

Universität Rostock

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

# **Der Einfluss von Hydrogensulfid auf die Aktivität humaner Thrombozyten und die mikrovaskuläre Thrombogenese im Modell der dorsalen Rückenhautkammer**



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Eberhard Grambow

geboren in Neubrandenburg

Rostock 2013

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Insitut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Noak, Institut für Physiologie, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter M. Vogt, Klinik für Hand-, Plastische- und Wiederherstellungschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 15.01.2014

*Meiner Familie*

Inhaltsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	4
2 Abstract	6
3 Glossar	7
4 Einleitung	9
4.1 Physiologie der Thrombogenese	9
4.1.1 Klinische Bedeutung der Thrombose	9
4.1.2 Physiologie der Hämostase	10
4.1.2.1 Primäre Hämostase	11
4.1.2.1.1 Morphologie der Thrombozyten	11
4.1.2.1.2 Funktion der Thrombozyten	12
4.1.2.1.3 Thrombozytäre Adhäsionsmoleküle	12
4.1.2.1.3.1 Selektine	13
4.1.2.1.3.2 Integrine	14
4.1.2.1.3.3 GP <sub>Ib</sub>	14
4.1.2.1.3.4 GP <sub>I<b>II</b>b-IIIa</sub>	15
4.1.2.1.4 Thrombozytenaktivierung	15
4.1.2.1.5 Thrombozytenadhäsion und –aggregation	17
4.1.2.2 Sekundäre Hämostase	18
4.2 Hydrogensulfid	20
4.2.1 Metabolismus	20
4.2.1.1 Cystathionin $\beta$ -Synthase	21
4.2.1.2 Cystathionin $\gamma$ -Lyase	22
4.2.1.3 3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase	22
4.2.2 Protein S-Sulfhydrierung	23
4.2.3 Endogene Funktionen	23
4.2.3.1 Herz-Kreislauf-System	24

Inhaltsverzeichnis	2
4.2.3.2 Zentralnervensystem .....	25
5 Zielstellung .....	28
6 Material und Methodik .....	29
6.1 Hydrogensulfid Donor GYY4137 .....	29
6.2 <i>In vivo</i> Experimente .....	29
6.2.1 Versuchstiere .....	29
6.2.2 Versuchsgruppen .....	30
6.2.3 Experimentelles Tiermodell .....	30
6.2.3.1 Anästhesie .....	30
6.2.3.2 Modell und Präparation der dorsalen Rückenhautkammer .....	30
6.2.3.3 Vorbereitung der Intravitalmikroskopie .....	35
6.2.3.4 Intravitalmikroskopie und Thromboseinduktion .....	37
6.2.3.5 Subaquale Blutungszeit und Blutentnahme .....	39
6.3 <i>In vitro</i> Experimente .....	39
6.3.1 Blutentnahme und Gewinnung plättchenreichen Plasmas .....	39
6.3.2 Durchflusszytometrie .....	40
6.3.3 Biotin Switch Assay .....	42
6.3.4 ELISA für lösliches P-Selektin .....	43
6.4 Statistische Analyse .....	44
7 Ergebnisse .....	45
7.1 Thrombosezeiten.....	45
7.2 Subaquale Blutungszeit und Thrombozytenzahl.....	46
7.3 Durchflusszytometrie.....	46
7.4 Plasmatische Konzentration von löslichem P-Selektin.....	49
7.5 Biotin Switch Assay .....	50
8 Diskussion.....	52

Inhaltsverzeichnis	3
8.1 Diskussion von Material und Methodik	52
8.1.1 Hydrogensulfid Donor GYY4137	52
8.1.2 <i>In vivo</i> Thrombosemodell	52
8.1.2.1 C57BL/6 Maus	52
8.1.2.2 Modell der Rückenhautkammerpräparation	53
8.1.2.3 Narkose	54
8.1.2.4 Intravitalmikroskopische Thromboseinduktion	55
8.1.3 Subaquale Schwanzvenen-Blutungszeit	57
8.1.4 Durchflusszytometrie	57
8.1.5 Biotin Switch Assay	58
8.2 Diskussion der Ergebnisse	58
9 Schlussfolgerung	66
10 Literaturverzeichnis	68
11 Anhang	84
12 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	86
12.1 Abbildungen	86
12.2 Tabellen	86
13 Danksagung	87
14 Eidesstattliche Erklärung	89
15 Lebenslauf	90
16 Thesen zur Dissertation	94

**1 Zusammenfassung**

**Hintergrund:** Das Gas Hydrogensulfid (H<sub>2</sub>S) ist als endogener, pleiotroper Mediator verschiedener Organismen bekannt. Als gasförmiger Transmitter beeinflusst H<sub>2</sub>S dosisabhängig Entzündungsreaktionen, ist kardio- und neuroprotektiv, und hat neuromodulatorische Eigenschaften im Zentralnervensystem.

**Zielstellung:** Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss des H<sub>2</sub>S Donors GYY4137 (GYY) auf die Adhäsionsmolekülexpression und die Protein S-Sulfhydrierung humaner Thrombozyten *in vitro* sowie auf die Kinetik der mikrovaskulären Thrombogenese *in vivo*.

**Material und Methodik:** Humane Thrombozyten wurden im ruhenden Zustand, nach Stimulation durch Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid, und nach Stimulation und zusätzlicher Exposition mit 1, 5 oder 10 mM GYY durchflusszytometrisch auf die Expression von P-Selektin, GP<sub>Ib</sub> und GP<sub>I**II**a</sub>, sowie auf die Bindung von Fibrinogen untersucht. Die Analyse der Protein S-Sulfhydrierung erfolgte unter Verwendung des Biotin Switch Assay an humanen Thrombozyten, die ebenfalls mit 1, 5 oder 10 mM GYY behandelt waren. Der Einfluss von GYY bzw. der Trägersubstanz DMSO auf die Thrombogenese wurde *in vivo* in Venolen der Rückenhautkammerpräparation im Modell der phototoxischen Thromboseinduktion untersucht. Weiterhin wurde ein anti-P-Selektin Antikörper appliziert, um den Einfluss der Blockade von P-Selektin auf die Thrombusbildung zu evaluieren. Nach der Thromboseinduktion erfolgte die Messung der subaqualen Schwanzvenen-Blutungszeit und die retrobulbäre Blutentnahme zur Bestimmung der plasmatischen P-Selektin Konzentration.

**Ergebnisse:** Die Exposition humaner Thrombozyten mit GYY reduzierte dosisabhängig die Expression aller untersuchten Adhäsionsmoleküle und steigerte signifikant die S-Sulfhydrierung thrombozytärer Proteine. *In vivo* prolongierte die Applikation von GYY gegenüber DMSO sowohl die venuläre Thrombogenese, als auch die Schwanzvenen-Blutungszeit. Weiterhin führte GYY zur Reduktion der plasmatischen Konzentration von

löslichem P-Selektin. Die Behandlung mit anti-P-Selektin Antikörper verzögerte vergleichbar zu GYY die venuläre Thombogenese in DMSO-behandelten Tieren.

**Schlussfolgerung:** Die Behandlung mit dem H<sub>2</sub>S Donor GYY wirkt anti-thrombogen und scheint die Thrombogenese durch Reduktion der thrombozytären Aktivität und Modulation der Expression von Adhäsionsmolekülen zu beeinflussen.



## 2 Abstract

**Background:** The gaseous transmitter hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is known as an endogenous, pleiotropic mediator. H<sub>2</sub>S dose dependently affects inflammatory reactions, acts cardio- and neuroprotective and is known as a neuromodulator in the central nervous system.

**Objective:** This thesis evaluates the effect of the H<sub>2</sub>S donor GYY4137 (GYY) on adhesion molecule expression and protein S-sulfhydration of platelets *in vitro* and on kinetics of microvascular thrombus formation *in vivo*.

**Materials and Methods:** We studied the expression of P-selectin, GP<sub>Ib</sub> and GP<sub>IIb-IIIa</sub> as well as the fibrinogen binding in human platelets by means of flow cytometry. Therefore, platelets were analysed under resting conditions, after activation with thrombin receptor activating peptide (TRAP) and after TRAP activation and concomitant exposure to 1, 5 or 10 mM GYY. Biotin switch assay served for analysis of S-sulfhydration of GYY-exposed platelet proteins. In the dorsal skinfold chamber model we assessed the effect of GYY and its vehicle DMSO in either the presence or the absence of an anti-P-selectin antibody on light/dye-induced venular thrombosis formation and on tail-vein bleeding time in C57BL/6 mice. The plasma concentrations of soluble P-selectin were measured in GYY- or DMSO-treated animals.

**Results:** Platelet exposure of GYY increased the S-sulfhydration of platelet proteins and dose-dependently reduced the expression of all adhesion molecules studied, indicating reduced platelet activity upon GYY exposure. *In vivo*, GYY treatment caused a prolongation of venular thrombus formation and of tail-vein bleeding time compared to DMSO-treated animals. In addition, the anti-P-selectin antibody prolonged venular thrombosis formation in DMSO-exposed animals as observed upon only GYY exposure. Further, plasma concentrations of soluble P-selectin were found significantly lower in GYY- than in DMSO-treated animals.

**Conclusions:** H<sub>2</sub>S acts anti-thrombotic and seems to regulate thrombogenesis by interference with platelet activation and adhesion molecule expression.

## 3 Glossar

3-MST	3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of Variance
Ca <sup>2+</sup>	Calziumionen
CBS	Cystathionin $\beta$ -Synthase
CSE	Cystathionin $\gamma$ -Lyase
DAO	D-Aminooxidase
F	Gerinnungsfaktor
g	Gramm
GP <sub>Ib</sub>	Glykoprotein Ib
GP <sub>IIb-IIIa</sub>	Glykoprotein IIb-IIIa
GYG	GYG4137
H <sub>2</sub> S	Hydrogensulfid
ip	Intraperitoneal
iv	Intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
M.	Musculus
mfs	Mittlerer Fluoreszenzshift
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts

Tab.	Tabelle
TF	Tissue Factor
TRAP	Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid
V.	Vena
vs	versus
vWF	von Willebrand Faktor
ZNS	Zentralnervensystem
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

**4 Einleitung****4.1 Physiologie der Thrombogenese****4.1.1 Klinische Bedeutung der Thrombose**

In den vergangenen Jahren wurden in der Medizin viele Fortschritte in der Prävention, Diagnostik und Therapie von Thrombosen erreicht. Trotzdem stellen thrombotische Gefäßverschlüsse und ihre Folgen aktuell noch immer ein eminentes Problem in der Chirurgie dar. Bei jedem operativen Eingriff kommt es zur Verletzung von Zellen und somit zur Freisetzung von Tissue Factor (TF), Adenosindiphosphat (ADP) und Thrombin, welche wesentlich zur Aktivierung der Gerinnungskaskade beitragen (Mann et al. 2003, Fisher 2011). Die vaskuläre Thrombose gefolgt vom Verlust von Lappenplastiken stellt die meistgefürchtetste Komplikation beim freien mikrovaskulären Gewebstransfer dar (Hidalgo et al. 1998, Khouri et al. 1998, Chang et al. 2011). Venöse Thrombosen treten in bis zu 74% der thrombotischen Gefäßverschlüsse in Lappenplastiken auf und sind damit häufiger als arterielle Thrombosen (Bui et al. 2007). Durch Torsion und Abknicken von Gefäßen bei extremer Lagerung von Gliedmaßen sowie beim Präparieren und Transplantieren von Lappenplastiken kommt es weiterhin zur Freilegung von subendothelialen Kollagenstrukturen, die einen zusätzlichen pro-thrombogenen Stimulus darstellen (Khouri 1992). Ein Ungleichgewicht im komplexen System der pro- und anti-thrombogenen Wechselwirkungen zwischen Endothel, Thrombozyten, plasmatischer Gerinnung und fibrinolytischem System kann somit zur Thrombose führen.

Dabei werden makro- von mikrovaskulären Thrombosen unterschieden. Makrovaskuläre Thrombosen treten postoperativ in Form von tiefen Beinvenenthrombosen, häufig nach Knie- und Hüftgelenksendoprothetik (Geerts et al. 2008, Kwong 2011) sowie im Bereich von Gefäßanastomosen in Erscheinung und sind allgemein durch eine deutliche klinische Symptomatik gekennzeichnet. Mikrovaskuläre Thrombosen entstehen in Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Sie manifestieren sich häufig nach Organtransplantationen oder Lappenplastiken, führen zu Funktionsstörungen und im Verlauf zur Nekrose des betroffenen

Gewebes. Im Gegensatz zu makrovaskulären Thrombosen ist die Entwicklung von mikrovaskulären Thrombosen akut bis schleichend, sodass die Thrombosierung bei klinischem Korrelat oft schon sehr fortgeschritten ist und irreversible Schäden verursacht hat.

Aus diesem Grund ist die primäre Prävention von Thrombosen von großer Bedeutung. Sie kann sowohl medikamentös, z. B. durch unfraktioniertes Heparin, als auch mechanisch in Form von Kompressionsstrümpfen und Physiotherapie erfolgen. Bei klinisch manifester Thrombose stehen drei allgemeine Therapieansätze zur Verfügung. Die Therapie kann entweder konservativ mit Medikamenten, operativ in Form von Thromboembolktomie oder Bypass und endovaskulär mittels enzymatischer Fibrinolyse erfolgen. Die große Inzidenz venöser Thromboembolien von bis zu 100 auf 100.000 Personen pro Jahr (White 2003) zeigt jedoch, dass trotz der vielseitigen Präventions- und Therapiemöglichkeiten weitere Forschung auf dem Gebiet der Thrombogenese stattfinden muss, um der Erkrankung effektiver vorbeugen und begegnen zu können. Dabei setzen sowohl Prophylaxe als auch Therapie exakte Kenntnis über die Physiologie und Pathophysiologie der Thromboseentstehung voraus.

#### **4.1.2 Physiologie der Hämostase**

Hämostase bezeichnet die Bildung eines Thrombus zur Blutstillung und somit zur Reduktion von Blutverlusten bei Schädigung der Gefäßintegrität (Ruggeri 2006, Subramaniam et al. 1996). Unter physiologischen Bedingungen erfolgt aufgrund des anti-thrombogenen und anti-inflammatorischen Phänotyps der Endothelzellen keine Gerinnung des Blutes (Becker et al. 2000, Spronk et al. 2003, Spronk et al. 2004, Eichhorn et al. 2002, Weiss & Turitto 1979). Durch pro-thrombogene Stimuli, wie einem Trauma der Gefäßwand, durch Ischämie/Reperfusion oder Arteriosklerose kommt es jedoch, wie durch die Virchowsche Trias 1985 beschrieben, zur Thrombusbildung (Aird 2003). Als die drei wesentlichen Auslöser einer Thrombose benannte Virchow reduzierte Blutflussgeschwindigkeit, veränderte Zusammensetzung des Blutes und Gefäßwandschäden

(Bagot & Arya 2008). Dabei wird die zur Thrombusbildung führende Hämostase in eine primäre und eine sekundäre Phase unterteilt.

#### **4.1.2.1 Primäre Hämostase**

Die Phase der primären Hämostase beginnt unmittelbar nach dem prothrombogenen Ereignis mit dem Ziel der initialen Bildung eines Thrombus zur schnellen Blutstillung. Dabei spielen Thrombozyten und ihre Anlagerung an Endothelzellen die wichtigste Rolle (Shebuski & Kilgore 2002, Furie et al. 2001).

Thrombozyten sind die kleinsten zellulären Blutbestandteile. Sie werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet und in den Blutkreislauf ausgeschwemmt (Ruggeri 2002). Etwa ein Drittel der Thrombozyten ist in der Milz gespeichert. Sie haben eine Lebensdauer von sieben bis zehn Tagen und werden im endoplasmatischen Retikulum von Leber und Milz abgebaut. Thrombozyten haben keinen Zellkern und können somit keine eigene Proteinbiosynthese betreiben (Ruggeri et al. 2002). Sie sind jedoch in der Lage, sich zu bewegen und ihre Form zu verändern (Frenette et al. 1995, Massberg et al. 1998).

##### **4.1.2.1.1 Morphologie der Thrombozyten**

Thrombozyten werden in vier morphologische Bereiche mit spezifischen Funktionen unterteilt: die periphere und strukturelle Zone, die Zone der Organellen sowie die Zone der Membransysteme. Als periphere Zone gilt dabei die Zellmembran mit ihrer Glykokalyx und integrierten Membranproteinen, die zum Teil eine Rezeptorfunktion besitzen. Die für die Formgebung und Formveränderung verantwortliche strukturelle Zone besteht aus Strukturproteinen des Zytoskeletts, welches primär aus Aktin und dessen Bindungsprotein aufgebaut ist. Die Zone der Organellen enthält neben Mitochondrien und Glykogenspeichern die für die Thrombozytenfunktion wesentlichen Granula in Form von Lysosomen, elektronendichte Granula und alpha Granula.

Elektronendichte Granula, so genannte „dense bodies“, enthalten unter anderem Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Phosphat, Serotonin, Adenin- und Guaninnukleotide. Alpha Granula stellen den größten Anteil der thrombozytären Granula dar und enthalten Proteine zur Chemotaxis, Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen sowie zur Beeinflussung inflammatorischer und hämostatischer Prozesse.

Die Zone der Membransysteme besteht aus dem offenen kanalikulären System mit weitreichenden gewundenen Kanälen, die mit der Zellmembran oder durch Poren mit dem Extrazellularraum verbunden sind (White & Clawson 1980 und 1981) und dem dichten tubulären System, welches von Megakaryozyten abstammt und als Hauptspeicherort für  $\text{Ca}^{2+}$  eine zentrale Rolle für die Aktivierung und Formveränderung der Thrombozyten einnimmt.

#### **4.1.2.1.2 Funktion der Thrombozyten**

Die primäre Funktion der Thrombozyten ist der normale Ablauf der Blutstillung, also die Bildung eines primären Hämostasethrombus und die Katalyse der Fibrinbildung (Shattil & Newman 2004, Wagner & Burger 2003). Weiterhin tragen Thrombozyten wesentlich zur Wundheilung bei (Sun et al. 2010, Pietramaggiori et al. 2010, De Rossi et al. 2009). Durch die Bildung von Sauerstoffradikalen (Forde & Fitzgerald 1997, Leo et al. 1997, Massberg et al. 1998) und die Freisetzung chemotaktischer Faktoren aus alpha Granula fördern sie die Rekrutierung von Monozyten sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (Massberg et al. 2003) und helfen somit bei der Bekämpfung von Infektionen (Hirsch 1960, Bout et al. 1986).

#### **4.1.2.1.3 Thrombozytäre Adhäsionsmoleküle**

Für die Kontaktaufnahme mit der Gefäßwandläsion und anderen zirkulierenden Blutbestandteilen spielen thrombozytäre Adhäsionsmoleküle eine wichtige

Rolle. Wesentliche Rezeptorfamilien sind dabei Selektine und Integrine auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten.

#### **4.1.2.1.3.1 Selektine**

Selektine sind Glykoproteine der C-Typ Lectin Familie (Berman et al. 1986) und vermitteln heterotypische Interaktionen von Zellen (McEver 1992, Merten & Thiagarajan 2004, Zimmerman et al. 1992). Sie bestehen aus einer extrazellulären Lektin Domäne mit der benachbarten epidermal growth factor-like Domäne, einer Komplementbindungsdomäne sowie einer transmembranen und zytoplasmatischen Domäne. Man unterscheidet drei Rezeptorgruppen nach ihrer Lokalisation und Funktion: L-, P- und E-Selektin. L-Selektin ist primär auf Leukozyten lokalisiert und ermöglicht die P- und E-Selektin-unabhängige Migration von TH 1 Zellen (Hirata et al. 2002) und neutrophilen Granulozyten (Bosse & Vestweber 1994). P-Selektin wird von Thrombozyten und Endothelzellen, E-Selektin primär nur von Endothelzellen exprimiert. Auf aktiviertem Endothel erlauben die beiden Selektine das Binden und Rollen von Leukozyten auf hochendothelialen Venolen in Lymphknoten (Hirata et al. 2002) und haben damit eine überlappende Funktion in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (Lenter et al. 1994, Labow et al. 1994).

Für die Thrombogenese hat P-Selektin die größte Bedeutung. Es beeinflusst durch seine Lectin-Domäne sowohl Größe und Stabilität des Thrombus als auch vaskuläre Reparaturvorgänge (Merten & Thiagarajan 2000 & 2004), ermöglicht Interaktionen zwischen Thrombozyten, Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten (Larsen et al. 1989, Theilmeier et al. 1999) und rekrutiert so Leukozyten als inflammatorische Komponente in den Thrombus (Palabrica et al. 1992, Becker et al. 1996, Henn et al. 1998). P-Selektin ist in alpha Granula (Stenberg et al. 1985) und Weibel-Pallade Körperchen (Van Mourik et al. 2002) ruhender Thrombozyten bzw. Endothelzellen lokalisiert und kann durch Fusion der Vesikel mit Zellmembranen schnell freigesetzt und extrazellulär exprimiert werden (Furie & Furie 2004, McEver et al. 1989, Merten & Thiagarajan 2000 & 2004). Membrangebundenes



P-Selektin kann durch alternatives Spleißen abgelöst werden, was zur Bildung von löslichem (s) P-Selektin führt (Johnston et al. 1990). Hauptligand ist neben dem Glykoprotein Ib (GP<sub>Ib</sub>, Romo et al. 1999) der P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) auf Leukozyten und Thrombozyten (Varki 1994, Norgard et al. 1993, Frenette et al. 2000, Borges et al. 1997).

#### 4.1.2.1.3.2 Integrine

Integrine sind ubiquitäre Adhäsionsmoleküle zur Steigerung von zellulärer Differenzierung, Entwicklung, Migration, Proliferation und Adhäsion (Shattil et al. 1998). Sie haben dabei eine zentrale Rolle in der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten während der primären Hämostase (Nieswandt et al. 2001, Phillips et al. 1991, Shattil et al. 1998). Integrine, wie z. B. der Ca<sup>2+</sup>-abhängige Glykoproteinrezeptor IIb-IIIa (GP<sub>IIb-IIIa</sub>, Kunicki et al. 1981), kommen als nicht kovalent verbundene heterodimere Komplexe vor (Ruoslahti & Pierschbacher 1987), die klassischerweise aus alpha und beta Untereinheiten aufgebaut sind. Für die Hämostase sind die Rezeptoren GP<sub>Ib</sub> und GP<sub>IIb-IIIa</sub> von entscheidender Bedeutung.

#### 4.1.2.1.3.3 GP<sub>Ib</sub>

Der Glykoproteinrezeptor besteht aus den vier Untereinheiten GP<sub>Ib-alpha</sub> und GP<sub>Ib-beta</sub>, GP<sub>IX</sub> sowie GP<sub>V</sub>, die im stöchiometrischen Verhältnis 2:4:1:2 vorliegen (Luo et al. 2007). Der Hauptligand ist der von Willebrand Faktor (vWF), der sowohl im Plasma zirkulierend als auch in alpha Granula und Weibel-Pallade Körperchen gespeichert vorkommt (Ruggeri 1999 & 2007). Der vWF ändert nach Gefäßschädigung und darauf folgenden Kontakt mit freigelegten subendothelialen Kollagenstrukturen seine Konformation, wodurch eine Bindung an die alpha Region des GP<sub>Ib</sub> Rezeptors ermöglicht wird (Ulrichs et al. 2006, Lisman et al. 2006, Kumar et al. 2003). Diese Rezeptor-Ligand-Interaktion erlaubt das Rollen von Thrombozyten im Bereich vaskulärer Läsionen und ist aufgrund der großen Stabilität besonders bei hohen Wandscherraten essentiell für die thrombozytäre Adhäsion

(Nieswandt et al. 2001). GP<sub>Ib</sub> bindet weiterhin P-Selektin, Thrombin, hochmolekulares Kininogen und die Gerinnungsfaktoren (F) FXI und FXII (Nuyttens et al. 2011) und fördert somit wesentlich die Plättchenaggregation und Thrombusbildung (van Gils et al. 2009).

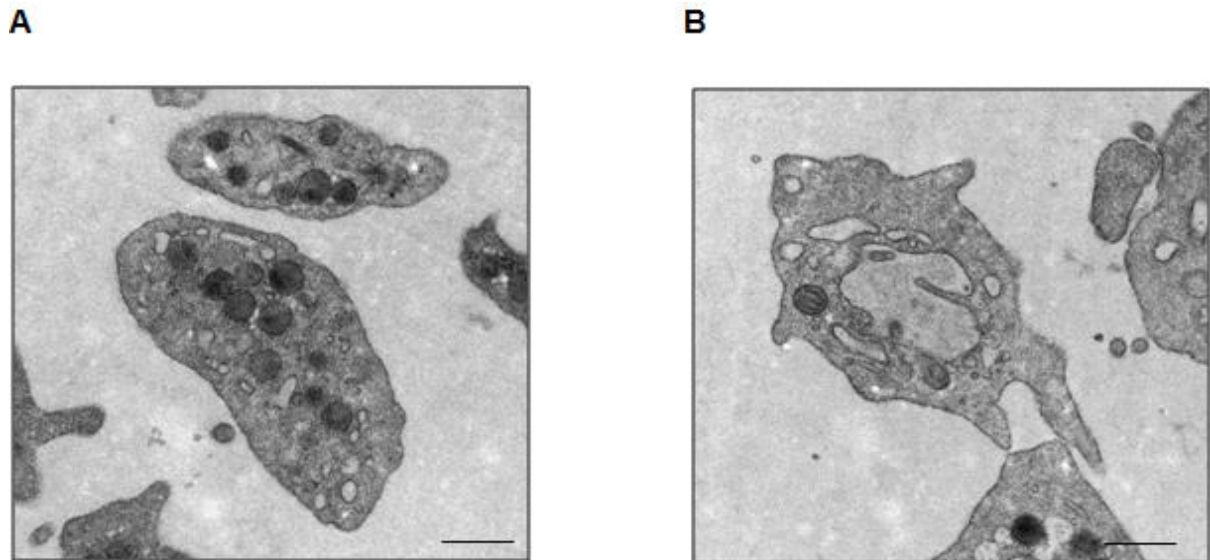
#### 4.1.2.1.3.4 GP<sub>I**IIb-IIIa**</sub>

Es handelt sich mit 80.000 Rezeptoren pro Thrombozyt um das häufigste thrombozytäre Adhäsionsmolekül, das sowohl auf der Zellmembran als auch auf alpha Granula und dem kanalikulären System lokalisiert ist (Phillips et al. 1988, Phillips et al. 1991, Plow et al. 1992, Shattil et al. 1998, Wagner et al. 1996). Die Aktivierung der Thrombozyten ist mit einer Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Konformationsänderung des Rezeptors von einem niedrigaffinen zu einem hochaffinen Zustand verbunden (Shattil 1995, Wagner et al. 1996, Woodside et al. 2001). Dies erlaubt die Bindung des Hauptliganden Fibrinogen über die im hochaffinen Zustand exponierte Bindungsstelle (Coller 1986) und ermöglicht somit die Aggregation von Thrombozyten (Fitzgerald et al. 1989, Hawiger 1995). GP<sub>I**IIb-IIIa**</sub> bindet neben Fibrinogen als weitere Liganden auch Fibronectin, Vitronectin, Kollagen und vWF (DeMarco et al. 1986). Die Bindung wird dabei durch die Tripeptidsequenz RGD (Pytela et al. 1986) in den alpha Ketten der Liganden vermittelt (Ruoslathi et al. 1987).

#### 4.1.2.1.4 Thrombozytenaktivierung

Die Aktivierung von Thrombozyten ist der erste Schritt zur Thrombogenese. Innerhalb von Sekunden nach Kontakt mit subendotheliale Kollagen (Savage et al. 2001), vWF, Thrombin, ADP, Adrenalin, PAF, PAI-1, endotheliale P-Selektin, TF oder Thromboxan A<sub>2</sub> kommt es zur lokalen Zellaktivierung (Clementson & Clementson 2001, Zimmerman et al. 1990, von Mourik et al. 2002, Ruggeri 2002). Der Zustand von Thrombozyten ist an ihrer Form zu erkennen (Abb. 1). Ruhende Thrombozyten sind diskoid mit einer Fläche von ca. 8 µm<sup>2</sup>. Mit der Aktivierung ist eine Formveränderung durch Ausbildung von Pseudopodien aufgrund von Aktinpolymerisierung und Zytoskelett-

Reorganisation sowie eine Vergrößerung der Oberfläche auf ca.  $13 \mu\text{m}^2$  verbunden, sodass aktivierte Thrombozyten auch als Eosinosphärozyten bezeichnet werden. Die Oberflächenvergrößerung beruht zum Teil auf der Fusion von Granula mit der Zellmembran und steigert die Wahrscheinlichkeit von Interaktionen mit zellulären und azellulären Blutbestandteilen.



*Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ruhenden (A) und mit Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid stimulierten humanen Thrombozyten (B). Die Aufnahmen entstammen der eigenen Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock. Der Maßstab entspricht 500 nm.*

Die Aktivierung beinhaltet weiterhin metabolische und biochemische Prozesse, die zur Aktivierung von Oberflächenrezeptoren und einer Neuorientierung von Phospholipiden in der Zellmembran führen. Bei diesen Vorgängen spielen  $\text{Ca}^{2+}$  eine bedeutende Rolle. Der intrazelluläre Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration induziert die Formveränderung, steigert die Bildung von Thromboxan  $\text{A}_2$  und fördert die Fusion von Granula mit der Zellmembran und dem kanalikulären System (Kaibuchi et al. 1983, Watson et al. 1988, Yamanishi et al. 1983). Auf diese Weise werden zusätzliche Adhäsionsmoleküle, wie P-Selektin und  $\text{GP}_{\text{Ib-IIIa}}$ , die zur Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten beitragen, extrazellulär exprimiert.

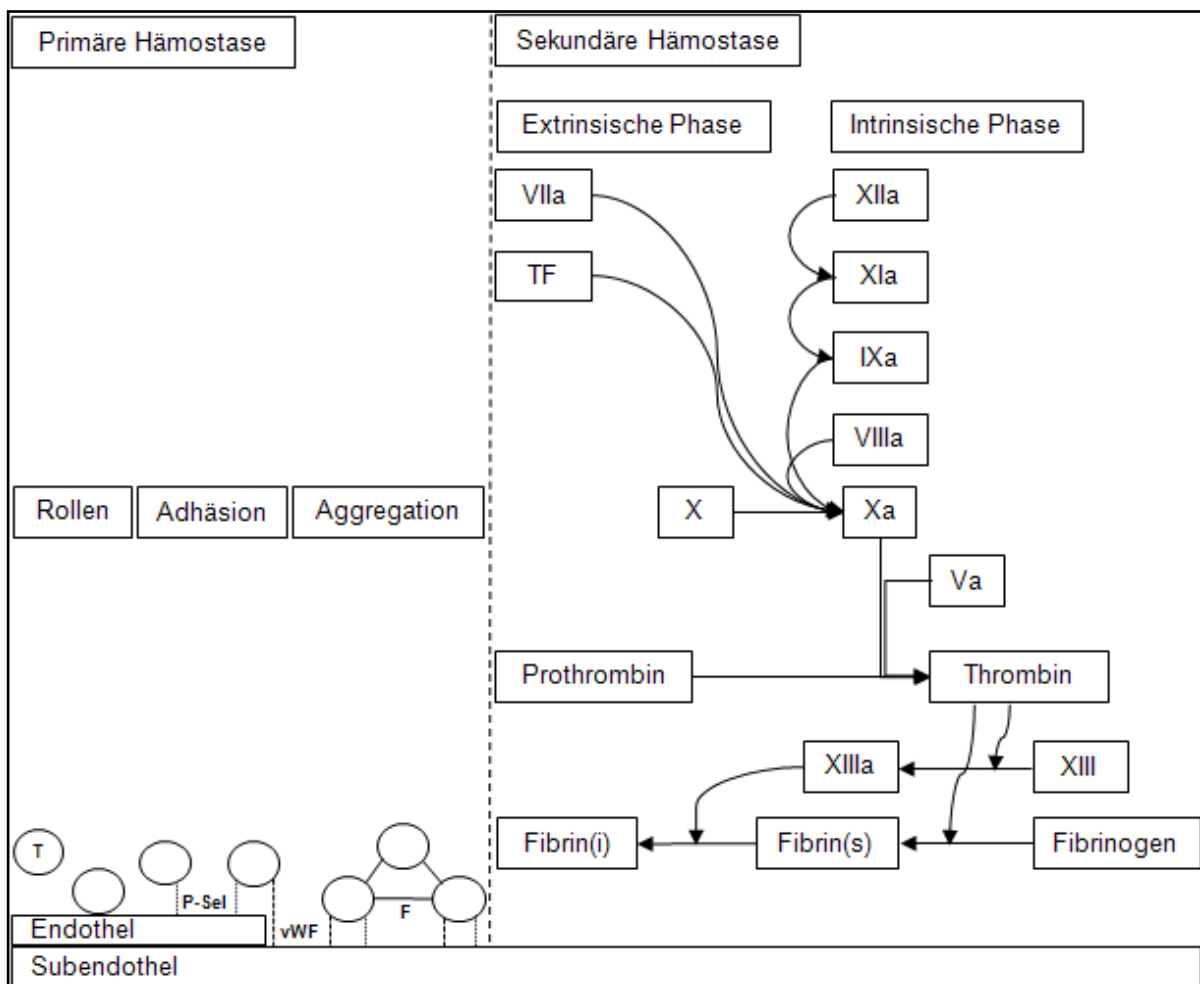
#### 4.1.2.1.5 Thrombozytenadhäsion und -aggregation

Einhergehend mit der Aktivierung erfolgen Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten als wesentliche Schritte der primären Hämostase. Die Adhäsion erfolgt innerhalb von Sekunden nach der Gefäßläsion durch Kontakt mit Kollagenen, Proteoglykanen, Entactin, Laminin, Fibronectin, vWF und Fibulin (Clemetson & Clemetson 2001, Bolhuis et al. 1979, DeGroot et al. 1988, McCarty et al. 2004, Ruggeri 2006, Savage et al. 1998). Weiterhin führt der Endothelschaden zur Freisetzung von TF, der zusätzlich zur thrombozytären Adhäsion und späteren Fibrinakkumulation im Thrombus beiträgt (Falati et al. 2002, Eilertsen & Østerud 2004). Der initiale Kontakt zwischen Thrombozyten und Gefäßwand beinhaltet drei wesentliche Mechanismen: Das Rollen aktivierter Thrombozyten auf dem Endothel durch P-Selektin sowie Rollen und stabile Adhäsion an subendotheliale Strukturen durch  $GP_{Ib}$ -vWF- und  $GP_{Ia-IIa}$ -Kollagen-Interaktion (Schulte et al. 2001, Ruggeri 2002 & 2006, Alberio & Dale 1999). Der so initial gebildete Thrombus ist sehr fragil und kann durch den Blutstrom leicht abgeschwemmt werden, sodass eine Stabilisierung durch Aggregation mit weiteren Thrombozyten erfolgen muss.

Die Aggregation von Thrombozyten erfolgt durch die Ausbildung von Fibrinogenbrücken zwischen Thrombozyten. Während der primären, reversiblen Aggregation werden Thrombozyten durch P-Selektin,  $GP_{Ib}$  (Kulkarni et al. 2000) und die Interaktion von Fibrinogen mit der niedrig affinen  $GP_{Iib-IIia}$  Konformation miteinander verbunden. Die sekundäre, irreversible Aggregation erfolgt verzögert durch Freisetzung von  $Ca^{2+}$  und Fibrinogen aus intrazellulären Granula (Scarborough et al. 1999), wodurch  $GP_{Iib-IIia}$  seine hochaffine Konformation einnimmt (Ruggeri 2002, Scarborough et al. 1999) und Fibrinogen dauerhaft bindet (Phillips et al. 1988, Phillips et al. 1991, Ruggeri 2002). Durch diese Mechanismen entsteht während der primären Hämostase ein wandständiger Thrombus, der die Gefäßläsion abdichtet und durch die Vorgänge der sekundären Hämostase verstärkt wird.

4.1.2.2 Sekundäre Hämostase

Die komplexe enzymatische Gerinnungskaskade der sekundären Hämostase wird in eine intrinsische und extrinsische Phase eingeteilt, die gemeinsam zur Bildung von Thrombin bzw. Fibrin und somit zur Konsolidierung des primären Thrombus führen (Abb. 2, Speckmann et al. 2008). Während der intrinsischen Phase kommt es zur Kontaktaktivierung von plasmatischen Gerinnungsfaktoren durch Kontakt mit Präkallikrein, Kallikrein und hochmolekularem Kininogen. Diese binden an negative Ladungen der subendothelialen Matrix und aktivierter Thrombozytenoberflächen und aktivieren FXII. Aktivierter FXII aktiviert durch proteolytische Spaltung FXI und dieser wiederum FIX.



*Abb. 2: Schematische Darstellung der Hämostase. Während der primären Hämostase erfolgt der initiale Kontakt von Thrombozyten (T) mit dem Endothel und subendothelialen Strukturen im Bereich des Endothelschadens. Die Bindung wird durch das thrombozytäre Adhäsionsmolekül P-Selektin (P-Sel) und die Interaktion des von Willebrand Faktors (vWF) mit subendotheliale Kollagen und Thrombozyten vermittelt. Nach initialem Rollen und nachfolgender Adhäsion kommt es schließlich zur Aggregationsbildung mit Stabilisierung des primären Thrombus durch Fibrinogenbrücken (F). Gleichzeitig findet während der sekundären Hämostase die plasmatische Gerinnung in einer extrinsischen und intrinsischen Phase statt. Beide Phasen führen über proteolytische Spaltung und Aktivierung von Gerinnungsfaktoren zur Aktivierung von Faktor X (X). Dieser ist essentiell für die Bildung von Thrombin, welches lösliches Fibrin (s) aus Fibrinogen abspaltet und Faktor XIII (XIII) aktiviert. Dieser aktivierte Faktor verfestigt Fibrinogen (i) und bewirkt so die finale Konsolidierung des Thrombus.*

Es kommt zur Bildung des endogenen Tenasekomplexes aus den aktivierten FIX und FVIII, Phospholipiden und  $\text{Ca}^{2+}$ .

Die extrinsische Phase wird im Gegensatz zur intrinsischen Phase wesentlich durch Gefäßläsionen initiiert. TF, ein integrales Membranprotein in der Adventita sowie in perivaskulären und epithelialen Zellen (Day et al. 2005, Engelmann 2006, Giesen & Nemerson 2000), kommt dabei in Kontakt mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren (Eilertsen & Osterud 2004, Engelmann 2006, Parry et al. 1998, Pawlinski et al. 2004), wobei es eine besondere Affinität zur aktivierten Serinprotease FVII hat (DeIConte et al. 2005). Resultierend formiert sich der exogene Tenasekomplex aus TF, aktiviertem FVII, Phospholipiden und  $\text{Ca}^{2+}$ .

Sowohl der endogene als auch der exogene Tenasekomplex aktivieren FX, wodurch der gemeinsame Abschnitt der endogenen und exogenen Phase der sekundären Hämostase beginnt. Aktivierter FX und FV bilden zusammen mit Phospholipiden und  $\text{Ca}^{2+}$  den Prothrombinaktivator Komplex, das Thromboplastin, welches Prothrombin in Thrombin spaltet. Thrombin führt wiederum zur Bildung von löslichem Fibrin aus Fibrinogen (Sidelmann et al. 2000) und aktiviert FXIII, eine Transglutaminase, welche die Quervernetzung und somit Stabilisation des Fibrinmaschenwerks ermöglicht und weitere Thrombozyten aktiviert. Darüber hinaus führt Thrombin zur Freisetzung von vWF, P-Selektin sowie von Plättchen-aktivierendem Faktor aus Endothelzellen und fördert so die Rekrutierung weiterer Thrombozyten (Bogatcheva et al. 2002).

Somit ist das Ziel der Hämostase, nämlich die Bildung eines stabilen Thrombus zur Blutstillung, erreicht (Speckmann et al. 2008).

## 4.2 Hydrogensulfid

Hydrogensulfid ( $H_2S$ ), auch als Schwefelwasserstoff bezeichnet, ist seit Jahrhunderten als farbloses, brennbares, giftiges, übelriechendes Gas bekannt, das in der Natur von verschiedenen Tier- und Bakterienarten gebildet wird. In den letzten Jahrzehnten wurde jedoch entdeckt, dass  $H_2S$  physiologisch von Säugetieren gebildet wird und Einfluss auf zahlreiche Organsysteme hat. Es wurde nach Kohlenstoffmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO) als dritter endogener volatiler Transmitter beschrieben und ist aktuell Gegenstand zahlreicher Studien.  $H_2S$  besteht aus zwei Wasserstoffatomen und einem Schwefelatom. Aufgrund seines lipophilen Charakters diffundiert  $H_2S$  ohne spezifische Transporter durch Biomembranen, sodass eine intrazelluläre Speicherung in Vesikeln nicht möglich ist (Mathai et al. 2009) und eine kontinuierliche enzymatische Neubildung erfolgen muss.

### 4.2.1 Metabolismus

An der Synthese von  $H_2S$  sind drei Enzymsysteme beteiligt. Die Cystathionin  $\beta$ -Synthase (CBS) und Cystathionin  $\gamma$ -Lyase (CSE) als primäre  $H_2S$ -bildende Enzyme (Stipanuk & Beck 1982, Kimura et al. 2005, Moore et al. 2003) und die erst vor wenigen Jahren beschriebene 3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase (3-MST, Shibuya et al. 2009, Singh & Banerjee 2011, Abb. 3). Unterschiede zwischen den Enzymen bestehen sowohl in der gewebespezifischen Expression als auch in der Katalyse verschiedener Reaktionen zur Bildung von  $H_2S$ .

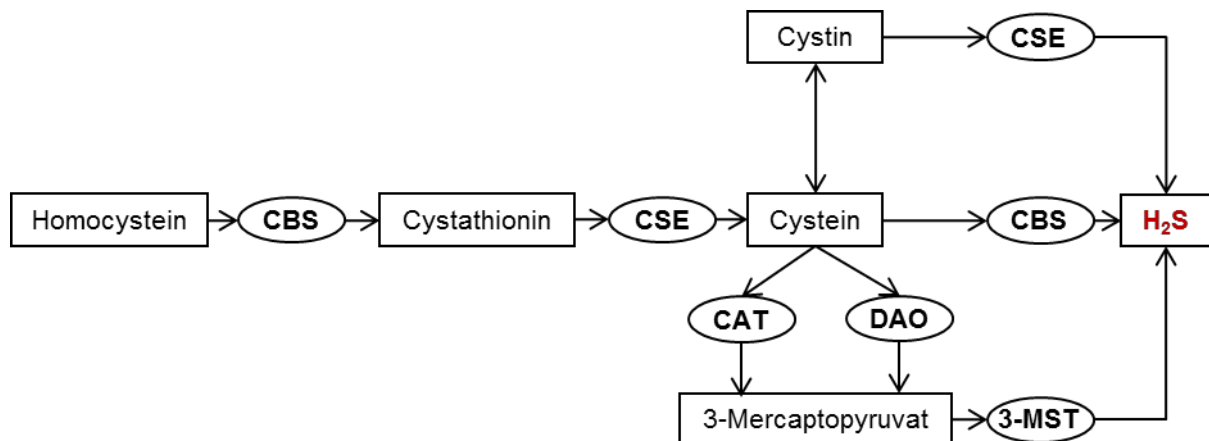


Abb. 3: Schematische Darstellung der Hydrogensulfid Biosynthese. Die Cystathionin  $\beta$ -Synthase (CBS) katalysiert sowohl die Bildung von Cystathionin aus Homocystein als auch die Synthese von Hydrogensulfid ( $H_2S$ ) aus Cystein. Cystein stellt die Hauptquelle für die  $H_2S$  Synthese dar und wird enzymatisch durch CSE aus Cystathionin gebildet. Die CSE ist weiterhin direkt an der Synthese von  $H_2S$  aus Cystin beteiligt. Das dritte an der Bildung von  $H_2S$  beteiligte Enzym, die 3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase (3-MST), benötigt 3-Mercaptopyruvat als Substrat, welches zunächst durch die Cystein Aminotransferase (CAT) aus L-Cystein bzw. durch die D-Aminooxidase (DAO) aus D-Cystein synthetisiert wird.

#### 4.2.1.1 Cystathionin $\beta$ -Synthase

Die CBS bildet  $H_2S$  aus Cystein und Homocystein (Chen et al. 2004, Singh et al. 2009). Damit nimmt es eine wesentliche Funktion in der Regulation des Homocysteinhaushalts ein. Dies wird deutlich am Krankheitsbild der Homocysteinämie, welches aufgrund reduzierter CBS Aktivität mit einer Ansammlung von Homocystein und einer Reduktion der  $H_2S$  Konzentration verbunden ist (Beard & Bearden 2011). S-Adenosylmethionin (SAM) aktiviert allosterisch die CBS und steigert deren zelluläre Expression (Finkelstein et al. 1975, Abe & Kimura 1996, Banerjee & Zou 2005). Die CBS kommt primär im Zentralnervensystem (ZNS) vor und ist besonders stark im Hippocampus exprimiert (Abe & Kimura 1996, Whiteman & Moore 2009, Njie-Mbye et al. 2010). Darüber hinaus konnte sie auch in Leber und Niere nachgewiesen werden (Ishii et al. 2004).



#### 4.2.1.2 Cystathionin $\gamma$ -Lyase

Die CSE ist Pyridoxalphosphat-abhängig und katalysiert die Bildung von  $\text{H}_2\text{S}$ , Pyruvat und Ammoniak aus Cystin (Stipanuk & Beck 1982, Singh & Banerjee 2011, Singh et al. 2009). CSE stellt die Hauptquelle für  $\text{H}_2\text{S}$  in peripheren Geweben von Säugetieren dar und wird von Neuronen und Endothelzellen (Enokido et al. 2005, Linden et al. 2008, Mancardi et al. 2009) sowie im Plexus myentericus des enterischen Nervensystems exprimiert (Teague et al. 2002, Linden et al. 2008). Darüber hinaus ist CSE auch in Leber und Nieren sowie in Astrozyten des ZNS beschrieben (Ishii et al. 2004, Vitvitsky et al. 2006).

Sowohl CBS als auch CSE werden von Endothelzellen sezerniert und tragen im Blut aktiv zirkulierend zur  $\text{H}_2\text{S}$  Synthese bei (Bearden et al. 2010).

#### 4.2.1.3 3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase

Die 3-MST wurde als drittes  $\text{H}_2\text{S}$ -synthetisierendes Enzym beschrieben und ist bislang nicht so weitreichend untersucht wie die CBS und CSE. 3-MST ist primär in Mitochondrien und Peroxisomen im Cerebellum und den Nieren lokalisiert. Ausgangssubstrat für die  $\text{H}_2\text{S}$  Synthese ist 3-Mercaptopyruvat, welches durch die Cystein Aminotransferase (CAT) aus L-Cystein (Kimura 2011, Li et al. 2009) und durch die D-Aminooxidase (DAO) aus D-Cystein (Shibuya et al. 2013) gebildet wird.

$\text{H}_2\text{S}$  steht physiologisch mit seiner anionischen Form  $\text{HS}^-$  im Verhältnis 1:4 im Gleichgewicht (Dombkowski et al. 2004). Weiterhin kommt  $\text{H}_2\text{S}$  kovalent, durch ein ungeladenes Schwefelatom, an Proteine gebunden vor. Aus dieser Bindung kann es nur unter alkalischen oder reduzierenden Bedingungen freigesetzt werden. Eine Transmitterfunktion konnte für kovalent gebundenes  $\text{H}_2\text{S}$  aktuell noch nicht eindeutig nachgewiesen werden (Toohey 2011, Paul & Snyder 2012). Der Abbau von  $\text{H}_2\text{S}$  erfolgt durch Sauerstoff-abhängige katabolische Prozesse in Mitochondrien (Vitevitsky et al. 2012).

Die physiologische Konzentration von  $\text{H}_2\text{S}$  im menschlichen Organismus ist noch nicht endgültig definiert. Es sind sowohl Konzentrationen von 34  $\mu\text{M}$  bis 65  $\mu\text{M}$  in

humanem Plasma (Whiteman & Moore 2009) als auch von 50  $\mu\text{M}$  bis 160  $\mu\text{M}$  in menschlichen Gehirnen (Whiteman et al. 2005) beschrieben. Die Werte sind dabei abhängig von der Messmethode, dem untersuchten Gewebe und dem Alter der Probanden. So detektieren viele Techniken, wie auch die Spektrophometrie, nicht nur freies  $\text{H}_2\text{S}$ , sondern auch Hydrogensulfid Anionen ( $\text{HS}^-$ ) und Sulfide ( $\text{S}^{2-}$ ). Aufgrund der unterschiedlichen Messverfahren von  $\text{H}_2\text{S}$  in verschiedenen Kompartimenten und Geweben ist eine große Spannweite der  $\text{H}_2\text{S}$  Konzentrationen beschrieben. Die meisten Daten entstammen dabei tierexperimentellen Versuchen.

#### 4.2.2 Protein S-Sulphydrierung

$\text{H}_2\text{S}$  vermittelt seine Transmitterfunktion wesentlich durch den Prozess der Protein S-Sulphydrierung. Es handelt sich hierbei um eine reversible Form (Krishnan et al. 2011) der post-translationalen Modifikation von Proteinen, welche den gleichen Angriffspunkt wie die durch NO-vermittelte Nitrosylierung hat (Stamler et al. 1992), nämlich die Sulfhydrylgruppe von Cysteinresten. Im Gegensatz zu NO bildet  $\text{H}_2\text{S}$  jedoch Persulfidbrücken (-SSH). Der Vorgang der S-Sulphydrierung ist, wie am Beispiel der 25-50%igen S-Sulphydrierung hepatischer Proteine gezeigt werden konnte, wesentlich häufiger und funktionell bedeutsamer als die Nitrosylierung (Paul & Snyder 2012). Im Vergleich sind nur ca. 1-5% der Proteine nitrosyliert (Mustafa et al. 2009).

#### 4.2.3 Endogene Funktionen

Ausgehend von der Expression der  $\text{H}_2\text{S}$ -bildenden Enzyme in verschiedenen Organsystemen ergeben sich pleiotrope Interaktionsmöglichkeiten für den gasförmigen Transmitter. Pleiotropie bezeichnet aus pharmakologischer Sicht die vielfältigen Wirkungen eines Pharmakons auf verschiedene Zell- und Organsysteme. So senken HMG-CoA-Reduktasehemmer als klassische pleiotrope Substanzen zum einen den Cholesterinspiegel, beeinflussen aber auch Endothelfunktionen, Inflammation und das Gerinnungssystem (Blum

& Shamburek 2009). CpG-Motiv-haltige DNA Sequenzen (CpG ODNs) bakteriellen Ursprungs aktivieren primär das Immunsystem, beeinflussen aber ebenso Angiogenese und fördern die Wundheilung (Yammamoto et al. 2011, Sato et al. 2010, Krieg 2002). Als eine endogene pleiotrope Substanz steigert Erythropoietin die Erythropoese, hemmt den Abbau erythrozytärer Vorläufer, reguliert zelluläre Proliferation und Differenzierung und fördert ebenso die Wundheilung (Sorg et al. 2009, Jelkmann & Wagner 2004). Der pleiotrope Charakter von H<sub>2</sub>S zeigt sich in Analogie anhand der vielseitigen Beeinflussung unterschiedlicher Organsysteme.

#### 4.2.3.1 Herz-Kreislauf-System

H<sub>2</sub>S beeinflusst das Herz-Kreislauf-System auf unterschiedliche Weise (Predmore & Lefer 2011). Es hat ähnlich wie NO die Funktion eines „endothelium-derived relaxing factor“ (Feletou & Vanhoutte 2007, Yang et al. 2008) und reguliert als solcher konsekutiv den Blutdruck. Die Grundlage der Blutdruckregulation ist zum einen die Expression von CSE in Endothelzellen (Yang et al. 2008). So konnte gezeigt werden, dass endotheliale CSE der Aorta, A. carotis und zerebralen sowie cochleären Blutgefäßen besonders unter hypoxischen Bedingungen sowohl den systemischen Blutdruck als auch die zerebrale bzw. cochleäre Perfusion moduliert (Peng et al. 2010, Ishikawa et al. 2005, Morikawa et al. 2012, Li et al. 2011). Weiterhin weisen Widerstandsgefäße, wie die Mesenterialarterien, eine hohe CSE Aktivität auf, welche zur Steuerung der enteralen Durchblutung beiträgt (Yang et al. 2008, Mustafa et al. 2011, Wang 2009). Der zu Grunde liegende Wirkmechanismus beruht auf einer Vasodilatation durch Relaxierung von vaskulären glatten Muskelzellen (Sun et al. 2011). Die Relaxierung ist Folge der Protein S-Sulfhydrierung von Untereinheiten ATP- und Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Kaliumkanäle in glatten Muskelzellen durch H<sub>2</sub>S. Es kommt zur Öffnung der Kaliumkanäle und durch den Einstrom von Kaliumionen in das Zellinnere zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials (Zhao et al. 2001, Mustafa et al. 2011). Somit übernimmt H<sub>2</sub>S auch die Rolle eines „endothelium-

derived hyperpolarisation factor“ (Edwards et al. 2010) und bewirkt durch lokale Vasodilatation eine Senkung des Blutdrucks (Liu et al. 2011). Die relaxierende Wirkung von H<sub>2</sub>S auf glatte Muskelzellen im Korpus cavernosum trägt dabei physiologisch zur penilen Erektion bei (Qiu et al. 2012).

Zusätzlich zur Modulation des Blutdrucks konnten positive Effekte von H<sub>2</sub>S auf den Ischämie/Reperfusionsschaden nach Myokardinfarkt gezeigt werden (Johansen et al. 2006, Eley et al. 2010, Sivarajah et al. 2006). So reduziert H<sub>2</sub>S die Größe des Infarktareals, steigert die myokardiale Leistungsfähigkeit (Pan et al. 2008, Sodha et al. 2009), wirkt anti-inflammatorisch durch Reduktion der leukozytären Adhäsion (Sivarajah et al. 2006, Sodha et al. 2009) und anti-apoptotisch durch Induktion anti- und Inhibition pro-apoptotischer Signalwege (Sivarajah et al. 2006, Zhu et al. 2007). H<sub>2</sub>S steigert weiterhin den koronaren Blutfluss und somit die Perfusion des Myokards (Hussain et al. 2011). Ein protektiver Effekt konnte in diesem Zusammenhang in einer retrospektiven Studie an Petroleum-Arbeitern mit chronisch inhalativer H<sub>2</sub>S Exposition auch beim Menschen gezeigt werden. Die Inhalation von H<sub>2</sub>S reduzierte die Mortalität von Myokardinfarkten um 50%, verglichen mit der zu erwartenden Mortalität der Normalbevölkerung (Lewis et al. 2003). *Vice versa* führt ein Mangel von H<sub>2</sub>S aufgrund einer CSE Defizienz in Knockoutmäusen bzw. einer reduzierten Enzymaktivität, wie im Krankheitsbild der Homocysteinämie, zu Hypertonie (Yang et al. 2008) und einer gesteigerten Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse (Beard & Bearden 2011).

#### **4.2.3.2 Zentralnervensystem**

Eine weitere Funktion kommt H<sub>2</sub>S als endogener Neuromodulator im ZNS zu (Kimura 2002). Als solcher fördert H<sub>2</sub>S die Langzeitpotenzierung und somit kognitive Lernprozesse durch selektive Steigerung der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor Aktivität im Hippocampus (Abe & Kimura 1996, Whiteman et al. 2004).

Wie bereits für das Myokard beschrieben, hat H<sub>2</sub>S auch eine positive Auswirkung auf die Folgen des zerebralen Ischämie/Reperfusionsschadens nach Infarkt. So

führt die Inhalation von H<sub>2</sub>S zur Induktion einer Langzeithypothermie, die das Ausmaß des Infarkts und den damit verbundenen neuronalen Schadens reduziert (Florian et al. 2008). Es konnte weiterhin eine ischämieassoziierte Kinetik der zerebralen H<sub>2</sub>S Konzentration mit einem deutlichen Anstieg innerhalb der ersten 12 Stunden nach Infarkt gezeigt werden (Ren et al. 2010). Die systemische Behandlung mit H<sub>2</sub>S Donatoren zeigte hinsichtlich der Beeinflussung des Ischämie/Reperfusion-Schadens jedoch eine Dosis-Wirkungsbeziehung, wobei sich besonders hohe Konzentrationen als nicht protektiv gegenüber niedrigen H<sub>2</sub>S Konzentrationen erwiesen. Als weitere protektive Effekte auf das ZNS wurden sowohl anti-inflammatorische (Hu et al. 2007) als auch anti-oxidative (Kimura & Kimura 2004) Eigenschaften aufgezeigt.

Die Bedeutung von H<sub>2</sub>S für das ZNS wird auch anhand von Krankheitsbildern deutlich, die mit einer reduzierten H<sub>2</sub>S Konzentration bzw. reduzierter CBS Aktivität einhergehen. So konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte neuronale Apoptoserate bei vaskulärer Demenz mit einer reduzierten H<sub>2</sub>S Konzentration assoziiert ist (Zhang et al. 2009). Auch der Verlust kognitiver Funktionen bei Morbus Alzheimer ist mit einer reduzierten H<sub>2</sub>S und SAM Konzentration sowie reduzierter CBS Aktivität verbunden. Letztere führt zur Anreicherung von Homocystein, welches zur Entstehung der Alzheimer-Krankheit beiträgt (Eto et al. 2002). Dass neben einem Mangel auch eine Überproduktion von H<sub>2</sub>S nachteilig sein kann zeigt sich am Beispiel der Trisomie 21. Diese ist zu 50% mit einer Hyperaktivität der CBS verbunden, die zur endogenen H<sub>2</sub>S Überproduktion führt und in Verbindung mit der reduzierten kognitiven Leistungsfähigkeit gebracht wird (Belardinelli et al. 2001, Pogribna et al. 2001).

Aufgrund seiner anti-oxidativen, anti-inflammatorischen und anti-apoptischen Eigenschaften hat H<sub>2</sub>S ebenso eine protektive Wirkung auf die Funktion von Pankreas (Taniguchi & Niki 2011), Leber (Jha et al. 2008, Tan et al. 2011), Gastrointestinaltrakt (Kimura 2010, Pouokam et al. 2011), Lunge (Wei et al. 2007), Retina (Biermann et al. 2011) und Nieren (Bos et al. 2009). Eine mögliche therapeutische Funktion

von H<sub>2</sub>S wird ebenfalls im Zusammenhang mit Asthma bronchiale (Perry et al. 2011) sowie akuter CO Vergiftung diskutiert (Yu et al. 2011). Die Beeinflussung von Entzündungsreaktionen wird jedoch kontrovers dargestellt. Es werden dosisabhängig sowohl pro-inflammatorische (Li et al. 2005, Zhang et al. 2010) als auch anti-inflammatorische Effekte (Zanardo et al 2006, Fiorucci et al. 2007, Pan et al. 2011, Yang et al. 2011) beschrieben, wobei niedrige H<sub>2</sub>S Konzentrationen im Sinne einer anti-inflammatorischen Wirkung protektiv sind. Aus den zahlreichen aufgeführten Funktionen von H<sub>2</sub>S in verschiedenen Organsystemen leitet sich der pleiotrope Charakter des volatilen Transmitter ab, dem eine Vielzahl von Interaktionen zugrunde liegt. Dies macht H<sub>2</sub>S zu einem spannenden und anspruchsvollen Forschungsgegenstand.

**5 Zielstellung**

Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, die anti-thrombotische Wirksamkeit von H<sub>2</sub>S auf die mikrovaskuläre Thrombogenese unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Wie aktuell gezeigt werden konnte, beeinflusst H<sub>2</sub>S die Aggregation humaner Thrombozyten (Zagli et al. 2007). Da die Antithrombogenität von H<sub>2</sub>S und im Besonderen die Wirkung auf Thrombozyten noch nicht vollständig untersucht sind stellten wir uns in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen:

1. Welchen Einfluss hat H<sub>2</sub>S auf die mikrovaskuläre Thrombogenese und die primäre Hämostase?
2. Beeinflusst die Behandlung mit H<sub>2</sub>S die plasmatische Thrombozytenzahl?
3. Hat H<sub>2</sub>S einen Einfluss auf die plasmatische Konzentration von löslichem P-Selektin?
4. Welchen Einfluss hat H<sub>2</sub>S auf die Expression pro-thrombogener Adhäsionsmoleküle auf aktivierten Thrombozyten?
5. Beeinflusst H<sub>2</sub>S die Protein S-Sulfhydrierung thrombozytärer Proteine?

## 6 Material und Methodik

### 6.1 Hydrogensulfid Donor GYY4137

Als H<sub>2</sub>S Donor wurde die Substanz GYY4137 (GY, Li et al. 2008) verwendet. Als Trägersubstanz diente Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO ist eine farb- und geruchlose Substanz, die zur Gruppe nukleophiler, aprotischer, dipolarer Lösungsmittel gehört. Als solches findet DMSO Einsatz in der Lösung von Farben und Lacken, sowie als Lösungs- und Oxidationsmittel in der organischen Chemie und wird in der Biotechnologie und Zellkulturtechnik zur Kryokonservierung verwendet (Pegg 2007).

### 6.2 *In vivo* Experimente

#### 6.2.1 Versuchstiere

Für die *in vivo* Versuche wurden männliche C57BL/6 Mäuse (Abb. 4) mit einem Körpergewicht (KG) von 25 bis 30 g und einem Alter zwischen vier und acht Monaten verwendet. Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz §8 genehmigt und standen unter der Aufsicht des Tierschutzbeauftragten am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock.

**A****B**

Abb. 4: C57BL/6 Maus. Versuchstier vor (A) und nach (B) Präparation der dorsalen Rückenhautkammer.



## **6.2.2 Versuchsgruppen**

Die Wirkung von GYY auf die mikrovaskuläre Thrombogenese wurde in vier experimentellen Gruppen untersucht. Die Versuchstiere wurden über einen Katheter in der linken V. jugularis entweder mit GYY (50 mg/kg KG; n=10) oder einer äquimolaren Menge der Trägersubstanz DMSO (30 vol/vol in 0,9% NaCl; n=10) behandelt. Um den Wirkmechanismus von GYY genauer zu untersuchen, wurde separaten Tieren ein monoklonaler, Biotin-konjugierter, anti-P-Selektin Antikörper (50 µg/Tier; Ratte anti-Maus anti-CD62P, BD Pharmingen) durch Injektion in die rechte V. jugularis 30 Minuten vor der Behandlung mit GYY (50 mg/kg KG; n=5) bzw. DMSO (30 vol/vol in 0,9% NaCl; n=5) appliziert.

## **6.2.3 Experimentelles Tiermodell**

### **6.2.3.1 Anästhesie**

Die Versuchstiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (90 mg/kg) und Xylazin (25 mg/kg) anästhesiert. Für die initiale Narkose wurde eine Stammlösung aus Ketamin 10% (100 mg/ml, Belapharm) und Xylazin 2% (20 mg/ml, Rompun, Bayer Healthcare) in einer 1 ml Spritze (0,2 ml Xylazin und 0,6 ml Ketamin) verwendet. Der gleiche Ansatz wurde 1:10 verdünnt und diente zur Aufrechterhaltung der Anästhesie.

### **6.2.3.2 Modell und Präparation der dorsalen Rückenhautkammer**

Um den Einfluss von GYY auf die mikrovaskuläre Thrombusbildung zu untersuchen, wurde das Modell der dorsalen Rückenhautkammerpräparation gewählt. Die Rückenhautkammer besteht aus zwei, durch Schrauben miteinander verbundenen, symmetrischen Titanrahmen mit einem Gewicht von ca. 4 g (Abb. 5). Die Präparationsfläche

auf der Vorderseite wird durch ein Deckglas verschlossen und bleibt somit der intravitalmikroskopischen Untersuchung zugänglich.

In der Vorbereitung der Präparation wurden die Versuchstiere zunächst gewogen und gewichtsadaptiert intraperitoneal anästhesiert. Nach einer Wartezeit von zehn Minuten erfolgte die Rasur des Rückenfalls mit einem Elektrorasierer (Bellissima Emilia®). Kleine Haare wurden nach Einwirken einer Enthaarungscreme (Pilca, Sodalco) für fünf Minuten unter fließendem 37°C warmen Wasser abgespült. Anschließend wurden die Tiere abgetrocknet und zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur von 37°C auf eine Heizplatte gelegt. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde Augensalbe (Bepanthere®, Bayer) aufgetragen.

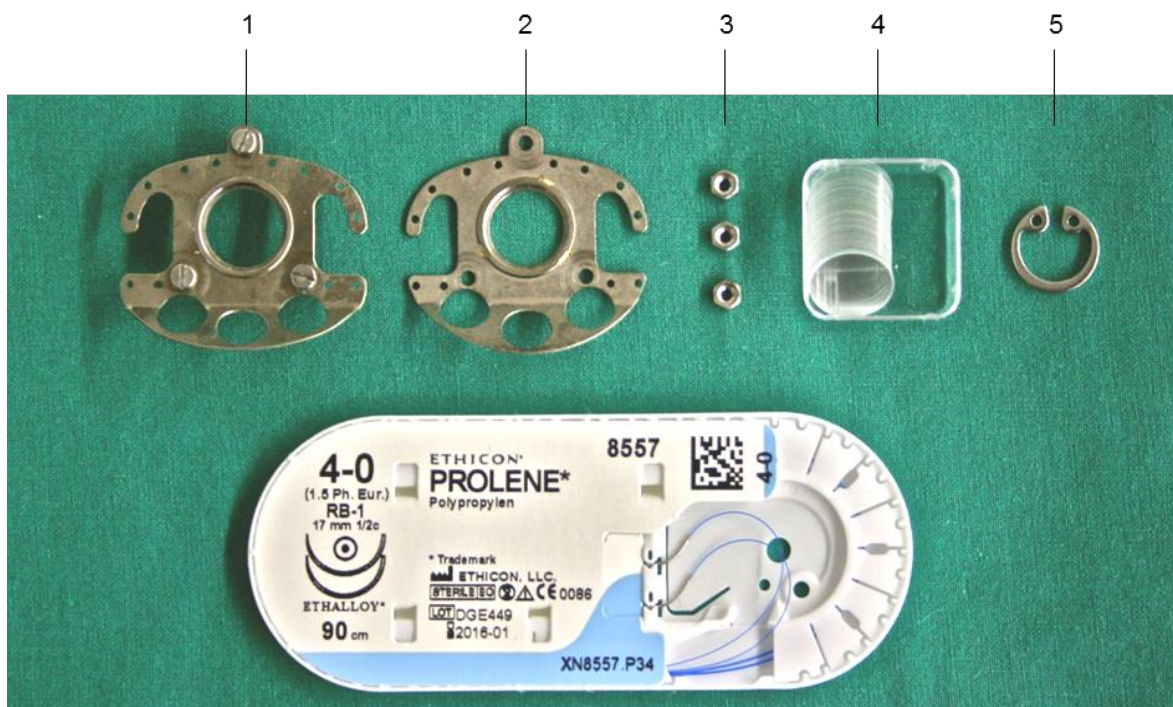


Abb. 5: Bestandteile der dorsalen Rückenhautkammer. Die Rückenhautkammer besteht aus einer Rückseite (1) und einer Vorderseite (2). Die Seitenteile bestehen aus Titan und werden durch drei Schrauben (3) und einen 4-0 Prolenefaden auf dem Rücken des Versuchstieres fixiert. Die Präparationsfläche wird mit einem Deckglas (4) verschlossen. Dieses wird durch einen Sprengring (5) auf der Titankammer fixiert.

Nach der Desinfektion der Rückenhaut (Octeniderm®) wurde durch vorsichtige Extension der Rückenhaut eine Hautdoppelschicht in der Medianlinie der Maus aufgespannt und mit einem kranialen und kaudalen temporären Haltefaden (Polyester 4/0) an einem Fixierungsbügel fixiert (Abb. 6). Die mediane Position war erreicht, wenn die großen Gefäße der extendierten Rückenhaut im Gegenlicht einer Schwanenhalslampe (M 651; Leica; Wetzlar; Deutschland) kongruent aufeinander lagen.

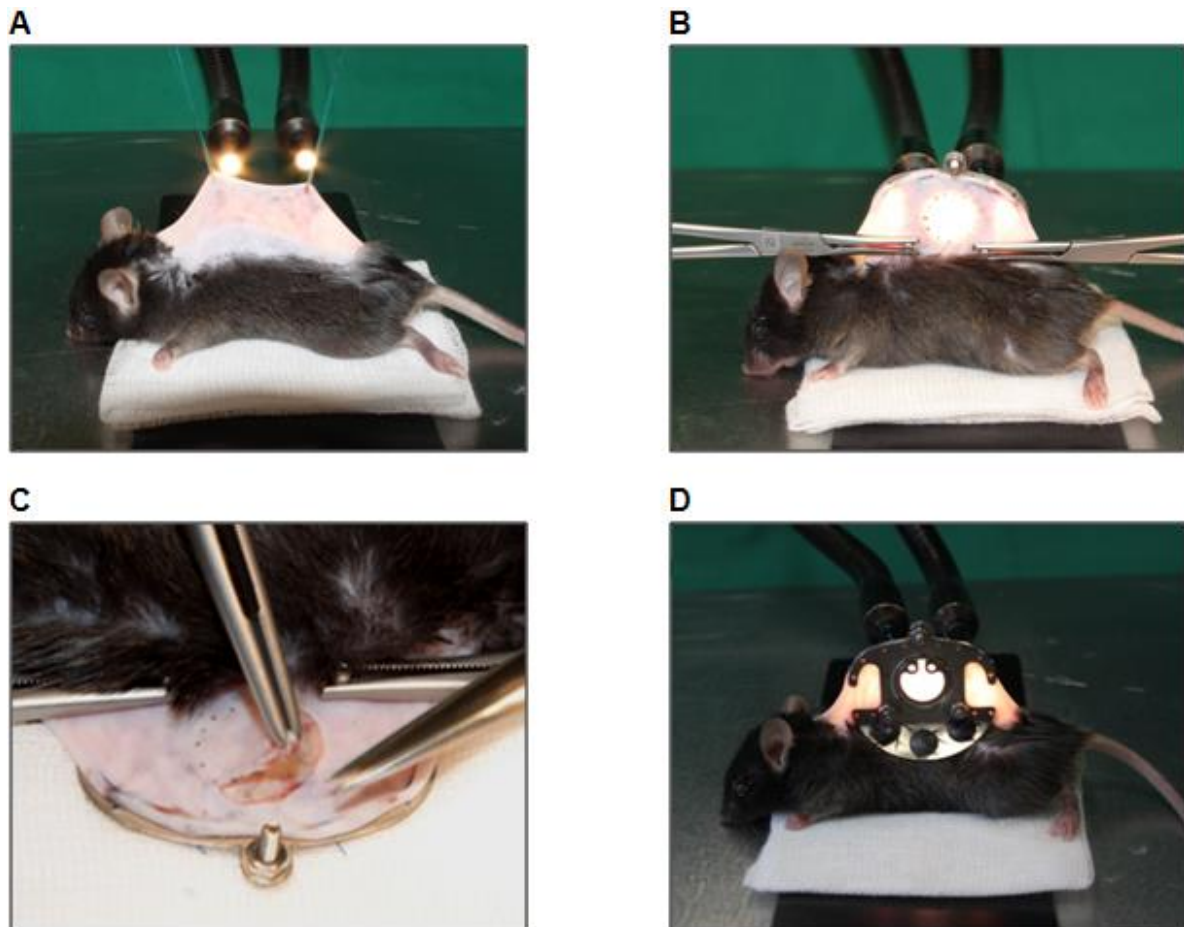


Abb. 6: Operative Schritte der Rückenhautkammerpräparation. Zunächst wird die Rückenhaut in der Medianlinie durch zwei Haltefäden extendiert (A). Unter Beachtung der Gefäße der Rückenhaut wird die Rückseite der Kammer durch vier Fäden befestigt. Die beiden unteren Verbindungsschrauben werden durch die Haut geführt und mit zwei Klemmen fixiert (B). Die Präparationsfläche wird im Gegenlicht markiert. Anschließend wird das Tier in Seitenlage gebracht und die oberste Hautschicht mit einer Schere entfernt. Nach der Präparation wird die Vorderseite der Kammer aufgebracht, durch Schrauben befestigt und die Präparationsfläche mit einem Deckglas und einem Sprengring verschlossen (D).

Anschließend wurde die Rückseite der Titankammer durch vier Nähte (Prolene 4/0) an der Oberseite der Hautfalte festgenäht. Am unteren Ende der Hautfalte erfolgte mittels einer Hautschere (Abb. 7) die Präparation von zwei Löchern, durch welche die Verbindungsschrauben des Titanrahmens geführt wurden. Die Rückenhaut wurde mit zwei Klemmen an den Schrauben fixiert.

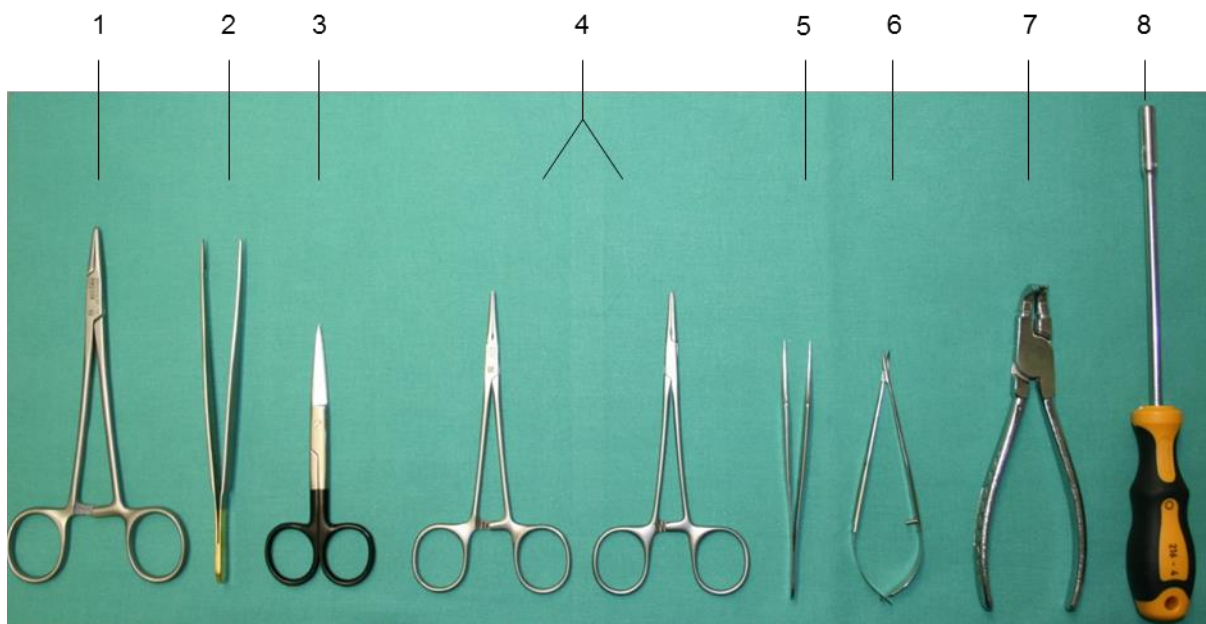


Abb. 7: Instrumente zur Präparation der dorsalen Rückenhautkammer: Nadelhalter (1), Pinzette (2), Gewebeschere (3) und anatomische Klemmen (4) dienen zur Fixierung der Titankammer auf dem Rücken des narkotisierten Versuchstieres. Für die mikrochirurgische Präparation werden eine Mikropinzette (5) und eine Mikrofederschere (6) verwendet. Die Zange (7) und der Schraubendreher (8) dienen zum finalen Verschluss des Präparationsareals mit einem Sprengring und zum Festdrehen der drei verwendeten Schrauben.

Im Gegenlicht erfolgte nun die farbliche Markierung der Präparationsfläche mit einem Durchmesser von ca. 15 mm. In seitlicher Lage des Versuchstieres wurde unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops im angezeichneten Areal mikrochirurgisch die Cutis, Subcutis, der M. panniculus carnosus sowie zwei Schichten des Rekraktormuskels vollständig bis auf den M. panniculus carnosus der Gegenseite abpräpariert (Abb. 8). Dabei wurde die Präparationsfläche kontinuierlich mit 0,9% NaCl Lösung benetzt, um eine

Austrocknung zu vermeiden. Zur Blutstillung während der Präparation dienten feuchte Wattestäbchen oder Kompressen. Das Gewebe der Kammergegensseite blieb in seiner Kontinuität vollständig erhalten.

Die präparierte Fläche war mit einem Durchmesser von ca. 15 mm bewusst größer als das spätere Beobachtungsfenster mit ca. 11 mm, um eine Kompression des Gewebes zu vermeiden. Als weiterer Kompressionsschutz der Blutgefäße dienten Muttern auf den Verbindungsschrauben, welche die Kammerhälften in einem Abstand von ca. 450 µm halten. Nach Abschluss der Präparation wurde die Vorderseite der Kammer auf die drei Verbindungsschrauben aufgebracht und mit Muttern unter sanftem Druck fixiert. Das Beobachtungsfenster der Vorderseite wurde mit einem Deckgläschen feucht mit 0,9% NaCl Lösung verschlossen und diente als Zugang für die intravitale Mikroskopie. Anschließend erfolgte die Fixierung des Deckgläschens in der Kammer durch einen Sprengling.

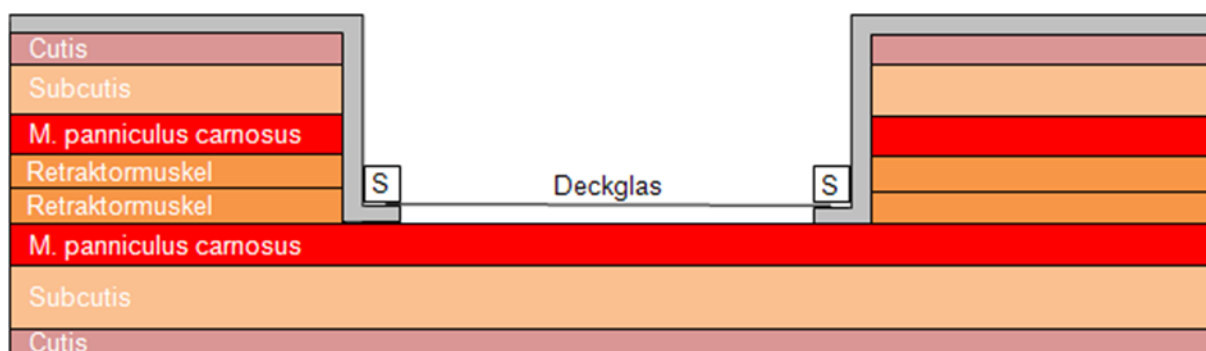
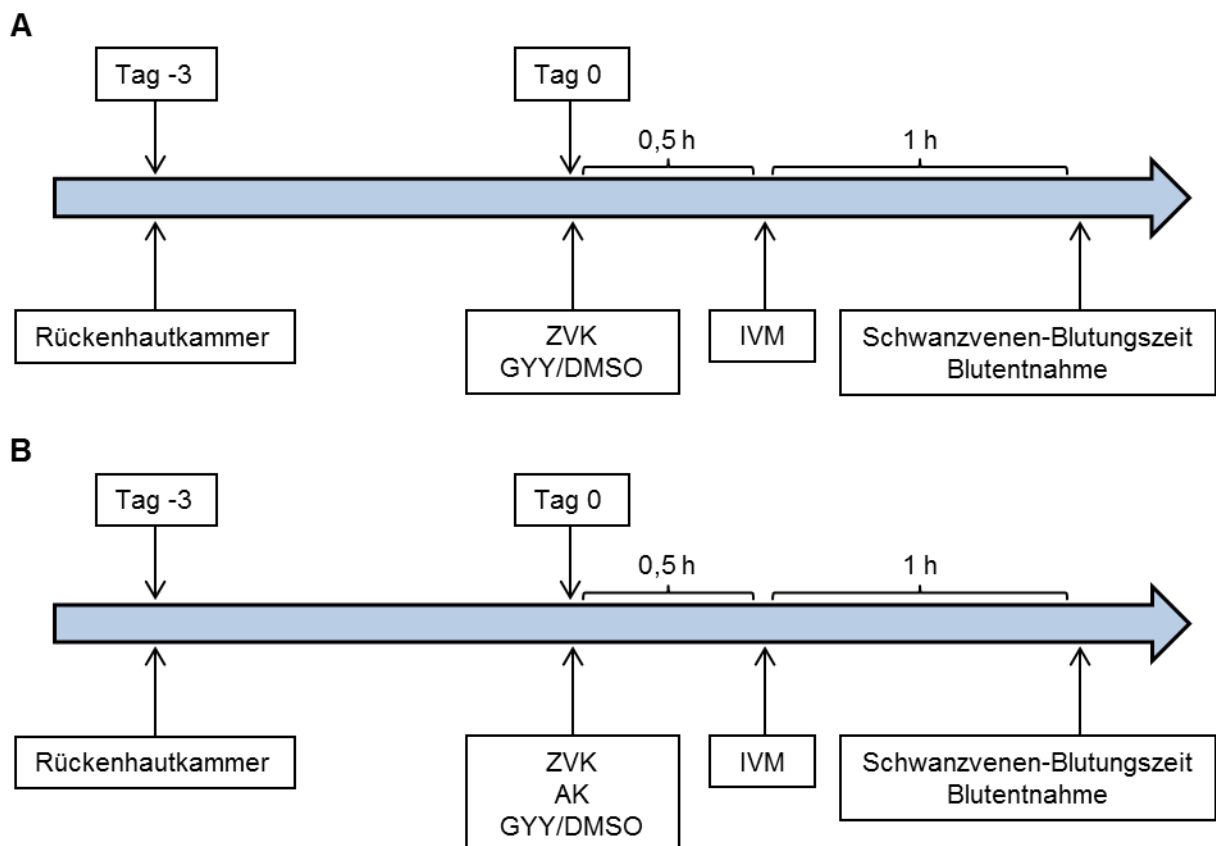


Abb. 8: Schema der einzelnen Rückenhautschichten innerhalb der Doppelfalte während der Rückenhautkammerpräparation. Diese umfasst die Haut- und Bindegewebsschichten von der Cutis bis zum M. panniculus carnosus. Die Präparationsfläche wird mit einem Deckglas verschlossen, welches durch einen Sprengling (S) in der Kammer fixiert wird.

Die beschriebene Präparation, inklusive Anästhesie und Rasur, dauerte ca. 45 Minuten. Anschließend er wachten die Versuchstiere aus der Narkose. Während der nächsten drei Tage wurden die Tiere bei Standardfutter für Nager und freiem Zugang zu Wasser in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Zyklus gehalten.

### 6.2.3.3 Vorbereitung der Intravitalmikroskopie

An Tag drei nach der Kammerpräparation erfolgte die Intravitalmikroskopie (Abb. 9). Hierfür wurden die Versuchstiere zunächst, wie bereits beschrieben, anästhesiert und am Hals rasiert. Anschließend wurden die Tiere auf einer Heizplatte so fixiert, dass der Hals der Präparation der V. jugularis zugänglich war. Die Applikation des anti-P-Selektin Antikörpers (50 µg/Tier; gelöst in 100 µl NaCl; 0,9%) erfolgte durch direkte Injektion in die rechte V. jugularis mit einer Insulinspritze und anschließender Blutstillung durch Druck mit einem Wattestäbchen. Für die Katheteranlage wurde die Haut über der linken Halsvene auf einer Strecke von ca. 2 cm in kranio-kaudaler Richtung inzidiert. Die Präparation erfolgte stumpf mit zwei gebogenen mikrochirurgischen Pinzetten unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops. Dabei wurden kleinere Seitenäste der Vene kauterisiert und kräftigere Äste ligiert (Polyester 8/0).



*Abb. 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. An Tag -3 erfolgte unter intraperitonealer Ketamin/Xylazin Narkose die Präparation der dorsalen Rückenhautkammer. An Tag 0 erfolgte die intravitalmikroskopische Thromboseinduktion. GYY (50 mg/kg KG) bzw. die Trägersubstanz DMSO (10 ml/kg KG, 30%) wurden 30 Minuten vor der Thromboseinduktion über einen zentralvenösen Katheter (ZVK) in die linke V. jugularis appliziert (A). Zur Blockade von P-Selektin wurde in einem zusätzlichen Set an Tieren ein anti-P-Selektin Antikörper (AK, 50 µg/Tier) vor der Applikation von GYY bzw. DMSO direkt in die rechte V. jugularis injiziert (B). Die Intravitalmikroskopie (IVM) wurde auf einen Zeitraum von 60 Minuten begrenzt. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der subaqualen Schwanzvenen-Blutungszeit, die Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus und die Entnahme des Rückenhautkammer-Gewebes.*

Vor dem Einbringen des Katheters wurde die frei liegende V. jugularis nach kranial durch eine Ligatur verschlossen. Kaudal wurden zwei Ligaturen vorgelegt, um den Katheter zu fixieren und den Blutverlust beim Einbringen zu minimieren. Es folgten der Einschnitt der Vene mit einer Mikrofederschere und das Einbringen des Jugulariskatheters zur Applikation von GYY bzw. der Trägersubstanz DMSO. Nach einer Wartezeit von 30 Minuten wurden die Versuchstiere seitlich, mit horizontaler Lage der Rückenhautkammer, auf einer speziell für die Intravitalmikroskopie entwickelten Plexiglasplattform fixiert, um bewegungsabhängige Artefakte zu reduzieren und somit die Mikroskopie zu optimieren. Unmittelbar vor der Intravitalmikroskopie erfolgte die Applikation von 0,1 ml Fluoreszeinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran; 5%; Sigma; Deisenhofen; Deutschland; MG 150.000 D). Der Fluoreszenzfarbstoff bewirkt eine Plasma-Anfärbung und damit eine Kontrastanhebung zwischen Intra- und Extravasalraum. FITC-Dextran besitzt eine gute Wasserlöslichkeit und ist aus zwei Molekülen aufgebaut, dem eigentlichen Fluoreszenzfarbstoff FITC und Dextran (Schroder et al. 1976). FITC besitzt ein Exzitationsmaximum im blauen Bereich bei einer Wellenlänge von  $\lambda=490$  nm und ein Emissionsmaximum im grünen Bereich von  $\lambda=520$  nm. Dextrane sind hochmolekulare Polysaccharide auf der Basis von Glucose-Monomeren, welche aufgrund ihres hohen Molekulargewichts (150 kDa) die Extravasation des Fluoreszenzfarbstoffs stark reduzieren.

#### 6.2.3.4 Intravitalmikroskopie und Thromboseinduktion

Die intravitalmikroskopische Thromboseinduktion wurde mit Hilfe eines Zeiss Intravitalmikroskops durchgeführt (Axiotech® Vario 100; Zeiss; Göttingen; Deutschland). Der Versuchsaufbau (Abb. 10) umfasste das Intravitalmikroskop mit einer sehr lichtsensitiven und hochauflösenden Schwarz-Weiß-CCD-Videokamera (FK 6990 IQ-S; Pieper; Schwerte; Deutschland).



Abb. 10: Aufbau der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Die Versuchsanordnung umfasst einen Objektivrevolver (1), ein Filtersystem für verschiedene Exzitations- und Emissionswellenlängen an Licht (2), das Mikroskop mit einer CCD-Kamera (3) sowie eine Belichtungssteuerung (4). Die CCD-Kamera ist über einen Echtzeitgenerator (5) an einen Monitor (6) und einen Videorecorder (7) angeschlossen.

Die Aufnahmen wurden an einen Echtzeitgenerator (AG-7350; Panasonic; Deutschland) übertragen, der sowohl an einen Monitor als auch an einen VHS-Videorekorder angeschlossen war, um die intravitalmikroskopischen Aufnahmen aufzuzeichnen und offline zu analysieren.

Das Intravitalmikroskop besteht aus einem Trägertisch, einem Filtersystem mit Reflektorschieber, einem Objektivrevolver, einer Lichtquelle und einer Belichtungssteuerung. Die Lichtgebung erfolgte mit einer stufenlos regelbaren Quecksilberdampf-Kurzbogen-Lampe (HBO 103 W/2, Zeiss, Göttingen). Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde das Filterset für



FITC (450 - 490 nm; FT 510; LP 520) verwendet. Der Objektivrevolver des Mikroskops war mit drei Objektiven bestückt. Für die Übersichtsaufnahmen wurden Objektive mit 10-facher Vergrößerung (10x/0,30 W; Plan-NEOFLUAR; Zeiss) und 20-facher Vergrößerung (20x/0,50 W; Plan-NEOFLUAR; Zeiss) verwendet (Abb. 11).

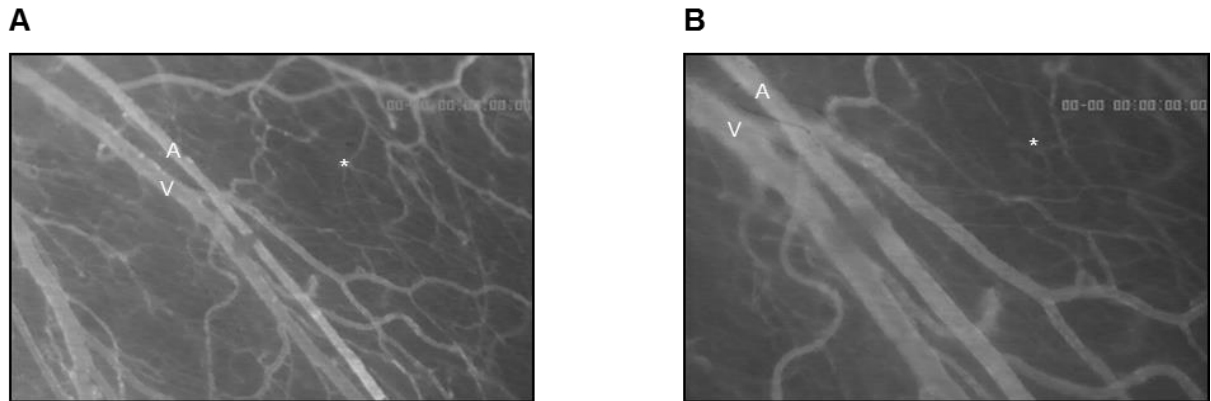


Abb. 11: Intravitalmikroskopische Aufnahme von Gefäßen der dorsalen Rückenhaut. Für eine Erhöhung des Kontrasts zwischen intra- und extravasalem Raum wurde FITC-Dextran intravenös appliziert. Zu sehen sind Übersichtsaufnahmen in 10-facher (A) und 20-facher (B) Vergrößerung (A, zuführende Arteriole; V, drainierende Venole; \*, Kapillaren).

Für die Bestimmung des Gefäßdurchmessers, der Blutflussgeschwindigkeit und der Thromboseinduktion diente ein Wasserimmersionsobjektiv mit 63-facher Vergrößerung (63x/0,95 W; ACHROPLAN; Zeiss). Vor der Thromboseinduktion erfolgte für 20 Sekunden die Aufzeichnung des Blutflusses in der ausgewählten Venole zur späteren offline Analyse des Gefäßdurchmessers und der Blutflussgeschwindigkeit. Unmittelbar darauf wurde die Epi-Illumination begonnen und zeitgleich die Stoppuhr am Echtzeitgenerator gestartet.

Das Thrombuswachstum wurde alle 60 Sekunden kontrolliert und die Zeit bis zum vollständigen Gefäßverschluss gemessen, der durch ein Sistieren des Blutflusses in der thrombosierten Venole definiert war. Die Dauer der Intravitalmikroskopie war auf eine Stunde begrenzt. Die Aufnahmen wurden offline mit einer Computer-basierten Software (CapImage®) ausgewertet.

### 6.2.3.5 Subaquale Blutungszeit und Blutentnahme

Im Anschluss an die Intravitalmikroskopie erfolgte die Bestimmung der subaqualen Blutungszeit als Parameter der primären Hämostase. Hierzu wurden die Schwanzspitzen der Versuchstiere auf einer Länge von ca. 2 mm mit einer Schere abgeschnitten und das Schwanzende in ein mit 0,9% NaCl Lösung gefülltes Becherglas platziert, worauf sich ein Blutfaden bildete. Die subaquale Schwanzvenen-Blutungszeit war definiert als die Zeit vom Eintauchen der Schwanzspitze bis zum Abriss des Blutfadens und dem damit verbundenen Sistieren der Blutung. Nach der Bestimmung der Blutungszeit erfolgte die Blutentnahme durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit einer Glaskapillare. Es konnten jeweils 500 µl EDTA- und Citratblut gewonnen werden.

## 6.3 *In vitro* Experimente

### 6.3.1 Blutentnahme und Gewinnung plättchenreichen Plasmas

Die Blutentnahmen waren durch die Ethikkommission genehmigt (A 2012-0038) und erfolgten an freiwilligen humanen Spendern nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Probanden. Für die *in vitro* Untersuchung der Thrombozytenfunktion wurde Blut mit einer 21G Nadel aus der linken Kubitalvene von insgesamt sieben männlichen Probanden in 3 ml S-Monovetten 9NC (1:10 Citrat vol/vol; Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland) abgenommen. Nach der Blutentnahme erfolgte die Bestimmung der Thrombozytenzahl im Citratblut durch ein Sysmex KX-21 Blutbild-Analysegerät (Sysmex; Norderstedt; Deutschland) und die anschließende Zentrifugation bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 110g mit langsamer Beschleunigung und ohne Bremse (GS-6R Zentrifuge; Beckman Coulter; Fullerton; Ca). Durch die Zentrifugation gewonnenes plättchenreiches Plasma (PRP) wurde in separate Reagenzgefäße pipettiert. Die Thrombozytenzahl wurde mit Hilfe des Sysmex KX-21 gemessen und durch Verdünnung mit Phosphat-gepuffertem Natriumchlorid (PBS) auf  $2 \cdot 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Um eine Aktivierung der Thrombozyten durch die Isolation auszuschließen, wurde das PRP für 30 Minuten in einem Wasserbad

(37°C) inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Suspension in neue Reagenzgefäße mit je 200 µl PBS pipettiert und im Wasserbad (37°C) mit 1,4 mM Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid (TRAP) allein oder in Kombination mit dem H<sub>2</sub>S Donor inkubiert, so dass finale GYY Konzentrationen von jeweils 1 mM, 5 mM oder 10 mM entstanden. TRAP bindet an den Thrombinrezeptor und führt -ähnlich einem pro-thrombogenen Stimulus- zu einer Aktivierung der Thrombozyten.

In einer weiteren Probe wurden ruhende, unbehandelte Blutplättchen parallel als Kontrolle mitgeführt. Nach 30 Minuten wurden die Thrombozyten mit Formaldehyd (4°C; 1% in PBS gelöst; Cell Fix; Becton Dickinson; Heidelberg; Deutschland) fixiert und für fünf Minuten auf Eis gelagert, um die Reaktion abzustoppen und den Zustand der Thrombozyten zu fixieren. Nach der Fixierung wurden die Thrombozyten bei 350g für vier Minuten bei 4°C zentrifugiert und anschließend mit PBS gewaschen, um die Fixierlösung zu entfernen. Es folgte die lichtgeschützte Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei Raumtemperatur. Nach 40 Minuten wurden die Thrombozyten erneut mit 1 ml PBS gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in PBS für die Durchflusszytometrie resuspendiert.

### **6.3.2 Durchflusszytometrie**

Für eine genaue Messung wurde das FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson) mit Fluoreszenz-Standard-Microbeads (CaliBRITE Beads, Becton Dickinson) kalibriert. Von jeder Probe wurden 20.000 Zellen pro Messung ausgewertet. Die Thrombozyten wurden mit dem Programm CellQuest (Becton Dickinson) anhand ihres charakteristischen forward scatter (FSC) und side scatter (SSC) identifiziert und hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysiert. Die Fluoreszenzmessung der unbehandelten Probe diente zur Erfassung des Dot-Plots sowie der Eigenfluoreszenz (Abb. 12).

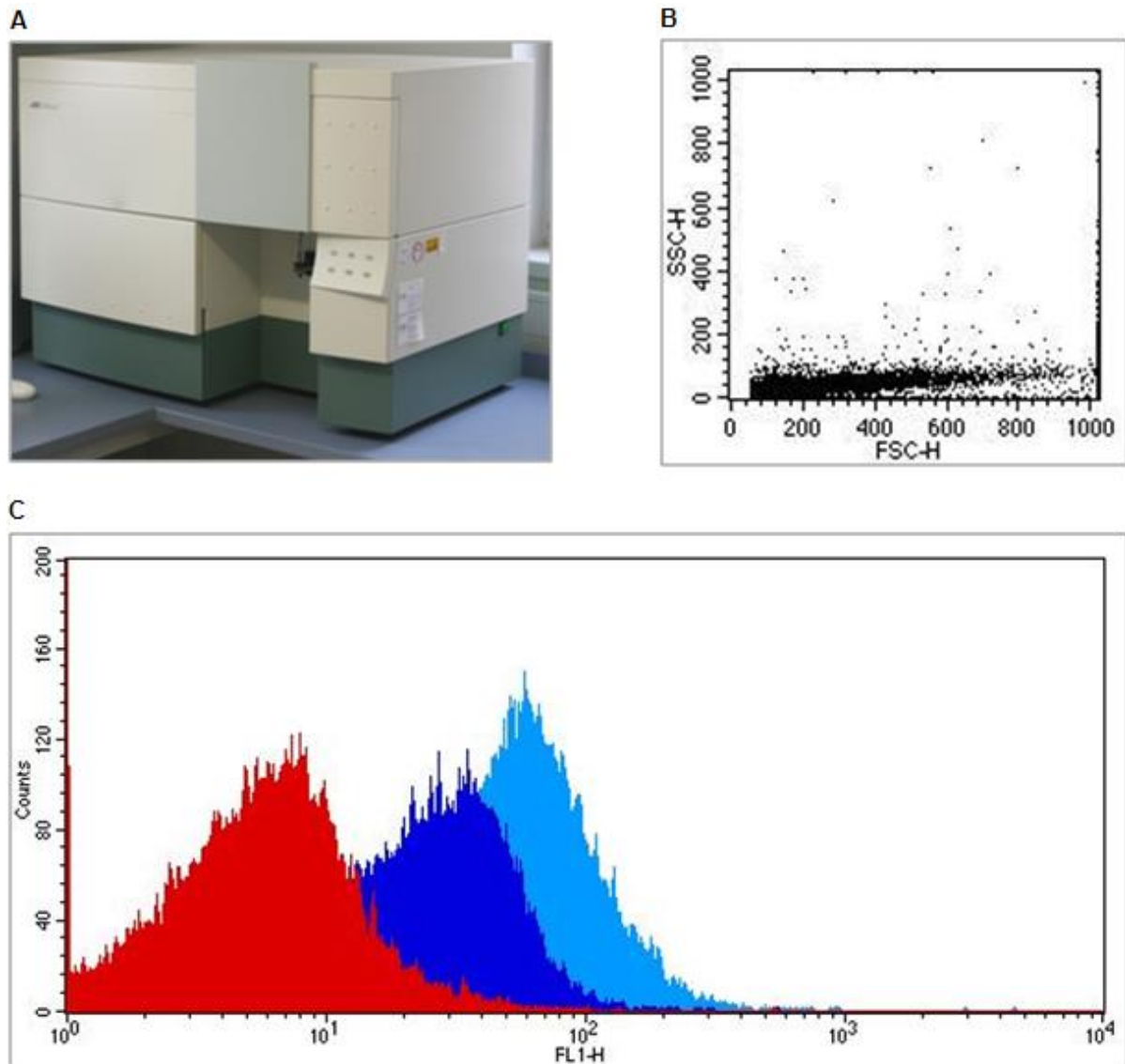


Abb. 12: Durchflusszytometer (A) mit exemplarischer Dot-Plot (B)- und Fluoreszenz-Messung der P-Selektin Expression humaner Thrombozyten (C). Durchflusszytometer messen sowohl die Lichtstreuung als auch die Fluoreszenz von einzelnen Zellen. Die Thrombozyten zeichnen sich durch eine charakteristische Vorwärts- und Seitwärtsstreuung aus, welche im Dot-Plot dargestellt ist. Durch Einsatz eines fluoreszenzmarkierten anti-P-Selektin Antikörpers können in der Fluoreszenz-Messung in Abhängigkeit von der P-Selektin Expression unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten gemessen werden.

Für die durchflusszytometrische Analyse der P-Selektin Expression wurde ein monoklonaler, FITC-markierter Maus anti-Human anti-P-Selektin Antikörper verwendet (1,5  $\mu$ l; sc 8419; Santa Cruz).

Die Bestimmung der Expression des Glykoprotein GP<sub>Ib</sub> erfolgte durch Applikation eines monoklonalen, FITC-markierten Maus anti-Human anti-CD42b Antikörpers (1,5 µl; sc-51549; Santa Cruz).

Die Expression des Glykoprotein GP<sub>IIB-IIIa</sub> wurde durch Applikation eines monoklonalen, FITC-markierten anti-PAC-1 Antikörpers (8 µl; Becton Dickinson) bestimmt, welcher ausschließlich an die aktive Form des Glykoproteins bindet. Um die physiologische Bindungsstärke von GP<sub>IIB-IIIa</sub> zu bestimmen, wurde weiterhin humanes, Alexa Fluor 488-markiertes Fibrinogen (F-13191; Molecular Probes; Eugene; USA), der physiologische Hauptligand von GP<sub>IIB-IIIa</sub>, appliziert.

Ein FITC-markierter, Isotyp-Kontroll IgG-1 Antikörper (Santa Cruz) wurde eingesetzt, um unspezifische Bindungen zu detektieren. Zur Bestimmung der relativen Fluoreszenz wurde die Fluoreszenz der Isotyp-Kontrolle von der Fluoreszenz aller anderen Proben subtrahiert.

### **6.3.3 Biotin Switch Assay**

Zur Analyse des potentiell zugrunde liegenden Wirkmechanismus von H<sub>2</sub>S erfolgte die Messung der S-Sulphydrierung thrombozytärer Proteine durch den Biotin Switch Assay (Mustafa et al. 2009). Die hierfür verwendeten Thrombozyten wurden, wie unter 6.3.1.1 beschrieben, aus dem Citratblut humaner Spender als PRP gewonnen. Die Thrombozyten wurden entsprechend der durchflusszytometrischen Versuche jeweils mit 1 mM, 5 mM oder 10 mM GYY exponiert. Nach der Inkubation mit Formaldehyd erfolgte die Waschung mit PBS bei 10.000 rpm für fünf Minuten. Das entstandene Pellet wurde in HEN Puffer (250 mM Hepes-NaOH; pH 7,7; 1 mM EDTA; 0,1 mM Neocuproin), supplementiert mit 100 µM Deferoxamin, resuspendiert und bei 13.000g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Das Zelllysat wurde in neue Reagenzgefäße mit Puffer zur Blockade unspezifischer Bindungen (Hen Puffer eingestellt mit 2,5% Natrium-dodecyl-sulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) und 20 mM Methylmethanethiosulfonat (MMTS)) überführt und für 20 Minuten bei 50°C

kontinuierlich gevortext. Anschließend wurde das MMTS durch Zugabe von zwei Volumina Aceton entfernt und die Proteine für 20 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  präzipitiert. Nach der Entfernung des Acetons wurden die Proteine in HEN Puffer (HEN eingestellt mit 1% SDS) resuspendiert, gefolgt von der Zugabe von vier Volumen 4 mM in DMSO-gelöstem *N*-(6-(biotinamido)hexyl)-3-(2-pyridyldithio) propionamid (Biotin-HPDP). Nach Inkubation bei Raumtemperatur für zwei Stunden wurden die durch Biotin-HPDP biotinylierten Proteine durch zwei Volumina Aceton gefällt. Vor dem Immunoblotten wurde das Aceton entfernt und die Proteine in HEN Puffer resuspendiert. Biotinylierte Proteine wurden mit gleichen Volumen von zweifachem SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) Ladepuffer verdünnt und für fünf Minuten auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Das Gesamtprotein (15  $\mu\text{g}$ ) wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt (12% Gele) und auf Polyvinylidendifluorid Membranen aufgetragen. Die immobilisierten Proteine wurden mit 2% bovinem Serumalbumin (BSA; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) geblockt und die Membranen über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit einem monoklonalen anti-Biotin Antikörper (1:1.000; Sigma-Aldrich) inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit einem sekundären Peroxidase-gebundenen anti-Maus Antikörper (1:60.000; Sigma-Aldrich). Die Proteinexpression wurde durch Luminol-verstärkte Chemilumineszenz (ECL plus; Amersham Pharmacia Biotech; Freiburg, Deutschland) sichtbar gemacht und mittels ChemiDox<sup>TM</sup> XRS System (Bio-Rad Laboratories) digitalisiert. Die Signale wurden desitometrisch ausgewertet (Quantity One; Bio-Rad Laboratories) und gegenüber dem  $\beta$ -Aktin Signal (Maus monoclonaler anti- $\beta$ -Aktin Antikörper; 1:20.000; Sigma Aldrich) normalisiert.

#### **6.3.4 ELISA für lösliches P-Selektin**

Die Konzentrationsbestimmung von löslichem P-Selektin erfolgte im Plasma von GYY- bzw. DMSO-behandelten Versuchstieren. Das Blut wurde, wie unter 6.2.3.5 beschrieben, nach der Thromboseinduktion entnommen. Für die Gewinnung von Plasma wurde das Blut bei 3500 rpm für zehn Minuten zentrifugiert (GS-15 Centrifuge; Beckman). Für die Konzentrationsbestimmung des löslichen P-Selektins wurde ein ELISA (Mouse sP-

Selectin; R&D Systems) verwendet und den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte entsprechend der im ELISA-Reader (SUNRISE; TECAN; Salzburg; Österreich) gemessenen Absorption und deren Auswertung durch das Programm Magellan (TECAN; Salzburg; Österreich).

#### **6.4            Statistische Analyse**

Die während der primären Erfassung erhobenen Daten wurden bei der Auswertung der Videobänder und der Blutuntersuchungen zur elektronischen Datenverarbeitung in Excel<sup>®</sup> (Microsoft<sup>®</sup>) eingegeben. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Varianzhomogenität (ANOVA) mit dem Students t-Test und anschließender Bonferroni-Korrektur unter Verwendung der SigmaStat<sup>®</sup> Statistical Software, Version 2.03 (Jandel Scientific; San Rafael; CA; USA). Zum Vergleich der Versuchsgruppen wurde ein Holm-Sidak multipler Vergleichstest durchgeführt. Falls die Voraussetzungen für diesen nicht gegeben waren, wurde ein Rangsummen-Test (Kruskal-Wallis-Test) für unverbundene Stichproben mit einem sich anschließenden Dunn's oder Tukey Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung der Software SigmaPlot<sup>®</sup> (Jandel Corp.; San Rafael; CA; USA) in Säulendiagrammen als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (MW ± SEM) dargestellt. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurden Unterschiede in den Ergebnissen unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur als signifikant angenommen. Beim Auftreten signifikanter Unterschiede wurde keine weitere Unterscheidung hinsichtlich bestimmter Signifikanzniveaus vorgenommen.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Thrombosezeiten

Die intravitalmikroskopische Thromboseinduktion führte zu einem vollständigen thrombotischen Gefäßverschluss in allen untersuchten Venolen. Tiere, die mit DMSO behandelt wurden, zeigten eine durchschnittliche Gefäßverschlusszeit von  $235 \pm 20$  Sekunden (Abb. 13A). Die Behandlung mit dem H<sub>2</sub>S Donor GYY führte zu einer signifikanten Verzögerung des vollständigen thrombotischen Gefäßverschlusses, der erst nach  $492 \pm 84$  Sekunden eintrat ( $p < 0,05$  vs DMSO).

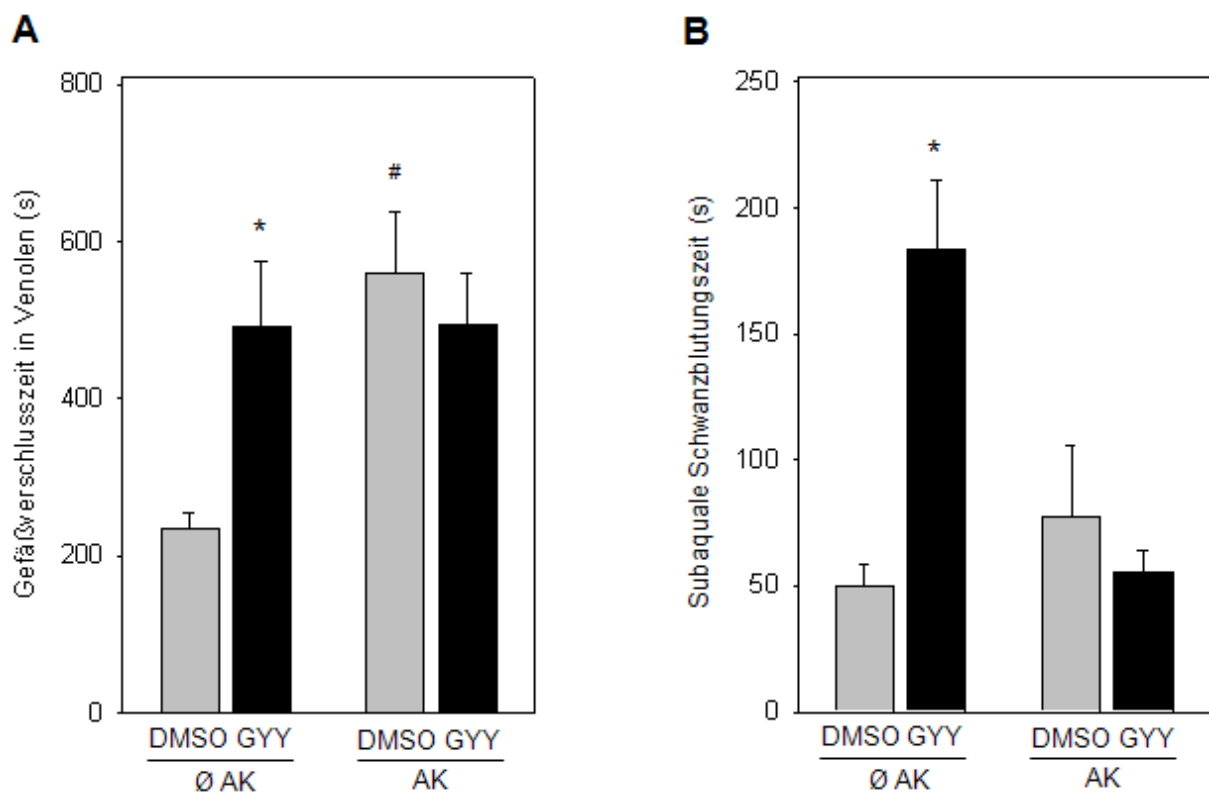


Abb. 13: Gefäßverschlusszeit in Venolen und subaquale Blutungszeit. Quantitative Analyse der Zeit bis zum vollständigen thrombotischen Gefäßverschluss der Venolen (A) und der subaqualen Schwanzvenen-Blutungszeit (B) in GYY- (schwarz) bzw. DMSO- (grau) behandelten Tieren. Weiterhin wurde ein anti-P-Selektin Antikörper appliziert, um die Beteiligung von P-Selektin an der Thrombusbildung zu untersuchen. MW  $\pm$  SEM, t-Test mit Bonferroni Korrektur, \*  $p < 0,05$  vs DMSO, #  $p < 0,05$  vs Ø anti-P-Selektin Antikörper.



Tiere, die zusätzlich zu DMSO mit anti-P-Selektin Antikörper behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur alleinigen DMSO Behandlung eine signifikant prolongierte Thrombogenese von  $560 \pm 78$  Sekunden ( $p < 0,05$  vs DMSO). Anti-P-Selektin Antikörper Applikation in GYY-exponierten Tieren hatte -verglichen mit der alleinigen GYY Behandlung- jedoch keinen weiteren Einfluss auf die Thrombogenese.

## 7.2 Subaquale Blutungszeit und Thrombozytenzahl

Die nach der Thromboseinduktion erfolgte Bestimmung der subaqualen Schwanzvenen-Blutungszeit zeigte ebenfalls eine Prolongation in Gegenwart von GYY (Abb. 13B). So sistierte die Blutung DMSO-behandelter Tiere nach  $50 \pm 8$  Sekunden. GYY-behandelte Tiere zeigten im Gegensatz dazu eine mit  $184 \pm 28$  Sekunden um das 3-fache verlängerte Blutungsdauer ( $p < 0,05$  vs DMSO). Die Applikation des anti-P-Selektin Antikörpers führte sowohl in DMSO- als auch in GYY-behandelten Tieren mit  $77 \pm 28$  und  $56 \pm 8$  Sekunden nur zu einer leichten Verlängerung der subaqualen Blutungszeit.

Die Thrombozytenzahl aller Tiere lag in einem Bereich von  $800-940 \times 10^9/\text{ml}$  und wurde weder durch die Behandlung mit DMSO oder GYY noch durch die Applikation des anti-P-Selektin Antikörpers beeinflusst (Tabelle 1, siehe Anhang).

## 7.3 Durchflusszytometrie

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigten ruhende Thrombozyten eine sehr geringe P-Selektin Expression, wohingegen die Glykoproteine  $\text{GP}_{\text{Ib}}$  und  $\text{GP}_{\text{IIb-IIIa}}$  konstitutiv exprimiert wurden (Abb. 14A-D). Die Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP führte zu einer Steigerung der Expression von P-Selektin und  $\text{GP}_{\text{IIb-IIIa}}$ . Die Expression von  $\text{GP}_{\text{IIb-IIIa}}$  wurde durch die Bindung von PAC-1 und Fibrinogen analysiert. Die Exposition TRAP-stimulierter Thrombozyten mit GYY in aufsteigenden Konzentrationen führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Expression aller untersuchten Adhäsionsmoleküle.

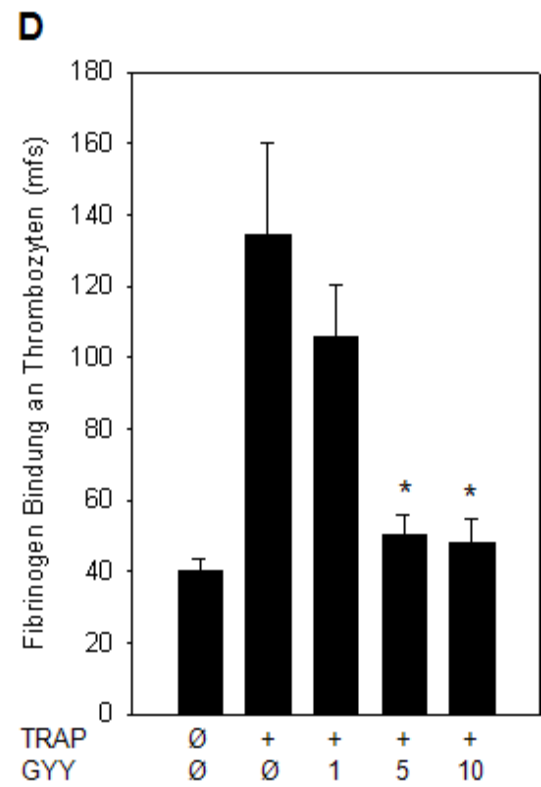
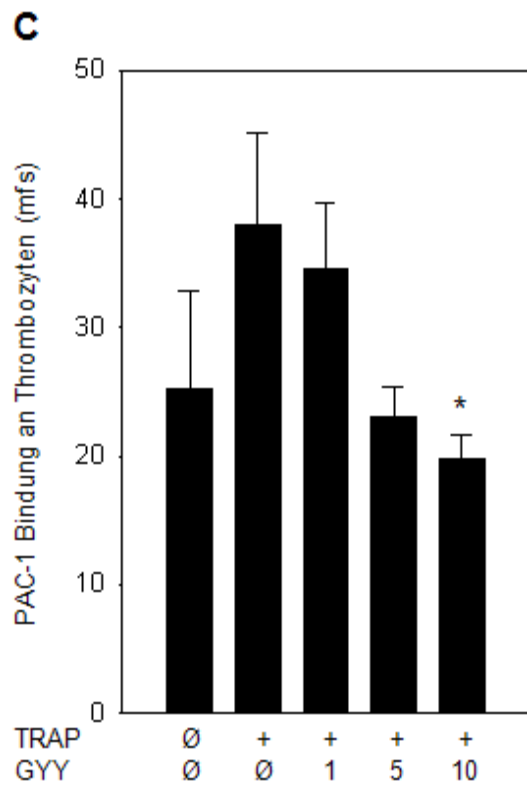
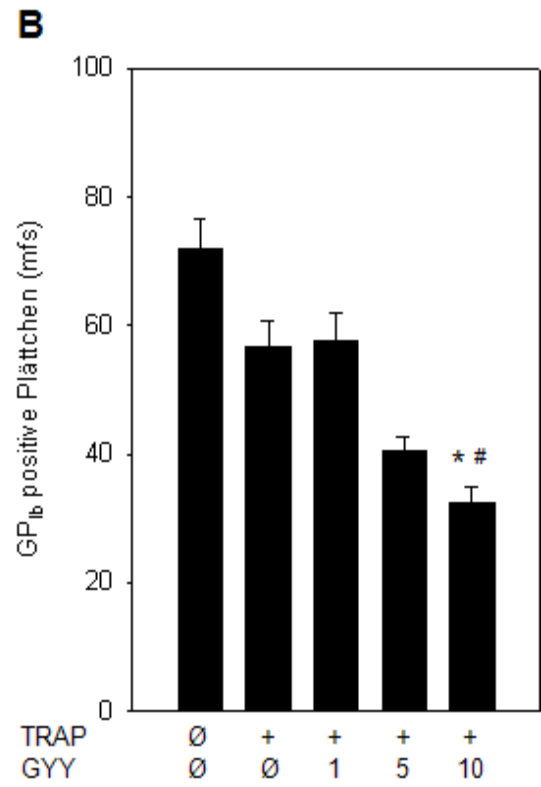
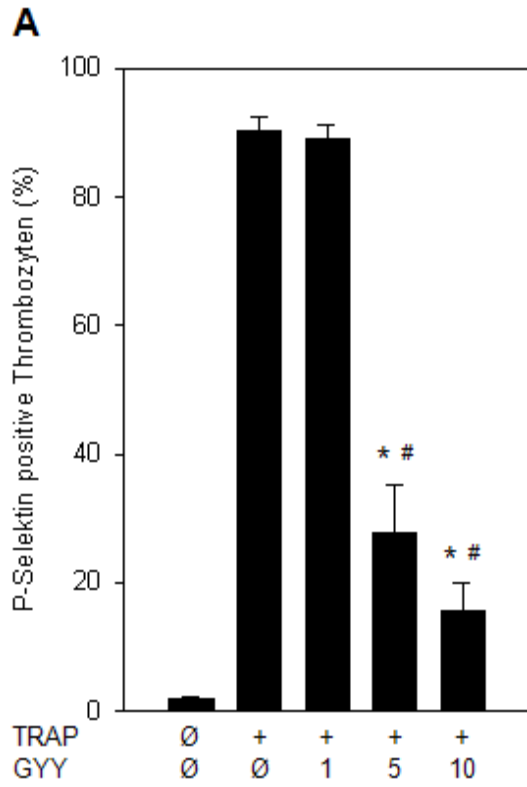


Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse von humanen Thrombozyten. Die Thrombozyten wurden im ruhenden Zustand sowie nach Exposition mit Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid (TRAP) und steigenden GYY Konzentrationen analysiert und auf die Expression der Adhäsionsmoleküle P-Selektin (A) und Glykoprotein Ib (GP<sub>Ib</sub>, B) untersucht. Die Expression des Glykoproteins IIb-IIIa (GP<sub>IIb-IIIa</sub>) wurde durch Bindung des PAC-1 Antikörpers (C) und anhand der Bindung von Fibrinogen (D) bestimmt. Zu sehen ist, dass P-Selektin erst auf TRAP Aktivierung hin extrazellulär exprimiert wird. Ruhende Thrombozyten zeigen hingegen bereits in Ruhe eine konstitutive Expression der Glykoproteinrezeptoren GP<sub>Ib</sub> und GP<sub>IIb-IIIa</sub>. Die Expression von GP<sub>IIb-IIIa</sub> wird durch TRAP Aktivierung gesteigert. Die Exposition von aktivierten Thrombozyten mit GYY führt zu einer dosisabhängigen Reduktion aller untersuchten Adhäsionsmoleküle. MW ± SEM, t-Test mit Bonferroni Korrektur \*  $p < 0,05$  vs TRAP / Ø GYY, #  $p < 0,05$  vs TRAP / GYY 1 mM.

Dabei zeigte die Applikation von 1 mM GYY noch keinen signifikanten Effekt auf die Adhäsionsmolekülexpression aktivierter Thrombozyten. Die Steigerung der GYY Konzentration auf 5 und 10 mM hingegen reduzierte die Adhäsionsmolekülexpression deutlich. Dabei zeigte sich der stärkste Effekt auf die Expression von P-Selektin (Abb. 14A), was anhand des Fluoreszenzshifts deutlich wird (Abb.15).

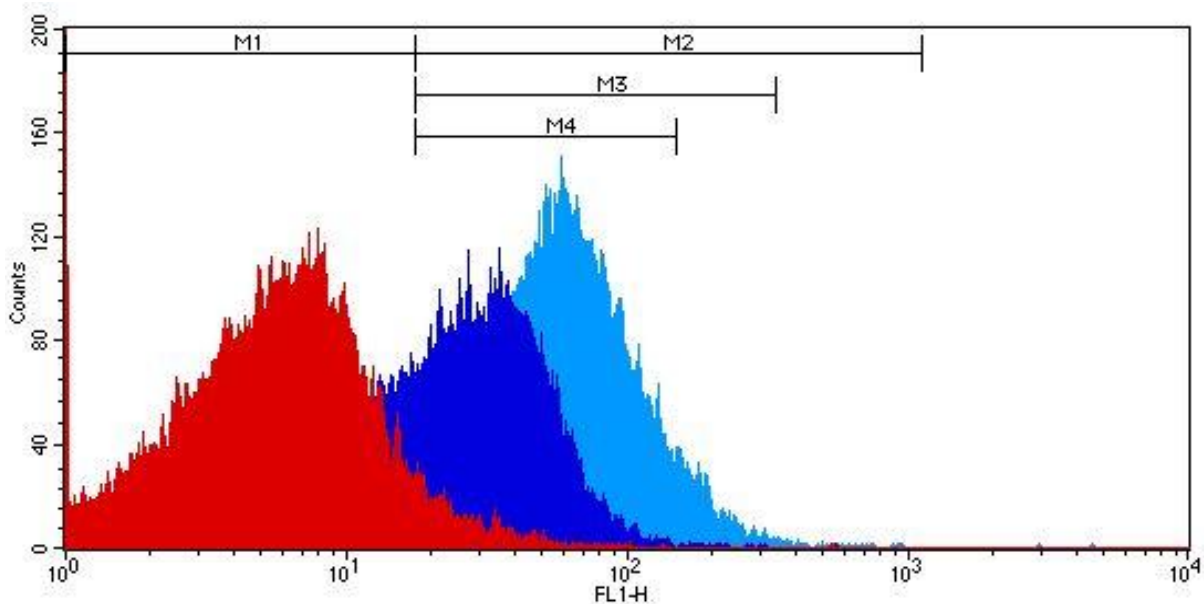


Abb. 15: P-Selektin Expression von humanen Thrombozyten. Die P-Selektin Expression wurde durchflusszytometrisch an Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid (TRAP, hellblau)-stimulierten bzw. mit TRAP und 5 mM GYY (dunkelblau) oder 10 mM GYY (rot)-behandelten Thrombozyten bestimmt. M1 ist der Fluoreszenzbereich nicht stimulierter Thrombozyten. Zu sehen ist, dass die mittlere Fluoreszenz von unbehandelten TRAP-stimulierten Thrombozyten (M2 = 58,41) im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten, die mit 5 mM GYY (M3 = 31,56) bzw. 10 mM GYY (M4 = 20,68) exponiert wurden, dosisabhängig reduziert wird.

Während ca. 90% der unbehandelten TRAP-stimulierten bzw. mit 1 mM GYY-behandelten Plättchen P-Selektin positiv waren, führte die Exposition mit 5 bzw. 10 mM GYY zu einer signifikanten Reduktion P-Selektin positiver Plättchen auf  $28\pm 8\%$  bzw.  $16\pm 4\%$  (jeweils  $p < 0,05$  vs alleinige TRAP Stimulation). Die GYY-induzierte Reduktion der Adhäsionsmolekülexpression zeigte sich ebenso bei den Integrinen  $GP_{Ib}$  und  $GP_{IIb-IIIa}$ .

Die thrombozytäre Exposition des vWF-Rezeptors  $GP_{Ib}$  wurde durch TRAP Stimulation nicht gesteigert. Es zeigte sich jedoch eine Reduktion der mittleren Fluoreszenz aktivierter Thrombozyten auf  $41\pm 2\%$  nach Exposition mit 5 mM GYY bzw.  $32\pm 2\%$  nach 10 mM GYY ( $p < 0,05$  vs alleinige TRAP Stimulation:  $57\pm 4\%$ , Abb. 14B). Sowohl die Bindung von PAC-1 als auch von Fibrinogen an  $GP_{IIb-IIIa}$  exprimierenden Thrombozyten wurde durch die Behandlung mit 5 und 10 mM GYY signifikant reduziert (Abb. 14C und D).

#### 7.4 Plasmatische Konzentration von löslichem P-Selektin

Der Einfluss von GYY auf das Shedding von membrangebundenem P-Selektin und somit die Bildung von löslichem P-Selektin wurde durch die Bestimmung der Konzentration des löslichen P-Selektins im Plasma der Versuchstiere untersucht.

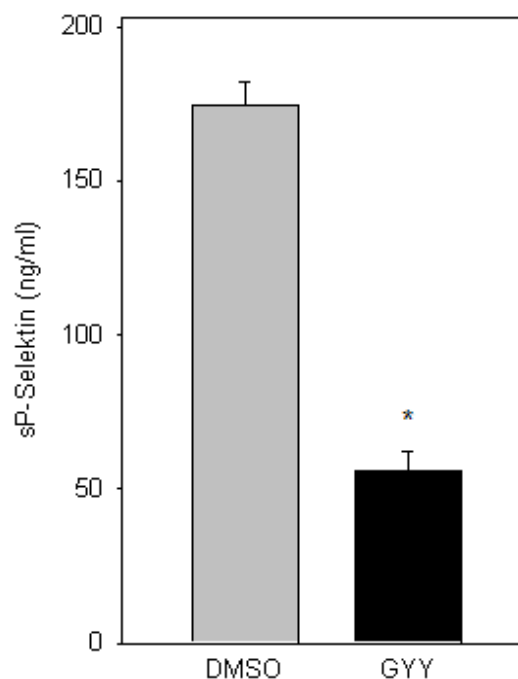
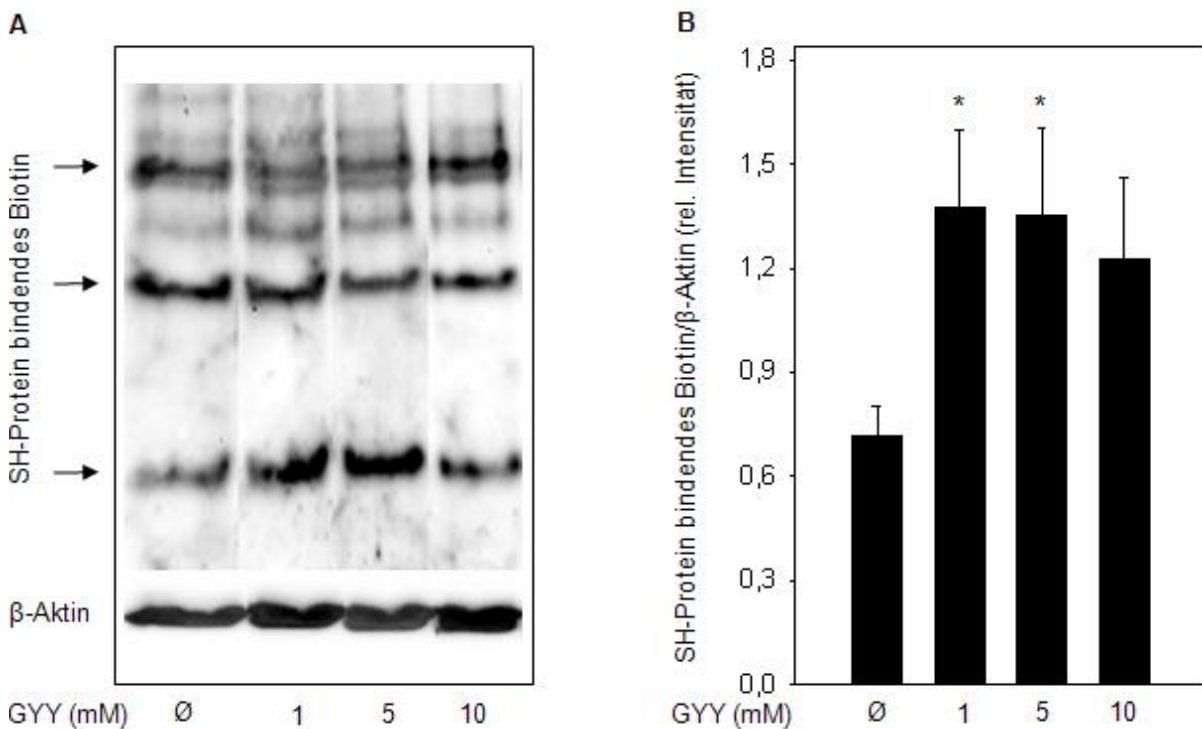


Abb. 16: Konzentration von löslichem (s)P-Selektin im Plasma von GYY- bzw. DMSO-behandelten Versuchstieren nach phototoxischer Thromboseinduktion. MW  $\pm$  SEM, t-Test, \*  $p < 0,05$  DMSO.

Die Behandlung mit GYY reduzierte die plasmatische Konzentration von löslichem P-Selektin nach Thromboseinduktion (Abb. 16). Die Konzentration von löslichem P-Selektin im Plasma von GYY-behandelten Tieren entsprach mit  $56 \pm 7$  ng/ml nur etwa einem Drittel der Konzentration, welche im Plasma von DMSO-behandelten Tieren gemessen wurde ( $p < 0,05$  vs DMSO:  $175 \pm 7$  ng/ml).

### 7.5 Biotin Switch Assay

Bei der Auswertung des Biotin Switch Assay stellen sich im Western Blot Banden dar, die durch die spezifische Bindung von Biotin an sulfhydrierte Proteine hervorgerufen wurden und somit den Grad der S-Sulfydrierung thrombozytärer Proteine widerspiegeln (Abb. 17A).



*Abb. 17: Protein S-Sulfhydrierung humaner Thrombozyten. Repräsentativer Westernblot (A) und entsprechende quantitative Densitometrie (B) des Biotin-Switch-Assay von thrombozytären Proteinen. Der Biotin-Switch-Assay erfolgte entsprechend den Angaben von Mustafa et al. (2009). Zu sehen ist die relative Intensität sulfhydrierter Proteine, welche durch Exposition mit GYY signifikant zunimmt. MW  $\pm$  SEM; t-Test mit Bonferoni Korrektur; \*  $p < 0,05$  vs  $\emptyset$  GYY.*

In der quantitativen densitometrischen Analyse zeigte sich nach Behandlung der Thrombozyten mit 1 und 5 mM GYY eine signifikante Zunahme der relativen Intensität des an SH-Gruppen gebundenen Biotins von  $0,7 \pm 0,1$  in unbehandelten Thrombozyten auf  $1,4 \pm 0,1$  und  $1,4 \pm 0,3$  (jeweils  $p < 0,05$  vs unbehandelte Kontrolle). Dies spricht für eine gesteigerte S-Sulfhydrierung thrombozytärer Proteine. Durch Steigerung der GYY Konzentration auf 10 mM konnte keine weitere Steigerung der thrombozytären Protein S-Sulfhydrierung erreicht werden (Abb. 17B).

## **8 Diskussion**

### **8.1 Diskussion von Material und Methodik**

#### **8.1.1 Hydrogensulfid Donor GYY4137**

Die aktuell verfügbaren H<sub>2</sub>S Donatoren unterscheiden sich wesentlich hinsichtlich der Kinetik der H<sub>2</sub>S Freisetzung. GYY wurde für die vorliegende Studie verwendet, da es im Gegensatz zu bekannten salzförmigen H<sub>2</sub>S Donatoren, wie z.B. NaHS, durch eine geringere, jedoch kontinuierliche und langanhaltende H<sub>2</sub>S Freisetzung gekennzeichnet ist. So wird nach einer Wirkdauer von ca. 30 Minuten die Plasmakonzentration von 50 µM erreicht und für mindestens 180 Minuten aufrechterhalten (Li et al. 2008). Somit spiegelt GYY die physiologische Bildung von H<sub>2</sub>S (Li et al. 2008 & 2009, Whiteman et al. 2010) vergleichbar der endogenen Bildung durch die entsprechenden Enzyme wider. Die geringen freigesetzten H<sub>2</sub>S Konzentrationen sind auch im Hinblick auf die dosisabhängige Wirkung des volatilen Transmitters auf den Organismus, besonders hinsichtlich Entzündungsreaktionen, von Vorteil. So hemmt GYY die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren, wie IL-1β, IL-6 und TNF-α aus LPS-stimulierten Makrophagen (Whiteman et al. 2010). GYY wurde als H<sub>2</sub>S Donor in experimentellen Versuchen (Li et al. 2008 und 2009, Whiteman M et al. 2010, Lisjak et al. 2010) eingesetzt, um unter anderem den Einfluss von H<sub>2</sub>S auf Makrophagen bei Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Inflammation (Whiteman et al. 2010) und auf humane Krebszelllinien (Lee et al. 2011) zu untersuchen.

#### **8.1.2 *In vivo* Thrombosemodell**

##### **8.1.2.1 C57BL/6 Maus**

Bei den für die Experimente verwendeten C57BL/6 Mäusen handelt es sich um einen häufig für Laborversuche verwendeten Inzuchtstamm. Die Tiere sind durch eine hohe Sensibilität für Schmerz und Temperaturen und ein schlechteres Ansprechen auf Analgetika im Vergleich zu anderen Mausstämmen gekennzeichnet. C57BL/6 war der zweite Stamm, dessen Genom vollständig entschlüsselt wurde, sodass detailliertes Wissen über die

Physiologie und Genetik der Tiere verfügbar ist. Dies stellt eine wesentliche Voraussetzung für gezielte genetische Modifikation dar und erklärt die große Popularität dieses Stammes für Laborversuche (Festing 1998).

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, um den Einfluss von Östrogenschwankungen im Hormonhaushalt weiblicher Tiere auf die Mikrozirkulation und die Thrombogenese auszuschließen.

### **8.1.2.2 Modell der Rückenhautkammerpräparation**

Erste experimentelle Untersuchungen zum Studium der Thrombose erfolgten bereits in der Bäckentasche des Hamsters (Kovacs et al. 1975), am Mesenterium (Sato & Ohshima 1984, Jourdan et al. 1995), der Retina (Wilson & Hatchell 1991), dem Periost, der Beinmuskulatur und der Subkutis (Ruecker et al. 2002), im kranialen Gefäßbett (Ishikawa et al. 2002), am Cremastermuskel von Ratte (Lindenblatt et al. 2004) und Maus (Thorlacius et al. 2000) sowie am Ohr der haarlosen Maus (Roesken et al. 1997) und des Kaninchens (Hashimoto et al. 2003). Die Rückenhautkammer wurde erstmals von Algire 1943 an der Maus mit dem Ziel angewendet, Wachstum und Vaskularisierung von implantierten Tumoren zu untersuchen (Algire 1943). Die Anwendung dieser Technik wurde in den folgenden Jahrzehnten erheblich erweitert (Lehr et al. 1993, Menger et al. 1994, Laschke et al. 2001) und gehört heute zu den etabliertesten Modellen, um auf nicht-invasive Weise Angiogenese (Laschke et al. 2002) und Mikrozirkulation durch repetitive Intravitalmikroskopie zu untersuchen (Menger et al. 2002, Vajkoczy et al. 2000, Hoffmann et al. 2000b). Ein Vorteil des Rückenhautkammermodells besteht darin, dass die Untersuchungen der Mikrozirkulation im Gegensatz zu akuten Präparationen, wie der des Cremastermuskels oder des Mesenteriums, nicht unmittelbar nach dem operativen Eingriff, sondern erst einige Tage später erfolgen. Jede Präparation ist mit einem chirurgischen Trauma verbunden, das eine pro-inflammatorische Antwort mit konsekutiver Beeinflussung mikrozirkulatorischer Parameter, wie Gefäßdurchmesser und Blutfluss, zur Folge hat. Auf diese Weise hat die



Operation auch Einfluss auf die Thrombogenese, sodass die Untersuchungen unter unphysiologischen Bedingungen erfolgen (Fiebig et al. 1991). So bewirkt allein eine Laparotomie zur Darstellung der Mesenterialgefäße einen hyperkoagulatorischen Zustand mit verlangsamter Mikrozirkulation und Bildung kleiner Thromben (Weiss 1990). Nach der Präparation der Rückenhautkammer hingegen können sich die Tiere drei Tage bis zum Beginn des eigentlichen Versuchs von der Narkose und dem chirurgischen Trauma der Präparation erholen. Auf diese Weise wird der Einfluss der Operations-assoziierten Inflammation auf die Hämodynamik der Mikrozirkulation minimiert, sodass die intravitale Mikroskopie repetitiv unter nahezu physiologischen Bedingungen erfolgen kann (Laschke et al. 2011).

### 8.1.2.3 Narkose

Sowohl die Präparation der Rückenhautkammer als auch die Intravitalmikroskopie machen eine Narkose unumgänglich. Die verwendete Ketamin/Xylazin Narkose stellt ein weit verbreitetes Anästhesieverfahren im Rahmen von tierexperimentellen Untersuchungen.

Der Wirkmechanismus von Ketamin besteht in einer Blockade des NMDA-Rezeptor an der Phencyclin-Bindestelle. Ketamin verhindert somit die NMDA-Rezeptor-abhängige Acetylcholinfreisetzung, was eine schnelle Bewusstlosigkeit und suffiziente Analgesie bewirkt. Weiterhin verstärkt Ketamin die Wirkung von Katecholaminen, wie Noradrenalin und Dopamin, durch Hemmung der peripheren Wiederaufnahme an der synaptischen Endplatte. Dies führt zu einer Stimulation des Herz-Kreislauf-Systems mit Steigerung des Herzschlagvolumens, gesteigerter Herzfrequenz und erhöhtem Blutdruck. Ketamin bewirkt jedoch keine Muskelrelaxierung (Adams & Werner 1997).

Xylazin bewirkt ebenso eine Analgesie und führt darüber hinaus zu einer Muskelrelaxierung. Es wirkt als Agonist an zentralen und peripheren  $\alpha_2$ -Rezeptoren. Die Wirkung auf den Blutkreislauf ist zeitabhängig, wobei es durch Stimulation peripherer  $\alpha_2$ -

Rezeptoren zunächst zu einem Blutdruckanstieg und einer verminderten Herzfrequenz kommt. Später führt die überwiegende Wirkung auf die zentralen  $\alpha_2$ -Rezeptoren zu einer herabgesetzten Aktivität des Sympathikus und damit zu einer Bradykardie (Wright 1982) mit AV-Blöcken 2. Grades (Alef & Oechtering 2003), einem Abfall des Herzminutenvolumens (Muir et al. 1979) und einer erniedrigten ventrikulären Kontraktion (Benson & Thurmon 1990). Xylazin bewirkt darüber hinaus eine ausgeprägte Sedierung und Hypnose.

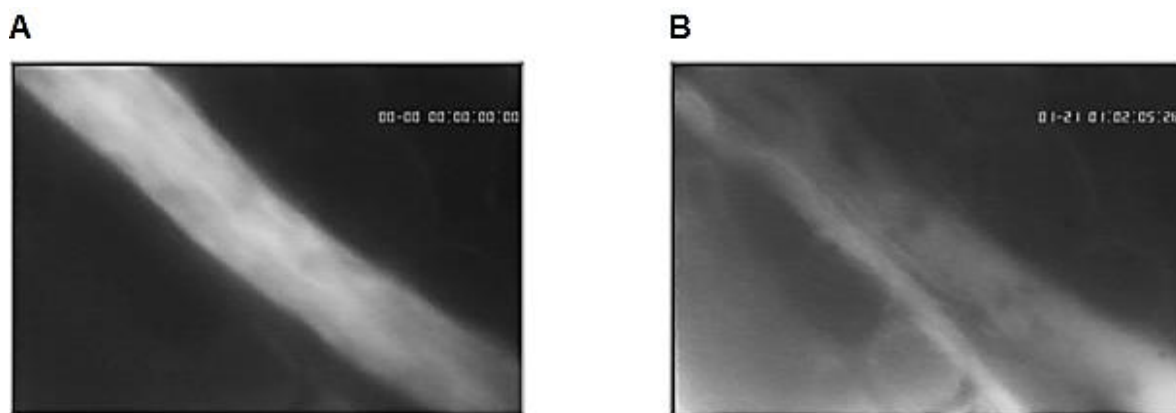
#### 8.1.2.4 Intravitalmikroskopische Thromboseinduktion

Die Kombination von Epi-Illumination und *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie stellen eine etablierte Methode zur Untersuchung der Mikrozirkulation des Gehirns (Villringer et al. 1989), des Herzens (Vollmar et al. 1995), der Lunge (Kuhnle et al. 1993), des Pankreas (Vollmar et al. 1994, Vajkoczy et al. 1999), des Darms (Bohlen & Gore 1976), des Mesenteriums (Zweifach 1973), der Niere (Steinhausen et al. 1981), des Knochens (Winet 1989, Ruecker et al. 2002), der Haut (Barker et al. 1989) und des Skelettmuskels (Menger et al. 1992a & b) dar.

Die Intravitalmikroskopie ermöglicht die direkte Visualisierung von Blutgefäßen und gestattet die Untersuchung zirkulierender Blutbestandteile, wie Leukozyten und Thrombozyten, durch Applikation von spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen (Menger et al. 1992a & b, Hoffmann et al. 1999 & 2000a, Knappe et al. 2005). Sie ermöglicht die visuelle und quantitative Analyse von Hämodynamik und Gefäßpermeabilität (Pries 1988), von Zellschäden (Westermann et al. 1999) und von Inflammation (Geeraedts et al. 1998).

Die erste phototoxische Thromboseinduktion erfolgte 1977 durch Rosenblum & El-Sabban in Gefäßen der Pia mater der Maus (Rosenblum & El-Sabban 1977). Grundlage der intravitalmikroskopischen Thromboseinduktion ist die durch kontinuierliche, lokale Lichtexposition hervorgerufene Phototoxizität des Fluorochromes FITC-Dextran. Dabei wird der Farbstoff durch das von der Quecksilberdampflampe ausgesandte Licht energetisch angeregt und erreicht ein höheres Energieniveau, welches jedoch nur für einen

Sekundenbruchteil gehalten wird. Kehren die Moleküle in ihren Ausgangszustand zurück, so kommt es zur Aussendung eines Photons, welches im Grünlichtfilter visualisiert wird. Durch diese energetische Anregung kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen (Rumbaut & Sial 1999, Herrmann 1983), welche lokal Endothelzellen schädigen und so zur Freisetzung von TF führen, der zur Adhärenz von Thrombozyten an die Gefäßwandläsion beiträgt (Valzeno 1987, Osterlund et al. 2001, Engelmann et al. 2003, Sato & Ohshima et al. 1984, Rumbaut et al. 2004). Somit ist der Endothelschaden durch Aktivierung von Thrombozyten und benachbarten Endothelzellen die Grundlage der Thrombusbildung (Inamo et al. 1996, Valzeno et al. 1987, Saniabadi et al. 1995, Osterlund et al. 2001, Engelmann et al. 2003). Durch diese Prozesse kommt es zur Anlagerung der Thrombozyten an die Gefäßwand, zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten und Leukozyten und konsekutiv zum vollständigen thrombotischen Gefäßverschluss im fokussierten Areal (Abb. 18).



*Abb. 18: Intravitalmikroskopische Thromboseinduktion. Aufnahmen einer Venole vor (A) und nach phototoxischer Thromboseinduktion (B). Die Thromboseinduktion erfolgte unter Verwendung eines 63-fachen Wasserimmersionsobjektivs. Zur besseren Kontrastierung des intravasalen Raums wurde FITC-Dextran intravenös appliziert.*

In Arteriolen, nicht jedoch Venolen, bewirkt die Photoaktivierung zusätzlich eine Vasokonstriktion. Um den Einfluss der Modell-bedingten Vasokonstriktion auf die

Thrombogenese auszuschließen, wurden in der vorliegenden Studie ausschließlich Venolen untersucht.

### 8.1.3 Subaquale Schwanzvenen-Blutungszeit

Es handelt sich hierbei um eine *in vivo* Methode zur Erfassung der primären Hämostase. Die Bestimmung der Blutungszeit erfolgt beim Menschen klassisch am Ohrläppchen, der Fingerbeere oder am Unterarm und wurde als subaquale Schwanzvenen-Blutungszeit auf die Maus übertragen. Sie erlaubt eine Aussage über die Funktionsfähigkeit von Thrombozyten bei der Bildung eines primären Hämostasethrombus. So liegt bei ausschließlich plasmatischen Gerinnungsstörungen meist eine normale Blutungszeit vor. Eine exogene Beeinflussung ist z.B. durch aggregationshemmende Substanzen möglich.

### 8.1.4 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter, FACS) kombinieren die Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz. Bei einer Messung werden suspendierte Zellen durch Überdruck in eine Kapillare gepresst und einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Der Laser erfasst dabei die Lichtstreuung als Vorwärtsstreuung (FSC) und rechtwinklig zu dieser als Seitwärtsstreuung (SSC). Dabei wird die FSC durch die Zellgröße und die SSC durch die intrazelluläre Granularität und die Membranbeschaffenheit bestimmt, was die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen ermöglicht. Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern können zusätzlich Strukturen auf Zellmembranen erfasst und quantitativ ausgewertet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Eigenschaft genutzt, um die Expression von thrombozytären Adhäsionsmolekülen zu untersuchen.

Die für die Durchflusszytometrie verwendeten GYY Konzentrationen (1 mM, 5 mM und 10 mM) wurden entsprechend den Ergebnissen von Li et al. gewählt (Li et al. 2008). Wie durch die Untersuchungen von Li et al. dargestellt, führt 1 mM GYY *in vitro* zu einer

kontinuierlichen Freisetzung von H<sub>2</sub>S mit einer „steady state“ Konzentration von ca. 5 µM. Daraus kann geschlossen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten GYY Konzentrationen im „steady state“ zu Konzentrationen von ca. 5 µM, 25 µM bzw. 50 µM H<sub>2</sub>S führen. Dabei entspricht die höchste erreichte H<sub>2</sub>S Konzentration von 50 µM dem physiologischen Bereich der in humanem Plasma gemessenen H<sub>2</sub>S Konzentrationen, welche zwischen 34 und 65 µM liegen (Whiteman & Moore 2009).

### **8.1.5 Biotin Switch Assay**

Die Technik des Biotin Switch Assay diente ursprünglich zum Detektieren von NO-bedingten Protein Nitrosylierungen (Jaffrey & Snyder 2001). Durch Modifikation des Assays ist es jedoch auch möglich, die H<sub>2</sub>S-vermittelte Protein S-Sulphydrierung zu messen (Mustafa et al. 2009). Das Prinzip besteht in der Bindung von Biotin an -SSH- und freie Thiolgruppen. Die Thiolgruppen werden durch MMTS blockiert, sodass die Biotinylierung ausschließlich an -SSH-Gruppen erfolgt (Mustafa et al. 2009). Die S-Sulphydrierung wird somit indirekt durch Biotinylierung nachgewiesen, die durch anti-Biotin Antikörper sichtbar gemacht und quantitativ ausgewertet werden kann.

## **8.2 Diskussion der Ergebnisse**

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von H<sub>2</sub>S auf die mikrovaskuläre Thrombogenese im Model der dorsalen Rückenhautkammer in Mäusen sowie auf die Aktivität und Protein S-Sulphydrierung humaner Thrombozyten untersucht.

Die Behandlung der Versuchstiere mit dem H<sub>2</sub>S Donor GYY resultiert in einer signifikanten Verlängerung der Dauer bis zum vollständigen thrombotischen Gefäßverschluss durch intravitalmikroskopische Thromboseinduktion. Bei der offline durchgeführten Videoanalyse der venulären Mikrozirkulation vor der Thromboseinduktion zeigte sich, dass sich weder der Gefäßdurchmesser noch die erythrozytäre Blutflussgeschwindigkeit (Tabelle 1, siehe Anhang) signifikant zwischen GYY- und DMSO-

behandelten Tieren differieren und somit deren Einfluss auf die Thrombogenese zu vernachlässigen ist. Die nach der Thromboseinduktion gemessene plasmatische Thrombozytenzahl (Tabelle 2, siehe Anhang) ist ebenfalls nicht durch GYY bzw. DMSO beeinflusst, sodass die Induktion einer Thrombozytopenie durch die Behandlung der Versuchstiere als Ursache für die prolongierte Thrombogenese ausgeschlossen werden kann.

Als einen möglichen Mechanismus des anti-thrombogenen Effekts des H<sub>2</sub>S Donors ist die Beeinflussung der Hämostase im Sinne einer alterierten Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion zu diskutieren. Das Binden von Thrombozyten an endotheliale bzw. subendotheliale Strukturen im Bereich einer Gefäßwandläsion wird wesentlich durch Adhäsionsmoleküle auf Thrombozyten und Endothelzellen ermöglicht. Bei den durchflusszytometrisch untersuchten Adhäsionsmolekülen GP<sub>Ib</sub>, GP<sub>IIB-IIIa</sub> und P-Selektin handelt es sich um Rezeptoren, welche wesentlich die primäre Hämostase vermitteln. Sowohl P-Selektin als auch GP<sub>Ib</sub> sind entscheidend am Rollen und der initialen Adhäsion von Thrombozyten im Bereich eines Gefäßwanddefekts beteiligt. GP<sub>IIB-IIIa</sub> stabilisiert die Thrombusbildung durch Aggregation der Thrombozyten über Fibrinogenbrücken. Die beiden Glykoproteinrezeptoren sind dabei klassische pro-thrombogene Adhäsionsmoleküle, die durch die Bindung von vWF bzw. Fibrinogen die thrombozytäre Adhäsion während der primären Hämostase fördern. Darüber hinaus hat GP<sub>IIB-IIIa</sub> durch Vermittlung eines „outside-in-signaling“ Einfluss auf die Formveränderung von Thrombozyten während der Zellaktivierung (Shattil & Newman 2004). Die Signalkaskade beginnt mit Aktivierung des Rezeptors und resultiert in einer dynamischen Änderung der Aktinstruktur des Cytoskeletts, welche für die thrombozytäre Formänderung im Sinne einer Entrundung der Zellen und der Ausbildung von Pseudopodien wichtig ist. Da die Vernetzung von Thrombozyten durch Fibrinogenbrücken, welche sekundär in stabilere Fibrinmonomere gespalten werden, essentiell für die Bildung eines beständigen Thrombus ist, hat das GP<sub>IIB-IIIa</sub> indirekt auch Einfluss auf die sekundäre Hämostase.

Auch Selektine tragen über die Rekrutierung weiterer Thrombozyten und Leukozyten zur Thrombogenese bei. So führt die Defizienz von P-Selektin in Mäusen zu einer verlängerten Schwanzvenen-Blutungszeit als Ausdruck einer beeinträchtigten primären Hämostase (Subramaniam et al. 1996). Die durch P-Selektin vermittelte Bindung ist nicht so stark wie die der Glykoproteine, sodass das Selektin besonders für die Adhäsion und das Rollen von Thrombozyten auf dem vaskulärem Endothel unter geringen Scherkräften, wie sie in Venolen bestehen, von Bedeutung ist (Furie et al. 2001). P-Selektin fördert weiterhin die Thrombogenese, indem es die Fibrinablagerung steigert, wodurch P-Selektin die Größe und Stabilität des Thrombus beeinflusst (Merten et al. 2000). Die Bedeutung von P-Selektin für die Thrombogenese zeigt sich auch anhand einer von Ramacciotti et al. durchgeführten Metaanalyse, welche die Wirkung von P-Selektin Inhibitoren gegenüber Enoxaparin auf die venöse Thromboembolie im Tiermodell vergleicht. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass P-Selektin Inhibitoren die Wiedereröffnungsrate von Venen nach einer Thrombose verbessern und die venöse Insuffizienz als Folge der Thrombose reduzieren (Ramacciotti et al. 2010).

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigt sich anhand der Intensität der Antikörperbindung bzw. des mittleren Fluoreszenzshifts, dass GYY dosisabhängig die Expression der Adhäsionsmoleküle  $GP_{Ib}$ ,  $GP_{IIb-IIIa}$  und P-Selektin reduziert. Ein toxischer Effekt von GYY auf die Blutplättchen ist als Ursache auszuschließen, da auch vom  $H_2S$  Donor NaHS in der Konzentration von 10 mM kein schadhafter Effekt auf Thrombozyten nachgewiesen werden konnte (Zagli et al. 2007). Dies ist insofern relevant, als dass NaHS zu einer wesentlich höheren  $H_2S$  Freisetzung gegenüber GYY führt. Es kann somit geschlussfolgert werden, dass der  $H_2S$  Donor GYY durch die Reduktion der Adhäsionsmolekülexpression die thrombozytäre Adhäsion und Aggregation während der primären Hämostase reduziert und somit das Thrombuswachstum beeinträchtigt.

P-Selektin wird als Transmembranprotein klassischerweise von aktivierten Thrombozyten exprimiert. In ruhenden Blutplättchen ist P-Selektin in den Membranen von

alpha Granula gespeichert, welche auf einen pro-thrombogenen Stimulus hin mit der Zellmembran fusionieren und so membrangebundene Rezeptoren wie P-Selektin und GP<sub>Ib-IIIa</sub> extrazellulär exprimieren. Membrangebundenes P-Selektin kann durch nicht-proteolytische Vorgänge abgespalten werden, was zur Bildung der im Plasma gelösten Form führt. Löslichem P-Selektin kommt somit eine Funktion als Marker für die thrombozytäre Aktivität zu, da die plasmatische Konzentration mit der Aktivierung der Thrombozyten korreliert (Frijns et al. 1997, Ferroni et al. 2009). Lösliches P-Selektin ist selbst pro-koagulatorisch. So konnte gezeigt werden, dass die Applikation von löslichem P-Selektin IgG1 die Fibrinablagerung im Bereich von Gefäßwandläsionen steigert und die Bildung von pro-koagulatorischen Mikropartikeln fördert (André et al. 2000).

Die Reduktion der plasmatischen Konzentration von löslichem P-Selektin nach Thromboseinduktion in GYY-behandelten Tieren kann somit als Ausdruck einer reduzierten thrombozytären Aktivität gewertet werden und spiegelt die anti-thrombogene Wirkung des H<sub>2</sub>S Donors wider.

Weiterhin zeigt die Verlangsamung des Thrombuswachstums in Venolen von DMSO-behandelten Tieren nach Applikation des anti-P-Selektin Antikörpers, dass die Blockade von P-Selektin anti-thrombogen ist. Dies spricht dafür, dass die reduzierte thrombozytäre P-Selektin Expression an der anti-thrombogenen Wirkung des H<sub>2</sub>S Donors beteiligt ist.

Eine mögliche Ursache der reduzierten thrombozytären P-Selektin Expression könnte in der Blockade der Exozytose von alpha Granula bestehen. Die Bedeutung der Granula für die Thrombogenese ergibt sich aus ihrem Inhalt. Sie speichern sowohl membrangebundene Adhäsionsmoleküle, die von Thrombozyten nach Fusion der Granula mit der Zellmembran exprimiert werden können als auch lösliche Proteine, die ins Plasma abgegeben werden, darunter auch die Rezeptoren P-Selektin, GP<sub>Ib</sub> und GP<sub>Ib-IIIa</sub> (Blair & Flaumenhaft 2009). Unter den gespeicherten Proteinen spielen der vWF und Fibrinogen als Liganden von GP<sub>Ib</sub> bzw. GP<sub>Ib-IIIa</sub> für die Stabilisierung und das Wachstums des Thrombus



während der primären Hämostase die größte Rolle. Somit kommt den thrombozytären Granula eine entscheidende Bedeutung während der Formierung eines Thrombus zu. Die Reduktion der Granula Exozytose durch  $H_2S$  würde die Thrombogenese folglich durch verminderte Rezeptorexpression, begrenzt induzierbare  $GP_{Ib-IIIa}$ -vermittelte intrazellulären Signalwege und reduzierte Freisetzung pro-thrombogener Plasmaproteine beeinflussen.

Die Fusion der alpha Granula mit der Zellmembran wird wesentlich durch den soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (SNARE) Komplex vermittelt. Dieser Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, dem vesikulär gebundenem v-SNARE und dem an die Zellmembran gebundenem t-SNARE. Während der Exozytose der Granula kommt es zu einer Aneinanderlagerung der Untereinheiten, sodass die intrazellulären Vesikel in die Nähe der Zellmembran gelangen. Dies ermöglicht die Fusion der Vesikelmembran mit der zytoplasmatischen Membran und erlaubt die Exozytose des Granulainhalts bzw. die extrazelluläre Präsentation membrangebundener Rezeptorstrukturen durch Einbau der Granulamembran in die Zellmembran. Die Funktion des SNARE Komplex ist dabei wesentlich vom N-ethylmaleimide-sensitive-factor (NSF), intrazellulärem ADP und  $Ca^{2+}$  abhängig. Die Behandlung mit dem  $H_2S$  Donor könnte sowohl Einfluss auf die Funktion von NSF als auch auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Konzentration haben. So wurde gezeigt, dass  $H_2S$  die intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Konzentration von glatten Muskelzellen zerebraler Arteriolen durch Aktivierung von  $Ca^{2+}$  Kanälen senkt und somit zu einer Vasodilatation führt (Liang et al. 2012).  $H_2S$  hemmt ebenso L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle in Myozyten und reduziert ihre mechanische Kontraktion (Sun et al. 2008). In Thrombozyten erfolgt der Einstrom von  $Ca^{2+}$  während der Zellaktivierung wesentlich durch ORAI-1 Kanäle (Braun et al. 2009).  $H_2S$  könnte die Funktion dieser  $Ca^{2+}$  Kanäle durch Protein S-Sulphydrierung von Cysteinresten modulieren. Dass durch S-Sulphydrierung die Funktion von Kanälen beeinflusst werden kann, wurde bereits anhand von  $K_{ATP}$  Kanälen gezeigt. Die S-Sulphydrierung der Sur6 Untereinheit führt zum Öffnen der  $K_{ATP}$  Kanäle und zum Ausstrom von Kaliumionen aus der Zelle, welche konsekutiv hyperpolarisiert (Sun et al. 2011). Auf ähnliche Weise könnte die S-

Sulfhydrierung von  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen Einfluss auf die thrombozytäre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration haben und somit die Funktion des SNARE Komplex während der Exozytose von alpha Granula beeinflussen.

Durch Protein S-Sulfhydrierung könnte  $\text{H}_2\text{S}$  ebenso die Funktion von NSF beeinflussen. Es ist bekannt, dass eine Nitrosylierung durch NO zu einer Inhibition von NSF führt und die Exozytose der Granula reduziert (Morrell et al. 2005). Ursächlich könnte eine Veränderung der Proteinstruktur sein, die zu einem Funktionsverlust führt. Analog könnte die  $\text{H}_2\text{S}$ -vermittelte Protein S-Sulfhydrierung die Funktion von NSF beeinflussen und somit wiederum die SNARE-vermittelte Exozytose von alpha Granula modulieren.

Die Analyse der S-Sulfhydrierung von thrombozytären Proteinen mittels Biotin Switch Assay in der vorliegenden Arbeit zeigt, dass der Anteil sulfhydrierter Proteine durch Applikation von GYY signifikant gesteigert wird. Im Gegensatz zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte jedoch keine Dosisabhängigkeit aufgezeigt werden. Eine mögliche Ursache für die fehlende Dosisabhängigkeit könnte die Anzahl vorhandener Cysteinreste sein, die einen limitierenden Faktor für die Protein S-Sulfhydrierung darstellen. Somit würde bereits durch die niedrigste GYY Konzentration ein Großteil der Cysteinreste sulfhydriert. Es bleibt jedoch ungeklärt, welche der thrombozytären Proteine in welcher Intensität und an welcher Position sulfhydriert werden.

Die Protein S-Sulfhydrierung könnte weiterhin die durchflusszytometrisch nachgewiesene reduzierte Bindung von PAC-1 an aktivierte Thrombozyten erklären. Bei PAC-1 handelt es sich um einen Antikörper, der ausschließlich die aktivierte und hochaffine Konformation des  $\text{GP}_{\text{IIb-IIIa}}$  Rezeptors erkennt und bindet. Die durch  $\text{H}_2\text{S}$  Exposition reduzierte Bindung von PAC-1 an aktivierte Thrombozyten kann sowohl im Zusammenhang mit einer geringeren Rezeptorexpression als auch mit einer verminderten Rezeptoraktivierung stehen. Dabei könnte  $\text{H}_2\text{S}$  analog zur Modulation der  $\text{K}_{\text{ATP}}$  Kanal Aktivität durch Protein S-Sulfhydrierung der Untereinheiten von  $\text{GP}_{\text{IIb-IIIa}}$  die Proteinstruktur verändern und somit die Konformationsänderung blockieren. Folglich könnte sich Fibrinogen nur an die

niedrigaffine Rezeptorform anlagern, deren Bindungsstärke nicht suffizient genug ist, um eine dauerhaft stabile Thrombozytenaggregation zu gewährleisten. Dies würde wiederum die im Vergleich mit der PAC-1 Bindung stärkere Reduktion der Fibrinogenbindung nach GYY Behandlung erklären.

Aufgrund der Fähigkeit, Zellmembranen auch ohne spezifische Transporter zu durchdringen, ist es ebenso wahrscheinlich, dass das von GYY liberierte  $H_2S$  nicht nur die zellulären Blutbestandteile, sondern auch Endothelzellen durch den Prozess der S-Sulfhydrierung von Proteinen sowie durch die Modifikation von Ionenkanälen in ihrer Funktion beeinflusst. So könnte  $H_2S$  auch einen Einfluss auf die Exozytose von Weibel-Palade Körperchen haben. Es handelt sich hierbei um endotheliale Granula, die Proteine, wie z.B. vWF, P-Selektin, FXIIIa, Eotaxin und Interleukin-8, zur Steuerung der Thrombogenese und von Entzündungsreaktionen speichern (Lowenstein et al. 2005). Die Fusion der Weibel-Palade Körperchen mit der Zellmembran wird analog zur Exozytose der alpha Granula durch den SNARE Komplex vermittelt (Lowenstein et al. 2005). Somit könnte  $H_2S$  durch Modulation der  $Ca^{2+}$  Konzentration in Endothelzellen und S-Sulfhydrierung von NSF ebenso Einfluss auf die Funktionalität des SNARE Komplexes in Endothelzellen und folglich auf die Exozytose pro-thrombogener Weibel-Palade Körperchen haben. Auf diese Weise würde zusätzlich zum thrombozytären P-Selektin endotheliales P-Selektin reduziert exprimiert bzw. abgespalten werden, was wiederum das Rollen von Thrombozyten und Leukozyten auf Endothelzellen während der primären Hämostase reduzieren würde. Außerdem könnte weniger vWF ins Plasma abgegeben werden, wodurch die Adhäsion von Thrombozyten via  $GP_{Ib}$  an subendotheliale Strukturen gestört würde. Die mögliche Beeinflussung der Endothelzellfunktion stellt somit eine weitere Erklärung für die anti-thrombogene Wirkung von  $H_2S$  dar.

Die im aktuellen Modell erhobenen Daten beziehen sich primär auf die venoläre Thrombogenese. Durch Modulation der Exozytose von alpha Granula und Weibel-Palade Körperchen und somit des vWF könnte  $H_2S$  jedoch auch die arterioläre Thrombogenese be-

einflussen. Die Bindung von Thrombozyten an Gefäßwandläsionen basiert aufgrund der im Gegensatz zu Venolen deutlich höheren Scherkräfte wesentlich auf der starken  $GP_{Ib}$  - vWF Bindung. Obwohl sich die Pathophysiologie der Thrombusbildung in Arteriolen durch unterschiedliche Gefäßwandeigenschaften sowie höhere Blutflussgeschwindigkeiten und Strömungsverhältnisse deutlich von der Pathophysiologie in Venolen unterscheidet, könnte  $H_2S$  durch Reduktion der vWF Konzentration im Plasma auch in Arteriolen eine anti-thrombogene Wirkung entfalten.

In diesem Zusammenhang ist weiterhin anzunehmen, dass  $H_2S$  nicht nur die mikrovaskuläre Thrombogenese beeinflusst, sondern auch die Bildung von Thrombosen im makrovaskulären Gefäßsystem verzögert.

Die vorliegende Arbeit gibt weiterhin eine Erklärung für die von Zagli et al. beschriebene Hemmung der Thrombozytenaggregation durch  $H_2S$  (Zagli et al. 2007). Zagli et al. hatten als mögliche Ursache sowohl die endogene Bildung von cAMP, cGMP und NO durch  $H_2S$  als auch die Rolle von  $K_{ATP}$  Kanälen ausgeschlossen, ohne einen Mechanismus definieren zu können. Im Zusammenhang mit den aktuellen Ergebnissen kann nun geschlussfolgert werden, dass die beschriebenen anti-aggregatorischen Effekte von  $H_2S$  auf der Modifikation thrombozytärer Proteine durch  $H_2S$ -vermittelte S-Sulfhydrierung beruhen könnten. Durch diesen Mechanismus könnte  $H_2S$  sowohl die Aktivierbarkeit von Thrombozyten modulieren als auch Einfluss auf die Exozytose pro-thrombogener alpha Granula nehmen und konsekutiv seine anti-thrombogene Wirkung vermitteln.

## 9 Schlussfolgerung

H<sub>2</sub>S ist ein endogenes Pharmakon, das aufgrund seiner pleiotropen Funktion in verschiedenen Bereichen als Therapeutikum eingesetzt werden könnte (Wallace 2007). Die Applikation könnte sowohl inhalativ, in Form von Gasgemischen, oder an Donatoren, wie GYY, gebunden oral bzw. parenteral erfolgen. So wurde zum Beispiel der Cyclooxygenase Inhibitor Diclofenac mit H<sub>2</sub>S-liberierenden funktionellen Gruppen modifiziert. Das Produkt S-Diclofenac ist aktuell Gegenstand zahlreicher experimenteller Untersuchungen und weist ebenso wie andere H<sub>2</sub>S Donatoren anti-inflammatorische (Li et al. 2007, Wallace et al. 2007) und kardioprotektive (Rossoni et al. 2008, Beltowski et al. 2010, Zhang et al. 2011) Eigenschaften auf. Das Naproxenderivat ATB-346 ist ein weiterer H<sub>2</sub>S Donor, der im Tierexperiment die gleiche anti-inflammatorische Potenz wie Naproxen besitzt, dabei jedoch weniger gastrointestinale Nebenwirkungen aufweist und im Gegensatz sogar die Heilung bestehender Ulcera fördert (Wallace et al. 2010).

Eine klinische Anwendung von H<sub>2</sub>S-liberierenden Substanzen ist jedoch als durchaus kritisch zu sehen, da aktuell keine genauen Daten über die physiologische H<sub>2</sub>S Konzentration im menschlichen Organismus vorliegen. Die gemessenen Konzentrationen schwanken von nano- bis mikromolar, wobei die niedrige Konzentrationen eher als physiologisch angesehen werden (Furne et al. 2008, Hughes et al. 2009, Tangerman 2009, Whiteman & Moore 2009). Die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen dabei auf der Detektion unterschiedlicher Speicherformen von H<sub>2</sub>S durch verschiedene Messmethoden (Vandiver & Snyder 2012). Die Definition eines sicheren Referenzbereichs für die endogene H<sub>2</sub>S Konzentration ist essentiell, um schädliche Nebenwirkungen zu vermeiden. Letztere beruhen wesentlich auf der Bindung von H<sub>2</sub>S an die Cytochrom-C Oxidase und konsekutiver Hemmung der mitochondrialen Atmungskette (Lloyd 2006, Hughes et al. 2009). Weiterhin bleibt zu bedenken, dass aufgrund der pleiotropen Effekte auf verschiedene Organsysteme mit einer Vielzahl von Interaktionen und möglichen Nebenwirkungen zu rechnen ist. In diesem Zusammenhang wäre ein Donor, wie GYY, mit kontinuierlicher Freisetzung geringer

H<sub>2</sub>S Konzentrationen für den klinischen Einsatz sowohl hinsichtlich der Steuerbarkeit als auch des Nebenwirkungsprofils vorteilhaft.

Aktuell ist der H<sub>2</sub>S Donor Na<sub>2</sub>S (IK-1001) in klinischer Erprobung zur Therapie von Ischämie/Reperfusion-Schäden (NCT00858936). Sollte sich dessen klinische Anwendbarkeit bestätigen, so könnten Prävention und Therapie von Thrombosen weitere Anwendungsbereiche sein.

Das Resultat der vorliegenden Arbeit, die experimentell nachgewiesene anti-thrombogene Wirkung von H<sub>2</sub>S, erweitert das funktionelle Spektrum des Gases und somit dessen therapeutisches Potential. Die Analyse des molekularen Wirkmechanismus und der Beeinflussung intrazellulärer Prozesse in Thrombozyten während der Hämostase bedürfen weiterer Studien und sind essentiell, um einen klinischen Einsatz von H<sub>2</sub>S zu realisieren.

## 10 Literaturverzeichnis

- Abe K, Kimura H. **The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator** J Neurosci. 1996;16:1066-71.
- Adams HA, Werner C. **From the racemate to the eutomer: (S)-ketamine. Renaissance of a substance?** Anaesthesist. 1997;46:1026-42.
- Aird WC. **Hemostasis and irreducible complexity.** J Thromb Haemost. 2003;1:227-30.
- Alberio L, Dale GL. **Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways.** Eur J Clin Invest. 1999;29:1066-76.
- Alef M, Oechtering G. **Reflections on anesthetic risk.** Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 1998;26:302-14.
- Algire GH. **An adaption of the transparent-chamber technique to the mouse.** J Natl Cancer Inst. 1943;4:1-11.
- André P, Hartwell D, Hrachovinová I, Saffaripour S, Wagner DD. **Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:13835-40.
- Bagot CN, Arya R. **Virchow and his triad: a question of attribution.** Br J Haematol. 2008;143:180-90.
- Banerjee R, Zou CG. **Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein.** Arch Biochem Biophys. 2005;433:144-56.
- Beard RS Jr, Bearden SE. **Vascular complications of cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency: future directions for homocysteine-to-hydrogen sulfide research.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011;300:H13-26.
- Bearden SE, Beard RS Jr, Pfau JC. **Extracellular transsulfuration generates hydrogen sulfide from homocysteine and protects endothelium from redox stress.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;299:H1568-76.
- Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. **Endothelial function and hemostasis.** Z Kardiol. 2000;89:160-7.
- Becker BF, Zahler S, Seligmann C, Kupatt C, Habazettl H. **Interaction of adenosine with leukocytes and thrombocytes.** Z Kardiol. 1996;85:161-70.
- Belardinelli MC, Chabli A, Chadeaux-Vekemans B, Kamoun P. **Urinary sulfur compounds in Down syndrome.** Clin Chem. 2001;47:1500.
- Bełtowski J, Jamroz-Wiśniewska A, Tokarzewska D. **Hydrogen sulfide and its modulation in arterial hypertension and atherosclerosis.** Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2010;8:173-86.
- Benson GJ, Thurmon JC. **Intravenous anesthesia.** Vet Clin North Am Equine Pract. 1990;6:513-28.
- Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie BC, Ginsberg MH, Furie B. **A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein.** J Clin Invest. 1986;78:130-7.
- Biermann J, Lagrèze WA, Schallner N, Schwer CI, Goebel U. **Inhalative preconditioning with hydrogen sulfide attenuated apoptosis after retinal ischemia/reperfusion injury.** Mol Vis. 2011;17:1275-86.

- Blair P, Flaumenhaft R. **Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates.** Blood Rev. 2009;23:177-89.
- Blum A, Shamburek R. **The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis.** Atherosclerosis. 2009;203:325-30.
- Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD. **Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability.** Biochemistry (Mosc). 2002;67:75-84.
- Bohlen HG, Gore RW. **Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies.** Microvasc Res. 1976;11:103-10.
- Bolhuis PA, Sakariassen KS, Sixma JJ. **Adhesion of blood platelets to human arterial subendothelium: role of factor VIII-Von Willebrand factor.** Haemostasis. 1979;8:312-23.
- Borges E, Tietz W, Steegmaier M, Moll T, Hallmann R, Hamann A, Vestweber D. **P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin.** J Exp Med. 1997;185:573-8.
- Bos EM, Leuvenink HG, Snijder PM, Kloosterhuis NJ, Hillebrands JL, Leemans JC, Florquin S, van Goor H. **Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury.** J Am Soc Nephrol. 2009;20:1901-5.
- Bosse R, Vestweber D. **Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum.** Eur J Immunol. 1994;24:3019-24.
- Bout D, Joseph M, Pontet M, Vorng H, Deslée D, Capron A. **Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein.** Science. 1986;231:153-6.
- Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bösl M, Stoll G, Nieswandt B. **Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation.** Blood. 2009;113:2056-63.
- Bui DT, Cordeiro PG, Hu QY, Disa JJ, Pusic A, Mehrara BJ. **Free flap reexploration: indications, treatment, and outcomes in 1193 free flaps.** Plast Reconstr Surg. 2007;119:2092-100.
- Chang EI, Mehrara BJ, Festekjian JH, Da Lio AL, Crisera CA. **Vascular complications and microvascular free flap salvage: the role of thrombolytic agents.** Microsurgery. 2011;31:505-9.
- Chen X, Jhee KH, Kruger WD. **Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine.** J Biol Chem. 2004;279:52082-6.
- Clemetson KJ, Clemetson JM. **Platelet collagen receptors.** Thromb Haemost. 2001;86:189-97.
- Coller BS. **Activation affects access to the platelet receptor for adhesive glycoproteins.** J Cell Biol. 1986;103:451-6.
- Day SM, Reeve JL, Pedersen B, Farris DM, Myers DD, Im M, Wakefield TW, Mackman N, Fay WP. **Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall.** Blood. 2005;105:192-8.
- DeRossi R, Coelho AC, Mello GS, Frazílio FO, Leal CR, Facco GG, Brum KB. **Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses.** Acta Cir Bras. 2009;24:276-81.
- DelConde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. **Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation.** Blood. 2005;106:1604-11.



- De Marco L, Girolami A, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. **von Willebrand factor interaction with the glycoprotein IIb/IIIa complex. Its role in platelet function as demonstrated in patients with congenital afibrinogenemia.** J Clin Invest. 1986;77:1272-7.
- Dombkowski RA, Russell MJ, Olson KR. **Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;286:R678-85.
- Edwards G, Félétou M, Weston AH. **Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis.** Pflugers Arch. 2010;459:863-79.
- Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. **Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy.** J Vasc Res. 2002;39:330-9.
- Eilertsen KE, Østerud B. **Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology.** Blood Coagul Fibrinolysis. 2004;15:521-38.
- Elsej DJ, Fowkes RC, Baxter GF. **L-cysteine stimulates hydrogen sulfide synthesis in myocardium associated with attenuation of ischemia-reperfusion injury.** J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2010;15:53-9.
- Engelmann B. **Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood.** Blood Cells Mol Dis. 2006;36:188-90.
- Engelmann B, Luther T, Müller I. **Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel.** Thromb Haemost. 2003;89:3-8.
- Enokido Y, Suzuki E, Iwasawa K, Namekata K, Okazawa H, Kimura H. **Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS.** FASEB J. 2005;19:1854-6.
- Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H. **Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease.** Biochem Biophys Res Commun. 2002;293:1485-8.
- Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. **Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse.** Nat Med. 2002;8:1175-81.
- Félétou M, Vanhoutte PM. **Endothelium-dependent hyperpolarizations: past beliefs and present facts.** Ann Med. 2007;39:495-516.
- Ferroni P, Martini F, Rioldino S, La Farina F, Magnapera A, Ciatti F, Guadagni F. **Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation.** Clin Chim Acta. 2009;399:88-91.
- Festing, Michael FW. **"Inbred Strains of Mice: C57BL".** Jackson mice. 2008.
- Fisher WD. **Impact of venous thromboembolism on clinical management and therapy after hip and knee arthroplasty.** Can J Surg. 2011;54:344-51.
- Fiebig E, Ley K, Arfors KE. **Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery.** Int J Microcirc Clin Exp. 1991;10:127-44.
- Finkelstein JD, Kyle WE, Martin JL, Pick AM. **Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine.** Biochem Biophys Res Commun. 1975;66:81-7.
- Fiorucci S, Orlandi S, Mencarelli A, Caliendo G, Santagada V, Distrutti E, Santucci L, Cirino G, Wallace JL. **Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis.** Br J Pharmacol. 2007;150:996-1002.
- Fitzgerald DJ, Wright F, FitzGerald GA. **Increased thromboxane biosynthesis during coronary thrombolysis. Evidence that platelet activation and thromboxane A2 modulate the response to tissue-type plasminogen activator in vivo.** Circ Res. 1989;65:83-94.

- Florian B, Vintilescu R, Balseanu AT, Buga AM, Grisk O, Walker LC, Kessler C, Popa. **Long-term hypothermia reduces infarct volume in aged rats after focal ischemia.** *Neurosci Lett.* 2008;438:180-5.
- Forde RC, Fitzgerald DJ. **Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury.** *Circulation.* 1997;95:787-9.
- Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. **P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo.** *J Exp Med.* 2000;191:1413-22.
- Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. **Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7450-4.
- Frijns CJ, Kappelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. **Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis.** *Stroke.* 1997;28:2214-8.
- Furie B, Furie BC. **Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation.** *Trends Mol Med.* 2004;10:171-8.
- Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. **A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion.** *Thromb Haemost.* 2001;86:214-21.
- Furne J, Saeed A, Levitt MD. **Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295:R1479-85.
- Geeraedts LM Jr, Vollmar B, Menger MD, Geisweid A, Jansen MJ, Goris RJ, Messmer K. **Striated muscle microvascular response to zymosan-induced generalized inflammation in awake hamsters.** *Shock.* 1998;10:103-9.
- Geerts WH, Bergqvist D, Pineo GF, Heit JA, Samama CM, Lassen MR, Colwell CW. **Prevention of venous thromboembolism: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition).** *Chest.* 2008;133:381S-453S.
- Giesen PL, Nemerson Y. **Tissue factor on the loose.** *Semin Thromb Hemost.* 2000;26:379-84.
- Hashimoto I, Nakanishi H, Shono Y, Yamano M, Toda M. **The features of thrombus in a microvessel injury model and the antithrombotic efficacy of heparin, urokinase, and prostaglandin E1.** *Plast Reconstr Surg.* 2003;111:2307-14.
- Hawiger J. **Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction.** *Thromb Haemost.* 1995;74:369-72.
- Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. **CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.** *Nature.* 1998;391:591-4.
- Herrmann KS. **Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran.** *Microvasc Res.* 1983;26:238-49.
- Hidalgo DA, Disa JJ, Cordeiro PG, Hu QY. **A review of 716 consecutive free flaps for oncologic surgical defects: refinement in donor-site selection and technique.** *Plast Reconstr Surg.* 1998;102:722-32.
- Hirata T, Furie BC, Furie B. **P-, E-, and L-selectin mediate migration of activated CD8+ T lymphocytes into inflamed skin.** *J Immunol.* 2002;169:4307-13.
- Hirsch JG. **Comparative bactericidal activities of blood serum and plasma serum.** *J Exp Med.* 1960;112:15-22.

- Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. **A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia.** Shock. 1999;12:355-64.
- Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. **Antithrombin reduces leukocyte adhesion during chronic endotoxemia by modulation of the cyclooxygenase pathway.** Am J Physiol Cell Physiol. 2000a;279:C98-C107.
- Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. **The thrombin antagonist hirudin fails to inhibit endotoxin-induced leukocyte/endothelial cell interaction and microvascular perfusion failure.** Shock. 2000b;14:528-34.
- Hu LF, Wong PT, Moore PK, Bian JS. **Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia.** J Neurochem. 2007;100:1121-8.
- Hughes MN, Centelles MN, Moore KP. **Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review.** Free Radic Biol Med. 2009 15;47:1346-53.
- Hussain A, Maddock H, Al-Rajaibi H, Carson RJ. **Effects of hydrogen sulphide on the isolated perfused rat heart.** Sultan Qaboos Univ Med J. 2011;11:236-44.
- Inamo J, Belougne E, Doutremepuich C. **Importance of photo activation of rose bengal for platelet activation in experimental models of photochemically induced thrombosis.** Thromb Res. 1996;83:229-35.
- Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, Kobayashi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H. **Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression.** Biochem J. 2004;381:113-23.
- Ishikawa M, Kajimura M, Adachi T, Maruyama K, Makino N, Goda N, Yamaguchi T, Sekizuka E, Suematsu M. **Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against NO-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation.** Circ Res. 2005;97:e104-14.
- Ishikawa M, Sekizuka E, Oshio C, Sato S, Yamaguchi N, Terao S, Tsukada K, Minamitani H, Kawase T. **Platelet adhesion and arteriolar dilation in the photothrombosis: observation with the rat closed cranial and spinal windows.** J Neurol Sci. 2002 15;194:59-69.
- Jaffrey SR, Snyder SH. **The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins.** Sci STKE. 2001;2001:pl1.
- Jelkmann W, Wagner K. **Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin.** Ann Hematol. 2004;83:673-86.
- Jha S, Calvert JW, Duranski MR, Ramachandran A, Lefer DJ. **Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;295:801-6.
- Johansen D, Ytrehus K, Baxter GF. **Exogenous hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury--Evidence for a role of K ATP channels.** Basic Res Cardiol. 2006;101:53-60.
- Johnston GI, Bliss GA, Newman PJ, McEver RP. **Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of adhesion receptors for leukocytes.** J Biol Chem. 1990;265:21381-5.
- Jourdan A, Aguejof O, Imbault P, Doutremepuich F, Inamo J, Doutremepuich C. **Experimental thrombosis model induced by free radicals. Application to aspirin and other different substances.** Thromb Res. 1995;79:109-23.

- Kaibuchi K, Takai Y, Sawamura M, Hoshijima M, Fujikura T, Nishizuka Y. **Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation.** J Biol Chem. 1983;258:6701-4.
- Khouri RK. Avoiding **free flap failure.** Clin Plast Surg. 1992;19:773-81.
- Khouri RK, Cooley BC, Kunselman AR, Landis JR, Yeramian P, Ingram D, Natarajan N, Benes CO, Wallemark C. **A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome.** Plast Reconstr Surg. 1998;102:711-21.
- Kimura H. **Hydrogen sulfide as a neuromodulator.** Mol Neurobiol. 2002;26:13-9.
- Kimura H. **Hydrogen sulfide: from brain to gut.** Antioxid Redox Signal. 2010;12:1111-23.
- Kimura H. **Hydrogen sulfide: its production, release and functions.** Amino Acids. 2011;41:113-21.
- Kimura Y, Kimura H. **Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress.** FASEB J. 2004;18:1165-7.
- Kimura H, Nagai Y, Umemura K, Kimura Y. **Physiological roles of hydrogen sulfide: synaptic modulation, neuroprotection, and smooth muscle relaxation.** Antioxid Redox Signal. 2005;7:795-803.
- Knappe T, Mittlmeier T, Eipel C, Amon M, Menger MD, Vollmar B **Effect of systemic hypothermia on local soft tissue trauma-induced microcirculatory and cellular dysfunction in mice.** Crit Care Med. 2005;33:1805-13.
- Kovács IB, Tigy-Sebes A, Trombitás K, Görög P. **Evans blue: an ideal energy-absorbing material to produce intravascular microinjury by HE-NE gas laser.** Microvasc Res. 1975;10:107-24.
- Krieg AM. **CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.** Annu Rev Immunol. 2002;20:709-60.
- Krishnan N, Fu C, Pappin DJ, Tonks NK. **H<sub>2</sub>S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response.** Sci Signal. 2011;4:ra86.
- Kunicki TJ, Pidard D, Rosa JP, Nurden AT. **The formation of Ca<sup>++</sup>-dependent complexes of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa in solution as determined by crossed immunoelectrophoresis.** Blood. 1981;58:268-78.
- Kuhnle GE, Leipfing FH, Goetz AE. **Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy.** J Appl Physiol. 1993;74:1462-71.
- Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP. **A revised model of platelet aggregation.** J Clin Invest. 2000;105:783-91.
- Kumar RA, Dong JF, Thaggard JA, Cruz MA, López JA, McIntire LV. **Kinetics of GPIIb/IIIa-vWF-A1 tether bond under flow: effect of GPIIb/IIIa mutations on the association and dissociation rates.** Biophys J. 2003;85:4099-109.
- Kwong LM. **Therapeutic potential of rivaroxaban in the prevention of venous thromboembolism following hip and knee replacement surgery: a review of clinical trial data.** Vasc Health Risk Manag. 2011;7:461-6.
- Labow MA, Norton CR, Rumberger JM, Lombard-Gillooly KM, Shuster DJ, Hubbard J, Bertko R, Knaack PA, Terry RW, Harbison ML, et al. **Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins.** Immunity. 1994;1:709-20.
- Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. **PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes.** Cell. 1989;59:305-12.

- Laschke MW, Menger MD, Vollmar B. **Ovariectomy improves neovascularization and microcirculation of freely transplanted ovarian follicles.** J Endocrinol. 2002;172:535-44.
- Laschke MW, Vollmar B, Menger MD. **The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue.** Eur Cell Mater. 2011;22:147-64
- Lee ZW, Zhou J, Chen CS, Zhao Y, Tan CH, Li L, Moore PK, Deng LW. **The slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits novel anti-cancer effects in vitro and in vivo.** PLoS One. 2011;6:e21077.
- Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. **Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice.** Am J Pathol. 1993;143:1055-62.
- Lenter M, Levinovitz A, Isenmann S, Vestweber D. **Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells.** J Cell Biol. 1994;125:471-81.
- Leo R, Praticò D, Iuliano L, Pulcinelli FM, Ghiselli A, Pignatelli P, Colavita AR, FitzGerald GA, Violi F. **Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated.** Circulation. 1997;95:885-91.
- Lewis RJ, Schnatter AR, Drummond I, Murray N, Thompson FS, Katz AM, Jorgensen G, Nicolich MJ, Dahlman D, Thériault G. **Mortality and cancer morbidity in a cohort of Canadian petroleum workers.** Occup Environ Med. 2003;60:918-28.
- Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK. **Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse.** FASEB J. 2005;19:1196-8.
- Li L, Hsu A, Moore PK. **Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation--a tale of three gases!** Pharmacol Ther. 2009;123:386-400.
- Li X, Mao XB, Hei RY, Zhang ZB, Wen LT, Zhang PZ, Qiu JH, Qiao L. **Protective role of hydrogen sulfide against noise-induced cochlear damage: a chronic intracochlear infusion model.** PLoS One. 2011;6:e26728.
- Li L, Rossoni G, Sparatore A, Lee LC, Del Soldato P, Moore PK. **Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative.** Free Radic Biol Med. 2007 1;42:706-19.
- Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, Zhao Y, Baskar R, Tan CH, Moore PK. **Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide.** Circulation. 2008;117:2351-60.
- Liang GH, Xi Q, Leffler CW, Jaggar JH. **Hydrogen sulfide activates Ca<sup>2+</sup> sparks to induce cerebral arteriole dilatation.** J Physiol. 2012 ;590:2709-20.
- Linden DR, Sha L, Mazzone A, Stoltz GJ, Bernard CE, Furne JK, Levitt MD, Farrugia G, Szurszewski JH. **Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in mouse tissues.** J Neurochem. 2008;106:1577-85.
- Lindenblatt N, Bordel R, Schareck W, Menger MD, Vollmar B. **Vascular heme oxygenase-1 induction suppresses microvascular thrombus formation in vivo.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:601-6.
- Lisjak M, Srivastava N, Teklic T, Civale L, Lewandowski K, Wilson I, Wood ME, Whiteman M, Hancock JT. **A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation.** Plant Physiol Biochem. 2010;48:931-5.
- Lisjak M, Teklić T, Wilson ID, Wood M, Whiteman M, Hancock JT. **Hydrogen sulfide effects on stomatal apertures.** Plant Signal Behav. 2011;6:1444-6.

- Lisman T, Raynal N, Groeneveld D, Maddox B, Peachey AR, Huizinga EG, de Groot PG, Farndale RW. **A single high-affinity binding site for von Willebrand factor in collagen III, identified using synthetic triple-helical peptides.** *Blood.* 2006;108:3753-6.
- Liu WQ, Chai C, Li XY, Yuan WJ, Wang WZ, Lu Y. **The cardiovascular effects of central hydrogen sulfide are related to K(ATP) channels activation.** *Physiol Res.* 2011;60:729-38.
- Lloyd D. **Hydrogen sulfide: clandestine microbial messenger?** *Trends Microbiol.* 2006;14:456-62.
- Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. **Regulation of Weibel-Palade body exocytosis.** *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15:302-8.
- Luo SZ, Mo X, López JA, Li R. **Role of the transmembrane domain of glycoprotein IX in assembly of the glycoprotein Ib-IX complex.** *J Thromb Haemost.* 2007;5:2494-502.
- Mancardi D, Penna C, Merlino A, Del Soldato P, Wink DA, Pagliaro P. **Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogen sulfide.** *Biochim Biophys Acta.* 2009;1787:864-72.
- Mann KG, Brummel K, Butenas S. **What is all that thrombin for?** *J Thromb Haemost.* 2003;1:1504-14.
- Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. **Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin.** *Blood.* 1998;92:507-15.
- Massberg S, Vogt F, Dickfeld T, Brand K, Page S, Gawaz M. **Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells.** *Thromb Res.* 2003;110:187-94.
- Mathai JC, Missner A, Kügler P, Saparov SM, Zeidel ML, Lee JK, Pohl P. **No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:16633.
- McCarty OJ, Zhao Y, Andrew N, Machesky LM, Staunton D, Frampton J, Watson SP. **Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion.** *J Thromb Haemost.* 2004;2:1823-33.
- McEver RP. **Leukocyte-endothelial cell interactions.** *Curr Opin Cell Biol.* 1992;4:840-9.
- McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. **GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies.** *J Clin Invest.* 1989;84:92-9.
- Menger MD, Laschke MW, Vollmar B. **Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber.** *Eur Surg Res.* 2002;34:83-91.
- Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. **Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox".** *Am J Physiol.* 1992a;263:H1901-6.
- Menger MD, Steiner D, Messmer K. **Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow".** *Am J Physiol.* 1992b;263:H1892-900.
- Menger MD, Steiner D, Pelikan S, Messmer K. **Buflomedil hydrochloride attenuates tourniquet-induced microvascular reperfusion injury in striated muscle.** *Int J Microcirc Clin Exp.* 1994;14:296-302.
- Merten M, Thiagarajan P. **P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates.** *Circulation.* 2000;102:1931-6.
- Merten M, Thiagarajan P. **P-selectin in arterial thrombosis.** *Z Kardiol.* 2004;93:855-63.

Moore PK, Bhatia M, Moochhala S. **Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future?** Trends Pharmacol Sci. 2003;24:609-11.

Morikawa T, Kajimura M, Nakamura T, Hishiki T, Nakanishi T, Yukutake Y, Nagahata Y, Ishikawa M, Hattori K, Takenouchi T, Takahashi T, Ishii I, Matsubara K, Kabe Y, Uchiyama S, Nagata E, Gadalla MM, Snyder SH, Suematsu M. **Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:1293-8.

Morrell CN, Matsushita K, Chiles K, Scharpf RB, Yamakuchi M, Mason RJ, Bergmeier W, Mankowski JL, Baldwin WM 3rd, Faraday N, Lowenstein CJ. **Regulation of platelet granule exocytosis by S-nitrosylation.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:3782-7.

Muir WW, Skarda RT, Sheehan WC. **Hemodynamic and respiratory effects of xylazine-morphine sulfate in horses.** Am J Vet Res. 1979;40:1417-20.

Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. **H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulfhydration.** Sci Signal. 2009;2:ra72.

Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R, Amzel LM, Berkowitz DE, Snyder SH. **Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels.** Circ Res. 2011;109:1259-68.

Nieswandt B, Bergmeier W, Eckly A, Schulte V, Ohlmann P, Cazenave JP, Zirngibl H, Offermanns S, Gachet C. **Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation.** Blood. 2001;97:3829-35.

Njie-Mbye YF, Bongmba OY, Onyema CC, Chitnis A, Kulkarni M, Opere CA, LeDay AM, Ohia SE. **Effect of hydrogen sulfide on cyclic AMP production in isolated bovine and porcine neural retinae** Neurochem Res. 2010;35:487-94.

Norgard KE, Moore KL, Diaz S, Stults NL, Ushiyama S, McEver RP, Cummings RD, Varki A. **Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides.** J Biol Chem. 1993;268:12764-74.

Nuyttens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K. **Platelet adhesion to collagen.** Thromb Res. 2011;127 Suppl 2:S26-9.

Osterlund M, Owenius R, Carlsson K, Carlsson U, Persson E, Lindgren M, Freskgård PO, Svensson M. **Probing inhibitor-induced conformational changes along the interface between tissue factor and factor VIIa.** Biochemistry. 2001;40:9324-8.

Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. **Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets.** Nature. 1992;359:848-51.

Pan LL, Liu XH, Gong QH, Wu D, Zhu YZ. **Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells.** PLoS One. 2011;6:e19766.

Pan TT, Neo KL, Hu LF, Yong QC, Bian JS. **H<sub>2</sub>S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes.** Am J Physiol Cell Physiol. 2008;294:C169-77.

Parry GC, Erlich JH, Carmeliet P, Luther T, Mackman N. **Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice.** J Clin Invest. 1998;101:560-9.

Paul BD, Snyder SH. **H<sub>2</sub>S signalling through protein sulfhydration and beyond.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13:499-507.

- Pawlinski R, Pedersen B, Erlich J, Mackman N. **Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice.** *Thromb Haemost.* 2004;92:444-50.
- Pegg DE. **Principles of cryopreservation.** *Methods Mol Biol.* 2007;368:39-57.
- Peng YJ, Nanduri J, Raghuraman G, Souvannakitti D, Gadalla MM, Kumar GK, Snyder SH, Prabhakar NR. **H2S mediates O2 sensing in the carotid body.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:10719-24.
- Perry MM, Hui CK, Whiteman M, Wood ME, Adcock I, Kirkham P, Michaeloudes C, Chung KF. **Hydrogen sulfide inhibits proliferation and release of IL-8 from human airway smooth muscle cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45:746-52.
- Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. **The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex.** *Blood.* 1988;71:831-43.
- Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. **GPIIb-IIIa: the responsive integrin.** *Cell.* 1991;65:359-62.
- Pietramaggiore G, Scherer SS, Mathews JC, Gennaoui T, Lancerotto L, Ragno G, Valeri CR, Orgill DP. **Quiescent platelets stimulate angiogenesis and diabetic wound repair.** *J Surg Res.* 2010;160:169-77.
- Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. **Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report.** *Semin Thromb Hemost.* 1992;18:324-32.
- Pogribna M, Melnyk S, Pogribny I, Chango A, Yi P, James SJ. **Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation.** *Am J Hum Genet.* 2001;69:88-95.
- Pouokam E, Steidle J, Diener M. **Regulation of colonic ion transport by gasotransmitters.** *Biol Pharm Bull.* 2011;34:789-93.
- Predmore BL, Lefer DJ. **Hydrogen sulfide-mediated myocardial pre- and post-conditioning.** *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2011;4:83-96.
- Pries AR. **A versatile video image analysis system for microcirculatory research.** *Int J Microcirc Clin Exp.* 1988;7:327-45.
- Pytela R, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, Plow EF, Ruoslahti E. **Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp--specific adhesion receptors.** *Science.* 1986;231:1559-62.
- Qiu X, Villalta J, Lin G, Lue TF. **Role of hydrogen sulfide in the physiology of penile erection.** *J Androl.* 2012;33:529-35.
- Ramacciotti E, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Deatrick KB, Lundy FJ, Rectenwald JE, Henke PK, Schaub RG, Wakefield TW. **P-selectin/PSGL-1 inhibitors versus enoxaparin in the resolution of venous thrombosis: a meta-analysis.** *Thromb Res.* 2010;125:e138-42.
- Ren C, Du A, Li D, Sui J, Mayhan WG, Zhao H. **Dynamic change of hydrogen sulfide during global cerebral ischemia-reperfusion and its effect in rats.** *Brain Res.* 2010;1345:197-205.
- Roesken F, Ruecker M, Vollmar B, Boeckel N, Morgenstern E, Menger MD. **A new model for quantitative in vivo microscopic analysis of thrombus formation and vascular recanalisation: the ear of the hairless (hr/hr) mouse.** *Thromb Haemost.* 1997;78:1408-14.
- Rosenblum WI, El-Sabban F. **Platelet aggregation in the cerebral microcirculation: effect of aspirin and other agents.** *Circ Res.* 1977;40:320-8.
- Rossoni G, Sparatore A, Tazzari V, Manfredi B, Del Soldato P, Berti F. **The hydrogen sulphide-releasing derivative of diclofenac protects against ischaemia-reperfusion injury in the isolated rabbit heart.** *Br J Pharmacol.* 2008;153:100-9.



- Ruecker M, Schäfer T, Stamm A, Saueressig K, Vollmar B, Spitzer WJ, Menger MD. **New model for in vivo quantification of microvascular embolization, thrombus formation, and recanalization in composite flaps.** J Surg Res. 2002;108:129-37.
- Ruggeri ZM. **Platelets in atherothrombosis.** Nat Med. 2002;8:1227-34.
- Ruggeri ZM. **Platelet interactions with vessel wall components during thrombogenesis.** Blood Cells Mol Dis. 2006;36:145-7.
- Ruggeri ZM. **Structure and function of von Willebrand factor.** Thromb Haemost. 1999;82:576-84.
- Ruggeri ZM. **Von Willebrand factor: looking back and looking forward.** Thromb Haemost. 2007;98:55-62.
- Rumbaut RE, Randhawa JK, Smith CW, Burns AR. **Mouse cremaster venules are predisposed to light/dye-induced thrombosis independent of wall shear rate, CD18, ICAM-1, or P-selectin.** Microcirculation. 2004;11:239-47.
- Rumbaut RE, Sial AJ. **Differential phototoxicity of fluorescent dye-labeled albumin conjugates.** Microcirculation. 1999;6:205-13.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. **New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins.** Science. 1987;238:491-7.
- Saniabadi AR, Umemura K, Matsumoto N, Sakuma S, Nakashima M. **Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction.** Thromb Haemost. 1995;73:868-72.
- Sato M, Ohshima N. **Platelet thrombus induced in vivo by filtered light and fluorescent dye in mesenteric microvessels of the rat.** Thromb Res. 1984;35:319-34.
- Sato T, Yamamoto M, Shimamoto T, Klinman DM. **Accelerated wound healing mediated by activation of Toll-like receptor 9.** Wound Repair Regen. 2010;18:586-93.
- Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. **Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow.** Cell. 1998;94:657-66.
- Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM. **Mechanisms of platelet aggregation.** Curr Opin Hematol. 2001;8:270-6.
- Scarborough RM, Kleiman NS, Phillips DR. **Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. What are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use?** Circulation. 1999;100:437-44.
- Schröder U, Arfors KE, Tangen O. **Stability of fluorescein labeled dextrans in vivo and in vitro.** Microvasc Res. 1976;11:57-66.
- Schulte V, Snell D, Bergmeier W, Zirngibl H, Watson SP, Nieswandt B. **Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets.** J Biol Chem. 2001;276:364-8.
- Shattil SJ. **Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology.** Thromb Haemost. 1995;74:149-55.
- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. **Integrin signaling: the platelet paradigm.** Blood. 1998;91:2645-57.
- Shattil SJ, Newman PJ. **Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets.** Blood. 2004;104:1606-15.
- Shebuski RJ, Kilgore KS. **Role of inflammatory mediators in thrombogenesis.** J Pharmacol Exp Ther. 2002;300:729-35.

- Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H. **A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells.** Nat Commun. 2013;4:1366.
- Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. **Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide.** J Biochem. 2009;146:623-6.
- Sidelmann JJ, Gram J, Jespersen J, Kluft C. **Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms.** Semin Thromb Hemost. 2000;26:605-18.
- Singh S, Banerjee R. **PLP-dependent H(2)S biogenesis.** Biochim Biophys Acta. 2011;1814:1518-27.
- Singh S, Padovani D, Leslie RA, Chiku T, Banerjee R. **Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H2S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions.** J Biol Chem. 2009;284:22457-66.
- Sivarajah A, McDonald MC, Thiemermann C. **The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat.** Shock. 2006;26:154-61.
- Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, Szabo C, Stahl GL, Sellke FW. **Hydrogen sulfide therapy attenuates the inflammatory response in a porcine model of myocardial ischemia/reperfusion injury.** J Thorac Cardiovasc Surg. 2009;138:977-84.
- Sorg H, Krueger C, Schulz T, Menger MD, Schmitz F, Vollmar B. **Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related.** FASEB J. 2009;23:3049-58.
- Speckmann EJ, Hescheler J, Köhling R. **Physiologie.** Elsevier-Verlag. 2008;5. Auflage.
- Spronk HM, Govers-Riemslog JW, ten Cate H. **The blood coagulation system as a molecular machine.** Bioessays. 2003;25:1220-8.
- Spronk HM, van der Voort D, Ten Cate H. **Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship.** Thromb J. 2004;2:12.
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. **S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89:444-8.
- Steinhausen M, Zimmerhackl B, Thederan H, Dussel R, Parekh N, Esslinger HU, von Hagens G, Komitowski D, Dallenbach FD. **Intraglomerular microcirculation: measurements of single glomerular loop flow in rats.** Kidney Int. 1981;20:230-9.
- Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. **A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation.** J Cell Biol. 1985;101:880-6.
- Stipanuk MH, Beck PW. **Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat.** Biochem J. 1982;206:267-77.
- Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. **Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice.** Blood. 1996;87:1238-42.
- Sun YG, Cao YX, Wang WW, Ma SF, Yao T, Zhu YC. **Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes.** Cardiovasc Res. 2008;79:632-41.
- Sun Y, Feng Y, Zhang CQ, Chen SB, Cheng XG. **The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects.** Int Orthop. 2010;34:589-97.

- Sun Y, Tang CS, DU JB, Jin HF. **Hydrogen sulfide and vascular relaxation.** Chin Med J (Engl). 2011;124:3816-9.
- Tan G, Pan S, Li J, Dong X, Kang K, Zhao M, Jiang X, Kanwar JR, Qiao H, Jiang H, Sun X. **Hydrogen sulfide attenuates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, liver cirrhosis and portal hypertension in rats.** PLoS One. 2011;6:e25943.
- Tangerman A. **Measurement and biological significance of the volatile sulfur compounds hydrogen sulfide, methanethiol and dimethyl sulfide in various biological matrices.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009;877:3366-77.
- Taniguchi S, Niki I. **Significance of hydrogen sulfide production in the pancreatic  $\beta$ -cell.** J Pharmacol Sci. 2011;116:1-5.
- Teague B, Asiedu S, Moore PK. **The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility.** Br J Pharmacol. 2002;137:139-45.
- Theilmeyer G, Lenaerts T, Remacle C, Collen D, Vermylen J, Hoylaerts MF. **Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoid/endothelial cell interaction under shear stress.** Blood. 1999;94:2725-34.
- Thorlacius H, Vollmar B, Seyfert UT, Vestweber D, Menger MD. **The polysaccharide fucoidan inhibits microvascular thrombus formation independently from P- and L-selectin function in vivo.** Eur J Clin Invest. 2000;30:804-10.
- Toohey JI. **Sulfur signaling: is the agent sulfide or sulfane?** Anal Biochem. 2011;413:1-7.
- Ulrichs H, Udvardy M, Lenting PJ, Pareyn I, Vandeputte N, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. **Shielding of the A1 domain by the D'D3 domains of von Willebrand factor modulates its interaction with platelet glycoprotein Ib-IX-V.** J Biol Chem. 2006;281:4699-707.
- Vajkoczy P, Thurnher A, Hirth KP, Schilling L, Schmiedek P, Ullrich A, Menger MD. **Measuring VEGF-Flk-1 activity and consequences of VEGF-Flk-1 targeting in vivo using intravital microscopy: clinical applications.** Oncologist. 2000;5:16-9.
- Vajkoczy P, Vollmar B, Wolf B, Menger MD. **Effects of cyclosporine A on the process of vascularization of freely transplanted islets of Langerhans.** J Mol Med (Berl). 1999;77:111-4.
- Valenzeno DP. **Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms.** Photochem Photobiol. 1987;46:147-60.
- Van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. **Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases.** J Leukoc Biol. 2009;85:195-204.
- Van Mourik JA, Romani de Wit T, Voorberg J. **Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies.** Histochem Cell Biol. 2002;117:113-22.
- Vandiver M, Snyder SH. **Hydrogen sulfide: a gasotransmitter of clinical relevance.** J Mol Med (Berl). 2012;90:255-63.
- Varki A. **Selectin ligands.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:7390.
- Villringer A, Haberl RL, Dirnagl U, Anneser F, Verst M, Einhupl KM. **Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo.** Brain Res. 1989;504:159-60.
- Vitvitsky V, Kabil O, Banerjee R. **High turnover rates for hydrogen sulfide allow for rapid regulation of its tissue concentrations.** Antioxid Redox Signal. 2012;17:22-31.
- Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, Gendelman HE, Banerjee R. **A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis.** J Biol Chem. 2006;281:35785-93.

- Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K. **Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart.** *Anesth Analg.* 1995;80:249-55.
- Vollmar B, Preissler G, Menger MD. **Hemorrhagic hypotension induces arteriolar vasomotion and intermittent capillary perfusion in rat pancreas.** *Am J Physiol.* 1994;267:H1936-40.
- Wagner DD, Burger PC. **Platelets in inflammation and thrombosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2131-7.
- Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Coller BS, Jordan RE. **Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets.** *Blood.* 1996;88:907-14.
- Wallace JL. **Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs.** *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28:501-5.
- Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G. **Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346).** *Br J Pharmacol.* 2010;159:1236-46.
- Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Fiorucci S. **Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat.** *Gastroenterology.* 2007;132:261-71.
- Wang R. **Hydrogen sulfide: a new EDRF.** *Kidney Int.* 2009;76:700-4.
- Watson SP, McNally J, Shipman LJ, Godfrey PP. **The action of the protein kinase C inhibitor, staurosporine, on human platelets. Evidence against a regulatory role for protein kinase C in the formation of inositol trisphosphate by thrombin.** *Biochem J.* 1988;249:345-50.
- Wei HL, Du JB, Tang CS. **Effect of hydrogen sulfide on oxidative stress in hypoxic pulmonary hypertension.** *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2007;39:565-9.
- Weiss L. **Some effects of mechanical trauma on the development of primary cancers and their metastases.** *J Forensic Sci.* 1990;35:614-27.
- Weiss HJ, Turitto VT. **Prostacyclin (prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium.** *Blood.* 1979;53:244-50.
- Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD. **Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle.** *Surgery.* 1999;126:881-9.
- White RH. **The epidemiology of venous thromboembolism.** *Circulation.* 2003;107:14-8.
- White JG, Clawson CC. **Effects of large latex particle uptake of the surface connected canalicular system of blood platelets: a freeze-fracture and cytochemical study.** *Ultrastruct Pathol.* 1981;2:277-87.
- White JG, Clawson CC. **The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system.** *Am J Pathol.* 1980;101:353-64.
- Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK. **The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'?** *J Neurochem.* 2004;90:765-8.
- Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau JL, Wong BS, Armstrong JS, Moore PK. **Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain?** *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326:794-8.

- Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. **The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages.** *Antioxid Redox Signal.* 2010;12:1147-54.
- Whiteman M, Moore PK. **Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide** *J Cell Mol Med.* 2009;13:488-507.
- Wilson CA, Hatchell DL. **Photodynamic retinal vascular thrombosis. Rate and duration of vascular occlusion.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:2357-65.
- Winet H. **A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation.** *Microvasc Res.* 1989;37:105-14.
- Woodside DG, Liu S, Ginsberg MH. **Integrin activation.** *Thromb Haemost.* 2001;86:316-23.
- Wright M. **Pharmacologic effects of ketamine and its use in veterinary medicine.** *J Am Vet Med Assoc.* 1982;180:1462-71.
- Yamamoto M, Sato T, Beren J, Verthelyi D, Klinman DM. **The acceleration of wound healing in primates by the local administration of immunostimulatory CpG oligonucleotides.** *Biomaterials.* 2011;32:4238-42.
- Yamanishi J, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Castagna M, Nishizuka Y. **Synergistic functions of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;112:778-86.
- Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. **H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase.** *Science.* 2008;322:587-90.
- Yang C, Yang Z, Zhang M, Dong Q, Wang X, Lan A, Zeng F, Chen P, Wang C, Feng J. **Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced cytotoxicity and inflammation in HaCaT cells through inhibition of ROS/NF- $\kappa$ B/COX-2 pathway.** *PLoS One.* 2011;6:e21971.
- Yu YP, Li ZG, Wang DZ, Zhan X, Shao JH. **Hydrogen sulfide as an effective and specific novel therapy for acute carbon monoxide poisoning.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;404:6-9.
- Zagli G, Patacchini R, Trevisani M, Abbate R, Cinotti S, Gensini GF, Masotti G, Geppetti P. **Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation.** *Eur J Pharmacol.* 2007;559:65-8.
- Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. **Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation.** *FASEB J.* 2006;20:2118-20.
- Zhang LM, Jiang CX, Liu DW. **Hydrogen sulfide attenuates neuronal injury induced by vascular dementia via inhibiting apoptosis in rats.** *Neurochem Res.* 2009;34:1984-92.
- Zhang J, Sio SW, Mochhala S, Bhatia M. **Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice.** *Mol Med.* 2010;16:417-24.
- Zhang H, Zhang A, Guo C, Shi C, Zhang Y, Liu Q, Sparatore A, Wang C. **S-diclofenac protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice via ameliorating cardiac gap junction remodeling.** *PLoS One.* 2011;6:e26441.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. **The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener.** *EMBO J.* 2001 1;20:6008-16.
- Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Huang SH, Tan CS, Whiteman M, Lu J, Moore PK. **Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats.** *J Appl Physiol.* 2007;102:261-8.

Zimmerman GA, McIntyre TM, Mehra M, Prescott SM. **Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion.** J Cell Biol. 1990;110:529-40.

Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. **Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules.** Immunol Today. 1992;13:93-100.

Zweifach BW. **The microcirculation in the intestinal mesentery.** Microvasc Res. 1973;5:363-7.

## 11 Anhang

Tabelle 1: Mikrohämodynamik in Venolen

	<i>Ø anti-P-Selektin Antikörper</i>		<i>anti-P-Selektin Antikörper</i>	
	<b>DMSO</b>	<b>GYG</b>	<b>DMSO</b>	<b>GYG</b>
<i>Blutflussgeschwindigkeit von Erythrozyten (mm/s)</i>	0,64 ± 0,04	0,53 ± 0,05	0,72 ± 0,04	0,66 ± 0,06
<i>Gefäßdurchmesser (µm)</i>	55,4 ± 3,9	58,9 ± 4,7	59,7 ± 3,9	52,0 ± 4,8

*Tab. 1: Quantitative Analyse der erythrozytären Blutflussgeschwindigkeit und des Gefäßdurchmessers von Venolen der dorsalen Rückenhautkammerpräparation. Es zeigen sich keine Unterschiede in den Parametern hinsichtlich der Behandlung mit GYG oder DMSO bzw. dem anti-P-Selektin Antikörper. MW ± SEM, t-Test mit Bonferroni Korrektur.*

Tabelle 2: Kleines Blutbild nach Thromboseinduktion

	<i>Ø anti-P-Selektin Antikörper</i>		<i>anti-P-Selektin Antikörper</i>	
	<b>DMSO</b>	<b>GYG</b>	<b>DMSO</b>	<b>GYG</b>
<i>Leukozyten (1*10<sup>9</sup>/l)</i>	7 ± 1	5 ± 0	8 ± 1	5 ± 1
<i>Thrombozyten (1*10<sup>9</sup>/l)</i>	936 ± 69	902 ± 66	800 ± 78	940 ± 63
<i>Erythrozyten (1*10<sup>12</sup>/l)</i>	8 ± 1	8 ± 0	8 ± 0	8 ± 0
<i>Hämoglobin (mM/l)</i>	7,6 ± 0,4	7,8 ± 0,2	7,1 ± 0,3	7,2 ± 0,4
<i>Hämatokrit (l/l)</i>	0,429 ± 0,024	0,428 ± 0,009	0,401 ± 0,013	0,417 ± 0,025
<i>MCV (fl)</i>	52,4 ± 0,4	52,5 ± 0,4	53,5 ± 0,3	53,6 ± 0,2
<i>MCH (aM)</i>	936 ± 6	947 ± 6	945 ± 9	926 ± 6
<i>MCHC (mM/l)</i>	17,9 ± 0,2	18,2 ± 0,2	17,7 ± 0,2	17,3 ± 0,1

Tab. 2: Analyse des peripheren Blutbildes von Versuchstieren, die mit GYG oder der Trägersubstanz DMSO bzw. mit und ohne anti-P-Selektin Antikörper behandelt wurden. MCV: mittleres korpuskuläres Volumen, MCH: mittleres korpuskuläres Hämoglobin, MCHC: mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration. Keine der Behandlungen zeigt eine wesentliche Beeinflussung der Blutparameter. MW ± SEM, t-Test mit Bonferroni Korrektur.



**12            Abbildungs- und Tabellenverzeichnis****12.1        Abbildungen**

- Abb. 1:        Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner Thrombozyten
- Abb. 2:        Schematische Darstellung der Hämostase
- Abb. 3:        Schematische Darstellung der Hydrogensulfid Biosynthese
- Abb. 4:        C57BL/6 Maus
- Abb. 5:        Bestandteile der dorsalen Rückenhautkammer
- Abb. 6:        Operative Schritte der Rückenhautkammerpräparation
- Abb. 7:        Instrumente zur Präparation der dorsalen Rückenhautkammer
- Abb. 8:        Schematische Darstellung der Schichten der Rückenhautpräparation
- Abb. 9:        Schematische Darstellung des Versuchsablaufs
- Abb. 10:       Aufbau der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie
- Abb. 11:       Intravitalmikroskopische Aufnahmen von Gefäßen der Rückenhaut
- Abb. 12:       Durchflusszytometrie
- Abb. 13:       Venoläre Gefäßverschlusszeit und subaquale Blutungszeit
- Abb. 14:       Durchflusszytometrie humaner Thrombozyten
- Abb. 15:       P-Selektin Expression humaner Thrombozyten
- Abb. 16:       Plasmatische P-Selektin Konzentration
- Abb. 17:       Protein S-Sulfhydrierung humaner Thrombozyten
- Abb. 18:       Intravitalmikroskopische Thromboseinduktion

**12.2        Tabellen**

- Tab. 1:        Mikrohämodynamik in Venolen
- Tab. 1:        Kleines Blutbild nach Thromboseinduktion

**13 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Brigitte Vollmar, der Direktorin des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut durchzuführen. Ihre Betreuung und stete Unterstützung haben mich geprägt und mein Studium wesentlich beeinflusst.

Auch für ihre Hilfe bei der Veröffentlichung der eigenen Forschungsergebnisse und der Fertigstellung der Arbeit und ihre Geduld bei allen Fragen und Problemen bedanke ich mich sehr herzlich.

Ich möchte mich ebenfalls dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte, nach dem Abschluss der Experimente dieser Arbeit als studentische Hilfskraft weiter wissenschaftlich am Institut arbeiten zu können.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Professor Michael D. Menger, dem Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, für die konstruktive Begutachtung meiner Arbeit.

Großer Dank gilt Frau Dr. Angela Kuhla für ihre professionelle und ausgezeichnete technische Unterstützung bei der Durchführung komplexer Experimente.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Dietmar Zechner und meinem Kommilitonen Fabian Müller-Graf für die professionelle Zusammenarbeit und die konstruktiven Diskussionen während der gemeinsamen Forschungsprojekte.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Berit Blendow, Doris Butzlaff, Eva Lorbeer-Rehfeld und Maren Nerowski sowohl für ihre stetige Hilfsbereitschaft und wertvolle technische Assistenz im Laboralltag als auch für ihre informativen Anregungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei Frau Anja Gellert für ihre fortwährende Hilfe und Unterstützung bedanken.

Allen Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie, auch den hier nicht namentlich genannten, bin ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit und für das angenehme Arbeitsklima am Institut sehr dankbar.

Mein Dank gilt all meinen Freundinnen und Freunden, die mich im Studium und während der Promotion mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meiner Großmutter bedanken, für ihre Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben und mich auch bei der Erstellung der Dissertation vor allem moralisch unterstützten und somit zum Gelingen beigetragen haben.

**14 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsamt vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Eberhard Grambow

**15 Lebenslauf****Persönliche Daten**

*Zur Person* Eberhard Grambow  
geboren am 15.07.1987  
in Neubrandenburg

*Kontaktdaten*

*Familienstand* ledig

**Schulbildung**

1994-1998 John Brinckman Grundschule; Schwerin

1998-2007 Goethe-Gymnasium; Schwerin  


*Sprachkenntnisse*

Deutsch Muttersprache

Englisch fließend in Wort und Schrift

Russisch Grundkenntnisse

**Studium**

seit 10/2007	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
09/2009	1. Ärztliche Prüfung
12/2013	Voraussichtlicher Studienabschluss

*Krankenpflegepraktikum*

07-09/2007	Urologie / Neurochirurgie; HELIOS Kliniken Schwerin
02-03/2008	Urologie / Neurochirurgie; HELIOS Kliniken Schwerin

*Freiwillige Praktika zur fachlichen Orientierung*

03/2009	Zentrum für Plastische und Ästhetische Chirurgie; HELIOS Kliniken Schwerin
02/2009	Praxis für Handchirurgie und Plastische Chirurgie; Dr. Belusa; Rostock

*Famulaturen*

02/2010-03/2010	Praxis für Handchirurgie und Plastische Chirurgie; Dr. Belusa; Rostock
07/2010-08/2010	Abteilung für Allgemeine Chirurgie, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie; Universitätsmedizin Rostock
02/2011-03/2011	Abteilung für Handchirurgie, Plastische und Mikrochirurgie Berufsgenossenschaftliches Unfallkrankenhaus Hamburg

*Praktisches Jahr*

1. Tertial	Abteilung für Urologie; Universitätsmedizin Rostock
2. Tertial	Abteilung für Mund-, Kiefer-, Gesichts- und Plastische Chirurgie Universitätsmedizin Rostock
	Abteilung für Allgemeine Chirurgie, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie; Universitätsmedizin Rostock
3. Tertial	Abteilung für Nephrologie; Universitätsmedizin Rostock

## Wissenschaftliche Tätigkeit

### *Promotion*

Seit 01/2010

Thema „Der Einfluss von Hydrogensulfid auf die Aktivität humaner Thrombozyten und die mikrovaskuläre Thrombogenese im Modell der dorsalen Rückenhautkammer“

Themenvergabe Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Institut Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie  
Universität Rostock

04/2011 Ende der Experimente

### *Studentische Hilfskraft*

Seit 01/2011 Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Einarbeitung und Betreuung von zwei Doktoranden auf den Gebieten der Thromboseforschung und der Stimulation der endogenen Wundheilung

## Publikationsverzeichnis

### *Peer-review Originalarbeiten*

Siebert N\*, Xu W\*, Grambow E, Zechner D, Vollmar B. *Erythropoietin improves skin wound healing and activates the TGF- $\beta$  signaling pathway*. Lab Invest. 2011;91:1753-65.

Hergert B\*, Grambow E\*, Butschkau A, Vollmar B. *Effects of systemic pretreatment with CpG ODN on skin wound healing in mice*. Manuskript in Revision bei Wound Repair Regen.

Grambow E\*, Mueller-Graf F\*, Delyagina E, Frank M, Kuhla A, Vollmar B. *Effect of the hydrogen sulfide donor GYY 4137 on platelet activation and microvascular thrombus formation in mice*. Platelets. 2013. Epub ahead of print.

Butschkau A, Nagel P, Grambow E, Broze GJ Jr, Vollmar B. *Contribution of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in generalized Shwartzman reaction*. Manuskript 04/2013 angenommen bei Crit Care Med.

*Zitierfähige Abstracts*

Grambow E, Eipel C, Kuehl AR, Kram L, Vollmar B. *The slow releasing H(2)S donor GYY 4137 exerts anti-thrombotic effects in vivo*. Langenbecks Arch Surg. 2010;395:788-9.

Grambow E, Eipel C, Kuehl AR, Kram L, Vollmar B. *The slow releasing H(2)S donor GYY 4137 exerts anti-thrombotic effects via a P-selectin dependent mechanism*. Langenbecks Arch Surg. 2011;369:582.

Grambow E, Siebert N, Xu W, Zechner D, Vollmar B. *Erythropoietin improves skin wound healing and activates TGF-beta signaling pathway*. Langenbecks Arch Surg. 2011; 396:888.

Grambow E, Eipel C, Kuehl AR, Kram L, Vollmar B. *Der Einfluss von Hydrogen-Sulfid auf die Aktivität von Thrombozyten und die mikrovaskuläre Thrombogenese*. Gefäßchirurgie. 2012;5:429-30.

*Kongressbeiträge*

Grambow E, Eipel C, Kuehl AR, Kram L, Vollmar B. *Molecular mechanisms of the anti-thrombotic effect of the slow releasing H<sub>2</sub>S donor GYY 4137*. Joint Meeting of the ESM & GfMVB, München, 13.-16.10.2011.



**16 Thesen zur Dissertation**

1. Trotz jahrelanger umfangreicher klinischer und experimenteller Studien zur Prophylaxe von Thrombosen stellen thrombotisch bedingte Gefäßverschlüsse eine bedeutsame Komplikation in allen chirurgischen Disziplinen dar und gefährden Patienten sowohl während der Operation als auch postoperativ.

2. Die Vorgänge der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten bis zur Bildung eines stabilen Thrombus sind komplex und werden als Hämostase bezeichnet. Während der primären Hämostase erfolgt die wesentlich auf Adhäsionsmolekül-vermittelter Bindung beruhende Formung eines instabilen primären Thrombus. Dieser wird durch die in der sekundären Hämostase ablaufenden Prozesse in einen stabilen Thrombus umgewandelt.

3. Hydrogensulfid ( $H_2S$ ) ist ein endogener gasförmiger Transmitter. Aufgrund seiner physiologisch protektiven Wirkung auf verschiedene Organsysteme ist es wahrscheinlich, dass  $H_2S$  ebenso Einfluss auf die Thrombogenese nimmt und ein mögliches anti-thrombogenes Potential besitzt.

4. In der vorliegenden Studie wurden die aktuell nicht hinreichend beschriebenen Effekte von  $H_2S$  auf die Bildung von Thrombosen *in vivo* und auf Thrombozyten *in vitro* untersucht.

5. Als  $H_2S$  Donor wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöstes GYY4137 (GYY) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Substanz, die  $H_2S$  kontinuierlich über mehrere Stunden in physiologischen Konzentrationen liberiert und somit die natürliche Bildung widerspiegelt. DMSO diente als Kontrolle.

6. *In vivo* erfolgten die Analyse der mikrovaskulären Thrombogenese in Venolen der dorsalen Rückenhautkammerpräparation und die Messung der subaqualen Schwanzvenen-Blutungszeit im Mausmodell. Hierzu wurden die Tiere mit GYY oder DMSO behandelt. Weiterhin wurde separaten GYY- bzw. DMSO-behandelten Tieren ein anti-P-Selektin Antikörper appliziert, um die Bedeutung von P-Selektin während der Thrombogenese zu evaluieren.

7. *In vitro* wurde die dosisabhängige Wirkung von GYY auf die Expression der pro-thrombogenen Adhäsionsmoleküle Glykoprotein Ib, IIb-IIIa und P-Selektin sowie auf die Protein S-Sulphydrierung humaner Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie bzw. Biotin Switch Assay analysiert. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Konzentration von löslichem P-Selektin im Plasma der Versuchstiere.

8. Die Behandlung mit GYY prolongierte gegenüber DMSO sowohl die Thrombogenese als auch die Schwanzvenen-Blutungszeit signifikant. Auch die Applikation von anti-P-Selektin Antikörper in DMSO-behandelten Tieren verzögerte den thrombotischen Gefäßverschluss signifikant. Weiterhin zeigten GYY-behandelte Tiere signifikant reduzierte Konzentrationen von plasmatischem P-Selektin.

9. Die Expression aller untersuchten Adhäsionsmoleküle auf aktivierten Thrombozyten wurde in Gegenwart von GYY dosisabhängig reduziert. Durch Behandlung mit GYY wurde weiterhin die S-Sulphydrierung thrombozytärer Proteine signifikant gesteigert.

10. Die vorliegende Studie zeigt die anti-thrombogene Wirkung von H<sub>2</sub>S auf die venuläre Thrombogenese und die Modulation der thrombozytären Funktion mit konsekutiver Beeinflussung der Hämostase. Somit sind H<sub>2</sub>S-liberierende Substanzen als neue potentielle anti-koagulatorische Therapeutika anzusehen und könnten zur Prophylaxe von Thrombosen eingesetzt werden.