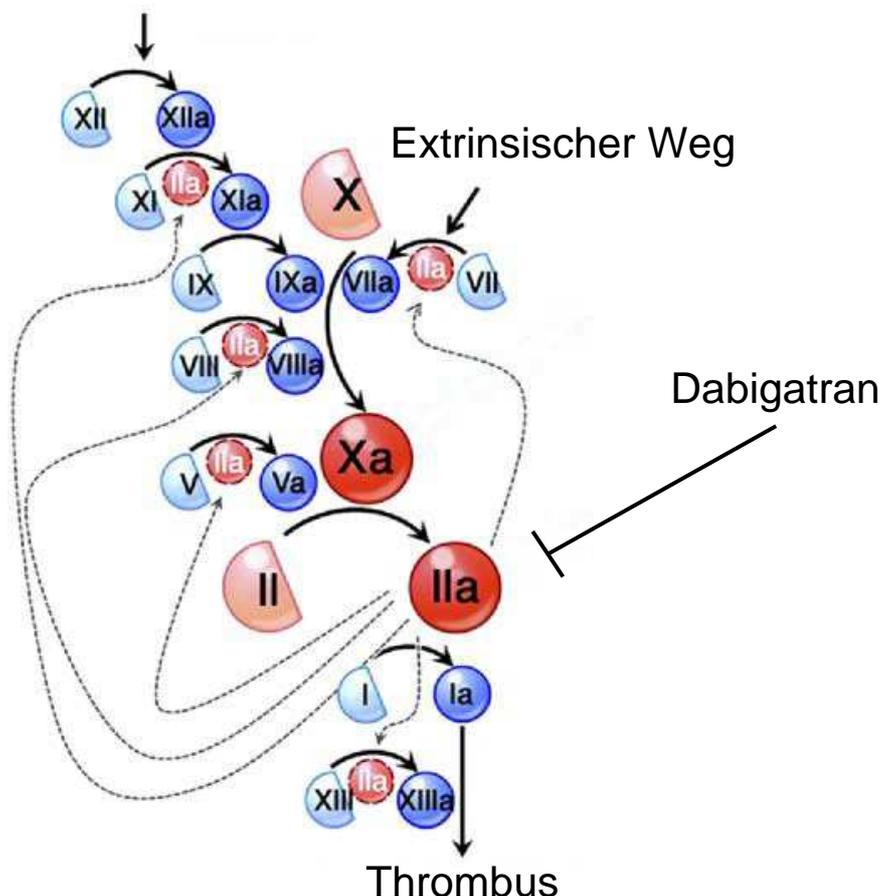
Die endotheliale Dysfunktion ist Ausgangspunkt der Atherosklerose. Cholesterin und gesättigte Fettsäuren wandern in das Endothel ein und lagern sich ab. Die endotheliale Permeabilität nimmt zu und Leukozyten migrieren in subendotheliale Gefäßschichten. Oxidativer Stress begünstigt das weitere Einwandern von Entzündungszellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen. Darüber hinaus heften sich Thrombozyten an die Intima an. Im weiteren Verlauf kann sich zum einen eine instabile Plaque mit dünner fibröser Kappe und hoher Rupturwahrscheinlichkeit, zum anderen eine fortgeschrittene Plaque mit einer durch glatte Muskelzellen stabilisierten fibrösen Kappe einschließlich nekrotischem Kern und geringer Rupturwahrscheinlichkeit ausbilden. Die instabile Plaque kann in eine fortgeschrittene Plaque übergehen, wie auch umgekehrt eine fortgeschrittene stabile Plaque durch Inflammation und Metalloproteinaseaktivierung zu einer rupturfährenden instabilen Plaque werden<sup>11</sup>.

## 2.2 Die Gerinnungskaskade

Die Gerinnungskaskade kann sowohl intrinsisch als auch extrinsisch aktiviert werden. Dabigatran ist ein orales Antikoagulans der neuesten Generation, welches den Faktor II (Thrombin) inhibiert und dabei an dem Punkt der Gerinnungskaskade agiert, an dem extrinsischer und intrinsischer Weg zusammenlaufen (siehe Abb. 2.2)<sup>12</sup>. Bisher standen lediglich Vitamin-K-Antagonisten, welche die Produktion der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (Faktoren II, XII, IX, X) in der Leber beeinflussen, zur therapeutischen Antikoagulation zur Verfügung<sup>13</sup>. Dabigatran wirkt an dem

Punkt, an welchem durch die Aktivierung des Faktor X der finale Abschnitt der Kaskade eingeleitet wird <sup>13</sup>. Über den Mediator Faktor V wird schließlich der Faktor II (Prothrombin) zu Faktor IIa (Thrombin) aktiviert und Fibrinogen wird zu Fibrin gespalten, welches der zentrale Bestandteil von Blutkoageln darstellt <sup>13</sup>. Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung und erhöht das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden um das Fünffache <sup>12,14</sup>. Dabei steigt die Inzidenz von Vorhofflimmern mit dem Alter stark an, was sich mit Daten der Framingham-Studie belegen lässt <sup>15</sup>. Daher wurde bei Vorhofflimmern der Thrombinantagonist Dabigatran im Vergleich zu den klassischen Vitamin-K-Antagonisten dahingehend untersucht, ob mit spezifischerer Wirkungshemmung diese Substanz mit weniger Nebenwirkungen vertragen wird und gleichzeitig ebenso viele oder sogar mehr klinische Ereignisse verhindert werden können. So konnte die RE-LY-Studie bereits zeigen, dass die Gabe des Thrombin-Inhibitors Dabigatran zur Prävention eines Schlaganfalls bei Vorhofflimmern der konventionellen Therapie mit Warfarin in der Verbindung ischämischer Schlaganfälle gleich wirksam (2x110 mg/d) oder sogar überlegen (2x150 mg/d) ist <sup>49</sup>.

### Intrinsischer Weg

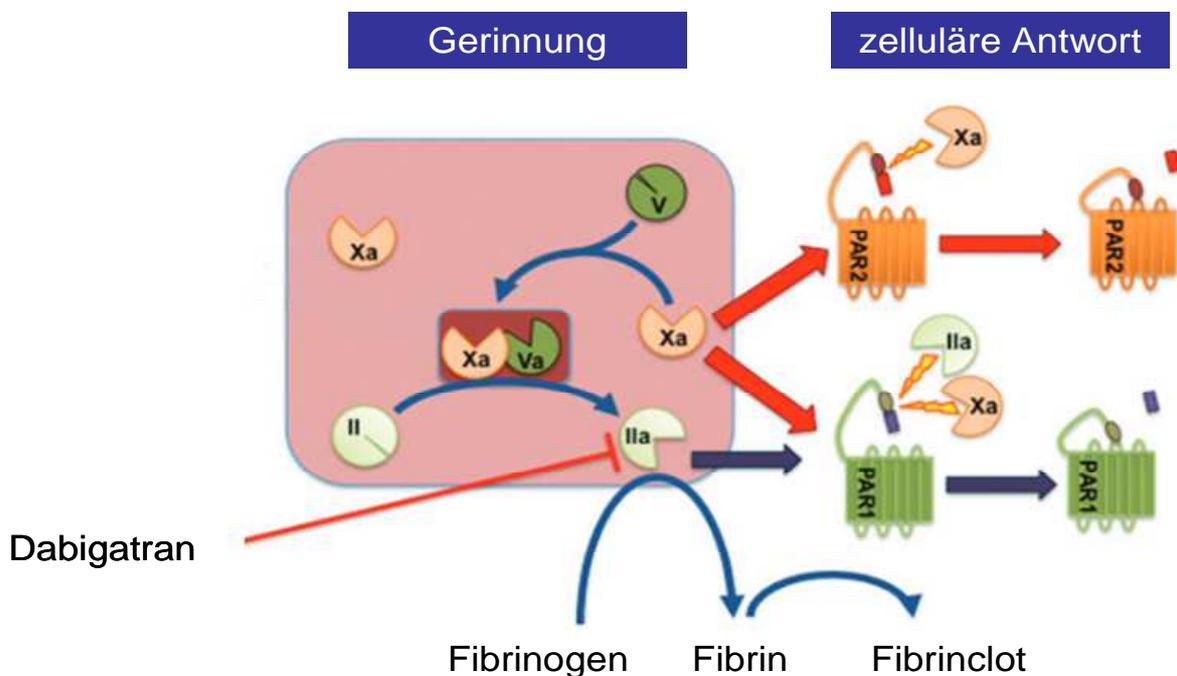


### Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade

Die Gerinnungskaskade läuft sowohl über einen intrinsischen als auch einen extrinsischen Weg ab. Dabei kommt es zu einer stufenweisen Aktivierung von Gerinnungsfaktoren, bis schließlich die beiden Mechanismen sich in der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa vereinen. Der Faktor Xa bewirkt wiederum eine Aktivierung von Thrombin, dem Faktor II der Gerinnungskaskade, an welchen der Thrombin-Inhibitor Dabigatran bindet. In der physiologischen Endphase der Gerinnungskaskade bildet sich schließlich ein Thrombus aus<sup>12</sup>.

## 2.3 Signaltransduktion durch Thrombinhemmung

Thrombin ist ein Aktivator der Expression von Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen (z. B. monoklonale Leukozyten und endotheliale Zellen)<sup>16-19</sup>. Darüber hinaus steigert Thrombin gerade die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Leukozytenoberfläche selbst, sowie deren Aktivierung, und kann die CD40-Liganden-vermittelte Stimulation durch Thrombin-aktivierte Blutplättchen hochregulieren<sup>20</sup>. Im Gegenzug sind inflammatorische Zytokine dafür bekannt, über eine Aktivierung der Expression von membrangebundenem „Tissue-Factor“ und Fibrinogen eine Gerinnung zu initiieren<sup>20</sup>. Die Interaktion zwischen Aktivierung einer Inflammation und Regulation der Gerinnung über die PAR-Rezeptoren-Aktivierung scheint für eine große Anzahl klinischer Pathologien, wie z. B. die Genese der Atherosklerose, relevant zu sein (siehe Abb. 2.3)<sup>21,22</sup>.



### Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Wirkung von Dabigatran auf die Gerinnungskaskade

Thrombin hat neben der Funktion als Bestandteil der Gerinnungskaskade auch eine autokatalytische, zelluläre Eigenschaft, welche über die Aktivierung der PAR1- und PAR2-Rezeptoren abläuft. Es gibt also nicht nur einen

*blutverdünnenden Effekt in der antikoagulativen Therapie, sondern auch einen direkten Einfluss auf zelluläre Signalwege<sup>23</sup>.*

## 2.4 Fragestellung

Thrombin ist ein Bestandteil der Gerinnungskaskade, welcher eine Verbindung zwischen Antikoagulation, aber auch Atherosklerose, über den PAR-Rezeptor darstellt<sup>24-26</sup>. Daher wurde im experimentellen Tiermodell der Frage nachgegangen, ob durch den neuen antikoagulativen Mechanismus der Thrombininhibierung günstige Veränderungen von atherosklerotischen Gefäßläsionen bewirkt werden kann. Aus diesem Grund wurde die Wirkung der direkten Thrombinhemmung mit Dabigatran auf die Endothelfunktion und die Genese einer generalisierten Atherosklerose in einem hypercholesterämischen Mausmodell (ApoE<sup>-/-</sup>-Maus) untersucht.

# 3 Material und Methodik

## 3.1 Materialien

### 3.1.1 Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
aqua dest., HPLC-tauglich	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aquatex, wässriges Eindeckmittel für Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Carbachol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Carbogen (5 Vol % CO <sub>2</sub> in O <sub>2</sub> )	Praxair, Düsseldorf, Deutschland
Chlorwasserstoffsäure	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Diaminofluorescein (DAF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Dihydroethidium (DHE)	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMSO (reinst)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamidtetraessigsäure (EDTA)	BDH Laboratory Supplies, Poole, Großbritannien
Einbettmedium für Gefrierschnitte (Jung)	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Entellan, Eindeckmittel für Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glucose, D(+)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Glyceroltrinitrat (Aquo-Trinitrosan)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Igepal (tert-Octylphenoxypoly(oxyethylen)ethanol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ketamin (Ketavet 100 mg/ml)	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mounting Medium für Fluoreszenzmikroskopie	Dako Deutschland GmbH, Hamburg Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-NAME	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ölrot-O (C.I. 26125)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Phenylephrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Pikrinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rompun (2 % Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Sirius Red (C.I. 35780)	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland
Stickstoff, verdichtet	Praxair, Düsseldorf, Deutschland
FITC-konjugierter Antikörper, goat-anti-rabbit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

### 3.1.2 Lösungen

<b>Tyrode</b>	<b>(mM)</b>	<b>PBS</b>	<b>(mM)</b>
CaCl <sub>2</sub>	2,50	KCl	2,68
EDTA, Dinatriumsalz	0,30	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76
Glucose, D(+)	5,50	NaCl	136,89
KCl	4,73	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,14
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,20		
MgCl <sub>2</sub>	1,20		
NaCl	118,00		
NaHCO <sub>3</sub>	25,00		
in aqua dest.		in aqua dest.	
pH 7,4		pH 7,4	

<b>Ölrot-O Stammlösung</b>		<b>Sirius-Red-Lösung 0,1%ig</b>		<b>DHE-Lösung 2µM</b>	
Ölrot-O	500 mg	Sirius-Red	0,1 g	DHE	63,08 mg
Triethylphosphat (60 %)	100 ml	Pikrinsäure (pH 2,0) (1,2 %)	1,2 g	in	
		aqua dest.	100 ml	DMSO (stabilisiert)	100 ml
				100 µl dieses Ansatzes in 100 ml PBS	

### 3.1.3 Geräte und Zubehör

#### 3.1.3.1 Versuchsübergreifend

Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml bzw. 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Feinwaage (Acculab ALC-110.4)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Konusröhrchen, 50 ml bzw. 15 ml („Falcon“)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kühlschrank -80°C (Profiline ECU)	M.u.T. Labor GmbH, Berlin, Deutschland
Laborwaage (Vicon VIC-212)	Acculab, Edgewood, New York, USA
Magnetrührer (IKA Combimac RCH)	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Pasteurpipetten, Polypropylen, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen (64 x 19 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
pH-Meter (pH 526)	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pinzette (INOX, Gewebepräparation)	Outils-Dumont, Montignez, Schweiz
Pipetten (Research 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf Deutschland
Scheren (Gewebepräparation)	FST Medizintechnik, Bad Oeynhausen, Deutschland
Vortexmischer (Vortex Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Zentrifuge (Sigma 1K15)	Sigma Laborzentrifugen, Osterode, Deutschland
Zentrifuge (Heraeus Fresco 21)	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland

#### 3.1.3.2 Isometrische Spannungsmessung an isolierten Geweben im Organbad

Tissue Organ Bath - Model 750TOBS	DMT (Danish Myo Technology)
-----------------------------------	-----------------------------

#### 3.1.3.3 Histologie

Brutschrank 37 °C (Kelvitron t)	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
Deckgläser (Stärke 130 µm)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Digitalkamera für Mikroskopie (DXM 1200 F)	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Typ E600	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Kryomikrotom, Kryostat Leica CM 1900-V5.0	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Lichtmikroskop (Nikon Alphaphot-2 YS2)	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Objektträger, polysinebeschichtet	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland

### 3.1.4 Software

#### 3.1.4.1 Bestimmung der Vitalparameter

BP 2000 Analysis Software	Visitech Systems Inc., Apex, North Carolina, USA
---------------------------	--

#### 3.1.4.2 Isometrische Spannungsmessung im Organbad

750TOBS (Version 2.2.0)	DMT (Danish Myo Technology)
-------------------------	-----------------------------

### 3.1.4.3 Histologie

ImageJ for microscopy, Version 1.37v	Wayne Rashband, NIH, USA
Lucia G/F, Version 4.60	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland

### 3.1.4.4 Statistische Auswertung

Microsoft Excel 2003	Microsoft, Redmond, USA
Graph Pad Prism, Version 5.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
SAS 9.1.	Statistical Analysis Software Inc, Cary, USA

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Versuchstiere

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden 80 männliche Mäuse, davon 40 Wildtyp-Mäuse (WT) des Stammes C57BL/6J und 40 Apolipoprotein-E-Knockout-Mäuse (ApoE<sup>-/-</sup>) verwendet. Die 10 Wochen alten Tiere wurden von Charles River Laboratories, Research Models and Services GmbH aus Sulzfeld in Deutschland erworben.

Die gesamten Tierversuche wurden von der Kreispolizeibehörde, dem Veterinäramt des Saarpfalzkreises und der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes genehmigt (Versuchsnummer: 9/2009). Aufgrund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206 ff. ber. S. 1313), zuletzt geändert durch Art. 2 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (BGBl. I S. 2936) in Verbindung mit § 1 Abs. 3 des Gesetzes über das öffentliche Veterinärwesen und die amtliche Lebensmittelüberwachung (VetALG) vom 19. Mai 1999 (Amtsbl. S 844, 851), geändert durch Art. 8 des Gesetzes Nr. 1632 vom 21. November 2007 (Amtsbl. S. 2393), wurden die Tierversuche durch die Amtstierärztin bewilligt.

### **3.2.2 Tierhaltung**

Die Mäuse wurden in Milieukäfigen mit bis zu maximal 5 Tieren bei einer Umgebungstemperatur von 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von rund 70 % gehalten. Die Beleuchtung der Tiere über einen Zeitraum von 12 Stunden gewährleistete die Aufrechterhaltung des Tag-Nacht-Rhythmus.

### **3.2.3 Tierfütterung**

Die Induktion einer generalisierten Atherosklerose ist eine wichtige Voraussetzung, welche zum Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge herangezogen werden muss. Zum jetzigen Zeitpunkt stellt die transgene ApoE<sup>-/-</sup>-Maus hierzu das ideale Modell dar. Apolipoprotein E ist ein wichtiger Ligand, der die Resorption von Chylomikronen, very low density lipoproteins (VLDL) und deren Zerfallsprodukte an hepatischen Rezeptoren reguliert. Die ApoE<sup>-/-</sup>-Maus ist aufgrund ihres genetischen Defekts nicht in der Lage, die Lipoprotein- und Triglyceridbestandteile aus dem Serum aufzunehmen. Insbesondere wegen der massiven Hypertriglycerid- und Hypercholesterinämie zeigen diese Tiere das Vollbild einer atherosklerotischen Gefäßveränderung<sup>27-29</sup>.

Alle Mäuse wurden mit einer fett- und cholesterinreichen Diät (21 % Rohfett, 19,5 % Casein sowie 1,25 % Cholesterin) gefüttert. Diese Futterpellets wurden von Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG produziert und zur Verfügung gestellt.

20 ApoE<sup>-/-</sup>- und 20 Wildtyp-Mäuse erhielten zusätzlich eine Dabigatran-Dosis von 0,1 mg pro kg Körpergewicht und Tag. Dazu wurde Dabigatran den Futterpellets in einer Konzentration von 900 mg/kg (bei einer geschätzten Futterraufnahme von 5 g pro Tier und Tag) zugefügt. Futter- und Wasseraufnahme wurden in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

### **3.2.4 Studienprotokoll**

Entsprechend den Angaben der Abteilung präklinische Entwicklung der Herstellerfirma von Dabigatran (Boehringer-Ingelheim) wurde eine Dosis von 0,1

mg/kg Körpergewicht gewählt. Dazu wurden ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie Wildtyp-Mäuse ab einem Alter von 10 Wochen für insgesamt 12 Wochen mit der oben beschriebenen hypercholesterämischen Diät sowie partiell zusätzlich mit Dabigatran gefüttert. Die Gruppeneinteilung war wie folgt:

Maustyp	WT	WT	ApoE <sup>-/-</sup>	ApoE <sup>-/-</sup>
Behandlung	Plazebo	Dabigatran	Plazebo	Dabigatran
Cholesterindiät	ja	ja	ja	ja
Anzahl	n = 20	n = 20	n = 20	n = 20

In der 11. Behandlungswoche wurden bei allen Tieren (n = 80) sowohl Blutdruck als auch Herzfrequenz mit der Tail-Cuff-Methode bestimmt. Die Tötung der Tiere fand nach Beendigung der 11. Behandlungswoche statt. Dabei wurden die Aorten entnommen und die Dabigatran-Plasmaspiegel in Citratplasma bestimmt.

### 3.2.5 Erhebung der Kreislaufdaten

Zur nichtinvasiven Bestimmung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz wurde das BP-2000 Blood Pressure Analysis System für Mäuse verwendet, welchem die nichtinvasive Tail-Cuff-Methode zu Grunde liegt. Über eine Blutdruckmanschette, die über den Schwanz der Tiere gestreift wird, erfolgt die Bestimmung des systolischen Blutdruckes<sup>30</sup>. Dabei erfasst das System über eine photoelektrische Pulswellenbestimmung den Blutfluss in der Kaudalarterie der Maus. Dieser wird in Echtzeit auf einem synchronisierten Computersystem angezeigt.

Das Messsystem wurde in einem abgedunkelten Raum aufgebaut und die Bodenplatte auf 37°C vorgeheizt. Danach wurden die von Störgeräuschen abgeschotteten Versuchstiere auf der Messeinheit in jeweils einzelnen Messkammern positioniert. Die Messung fand an jeweils 4 Tieren parallel an 5 aufeinanderfolgenden Tagen statt. Außerdem wurde die Messreihenfolge der 80 Versuchstiere täglich geändert, um einen zeitlichen Einfluss auf die systolischen Blutdruckwerte und die Herzfrequenz zu vermeiden. Um einer Verfälschung der Blutdruck- und Herzfrequenzwerte aus dem Wege zu gehen, wurde eine Eingewöhnungsphase herangezogen. Dabei wurden 10 vorläufige

Blutdruckmessungen mit einer Dauer von etwa 8 Minuten bei jedem Tier durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden verworfen. Daraufhin wurden weitere 15 Messzyklen mit einer Dauer von ca. 12 Minuten durchgeführt. Die daraus entstandenen Ergebnisse bezüglich des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz wurden statistisch gemittelt. Um die Richtigkeit der erhobenen Daten zu bestärken, wurden außerdem die Messergebnisse der ersten 3 Tage verworfen. Lediglich die Messergebnisse des 4. und 5. Tages wurden zur statistischen Datenerhebung herangezogen.

### **3.2.6 Erhebung der Dabigatran-Plasmakonzentration mittels HEMOCLOT**

Zur Bestimmung der Konzentration des direkten Thrombin-Inhibitors Dabigatran im Plasma der Testmäuse wurde das verdünnte Probenplasma zunächst mit gepooltem Normalplasma (Citratplasma) versetzt. Anschließend wurde die Gerinnung mittels Zugabe von hochgereinigtem humanem  $\alpha$ -Thrombin initiiert. Dadurch wurde ein Koagulationsprozess ausgelöst, welcher zur Bildung eines Blutgerinnsels führte. Die gemessene Koagulationszeit verhält sich direkt proportional zur Konzentration des direkten Thrombininhibitors Dabigatran im Testplasma.

### **3.2.7 Isometrische Spannungsmessung an isoliertem Gewebe im Organbad**

#### **3.2.7.1 Anästhesie und Organentnahme**

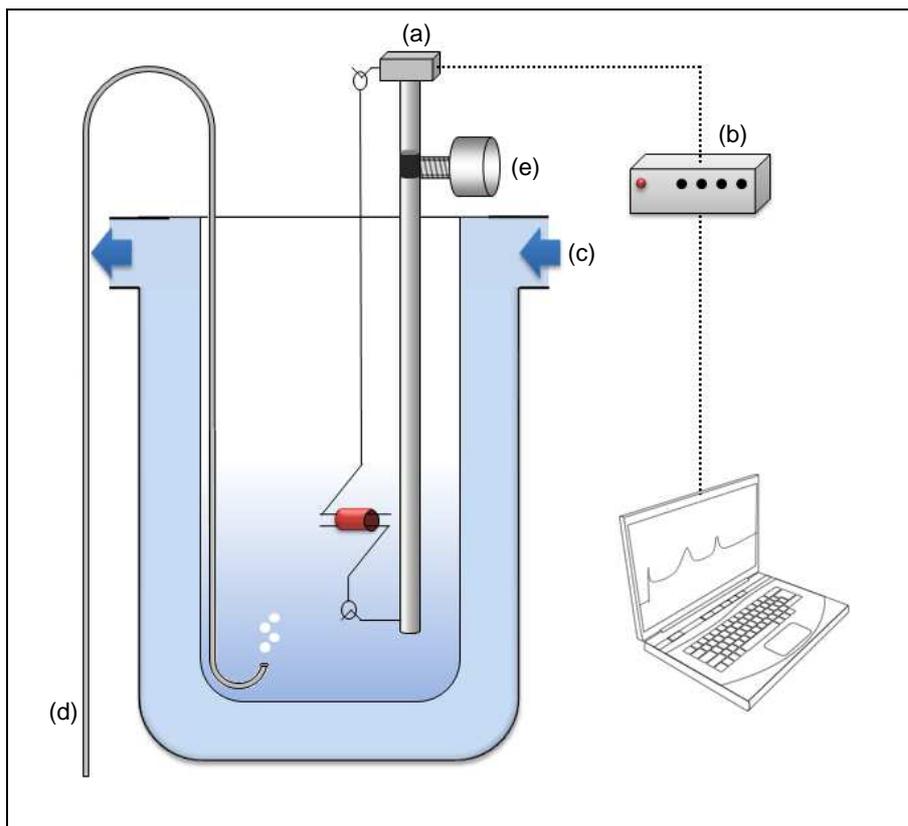
Nachdem die 12. Fütterungswoche beendet war, wurde den Mäusen eine Überdosis Ketamin (20 mg) und Rompun (Xylazin-HCl, 2 mg) intraperitoneal appliziert, wodurch die Tiere verstarben. Im direkten Anschluss wurde die endotheliale Funktion durch ein funktionelles Messverfahren bestimmt. Mit einer Spritze wurde 1 ml Blut aus der Aorta Abdominalis entnommen und in ein mit Citratplasma gefülltes Eppendorfgefäß gegeben (Verhältnis Citratplasma/Blut: 1 zu 10). Das Blut wurde daraufhin bei 4 °C mit 6000 x g zentrifugiert und zur Serumlipidbestimmung bei -80 °C aufbewahrt.

Das Herz wurde ohne Absetzen der Aorta aus der prävertebralen Position entfernt, wobei strengstens darauf geachtet wurde, dass keine Druck- und Zugkräfte auf die Pars Thoracica Aortae einwirkten. Die Aorta wurde kurz vor dem Durchtritt durch den Hiatus aorticus abgetrennt und zusammen mit dem Herz in eine mit 4 °C kalter Tyrode gefüllte Petrischale gelegt. Das restliche Fett- und Bindegewebe wurde behutsam abgelöst, damit die Pars Thoracica Aortae problemlos in 4 gleichgroße Segmente (ca. 3 mm lang) zur Untersuchung der Endothelfunktion unterteilt werden konnte. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

### 3.2.7.2 Versuchsablauf

#### Aortensegmente

Die Aortensegmente wurden, unmittelbar nach Präparation, in Organbäder überführt (Abb. 3.1 und 3.2).



**Abb. 3.1** *Verwendete Organbadapparatur in schematischer Darstellung*

*In das Lumen des zuvor präparierten Aortensegments wurden zwei triangulär geformte Haken in gegenläufiger Richtung eingeführt. Der untere Haken wurde fest mit der Organbadapparatur verbunden, wohingegen der obere Haken an einen isometrischen Spannungsabnehmer gekoppelt wurde. Die Verbindung aus dem Aortensegment mit den beiden Haken wird nun in das Organbad (10 ml), welches mit Tyrode gefüllt ist, eingebracht und durch destilliertes Wasser, bei physiologischer Körpertemperatur von 37 °C, umwärmt. Außerdem wird das System dauerhaft mit Carbogen (5 Vol % CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>) begast und ist zur Aufzeichnung der Daten an einen Computer*

angeschlossen. Nachdem die Äquilibrationsphase im Organbad beendet war, ist die Position der Haken mit einer Mikrometerschraube so justiert worden, dass eine Vorspannung von 10 mN für das entsprechende Aortensegment erreicht wurde. Diese Vorspannung ist für mindestens 10 min auf konstantem Niveau gehalten worden, bevor mit den Kontraktilitätsmessungen begonnen wurde<sup>31</sup>.



**Abb. 3.2 Versuchsaufbau**

*Organbadapparatur mit Computer zur digitalen Daten-Aufzeichnung.*

### Kontraktion durch Phenylephrin:

Phenylephrin ist ein direkt wirkendes Sympathomimetikum, das an den  $\alpha_1$ -Rezeptor bindet und diesen aktiviert<sup>32</sup>. In 5 aufeinanderfolgenden Schritten, begonnen bei 1 nM, wurde den Organbädern zur Erhebung einer kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurve Phenylephrin zugegeben, wobei die Konzentration immer um eine Zehnerpotenz (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) gesteigert wurden, bis schließlich eine Endkonzentration von 10  $\mu$ M erreicht war. Die Applikation der nächsten Konzentrationsstufe fand immer erst dann statt, wenn sich auf die vorherige ein Kontraktionsplateau ausgebildet hatte. Die sich daraus ergebende Kontraktionsamplitude wurde der jeweiligen Phenylephrin-Konzentration zugeordnet.

Wenn sich keine Kontraktion auf die Zugabe von Phenylephrin zeigte bzw. diese nicht über 10 % der Ausgangsspannung anstieg, wurden die entsprechenden Aortensegmente aus der Versuchsreihe herausgenommen.

### Endothelabhängige Relaxation mittels Carbachol

Carbachol ist ein direkt wirkendes Parasympathomimetikum, welches unselektiv an muskarinerge Acetylcholinrezeptoren bindet und diese stimuliert<sup>33</sup>. Dabei ist insbesondere die Aktivierung des M<sub>3</sub>-Rezeptors für die Synthese und anschließende Freisetzung von NO aus den endothelialen Zellen verantwortlich, wodurch es zur Relaxation der glatten Muskulatur kommt. Diese korreliert stark mit der endothelialen Funktionsfähigkeit des entsprechenden Aortensegments, d. h. je höher das Ausmaß der Relaxation, desto besser ist die endotheliale Funktionsfähigkeit. Daher wird Carbachol gerne zu deren Beurteilung herangezogen. So wurde, nachdem die höchste Phenylephrin-Konzentration zugegeben war und sich ein Kontraktionsplateau eingestellt hatte, eine Relaxation mit Carbachol herbeigeführt. Nach und nach wurde in sechs Schritten eine sich um je eine Zehnerpotenz steigernde Carbachol-Konzentrationen (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) hinzugegeben, bis schließlich die Endkonzentration von 100 µM erreicht war. Auch hier fand die Zugabe der nächsten Konzentrationsstufe immer erst dann statt, wenn sich auf die vorherige ein Relaxationsplateau eingestellt hatte. Um das Ausmaß der Relaxation genau bestimmen zu können, wurde diese immer in Relation zur maximal erfolgten Kontraktion gesetzt.

### Reversibilität der endothelabhängigen Relaxation durch die Blockade der eNOS mittels N<sub>ω</sub>-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME)

L-NAME inhibiert die eNOS und führt daher zu einer Reduktion der Menge an freigesetztem NO durch die Endothelzellen. L-NAME, ein Struktur analogon von L-Arginin, kann somit nicht von der eNOS als Substrat verwendet werden. Die Folge ist eine Blockade der endothelialen Relaxation durch NO, was bedeutet, dass die konstriktorisches Mediatoren überwiegen und eine Kontraktion der glatten Muskulatur bedingen. Nach Erreichen der maximalen Relaxation der jeweiligen Aortensegmente durch Carbachol wurde L-NAME mit einer Endkonzentration von 1 µM pro Organbad hinzugegeben. So konnte durch die L-NAME-Blockade der eNOS und den daraus folgenden Verlust des Carbachol-Effekts der entsprechenden

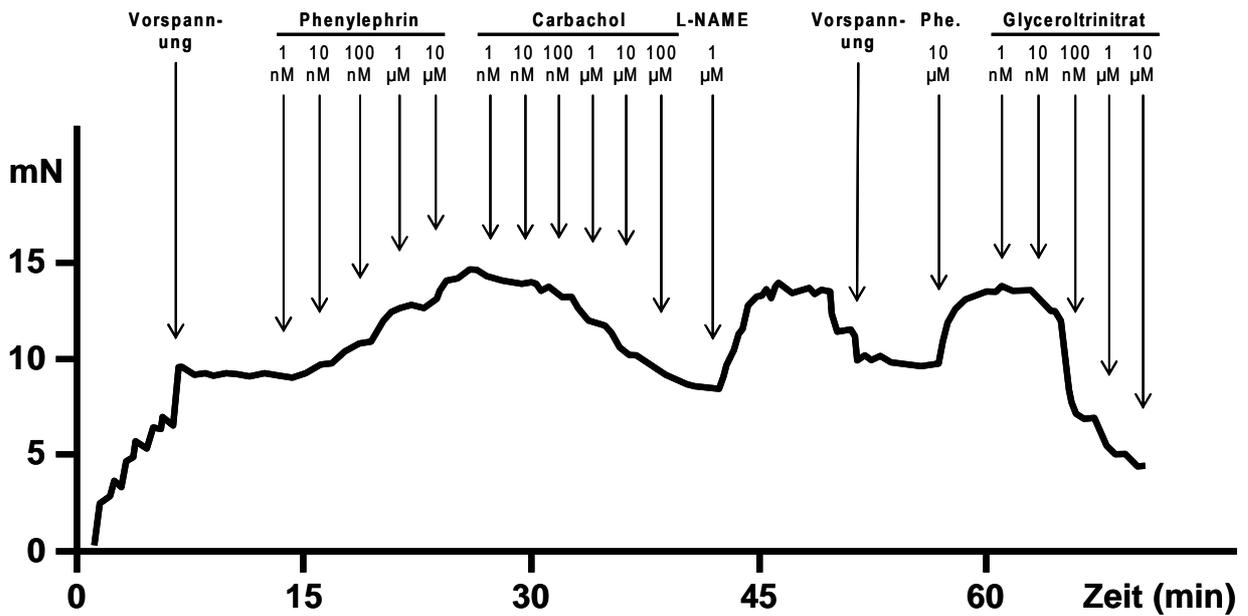
Aortensegmente überprüft werden, ob diese Relaxation durch einen eNOS-vermittelten endothelialen Effekt bedingt sein kann. Sofern Aortensegmente diese Reversibilität nicht zeigten, wurden sie in die Auswertung nicht mit einbezogen, da die Endothelzellen nicht intakt waren. Anschließend wurden die Organbäder, um restliche Substanzen auszuwaschen, mehrfach mit Tyrode gespült und erneut eine Vorspannung mit 10 mN eingestellt, welche mindestens 5 Minuten auf einem konstanten Plateau gehalten werden musste.

#### Endothelunabhängige Relaxation durch Glyceroltrinitrat

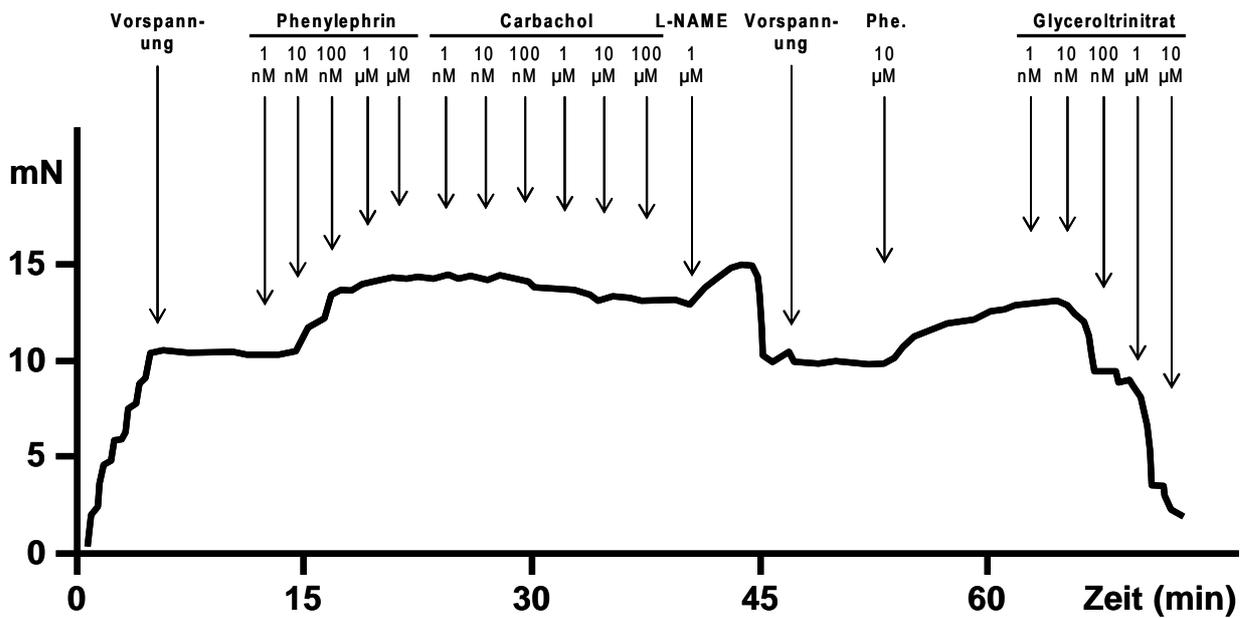
Aus dem organischen Nitrat Glyceroltrinitrat, welches als Prodrug des NO fungiert, werden in den Zellen der glatten Muskulatur Nitrit-Ionen freigesetzt. Diese Ionen können zu NO reduziert werden und als solches die glatten Muskelzellen des Gefäßes relaxieren. Dabei läuft die Umwandlung des von außen zugegebenen Glyceroltrinitrats ausschließlich in der glatten Muskelzelle ab, d. h. die Vasodilatation entsteht ohne jeden Einfluss des Endothels und der Endothelfunktion. Nachdem die Aortenringe wiederum mit einer Einzeldosis Phenylephrin in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  pro Organbad kontrahiert wurden und sich ein gleich bleibendes Kontraktionsniveau ausgebildet hat, erfolgte stufenweise eine Relaxation mit Glyceroltrinitrat. Die Endkonzentrationen pro Organbad betragen jeweils 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ . Auch hier wurde die maximale Relaxation durch Glyceroltrinitrat mit der zuvor entstandenen Kontraktion durch Phenylephrin in ein prozentuales Verhältnis gesetzt. Nachdem die Organbadversuche beendet waren, wurden die verbleibenden Aortensegmente bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

Abb. 3.3 zeigt die beispielhafte Darstellung des Ablaufes einer isometrischen Spannungsmessung an einem WT- und ApoE<sup>-/-</sup>-Tier.

## Wildtyp



## ApoE<sup>-/-</sup>



**Abb. 3.3 Endothelabhängige Relaxation der Aortenringe**

Exemplarische Darstellung der isometrischen Kontraktilitäts- und Relaxationsbestimmung an Aortenringen eines Wildtyp- und ApoE<sup>-/-</sup>-Tieres nach zwölfwöchiger cholesterinreicher Diät. Mittels FMI VirtoDat wurden die Daten aufgezeichnet. Zu welchem Zeitpunkt die jeweiligen Lösungen in die Organbäder gegeben wurden, ist durch die Pfeile markiert<sup>31</sup>.

## **3.2.8 Histologische Untersuchungen**

### **3.2.8.1 Kryotomie**

Zur Herstellung der Schnittpräparate wurden die Mäuseherzen in Jung-Einbettmedium für Gefrierschnitte fixiert und mittels Kryomikrotom-Schnittverfahren (Kryostat) zur histologischen Untersuchung aufbereitet. Dabei wurde die Kühlkammertemperatur auf -25 °C und die Objekttemperatur auf -20 °C eingestellt. Damit die optimale histologische Bearbeitung des Gewebes gewährleistet war, wurde eine Schnittdicke von lediglich 10 µm gewählt. Anschließend wurden die Schnitte auf polysinebeschichtete Objektträger aufgetragen und bei -80°C eingelagert.

### **3.2.8.2 Mikroskopie**

Zur digitalen Aufnahme der histologisch gefärbten Präparate wurde ein Nikon-Mikroskop mit integrierter Digitalkamera und die Software Lucia G/F verwendet.

### **3.2.8.3 Ölrot-O-Färbung**

Der fettlösliche Diazofarbstoff Ölrot (Synonyme: Sudanrot 5B, solvent red 27,  $C_{26}H_{24}N_4O$ ) ist ein Lysochrom, welches neutrale Lipide in Kryoschnitten anfärbt <sup>34</sup>. Durch diese Eigenschaft kann Ölrot Lipidkerne markieren, welche typischerweise in subendothelialen atherosklerotischen Gefäßläsionen (Plaques) zu finden sind.

Gewebe: Pro Tier wurden 5 aufeinanderfolgende Transversalschnitte aus dem Aortensinus auf einen Objektträger aufgetragen und angefärbt. Dabei wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe untersucht. Der Aortensinus ist die am häufigsten verwendete Lokalisation zur Quantifizierung atherosklerotischer Läsionen im Tiermodell, da das Ausmaß der Plaques in dieser Region geringeren Variationen unterworfen ist, als in anderen Gefäßbereichen und da die Aortenwurzel eine standardisierbare Lokalisation darstellt <sup>35</sup>.

Färbung: Die Färbelösung wurde aus einer Stammlösung, die im Verhältnis 3:2 mit destilliertem Wasser gemischt wurde, hergestellt. Anschließend wurden die Gefrierschnitte, nachdem diese zuvor bei Raumtemperatur luftgetrocknet wurden,

über einen Zeitraum von 1 h in 4%iger wässriger Paraformaldehyd-Lösung vorbehandelt. Daraufhin wurden die Objektträger dreimal mit destilliertem Wasser gespült und 1 h lang in der Färbelösung eingefärbt. Schließlich wurde die restliche Ölrotlösung ausgewaschen, indem die Gefrierschnitte wiederum dreimal mit destilliertem Wasser gespült und mit Aquatex eingedeckt wurden.

Auswertung: Mittels Hellfeldmikroskopie wurden die gefärbten Transversalschnitte des Aortensinus digitalisiert und mit der Auswertungssoftware Lucia G/F bearbeitet. Dabei wurden sowohl die Ränder der atherosklerotischen Plaques, als auch das Gefäßlumen umrandet. Mit Hilfe dieser Flächen kann nun prozentual die Fläche der Plaque im Verhältnis zur Fläche des gesamten Gefäßlumens berechnet werden.

#### **3.2.8.4 Sirius-Red-Färbung**

Die „Sirius-Red“-Färbung beruht auf der selektiven Bindung des Farbstoffs an die fibrillären Kollagene Typ I und III. Dadurch färben sich diese in der Hellfeldmikroskopie in einem kräftigen Rot und die zytoplasmatischen Strukturen in einem schwachen Gelb<sup>36</sup>. Das fibrotische Remodelling, welches eine Erhöhung des Anteils an fibrillären Kollagenfasern innerhalb der Gefäßwand bedeutet, ist eine typische Folge der Atherogenese und kann mittels Sirius Red im Gewebe detektiert und quantifiziert werden.

Gewebe: Pro Tier wurden 5 aufeinanderfolgende Transversalschnitte aus dem Aortensinus auf einen Objektträger aufgetragen und angefärbt. Dabei wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe untersucht.

#### Färbung:

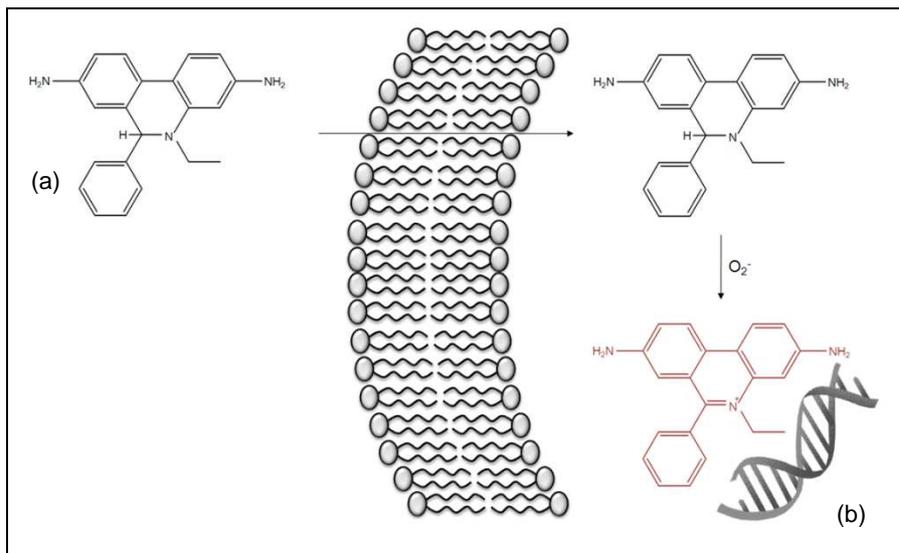
- Absteigende Ethanolreihe: jeweils 2 min in 100%igem sowie 90%igem und 70%igem Ethanol in aqua dest.
- Zweimalige Spülung in aqua dest. für 5 und anschließend 10 min
- Färbung in Sirius-Red-Gebrauchslösung (Sinus aorticus, 10 min)
- Erneutes Spülen in aqua dest.
- Jeweils 2 min in 90%igem und anschließend 100%igem Ethanol

- 2 min in Xylol
- Eindecken mit Entellan

Auswertung: Auch hier wurden die gefärbten Transversalschnitte mittels Hellfeldmikroskopie und konstanter Belichtungszeit aufgenommen. Die Auswertung der Daten fand mit der Lucia-G/F-Software statt, da diese eine standardisierte Auswertungsmaske besitzt (Sirius Red Macro für Expositionszeiten  $\leq 83$  ms), welche den Intensitätsbereich der Rotfärbung der Kollagenfibrillen definiert. Jede Gewebefläche, deren Farbton in den definierten Intensitätsbereich passte, wurde ins Verhältnis mit der Gesamtfläche des Gewebes gesetzt.

### 3.2.8.5 Dihydroethidium-Färbung

Dihydroethidium (DHE) eignet sich zur Quantifizierung intrazellulärer Superoxidproduktion, da es durch ROS zu fluoreszierenden Ethidium-Kationen oxidiert wird<sup>37</sup>. Ethidium-Kationen sind Bestandteil des Ethidumbromid, das einen aromatischen, roten Phenanthridinfarbstoff darstellt, der avid in Nukleinsäuren interkaliert und daher in der Molekularbiologie zum Nachweis von DNA und RNA verwendet wird (siehe Abb. 3.4).



**Abb. 3.4 Prinzip der DHE-Superoxid-Färbung**

DHE (a) permeiert Zellmembranen ungehindert. In der Anwesenheit von Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) wird DHE zu Ethidium-Kationen (b) und anderen fluoreszierenden Produkten wie Oxy-Ethidium oxidiert. Ethidium-Kationen können die Zelle aufgrund ihrer unmittelbaren Interkalation in die DNA nicht mehr verlassen. Im Gegensatz zu

DHE weisen Ethidium-Kationen eine Fluoreszenz (Exzitationsspektrum:  $\lambda = 500-530 \text{ nm}$ , Emissionsspektrum:  $\lambda = 590-620 \text{ nm}$ ) auf<sup>31</sup>.

Gewebe: Pro Tier wurden 5 aufeinanderfolgende Transversalschnitte aus dem Aortensinus auf einen Objektträger aufgetragen und angefärbt. Dabei wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe untersucht.

Färbung: Nachdem die Gefrierschnitte bei Raumluft getrocknet waren, wurden diese mit einem Fettstift umrandet. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Färbelösung auf den Aortensinus lokalisiert bleibt. In einem abgedunkelten Raum wurde auf jeden Schnitt 100  $\mu\text{l}$  der Dihydroethidium-Färbelösung gegeben und anschließend bei 37 °C in einem Inkubator für 30 min gelagert. Daraufhin wurden die Schnitte, ohne zusätzliches Eindeckmedium, mit einem Deckgläschen versehen und sofort bei konstanter Belichtungszeit von 1 ms mikroskopisch aufgenommen. Das oxidierte Dihydroethidium imponiert im G-2A-Fluoreszenzfilter bei einem Exzitationsspektrum von  $\lambda = 510-560 \text{ nm}$  und bei einem Langpassfilter mit Absorptionskante von  $\lambda = 565 \text{ nm}$  in einem leuchtenden Rot.

Auswertung: Der endotheliale Bereich des Aortensinus, einschließlich der Intima, wurde mit der Auswertungssoftware ImageJ analysiert. Dabei wurde jedem Bildpunkt, abhängig von dessen Helligkeitsgrad, ein bestimmter Pixelwert zwischen 0 und 255 zugeteilt. Somit ergaben sich anhand der Helligkeitsverteilung im ausgewählten Bildbereich ein Histogramm und die dazugehörigen Mittelwerte. Anhand der Mittelwerte konnten nun Rückschlüsse auf den Gehalt des oxidierten Fluoreszenzfarbstoffes Dihydroethidium und somit die Last an Superoxid-Anionen gezogen werden. Je höher der Wert, desto mehr Superoxid-Anionen finden sich im endothelialen Bereich des Aortensinus.

### **3.2.8.6 Immunfluoreszenzfärbung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)**

Molekularer Sauerstoff und die basische Aminosäure L-Arginin stellen die beiden Grundlagen zur Synthese von hochreaktivem NO dar. Dieser biochemische Prozess wird durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert, wobei sich aus dem L-

Arginin L-Citrullin bildet. Im Gefäßendothel wird die eNOS, ein auf das Endothel spezialisierter Subtyp der NOS, welcher auch NOS Typ III genannt wird, ausgebildet. Von dieser konstitutiven Expression abgesehen, unterliegt die eNOS sowohl einer physiologischen Regulation, als auch der Beeinflussung durch pathologische Zustände, auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene<sup>38,39</sup>. Daher wurde mittels Immunfluoreszenz das Expressionsniveau des eNOS-Proteins bestimmt.

Gewebe: Pro Tier wurden 5 aufeinanderfolgende Transversalschnitte aus dem Aortensinus auf einen Objektträger aufgetragen und gefärbt. Dabei wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe untersucht.

Färbung: Auch bei dieser Färbung wurden die Gefrierschnitte bei Raumluft getrocknet und mit einem Fettstift umrandet. Dann wurde das folgende immunhistochemische Färbeprotokoll abgearbeitet:

- 2 min in 4%igem Paraformaldehyd
- 5 min waschen in PBS
- 2 mal 5 min in 0,5%iger Lösung von Igepal (tert-Octylphenoxy-poly(oxyethylen)ethanol) in PBS
- 30 min in 0,5%iger Lösung von Ziegen Serum in PBS
- 90 min Exposition jedes Schnittes gegenüber 100 µl 1%iger Lösung des Primärantikörpers (NOS Typ III Antikörper, rabbit-anti-mouse, Isotyp IgG) in 0,5 % Ziegen Serum in PBS, bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 3 mal 5 min waschen in PBS
- 45-minütige Inkubation jedes Schnittes mit 100 µl 1%iger Lösung des Sekundärantikörpers (FITC-konjugierter Antikörper, goat-anti-rabbit, affinitätsisoliert und mit humanem IgG adsorbiert) in 0,5 % Ziegen Serum in PBS, in einer feuchten Kammer, im abgedunkelten Raum
- 3 mal 10 min waschen in PBS
- Eindecken mit Mounting Medium

Auswertung: Sowohl die mikroskopische Digitalisierung, als auch die Auswertung der fluoreszenzgefärbten Schnitte (Exzitationsspektrum:  $\lambda = 465-495$  nm, Langpassfilter mit Absorptionskante bei  $\lambda = 505$  nm) entspricht dem gleichen Ablauf, wie er in der DHE-Färbung beschrieben ist, außer dass in dieser Färbung die Intensität des Fluoreszenzsignals mit der Anzahl der spezifisch gebundenen Primärantikörper an das vorliegende eNOS-Protein korreliert.

### **3.2.8.7 Quantifizierung von Stickstoffmonoxid (Diaminofluorescein-Färbung)**

Das nicht fluoreszierende Diaminofluorescein Diacetat (DAF DA) besitzt die Fähigkeit, Zellmembranen zu permeieren und wird im Zytosol der Zelle durch diverse Esterasen hydrolysiert. Als Produkt dieser Reaktion entsteht Diaminofluorescein, welches die Zellmembran in deutlich geringerem Maß durchdringen und somit verlassen kann. Durch den intrazellulären Konzentrationsanstieg an Diaminofluorescein reagiert dieses mit NO unter Bildung eines fluoreszierenden Triazol-Derivates. Das Triazol zeigt bei einem Exzitationsmaximum von  $\lambda = 488$  nm und einem Emissionsmaximum von  $\lambda = 515$  nm eine grüne Fluoreszenz<sup>40</sup>. Die Menge an intrazellulärem Stickstoffmonoxid kann über das Ausmaß des Fluoreszenzsignals dadurch, dass diese beiden Faktoren direkt miteinander korrelieren, ermittelt werden.

Gewebe: Pro Tier wurden 5 aufeinanderfolgende Transversalschnitte aus dem Aortensinus auf einen Objektträger aufgetragen und angefärbt. Dabei wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe untersucht.

Färbung: Auch hier wurden die luftgetrockneten Gefrierschnitte mit einem Fettstift umrandet. Anschließend wurde jeder Schnitt mit 100  $\mu$ l der Gebrauchslösung bedeckt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Auswertung der Kryoschnitte wurde ein Deckgläschen direkt auf die Färbelösung (ohne Eindeckmedium) aufgebracht und ohne Verzögerung mikroskopiert. Bei der Durchführung der DAF-Färbung muss strengstens darauf geachtet werden, dass die Färbelösung keinen direkten Lichtquellen ausgesetzt ist.

Auswertung: Auch hier wurde ein Fluoreszenzfilter mit FITC-Spektrum (Exzitationsspektrum  $\lambda = 465-495$  nm, Langpassfilter mit Absorptionskante bei

$\lambda = 505 \text{ nm}$ ) benutzt. Daher verläuft die Auswertung der DAF-DA-Färbung nach dem gleichen Schema, das schon in der DHE- und Immunfluoreszenz-Färbung beschrieben ist.

### **3.3 Statistische Auswertung**

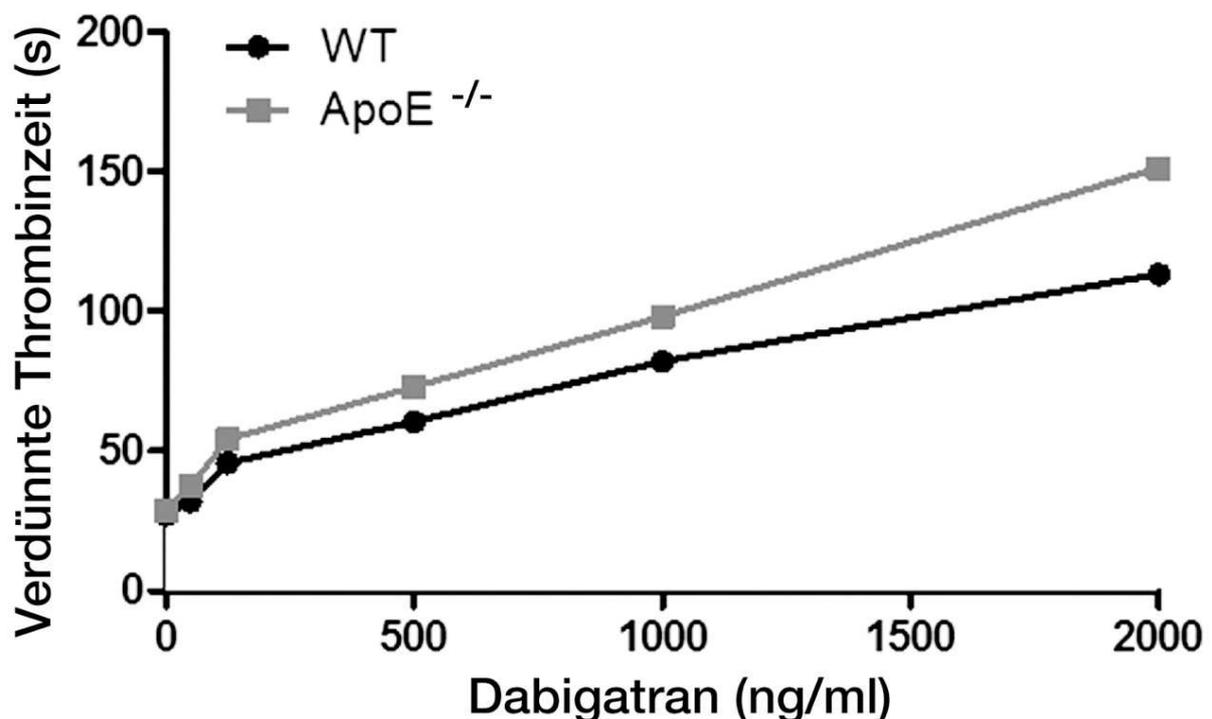
Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler berechnet. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert von  $< 5 \%$  (0,05) angenommen. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels Varianzanalyse und Dunnett-post-hoc-Analyse berechnet (Microsoft Excel 2003; Graph Pad Prism, Version 4.03).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss des Thrombin-Inhibitors Dabigatran auf die endotheliale Funktion im Modell der ApoE-Knockout-Maus

#### 4.1.1 Gerinnungsparameter und Plasmakonzentration

Wie in Abb. 4.1 dargestellt, wurden die Dabigatran-Plasmakonzentrationen zum Ende der Versuchsreihe erhoben ( $622,3 \pm 169$  ng/ml,  $n = 10$  in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen). Dabei wurde die verdünnte Thrombinzeit bei verschiedenen Dabigatran-Konzentrationen bestimmt (0, 50, 125, 500, 1000 und 2000 ng/ml). Boehringer Ingelheim führte eine Analyse der Dabigatran-Plasmakonzentrationen durch und es konnte mittels HEMOCLOT (Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France) ein Anstieg der dTT beobachtet werden<sup>41,42</sup>.



**Abb. 4.1 Bestimmung der verdünnten Thrombinzeit (dTT) mittels HEMOCLOT zur Analyse des antikoagulativen Effekts durch Dabigatran**

Zur Erstellung der Standardkurve wurde das Plasma der beiden oben aufgezeigten Tiergruppen (Wildtyp- und ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse,  $n = 10$  pro Gruppe) gepoolt<sup>43</sup>.

### 4.1.2 Vitalparameter

Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz, wie in Tab. 4.1 dargestellt, wurden bei den 4 verschiedenen Behandlungsgruppen (Wildtyp, Wildtyp-Dabigatran, ApoE<sup>-/-</sup>, ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran) in der elften Fütterungswoche mittels Tail-Cuff-Methode erhoben. Die Intervention zeigte keine signifikante Senkung des systolischen Blutdrucks. Lediglich die behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten gegenüber den beiden Wildtyp-Gruppen, jedoch nicht gegenüber den unbehandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren, welche als Kontrolle dienten, einen signifikant erhöhten Blutdruck. Auch die Herzfrequenz wurde nach diesem Zeitraum bestimmt. Die beiden Wildtyp-Gruppen, wie auch die beiden ApoE<sup>-/-</sup>-Gruppen untereinander, wiesen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Herzfrequenz auf, wobei jedoch beim Vergleich der beiden Wildtyp- mit den beiden ApoE<sup>-/-</sup>-Gruppen signifikante Unterschiede festgestellt werden können. Zum Tötungszeitpunkt der Tiere wurde das Körpergewicht aller Mäuse ermittelt. Hierbei wiesen lediglich die beiden ApoE<sup>-/-</sup>-Gruppen untereinander keinen signifikanten Gewichtsunterschied auf. Jedoch zeigte sich im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren bei den ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes. Die jeweiligen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle (siehe Tab. 4.1) aufgeführt.

	Wildtyp	Wildtyp-Dabigatran	ApoE <sup>-/-</sup>	ApoE <sup>-/-</sup> -Dabigatran
<b>systolischer Blutdruck (mmHg)</b>	115,3 ± 2,5	115,6 ± 1,2	119,6 ± 1,9	123,7 ± 2,6*
<b>Herzfrequenz (Schläge/min)</b>	703,8 ± 10,2 <sup>#</sup>	727,0 ± 5,6 <sup>†</sup>	637,2 ± 13,9	602,0 ± 14,0
<b>Körpergewicht (g)</b>	35,7 ± 1,1	39,2 ± 1,1	30,2 ± 0,5	29,3 ± 1,0

**Tab. 4.1 Bestimmung der Vitalparameter und des Körpergewichtes zum Ausschluss eines antihypertensiven Effekts des Thrombininhibitors Dabigatran**

Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz wurden nach elfwöchiger cholesterinreicher Diät und Behandlung mit dem Thrombin-Inhibitor Dabigatran mittels Tail-Cuff-Methode bei den Wildtyp- und ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen bestimmt. Die Parameter bezüglich des Körpergewichtes wurden zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere erfasst (MW ± SEM; \*p < 0,05 vs. Wildtyp und Wildtyp-Dabigatran, <sup>#</sup>p < 0,01 vs. ApoE<sup>-/-</sup> und p < 0,001 vs. ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran, <sup>†</sup>p < 0,001 vs. ApoE<sup>-/-</sup> und ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran, n = 19 pro Gruppe).

### 4.1.3 Verbesserung der Endothelfunktion durch Dabigatran

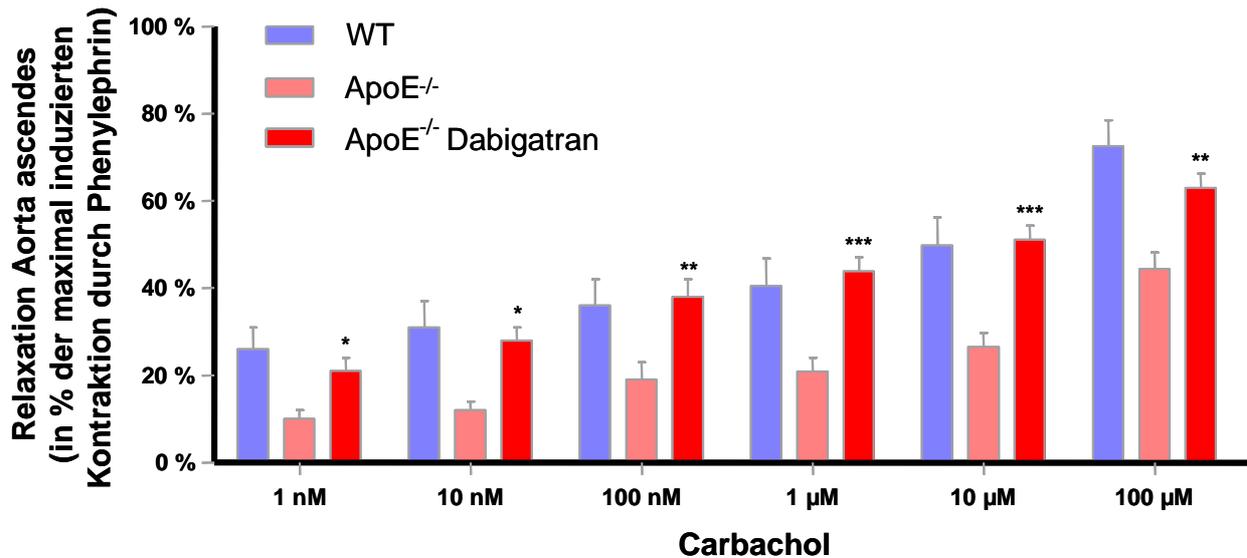
In den unbehandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war die endothelabhängige Relaxation mittels Carbachol signifikant gemindert gegenüber der Relaxationsfähigkeit bei den ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren, welche mit Dabigatran behandelt wurden. Diese zeigte sich in der maximalen (Efficacy) und halbmaximalen Wirkstärke (Potency, logED<sub>50</sub>) bezüglich der Relaxation mit Carbachol (siehe Tab. 4.2).

	Wildtyp	ApoE <sup>-/-</sup>	ApoE <sup>-/-</sup> -Dabigatran
<b>pD<sub>2</sub> (-log)</b> (maximale Relaxation durch Zugabe von Carbachol in %)	-5,8 ± 0,2 72,0 ± 4,4*	-5,3 ± 0,3 42,6 ± 2,7	-6,3 ± 0,3** 62,9 ± 3,3**
<b>pD<sub>2</sub> (-log)</b> (maximale Relaxation durch Zugabe von Glyceroltrinitrat in %)	-5,6 ± 0,1 153,2 ± 11,5*	-5,6 ± 0,1 214,9 ± 12,4	-5,7 ± 0,1 234,7 ± 10,4

**Tab. 4.2 Efficacy und Potency der endothelabhängigen Relaxation mit Carbachol**

*Efficacy (maximale Relaxation der durch Phenylephrin-induzierten Kontraktion bei einer Carbachol-Konzentration von 100 µmol und Glyceroltrinitrat-Konzentration von 10 µmol) und Potency (pD<sub>2</sub>) der endothelabhängigen (Carbachol) und -unabhängigen (Glyceroltrinitrat) Relaxation der Aortensegmente (MW ± SEM; \*p < 0,05 vs. ApoE<sup>-/-</sup>; \*\*p < 0,001 vs. ApoE<sup>-/-</sup>).*

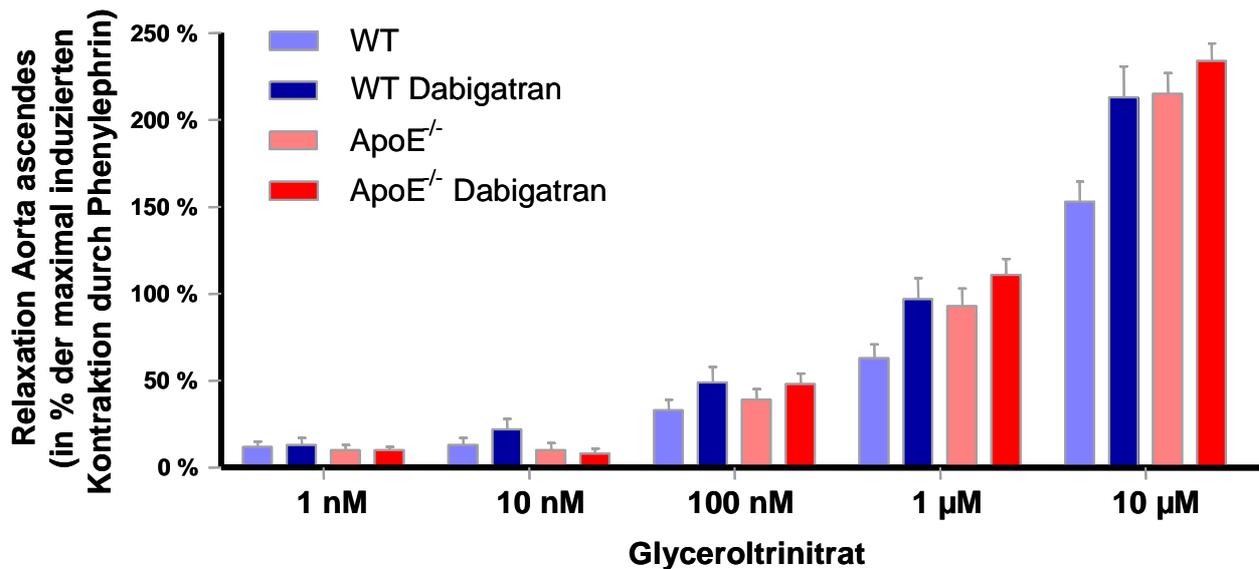
Die endothelabhängige Relaxationsfähigkeit, dargestellt in Abb. 4.2, wurde bei den ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen durch eine Therapie mit Dabigatran signifikant verbessert. Dabei erreichten die mit dem Thrombin-Inhibitor behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Tiere eine äquivalente Potenz und Effektivität wie es bei den beiden WT-Gruppen beobachtet werden konnte.



**Abb. 4.2 Verbesserte endothelabhängige Relaxationsfähigkeit in ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren durch Thrombin-inhibierung mit Dabigatran**

Relaxation isolierter Aortenringe von WT- und ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach zwölfwöchiger cholesterinreicher Diät und Therapie mit dem Thrombin-Inhibitor Dabigatran. Prozentualer Anteil der Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion im Bezug auf die endothelabhängige Relaxation durch Carbachol in aufsteigenden Konzentrationen. Dabei konnte bei den ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren eine signifikant schlechtere endotheliale Relaxationsfähigkeit im Vergleich zu den WT-Tieren beobachtet werden. Die mit dem Thrombin-Inhibitor Dabigatran behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Tiere wiesen jedoch eine signifikant bessere Relaxationsfähigkeit auf. Diese lag auf dem gleichen Niveau, wie bei den WT-Tieren (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran vs. ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001; n = 20 pro Gruppe).

Abb. 4.3 zeigt die endothelunabhängige Relaxation der Aortenringe mittels Glyceroltrinitrat, welche als Negativkontrolle dient. Dabei konnten über keinen Konzentrationsbereich signifikante Unterschiede zwischen allen Behandlungsgruppen gezeigt werden.



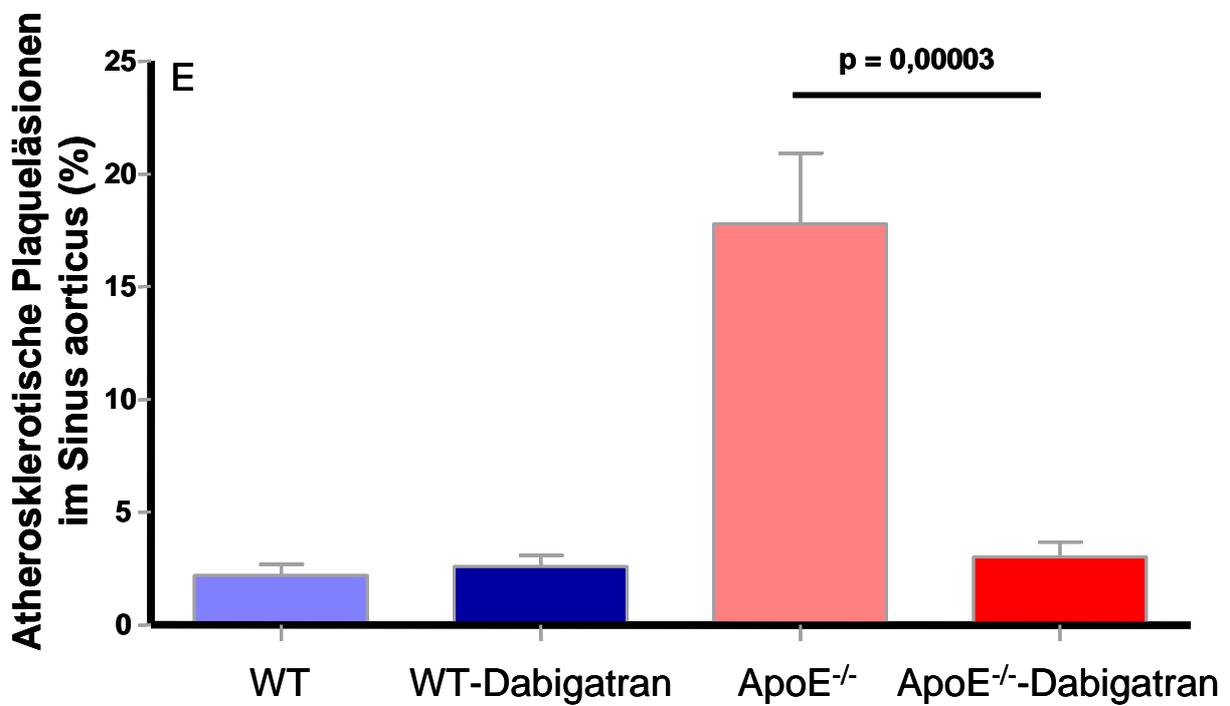
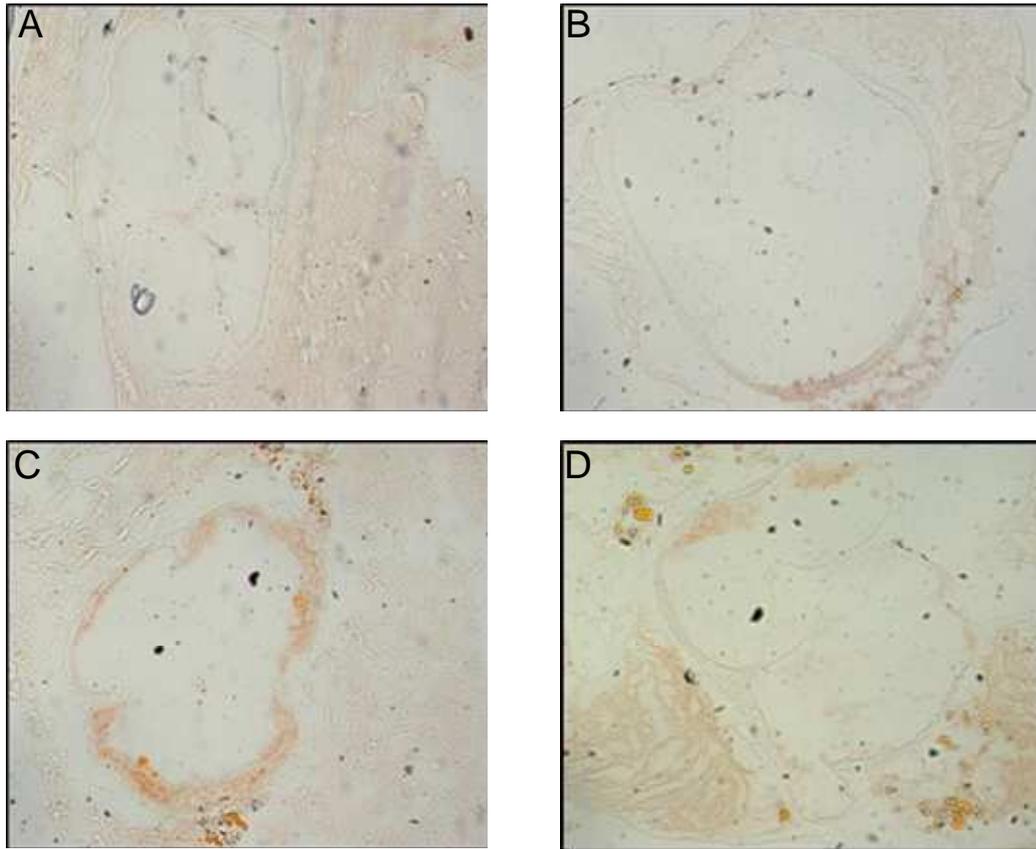
**Abb. 4.3 Endothelunabhängige Relaxation der Aortenringe durch Glyceroltrinitrat**

Relaxation isolierter Aortenringe von WT- und ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach zwölfwöchiger cholesterinreicher Diät und Therapie mit dem Thrombin-Inhibitor Dabigatran. Prozentualer Anteil der Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion in Bezug auf die endothelunabhängige Relaxation durch Glyceroltrinitrat in aufsteigenden Konzentrationen. Hier konnten über alle Behandlungsgruppen und -konzentrationen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Relaxationsfähigkeit festgestellt werden (MW ± SEM; n. s.; n = 20 pro Gruppe).

#### 4.1.4 Histologische Untersuchungen an Aorten unter Behandlung mit Dabigatran

##### 4.1.4.1 Reduktion atherosklerotischer Läsionen

Wie erwartet, entwickelten die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse durch die zwölfwöchige Fütterung mit der cholesterinreichen Diät eine generalisierte systemische Atherosklerose mit einem signifikanten Anstieg der atherosklerotischen Plaquelast im Sinus aorticus. Durch eine medikamentöse Therapie der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit dem Thrombin-Inhibitor Dabigatran konnte bei dieser behandelten Gruppe eine hochsignifikante Reduktion der atherosklerotischen Plaquefläche im Sinus aorticus im Vergleich zu den unbehandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet werden. In gleichem Maße zeigten auch die beiden Wildtyp-Gruppen im Bezug auf die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse eine hochsignifikante Reduktion der atherosklerotischen Plaquelast. Unter den Wildtyp-, den Wildtyp-Dabigatran- und den ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran-Tieren konnte kein signifikanter Unterschied im Bezug auf den Atherosklerosestatus festgestellt werden (siehe Abb. 4.4).

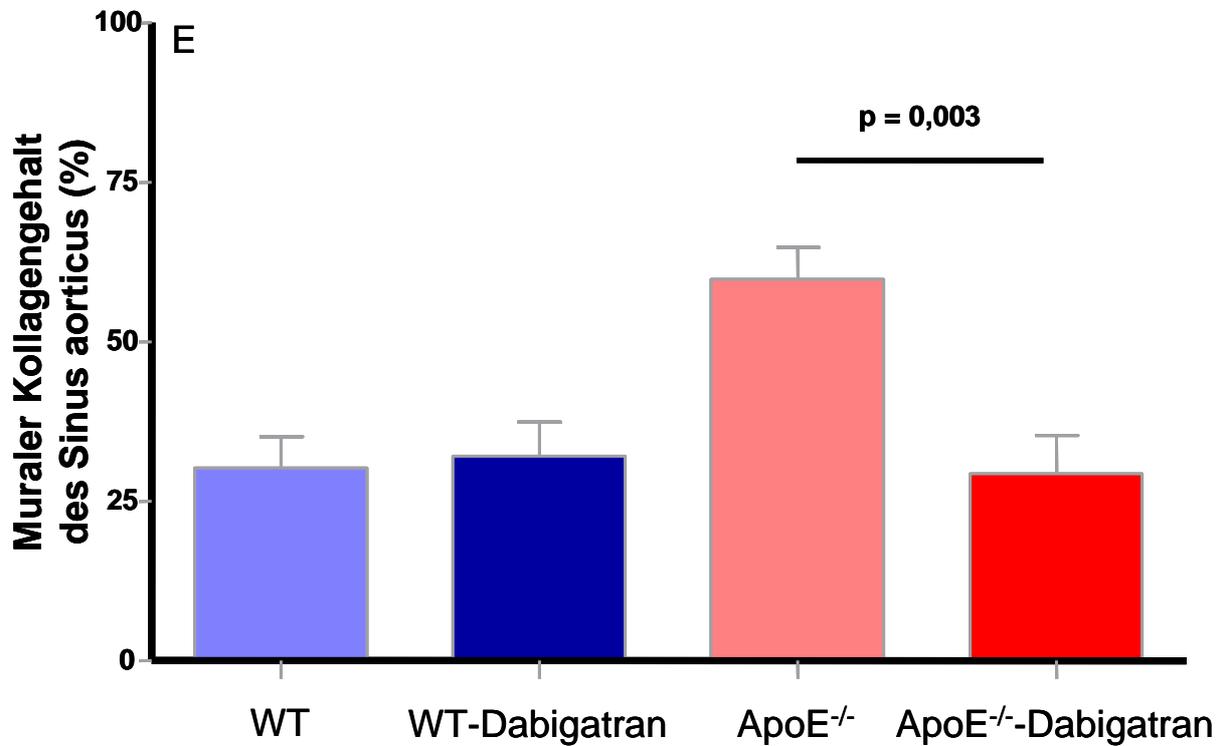
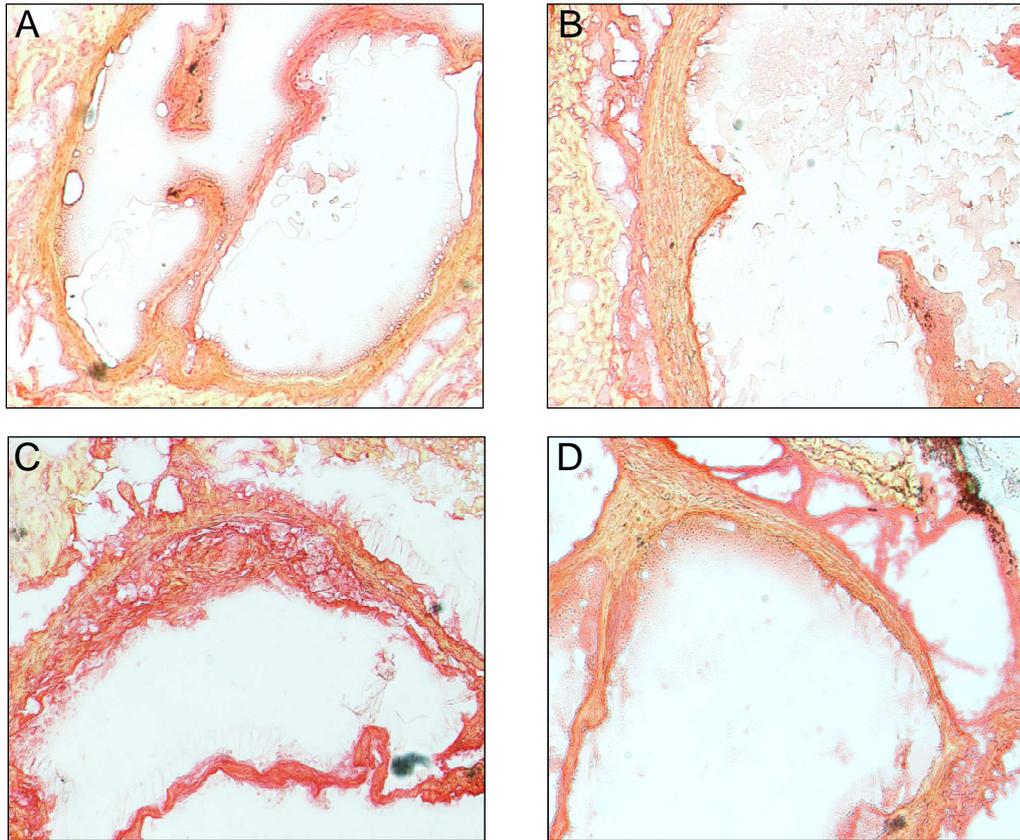


**Abb. 4.4 Reduktion der atherosklerotischen Plaquelast in dem Sinus aorticus unter Dabigatrantherapie**  
 Quantifizierung durch Verhältnis zwischen atherosklerotischer Plaquelast zu Gesamtlumen des Sinus aorticus.  
 Repräsentative histologische Transversalschnitte des Sinus aorticus mittels Ölrot-Färbung. A: WT, B: WT-Dabigatran, C: ApoE<sup>-/-</sup>, D: ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran, E: graphische Darstellung der Verteilung der atherosklerotischen

*Plaquelast im Sinus aorticus innerhalb der vier verschiedenen Behandlungsgruppen (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran: 3 ± 0,7 % vs. ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle, p = 0,00003, n = 5 pro Gruppe).*

#### **4.1.4.2 Reduktion des fibrotischen Remodelling**

Durch die zwölfwöchige cholesterinreiche Diät konnte in den ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ein fibrotischer Umbauprozess induziert werden, welcher im Vergleich zu den mit Dabigatran behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran) signifikant höher ausfiel. Auch in den beiden WT-Gruppen (WT und WT-Dabigatran) konnte eine signifikante Reduktion des fibrotischen Remodelling im Vergleich zu den ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet werden. Die Wildtyp-, Wildtyp-Dabigatran- und ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran-Gruppe zeigten untereinander keine signifikante Differenz bezüglich des muralen Kollagenstatus (siehe Abb. 4.5).

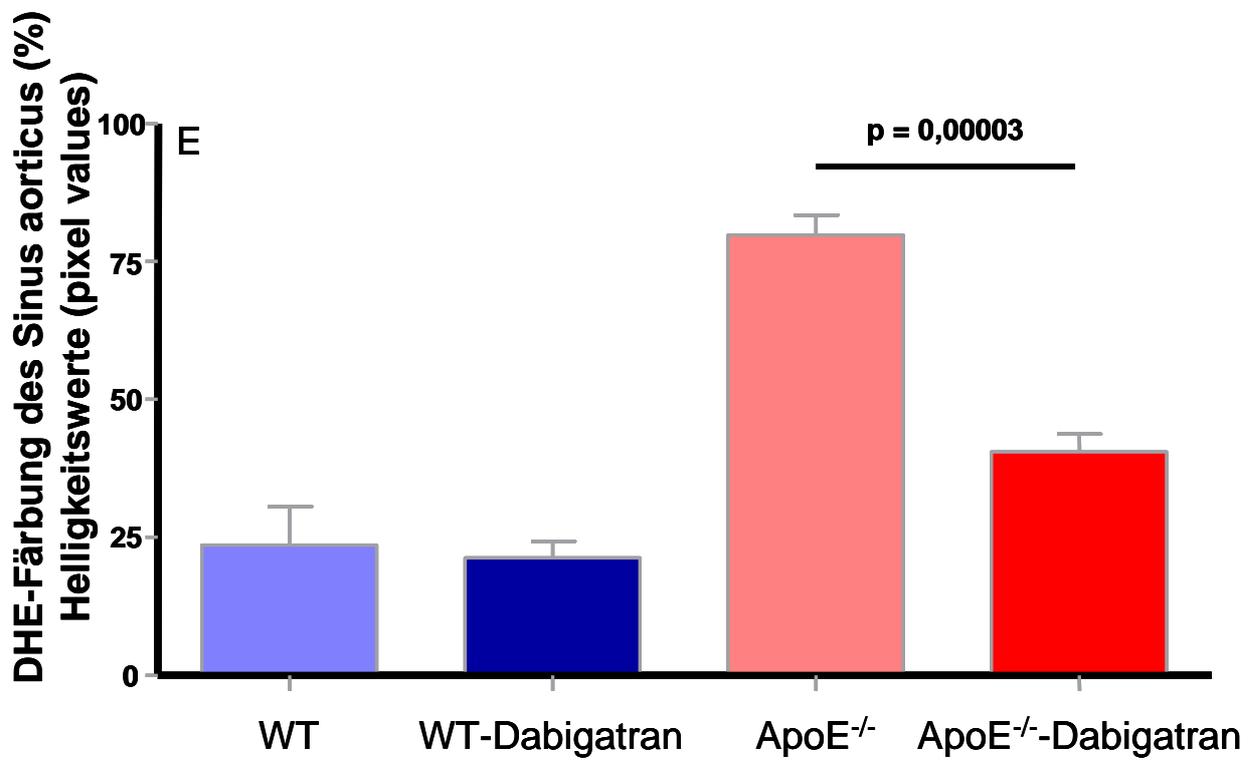
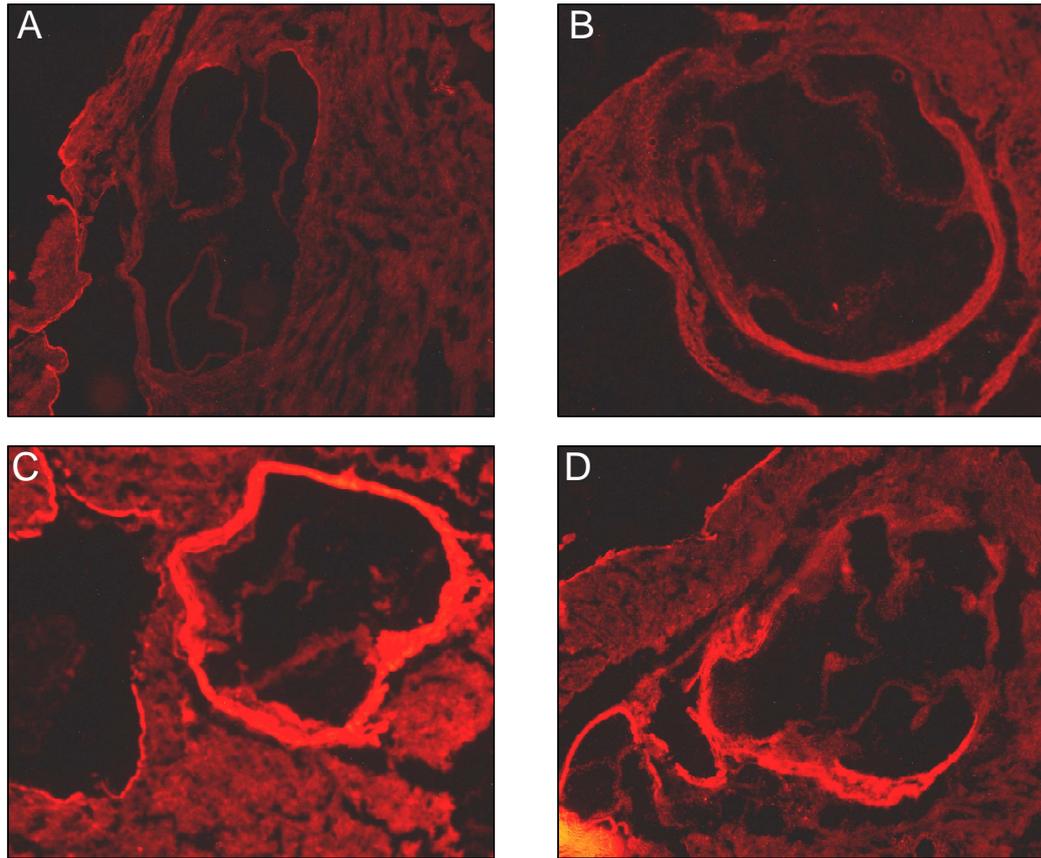


**Abb. 4.5 Reduktion des muralen fibrotischen Remodelling durch den Thrombin-Inhibitor Dabigatran**

Quantifizierung des muralen Kollagengehaltes mittels Sirius-Red-Färbung und repräsentative histologische Schnitte des Sinus aorticus. A: WT, B: WT-Dabigatran, C: ApoE<sup>-/-</sup>, D: ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran, E: graphische Darstellung der Verteilung der muralen Kollagengehalte im Sinus aorticus innerhalb der vier verschiedenen Behandlungsgruppen (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran: 29,4 ± 5,9 % vs. ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle, p = 0,003; n = 5 pro Gruppe).

#### **4.1.4.3 Geringere Last an radikalen Sauerstoffspezies**

Die DHE-Färbung, ein semiquantitatives Messverfahren zur Bestimmung von Superoxidradikalen, zeigte eine signifikante Steigerung der DHE-Fluoreszenzsignale von ROS bei den mit einer zwölfwöchigen cholesterinreichen Diät behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren im Endothel des Sinus aorticus. Dahingegen führte eine Behandlung der ApoE<sup>-/-</sup>-Tiere mit Dabigatran zu einer signifikanten Reduktion der Radikallast, welche fast dem Niveau beider Wildtyp-Gruppen (WT und WT-Dabigatran) entsprach. Lediglich die Wildtyp-Gruppen, welche untereinander keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Radikal-Konzentration aufwiesen, erreichten eine noch niedrigere Radikalkonzentration im Vergleich zu den beiden ApoE<sup>-/-</sup>-Gruppen (siehe Abb. 4.6).



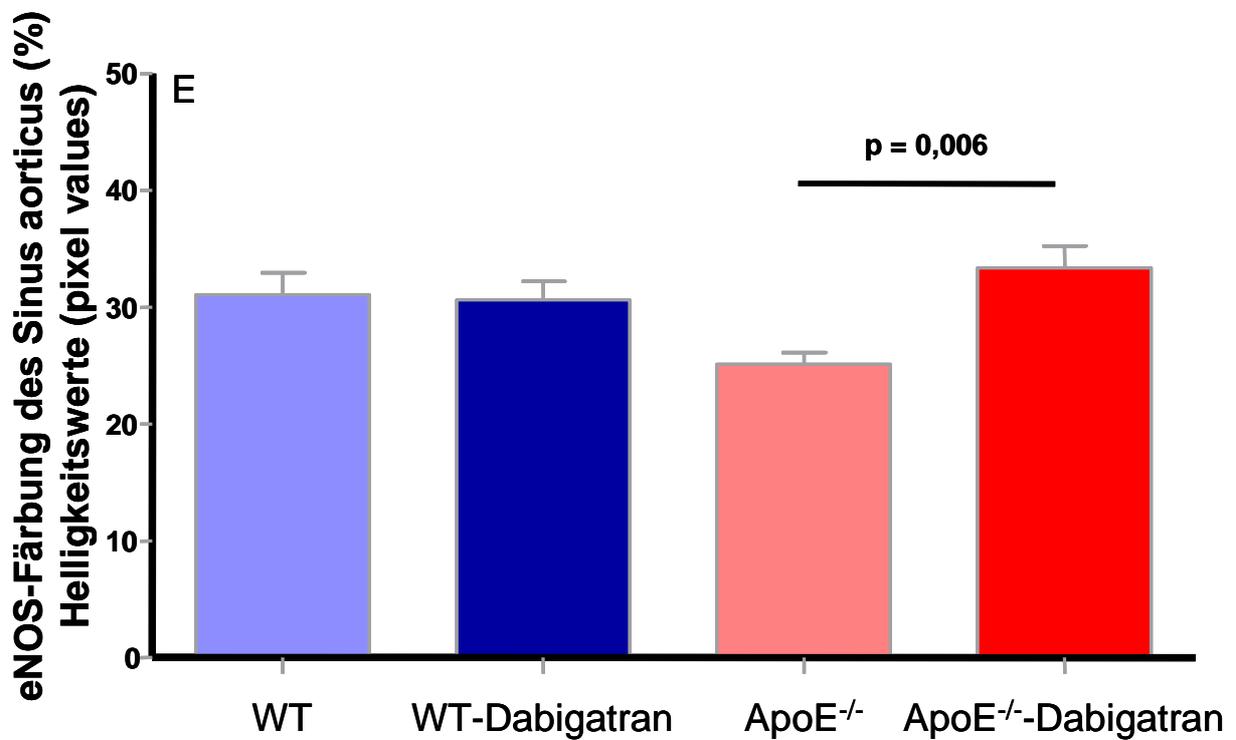
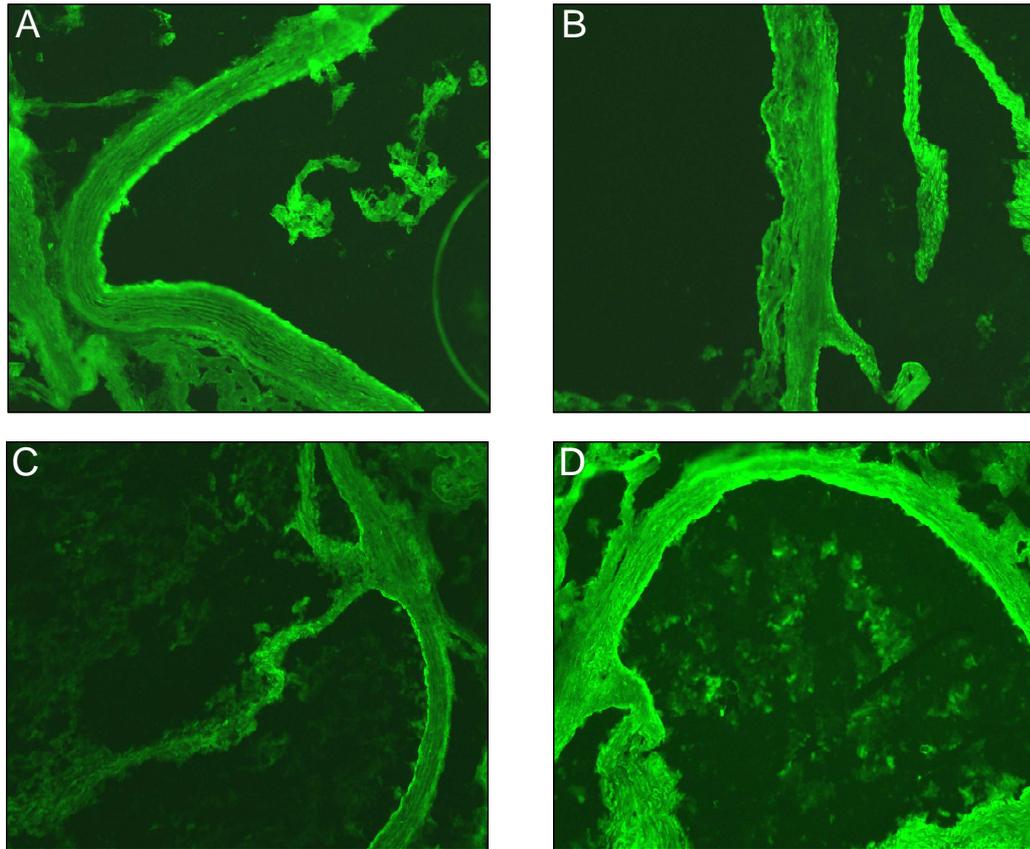
**Abb. 4.6 Reduzierte Konzentration an ROS in dem Sinus aorticus unter Dabigatrantherapie**

Repräsentative histologische Schnitte des Sinus aorticus in der DHE-Färbung. A: WT, B: WT-Dabigatran, C: ApoE<sup>-/-</sup>, D: ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran, E: graphische Darstellung der Verteilung der muralen Kollagengehalte im Sinus

*aorticus* innerhalb der vier verschiedenen Behandlungsgruppen (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran: 40,5 ± 3,3 % vs. ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle,  $p = 0,00003$ ;  $n = 5$  pro Gruppe).

#### **4.1.4.4 Gesteigerte Expression der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)**

Die zwölfwöchige cholesterinreiche Diät bewirkte bei den ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, im Vergleich zu den drei anderen Behandlungsgruppen (Wildtyp, Wildtyp-Dabigatran, ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran), eine signifikante Abnahme der Expression des eNOS-Proteins im Endothel des Sinus aorticus. Durch eine Therapie der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Dabigatran konnte eine signifikant höhere Expression des eNOS-Proteins erreicht werden, welche sogar über dem Niveau der beiden WT-Gruppen lag. Die Wildtyp-, Wildtyp-Dabigatran- und die ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran-Gruppe wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Abb. 4.7).

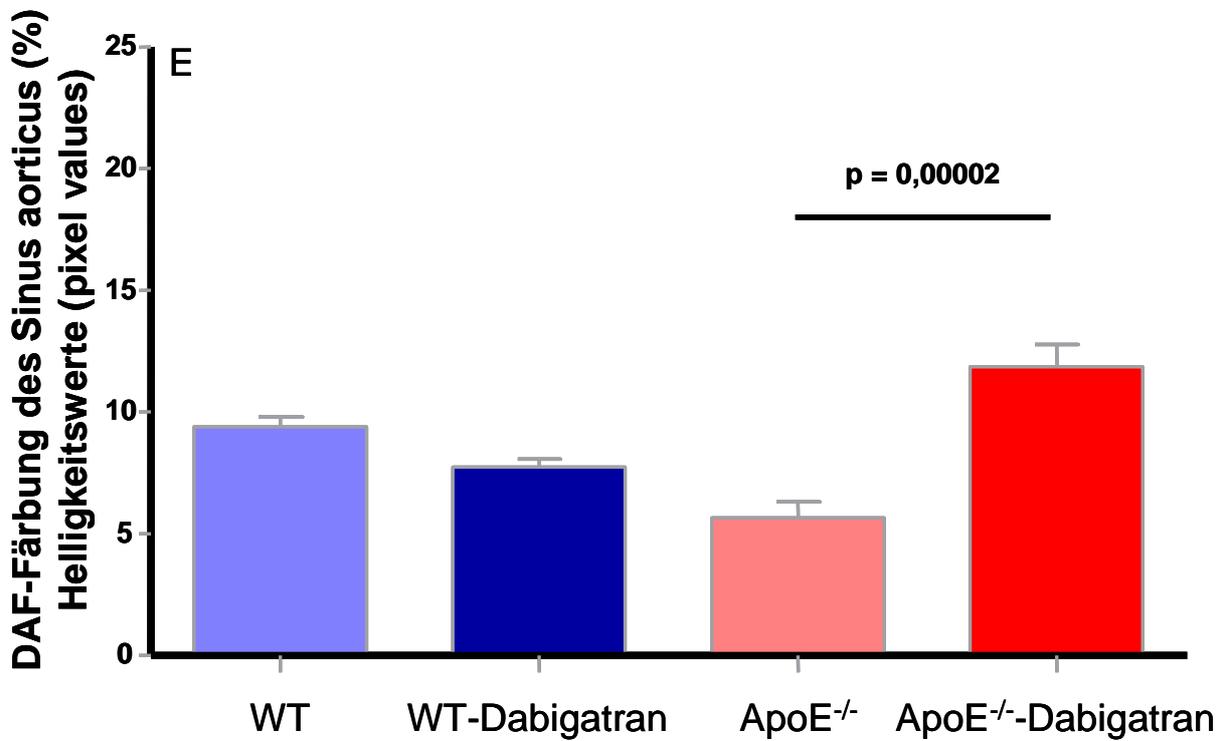
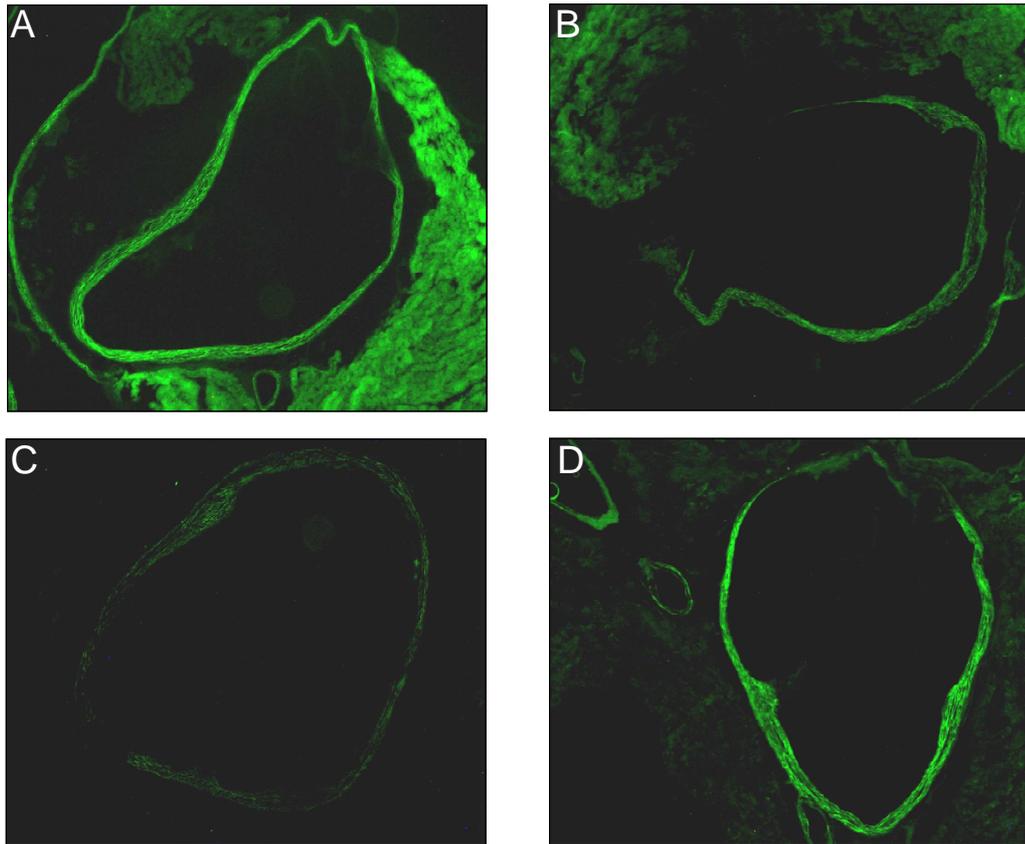


**Abb. 4.7 Gesteigerte eNOS-Proteinexpression im Gefäßendothel von ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren unter Dabigatran**  
 Darstellung des eNOS-Proteins mittels Immunfluoreszenzfärbung (FITC-konjugierte Sekundäntikörper auf anti-eNOS Primäntikörpern) in dem Sinus aorticus. A: WT, B: WT-Dabigatran, C: ApoE<sup>-/-</sup>, D: ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran, E: graphische Darstellung der Verteilung der muralen Kollagengehalte im Sinus aorticus innerhalb der vier

verschiedenen Behandlungsgruppen (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran: 33,4 ± 1,8 % vs. ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle, p = 0,006; n = 5 pro Gruppe).

#### **4.1.4.5 Gesteigerte endotheliale Stickstoffmonoxidfreisetzung**

Die Bioverfügbarkeit von NO im Endothel des Sinus aorticus kann mit der immunhistochemischen Diaminofluorescein-Färbung, einem semiquantitativen Messverfahren, nachgewiesen werden. Dabei konnte bei den beiden WT-Gruppen (WT und WT-Dabigatran) und bei den mit Dabigatran behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, im Vergleich zu der reinen ApoE<sup>-/-</sup>-Gruppe, ein signifikant höherer Gehalt an NO beobachtet werden, da durch eine zwölfwöchige cholesterinreiche Diät in der ApoE<sup>-/-</sup>-Gruppe eine signifikante Reduktion des NO-Gehaltes im Sinus aorticus induziert werden konnte. Durch eine Therapie der ApoE<sup>-/-</sup>-Tiere mit Dabigatran wurde der NO-Gehalt sogar über das Niveau der beiden WT-Gruppen hinaus gesteigert. Dies lässt auf eine höhere Bioverfügbarkeit von NO bei den ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran-Tieren schließen (siehe Abb. 4.8).



**Abb. 4.8 Gesteigerter NO-Gehalt im Sinus aorticus von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Thrombininhibierung**  
 Darstellung der immunhistochemischen DAF-Färbung von NO im Sinus aorticus. A: WT, B: WT-Dabigatran, C: ApoE<sup>-/-</sup>, D: ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran, E: graphische Darstellung der Verteilung der muralen Kollagengehalte im Sinus

*aorticus* innerhalb der vier verschiedenen Behandlungsgruppen (ApoE<sup>-/-</sup>-Dabigatran: 11,9 ± 0,9 % vs. ApoE<sup>-/-</sup>-Kontrolle,  $p = 0,00002$ ;  $n = 5$  pro Gruppe).

## 5 Diskussion

In den vorgelegten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Applikation des oralen Antikoagulans Dabigatran, welches den Thrombin-Rezeptor direkt inhibiert, die Plaquegröße und folglich die Atheroskleroselast im Aortensinus der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus signifikant reduziert. Darüber hinaus hat sich die Endothelfunktion durch eine Reduktion des oxidativen Stresses, einen Anstieg der Expression der endothelialen NO-Synthase und der freien aortalen NO-Konzentration verbessert. Im Gegenzug konnte ein Rückgang des muralen Kollagengehaltes im Sinne einer Abnahme der interstitiellen Fibrose an der Aorta beobachtet werden.

Vorhofflimmern erhöht das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden um das Fünffache<sup>44,45</sup>. Dabei verlaufen ischämische Schlaganfälle, welche mit Vorhofflimmern assoziiert sind, oft tödlich<sup>14</sup>. Patienten, die ein solches Ereignis überleben, zeigen meist weitaus größere körperliche und geistige Einschränkungen und neigen darüber hinaus mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einem weiteren embolischen Ereignis, als Patienten, welche einen Schlaganfall aus anderer Ursache erleiden. Das Risiko, an einem Schlaganfall zu versterben, welcher durch ein thrombembolisches Ereignis basierend auf Vorhofflimmern ausgelöst wurde, ist im Durchschnitt doppelt so hoch wie das bei vaskulären Schlaganfällen anderer Genese der Fall ist<sup>44,46</sup>. Einzig eine antithrombotische Therapie hat eine Reduktion der durch Vorhofflimmern ausgelösten Schlaganfälle mit Todesfolge zeigen können<sup>47</sup>. Dabei waren bisher Vitamin-K-Antagonisten die Antikoagulantien der Wahl, welche zur Prävention von Schlaganfällen bei Vorhofflimmern eingesetzt wurden und die eine belegte Wirksamkeit aufweisen<sup>48</sup>. Jedoch benötigt gerade die Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten einerseits eine regelmäßige Kontrolle des INR (International Normalized Ratio)<sup>47</sup>, andererseits ist das Risiko für eine Blutung signifikant erhöht<sup>12</sup>. So konnte in der RE-LY-Studie gezeigt werden, dass die Gabe des Thrombin-Inhibitors Dabigatran zur Prävention eines Schlaganfalls bei Vorhofflimmern der konventionellen Therapie mit Warfarin in der Verbindung ischämischer Schlaganfälle gleich wirksam (2x110 mg/d) oder sogar überlegen (2x150 mg/d) ist<sup>49</sup>.

Thrombin spielt eine wichtige Rolle in der Gerinnungskaskade, da es durch die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin die Organisation des Fibrinclots unterstützt<sup>50</sup>.

Außerdem kann Thrombin die Endothelfunktion direkt beeinflussen und verändern, indem es die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in frühen Stadien der Atherosklerose fördert<sup>51</sup>. Diese Daten konnten durch die Therapie mit dem Thrombin-Inhibitor Dabigatran in einem in-vivo-Modell mit ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigt werden. Es zeigte sich, dass die Endothelfunktion bei den ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren durch eine Dabigatran-Therapie auf das Niveau der Wildtyp-Tiere angestiegen ist. Folglich existiert also eine Verbindung zwischen Koagulation und Entzündung<sup>52,53</sup>. Des Weiteren begünstigt Thrombin die Entwicklung der Atherosklerose durch die Steigerung der Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen<sup>54,55</sup>, durch Fibroblastenstimulation<sup>56</sup>, Hemmung der NO-Synthase<sup>57,58</sup>, durch Steigerung des Gefäßtonus<sup>59</sup>, durch die Rekrutierung von proinflammatorischen Zellen<sup>60</sup>, Blättchenaggregation mit Ausbildung und endotheliale Stimulation von Thromben<sup>61,62</sup>. Durch die Sekretion von Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) oder Thromboxan A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>) beeinflusst Thrombin den Gefäßtonus dadurch, dass es eine biphasische vaskuläre Antwort mit einer frühen Relaxation und einer subsequents transienten Kontraktion induziert<sup>59</sup>. Verschiedene Studien zeigten bereits, dass die Aktivierung von PAR2 vaskuläre Umbauprozesse begünstigt und eine wichtige Rolle in der Genese der Atherosklerose spielt<sup>63</sup>. Auch Thrombin induziert die Expression von Zytokinen (z.B. Interleukin-6 und Interleukin-8), Chemokine (z.B. MCP-1) und zelluläre Adhäsionsmoleküle (z.B. cell adhesion molecule-1 und intercellular adhesion molecule-1), welche das Einwandern von Monozyten in die Gefäßwand begünstigen<sup>23</sup>. Thrombin beeinflusst über die Regulation der Plättchen-vermittelten Wachstumsfaktoren die Migration und Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen, welche zur Plaqueentwicklung beitragen<sup>51,64</sup>. Darüber hinaus hat Thrombin über den PAR1-Rezeptor arrhythmogene Eigenschaften, indem der Natriumeinstrom in die atrialen Kardiomyozyten dauerhaft gesteigert wird<sup>65</sup>. Die Rolle der PAR-Aktivierung und die Hyperkoagulabilität in der Entwicklung von Vorhofflimmern dürfte für die Auffassung wichtig sein, dass spezifische Antikoagulantien arrhythmogene Zellveränderungen vorbeugen können<sup>23</sup>.

Eine verlängerte Inkubation mit Thrombin hat gezeigt, dass die NO-Synthase gehemmt wird, was die Endothelfunktion in einem kritischen Maße beeinflusst<sup>66,67</sup>. So konnte in unserem in-vivo-Modell gezeigt werden, dass durch die Therapie transgener ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit dem Thrombin-Inhibitor Dabigatran sowohl eine

Zunahme der endothelialen NO-Konzentration als auch der endothelialen NO-Synthase bewirkt werden konnte. Sind bereits endotheliale Läsionen vorhanden, so ist die Thrombin-Konzentration an diesen Stellen erhöht <sup>68</sup> und induziert eine proinflammatorische Antwort, welche über den Protease aktivierenden Rezeptor Typ 1 (PAR-1) vermittelt wird <sup>69</sup>. Darüber hinaus korrelieren erhöhte freie Sauerstoffradikal-Konzentrationen mit der endothelialen Dysfunktion und dem Fortschreiten der Atherosklerose <sup>70</sup>. So konnten wir bei den ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren unter Dabigatran-Therapie eine signifikante Abnahme der Konzentration an freien Sauerstoffradikalen in histologischen Untersuchungen an aortalem Gewebe feststellen. Diese vielseitigen Effekte des Thrombins auf die vaskuläre Pathophysiologie lässt darauf schließen, dass die Entwicklung eines direkten Thrombin-Inhibitors eine vielversprechende Therapieoption auch in der Behandlung von Gefäßerkrankungen zu sein scheint.

Die ersten Ergebnisse suggerierten einen signifikanten Anstieg nicht-fataler Herzinfarkte in der mit Dabigatran behandelten Gruppe im Vergleich zur Warfarin-Gruppe, welche nach Reevaluation nicht stabil war <sup>71</sup>. Andererseits kann eine Thrombinhemmung mittels Dabigatran, mit dem daraus folgenden protektiven Effekt auf die Genese einer Atherosklerose, welche sich aufgrund der neu publizierten Metaanalyse aus verschiedenen randomisierten nicht-unterlegenen Studien zu festigen scheint <sup>72</sup>, bedeutsam sein. Diese aus in-vitro-Untersuchungen stammende Daten konnten nun auch in einem in-vivo-Modell mit transgenen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigt werden. Erste experimentelle Studien mit dem Thrombinhemmer Malegatran haben bereits positive Effekte auf die vaskuläre Pathologie im Sinne einer Hemmung der Atheroskleroseprogression gezeigt <sup>73</sup>. Auch diese zeigten eine Reduktion der Atheroskleroselast und eine Stabilisierung der Plaqueläsion. So zeigten Borissoff et al., dass Dabigatran bei Mäusen mit einem pro-koagulativen Phänotyp (TMPRO/PRO:ApoE<sup>-/-</sup>) einen starken und protektiven Effekt auf eine experimentell induzierte Atherosklerose besitzt <sup>74</sup>. Außerdem haben Preusch et al. herausgefunden, dass eine Therapie mit Dabigatran die Entwicklung einer Atherosklerose verzögert <sup>75</sup>. Des Weiteren zeigten Nagy et al., dass eine Therapie mit Dabigatran signifikant die Ausbildung einer generalisierten Atherosklerose in der Aorta von Mäusen mit ausgeschaltetem LDL-Rezeptor bedingt, was meistens auf ein

Umbau der extrazellulären Plaquematrix zurückzuführen ist <sup>76</sup>. Diese letzteren Studien wurden bisweilen lediglich als Abstract publiziert.

Die durchgeführte Untersuchungen sind, wie in den oben beschriebenen Fällen, zu den gleichen Ergebnissen gekommen und zeigen darüber hinaus noch einen vorteilhaften Einfluss auf die Endothelfunktion durch ein Absinken der ROS-Produktion und folglich eine Reduktion des oxidativen Stresses. Außerdem kann durch einen Anstieg des endothelialen NO-Gehalts und der Konzentration der endothelialen NO-Synthase (eNOS) ein Vorteil bezüglich der Funktionstüchtigkeit des Endothels gezeigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Dabigatran in einer antikoagulativen Dosis eingesetzt wurde.

## **5.1 Fazit**

Zusammenfassend zeigt die vorgelegte Arbeit einen protektiven Effekt der direkten Thrombinhemmung im Bezug auf das vaskuläre Remodelling. Die direkte Thrombininhibierung führt zu einer verbesserten Endothelfunktion und einer Reduktion des oxidativen Stresses. Außerdem werden die Genese von atherosklerotischen Gefäßveränderungen und die Proliferation der Kollagensynthese gehemmt. Klinische Langzeitstudien werden zeigen, ob die Thrombinhemmung einen vorteilhaften Effekt auf das vaskuläre Outcome hat.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Blann AD, Lip GY. The endothelium in atherothrombotic disease: assessment of function, mechanisms and clinical implications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9:297-306
- 2 Forgione MA, Leopold JA, Loscalzo J. Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2000; 15:409-415
- 3 Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:61-74
- 4 Loscalzo J. Inducible NO synthesis in the vasculature: molecular context defines physiological response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1259-1260
- 5 Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, et al. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. *Circulation* 1996; 93:1346-1353
- 6 Blann AD, Lip GY. Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. *Clin Cardiol* 1997; 20:822, 824
- 7 Steinberg HO, Bayazeed B, Hook G, et al. Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. *Circulation* 1997; 96:3287-3293
- 8 Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91:3527-3561
- 9 Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844
- 10 Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:791-804

- 11 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126
- 12 Schirmer SH, Baumhake M, Neuberger HR, et al. Novel anticoagulants for stroke prevention in atrial fibrillation: current clinical evidence and future developments. *J Am Coll Cardiol*, 2010; 2067-2076
- 13 Verheugt FW. The new oral anticoagulants in atrial fibrillation: an update. *Neth Heart J* 2013; 21:480-484
- 14 Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation--developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Europace* 2012; 14:1385-1413
- 15 Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, et al. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA* 1994; 271:840-844
- 16 Miho N, Ishida T, Kuwaba N, et al. Role of the JNK pathway in thrombin-induced ICAM-1 expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2005; 68:289-298
- 17 Daniel TO, Gibbs VC, Milfay DF, et al. Thrombin stimulates c-sis gene expression in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1986; 261:9579-9582
- 18 Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol* 1994; 144:975-985

- 19 Naldini A, Carney DH, Pucci A, et al. Thrombin regulates the expression of proangiogenic cytokines via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *Gen Pharmacol* 2000; 35:255-259
- 20 Esmon CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* 2008; 61:122-131
- 21 Borisoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011; 364:1746-1760
- 22 Borensztajn K, Spek CA. Blood coagulation factor Xa as an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15:341-349
- 23 Spronk HM, de Jong AM, Crijns HJ, et al. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovasc Res* 2014; 101:344-351
- 24 Gudmundsdottir IJ, Lang NN, Boon NA, et al. Role of the endothelium in the vascular effects of the thrombin receptor (protease-activated receptor type 1) in humans. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:1749-1756
- 25 Martin K, Weiss S, Metharom P, et al. Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin. *Circ Res* 2009; 105:214-218
- 26 Seehaus S, Shahzad K, Kashif M, et al. Hypercoagulability inhibits monocyte transendothelial migration through protease-activated receptor-1-, phospholipase-Cbeta-, phosphoinositide 3-kinase-, and nitric oxide-dependent signaling in monocytes and promotes plaque stability. *Circulation* 2009; 120:774-784
- 27 Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:133-140

- 28 van Ree JH, van den Broek WJ, Dahlmans VE, et al. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 1994; 111:25-37
- 29 Napoli C, Palinski W, Di Minno G, et al. Determination of atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000; 10:209-215
- 30 Krege JH, Hodgin JB, Hagaman JR, et al. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 1995; 25:1111-1115
- 31 Schlimmer N. Effekte der Blockade des Angiotensin II Rezeptors Typ 1 auf die endotheliale und erektile Funktion: Inauguraldissertation, 2011;
- 32 Guimaraes S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 2001; 53:319-356
- 33 Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998; 50:279-290
- 34 McVean DE, Patrick RL, Witchett CE. AN AQUEOUS OIL RED O FIXATIVE STAIN FOR HISTOLOGICAL PREPARATIONS. *Am J Clin Pathol* 1965; 43:291-293
- 35 Daugherty A, Rateri DL. Development of experimental designs for atherosclerosis studies in mice. *Methods* 2005; 36:129-138
- 36 Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. SIRIUS RED F3BA AS A STAIN FOR CONNECTIVE TISSUE. *Arch Pathol* 1964; 78:69-72
- 37 Christensen FH, Hansen T, Stankevicius E, et al. Elevated pressure selectively blunts flow-evoked vasodilatation in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol* 2007; 150:80-87

- 38 Nishida K, Harrison DG, Navas JP, et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992; 90:2092-2096
- 39 Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291:C803-816
- 40 Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 1998; 70:2446-2453
- 41 Love JE, Ferrell C, Chandler WL. Monitoring direct thrombin inhibitors with a plasma diluted thrombin time. *Thromb Haemost* 2007; 98:234-242
- 42 Stangier J, Feuring M. Using the HEMOCLOT direct thrombin inhibitor assay to determine plasma concentrations of dabigatran. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012; 23:138-143
- 43 Lee IO, Kratz MT, Schirmer SH, et al. The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 343:253-257
- 44 Kirchhof P, Auricchio A, Bax J, et al. Outcome parameters for trials in atrial fibrillation: executive summary. *Eur Heart J* 2007; 28:2803-2817
- 45 Knecht S, Oelschlager C, Duning T, et al. Atrial fibrillation in stroke-free patients is associated with memory impairment and hippocampal atrophy. *Eur Heart J* 2008; 29:2125-2132
- 46 Stewart S, Hart CL, Hole DJ, et al. A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *Am J Med* 2002; 113:359-364

- 47 Hylek EM, Go AS, Chang Y, et al. Effect of intensity of oral anticoagulation on stroke severity and mortality in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2003; 349:1019-1026
- 48 Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med* 2007; 146:857-867
- 49 Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009; 361:1139-1151
- 50 Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med* 1992; 326:800-806
- 51 Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, et al. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res* 2009; 82:392-403
- 52 Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* 2005; 131:417-430
- 53 Levi M, van der Poll T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15:254-259
- 54 Dabbagh K, Laurent GJ, McAnulty RJ, et al. Thrombin stimulates smooth muscle cell procollagen synthesis and mRNA levels via a PAR-1 mediated mechanism. *Thromb Haemost* 1998; 79:405-409
- 55 Ivey ME, Little PJ. Thrombin regulates vascular smooth muscle cell proteoglycan synthesis via PAR-1 and multiple downstream signalling pathways. *Thromb Res* 2008; 123:288-297
- 56 Chambers RC, Dabbagh K, McAnulty RJ, et al. Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1. *Biochem J* 1998; 333 ( Pt 1):121-127

- 57 Eto M, Barandier C, Rathgeb L, et al. Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circ Res* 2001; 89:583-590
- 58 Watts VL, Motley ED. Role of protease-activated receptor-1 in endothelial nitric oxide synthase-Thr495 phosphorylation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234:132-139
- 59 Derkach DN, Ihara E, Hirano K, et al. Thrombin causes endothelium-dependent biphasic regulation of vascular tone in the porcine renal interlobar artery. *Br J Pharmacol* 2000; 131:1635-1642
- 60 Bizios R, Lai L, Fenton JW, 2nd, et al. Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol* 1986; 128:485-490
- 61 Eidt JF, Allison P, Noble S, et al. Thrombin is an important mediator of platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries with endothelial injury. *J Clin Invest* 1989; 84:18-27
- 62 Harker LA, Hanson SR, Runge MS. Thrombin hypothesis of thrombus generation and vascular lesion formation. *Am J Cardiol* 1995; 75:12B-17B
- 63 Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med* 2008; 14:429-440
- 64 Hamilton JR, Cornelissen I, Mountford JK, et al. Atherosclerosis proceeds independently of thrombin-induced platelet activation in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Atherosclerosis* 2009; 205:427-432
- 65 Pinet C, Algalarrondo V, Sablayrolles S, et al. Protease-activated receptor-1 mediates thrombin-induced persistent sodium current in human cardiomyocytes. *Mol Pharmacol* 2008; 73:1622-1631

- 66 Ming XF, Barandier C, Viswambharan H, et al. Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; 110:3708-3714
- 67 Zhang C, Hein TW, Wang W, et al. Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension* 2004; 44:935-943
- 68 Hatton MW, Moar SL, Richardson M. Deendothelialization in vivo initiates a thrombogenic reaction at the rabbit aorta surface. Correlation of uptake of fibrinogen and antithrombin III with thrombin generation by the exposed subendothelium. *The American journal of pathology* 1989; 135:499-508
- 69 Hirano K. The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2007; 27:27-36
- 70 Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91:7A-11A
- 71 Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al. Newly identified events in the RE-LY trial. *N Engl J Med* 2010; 363:1875-1876
- 72 Uchino K, Hernandez AV. Dabigatran association with higher risk of acute coronary events: meta-analysis of noninferiority randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2012; 172:397-402
- 73 Bea F, Kreuzer J, Preusch M, et al. Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2787-2792
- 74 Borissoff JI, Heeneman S, Kilinc E, et al. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation* 2010; 122:821-830

- 75 Preusch M, Wijelath E, Murray J, et al. Dabigatran etexilate, a new oral thrombin inhibitor, retards the initiation and progression of atherosclerotic lesions and inhibits the expression of oncostatin M in apolipoprotein E-deficient mice, at the Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2010 Scientific Sessions; 2010 April 8-10; San Francisco, CA. American Heart Association, Dallas, TX. 2010
- 76 Nagy N, Grandoch M, Fischer J. Abstract 15194: Dabigatran causes remodelling of plaque extracellular-matrix in diabetogenic low density lipoprotein-receptor knockout mice. *Circulation* 2011; 124

## 7 Publikationen

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit ist folgende Publikation entstanden:

Lee IO\*, **Kratz MT\***, Schirmer SH, Baumhäkel M, Böhm M (2012)

The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice.

J Pharmacol Exp Ther, 343(2):253-7.

\*geteilte Erstautorenschaft

Weitere Publikationen:

**Kratz MT**, Schumacher H, Sliwa K, Schmieder R, Pöss J, Mahfoud F, Unger T, Lonn E, Koon T, Mancía G, Sleight P, Yusuf S, Böhm M (2014)

Heart rate and blood pressure interactions in the development of erectile dysfunction in high-risk cardiovascular patients.

Eur J Prev Cardiol, 21(3):272-80.

Reil JC, Hohl M, Reil GH, Granzier HL, **Kratz MT**, Kazakov A, Fries P, Müller A, Lenski M, Custodis F, Gräber S, Fröhlig G, Steendijk P, Neuberger HR, Böhm M (2013)

Heart rate reduction by If-inhibition improves vascular stiffness and left ventricular systolic and diastolic function in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction.

Eur Heart J, 34(36):2839-49.

Böhm M\*, **Kratz MT\***, Schlimmer N, Baumhäkel M (2008)

Erectile dysfunction as cardiovascular risk marker. Role of the renin-angiotensin system.

Dtsch Med Wochenschr, 133(24):1313-6.

\*geteilte Erstautorenschaft

Baumhäkel M, Schlimmer N, **Kratz MT**, Böhm M (2009)

Erectile dysfunction: indicator of end-organ damage in cardiovascular patients.

Med Klin (Munich), 104(4):309-13.

Baumhäkel M, Schlimmer N, **Kratz M**, Hackett G, Jackson G, Böhm M (2011)

Cardiovascular risk, drugs and erectile function - a systematic analysis.

Int J Clin Pract, 65(3):289-98.

Review. Erratum in: Int J Clin Pract, 65(4):516.

Schlimmer N, **Kratz M**, Böhm M, Baumhäkel M (2011)

Telmisartan, ramipril and their combination improve endothelial function in different tissues in a murine model of cholesterol-induced atherosclerosis.

Br J Pharmacol, 163(4):804-14.

Abstracts:

**Kratz MT**, Lee IO, Schirmer SH, Baumhäkel M, Böhm M (2012)

The Influence on Plaque Formation and Endothelial Function in Apoe-Deficient Mice by Direct Thrombin Inhibition with Dabigatran.

Circulation 126: A14060

**Kratz MT**, Lee I, Schirmer SH, Böhm M, Baumhäkel M (2012)

Eplerenone improves endothelial function in different tissues in a murine model of cholesterol-induced atherosclerosis.

Eur Heart J 33 suppl: 589-590

Schirmer SH, **Kratz MT**, Bettink S, Degen A, Kazakov A, Nylander S, Baumhäkel M, Laufs U, Böhm M (2013)

Inhibition des Adenosindiphosphat-Rezeptors P2Y<sub>12</sub> reduziert Atherosklerose und Inflammation in der hyperlipidämischen Apolipoprotein E-defizienten Maus.

79. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Clin Res Cardiol 102, suppl 1 (V524)

**Kratz MT**, Lee IO, Schirmer SH, Baumhäkel M, Böhm M (2013)

The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on atherosclerosis and endothelial function in ApoE-deficient mice.

79. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Clin Res Cardiol 102 suppl 1 (P1078)

**Kratz MT**, Lee IO, Schirmer SH, Baumhäkel M, Böhm M (2013)

Die Therapie mit dem Mineralokortikoidantagonisten Eplerenon verbessert die aortale und penile Endothelfunktion und hemmt die Entwicklung einer Atherosklerose im Modell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus.

119. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, Der Internist 2013-54:1-152 (YIA01)

**Kratz MT**, Lee IO, Schirmer SH, Baumhäkel M, Böhm M (2013)

Die direkte Thrombininhibierung mit Dabigatran verbessert die Endothelfunktion und hemmt die Entwicklung der Atherosklerose im Modell ApoE<sup>-/-</sup>-Maus.

119. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, Der Internist 2013-54:1-152 (P211)

## 8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich in aller Form bei Herrn Prof. Dr. M. Böhm, Herrn PD Dr. M. Baumhäkel und Herrn PD Dr. Dr. S. H. Schirmer bedanken, die mir die Durchführung des wissenschaftlichen Projektes ermöglicht haben. Sie haben meinen Ehrgeiz geweckt und mir gezeigt, dass mit experimenteller Arbeit die Grundsteine für neueste Behandlungsmethoden in der Medizin gelegt werden. Es ist nicht selbstverständlich, dass ein junger Medizinstudent schon zu Beginn seines Studiums in diesem Maße gefördert und gefordert wird. Außerdem gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. N. Schlimmer, der mich von Beginn an in die wissenschaftliche Arbeit eingewiesen und mir stets mit seinem Rat zur Seite gestanden hat. Obwohl sich unser beruflicher Weg leider getrennt hat, kann ich heute immer noch auf sein wissenschaftliches Wissen, aber auch auf sein offenes Ohr als Freund vertrauen.

Des Weiteren muss ich einen besonderen Dank Frau Nina Rebmann aussprechen. Als Biologielaborantin unserer Arbeitsgruppe konnte ich immer auf ihre Mithilfe bei allen Projekten bauen. Sie zeigte stets den Ehrgeiz, die anstehenden Arbeiten zur vollsten Zufriedenheit aller zu erledigen. Ferner möchte ich mich auch bei Armin Schweitzer für seine computer-technische Mithilfe bedanken. Gerade bei der Fertigung von Diagrammen und Bildern konnte ich immer auf seine Unterstützung bauen.

Es liegt mir sehr am Herzen, mich auch bei meinen Freunden zu bedanken. Wenn mir die gesamte universitäre Arbeit das eine oder andere Mal über den Kopf zu wachsen schien, habe ich auf ihre Ablenkung zählen können, obwohl dies nicht immer leicht gewesen sein muss. Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, die mich stets mit Rat und Tat, sowohl bei der Durchführung dieser Arbeit, als auch während meines ganzen Studiums unterstützt und ertragen hat.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

<b>Name</b>	Kratz, Mario Tobias
<b>Geburtsdatum</b>	05. Januar 1987
<b>Geburtsort</b>	Homburg/Saar
<b>Wohnort</b>	Buchenweg 1 66894 Bechhofen
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Religion</b>	römisch-katholisch

### Schulbildung / Studium:

<b>1993 – 1997</b>	Grundschule Sonnenfeld in Homburg/Saar
<b>1997 – 2006</b>	Gymnasium Johanneum (gGmbH), Homburg/Saar
<b>06/2006</b>	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,7) Gymnasium Johanneum (gGmbH), Homburg/Saar
<b>2006 – 2013</b>	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
<b>03/2009</b>	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<b>10/2013</b>	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<b>12/2013</b>	Approbation

### Beschäftigungsverhältnisse:

<b>10/2005</b>	Pflegediensttätigkeiten in der Klinik für Innere Medizin III – Station M3-02, M3-04, M3-08 (Kardiologie, Angiologie, Internistische Intensivmedizin)
<b>04/2007</b>	Studentische und wissenschaftliche Hilfskraft in der Klinik für Innere Medizin III (Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin) – Arbeitsgruppe kardiovaskuläre Forschung

**07/2009 – 07/2010**

Klinisch-wissenschaftliche Arbeit in der Klinik für Innere Medizin III (Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin), Prof. Dr. Michael Böhm, mit dem Thema:

**Possible mechanisms of testosterone-induced vascular and endothelial reactivity in vitro and in a testicular-feminized murine model, comprising androgen-receptor-dependent and -independent pathways**

Weitere wissenschaftliche Arbeiten:

**07/2007**

Mitarbeit bei klinischen Studien zu dem Thema: Mikrovaskuläre Zirkulationsstörungen und erektile Dysfunktion  
Experimentelle Arbeiten in der klinischen Forschung

Praktika, berufliche Erfahrungen:

**02/2004**

Sozialpraktikum in der Klinik für Innere Medizin II – Ambulanz

**06/2006**

Pflegepraktikum in der Klinik für Innere Medizin III

**09/2006**

Pflegepraktikum in der Klinik für Innere Medizin III

**08/2009**

Famulatur – Kardiologie, Angiologie, internistische Intensivmedizin

**08/2010**

Famulatur – Kardiologie, Angiologie, internistische Intensivmedizin – Angiologische Ambulanz

**02/2011**

Famulatur – Gemeinschaftspraxis Bechhofen – Hr. A. Schilling & Dr. W. Johannes

**08/2011**

Famulatur – Kardiologie, Angiologie, internistische Intensivmedizin

Stipendien, Preise:

**07/2009 – 06/2010**

Stipendiat der deutschen Herzstiftung

**10/2010 – 03/2011**

Stipendiat der MLP Finanzdienstleistungen AG

**08.04.2013**

Posterpreis (Schwerpunkt Kardiologie) – Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin e. V. mit dem Thema:

**Die direkte Thrombininhibierung mit Dabigatran verbessert die Endothelfunktion und hemmt die Entwicklung der Atherosklerose im Modell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus**

**08.04.2013**

Endrundenteilnehmer Young Investigators' Award – Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin e.V. mit dem Thema:

**Die Therapie mit dem Mineralokortikoid-antagonisten Eplerenon verbessert die aortale und penile Endothelfunktion und hemmt die Entwicklung einer Atherosklerose im Modell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus**

Soziale Aktivitäten:

**12/2003**

Projektleiter bei den Bibelprojekttagen –  
Gymnasium Johanneum

**Seit 06/2008**

Junger Chor Da Capo Münchwies e.V.

**Seit 06/2011**

Siedlergemeinschaft Birkensiedlung e.V.

**Seit 11/2011**

Pressewart Junger Chor Da Capo Münchwies e.V.

**Seit 12/2012**

Obst- und Gartenbauverein Kirrberg e.V.

**02 – 07/2012**

Ehrenamtliche Tätigkeit bei der ökumenischen  
Sozialstation Westpfalz