

Aus dem
Center for Cardiovascular Research (CCR) der
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Mitte
(Gemeinsame Einrichtung der
Humboldt-Universität zu Berlin und der
Freien Universität Berlin)

Forscherguppe Experimentelle und Klinische Arteriogenese

eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Einfluss des oralen Antidiabetikums Pioglitazon auf die Arteriogenese im Gehirn der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Johanna Glaser
Tierärztin aus Offenbach am Main

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3355

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Leo Brunnberg

Erster Gutachter: Prof. Dr. Johanna Plendl

Zweiter Gutachter: PD Dr. Ivo Buschmann

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Kerstin Müller

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats, diabetes mellitus, blood vessels, animal models, brain, collateral circulation,
hypoglycemic agents

Tag der Promotion: 12.04.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-786-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Coverbild © fotoflash - Fotolia.com

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2010 choriner str. 85 - 10119 berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Oma
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung	1
2. Einleitung	3
2. 1. Arteriogenese	3
2. 1. 1. Mechanismen und Ablauf der Arteriogenese.....	3
2. 1. 2. Arteriogenese und Angiogenese.....	5
2. 1. 3. Arteriogenese und Atherogenese	6
2. 1. 4. Zerebrale Blutversorgung.....	7
2. 1. 5. Zerebrale Arteriogenese	8
2. 1. 6. Tiermodell: Three-Vessel-Occlusion (3-VO)	9
2. 2. Diabetes mellitus Typ II.....	10
2. 2. 1. Epidemiologie	10
2. 2. 2. Pathogenese des Diabetes mellitus Typ II.....	10
2. 2. 3. Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen	12
2. 2. 4. Therapiekonzepte zum Diabetes mellitus Typ II	14
2. 3. Pioglitazon.....	15
2. 3. 1. Pharmakologische Eigenschaften.....	15
2. 3. 2. Einsatz in der Diabetes-Therapie	16
2. 3. 3. PROactive-Studie	17
2. 4. Peroxisome Proliferator-activated Rezeptoren.....	19
2. 4. 1. Wirkungsmechanismen	19
2. 4. 2. PPAR-Typen	20
2. 4. 3. Bedeutung von PPAR- γ für das Gefäßwachstum.....	21
3. Tiere, Material und Methoden.....	25
3. 1. Materialien	25
3. 1. 1. Tierhaltung	25
3. 1. 2. Geräte	25
3. 1. 3. Chirurgische Instrumente	26
3. 1. 4. Medikamente	26
3. 1. 5. Chemikalien, Lösungen & Gase.....	27
3. 1. 6. Verbrauchsmaterialien	27
3. 2. Versuchstiere	28
3. 2. 1. Haltungsbedingungen.....	28
3. 2. 2. Genehmigung des Tierversuchs	28
3. 2. 3. Gruppeneinteilung und Randomisierung	28
3. 3. Behandlung.....	29
3. 3. 1. Schmerztherapie	29
3. 3. 2. Medikamentelle Behandlung.....	29
3. 4. Operationen	30
3. 4. 1. Narkose.....	30
3. 4. 2. Drei-Gefäßverschluss (Three-vessel-occlusion, 3-VO)	31
3. 4. 3. Sham-Operation	32
3. 4. 4. Zerebrovaskuläre Reaktivität	33
3. 4. 5. Latexangiographie und Diameterbestimmung	35
3. 5. Histologische Untersuchung	37
3. 5. 1. Einbetten in Paraffin.....	37
3. 5. 2. Anfertigen der Gewebeschnitte.....	37
3. 5. 3. Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung.....	37
3. 5. 4. α -Smooth-Muscle-Cell-Actin(α -SMCA)-Markierung.....	38
3. 6. Statistische Datenauswertung.....	39

4. Ergebnisse	40
4. 1. Allgemeines.....	40
4. 1. 1. Überlebensraten.....	40
4. 1. 2. Körpergewicht	41
4. 2. 3-VO-Operation	43
4. 3. Latexangiographie.....	45
4. 3. 1. Heubnersche Anastomosen	45
4. 3. 2. Durchmesser der Gefäße des Circulus Willisii	46
4. 3. 3. Durchmesser der A. cerebri posterior.....	47
4. 4. Zerebrovaskuläre Reaktivität (CVR)	51
4. 4. 1. Blutgasanalyse, Blutglukosespiegel und Hämatokrit.....	51
4. 4. 2. Vergleich der Reservekapazität zwischen den 3-VO-Gruppen.....	51
4. 4. 3. Vergleich der Reservekapazität zwischen den Sham-Gruppen.....	54
4. 4. 4. Gesamtvergleich der Reservekapazität zwischen allen Gruppen.....	55
4. 5. Histologie	57
4. 5. 1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	57
4. 5. 2. α -SMC-Aktin-Färbung	58
5. Diskussion	61
5. 1. Evaluierung der eingesetzten Methoden	61
5. 1. 1. Erzeugung einer zerebralen Hypoperfusion durch den Drei-Gefäßverschluss	61
5. 1. 2. Bewertung des induzierten Gefäßwachstums und Vergleichbarkeit mit dem Menschen	61
5. 1. 3. Bestimmung der Gefäßdiameter mittels Latexangiographie.....	62
5. 1. 4. Bestimmung der zerebralen Blutversorgung.....	63
5. 1. 5. Beurteilung der Gefäßmuskulatur mittels Immunhistochemie	64
5. 2. Auslegung und Bewertung der ermittelten Ergebnisse	64
5. 2. 1. Hoch dosierte Pioglitazon-Gabe führt zu einer Zunahme des Körpergewichts ...	64
5. 2. 2. Kein Einfluss von Pioglitazon auf Hämatokrit und Blutglukosespiegel.....	65
5. 2. 3. 3-VO induziert Kollateralwachstum in der PCA	66
5. 2. 4. Pioglitazon hemmt das Wachstum der PCA nach 3-VO-Operation	67
5. 2. 5. Pioglitazon vermindert die zerebrovaskuläre Reservekapazität.....	67
5. 2. 6. Pioglitazon hemmt die Proliferation glatter Muskelzellen.....	68
5. 2. 7. Weitere mögliche Ursachen für die Hemmung der Arteriogenese durch Pioglitazon.....	69
5. 3. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen.....	70
5. 4. Konsequenzen für die Therapie des Diabetes mellitus Typ II	70
5. 4. 1. Vergleich von Glitazonen mit anderen oralen Antidiabetika.....	70
5. 4. 2. Alternativen zur konventionellen Diabetes-mellitus-Therapie	72
5. 5. Konsequenzen für die Therapie atherosklerotischer Erkrankungen	73
5. 5. 1. Einsatz von Glitazonen in der Schlaganfalltherapie	73
5. 5. 2. Arteriogenesehemmung als Erklärung für Glitazon-bedingtes Herzversagen	75
5. 5. 3. Einsatz von Glitazonen in der Therapie makrovaskulärer Erkrankungen.....	76
5. 5. 4. Therapie der Artherosklerose durch Ursachenbekämpfung.....	77
5. 5. 5. Stimulation der Arteriogenese und Hemmung der Atherosklerose	79
6. Zusammenfassung.....	81
7. Summary	82
8. Literaturverzeichnis.....	83
9. Abkürzungsverzeichnis	93
10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	95
11. Danksagungen	97
12. Selbstständigkeitserklärung.....	98

1. Zielsetzung

Diabetes mellitus ist eine weit verbreitete Stoffwechselerkrankung. Zurzeit gibt es etwa 246 Millionen Diabetiker weltweit und es wird geschätzt, dass sich diese Zahl bis 2025 auf etwa 380 Millionen erhöht. Dabei handelt es sich in 90-95 % der Fälle um eine Erkrankung vom Typ II des Diabetes mellitus (<http://www.idf.org>).

Die Konsequenzen eines klinisch manifesten Diabetes mellitus sind oft schwerwiegend und betreffen zahlreiche Organsysteme. Den Großteil der Folgeerkrankungen stellen dabei kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Diabetes-Patienten haben ein vier- bis siebenmal so hohes Risiko an einem Herzinfarkt zu sterben wie Nicht-Diabetiker (Lundberg/Stegmayer, 1997). Des Weiteren ist das Risiko eines Schlaganfalls bei Diabetes-Patienten um das vier- bis fünffache erhöht (Stegmayr/Asplund, 1995). 50-60% der Todesfälle nach Diabetes mellitus Erkrankungen sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen (Panzram, 1987). Meist liegen dem Verschluss arterieller Gefäße arteriosklerotische Veränderungen zu Grunde. Aufgrund des erhöhten Blutzuckerspiegels entwickeln Diabetes-Patienten häufig derartige Läsionen der Gefäßwand. In den letzten Jahrzehnten sind zahlreiche Therapiemethoden zur Behandlung von Typ II Diabetes entwickelt worden. Hierbei spielen die oralen Antidiabetika, wie das in dieser Arbeit untersuchte Pioglitazon, eine zunehmende Rolle. Pioglitazon übt als Agonist am Peroxisome Proliferator-activated Rezeptor- γ anti-arteriosklerotische Effekte aus. Daher erschien es naheliegend, dass Pioglitazon zusätzliche positive Wirkungen in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II entfaltet.

2005 wurden die ersten Ergebnisse der PROactive Studie (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events), einer umfangreichen klinischen Studie mit Pioglitazon, veröffentlicht (Dormady et al., 2005). Ziel der Studie sollte es sein, einen positiven Einfluss von Pioglitazon auf die Häufigkeit und Schwere kardiovaskulärer Erkrankungen bei Diabetikern nachzuweisen (Charbonnel et al., 2004). Jedoch blieb die enorme Verbesserung aus, die man sich von Pioglitazon im Hinblick auf die Erkrankung versprochen hatte, ohne dass eine Erklärung hierfür gefunden werden konnte.

Arteriogenese, das Wachstum von Kollateralgefäßen, stellt einen wirksamen Mechanismus dar, um im Falle eines Gefäßverschlusses im Bereich einer Arterie durch Umleitung des Blutflusses die Versorgung des nachgeschalteten Gebietes sicherzustellen. Daher spielt die Arteriogenese besonders bei Patienten mit erhöhtem Risiko von Schlaganfall, Herzinfarkt oder anderen kardiovaskulären Erkrankungen eine entscheidende Rolle (Schaper/Buschmann, 1999).

Da Arteriogenese und Atherogenese, die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen, in ihrem Ablauf grundlegende Gemeinsamkeiten haben, liegt der Schluss nahe, dass bei Inhibierung atherosklerotischer Prozesse auch die Arteriogenese gehemmt wird. Eine solche Hemmung der Ausbildung von Kollateralgefäßen könnte erklären, warum der Einsatz von Pioglitazon in der Diabetes-mellitus-Therapie keinen zusätzlichen Erfolg erbrachte.

Ziel der angestrebten Dissertation ist es daher, den hemmenden Einfluss von Pioglitazon auf die Arteriogenese nachzuweisen.

2. Einleitung

2. 1. Arteriogenese

2. 1. 1. Mechanismen und Ablauf der Arteriogenese

Als Arteriogenese bezeichnet man das Wachstum kleiner Kollateralgefäße zu großen Konduktanzarterien. Kommt es beispielsweise im Falle einer fortgeschrittenen Atherosklerose zum Verschluss einer Arterie, so kann der Blutfluss über bereits vorhandene Kollateralgefäße umgeleitet werden. Auf diese Weise ist die Versorgung des peripher gelegenen Gewebes mit sauer- und nährstoffreichem Blut gewährleistet.

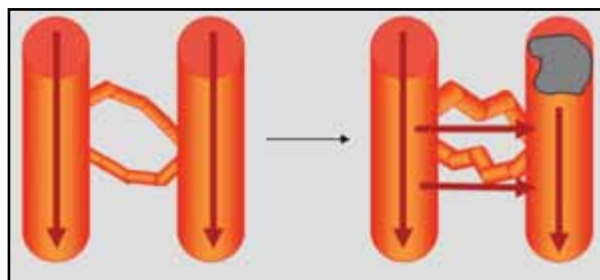


Abb. 1 Prozess der Arteriogenese: Physiologischerweise werden die Kollateralen, die zwei oder mehrere arterielle Gefäße verbinden, nicht beansprucht. Nach dem Verschluss einer Hauptarterie strömt aufgrund eines Druckgradienten Blut durch die Gefäße, die sich durch Umbau in ihrem Durchmesser erweitern (Heil et al., 2006).

Um eine solche Versorgung übernehmen zu können, ist jedoch eine Erweiterung der Kollateralen nötig. Dieses erfolgt durch eine Reihe von Umbauprozessen, an deren Ende ein voll funktionsfähiges Gefäß mit dem klassischen Wandaufbau aus Tunica intima (Endothel, Stratum subendotheliale, Membrana elastica interna), Tunica media (glatte Gefäßmuskulatur) und Tunica externa s. adventitia (Membrana elastica externa, Bindegewebe) steht (Leonhardt, 1971). Auslöser für den Beginn von arteriogenetischen Prozessen ist die erhöhte Schubspannung (engl. shear stress), die auf das Gefäßendothel wirkt (Schaper/Scholz, 2003; Eitenmüller et al., 2006). Diese wird durch den erhöhten Blutfluss in den anliegenden präexistenten Kollateralen des stenosierten oder okkludierten Hauptgefäßes erzeugt. Die Schubspannung berechnet sich nach der Formel

$$F = K * V/r^2,$$

wobei F die Schubspannung, V die Blutflussgeschwindigkeit, r den Radius und K die Konstante angibt. Aus der Formel wird deutlich, dass bei gleichbleibender Geschwindigkeit aber kleinerem Radius die Schubspannung erhöht ist (Schaper, 2004; Heil et al., 2004).

Die Erhöhung der Schubspannung resultiert in einer veränderten Genexpression in den Endothelzellen. Zunächst kommt es über Volumen-regulierte Anionen-Kanäle (volume-regulated anion channels, VRACs) zur Einstrom von Anionen in die Endothelzellen. Durch die so geänderten osmotischen Verhältnisse nimmt die Endothelzelle Flüssigkeit auf und schwillt an. Dies führt zur Aktivierung von shear stress responsive elements (SSRE), die sich in der Promotorregion verschiedener Gene befinden. Es werden vermehrt Adhäsionsmoleküle wie intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oder vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) auf der Zelloberfläche exprimiert (Nagel et al., 1994, Buschmann et al. 2003). Diese Adhäsionsmoleküle spielen eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von monozytären Zellen aus dem Blutstrom (Heil et al., 2004).

Eine weitere wichtige Rolle spielt das monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), das ebenfalls bei der Attraktion der Monozyten beteiligt ist. Die Bildung von MCP-1 wird über die Erhöhung der Schubspannung gesteigert (Shyy et al., 1994). Nach Chemoattraktion, Abrollen und anschließender Adhäsion am Endothel wandern die Monozyten durch das Endothel in die Gefäßwand ein und sezernieren eine Reihe von Cytokinen (MCP-1, Interleukine, tumor necrosis factor (TNF) α), so dass weitere Entzündungszellen rekrutiert werden. So entstehen in der ersten Phase der Arteriogenese entzündliche Reaktionen in der Gefäßwand, die für den Umbau unerlässlich sind (Buschmann et al. 2003, Schaper/Scholz 2003).

Besonders bedeutsam für den zweiten Schritt der Arteriogenese sind die von den Monozyten gebildeten Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (Hillmeister et al., 2008). Diese führen zu einer Auflösung des perivaskulären Gewebes. Glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs), die durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden, proliferieren und können sich durch das aufgelockerte Gewebe fortbewegen. Es kommt zu einer neuen Anordnung der Muskelzellen, die wieder eine longitudinale und eine zirkuläre Gefäßmuskelchicht ausbilden. Des Weiteren bilden die Muskelzellen Kollagen und Elastin, wodurch eine neue Membrana elastica externa entsteht (van Royen et al., 2001).

Nach einigen Wochen sind die Umbaumaßnahmen am Gefäß abgeschlossen, das sich nun in seinem Aufbau kaum noch von anderen Arterien unterscheidet (Schaper, 2004).

Ein Nachteil der Arteriogenese ist, dass sie unter natürlichen Bedingungen relativ langsam voranschreitet, so dass bei einem akuten Gefäßverschluss die Blutversorgung des angrenzenden Gebietes nicht sofort sichergestellt werden kann. Schreitet der Gefäßverschluss jedoch langsam fort, kann davon ausgegangen werden, dass der Blutfluss bereits nach und nach über das sich erweiternde Kollateralgefäß umgeleitet wird. Daher kann bei endgültigem Verschluss der Arterie eine ausreichende Blutversorgung des Gewebes sichergestellt werden (Abrams, 1983). Da atherosklerotische Prozesse, wie sie für Diabetes mellitus-Patienten typisch sind, oft recht langsam voranschreiten, ist es durchaus möglich, dass hier die Blutversorgung über die Kollateralen eine entscheidende Rolle spielt.

2. 1. 2. Arteriogenese und Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man das Aussprossen von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen. Es handelt sich also nicht um einen Umbau von bereits vorhandenen Gefäßen, sondern um eine komplette Neubildung von kleinen, kapillären Gefäßen. Diese Kapillaren unterscheiden sich grundlegend von den bei der Arteriogenese wachsenden Kollateralen. Sie weisen einen wesentlich geringeren Durchmesser auf und besitzen keine Gefäßmuskelschicht (Buschmann et al., 2002; Heil et al., 2006).

Auch die Mechanismen, die den beiden Prozessen zugrunde liegen, sind unterschiedlicher Natur. Wie bereits erwähnt, ist bei der Arteriogenese die erhöhte Schubspannung der entscheidende Auslöser. Angiogenese wird dagegen durch eine sinkende Sauerstoffspannung im Gewebe ausgelöst. Eine solche Hypoxie ist in Gebieten, in denen arteriogenetische Prozesse ablaufen, nicht vorhanden (Heil et al., 2006). Zudem spielen bei Arterio- und Angiogenese unterschiedliche Faktoren eine Rolle. So ist der vascular endothelial growth factor (VEGF) entscheidend für den Ablauf der Angiogenese, hat aber wiederum nur geringen Einfluss auf die Arteriogenese (Buschmann et al., 2003; Schaper/Scholz, 2003; Scholz et al., 2001; Zhang et al., 2000).

Während Arteriogenese proximal eines Gefäßverschlusses induziert wird, entsteht Angiogenese mehr distal des Verschlusses mit dem Ziel das Blut besser im hypoxischen Gewebe zu verteilen und somit die Sauerstoffversorgung zu verbessern. Es ist jedoch offensichtlich, dass hierfür die Bereitstellung von sauerstoffreichem Blut unabdingbar ist. Diese wiederum erfolgt durch den „biologischen Bypass“, das Kollateralgefäß (Abrams, 1983).

Somit handelt es sich bei Angio- und Arteriogenese zwar um grundlegend verschiedene Prozesse, allerdings sind diese jedoch untrennbar miteinander verbunden: Durch Arteriogenese wird das Blut bereitgestellt, das dann mittels ausgesprossener Kapillaren im Gewebe verteilt wird.

2. 1. 3. Arteriogenese und Atherogenese

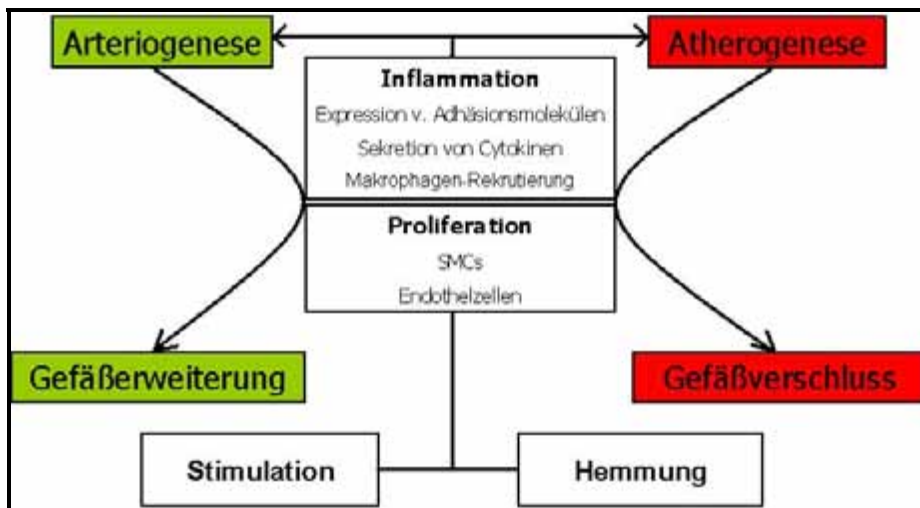


Abb. 2 Zusammenfassende Darstellung des „Janus-Phänomens“: *Arteriogenese und Atherogenese sind sich in ihrem Ablauf ähnlich, führen aber zu einem entgegengesetzten Endergebnis*

Arteriogenese und Atherogenese, die Entstehung atherosklerotischer Prozesse, haben einige Gemeinsamkeiten, obwohl sie zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen führen. Am Ende der Atherogenese steht der Gefäßverschluss, wohingegen Arteriogenese zur Erweiterung von Gefäßen führt (Schaper/Buschmann, 1999). Dennoch bedienen sich beide Prozesse derselben zentralen Elemente – der Inflammation und der Proliferation, wie in Abb. 2 zusammengefasst. Die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1, die Einwanderung monozytärer Zellen aus dem Blutstrom und die Sekretion von Zytokinen fördern ebenso die Atherogenese wie die Arteriogenese (Epstein et al., 2004, Schaper/Scholz 2003).

Ein Beispiel für diesen Zusammenhang ist MCP-1, das für die Attraktion von Monozyten von zentraler Bedeutung ist. Es ist seit langem bekannt, dass MCP-1 der Entstehung atherosklerotischer Plaques Vorschub leistet (van Royen et al., 2003). Die Sekretion von MCP-1 ist aber ebenso für die Arteriogenese ein äußerst wichtiger Faktor. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch MCP-1 Kollateralwachstum stimuliert werden kann (van Royen et al., 2002).

Desweiteren kommt es sowohl beim Kollateralwachstum als auch bei atherosklerotischen Veränderungen zur Proliferation von Endothel- und besonders glatten Gefäßmuskelzellen. Während diese Proliferation bei der Atherosklerose unkontrolliert im Gefäßverschluss mündet, ist sie bei der Arteriogenese wichtiger Bestandteil der kontrollierten Gefäßerweiterung.

Dieses Verhältnis zweier Prozesse, die in ihrer Erscheinung zunächst ungleich sind, dennoch aber gemeinsame Ursachen haben, wird in der Literatur in Anlehnung an Janus, einen zweigesichtigen Gott aus der römischen Mythologie, auch als „Janus Phänomen“ bezeichnet (van Royen et al., 2001).

Aufgrund dieser Feststellungen wurde bei der Entwicklung von Arteriogenese fördernden Stoffen frühzeitig darauf hingewiesen, dass bei diesen stets ein atherogenes Potential zu berücksichtigen ist (Schaper/Buschmann, 1999). Umgekehrt wird bei der Behandlung von atherosklerotischen Prozessen selten die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die eingesetzten Medikamente ebenso potentielle Hemmer der Arteriogenese darstellen. Offenbar wird hier die Bedeutung des Kollateralwachstums zur Verhinderung der schwerwiegenden Folgen von Gefäßverschlüssen immer noch unterschätzt.

2. 1. 4. Zerebrale Blutversorgung

Das Gehirn wird über vier Arterien mit Blut versorgt: Arteriae carotides internae dextra und sinistra und die beiden Arteriae vertebrales (Delank/Gehlen, 2006; Poeck/Hacke, 2006).

Diese vier Gefäße sind an der Hirnbasis über den Circulus arteriosus cerebri, der auch nach seinem Entdecker Thomas Willis als Circulus Willisii bezeichnet wird, verbunden. Dieser Gefäßring setzt sich zusammen aus den Arteriae carotides internae (ICA), den Arteriae cerebi mediae (MCA), die Arteriae cerebri anteriores (ACA), den Arteriae communicantes posteriores (PComA) und den Arteriae cerebri posteriores (PCA) (Poeck/Hacke, 2006).

Durch diese Verbindung kann der Blutfluss im Gehirn auch beim Verschluss eines der zuführenden Hauptgefäße erhalten bleiben. Die Arterien des Circulus Willisii funktionieren dabei als Kollateralgefäße (Schaper, 2004).

Aus diesen großen Arterien zweigen sowohl perforierende Arterien ab, die in das Gehirn eindringen, als auch Zirkumferenzarterien, die auf der Hirnoberfläche leptomeningeale Anastomosen, die sogenannten Heubnerschen Anastomosen bilden. Die Heubnerschen Anastomosen bilden also neben dem Circulus Willisii ein weiteres kollaterales Netzwerk (Delank/Gehlen, 2006, Scharper, 2004).

Bezüglich der Nomenklatur der Gefäße sei darauf hingewiesen, dass die Bezeichnungen „anterior“ und „posterior“ aus der Humanmedizin stammen. Bei der Benennung der Gefäße der Ratte müssten die entsprechenden veterinärmedizinischen Termini „rostralis“ und „caudalis“ Anwendung finden. Da aber in der Fachliteratur zum Thema Arteriogenese im Gehirn der Ratte ausschließlich die humanmedizinischen Begriffe verwendet werden, sollen diese im Folgenden auch in Bezug auf die Arterien im Gehirn der Ratte genannt werden, um Missverständnisse zu vermeiden.

2. 1. 5. Zerebrale Arteriogenese

In vorhergehenden Studien bei denen das Three-Vessel-Occlusion-Modell in der Ratte (3-VO, siehe 2. 1. 5.) angewandt wurde, konnte gezeigt werden, dass es durch Verschluss der beiden Aa. vertebrales und der linken A. carotis communis zu einer Umleitung des Blutflusses über den Circulus Willisii und dabei besonders über die ipsilaterale (also auf der Seite der verschlossenen A. carotis communis gelegene) A. cerebri posterior kommt (Busch et al., 2003).

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die A. cerebri posterior bereits eine Woche nach erfolgter 3-VO-Operation einen um 39%, nach 3 Wochen sogar um 72%, gesteigerten Durchmesser aufweist.

Doch auch die anderen, an der Bildung des Circulus Willisii beteiligten, Gefäße weisen einige Zeit nach der Operation einen erhöhten Durchmesser auf. So erweitert sich die A. cerebri anterior innerhalb von 3 Wochen um 28% (Busch et al., 2003).

Somit konnte nachgewiesen werden, dass arteriogenetische Prozesse im Gehirn möglich sind. Das Wachstum von Kollateralen konnte inzwischen auch in ähnlicher Form im Gehirn des Menschen nachgewiesen werden (Reiche et al., 1997).

2. 1. 6. Tiermodell: Three-Vessel-Occlusion (3-VO)

Beim Modell der Three-Vessel-Occlusion (3-VO) werden drei von vier Arterien, die das Gehirn mit Blut versorgen, verschlossen. Bei diesen Gefäßen handelt es sich um die beiden Aa. vertebrales und die linke A. carotis communis.

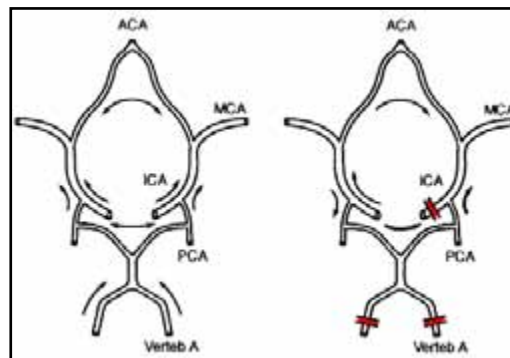


Abb. 3 Circulus Willisii der Ratte: Links vor 3-VO-Operation, rechts danach; die Pfeile verdeutlichen die geänderten Blutflussverhältnisse, modifiziert nach Busch (Busch et al., 2003); ACA: A. cerebri anterior, ICA: A. carotidea interna, MCA: A. cerebri medialis, PCA: A. cerebri posterior, Verteb A: A. vertebralis

Auf diese Weise wird eine Hypoperfusion des Gehirns erzeugt. Entscheidend ist, dass durch diese Hypoperfusion jedoch keine histologischen Schäden oder neurologischen Ausfälle zu beobachten sind (Schneeloch et al., 2004). Die Hypoperfusion ist aber trotzdem ein ausreichender Anreiz, um arteriogene Prozesse in Gang zu setzen. Der ipsilaterale Blutfluss sinkt nach Verschluss der Arteriae vertebrales und der Arteria carotis communis um etwa 50% ab. Die Versorgung des Gehirns muss nun über eine Arteria carotis communis und den Circulus Willisii aufrechterhalten werden. Im Zuge dessen erweitert sich der Durchmesser der Gefäße, die den Circulus arteriosus bilden.

Zudem sind im perivaskulären Gewebe histologisch Monozyteninfiltrationen als Anzeichen von Umbaumaßnahmen nachweisbar (Busch et al., 2003).

Besonders deutlich wird der Effekt der zerebralen Arteriogenese bei Betrachtung der zerebrovaskulären Reservekapazität (siehe 3.3.4.): Kurz nach erfolgter Operation ist die zerebrovaskuläre Reserve bei Erhöhung des arteriellen CO₂-Partialdruckes (pCO₂) deutlich herabgesetzt, bzw. eine Erweiterung der Gefäße nicht möglich. Jedoch bereits eine Woche nach der 3-VO-Operation steigt der Blutfluss im Gehirn nach Erhöhung des pCO₂ bereits deutlich an (Busch et al., 2003).

Mit dem 3-VO-Modell steht somit ein geeignetes Tiermodell zur Verfügung, um Arteriogenese zu provozieren und den Einfluss von Substanzen auf die Arteriogenese zu untersuchen.

2. 2. Diabetes mellitus Typ II

2. 2. 1. Epidemiologie

Beim Typ II des Diabetes mellitus handelt es sich um eine weltweit verbreitete Stoffwechselerkrankung. Derzeit wird die Anzahl der Menschen mit Typ II Diabetes auf etwa 246 Millionen geschätzt. Dabei ist von einer hohen Dunkelziffer auszugehen, zumal viele Erkrankungen nicht oder erst in einem sehr späten Stadium diagnostiziert werden. Betroffen sind sowohl Industrienationen, wie die USA mit etwa 20 Millionen Diabetikern, als auch Länder mit wachsendem wirtschaftlichem Wohlstand wie Indien mit geschätzten 40 Millionen erkrankten Menschen. In Deutschland wird die Anzahl der Patienten, die unter Diabetes mellitus Typ II leiden auf über sieben Millionen geschätzt. Das heißt, dass etwa jeder zwölfte Deutsche erkrankt ist. Es wird angenommen, dass sich die Zahl der Erkrankten weltweit bis 2025 auf 380 Millionen erhöht (<http://www.idf.org>).

2. 2. 2. Pathogenese des Diabetes mellitus Typ II

Der Name *Diabetes mellitus* leitet sich vom dem oft beobachteten Symptom der vermehrten Harnbildung ab, wobei der Harn einen süßlichen Geschmack aufweist (diabeinein (griech.) = durchfließen, mellitus (lat.) = honigsüß) (Mehnert/Förster, 1997). In der englischsprachigen Literatur wird der Typ II des Diabetes mellitus in Bezug auf die Insulinunabhängigkeit als „Non-insulin dependent diabetes mellitus“ (NIDDM) bezeichnet, wobei wiederum zwischen Typ 1 (ohne Übergewicht) und Typ 2 (mit Übergewicht) unterschieden wird (Scriver, 1989).

Diabetes mellitus Typ II ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung. Die genetische Komponente ist nachgewiesen worden. Einen größeren Einfluss auf die Krankheit hat jedoch der Lebensstil. Seit Jahren ist bekannt, dass mangelnde Bewegung und kalorienreiche Ernährung die Entstehung der Erkrankung fördern. (LaMonte et al., 1999; Wylie-Rosett et al., 2006).

Im Gegensatz zum Typ I Diabetes, bei dem ein Insulin-Mangel herrscht, steht beim Typ II die Insulin-Resistenz der Glukose verarbeitenden Zellen (Skelettmuskelzellen, Leberzellen) im Vordergrund. Im Verlauf der Erforschung des Typ II Diabetes wurden verschiedene Modelle der Pathogenese der Erkrankung entwickelt. Inzwischen wird jedoch von einem Verlauf ausgegangen, wie er in Abbildung 4 skizziert ist und im Folgenden beschrieben wird.

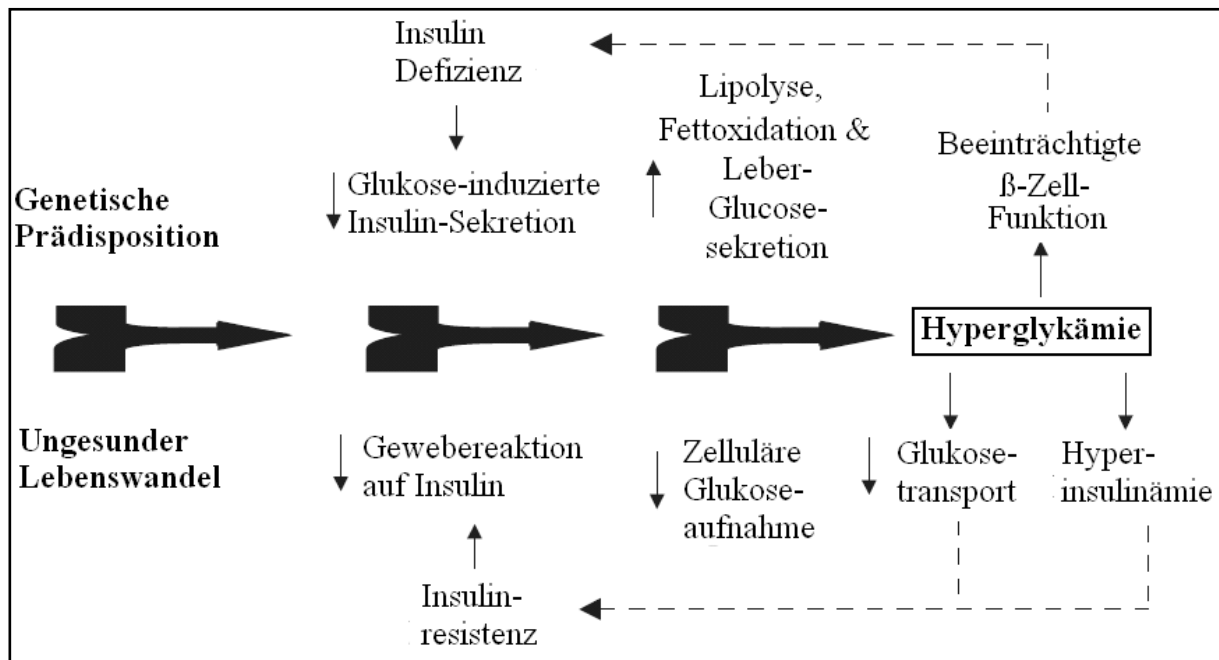


Abb. 4 Darstellung der Pathogenese des Typ II Diabetes mellitus nach LaMonte (LaMonte et al., 2005)

Die Krankheit beginnt zunächst mit einer verminderten Reaktion verschiedener Zellen auf das in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse produzierte Hormon Insulin, das die Aufnahme von Glukose in die Zelle vermittelt. Da die Glukose nun nicht mehr aufgenommen werden kann, erhöht sich die Konzentration im Blut. Dies wiederum führt dazu, dass aus den β -Zellen vermehrt Insulin ausgeschüttet wird.

So kann die Resistenz der Zellen gegen Insulin zu Beginn der Erkrankung durch einen erhöhten Insulin-Spiegel im Blut überwunden werden. Der Blutzuckerspiegel liegt dadurch oft noch im Normalbereich (Waldhäusl/Scherbaum, 2004).

Die Reaktion des Körpers auf eine erhöhte Glukosezufuhr ist jedoch bereits herabgesetzt. Wird Glukoselösung verabreicht, steigt der Blutzuckerspiegel stark an. Diese Tatsache macht man sich diagnostisch zu Nutze, um die Erkrankung bereits in einem frühen Stadium feststellen und somit den weiteren Verlauf verlangsamen zu können (Waldhäusl/Scherbaum, 2004). Durch den zunehmend erhöhten Blutglukosespiegel entsteht oxidativer Stress, der sich auf die β -Zellen im Pankreas auswirkt, die dann zunehmend absterben. Damit ist die Insulinproduktion eingeschränkt.

Da nun die zunehmende Insulinresistenz der Zellen nicht mehr durch gesteigerte Sekretion des Hormons überwunden werden kann, kommt es zu einem fortschreitenden Anstieg von Glukose im Blut. Mit steigendem Blutglukosespiegel wird die Krankheit klinisch manifest. Die Patienten zeigen typische Symptome wie Polyurie, Polydipsie, Schwäche und Abgeschlagenheit. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt meist die Diagnose der Erkrankung (Phillips, 2005; Scheen, 2005).

Prinzipiell ist die Resistenz der Körperzellen gegen Insulin ein Mechanismus, der bei allen Menschen im Alter beobachtet werden kann (Scheen, 2005). Durch ungenügende Bewegung bei gleichzeitig kalorienreicher Ernährung wird dieser Vorgang jedoch derart beschleunigt, dass das Gleichgewicht aus zunehmender Insulinsekretion und zunehmender Insulinresistenz bereits frühzeitig außer Kontrolle gerät. Daher erkranken besonders in den letzten Jahren auch häufig jüngere Menschen, teilweise sogar Kinder an Typ II Diabetes.

2. 2. 3. Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen

Als Bestandteil des klinischen Bildes des metabolischen Syndroms trägt eine Typ II Diabetes mellitus Erkrankungen drastisch zu einer Erhöhung des Risikos von kardiovaskulären Erkrankungen bei (WHO, 1985).

Beim metabolischen Syndrom handelt es sich um einen Komplex aus verschiedenen Einzelsymptomen. Laut der International Diabetes Federation (IDF) liegt ein metabolisches Syndrom bei einem Bauchumfang von mehr als 94cm bei Männern bzw. 80cm bei Frauen und mindestens zwei der folgenden Symptome vor: erhöhte Tryglyzeridwerte (mind. 150mg/dl bzw. 1,7mmol/l), niedriger HDL (high density lipoprotein)-Cholesterinspiegel (Männer: unter 40mg/dl bzw. 1,03mmol/l, Frauen: unter 50mg/dl bzw. 1,29mmol/l), Hypertonie (systolisch über 130mmHg, diastolisch mehr als 85mmHg), erhöhte Nüchtern-Blutglukosespiegel (über 100mg/dl bzw 5,6 mmol/l) (http://www.idf.org/metabolic_syndrome).

Zusätzlich können weitere Komponenten wie gestörte Fibrinolyse, Mikroalbuminurie, Hyperurikämie und bei Frauen auch Hyperandrogenämie vorkommen (Waldhäusl/Scherbaum, 2004).

Eine Schlüsselrolle beim metabolischen Syndrom nimmt die Adipositas ein. Die mit der Erkrankung einhergehende Hypertonie stellt einen klassischen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Die Dyslipoproteinämie ist durch Hypertriglyceridämie, niedrige high density lipoprotein(HDL)-Cholesterinwerte und eine hohe Konzentration von low density lipoproteins (LDL) gekennzeichnet. Diese Verschiebung des Lipidprofils stellt einen weiteren Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar (Waldhäusl/Scherbaum, 2004).

Des Weiteren fördert die Erhöhung des Blutglukosespiegels beim Diabetes mellitus ein proatherogenes Milieu, das Gefäßerkrankungen Vorschub leistet, da durch die Hyperglykämie vermehrt Glykolyseendprodukte (advanced glycation end products, AGE) entstehen, die NO verbrauchen und dadurch endotheliale Dysfunktionen nach sich ziehen (Hartge et al., 2007).

Aufgrund dieser Tatsachen überrascht es wenig, dass in verschiedenen Untersuchungen ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen bei Diabetikern festgestellt werden konnte (Panzram, 1987). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Diabetiker ein vier- bis siebenfach erhöhtes Risiko haben, an einem Herzinfarkt zu sterben (Lundberg/Stegmayer, 1997) bzw. ein vier- bis fünffach erhöhtes Risiko haben, einen Schlaganfall zu erleiden als Nicht-Diabetiker (Stegmayer/Asplund, 1995). 50-60% der Todesfälle nach Diabetes mellitus Erkrankungen sind auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen (Panzram, 1987).

Im Zusammenhang mit dem Wachstum von Kollateralgefäßen wird vermutet, dass sich ein erhöhter Blutglukosespiegel negativ auf das arteriogene Potential auswirkt (Schaper/Buschmann, 1999; Abaci et al., 1999). Es ist also in jedem Fall notwendig, die Hyperglykämie therapeutisch unter Kontrolle zu bringen.

2. 2. 4. Therapiekonzepte zum Diabetes mellitus Typ II

Der erste Schritt der Therapie einer Typ II Diabetes Erkrankung ist immer eine Umstellung des Lebenswandels. Ausreichende Bewegung und kalorienreduzierte, ballaststoffreiche Diät sind bei einem Großteil der Patienten im Anfangsstadium ausreichend, um die Krankheit unter Kontrolle zu bringen (WHO, 1985; Wylie-Rosett et al., 2006). Allerdings fällt es auch einem Großteil der Patienten schwer, alte Gewohnheiten aufzugeben und sich an eine Diät und ein Sportprogramm zu halten. Daher wird oft auf medikamentelle Therapie zurückgegriffen, obwohl dies nicht zwingend erforderlich ist (Philipps, 2005).

Jedoch muss auch berücksichtigt werden, dass es sich beim Typ II Diabetes mellitus um eine progressive Krankheit handelt. Oftmals reicht selbst eine konsequente Umstellung des Lebensstils auf Dauer nicht aus, um den Blutglukosespiegel im Normalbereich zu halten. Der nächste Schritt ist dann meist der Einsatz oraler Antidiabetika.

Entsprechend ihrer Wirkungsmechanismen lassen sich verschiedene Klassen unterscheiden:

1. Stoffe, die die Aufnahme von Glukose aus dem Darm hemmen: alpha-Glucosidase-Hemmer, wie Acarbose
2. Stoffe, die die Freisetzung von Insulin aus der Bauchspeicheldrüse erhöhen: Sulfonylharnstoffe, wie Glibenclamid und Meglitinide, wie Nateglinid
3. Stoffe, die die Sensibilität der Zellen für Insulin erhöhen, sogenannte „Insulin-Sensitizer“: Biguanide, wie Metformin und Glitazone, wie das in dieser Arbeit untersuchte Pioglitazon (Macfarlane et al., 2007).

Reichen die oralen Antidiabetika nicht aus, um die Krankheit unter Kontrolle zu bringen, werden Insulin-Injektionen verabreicht. Diese können zusätzlich zu bestimmten oralen Antidiabetika oder als Monotherapie angewendet werden (Philipps, 2005).

2. 3. Pioglitazon

2. 3. 1. Pharmakologische Eigenschaften

Pioglitazon gehört zur Stoffklasse der Thiazolidinedione, die häufig auch als Glitazone bezeichnet werden. Allen Glitazonen ist die Thiazolidine-2-4-dion Struktur gemeinsam. Sie unterscheiden sich lediglich durch ihre Seitenketten.

Pioglitazon wird nach oraler Einnahme schnell im Darm resorbiert und erreicht bereits nach zwei Stunden Spitzenkonzentrationen im Plasma, wobei gleichzeitige Nahrungsaufnahme die Anreicherung im Plasma verzögert, aber die Aufnahme an sich nicht behindert. Steady-State-Konzentrationen werden innerhalb von vier bis sieben Tagen erreicht. Im Plasma liegt Pioglitazon bis zu 99% an Plasmaproteine gebunden vor. Die Plasmahalbwertszeit beträgt drei bis sieben Stunden für Pioglitazon selbst und 16-24 Stunden für seine Metaboliten.

Pioglitazon wird in der Leber über Cytochrom P450 metabolisiert. Die beteiligten Isoformen des Enzyms, CYP2C8 und CYP3A4, sind auch bei der Metabolisierung zahlreicher anderer Wirkstoffe beteiligt, so dass eine Beeinflussung des Abbaus anderer Stoffe durch Pioglitazon nicht ausgeschlossen werden kann. Es sind sechs Pioglitazon-Metabolite identifiziert worden, von denen drei (M-II, M-III und M-IV) pharmakologisch aktiv sind. Pioglitazon wird über die Fäzes und zu einem etwas geringeren Anteil mit dem Harn ausgeschieden (<http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Actos/H-285-PI-de.pdf>).

Seine pharmakodynamischen Eigenschaften entfaltet Pioglitazon überwiegend über Aktivierung des Peroxisome Proliferator-activated Rezeptor- γ (PPAR- γ) (Lehmann et al., 1995). Die vielfältigen Wirkungen von PPAR- γ werden unter 2. 4. erläutert. Zudem ist Pioglitazon auch ein schwacher Agonist am PPAR- α (Orasanu et al., 2008; Sakamoto et al., 2000).

Es sind zahlreiche Nebenwirkungen durch die Pioglitazon-Behandlung bekannt. Gewichtszunahme und Ödembildung sind offenbar eine klassentypische Nebenwirkung aller Thiazolidinedione (Macfarlane et al., 2007). Auch konnte unter Pioglitazongabe ein leichter Abfall von Hämatokrit und Hämoglobinkonzentration im Blut ermittelt werden, dieser ist jedoch nicht, wie oft diskutiert, durch Hämodilution bedingt (Berria et al., 2007).

Gewichtszunahme und Ödembildung werden häufig auf Glitazon-bedingte Flüssigkeitsretention zurückgeführt (Kyriluk/Isom, 2007; Touyz/Schiffrin, 2006). Allerdings konnte dies bisher nicht mit Sicherheit bestätigt werden und auch die Mechanismen der Glitazon-bedingten Flüssigkeitsretention sind noch nicht vollständig aufgeklärt (Hollenberg, 2003; Tang/Maroo, 2007; Yang/Soodvilai, 2008). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass zumindest die gesteigerte Neigung zur Ödembildung auf eine erhöhte Produktion des vascular endothelial growth factors (VEGF) zurückzuführen ist (Vijay et al., 2008).

Ob es sich bei den unter Glitazon-Behandlung auftretenden erhöhten Raten von Herzversagen um eine klassentypische Nebenwirkung handelt, ist derzeit heftig umstritten (Berria et al., 2007; Karter et al., 2004; Karter et al. 2005; Libby/Plutzky, 2007; Nissen/Wolski, 2007; Tang/Maroo, 2007). Jedoch liegen ausreichende Hinweise für diesen Sachverhalt vor, so dass die Food and Drug Administration (FDA) der USA im August 2007 eine Warnung herausgegeben hat, die besagt, dass Pioglitazon Herzversagen verursachen oder begünstigen kann.

Die Anwendung von Pioglitazon ist kontraindiziert bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion und mit Herzinsuffizienz (New York Heart Association Class I bis IV) (<http://www.fda.gov/cder/drug/InfoSheets/HCP/pioglitazoneHCP.htm>).

Kürzlich wurden Daten veröffentlicht, die eine erhöhte Frakturneigung bei mit Pioglitazon behandelten Frauen belegen, was bereits von der Herstellerfirma Takeda (Osaka, Japan) bestätigt wurde (<http://www.fda.gov/medwatch/safety/2007/Actosmar0807.pdf>).

Ob Pioglitazon genotoxisch wirkt, ist bislang nicht ausreichend untersucht worden. Es gibt Studien, die DNA-Schäden durch oxidativen Stress im Zusammenhang mit Pioglitazon-Behandlung belegen (Bedir et al., 2008). Die klinische Relevanz dieser Befunde ist bislang aber noch nicht weitergehend untersucht worden.

2. 3. 2. Einsatz in der Diabetes-Therapie

Pioglitazon ist seit 1999 als Monopräparat unter dem Handelsnamen Actos® von der Firma Takeda Pharmaceuticals (Osaka, Japan) erhältlich. Es werden drei Dosierungen (15, 30 und 45 mg angeboten) in Tablettenform angeboten.

Neben der Monotherapie kann Pioglitazon als Kombinationstherapie mit anderen oralen Antidiabetika wie Sulfonylharnstoffen oder Metformin angewandt werden. Auch für eine kombinierte Therapie aus Insulin und Pioglitazon ist das Medikament inzwischen zugelassen. Die Erhöhung der Dosis erfolgt schrittweise, je nach Bedarf. Bei den meisten Patienten ist aber eine Dosierung von 45 mg pro Tag notwendig (<http://www.fda.gov/cder/foi/label/1999/21073lbl.pdf>).

2. 3. 3. PROactive-Studie

Aufgrund der positiven Wirkungen von Pioglitazon auf Blutglukosespiegel, Blutdruck und Lipid-Profil (Haberbosch, 2007) und der anti-inflammatorischen Wirkung am Gefäß (Balakumar, 2007 et al.; Satoh et al., 2003) ging man davon aus, dass das Medikament auch einen positiven Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen haben müsste (Haberbosch, 2007).

Um einen solchen positiven Einfluss von Pioglitazon nachzuweisen, wurde 2002 eine umfangreiche prospektive Studie zur Auswirkung der Pioglitazon-Behandlung auf makrovaskuläre Erkrankungen begonnen (PROactive: PROspective pioglitAzone Clinical Trial IN macroVascular Events) (Charbonnel et al., 2004). Im Rahmen einer randomisierten, placebo-kontrollierten Doppel-Blind-Studie wurden bei 5238 Diabetes-Patienten, die bereits durch eine oder mehrere makrovaskuläre Erkrankungen vorbelastet waren, Ereignisse wie Herzinfarkt, Schlaganfall und andere Erscheinungen einer makrovaskulären Erkrankung erfasst.

Als primärer Endpunkt wurde eine Kombination der Ergebnisse bezüglich Gesamtsterblichkeit, nicht-fataler Myokardinfarkt, nicht-fataler Schlaganfall, akutes koronares Syndrom, Eingriffe am Herzen, Revaskularisierung am Bein und Amputation über dem Knöchel definiert, da diese Ereignisse typische makrovaskuläre Erkrankungen bei Diabetes mellitus Patienten darstellen, bzw. die entsprechend Eingriffe häufig als Folge der Erkrankung notwendig werden. Zwar konnte bei diesem primären Endpunkt der Studie eine geringere Anzahl an Erkrankungen bzw. Eingriffen festgestellt werden, jedoch handelte es sich dabei um eine statistisch nicht signifikante Abweichung (Dormandy et al., 2005).

Beim sekundären Endpunkt (gesamte Sterblichkeit, nicht-fataler Myokardinfarkt, nicht-fataler Schlaganfall) wurde eine signifikant geringere Anzahl an Erkrankungen festgestellt.

Betrachtet man jedoch die genaue Aufschlüsselung der einzelnen Erkrankungsanzahlen, so stellt man fest, dass bei manchen Erkrankungen keine Verbesserung (Koronare Revaskularisation), ja teilweise sogar eine Verschlechterung (Revaskularisierung am Bein) bei mit Pioglitazon behandelten Patienten im Vergleich zu denen, die ein Placebo erhielten, erfolgte (Dormandy et al., 2005; Dormandy et al., 2008; Singaram/Pratley, 2007).

Besonders die Auswirkungen der Pioglitazon-Behandlung auf Patienten, die zuvor einen Herzinfarkt oder Schlaganfall erlitten hatten, wurden eingehend untersucht. Im Hinblick auf die Teilgruppe mit vorhergehender Herzinfarkterkrankung fällt auf, dass zwar signifikant weniger Patienten einen Herzinfarkt erlitten, jedoch war die Anzahl der Patienten, die im Laufe der Studie an Herzversagen erkrankten, sowohl in der Teilgruppe mit vorhergehendem Infarkt als auch in der Gruppe ohne vorhergehenden Infarkt deutlich erhöht (Erdmann et al., 2007). Für diese Erhöhung des Risikos, bei Behandlung mit Pioglitazon an Herzversagen zu erkranken, gibt es bis heute keine gesicherte Erklärung (Erdmann et al., 2007). Vermutet wird eine Überlastung des Herzens durch Flüssigkeitsretention, eine Nebenwirkung der Stoffklasse der Glitazone (Takano/Komuro, 2009; Touyz/Schiffrin, 2006). Allerdings gibt es mittlerweile Untersuchungen, die gegen eine derartige Erklärung sprechen (Tang et al., 2003; Tang/Maroo, 2007).

Bei den Patienten, die vor Eintritt in die Studie einen Schlaganfall erlitten hatten, konnte durch Pioglitazon-Behandlung die Wahrscheinlichkeit, tendenziell (jedoch nicht signifikant) einen erneuten Schlaganfall zu erleiden, vermindert werden. Anders stellte sich die Situation jedoch bei Patienten dar, die noch keinen Schlaganfall erlitten hatten. Hier erkrankten im Laufe der Studie nahezu gleich viele der Pioglitazon-behandelten Patienten an einem Schlaganfall wie in der Placebo-Gruppe. Auch für diesen Sachverhalt konnte bisher keine schlüssige Erklärung gefunden werden (Wilcox et al., 2007).

Die Aussagekraft der Studie ist aufgrund ihres mangelhaften Designs und der nicht ausreichenden Untersuchungsdauer umstritten (Karter et al., 2004).

2. 4. Peroxisome Proliferator-activated Rezeptoren

2. 4. 1. Wirkungsmechanismen

Bei den Peroxisome Proliferator-activated Rezeptoren (PPARs) handelt es sich um nukleäre Rezeptoren. Sie sind in die Kernhülle integriert und werden bei Aktivierung in den Zellkern eingeschleust. Dort bilden sie mit einem anderen Rezeptor, dem Retinoid X Rezeptor, ein Heterodimer. Dieses Heterodimer bindet an spezielle PPAR Response Elements der DNA. Diese Elemente fungieren als Promotor für bestimmte Gene. So kann über PPAR-Aktivierung die Translation verschiedenster Gene ausgelöst werden (Ferré, 2004; Libby/Plutzky, 2007). Auf diese Weise wird z. B. die Insulin-sensibilisierende Wirkung der Glitazone vermittelt. Außerdem erhöht die PPAR-Aktivierung die Transkription von Enzymen, die am Fettstoffwechsel beteiligt sind, was sich positiv auf die Zusammensetzung des Fettes im Blut und die Verteilung von Körperfett auswirkt.

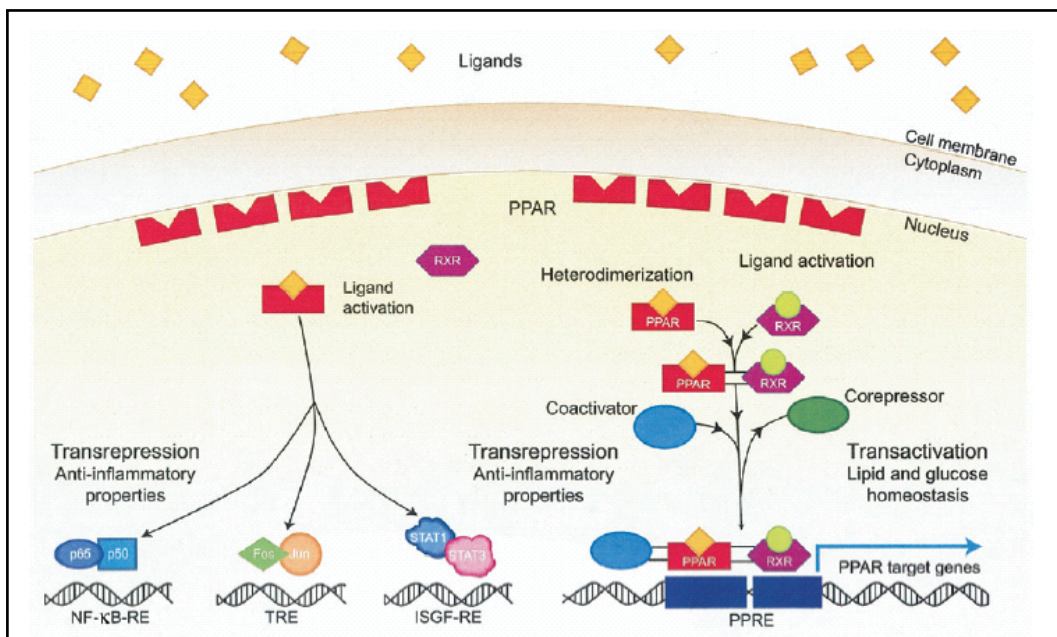


Abb. 5 Darstellung des Wirkungsmechanismus von PPARs: Nach Binden des Liganden bildet der zuvor kernmembranständige Rezeptor (PPAR) ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Dieses führt am Response Element (PPRE) zur Repression oder Aktivierung der entsprechenden Gentranslation. Zudem kann der aktivierte Rezeptor über posttranslationale Mechanismen verschiedene Systeme beeinflussen (Libby/Plutzky, 2007).

Jedoch kann die Translation durch Bindung von aktivierten PPARs auch inhibiert werden. Solche Mechanismen sind u. a. für die entzündungshemmende Wirkung von PPAR-Agonisten verantwortlich (Libby/Plutzky, 2007).

Des Weiteren sind auch DNA-unabhängige Wirkungen von PPAR bekannt. Vermutet werden posttranslationale Modifikationen. Ein Großteil der entzündungshemmenden Eigenschaften von PPARs beruht vermutlich auf solchen Wirkungsweisen (Pascual et al., 2005). Die genauen Mechanismen sind aber noch nicht bekannt.

2. 4. 2. PPAR-Typen

Man unterscheidet PPAR- α , PPAR- γ und PPAR- δ (auch als PPAR- β oder PPAR- β/δ bezeichnet). Diese Subtypen finden sich in vielen verschiedenen Zellen unterschiedlicher Organsysteme und Gewebe.

PPAR- α befinden sich in verschiedenen Zellen im braunen Fettgewebe, in der Skelettmuskulatur, im Herz, in der Leber, der Niere, in Endothelzellen, in glatten Gefäßmuskelzellen, in Monozyten und in Makrophagen. Endogen wird PPAR- α von Arachidonsäuremetaboliten, wie Prostaglandinen und Leukotrienen, aktiviert. Therapeutisch beeinflusst man PPAR- α durch die sogenannten Fibrate (Bezafibrat, Fenofibrat). Hierbei ist besonders die positive Wirkung von PPAR- α -Agonisten auf das Lipidprofil von Bedeutung. Durch Fibrate wird die HDL-Cholesterin-Konzentration im Blut gesteigert, die Triglyceridkonzentration und ebenso die LDL-Cholesterin-Konzentration gesenkt (Marx et al., 2004; Touyz/Schiffrin, 2006).

PPAR- γ befinden sich in weißem und braunem Fettgewebe, in der Muskulatur, im Kolon, in der Leber, in Gefäßendothelzellen und in den glatten Muskelzellen der Gefäße (Ferré, 2004). In geringerer Anzahl finden sich PPAR- γ auch in Monozyten und Makrophagen. Es werden zwei Subtypen PPAR- γ -1 und PPAR- γ -2 unterschieden. PPAR- γ -1 befinden sich besonders in der Skelettmuskulatur, PPAR- γ -2 dagegen in Skelettmuskulatur und Fettgewebe. Klinisch ist dieser Unterschied zurzeit jedoch nicht von Bedeutung, da Glitazone beide Subtypen gleichermaßen aktivieren (Mukherjee et al., 1997).

Natürliche Liganden von PPAR- γ sind Fettsäuren sowie Eicosanoide und ihre Metaboliten. Klinisch werden die Glitazone, zu denen Pioglitazon gehört, als PPAR- γ -Agonisten genutzt. In den Leber- und Skelettmuskelzellen führen sie über gesteigerte Gen-Expression zu einer Erhöhung der Anzahl von Glukosetransportern in der Zellmembran, die den transmembranären Fluss von Glukose vermitteln (siehe Abb. 6). So verbessern Glitazone die Insulin-Sensibilität der Zelle. Daher werden PPAR- γ -Agonisten auch als „Insulin-Sensitizer“ bezeichnet (Mudaliar/Henry, 2001).

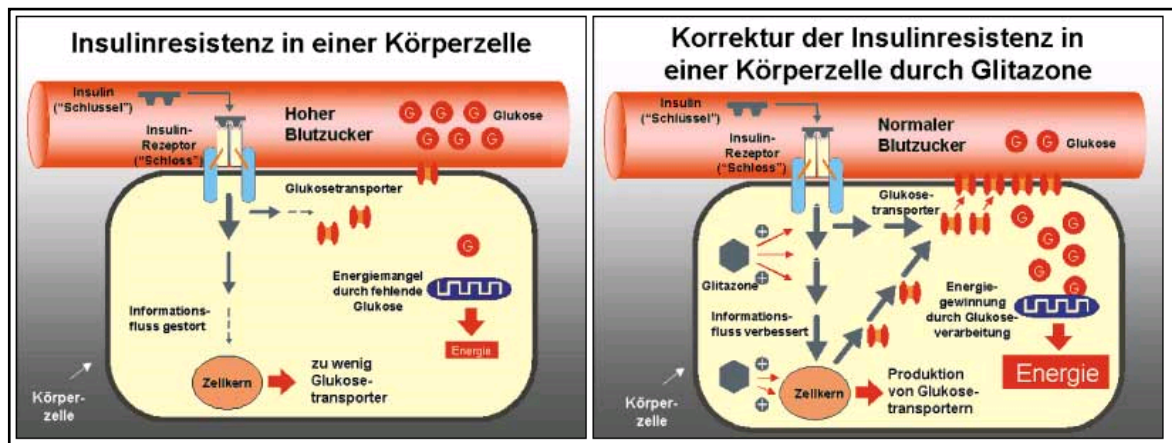


Abb. 6 Darstellung der „insulin-sensibilisierenden“ Wirkung der Glitazone (Kleinwechter et al., 2002)

Zusätzlich zu ihrer Insulin sensibilisierenden Wirkung entfalten PPAR- γ -Agonisten eine Reihe weiterer Effekte. Die Einflüsse auf das Gefäßwachstum werden unter Punkt 2. 4. 3. beschrieben.

PPAR- δ ist ubiquitär im Organismus verbreitet und wird natürlicherweise unter anderem durch Fettsäuren und Prostacyclin aktiviert. Der Wirkungsmechanismus von PPAR- δ wird zurzeit intensiv erforscht. Erste Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich mittels PPAR- δ -Agonisten Restenosen nach Stent-Implantationen vermeiden lassen (Barish et al., 2006).

2. 4. 3. Bedeutung von PPAR- γ für das Gefäßwachstum

Die Bedeutung von PPAR- γ -Agonisten beim Gefäßwachstum ist in der Literatur stark umstritten. Klar ist jedoch, dass Glitazone über PPAR- γ direkte Effekte auf alle Zellen der Gefäßwand ausüben (Takano/Komuro, 2009).

Einerseits gibt es zahlreiche Arbeiten, die eine Hemmung der Angiogenese mittels PPAR- γ -Agonisten dokumentieren (Sheu et al., 2006; Xin et al., 1999). So konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Substanzen aus der Gruppe der Glitazone die choroidale, die retinale und die corneale Neovaskularisation gehemmt werden kann (Saryaba et al., 2005) und Apoptose von Endothelzellen ausgelöst wird (Bishop-Bailey/Hla, 1999).

Außerdem wird die Möglichkeit des Einsatzes von Glitazonen in der Tumorbehandlung diskutiert, da mehrfach gezeigt werden konnte, dass Glitazone die tumor-induzierte Angiogenese hemmen können (Keshamouni et al., 2005; Panigrahy et al., 2005).

Andererseits wurde beschrieben, dass durch PPAR- γ -Agonisten die Expression von VEGF gesteigert werden kann, was wiederum für einen positiven Einfluss von Glitazonen auf die Angiogenese sprechen würde (Chintalgattu et al., 2007; Yamakawa et al., 2000).

Die Auswirkungen von Glitazonen auf Zellen der Gefäßwand sind zudem bereits mehrfach *in vitro* untersucht worden (Chintalgattu et al., 2007; de Dios et al., 2001; Goetze et al., 2002; Kintscher et al., 2000). Dabei wurde die Wirkung von PPAR- γ -Agonisten auf Endothelzellen (de Dios et al., 2001; Goetze et al., 2002, Jackson et al., 1999) sowie auf glatte Muskelzellen (de Dios et al., 2003; Goetze et al., 2001; Marx et al., 1998) und monozytäre Zellen (Kintscher et al., 2000; Ricote et al., 1998) überprüft. Die erhobenen Befunde sind oft stark widersprüchlich.

Bei Endothelzellen konnte einerseits eine zunehmende Proliferation und Migration festgestellt werden (Hannan et al., 2007; de Dios et al., 2006). Maegawa et al. Beschreiben dementsprechend eine positive Wirkung von kurzzeitiger „low dose“ Therapie mit Pioglitazon auf die endotheliale Funktion (Maegawa et al., 2007). Sheu et al. berichtet dagegen von einer Hemmung der endothelialen Proliferation (Sheu et al., 2006) und auch die Inhibierung der endothelialen Migration durch PPAR- γ -Agonisten ist beschrieben worden (Goetze et al., 2002).

Zusätzlich wurde der Einfluss von Thiazolidinedionen auf endotheliale Vorläuferzellen im Knochenmark untersucht. Es wurde ermittelt, dass Glitazone die Proliferation von endothelialen Vorläuferzellen stimulieren (Wang et al., 2006; Werner et al., 2007).

Es wird vermutet, dass endotheliale Vorläuferzellen eine gefäßprotective Wirkung ausüben können (Wang et al., 2006).

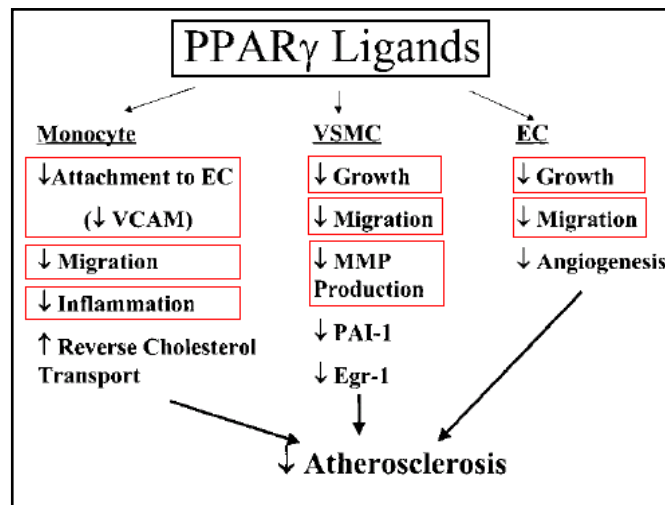


Abb. 7 Zusammenfassung der Wirkungen von PPAR- γ -Aktivierung auf Zellen, die am Gefäßumbau beteiligt sind, modifiziert nach Hsueh/Law (Hsueh/Law, 2001): Die für die Arteriogenese bedeutsamen Schritte sind farblich hervorgehoben. (EC: endothelial cell, Egr-1: early growth response-1 protein, MMP: matrix-metallo-proteinase, PAI-1: plasminogenactivator inhibitor-1, VCAM: vascular cell adhesion molecule, VSMC: vascular smooth muscle cell)

Des Weiteren hemmt Pioglitazon die Proliferation von glatten Muskelzellen (de Dios et al., 2003; Goetze et al., 2001; Li et al., 2008; Wakino et al., 2000) und die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen, wie z. B. MMP-9 (Kappert et al., 2008).

Anti-inflammatorisch wirken PPAR- γ -Agonisten, indem sie die Expression von Zelladhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) hemmen und damit die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut unterbinden (Calabrò et al., 2005; Pasceri et al., 2000; Wang et al., 2008). Die Bildung von monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) wird gehemmt (Calabrò, 2005; Joner et al., 2007; Zhang et al., 2008) und somit die MCP-1-induzierte Migration von Monozyten herabgesetzt (Kintscher et al., 2000; Tanaka et al., 2004).

Zudem inhibieren sowohl Pioglitazon als auch das zweite zur Diabetes mellitus Therapie zugelassene Glitazon, Rosiglitazon, die Aktivierung von monozytären Zellen sowie deren Produktion proinflammatorischer Zytokine (Jiang et al., 1998; Mohanty et al., 2004; Pitocco et al., 2009; Ricote et al., 1998). Ein Großteil dieser anti-inflammatorischen Wirkungen beruht vermutlich auf der Hemmung des NF- κ B-Weges durch PPAR- γ -Aktivierung (Straus et al., 2000).

Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass durch Glitazone die mitochondriale Bildung von reactive oxygen species (ROS) gehemmt wird, welche potentiell gewebsschädigend wirken (Fujisawa et al., 2009). Aufgrund dieser Feststellungen wird den Glitazonen eine anti-atherogene Wirkung zugeschrieben (Takano/Komuro, 2009; Wang et al., 2008) (siehe auch Abb. 7).

Der Einfluss von PPAR- γ -Agonisten auf das Kollateralwachstum ist bisher nicht untersucht worden.

3. Tiere, Material und Methoden

3. 1. Materialien

3. 1. 1. Tierhaltung

- > Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (V1534-300), sniff Spezialdiäten GmbH, Soest (Deutschland)
- > Makrolonkäfige Typ IV (Innenbodenfläche: 1800 bis 1815cm², Höhe: 19cm), Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co. KG, Emmendingen
- > Weichholzgranulat

3. 1. 2. Geräte

- > Blutdruckmessgerät, Medtronic GmbH, Düsseldorf (Deutschland)
- > Elektrokoagulator, ICC 50, Erbe Elektromedizin, Tübingen (Deutschland)
- > Mikrotom, HM 325, MICROM International, Walldorf (Deutschland)
- > Objektmikrometer für Mikroskop, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg (Schweiz)
- > Operationsmikroskop OPMI 1FC und Bodenstativ S21, Carl Zeiss AG, Göttingen (Deutschland)
- > Perfusor segura, B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
- > Periflux System 5000, Perimed AG, Järfälla (Schweden)
- > PowerShot S70 Digitalcamera, Canon Deutschland GmbH, Krefeld (Deutschland)
- > Radiometer Copenhagen, Radiometer Medical ApS, Brønshøj (Dänemark)
- > Stereomikroskop Leica MZ6 mit Kaltlichtquelle KL 1500 LCD, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (Deutschland)
- > Stereotaktisches Instrument, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach (Deutschland)
- > Vapor 2000 Isofluran, Dräger Medical AG & Co. KG, Lübeck (Deutschland)
- > Waage, Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)
- > Wärmeplatte, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen (Deutschland)

3. 1. 3. Chirurgische Instrumente

Anatomische und chirurgische Pinzetten; Anlegepinzette und Biemer-Gefäßclips; Inzisionsschere geknüpft; Klein-Set-Container; Knochenschere; Metzenbaumscheren, gerade und gebogen; Mikrofederscheren; Mikroskopierpinzetten, gerade und abgewinkelt; Nadelhalter nach Mathieu; Splitterpinzetten, gerade und abgewinkelt; Wundspreizer Logan modif. Reill; Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen (Deutschland)

3. 1. 4. Medikamente

- > Actos® (Wirkstoff: Pioglitazonhydrochlorid), Takeda Pharmaceuticals, Osaka (Japan)
- > Ampuwa® (Aqua ad injectabilia - Wasser für Injektionszwecke), Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland)
- > Diamox® parenteral Trockensubstanz (Wirkstoff: Azetazolamid-Natrium), Goldshield Pharmaceuticals Ltd., Surrey (England)
- > Forene® (Wirkstoff: Isofluran), Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden (Deutschland)
- > Isotonische Kochsalzlösung (Wirkstoff: Natriumchlorid), Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland)
- > Ketavet ® (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid), Pfizer, New York (USA)
- > Liquemin® N 25 000 (Wirkstoff: Heparin-Natrium), Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen (Deutschland)
- > Methylcellulose 0,5%ig (Deutschland)
- > Naropin® (Wirkstoff: Ropivacainhydrochlorid), AstraZeneca, Södertälje (Schweden)
- > Paveron® N (Wirkstoff: Papaverinhydrochlorid), Weimer Pharma GmbH, Rastatt (Deutschland)
- > Rompun® (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid), Bayer AG, Leverkusen (Deutschland)

3. 1. 5. Chemikalien, Lösungen & Gase

- > Aquatex, Harleco, Gibbstown, New Jersey (USA)
- > Bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
- > Chicago Latex, Industrial Latex Product No. 563, Spartan Adhesives & Coatings Co., Crystal Lake (USA)
- > Eosin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
- > Ethanol (Deutschland)
- > Fluoromont-G, Southern Biotech, Birmingham, Alabama (USA)
- > Hämatoxylin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
- > Hoechst-33342, Molecular Probes, Eugene, Oregon (USA)
- > Indian Link (Chinesische Tusche schwarz), Royal Talens, Apeldoorn (Holland)
- > Medizinische Gase Sauerstoff (O₂) / Distickoxid (N₂O, Lachgas), Linde AG, Unterschleißheim (Deutschland)
- > Monoclonal mouse anti- α -SMC-actin, Cy3, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
- > Paraffin Type 9, MICROM International, Walldorf (Deutschland)
- > Softasept® N (Wirkstoff: Ethanol), B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
- > Tween20, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
- > Xylol (Xylene), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)

3. 1. 6. Verbrauchsmaterialien

- > Deckgläser, 24x50mm, Menzel, Braunschweig (Deutschland)
- > EcoLab-Polyethylen-Mikroschlauch 0,58*0,96 mm, SIMS Portex Ltd., Hythe (Vereinigtes Königreich)
- > Einmalspritzen Luer 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, Perfusorspritzen 50 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
- > Fettstift, Dako Cytomation Pen, Dako, Glostrup (Dänemark)
- > Falcontube 15/50ml, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht (Deutschland)
- > Kanülen BD Microlance™ 3; 23 G * 1“ – Nr. 16; 0,6 mm * 25 mm, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)
- > Nahtmaterial: Polyester, nicht resorbierbar, geflochten, 5/0 USP, 1 metric, 75 cm, Ethicon, Norderstedt (Deutschland)
- > Objektträger, SuperFrost Plus, R. Langenbrinck, Emmendingen (Deutschland)

3. 2. Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen, adulten Ratten des Stammes Sprague-Dawley durchgeführt. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere elf bis zwölf Wochen alt und hatten ein Gewicht von 300g bis 324g. Sie wurden von der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln (Deutschland) mit Gesundheitszeugnis bezogen.

3. 2. 1. Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen (Typ IV, Innenbodenfläche: 1800 bis 1815 cm², Höhe: 19cm) die mit sterilisiertem, staubfreiem Weichholzgranulat eingestreut waren, in Gruppen von zwei bis vier Tieren gehalten. Sie erhielten Futter (Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (V1534-300) sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum. Die Raumtemperatur betrug konstant 22° Celsius. Die Luftfeuchtigkeit betrug 50-70%. Mittels künstlicher Beleuchtung wurde ein Hell-Dunkel-Zyklus von zwölf Stunden je Phase erzeugt.

3. 2. 2. Genehmigung des Tierversuchs

Die Genehmigung des Tierversuchs nach §8 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 1. Oktober 1972, geändert am 18. Dezember 2007, erfolgte am 12. Dezember 2007 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales der Stadt Berlin unter der Genehmigungsnummer G 0225/07 und lag somit zu Versuchsbeginn vor.

3. 2. 3. Gruppeneinteilung und Randomisierung

Gemäß der durchzuführenden Behandlungen und Auswertungsmethoden wurden 120 Tiere zufällig in folgende Gruppen eingeteilt (Tab. 1):

Tab. 1: Gruppeneinteilung (LD: low dose, HD: high dose, CVR: cerebrovascular reserve)

	3- VO-Operation		Sham-Operation	
	CVR	Angiographie	CVR	Angiographie
Kontrolle	10	10	10	10
Pioglitazon LD	10	10	10	10
Pioglitazon HD	10	10	10	10

3. 3. Behandlung

3. 3. 1. Schmerztherapie

Der Einsatz nicht-steroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) ist im Zusammenhang mit der Untersuchung arteriogenetischer Prozesse aufgrund der entzündungshemmenden Wirkung kontraindiziert, da inflammatorische Vorgänge ein zentrales Ereignis beim Kollateralwachstum darstellen.

Ebenso ist nicht auszuschließen, dass Opioide das Gefäßwachstum durch ihre anti-inflammatorische Teilwirkung negativ beeinflussen. Zudem zeigten in vorhergehenden Versuchen verwendete Tiere nach Einsatz von Buprenorphin das Pica-Syndrom, was zu erhöhten Todesfällen führte. Analgesie mittels Opioiden wurde somit ebenfalls ausgeschlossen.

Die Einleitung der Narkose erfolgte vor der 3-VO-Operation mit Hilfe von Ketamin/Xylazin (50mg/kg/4mg/kg, Ketavet®/Rompun®, Pfizer, New York, USA/Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), wobei die analgetische Komponente des Ketamins ausgenutzt wurde. Es ist bekannt, dass diese analgetische Wirkung auch nach abgeschlossener Operation anhalten kann.

Zusätzlich wurden die Inzisionsbereiche mit dem Lokalanästhetikum Ropivacain (insgesamt 1ml, 3mg/kg, Naropin®, AstraZeneca, Södertälje, Schweden) umspritzt. Ropivacain weist eine lange Wirkungsdauer auf, so dass eine post-operative Analgesie gewährleistet werden konnte. Nach Bedarf erhielten die Tiere über die Dauer von zwei Tagen post-operativ weitere Ropivacain-Injektionen im Abstand von zwölf Stunden.

3. 3. 2. Medikamentelle Behandlung

Die Behandlung mit Pioglitazon wurde bereits vier Tage vor der 3-VO-Operation begonnen, um zum Zeitpunkt des Drei-Gefäßverschlusses einen ausreichenden Wirkspiegel der Substanz im Organismus gewährleisten zu können. Pioglitazon wurde in zwei verschiedenen Dosierungen verabreicht (Pioglitazon „low dose“, LD: 2,8 mg/kg und Pioglitazon „high dose“, HD: 10 mg/kg), wobei die niedrige Dosierung der in der Humanmedizin üblichen maximalen Dosierung von 45mg entsprach (Umrechnung über das metabolische Körpergewicht).

Die Applikation erfolgte oral über eine Schlundsonde. Dazu wurde das wasserunlösliche Pioglitazon in 0,5%iger Methylcellulose gelöst. Es wurden 0,5ml der hergestellten Lösung verabreicht.

Des Weiteren erfolgte eine Behandlung von Kontrolltieren mittels 0,5ml reiner Methylcellulose, die ebenfalls über die Schlundsonde appliziert wurde. Diese Tiere wurden ebenfalls vier Tage vor der Erstoperation behandelt.

Sämtliche Medikamente sowie die Kontrolllösung wurden täglich über eine Gesamtdauer von drei Wochen nach 3-VO-Operation verabreicht. Danach erfolgt die Auswertung mittels zerebrovaskulärer Reaktivität und Latexangiographie mit Diameter-Bestimmung.

Tab. 2: Behandlungsschema (3-VO: Three vessel occlusion, CVR: cerebrovascular reserve)

<i>Vorbe- handlung</i>	<i>3-VO-Operation</i>	<i>Behandlung mit Pioglitazon/Kontrolllösung</i>	<i>Auswertung: CVR</i>
	<i>Sham-Operation</i>		<i>Auswertung: Angiographie</i>
Tag 1 bis 4	Tag 5	Tag 6 bis 25	Tag 26

3. 4. Operationen

3. 4. 1. Narkose

Die Einleitung der Narkose erfolgte bei der 3-VO-Operation durch intraperitoneale Applikation von 50mg/kg Ketamin (Ketavet®, Pfizer, New York, USA) und 4 mg/kg Xylazin (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), welches 15 Minuten präoperativ injiziert wurde. Zur Latexangiographie sowie zur Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität erfolgte die Einleitung durch Verbringen des Tieres in eine Narkosekammer, in die ein Gemisch aus 30% Sauerstoff, 70% Distickoxid (Lachgas) und 4 Vol.-% Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) geleitet wurde.

Zum Erhalt der Narkose während der Operation wurden je nach Bedarf 1,5-3 Vol.-% Isofluran in 30% Sauerstoff und 70% Distickoxid verwendet. Das Gas wurde dann über eine Narkosemaske verabreicht, wobei die Spontanatmung erhalten blieb und eine Intubation nicht notwendig war.

3. 4. 2. Drei-Gefäßverschluss (Three-vessel-occlusion, 3-VO)

Das Tier wurde in Rückenlage auf einer rückgekoppelten Heizplatte gelagert. Danach wurden die zu eröffnenden Operationsstellen mit insgesamt 1 ml (5mg/kg) des Lokalanästhetikum Ropivacain (Naropin®, AstraZeneca, Södertälje, Schweden) unterspritzt.

Nach Scheren, Reinigung und Desinfektion wurde auf der linken Schädelseite temporal die Haut eröffnet und stumpf bis auf den Schädelknochen präpariert, um einen Zugang für die spätere Laserdopplermessung zu erhalten.

Danach erfolgte die Umlagerung des Tieres in ein stereotaktisches Gerät. Dieses diente der Fixierung des Schädels mittels zweier in den Meatus acusticus externus eingeführter Metallstäbe.

Nach Scheren, Reinigung und Desinfektion der Haut im Nackenbereich wurde die Haut caudal des Os occipitale auf einer Länge von ca. 1 cm eröffnet. Durch stumpfe Präparation wurden der M. semispinalis capitis und der M. longissimus capitis median getrennt und mittels eines Wundspreizers gespreizt. Durch weiterhin stumpfe Präparation erfolgte die Durchtrennung des M. rectus capitis dorsalis major et minor zur beidseitigen Freilegung der Foramina alarae am Atlas.

Mit einer Koagulationssonde von 0,45mm Durchmesser wurde auf jeder Seite in das Foramen alare eingegangen und die Arteria vertebralis durch unipolare Elektrokoagulation verschlossen.

Der Wundverschluss erfolgte mittels Muskel-, Unterhaut- und Hautnaht (Ethibond EXCEL, polyfil, nicht resorbierbar, USB 5-0, metric 1,0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland).

Das Tier wurde nun aus dem stereotaktischen Gerät auf die rückgekoppelte Heizplatte in Rückenlage umgelagert. Ventral wurde etwa 1-2mm links der Medianen zunächst geschoren, gereinigt und desinfiziert und dann die Haut im Halsbereich auf einer Länge von 1cm eröffnet. Mittels stumpfer Präparation wurde die Arteria carotis communis aufgesucht und vom Truncus vagosympathicus gelöst. Anschließend wurde eine Ligatur um das Gefäß vorgelegt, aber noch nicht angezogen (Ethibond EXCEL, polyfil, nicht resorbierbar, USB 5-0, metric 1,0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland).

Nun wurde an der zuvor präparierten Stelle links temporal am Schädel die Laserdopplersonde (Peri Flux System 5000, Perimed, Järfälla, Schweden) angeschlossen und der zerebrale Blutfluss bestimmt und aufgezeichnet.

Die Schlinge um die Arteria carotis communis wurde nun zugezogen, so dass das Gefäß ligiert war. Nach dieser Ligatur waren drei der vier arteriellen Zuflüsse zum Gehirn verschlossen. Gefäße, die sich auf der Seite der ligierten Arteria carotis communis befinden, wurden im Folgenden als ipsilateral bezeichnet, Gefäße, die sich auf der gegenüberliegenden Seite befinden, als contralateral. Mittels Laserdoppler wurde kontrolliert, dass der Blutfluss auf mindestens 65% des zuvor gemessenen Ausgangswertes absank und dieser niedrige Wert für mindestens zehn Minuten erhalten blieb. Die Aufzeichnung des zerebralen Blutflusses erfolgte kontinuierlich mittels spezieller Software (Perisoft, Perimed, Järfälla, Schweden).

Danach wurde die Wunde mittels Unterhaut und Hautnaht verschlossen (Ethibond EXCEL, polyfil, nicht resorbierbar, USB 5-0, metric 1,0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Schließlich wurde die Laserdopplermessstelle am Schädel mittels Hautnaht verschlossen (Ethibond EXCEL, polyfil, nicht resorbierbar, USB 5-0, metric 1,0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland).

Das Tier wurde zum Erwachen in eine Einzelbox verbracht und dort mit einer Rotlichtlampe bestrahlt. Während des Aufwachvorgangs wurde besonders auf neurologische Auffälligkeiten geachtet. War das Tier vollständig erwacht und zeigte keinerlei Orientierungsstörungen mehr, wurde es in den Gruppen-Käfig zurückgesetzt.

3. 4. 3. Sham-Operation

Bei der Sham-Operation (Sham, engl. Imitation) wurde prinzipiell ebenso vorgegangen wie bei der 3-VO-Operation. Jedoch erfolgte hier kein Verschluss der Gefäße, also keine Elektrokoagulation der Arteriae vertebrales und keine Ligatur der Arteria carotis communis.

Die Sham-Operation dient dem Nachweis, dass die durch 3-VO auftretenden Veränderungen tatsächlich Folge der Gefäßverschlüsse sind und sich nicht aufgrund von operativer Beeinflussung des umgebenden Gewebes ergeben haben.

3. 4. 4. Zerebrovaskuläre Reaktivität

Mittels Bestimmung der zerebrovaskulären Reservekapazität (cerebrovascular reserve capacity, CVRC) wird bestimmt, inwiefern die Gefäße in der Lage sind, auf steigenden CO₂-Partialdruck (pCO₂) im Blut und Absinken des pH-Wertes des Blutes zu reagieren.

Physiologischerweise führt ein Ansteigen des pCO₂ im arteriellen Blut und ein Absinken des pH-Wertes des Blutes zur Vasodilatation. Kurz nach der 3-VO-Operation bleibt diese Reaktion jedoch aus. Da die Gefäße einen erhöhten Blutfluss übernehmen müssen, sind sie zu diesem Zeitpunkt bereits maximal dilatiert und können sich daher auch bei steigendem pCO₂ und sinkendem pH-Wert nicht mehr erweitern.

Bereits eine Woche nach der 3-VO-Operation ist durch die erfolgten Umbaumaßnahmen am Gefäß wieder eine Erweiterung möglich. Erhöht man nun den pCO₂ und senkt den pH-Wert im Blut, so lässt sich ein erhöhter zerebraler Blutfluss (cerebral blood flow, CBF) messen. Diese Reaktion ist nach drei Wochen besonders deutlich. Im Falle einer gehemmten Arteriogenese würde diese Erhöhung des Blutflusses ausbleiben oder zumindest geringer ausfallen, als bei Tieren deren Arteriogenese nicht gehemmt war.

Nach erfolgter Narkoseeinleitung wurde links temporal am Kopf bis auf den Schädelknochen präpariert, um eine Anschlussstelle für die Laserdopplersonde zu schaffen. Anschließend wurde die Haut im linken Schenkelspalt auf einer Länge von etwa 2 cm eröffnet. Es wurden Arteria und Vena femoralis aufgesucht und freipräpariert. Zunächst wurden die Gefäße möglichst weit distal ligiert (Ethibond EXCEL, polyfil, nicht resorbierbar, USB 5-0, metric 1,0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). In beide Gefäße wurde mit einer Mikroschere eingeschnitten und ein Katheter (ecoLab-PE-Mikroschlauch 0,58*0,96mm, SIMS Portx Ltd., Hythe, Vereinigtes Königreich) eingeführt. Um ein Herausrutschen des Katheters zu vermeiden, wurde dieser mittels einer Ligatur (Ethibond EXCEL, polyfil, nicht resorbierbar, USB 5-0, metric 1,0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) um Katheter und Gefäßwand fixiert. Der Katheter wurde mit einer geringen Menge Heparin-Lösung (5000 IE in 100ml Kochsalzlösung, Liquenim®, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) gespült, um zu verhindern, dass Blut im Katheter gerinnt.

Nun wurde aus der linken Arteria femoralis aus dem zuvor gelegten Katheter eine Blutprobe entnommen, um die arteriellen Blutgase ($p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$) und den pH-Wert des Blutes vor Beginn der Messung zu bestimmen. Dazu wurde ein Blutgasanalysegerät (ABL Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark) verwendet. Danach wurde über die Arterie der mittlere arterielle Blutdruck mittels eines Blutdruckmessgerätes (Medtronic GmbH, Düsseldorf, Deutschland) gemessen und während der gesamten weiteren Operation minütlich aufgezeichnet. Die Laserdopplersonde wurde am Schädel platziert. Die Aufzeichnung des zerebralen Blutflusses erfolgte kontinuierlich mittels spezieller Software (Perisoft, Perimed; Järfälla, Schweden).

In die linke V. femoralis wurden nun 0,1 ml Acetazolamid (Diamox®, 30 mg/kg, Goldshield Pharmaceuticals Ltd. Surrey, England) appliziert. Acetazolamid bewirkt eine Hemmung der erythrozytären Carboanhydrase, wodurch es zur Erhöhung der Konzentration an Wasserstoffionen und somit zum Absinken des pH-Wertes im Blut kommt. Es entsteht also eine metabolische Azidose. Einerseits führt diese bereits dazu, dass es zur Dilatation von Widerstandsgefäßen kommt, andererseits wird dadurch die Bildung von CO_2 angeregt, was abgeatmet werden kann. So wird unter natürlichen Bedingungen ein Ausgleich der metabolischen Azidose vorgenommen. Da die folgende Messung aber über einen relativ kurzen Zeitraum stattfand und Azetazolamid eine lange Wirkdauer hat, kommt dieser Ausgleich durch Abatmung nicht zum Tragen. Nach acht Minuten wurde die Messung beendet und aus der Arteria femoralis eine Blutprobe zur erneuten Blutgasanalyse entnommen.

Da das Gehirn zur histologischen Untersuchung genutzt wurde, erfolgte abschließend die Perfusion des Gehirns mittels 4%iger Formalin-Lösung. Dazu wurde zunächst die Isofluran-Narkose vertieft (4 Vol.-%) und der Brustkorb des Tieres eröffnet. Zur Entlastung des Blutgefäßsystems wurde das rechte Herzohr eröffnet und die Katheter wurden aus den Gefäßen der Hintergliedmaße entfernt. Nun wurde die linke Herzkammer punktiert und über diese wurden 20ml der Formalin-Lösung appliziert, wodurch das Tier sofort verstarb.

Danach erfolgt die Dekapitation und der Schädel wurde zur Entnahme des Gehirns eröffnet. Die Konservierung des Gehirns bis zur Einbettung in Paraffin (siehe 3. 5. 1.) erfolgte in 10ml 4%iger Formalin-Lösung.

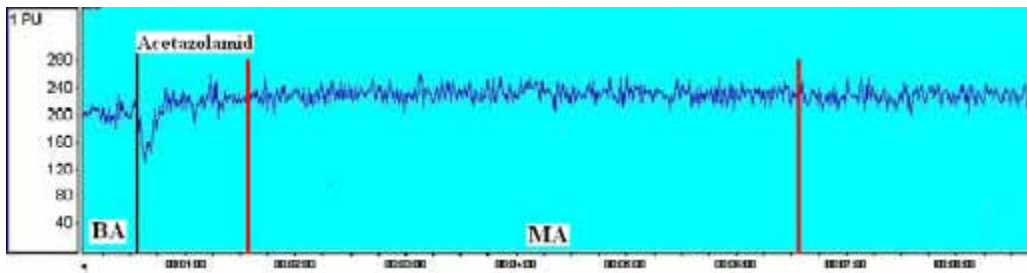


Abb. 8: Beispiel für die Auswertung einer aufgezeichneten CBF-Kurve: Die „baseline area“ (BA) liegt vor der Acetazolamid-Applikation, die „measurement area“ (MA) beginnt eine Minute nach Acetazolamid-Gabe und liegt innerhalb der roten Markierungen. (PU: perfusion unit)

Die Berechnung der CVRC erfolgte mit Hilfe der Software des Laserdoppler-Gerätes (Perisoft, Perimed, Järfälla, Schweden). Da die Angabe des CBFs durch das Laserdoppler-Gerät in Perfusions-Einheiten (perfusion units, PU) erfolgt und diese sich nicht für den direkten Vergleich eignen, da sie keine definierte Größe darstellen, wurde wie folgt vorgegangen: Es wurde eine „baseline area“ (BA) vor Applikation des Acetazolamids definiert und der Mittelwert des CBF innerhalb dieser Zone (meanBA) bestimmt. Eine weitere Zone („measurement area“, MA) umfasste alle Messwerte von einer Minute bis sechs Minuten nach Acetazolamid-Gabe von denen ebenfalls der Mittelwert (meanMA) gebildet wurde. Der meanBA wurde einem CBF von 100% gleichgesetzt. Dementsprechend wurde der meanMA in % des meanBA angegeben ($\text{meanMA}/\text{meanBA} \cdot 100\%$). Die Differenz der beiden Prozentualwerte ($\text{meanMA in \%} - \text{meanMA in \%}$) wurde als zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC) bezeichnet.

3. 4. 5. Latexangiographie und Diameterbestimmung

Das Tier wurde in Rückenlage auf eine rückgekoppelte Heizplatte gelegt. Dann wurde etwa 1-2mm rechts der Medianen die Haut im Halsbereich auf einer Länge von 1,5cm eröffnet. Mittels stumpfer Präparation in die Tiefe wurde die rechte Arteria carotis communis aufgesucht und vorgelagert. Die Arterie wurde distal ligiert und dann proximal der Ligatur mit einer Mikroschere eröffnet und ein Katheter (ecoLab-PE-Mikroschlauch 0,58*0,96mm, SIMS Portx Ltd., Hythe, Vereinigtes Königreich) eingeführt.

Um das Herausrutschen des Katheters zu vermeiden, wurde dieser mittels einer Ligatur (Ethibond EXCEL, polyfil, nicht resorbierbar, USB 5-0, metric 1,0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) um Katheter und Gefäßwand fixiert. Der Katheter wurde mit einer geringen Menge Heparin-Lösung (5000 IE in 100ml Kochsalzlösung, Liquenim®, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) gespült, um zu verhindern, dass Blut im Katheter gerinnt.

Die linke Arteria carotis communis wurde ebenfalls aufgesucht und durchtrennt, so dass arterielles Blut aus dem zerebralen Gefäßsystem abfließen konnte und es nicht zu einer Drucksteigerung im Gefäßsystem kam. Zusätzlich wurde zur Entlastung über den venösen Kreislauf das rechte Herzohr nach Eröffnung des Brustkorbs inzidiert.

Durch Applikation von 40-50 mg/kg Papaverin (Paveron®, Weimarer Pharma GmbH, Rastatt, Deutschland) wurde die maximale Dilatation der Gefäße erreicht. Gleichzeitig starb das Tier umgehend aufgrund der eintretenden Hypotonie.

Über den Katheter wurde zunächst mit heparinierter Kochsalzlösung (ca. 2ml) Blut aus dem arteriellen Gefäßsystem gespült und dann mit Hilfe eines Perfusors mit einem kontinuierlichen Druck von 150mmHg 2 ml mit schwarzer Tinte (Indian ink) gefärbte, etwa 37° Celsius warme Latexmilch (Chicago Latex Products No. 563, Spartan Adhesives & Coatings Co., Crystal Lake, USA) appliziert. Danach wurde das Tier auf Eis gelegt, um das Aushärten des Latex zu beschleunigen. Nach etwa 20 Minuten wurde der Kopf abgetrennt und das Gehirn durch vorsichtige Präparation entnommen.

Die Diameter der Gefäße wurden anschließend unter einem Lichtmikroskop mit integriertem und geeichtem Objektmikrometer (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) von einer unabhängigen Person geblindet bestimmt. Gemessen wurden folgende Diameter jeweils ipsi- und contralateral (auf Seite der ligierten Arteria carotis communis und auf der gegenüberliegenden Seite): Arteria cerebri posterior (PCA), Arteria cerebri communicans posterior (PCom), Arteria carotis interna (ICA), Arteria cerebri media (MCA), Arteria cerebri anterior (ACA). Diese Gefäße bilden den Circulus arteriosus (Willisii). Es wurden je vier Messungen an verschiedenen Stellen des Gefäßes durchgeführt aus denen dann der durchschnittliche Gefäßdiameter berechnet wurde.

3. 5. Histologische Untersuchung

3. 5. 1. Einbetten in Paraffin

Nach zwölfstündiger Fixierung in 4%iger Formalinlösung, erfolgte die Zerteilung der Gehirne, so dass nur die Region der Arteria cerebri posterior (PCA) zur weiteren histologischen Untersuchung herangezogen wurde.

Die Entwässerung des Gewebes erfolgte mittels aufsteigender Alkoholreihe (1 Std. in 70% Ethanol, 1 Std. in 95% Ethanol, 3 x 1 Std. in 100% Ethanol). Anschließend wurde das Gewebe für 30 Minuten in Aceton gelegt. Danach erfolgte die dreimalige Waschung mit flüssigem Paraffin (Paraffin Type 9, MICROM International) für jeweils 30 Minuten. Schließlich verblieb das Gewebe mindestens 12 Stunden bei 60°C im Brutschrank in flüssigem Paraffin. Danach erfolgte das Eingießen in Paraffinblöcke.

3. 5. 2. Anfertigen der Gewebeschnitte

Aus der Kontrollgruppe, der Gruppe, die mit Pioglitazon in niedriger Dosierung behandelt worden waren und der Gruppe, die Pioglitazon in höherer Dosierung erhalten hatten, wurden je zufällig je drei Tiere ausgewählt, deren Gewebe zur histologischen Untersuchung herangezogen wurde. Zudem wurde von drei Tieren, die keinerlei Behandlung oder Operation erhalten hatten, Gewebe gewonnen und als Negativkontrolle histologisch ausgewertet. Mittels eines Mikrotoms (HM 325, MICROM) wurden 5µm dicke Schnitte der zu untersuchenden Region angefertigt. Die Schnittführung erfolgte dabei sagittal, beginnend auf der Seite der ipsilateralen PCA. Je drei Schnitte wurden auf einem Objektträger (SuperFrost Plus, R.Langensbrinck) plaziert. Pro Paraffinblock wurden 50 Objektträger angefertigt. Zur Fixierung wurden diese für 12 Stunden bei 60°C getrocknet.

3. 5. 3. Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung

Um sicherzustellen, dass die angefertigten Gewebeschnitte in der Region der PCA lagen, wurde jeweils der erste, der 25. und der 50. Objektträger ausgewählt und zur besseren Übersicht mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dabei fand das folgende Protokoll Anwendung:

- > zweimaliges Bad in Xylol (Sigma-Aldrich) für je fünf Minuten
- > Bad in 100%, 95%, 80% und 70% Ethanol für je 15 Sekunden
- > 30 Sekunden Färbung in Hämatoxylin (Sigma-Aldrich)
- > Spülung in destilliertem Wasser für 30 Sekunden
- > Spülung in Leitungswasser für 30 Sekunden

- > zehn Sekunden Färbung in Eosin (Sigma-Aldrich)
- > Spülung in destilliertem Wasser für 30 Sekunden
- > Bad in 100%, 95%, 80% und 70% Ethanol für je 15 Sekunden
- > Bad in Xylol für fünf Minuten
- > Eindeckeln mit Aquatex (Harleco) und Deckgläsern (24*50mm, Menzel)

Anschließend wurden die Schnitte unter dem Mikroskop beurteilt. Nur wenn die PCA deutlich zu erkennen war, wurden die Schnitte der entsprechenden Region zur immunhistologischen Färbung herangezogen.

3. 5. 4. α -Smooth-Muscle-Cell-Actin(α -SMCA)-Markierung

Um die glatte Gefäßmuskulatur beurteilen zu können, wurde eine immunhistologische Färbung mit Cy3 markiertem α -SMCA-Antikörper durchgeführt.

Dazu wurden pro Tier drei Objektträger aus der zuvor mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung identifizierten Region ausgewählt und zunächst entparaffiniert und rehydriert (2maliges Bad Xylol für je zehn Minuten, Bad in 100%, 95%, 80% und 70% Ethanol für je drei Minuten, Waschen mit destilliertem Wasser). Die Schnitte wurden auf dem Objektträger mit einem Fettstift (Dako Cytomation Pen, Dako, Glosrup, Dänemark) umkreist, um zu gewährleisten, dass der Antikörper das Gewebe während der Inkubation vollständig bedeckte. Anschließend wurden die Schnitte in Phosphatpuffer (phosphate buffer saline, PBS: 80g NaCl, 2g KCl, 11,5g Na₂HPO₄*7H₂O, 2g KH₂PO₄ in 1l Aqua dest.) gewaschen. Der direkt markierte α -SMCA-Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde 1:100 mit PBSA (10ml PBS mit 100mg bovinem Serumalbumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde in einer feuchten Kammer.

Danach wurden die Objektträger dreifach für je drei Minuten in PBS gewaschen, gefolgt von einer Waschung mit PBST (Tween20, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 1:1000 mit PBS verdünnt) für ebenfalls drei Minuten und einer erneuten Waschung in PBS für drei Minuten. Zur besseren Kontrastgebung erfolgte eine Kernfärbung mit Hoechst 33342-Reagenz (1:1000 in PBS verdünnt, Molecular Probes, Eugene, USA) für eine Minute.

Abschließend wurde zunächst zweimal für je drei Minuten mit PBS und dann einmal drei Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Entdeckung mit Deckgläsern (24*50mm, Menzel, Braunschweig, Deutschland) erfolgte mit Hilfe von Fluoromont-G (Southern Biotech, Birmingham, USA).

Die Auswertung erfolgte geblindet mithilfe einer Fluoreszenzlampe unter dem Mikroskop. Beurteilt wurden jeweils die Anzahl der einzelnen Schichten der glatten Gefäßmuskulatur (mehr als drei Schichten, drei Schichten oder zwei Schichten) sowie die Form des Gefäßes (rund, oval oder s-förmig).

3. 6. Statistische Datenauswertung

Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte (Mean) \pm Standard Deviation (SD). Balkendiagramme wurden durch die Mittelwerte (Mean) \pm Standard Error of Mean (SEM) dargestellt. Die Gruppenunterschiede wurden mithilfe des SPSS ANOVA Post Hoc LSD Tests auf statistische Signifikanz untersucht. Für alle Berechnungen wird die statistische Signifikanz mit Signifikanzniveau (p 0,01 bzw. p 0,05) bei den jeweiligen Graphiken angegeben.

4. Ergebnisse

4. 1. Allgemeines

4. 1. 1. Überlebensraten

In der Gruppe, die mit Kontrolllösung behandelt wurde und die abschließend einer Latexangiographie unterzogen werden sollte, starb ein Tier aufgrund eines Atemstillstands in der Narkose während der 3-VO-Operation. Weitere drei Tiere, die mit Pioglitazon in niedriger Dosierung vorbehandelt waren, überlebten die 3-VO-Operation, ebenfalls aufgrund eines Atemstillstands, nicht. Von den Tieren, die Pioglitazon in hoher Dosierung erhalten hatten, musste ein Tier, das gestörtes Allgemeinbefinden mit hochgradigem Gewichtsverlust zeigte, zwei Tage nach der 3-VO-Operation getötet werden.

Bei den Tieren, die einer Sham-Operation unterzogen wurden, starben je zwei Tiere aus der Kontrollgruppe und aus der Pioglitazon LD-Gruppe sowie ein Tier aus der Pioglitazon HD-Gruppe während der 3-VO-Operation an Atemstillstand.

Die überwiegende Anzahl der Tiere verstarb somit während der Operation an Atemstillstand vermutlich aufgrund der Narkose. Daher steht ihr Tod in keinem Zusammenhang dazu, ob sie Kontrolllösung oder Pioglitazon in hoher oder niedriger Dosierung erhalten hatten. Ein Tier, das Pioglitazon erhalten hatte, musste aufgrund reduzierten Allgemeinbefindens getötet werden. Da jedoch alle anderen Tiere, die einer Behandlung mit hoch dosiertem Pioglitazon unterzogen wurden, keinerlei Störung des Allgemeinbefindens zeigten, lässt sich dieser Todesfall nicht auf die Behandlung mit Pioglitazon zurückführen. Die Todesfälle traten also unabhängig davon auf, ob die Tiere Kontrolllösung, Pioglitazon hochdosiert oder Pioglitazon in niedriger Dosierung erhalten hatten.

Aufgrund eines technischen Fehlers mussten vier Tiere aus der Pioglitazon HD-Gruppe, die eine Latexangiographie erhalten hatte, von der Auswertung ausgeschlossen werden.

Daher ergaben sich für die Auswertung der entsprechenden Gruppen folgende Tierzahlen (Tab. 3):

Tab. 3 Anzahl überlebender, auswertbarer Tiere (LD: low dose, HD: high dose, CVR: cerebrovascular reserve)

	3- VO-Operation		Sham-Operation	
	CVR	Angiographie	CVR	Angiographie
Kontrolle	10	9	10	8
Pioglitazon LD	8	9	10	8
Pioglitazon HD	9	6	10	9

4. 1. 2. Körpergewicht

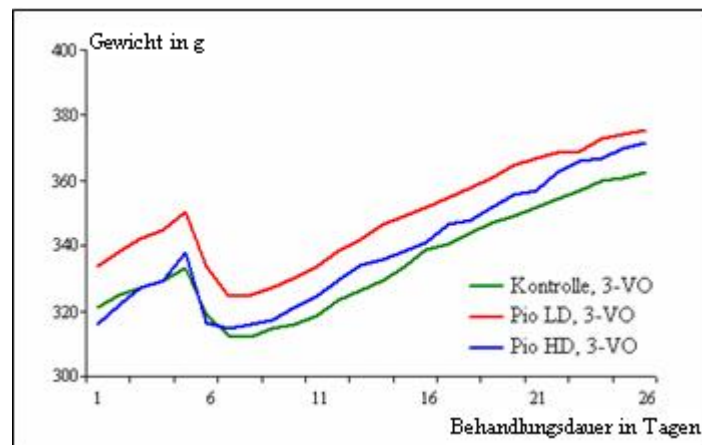


Abb. 9 Darstellung des Verlaufs des mittleren Körpergewichts bei 3-VO-operierten Tieren: Die Linien geben jeweils den Gruppen Mittelwert an; Kontrolle, 3-VO n=21, Pio LD, 3-VO n=17, Pio HD, 3-VO n=15; Tag 1=Behandlungsbeginn

Abbildung 9 macht deutlich, dass es während der ersten zwei bis drei Tage nach erfolgtem Drei-Gefäßverschluss zu Gewichtsverlusten kommt. Zwar zeigen die Tiere unmittelbar nach der Operation bereits wieder ein scheinbar ungestörtes Allgemeinbefinden, jedoch ist die Futteraufnahme gegenüber Sham-operierten Tieren reduziert. Diese zeigen nach dem Eingriff nur einen geringgradigen Gewichtsverlust (s. Abb. 10).

Dennoch wird dieser Gewichtsverlust nach der 3-VO-Operation innerhalb von sieben bis zehn Tagen wieder ausgeglichen, was sich auch in der Betrachtung des relativen Körpergewichts ausdrückt (Abb. 11). Hierzu wurde der Mittelwert der während der 21 Tage nach 3-VO bestimmten Gewichte ermittelt und in Bezug zum Mittelwert der während der ersten fünf Tage gemessenen Körpergewichte gesetzt. Bei dieser Darstellung wird deutlich, dass in allen Gruppen der Ausgangswert von 100% wieder erreicht und übertroffen wurde.

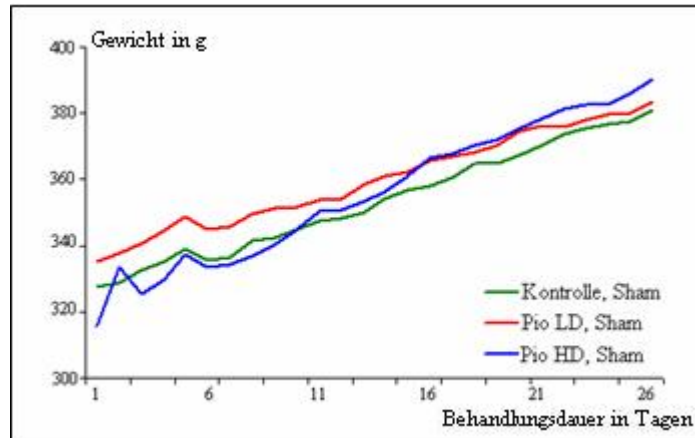


Abb. 10 Darstellung des Verlaufs des mittleren Körpergewichts bei Sham-operierten

Tieren: Die Linien geben jeweils den Gruppen Mittelwert an; Kontrolle, Sham $n=18$, Pio LD Sham $n=18$, Pio HD Sham $n=21$; Tag 1=Behandlungsbeginn

Innerhalb der Kontrollgruppe wurde dabei ein relatives Körpergewicht ermittelt, das sich kaum von dem der Pioglitazon LD-behandelten Gruppe unterschied. Die Pioglitazon-HD-Gruppe zeigte dagegen ein deutlich höheres relatives Körpergewicht. Allerdings erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz.

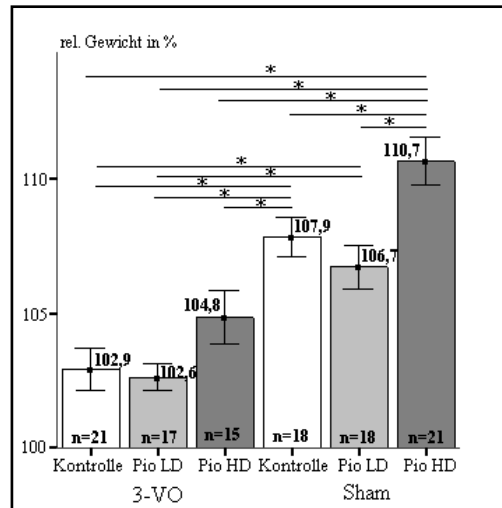


Abb. 11 Vergleich des relativen Körpergewichts: Die Balken repräsentieren den jeweiligen Gruppenmittelwert, $p \leq 0,05$; 3-VO: Three vessel occlusion, LD: low dose, HD: high dose

Alle Sham-Gruppen wiesen ein signifikant höheres relatives Gewicht auf, als die entsprechenden 3-VO-Gruppen. Hierbei wurde erneut deutlich, dass Tiere die Pioglitazon in hoher Dosierung erhalten hatten, mehr an Gewicht gewonnen hatten, als Sham-operierte Tiere, denen Kontrolllösung oder operierten Tieren, denen Pioglitazon in niedriger Dosierung verabreicht worden war. Dieser Unterschied erreichte ein statistisch signifikantes Niveau.

Die Applikation von 10mg/kg Pioglitazon hatte somit eine Steigerung des Körpergewichts zufolge.

4. 2. 3-VO-Operation

Wie in Abbildung 12 beispielhaft dargestellt, führte die Ligatur der A. carotis communis nach erfolgter Elektrokoagulation der Aa. vertebrales zu einem Abfall des zerebralen Blutflusses. Dieser Abfall wurde in % der vor Setzen der Ligatur aufgezeichneten Baseline angegeben (s. Abb. 13). Zwar steigt der Blutfluss innerhalb von zehn Minuten geringgradig an, erreicht jedoch nie über 60% des Ausgangswertes.

Der Abfall des CBFs erscheint zwar bei mit Pioglitazon in niedriger Dosierung behandelten Tieren etwas geringer als bei Tieren der Kontrollgruppe und den mit hoch dosiertem Pioglitazon behandelten Tieren. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

4. Ergebnisse

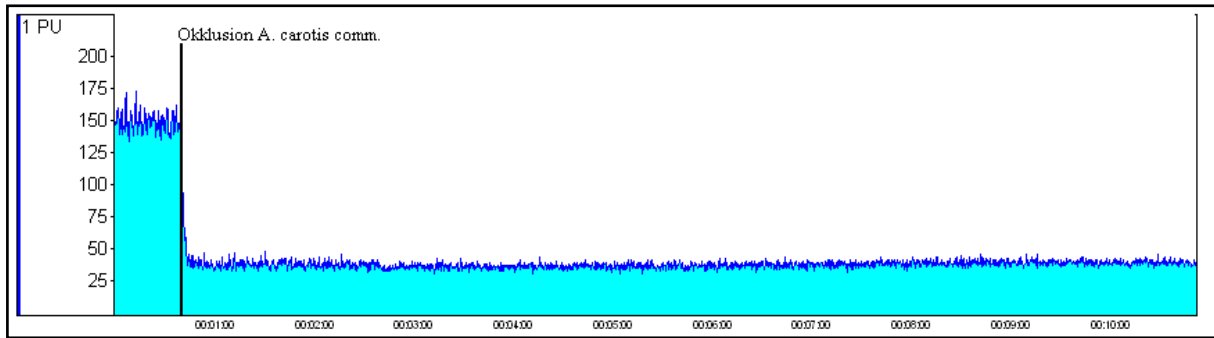


Abb. 12 Beispiel für Aufzeichnung des CBFs während 3-VO: Nach erfolgter Ligatur der A. carotis communis sinkt der zerebrale Blutfluss deutlich ab und steigt während der folgenden zehn Minuten nicht wieder an; Kurve eines Einzeltieres aus der mit Kontrolllösung behandelten Gruppe; y-Achse = Perfusion Units (PU); x-Achse = Zeit in Minuten

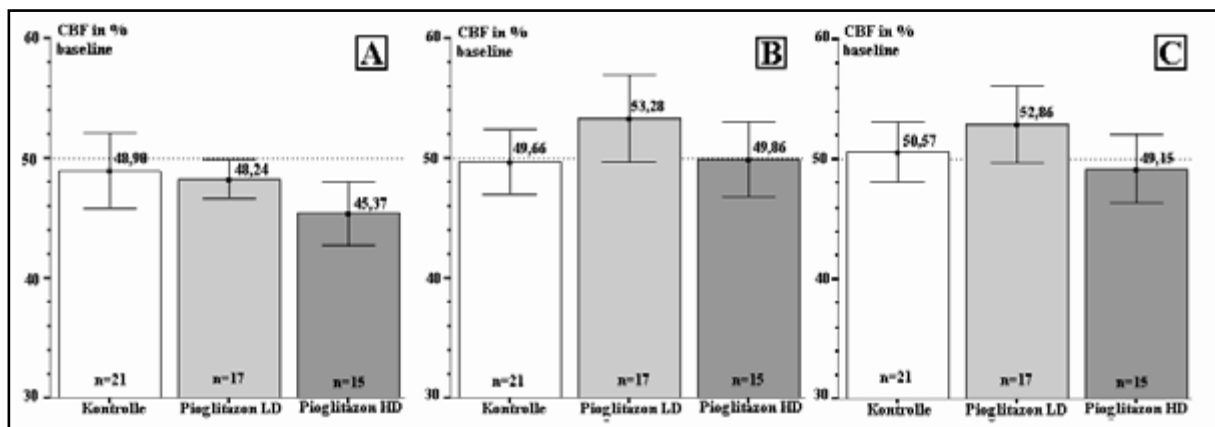


Abb. 13 CBF unmittelbar (A), 5 Minuten (B) und 10 Minuten (C) nach Okklusion der A. carotis communis: Die Balken geben den Gruppenmittelwert an; Der CBF steigt nie über 60% des Ausgangswertes an

Durch den Drei-Gefäßverschluss konnte also zusammenfassend zuverlässig eine dauerhafte Hypoperfusion des Gehirns erreicht werden.

4. 3. Latexangiographie

4. 3. 1. Heubnersche Anastomosen

Abbildung 14 illustriert beispielhaft die Latexangiographie auf der Seite der Heubnerschen Anastomosen. Diese wurden fotografiert und hinsichtlich Unterschieden zwischen den Gruppen qualitativ bewertet. Da aber die gleichmäßige Perfusion der Arterien nicht zuverlässig gewährleistet werden konnte, konnte keine sichere Aussage über das Verhalten der Heubnerschen Anastomosen getroffen werden. Die Latexperfusion eignet sich somit nicht zur deutlichen Darstellung dieser Gefäße.

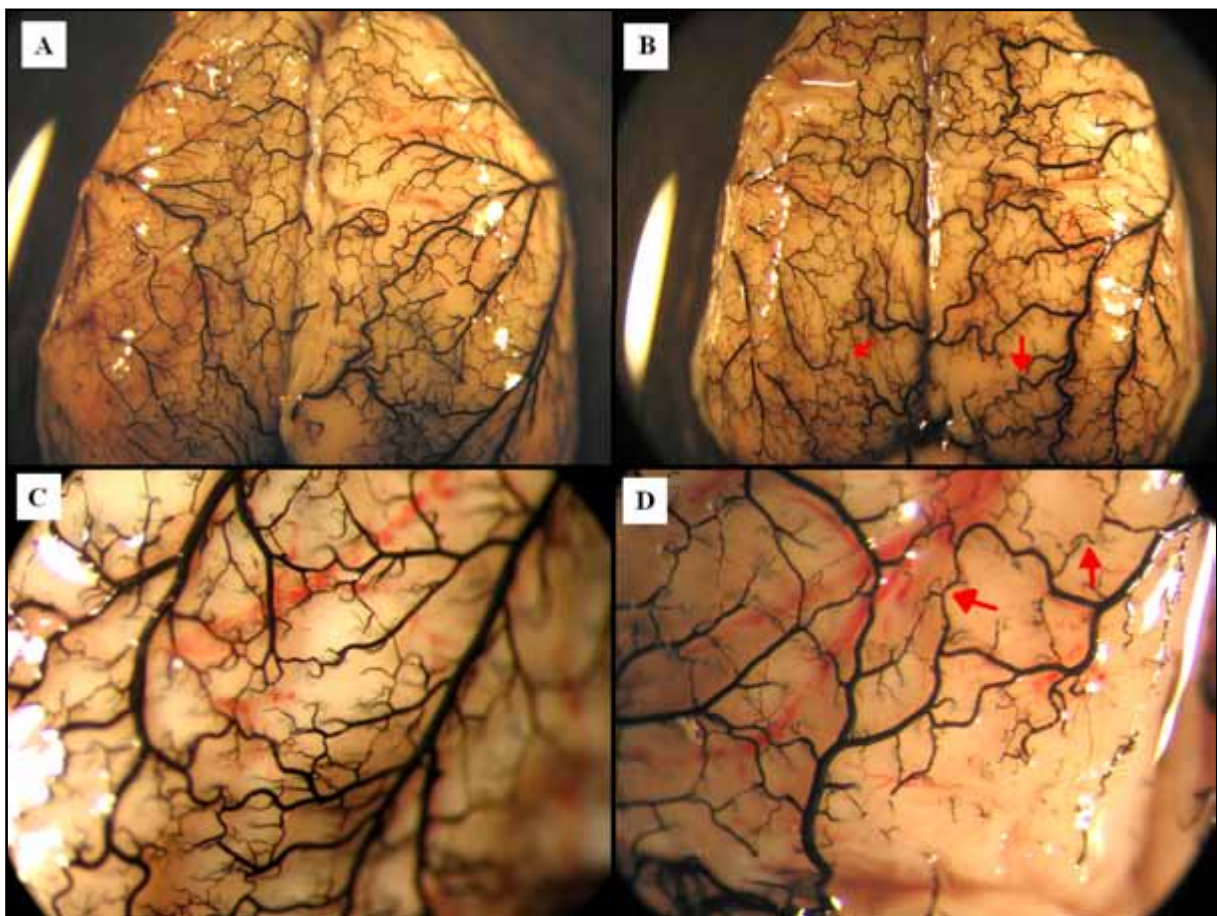


Abb. 14 Latexperfusion der Heubnerschen Anastomosen: Bild A und B zeigen die Oberfläche der beiden Hemisphären mit den perfundierten Arterien; die roten Pfeile in Bild B markieren Arterien, deren geschlängelte Form („tortuosity“) Hinweise auf arterielles Wachstum geben könnte. Bild C und D zeigt die Anastomosen vergrößert; die roten Pfeile in Bild D markieren Gefäße, die aufgrund schlechter Perfusion mangelhaft dargestellt sind.

4. 3. 2. Diameter der Gefäße des Circulus Willisii

Die Durchmesser aller Gefäße des Circulus Willisii sind in Tabelle 4 aufgelistet. Signifikante Unterschiede wurden überwiegend im Bereich der Arteria cerebri posterior (PCA) gefunden. Einzig die A. cerebri anterior der ipsilateralen Seite von mit Pioglitazon in niedriger Dosierung behandelten Tiere zeigte eine signifikante Vergrößerung des Diameters ($213,3 \pm 24,2 \mu\text{m}$) verglichen mit der entsprechenden Sham-Gruppe ($174,7 \pm 17,7 \mu\text{m}$). Im Folgenden werden daher nur die Diameter der PCA verglichen.

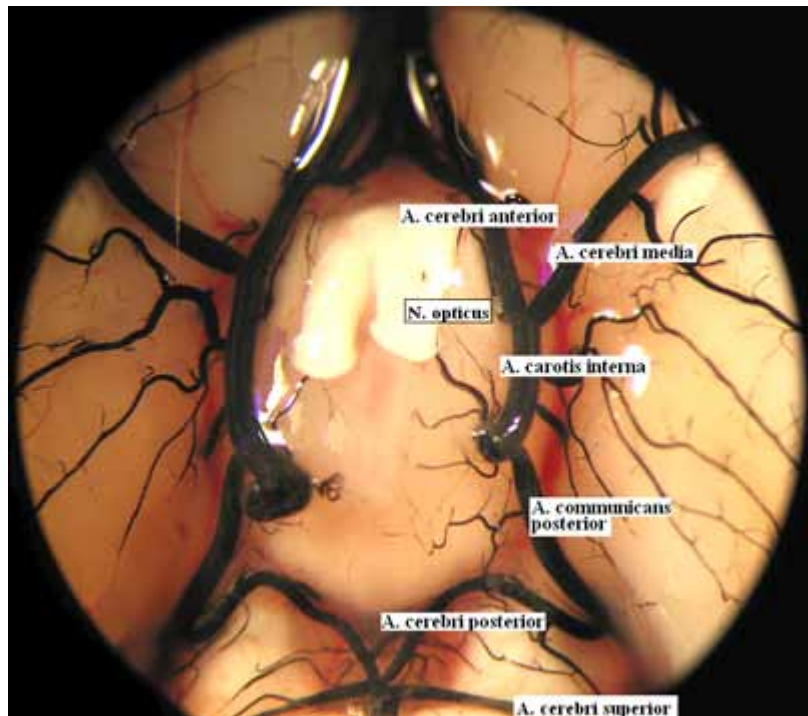


Abb. 15 Mittels Latexangiographie dargestellter Circulus Willisii

4. 3. 3. Diameter der *A. cerebri posterior*

Beim Vergleich der Gefäßdiameter von Tieren, die mit Pioglitazon behandelt wurden, fällt auf, dass diese sowohl ipsi- als auch contralateral signifikant kleiner (Pioglitazon LD: ipsilat. $203,3 \pm 30,5 \mu\text{m}$, contralat. $210,7 \pm 36,1 \mu\text{m}$; Pioglitazon HD ipsilat. $202,0 \pm 20,8 \mu\text{m}$, contralat. $207,0 \pm 27,2 \mu\text{m}$) sind als die der Tiere, die lediglich Kontrolllösung (ipsilat. $256,7 \pm 53,0 \mu\text{m}$, contral. $254,0 \pm 29,9 \mu\text{m}$) erhielten (Abb. 16 und Tab. 4).

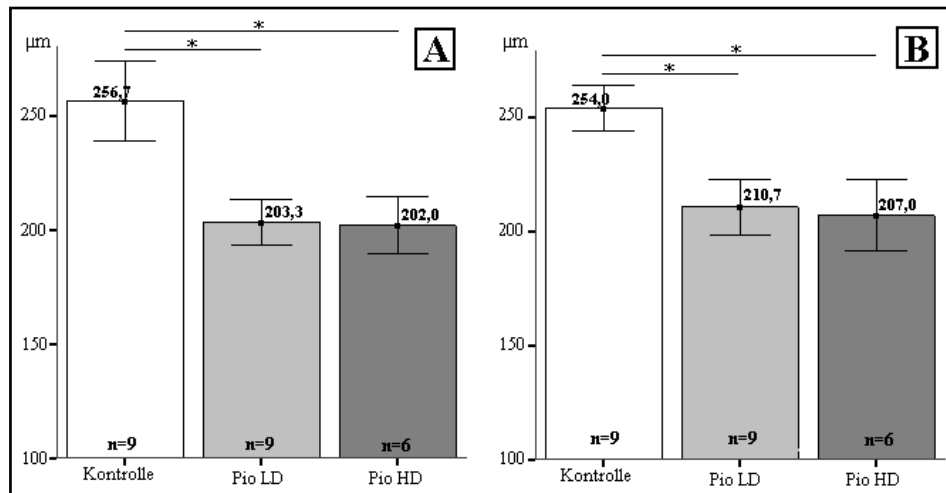


Abb. 16 Diameter der *A. cerebri posterior* ipsilateral (A) und contralateral (B) der 3-VO-Gruppen: Die Angaben sind Gruppenmittelwerte; $p \leq 0,01$

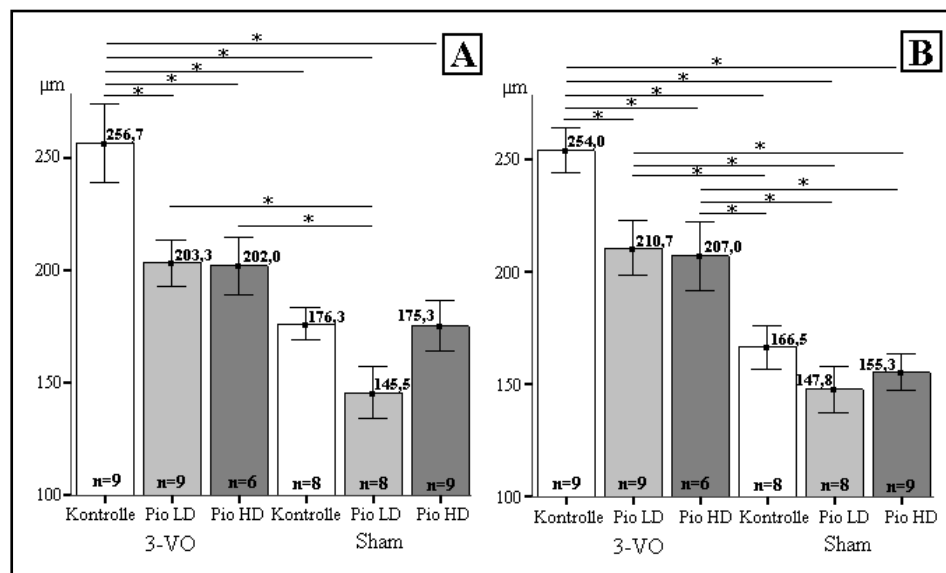


Abb. 17 Diameter der *A. cerebri posterior* ipsilateral (A) und contralateral (B): Die Angaben sind Gruppenmittelwerte; $p \leq 0,01$

4. Ergebnisse

Tab. 4 Durchmesser der Arterien des Circulus Willisii: Angaben in μm ; Angaben sind Gruppenmittelwerte mit Standardfehler; † = $p \leq 0,01$ 3-VO gegenüber Sham * = $p \leq 0,01$ Kontrolle gegenüber Pioglitazon LD resp. HD

	PCA		PCoA		ICA		MCA		ACA	
	ipsilat.	contralat.	Ipsilat.	contralat.	ipsilat.	contralat.	ipsilat.	contralat.	ipsilat.	contralat.
Kontrolle										
3-VO (n=9)	256,7±53,0†	254,0±29,9†	231,3±48,6	244,0±41,4	298,0±42,6	280,0±45,7	215,3±41,7	239,3±52,0	222,7±35,7	206,0±38,1
Pio LD										
3-VO (n=9)	203,3±30,5*†	210,7±36,1*†	202,7±15,5	222,7±37,0	271,3±15,5	282,7±33,6	194,7±17,3	214,7±25,9	213,3±24,2†	210,7±20,
Pio HD										
3-VO (n=6)	202,0±30,8*	207,0±38,1*†	191,0±33,6	199,0±30,5	277,0±27,5	274,0±17,7	207,0±37,7	215,3±33,2	229,0±54,1	212,0±26,2
Kontrolle										
Sham (n=8)	176,3±20,8	166,5±27,2	202,5±24,4	220,5±30,7	262,5±17,8	268,5±31,3	185,3±13,8	224,3±29,6	195,0±16,4	200,3±26,8
Pio LD										
Sham (n=8)	145,5±33,1	147,8±29,4	202,5±25,4	234,8±45,9	259,7±24,0	285,8±24,0	189,0±31,3	230,5±43,2	174,7±17,7	172,0±30,4
Pio HD										
Sham (n=9)	175,3±33,1	155,3±25,0	226,7±40,8	183,3±39,8	252,8±47,3	233,3±22,5	200,7±32,2	222,2±38,1	199,1±38,1	202,0±32,8

PCA: A. cerebri posterior, PCoA: A. communicans posterior, ICA: A. carotis interna, MCA: A. cerebri media, ACA: A. cerebri anterior, ipsilat.: ipsilateral, contralat.: contralateral, 3-VO: 3-Gefäßverschluss, HD: high dose, LD: low dose

4. Ergebnisse

Betrachtet man nun zusätzlich zum Vergleich die entsprechenden Sham-Gruppen, wird deutlich, dass zwar bei fast jeder Gruppe arterielles Wachstum stattgefunden hat, da die Durchmesser signifikant vergrößert sind, jedoch in wesentlich geringerem Umfang bei Tieren unter Pioglitazon-Behandlung. Bei Tieren, die hoch dosiert Pioglitazon erhielten, erreichte die Vergrößerung der ipsilateralen PCA ($202,0 \pm 30,8 \mu\text{m}$) gegenüber der Sham-Gruppe ($175,3 \pm 33,1 \mu\text{m}$) kein statistisch signifikantes Niveau.

Der Unterschied der Diameter der PCA innerhalb der verschiedenen Sham-Gruppen war nicht statistisch signifikant.

Zusammenfassend hat die Behandlung mit Pioglitazon, sowohl in niedriger als auch in hoher Dosierung, zu einer signifikanten Hemmung des arteriellen Wachstums im Bereich der A. cerebri posterior geführt.

Abbildung 18 illustriert die Verhältnisse am Beispiel der perfundierten PCA verschiedener Einzeltiere.



Abb. 18 Darstellung der A. cerebri posterior mittels Latexangiographie bei 3-VO- (links, A bis C) und Sham-operierten (rechts, D bis F) Tieren: Kontrolle, 3-VO (A), Pioglitazon LD, 3-VO (B), Pioglitazon HD, 3-VO (C), Kontrolle, Sham (D), Pioglitazon LD, Sham (E), Pioglitazon HD, Sham (F)

4. 4. Zerebrovaskuläre Reaktivität (CVR)

4. 4. 1. Blutgasanalyse, Blutglukosespiegel und Hämatokrit

Tabelle 5 zeigt die Messergebnisse der Blutgasanalyse. Zudem wurde der Blutglukosespiegel sowie der Hämatokrit vor und nach Messung der CVR ermittelt und dann aus beiden Werten der Mittelwert gebildet.

In allen Gruppen konnte ein deutlicher Anstieg des CO₂-Partialdruckes in der zweiten Probe (nach Acetazolamid-Applikation und CVR-Messung) und zudem ein Abfall des Blut-pH-Wertes nachgewiesen werden. Die gemessenen Werte bezüglich Blutglukose und Hämatokrit unterscheiden sich nicht zwischen den Gruppen. Die Behandlung mit Pioglitazon hat diese Werte somit nicht beeinflusst.

4. 4. 2. Vergleich der Reservekapazität zwischen den 3-VO-Gruppen

Drei Wochen nach dem Drei-Gefäßverschluss konnte bei Tieren, die mit Kontrolllösung behandelt worden waren, eine zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC) von 10,52±20,51% ermittelt werden. Dagegen war bei Tieren, die Pioglitazon in niedriger Dosierung erhalten hatten, keine CVR vorhanden. Der zerebrale Blutfluss sank im Verlauf der Messung sogar (-4,60±12,55%). Der Unterschied in der CVRC zwischen der Kontrollgruppe und der Pioglitazon-LD-Gruppe war statistisch signifikant.

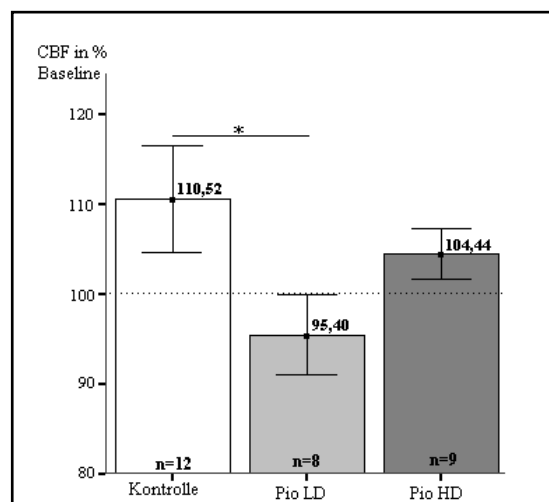


Abb. 19 Darstellung des CBFs und der CVRC von 3-VO-Tieren: Die Balken repräsentieren den Gruppenmittelwert. Als CVRC wird der Anstieg über den Ausgangswert (100%) definiert. $p \leq 0,05$

Tiere, die hoch dosiertes Pioglitazon erhalten hatten, zeigten mit $4,44 \pm 8,63\%$ zwar eine deutlich geringere CVRC als Tiere der Kontrollgruppe, jedoch erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz. (s. Abb. 19 und Tab. 5)

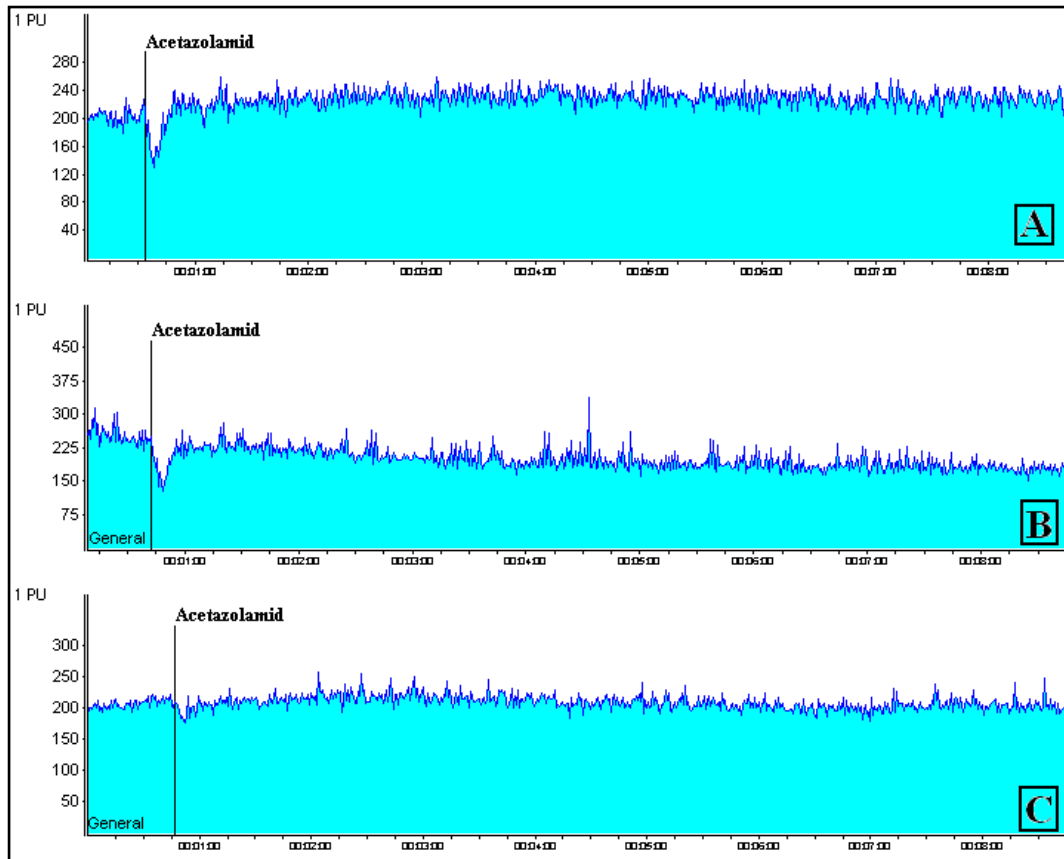


Abb. 20 Beispiele für Aufzeichnung des CBFs während Messung der CVRC: Das Kontrolltier (A) zeigt nach Applikation von Acetazolamid einen deutlichen, andauernden Anstieg des CBFs. Beim mit Pioglitazon in niedriger Dosierung behandelten Tier (B), kommt es zu keinem Anstieg des CBFs. Das Tier aus der Pioglitazon-HD-Gruppe (C) zeigt einen geringgradigen, kurzfristigen Anstieg. y-Achse = Perfusion Units (PU); x-Achse = Zeit in Minuten

4. Ergebnisse

Tab. 5 Ergebnisse der CVRC-Messung, Blutgasanalyse, Blutglukose- und Hämatokritbestimmung: Angaben sind Gruppenmittelwerte mit Standardfehler; † = $p \leq 0,05$ 3-VO gegenüber Sham, * = $p \leq 0,05$ Kontrolle gegenüber Pioglitazon LD resp. HD

	CVRC in %	pCO ₂ in mmHg		pH		pO ₂ in mmHg		Glukose in mmol/l	Hämatokrit in %
		Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2		
Kontrolle									
3-VO (n=12)	10,52±20,52	47,4±6,3	55,0±11,7	7,385±0,040	7,334±0,045	125,5±26,6	135,0±28,7	17,2±2,1	40,8±3,9
Pio LD									
3-VO (n=8)	4,60±12,55*†	52,0±7,2	64,6±8,3	7,357±0,036	7,289±0,045	99,4±21,2	107,0±17,1	19,8±1,3	40,4±2,4
PioHD									
3-VO (n=9)	4,44±8,63	38,8±5,5	55,5±4,3	7,422±0,020	7,331±0,023	126,3±21,8	125,2±16,0	16,3±1,5	38,6±2,6
Kontrolle									
Sham (n=10)	11,88±12,59	48,8±8,0	63,7±7,2	7,392±0,063	7,320±0,023	110,2±21,8	120,0±18,2	19,4±1,4	39,6±6,5
Pio LD									
Sham (n=10)	17,88±18,81	45,7±7,9	53,3±7,4	7,402±0,033	7,341±0,023	114,5±32,6	130,0±22,8	18,6±2,0	38,8±7,7
Pio HD									
Sham (n=10)	7,54±19,89	40,4±4,5	48,1±4,5	7,435±0,046	7,368±0,036	119,3±22,8	127,3±22,1	17,8±1,2	41,1±1,6

CVRC: Zerebrovaskuläre Reservekapazität, pCO₂: CO₂-Partialdruck, pO₂: O₂-Partialdruck, 3-VO: 3-Gefäßverschluss, HD: high dose, LD low dose, Probe 1: Vor der Acetazolamid-Applikation, Probe 2: Nach der Acetazolamid-Applikation

Abbildung 20 illustriert die Unterschiede zwischen den Gruppen anhand von drei Beispielkurven. Es wird deutlich, dass es bei Tieren der Pioglitazon-LD-Gruppe zu einem kontinuierlichen Abfall des CBFs während der Messung kommt. Demgegenüber bewirkt Acetazolamid bei Kontrolltieren einen deutlichen Anstieg des CBFs, der bis zum Ende der Messung erhalten bleibt. Bei Betrachtung der CBF-Kurve des Tieres mit HD-Pioglitazon-Behandlung fällt auf, dass es zwar als Folge der Acetazolamid-Gabe zu einem Anstieg kommt, dieser jedoch geringer ausfällt und bereits nach wenigen Minuten wieder abnimmt.

4. 4. 3. Vergleich der Reservekapazität zwischen den Sham-Gruppen

Bei den Sham-Gruppen kam es, wie zu erwarten, zu einem deutlichen Anstieg des zerebralen Blutflusses nach Acetazolamid-Applikation. Auch wenn der Anstieg bei Tieren, die Pioglitazon in hoher Dosierung erhalten hatten, geringer erscheint (s. Abb. 21), erreichten diese Befunde keine statistische Signifikanz. Abbildung 22 zeigt diesen Anstieg am Beispiel der Messkurven von drei Einzeltieren.

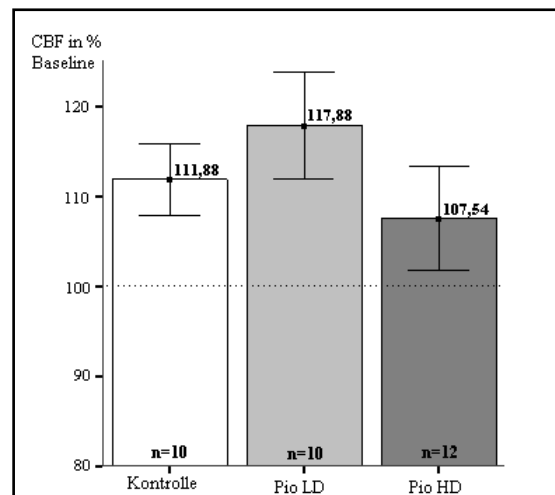


Abb. 21 Darstellung des CBFs und der CVR von Sham-operierten Tieren: Die Balken repräsentieren den Gruppenmittelwert. Als CVR wird der Anstieg über den Ausgangswert (100%) definiert. $p \leq 0,05$

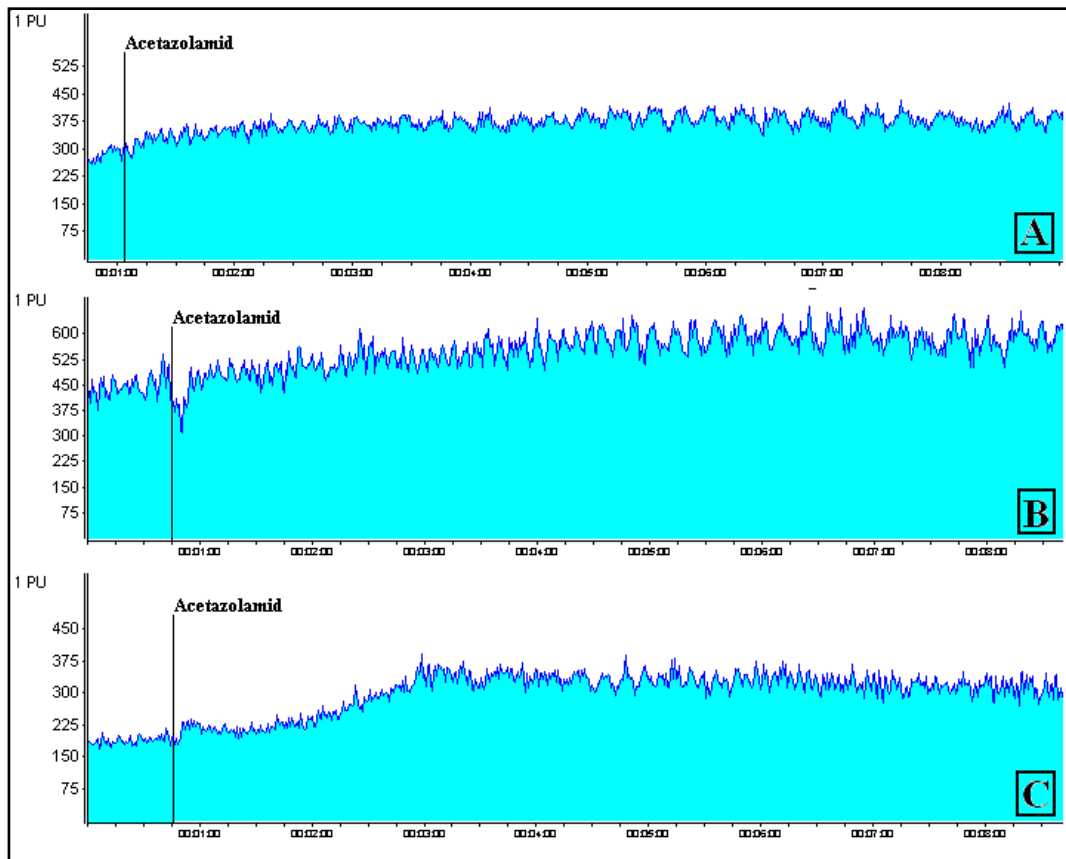


Abb. 22 Beispiele für Aufzeichnung des CBFs während Messung der CVRC: Sowohl das Kontrolltier (A), als auch das mit Pioglitazon in niedriger Dosierung behandelte Tier (B) und das Tier aus der Pioglitazon-HD-Gruppe (C) zeigen einen deutlichen Anstieg des CBFs nach Azetazolamid-Gabe. y-Achse = Perfusion Units (PU); x-Achse = Zeit in Minuten

4. 4. 4. Gesamtvergleich der Reservekapazität zwischen allen Gruppen

Beim Vergleich der Tiere, die einem Drei-Gefäßverschluss unterzogen wurden, mit den entsprechenden Sham-operierten Tieren, fällt auf, dass lediglich bei Pioglitazon-LD-Behandlung ein signifikanter Unterschied besteht (CBF bei 3-VO-operierten Tieren $95,4 \pm 12,55\%$, bei Sham-operierten Tieren $117,88 \pm 18,81\%$). Im Gegensatz dazu ist die CVRC bei der 3-VO-Kontrollgruppe ($10,52 \pm 20,51\%$) gegenüber der der entsprechenden Sham-Tiere ($11,88 \pm 12,59\%$) nur geringfügig reduziert. Hier ist es also innerhalb von drei Wochen zu einer fast vollständigen Wiederherstellung der CVRC gekommen.

4. Ergebnisse

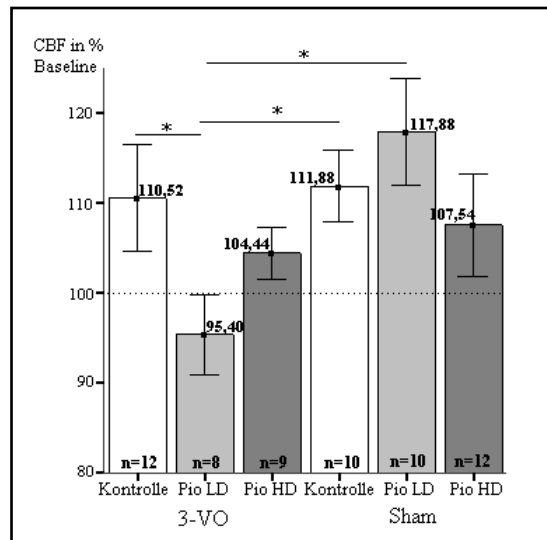


Abb. 23 Darstellung des CBFs und der CVRC aller Gruppen im Vergleich: Die Balken repräsentieren den Gruppenmittelwert. Als CVR wird der Anstieg über den Ausgangswert (100%) definiert. $p \leq 0,05$

Ähnliches gilt für die Pioglitazon-HD behandelte Gruppe, wobei hier die Differenz zwischen 3-VO- ($4,44 \pm 8,63\%$) und Sham-operierten Tieren ($7,54 \pm 19,88\%$) etwas größer ausfällt. Zudem ist zu berücksichtigen, dass der CBF bei den Sham-Tieren mit Pioglitazon-HD-Behandlung mit $107,54 \pm 19,88\%$ bereits deutlich unter dem von mit Kontrolllösung behandelten Sham-Tieren liegt. Hier kann also nur von einer teilweisen Wiederherstellung der zerebrovaskulären Reservekapazität gesprochen werden.

4. 5. Histologie

4. 5. 1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung konnte die Arteria cerebri posterior identifiziert werden. Je nach Lage des entsprechenden Schnittes waren zudem entweder die Arteria cerebri superior oder die Arteria communicans posterior oder auch alle drei Gefäße sichtbar. (Abb. 24 und Abb. 25)

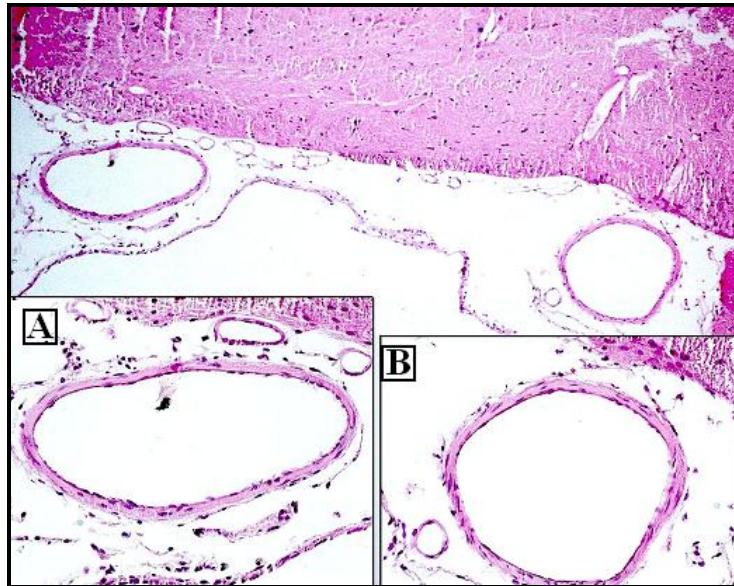


Abb. 24 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der A. cerebri posterior (A) und der A. cerebri superior (B)

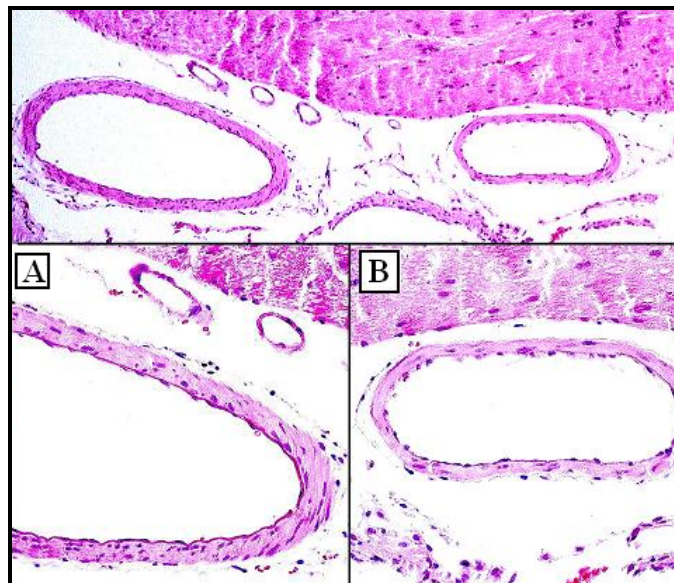


Abb. 25 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der A. communicans posterior (A) und der A. cerebri posterior (B)

4. 5. 2. α -SMC-Aktin-Färbung

Wie aus Tabelle 6 deutlich wird, konnten mit Hilfe der α -SMC-Aktin-Färbung Unterschiede in der Gefäßform und der Zellschichtung der A. cerebri posterior ermittelt werden. Bei Tieren aus der Kontrollgruppe wurde bei 100% der ausgewerteten Schnitte ein s-förmiger oder ovaler Anschnitt des Gefäßes aufgefunden. Des Weiteren zeigten diese Arterien in 96% der Fälle drei oder mehr Schichten von glatten Gefäßmuskelzellen in der Gefäßwand. Abbildung 26 zeigt dies beispielhaft anhand der PCA eines mit Kontrolllösung behandelten Tieres.

Tab. 6 Ergebnisse der qualitativen Analyse der α -SMC-Aktin-Färbung

	Ausgewertete Schnitte	Gefäßform			Anzahl der Zellschichten		
		s-förmig	Oval	Rund	>3	3	2 oder 1
Kontrolle	25	16 (64%)	9 (36%)	0 (0%)	13 (52%)	11 (44%)	1 (4%)
Pio LD	24	3 (12,5%)	12 (50%)	9 (37,5%)	0 (0%)	8 (33%)	16 (67%)
Pio HD	27	3 (11%)	9 (33%)	15 (56%)	0 (0%)	8 (30%)	19 (70%)
Unbeh.	26	5 (20%)	10 (38%)	11 (42%)	0 (0%)	13 (50%)	13 (50%)

Die ausgewerteten Schnitte der mit Pioglitazon behandelten Tiere zeigten dagegen in der überwiegenden Anzahl der Fälle einen ovalen oder kreisrunden Anschnitt (Pioglitazon LD: 87,5%, Pioglitazon HD: 89%). Außerdem wurde die Gefäßwand hier meist lediglich von zwei oder weniger Schichten glatter Gefäßmuskulatur gebildet (Pioglitazon LD: 67%, Pioglitazon HD: 70%). PCAs mit mehr als drei Gefäßmuskelschichten wurden nicht angetroffen.

Wie aus Tabelle 6 zudem ersichtlich und in Abbildung 27 beispielhaft illustriert, unterscheidet sich die Morphologie der PCA bei Tieren, die nach der 3-VO-Operation Pioglitazon erhalten hatten, nicht von der von Tieren, die keiner Operation unterzogen wurden.

Die gefundenen Veränderungen der Gefäßmuskulatur geben Hinweise darauf, dass die Proliferation der glatten Muskelzellen und damit das Gefäßwachstum unter Pioglitazon-Einfluss gehemmt ist.

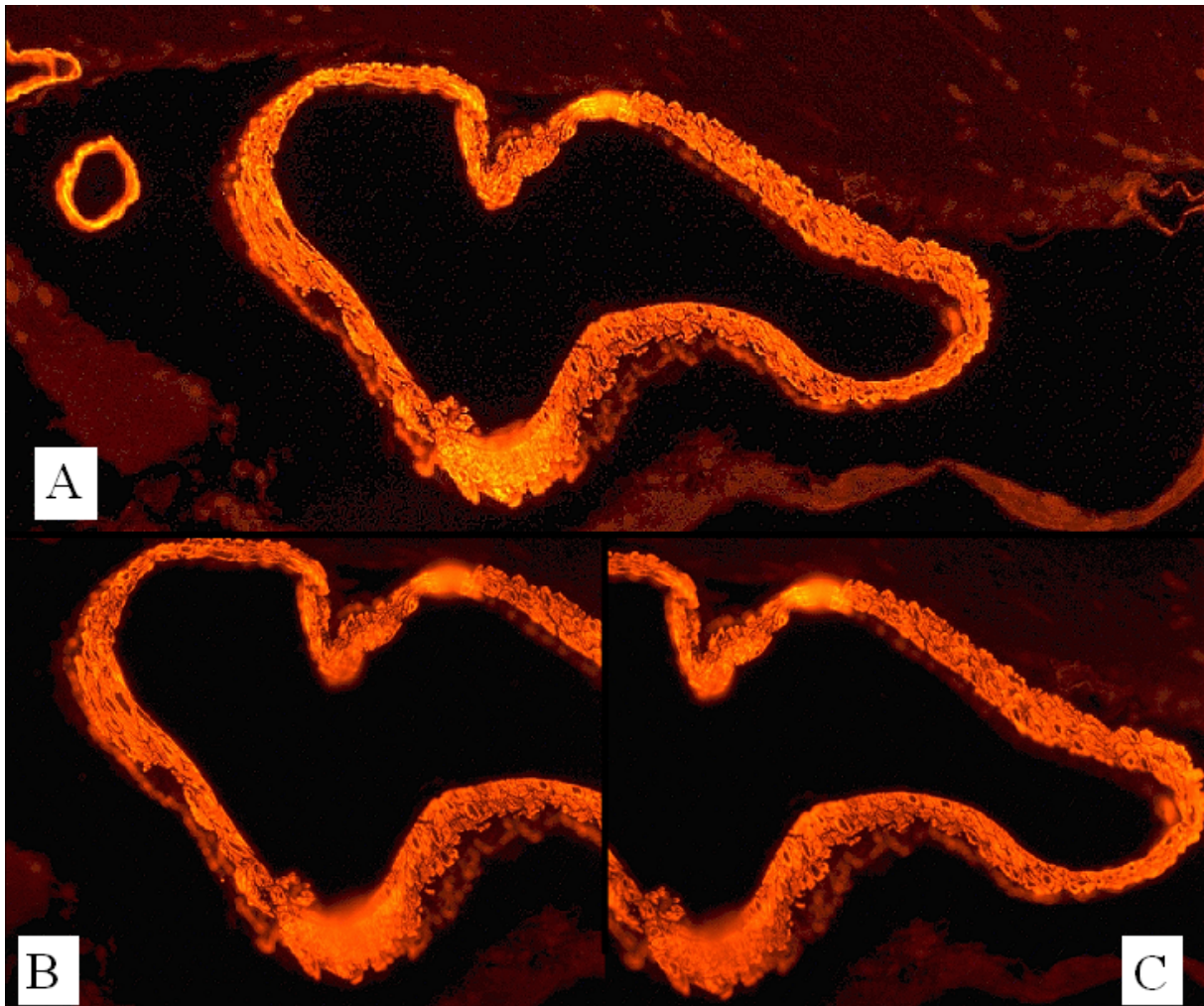


Abb. 26 Glatte Gefäßmuskulatur der A. cerebri posterior eines 3-VO operierten Kontrolltieres in 20facher (A) und 40facher (B, C) Vergrößerung: Die mit Hilfe des Cy3-markierten α -SMC-Aktin-Antikörpers glatten Muskelzellen leuchten im grünen Fluoreszenzlicht rot. In der 20fachen Vergrößerung (oben) ist deutlich der s-förmige Gefäßumriss erkennbar. Bei 40facher Vergrößerung lassen sich die einzelnen Zellschichten auszählen. Man erkennt, dass die Gefäßwand von mehr als drei übereinander liegenden Zellschichten gebildet wird.

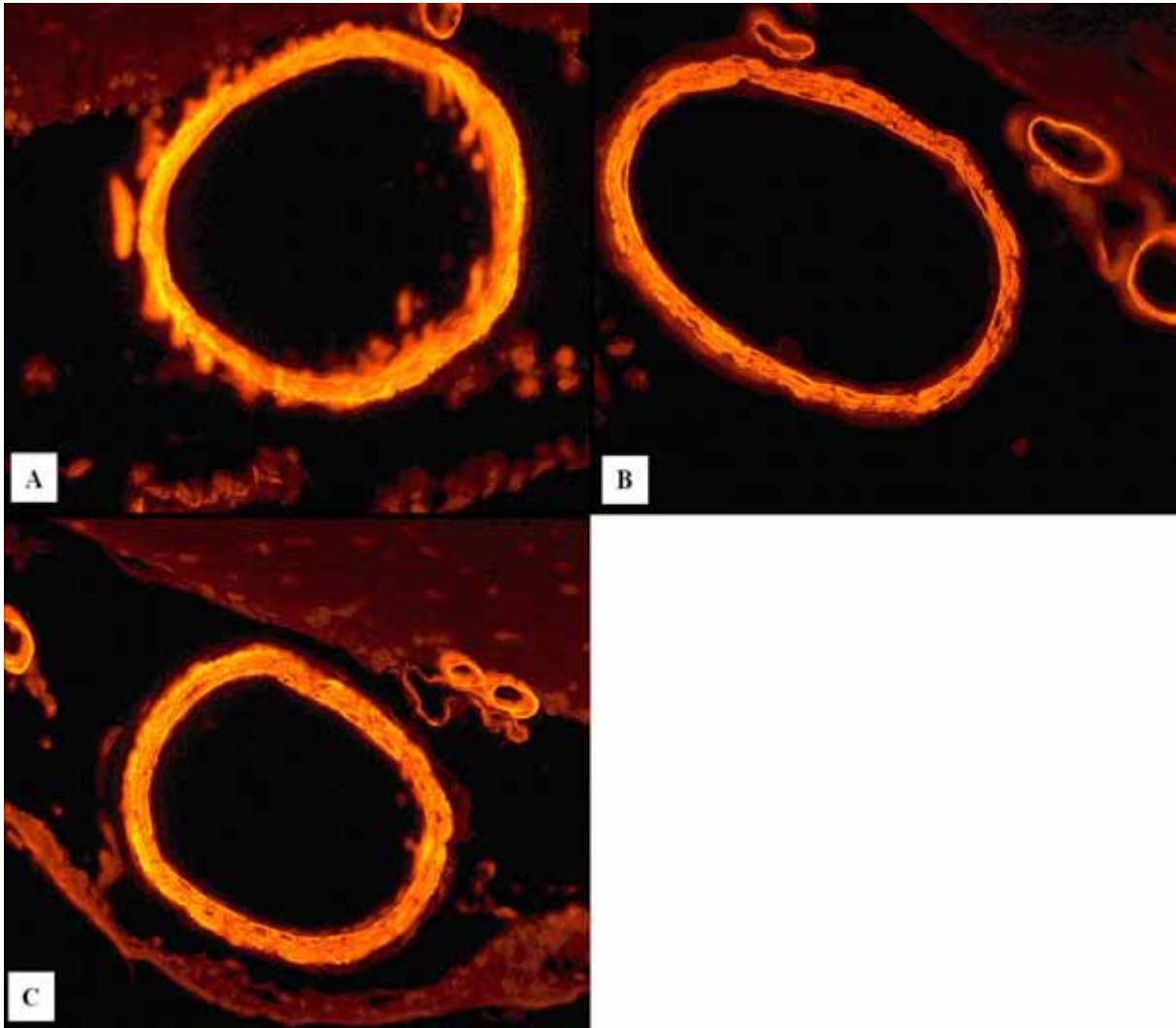


Abb. 27 Glatte Gefäßmuskulatur der A. cerebri posterior eines Pioglitazon LD (A) behandelten, eines Pioglitazon HD (B) behandelten 3-VO Tieres und eines unoperierten, unbehandelten Tieres (C) in 40facher Vergrößerung: Die mit Cy3-markiertem α -SMC-Aktin-Antikörper Gefäßmuskelzellen leuchten im grünen Fluoreszenzlicht rot, die Zellkerne sind nicht gefärbt und stellen sich schwarz dar. Die Aa. cerebri posteriores zeigen eine kreisrunde (A und C) bzw. leicht ovale (B) Form. Es sind maximal drei, meist nur zwei Schichten glatter Gefäßmuskelzellen sichtbar.

5. Diskussion

5. 1. Evaluierung der eingesetzten Methoden

5. 1. 1. Erzeugung einer zerebralen Hypoperfusion durch den Drei-Gefäßverschluss

Wie in Kapitel 4.2.3. erläutert, konnte durch den Verschluss der beiden Aa. vertebrales und der linken A. carotis communis zuverlässig eine Hypoperfusion des Gehirns gewährleistet werden. Dies führt zu Änderungen im zerebralen Blutfluss, die den Umbau der Gefäße des Circulus Willisii, besonders der A. cerebri posterior, nach sich ziehen. Im Gegensatz dazu führt der Verschluss nur einer A. carotis communis (One vessel occlusion, 1-VO) oder beider Aa. carotides communes (Two vessel occlusion, 2-VO) zwar auch zu einem Abfall des zerebralen Blutflusses. Dieser ist jedoch nicht von Dauer und wird innerhalb weniger Minuten durch Vasodilatation der verbleibenden Gefäße wieder ausgeglichen. Daher kann mit diesen beiden letztgenannten Methoden das Wachstum der zerebralen Kollateralgefäße nicht sicher induziert werden (Schneeloch et al., 2004).

Es ist mehrfach beschrieben worden, dass die durch den Drei-Gefäßverschluss hervorgerufene Minderperfusion des Gehirns nicht zu histologisch nachweisbaren Gewebeschäden führt. Es entsteht also keine Hypoxie, die den Untergang von Nervenzellen zur Folge hätte, wie es bei einem Schlaganfall zu erwarten wäre. Dementsprechend sind bei den Tieren auch keine neurologischen Ausfallserscheinungen (Ataxie, Kreisbewegungen) zu beobachten, was auch in dieser Studie bestätigt werden konnte (Busch et al., 2003; Schneeloch et al., 2004).

Das Modell des Drei-Gefäßverschlusses ist somit geeignet, den Zustand vor einem Schlaganfall zu simulieren und Arteriogenese im Gehirn der Ratte zu induzieren (Kawata et al., 1996).

5. 1. 2. Bewertung des induzierten Gefäßwachstums und Vergleichbarkeit mit dem Menschen

Durch die 3-VO-Operation ließ sich Arteriogenese im Gehirn induzieren, was vor allem anhand der Erweiterung der A. cerebri posterior deutlich wurde (Kapitel 4.3.3.).

Die Heubnerschen Anastomosen konnten mittels Latexangiographie nicht zuverlässig dargestellt werden und wurden somit keiner quantitativen Auswertung zugeführt. Die gefundenen Veränderungen (Kapitel 4.3.1.) waren recht undeutlich und unregelmäßig.

Ähnliche Ergebnisse beschreiben Busch et al., die den Heubnerschen Anastomosen dementsprechend keine zentrale Rolle bei der kollateralen Versorgung zuschreiben (Busch et al., 2003).

Der Circulus Willisii des Menschen ähnelt in seinem Aufbau sehr stark dem der Ratte. Somit lässt sich vermuten, dass auch das Wachstum der Arterien des Ringes einem ähnlichen Muster folgt. Dies bestätigt die Studie von Reiche et al., in der die Proliferation von Kollateralgefäßen nach arteriellen Stenosen beschrieben ist. Hier zeigt sich, dass die Wiederherstellung des zerebralen Blutflusses überwiegend auf Vergrößerung der Arterien des Circulus Willisii zurückzuführen ist. Die Heubnerschen Anastomosen tragen, wie bei der Ratte, wenig dazu bei (Reiche et al., 1997).

Das Drei-Gefäßverschluss-Modell in der Ratte ist somit geeignet, die zerebralen Blutflussverhältnisse und die folgenden Umbauprozesse nach einer arteriellen Stenose beim Menschen zu simulieren.

5. 1. 3. Bestimmung der Gefäßdiameter mittels Latexangiographie

Zur exakten Bestimmung der Gefäßdiameter mittels Latexangiographie ist es zunächst wichtig, die Arterien vor Applikation maximal zu dilatieren, um die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen zu gewährleisten. Dies wurde durch intraarterielle Papaverin-Injektion erreicht. Nachfolgend muss das arterielle Gefäßsystem ausreichend mit heparinisierte Kochsalzlösung gespült werden, um die Blutgerinnung in den Arterien zu vermeiden. Die flüssige Latexmilch muss zwingend mit einem kontinuierlichen Druck, der den arteriellen Blutdruck nicht übersteigt, perfundiert werden, da die Gefäße anderenfalls künstlich dilatiert würden.

Wird zudem darauf geachtet, dass ausreichender venöser und arterieller Abfluss vorhanden ist indem sowohl die A. carotis communis als auch das rechte Herzohr eröffnet werden, können die Gefäße des Circulus Willisii zuverlässig dargestellt und ausgemessen werden.

5. 1. 4. Bestimmung der zerebralen Blutversorgung

Die Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität erfolgte analog zu der auch beim Menschen durchgeführten Methode (Stoll/Hamann, 2002) mit Hilfe von Acetazolamid-Applikation. Busch et al. verwenden dagegen die Beatmung mit CO₂, um eine zerebrale Vasodilatation herbeizuführen (Busch et al., 2003). Hierbei muss ein Tubus eingeführt und die Spontanatmung ausgeschaltet werden, um die künstliche Beatmung mit verschiedenen CO₂-Anteilen in der Atemluft zu ermöglichen. Durch diesen invasiven Eingriff kann es zu Schwankungen des arteriellen Blutdrucks kommen, der Ungenauigkeiten in der Messung des zerebralen Blutflusses zur Folge haben kann, zumal der CBF unmittelbar vom arteriellen Blutdruck abhängig ist.

Die Bestimmung der zerebrovaskulären Vasoreaktivität mittels CBF-Messung nach Acetazolamid-Applikation ist der Ermittlung durch transkraniellen Doppler gleichwertig (Dahl et al., 1992).

Der Einsatz von Acetazolamid, das einfach über einen venösen Zugang appliziert werden kann, macht ein solches aufwendiges Vorgehen überflüssig. Wie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde, lässt sich durch Acetazolamid zuverlässig ein Anstieg des pCO₂ und ein Abfall des Blut-pH-Wertes erreichen, was die Vasodilatation zerebraler Gefäße und somit den Anstieg des CBFs nach sich zieht. Bleibt dieser Anstieg aus, hat das gehemmte Kollateralwachstum einen Funktionsverlust zu Folge gehabt, da die arteriellen Gefäße nicht mehr in der Lage sind mit Vasodilatation auf einen Anstieg des pCO₂ und einen Abfall des Blut-pH-Wertes zu reagieren.

Wie Démolis et al. beschreiben, ist eine Dosierung von 21mg/kg Acetazolamid, als einmalige Bolusinjektion gegeben, ausreichend, um bei der Ratte eine maximale Vasodilatation hervorzurufen (Démolis et al., 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sogar 30mg/kg eingesetzt, um die größt mögliche Gefäßerweiterung sicherzustellen.

Durch das kontinuierliche Monitoring des mittleren arteriellen Blutdrucks kann ausgeschlossen werden, dass dieser den CBF beeinflusst hat.

Die natürlich auftretenden Schwankungen innerhalb der Gruppen, die sich aufgrund biologischer Unterschiede der einzelnen Tiere ergeben, wurden durch eine ausreichende Gruppengröße ausgeglichen, so dass statistisch signifikante Unterschiede ermittelt werden konnten.

Somit ist die in dieser Studie durchgeführte Evaluierung der CVR durch Acetazolamid-Applikation geeignet, um die Auswirkungen des Kollateralwachstums auf die Funktionsfähigkeit der arteriellen zerebralen Gefäße zu beurteilen.

5. 1. 5. Beurteilung der Gefäßmuskulatur mittels Immunhistochemie

Nachdem die A. cerebri posterior durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung identifiziert wurde (Kapitel 4.5.1.), konnten die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur mit Hilfe der α -SMC-Aktin-Färbung sicher für die Beurteilung der Form der PCA dargestellt werden. Die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hoechst-Reagenz ermöglichte die genaue Auszählung der Zellschichten.

Zwar handelt es sich hierbei um eine rein qualitative Erhebung, die keiner statistischen Auswertung unterzogen werden konnte, dennoch waren die erhobenen Befunde eindeutig.

5. 2. Auslegung und Bewertung der ermittelten Ergebnisse

5. 2. 1. Hoch dosierte Pioglitazon-Gabe führt zu einer Zunahme des Körpergewichts

Die Gewichtszunahme ist eine beim Menschen häufig beobachtete Nebenwirkung der Glitazon-Therapie (Macfarlane et al., 2007). Wie in Kapitel 4.1.2. beschrieben, zeigten Tiere, die Pioglitazon in hoher Dosierung erhalten hatten, ebenfalls eine solche Steigerung des Körpergewichts und dies bereits während des relativ kurzen Behandlungszeitraums von drei Wochen.

In der Literatur wird als Ursache hierfür oftmals auf die gesteigerte Einlagerung von Flüssigkeit im Gewebe, sowie die unter PPAR- γ -Aktivierung beobachtete Hämodilution verwiesen (Kyriluk/Isom, 2007; Touyz/Schiffirin, 2007). Diese Theorie wird im folgenden Abschnitt (5.2.2.) eingehender betrachtet.

Es wurde allerdings auch eindeutig nachgewiesen, dass die Einnahme von Glitazonen zu einer Vermehrung des Fettgewebes überwiegend im Bereich der subkutanen Fettdepots führt. Es kommt somit nicht wie bei anderen oralen Antidiabetika (z. B. Metformin) zu einer Reduktion der Körpermasse, sondern lediglich zu einer Umverteilung des Fettgewebes (Hwang et al., 2008).

Diese Eigenschaft der Glitazone steht im Gegensatz zu den Zielen einer effektiven Diabetes-mellitus-Therapie, da die Gewichtsabnahme hier eine zentrale Rolle spielt.

5. 2. 2. Kein Einfluss von Pioglitazon auf Hämatokrit und Blutglukosespiegel

In der vorliegenden Studie konnte keinerlei Einfluss der Behandlung mit Pioglitazon auf den Blutglukosespiegel nachgewiesen werden (Kapitel 4.4.1.). Da zur Untersuchung jedoch gesunde Tiere ohne gestörten Glukosemetabolismus herangezogen wurden, war dieser Befund zu erwarten.

Des Weiteren zeigte die Pioglitazon-Applikation weder in niedriger noch in hoher Dosierung Einfluss auf den gemessenen Hämatokrit (Kapitel 4.4.1.). Dieser Befund steht im Gegensatz zu Veröffentlichungen, die eine Hämodilution unter Glitazon-Einfluss beschreiben. Vielfach ist beschrieben worden, dass das durch Verdünnung vergrößerte Blutvolumen ursächlich für das unter der Therapie mit Glitazonen gehäuft auftretende Herzversagen ist (Kiryluk/Isom, 2007; Touyz/Schiffirin, 2007).

Tang und Maroo (2007) widersprechen jedoch dieser Hypothese, da die Hämodilution, wenn überhaupt nachweisbar, dann geringgradig sei. Zudem weisen sie darauf hin, dass Flüssigkeitsretention nicht zwangsläufig in Herzversagen resultiere (Tang/Maroo, 2007; Hollenberg, 2003). Ebenso konnten Berria et al. zwar einen leicht verringerten Hämoglobin-Gehalt des Blutes und einen geringgradig reduzierten Hämatokrit messen, sie ermittelten jedoch keine Zunahme des totalen Körperwassergehaltes. Daher scheint diese Veränderung des roten Blutbildes nicht durch Hämodilution bedingt zu sein (Berria et al., 2007). Somit erscheint eine „Überladung“ des Herz-Kreislaufsystems als Ursache für Glitazon-bedingtes Herzversagen eher unwahrscheinlich.

Damit im Einklang stehen die in der vorliegenden Studie erhobenen Befunde, denn trotz Applikation einer Pioglitazon-Dosierung, die die Maximaldosis beim Menschen um ein Vielfaches übersteigt, konnte keine Hämodilution hervorgerufen werden.

Die Frage nach der Ursache für das unter Glitazon-Therapie vielfach auftretende Herzversagen, bleibt somit weiterhin unbeantwortet.

5. 2. 3. 3-VO induziert Kollateralwachstum in der PCA

Der Verschluss zweier Aa. vertebrales und einer A. carotis communis hat in der durchgeführten Studie, wie in der Literatur beschrieben, zur Erweiterung der A. cerebri posterior geführt (Kapitel 4.3.3.). Diese Erweiterung des Durchmessers war ipsi- und contralateral gleich stark ausgeprägt. Alle anderen Gefäße zeigten keine deutliche Änderung des Diameters, was im Gegensatz zu einer Studie von Busch et al. steht. Hier hatte man sowohl eine Erweiterung des Diameters im Bereich der PCA als auch im Bereich der ACA ermittelt (Busch et al., 2003).

Diese Unterschiede in der Vergrößerung des Durchmessers der Kollateralgefäße lassen sich durch die biologische Varianz der in den Studien verwendeten Tiere erklären. Sie sind für die weiteren Analysen jedoch nicht von Bedeutung, da hier nur die Ergebnisse von Tieren der vorliegenden Studie zur Auswertung herangezogen wurden.

Das Wachstum der PCA hat zudem zu einer Wiederherstellung der funktionalen zerebralen Blutversorgung geführt, die mithilfe der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität bestimmt wurde (Kapitel 4.4.4.). Unmittelbar nach dem Drei-Gefäßverschluss kann keine CVRC gemessen werden, da alle zerebralen Gefäße maximal dilatiert sind, um die Hypoperfusion auszugleichen. 21 Tage nach 3-VO-Operation zeigten die Tiere, die Kontrolllösung erhalten hatten, eine CVRC, die mit der entsprechenden Sham-Gruppe identisch war. Innerhalb von drei Wochen konnte somit der verschlussbedingte Funktionsverlust vollständig ausgeglichen werden.

5. 2. 4. Pioglitazon hemmt das Wachstum der PCA nach 3-VO-Operation

Wie in Kapitel 4.3.3. beschrieben, wurde unter Pioglitazon-Behandlung zwar auch eine Vergrößerung im Diameter der PCA gegenüber den entsprechenden Sham-Gruppen beobachtet, jedoch war diese signifikant geringer als bei Tieren, denen kein Pioglitazon verabreicht worden war. Die Applikation von Pioglitazon hat somit eindeutig zu einer Hemmung der zerebralen Arteriogenese geführt. Dabei war der Grad der Hemmung unabhängig von der Höhe der eingesetzten Dosierung.

Über den Einfluss von Glitazonen auf das Kollateralwachstum gab es bislang keinerlei Untersuchungen. In verschiedenen Studien wurde lediglich der Einfluss der Glitazon-Therapie auf atherosklerose-bedingte Proliferation der Gefäßwand beobachtet (Hirano et al., 2008; Park et al., 2007).

Diese veröffentlichten Befunde ließen die Annahme zu, dass Glitazone ebenso einen hemmenden Einfluss auf das Kollateralwachstum haben könnten, was durch die vorliegende Studie bestätigt wurde.

5. 2. 5. Pioglitazon vermindert die zerebrovaskuläre Reservekapazität

Zwar konnte mit Hilfe der Bestimmung der Diameter der PCA nachgewiesen werden, dass Pioglitazon zu einer Hemmung des Kollateralwachstums führte, jedoch stellte sich die Frage, ob dies auch in einem Funktionsverlust hinsichtlich der zerebralen Durchblutung resultieren würde.

Um dies zu klären, wurde die zerebrovaskuläre Reservekapazität bestimmt (Kapitel 4.4.4.). Während es bei Tieren, die lediglich mit Kontrolllösung behandelt wurden, zu einer vollständigen Wiederherstellung der CVRC kam, zeigten Tiere, die mit Pioglitazon in niedriger Dosierung behandelt worden waren, gar keine CVRC. In der Gruppe mit hochdosierter Pioglitazon-Behandlung konnte zwar eine geringe CVRC gemessen werden, dennoch lag auch diese deutlich unter der Reservekapazität der Kontrollgruppe. Somit hatte die Hemmung der zerebralen Arteriogenese einen direkten Funktionsausfall in der zerebralen arteriellen Blutversorgung zur Folge.

Die zerebrovaskuläre Reservekapazität wird beim Menschen im Rahmen der Diagnostik zerebraler Perfusionsstörungen ermittelt (Stoll/Hamann, 2002). Als Vorstufe des irreversiblen Schlaganfalls werden häufig transitorische ischämische Attacken (TIA) angesehen. Hierbei kommt es zu einer reversiblen Durchblutungsstörung bestimmter Gehirnareale. Je nach betroffenem Gebiet zeigen die Patienten Symptome wie monokulare Blindheit (Amaurosis fugax), Schwindel, Erbrechen, Ataxien, Sprech- und Schluckstörung. Diese Symptome gehen innerhalb von 24 Stunden zurück (Poeck/Hacke, 2006). Halten sie darüber hinaus bis zu drei Wochen an, spricht man von einem prolongierten reversiblen ischämischen neurologischen Defizit (PRIND) (Delank/Gehlen, 2006). Patienten, bei denen eine TIA oder ein PRIND aufgetreten sind, haben ein erhöhtes Risiko innerhalb der nächsten Monate einen Schlaganfall zu erleiden (Poeck/Hacke, 2006).

Patienten, die unter TIAs oder PRINDs leiden, können eine reduzierte zerebrovaskuläre Reservekapazität zeigen (Stoll/Hamann, 2002). Somit wird deutlich, dass die CVR ein Indiz für die Wahrscheinlichkeit ist, einen zerebralen ischämischen Infarkt zu erleiden (Reiche et al., 1997), da der Grad der Reservekapazität umgekehrt proportional zur Schwere des Infarktvolumens ist (Stoll/Hamann, 2002). Es kann also geschlussfolgert werden, dass das Risiko eines Schlaganfalls bei Tieren, die nach der 3-VO-Operation mit Pioglitazon behandelt wurden, höher liegt, als das von Tieren der Kontrollgruppe. Die Bedeutung dieses Befundes für die Schlaganfalltherapie des Menschen wird in Kapitel 5.5.1. eingehender diskutiert.

5. 2. 6. Pioglitazon hemmt die Proliferation glatter Muskelzellen

Die immunhistologische Markierung der glatten Gefäßmuskelzellen im Bereich der A. cerebri posterior mittels eines Cy3-markierten α -SMC-Aktin-Antikörper zeigte deutlich, dass die Muskelzellschicht bei Tieren, die einer Pioglitazonbehandlung unterzogen wurden weniger Zellschichten aufweist, als bei Tieren der Kontrollgruppe. Dies lässt sich auf eine Hemmung der Proliferation der glatten Muskelzellen zurückführen.

Die Tatsache, dass durch PPAR- γ -Aktivierung die Zellteilung von Gefäßmuskelzellen unterbunden wird, ist bereits in der Literatur beschrieben worden. Dabei führt der Einsatz von PPAR- γ -Agonisten vermutlich zu einer Arrettierung des Zellteilungszyklus durch das Ausbleiben der Retinoblastom-Phosphorylierung im Übergang von der R1- zur S-Phase (de Dios et al., 2003; Wakino et al., 2000).

Des Weiteren inhibiert die PPAR- γ -Aktivierung die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen (Goetze et al., 2001), die bei der Arteriogenese ebenfalls von wesentlicher Bedeutung ist. Diese Wirkung wurde auch speziell für Pioglitazon nachgewiesen. Jedoch ist der Mechanismus noch unklar, da es sich offenbar um einen PPAR- γ -unabhängigen Effekt handelt (Li et al., 2008).

Zudem wurden Unterschiede in der Form des Gefäßanschnitts gefunden. Tiere der Kontrollgruppe zeigten überwiegend einen s-förmigen Anschnitt, während sich die PCA bei Pioglitazon behandelten Tieren meist rund bis oval darstellte. Dies lässt sich auf die Unterschiede des kollateralen Wachstums zurückführen. Beim arteriogenen Gefäßwachstum kommt es nicht nur zu einer Zunahme des Durchmessers, das Gefäß wächst zudem auch in die Länge. Da die Endpunkte des Gefäßes jedoch fixiert sind, entsteht ein schlangenförmiges Erscheinungsbild des Blutgefäßes („tortuosity“, Schaper, 2004) (siehe auch Kapitel 4.3.1.), Heubnersche Anastomosen). Im Anschnitt stellt sich die PCA daher oft s-förmig dar. Aufgrund der gehemmten Arteriogenese bei Pioglitazon-Behandlung fehlt hier diese typische Morphologie.

5. 2. 7. Weitere mögliche Ursachen für die Hemmung der Arteriogenese durch Pioglitazon

Die zahlreichen Einflüsse von PPAR- γ -Agonisten auf die Zellen der Gefäßwand sind bereits in Kapitel 2.4.3. näher erläutert worden. Des Weiteren wurde besprochen, wie bedeutsam viele dieser Prozesse für den Vorgang der Arteriogenese sind.

Auch wenn in dieser Studie der Zusammenhang nicht spezifisch untersucht wurde, kann dennoch davon ausgegangen werden, dass Faktoren, wie die Hemmung der endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen und die Reduzierung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie MCP-1 und MMP-9 zur Inhibierung des Kollateralwachstums durch Pioglitazon beigetragen haben, da diese im Rahmen der Arteriogenese eine zentrale Rolle spielen (Buschmann et al., 2003; Heil et al., 2004; Hillmeister et al., 2008; Nagel et al., 1994; Schaper/Scholz, 2003).

5. 3. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Die Gemeinsamkeiten von Mensch und Ratte hinsichtlich des zerebralen Kollateralwachstums wurden bereits in Kapitel 5.1.2. hinreichend erläutert. Ebenso wurde darauf hingewiesen, dass die Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität in ähnlicher Form auch in der Humanmedizin zur Diagnose von Störungen der arteriellen Blutversorgung des Gehirns Anwendung findet (Stoll/Hamann, 2002). Die eingesetzte Dosierung von 2,8mg/kg bei der Ratte wurde unmittelbar unter Einbeziehung des metabolischen Körpergewichts (Frey/Löscher, 2002) aus der üblichen maximalen Humandosierung von 45mg berechnet. Die bei den Tieren eingesetzte Dosis von 10mg/kg überschreitet zwar diese Humandosis um ein Vielfaches, jedoch wurde diese hohe Dosis lediglich herangezogen, um beurteilen zu können inwiefern die erhobenen Befunde eine Dosisabhängigkeit aufweisen.

Da somit sowohl die eingesetzten Methoden zur Ergebnisermittlung als auch die Art und Dosierung der Medikation grundsätzlich mit dem Menschen verglichen werden kann, kann vermutet werden, dass sich die ermittelten Ergebnisse in die Humanmedizin übertragen lassen könnten.

5. 4. Konsequenzen für die Therapie des Diabetes mellitus Typ II

5. 4. 1. Vergleich von Glitazonen mit anderen oralen Antidiabetika

Die verschiedenen Klassen oraler Antidiabetika sind bereits in Kapitel 2.2.4. beschrieben worden. Direkt vergleichbar mit den Glitazonen ist davon einzig Metformin, da es wie die PPAR- γ -Agonisten eine erhöhte Insulin-Sensibilität bewirkt und somit zu den Insulin-Sensitizern zählt.

Die klinische Wirksamkeit von Metformin, das für die Therapie von Typ II Diabetes mellitus zugelassen ist, wurde in der UK Prospective Diabetes Studie (UKPDS) eindeutig nachgewiesen (UKPDS Group, 1998). Gegenüber den Glitazonen bietet es neben deutlich geringeren Kosten, den Vorteil, dass es keine Gewichtszunahme, sondern im Gegenteil einen Gewichtsverlust bewirkt und zudem kaum Nebenwirkungen aufweist. Demnach empfehlen sowohl die Richtlinien der American Diabetes Association (ADA), als auch die der European Association for the Study of Diabetes (EASD) Metformin als Therapeutikum für die initiale Diabetes-Behandlung (Singaram/Pratley, 2007). Außerdem liegt der Wirkung von Metformin keine Aktivierung des PPAR- γ -Rezeptors zu Grunde. Es erscheint also unwahrscheinlich, dass die Substanz das Kollateralwachstum hemmen könnte.

Zurzeit ist Pioglitazon für die Monotherapie beim Diabetes mellitus zugelassen. Jedoch ist fraglich inwiefern dies aufgrund des großen Nebenwirkungsspektrums und der in dieser Studie beobachteten Hemmung der Arteriogenese sinnvoll ist. Es wurde bereits dargelegt, dass Diabetiker ein stark erhöhtes Risiko haben, einen Schlaganfall oder einen myokardialen Herzinfarkt zu erleiden (Kapitel 2.2.3.). Daher ist davon auszugehen, dass für diesen Patientenkreis kollaterales Wachstum zur Vermeidung ischämischer Zustände von vitaler Bedeutung ist. Somit wäre hier eine Substanz ohne antiarteriogenes Potential, wie das genannte Metformin, der Glitazon-Therapie überlegen.

Zu einem ähnlichen Schluss kommen Richter et al., die 2006 in einer Metaanalyse keinen Vorteil von Pioglitazon gegenüber klassischen oralen Antidiabetika bezüglich der Senkung des Blutglukosespiegels feststellen konnten. Sie beschreiben das Nutzen-Risiko-Potential des Medikaments als unklar (Richter et al., 2006).

Der Vollständigkeit halber soll auch eine neue Klasse oraler Antidiabetika erwähnt werden, die DPP4-Antagonisten, die derzeit auf den Markt eingeführt werden (Marino et al., 2008). Da auch diese keine Beeinflussung von PPAR- γ aufweisen, erscheinen sie diesbezüglich in der Diabetes-Therapie vorteilhaft. Jedoch liegen bislang keine Studien über die langfristige Wirksamkeit dieser Medikamente vor, so dass abzuwarten bleibt, inwiefern sie sich für den breiten Einsatz eignen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz von Glitazonen in der Therapie des Typ II Diabetes aufgrund ihrer antiarteriogenen Wirkung nur nach Ausschöpfen aller Alternativen und auch dann nur unter strenger klinischer Kontrolle in möglichst geringer Dosierung erfolgen sollte. Die Kombinationstherapie ist in jedem Fall der Monotherapie vorzuziehen (Khanderia et al., 2008; Richter et al., 2006).

5. 4. 2. Alternativen zur konventionellen Diabetes-mellitus-Therapie

Es wurde bereits erwähnt, dass die Ursache für die rasante Ausbreitung vom Diabetes mellitus Typ II in einem geänderten Lebenswandel zu finden ist (Kapitel 2.2.1.). Übermäßige Kalorienzufuhr bei gleichzeitigem Bewegungsmangel führt dazu, dass bereits junge Menschen erkranken. Zunehmend sind auch Länder betroffen, in denen der wirtschaftliche Wohlstand in Teilen der Bevölkerung in den letzten Jahren zugenommen hat, wie z. B. China und Indien (<http://www.idf.org>). Oft tritt die Krankheit im Rahmen des metabolischen Syndroms auf (Kapitel 2.2.2.). Eine zentrale Rolle bei der Therapie spielt die frühzeitige Diagnose der Erkrankung. Reduzierte Glukosetoleranz tritt bereits vor klinischer Manifestation des Diabetes mellitus auf. In diesem Stadium lässt sich der progradienten Entwicklung noch gut mit konsequenter Lebensumstellung entgegensteuern. Eine kontrollierte Diät und ausreichende Bewegung sind von größter Bedeutung (LaMonte et al., 2005; Wylie-Rosett et al., 2006).

Zudem sollten die Patienten ausreichend über die Schwere ihrer Erkrankung aufgeklärt werden. Es ist zwingend notwendig, darauf hinzuweisen, dass es sich bei Diabetes mellitus um eine kontinuierlich fortschreitende Erkrankung handelt, die durch die richtige Therapie lediglich in ihrem Verlauf verlangsamt wird, aber nicht heilbar ist. Dies ist erforderlich, um Frustration seitens des Patienten bei ausbleibendem Therapieerfolg vorzubeugen (Parry et al., 2006).

Inzwischen gibt es Untersuchungen, die belegen, dass die Krankheit langsamer fortschreitet, wenn frühzeitig, eventuell sogar schon im prä-diabetischen Stadium, mit Insulininjektionen begonnen wird. Da viele Patienten jedoch die Injektion scheuen, wird oft unnötigerweise auf orale Antidiabetika zurückgegriffen. Dies könnte durch ausreichende Beratung und Aufklärung des Patienten vermieden werden (Philipps, 2005).

In jedem Fall ist zu berücksichtigen, dass es sich bei Diabetes mellitus um ein sehr komplexes Krankheitsgeschehen handelt, besonders wenn die Krankheit in Verbindung mit dem metabolischen Syndrom auftritt. Meist wird der Einsatz einer Vielzahl von Medikamenten sowie eine tiefgreifende Änderung des Lebensstils notwendig sein.

5. 5. Konsequenzen für die Therapie atherosklerotischer Erkrankungen

5. 5. 1. Einsatz von Glitazonen in der Schlaganfalltherapie

Ein Teilaspekt der bereits erwähnten PROactive-Studie (Kapitel 2.3.3.) war die Untersuchung der Auswirkungen einer Therapie mit Pioglitazon bei Diabetes-Patienten, die zuvor einen Schlaganfall erlitten hatten. Es zeigte sich, dass bei Patienten, die Pioglitazon erhalten hatten, seltener ein weiterer Schlaganfall auftrat. Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Wilcox et al., 2007).

In der Diskussion der Studie bleibt jedoch meist unberücksichtigt, dass bei Patienten, die vor Studienbeginn keinen Schlaganfall erlitten hatten, im Verlauf der Behandlung häufiger ein ischämischer Hirninfarkt diagnostiziert wurde, als bei Placebo-behandelten Personen (Wilcox et al., 2007). Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt bieten die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde. Es ist durchaus denkbar, dass bei diesen Patienten das kollaterale Wachstum durch die Pioglitazon-Applikation gehemmt wurde. Bei eintretendem Gefäßverschluss erlitten die Patienten somit einen Schlaganfall. Im Gegensatz dazu hatten Placebo-behandelte Personen Kollateralen ausgebildet, wodurch das Risiko eines ischämischen Infarkts gemindert wurde.

Warum sich diese Verhältnisse nicht auch in der Untersuchungsgruppe mit Hirninfarkt vor Studienbeginn widerspiegeln, lässt sich anhand der Ausschlusskriterien von PROactive erklären. Zur Untersuchung zugelassen wurden nur Patienten, deren erstes Auftreten einer makrovaskulären Erkrankung, in diesem Fall des Schlaganfalls, mindestens ein Jahr zurücklag (Charbonnel et al., 2003).

Es ist also wahrscheinlich, dass Patienten, die zuvor einen ischämischen zerebralen Infarkt aufgrund einer arteriellen Stenose erlitten hatten, innerhalb dieses Jahres bereits durch Arteriogenese Kollateralen ausgebildet hatten. Somit trat durch die Pioglitazon-Applikation nach Studienbeginn keine Hemmung des Kollateralwachstums mehr ein.

Diese Theorie unterstützt die 2008 veröffentlichte Studie von Winkelmayr et al., bei der ebenfalls besonders viele Patienten an kardiovaskulären Ereignissen erkrankten, wenn sie zuvor noch nicht erkrankt waren und Pioglitazon erhielten (Winkelmayr et al., 2008).

Wie bereits in Kapitel 2.4.3. angesprochen, wurde im Zusammenhang mit der zerebralen Blutversorgung überwiegend der Effekt einer Glitazon-Therapie auf die A. carotis communis betrachtet. Auch wenn in einer Studie hier eine Reduktion der Pulsatilität festgestellt werden konnte, überrascht es dennoch, dass bislang keine Reduktion der Intima-Media-Dicke der Arterie ermittelt werden konnte (Hirano et al., 2008; Park et al., 2009). Es bleibt also offen, ob Pioglitazon wirklich einen positiven Einfluss auf die zerebrale, arterielle Blutversorgung hat, da dem voranschreitenden Verschluss der A. carotis communis im Rahmen der Atherosklerose offenbar nicht entgegengewirkt werden konnte.

Inzwischen sind zahlreiche Publikationen veröffentlicht worden, die die Effekte einer Glitazon-Therapie nach erfolgtem Schlaganfall betrachten (Collino et al., 2008). Der Grundgedanke hierbei ist, dass sich durch die PPAR- γ -Aktivierung eine anti-inflammatorische Wirkung auf das Nervengewebe erzielen lässt. Durch Reperfusion des ischämischen Infarktgebietes nach Öffnung der Stenose kommt es im Rahmen des Abbaus von abgestorbenem Gewebe zu Entzündungsreaktionen, die vor allem durch Bildung von Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) das umliegende Gewebe schädigen (Hossmann, 2006). Da durch PPAR- γ -Agonisten die Produktion von ROS inhibiert wird (Fujisawa et al., 2008; Li et al., 2008) und zudem inflammatorische Prozesse gehemmt werden, erscheint der Einsatz solcher Substanzen nach einem Schlaganfall sinnvoll (Nakamura et al., 2007). Tatsächlich konnte in verschiedenen Untersuchungen eine Reduktion des Infarktvolumens durch Glitazon-Gabe herbeigeführt werden (Ji et al., 2008; Lee et al., 2009; Schmerbach et al., 2008).

Im Hinblick auf diese Studien ist jedoch zu berücksichtigen, dass sie an völlig anderer Stelle ansetzen wie Untersuchungen, die Arteriogenese beurteilen. Wie in Kapitel 2.1.1. erläutert, ist es das Ziel von kollateralem Wachstum, einen „biologischen Bypass“ herzustellen, um im Falle eines Gefäßverschlusses Ischämien und die damit verbundenen Gewebläsionen zu vermeiden. In diesem Fall tritt somit gar kein Schlaganfall ein, da die zerebrale Blutversorgung über das Kollateralgefäß aufrechterhalten wird.

Somit würde eine post-Infarkt-Therapie überflüssig. Im Falle eines bereits eingetreten Hirninfarkts ist natürlich abzuwägen, ob es von höherer Priorität ist, die Größe des geschädigten Areals zu minimieren oder kollaterales Wachstum zu fördern, um einem erneuten Schlaganfall vorzubeugen. Ideal wäre sicherlich die Kombination beider Therapieansätze, jedoch fehlen hier bislang geeignete Mittel.

5. 5. 2. Arteriogenesehemmung als Erklärung für Glitazon-bedingtes Herzversagen

Da in der vorliegenden Studie die Auswirkungen von Pioglitazon auf die zerebrale Arteriogenese untersucht wurde, sollen die kardialen Effekte hier nur kurz angesprochen werden. Grundsätzlich unterscheiden sich die molekularen Mechanismen der Arteriogenese in kardialen und zerebralen Gefäßen nicht. Somit lässt sich vermuten, dass die hier ermittelte Hemmung des Kollateralwachstums im Gehirn auch bei der Ausbildung von Kollateralgefäßen am Herzen stattfindet.

Im Rahmen der PROactive-Studie wurde bereits festgestellt, dass bei Patienten unter Pioglitazon-Behandlung gehäuft Herzversagen auftrat (Erdmann et al., 2007). Der gleiche Zusammenhang wurde anhand verschiedener klinischer Studien mit dem zweiten im Handel erhältlichen Glitazon, Rosiglitazon, beschrieben (The DREAM Trial Investigators, 2006). Da es sich somit vermutlich um einen Klasseneffekt handelt, wurde die Warnung der amerikanischen Food and Drug Administration, die zunächst nur für Rosiglitazon galt, auf Pioglitazon ausgedehnt

(<http://www.fda.gov/cder/drug/InfoSheets/HCP/pioglitazoneHCP.htm>).

Die Frage nach der Ursache bleibt nach wie vor unbeantwortet. Wie bereits erwähnt (Kapitel 5.2.2.) wurde das Auftreten von klinisch manifestem Herzversagen häufig mit einem vergrößertem Blutvolumen aufgrund von Flüssigkeitsretention in Verbindung gebracht (Erdmann et al., 2007; Kiryluk/Isom, 2007; Touyz/Schiffrin, 2006). Diese Erklärung ist jedoch umstritten (Tang/Maroo, 2007; Tang et al.; 2003).

Eine andere Ursache lässt sich vermuten, wenn man die in dieser Arbeit am Gehirn erhobenen Befunde auf das Herz überträgt. Mangelhaftes, da durch PPAR- γ -Agonisten gehemmtes Kollateralwachstum, könnte eine verminderte Leistungsfähigkeit des Herzens, die in klinischem Herzversagen resultiert, erklären. Diese Vermutung ließe sich allerdings lediglich durch Studien im Tiermodell oder durch klinische Studien bestätigen.

5. 5. 3. Einsatz von Glitazonen in der Therapie makrovaskulärer Erkrankungen

Patienten, die an Typ II Diabetes mellitus erkrankt sind, haben ein erhöhtes Risiko für makrovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und die perivaskuläre Verschlusskrankheit (PVK) (Lundberg/Stegmayer, 1997; Panzram, 1987; Stegmayr/Asplund, 1995). Dies liegt einerseits in der Tatsache begründet, dass durch den erhöhten Blutglukosespiegel ein proatherogenes Milieu geschaffen wird (Hartge et al., 2007), andererseits tritt Typ II Diabetes häufig in Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom auf, so dass Dyslipidämie und Bluthochdruck atherosklerotischen Prozessen zusätzlich Vorschub leisten (Kapitel 2.2.3.).

Daher erschien es vorteilhaft, die Senkung des Blutglukosespiegels mit einer anti-atherosklerotischen Therapie zu kombinieren. Dies konnte durch die insulin-sensibilisierende Wirkung von Pioglitazon einerseits und die durch PPAR- γ -vermittelten anti-inflammatorischen und anti-proliferativen Effekte der Substanz andererseits erreicht werden. Zudem wurde Pioglitazon aufgrund der geringen PPAR- α -Aktivität eine positive Wirkung auf die Dyslipidämie zugeschrieben (Haberbosch et al., 2007; Sakamoto et al., 2000).

Um die Vorteile dieser Kombination nachzuweisen, startete 2005 die bereits erwähnte PROactive-Studie (Kapitel 2.3.3.). Der erste kombinierte Endpunkt der Studie wurde allerdings nicht erreicht (Dormandy et al., 2005). Obwohl sich im zweiten kombinierten Endpunkt signifikante Unterschiede zeigten, ist die Studie nicht zuletzt wegen des gehäuft auftretenden Herzversagens unter Pioglitazon-Therapie bis heute stark umstritten.

Ein weiteres Beispiel für die Kombination von anti-diabetischer und anti-atherosklerotischer Therapie bieten die sogenannten Dualen-PPAR-Agonisten (Balakumar et al., 2007). Muraglitazar ist eine Substanz aus dieser Gruppe, die Pioglitazon im pharmakologischen Wirkprofil sehr ähnlich ist. Muraglitazar wirkt über eine starke PPAR- γ -Aktivierung Blutglukosespiegel-senkend, anti-inflammatorisch und anti-proliferativ. Zudem weist es eine geringe Aktivität am PPAR- α -Rezeptor auf, die sich positiv auf die Lipidzusammensetzung des Blutes auswirkt (geringerer Anteil an LDL, stärkere Produktion von HDL) (Nissen et al., 2005).

In Phase III der klinischen Entwicklung von Muraglitazar traten vermehrt Schlaganfälle sowie Myokardinfarkte auf. Aufgrund dessen wurde die Substanz nicht für den klinischen Einsatz zugelassen. Eine Erklärung für diese Effekte von Muraglitazar wurde bislang nicht gefunden (Balakumar et al., 2007).

Bedenkt man jedoch die Ergebnisse der vorliegenden Studie, in der die Hemmung des Kollateralwachstums durch Pioglitazon, das ebenso wie Muraglitazar stark an PPAR- γ und schwach an PPAR- α aktiv ist (Sakamoto et al., 2000) und durch PPAR- α -Agonismus zusätzlich anti-inflammatorische Effekte entstehen (Orasanu et al., 2008), so liegt der Schluss nahe, dass vermindertes Gefäßwachstum die Ursache für die erhöhte Infarktrate unter Muraglitazar-Behandlung gewesen sein könnte. Berücksichtigt man diese Überlegungen, so überrascht es wenig, dass inzwischen in mehreren Studien auch unter Glitazon-Einfluss ein erhöhtes Risiko für myokardiale Infarkte und Todesfälle kardiovaskulärer Ursache ermittelt werden konnte. (Koro et al., 2008; Lipscombe et al., 2007; Nissen/Wolski, 2007; Stockl et al. 2008).

Chiarelli und Di Marzio vermuten als Ursache für dieses vermehrte Auftreten von Myokardinfarkten gesteigerten physiologischen Stress im Herzmuskel aufgrund des durch Glitazon-Therapie ausgelösten Hämoglobin-Mangels (Kapitel 5.2.2.) (Chiarelli/Di Marzio, 2008). Ebenso könnte das gehäufte Auftreten von Herzinfarkten unter Glitazon-Einfluss jedoch durch eine Hemmung des Kollateralwachstums am Herzen erklärt werden.

Zusammenfassend erscheint es zumindest fraglich, inwiefern der Einsatz von Substanzen, die das Wachstum von Kollateralgefäßen hemmen, in der Therapie makrovaskulärer Erkrankungen sinnvoll ist (Balakumar et al., 2007; Khanderia et al., 2008; Lipscombe et al., 2007).

5. 5. 4. Therapie der Artherosklerose durch Ursachenbekämpfung

Um atherosklerotische Veränderungen und damit Stenosen der Gefäße zu bekämpfen, ist es wichtig zwischen Ursache und Wirkung makrovaskulärer Erkrankungen zu unterscheiden. Hauptursachen für das Entstehen von Atherosklerose sind Bluthochdruck und Dyslipidämie (Waldhäusl/Scherbaum, 2004).

Diese Zustände werden meist im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom beobachtet. Die durch Typ II Diabetes mellitus hervorgerufene Hyperglykämie bietet zwar zusätzlich ein pro-athrogenes Milieu, ist aber selten alleiniger Auslöser für makrovaskuläre Erkrankungen (Hartge et al., 2007; Panzram, 1987).

Durch die genannten Faktoren kommt es zu Läsionen der Gefäßwand, da hier vermehrt Lipide eingelagert werden und die Zellen aufgrund geänderter Strömungsverhältnisse zur Proliferation angeregt werden. Es entstehen entzündliche Prozesse (Gass/Kolich, 1973). Entweder kann es durch Verdickung der Gefäßwand zu einem Verschluss unmittelbar im Bereich der atherosklerotischen Läsion kommen oder es entstehen durch gestörte Blutgerinnung Thromben, die weiter distal eine Stenose verursachen (Poeck/Hacke, 2006). Zu beachten ist hier jedoch, dass die Entzündung und die damit einhergehenden Umbauprozesse lediglich als Folge der eigentlichen Ursachen der Artherosklerose auftreten. Es macht daher wenig Sinn, mit der Therapie am Blutgefäß selbst anzusetzen, wenn nicht zuvor alle grundlegenden Auslöser der atherosklerotischen Veränderungen beseitigt sind. Für die sinnvolle Therapie makrovaskulärer Erkrankungen ist daher unbedingt zunächst die Ursache zu ermitteln und medikamentell zu behandeln (Gupta/Gupta, 2006).

Tritt die makrovaskuläre Erkrankung als Teilbild des metabolischen Syndroms auf, ist zudem, wie bereits in Kapitel 5.4.2. erläutert, eine Umstellung des Lebenswandels mit Diät und Bewegungstherapie zwingend erforderlich. Sind die Ursachen der Atherosklerose durch medikamentelle, diätetische und physiologische Therapie beseitigt und befinden sich Blutdruck, Blutglukosespiegel und Lipidprofil im Normalbereich, ist damit zu rechnen, dass sich atherosklerotische Veränderungen zurückbilden. Dies konnte vielfach in Studien bestätigt werden (Deedwania/Srikanth, 2008; Keller, 2008; Kozakova et al., 2007; Peschel et al., 2007).

Daher ist die anti-proliferative und anti-inflammatorische Wirkung, die Pioglitazon am Gefäß entfaltet, nicht notwendig, wenn durch erfolgreiche Therapie alle Auslöser der Atherosklerose beseitigt wurden. Das würde bedeuten, dass dieser Effekt keinen zusätzlichen Vorteil des Medikaments gegenüber oralen Antidiabetika wie Metformin bietet. Im Gegenteil wären diese sogar den Glitazonen überlegen, da durch sie keine Hemmung der Arteriogenese zu erwarten ist.

5. 5. 5. Stimulation der Arteriogenese und Hemmung der Atherosklerose

Wie bereits dargelegt wurde, zieht eine Stimulation der Arteriogenese mittels pro-inflammatorischer Faktoren immer eine Stimulation artherosklerotischer Prozesse nach sich (Schaper/Buschmann, 1999). Umgekehrt bestand die Vermutung, dass eine Inhibierung der Atherosklerose durch Anti-Inflammation und Hemmung der Proliferation von Gefäßzellen immer auch eine Verminderung des Kollateralwachstums bewirkt (Kapitel 2.1.3.). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen diese Hypothese. Es stellt sich daher die Frage, wie es möglich sein könnte, atherosklerotische Prozesse wirkungsvoll zu therapieren, ohne dabei der Entstehung von „biologischen Bypassen“ entgegen zu wirken. In Abschnitt 5.5.4. wurde erläutert, wie eine sinnvolle Therapie der Atherosklerose aussehen könnte.

Es kann vermutet werden, dass diese ursachenorientierte Behandlung auch in einem verbesserten Kollateralwachstum resultiert. Abaci et al. beschreiben in diesem Zusammenhang ein reduziertes arteriogenes Potential bei Patienten mit Typ II Diabetes mellitus, welches dazu beiträgt, dass dieser Personenkreis einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen ausgesetzt ist (Abaci et al., 1999). Es ist daher davon auszugehen, dass die Behandlung hyperglykämischer Zustände sich auch positiv auf das Wachstum von Kollateralgefäßen auswirkt. Der abschließende Beweis dieser Theorie steht allerdings noch aus.

Auf einen weiteren wichtigen Punkt im Zusammenhang mit der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen, die Umstellung des Lebensstils, ist bereits eingehend eingegangen worden (Kapitel 5.4.2.). Inzwischen gibt es Studien, die den positiven Einfluss von regelmäßigem körperlichem Training auf die Arteriogenese belegen (Naylor et al., 2008; Yang et al., 2008) und weitere sind auf dem Weg, um diese These zu belegen (Bondke et al., 2007). Da eine solche Bewegungstherapie auch bei der Atherosklerose-Behandlung besonders in Verbindung mit dem metabolischen Syndrom Einsatz findet, ergibt sich hier die Möglichkeit, auf beide Prozesse gleichermaßen positiv Einfluss zu nehmen.

Abschließend ist zu sagen, dass bei der Therapie der Atherosklerose die Auswirkungen auf die Arteriogenese in jedem Fall zu beachten sind. Anti-inflammatorische und anti-proliferativ wirkende Substanzen, wie das in dieser Arbeit untersuchte Pioglitazon, scheinen in diesem Zusammenhang ungeeignet, da sie das Wachstum von Kollateralgefäßen hemmen und damit einen wichtigen natürlichen Mechanismus zur Vermeidung ischämischer Infarkte ausschalten. Alternativen bieten Therapieansätze, die sowohl Atherosklerose hemmen, als auch Arteriogenese stimulieren, wie beispielsweise körperliches Training.

6. Zusammenfassung

Einfluss des oralen Antidiabetikums Pioglitazon auf die Arteriogenese im Gehirn der Ratte

Hintergrund und Zielsetzung – Pioglitazon, ein Peroxisome proliferator-activated Rezeptor-(PPAR)- γ Agonist, findet zunehmend Einsatz in der Therapie des Typ II Diabetes mellitus. Inzwischen ist bekannt, dass Pioglitazon, zusätzlich zu seiner Blutzuckerspiegel-senkenden Wirkung, zahlreiche Effekte auf die Gefäßwand ausübt, welche auf die Aktivierung von PPAR- γ zurückzuführen sind. Aufgrund seines anti-inflammatorischen und anti-proliferativen Potentials wird Pioglitazon eine positive Wirkung bei der Behandlung makrovaskulärer Erkrankungen zugeschrieben. Da Entzündung und Proliferation aber auch zentrale Ereignisse im Rahmen der Arteriogenese sind, erscheint es wahrscheinlich, dass durch die Stimulation von PPAR- γ das Wachstum von Kollateralgefäßen gehemmt wird. Ziel der Studie war es daher, den hemmenden Einfluss von Pioglitazon auf die Arteriogenese nachzuweisen.

Methoden – In männlichen Sprague-Dawley Ratten wurden beide Arteriae vertebrales sowie eine Arteria carotis communis verschlossen (3-Gefäßverschluss, 3 vessel occlusion, 3-VO). Die so entstandene Hypoperfusion des Gehirns führte zum Wachstum der Kollateralgefäße des Circulus arteriosus cerebri (Circulus Willisii). Pioglitazon wurde in einer Dosierung von 2,8mg/kg (low dose, LD) bzw. 10mg/kg (high dose HD) verabreicht. Nach 21 Tagen erfolgte die Auswertung mittels postmortaler Latexangiographie und Diameterbestimmung oder Bestimmung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC). Zudem wurden Gewebeproben immunhistochemisch untersucht.

Ergebnisse – In der Kontrollgruppe wurde eine CVRC von $10,52 \pm 20,52\%$ ermittelt. Mit Pioglitazon behandelte Tiere zeigten eine signifikant geringere CVRC (LD $-4,15 \pm 12,55\%$, HD: $4,44 \pm 8,63$). Ebenso waren die Diameter der Arteriae cerebrales posteriores (PCA) beidseits signifikant kleiner bei Tieren, die Pioglitazon erhalten hatten. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte eine reduzierte Dicke der glatten Muskelzellschicht bei Tieren die mit Pioglitazon behandelt worden waren.

Schlussfolgerung – Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Pioglitazon die Arteriogenese hemmt. Zudem wurde durch die reduzierte zerebrovaskuläre Reservekapazität ein funktionelles Defizit nachgewiesen. Zumal es sich bei der Arteriogenese um einen wichtigen natürlichen Mechanismus zur Vermeidung ischämischer Zustände nach Gefäßverschlüssen handelt, ist in Frage zu stellen, inwiefern der Einsatz von Pioglitazon bei der Therapie makrovaskulärer Erkrankungen tatsächlich sinnvoll ist

7. Summary

Influence of the oral antidiabetic agent pioglitazone on arteriogenesis in the rat brain

Background - Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ agonist pioglitazone is commonly used in the treatment of non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). Recently it has been discovered that pioglitazone, in addition to its blood glucose lowering potential, exerts various effects on the vessel wall which are a result of the activation of PPAR- γ . Due to its anti-inflammatory and anti-proliferative capabilities pioglitazone is said to be beneficial in the treatment of macrovascular disease. As inflammation and proliferation of vascular cells are crucial in the process of collateral growth, arteriogenesis, it seems likely that activation of PPAR- γ with pioglitazone will inhibit the development of collateral vessels. The aim of this study was to confirm the inhibitory influence of pioglitazone on arteriogenesis.

Methods – To induce cerebral collateral growth both vertebral arteries and one common carotid artery were occluded in male Sprague-Dawley rats (Three vessel occlusion, 3-VO). This results in non-lethal hypoperfusion of the brain leading to a stimulation of collateral growth of the arteries forming the Circle of Willis (Circulus arteriosus cerebri). Animals were treated with either pioglitazone low dose (LD, 2,8mg/kg) or high dose (HD, 10mg/kg). After 21 days rats measurement of cerebrovascular reserve capacity (CVRC) or post-mortem latexangiography with measurement of arterial diameters was done. Furthermore, tissue samples were collected and examined after immunohistochemistry was performed.

Results – Control animals showed a CVRC of $10,52 \pm 20,52\%$ three weeks after 3-VO surgery. In contrast animals that had received pioglitazone showed a significantly lower CVRC (LD: $4,15 \pm 12,55\%$, HD: $4,44 \pm 8,63$). Additionally diameters of the posterior cerebral artery were significantly lower in Pioglitazone treated animals than in the control group. Immunohistology of the PCA of pioglitazone treated rats showed a diminished layer of smooth muscle cells compared to control rats.

Conclusion – In this study it was shown that treatment with the PPAR- γ agonist pioglitazone results in inhibition of collateral growth. Furthermore, a reduced CVRC was detected in animals that had received pioglitazone indicating a functional deficit in arterial blood supply of the brain. As arteriogenesis is known to be an important mechanism to avoid tissue ischemia after arterial stenosis, it remains questionable whether the use of pioglitazone in the treatment of macrovascular disease should be advised.

8. Literaturverzeichnis

Homepage der European Medicine Agency (<http://www.emea.europa.eu>)

Homepage der Food and Drug Administration (<http://www.fda.gov>)

Homepage der International Diabetes Foundation (<http://www.idf.org>)

"Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group." (1985). World Health Organ Tech Rep Ser 727: 1-113.

Abaci, A., A. Oguzhan, et al. (1999). "Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels." *Circulation* 99(17): 2239-42.

Abrams, H. L. (1983). "Caldwell Lecture. The collateral circulation: response to ischemia." *AJR Am J Roentgenol* 140(6): 1051-63.

Balakumar, P., M. Rose, et al. (2007). "PPAR dual agonists: Are they opening Pandora's Box?" *Pharmacol Res.*

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

Barish, G. D., V. A. Narkar, et al. (2006). "PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome." *J Clin Invest* 116(3): 590-7.

Bedir, A., Y. Aliyazicioglu, et al. (2008). "Assessment of genotoxicity in rats treated with the antidiabetic agent, pioglitazone." *Environ Mol Mutagen* 49(3): 185-91.

Berria, R., L. Glass, et al. (2007). "Reduction in Hematocrit and Hemoglobin Following Pioglitazone Treatment is not Hemodilutional in Type II Diabetes Mellitus." *Clin Pharmacol Ther.*

Bishop-Bailey, D. and T. Hla (1999). "Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2." *J Biol Chem* 274(24): 17042-8.

Bondke, A., I. R. Buschmann, et al. (2007). "[Inducing collaterals in due time. Arteriogenesis as a preventive principle]." *Hamostaseologie* 27(5): 363-72.

Busch, H. J., I. R. Buschmann, et al. (2003). "Arteriogenesis in hypoperfused rat brain." *J Cereb Blood Flow Metab* 23(5): 621-8.

Buschmann, I., M. Heil, et al. (2003). "Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis." *Microcirculation* 10(3-4): 371-9.

Buschmann, I., E. Katzer, et al. (2003). "Arteriogenesis - is this terminology necessary?" *Basic Res Cardiol* 98(1): 1-5.

Calabrò, P., I. Samudio, et al. (2005). "Inhibition of tumor-necrosis-factor-alpha induced endothelial cell activation by a new class of PPAR-gamma agonists. An in vitro study showing receptor-independent effects." *J Vasc Res* 42(6): 509-16.

- Charbonnel, B., J. Dormandy, et al.** (2004). "The prospective pioglitazone clinical trial in macrovascular events (PROactive): can pioglitazone reduce cardiovascular events in diabetes? Study design and baseline characteristics of 5238 patients." *Diabetes Care* 27(7): 1647-53.
- Chiarelli, F. and D. Di Marzio** (2008). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives." *Vasc Health Risk Manag* 4(2): 297-304.
- Chintalgattu, V., G. S. Harris, et al.** (2007). "PPAR-gamma agonists induce the expression of VEGF and its receptors in cultured cardiac myofibroblasts." *Cardiovasc Res* 74(1): 140-50.
- Collino, M., N. S. Patel, et al.** (2008). "PPARs as new therapeutic targets for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury." *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2(3): 179-97.
- Dahl, A., D. Russell, et al.** (1992). "A comparison of regional cerebral blood flow and middle cerebral artery blood flow velocities: simultaneous measurements in healthy subjects." *J Cereb Blood Flow Metab* 12(6): 1049-54.
- de Dios, S. T., D. Bruemmer, et al.** (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): 2548-50.
- de Dios, S. T., K. M. Hannan, et al.** (2001). "Troglitazone, but not rosiglitazone, inhibits Na/H exchange activity and proliferation of macrovascular endothelial cells." *J Diabetes Complications* 15(3): 120-7.
- Deedwania, P. and S. Srikanth** (2008). "Diabetes and vascular disease." *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6(1): 127-38.
- Delank/Gehlen** (2006). *Neurologie*. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Demolis, P., G. Florence, et al.** (2000). "Is the acetazolamide test valid for quantitative assessment of maximal cerebral autoregulatory vasodilation? An experimental study." *Stroke* 31(2): 508-15.
- Dormandy, J. A., D. J. Betteridge, et al.** (2008). "Impact of peripheral arterial disease in patients with diabetes-Results from PROactive (PROactive 11)." *Atherosclerosis*.
- Dormandy, J. A., B. Charbonnel, et al.** (2005). "Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial." *Lancet* 366(9493): 1279-89.
- Eitenmuller, I., O. Volger, et al.** (2006). "The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion." *Circ Res* 99(6): 656-62.
- Epstein, S. E., E. Stabile, et al.** (2004). "Janus phenomenon: the interrelated tradeoffs inherent in therapies designed to enhance collateral formation and those designed to inhibit atherogenesis." *Circulation* 109(23): 2826-31.

- Erdmann, E., B. Charbonnel, et al.** (2007). "Pioglitazone Use and Heart Failure in Patients with Type 2 Diabetes and Preexisting Cardiovascular Disease: Data from the PROactive Study (PROactive 08)." *Diabetes Care*.
- Erdmann, E., J. A. Dormandy, et al.** (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): 1772-80.
- Ferré, P.** (2004). "The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity." *Diabetes* 53 Suppl 1: S43-50.
- Frey/Löscher** (2002). *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Stuttgart, Enke Verlag.
- Fujisawa, K., T. Nishikawa, et al.** (2009). "TZDs reduce mitochondrial ROS production and enhance mitochondrial biogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* 379(1): 43-8.
- Gass, G. H. and M. S. Kolich** (1973). "Hyperlipemia and atherosclerosis: a preliminary note on the mechanism of action." *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 45(1): 25-30.
- Gerstein, H. C., S. Yusuf, et al.** (2006). "Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial." *Lancet* 368(9541): 1096-105.
- Goetze, S., F. Eilers, et al.** (2002). "PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt." *Biochem Biophys Res Commun* 293(5): 1431-7.
- Goetze, S., U. Kintscher, et al.** (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nuclear but not cytosolic extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-regulated steps in vascular smooth muscle cell migration." *J Cardiovasc Pharmacol* 38(6): 909-21.
- Gupta, S. and B. M. Gupta** (2006). "Metabolic syndrome: diabetes and cardiovascular disease." *Indian Heart J* 58(2): 149-52.
- Haberbosch, W.** (2007). "[Effects of thiazolidinediones on dyslipidemia in patients with type 2 diabetes. Are all equally vasoprotective?]." *Herz* 32(1): 51-7.
- Hannan, K. M., R. J. Dilley, et al.** (2003). "Troglitazone stimulates repair of the endothelium and inhibits neointimal formation in denuded rat aorta." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(5): 762-8.
- Hartge, M. M., T. Unger, et al.** (2007). "The endothelium and vascular inflammation in diabetes." *Diab Vasc Dis Res* 4(2): 84-8.
- Heil, M., I. Eitenmuller, et al.** (2006). "Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences." *J Cell Mol Med* 10(1): 45-55.
- Heil, M. and W. Schaper** (2004). "Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis)." *Circ Res* 95(5): 449-58.

- Hillmeister, P., K. E. Lehmann, et al.** (2008). "Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain." *J Cereb Blood Flow Metab* 28(11): 1811-23.
- Hirano, M., T. Nakamura, et al.** (2008). "Rapid improvement of carotid plaque echogenicity within 1 month of pioglitazone treatment in patients with acute coronary syndrome." *Atherosclerosis*.
- Hoefler, I. E., N. van Royen, et al.** (2004). "Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1-mediated mechanisms." *Circ Res* 94(9): 1179-85.
- Hollenberg, N. K.** (2003). "Considerations for management of fluid dynamic issues associated with thiazolidinediones." *Am J Med* 115 Suppl 8A: 111S-115S.
- Hossmann, K. A.** (2006). "Pathophysiology and therapy of experimental stroke." *Cell Mol Neurobiol* 26(7-8): 1057-83.
- Hsueh, W. A. and R. E. Law** (2001). "PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(12): 1891-5.
- Hwang, Y. C., E. Y. Lee, et al.** (2008). "Effects of rosiglitazone on body fat distribution and insulin sensitivity in Korean type 2 diabetes mellitus patients." *Metabolism* 57(4): 479-87.
- Ji, S., G. Kronenberg, et al.** (2009). "Acute neuroprotection by pioglitazone after mild brain ischemia without effect on long-term outcome." *Exp Neurol* 216(2): 321-8.
- Jiang, C., A. T. Ting, et al.** (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." *Nature* 391(6662): 82-6.
- Joner, M., A. Farb, et al.** (2007). "Pioglitazone inhibits in-stent restenosis in atherosclerotic rabbits by targeting transforming growth factor-beta and MCP-1." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(1): 182-9.
- Kappert, K., H. Meyborg, et al.** (2008). "Insulin facilitates monocyte migration: a possible link to tissue inflammation in insulin-resistance." *Biochem Biophys Res Commun* 365(3): 503-8.
- Karter, A. J., A. T. Ahmed, et al.** (2005). "Pioglitazone initiation and subsequent hospitalization for congestive heart failure." *Diabet Med* 22(8): 986-93.
- Karter, A. J., A. T. Ahmed, et al.** (2004). "Use of thiazolidinediones and risk of heart failure in people with type 2 diabetes: a retrospective cohort study: response to Delea et al." *Diabetes Care* 27(3): 850-1; author reply 852-3.
- Kawata, Y., K. Sako, et al.** (1996). "Sequential changes in cerebrovascular reserve capacity in three-vessel occlusion rats." *Brain Res* 739(1-2): 330-4.
- Keller, U.** (2006). "From obesity to diabetes." *Int J Vitam Nutr Res* 76(4): 172-7.
- Keshamouni, V. G., D. A. Arenberg, et al.** (2005). "PPAR-gamma activation inhibits angiogenesis by blocking ELR+CXC chemokine production in non-small cell lung cancer." *Neoplasia* 7(3): 294-301.

- Khanderia, U., R. Pop-Busui, et al.** (2008). "Thiazolidinediones in type 2 diabetes: a cardiology perspective." *Ann Pharmacother* 42(10): 1466-74.
- Kintscher, U., S. Goetze, et al.** (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1-directed migration of monocytes." *Eur J Pharmacol* 401(3): 259-70.
- Kirylyuk, K. and R. Isom** (2007). "Thiazolidinediones and fluid retention." *Kidney Int.*
- Kleinwechter, H., Demandt, N., Mainski, E.** (2002). "Verordnungsweise der Glitazone Rosiglitazon (Avandia®) und Pioglitazon (Actos®) zur Therapie des Typ-2-Diabetes mellitus" *Schleswig-Holsteinisches Ärzteblatt* 2002 (10) 70-73
- Koro, C. E., Q. Fu, et al.** (2008). "An assessment of the effect of thiazolidinedione exposure on the risk of myocardial infarction in type 2 diabetic patients." *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 17(10): 989-96.
- Kozakova, M., C. Palombo, et al.** (2007). "Habitual physical activity and vascular aging in a young to middle-age population at low cardiovascular risk." *Stroke* 38(9): 2549-55.
- LaMonte, M. J., S. N. Blair, et al.** (2005). "Physical activity and diabetes prevention." *J Appl Physiol* 99(3): 1205-13.
- Lee, S. R., H. Y. Kim, et al.** (2009). "PPARgamma agonist pioglitazone reduces matrix metalloproteinase-9 activity and neuronal damage after focal cerebral ischemia." *Biochem Biophys Res Commun* 380(1): 17-21.
- Lehmann, J. M., L. B. Moore, et al.** (1995). "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)." *J Biol Chem* 270(22): 12953-6.
- Leonhardt, Helmut** (1971). *Histologie und Zytologie des Menschen*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag
- Li, L., P. J. Gao, et al.** (2008). "Pioglitazone inhibits homocystein induced migration of vascular smooth muscle cells through a peroxisome proliferators-activated receptor gamma-independent mechanism." *Clin Exp Pharmacol Physiol*.
- Libby, P. and J. Plutzky** (2007). "Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists." *Am J Cardiol* 99(4A): 27B-40B.
- Lipscombe, L. L., T. Gomes, et al.** (2007). "Thiazolidinediones and cardiovascular outcomes in older patients with diabetes." *Jama* 298(22): 2634-43.
- Loke, Y. K., S. Singh, et al.** (2009). "Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis." *Cmaj* 180(1): 32-9.
- Lundberg, V., B. Stegmayr, et al.** (1997). "Diabetes as a risk factor for myocardial infarction: population and gender perspectives." *J Intern Med* 241(6): 485-92.
- Macfarlane, D. P., K. R. Paterson, et al.** (2007). "Oral antidiabetic agents as cardiovascular drugs." *Diabetes Obes Metab* 9(1): 23-30.

- Maegawa, H., Y. Nishio, et al.** (2007). "Short-term low-dosage pioglitazone treatment improves vascular dysfunction in patients with type 2 diabetes." *Endocr J*.
- Marino, M. T.** (2008). "DPP-4 inhibitors. A new class of drugs for type 2 diabetes." *Diabetes Self Manag* 25(4): 60, 62-4.
- Marx, N., H. Duez, et al.** (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells." *Circ Res* 94(9): 1168-78.
- Mehnert/Förster** (1974). *Stoffwechselkrankheiten*. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Mohanty, P., A. Aljada, et al.** (2004). "Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone." *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2728-35.
- Mudaliar, S. and R. R. Henry** (2001). "New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: The glitazones or insulin sensitizers." *Annu Rev Med* 52: 239-57.
- Mukherjee, R., L. Jow, et al.** (1997). "Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists." *J Biol Chem* 272(12): 8071-6.
- Nagel, T., N. Resnick, et al.** (1994). "Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells." *J Clin Invest* 94(2): 885-91.
- Nakamura, T., E. Yamamoto, et al.** (2007). "Pioglitazone exerts protective effects against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, independently of blood pressure." *Stroke* 38(11): 3016-22.
- Nathan, D. M., J. B. Buse, et al.** (2006). "Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." *Diabetes Care* 29(8): 1963-72.
- Naylor, L. H., G. O'Driscoll, et al.** (2006). "Effects of training resumption on conduit arterial diameter in elite rowers." *Med Sci Sports Exerc* 38(1): 86-92.
- Nissen, S. E. and K. Wolski** (2007). "Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes." *N Engl J Med* 356(24): 2457-71.
- Nissen, S. E., K. Wolski, et al.** (2005). "Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus." *Jama* 294(20): 2581-6.
- Orasanu, G., O. Ziouzenkova, et al.** (2008). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone represses inflammation in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner in vitro and in vivo in mice." *J Am Coll Cardiol* 52(10): 869-81.
- Panigrahy, D., S. Huang, et al.** (2005). "PPARgamma as a therapeutic target for tumor angiogenesis and metastasis." *Cancer Biol Ther* 4(7): 687-93.

- Panzram, G.** (1987). "Mortality and survival in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus." *Diabetologia* 30(3): 123-31.
- Park, J. S., M. H. Cho, et al.** (2007). "The effects of pioglitazone on cerebrovascular resistance in patients with type 2 diabetes mellitus." *Metabolism* 56(8): 1081-6.
- Parry, O., E. Peel, et al.** (2006). "Issues of cause and control in patient accounts of Type 2 diabetes." *Health Educ Res* 21(1): 97-107.
- Pasceri, V., H. D. Wu, et al.** (2000). "Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators." *Circulation* 101(3): 235-8.
- Pascual, G., A. L. Fong, et al.** (2005). "A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma." *Nature* 437(7059): 759-63.
- Peschel, T., S. Sixt, et al.** (2007). "High, but not moderate frequency and duration of exercise training induces downregulation of the expression of inflammatory and atherogenic adhesion molecules." *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14(3): 476-82.
- Phillips, P.** (2005). "Type 2 Diabetes - failure, blame and guilt in the adoption of insulin therapy." *Rev Diabet Stud* 2(1): 35-9.
- Pitocco, D., S. Giubilato, et al.** (2009). "Pioglitazone reduces monocyte activation in type 2 diabetes." *Acta Diabetol* 46(1): 75-7.
- Poeck/Hacke** (2006). *Neurologie*. Berlin, Springer Verlag.
- Reiche, W., R. Schafer, et al.** (1997). "[Cerebral perfusion reserve and collateral circulation in patients with internal carotid stenosis]." *Radiologe* 37(11): 891-8.
- Richter, B., E. Bandeira-Echtler, et al.** (2006). "Pioglitazone for type 2 diabetes mellitus." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD006060.
- Ricote, M., A. C. Li, et al.** (1998). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." *Nature* 391(6662): 79-82.
- Sakamoto, J., H. Kimura, et al.** (2000). "Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone." *Biochem Biophys Res Commun* 278(3): 704-11.
- Sarayba, M. A., L. Li, et al.** (2005). "Inhibition of corneal neovascularization by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand." *Exp Eye Res* 80(3): 435-42.
- Satoh, N., Y. Ogawa, et al.** (2003). "Antiatherogenic effect of pioglitazone in type 2 diabetic patients irrespective of the responsiveness to its antidiabetic effect." *Diabetes Care* 26(9): 2493-9.
- Schaper, W. and I. Buschmann** (1999). "Arteriogenesis, the good and bad of it." *Cardiovasc Res* 43(4): 835-7.

- Schaper, W. and D. Scholz** (2003). "Factors regulating arteriogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(7): 1143-51.
- Schaper, W./Scharper, J.** (2004). *Arteriogenesis*. Kluwe Academic Publishers, USA
- Scheen, A. J.** (2005). "Diabetes mellitus in the elderly: insulin resistance and/or impaired insulin secretion?" *Diabetes Metab* 31 Spec No 2: 5S27-5S34.
- Schmerbach, K., J. H. Schefe, et al.** (2008). "Comparison between single and combined treatment with candesartan and pioglitazone following transient focal ischemia in rat brain." *Brain Res* 1208: 225-33.
- Schneeloch, E., G. Mies, et al.** (2004). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced arteriogenesis reduces energy failure in hemodynamic stroke." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34): 12730-5.
- Scholz, D., W. J. Cai, et al.** (2001). "Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease." *Angiogenesis* 4(4): 247-57.
- Scriber** (1989). *The Metabolic Basis of inherited disease*, McGraw-Hill Professional.
- Sheu, W. H., H. C. Ou, et al.** (2006). "Rosiglitazone inhibits endothelial proliferation and angiogenesis." *Life Sci* 78(13): 1520-8.
- Shyy, Y. J., H. J. Hsieh, et al.** (1994). "Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 4678-82.
- Singaram, V. and R. Pratley** (2007). "The PROactive trial (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): what does it mean for primary care physicians?" *Diab Vasc Dis Res* 4(3): 237-40.
- Stegmayr, B. and K. Asplund** (1995). "Diabetes as a risk factor for stroke. A population perspective." *Diabetologia* 38(9): 1061-8.
- Stockl, K. M., L. Le, et al.** (2009). "Risk of acute myocardial infarction in patients treated with thiazolidinediones or other antidiabetic medications." *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 18(2): 166-74.
- Stoll, M. and G. F. Hamann** (2002). "[Cerebrovascular reserve capacity]." *Nervenarzt* 73(8): 711-8.
- Straus, D. S., G. Pascual, et al.** (2000). "15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9): 4844-9.
- Takano, H. and I. Komuro** (2009). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases." *Circ J* 73(2): 214-20.
- Tanaka, T., Y. Fukunaga, et al.** (2005). "Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma for monocyte recruitment and endothelial regeneration." *Eur J Pharmacol* 508(1-3): 255-65.

- Tang, W. H., G. S. Francis, et al.** (2003). "Fluid retention after initiation of thiazolidinedione therapy in diabetic patients with established chronic heart failure." *J Am Coll Cardiol* 41(8): 1394-8.
- Tang, W. H. and A. Maroo** (2007). "PPARgamma agonists: safety issues in heart failure." *Diabetes Obes Metab* 9(4): 447-54.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin** (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications." *Vascul Pharmacol* 45(1): 19-28.
- UKPDS-Group** (1998). "Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group." *Lancet* 352(9131): 854-65.
- van Royen, N., I. Hoefler, et al.** (2003). "Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression." *Circ Res* 92(2): 218-25.
- van Royen, N., I. Hoefler, et al.** (2003). "Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits." *Cardiovasc Res* 57(1): 178-85.
- Van Royen, N., J. J. Piek, et al.** (2001). "Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development." *J Nucl Cardiol* 8(6): 687-93.
- Vijay, S. K., M. Mishra, et al.** (2008). "Effect of pioglitazone and rosiglitazone on mediators of endothelial dysfunction, markers of angiogenesis and inflammatory cytokines in type-2 diabetes." *Acta Diabetol*.
- Wakino, S., U. Kintscher, et al.** (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* 275(29): 22435-41.
- Waldhäusl W., G. F. A., Scherbaum, W.** (2004). *Diabetes in der Praxis*. Heidelberg/Berlin, Springer Verlag.
- Wang, C. H., M. K. Ting, et al.** (2006). "Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus." *Am Heart J* 152(6): 1051 e1-8.
- Wang, G., Z. Zhang, et al.** (2008). "Antidiabetic rosiglitazone reduces soluble intercellular adhesion molecule-1 level in type 2 diabetic patients with coronary artery disease." *PPAR Res* 2008: 548178.
- Wang, N.** (2008). "PPAR-delta in Vascular Pathophysiology." *PPAR Res* 2008: 164163.
- Werner, C., C. H. Kamani, et al.** (2007). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance." *Diabetes* 56(10): 2609-15.

- Wilcox, R., M. G. Bousser, et al.** (2007). "Effects of pioglitazone in patients with type 2 diabetes with or without previous stroke: results from PROactive (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events 04)." *Stroke* 38(3): 865-73.
- Winkelmayer, W. C., S. Setoguchi, et al.** (2008). "Comparison of cardiovascular outcomes in elderly patients with diabetes who initiated rosiglitazone vs pioglitazone therapy." *Arch Intern Med* 168(21): 2368-75.
- Wylie-Rosett, J., W. H. Herman, et al.** (2006). "Lifestyle intervention to prevent diabetes: intensive and cost effective." *Curr Opin Lipidol* 17(1): 37-44.
- Xin, X., S. Yang, et al.** (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo." *J Biol Chem* 274(13): 9116-21.
- Yamakawa, K., M. Hosoi, et al.** (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists increase vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* 271(3): 571-4.
- Yang, H. T., B. M. Prior, et al.** (2008). "Training-induced vascular adaptations to ischemic muscle." *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 7: 57-70.
- Yang, T. and S. Soodvilai** (2008). "Renal and vascular mechanisms of thiazolidinedione-induced fluid retention." *PPAR Res* 2008: 943614.
- Zhang, W. Y., E. A. Schwartz, et al.** (2008). "Pioglitazone inhibits the expression of inflammatory cytokines from both monocytes and lymphocytes in patients with impaired glucose tolerance." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(12): 2312-8.
- Zhang, Z. G., L. Zhang, et al.** (2000). "VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain." *J Clin Invest* 106(7): 829-38.

9. Abkürzungsverzeichnis

1-/2-/3-VO	One/Two/Three vessel occlusion, 1-/2-/3-Gefäßverschluss
ACA	Arteria cerebri anterior, Anterior cerebral artery
ADA	American Diabetes Association
AGE	Advanced glycation end products
ANOVA	Analysis of variance
BA	„baseline area“
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CBF	Cerebral blood flow, Zerebraler Blutfluss
CCA	Arteria carotis communis, Common carotid artery
CSF	Colony-stimulating factor
CVR	Cerebrovascular reactivity, Zerebrovaskuläre Reaktivität, CO ₂ -Reaktion
DPP-4	Dipeptidyl Peptidase-4
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
EASD	European Association for the study of Diabetes
EC	Endothelial cell
FDA	Food and Drug Administration
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GLM	General Linear Models
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor
HD	„high dose“
HDL	high density lipoprotein
ICA	Arteria carotis interna, Internal carotid artery
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IE	Internationale Einheiten
LD	„low dose“
LDL	low density lipoprotein
LDF	Laser-Doppler flowmetry
MA	„measurement area“
MABP	mean arterial blood pressure, mittlerer arterieller Blutdruck
MCA	Arteria cerebri media, Middle cerebral artery
MCAO	MCA occlusion
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MMP	Matrix metalloproteinase

9. Abkürzungsverzeichnis

NSAID.....	non-steroidal antiinflammatory drugs
NFkappa-B	Nuclear factor-kappa B
NIDDM	non-insulin dependent Diabetes
pCO ₂	Partialdruck von Kohlendioxid
PaVK/PAD.....	Periphere arterielle Verschlusskrankheit/ Peripheral artery disease
PCA.....	Arteria cerebri posterior, Posterior cerebral artery
PComA	Arteria communicans posterior, Posterior communicans artery
pO ₂	Partialdruck von Sauerstoff
PPAR.....	peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	PPAR responsive element
PRIND	progradients reversibles ischämisches neurologisches Defizit
PROactive.....	PROspective pioglitAzone Clinical Trial IN macroVascular Events
PU.....	perfusion units
ROS	Reactive oxygen species
SD.....	Standard Deviation
SD-Ratten	Sprague Dawley-Ratten
SEM.....	Standard Error of Mean
SMC	smooth muscle cell, glatte Gefäßmuskelzelle
SSRE	shear stress responsive elements
TIA	transiente ischämische Attacke
USP.....	United States Pharmacopeia (amerikanische Fadenstärke)
VCAM-1.....	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VRAC.....	volume regulated anion channels
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Prozess der Arteriogenese.....	3
Abbildung 2: Zusammenfassende Darstellung des „Janus-Phänomens“.....	6
Abbildung 3: Circle of Willis der Ratte.....	9
Abbildung 4: Darstellung der Pathogenese des Diabetes mellitus nach LaMonte.....	11
Abbildung 5: Darstellung des Wirkungsmechanismus von PPARs.....	19
Abbildung 6: Darstellung der „insulin-sensibilisierenden“ Wirkung der Glitazone.....	21
Abbildung 7: Zusammenfassung der Wirkungen von PPAR- γ -Aktivierung auf Zellen, die am Gefäßumbau beteiligt sind, modifiziert nach Hsueh/Law.....	23
Abbildung 8: Beispiel für die Auswertung einer aufgezeichneten CBF-Kurve.....	35
Abbildung 9: Darstellung des Verlaufs des mittleren Körpergewichts bei 3-VO-operierten Tieren.....	41
Abbildung 10: Darstellung des Verlaufs des mittleren Körpergewichts bei Sham-operierten Tieren.....	42
Abbildung 11: Vergleich des relativen Körpergewichts.....	43
Abbildung 12: Beispiel für die Aufzeichnung des CBFs während 3-VO.....	44
Abbildung 13: CBF unmittelbar (A), 5 Minuten (B) und 10 Minuten (C) nach Okklusion der A. carotis communis.....	44
Abbildung 14: Latexperfusion der Heubnerschen Anastomosen.....	45
Abbildung 15: Mittels Latexangiographie dargestellter Circle of Willis.....	46
Abbildung 16: Diameter der A. cerebri posterior ipsilateral (A) und contralateral (B) der 3-VO-Gruppen.....	47
Abbildung 17: Diameter der A. cerebri posterior ipsilateral (A) und contralateral (B).....	47
Abbildung 18: Darstellung der A. cerebri posterior mittels Latexangiographie bei 3-VO- (links, A bis C) und Sham-operierten (rechts, D-F) Tieren.....	50
Abbildung 19: Darstellung des CBFs und der CVR von 3-VO-Tieren.....	51
Abbildung 20: Beispiele für Aufzeichnung des CBFs während Messung der CVR.....	52
Abbildung 21: Darstellung des CBFs und der CVR von Sham-Tieren.....	54
Abbildung 22: Beispiele für Aufzeichnung des CBFs während Messung der CVR.....	55
Abbildung 23: Darstellung des CBFs und der CVR aller Gruppen im Vergleich.....	56
Abbildung 24: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der A. cerebri posterior (A) und der A. cerebri superior (B).....	57

Abbildung 25: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der A. communicans posterior (A) und der A. cerebri posterior (B)	57
Abbildung 26: Glatte Gefäßmuskulatur der A. cerebri posterior eines 3-VO operierten Kontrolltieres in 20facher (A) und 40facher (B, C) Vergrößerung.....	59
Abbildung 27: Glatte Gefäßmuskulatur der A. cerebri posterior eines Pioglitazon LD (A) behandelten, eines Pioglitazon HD (B) behandelten 3-VO Tieres und eines unoperierten, unbehandelten Tieres (C) in 40facher Vergrößerung.....	60
Tabelle 1: Gruppeneinteilung	28
Tabelle 2: Behandlungsschema	30
Tabelle 3: Anzahl überlebender, auswertbarer Tiere	41
Tabelle 4: Diameter der Arterien des Circulus Wilisi.....	48
Tabelle 5: Ergebnisse der CVR-Messung, Blutgasanalyse, Blutglukose- und Hämatokritbestimmung	53
Tabelle 6: Ergebnisse der qualitativen Analyse der α -SMC-Aktin-Färbung	58

11. Danksagungen

Ich danke Herrn PD Dr. I. Buschmann sehr herzlich für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen und für seine stets aufmerksame, kompetente, hilfreiche und motivierende Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl sehr herzlich für die stetige Unterstützung, den fachlichen Austausch und die detaillierte Beratung, besonders in veterinärmedizinischen und veterinäranatomischen Fragen, während des Dissertationsvorhabens.

Besonders herzlich danke ich auch Herrn André Dülsner für die Einarbeitung in alle durchgeführten Methoden und seine positive, aufbauende Unterstützung bei der Durchführung sowie für seine Hilfe bei sämtlichen Problemen und Schwierigkeiten im Rahmen des Projektes.

Ich danke den Kolleginnen und Kollegen aus der Arbeitsgruppe, namentlich Susanne Granzow, Danae Mitakidou, Nora Gatzke, Philipp Hillmeister, Doreen Jahnke, Julia Pfitzner Franziska Weber sowie unserer Leiterin des in-vitro-Bereichs, Frau Dr. Kerstin Lehmann für ihr Unterstützung, Motivation und den interdisziplinären Ideenaustausch.

Ich danke abschließend auch allen nicht genannten MitarbeiterInnen unserer Arbeitsgruppe, ohne die die Zeit wohl nicht so angenehm verlaufen wäre, besonders herzlich.

Zuletzt, wenn auch nicht als letztes, möchte ich meinen Eltern, Ursula Ihrig und Rainer Glaser, für ihre moralische und finanzielle Unterstützung danken, meiner verstorbenen Großmutter, Else Glaser, deren Wunsch es war, dass ich diese Arbeit abschließe, was stets meine größte Motivation war und meinem Freund, Martin Schmidt, dafür dass er mir die Kraft gegeben hat, immer an den Erfolg zu glauben.

12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quelle und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Johanna Glaser