Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Markus Schwaninger

Reduktion der diabetischen Kapillarschädigung im Herz- und Skelettmuskel durch einen PPAR-γ-Agonisten und einen Vasopeptidase-Inhibitor

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

Vorgelegt von
Astrid Ashoff
aus Rheine/Westfalen

Lübeck 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Boris Perras

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 27.03.2012

Promotionskommission der Sektion Medizin

Meinen Großmüttern

Erna und Kreszentia

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Akronyme 7

1 Einleitung

1.1 Pathogenese der allgemeinen Gefäßschädigung beim Diabetes mellitus 9

1.2 Therapeutische Angriffspunkte zur Prävention der diabetischen Gefäßschädigung 13

1.2.1 Allgemeine Therapieprinzipien 13

1.2.2 Anti-hyperglykämische Therapie 13

1.2.3 Glukose-unabhängige medikamentöse vaskuläre Protektion 14

1.3 Untersuchte Medikamente mit organprotektiver Wirkung 16

1.3.1 ACE-Hemmer 16

1.3.2 PPAR-γ-Agonisten 17

1.3.3 Vasopeptidase-Inhibitoren 21

1.4 Fragestellung/Zielsetzung 23

2 Material und Methoden

2.1 Material 24

2.1.1 Versuchstiere 24

2.1.2 Medikamente 24

2.1.3 Antikörper 24

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien 25

2.1.5 Puffer 25

2.1.6 Geräte 25

2.2 Methoden 27

2.2.1 Streptozotocin-Injektion zur Induktion eines Diabetes mellitus 27

2.2.2 Medikamentendosierungen und -verabreichung 27

2.2.3 Versuchsprotokoll 29

2.2.4 Blutzuckermessung 30

2.2.5 Nicht-invasive Blutdruck- und Herzfrequenzmessung (Tail-Cuff-Methode) 31

2 Material und Methoden (Fortsetzung)

2.2.6 Uringewinnung mit Hilfe von Stoffwechselkäfigen und Bestimmung der Albumin- sowie Kreatininausscheidung 31

2.2.7 Herstellung und Färbung der Gefrierschnitte 32

2.2.8 Auszählung der Kapillaren und Myozyten 34

2.2.9 Statistik 36

3 Ergebnisse

3.1 Zeitverlauf der diabetischen Herz-Kreislauf-Veränderungen in diabetischen Ratten 37

3.1.1 Blutglukosekonzentration 37

3.1.2 Blutdruck und Herzfrequenz 38

3.1.3 Körpergewicht und Gewicht des linken Ventrikels 39

3.1.4 Myozytenquerschnitt im M. quadriceps femoris 40

3.1.5 Absolute und relative Kapillardichten im M. quadriceps femoris 41

3.1.6 Albumin- und Kreatininkonzentration im Urin 42

3.2 Einfluss von AVE 7688 oder Pioglitazon auf die kardiovaskulären Veränderungen in diabetischen Ratten 43

3.2.1 Blutglukosekonzentration 43

3.2.2 Blutdruck und Herzfrequenz 44

3.2.3 Körpergewicht und Gewicht des linken Ventrikels 45

3.2.4 Myozytenquerschnitt im M. quadriceps femoris sowie im linken Ventrikel 46

3.2.5 Absolute und relative Kapillardichten im M. quadriceps femoris und im linken Ventrikel 48

3.2.6 Albumin- und Kreatininkonzentration im Urin 49

4 Diskussion

4.1 Versuchsmodell 51

4.1.1 Ablauf 51

4.1.2 Aussagekraft 54

4.1.3 Analyse der Kapillardichten 58

4.1.4 Strukturelle Myokard- bzw. Myozytenveränderungen sowie Myozytenmorphometrie im Versuchsverlauf 60

4 Diskussion (Fortsetzung)

4.2 Bedeutung der PPAR-γ-Rezeptor vermittelten Wirkungen 62

4.2.1 Blutdruck 62

4.2.2 Angiogenese 64

4.2.3 Anti-apoptotische Effekte 66

4.2.4 Entzündung und Angiotensin II-Stoffwechsel 67

4.2.5 Kardiale Wirkungen 68

4.2.6 Renale Wirkungen 70

4.3 Interpretation der Effekte des Vasopeptidase-Inhibitors 72

4.3.1 Blutdruck 72

4.3.2 Gefäßfunktion und Angiogenese 74

4.3.3 Kardiale Wirkungen 77

4.3.4 Renale Wirkungen 78

4.4 Fazit 79

5 Zusammenfassung 80

6 Literaturverzeichnis 82

7 Danksagung 95

8 Curriculum vitae 96

9 Publikationen 97

Abkürzungen und Akronyme

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme = Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACR	Urinary Albumin-to-Creatinine Ratio (Albumin-Kreatinin-Verhältniss im Urin)
AGE	Advanced Glycation End Product = nicht-enzymatisch glykosylierte Proteine
ANG	Angiotensin II
ANP	Atrial Natriuretic Peptide = A-Typ Natriuretisches Peptid oder Atriales Natriuretisches Peptid
APC	Angiogenic Progenitor Cell = angiogene Stammzelle
AT_1-Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor (AT_1-Subtyp)
AVE 7688	Vasopeptidase-Inhibitor der Firma Aventis (Reinsubstanz)
B_2-Rezeptor	Bradykinin-Rezeptor (B_2-Subtyp)
BK	Bradykinin
BNP	Brain Natriuretic Peptide = B-Typ Natriuretisches Peptid
CD	Capillary Density = Kapillardichte
CD31, CD34	Cluster of Differentiation Protein 31 bzw. 34
C/F	Capillary-to-Fiber-ratio = relative Kapillardichte
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
CRP	C-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidin
ECE	Endothelin-Converting-Enzyme = Endothelin-konvertierendes Enzym
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPC	Endothelial progenitor cell = endotheliale Stammzelle
ET-1	Endothelin-1
GLUT-1, -2, -4	Glukosetransporter-1, -2, -4
HbA_{1c}	Hämoglobin A_{1c}
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography = Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
IDDM	Insulinabhängiger Diabetes mellitus
IL-6, -10 , -12	Interleukin-6, -10, -12

KKS	Kallikrein-Kinin-System
LZR	Lean Zucker Rat = magere Zuckerratte
mRNA	messenger Ribonucleic Acid = messenger Ribonukleinsäure
NADP, NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEP	Neutrale Endopeptidase 24.11
NIDDM	Nicht-Insulinabhängiger Diabetes mellitus
NP	Natriuretische Peptide
OZR	Obese Zucker Rat = adipöse Zuckerratte
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 = CD31
PIO	Pioglitazon
PKC	Proteinkinase C
PLC, PLA_2	Phospholipase C, Phospholipase A_2
PGI_2	Prostaglandin-I_2 = Prostacyclin
PPAR-γ-Rezeptor	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor-γ
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reactive Oxygen Species = Sauerstoffradikale
RSG	Rosiglitazon
STZ	Streptozotocin
TNF, TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor, Tumor-Nekrose-Faktor-α
TRO	Troglitazon
TZD	Thiazolidindione
UAE	Urine Albumin Excretion (renale Albuminausscheidung)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPI	Vasopeptidase-Inhibitor
vWF:Ag	von Willebrand-Faktor-Antigen, früher: Faktor VIII-assoziiertes Antigen

1 Einleitung

Nach Hochrechnungen der Weltgesundheitsorganisation und der internationalen Diabetes-Vereinigung wird die Zahl der Diabetiker weltweit von derzeit etwa 246 Millionen bis zum Jahr 2025 auf 380 Millionen ansteigen. Allein in Deutschland leiden etwa 6 % der Gesamtbevölkerung (≈ 5 Millionen Betroffene) an einem bekannten Diabetes mellitus; über 90 % davon sind Typ-II-Diabetiker, ca. 5 % Typ-I-Diabetiker.

1.1 Pathogenese der allgemeinen Gefäßschädigung beim Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus wird im Wesentlichen als eine Störung des Glukosemetabolismus betrachtet, die, je nachdem ob es sich um einen Diabetes mellitus Typ I oder Typ II handelt, durch den absoluten bzw. relativen Mangel an Insulin hervorgerufen wird. Während der Diabetes mellitus Typ I durch einen Untergang der β-Zellen des Pankreas gekennzeichnet ist, dem ursächlich eine genetische und autoimmune Komponente zugrunde gelegt wird, korreliert das Risiko zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II mit dem Vorhandensein von verschiedenen Risikofaktoren, die als Metabolisches Syndrom zusammengefasst werden können (Howard et al., 2002; Mokdad et al., 2003). Dies ist gekennzeichnet durch das gemeinsame Auftreten mehrerer der folgenden Störungen: abdominelle Adipositas, Dyslipoproteinämie, Glukoseintoleranz und essentielle Hypertonie.

Inzwischen ist bekannt, dass sich das diabetische Krankheitsbild aus einer komplexen Konstellation von metabolischen Fehlfunktionen zusammensetzt, die sowohl den Kohlenhydrat-, Protein- sowie Lipidhaushalt betreffen. Dieser multifaktorielle Prozess führt durch das Zusammenwirken verschiedener metabolischer Dysfunktionen zur Genese und Progredienz schwerwiegender Folge- und Begleiterkrankungen.

Die durch den Diabetes bedingten chronischen Alterationen am Gefäß- und Nervensystem lassen sich in zwei Kategorien einteilen: Makroangiopathie sowie die diabetische Mikroangiopathie. Die Makroangiopathie entspricht im Wesentlichen einer frühzeitig beginnenden und beschleunigt ablaufenden Atherosklerose (Ganda, 1980; Rahman et al., 2007) und ist damit verantwortlich für die signifikant erhöhte Inzidenz an kardiovaskulären Ereignissen, beispielsweise Herzinfarkt (♂ +52 %, ♀ +160 %), im Vergleich zu Nicht-Diabetikern (Gasic und Waldhausl, 2000). Aus diesem Grund stellt sie die häufigste Todesursache im Verlauf der diabetischen Erkrankung dar. Demgegenüber manifestiert

sich die diabetische Mikroangiopathie an den kleinsten Gefäßen, den Arteriolen und Kapillaren, und prädisponiert zur Entwicklung der diabetischen Retino-, Nephro- und Neuropathie. Mittlerweile ist bekannt, dass die anhaltende Hyperglykämie zu den Hauptursachen in der Pathogenese der diabetischen Vaskulopathie gehört (Laakso, 1999). Hohe Blutglukosekonzentrationen gehen einher mit einer gesteigerten Aktivierung der Proteinkinase C (Koya und King, 1998; Beckman, 2004) und mit einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen (Brownlee, 2001; Camera et al., 2007) sowie nicht-enzymatisch glykosylierten Proteinen, beispielsweise HbA_{1c} (Hudson et al., 2005). Weitere Pathomechanismen sind eine gesteigerte Inflammation durch Interaktionen von Leukozyten mit dem Gefäßendothel (Morigi et al., 1998) sowie eine vermehrte Freisetzung von Wachstumsfaktoren (Craven et al., 1995; Murata et al., 1997) mit der konsekutiven Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion (Abb. 1.1). Diese beschreibt die zunehmende Beeinträchtigung des Endothels, gefäßprotektive Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostacyclin (PGI_2) zu bilden und/oder freizusetzen. Folge dieser dauerhaft eingeschränkten Endothelfunktion ist eine herabgesetzte NO-vermittelte Vasodilatation mit konsekutiv ansteigender vaskulärer Kontraktionsbereitschaft und Anstieg des Blutdruckes sowie eine zunehmende Kapillarrarefizierung (Irving et al., 2002). Diese progrediente mikrovaskuläre Gefäßschädigung könnte möglicherweise die früheste Form der Gefäßschädigung im Rahmen des Diabetes darstellen und damit einer der ausschlaggebenden Faktoren für die Entwicklung diabetischer Komplikationen sein. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass die Versorgung kardiovaskulärer Organe vor allem durch die Mikroangiopathie beeinflusst wird; im Gegensatz dazu manifestiert sich die Makroangiopathie erst dann, wenn gravierende Ereignisse wie zum Beispiel ein Myokardinfarkt aufgetreten sind.

Weiterhin ist inzwischen belegt, dass es im Verlauf der diabetischen Erkrankung frühzeitig zu einer erhöhten lokalen Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) mit ansteigenden Konzentrationen von Angiotensin II (ANG) kommt (Jandeleit et al., 1992; Crespo et al., 2003). Brewster und Mitarbeiter (2003) konnten beweisen, dass auch in diesem Falle die Hyperglykämie als ursächlicher Faktor eine vermehrte Aktivierung des intrarenalen RAAS bewirkt. Bemerkenswert ist dabei, dass das RAAS einerseits direkt durch die erhöhten Blutzuckerkonzentrationen aktiviert wird (Singh et al., 1999), andererseits wird der erhöhte Körperwasserverlust aufgrund der hyperglykämisch-induzierten osmotischen Diurese ebenso durch eine zunehmende Wirksamkeit des RAAS kompensiert.

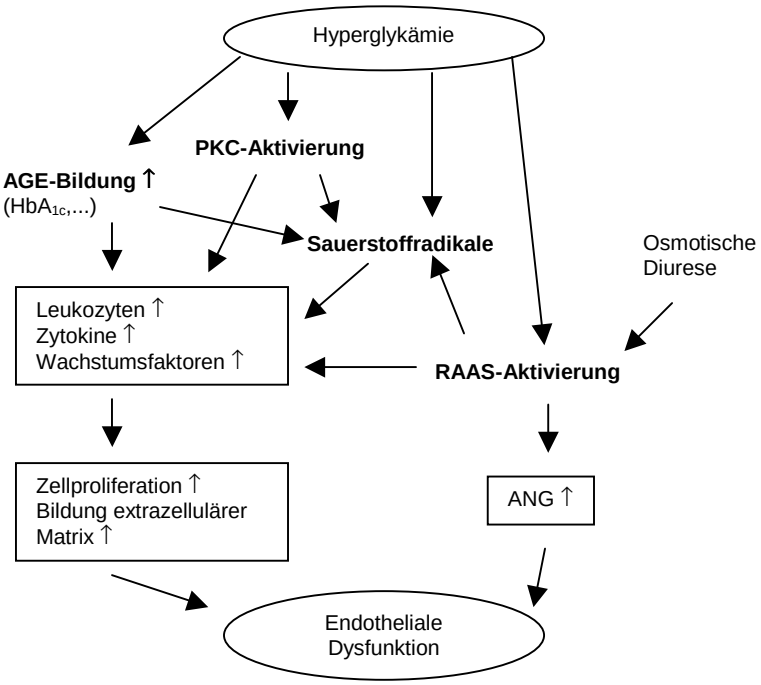

Abb. 1.1 Hyperglykämie-induzierte Prozesse zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, AGE = Advanced glycation end product, ANG II = Angiotensin II, HbA_{1c} = Hämoglobin A_{1c}, PKC = Proteinkinase C, RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

ANG ist ein multifunktionales Hormon, das über das „Angiotensin-Converting-Enzyme“ (ACE) aus Angiotensin I durch Spaltung gebildet wird und über den Angiotensin II-Rezeptor (AT_1-Subtyp) die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen fördert (Dendorfer et al., 2005). Ausgangspunkt für die durch ANG hervorgerufenen pathologischen Gefäßveränderungen ist ebenfalls die Entwicklung bzw. Verstärkung der endothelialen Dysfunktion. Ursächlich hierfür ist unter anderem eine erhöhte ANG-vermittelte Aktivierung von NADPH-Oxidasen der Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen, die durch Triggerung von Stoffwechselprozessen eine vermehrte Genese von hoch reaktiven Peroxiden und Superoxiden („reactive oxygen species“ = ROS) induzieren (Seshiah et al., 2002; Cai et al., 2003). Diese Radikale inaktivieren das endothelial gebildete NO und triggern durch Wechselwirkungen mit intrazellulären Signalmolekülen inflammatorische (Schieffer et al., 2000; Harrison et al., 2003) sowie apoptotische Prozesse (Feuerstein und Young, 2000) mit der Folge einer zunehmenden Beeinträchtigung der Endothelfunktion bis hin zum programmierten Zelltod.

Über eine vermehrte Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) oder „Epidermal growth factor“ (EGF), und eine

erhöhte Produktion des Zytokins „Transforming growth factor-β“ (TGF-β) mit konsekutiver Proliferation und Hypertrophie von glatten Muskelzellen und Fibroblasten (Chiarelli et al., 2000) begünstigt ANG die Entwicklung einer vaskulären (Vranes et al., 1995; Su et al., 1998) und kardialen Hypertrophie (Schunkert et al., 1995) sowie eine zunehmende Akkumulation von extrazellulärer Matrix (Kagami et al., 1994).

Des Weiteren bewirkt ANG über den AT_1-Rezeptor eine blutdrucksteigernde Vasokonstriktion. Diese wird zum einen durch eine direkt kontrahierende Wirkung auf die glatten Gefäßmuskelzellen ausgelöst (Griendling et al., 1997), zum anderen durch eine vermehrte Expression und Freisetzung von Endothelin-1 (ET-1), welches zu den potentesten endogenen Vasokonstriktoren gehört (Rajagopalan et al., 1997; Luft, 2002) (Abb. 1.2).

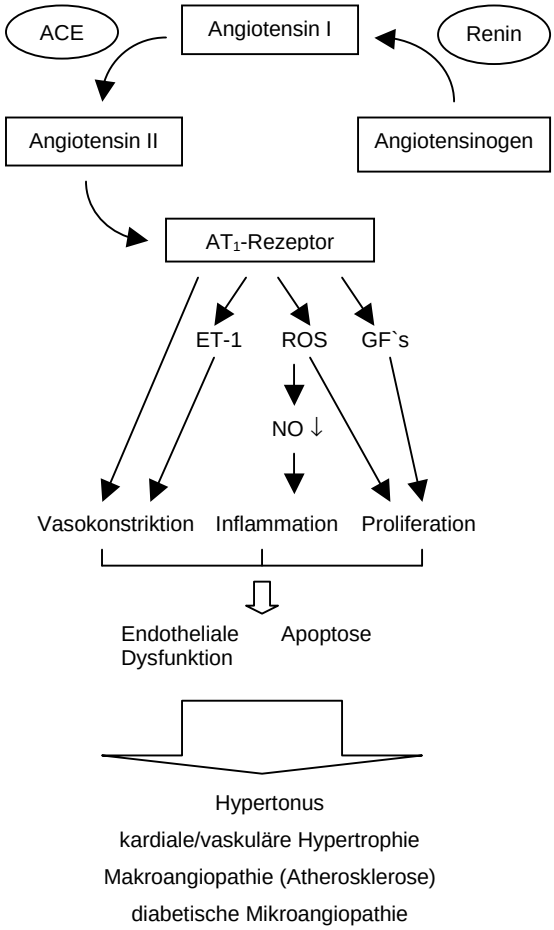

Abb. 1.2 AT_1-Rezeptor vermittelte Wirkungen von Angiotensin II auf das kardio-vaskuläre System (nach Dendorfer et al., 2005 Fig. 1), ACE = Angiotensin-Converting-Enzyme, AT_1-Rezeptor = Angiotensin II-Rezeptor (AT_1-Subtyp), ET-1 = Endothelin-1, GF = Growth factor, NO = Nitric oxide, ROS = Reactive oxygen species

1.2 Therapeutische Angriffspunkte zur Prävention der diabetischen Gefäßschädigung

1.2.1 Allgemeine Therapieprinzipien

Eine frühzeitige und konsequente Behandlung der beeinflussbaren Risikofaktoren kann die kardiovaskuläre Morbiditäts- und Mortalitätsrate unter Diabetikern nachweislich reduzieren (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; UKPDS 38, 1998). Während beim Diabetes mellitus Typ I die Insulinbehandlung als lebensrettende Hormonersatztherapie zwingend indiziert und lebenslang beizubehalten ist, sollten als Basis jeder Behandlung des Diabetes mellitus Typ II zunächst nicht-pharmakologische Maßnahmen zur Therapie der Hyperglykämie ausgeschöpft werden. Dazu gehören vor allem eine Lebensstiländerung in Form einer Ernährungsumstellung, Gewichtsreduktion sowie Erhöhung der körperlichen Aktivität. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass gerade sportliche Betätigung positive Effekte auf den Erhalt von Mikrogefäßen und damit auf die Integrität des kapillären Netzwerkes hat (Hudlická, 1982; Hudlická et al., 1995; Amaral et al., 2000; Frisbee et al., 2006).

1.2.2 Anti-hyperglykämische Therapie

Sollten die oben genannten Maßnahmen nicht ausreichend sein, wird ergänzend eine pharmakologische anti-hyperglykämische Therapie eingeleitet, beispielsweise mit oralen Antidiabetika, Thiazolidindionen, Biguaniden, α-Glucosidase-Hemmern oder Insulin. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl das mikrovaskuläre als auch das makrovaskuläre Erkrankungsrisiko mit der Dauer und Höhe der Hyperglykämie in enger Beziehung stehen (Stevens et al., 2004; Selvin et al., 2005). So konnten Stratton und Kollegen (2000) beweisen, dass jede Reduktion des mittleren HbA_{1c}-Wertes um 1 % das Myokardinfarkt- sowie Schlaganfallrisiko um 14 % bzw. 12 % verringert und mit einer Risikoreduktion von 37 % für mikrovaskuläre Folgeschäden bzw. Komplikationen einhergeht. Die 2005 vorgestellte PROspective PioglitAzon Clinical Trial In MacroVascular Events Studie (PROactive) untersuchte die Wirkungen einer Pioglitazontherapie auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Typ-II-Diabetes und bekanntem makrovaskulären Ereignis (Herzinfarkt, Bypasserfordernis, Apoplex). Hierbei stellte sich heraus, dass Pioglitazon die kardiovaskulären

Endpunkte, bestehend aus nicht-tödlichem Myokardinfarkt, Schlaganfall sowie kardiovaskulärer Gesamtmortalität, signifikant um 16 % reduzierte (Walcher und Marx, 2006). In einer Subgruppe der PROactive-Studie konnte Pioglitazon das Herzinfarktrisiko um 28 % und die Inzidenz eines akuten Koronarsyndroms um 37 % reduzieren (Erdmann et al., 2007).

1.2.3 Glukose-unabhängige medikamentöse vaskuläre Protektion

Inzwischen ist bekannt, dass die Diabetes-bedingten kardiovaskulären Folge- und Begleiterkrankungen durch die Normalisierung der Blutglukosekonzentration nicht ausreichend reduziert werden können, so dass die Indikation für eine ergänzende Glukose-unabhängige Medikation gegeben ist.

Die Prävalenz der Hypertonie ist bei Diabetikern etwa doppelt so hoch wie bei gleichaltrigen nicht-diabetischen Patienten. Parallel dazu ist auch das Risiko einer koronaren Herzerkrankung sowie der Herz- und Niereninsuffizienz bei hypertonen Diabetikern um das 3- bis 5- fache erhöht (Gasic und Waldhausl, 2000). Folglich profitieren sowohl hypertensive als auch niereninsuffiziente Diabetiker von der Gabe eines ACE-Hemmers (Lewis et al., 1993; Adler et al., 2000) oder Angiotensin II-Rezeptor-antagonisten (AT_1-Antagonist) (Brenner et al., 2001). Die Gabe von Ramipril reduzierte in der Heart Outcomes Prevention Evaluation Studie (HOPE-Studie, 2000) die Gesamtmortalität von Diabetikern um 24 %. Ebenso wurde das Myokardinfarktrisiko um 22 % und die Gefahr der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie um 24 % vermindert. Zusätzlich sank die Diabetes-Inzidenz unter der Behandlung mit Ramipril um 34 % (Ingelfinger und Solomon, 2006). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass Ramipril keinerlei direkte Effekte auf die Blutglukosekonzentration hat. Ursächlich für diese Prognoseverbesserung könnten unter anderem Schutzwirkungen auf das Kapillarwachstum sein. In einer experimentellen Studie von Frisbee (2005a) zeigte sich in adipösen Zuckerratten (Obese Zucker Rats = OZR) im Verlauf von knapp 3 Wochen eine um ca. 23 % reduzierte Kapillardichte im Skelettmuskel im Vergleich zu mageren Zuckerratten (Lean Zucker Rats = LZR). In einem anderen Versuchsarm der gleichen Studie verhinderte die Applikation von Captopril in OZR die Genese von Bluthochdruck und verursachte neben einer verbesserten Glukoseutilisation einen signifikanten Anstieg der mikrovaskulären Dichte. Die Gabe von Hydralazin zeichnete sich ebenfalls durch präventive Effekte bezüglich der Entwicklung eines Hypertonus aus,

hatte jedoch keinen relevanten Einfluss auf das kapilläre Netzwerk, woraufhin die Hypothese aufgestellt wurde, dass die zunehmende Insulinresistenz im Rahmen des metabolischen Syndroms entscheidend zur progredienten Kapillarrarefizierung beiträgt. Eine mögliche Ursache für diese durch die aufgestellte Hypothese beschriebene Entwicklung könnten ansteigende bzw. anhaltend hohe Blutzuckerkonzentrationen sein, die bekanntermaßen mit einer zunehmenden Einschränkung der physiologischen Endothelfunktion einhergehen. Konsequenz könnte eine fortschreitende Insuffizienz der Zielzellen sein, Glukose zu verstoffwechseln mit der Folge einer persistierenden Hyperglykämie und konsekutiver Zellschädigung.

ACE-Hemmer durchbrechen diesen Circulus vitiosus, indem sie die pathologisch veränderte Endothelfunktion positiv beeinflussen und damit eine verbesserte periphere Insulinsensitivität, einhergehend mit einer reduzierten Zielzellschädigung, hervorrufen.

Die Tatsache, dass die Inzidenz und die Progression des Diabetes durch die Gabe von ACE-Inhibitoren positiv beeinflusst werden kann (Vermes et al., 2003; Abuissa et al., 2005; Ingelfinger und Solomon, 2006), unabhängig von direkten Effekten auf die Blutglukosekonzentration, spricht dafür, dass die beobachtete Verbesserung der Kapillardichte unter der Behandlung mit ACE-Hemmern als kausaler Faktor für diese Ergebnisse verantwortlich sein kann. Aus diesem Grund wurde der Fokus der vorliegenden Arbeit bewusst auf die Glukose-unabhängigen (mikro-) gefäßprotektiven Wirkungen von ausgewählten Medikamenten gelegt.

1.3 Untersuchte Medikamente mit organprotektiver Wirkung

1.3.1 ACE-Hemmer

Die antihypertensiven und organprotektiven Wirkungen von ACE-Inhibitoren werden einerseits durch den Eingriff ins RAAS mit verminderter Angiotensin II-Bildung und andererseits durch Beeinflussung des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS) mit vermehrter Akkumulation von Bradykinin (BK) hervorgerufen (Ebrahimian et al., 2005).

Das ACE, welches identisch ist mit der Kininase II und vor allem auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird, katalysiert einerseits die Konversion von Angiotensin I zu Angiotensin II (ANG) sowie andererseits den Abbau verschiedener Peptide, von denen BK das bedeutendste ist (Corti et al., 2001).

BK, das durch Kallikrein aus zirkulierenden Kininogenen freigesetzt wird, führt über die Aktivierung eines endothelialen G-Protein-gekoppelten Kininrezeptors (B_2-Subtyp) zu einer Stimulation der Phospholipasen A_2 und C mit vermehrter Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) (Wiemer et al., 1991) und Prostacyclin (PGI_2) (Schrör, 1992). Der Anstieg dieser beiden Gewebshormone führt zu einer endothelvermittelten Vasodilatation und trägt aufgrund der anti-inflammatorischen, anti-proliferativen und anti-thrombotischen Wirkungen wesentlich zur Aufrechterhaltung der physiologischen Gefäßfunktion bei (Abb. 1.3) (Moncada und Higgs, 1993; Linz et al., 1995). So wurde Anfang der 90-er Jahre in einer Vielzahl von experimentellen Studien festgestellt, dass ACE-Hemmer endothelprotektive und dadurch durchblutungsfördernde sowie anti-atherosklerotische Wirkungen haben (Becker et al., 1991; Rolland et al., 1993). Farhy et al. (1992, 1993) konnten zeigen, dass die durch Ramipril vermittelte Akkumulation von BK, zusätzlich zur verminderten ANG-Bildung, beachtlich zu den anti-proliferativen Wirkungen der ACE-Hemmer beiträgt. Infolgedessen kam es insbesondere nach Gefäßverletzungen zu einer deutlich reduzierten Intimaneubildung. Ein weiterer Vorteil der ACE-Inhibitoren sind ihre kardioprotektiven Wirkungen, die ebenso auf eine herabgesetzte ANG-Bildung sowie verminderte BK-Degradierung zurückgeführt werden. Demzufolge bewirken die ACE-Hemmer Perindopril und Ramipril eine deutliche Verbesserung der Herzfunktion, die sich zum einen in einem Anstieg des Schlagvolumens und der Koronardurchblutung sowie einem reduzierten Auftreten postischämischer Arrhythmien äußert und sich zum anderen in einer verminderten Entwicklung einer ventrikulären Hypertrophie manifestiert (Linz et al., 1986, 1989; Gohlke et al., 1994a, 1994b).

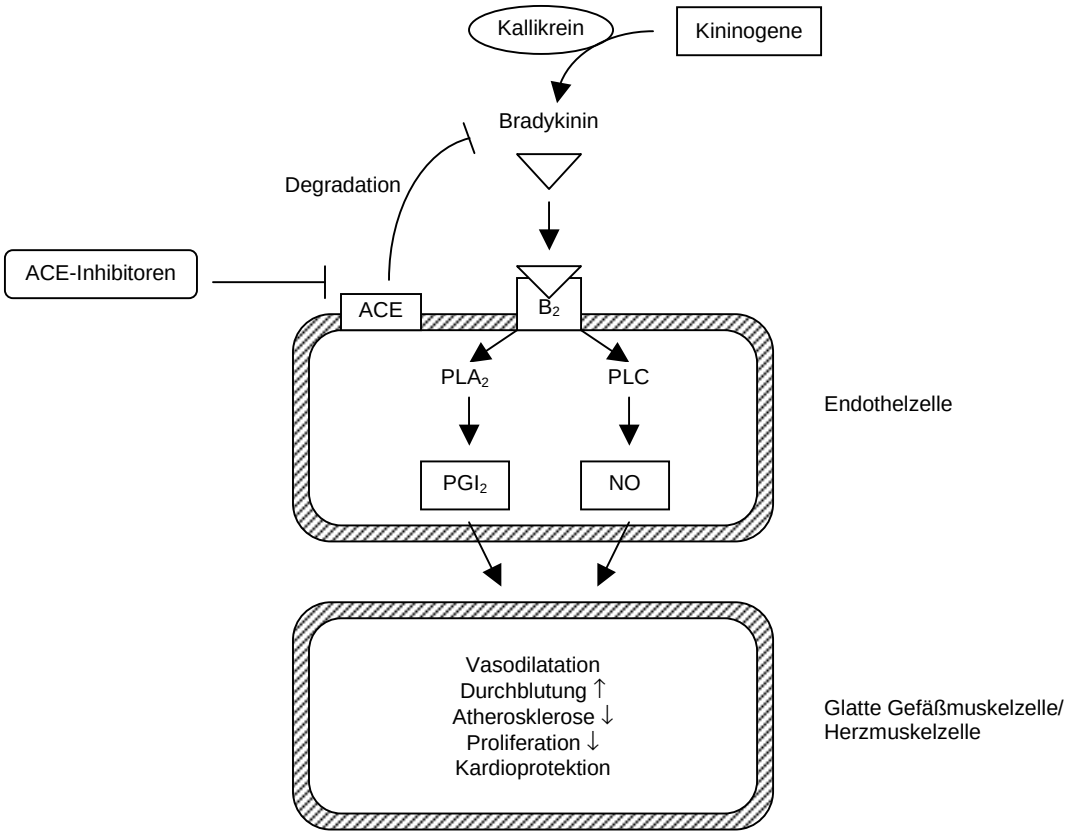

Abb. 1.3 Wirkungsmechanismen von Bradykinin auf die glatte Muskelzelle, ACE = Angiotensin-Converting-Enzyme, B_2 = Kinin-Rezeptor (B_2-Subtyp), NO = Nitric oxide, PGI_2 = Prostacyclin, PLA_2 = Phospholipase A_2, PLC = Phospholipase C

1.3.2 PPAR-γ-Agonisten

Der „Peroxisom-Proliferator-Aktivierte-Rezeptor-γ“ (PPAR-γ) ist ein zytoplasmatisches Protein, das vor allem im Fettgewebe wie auch in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen exprimiert wird (Staels und Fruchart, 2005).
Fettsäuren und ihre durch Cyclo- und Lipooxygenase gebildeten Eicosanoid-Derivate, mit besonderer Bedeutung das 15-Desoxy-Δ-prostaglandin J_2, stellen natürliche Liganden des PPAR-γ dar (Ferry et al., 2001). Nach Bindung eines Liganden transloziert PPAR-γ in den Zellkern und steuert als Transkriptionsfaktor direkt die Expression bestimmter Zielgene, die an der Regulation des Lipid- und Glukosestoffwechsels sowie inflammatorischer Prozesse und der Endothelfunktion beteiligt sind (Abb. 1.4) (Yki-Järvinen, 2004).

Seit der Entwicklung der Thiazolidindione (TZD) in den 90-er Jahren stehen synthetische Liganden zur Verfügung, die bisher lediglich in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden und auch als „Glitazone“ oder „Insulinsensitizer“ bezeichnet werden.

Glitazone führen über eine vermehrte Expression der Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-4 im Fett- und Skelettmuskelgewebe zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme in die Zielzellen mit resultierender Abnahme der Plasmaglukosekonzentration und damit einhergehender erhöhter peripherer Insulinsensitivität (Kramer et al., 2001). In Placebo-kontrollierten Studien bewirkte sowohl die Therapie mit Pioglitazon als auch mit Rosiglitazon eine Abnahme des glykosylierten Hämoglobins bzw. des HbA_{1c}-Wertes um 0,5-1,4 % (Gale, 2001). Gleichartige Resultate zeigten Imano und Kollegen (1998) bei Diabetikern unter der Behandlung mit Troglitazon.

Darüber hinaus beobachtet man unter der Behandlung mit TZD ansteigende Konzentrationen von Adiponektin, einem Zytokin, welches ausschließlich im Fettgewebe gebildet wird und ebenfalls die Insulinempfindlichkeit der Zellen erhöht (Maeda et al., 2002; Matsuda et al., 2002).

In dysfunktionalen Fettzellen gebildete Zytokine wie Leptin und Resistin verstärken die Insulinresistenz. Die Inhibition der Sekretion dieser Zytokine durch TZD führt ebenso zu einer Besserung der Insulinsensitivität (Marx et al., 2004).

Neben den erwähnten blutzuckersenkenden Wirkungen weisen TZD auch günstige Eigenschaften in Bezug auf den Erhalt und die Verbesserung der Endothelfunktion auf (Campia et al., 2006; Martens et al., 2006). Entsprechend führt die Stimulation vaskulärer PPAR-γ-Rezeptoren über Transkriptionsmechanismen zu einer gesteigerten endothelialen NO-Freisetzung (Calnek et al., 2003; Polikandriotis et al., 2005). Folgen dieser erhöhten NO-Konzentrationen sind neben einer potenten Vasodilatation, anti-proliferative, anti–thrombotische sowie anti-atherosklerotische Wirkungen, die wesentlich zum Erhalt der physiologischen Gefäßfunktion beitragen (Harrison, 1997).

Zusätzlich bewirken PPAR-γ-Agonisten eine verminderte Expression und Freisetzung von Endothelin-1 (ET-1) (Delerive et al., 1999; Barbier et al., 2002), was zu einer Potenzierung der vasodilatierenden Wirkungen führt.

Ein wichtiger Faktor in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen ist das vaskuläre „remodeling“. Dies ist durch eine abnorme Sensitivität glatter Muskelzellen gegenüber zum Beispiel Wachstumsfaktoren gekennzeichnet, mit der Folge einer Proliferation und Hypertrophie kardialer sowie vaskulärer Myozyten. Mit Hilfe von in-vitro- und in-vivo-Studien konnte bewiesen werden, dass TZD über die PPAR-γ-Aktivierung diese

Entwicklungen hemmen und folglich kardiovaskulären Erkrankungen vorbeugen können (de Dios et al., 2003; Benkirane et al., 2006a; Balakumar et al., 2007).

Auch die durch ANG hervorgerufenen Prozesse, welche beachtlich zur Genese verschiedener Krankheitsbilder beitragen, werden durch die Verabreichung dieser Wirkstoffe entscheidend geschwächt. Die Ursache hierfür liegt in einer verminderten Expression von AT_1-Rezeptoren (Diep et al., 2002; Benkirane et al., 2006b).

Ausgelöst durch diese vielfältigen Mechanismen zeigt diese Substanzklasse auch gute Resultate im Hinblick auf die Blutdruckregulation. So führte die Gabe von Rosiglitazon in hypertensiven männlichen Zuckerratten zu einem ausgeprägten Blutdruckabfall (Walker et al., 1999). Vergleichbare Resultate beobachteten Nolan und Mitarbeiter (1994) bei adipösen Patienten mit gestörter Glukosetoleranz unter der Therapie mit Troglitazon.

Des Weiteren spielen PPAR-γ-Rezeptoren eine zentrale Rolle in der Modulierung der Entzündung, was ebenfalls zu den anti-atherosklerotischen, vaskuloprotektiven Wirkungen beiträgt. Atherosklerose ist ein chronisch entzündlicher Prozess innerhalb der arteriellen Gefäßwand, der mit einer erhöhten Expression an inflammatorischen Markern, wie etwa C-reaktivem Protein (CRP), Fibrinogen, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und Interleukin-6 (IL-6), einhergeht. PPAR-γ-Liganden inhibieren in Leukozyten die Expression pro-inflammatorischer Gene wie etwa Zytokinen und Akut-Phase-Proteinen. Dementsprechend führt die Gabe von 15-Desoxy-Δ-prostaglandin J_2 und TZD zu einer herabgesetzten Sekretion von CRP, TNF, IL-6, IL-10 und IL-12 (Azuma et al., 2001; Verma und Szmitko, 2006; Goldberg, 2007).

Dadurch, dass die Makroangiopathie im Rahmen der diabetischen Erkrankung unter anderem auf einem chronischen Entzündungsprozess beruht, ist zu vermuten, dass gesteigerte inflammatorische Prozesse ebenso für die progrediente Kapillarrarefizierung verantwortlich sein könnten. Demzufolge könnten die anti-inflammatorischen Wirkungen von TZD auch wesentlich zur Verzögerung bzw. Milderung dieser zunehmenden Mikrogefäßschädigung beitragen.

Therapeutische Effekte von TZD werden auch hinsichtlich der Diabetes-bedingten Nierenschädigung sichtbar. Gerade in den frühen Stadien der diabetischen Nephropathie führt der Einsatz von Troglitazon oder Rosiglitazon zu einer reduzierten Mikroalbuminurie und Albuminexkretion (Abb. 1.5) (Imano et al., 1998; Nakamura et al., 2001).

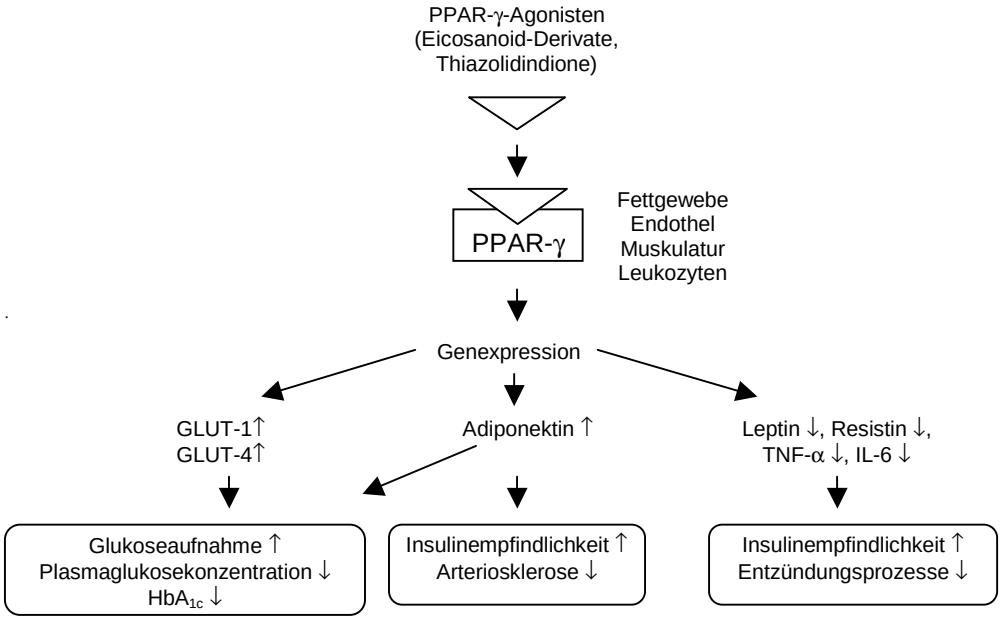

Abb. 1.4 Regulation des Lipid- und Glukosestoffwechsels sowie der Entzündungsreaktion durch PPAR-γ, GLUT-1 = Glukosetransporter-1, GLUT-4 = Glukosetransporter-4, HbA_{1c} = Hämoglobin A_{1c}, IL-6 = Interleukin-6, PPAR-γ = Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor-γ, TNF-α = Tumor-Nekrose-Faktor-α

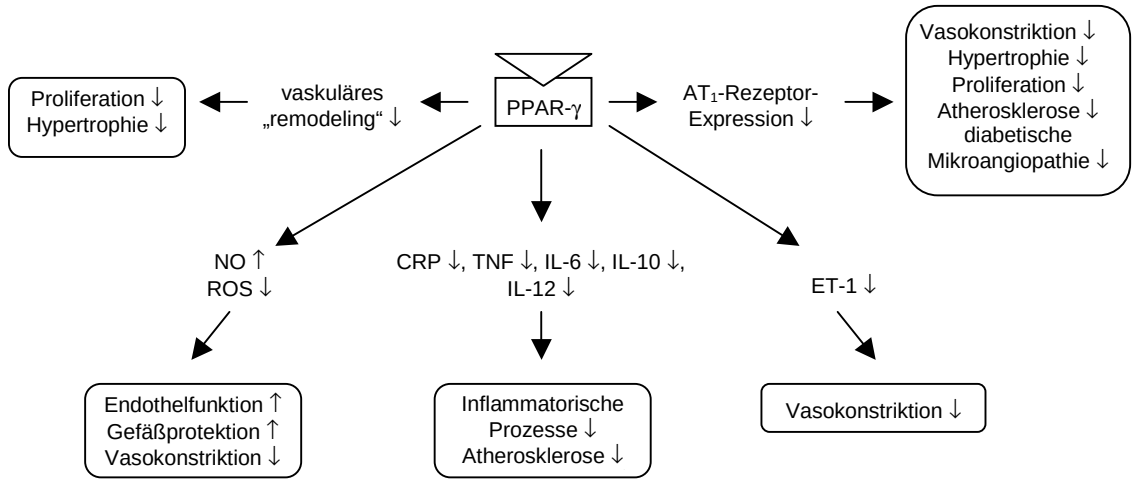

Abb. 1.5 Einfluss von PPAR-γ-Agonisten auf das kardiovaskuläre System und inflammatorische Prozesse, AT_1-Rezeptor = Angiotensin II-Rezeptor (AT_1-Subtyp), CRP = C-reaktives Protein, ET-1 = Endothelin-1, IL-6 = Interleukin-6, IL-10 = Interleukin-10, IL-12 = Interleukin-12, NO = Nitric oxide, PPAR-γ = Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor-γ, ROS = Reactive oxygen species, TNF = Tumor-Nekrose-Faktor

1.3.3 Vasopeptidase-Inhibitoren

Bei den Vasopeptidase-Inhibitoren (VPI) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der ACE-Hemmer, die als duale Hemmstoffe sowohl die Neutrale Endopeptidase 24.11 (NEP) als auch das ACE mit vergleichbarer inhibitorischer Potenz blockieren.

Bei der NEP handelt es sich um eine membran-gebundene Zink-Metalloprotease, die vornehmlich im Zentralen Nervensystem, in der Niere, in der Gefäßwand, im Herz und in Fibroblasten sowie in Leukozyten lokalisiert ist (Roques et al., 1993; Ruschitzka et al., 2001).

Das aktive Zentrum bzw. die katalytische Einheit dieses Enzyms ist dem ACE sehr ähnlich und ebenso am Abbau einer Vielzahl endogener Peptide beteiligt. So werden die vasodilatativ wirksamen Natriuretischen Peptide (NP) ANP, BNP und CNP, Substanz P und Bradykinin wie auch die vasokonstriktiv wirksamen Peptide Endothelin-1 (ET-1) und Angiotensin II (ANG) von der Peptidase gespalten und damit inaktiviert (Corti et al., 2001). Weitere Substrate sind das Adrenomedullin, das Cholezystokinin und endogene Opioide wie z.B. die Enkephaline, weshalb die NEP auch als Enkephalinase bezeichnet wird (Roques et al., 1993).

Erwähnenswert ist, dass die Wirkungen von NEP-Inhibitoren auf den Gefäßtonus davon abhängig sind, ob die Mehrzahl der vermindert abgebauten Substrate überwiegend vasodilatative oder -konstriktive Eigenschaften aufweisen. So konnte in experimentellen Studien gezeigt werden, dass unter selektiver NEP-Hemmung mit z.B. Candoxatril eine Vasokonstriktion hervorgerufen wird, die durch einen verminderten Abbau von ANG und ET-1 verursacht wird (Motwani et al., 1995; Ferro et al., 1998). Dies erklärt, weshalb selektive NEP-Inhibitoren zwar zu einer Potenzierung der natriuretischen und diuretischen Wirkung von ANP führen, dadurch jedoch lediglich einen minimalen Blutdruckabfall bewirken bzw. bei normotensiven Patienten sogar zu einem Blutdruckanstieg führen können (Ando et al., 1995; Motwani et al., 1995). Da die selektive Hemmung des ACE sowohl zu einer herabgesetzten ANG-Bildung als auch zu einer verminderten Expression und Freisetzung von ET-1 führt, entwickelte man kombinierte NEP- und ACE-Hemmstoffe, wie z.B. das Omapatrilat, die als VPI bezeichnet werden. Diese Kombination bietet den Vorteil, dass die ACE-Hemmung speziell die Effekte der vasokonstriktorischen Anteile unter NEP-Hemmung unterdrückt und dadurch die blutdrucksenkenden Wirkungen verstärkt.

Ebenso wie das ACE interferiert die NEP mit dem KKS. So ist die NEP vor allem unter vorliegender ACE-Hemmung wesentlich am BK-Abbau beteiligt. Die kombinierte

Anwendung eines ACE- und NEP-Inhibitors führt damit zu einer vermehrten Akkumulation und verstärkten protektiven Wirkung des Bradykinins gegenüber der alleinigen Applikation eines selektiven ACE- oder NEP-Hemmers (Blais et al., 2000; Dumoulin et al., 2001).

Ein weiterer großer Vorteil der VPI liegt darin, dass sie ein deutlich größeres Wirkungsspektrum umfassen als die ACE-Hemmer. French und Mitarbeiter (1995) konnten diesbezüglich belegen, dass die antihypertensiven Wirkungen des VPI „MDL 100,173“ unabhängig von der Plasma-Renin-Aktivität sind, wohingegen Captopril zwar eine potente, jedoch im Vergleich zu MDL 100,173 weniger ausgeprägte Blutdrucksenkung erzeugte und dies auch nur in Versuchsmodellen mit hoher und normaler Reninkonzentration. Vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Wirkungsbandbreite von VPI wurden auch von Fournié-Zaluski und ihren Mitarbeitern (1994) sowie Trippodo et al. (1998) beobachtet.

Zusätzlich weist die Substanzgruppe der VPI auch deutliche Vorteile im Hinblick auf die kardio- und vaskuloprotektiven Wirkungen auf. So fanden Quaschning et al. (2001a, 2001b) heraus, dass die Verbesserung der Endothelfunktion unter der Therapie mit Omapatrilat im Vergleich zur alleinigen Gabe von Captopril signifikant höher war. Des weiteren zeigte Omapatrilat hinsichtlich der Entwicklung einer kardialen und vaskulären Hypertrophie eindeutig stärkere präventive Effekte, die ebenfalls auf eine Potenzierung der Wirkung von Bradykinin und der Natriuretischen Peptide sowie auf eine verminderte Bildung von ANG und ET-1 zurückgeführt wurden.

1.4 Fragestellung/Zielsetzung

Die progrediente Kapillarrarefizierung im Rahmen des Diabetes mellitus stellt eine früh auftretende Gefäßschädigung dar, die möglicherweise ursächlich ist für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und Komplikationen. Inzwischen gibt es umfangreiche Hinweise für gefäß- und organprotektive Wirkungen gängiger zur Diabetes-Behandlung eingesetzter Medikamente, vor allem in Bezug auf die Makroangiopathie. Vaskuloprotektive Effekte auf das kapilläre Netzwerk haben bisher jedoch kaum Beachtung gefunden. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die frühzeitige Therapie mit dem Vasopeptidase-Inhibitor AVE 7688 oder dem PPAR-γ-Agonisten Pioglitazon eine Verzögerung und/oder Milderung der progredienten mikrovaskulären Gefäßschädigung im Verlauf der diabetischen Erkrankung bewirkt. Zusätzlich sollte der Einfluss dieser beiden Medikamente auf die renale Albumin- und Kreatininexkretion sowie die hämodynamischen Parameter Blutdruck und Herzfrequenz ermittelt werden.
Zum Nachweis dieser Arbeitshypothesen sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Wann tritt die Kapillarrarefizierung auf und wie ist der zeitliche Verlauf der Gefäßschädigung im STZ-diabetischen Modell?
2. Werden die Diabetes-bedingten pathologischen Gefäßveränderungen in Form einer abnehmenden Mikrogefäßdichte durch Vasopeptidasehemmung bzw. durch die Therapie mit einem PPAR-γ-Agonisten günstig beeinflusst?
3. Hat die Therapie positive bzw. präventive Wirkungen auf die Entwicklung diabetischer Folgeerkrankungen wie zum Beispiel Hypertonie, Linksherz-hypertrophie oder die diabetische Nephropathie?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die einzelnen Untersuchungen dieser Studie wurden an männlichen Wistar-Ratten mit einem Ausgangsgewicht von 253 ± 3 g durchgeführt, die von der Firma Charles River, Sulzfeld, bezogen wurden. Die Versuchstiere wurden in Käfigen mit jeweils 5 Tieren gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Futter. Bis auf die Medikamentengruppen erhielten die Tiere Standardfutter (Altromin-Haltungsdiät**)**. Die Klimakammer, in der die Tiere während der gesamten Studie gehalten wurden, hatte eine konstante Temperatur von 21 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 50 %. Der automatisierte Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden begann um 6:00 Uhr und wechselte um 18:00 Uhr zur Dunkelheit.
Dieser tierexperimentelle Versuch wurde vom Ministerium für Natur, Umwelt und Landesentwicklung des Landes Schleswig-Holstein mit dem Aktenzeichen V 742-72241.122-22 genehmigt.

2.1.2 Medikamente

Pioglitazon	zermahlene Tabletten des zugelassenen Präparates Actos™
AVE 7688	Reinsubstanz, von der Firma Aventis zur Verfügung gestellt

2.1.3 Antikörper

Antikörper Maus-anti-Ratte „CD31“, monoklonal	Serotec, Raleigh, NC
VECTASTAIN® Elite ABC - Kit Maus IgG PK-6102	Vector Laboratories
DAB Substrat KIT für Peroxidase	Vector Laboratories

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck
Ether	Hoechst
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Distickstoffoxid (Lachgas)	Messer Griesheim
Ethanol	Merck
Eukitt® („Mounting Medium“)	O. Kindler
Haemalaun	Division Chroma®
Wasserstoffperoxid (30 %- ig)	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Methanol	J. T. Baker
2-Methylbutan für HPLC	Aldrich
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Pentobarbital-Na (96 mg/1,8 ml)	Klinikapotheke
Sauerstoff	Messer Griesheim
Streptozotocin	Sigma
Xylol	Merck

2.1.5 Puffer

PBS (pH 7,4)	8 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4, 0,2 g KCl, 1,150 g Na_2HPO_4, Aqua dest. ad 1000 ml

2.1.6 Geräte

Nicht-invasive Blutdruckmessung:

Blood Pressure Monitor 8002 Dual Channel	TSE, Bad Homburg
Piezoelemente zur Pulsdetektion	TSE, Bad Homburg
Recomed Schreiber 218099	Marquette Hellige, Freiburg

Wärmelampe 230 W	Osram, München
Kryostat:	
Kryostat CM 3050	Leica
Embedding Matrix (= Bindemittel zum Einbetten) für Gefrierschnitte	Lipshaw, Pittsburgh
SuperFrost Plus® Objektträger	Menzel-Gläser
Schnittstrecker (Glas, 80 mm)	Leica Instruments GmbH
Schnittmesser (Model 818)	Leica Instruments GmbH
Blutzuckermessgerät:	
Ascensia Elite XL	Bayer
Ascensia Elite Sensor	Bayer
Lichtmikroskop:	
Axiophot	Zeiss
Mikrometer:	
Objektmikrometer	Zeiss
Kamera:	
AxioCam	Zeiss
Bildverarbeitungssoftware:	
AxioVision Rel. 4.6	Zeiss
Statistiksoftware:	
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, Inc.
Waagen:	
BP 201 D (Feinwaage)	Sartorius
MC1	Sartorius

2.2.1 Streptozotocin-Injektion zur Induktion eines Diabetes mellitus

Zur Induktion eines Typ-I-Diabetes mellitus wurden die einzelnen Versuchstiere für kurze Zeit mit Ether narkotisiert. Anschließend erhielt jede Ratte eine einmalige intraperitoneale Streptozotocin (STZ) -Injektion in einer Dosierung von 75 mg kg^{-1}. Zur Verbesserung der Resorption wurde den Tieren 24 Stunden vor STZ-Gabe das Futter bei weiter bestehendem Wasserangebot entzogen und 15 Minuten nach STZ-Applikation wieder zugeführt (Junod et al., 1967; Giorgino et al., 1992). Da STZ in Pulverform vorliegt, wurde die Substanz in 0,1 M Zitratpuffer (pH = 4,5) gelöst (= 75 mg STZ ml^{-1}) und daraufhin injiziert (Junod et al., 1967; Dorenkamp et al., 2005).

2.2.2 Medikamentendosierungen und –verabreichung

Nach einem Beobachtungszeitraum von 8 Tagen wurden 30 STZ-diabetische Wistar-Ratten in insgesamt 3 Behandlungsgruppen mit jeweils 10 Tieren eingeteilt. Eine Tiergruppe wurde mit Standardfutter (Altromin-Haltungsdiät) ernährt (= Placebo). In den anderen beiden Behandlungsgruppen erfolgte die Verabreichung der Medikamente AVE 7688 und Pioglitazon mit dem Futter. Um die jeweiligen Medikamentenkonzentrationen für die einzelnen Futtergemische zu dosieren, wurde vor Beginn der medikamentösen Behandlung täglich das Körpergewicht jeder Ratte bestimmt sowie in regelmäßigen Abständen die Futtermenge errechnet, die jede Ratte pro Tag frisst. Die Herstellung der einzelnen Futtergemische erfolgte daraufhin auf Basis der erhobenen Werte, dass jede Ratte ein Durchschnittsgewicht von 300 g besitzt und täglich ca. 40 g Futter frisst. Die Zieldosis jeder Ratte sollte für AVE 7688 30 mg kg^{-1} bzw. für Pioglitazon 10 mg kg^{-1} sein. Entsprechend belief sich die Medikamentenkonzentration in den speziell angefertigten Futtergemischen auf 0,23 mg AVE 7688 g^{-1} Futter bzw. auf 0,1 mg Pioglitazon g^{-1} Futter.
Als Anhaltspunkt für die Dosierungen der eingesetzten Medikamente dienten vorangegangene experimentelle Studien, die für den von uns gewählten Dosisbereich Effekte hinsichtlich der Wirksamkeit und Toxizität nachweisen konnten. In diesen Studien wurde Ratten Pioglitazon in einer Spannbreite von 1 mg kg^{-1} bis 30 mg kg^{-1} (Larsen et al., 2003, Minoura et al., 2007) und AVE 7688 in einer Höhe von 30 mg kg^{-1} bis 45 mg kg^{-1} (Schäfer et al., 2004, Linz et al., 2006) verabreicht. Die von uns angestrebten Zieldosen liegen damit

innerhalb dieser bewährten Dosierungsbereiche. In Relation zum Körpergewicht wurden in der vorliegenden Studie bewusst höhere Dosierungen gewählt, als sie therapeutisch beim Menschen eingesetzt werden, da bei kleinen Nagern aufgrund des aktiveren Stoffwechsels nur unter diesen Bedingungen ein wirksamer Plasmaspiegel erreicht werden kann.

Am Versuchsende ergab die Futtermengenkontrolle, die insgesamt 23-mal durchgeführt wurde, dass jede Ratte täglich ca. 41,84 g Futter (= AVE 7688) bzw. ca. 40,79 g Futter (= Pioglitazon) gefressen hatte und die tatsächliche Dosis jeder Ratte für AVE 7688 ca. 38 mg kg^{-1} und für Pioglitazon ca. 17 mg kg^{-1} betrug.

2.2.3 Versuchsprotokoll

1. Studie: Beginn und zeitlicher Verlauf der Kapillarrarefizierung

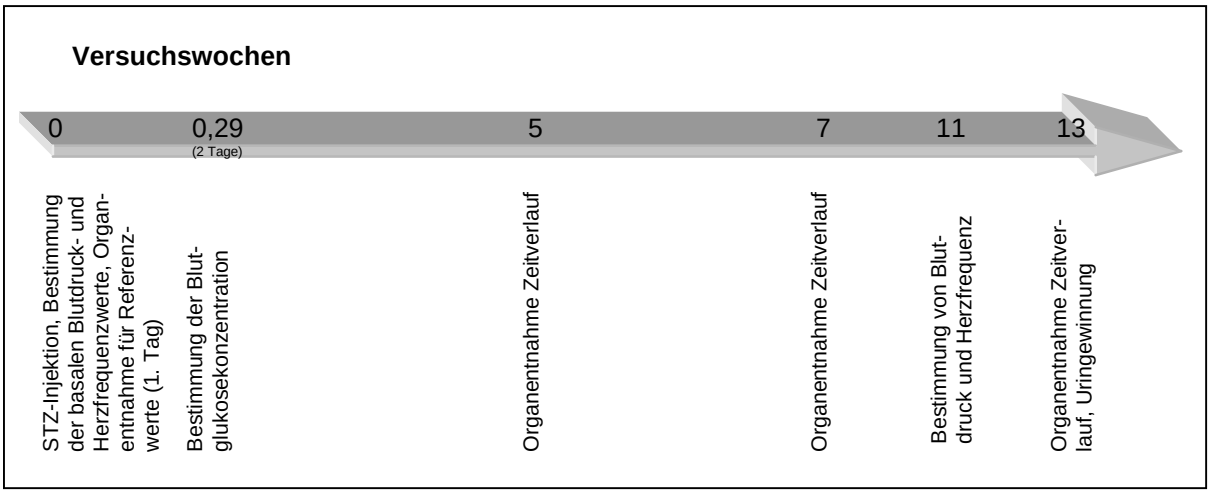

Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Studienprotokolls

2. Studie: Medikamentöse Therapie

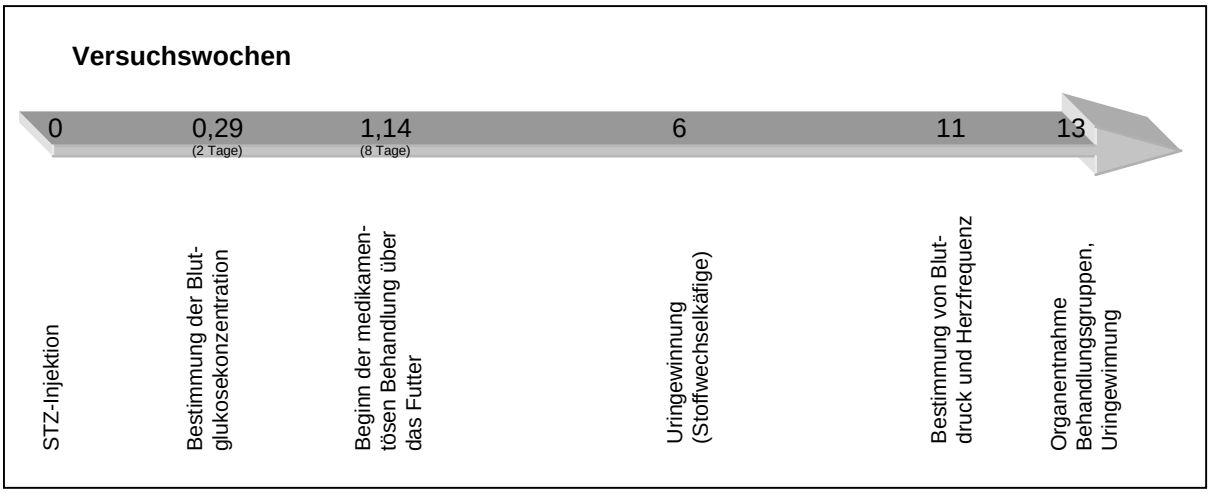

Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Studienprotokolls

Die vorliegende Untersuchung wurde über einen Zeitraum von insgesamt 13 Wochen durchgeführt und war in 2 voneinander unabhängige Studien unterteilt.

In der ersten Studie gab es insgesamt 4 parallel durchgeführte STZ-diabetische Behandlungsarme mit jeweils 5 bis10 Tieren, die keine weitere Behandlung erfuhren und am 1. Tag nach STZ-Injektion (= Versuchsbeginn) sowie im Abstand von 5, 7 und 13 Wochen getötet wurden, um den Zeitverlauf der diabetischen Veränderungen zu repräsentieren.

Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden am Versuchsbeginn und nach 11 Wochen nicht-invasiv gemessen (siehe 2.2.5).
Die zweite Studie bestand aus insgesamt 3 STZ-diabetischen Behandlungsgruppen mit jeweils 10 Ratten. Um einen möglichen medikamentösen Einfluss auf die STZ-Wirkung zu verhindern, wurde den Tieren nach 8 Tagen, also erst nach Etablierung des Diabetes, entweder Placebo (Altromin-Haltungsdiät) oder verschiedene Pharmaka (tatsächliche Dosis für AVE 7688 ca. 38 mg kg^{-1}, für Pioglitazon ca. 17 mg kg^{-1}) verabreicht. Die einzelnen Medikamente wurden täglich mit dem Futter zugeführt.
Zur Bestimmung der renalen Albumin- und Kreatininexkretion wurde nach 6 Wochen mit Hilfe von Stoffwechselkäfigen Urin gewonnen (siehe 2.2.6).
Alle Tiere wurden täglich gewogen und die pro Tag gefressene Futtermenge jeder einzelnen Ratte wurde insgesamt 24-mal ermittelt.
Zur Kontrolle der STZ-Wirkung und zur Bestätigung der Induktion bzw. des Vorhandenseins eines Diabetes mellitus Typ I wurde bei jeder Ratte die Blutglukosekonzentration erstmalig 2 Tage nach STZ-Injektion gemessen.
Nach Tötung der Tiere wurden zur Bestimmung des linksventrikulären Gewichtes, des Myozytenquerschnittes und der Kapillardichten Skelettmuskel (M. quadriceps femoris) und Herz entnommen. Die Ermittlung der renalen Albumin- und Kreatininausscheidung erfolgte nach Entnahme einer Urinprobe aus der Blase. Zusätzlich wurde aus einer Oberschenkelvene die Blutglukosekonzentration bestimmt.

2.2.4 Blutzuckermessung

Die einzelnen Blutglukosekonzentrationen wurden mit dem Ascensia Elite XL und den dazugehörigen Ascensia Elite Sensoren der Firma Bayer bestimmt.
Die Induktion des Diabetes durch STZ wurde am Versuchsanfang bzw. 2 Tage nach STZ-Injektion überprüft. Dazu wurden die Versuchstiere für kurze Zeit mit Ether narkotisiert. Anschließend wurde ein Blutstropfen aus der jeweiligen Rattenschwanzvene entnommen, mit dem der Blutzuckerspiegel gemessen wurde. Später, nach Tötung der Tiere, erfolgte die Blutzuckermessung aus einer Oberschenkelvene.

2.2.5 Nicht-invasive Blutdruck- und Herzfrequenzmessung (Tail-Cuff-Methode)

Die Blutdruckmessung erfolgte bei den wachen Tieren am Schwanz (Raasch et al., 2002). Zur Bewegungseinschränkung wurden die einzelnen Ratten in eine Metallröhre gesetzt, die daraufhin verschlossen wurde. Anschließend wurde den Tieren zur Beruhigung ein Gasgemisch aus Distickstoffoxid (N_2O) und Sauerstoff (80 : 20 Vol.- %) zugeführt. Eine automatisch aufblasbare Druckmanschette wurde um den Schwanz gelegt und distal der Blutdruckmanschette wurde ein Piezoelement angelegt, das zur Erfassung der Pulssignale diente. Um eine Dilatation der Schwanzarterien zu provozieren, wurde eine Infrarotlampe verwendet. Zur späteren Auswertung erfolgte die Registrierung von Pulsschlägen und Druckverlauf analog mit einem 2-Kanalschreiber. Sobald ein gleichmäßiges Pulssignal messbar war, wurde die Blutdruckmanschette so lange langsam aufgeblasen, bis das Pulssignal unterdrückt wurde. Die Messung der Herzfrequenz erfolgte durch Auszählen der Pulsschläge direkt vor dem Aufblasen der Blutdruckmanschette. Zur Bestimmung des systolischen Blutdruckes wurde das Lot auf die Ausgangslinie der Druckkurve an dem Punkt gefällt, an dem keine Pulswelle mehr erfasst werden konnte. Durch externe Kalibrierung mit einem Gauss`schen Manometer (0–280 mmHg, Steigung = 0,1310, r^2 = 0,9989) konnte aus der Höhe der Druckkurve der Blutdruck ermittelt werden.

2.2.6 Uringewinnung mit Hilfe von Stoffwechselkäfigen und Bestimmung der Albumin- sowie Kreatininausscheidung

Nach 6 Wochen Versuchsdauer (davon 5 Wochen mit durchgehender medikamentöser Behandlung) wurden die Tiere in spezielle Stoffwechselkäfige (ø 20 cm) gesetzt, die die Gewinnung von Urin jeder einzelnen Ratte ermöglichten. Der Urin wurde in 15 ml Falcon-Röhrchen eingefangen, anschließend in 2 ml Eppendorf-Gefäße umgefüllt und bei –20 °C gelagert. Die Bestimmung der Untersuchungsparameter erfolgte am nächsten Tag durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.
Der Albumingehalt in den Rattenurinen wurde immunnephelometrisch ermittelt, also mit Hilfe von Streulicht, wohingegen die Kreatininkonzentration chemisch bestimmt wurde, und zwar anhand der Methode nach Jaffé mit Pikrin-Säure.

2.2.7 Herstellung und Färbung der Gefrierschnitte

Am Versuchsende wurden die Ratten gewogen und anschließend durch eine intraperitoneale Injektion von 100 mg kg^{-1} Pentobarbital getötet. Die Tiere wurden auf den Rücken gelegt und der Bauch sowie die Oberschenkel durch einen Längsschnitt geöffnet. Als erstes wurde die Blutglukosekonzentration mit Hilfe von Blut aus einer Oberschenkelvene bestimmt. Dann wurden Herz und Skelettmuskel (Querschnitt aus der Mitte des M. quadriceps femoris) herauspräpariert und in NaCl gewaschen. Der Skelettmuskel wurde sofort in 2-Methylbutan schockgefroren, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und auf Trockeneis gelagert. Beim Herz wurde der rechte Ventrikel vom Rest des Herzens abpräpariert, wobei das Septum komplett dem linken Ventrikel zugeordnet wurde. Danach wurde der linke Ventrikel gewogen und in ein oberes, mittleres und unteres Drittel geteilt. Das mittlere Drittel (= Mittelstück) wurde in 2-Methylbutan schockgefroren, in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und ebenfalls auf Trockeneis gelagert. Anschließend wurden alle Gewebepräparate bei –80 °C eingefroren.

Das Anfertigen der transversalen Gefrierschnitte von Herz- und Skelettmuskel erfolgte mit dem Kryostat CM 3050 von Leica. Vor dem Schneiden wurden die bei –80 °C eingefrorenen Gewebepräparate für 30 Minuten im gekühlten Kryostat (-25 °C) gelagert bzw. „angetaut“, um die Gewebetemperatur an die herrschende Kammertemperatur anzugleichen. Anschließend wurden die Gewebeproben in „Embedding Matrix“ (= „Gewebekleber“ für die Einbettung/Aufblockung von Gefrierschnitten) der Firma Lipshaw auf Aluminiumzylindern fixiert und auf der aktiv gekühlten Schnellgefrierleiste (-45 °C) mit Wärmeableitblock platziert. Die Anfertigung der Transversalschnitte erfolgte unter konstanter Kammer- und Objekttemperatur mit Messern und Schnittstreckern der Firma Leica. Je nach Größe des Gewebepräparates wurde eine Kammer- und Objekttemperatur zwischen –15 °C und –21 °C eingestellt. Die Schnitte waren 10 µm dick und wurden auf SuperFrost® Plus Objektträger der Firma Menzel-Gläser aufgezogen bzw. angeschmolzen. Nach dem Schneiden wurden die Objektträger für 6 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei –20 °C in geschlossenen Objektträgerkästen gelagert. Um die Gewebestruktur optimal zu erhalten, wurden die Gefrierschnitte vor dem Einfrieren weder mit Formalin noch mit Aceton fixiert, da die Proteinvernetzung durch z.B. Formalinfixierung eine Maskierung oder Zerstörung antigener Strukturen bewirken kann.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode, die von allen immunhistochemischen Färbemethoden die höchste Sensitivität hat. Hierbei

bindet ein Primärantikörper an das Antigen - in der vorliegenden Studie CD31 - und reagiert anschließend mit einem biotinylierten Sekundärantikörper. Vorteil dieser Färbung ist die hohe Affinität von Avidin für Biotin zur Bildung von Komplexen aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Verbindungen mit dem biotinylierten Sekundärantikörper. Diese Komplexe werden durch die enzymatische Reaktion mit dem Chromogen/Substrat (= Diaminobenzidin) zu unlöslichem, farbigen Präzipität und weisen damit das Antigen (CD31) nach. Als Enzym diente die Meerrettichperoxidase.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Gefrierschnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut bzw. getrocknet und anschließend für 30 Minuten in Aceton fixiert. Nach 5-minütiger Spülung in PBS wurden die Schnitte für 5 Minuten in ein 3 %-iges H_2O_2-Methanol-Bad überführt, das die endogene Peroxidase inhibiert bzw. deaktiviert. Anschließend erfolgte ein Waschvorgang von 5 Minuten in Aqua dest. Nach einer erneuten 5-minütigen Spülung in PBS schloss sich die Inkubation mit dem Primärantikörper (Maus-anti-Ratte „CD31“, monoklonal, Serotec, Raleigh, NC) in der Verdünnung 1:1000 für 1 Stunde bei Raumtemperatur an. Um unspezifische Reaktionen des Sekundärantikörpers mit dem Gewebe auszuschließen, wurden in diesem Arbeitsschritt zusätzlich Negativkontrollen durchgeführt, die - anstatt mit dem Primärantikörper - lediglich mit PBS inkubiert und ansonsten wie die markierten Schnitte behandelt wurden. Danach wurden die Schnitte wieder für 5 Minuten in PBS gespült, gefolgt von einer 45-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (nach Angaben des Herstellers) mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (VECTASTAIN® Elite ABC - Kit Maus IgG PK–6102). Die anschließende Spülung der Schnitte in PBS für 5 Minuten zog die Inkubation (nach Angaben des Herstellers) mit dem enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplex (VECTASTAIN® Elite ABC - Kit Maus IgG PK–6102) für 45 Minuten bei Raumtemperatur nach sich. Nach einem weiteren Waschvorgang für 5 Minuten in PBS wurde Diaminobenzidin (DAB Substrat KIT für Peroxidase, Vector Laboratories) als Chromogen/Substrat zugesetzt (nach Angaben des Herstellers), bis nach ca. 3 bis 4 Minuten eine optimale Färbung erreicht war. Nach Abtropfen des DAB-Reagenz wurden die Schnitte kurz in stehendes Leitungswasser gegeben, gefolgt von einer 5-minütigen Kerngegenfärbung mit Hämalaun. Anschließend erfolgte eine Bläuung der Schnitte in fließendem Leitungswasser, wiederum 5 Minuten lang. Nach Durchwandern einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) wurden die Schnitte für ca. 1 Minute in Xylol verbracht und schließlich mit Eukitt® eingedeckt.

2.2.8 Auszählung der Kapillaren und Myozyten

Zur Auswertung und Dokumentation der Kapillaren und Myozyten wurde das Lichtmikroskop Axiophot der Firma Zeiss verwendet. Unter diesem Lichtmikroskop stellten sich die CD31-positiven Kapillaren braun dar und die mit Hämalaun gegengefärbten Zellkerne zeigten eine blau-violette Farbe (Abb. 2.1, Abb. 2.2). An den immunhistochemisch gefärbten Gefrierschnitten erfolgte die Bestimmung der Kapillar- bzw. Mikrogefäßdichte nach den Kriterien von Weidner unter Berücksichtigung der so genannten „Hot-spots“ (= Areale mit der höchsten Gefäßdichte) (Weidner, 1995a). Diese „Hot-spots“ wurden unter Verwendung einer geringen Vergrößerung (100-fach) ermittelt bzw. aufgesucht. Anschließend wurden pro Schnitt insgesamt 20 unterschiedliche Gesichtsfelder der „Hot-spots“ in hoher Vergrößerung (400-fach) mit der integrierten digitalen Kamera „AxioCam“ fotografiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Gesichtsfelder frei von größeren Arteriolen und Arterien, großen Interzellularspalten sowie Artefakten, wie zum Beispiel Schäden am Gewebe, waren. Als digitale Bildverarbeitungs-software diente AxioVision Rel. 4.6, ebenfalls von der Firma Zeiss. Mit Hilfe eines Objektmikrometers wurde die Bezugsfläche der einzelnen Gesichtsfelder unter 400-facher Vergrößerung ermittelt (= 0,0357 mm^2). Das Auszählen der einzelnen Kapillaren und Myozyten erfolgte anhand der fotografierten Gesichtsfelder unter Verwendung der Gundersen-Regel der „forbidden lines“ (= Ausschlusslinien) (Gundersen, 1978): Kapillaren und Muskelzellen, die den linken oder oberen Rand des Gesichtsfeldes schnitten, wurden nicht mitgezählt. Analog galten der rechte und untere Rand des Gesichtsfeldes als „acceptance lines“ (= Einschlusslinien): Kapillaren und Myozyten, die diese Ränder des Gesichtsfeldes schnitten, wurden folglich mitgezählt. Mit dieser Methode wurde ausgeschlossen, dass Kapillaren und/oder Myozyten doppelt gezählt wurden. Aus der pro Gesichtsfeld ermittelten Anzahl an Kapillaren und Myozyten ließen sich dann die Kapillardichte pro mm^2 bzw. μm^2 und der Myozytenquerschnitt errechnen. Zusätzlich konnte die Anzahl an Kapillaren pro Myozyt bestimmt werden.

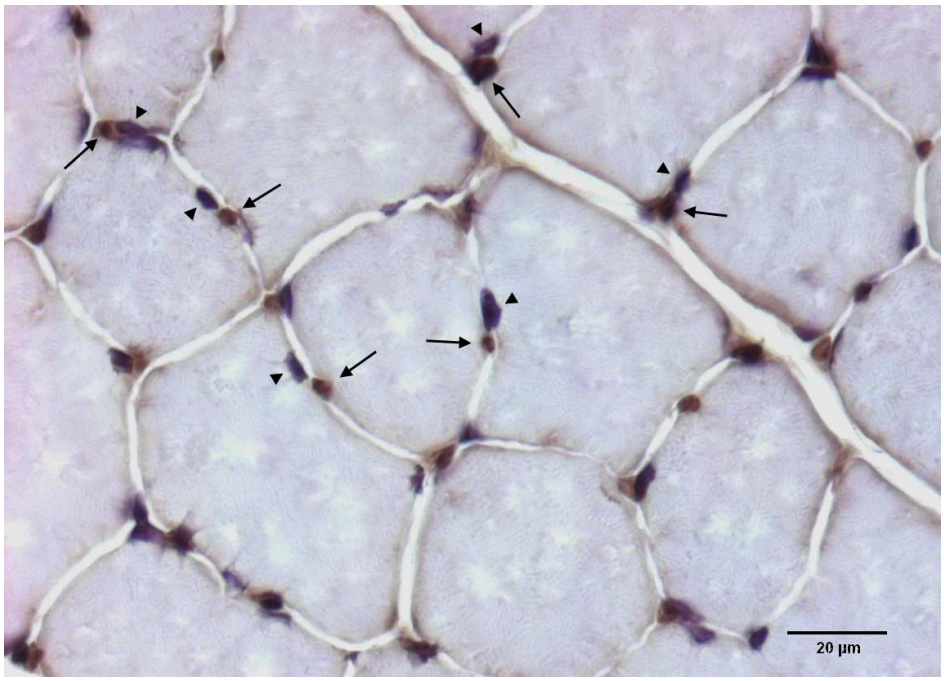

Abb. 2.1 Exemplarische Darstellung eines Gesichtsfeldes des Skelettmuskels (M. quadriceps femoris) in 400-facher Vergrößerung (CD31-positive Kapillaren = braune Strukturen bzw. Pfeile, Zellkerne = blau-violette Strukturen bzw. Pfeilspitzen). Färbung mit PECAM-1 (CD31) und Hämalaun.

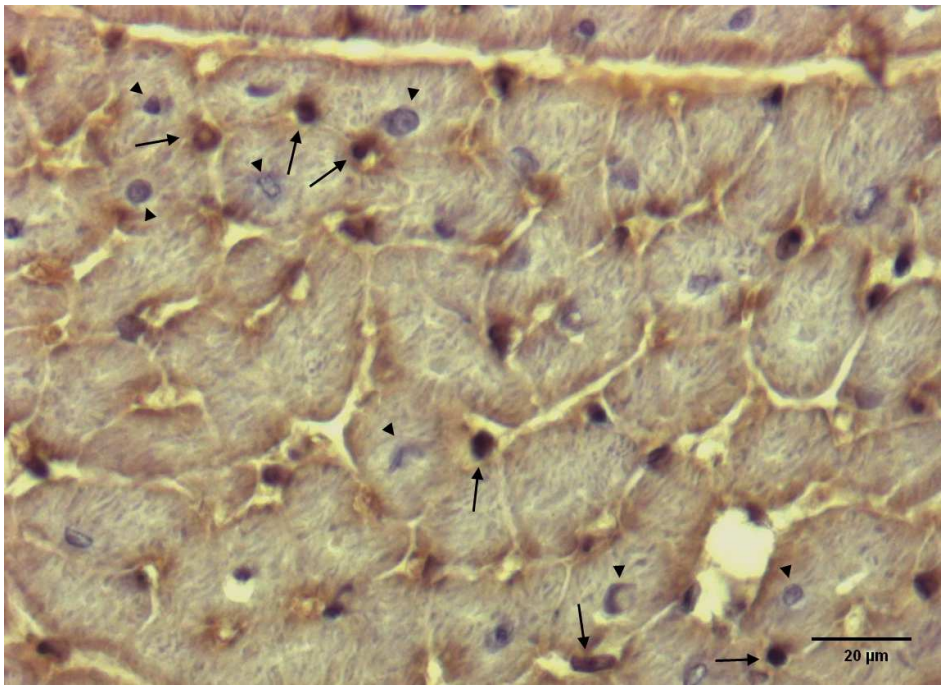

Abb. 2.2 Exemplarische Darstellung eines Gesichtsfeldes des Herzmuskels (linker Ventrikel) in 400-facher Vergrößerung (CD31-positive Kapillaren = braune Strukturen bzw. Pfeile, Zellkerne = blau-violette Strukturen bzw. Pfeilspitzen). Färbung mit PECAM-1 (CD31) und Hämalaun.

2.2.9 Statistik

Die Datenaufbereitung und -verarbeitung erfolgte mit Microsoft Excel (Office 2003); die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4 vorgenommen. Die in den Graphiken und Tabellen dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler (MW ± SEM) angegeben. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p<0,05$) anerkannt. Gruppenunterschiede wurden entweder durch einen ungepaarten t-Test oder mittels Varianzanalyse (One-Way ANOVA) und Tukey's post Test überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Zeitverlauf der Herz-Kreislauf-Veränderungen in diabetischen Ratten

Im ersten Versuchsteil dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Diabetes mellitus auf die Gefäßmorphologie und verschiedene Herz-Kreislauf-Parameter im Zeitverlauf ermittelt. Hierzu wurden Ratten in parallel durchgeführten Versuchsgruppen am 1 Tag nach der Injektion von Streptozotocin (= nicht-diabetische Referenzgruppe) sowie 5, 7 und 13 Wochen nach Induktion eines Diabetes mellitus untersucht.

3.1.1 Blutglukosekonzentration

Die einmalige Injektion von Streptozotocin (STZ) induzierte in allen Ratten einen Typ-I-Diabetes mellitus mit einem Anstieg der Blutglukosekonzentration. Am Anfang des Versuches bzw. 2 Tage nach STZ-Injektion betrug der Blutzuckerwert 248 ± 39 mg/dl (= Ausgangswert). Nach 5 Wochen Versuchsdauer war die Blutglukosekonzentration im Vergleich zu den nicht-diabetischen Ratten am Versuchsbeginn signifikant angestiegen und blieb im weiteren Verlauf auf konstantem Niveau (Abb. 3.1).

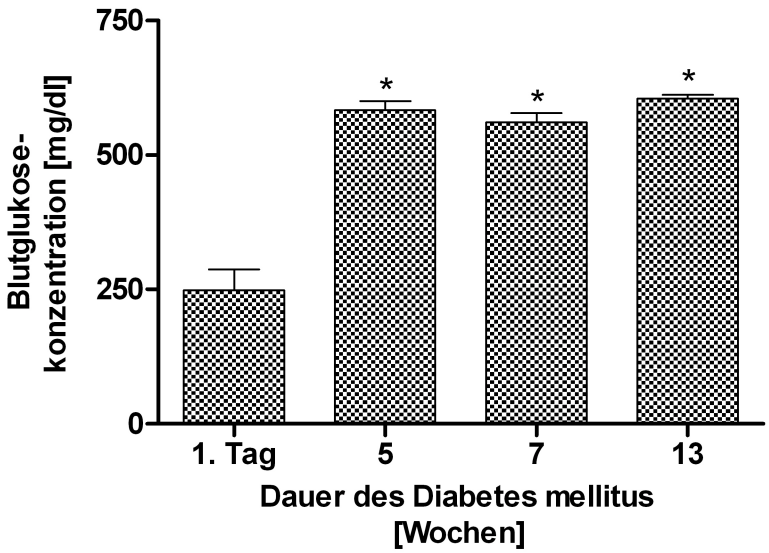

Abb. 3.1 Blutglukosekonzentration im Ratten-Vollblut zu Versuchsbeginn (= nicht-diabetische Referenzgruppe am 1. Tag) sowie 5, 7 und 13 Wochen nach STZ-Injektion (MW ± SEM, n = 5-10, *p<0,05 versus Versuchsbeginn)

3.1.2 Blutdruck und Herzfrequenz

Die im Rahmen eines Diabetes mellitus entstehenden Veränderungen von Blutdruck und Herzfrequenz sollten mit Hilfe dieses Versuches überprüft werden. Dazu wurden die hämodynamischen Parameter zu Beginn des Versuches und nach einem Zeitraum von 11 Wochen nicht-invasiv bestimmt. Am Versuchsanfang belief sich der systolische Blutdruck ($RR_{syst.}$) auf einen Wert von 104 ± 2 mmHg und die Herzfrequenz betrug 418 ± 3 Schläge pro Minute.

Während der folgenden 11 Versuchswochen stieg der Blutdruck, bezogen auf die Werte zu Versuchsbeginn, im Mittel um 24 ± 4 mmHg. Die Herzfrequenz fiel dagegen im Durchschnitt um 52 ± 17 Schläge pro Minute (Abb. 3.2).

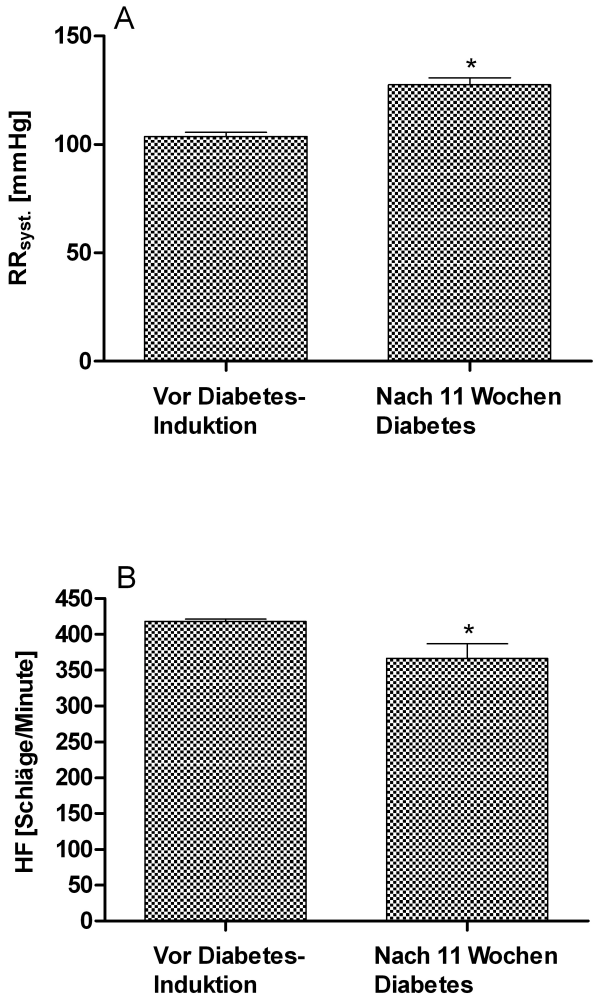

Abb. 3.2 Systolischer Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) nach 11-wöchiger Versuchsdauer (MW ± SEM, n = 10, *p<0,05 versus Versuchsbeginn)

3.1.3 Körpergewicht und Gewicht des linken Ventrikels

Um im weiteren Versuchsverlauf die Entwicklung des Körpergewichtes sowie die zu erwartende linksventrikuläre Hypertrophie zu erfassen, wurden zu Versuchsbeginn das Körpergewicht sowie das linksventrikuläre Gewicht bestimmt. Das Körpergewicht jeder Ratte betrug 280 ± 18 g und das linksventrikuläre Gewicht belief sich auf 542 ± 40 mg. Sowohl nach 5 als auch nach 7 Wochen Therapiedauer blieb das Körpergewicht in den jeweiligen Versuchsgruppen relativ konstant. Lediglich innerhalb der letzten 6 Versuchswochen kam es zu einer Abnahme des durchschnittlichen Körpergewichtes, die jedoch nicht signifikant war. Auch bezüglich des linksventrikulären Gewichtes kam es während der gesamten Versuchsdauer zu keinen signifikanten Veränderungen (Abb. 3.3).

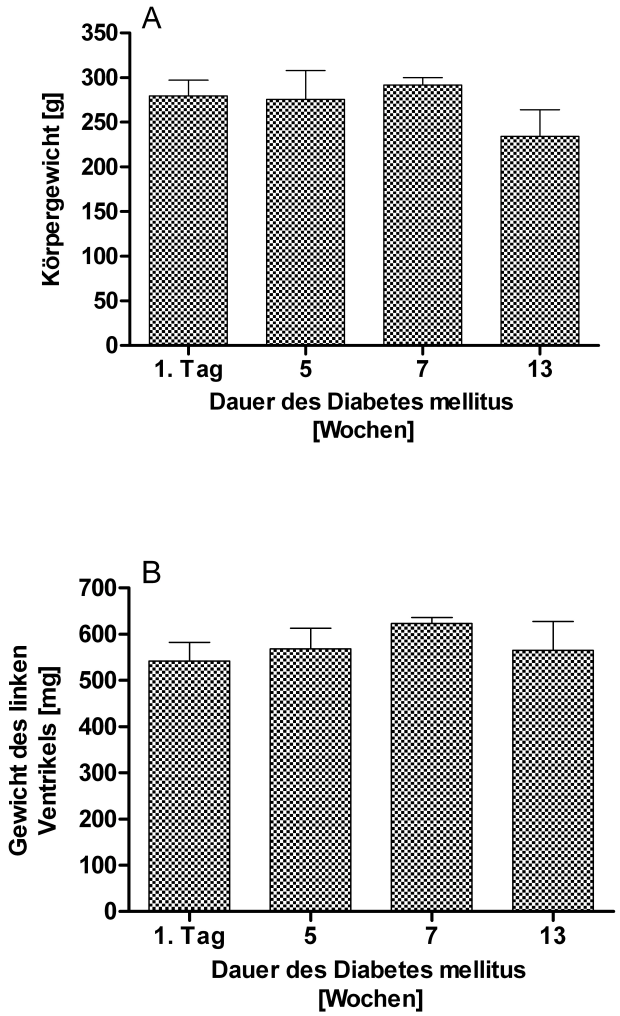

Abb. 3.3 Körpergewicht (A) und Gewicht des linken Ventrikels (B) zu Versuchsbeginn (1. Tag) sowie 5, 7 und 13 Wochen nach STZ-Injektion (MW ± SEM, n = 5-10)

3.1.4 Myozytenquerschnitt im M. quadriceps femoris

Zu Beginn des Versuches sowie nach 5-, 7- und 13-wöchiger Versuchsdauer wurde der Myozytenquerschnitt im M. quadriceps femoris bestimmt, der bei Zunahme als weiterer Parameter für die Entwicklung einer muskulären Hypertrophie gedeutet werden kann. Die Bestimmung erfolgte, indem die Gesamtfläche des ausgezählten Gewebeausschnittes (in μm^2) durch die Anzahl der Muskelzellen des ausgezählten Gewebeausschnittes dividiert wurde. Wie aus Abb. 3.4 zu entnehmen ist, kam es während der 13 Versuchswochen in den einzelnen Versuchsgruppen insgesamt zu einer Abnahme des Myozytenquerschnittes, die jedoch nicht signifikant war.

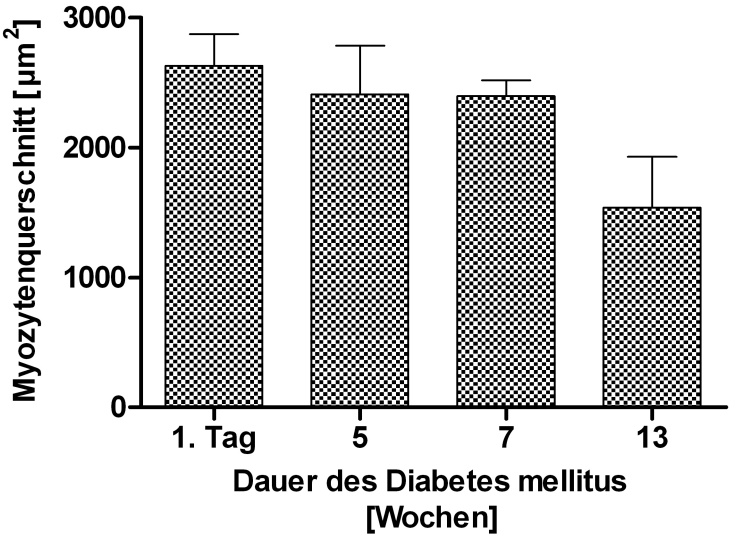

Abb. 3.4 Myozytenquerschnitt im M. quadriceps femoris in den einzelnen Gruppen während der insgesamt 13-wöchigen Versuchsdauer (MW ± SEM, n = 5-10)

3.1.5 Absolute und relative Kapillardichten im M. quadriceps femoris

Anhand dieses Versuches sollte die zunehmende Gefäßrarefizierung, die eine typische Komplikation des Diabetes mellitus darstellt, nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde die Anzahl der Kapillaren im M. quadriceps femoris in den jeweiligen Gewebeausschnitten ermittelt und entweder zur Gesamtfläche des ausgezählten Gewebeausschnittes (= absolute Kapillardichte) oder zur Anzahl der Myozyten im ausgezählten Gewebeausschnitt (= relative Kapillardichte) ins Verhältnis gesetzt. Am Anfang des Versuches betrug die absolute Kapillardichte 971 ± 86 Kapillaren pro mm^2 und jede Muskelzelle wurde von 2,4 ± 0,07 Kapillaren versorgt (= relative Kapillardichte). Innerhalb der folgenden 5, 7 und 13 Versuchswochen kam es in den einzelnen Versuchsgruppen sowohl im Hinblick auf die absolute wie auch auf die relative Kapillardichte zu einer stetigen signifikanten Abnahme (Abb. 3.5).

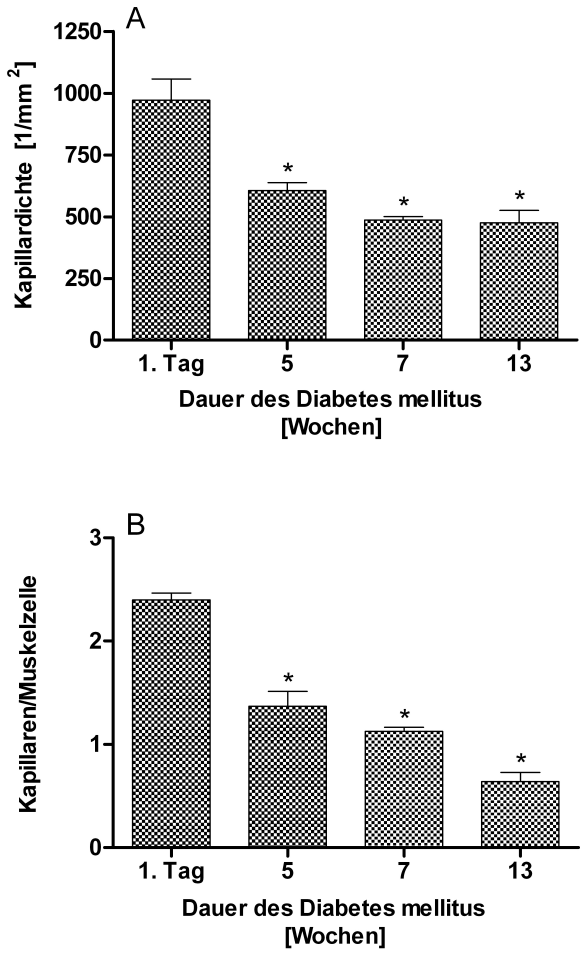

Abb. 3.5 Absolute (A) und relative (B) Kapillardichten im M. quadriceps femoris zu Versuchsbeginn (1. Tag) sowie nach 5-, 7- und 13-wöchiger Versuchsdauer (MW ± SEM, n = 5-10, *p<0,05 versus Versuchsbeginn)

3.1.6 Albumin- und Kreatininkonzentration im Urin

Als Parameter für eine mögliche Schädigung der glomerulären Nierengefäße diente die renale Ausscheidung von Albumin nach 13 Wochen Versuchsdauer. Dabei stellte sich heraus, dass der Albumingehalt im Rattenurin 0,12 ± 0,06 g/l betrug und somit deutlich über dem klinischen Normbereich für Menschen von 0,02 g/l lag. Um eine potenzielle Einschränkung der Nierenfunktion zu erfassen, wurde nach 13 Wochen ebenfalls die Kreatininkonzentration in den jeweiligen Rattenurinen bestimmt. Diese betrug 1,23 ± 0,23 mmol/l, was sich wiederum unterhalb des klinischen Normbereiches für Menschen von 3,2-11,5 mmol/l befand. Unter der Voraussetzung, dass die Gesamtausscheidung an Kreatinin über den Versuchsverlauf konstant blieb und weder das Kreatinin noch das Albumin in den Nierentubuli rückresorbiert wurden, wurde zur Verifizierung einer glomerulären Permeabilitätsstörung aufgrund eines zunehmenden Kapillarlecks das ausgeschiedene Albumin ins Verhältnis zur gemessenen Kreatininkonzentration gesetzt. Die mit zunehmender Diabetesdauer entstandene Schädigung der Nierenglomeruli ist damit umso ausgeprägter, je höher der Quotient aus Albumin/Kreatinin ist, da dieser von der Albuminausscheidung pro Nephron abhängt. Nach 13 Wochen Diabetes mellitus ergab sich dabei ein funktions- bzw. verdünnungskorrigierter Parameter von 0,10 ± 0,05 g/mmol.

3.2 Einfluss von AVE 7688 oder Pioglitazon auf die kardiovaskulären Veränderungen in diabetischen Ratten

Der zweite Versuchsteil dieser Arbeit befasste sich mit dem Einsatz und den Auswirkungen verschiedener Medikamente auf die Gefäßmorphologie und die Veränderungen von Herz-Kreislauf-Parametern im Zeitverlauf der diabetischen Erkrankung. Zu diesem Zweck wurden Ratten in parallel durchgeführten Behandlungsgruppen über einen Zeitraum von 12 Wochen mit Medikamenten behandelt und anschließend untersucht.

3.2.1 Blutglukosekonzentration

Nach 13 Wochen Diabetesdauer zeigten sich in allen 3 Behandlungsarmen im Ratten-Vollblut stark erhöhte Blutglukosekonzentrationen. In der Placebogruppe war der Blutzucker vergleichbar mit den Blutglukosewerten, die die Ratten nach 13 Wochen Diabetesdauer im ersten Ergebnisteil aufwiesen. AVE 7688 und Pioglitazon wiesen gegenüber der Placebogruppe ebenfalls gleichartige Werte für die Blutzuckerkonzentration auf (Abb. 3.6).

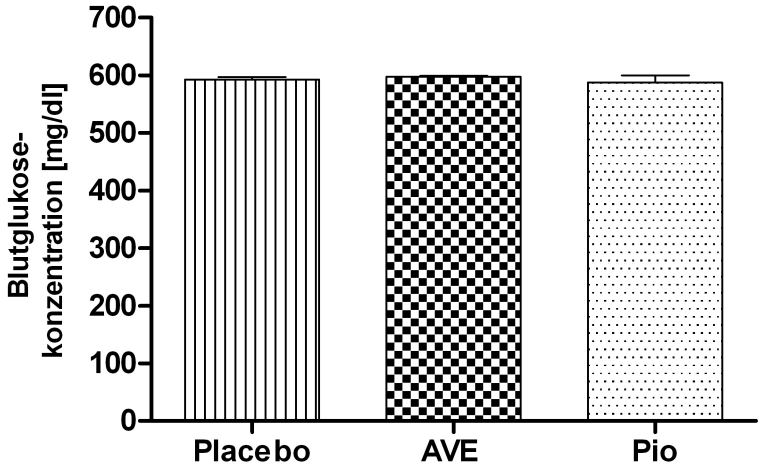

Abb. 3.6 Blutglukosekonzentration im Ratten-Vollblut nach 12-wöchiger Behandlung mit AVE 7688 oder Pioglitazon (MW ± SEM, n = 10)

3.2.2 Blutdruck und Herzfrequenz

Die Behandlung mit AVE 7688 führte nach einer Therapiedauer von 10 Wochen zu keiner relevanten Veränderung des systolischen Blutdruckes. Demgegenüber kam es im gleichen Zeitraum in der Placebogruppe zu einer signifikanten Erhöhung des systolischen Blutdruckes um 21 ± 3 mmHg, die den Werten nach 11 Wochen Diabetesdauer im Zeitverlauf des ersten Versuchsteils entsprach. Unter der Gabe von Pioglitazon zeigte sich innerhalb dieser Zeitspanne ebenfalls eine relevante systolische Blutdruckerhöhung von 10 ± 3 mmHg, die jedoch im Vergleich zur Placebogruppe signifikant um 11 ± 3 mmHg niedriger war (Abb. 3.7). Die Herzfrequenz fiel im gesamten Zeitverlauf von 11 Wochen Versuchsdauer in allen Behandlungsarmen ab. In der Placebogruppe kam es zu einer Verminderung der Herzfrequenz um 69 ± 12 Schläge/min, was den Werten im Zeitverlauf von 11 Wochen Diabetesdauer im ersten Versuchsabschnitt ebenfalls nahezu entsprach. Pioglitazon zeigte diesbezüglich gleichartige Effekte. AVE 7688 senkte die Herzfrequenz um 57 ± 9 Schläge/min. Der Unterschied zwischen AVE 7688 und der Placebogruppe war nicht signifikant.

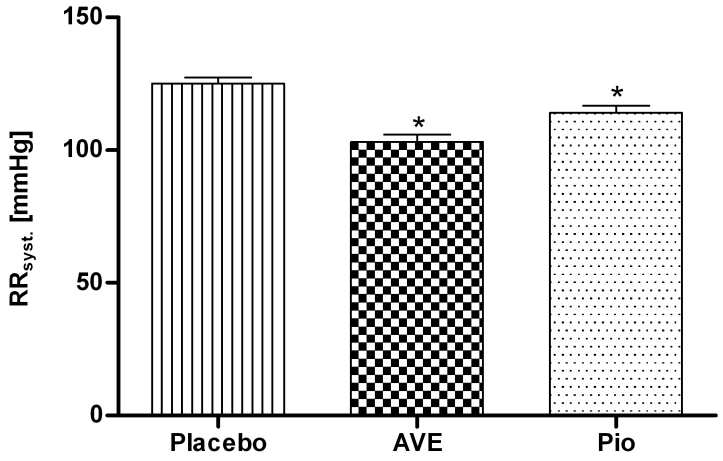

Abb. 3.7 Systolischer Blutdruck ($RR_{syst.}$) nach 10-wöchiger Therapie mit AVE 7688 oder Pioglitazon (MW ± SEM, n = 9-10, *p<0,05 versus Placebo)

3.2.3 Körpergewicht und Gewicht des linken Ventrikels

Durch diesen Versuch sollte der Einfluss von AVE 7688 und Pioglitazon auf das Körpergewicht sowie die Genese einer linksventrikulären Hypertrophie untersucht werden. Dabei bewirkte innerhalb von 12 Behandlungswochen weder die Gabe von AVE 7688 noch die Therapie mit Pioglitazon eine signifikante Veränderung des Körpergewichts im Vergleich zur Placebogruppe (Abb. 3.8). Die Werte für das Körpergewicht in der Placebogruppe waren mit den Ergebnissen des ersten Versuchsabschnittes nach einem Zeitverlauf von 13 Wochen Diabetes ebenfalls vergleichbar.

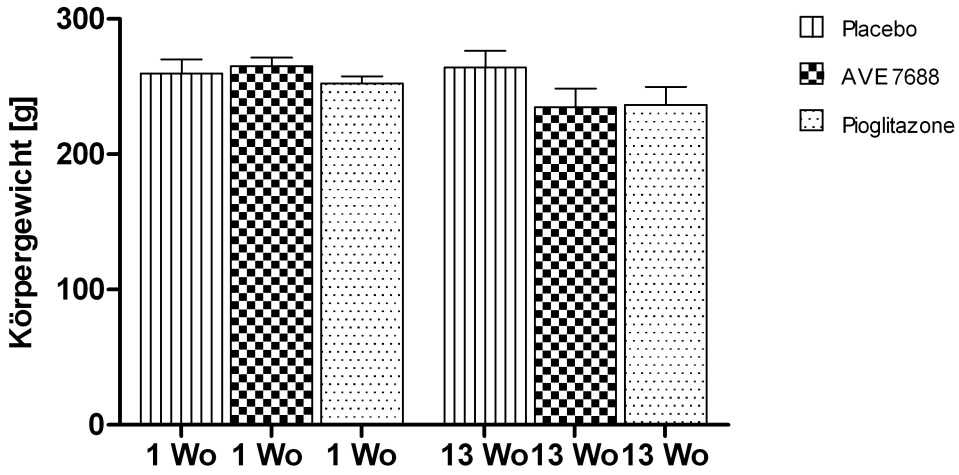

Abb. 3.8 Verlauf des Körpergewichtes innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen nach 1-wöchiger Versuchsdauer und anschließender 12-wöchiger Behandlung mit AVE 7688 oder Pioglitazon (MW ± SEM, n = 10)

Am Versuchsende zeigte sich in der Placebogruppe ein linksventrikuläres Gewicht von 607 ± 15 mg. Entsprechende Werte fanden sich im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit nach 13 Wochen Diabetesdauer. Die Gabe von Pioglitazon führte zu vergleichbaren Werten bezogen auf das Gewicht des linken Ventrikels. Unter AVE 7688 war das linksventrikuläre Gewicht im Hinblick auf die Placebogruppe signifikant um 81 ± 28 mg leichter (Abb. 3.9).

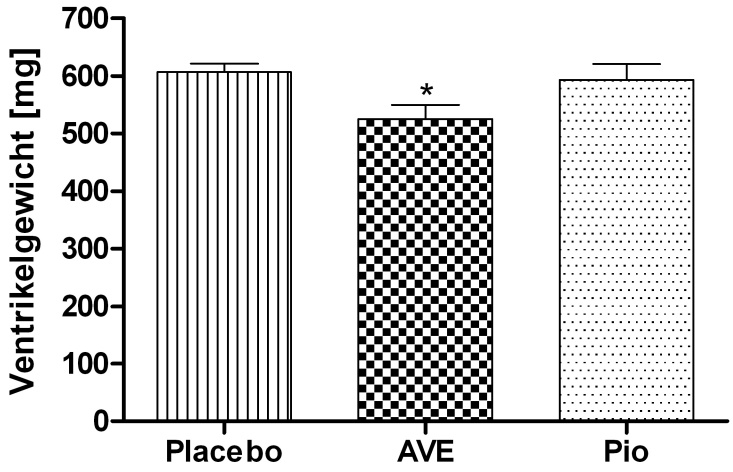

Abb. 3.9 Gewicht des linken Ventrikels in den einzelnen Behandlungsarmen nach 12-wöchiger Therapie mit AVE 7688 oder Pioglitazon (MW ± SEM, n = 10, *p<0,05 versus Placebo)

3.2.4 Myozytenquerschnitt im M. quadriceps femoris sowie im linken Ventrikel

Mit Hilfe dieses Versuches sollte untersucht werden, inwiefern AVE 7688 oder Pioglitazon die Entwicklung einer muskulären Hypertrophie beeinflussen. Dazu wurde am Versuchsende in den jeweiligen Behandlungsgruppen der Myozytenquerschnitt im M. quadriceps femoris sowie im linken Ventrikel bestimmt. Das Vorgehen zur Ermittlung der einzelnen Myozytenquerschnitte entspricht dem, welches in Kapitel 3.1.4 der 1. Studie dieser Arbeit beschrieben wurde.

Nach 12 Wochen Therapiedauer war die Myozytengröße im M. quadriceps femoris der Placebogruppe am größten. Demgegenüber stellte sich der Myozytenquerschnitt unter der Behandlung mit AVE 7688 als signifikant kleiner dar. Pioglitazon führte ebenfalls zu einer verminderten Myozytengröße im M. quadriceps femoris, die jedoch in Bezug auf die Placebogruppe nicht signifikant unterschiedlich war (Abb. 3.10).

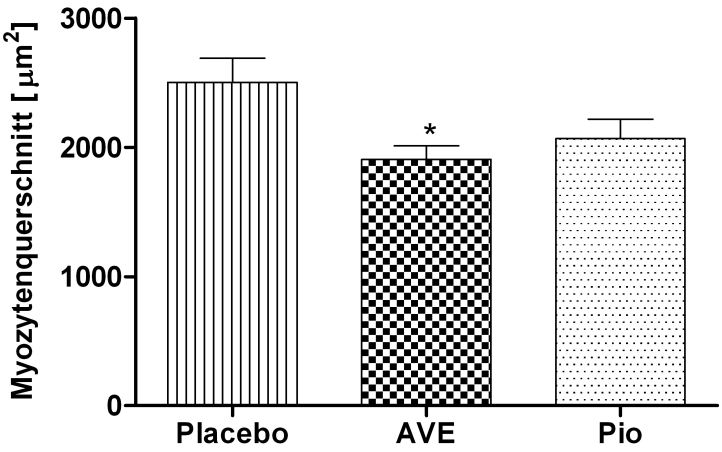

Abb. 3.10 Myozytenquerschnitt im M. quadriceps femoris nach 12-wöchiger Behandlung mit AVE 7688 oder Pioglitazon (MW ± SEM, n = 10, *p<0,05 versus Placebo)

Im linken Ventrikel der Placebogruppe zeigten sich am Versuchsende die kleinsten kardialen Myozyten. Pioglitazon führte diesbezüglich zu einer signifikanten Zunahme des kardialen Myozytenquerschnittes von 158 ± 33 µm^2. In den mit AVE 7688 behandelten Tieren zeigten sich ebenfalls größere kardiale Myozyten; der Unterschied zwischen AVE 7688 und der Placebogruppe war jedoch nicht signifikant (Abb. 3.11).

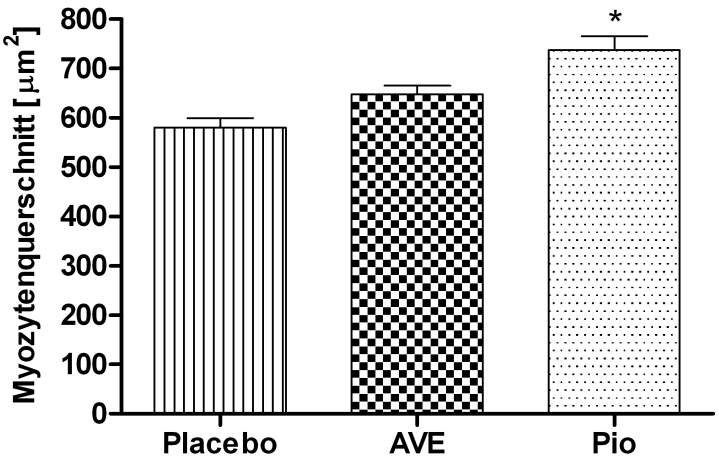

Abb. 3.11 Myozytenquerschnitt im linken Ventrikel nach 12-wöchiger Behandlung mit AVE 7688 oder Pioglitazon (MW ± SEM, n = 10, *p<0,05 versus Placebo)

3.2.5 Absolute und relative Kapillardichten im M. quadriceps femoris und im linken Ventrikel

In der Placebogruppe trat eine ausgeprägte Kapillarrarefizierung im M. quadriceps femoris auf, die mit den Werten der absoluten Kapillardichte nach 13 Wochen Diabetesdauer im ersten Versuchsabschnitt dieser Arbeit vergleichbar war. Unter der Therapie mit AVE 7688 oder Pioglitazon war die Mikrogefäßrarefizierung in Bezug auf die Placebogruppe deutlich geringer. Sowohl die absolute als auch die relative Kapillardichte zeigte sich in beiden Behandlungsgruppen signifikant erhöht (Abb. 3.12). Die Mikrogefäßdichte in diesen beiden Gruppen erreichte allerdings nicht die Werte der nicht-diabetischen Ratten (= Referenzgruppe) im ersten Versuchsteil der vorliegenden Studie. Hinsichtlich der jeweiligen Kapillardichten im linken Ventrikel fanden sich gleichartige Ergebnisse; absolute und relative Kapillardichten stellten sich in den mit AVE 7688 oder Pioglitazon behandelten Tieren als signifikant erhöht dar (Abb. 3.13).

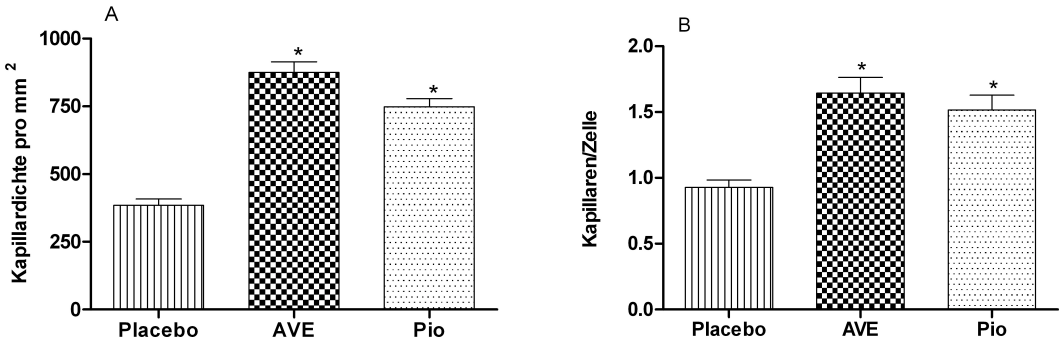

Abb. 3.12 Absolute (A) und relative (B) Kapillardichten im M. quadriceps femoris nach 12-wöchiger Behandlung mit AVE 7688 oder Pioglitazon (MW ± SEM, n = 10, *p<0,05 versus Placebo)

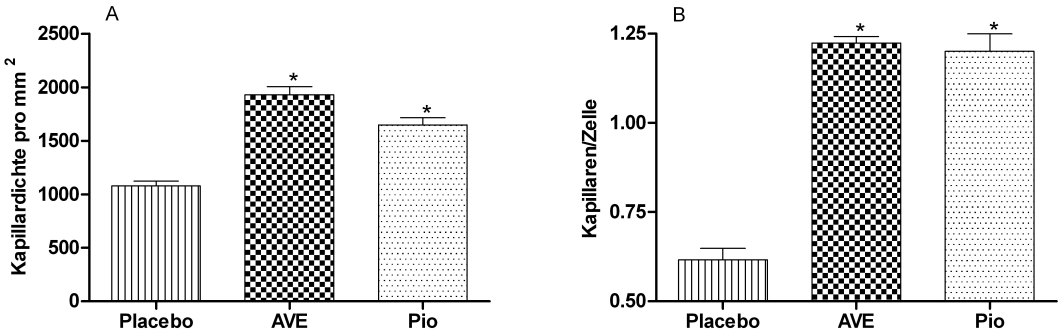

Abb. 3.13 Absolute (A) und relative (B) Kapillardichten im linken Ventrikel nach 12-wöchiger Behandlung mit AVE 7688 oder Pioglitazon (MW ± SEM, n = 10, *p<0,05 versus Placebo)

3.2.6 Albumin- und Kreatininkonzentration im Urin

Um den Einfluss von AVE 7688 und Pioglitazon auf die mögliche Entwicklung einer diabetischen Nephropathie bzw. einer Schädigung der glomerulären Nierengefäße zu untersuchen, wurden nach 5-wöchiger Behandlungsdauer die renale Ausscheidung von Albumin sowie nach 12 Wochen Behandlung zusätzlich zum Albumin die renale Kreatininausscheidung bestimmt.

Placebo führte nach 5 Wochen zu einer Albuminausscheidung, die den klinischen Normbereich für Menschen von 0,02 g/l nur leicht überstieg. Das gleiche Resultat fand sich zum selben Zeitpunkt unter AVE 7688. Unter der Gabe von Pioglitazon war die renale Albuminexkretion zwar tendenziell höher, im Vergleich zur Placebogruppe jedoch nicht signifikant (Abb. 3.14).

Während der folgenden 7 Versuchswochen kam es in allen Behandlungsarmen zu einem weiteren Anstieg des Albumingehaltes in den jeweiligen Rattenurinen. In der Placebogruppe fiel der renale Albuminverlust am stärksten aus und war damit vergleichbar mit den Werten aus dem ersten Ergebnisteil nach 13 Wochen Diabetesdauer. Demgegenüber wiesen die mit Pioglitazon oder AVE 7688 behandelten Tiere eine geringere renale Albuminausscheidung auf; dieser Therapieeffekt wurde jedoch aufgrund hoher individueller Unterschiede in der Albuminausscheidung durch die Statistik nicht bestätigt.

Die Kreatininkonzentration im Urin war in allen Behandlungsgruppen nach 12 Wochen Behandlungsdauer unterhalb des klinischen Normbereiches für Menschen von 3,2-11,5 mmol/l. Um das Ausmaß der glomerulären Permeabilitätsstörung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen zu differenzieren, wurde am Versuchsende der Quotient aus Albumin und Kreatinin bestimmt, unter der Annahme, dass die tägliche Kreatininproduktion und -ausscheidung konstant geblieben waren. Nach 12-wöchiger Diabetesdauer betrug dieses Verhältnis für AVE 7688 0,151 ± 0,07 g/mmol, für Pioglitazon 0,081 ± 0,02 g/mmol und für die Placebogruppe 0,155 ± 0,06 g/mmol (Abb. 3.15).

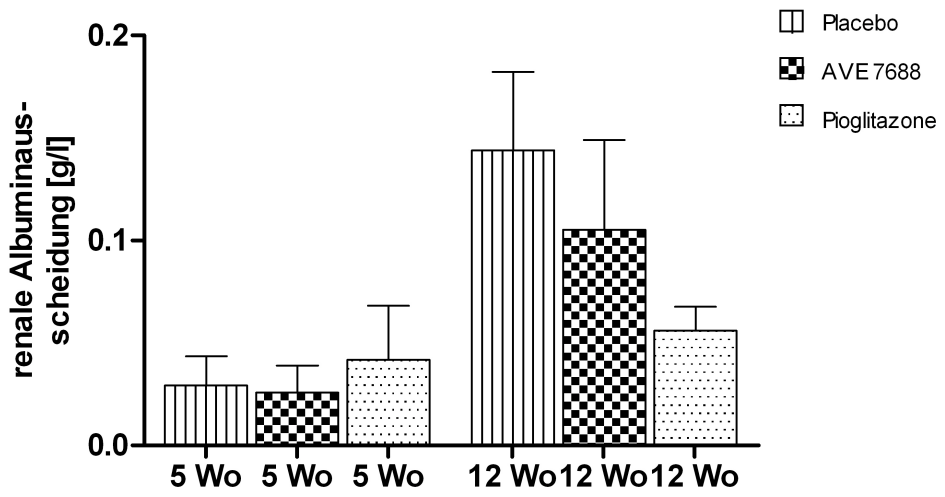

Abb. 3.14 Verlauf der Albuminausscheidung zwischen der Placebogruppe, AVE 7688 und Pioglitazon nach 5- sowie 12-wöchiger Behandlungsdauer (MW ± SEM, n = 9-10, *p<0,05 versus Placebo)

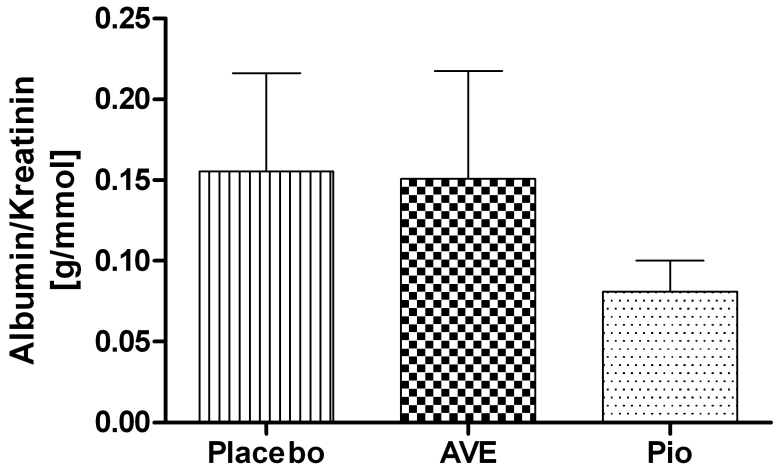

Abb. 3.15 Funktions- bzw. verdünnungskorrigiertes Verhältnis Albumin/Kreatinin nach 12 Wochen Behandlung mit AVE 7688 oder Pioglitazon (MW ± SEM, n = 9-10)

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit dem Vasopeptidase-Inhibitor AVE 7688 oder dem Insulinsensitizer Pioglitazon in Streptozotocin (STZ) -diabetischen Ratten vasoprotektive Effekte im Sinne einer verminderten Gefäßrarefizierung aufweist und sich außerdem günstig auf die hämodynamischen Parameter Blutdruck und Herzfrequenz auswirkt. Als weiterer Einfluss wurden unter der Behandlung mit Pioglitazon Anzeichen einer verminderten Schädigung der glomerulären Nierengefäße beobachtet.

4.1 Versuchsmodell

4.1.1 Ablauf

Mit Hilfe einer Vielzahl von klinischen und experimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Adipositas, Bluthochdruck und Diabetes mellitus mit einer zunehmenden mikrovaskulären bzw. kapillären Gefäßrarefizierung assoziiert sind, die entscheidend zur Genese kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt und dadurch zu einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität dieser Patienten prädisponiert (Toblli et al., 2004; Camera et al., 2007).

Zur Simulation dieses relevanten Diabetes-assoziierten Pathomechanismus auf die Gefäß- bzw. Kapillardichte wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von STZ ein Typ-I-Diabetes induziert und anschließend an medikamentös behandelten männlichen Wistar-Ratten im Zeitverlauf der diabetischen Erkrankung die sukzessive Abnahme der Kapillardichte sowohl im Skelettmuskel (M. quadriceps femoris) als auch im linken Ventrikel untersucht. Zeitgleich wurden die mit zunehmender Gefäßrarefizierung einhergehenden kardiovaskulären Veränderungen von Herzfrequenz, Blutdruck und Nierengefäßen gemessen.

Zur Sicherstellung der experimentellen Methodik und zur Darstellung des Einflusses von Diabetes mellitus auf die Gefäßdichte wurde die vorliegende Untersuchung in insgesamt 2 voneinander unabhängige Studien unterteilt, die jeweils eine unterschiedliche Behandlung vorsahen. Durch die erste der beiden Studien war es möglich, Aussagen über den zeitlichen Beginn sowie den Verlauf der maximalen Gefäßschädigung zu machen, was letztendlich wegweisend für die Dauer der medikamentösen Behandlung in der zweiten Studie war.

Weiterhin diente das in der ersten Studie verwendete Tiermodell der Validierung von Versuchsmodell und Analytik. Dementsprechend sollten die pathophysiologischen Auswirkungen des Diabetes mellitus auf das Gefäßsystem im Zeitverlauf von insgesamt 12 Wochen aufgezeigt und damit die langfristige Adaption der Gefäße an die diabetische Stoffwechsellage dargestellt werden. Die Tatsache, dass es im Zeitverlauf unserer Untersuchung zu einer zunehmenden Gefäßrarefizierung kam, welche sich mit Hilfe von Immunhistochemie gut nachweisen ließ, spricht für die Entwicklung einer diabetischen Gefäßschädigung und damit für die Eignung und Repräsentativität des hier eingesetzten Tiermodells zur Simulation der progredienten Gefäßrarefizierung im Rahmen der diabetischen Erkrankung.

Zielsetzung der zweiten Studie war der spezifische Nachweis therapeutischer Effekte von verschiedenen Pharmaka - im Besonderen des Vasopeptidase-Inhibitors (VPI) AVE 7688 bzw. des Insulinsensitizers Pioglitazon - auf die vaskulären Veränderungen im Verlauf des Diabetes. Um diesen medikamentösen Einfluss so spezifisch wie möglich darzustellen, ermittelten wir zeitgleich die Gefäßveränderungen in einer Placebogruppe. Unter der Annahme, dass das kapilläre Netzwerk und die Gefäßstruktur unter physiologischen Bedingungen stabil sind und keinem pathologischen Umbau unterliegen, haben wir zur Vermeidung nicht zwingend erforderlicher Tierversuche keine nicht-diabetischen Tiere in diese Untersuchung einbezogen. Schließlich sollte der protektive, medikamentös-induzierte Einfluss in dem speziellen Fall der diabetischen Gefäßschädigung untersucht werden.

Nach insgesamt 12 Wochen Therapie zeigte sich sowohl in der mit AVE 7688 behandelten als auch in der mit Pioglitazon behandelten Gruppe eine signifikant erhöhte Kapillardichte im Skelett- und Herzmuskel, verglichen mit der Placebogruppe. Dieses Ergebnis belegt, dass gerade die Verabreichung dieser Medikamente ursächlich für die verminderte Gefäßrarefizierung ist und damit einen positiven Effekt auf die Gefäßprotektion hat. Als Erklärung für diese beobachtete erhöhte Kapillaranzahl unter der medikamentösen Therapie ergeben sich 2 verschiedene Angriffspunkte: Denkbar wäre ein verminderter Gefäßuntergang bzw. -umbau und/oder eine Stimulation der Angiogenese. Diesbezüglich konnten Debbabi und seine Mitarbeiter (2006) demonstrieren, dass die Langzeittherapie mit Antihypertensiva bei Patienten mit essentieller Hypertonie und (konsekutiv) verminderter Kapillardichte nicht nur eine therapeutische Normalisierung der Gefäßdichte verursachen, sondern sogar eine erhöhte Vaskularisation im Vergleich zur normotensiven Patienten bewirken kann.

In unserer Studie zeigte sich im M. quadriceps femoris unter der Behandlung mit AVE 7688 eine absolute Kapillardichte von 874,2 ± 40 mm^{-2} und eine relative Kapillardichte von 1,6 ± 0,1. Im Hinblick auf die Ergebnisse der nicht-diabetischen Referenzgruppe am Versuchsanfang (absolute Kapillardichte = 971,1 ± 86 mm^{-2}, relative Kapillardichte = 2,4 ± 0,07) verursachte die Behandlung mit dem VPI AVE 7688 weder eine erhöhte Vaskularisation noch eine therapeutische Normalisierung der Gefäßdichte. Entsprechendes gilt für die Behandlung mit Pioglitazon (absolute Kapillardichte = 748,4 ± 30 mm^{-2}, relative Kapillardichte = 1,5 ± 0,1). Die in der Literatur beschriebenen Referenzwerte für die Kapillardichte in gesunden Ratten unterliegen einer großen Schwankungsbreite. Olfert et al. führten 2001 ein Experiment mit gesunden, weiblichen Wistar-Ratten durch, in dem sie den Einfluss von körperlicher Aktivität unter Normoxämie sowie Hypoxie auf die Kapillardichte und die Expression Angiogenese-fördernder Gene (VEGF etc.) im Skelettmuskel (M. gastrocnemius) genauer untersuchten. Infolgedessen verglichen sie die Kapillardichte und die „capillary-to-fiber-ratio“ (C/F) von Ratten, die sich einem 8-wöchigen Trainingsprogramm unterziehen mussten, mit untrainierten Tieren. Dies erfolgte zum einen unter Raumluftbedingungen und zum anderen unter Sauerstoffmangel. Untrainierte, normoxämische Ratten hatten im M. gastrocnemius eine absolute Kapillardichte von 1153 ± 119 Kapillaren pro mm^2 und eine C/F von 1,88 ± 0,11. Im Gegensatz dazu fanden Adolfsson et al. (1981) im M. quadriceps femoris von untrainierten, gesunden Sprague-Dawley Ratten 393 ± 115 Kapillaren pro mm^2 und eine C/F von 1,38 ± 0,16, was in Bezug auf die einzelnen Kapillardichten deutlich unter unseren Werten liegt. Jefferson Frisbee initiierte 2006 eine vergleichbare Untersuchung mit mageren und adipösen Zuckerratten. Auch er untersuchte den Einfluss von körperlichem Training auf die Kapillardichte im M. gastrocnemius. Dabei zeigte sich in untrainierten mageren Zuckerratten (Lean Zucker Rats = LZR) eine Mikrogefäßdichte von ca. 860 mm^{-2} und in adipösen Zuckerratten (Obese Zucker Rats = OZR) von knapp 660 mm^{-2}, was in Bezug auf die OZR erneut deutlich unter den in der vorliegenden Studie konstatierten Werten liegt. Bezogen auf die Referenzwerte in LZR entwickelte sich sogar in der mit AVE 7688 behandelten Gruppe eine therapeutische Normalisierung der Mikrogefäßdichte. Ähnliche Resultate ergab die Behandlung mit Pioglitazon, was für die hohe Effizienz dieser beiden Medikamente spricht.

Bezüglich der kardialen Mikrogefäßdichte fanden Hudlická und Kollegen (1995) im linken Ventrikel von männlichen Sprague-Dawley-Ratten eine Kapillardichte von 1971 ± 97 mm^{-2} und eine C/F von 1,30 ± 0,04, was mit unseren Werten für AVE 7688

nahezu übereinstimmt (CD = 1930 ± 75 mm^{-2}, C/F = 1,2 ± 0,02). Auch Toblli und Kollegen (2004) konnten im Herzen von LZR eine Mikrogefäßdichte von 2031 ± 50 mm^{-2} ausmachen, was ebenfalls eine potentielle Normalisierung der Mikrogefäßdichte unter der von uns eingesetzten Therapie annehmen lässt.

4.1.2 Aussagekraft

Die spezifische Toxizität von Streptozotocin (STZ) für die insulinproduzierenden Betazellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas stellt eine grundlegende Voraussetzung für die Entwicklung und Anwendung eines medikamentös-induzierten, experimentellen diabetischen Tiermodells dar; sie ermöglicht Untersuchungen, deren Ergebnisse charakteristisch für die diabetischen Folgeerkrankungen sind und nicht durch weitere Wirkungen von STZ auf andere Organsysteme bedingt sind.

Mitte der 90-iger Jahre fanden Schnedl und Mitarbeiter (1994) heraus, dass die zytotoxischen Effekte von STZ an die Expression von GLUT-2-Transportern gebunden sind, welche v.a. in den pankreatischen Betazellen, der Leber, der Niere und im Dünndarm exprimiert werden. STZ wird über diese Transporter in die jeweiligen Zielzellen aufgenommen und führt dort durch Alkylierung und Bildung von freien Radikalen zur DNA-Fragmentation mit konsekutiver Apoptose (Thulesen et al., 1997). Eine Regeneration der β-Zellen ist auch nach einer längeren Versuchsdauer nicht wahrscheinlich (Junod et al., 1967, 1969; Steiner et al., 1970).

Um die diabetische Stoffwechsellage eines Typ-I-Diabetes mellitus zu simulieren und die damit einhergehenden pathologischen Alterationen am Herz- und Kreislaufsystem zu provozieren, setzten wir in der vorliegenden Arbeit ein experimentelles STZ-diabetisches Rattenmodell ein. Nach intraperitonealer STZ-Injektion zeigten die in unserer Studie behandelten männlichen Wistar-Ratten viele Eigenschaften, die ebenfalls bei Patienten mit schlecht eingestelltem insulinabhängigen Typ-I-Diabetes mellitus auftreten, beispielsweise Hyperglykämie, Polydipsie und Polyurie.

In den späten 60-iger Jahren zeigten Junod und seine Mitarbeiter (1967, 1969) in einem Rattenmodell, dass die Wirksamkeit von STZ hinsichtlich der Ausprägung des diabetischen Krankheitsbildes dosisabhängig ist; angefangen von der Entwicklung eines milden Diabetes mellitus bei einer eingesetzten STZ-Dosis von 25-35 mg kg^{-1}, bis hin zur Ausbildung eines ketoazidotischen Krankheitsbildes nach Applikation von 100 mg STZ kg^{-1}, das ohne weitere Insulinsubstitution innerhalb von 2 bis 3 Tagen zum

Sterben des Tieres führt. Durch diese Korrelation zwischen STZ-Dosierung und Diabetesausprägung konnten wir eine relativ hohe STZ-Dosis von 75 mg kg^{-1} einsetzen, die zur Genese eines schweren diabetischen Krankheitsbildes führt, jedoch ein Überleben der Versuchstiere ohne zusätzliche Insulinsubstitution ermöglicht.

Ein weiterer Vorteil dieses Tiermodells ist - neben der Möglichkeit pharmakologische und biochemische Untersuchungen durchzuführen - die einfache Handhabung sowie die gute Reproduzierbarkeit. Erwähnenswert ist darüber hinaus die Tatsache, dass STZ keine toxischen Wirkungen an Leber und Niere hervorruft (Junod et al., 1967; Evan et al., 1984). Aus diesem Grund ist der Einsatz von STZ im Rahmen von Untersuchungen zu Auswirkungen des Diabetes auf die Nierenfunktion und -struktur sehr gut geeignet.

Ein weiterer wichtiger Vorteil des STZ-induzierten Diabetes ist die fehlende vaskuläre STZ-Toxizität. Diese erklärt sich zum einen durch den postulierten Wirkmechanismus von STZ, der auf das Vorhandensein von GLUT-2-Transportern angewiesen ist. Schließlich wird in Gefäß- bzw. Endothelzellen vornehmlich der GLUT-1-Transporter exprimiert, der keine Affinität für STZ besitzt (Schnedl et al., 1994). Zum anderen zeichnet sich STZ durch eine schnelle Wirkung mit einer kurzen Halbwertszeit von ca. 5 bis 10 Minuten aus (Schnedl et al., 1994), die sich unter anderem durch die hohe Photo- und Thermoinstabilität begründen lässt. Hätte STZ eine potentielle vaskuläre Toxizität, hätte die von uns eingesetzte Therapie mit AVE 7688 und Pioglitazon, die erst 8 Tage nach STZ-Injektion angesetzt wurde, keinen Effekt haben dürfen. Da wir jedoch belegen konnten, dass die von uns eingesetzte medikamentöse Behandlung eine hohe Effizienz aufweist, kann man eine mögliche STZ-induzierte Gefäß- bzw. Endotheltoxizität ausschließen. Dadurch wird gewährleistet, dass das Auftreten pathologischer Gefäßstrukturen im STZ-diabetischen Tiermodell ‚lediglich' durch den Diabetes bedingt ist und keinem anderen Einfluss unterliegt.

Die Ursache für die Genese des Diabetes, nämlich die organotrope STZ-Wirkung und die damit einhergehende selektive Zerstörung der pankreatischen Betazellen, ist ein weiterer Vorteil dieser Studie. Dadurch, dass das hier verwendete STZ-induzierte diabetische Krankheitsbild eher einem Typ-I- als einem Typ-II-Diabetes entspricht, lässt sich ein ursächlicher Einfluss von Pioglitazon auf die diabetische Stoffwechsellage bzw. Stoffwechselbeeinträchtigung vermeiden, im Speziellen auf die Insulinfreisetzung und Veränderung der Blutglukosekonzentration. Entsprechend demonstriert das hier eingesetzte Tiermodell vornehmlich den Einfluss von Pioglitazon auf die diabetische Vaskulopathie und die damit einhergehenden Diabetes-induzierten Sekundärerkrankungen.

Aus diesem Grund eignet sich das von uns ausgewählte pathophysiologische Tiermodell sehr gut für Untersuchungen im Hinblick auf die Diabetes-unabhängigen „pleiotropen“ Wirkungen von Pioglitazon. Dies wird durch die Beobachtung belegt, dass es in unserer Studie unter der Behandlung mit Pioglitazon zu keiner signifikanten Abnahme der Blutglukosekonzentration oder des Körpergewichtes kam, verglichen mit unbehandelten diabetischen Ratten gleichen Alters. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass STZ-diabetische Ratten keine Insulinresistenz, sondern aufgrund fehlender Produktion einen Insulinmangel aufweisen. Glitazone vermindern die Plasma-Glukose-Konzentration, indem sie die periphere Insulinsensitivität über GLUT-1- und GLUT-4-Transporter sowie über ergänzende bzw. zusätzliche Wirkungen an Leber und Skelettmuskel erhöhen. Dementsprechend führt die Gabe von Pioglitazon in STZ-diabetischen Ratten zu keinen relevanten Veränderungen des Blutzuckers. Entsprechende Befunde anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls die Wirkungen von Pioglitazon im Tiermodell untersucht haben, unterstützen dieses Ergebnis (Majithiya et al., 2005; Toba et al., 2006).

Für die pathophysiologische Relevanz dieses Tiermodells spricht außerdem, dass es in Bezug auf Veränderungen wichtiger Regulationsmechanismen Parallelitäten aufweist, die ebenfalls im Rahmen der diabetischen Erkrankung auftreten.

Inzwischen ist bekannt, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine wichtige Schlüsselrolle in der Pathogenese diabetischer Komplikationen einnimmt. Im Besonderen die durch Angiotensin II (ANG) vermittelten Wirkungen auf das kardiovaskuläre System tragen wesentlich zur Entwicklung Diabetes-assoziierter Folgeerkrankungen bei (Dendorfer et al., 2005).

Bei Patienten mit chronischem Diabetes mellitus kommt es typischerweise zu einer Abnahme der plasmatischen Renin- und ANG-Konzentrationen (Christlieb, 1976; Feldt-Rasmussen et al., 1987; Christiansen et al., 1988). Gleiche inhibitorische Effekte auf diese Konzentrationen zeigen sich in diabetischen, nicht-ketotischen Ratten nach der Behandlung mit STZ (Kigoshi et al., 1986). In direktem Kontrast zu dieser plasmatischen Hemmung zeigt sich jedoch in verschiedenen kardiovaskulären Organen, wie zum Beispiel der Niere, eine erhöhte lokale RAAS-Aktivität mit folglich erhöhten Enzymkonzentrationen von Renin und ANG (Danser et al., 1989). Ursächlich könnte der intrazelluläre Volumenmangel aufgrund osmotischer Diurese und Eletrolytverschiebungen sein. Bereits 1988 fanden Ubeda und seine Mitarbeiter in STZ-diabetischen Ratten sowohl in der Aorta als auch in den Nebennieren erhöhte RAAS-Komponenten mit ansteigenden Plasmakonzentrationen an renal sezerniertem inaktivem Pro-Renin, welches daraufhin vom

Gewebe aufgenommen und in kardiovaskulär wirksames, aktives Renin umgewandelt wird. Weiterhin konnte in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden, dass STZ-diabetische Ratten eine erhöhte ACE-Expression im Gewebe sowie einen Anstieg derselbigen im Plasma zeigen (Hartmann et al., 1988; Jandeleit et al., 1992; Erdmann et al., 1998). Entsprechende Ergebnisse ergaben sich 1987 aus einer Studie von Feldt-Rasmussen bei diabetischen Patienten. Diese hohe lokale ACE-Expression kann durch vermehrte Konversion von Angiotensin I zu einem Anstieg der ANG-Konzentration in den jeweiligen Organen führen, was wiederum die ANG-vermittelte zunehmende kardiovaskuläre Schädigung im weiteren Verlauf der diabetischen Erkrankung erklären könnte (Crespo et al., 2003). Das Übereinstimmen in der Regulation von vaskulärer und organbezogener RAAS-Aktivität in STZ-behandelten Ratten und in diabetischen Patienten spricht erneut für die Eignung des hier eingesetzten Tiermodells.

Zusätzlich konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass die Endothelfunktion in diabetischen Patienten beeinträchtigt ist und sich weiterhin erhöhte Endothelin-1 (ET-1) -Konzentrationen im Plasma zeigen (Tomlinson et al., 1992). Interessanterweise finden sich vergleichbare Endothelveränderungen sowie erhöhte plasmatische ET-1-Konzentrationen in STZ-behandelten Ratten (Tomlinson et al., 1992). Demzufolge ermöglicht dieses Tiermodell ebenfalls Untersuchungen bzw. Beurteilungen in Bezug auf die pathologischen Endothelzellveränderungen sowie der daraus hervorgehenden kardiovaskulären Veränderungen im Rahmen des Diabetes mellitus.

In der Klinik wird Pioglitazon therapeutisch bei Patienten mit Typ-II-Diabetes eingesetzt. Folglich stellt sich die Frage, ob sich die experimentell bei einem absoluten Insulinmangel nachgewiesene mikrovaskuläre Protektion auch positiv auf die kapillären Gefäßveränderungen beim Typ-II-Diabetes auswirken könnte. Diesbezüglich konnte Frisbee (2005a) als pathophysiologische Entsprechung eine ähnlich progrediente kapilläre Gefäßschädigung als Konsequenz eines Typ-II-Diabetes nachweisen. Aufgrund der Tatsache, dass sich in STZ-behandelten Mäusen ebenfalls vergleichbare Mikrogefäßschädigungen zeigten (Emanueli et al., 2002, Han et al., 2009), ist es plausibel, dass die bei beiden Diabetesformen vorhandene Hyperglykämie, von der bedeutende gefäßschädigende Effekte bekannt sind (Laakso, 1999), das ausschlaggebende pathophysiologische Korrelat für die auftretende Kapillarrarefizierung ist. Dementsprechend wäre zu erwarten, dass die gefäßprotektiven Effekte von AVE 7688 und Pioglitazon ebenfalls beim Diabetes mellitus Typ II zu beobachten sind, zusätzlich zu blutzuckersenkenden Wirkungen (bei Pioglitazon). Allerdings kann man diese

vasoprotektiven Effekte beim Typ-II-Diabetes nicht selektiv nachweisen, da die Behandlung mit Pioglitazon zusätzlich auch die diabetische Stoffwechsellage verbessern würde.
In der vorliegenden experimentellen Studie bewirkte die organotrope STZ-Wirkung eine selektive Zerstörung der pankreatischen Betazellen einhergehend mit der Entwicklung einer akuten Hyperglykämie. Das plötzliche Einsetzen dieser Hyperglykämie und der von uns induzierte frühe Therapiebeginn entsprechen nicht der pathophysiologischen Entwicklung des Diabetes und der klinischen Praxis beim Menschen. Aus diesem Grund müssen eventuelle klinische Konsequenzen dieser Befunde sehr zurückhaltend diskutiert werden. An dieser Stelle ist allerdings hervorzuheben, dass mit Hilfe der vorliegenden Arbeit vor allem ein gefäßprotektiver Wirkmechanismus der eingesetzten Medikamente dargestellt werden sollte.

4.1.3 Analyse der Kapillardichten

Durch konventionelles Mikroskopieren in Kombination mit Immunhistochemie lassen sich Gewebe- bzw. Gefäßstrukturen morphologisch und Antigen-spezifisch in einer hohen Auflösung darstellen. Zur Auswertung dieser immunhistochemisch markierten Gefäßkomponenten, beispielsweise zur Bestimmung von Gefäßdichten, stehen heutzutage als Standardmethoden die manuelle oder computergestützte Auszählung zur Verfügung. Dabei konnte in Untersuchungen zur Gegenüberstellung der manuellen mit der computergestützten Bildanalyse hinsichtlich der Determination von Gefäßdichten eine signifikante Übereinstimmung der Ergebnisse beider Analysemethoden gezeigt werden (Fox et al., 1995; Weidner, 1995b; Cruz et al., 2001). CD31, auch bekannt als „Platelet endothelial cell adhesion molecule“ (PECAM-1), ist ein transmembranes Glykoprotein mit einer Molekularmasse von 130 Kilodalton (kDa), welches vor allem auf Endothelzellen exprimiert wird. Antikörper gegen das CD31-Antigen gehören derzeit zu den sensitivsten Endothelmarkern. Dies ergibt sich aus vorangegangenen Studien, in denen die Überlegenheit von CD31 gegenüber anderen spezifischen Endothelmarkern, wie zum Beispiel dem von-Willebrand-Faktor-Antigen (vWF:Ag, früher: Faktor VIII-assoziiertes Antigen) oder CD34, zur Markierung von Endothelzellen gezeigt werden konnte (Horak et al., 1992; Giatromanolaki et al., 1997). Ein Nachteil des vWF:Ag ist, dass es nicht auf allen Endothelzellen exprimiert wird und damit zu falsch-negativen Resultaten führen kann (Parums et al., 1990). Weiterhin ist bekannt, dass sowohl vWF:Ag wie auch CD34 zusätzlich mit lymphatischem Gewebe reagieren und dadurch falsch-positive Ergebnisse

aufweisen können (Schmidt und von Hochstetter, 1995; Vermeulen et al., 1996). Zu erwähnen ist jedoch, dass CD31 in Formalin-fixiertem Gewebe gelegentlich mit Plasmazellen reagieren kann (Vermeulen et al., 1996), ein Grund, weshalb wir uns für den Einsatz von Gefrierschnitten entschieden haben. Eine weitere wichtige Grundlage ist, dass der eingesetzte Antikörper ebenfalls eine Spezifität für das jeweilige Tiermodell zeigt. Der in dieser Arbeit eingesetzte CD31-Antikörper ist spezifisch für Rattengewebe und eignet sich damit gut für die von uns gewählte Auswertungsmethode. Bei der hier angewandten Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) für Gefrierschnitte bindet zunächst ein Primärantikörper an das Antigen, in diesem Fall CD31. Dieser Primärantikörper ist unabdinglich für eine positive Reaktion. Dementsprechend führten wir zur Verifizierung der Antikörper-Spezifität für Endothelzellen bzw. CD31 diese Methode auch ohne den Primärantikörper durch, woraufhin sich die Immunhistochemie als negativ darstellte. Um mögliche Verwechslungen mit den Myozytenzellkernen zu vermeiden, führten wir eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin durch, welche vor allem basophile Strukturen - insbesondere Zellkerne - blau färbt.

Des Weiteren stimmt unsere immunhistochemische Färbung mit der bekannten Histologie des Skelett- und Herzmuskels überein. Sowohl im histologischen Bild des quergeschnittenen Skelett- und Herzmuskels als auch in unseren immunhistochemisch angefärbten Gefrierschnitten zeigen sich die Muskelfasern dicht aneinandergelagert und von Kapillaren versorgt. Diese Mikrogefäße verlaufen zusammen mit Lymphgefäßen und Nervenfasern in den Bindegewebssepten (= Endomysium), die die einzelnen Muskelfasern umspinnen. Hinzukommend zeigt sich in unseren Gefrierschnitten sowohl das Zytosol als auch das Endomysium völlig frei von unspezifischen Verfärbungen, was ebenfalls für die von uns gewählte Färbungsmethode spricht.

Außerdem entsprechen die von uns erhobenen quantitativen Ergebnisse bezüglich der Kapillardichten im Herz- und Skelettmuskel von Ratten den Werten vorangegangener Studien (Hudlická et al., 1995; Frisbee et al., 2006), was ebenso die Eignung der von uns eingesetzten immunhistochemischen Färbung bestätigt.

Die Schnittfelder zur Bestimmung bzw. Auszählung der Kapillardichte wurden von uns nach den Kriterien von Weidner unter Berücksichtigung der sog. „Hot-spots“ (= Areale mit der höchsten Gefäßdichte) (Weidner, 1995a) ausgewählt. Laut Vermeulen et al. (1996) gehört dieses Vorgehen zu den in der Literatur empfohlenen Standardmethoden.

4.1.4 Strukturelle Myokard- bzw. Myozytenveränderungen sowie Myozyten-morphometrie im Versuchsverlauf

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich am Versuchsende in der Placebogruppe ein linksventrikuläres Gewicht von 607 ± 15 mg. Entsprechende Werte fanden sich im Zeitverlauf des ersten Versuchsabschnittes nach einer Diabetesdauer von 13 Wochen. Die Behandlung mit Pioglitazon führte zu vergleichbaren Werten. Unter AVE 7688 war das Gewicht des linken Ventrikels signifikant leichter. Mit Bezug auf die Ergebnisse der nicht-diabetischen Referenzgruppe am Versuchsanfang zeigte sich weder in der Placebogruppe noch im Zeitverlauf von 13 Wochen Diabetes ein wesentlicher Unterschied für das linksventrikuläre Gewicht. Folglich kann die Entwicklung einer Linksherzhypertrophie unter der Behandlung mit AVE 7688 oder Pioglitazon in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden. Dies wird durch vorangegangene Studien unterstützt, die belegen konnten, dass sowohl Pioglitazon als auch VPI die Genese einer kardialen Hypertrophie verhindern (Trippodo et al., 1999; Asakawa et al., 2002). Diesbezüglich konnten Trippodo et al. (1999) demonstrieren, dass VPI die mögliche Entwicklung einer Herzhypertrophie stärker unterdrücken als die alleinige Gabe eines ACE-Inhibitors. Eine potentielle Erklärung für diese bessere Wirksamkeit könnte die erhöhte renale ANP-Exkretion sein, die sich auf die zusätzliche NEP-Inhibition zurückführen lässt.

Des Weiteren liegen die in der Literatur beschriebenen Werte für das linksventrikuläre Gewicht in Wistar-Ratten mit 636 ± 20 mg bzw. 964 ± 33 mg (Leineweber et al., 2003; Lorenz, 2007) teilweise deutlich über unseren Werten, was ebenfalls gegen die Genese einer Linksherzhypertrophie spricht.

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie sowohl unter der Gabe von Pioglitazon als auch von AVE 7688 die absolute und die relative kardiale Kapillardichte im Vergleich zur Placebogruppe bei annähernd gleichbleibendem Herzgewicht signifikant erhöht waren, spricht für einen verbesserten Erhalt von Mikrogefäßen. Ursächlich für diese beobachtete Entwicklung könnten - zusätzlich zur Verhinderung des Diabetes-bedingten direkten Kapillaruntergangs - ein sukzessiver Verlust von Kardiomyozyten oder eine Abnahme der Myozytengröße im Versuchsverlauf sein. Dadurch, dass die relative Kapillardichte (= Kapillaranzahl pro Myozyt) ähnlich ansteigt wie die absolute Kapillardichte, scheidet eine Verringerung der Myozytengröße unter der medikamentösen Therapie als wesentlicher Einfluss aus. Das unter der Behandlung mit Pioglitazon unveränderte Herzgewicht spricht zudem gegen einen Verlust von myozytären Zellen. Die leichte Verminderung des linksventrikulären Gewichtes unter AVE 7688 lässt diese Möglichkeit

noch offen. Allerdings ist bekannt, dass besonders ACE-Hemmer das Herz hämodynamisch entlasten und durch Reduktion von Angiotensin II (ANG) einer Myokardhypertrophie entgegenwirken. Entsprechend konnten Amann und ihre Forschungsgruppe (2003) in Ratten mit subtotaler Nephrektomie nach 8-wöchiger Versuchsdauer demonstrieren, dass die Gabe von Ramipril den in unbehandelten Tieren beobachteten Verlust von Herzmuskelzellen verhinderte. Zusätzlich zeigte sich in der Kontrollgruppe eine deutliche Zunahme des Muskelzellvolumens (Zellhypertrophie) mit konsekutiver Entwicklung einer Linksherzhypertrophie. Beide Phänomene wurden ebenfalls durch die Gabe von Ramipril aufgehoben. Auch Olivetti et al. (1993) konnten anhand eines Rattenmodells veranschaulichen, dass der ACE-Inhibitor Spirapril eine Abnahme des Herzgewichtes und der Myokarddicke sowie eine Zunahme der kardialen Kapillardichte verursacht.

Im Hinblick auf die TZD konnten Diep et al. (2002) belegen, dass PPAR-γ-Agonisten eine Normalisierung des Zellwachstums in glatten Gefäßmuskelzellen bewirken. Darüber hinaus hat sich Pioglitazon seit dem Zeitpunkt seiner Markteinführung in Deutschland als wirksames und gut verträgliches orales Antidiabetikum etabliert, was unter anderem auf die vorwiegend tierexperimentell nachgewiesenen günstigen vaskulären und kardialen Effekte zurückzuführen ist. Eine Myokardschädigung in Form eines zunehmenden Myozytenunterganges ist als Nebenwirkung von Pioglitazon nicht bekannt (Erdmann und Hanefeld, 2004). Aus diesen Überlegungen folgt, dass die beobachtete Steigerung der Kapillardichte unter AVE 7688 oder Pioglitazon auf einen besseren Erhalt oder die Neubildung von Kapillaren zurückzuführen ist und nicht wesentlich von strukturellen Veränderungen des Myokards beeinflusst wird.

4.2 Bedeutung der PPAR-γ-Rezeptor vermittelten Wirkungen

4.2.1 Blutdruck

Die Regulation des Gefäßtonus wird vor allem über die endotheliale Freisetzung vasoaktiver Substanzen gesteuert, von denen insbesondere die Vasodilatatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin sowie die Vasokonstriktoren Endothelin-1 (ET-1) und Thromboxan A_2 erwähnenswert sind.

Inzwischen gibt es eine Vielzahl an experimentellen und klinischen Studien, die beweisen konnten, dass Bluthochdruck mit einer progredienten Abnahme der Kapillardichte einhergeht (Battegay et al., 2007). Die daraus resultierende verminderte Anzahl und Bildung von Mikrogefäßen kann wiederum durch eine zunehmende Beeinträchtigung der Organdurchblutung eine kompensatorische Sympathikusaktivierung hervorrufen mit konsekutiver Erhöhung des peripheren Widerstandes und damit einhergehend einem weiterem Anstieg des arteriellen Blutdruckes. Folge dieses Circulus vitiosus ist eine zunehmende Gefäßrarefizierung in Kombination mit einer fortschreitenden Schädigung kardiovaskulärer Organe. Dementsprechend ist das Durchbrechen dieses Circulus vitiosus mit einer effektiven antihypertensiven Therapie und den daraus resultierenden Auswirkungen auf die Kapillardichte von großem Interesse. Debbabi et al. (2006) konnten diesbezüglich belegen, dass eine wirksame blutdrucksenkende Langzeittherapie bei Patienten mit essentieller Hypertonie mit einer ansteigenden Mikrogefäßdichte einhergeht.

In der Placebogruppe kam es nach 11 Wochen Versuchsdauer zu einem Diabetes-bedingtem Blutdruckanstieg von 21 ± 3 mmHg. Pioglitazon schwächte diesen Blutdruck-anstieg um 11 ± 2 mmHg ab, so dass die Blutdruckwerte in der Pioglitazongruppe nach wie vor den in der Literatur beschriebenen Normwerten für gesunde Wistar-Kyoto-Ratten (110 ± 2 mmHg) (Hsieh et al., 2004) entsprachen.

Des Weiteren zeigte sich unter der Behandlung mit Pioglitazon eine um ca. 94 % (= Skelettmuskel) bzw. um ca. 53 % (= Herzmuskel) höhere Kapillardichte, die unter anderem durch die beobachtete Blutdrucksenkung bedingt sein könnte und damit die Hypothese unterstützt, dass Thiazolidindione (TZD) blutdrucksenkende und damit gefäßprotektive Eigenschaften besitzen. Majithiya und Kollegen konnten 2005 in einem Rattenmodell des Typ-I-Diabetes demonstrieren, dass die Therapie mit Pioglitazon im Vergleich zur Placebogruppe mit einer signifikant erhöhten Bildung der endogenen Antioxidantien Superoxid-Dismutase und Catalase einhergeht, welche wiederum für einen

vermehrten Abbau von Sauerstoffradikalen (ROS) zuständig sind und dadurch ansteigende NO-Spiegel verursachen. Bereits nach 4 Wochen Behandlungsdauer kam es zu einer Regenerierung des Gleichgewichtes zwischen Vasodilatation und -konstriktion und damit einhergehend zu einer Minderung des erhöhten Blutdruckes. Zusätzlich konnte belegt werden, dass Pioglitazon zu einer gesteigerten NO-Freisetzung in der Aorta STZ-diabetischer Ratten führt. 1994 konnte die Forschungsgruppe von Zhang et al. demonstrieren, dass die blutdrucksenkenden Eigenschaften von Pioglitazon auch durch eine direkte vasodilatierende Wirkung hervorgerufen werden, nämlich durch die Blockade von Calcium-Kanälen und damit einhergehendem verminderten Calcium-Einstrom in die Zelle. Gleiche Resultate erzielten Buchanan et al. (1995) in einem Rattenmodell. Interessanterweise treten diese direkten Effekte erst nach einer Behandlungsdauer von mehr als 3 Wochen und einer eingesetzten Pioglitazon-Konzentration von mehr als 10 µM auf (Majithiya et al., 2005). Grund für diese protrahierte Wirksamkeit könnte die initial vorhandene Störung der physiologischen Endothelfunktion sein, die sich erst im Laufe der folgenden Wochen regeneriert und Voraussetzung für die direkten vasodilatierenden Effekte der PPAR-γ-Agonisten ist.

Pharmakokinetische Studien an männlichen Ratten haben gezeigt, dass die maximale Plasma-Konzentration von Pioglitazon (Cmax) nach oraler Verabreichung von 10 mg kg^{-1} 35 µM beträgt (Majithiya et al., 2005). Um die direkten Effekte von Pioglitazon auf die Calcium-Kanäle zu nutzen, betrug die von uns eingesetzte Pioglitazon-Dosierung 10 mg kg^{-1} und die Behandlung dauerte insgesamt 12 Wochen. Demzufolge kann der beobachtete verminderte Blutdruckanstieg sowohl durch direkte als auch durch indirekte vasodilatierende Pioglitazon-Wirkungen erklärt werden.

Ein weiteres wichtiges Substrat, das wesentlich an der Blutdruckregulation beteiligt ist und dessen Stoffwechsel entscheidend durch TZD beeinflusst werden kann, ist das ET-1. Dementsprechend können auch Interaktionen mit dem ET-1-Stoffwechsel für die beobachteten Blutdruckeffekte in der vorliegenden Arbeit verantwortlich sein. Zumal inzwischen belegt ist, dass ET-1 eine Erhöhung des Sympathikotonus verursacht und dadurch eine nicht zu unterschätzende Rolle in der Pathogenese von Bluthochdruck und Niereninsuffizienz spielt. Dies konnte unter anderem durch die Gabe des spezifischen ET-Rezeptor-Antagonisten Bosentan verifiziert werden, der bei Patienten mit essentieller Hypertonie zu einem Blutdruckabfall führte (Krum et al., 1998). Ischämie, Stress sowie diverse humorale Faktoren, wie zum Beispiel Glukose oder Insulin, bewirken eine erhöhte endotheliale ET-1-Sekretion. Tomić et al. (2008) konnten belegen, dass sowohl Patienten

mit insulinabhängigem Diabetes mellitus (IDDM) als auch mit nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus (NIDDM) erhöhte Plasma- und Urin-Konzentrationen an ET-1 aufweisen. Zusätzlich zeigte sich im gleichen Patientenkollektiv eine signifikant positive Korrelation zwischen Plasma-ET-1 und Blutdruck ($RR_{Diabetes}$ = 160/92 mmHg im Vergleich zu $RR_{Kontrolle}$ = 120/80 mmHg). Entsprechend bewirkte die Gabe von Rosiglitazon in Ratten eine Abnahme der erhöhten ET-1-mRNA-Expression und führte dadurch zu einem vermindertem Blutdruckanstieg (Schiffrin et al., 2003).
Folglich lassen sich die blutdruckregulierenden Eigenschaften der TZD unter anderem durch Interaktionen mit dem NO-, Calcium- und Endothelinstoffwechsel erklären.

4.2.2 Angiogenese

Zusätzlich zur Blutdrucksenkung könnte die unter der Gabe von TZD nachgewiesene erhöhte NO-Bioverfügbarkeit durch eine gesteigerte NO-Freisetzung (Calnek et al., 2003; Schiffrin, 2005) eine weitere mögliche Erklärung für die in dieser Studie aufgetretene merklich verminderte Kapillarrarefizierung im Herz- und Skelettmuskel sein. Schließlich ist inzwischen belegt, dass gerade das Vorhandensein und die Wirkungen von NO Voraussetzungen für den Gefäßerhalt und Bedingungen für die Genese neuer Kapillaren sind (Ziche et al., 1994; Matsunaga et al., 2000; Lloyd et al., 2001; Girardot et al., 2004). Dies wird durch einen Bericht von Conway und seiner Forschungsgruppe (2001) untermauert, in dem die NO-vermittelte Vasodilatation als einer der ersten Schritte in der Angiogenese beschrieben wird. „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF), dessen Expression unter anderem durch NO hochreguliert wird, bewirkt eine erhöhte vaskuläre Permeabilität - hervorgerufen durch eine Um- bzw. Neuverteilung von interzellulären Adhäsionsmolekülen - sowie Veränderungen der Zellmembranstruktur. Folge ist neben einer Extravasation von Plasmaproteinen die Aktivierung, Proliferation und Migration von Endothelzellen. Zusätzlich stimuliert VEGF die endotheliale NO-Synthase (eNOS), was wiederum eine erhöhte Freisetzung von NO hervorruft und somit eine weitere Stimulation der Angiogenese bewirkt. Um eine pathologische Gefäßneubildung zu vermeiden und gleichzeitig den Erhalt der Gefäße zu gewährleisten, spielt zusätzlich das Angiopoietin-1 als natürlicher Anti-Permeabilitätsfaktor eine zentrale Rolle in der Regulation der physiologischen Angiogenese.
Auch Jefferson Frisbee konnte 2005 (b) zeigen, dass eine verminderte NO-Verfügbarkeit zu einer zunehmenden Kapillarrarefizierung im Skelettmuskel bei Ratten mit

metabolischem Syndrom führt. In adipösen Zuckerratten kam es zu einer zunehmenden Beeinträchtigung der Durchblutung des Skelettmuskels, verbunden mit einer reduzierten Mikrogefäßdichte (Capillary Density (CD) ≈ 650 Kapillaren mm^{-2}). Zeitgleich zeigte sich eine erhöhte Gefäßwandsteifigkeit sowie eingeschränkte Vasodilatation. Als Ursache für die progressive Mikrogefäßschädigung wurde in dieser Studie eine vermehrte ROS-Produktion angenommen. Diese Vermutung wurde durch erhöhte Konzentrationen von 15-Isoprostan F_{2t} (ehemals als 8-Epi-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ bezeichnet) verstärkt, einem in-vivo-Indikator für chronisch erhöhten oxidativen Stress (Hansel et al., 2004). Bestätigt wurde dieser Verdacht durch den Erfolg einer antioxidativen Therapie mit Tempol, einem Superoxid-Dismutase-Mimetikum, welches zu signifikant reduzierten Plasma-15-Isoprostan F_{2t}-Spiegeln mit konsekutiv abnehmender Genese von reaktiven Sauerstoffradikalen führte. Zusätzlich zeigten sich erhöhte vaskuläre NO-Konzentrationen, eine gesteigerte Skelettmuskeldurchblutung sowie eine erhöhte vasodilatative Reaktivität in Kombination mit einer verminderten Kapillarrarefizierung (CD ≈ 780 Kapillaren mm^{-2}). In einem anderen Versuchsarm dieser Studie, nämlich in mageren Zuckerratten, verursachte die chronische Blockade der NO-Synthase neben einem deutlichen Blutdruckanstieg ebenfalls einen Rückgang der Kapillardichte, ein Indiz für die zentrale Bedeutung von NO bezüglich der Entwicklung und dem Erhalt von Kapillaren.

Die Mobilisation vaskulärer angiogener Stammzellen könnte einen weiteren Wirkmechanismus der TZD darstellen, der für die erhöhte Mikrogefäßdichte in der vorliegenden Studie verantwortlich ist. Schließlich gibt es inzwischen Studien, die belegen, dass sich mit Hilfe der pleiotropen Wirkungen von PPAR-γ-Agonisten im Knochenmark gebildete und im Blutkreislauf zirkulierende adulte bzw. angiogene Stammzellen (angiogenic progenitor cells = APCs) zu Endothelzellen differenzieren können. Diese APCs können mobilisiert werden wesentlich zur Re-Endothelialisierung nach Gefäßintervention beitragen. In einem von Wang et al. (2004) durchgeführten Mausmodell förderte die Behandlung mit Rosiglitazon nach femoraler Angioplastie sowohl in vitro als auch in vivo die Differenzierung von APCs in ausgereifte Endothelzellen und verursachte dadurch eine frühzeitige Re-Endothelialisierung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im gleichen Tiermodell führte Rosiglitazon zu einer Zunahme der endothelialen Stammzellen (endothelial progenitor cells = EPCs) im Knochenmark und zu einer abnehmenden Differenzierung der im Blutkreislauf zirkulierenden Stammzellen in glatte Muskelzellen, was ebenfalls schützende Wirkungen bezüglich der Entwicklung einer Intimahyperplasie mit möglicher Re-Okklusion zeigte.

PPAR-γ-Agonisten könnten demnach nicht nur durch eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit, sondern auch durch die Bildung und Mobilisierung von EPCs eine vermehrte Genese von Blutgefäßen induzieren.

4.2.3 Anti-apoptotische Effekte

Die vermehrte Formation von Sauerstoffradikalen (ROS) im Rahmen der diabetischen Erkrankung ist eine der Hauptursachen für die progrediente Endothelschädigung (Camera et al., 2007). ROS bewirken durch Interaktionen mit intrazellulären Signalmolekülen - wie zum Beispiel der Poly-ADP-ribose Polymerase (Zheng et al., 2004) - DNA-Schäden und aktivieren dadurch die zelluläre Apoptose (Wiernsperger, 2003). Ein weiterer Apoptosefördernder Pathomechanismus ist die anhaltende Hyperglykämie, die über die Bildung von glykosyliertem Kollagen eine vorzeitige Alterung von Endothelzellen verursacht und schließlich eine Aktivierung des programmierten Zelltodes hervorruft (Camera et al., 2007).
Der präventive Einfluss von PPAR-γ-Agonisten auf die Apoptose ist in einer Vielzahl von Studien untersucht worden. Insofern könnten auch anti-apoptotische Wirkmechanismen von Thiazolidindionen (TZD) ein weiterer Grund für die in der vorliegenden Untersuchung beobachtete deutlich verminderte Kapillarschädigung sein. Zumal man inzwischen nachweisen konnte, dass TZD eine erhöhte Expression von Apoptose-Inhibitoren bewirken. Diesbezüglich führten Artwohl et al. (2005) eine experimentelle in-vitro-Studie mit humanen Endothelzellen durch. Ziel war, die direkten Wirkungen von verschiedenen PPAR-γ-Liganden auf die basale sowie TNF-α- bzw. Stearinsäure-induzierte Apoptose und die damit einhergehende Protein-Expression zu untersuchen. Die isolierten Endothelzellen wurden hierfür über 48 Stunden den TZD Troglitazon, Rosiglitazon, Pioglitazon oder RWJ241947 (RWJ) mit einer Konzentration von 2-50 μM ausgesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass Troglitazon, Rosiglitazon und Pioglitazon bei einer Konzentration von 10 μM und RWJ bei einer Konzentration von 50 μM zu einer Hemmung der basalen Apoptoserate um 8-25 % führten. Interessanterweise nahm diese Hemmung bei zunehmender Dosierung von Troglitazon, Rosiglitazon und Pioglitazon ab, um dann bei einer Konzentration von 50 μM wieder auf den Ausgangswert der basalen Apoptoserate zurückzukehren. RWJ verursachte eine komplette Aufhebung der TNF-α- bzw. Stearinsäure-vermittelten Apoptose. Ursache für die anti-apoptotischen Wirkungen der TZD war in der

Untersuchung die erhöhte Expression des Apoptose-Inhibitors Bcl-2, die mit der eingesetzten Medikamentenkonzentration invers korrelierte.

Taba und Mitarbeiter (2003) konnten demonstrieren, dass auch 15-Desoxy-Δ-prostaglandin J_2 dosis-abhängig anti-apoptotische Effekte aufweist, indem es bei einer eingesetzten Konzentration von 16 µM eine erhöhte Expression des Apoptose-Inhibitors c-IAP1 hervorruft.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die anti-apoptotischen Wirkungen der TZD zum einen in einer vermehrten Bcl-2-Expression mit gegenläufiger Downregulation Apoptose-fördernder Proteine äußern. Zum anderen konnten Chen et al. (2004) belegen, dass die Apoptose-hemmenden Effekte von PPAR-γ-Agonisten zusätzlich auf einer Hemmung der Caspase-3-Aktivität und der TNF-α-induzierten Apoptose beruhen.

4.2.4 Entzündung und Angiotensin II-Stoffwechsel

Die Genese kardiovaskulärer Erkrankungen wird durch das Zusammenspiel einer Vielzahl von pathogenen Stoffwechselprozessen gefördert. Diese beinhalten, zusätzlich zu den bereits erwähnten Pathomechanismen, eine vermehrte Transkription von Entzündungs-faktoren mit resultierender Induktion von inflammatorischen Prozessen sowie eine erhöhte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Akut-Phase-Proteinen (Reynolds und Goldberg, 2006).

Untersuchungen, die einen möglichen Einfluss dieser Entzündungsprozesse auf das mikrovaskuläre Netzwerk und den Kapillarumbau behandeln, sind in der Literatur nicht auszumachen. Dennoch könnte das vermehrte Vorhandensein von inflammatorischen Reaktionen ein weiterer Mechanismus für die progrediente Kapillarrarefizierung im Rahmen der diabetischen Erkrankung sein. Zumal mittlerweile belegt ist, dass auch makrovaskuläre Erkrankungen wie die Atherosklerose auf einem Entzündungsprozess beruhen. Folglich könnten die bekannten anti-inflammatorischen Wirkungen von Thiazolidindionen (TZD) auch entscheidend zu einer Verzögerung und/oder Milderung dieser zunehmenden Mikrogefäßschädigung beitragen. Unterstützt wird diese Hypothese durch vorangegangene Publikationen, die beweisen konnten, dass die entzündungshemmenden Effekte von PPAR-γ-Agonisten die Entwicklung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen wesentlich verzögern (Haffner et al., 2002).

Die Proliferation und Hypertrophie kardialer sowie vaskulärer Muskelzellen ist ein wesentlicher Bestandteil des kardiovaskulären „remodeling“. Folge ist die Genese von Gefäßstenosen, -verschlüssen, Hypertonie und Organhypertrophie mit zunehmender Myokardinsuffizienz. PPAR-γ-Agonisten vermindern die Proliferation und Migration von Monozyten und glatten Muskelzellen durch Interferenz mit multiplen Zellzyklus-regulatoren (Hsueh und Law, 2001). Diese Interaktionen stellen ebenfalls eine potentielle Erklärung für die in dieser Untersuchung erhobenen Befunde hinsichtlich des kardiovaskulären Systems unter der Gabe von Pioglitazon dar. Weiterhin konnte mit Hilfe von experimentellen Studien belegt werden, dass Pioglitazon auch die Angiotensin II (ANG) -vermittelten proliferativen Wirkungen auf glatte Muskelzellen und Fibroblasten inhibiert, einerseits durch eine reduzierte ROS-Produktion und andererseits durch eine Downregulation der AT_1-Rezeptor-Expression und -aktivität (Takeda et al., 2000). Diep und Mitarbeiter (2002) konnten an Sprague-Dawley-Ratten zeigen, dass die Behandlung mit Pioglitazon die Entwicklung einer ANG-vermittelten Hypertonie verhindern konnte. In der gleichen Studie wurde zusätzlich konstatiert, dass PPAR-γ-Agonisten durch Unterbindung der pathologischen Zellproliferation sowie durch entzündungshemmende Effekte eine Verbesserung der eingeschränkten Endothelfunktion hervorrufen; möglicherweise durch eine verminderte Hochregulation von AT_1-Rezeptoren, Zellzyklus-proteinen und pro-inflammatorischen Mediatoren.
Demnach könnten die kardio- und vaskuloprotektiven Effekte von Pioglitazon in der vorliegenden Studie zusätzlich durch Interaktionen mit inflammatorischen Stoffwechsel-prozessen sowie durch Wechselwirkungen mit dem ANG-Haushalt assoziiert sein.

4.2.5 Kardiale Wirkungen

Zur Expression und Funktion von kardialen PPAR-γ-Rezeptoren finden sich in der Literatur kontroverse Standpunkte. In einigen Studien konnte im Herzen bzw. in den Kardiomyozyten eine relativ hohe Konzentration von PPAR-γ-Rezeptoren nachgewiesen werden (Bishop-Bailey, 2000; Takano et al., 2000), in anderen Studien hingegen fand man nur eine sehr geringe bzw. gar keine Expression (Kelly, 2003). Gleichwohl gibt es inzwischen eine Vielzahl von Untersuchungen, die belegen, dass PPAR-γ-Agonisten kardioprotektive Wirkungen entfalten. Diese Effekte konnten in Bezug auf die mikrovaskuläre Gefäßversorgung des linken Ventrikels ebenfalls in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. So konnte Pioglitazon die progrediente Kapillarrarefizierung im

linken Ventrikel STZ-diabetischer Ratten deutlich verzögern bzw. reduzieren. Eine denkbare Erklärung für diesen Sachverhalt könnte eine vermehrte kardiale Expression und Wirksamkeit von PPAR-γ-Rezeptoren sein, die möglicherweise erst durch verschiedene physiologische und pathophysiologische Stoffwechselprozesse induziert wird.

Gilde et al. konnten 2003 belegen, dass der kardiale Lipidmetabolismus durch die PPAR-Rezeptoren α und β/δ reguliert wird, jedoch nicht durch den PPAR-γ-Rezeptor. Folglich könnten die über den PPAR-γ-Rezeptor vermittelten kardialen Wirkungen auch auf indirekten Mechanismen beruhen, wie zum Beispiel eine verbesserte Glukoseutilisation. Eine weitere Alternative wäre, dass die kardialen PPAR-γ-Rezeptoren vor allem im Endothel exprimiert werden und nicht in den Myozyten selbst. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine experimentelle Studie von Marx et al. (1999), die in humanen Endothelzellen, extrahiert aus der V. saphena, die Expression von PPAR-γ nachweisen konnte. Erwähnenswert ist, dass diese kultivierten Endothelzellen sowohl PPAR-γ-mRNA als auch PPAR-γ-Proteine exprimierten. Des Weiteren konnte auch in der menschlichen A. carotis immunhistochemisch PPAR-γ nachgewiesen werden. Im Vergleich des in den Endothelzellen vorgefundenen Gehalts an PPAR-γ mit dem von anderen bekannten PPAR-γ-exprimierenden Zellen (z.B. Pre-Adipozyten) konnte man feststellen, dass die Präsenz von PPAR-γ in humanen Endothelzellen ähnlich hoch ausgeprägt war.

In unserer Untersuchung führte die Behandlung mit Pioglitazon zu einer signifikant erhöhten Anzahl an Mikrogefäßen im linken Ventrikel, verglichen mit der Placebogruppe. Andere Studien, die die Auswirkungen von TZD auf die kardiale Kapillardichte im Verlauf der diabetischen Erkrankung untersuchen, sind in der Literatur bisher nicht zu finden. Dennoch könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum einen auf direkte Wirkungen von PPAR-γ-Agonisten auf die Kardiomyozyten bzw. das Endothel zurückgeführt werden oder zum anderen mit den bereits beschriebenen anti-proliferativen sowie positiven Wirkungen von TZD auf den NO-Stoffwechsel und die Modulierung der Entzündungsreaktion erklärt werden. Diese Hypothese wird durch Studien unterstützt, die sich mit den präventiven Effekten von PPAR-γ-Agonisten auf makrovaskuläre Ereignisse, beispielsweise dem Myokardinfarkt, auseinandergesetzt haben. So behandelten Yue und seine Mitarbeiter (2001) männliche Lewis-Ratten mit Rosiglitazon bevor sie für 30 Minuten die linke Koronararterie ligierten. Nach 24 Stunden der Reperfusion wurden die Infarktgröße und die damit verbundene kontraktile Dysfunktion im Vergleich mit nicht behandelten Tieren untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die intravenöse Vorbehandlung mit Rosiglitazon unmittelbar vor Gefäßunterbindung das Infarktgebiet

dosisabhängig um bis zu 37 % reduzierte. Demgegenüber führte die 7-tägige perorale Vorbehandlung mit Rosiglitazon zu einer verminderten Infarktgröße von 24 %. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich hinsichtlich des Ausmaßes der kontraktilen Dysfunktion. Im Gegensatz dazu ließ sich in einer klinischen Studie von Nissen und Wolski (2007) unter der Behandlung mit Rosiglitazon ein um 43% erhöhtes Herzinfarktrisiko nachweisen. Pioglitazon besitzt diesbezüglich ein deutlich günstigeres Wirkungsprofil. So konnte 2010 demonstriert werden (Graham et al., 2010), dass Rosiglitazon im Vergleich zu Pioglitazon mit einem signifikant erhöhten Risiko von Schlaganfällen, Herzinsuffizienz und Todesfällen assoziiert war, was letztendlich auch zur Rücknahme der Zulassung für Rosiglitazon geführt hat. Auch Loke et al. konnten 2011 erneut nachweisen, dass Pioglitazon im Gegensatz zu Rosiglitazon mit deutlich weniger kardialen Zusatzrisiken behaftet ist. Das unterschiedliche Wirkspektrum dieser beiden Substanzen war ein Grund, weshalb wir uns in der vorliegenden Studie für die Behandlung mit Pioglitazon entschieden haben. Allerdings zeigt auch Pioglitazon ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil (leicht erhöhtes Risiko für Blasenkarzinome, Verschlechterung einer Herzinsuffizienz, erhöhtes Frakturrisiko etc.), so dass man abwägen und genauer untersuchen muss, ob die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen gefäßprotektiven Effekte für den Patienten so vorteilhaft sind, dass sie die klinischen Risiken überwiegen.

4.2.6 Renale Wirkungen

Das Vorhandensein einer Mikroalbuminurie bei Diabetikern ist ein frühzeitiges Indiz für eine gestörte Endothelfunktion sowie eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, wohingegen die Progression in eine Makroalbuminurie die Manifestation einer offenkundigen Nephropathie darstellt mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion. Mittlerweile gibt es verschiedene experimentelle und klinische Studien, die den TZD zusätzlich renoprotektive Wirkungen zusprechen, die sich ebenfalls durch die bereits genannten gefäß- bzw. endothelschützenden Mechanismen dieser Substanzen erklären lassen. Schließlich basiert auch die Genese der diabetischen Nephropathie auf einer zunehmenden endothelialen Dysfunktion. Diesbezüglich konnten Imano und seine Mitarbeiter (1998) zeigen, dass die Behandlung mit Troglitazon bei Typ-II-Diabetikern mit bereits bestehender Mikroalbuminurie eine signifikante Reduktion des Albumin-Kreatinin-Verhältnisses im Urin („urinary albumin-to-creatinine ratio“ = ACR) verursachte und dadurch eine Verzögerung und/oder Milderung der progredienten Glomerulumschädigung

bewirkte. Entsprechende Ergebnisse ergab auch unsere Untersuchung, in der sich nach 12 Wochen Behandlungsdauer unter der Therapie mit Pioglitazon ebenfalls die niedrigste ACR zeigte (0,081 ± 0,02 g/l). Nach 5 Wochen Behandlungsdauer zeigte sich zwar in der Pioglitazon-Gruppe zunächst die höchste ACR, welche sich jedoch im weiteren Versuchsablauf deutlich reduzierte. Grund für diesen anfänglichen ACR-Anstieg könnte die bereits oben erwähnte initiale Störung der Endothelfunktion sein, die sich im Verlauf der nächsten 7 Versuchswochen unter der Gabe von Pioglitazon wesentlich erholt hatte. Ein weiterer Wirkmechanismus für die verminderte Albuminexkretion („urine albumin excretion“ = UAE) in der vorliegenden Untersuchung könnte eine Pioglitazon-induzierte gesteigerte Albuminaufnahme von Tubuluszellen sein. In diesem Zusammenhang konnte Zafiriou mit seiner Forschungsgruppe (2004) beweisen, dass die Gabe von Pioglitazon dosis-abhängig eine gesteigerte Albuminaufnahme der Tubuluszellen verursacht. Bemerkenswert ist außerdem, dass es zum Teil sogar Studien gibt, die den TZD - im Vergleich zu ACE-Inhibitoren - eine vergleichbare oder sogar bessere Renoprotektion zuweisen (Baylis et al., 2003). Welche Wirkungsmechanismen für die renoprotektiven Eigenschaften der TZD verantwortlich sind, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. In Frage kommen einerseits systemische Wirkungen wie zum Beispiel Blutdrucksenkung oder Verbesserung der Glukoseutilisation. Andererseits konnte man im renalen Kortex sowie im Nierenmark funktionelle PPAR-γ-Rezeptoren identifizieren (Yoshida et al., 2001). Folglich können die in dieser Untersuchung beobachteten renoprotektiven Effekte von Pioglitazon zum einen durch indirekte, systemische Wirkungen und zum anderen durch direkte Effekte am renalen Kortex und im Nierenmark begründet werden.

4.3 Interpretation der Effekte des Vasopeptidase-Inhibitors (VPI)

4.3.1 Blutdruck

Die Tatsache, dass erhöhte Blutdruckwerte mit einer progredienten Gefäßschädigung in Form einer stetig abnehmenden Kapillardichte einhergehen (Cheng et al., 2008a, 2008b), demonstriert, dass eine effektive Blutdruckregulation zur Prävention kardiovaskulärer Komplikationen von essentieller Bedeutung ist. Nicht ohne Grund wird der antihypertensiven Behandlung im Rahmen der Diabetestherapie eine gleichwertige Bedeutung zugesprochen wie der Kontrolle des Blutzuckers (UKPDS 38, 1998).

In der vorliegenden Studie entwickelte sich innerhalb von 12 Versuchswochen in der Placebogruppe ein signifikanter Blutdruckanstieg in Kombination mit einer deutlich reduzierten Mikrogefäßdichte in Herz- und Skelettmuskel. Im Vergleich dazu verhinderte die Behandlung mit dem kombinierten ACE/NEP-Inhibititor (= Vasopeptidase-Inhibitor, VPI) AVE 7688 eine Erhöhung des Blutdruckes, einhergehend mit signifikant erhöhten Kapillardichten in den entsprechenden Geweben. Als Erklärung für diese blutdruckregulierenden und (mikro-) gefäßprotektiven Wirkungen von AVE 7688 kommen vor allem 2 verschiedene Mechanismen in Frage: Zum einen zeigt sich unter der Gabe von VPI eine reduzierte Angiotensin II (ANG) -Bildung, die auf die vorliegende ACE-Hemmung zurückzuführen ist, zum anderen erhöhen VPI die plasmatische Bradykinin-Konzentration in Kombination mit einer vermehrten Präsenz von Natriuretischen Peptiden (NP) - im Besonderen atriales natriuretisches Peptid (ANP) - die dieses Ergebnis entscheidend unterstützen.

Bradykinin (BK) wird durch Kininogenasen aus seinen plasmatischen Vorläuferproteinen, den Kininogenen, freigesetzt und induziert über einen endothelialen Kininrezeptor die vermehrte Freisetzung der potenten Vasodilatatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI_2) (Wiemer et al., 1991; Schrör, 1992) mit resultierender Blutdrucksenkung. Die Halbwertszeit von Bradykinin im Blut beträgt ca. 0,5 s, bis es von Enzymen gespalten und damit inaktiviert wird. Inzwischen ist bekannt, dass das ACE und die NEP wesentlich für diesen metabolischen Abbau verantwortlich sind und dadurch den Bradykinin-, NO- und PGI_2-Stoffwechsel entscheidend beeinflussen können (Pham et al., 1996). González und seine Mitarbeiter (1998) konnten mit Hilfe von Zellkulturen belegen, dass die Gabe von VPI bezüglich des verminderten Bradykinin-Abbaus deutlich effektiver ist, als die alleinige Gabe eines selektiven ACE- oder NEP-Hemmers. Entsprechende Resultate fanden Dumoulin und Kollegen (2001) in einem experimentellen Tiermodell.

Arbin und seine Forschungsgruppe (2000) behandelten männliche STZ-diabetische Sprague-Dawley-Ratten mit Captopril oder mit Captopril in Kombination mit Retrothiorphan, einem NEP-Hemmer, um anschließend den systemischen peripheren Widerstand und die Durchblutung in der Femoralarterie zu messen. Dabei verursachte die kombinierte ACE/NEP-Inhibititon einen stärkeren Abfall des systemischen peripheren Widerstandes, einhergehend mit einer verbesserten Durchblutung, gegenüber der alleinigen Gabe des ACE-Hemmers. Als Ursache zeigte sich unter der Behandlung mit dem VPI eine höhere NO-Bildung und -Freisetzung aufgrund einer vermehrten Bradykinin-vermittelten Aktivierung des B_2-Kinin-Rezeptors. Auch Tikkanen et al. (1998) konnten mit Hilfe von Rattenmodellen belegen, dass die beobachtete Blutdrucksenkung unter dem VPI „S 21402“ im Vergleich zu Captopril überlegen ist. Vergleichbare Ergebnisse beobachteten Campese et al. (2001) bei Patienten mit Bluthochdruck, was erneut dafür spricht, dass die Ursache für die potentere Blutdrucksenkung unter VPI in einer gesteigerten Bradykininakkumulation liegt (Quaschning et al., 2001a).

Die Natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP sowie ET-1 und ANG stellen weitere wichtige Peptide dar, die unter anderem von der NEP katabolisiert werden (Erdös und Skidgel, 1989; Ferro et al., 1998). Entsprechend können die in der vorliegenden Studie beobachteten blutdruckregulierenden Eigenschaften von AVE 7688 auch durch additive bzw. synergistische sowie antagonistische Wirkungen in Bezug auf die Bildung und Freisetzung dieser Gewebshormone erklärt werden.

Je nachdem, ob die NEP-Inhibition entweder einen verminderten Abbau von überwiegend vasodilatativ oder -konstriktiv wirksamen Substraten verursacht, ergeben sich unterschiedliche Auswirkungen auf den Blutdruck.

Bewirkt die alleinige Gabe eines NEP-Inhibitors vornehmlich einen herabgesetzten Abbau der vasokonstriktiv wirkenden Peptide ANG und ET-1 mit resultierender Blutdrucksteigerung, so wird dies durch die zusätzliche ACE-Inhibition verhindert bzw. geschwächt und unterstützt dadurch die gewünschte Vasodilatation.

Des Weiteren konnte inzwischen gezeigt werden, dass die Langzeitbehandlung mit dem VPI Omapatrilat - im Unterschied zu Captopril - erhöhte Plasma-ET-1-Konzentrationen aufgrund einer gesteigerten „Endothelin-Converting-Enzyme“ (ECE) -Aktivität normalisiert und dadurch ebenfalls eine Blutdrucksenkung hervorruft (Quaschning et al., 2001c).

ANG, das vorherrschend über das ACE aus Angiotensin I gebildet wird, vermittelt über den AT_1-Rezeptor eine Vasokonstriktion mit resultierender Blutdrucksteigerung (Griendling et al., 1997). Zusätzlich interferiert es mit dem ET-1-Stoffwechsel in Form

einer vermehrten Expression und Freisetzung von ET-1 (Luft, 2002), was letztendlich eine Potenzierung der hypertensiven Effekte verursachen kann. Weiterhin bewirkt ANG über das RAAS eine gesteigerte Aldosteronsynthese mit konsekutiv erhöhter renaler Natrium- und Wasserretention. Folge ist ein vermehrtes intravasales Volumenangebot, das ebenfalls in einer Steigerung des Blutdruckes resultieren kann. Diese ANG-induzierten Wirkungen werden unter der Behandlung mit einem VPI zum einen durch die ACE-Inhibiton und zum anderen durch die oppositionellen Effekte zwischen ANP und ANG deutlich geschwächt. Interessanterweise bezeichnen Corti et al. (2001) ANP sogar als endogenen Antagonist des RAAS. Harris und Kollegen (1987) konnten belegen, dass erhöhte ANP-Konzentrationen, die unter NEP-Inbihition vorliegen, den stimulatorischen Einfluss von ANG auf den renalen Natrium-/Wasserhaushalt aufheben und dadurch die erwünschte Blutdrucksenkung verstärken können. Des Weiteren erzeugt ANP eine gesteigerte renale Natrium- und Wasserausscheidung sowie eine herabgesetzte Aldosteron-, Renin- und Vasopressin-sekretion, die ebenfalls die bereits erwähnten antihypertensiven Eigenschaften von VPI intensivieren (Lang et al., 1987; Seymour et al., 1991). Erwähnenswert ist außerdem, dass ANP sogar sympatholytische Wirkungen aufweist, die sich unter anderem in einer Senkung des arteriellen Mitteldruckes bemerkbar machen (Floras, 1990; Lang und Struthers, 1991).

Zur Verifizierung, dass das Bradykinin-Kallikrein-System und ANP maßgeblich an der VPI-vermittelten Blutdruckregulation mitwirken und demzufolge ursächlich an den in der vorliegenden Untersuchung beobachteten Ergebnissen beteiligt sein können, wurde in verschiedenen Studien der Bradykinin-Antagonist Hoe 140 und der ANP-Antagonist HS 142-1 verabreicht. Den Erwartungen entsprechend zeigte sich daraufhin ein Blutdruck-anstieg, einhergehend mit einer verminderten renalen Natrium-Exkretion (Madeddu et al., 1992; Hirata et al., 1993).

4.3.2 Gefäßfunktion und Angiogenese

Erstes Anzeichen einer beeinträchtigten Endothelfunktion ist die eingeschränkte NO- und Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation, die im weiteren Verlauf die Genese einer Mediahypertrophie mit zunehmendem Verlust des Gefäßlumendurchmessers begünstigt. Konsequenz dieses vaskulären „remodelings“ ist schließlich eine erhöhte Gefäßwandsteifigkeit, die zur Entwicklung diverser kardiovaskulärer Erkrankungen,

beispielsweise Ischämien im Rahmen von Stenosen, bis hin zum Verschluss des Gefäßes führen kann.

Die in der vorliegenden Studie unter der Therapie mit AVE 7688 beobachtete deutlich erhöhte Kapillardichte im Herz- und Skelettmuskel könnte sich neben den bereits genannten antihypertensiven Eigenschaften zusätzlich durch die vaskuloprotektiven Wirkungen von VPI erklären lassen. Diese Hypothese geht mit vorangegangenen Studien konform, in denen insbesondere der Erhalt der physiologischen Endothelfunktion bzw. die Verbesserung einer bestehenden endothelialen Dysfunktion unter der Gabe von VPI untersucht worden sind. So bewirkte die Behandlung mit equipotent antihypertensiven Dosierungen von Captopril oder Omapatrilat in Mesenterialarterien von salzsensitiven Dahl-Ratten eine Normalisierung der initial bestehenden Mediahypertrophie, einhergehend mit einer Vergrößerung des Gefäßlumens (d'Uscio et al., 2001). Diese Hemmung bzw. Normalisierung des pathologischen Wachstums von glatten Gefäßmuskelzellen wird einerseits durch die verminderte ANG-Formation hervorgerufen, andererseits konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass die NP ebenfalls anti-proliferative sowie muskelrelaxierende Wirkungen entfalten können (Hutchinson et al., 1997). Darüber hinaus war das oben genannte Rattenmodell durch eine verminderte Endothel-abhängige Vasodilatation als Antwort auf Acetylcholin charakterisiert, was die progrediente Beeinträchtigung der physiologischen Endothelfunktion widerspiegelte, die sich ebenfalls unter der Therapie mit Omapatrilat/Captopril signifikant verbesserte. Allerdings war die maximale Gefäßrelaxation unter der Captopril-Gabe, im Gegensatz zu Omapatrilat, nach wie vor eingeschränkt. Die zusätzliche Präinkubation mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME verstärkte die verminderte Acetylcholin-induzierte Vasodilatation, was schließlich zu der Hypothese führte, dass eine eingeschränkte endotheliale NO-Produktion und/oder -Bioverfügbarkeit sowie eine herabgesetzte Reaktivität der glatten Gefäßmuskelzellen auf NO ursächlich an der reduzierten Endothel-abhängigen Vasodilatation beteiligt sind. Im gleichen Versuchsmodell rief Omapatrilat, im Vergleich zu Captopril, zusätzlich eine erhöhte endotheliale cGMP-Produktion hervor, was erneut für die zunehmende Normalisierung der Endothelfunktion spricht (d'Uscio et al., 2001) und die unter Captopril nach wie vor beeinträchtigte maximale Gefäßrelaxation erklären könnte. Porter et al. (1992) konnten nachweisen, dass diese ausgeprägten stimulatorischen Effekte hinsichtlich der cGMP-Bildung in Endothel- sowie glatten Gefäßmuskelzellen auf ANP und BNP zurückgehen, die unter vorliegender NEP-Inhibiton in erhöhten Konzentration nachzuweisen sind und dadurch wesentlich zu den endothelprotektiven Eigenschaften von

VPI beitragen. Des Weiteren konnten Novosel und seine Kollegen (1994) bestätigen, dass auch die herabgesetzte Bildung von ANG unter vorliegender ACE-Inhibition eine Verbesserung der Endothelfunktion und damit eine Potenzierung der bereits genannten positiven Effekte bewirkt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die gewünschte reduzierte ANG-Formation unter der Gabe von VPI durch den zusätzlichen Antagonismus zwischen vaskulärem RAAS und dem System der Natriuretischen Peptide verstärkt wird (Itoh und Nakao, 1994).

Eine weitere Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete erhöhte Anzahl an Mikrogefäßen unter der Gabe von AVE 7688 könnte - neben eines verminderten Gefäß-unterganges aufgrund der Aufrechterhaltung der gefäßprotektiven Endothelfunktion - auch eine gesteigerte Kapillarneubildung sein. Schließlich gibt es bereits eine Vielzahl an Untersuchungen, die ACE-Inhibitoren pro-angiogene Eigenschaften zusprechen (Fabre et al., 1999) und folglich auch für die unter ACE-Hemmung beobachtete deutlich erhöhte Kapillardichte (Unger et al., 1992; Gohlke et al., 1996; Sabino et al., 2008) Ursache sein könnten. Interessanterweise scheint auch hier der reduzierte Bradykinin-Abbau, der unter dualer ACE/NEP-Hemmung weitaus stärker verhindert wird, entscheidend für diese angiogenen Effekte verantwortlich zu sein (Kiefer et al., 2003). In diesem Zusammenhang konnten Gohlke et al. (1997) an spontan hypertensiven Ratten demonstrieren, dass die Gabe von Ramipril - im Gegensatz zum AT_1-Rezeptor-Antagonisten Losartan - eine Zunahme der kardialen Kapillardichte verursachte. Erwähnenswert ist, dass diese Effekte bereits unter niedrigen Dosierungen des ACE-Hemmers zu beobachten waren, die noch keinen Einfluss auf den Blutdruck hatten. Zur Unterstützung der Hypothese, dass dieser kardiale Mikrogefäßanstieg auf eine Akkumulation von endogenem Bradykinin zurückzuführen ist, wurde in einem weiteren Versuchsarm dieser Studie zusätzlich zu Ramipril der Bradykinin B_2-Rezeptor Antagonist Icatibant verabreicht. Erwartungsgemäß entwickelte sich unter dieser kombinierten Behandlung keine Zunahme der kardialen Kapillardichte, weder unter hohen noch unter niedrigen Dosierungen von Ramipril. Ein potentieller Einfluss von Icatibant allein auf die Gefäße wurde ebenfalls ausgeschlossen und unterstreicht zusammen mit der fehlenden Wirkung von Losartan, dass das unter Ramipril beobachtete kardiale Kapillarwachstum auf eine Potenzierung von Bradykinin zurückzuführen ist. Vergleichbare Ergebnisse fanden Silvestre et al. (2001) bei Bradykinin-Rezeptor (B_2-Subtyp) Knockout-Mäusen.

Die pro-angiogenen Eigenschaften von Bradykinin lassen sich sowohl auf direkte als auch auf indirekte Wirkmechanismen zurückführen. Ein direkter Mechanismus zeigte sich in

kultivierten Endothelzellen, in denen Bradykinin dosisabhängig eine vermehrte DNA-Synthese hervorrief (Morbidelli et al., 1992). Indirekte Wirkungen scheinen erneut durch die endothelial gebildeten gefäßprotektiven Mediatoren Stickstoffmonoxid (NO) und/oder Prostaglandine bedingt zu sein (Siragy et al., 1997). Diesbezüglich konnten Toblli und seine Mitarbeiter (2004) nach 6 Monaten in adipösen Zuckerratten eine progrediente myokardiale Kapillarrarefizierung begleitet von einer stetigen Abnahme der VEGF- und endothelialen NO-Synthase (eNOS) -Expression nachweisen. Die Gabe von Perindopril reduzierte diesen zunehmenden Gefäßuntergang, einhergehend mit einer erhöhten VEGF- und eNOS-Expression. Dabei gab es eine positive sowie signifikante Korrelation zwischen der VEGF-Konzentration und der Gefäßanzahl im Myokard. Ähnlich wie in der vorliegenden Studie zeigte sich unter Perindopril - im Vergleich zu nicht-behandelten mageren Zuckerratten - sogar eine therapeutische Normalisierung der kardialen Mikrogefäßdichte sowie „capillary-to-myocyte-ratio“, was wiederum ein weiteres eindeutiges Indiz für die zentrale Bedeutung von NO und VEGF bezüglich der Entwicklung und dem Erhalt von Kapillaren ist.

Dementsprechend lassen sich die gefäßprotektiven Wirkungen von VPI, die sich in der vorliegenden Studie - neben positiven Effekten auf den Blutdruck - in einer reduzierten Kapillarschädigung und/oder erhöhten Kapillarneubildung äußern, sowohl durch Interaktionen mit den NP als auch auf direkte sowie indirekte Wirkungsmechanismen von Bradykinin zurückführen. Ausgangspunkt für diese Effekte scheint erneut die Aufrechterhaltung der physiologischen Endothelfunktion zu sein, die nach Aktivierung des Bradykinin-abhängigen B_2-Rezeptors bzw. durch Wechselwirkungen mit NP gefäß-protektive Mediatoren bildet.

4.3.3 Kardiale Wirkungen

Inzwischen ist bekannt, dass auch die kardioprotektiven Wirkungen von ACE-Inhibitoren zu einem großen Teil über Kinine, vor allem Bradykinin, vermittelt werden. Zur Verifizierung, ob diese Effekte auf das vaskuläre Kallikrein-Kinin-System (KKS) zurückzuführen sind oder aber auf das Vorhandensein eines unabhängigen kardialen KKS, führten Nolly und Mitarbeiter (1994) eine Untersuchung mit männlichen Wistar-Ratten durch, in der sie im Vorhof und im Ventrikel die Präsenz von Gewebekallikrein mRNA nachweisen konnten. Zhang et al. (1998) konnten belegen, dass sowohl die Gabe eines ACE- als auch eines NEP-Inhibitors über Interaktionen lokaler Kinine eine Stimulation der

NO-Produktion in den Koronargefäßen hervorruft. Zur Bestätigung der Hypothese, dass dieser NO-Anstieg auf eine vermehrte Bildung von lokalem BK zurückzuführen ist, wurde zusätzlich der BK-Antagonist Hoe 140 und der Serinproteaseinhibitor Dichloroisocoumarin verabreicht, die eine deutliche Abnahme der NO-Konzentration verursachten. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass neben BK auch die unter NEP-Hemmung ansteigende ANP-Konzentration eine weitere Begründung für die in dieser Studie beobachteten kardioprotektiven Wirkungen von AVE 7688 sein könnte. So behandelten Yang und Kollegen (1997) männliche Lewis-Ratten mit dem NEP-Inhibitor CGS24592, bevor sie für 30 Minuten die linke Koronararterie ligierten. Anschließend wurde nach 120 Minuten der Reperfusion die Infarktgröße im Vergleich mit nicht behandelten Tieren bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Vorbehandlung mit CGS24592 unmittelbar vor Reperfusion das Infarktgebiet signifikant um 24 ± 4 % reduzierte. Erwartungsgemäß bewirkte die Gabe des Kinin-Rezeptor-Antagonisten Icatibant oder des ANP-Antagonisten HS-142-1 vor Gefäßokklusion eine Zunahme des Ischämiegebietes.
Die Überlegenheit von VPI gegenüber der Verabreichung eines selektiven ACE- oder NEP-Inhibitors in Bezug auf die kardioprotektiven Wirkungen konnte inzwischen mit Hilfe einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden (Xu et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt könnten neben der erhöhten BK-Akkumulation erneut die Wechselwirkungen mit dem RAAS und den NP sein. So konnten Trippodo und Kollegen (1993) mit Hilfe eines experimentellen Hamstermodells beweisen, dass die synergistischen Wirkungen von verminderter ANG-Bildung und gesteigerter ANP-Formation unter kombinierter ACE- und NEP-Inhibition eine wesentlich effektivere Kardioprotektion aufweisen als die alleinige Gabe eines NEP- oder ACE-Inhibitors. Weiterhin beobachteten Trippodo et al. (1999) bei Hamstern mit Kardiomyopathie unter Omapatrilat eine deutlich größere mittlere Überlebensrate der Versuchstiere als unter der alleinigen Gabe von Captopril (99 % bzw. 51 % im Vergleich zur Kontrollgruppe). Diese Steigerung der mittleren Überlebensrate konnte inzwischen auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz unter der Behandlung mit Omapatrilat im Rahmen der IMPRESS-Studie nachgewiesen werden (Rouleau et al., 2000).

4.3.4 Renale Wirkungen

In unserer Untersuchung zeigte sich unter der Gabe von AVE 7688 nach 5 Wochen Behandlungsdauer eine über den klinischen Normbereich für Menschen diskret erhöhte

renale Albuminausscheidung, die sich innerhalb des weiteren Versuchsverlaufes zwar nahezu vervierfachte, jedoch nach wie vor unter den in der Placebogruppe gemessenen Werten lag. Eine mögliche Erklärung für diese Entwicklung können ebenfalls die Wechselwirkungen von VPI mit dem renalen KKS sein. Zumal inzwischen bewiesen ist, dass alle Komponenten des KKS auch in der Niere exprimiert werden und dort wichtige Regulatoren in Bezug auf die renale Hämodynamik und Tubulusfunktion darstellen (Riad et al., 2007). Entsprechend konnten Tschöpe et al. (2003) an STZ-diabetischen Ratten demonstrieren, dass die Gabe von Ramipril eine Normalisierung der renalen Protein- und Bradykininexkretion sowie der renalen Kininogen mRNA-Expression hervorrief. Zusätzlich konnte mit Hilfe des Bradykinin B_2-Rezeptor Antagonisten Icatibant belegt werden, dass die anti-proteinurischen Wirkungen von Ramipril zu einem großen Teil über Kinine vermittelt werden. Des Weiteren ist bekannt, dass NEP-Inhibitoren eine ausgeprägte Stimulation von Diurese, Natriurese, Kaliurese, renaler ANP- und cGMP-Exkretion, Bradykinin sowie Prostaglandin verursachen (Pham et al., 1996; Chen et al., 2001), die ebenso zu den renoprotektiven Wirkungen von VPI beitragen und folglich eine weitere Ursache für den in dieser Studie beobachteten Verlauf der Albuminausscheidung sind.

4.4 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die progrediente Kapillarrarefizierung im Rahmen der diabetischen Erkrankung durch die frühzeitige Behandlung mit dem Vasopeptidase-Inhibitor AVE 7688 oder dem PPAR-γ-Agonisten Pioglitazon deutlich reduziert wird. Neben diesen ausgeprägten vaskuloprotektiven Effekten zeigen diese beiden Therapieansätze weiterhin positive Wirkungen auf die Diabetes-bedingten Veränderungen des kardiovaskulären Systems wie Blutdruckanstieg, Herzfrequenz-minderung sowie die zunehmende Einschränkung der physiologischen Nierenfunktion.
Die vorliegende Studie demonstriert damit einen wichtigen organprotektiven und potentiell antidiabetischen Wirkmechanismus der beiden eingesetzten Substanzen.
Nachdem der Prototyp der Vasopeptidase-Inhibitoren „Omapatrilat“ aufgrund eines gehäuften Auftretens von Angioödemen nie als Antihypertensivum zugelassen wurde, könnte AVE 7688 eine mögliche Alternative dieser neuen Substanzklasse darstellen.

5 Zusammenfassung

Das diabetische Krankheitsbild ist unter anderem durch eine progrediente Kapillarrarefizierung gekennzeichnet, die sich in multiplen Organsystemen manifestiert und zu den kardiovaskulären Komplikationen beiträgt. Derzeitige antidiabetische Therapien zielen auf eine Reduktion des Blutzuckers und die arterielle Mikro- und Makroangiopathie; ihr Einfluss auf das kapilläre Netzwerk hat jedoch bisher kaum Beachtung gefunden. Inzwischen ist bekannt, dass die zur Behandlung des Diabetes etablierten Medikamente ihre Wirkungen durch Interaktionen mit verschiedenen Stoffwechselprozessen induzieren und dadurch den Erhalt der physiologischen Gefäßfunktion positiv beeinflussen können. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob und inwieweit die frühzeitige Therapie mit einem PPAR-γ-Agonisten oder Vasopeptidase-Inhibitor die fortschreitende mikrovaskuläre Gefäßschädigung im Skelettmuskel (M. quadriceps femoris) und im linken Ventrikel diabetischer Ratten positiv beeinflusst.

Um den Verlauf der experimentellen Gefäßschädigung zu beschreiben, wurden unbehandelte diabetische Ratten in regelmäßigen Abständen untersucht.

In einem Therapieansatz wurden männliche Wistar-Ratten mit einem medikamentös-induzierten Typ-I-Diabetes über einen Zeitraum von insgesamt 12 Wochen entweder mit dem Vasopeptidase-Inhibitor AVE 7688 oder dem PPAR-γ-Agonisten Pioglitazon behandelt. Zielsetzung dieser Studie war der spezifische Nachweis therapeutischer Effekte auf die vaskulären Veränderungen im Verlauf des Diabetes.

Weiterhin wurden die Diabetes-induzierten Veränderungen von Blutdruck, Herzfrequenz und Nierenfunktion erfasst sowie strukturelle Myokard- und Myozytenveränderungen ermittelt.

In diabetischen Tieren kam es während der 12-wöchigen Versuchsdauer zu einer Abnahme der absoluten Kapillardichte im Skelettmuskel (= Gesamtzahl der Kapillaren pro Fläche) um ca. 60 %. Entsprechende Werte zeigten sich auch für die relative Kapillardichte im Skelettmuskel (= Anzahl der Kapillaren pro Myozyt), die um ca. 62,5 % reduziert war. Die Veränderungen der Kapillardichten sind durch einen Verlust von Kapillaren in Folge diabetischer Schädigung zu interpretieren.

Die Behandlung diabetischer Tiere mit AVE 7688 über 12 Wochen steigerte die absolute und die relative Kapillardichte im M. quadriceps femoris um ca. 56 % bzw. ca. 44 %. Die Therapie mit Pioglitazon ergab entsprechende Ergebnisse (49 % bzw. 40 %). Im

Skelettmuskel kann eine Verringerung des Myozytenquerschnittes, der nur unter AVE 7688 beobachtet wurde, zu einer Steigerung der Kapillardichten beigetragen haben. Weitere Einflussfaktoren wie myozytäre Hypertrophie oder Apoptose konnten morphometrisch ausgeschlossen werden.
Im Herzmuskel diabetischer Tiere zeigte sich am Versuchsende eine vergleichbare diabetische Reduktion der absoluten und relativen Kapillardichte. Pioglitazon verminderte diese Gefäßrarefizierung signifikant um 35 % bzw. 48 %. Ähnliche Resultate bewirkte die Therapie mit AVE 7688, die eine Zunahme der absoluten Kapillardichte um ca. 44 % und der relativen Kapillardichte um ca. 49 % im linken Ventrikel bewirkte. Diese beobachteten Effekte unter der medikamentösen Therapie lassen sich durch eine Reduzierung des Diabetes-bedingten Gefäßunterganges bzw. durch eine kompensatorische Gefäßneubildung erklären. Unter der Behandlung mit Pioglitazon oder AVE 7688 wiesen die Ratten signifikant niedrigere Blutdruckwerte auf als in der Placebogruppe.
Während der 12-wöchigen Versuchsdauer trat eine zunehmende renale Albuminexkretion auf, die durch AVE 7688 und Pioglitazon tendenziell verbessert wurde.

PPAR-γ-Agonisten und Vasopeptidase-Inhibitoren besitzen demnach effektive vaskuloprotektive Wirkungen, die sich unter anderem in einer deutlich reduzierten Kapillarrarefizierung im Rahmen der diabetischen Erkrankung manifestieren. Dieser protektive Einfluss auf die diabetische Gefäßrarefizierung konnte mit Hilfe der vorliegenden Arbeit erstmals nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigen sie Anzeichen für nephroprotektive Effekte, die sich in einer verminderten Nierenschädigung äußern. Kardiovaskuläre Erkrankungen und Komplikationen wie Bluthochdruck und die Genese einer zunehmenden Niereninsuffizienz können dadurch verhindert bzw. abgeschwächt werden.

6 Literaturverzeichnis

Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH (2005) "Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials." *J Am Coll Cardiol.* 46(5):821-826.

Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, Wright AD, Turner RC, Holman RR (2000) "Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study." *BMJ*. 321(7258):412-419.

Adolfsson J, Ljungqvist A, Tornling G, Unge G (1981) "Capillary increase in the skeletal muscle of trained young and adult rats." *J Physiol.* 310:529-532.

Amann K, Tyralla K, Gross M, Schwarz U, Törnig J, Haas CS, Ritz E, Mall G (2003) "Cardiomyocyte loss in experimental renal failure: prevention by ramipril." *Kidney Int*. 63(5):1708-1713.

Amaral SL, Zorn TM, Michelini LC (2000) "Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats." *J Hypertens*. 18(11):1563-1572.

Ando S, Rahman MA, Butler GC, Senn BL, Floras JS (1995) "Comparison of candoxatril and atrial natriuretic factor in healthy men. Effects on hemodynamics, sympathetic activity, heart rate variability, and endothelin." *Hypertension*. 26(6 Pt 2):1160-1166.

Arbin V, Claperon N, Fournié-Zaluski MC, Roques BP, Peyroux J (2000) "Effects of combined neutral endopeptidase 24-11 and angiotensin-converting enzyme inhibition on femoral vascular conductance in streptozotocin-induced diabetic rats." *Br J Pharmacol.* 130(6):1297-1304.

Artwohl M, Hölzenbein T, Fürnsinn C, Freudenthaler A, Huttary N, Waldhäusl WK, Baumgartner-Parzer SM (2005) "Thiazolidinediones inhibit apoptosis and heat shock protein 60 expression in human vascular endothelial cells." *Thromb Haemost*. 93(5):810-815.

Asakawa M, Takano H, Nagai T, Uozumi H, Hasegawa H, Kubota N, Saito T, Masuda Y, Kadowaki T, Komuro I (2002) "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo." *Circulation*. 105(10):1240-1246.

Azuma Y, Shinohara M, Wang PL, Ohura K (2001) "15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits IL-10 and IL-12 production by macrophages." *Biochem Biophys Res Commun*. 283(2):344-346.

Balakumar P, Rose M, Singh M (2007) "PPAR ligands: are they potential agents for cardiovascular disorders?." *Pharmacology*. 80(1):1-10.

Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart J, Glineur C, Staels B (2002) "Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22(5):717-726.

Battegay EJ, de Miguel LS, Petrimpol M, Humar R (2007) "Effects of anti-hypertensive drugs on vessel rarefaction." *Curr Opin Pharmacol*. 7(2):151-157.

Baylis C, Atzpodien E, Freshour G, Engels K (2003) "Peroxisome proliferator-activated receptor [gamma] agonist provides superior renal protection versus angiotensin-converting enzyme inhibition in a rat model of type 2 diabetes with obesity." *J Pharmacol Exp Ther*. 307(3):854-860.

Becker RH, Wiemer G, Linz W (1991) "Preservation of endothelial function by ramipril in rabbits on a long-term atherogenic diet." *J Cardiovasc Pharmacol*. 18 Suppl 2:S110-115.

Beckman JA (2004) "Pathophysiology of vascular dysfunction in diabetes." *Cardiol Rounds*. 8:1–5.

Benkirane K, Amiri F, Diep QN, El Mabrouk M, Schiffrin EL (2006a) "PPAR-gamma inhibits ANG II-induced cell growth via SHIP2 and 4E-BP1." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290(1):H390-397.

Benkirane K, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL (2006b) "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates angiotensin II-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in blood vessels in vivo." *Hypertension.* 47(1):102-108.

Bishop-Bailey D (2000) “Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system.” *Br J Pharmacol*. 129(5):823-834.

Blais C, Fortin D, Rouleau JL, Molinaro G, Adam A (2000) “Protective effect of omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor, on the metabolism of bradykinin in normal and failing human hearts.” *J Pharmacol Exp Ther*. 295(2):621-626.

Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S (2001) “Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy.” *N Engl J Med*. 345(12):861-869.

Brewster UC, Setaro JF, Perazella MA (2003) “The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and cardiovascular disease states.” *Am J Med Sci*. 326(1):15-24.

Brownlee M (2001) “Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.” *Nature*. 414(6865):813-820.

Buchanan TA, Meehan WP, Jeng YY, Yang D, Chan TM, Nadler JL, Scott S, Rude RK, Hsueh WA (1995) “Blood pressure lowering by pioglitazone. Evidence for a direct vascular effect.” *J Clin Invest*. 96(1):354-360.

Cai H, Griendling KK, Harrison DG (2003) “The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases.” *Trends Pharmacol Sci*. 24(9):471-478.

Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM (2003) “Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells.” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23(1):52-57.

Camera A, Hopps E, Caimi G (2007) “Diabetic microangiopathy: physiopathological, clinical and therapeutic aspects.” *Minerva Endocrinol*. 32(3):209-229.

Campese VM, Lasseter KC, Ferrario CM, Smith WB, Ruddy MC, Grim CE, Smith RD, Vargas R, Habashy MF, Vesterqvist O, Delaney CL, Liao WC (2001) “Omapatrilat versus lisinopril: efficacy and neurohormonal profile in salt-sensitive hypertensive patients.” *Hypertension*. 38(6):1342-1348.

Campia U, Matuskey LA, Panza JA (2006) “Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation with pioglitazone improves endothelium-dependent dilation in nondiabetic patients with major cardiovascular risk factors.” *Circulation*. 113(6):867-875.

Chen HH, Lainchbury JG, Matsuda Y, Harty GJ, Burnett JC (2001) “Endogenous natriuretic peptides participate in renal and humoral actions of acute vasopeptidase inhibition in experimental mild heart failure.” *Hypertension*. 38(2):187-191.

Chen J, Li D, Zhang X, Mehta JL (2004) “Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of human coronary artery endothelial cells: modulation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand pioglitazone.” *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 9(1):35-41.

Cheng C, Daskalakis C, Falkner B (2008a) “Capillary rarefaction in treated and untreated hypertensive subjects.” *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2(2):79-88.

Cheng C, Diamond JJ, Falkner B (2008b) “Functional capillary rarefaction in mild blood pressure elevation.” *Clin Transl Sci*. 1(1):75-79.

Chiarelli F, Santilli F, Mohn A (2000) “Role of growth factors in the development of diabetic complications.” *Horm Res*. 53(2):53-67.

Christiansen JS, Giese J, Damkjaer M, Parving HH (1988) “The renin-angiotensin system and kidney function during initial insulin treatment in diabetic man.” *Scand J Clin Lab Invest*. 48(5):451-456.

Christlieb AR (1976) “Renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes mellitus.” *Diabetes*. 25(2 SUPPL):820-825.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) “Molecular mechanisms of blood vessel growth.” *Cardiovasc Res*. 49(3):507-521.

Corti R, Burnett JC, Rouleau JL, Ruschitzka F, Lüscher TF (2001) "Vasopeptidase inhibitors: a new therapeutic concept in cardiovascular disease?." *Circulation*. 104(15):1856-1862.

Craven PA, Studer RK, Negrete H, DeRubertis FR (1995) "Protein kinase C in diabetic nephropathy." *J Diabetes Complications*. 9(4):241-245.

Crespo MJ, Moreta S, González J (2003) "Cardiovascular deterioration in STZ-diabetic rats: possible role of vascular RAS." *Pharmacology*. 68(1):1-8.

Cruz D, Valentí C, Dias A, Seixas M, Schmitt F (2001) "Microvessel density counting in breast cancer. Slides vs. digital images." *Anal Quant Cytol Histol*. 23(1):15-20.

Danser AH, van den Dorpel MA, Deinum J, Derkx FH, Franken AA, Peperkamp E, de Jong PT, Schalekamp MA (1989) "Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy." *J Clin Endocrinol Metab*. 68(1):160-167.

Debbabi H, Uzan L, Mourad JJ, Safar M, Levy BI, Tibiriçà E (2006) "Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients." *Am J Hypertens*. 19(5):477-483.

Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B (1999) "Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway." *Circ Res*. 85(5):394-402.

Dendorfer A, Dominiak P, Schunkert H (2005) "ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists." *Handb Exp Pharmacol*. (170):407-442.

Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Neves MF, Schiffrin EL (2002) "Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." *Circulation*. 105(19):2296-2302.

de Dios ST, Bruemmer D, Dilley RJ, Ivey ME, Jennings GLR, Law RE, Little PJ (2003) "Inhibitory activity of clinical thiazolidinedione peroxisome proliferator activating receptor-gamma ligands toward internal mammary artery, radial artery, and saphenous vein smooth muscle cell proliferation." *Circulation*. 107(20):2548-2550.

Dorenkamp M, Riad A, Stiehl S, Spillmann F, Westermann D, Du J, Pauschinger M, Noutsias M, Adams V, Schultheiss H, Tschöpe C (2005) "Protection against oxidative stress in diabetic rats: role of angiotensin AT(1) receptor and beta 1-adrenoceptor antagonism." *Eur J Pharmacol*. 520(1-3):179-187.

Dumoulin MJ, Adam A, Rouleau JL, Lamontagne D (2001) "Comparison of a vasopeptidase inhibitor with neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme inhibitors on bradykinin metabolism in the rat coronary bed." *J Cardiovasc Pharmacol*. 37(4):359-366.

d'Uscio LV, Quaschning T, Burnett JC, Lüscher TF (2001) "Vasopeptidase Inhibition Prevents Endothelial Dysfunction of Resistance Arteries in Salt-Sensitive Hypertension in Comparison With Single ACE Inhibition." *Hypertension*. 37(1):28-33.

Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, Duriez M, Levy BI, Silvestre J (2005) "Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25(1):65-70.

Emanueli C, Salis MB, Pinna A, Stacca T, Milia AF, Spano A, Chao J, Chao L, Sciola L, Madeddu P (2002) "Prevention of diabetes-induced microangiopathy by human tissue kallikrein gene transfer." *Circulation*. 106(8):993–999.

Erdmann A, Chen-Gal B, David I, Giler S, Boner G, van Dijk DJ (1998) "Insulin treatment reduces the increased serum and lung angiotensin converting enzyme activity in streptozotocin-induced diabetic rats." *Scand J Clin Lab Invest*. 58(1):81-87.

Erdmann E, Hanefeld M (2004) "Glitazone – eine antidiabetische Substanzklasse aus kardiologischer Sicht: Neue Aspekte für eine gefäßorientierte Behandlung bei Diabetes mellitus Typ 2." *Dtsch Arztebl.* 101(44):A2954-A2961.

Erdmann E, Dormandy JA, Charbonnel B, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM (2007) "The effect of pioglitazone on recurrent myocardial infarction in 2,445 patients with type 2 diabetes and previous myocardial infarction: results from the PROactive (PROactive 05) Study." *J Am Coll Cardiol*. 49(17):1772-1780.

Erdös EG, Skidgel RA (1989) "Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones." *FASEB J*. 3(2):145-151.

Evan AP, Mong SA, Gattone VH, Connors BA, Aronoff GR, Luft FC (1984) "The effect of streptozotocin and streptozotocin-induced diabetes on the kidney." *Ren Physiol*. 7(2):78-89.

Fabre JE, Rivard A, Magner M, Silver M, Isner JM (1999) "Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo." *Circulation*. 99(23):3043-3049.

Farhy RD, Carretero OA, Ho KL, Scicli AG (1993) "Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation." *Circ Res*. 72(6):1202-1210.

Farhy RD, Ho KL, Carretero OA, Scicli AG (1992) "Kinins mediate the antiproliferative effect of ramipril in rat carotid artery." *Biochem Biophys Res Commun.* 182(1):283-288.

Feldt-Rasmussen B, Mathiesen ER, Deckert T, Giese J, Christensen NJ, Bent-Hansen L, Nielsen MD (1987) "Central role for sodium in the pathogenesis of blood pressure changes independent of angiotensin, aldosterone and catecholamines in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus." *Diabetologia*. 30(8):610-617.

Ferro CJ, Spratt JC, Haynes WG, Webb DJ (1998) "Inhibition of neutral endopeptidase causes vasoconstriction of human resistance vessels in vivo." *Circulation*. 97(23):2323-2330.

Ferry G, Bruneau V, Beauverger P, Goussard M, Rodriguez M, Lamamy V, Dromaint S, Canet E, Galizzi JP, Boutin JA (2001) "Binding of prostaglandins to human PPARgamma: tool assessment and new natural ligands." *Eur J Pharmacol*. 417(1-2):77-89.

Feuerstein GZ, Young PR (2000) "Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways." *Cardiovasc Res*. 45(3):560-569.

Floras JS (1990) "Sympathoinhibitory effects of atrial natriuretic factor in normal humans." *Circulation*. 81(6):1860-1873.

Fournié-Zaluski MC, Gonzalez W, Turcaud S, Pham I, Roques BP, Michel JB (1994) "Dual inhibition of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase by the orally active inhibitor mixanpril: a potential therapeutic approach in hypertension." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(9):4072-4076.

Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL (1995) "Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis." *J Pathol*. 177(3):275-283.

French JF, Anderson BA, Downs TR, Dage RC (1995) "Dual inhibition of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase in rats with hypertension." *J Cardiovasc Pharmacol*. 26(1):107-113.

Frisbee JC (2005a) "Hypertension-independent microvascular rarefaction in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome." *Microcirculation*. 12(5):383-392.

Frisbee JC (2005b) "Reduced nitric oxide bioavailability contributes to skeletal muscle microvessel rarefaction in the metabolic syndrome." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 289(2):R307-R316.

Frisbee JC, Samora JB, Peterson J, Bryner R (2006) "Exercise training blunts microvascular rarefaction in the metabolic syndrome." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(5):H2483-2492.

Gale EA (2001) "Lessons from the glitazones: a story of drug development." *Lancet*. 357(9271):1870-1875.

Ganda OP (1980) "Pathogenesis of macrovascular disease in the human diabetic." *Diabetes*. 29(11):931-942.

Gasic S, Waldhausl W (2000) "Diabetes mellitus und koronare Herzkrankheit." *J Cardiol*. 7(10):407–415.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Theodossiou D, Barbatis K, O'Byrne K, Harris AL, Gatter KC (1997) "Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-VIII and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res*. 3(12 Pt 1):2485-2492.

Gilde AJ, van der Lee KAJM, Willemsen PHM, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, van Bilsen M (2003) "Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism." *Circ Res*. 92(5):518-524.

Giorgino F, Chen JH, Smith RJ (1992) "Changes in tyrosine phosphorylation of insulin receptors and a 170,000 molecular weight nonreceptor protein in vivo in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin and glucose." *Endocrinology*. 130(3):1433-1444.

Girardot D, Jover B, Moles J, Deblois D, Moreau P (2004) "Chronic nitric oxide synthase inhibition prevents new coronary capillary generation." *J Cardiovasc Pharmacol*. 44(3):322-328.

Gohlke P, Kuwer I, Bartenbach S, Schnell A, Unger T (1994a) "Effect of low-dose treatment with perindopril on cardiac function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: role of bradykinin." *J Cardiovasc Pharmacol*. 24(3):462-469.

Gohlke P, Kuwer I, Schnell A, Amann K, Mall G, Unger T (1997) "Blockade of bradykinin B2 receptors prevents the increase in capillary density induced by chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *Hypertension*. 29(1 Pt 2):478-482.

Gohlke P, Linz W, Schölkens B, Van Even P, Martorana P, Unger T (1996) "Vascular and cardiac protection by ramipril in spontaneously hypertensive rats: prevention versus regression study." *Br J Clin Pract Suppl*. 84:1-10.

Gohlke P, Linz W, Schölkens BA, Kuwer I, Bartenbach S, Schnell A, Unger T (1994b) "Angiotensin-converting enzyme inhibition improves cardiac function. Role of bradykinin." *Hypertension*. 23(4):411-418.

Goldberg RB (2007) "Thiazolidinediones and vascular damage." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 14(2):108-115.

González W, Soleilhac JM, Fournié-Zaluski MC, Roques BP, Michel JB (1998) "Characterization of neutral endopeptidase in vascular cells, modulation of vasoactive peptide levels." *Eur J Pharmacol.* 345(3):323-331.

Graham DJ, Ouellet-Hellstrom R, MaCurdy TE, Ali F, Sholley C, Worrall C, Kelman JA (2010) "Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone." *JAMA.* 304(4):411–418.

Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassègue B, Alexander RW (1997) "Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts." *Hypertension*. 29(1 Pt 2):366-373.

Gundersen HJ (1978) "Estimators of the number of objects per area unbiased by edge effects." *Microsc Acta*. 81(2):107-117.

Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI (2002) "Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus." *Circulation*. 106(6):679-684.

Han B, Baliga R, Huang H, Giannone PJ, Bauer JA (2009) "Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and redox imbalance in murine diabetic cardiomyopathy." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297(2):H829–835.

Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A (2004) "Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity." *J Clin Endocrinol Metab*. 89(10):4963-4971.

Harris PJ, Thomas D, Morgan TO (1987) "Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption." *Nature*. 326(6114):697-698.

Harrison DG (1997) "Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction." *J Clin Invest*. 100(9):2153-2157.

Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2003) "Role of oxidative stress in atherosclerosis." *Am J Cardiol*. 91(3A):7A-11A.

Hartmann JF, Szemplinski M, Hayes NS, Keegan ME, Slater EE (1988) "Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor, lisinopril, on normal and diabetic rats." *J Hypertens*. 6(8):677-683.

Hirata Y, Matsuoka H, Suzuki E, Hayakawa H, Sugimoto T, Matsuda Y, Morishita Y, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H (1993) "Role of endogenous atrial natriuretic peptide in DOCA-salt hypertensive rats. Effects of a novel nonpeptide antagonist for atrial natriuretic peptide receptor." *Circulation*. 87(2):554-561.

HOPE-Studie (2000) "Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators." *Lancet*. 355(9200):253-259.

Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris AL (1992) "Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer." *Lancet*. 340(8828):1120-1124.

Howard BV, Rodriguez BL, Bennett PH, Harris MI, Hamman R, Kuller LH, Pearson TA, Wylie-Rosett J (2002) "Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular disease: Writing Group I: epidemiology." *Circulation*. 105(18):e132-137.

Hsieh NK, Wang JY, Liu JC, Lee WH, Chen HI (2004) "Structural changes in cerebral arteries following nitric oxide deprivation: a comparison between normotensive and hypertensive rats." *Thromb Haemost*. 92(1):162-170.

Hsueh WA, Law RE (2001) "PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21(12):1891-1895.

Hudlická O (1982) "Growth of capillaries in skeletal and cardiac muscle." *Circ Res*. 50(4):451-461.

Hudlická O, Brown MD, Walter H, Weiss JB, Bate A (1995) "Factors involved in capillary growth in the heart." *Mol Cell Biochem*. 147(1-2):57-68.

Hudson BI, Wendt T, Bucciarelli LG, Rong LL, Naka Y, Yan SF, Schmidt AM (2005) "Diabetic vascular disease: it's all the RAGE." *Antioxid Redox Signal*. 7(11-12):1588-1600.

Hutchinson HG, Trindade PT, Cunanan DB, Wu CF, Pratt RE (1997) "Mechanisms of natriuretic-peptide-induced growth inhibition of vascular smooth muscle cells." *Cardiovasc Res*. 35(1):158-167.

Imano E, Kanda T, Nakatani Y, Nishida T, Arai K, Motomura M, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Hori M (1998) "Effect of troglitazone on microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy." *Diabetes Care*. 21(12):2135-2139.

Ingelfinger JR, Solomon CG (2006) "Angiotensin-converting-enzyme inhibitors for impaired glucose tolerance--is there still hope?." *N Engl J Med*. 355(15):1608-1610.

Irving RJ, Walker BR, Noon JP, Watt GCM, Webb DJ, Shore AC (2002) "Microvascular correlates of blood pressure, plasma glucose, and insulin resistance in health." *Cardiovasc Res*. 53(1):271-276.

Itoh H, Nakao K (1994) "Antagonism between the vascular renin-angiotensin and natriuretic peptide systems in vascular remodelling." *Blood Press Suppl*. 5:49-53.

Jandeleit K, Rumble J, Jackson B, Cooper ME (1992) "Mesenteric vascular angiotensin-converting enzyme is increased in experimental diabetes mellitus." *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 19(5):343-347.

Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE (1967) "Studies of the diabetogenic action of streptozotocin." *Proc Soc Exp Biol Med*. 126(1):201-205.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE (1969) "Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response." *J Clin Invest*. 48(11):2129-2139.

Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA (1994) "Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells." *J Clin Invest*. 93(6):2431-2437.

Kelly DP (2003) "PPARs of the heart: three is a crowd." *Circ Res*. 92(5):482-484.

Kiefer FN, Neysari S, Humar R, Li W, Munk VC, Battegay EJ (2003) “Hypertension and angiogenesis.” *Curr Pharm Des*. 9(21):1733-1744.

Kigoshi T, Imaizumi N, Azukizawa S, Yamamoto I, Uchida K, Konishi F, Morimoto S (1986) “Effects of angiotensin II, adrenocorticotropin, and potassium on aldosterone production in adrenal zona glomerulosa cells from streptozotocin-induced diabetic rats.” *Endocrinology*. 118(1):183-188.

Koya D, King GL (1998) “Protein kinase C activation and the development of diabetic complications.” *Diabetes*. 47(6):859-866.

Kramer D, Shapiro R, Adler A, Bush E, Rondinone CM (2001) “Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats.” *Metabolism*. 50(11):1294-1300.

Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V (1998) “The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators.” *N Engl J Med*. 338(12):784-790.

Laakso M (1999) “Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes.” *Diabetes*. 48(5):937-942.

Lang CC, Struthers AD (1991) “Interactions between atrial natriuretic factor and the autonomic nervous system.” *Clin Auton Res*. 1(4):329-336.

Lang RE, Unger T, Ganten D (1987) “Atrial natriuretic peptide: a new factor in blood pressure control.” *J Hypertens*. 5(3):255-271.

Larsen PJ, Jensen PB, Sørensen RV, Larsen LK, Vrang N, Wulff EM, Wassermann K (2003) “Differential influences of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and -alpha on food intake and energy homeostasis.“ *Diabetes*. 52(9):2249–2259.

Leineweber K, Seyfarth T, Abraham G, Gerbershagen H, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde O (2003) “Cardiac beta-adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes.” *J Cardiovasc Pharmacol*. 41(3):333-342.

Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD (1993) “The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group.” *N Engl J Med*. 329(20):1456-1462.

Linz W, Schäfer S, Afkham F, Gerl M, Schmidts HL, Rütten H (2006) “Vasopeptidase inhibition prevents target organ damage and improves survival in spontaneously hypertensive rats.“ *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 7(3):155–161.

Linz W, Schölkens BA, Han YF (1986) “Beneficial effects of the converting enzyme inhibitor, ramipril, in ischemic rat hearts.” *J Cardiovasc Pharmacol*. 8 Suppl 10:S91-99.

Linz W, Schölkens BA, Kaiser J, Just M, Qi BY, Albus U, Petry P (1989) “Cardiac arrhythmias are ameliorated by local inhibition of angiotensin formation and bradykinin degradation with the converting-enzyme inhibitor ramipril.” *Cardiovasc Drugs Ther*. 3(6):873-882.

Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA (1995) “Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors.” *Pharmacol Rev*. 47(1):25-49.

Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL (2001) “Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide.” *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281(6):H2528-2538.

Loke YK, Kwok CS, Singh S (2011) “Comparative cardiovascular effects of thiazolidinediones: systematic review and meta-analysis of observational studies“. *BMJ*. 342:d1309

Lorenz M (2007) “Stellenwert einer definierten Reduktion der Nephronanzahl für den arteriellen Blutdruck, die Myokardhypertrophie und die linksventrikuläre Funktion im Rattenmodell.” *Diss. Berlin.*

Luft FC (2002) “Proinflammatory effects of angiotensin II and endothelin: targets for progression of cardiovascular and renal diseases.” *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 11(1):59-66.

Madeddu P, Anania V, Parpaglia PP, Demontis MP, Varoni MV, Pisanu G, Troffa C, Tonolo G, Glorioso N (1992) "Effects of Hoe 140, a bradykinin B2-receptor antagonist, on renal function in conscious normotensive rats." *Br J Pharmacol*. 106(2):380-386.

Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002) "Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30." *Nat Med*. 8(7):731-737.

Majithiya JB, Paramar AN, Balaraman R (2005) "Pioglitazone, a PPARgamma agonist, restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats." *Cardiovasc Res*. 66(1):150-161.

Martens FM, Rabelink TJ, op 't Roodt J, de Koning EJ, Visseren FL (2006) "TNF-alpha induces endothelial dysfunction in diabetic adults, an effect reversible by the PPAR-gamma agonist pioglitazone." *Eur Heart J*. 27(13):1605-1609.

Marx N, Bourcier T, Sukhova GK, Libby P, Plutzky J (1999) "PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19(3):546-551.

Marx N, Duez H, Fruchart J, Staels B (2004) "Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells." *Circ Res*. 94(9):1168-1178.

Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N, Kumada M, Okamoto Y, Nagaretani H, Nishizawa H, Kishida K, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Nagai R, Funahashi T, Matsuzawa Y (2002) "Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis." *J Biol Chem*. 277(40):37487-37491.

Matsunaga T, Warltier DC, Weihrauch DW, Moniz M, Tessmer J, Chilian WM (2000) "Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide." *Circulation*. 102(25):3098-3103.

Minoura H, Takeshita S, Kimura C, Hirosumi J, Takakura S, Kawamura I, Seki J, Manda T, Mutoh S (2007) "Mechanism by which a novel non-thiazolidinedione peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, FK614, ameliorates insulin resistance in Zucker fatty rats." *Diabetes Obes Metab*. 9(3):369–378.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS (2003) "Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001." *JAMA*. 289(1):76-79.

Moncada S, Higgs A (1993) "The L-arginine-nitric oxide pathway." *N Engl J Med*. 329(27):2002-2012.

Morbidelli L, Parenti A, Granger H, Ziche M, Ledda F (1992) "Activation of DNA synthesis and inositol-phosphate turnover in coronary venular endothelial cells exposed to bradykinin.." *Pharmacol Res*. 25(Suppl 2):150-151.

Morigi M, Angioletti S, Imberti B, Donadelli R, Micheletti G, Figliuzzi M, Remuzzi A, Zoja C, Remuzzi G (1998) "Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF-kB-dependent fashion." *J Clin Invest*. 101(9):1905-1915.

Motwani JG, Lang CC, Cramb G, Struthers AD (1995) "Natriuretic response to neutral endopeptidase inhibition is blunted by enalapril in healthy men." *Hypertension*. 25(4 Pt 1):637-642.

Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomuta H, Ikeda K, Horiuchi S (1997) "The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas." *Diabetologia*. 40(7):764-769.

Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara L, Koide H (2001) "Effect of troglitazone on urinary albumin excretion and serum type IV collagen concentrations in Type 2 diabetic patients with microalbuminuria or macroalbuminuria." *Diabet Med*. 18(4):308-313.

Nissen SE, Wolski K (2007) "Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes." *N Engl J Med*. 356(24):2457–2471.

Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J (1994) "Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone." *N Engl J Med*. 331(18):1188-1193.

Nolly H, Carbini LA, Scicli G, Carretero OA, Scicli AG (1994) "A local kallikrein-kinin system is present in rat hearts." *Hypertension*. 23(6 Pt 2):919-923.

Novosel D, Lang MG, Noll G, Lüscher TF (1994) "Endothelial dysfunction in aorta of the spontaneously hypertensive, stroke-prone rat: effects of therapy with verapamil and trandolapril alone and in combination." *J Cardiovasc Pharmacol*. 24(6):979-985.

Olfert IM, Breen EC, Mathieu-Costello O, Wagner PD (2001) "Skeletal muscle capillarity and angiogenic mRNA levels after exercise training in normoxia and chronic hypoxia." *J Appl Physiol*. 91(3):1176-1184.

Olivetti G, Cigola E, Lagrasta C, Ricci R, Quaini F, Monopoli A, Ongini E (1993) "Spirapril prevents left ventricular hypertrophy, decreases myocardial damage and promotes angiogenesis in spontaneously hypertensive rats." *J Cardiovasc Pharmacol*. 21(3):362-370.

Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY (1990) "JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections." *J Clin Pathol*. 43(9):752-757.

Pham I, Gonzalez W, Doucet J, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Michel JB (1996) "Effects of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase inhibitors: influence of bradykinin." *Eur J Pharmacol*. 296(3):267-276.

Polikandriotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, Hart CM (2005) "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25(9):1810-1816.

Porter JG, Catalano R, McEnroe G, Lewicki JA, Protter AA (1992) "C-type natriuretic peptide inhibits growth factor-dependent DNA synthesis in smooth muscle cells." *Am J Physiol*. 263(5 Pt 1):C1001-1006.

Quaschning T, D'Uscio LV, Shaw S, Gröne HJ, Ruschitzka F, Lüscher TF (2001a) "Vasopeptidase inhibition restores renovascular endothelial dysfunction in salt-induced hypertension." *J Am Soc Nephrol*. 12(11):2280-2287.

Quaschning T, d'Uscio LV, Shaw S, Lüscher TF (2001b) "Vasopeptidase inhibition exhibits endothelial protection in salt-induced hypertension." *Hypertension*. 37(4):1108-1113.

Quaschning T, d'Uscio LV, Shaw S, Viswambharan H, Ruschitzka FT, Lüscher TF (2001c) "Chronic vasopeptidase inhibition restores endothelin-converting enzyme activity and normalizes endothelin levels in salt-induced hypertension." *Nephrol Dial Transplant*. 16(6):1176-1182.

Raasch W, Bartels T, Schwartz C, Häuser W, Rütten H, Dominiak P (2002) "Regression of ventricular and vascular hypertrophy: are there differences between structurally different angiotensin-converting enzyme inhibitors?." *J Hypertens*. 20(12):2495-2504.

Rahman S, Rahman T, Ismail AA, Rashid ARA (2007) "Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis." *Diabetes Obes Metab*. 9(6):767-780.

Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, Giaid A, Harrison DG (1997) "Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension." *Hypertension*. 30(1 Pt 1):29-34.

Reynolds K, Goldberg RB (2006) "Thiazolidinediones : beyond glycemic control." *Treat Endocrinol*. 5(1):25-36.

Riad A, Zhuo JL, Schultheiss HP, Tschöpe C (2007) "The role of the renal kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy." *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 16(1):22-26.

Rolland PH, Charpiot P, Friggi A, Piquet P, Barlatier A, Scalbert E, Bodard H, Tranier P, Mercier C, Luccioni R (1993) "Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition with perindopril on hemodynamics, arterial structure, and wall rheology in the hindquarters of atherosclerotic mini-pigs." *Am J Cardiol*. 71(17):22E-27E.

Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC, Beaumont A (1993) "Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology." *Pharmacol Rev*. 45(1):87-146.

Rouleau JL, Pfeffer MA, Stewart DJ, Isaac D, Sestier F, Kerut EK, Porter CB, Proulx G, Qian C, Block AJ (2000) "Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial." *Lancet*. 356(9230):615-620.

Ruschitzka F, Corti R, Quaschning T, Hermann M, Lüscher TF (2001) "Vasopeptidase inhibitors--concepts and evidence." *Nephrol Dial Transplant*. 16(8):1532-1535.

Sabino B, Lessa MA, Nascimento AR, Rodrigues CA, Henriques MDG, Garzoni LR, Levy BI, Tibiriçá E (2008) "Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis." *J Cardiovasc Pharmacol*. 51(4):402-409.

Schäfer S, Steioff K, Linz W, Bleich M, Busch AE, Löhn M (2004) "Chronic vasopeptidase inhibition normalizes diabetic endothelial dysfunction." *Eur J Pharmacol*. 484(2-3):361–362.

Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H (2000) "Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction." *Circ Res*. 87(12):1195-1201.

Schiffrin EL (2005) "Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288(3):H1037-1043.

Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN (2003) "Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension." *Hypertension*. 42(4):664-668.

Schmidt D, von Hochstetter AR (1995) "The use of CD31 and collagen IV as vascular markers. A study of 56 vascular lesions." *Pathol Res Pract*. 191(5):410-414.

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB (1994) "STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells." *Diabetes*. 43(11):1326-1333.

Schrör K (1992) "Role of prostaglandins in the cardiovascular effects of bradykinin and angiotensin-converting enzyme inhibitors." *J Cardiovasc Pharmacol*. 20 Suppl 9:S68-73.

Schunkert H, Sadoshima J, Cornelius T, Kagaya Y, Weinberg EO, Izumo S, Riegger G, Lorell BH (1995) "Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II." *Circ Res*. 76(3):489-497.

Selvin E, Coresh J, Golden SH, Brancati FL, Folsom AR, Steffes MW (2005) "Glycemic control and coronary heart disease risk in persons with and without diabetes: the atherosclerosis risk in communities study." *Arch Intern Med*. 165(16):1910-1916.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002) "Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators." *Circ Res*. 91(5):406-413.

Seymour AA, Swerdel JN, Abboa-Offei B (1991) "Antihypertensive activity during inhibition of neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme." *J Cardiovasc Pharmacol*. 17(3):456-465.

Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI (2001) "Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway." *Circ Res*. 89(8):678-683.

Singh R, Alavi N, Singh AK, Leehey DJ (1999) "Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation." *Diabetes*. 48(10):2066-2073.

Siragy HM, Jaffa AA, Margolius HS (1997) "Bradykinin B2 receptor modulates renal prostaglandin E2 and nitric oxide." *Hypertension*. 29(3):757-762.

Staels B, Fruchart J (2005) "Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists." *Diabetes*. 54(8):2460-2470.

Steiner H, Oelz O, Zahnd G, Foresch ER (1970) "Studies on islet cell regeneration, hyperplasia and intrainsular cellular interrelations in long lasting streptozotocin diabetes in rats." *Diabetologia*. 6(6):558-564.

Stevens RJ, Coleman RL, Adler AI, Stratton IM, Matthews DR, Holman RR (2004) "Risk factors for myocardial infarction case fatality and stroke case fatality in type 2 diabetes: UKPDS 66." *Diabetes Care*. 27(1):201-207.

Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR (2000) "Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study." *BMJ*. 321(7258):405-412.

Su EJ, Lombardi DM, Siegal J, Schwartz SM (1998) "Angiotensin II induces vascular smooth muscle cell replication independent of blood pressure." *Hypertension*. 31(6):1331-1337.

Taba Y, Miyagi M, Miwa Y, Inoue H, Takahashi-Yanaga F, Morimoto S, Sasaguri T (2003) "15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and laminar fluid shear stress stabilize c-IAP1 in vascular endothelial cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 285(1):H38-46.

Takano H, Nagai T, Asakawa M, Toyozaki T, Oka T, Komuro I, Saito T, Masuda Y (2000) "Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes." *Circ Res*. 87(7):596-602.

Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A (2000) "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells." *Circulation*. 102(15):1834-1839.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group." *N Engl J Med*. 329(14):977-986.

Thulesen J, Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS (1997) "Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats." *Endocrinology*. 138(1):62-68.

Tikkanen T, Tikkanen I, Rockell MD, Allen TJ, Johnston CI, Cooper ME, Burrell LM (1998) "Dual inhibition of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme in rats with hypertension and diabetes mellitus." *Hypertension*. 32(4):778-785.

Toba H, Miki S, Shimizu T, Yoshimura A, Inoue R, Sawai N, Tsukamoto R, Murakami M, Morita Y, Nakayama Y, Kobara M, Nakata T (2006) "The direct antioxidative and anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptors ligands are associated with the inhibition of angiotensin converting enzyme expression in streptozotocin-induced diabetic rat aorta." *Eur J Pharmacol*. 549(1-3):124-132.

Toblli JE, Cao G, DeRosa G, Di Gennaro F, Forcada P (2004) "Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiogenesis in myocardium of obese Zucker rats." *Am J Hypertens*. 17(2):172-180.

Tomić M, Galesić K, Morović-Vergles J, Romić Z, Mikulić I (2008) "The role of endothelin-1 and nitric oxide in the pathogenesis of hypertension in diabetic patients." *Coll Antropol*. 32(1):93-98.

Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T (1992) "Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system." *Pharmacol Rev*. 44(1):103-150.

Trippodo NC, Fox M, Monticello TM, Panchal BC, Asaad MM (1999) "Vasopeptidase inhibition with omapatrilat improves cardiac geometry and survival in cardiomyopathic hamsters more than does ACE inhibition with captopril." *J Cardiovasc Pharmacol*. 34(6):782-790.

Trippodo NC, Fox M, Natarajan V, Panchal BC, Dorso CR, Asaad MM (1993) "Combined inhibition of neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme in cardiomyopathic hamsters with compensated heart failure." *J Pharmacol Exp Ther*. 267(1):108-116.

Trippodo NC, Robl JA, Asaad MM, Fox M, Panchal BC, Schaeffer TR (1998) "Effects of omapatrilat in low, normal, and high renin experimental hypertension." *Am J Hypertens*. 11(3 Pt 1):363-372.

Tschöpe C, Seidl U, Reinecke A, Riester U, Graf K, Schultheiss HP, Hilgenfeldt U, Unger T (2003) "Kinins are involved in the antiproteinuric effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental diabetic nephropathy." *Int Immunopharmacol*. 3(3):335-344.

Ubeda M, Hernandez I, Fenoy F, Quesada T (1988) "Vascular and adrenal reninlike activity in chronically diabetic rats." *Hypertension*. 11(4):339-343.

UKPDS 38 (1998) "Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group." *BMJ*. 317(7160):703-713.

Unger T, Mattfeldt T, Lamberty V, Bock P, Mall G, Linz W, Schölkens BA, Gohlke P (1992) "Effect of early onset angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial capillaries." *Hypertension*. 20(4):478-482.

Verma S, Szmitko PE (2006) "The vascular biology of peroxisome proliferator-activated receptors: modulation of atherosclerosis." *Can J Cardiol*. 22 Suppl B:12B-17B.

Vermes E, Ducharme A, Bourassa MG, Lessard M, White M, Tardif J (2003) "Enalapril reduces the incidence of diabetes in patients with chronic heart failure: insight from the Studies Of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD)." *Circulation*. 107(9):1291-1296.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY (1996) "Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation." *Eur J Cancer*. 32A(14):2474-2484.

Vranes D, Cooper ME, Dilley RJ (1995) "Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces diabetes-induced vascular hypertrophy: morphometric studies." *J Vasc Res*. 32(3):183-189.

Walcher D, Marx N (2006) "Glitazone 2006–ein Update." *J Cardiol*. 13(5-6):140-143.

Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, Williams G (1999) "The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats." *Diabetes*. 48(7):1448-1453.

Wang C, Ciliberti N, Li S, Szmitko PE, Weisel RD, Fedak PWM, Al-Omran M, Cherng W, Li R, Stanford WL, Verma S (2004) "Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy." *Circulation*. 109(11):1392-1400.

Weidner N (1995a) "Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors." *Breast Cancer Res Treat*. 36(2):169-180.

Weidner N (1995b) "Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer." *Am J Pathol*. 147(1):9-19.

Wiemer G, Schölkens BA, Becker RH, Busse R (1991) "Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin." *Hypertension*. 18(4):558-563.

Wiernsperger NF (2003) "Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy." *Diabetes & Metab*. 29(6):579-585.

Xu J, Carretero OA, Liu Y, Yang F, Shesely EG, Oja-Tebbe N, Yang X (2004) "Dual inhibition of ACE and NEP provides greater cardioprotection in mice with heart failure." *J Card Fail*. 10(1):83-89.

Yang XP, Liu YH, Peterson E, Carretero OA (1997) "Effect of neutral endopeptidase 24.11 inhibition on myocardial ischemia/reperfusion injury: the role of kinins." *J Cardiovasc Pharmacol*. 29(2):250-256.

Yki-Järvinen H (2004) "Thiazolidinediones." *N Engl J Med*. 351(11):1106-1118.

Yoshida K, Kohzuki M, Xu HL, Wu XM, Kamimoto M, Sato T (2001) "Effects of troglitazone and temocapril in spontaneously hypertensive rats with chronic renal failure." *J Hypertens*. 19(3):503-510.

Yue Tl TL, Chen J, Bao W, Narayanan PK, Bril A, Jiang W, Lysko PG, Gu JL, Boyce R, Zimmerman DM, Hart TK, Buckingham RE, Ohlstein EH (2001) "In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone." *Circulation*. 104(21):2588-2594.

Zafiriou S, Stanners SR, Polhill TS, Poronnik P, Pollock CA (2004) "Pioglitazone increases renal tubular cell albumin uptake but limits proinflammatory and fibrotic responses." *Kidney Int*. 65(5):1647-1653.

Zhang F, Sowers JR, Ram JL, Standley PR, Peuler JD (1994) "Effects of pioglitazone on calcium channels in vascular smooth muscle." *Hypertension*. 24(2):170-175.

Zhang X, Nasjletti A, Xu X, Hintze TH (1998) “Neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme inhibitors increase nitric oxide production in isolated canine coronary microvessels by a kinin-dependent mechanism.” *J Cardiovasc Pharmacol*. 31(4):623-629.

Zheng L, Szabó C, Kern TS (2004) “Poly(ADP-ribose) polymerase is involved in the development of diabetic retinopathy via regulation of nuclear factor-kappaB.” *Diabetes*. 53(11):2960-2967.

Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F (1994) “Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P.” *J Clin Invest*. 94(5):2036-2044.

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer für das anspruchsvolle und interessante Promotionsthema bedanken. Seine kompetente und beständige Betreuung, seine fundierten Empfehlungen und seine immerwährende Bereitschaft zu Diskussion und Beratung haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Dominiak für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. sc. hum. Fatimunnisa Qadri für die Einarbeitung in das Kryostat und die Immunhistochemie sowie ihre Hilfe bei den operativen Techniken und allen laborbezogenen Fragen.

Für die umfangreiche Unterstützung bei der Lichtmikroskopie und der Beratung bei der Auswertung der immunhistochemisch markierten Gefäß- und Zellkomponenten danke ich Herrn Dr. med. Reinhard Eggers.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Volker Fensterl für sein stets offenes Ohr und die unverzichtbare Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Ein ganz besonderes Dankeswort gilt Herrn Dipl. Inf. Lars Neumann für die stärkende und liebevolle Unterstützung sowie den kontinuierlichen Rückhalt.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen beiden Großmüttern, von denen leider nur noch eine lebt. Bei Frau Kreszentia Scheffold, die mir immer wieder sagt, wie stolz sie auf mich ist und bei Frau Erna Ashoff, der das Medizinstudium leider verwehrt blieb und die ihren Lebenstraum „Ärztin zu werden“ an mich weitergegeben hat.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für die kontinuierliche Unterstützung während des gesamten Studiums und den anhaltenden Glauben an mich.

8 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name:	Astrid Birgitta Ashoff
Geburtsdatum:	30.07.1979
Geburtsort:	Rheine/Westfalen

Schulausbildung:

1986 – 1990	Grundschule Diesterweg, Rheine
1990 – 1999	Gymnasium Marienschule, Hildesheim (Abitur)

Studium und wissenschaftliche Mitarbeit:

Oktober 1999 – Mai 2006	Universität zu Lübeck, Studium der Humanmedizin September 2001: Ärztliche Vorprüfung August 2002: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung März 2005: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung April 2006: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 – 2004	Hilfswissenschaftlerin im vorklinischen Praktikum der Physiologie

Promotion:

Januar 2003 – Juli 2004	Experimenteller Teil der Dr.-Arbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck (Leitung: Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer)

Beruflicher Werdegang:

Seit Juni 2006	Ärztin an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität zu Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. Peter Schmucker)
Seit September 2011	Fachärztin für Anästhesiologie

9 Publikationen

Poster: **Dendorfer A, Ashoff A, Raasch W, Dominiak P** (2006) "Vasopeptidase inhibition prevents capillary rarefaction in STZ-diabetic rats." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 372(Suppl): 44/129.*

Paper: **Ashoff A, Qadri F, Eggers R, Jöhren O, Raasch W, Dendorfer A** (2011) "Pioglitazone prevents capillary rarefaction in streptozotocin-diabetic rats independently of glucose control and VEGF expression." *J Vasc Res., in press.*