

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die Rolle der Entwicklung einer Vaskulopathie beim Diabetes mellitus**

Kardiovaskuläre Erkrankungen repräsentieren die höchste Komplikationsrate beim Diabetes mellitus [149]. Über 75 % aller Diabetiker versterben an kardiovaskulären Komplikationen [150-152]. Im Vergleich zu Nicht-Diabetikern haben Patienten mit Diabetes mellitus eine stärker ausgeprägte Atherosklerose, eine höhere Inzidenz der Mikro- und Makroangiopathie sowohl der peripheren als auch der kardialen Gefäße und eine schlechtere Prognose bezogen auf die Ein-Jahres-Überlebensrate nach abgelaufenem Herzinfarkt [153]. Die Mortalitätsrate bei einer vorliegenden koronaren Herzerkrankung ist im Vergleich zu Nichtdiabetikern um das dreifache erhöht [153]. Die Framingham Studie ergab Ende der 70er Jahre, dass Diabetiker ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen aufweisen als Nichtdiabetiker [106, 107]. Damals fand sich bei 45-74jährigen Patienten nach einem Followup von 20 Jahren in multivariablen Analysen ein 1,7fach erhöhtes Risiko bei den Männern und ein 2,1fach erhöhtes Risiko bei den Frauen für eine koronare Herzerkrankung [106, 107]. Das Risiko erhöhte sich weiter beim Vorhandensein von weiteren Risikofaktoren wie Hypertonus, Nikotinabusus [106, 107]. Bei der Tecumseh-Studie fand sich bei über 40-Jährigen nach einem Followup von 18 Jahren bei Diabetikern geschlechtsunabhängig im Vergleich zu Nichtdiabetikern eine dreifach erhöhte Mortalität an koronarer Herzerkrankung [154]. Im „Chicago Heart Association Detection Project“ lag das relative Risiko für Diabetiker an einer koronaren Herzerkrankung zu versterben nach einem Followup von 9 Jahren von 35-64-Jährigen sogar noch höher bei Männern bei 3,8 und bei Frauen bei 4,7, adjustiert nach Alter, Geschlecht und Vorliegen weiterer Risikofaktoren [155]. Auch die NHANES-I-Kohorte ergab eine altersadjustierte 2fach erhöhte Mortalität bei Diabetikern im Vergleich zu Nichtdiabetikern [156]. Haffner et al. konnte in einer Studie zeigen, dass die Inzidenz einen Myokardinfarkt zu erleiden bei nichtdiabetischen Patienten, die in ihrer Krankengeschichte schon einmal einen Herzinfarkt hatten, gleich hoch war wie bei Diabetikern ohne vorausgegangenes kardiales Ereignis [157].

### **4.2 Die endotheliale Dysfunktion beim Diabetes mellitus**

Kardiovaskuläre Komplikationen sind die Hauptursachen für die Morbidität und Mortalität von Patienten mit Diabetes mellitus Typ-1 und -2. Ein initiiender Faktor für die Entwicklung von diabetischer Atherosklerose ist die endotheliale Dysfunktion [158]. Die vorliegende Arbeit konnte tierexperimentell zeigen, dass unter diabetischen

Bedingungen die endothelabhängige Vasodilatation *in vivo* signifikant im Vergleich zu normoglykämischen Bedingungen reduziert ist. Es gibt zahlreiche Studien, die anhand von verschiedenen experimentellen Modellen ebenso belegen können, dass bei Diabetikern im Vergleich zu nichtdiabetischen Patienten eine endotheliale Dysfunktion vorliegt [117, 119] (siehe 1.3.6). Weitere Studien haben gezeigt, dass eine Hyperglykämie die NO-Produktion beeinträchtigt, und andere Studien konnten in Untersuchungen an diabetischen Patienten und in experimentellen Diabetes-Tiermodellen eine beeinträchtigte endothelabhängige Vasodilatation nachweisen [147, 159-164]. Yu et al. konnte anhand einer Studie mittels des Knöchel-Arm-Index und eines Hoch-Frequenz-Ultraschalles den endothelialen Funktionsstatus bei Diabetikern mit einer peripheren Gefäßerkrankung charakterisieren [120]. Im Vergleich standen 28 Patienten mit Diabetes Typ-2 mit einem Knöchel-Arm-Index von  $<0,97$ , 31 diabetische Patienten mit einem Knöchel-Arm-Index von  $\geq 1,0$  und 28 Nichtdiabetiker als Kontrollgruppe. Alter, Blutdruck, diabetische Krankheitsdauer und Prädiktoren für eine endotheliale Dysfunktion wurden bei den Patienten mit einer peripheren Gefäßerkrankung adjustiert. Die Untersuchung ergab, dass Diabetiker eine verminderte Fluß-vermittelte reaktive Dialatation zeigten und diese bei diabetischen Patienten mit einer peripheren Gefäßerkrankung noch stärker vermindert war im Vergleich zu nichtdiabetischen Patinten, dabei ist eine verminderte reaktive Hyperämie als ein Index für die endotheliale Dysfunktion zu betrachten [120]. Andere Studien konnten zudem belegen, dass eine Korrelation zwischen der endothelialen Dysfunktion und dem Schweregrad des Diabetes besteht. Mehrere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass akute und chronische Hyperglykämien zu einer endothelialen Dysfunktion führen können und dass eine enge Beziehung zwischen dem Ausprägungsgrad der endothelialen Dysfunktion und der diabetischen Komponente besteht [109-112]. Eine diabetische Studie am Menschen konnte nachweisen, dass bei Typ-1-Diabetikern in Abhängigkeit von der Höhe des HbA1c-Wertes eine Zunahme der endothelialen Dysfunktion besteht [117]. Eine andere Studie zeigte bei Patienten, dass gefäßschädigende Effekte, hervorgerufen durch akute Hyperglykämien mittels Substitution von L-Arginin, dem Substrat der eNOS, regredient waren [110].

#### **4.2.1 Die eNOS-Regulation beim Diabetes mellitus**

Das Frühzeichen für vaskulären Komplikationen in Diabetes mellitus ist die endotheliale Dysfunktion, bedingt durch eine reduzierte NO-Produktion. Der Pathomechanismus, der in eine verminderte Bioverfügbarkeit des NO mündet, scheint bei dem Risikofaktor Diabetes mellitus unterschiedlich zu anderen Risikofaktoren wie Hypertonus, Nikotinabusus, Umweltfaktoren und Lebensstil zu sein [165]. Der Einfluß der Hyperglykämie auf die eNOS-Regulation beim Diabetes mellitus wird aktuell noch kontrovers diskutiert [128, 129]. In Diskussion stehen Mechanismen, denen die endotheliale Dysfunktion unterliegt: Eine veränderte eNOS-Expression, eine Reduktion der Phosphorylierung der eNOS, die eNOS-Entkoppelung und eine erhöhte Inaktivierung der eNOS durch erhöhte Konzentration von Radikalen und Veränderungen der Expression von eNOS-Kofaktoren [130]. Ein Diskussionspunkt ist die Frage, ob die Expression von eNOS unter diabetischen Bedingungen unphysiologisch zu hoch oder zu niedrig reguliert wird. Die Ergebnisse der Untersuchung der eNOS-Expression der vorliegenden Arbeit zeigten, dass es unter diabetischen Bedingungen zu einer Reduktion der eNOS-Expression im Vergleich zu normoglykämischen Bedingungen kommt. Desweiteren spricht die Assoziation zwischen verbesserter Endothelfunktion bei behandelten diabetischen Ratten und einer nachgewiesenen pharmakologischen Erhöhung der eNOS-Expression gegen die Hypothese, dass die eNOS beim Diabetes mellitus überreguliert ist. Srinivasan et al. geht ebenfalls von einer reduzierten Expression der eNOS bei der endothelialen Dysfunktion aus: Eine *in vitro* Untersuchung an humanen Endothelzellen der Aorta hat gezeigt, dass nach verschiedenen Zeitpunkten nach Exposition von Glucose sich die eNOS-Expression unterschiedlich verhält. Eine akute Glukoseexposition führte zu einer erhöhten eNOS-Aktivität und eNOS-Expression von mRNA und Protein, während im Gegensatz dazu bei chronologischer Beobachtung eine chronisch hohe Glucoseexposition zu einer reduzierten NO-Produktion in Endothelzellen und reduzierten Expression von eNOS-mRNA und -Protein führte [130]. Weitere Untersuchungen dieser Studie zeigten, dass die Reduktion der eNOS-mRNA- und Protein-Expression durch Glukose über eine falsche mitochondriale ROS-Produktion reguliert wird. Ähnliche Ergebnisse ergab eine Studie von Ho et al. Eine akute Glukose-Exposition für 2-6 Stunden führte zu einer Hochregulation der eNOS-Expression in humanen aortalen Endothelzellen, die aber nach einer längeren Exposition über Tage downreguliert wurde [131]. Salt et al. berichtet gleichfalls von einer reduzierten eNOS-

Aktivität durch chronische Hyperglykämien [132]. Gegensätzliche Ergebnisse ergab eine Studie von Cosentino et al., in der von einer Hochregulation der eNOS-Expression nach einer Glucosegabe auf humane aortale Endothelzellen für eine Dauer von 5 Tagen berichtet wird [133]. Hink et al. konnte in einer Studie mittels eines experimentellen Diabetesmodells eine erhöhte Expression von dysfunktionaler eNOS sowie eine erhöhte Superoxid-Produktion nachweisen. Die erhöhte Radikalproduktion resultierte nach Hink et al. aus dem eNOS-uncoupling und der NADPH-Oxidase. Bei noch fehlender einheitlicher Klärung über die Proteinexpressionsmechanismen der eNOS konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es unter diabetischen Bedingungen zu einer Reduktion der Proteinexpression von eNOS kam und dies assoziiert war mit einer verminderten Vasodilatation als Indikator für eine reduzierte NO-Verfügbarkeit. Auf Grund dieses experimentell ermittelten Ergebnisses entstand die Überlegung mittels eines eNOS-Proteinexpressions-Aktivators der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion unter diabetischen Bedingungen entgegenzuwirken.

#### **4.2.2 Die Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion unter diabetischen Bedingungen**

Im gesunden Gefäß hat NO auf molekularer Ebene verschiedene Wirkmechanismen, die zu einer Vasodilatation führen können. Der erste Wirkmechanismus ist die Interaktion des NO mit Metallzentren von Molekülen, nachdem NO vom Endothel in die glatte Muskulatur diffundiert ist. Im Folgenden wird dadurch eine Guanylatcyclase stimuliert, welche die Umwandlung von Guanosinmonophosphat (GMP) zu zyklischem GMP (cGMP) steuert. CGMP als der second messenger von NO aktiviert eine Proteinkinase und induziert die muskuläre Relaxation, es kommt zur Vasodilatation. Über den zweiten Wirkmechanismus kann NO nach Interaktionen mit Thiolgruppen von Molekülen zu Signaltransduktionen führen. Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren, Enzymen oder Proteinen, die die Calcium-Homöostase der Zelle beeinflussen, werden über diesen Weg moduliert [16]. Auf diesen Weg kann es zu einer positiven Rückkoppelung kommen, denn die eNOS wird Calcium-abhängig über Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden oder über Scherkräfte am Endotel aktiviert. Allerdings sind auch Calcium-unabhängige Aktivierungswege nachgewiesen [32, 33]. Neben NO werden im Endothel weitere vasoaktive Substanzen gebildet, dazu gehören Prostaglandine, Endothelin, Angiotensin II (AT II), gebildet aus Angiotenin I (AT I) durch das Angiotensinogenase (,,*angio-converting-enzyme*“, ACE) an der

Endotheloberfläche, Inaktivierung von Bradykinin durch ACE. Somit bestehen Interaktionen zwischen dem NO-System und dem Renin-Angiotensin-System, denn über ACE wird Bradykinin inaktiviert, welches in seiner aktivierten Form über einen B2-Rezeptor zur Freisetzung von NO führt [166]. Zwischen dem NO-System und dem Endothelin-System bestehen Interaktionen durch die Inhibition der Expression und Wirkung von Endothelin durch NO über cGMP. Endothelin (ET) bewirkt an glatten Muskelzellen über ET A- und ET B-Rezeptoren eine Vasokonstriktion. An der Endothelzelle wird durch ET über ET B-Rezeptoren die NO-Freisetzung stimuliert [167]. Neben NO wird durch Acetylcholin und Bradykinin und andere Stimuli EDHF freigesetzt, welches ebenfalls eine endothelabhängige Vasodilatation bewirkt [168]. In Koronararterien konnte als eine EDHF-Synthase das Cytochrom P450 2C nachgewiesen werden, die durch LPS und Zytokine gehemmt werden kann [169].

Hohe Glucosekonzentrationen führen zu einer Aktivierung von PK C und Bildung von Sauerstoffradikalen, Aktivierung und Bildung von Sauerstoffradikale durch AGEs, Inaktivierung von NO durch Sauerstoffradikale und Verletzung des Endothels [109] (siehe 1.3.6). Sauerstoffradikale können nicht nur zu einer direkten Inaktivierung von NO führen, sondern stimulieren auch die Bildung von vasokonstriktorisches Prostanoiden. Der physiologische Abbau von NO-Synthase-Inhibitoren wird durch Sauerstoffradikale blockiert. Die Aktivierung der PK C durch Hyperglykämien führt zu einer erhöhten Stimulierung der eNOS und gleichzeitig der NADPH-Oxidase, wodurch durch deren Endprodukte NO und Superoxid das Radikal Peroxynitrit entsteht. Dieses entkoppelt die eNOS durch Oxidation des Kofaktors Tetrahydrobiopterin, die in Folge statt NO Superoxid-Radikale bildet [91] (siehe 1.2.1.3.1).

#### **4.3 Die endotheliale Dysfunktion als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen**

Die koronare Herzerkrankung ist die führende Hauptursache für die Morbidität und Mortalität in Industrieländern [170]. Untersuchungen konnten zeigen, dass koronare Risikofaktoren eine Verschlechterung der endothelialen Funktion der Koronargefäße verursachen können [53, 54, 134, 171-175], welches als die endotheliale Dysfunktion das erste Stadium der Pathogenese der Atherogenese ist [53, 54, 175]. Zahlreiche Studien konnten belegen, dass eine endotheliale Dysfunktion in den Koronargefäßen von Patienten assoziiert sein kann mit einer myokardialen Ischämie [175, 176]. So

konnte eine Studie nach jahrelanger Beobachtung von Patienten mit einer angiographisch bestätigten Koronarsklerose eine endotheliale Dysfunktion bei diesen beweisen. Diese zeigten bei eindeutig pathologischer Antwort auf eine Acetylcholingabe langfristig eine erhöhte Rate an kardialen Ereignissen, wie Herzinfarkt, Angina pectoris oder Herztod [177]. Außerdem konnte durch andere Studien gezeigt werden, dass eine Modifizierung von kardiovaskulären Risikofaktoren, die zu einer endothelialen Dysfunktion führt, das outcome der Patienten verbessert und die kardiale Atherosklerose sich dazu disproportional verhält [178]. Dieser Benefit wird der Reduktion der endothelialen Dysfunktion zugesprochen [176, 178]. So gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass einer endothelialen Dysfunktion der epikardialen Gefäße eine prognostische Relevanz zukommt. Eine Studie konnte bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung nachweisen, dass eine endotheliale Dysfunktion vorliegt und diese einen bedeutenden Einfluß auf das Risiko, an kardiovaskulären Komplikationen zu erkranken, hat [179]. Suwaidi et al. zeigte in einer Studie mit Patienten mit einer milden koronaren Herzerkrankung ohne das Vorliegen einer koronaren Obstruktion, dass die endotheliale Dysfunktion assoziiert ist mit einer erhöhten kardiovaskulären Komplikationsrate und die koronare endotheliale Dysfunktion eine wesentliche Rolle für die Prognose von koronarer Atherosklerose hat [178]. Es gibt 2 weitere Studien, die ähnliche und bedeutsame Hinweise dafür bringen, dass eine endotheliale Dysfunktion für das Voranschreiten einer koronaren Herzerkrankung und ihrer Folgen prognostisch bedeutsam sein kann [180, 181]. Widlansky et al. berichtet ebenfalls, dass beim Vorhandensein von kardiovaskulären Risikofaktoren die endotheliale Gefäßtonus regulierende Funktion beeinträchtigt wird und das Vorkommen von Angina pectoris, Myokardinfarkt, Claudiacatio und Apoplex teilweise auf die endotheliale Dysfunktion bezogen ist. Widlansky et al. und Vita et al. beschreiben im Einklang zusätzlich, dass mehrere therapeutische Interventionen die endotheliale Funktion verbessern und so die endotheliale Funktion als ein „Barometer“ für das physiologische gesunde kardiovaskuläre System anzunehmen ist [182, 183]. Die endotheliale Funktion als ein Barometer für die Aufrechterhaltung eines gesunden kardiovaskulären Systems bietet Möglichkeiten für neue therapeutische Optionen und Präventionen. Die endotheliale Dysfunktion, als das Vorstadium von kardiovaskulären Erkrankungen, ist im Anfangsstadium noch reversibel und die Morphologie des Endothels ist noch nicht beeinträchtigt [134]. Daher repräsentiert die Wiederherstellung der normalen Endothelfunktion ein wichtiges Therapieziel.

#### **4.4 Die Rolle der inflammatorischen Antwort beim Diabetes mellitus**

Die pathophysiologischen Mechanismen der endothelialen Dysfunktion beim Diabetes mellitus (Aktivierung Polyol- und Hexosaminstoffwechselweges, PK C, Bildung von AGE, Veränderung im RedOxpotential [121, 122, 184, 185]) induzieren Signalkaskaden in der Zelle, die mit der Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors Nuklearfaktor (NF)  $\kappa$ B enden [121, 186, 187]. Die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B-spezifischen Inhibitormoleküle (I)  $\kappa$ B [188, 189]. Nicht stimuliert halten sie den Transkriptionsfaktor im Zytoplasma zurück, phosphoryliert wird NF- $\kappa$ B durch die proteosomenvermittelte Degradation von I $\kappa$ B aus ihm freigesetzt und in den Zellkern transloziert [188, 189]. Die Familie der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf Untereinheiten, den p105/p50, p100/p52, p65, relB, c-Rel. Diese können als Homo- oder Heterodimere an dekamere DNA-Erkennungssequenzen nach der Translokation binden [189]. Es folgt die Aktivierung der Expression von Genen, die bei der Akute-Phasen-, Immun- und Entzündungsantwort nötig sind. Dazu zählen Zytokine, wie TNF $\alpha$ , IL-6, und Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1, VCAM-1 aber auch Wachstumsfaktoren, Endothelin-1, iNOS, Tissue factor, Cyclooxygenase, u.a. [189-192]. IL-6, dessen Aktivierung über NF- $\kappa$ B reguliert wird, ist das einzige Zytokin, das alle Akute-Phase-Proteine in der Entzündungsantwort aktivieren kann [193]. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Induktion von CRP [194]. Erhöhte IL-6- und CRP-Werte sind Prädiktoren für die Entstehung von Diabetes mellitus, wie in mehreren Verlaufsstudien gezeigt werden konnte [195-197], darunter die MONICA-Studie, die bei initial gesunden Probanden zeigte, dass eine systemische Entzündung mit einem 2,7fachen Risiko Diabetes mellitus zu entwickeln, assoziiert ist [196]. Die Zunahme der NF- $\kappa$ B-Aktivität unter hyperglykämischen Bedingungen kann also zur kausalen systemischen Entzündung des Diabetes beitragen. Da neben Entzündungszellen auch Adipozyten Zytokine freisetzen, nimmt man an, dass diese die Insulinresistenz mit der verbundenen Fettleibigkeit, Diabetes mellitus und Arteriosklerose auslösen, anstatt deren Folge zu sein [198]. Weiterhin belegen andere Studien, dass selbst kurzfristige Hyperglykämien zu einer erhöhten NF- $\kappa$ B-Aktivierung und einer folgenden Plasmazytokinaktivierung, wie IL-6 und TNF $\alpha$ , führen und so eine Entzündungsreaktion hervorrufen können [199, 200]. Wie schon erläutert führt eine Aktivierung durch NF- $\kappa$ B zu einer Induktion von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen [189-192]. Neben den Zytokinen spielen die Adhäsionsmoleküle eine weitere entscheidende Rolle bei der Entzündungsreaktion der diabetischen Vaskulopathie. Adhäsionsmoleküle ermöglichen

die lokale Regulation von Gefäßwandinteraktionen, darunter die Leukozytenadhäsion an das Endothel, die Leukozytenaktivierung und –migration [69, 201, 202]. Die Leukozytenmigration trägt entscheidend bei Gefäßwandschädigungen und damit der Entwicklung zur Atherosklerose mit (siehe 1.2.1.2). Im Folgenden kommt es zur Chemotaxis. Einwandernde Lymphozyten und Monozyten setzen ebenfalls Zytokine frei, welche wiederum als Amplifizierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Entzündungsreaktion dienen [13, 203]. Zu den von NF- $\kappa$ B-regulierten Adhäsionsmolekülen zählen VCAM-I, ICAM-I, „*platelet/endothelial cell adhesion molecule*“ (PECAM-I), E-Selektine, P-Selektine, IL-8 und MCP-1 [201, 202, 204, 205]. Neben der NF- $\kappa$ B-Aktivierung können diese auch durch PAF („*platelet activation factor*“) induziert werden. PAF wird von aktivierten Endothelzellen sezerniert und ist nachweislich bei Diabetes mellitus erhöht exprimiert [206]. Er führt neben einer Rückkoppelung zu einer Induktion oder Verstärkung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, zu einer direkten Thrombozytenaggregation und fördert so die Zelladhäsion an der endothelialen Oberfläche. Aktivierte Endothelzellen sezernieren neben PAF und Selektinen auch VCAM-I und ICAM-I. VCAM-I und ICAM-I sind wichtige Faktoren bei der Kaskade der Zellinfiltration, denn sie binden über Integrine an unterschiedliche Rezeptoren zirkulierender Monozyten und Leukozyten und fördern so die Zellmigration [5, 13, 67-69, 207].

Die Ergebnisse bezüglich der inflammatorischen Antwort unter diabetischen Bedingungen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass es im Vergleich zu der normoglykämischen Kontrollgruppe zu einer signifikant erhöhten Expression der Entzündungsparameter ICAM-I, VCAM-I und TNF $\alpha$  kam. Eine Erhöhung der eNOS-Expression via AVE3085 führte zu einer signifikanten Reduktion dieser erhöhten Expression der Entzündungsparameter. Somit ist davon auszugehen, dass beim Diabetes mellitus neben der beeinträchtigten Gefäßfunktion bei der endothelialen Dysfunktion der inflammatorischen Antwort -als ein wichtiges Charakteristikum der endothelialen Dysfunktion- eine bedeutende Komponente zugesprochen werden muß. Man kann von einer Assoziation zwischen Erhöhung der eNOS-Expression und einer Reduktion dieser Entzündungsparameter unter pharmakologischem Einfluß sprechen, der Zusammenhang bezogen auf die Mechanismen könnte darin liegen, dass durch eine Erhöhung der eNOS-Aktivität vermehrt NO produziert wird, welches sich antiinflammatorisch auf das Endothel auswirkt. NO kann durch eine Reduktion der



Expression von Adhäsionsmolekülen einer Inflammation gegenregulieren [13, 14] und durch seine antioxidative Eigenschaft einem oxidativem Stress entgegenwirken. Ähnliche Ergebnisse, die für eine Assoziation von erhöhter inflammatorischer Antwort beim Diabetes mellitus und einer Verbesserung der diabetischen Folgen durch eine Reduktion der inflammatorischen Antwort sprechen, konnten in mehreren Studien erzielt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Inhibitoren der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, Antioxidantien und PK C-Inhibitoren zu einer Hemmung der Glukose- und AGE-vermittelten Induktion von VCAM-I, ICAM-I, E-Selektin und der endothelialen Monozytenadhäsion führen. Durch neutralisierende Antikörper, die an RAGE (Rezeptor für AGE) binden, konnte die Expression von VCAM-I *in vitro* in experimentellen Diabetesmodellen vermindert werden [208]. In hyperglykämischen Studien konnten bei Kindern erhöhte ICAM-I-Plasmaspiegel gefunden werden [209]. Eine andere Studie mit schlecht eingestellten Diabetikern versus einer Kontrollgruppe konnte belegen, dass im Serum der Diabetiker die Leukozyten- und Monozytenadhärenz an das Endothel verstärkt ist [208, 210]. In einer *in vitro* Untersuchung konnte desweiteren gezeigt werden, dass humane aortale Endothelzellen, nachdem sie einem Medium mit hoher Glukosekonzentration ausgesetzt waren, einen Anstieg der ICAM-I-Proteinexpression vorwiesen [211]. Eine weitere Studie konnte belegen, dass Endothelzellen und Monozyten, die in einem Medium höherer Glukosekonzentration inkubiert wurden, eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit aufwiesen, die wiederum durch Antikörper gegen  $\beta_2$ -Integrine gehemmt werden konnte [162]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass hyperglykämiebedingte Entzündungsreaktionen über die NF- $\kappa$ B-Aktivierung von Adhäsionsmolekülen zu einer Gefäßschädigung des Diabetikers führen. In der vorliegenden Arbeit konnte in den Mm. quadriceps der unbehandelten STZ-diabetischen Ratten eine stark erhöhte endotheliale mRNA-Proteinexpression von VCAM-I und ICAM-I nachgewiesen werden. Das ist für den Hinweis einer inflammatorischen Komponente bei der endothelialen Dysfunktion bei der diabetischen Vaskulopathie bedeutend, denn VCAM-I und ICAM-I können unter diabetischen Bedingungen nach der NF- $\kappa$ B-Aktivierung von Zytokinen von aktivierten Endothelzellen sezerniert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Adhäsionsmolekülproteinexpression von gesundem Gewebe (SD) im Vergleich zu diabetischem (STZ) wurden am Menschen bestätigt. So wurde gezeigt, dass Patienten mit Diabetes mellitus höhere Plasmaspiegel an löslichem VCAM-I und ICAM-I aufwiesen als die gesunden Kontrollpersonen [209, 212-214].

## **4.5 Der Effekt einer pharmakologischen Erhöhung der eNOS-Expression**

### **4.5.1 Der Effekt einer pharmakologischen Erhöhung der eNOS auf die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion**

Die endotheliale Dysfunktion ist wesentlich durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit gekennzeichnet. Ursächlich hierfür könnte eine Dysregulation der eNOS sein. Experimentelle und humane Studien zeigen zum Teil konträre Ergebnisse bezüglich der eNOS-Expression unter diabetischen Bedingungen, was unter anderem durch unterschiedliche Beobachtungzeitpunkte, unterschiedliches zu untersuchendes Gewebe oder ein unterschiedliches Studienkollektiv begründet sein könnte [130-133]. Während eine Reihe von kardiovaskulären Medikamenten, wie zum Beispiel Betablocker, ACE-Hemmer oder Statine, wahrscheinlich sekundär die NO-Bioverfügbarkeit verbessern [215-218], wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals der vaskuläre Effekt durch eine direkte Erhöhung der eNOS unter Diabetes mellitus Typ-1 -Bedingungen untersucht. Eine chronische Behandlung mit dem eNOS-Enhancer AVE3085 führte in der durchgeführten Studie zu einer nahezu wiederhergestellten eNOS-Proteinexpression im M. quadriceps unter STZ-diabetischen Bedingungen. Dies war mit einer signifikanten Verbesserung der Endothelfunktion unter STZ-diabetischen Bedingungen assoziiert.

### **4.5.2 Der Effekt einer pharmakologischen Erhöhung der eNOS-Expression auf die inflammatorische Antwort**

Die vorliegende Arbeit konnte außerdem zeigen, dass die Behandlung von diabetischen Ratten mit AVE3085 zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-I und ICAM-I auf das nahezu basale Niveau von normoglykämischen Ratten führte. AVE3085 mindert die Entwicklung einer vaskulären Entzündungsreaktion und ist mit einer Verbesserung der Endothelfunktion unter diabetischen Bedingungen assoziiert, wie in der STZ/eNOS-Tiergruppe gezeigt werden konnte. In verschiedenen Studien wird beschrieben, dass die gesteigerte VCAM-I- und ICAM-I-abhängige Leukozytenadhäsion an Endothelzellen in Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen über einen NF- $\kappa$ B-abhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt wird [189, 191, 192, 204, 207] (siehe 4.4). Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist zusätzlich an der Induktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und MCP-1 beteiligt [208, 211]. Die Behandlung von diabetischen Ratten mit AVE3085 zeigte weiterhin eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression des Zytokins TNF $\alpha$  auf das

nahezu basale Niveau von normoglykämischen Ratten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass eine pharmakologische Erhöhung der eNOS-Expression zu einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit führt und über antiinflammatorische Effekte die Entwicklung und Progression einer diabetischen Vaskulopathie mindert.

## **4.6 Methodenkritik**

### **4.6.1 Methodenkritik des diabetischen Tiermodelles**

Ein optimales diabetisches Tiermodell, bei dem die Krankheit des Tieres auf molekularer Ebene genau dieselben Prinzipien zeigt wie die Krankheit des Menschen, gibt es heutzutage nicht. Dies liegt unter anderem daran, dass die Ursache des Diabetes mellitus Typ-1 auf seiner molekularbiologischen Grundlage noch nicht in seiner vollen Gänze erforscht ist und daher ein provoziertes auf molekularbiologischer Ebene gleiches Ausbruch der Krankheit bei einem Tier unmöglich macht. Daher ist es sinnvoll ein Tiermodell zu wählen, dessen Erscheinungsbild dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus Typ-1 am ähnlichsten ist. Das eingesetzte STZ-induzierte diabetische Tiermodell ist das aktuell am besten dokumentierteste und weit verbreitetste Modell. Es kann in seiner klinischen Ausprägung auf einige klinische Symptome des menschlichen diabetischen Krankheitsbildes übertragen werden. Um einige Beispiele wiederzugeben, seien hier die Polydipsie und Polyurie, Glucosurie, Gewichtsverlust, frühe Sterblichkeit bei fehlender Einstellung, Retinopathia diabetica, Makro- und Mikroangiopathie genannt. Ein weiterer Vorteil bietet das STZ-Diabetesmodell in seinem zeitlichen Rahmen. Auf das Alter der Ratte angewendet kommt es daher zu einem frühen klinischen Krankheitsbild mit Blutzuckerwerten >500 mg/dl ab 14 Tagen, während sich beim menschlichen Diabetes die Progression des Diabetes mit dem Auftreten von kardiovaskulären Komplikationen auf viele Jahren erstreckt. Dadurch ist durch den kurzen Zeitrahmen die Studie gut überschaubar. Besonders in Hinblick auf die Progression der diabetischen Vaskulopathie ist das Modell das am besten erforschtete und daher optimal auf die Fragestellung dieser Arbeit anzuwenden. Auf Grund der einmaligen Untersuchung der Parameter ist bei diesem Modell keine Aussage zu treffen, wie sich diese gemessenen Parameter der Gefäßfunktion und der Molekularbiologie im zeitlichen Verlauf bezogen auf den Diabetes verhalten. In unserer Arbeitsgruppe wird ausschließlich zu ähnlichen Fragestellungen mit diesem Modell gearbeitet. Dabei hat sich im Verlauf und transferen Vergleich herausgestellt, dass die

Wahl des Sechs-Wochen-Zeitpunktes gut geeignet ist, die Langzeitfolgen eines chronischen Diabetes Mellitus zu untersuchen.

#### **4.6.2 Methodenkritik des Modells des autoperfundierten Hinterbeines**

Ein möglicher Angriffspunkt des Modells des autoperfundierten Hinterbeines kann die unphysiologische Durchspülung des Gefäßsystems mit heparinierter KHS-Lösung bei Inbetriebnahme der Rollerpumpe des extrakorporalen Kreislaufes sein. Die Operation der Ratte per se übt einen Stressfaktor auf das Tier und damit einhergehend auf das Gefäßsystem aus. Dem entgegenzusetzen ist, dass isoliert betrachtet die KHS-Lösung standardisiert zur Perfusion von Organen ist. Der entstehende Stressfaktor ist für die Fragestellung der Arbeit wichtig, da er für die Erfassung der hämodynamischen Parameter erforderlich ist. Zudem ist gesamt betrachtet bei allen operierten Tieren die Methode in Bezug auf Operation, Perfusionsvolumina und Heparinisierungsgrad gleich aufgebaut. Somit hat eine Standardisierung stattgefunden und die Ergebnisse der Gefäßfunktion sind daher valide. Ein weiterer Angriffspunkt dieses Modell könnte sein, dass die gemessene Vasodilatation eine Summe aus der aller nachgeschalteten Gefäßsegmente, also Arterie, Arteriolen, Kapillaren und Venen, ist und eine separate Beeinflussung eines Gefäßsegmentes nicht evaluierbar ist. Aber auch dies wird durch die Methode standardisiert und valide in seiner Aussagekraft. Das Hauptargument für die Wahl dieser Methode ist, dass es derzeit das einzige *in vivo* Modell zur Messung der Gefäßfunktion ist. Es konnte daher gut zur Beantwortung der Fragestellungen in dieser Arbeit benutzt werden.

Als Maß der Vasodilatation wurde das Integral des Druckabfalls nach Dilatationsinduktion gemessen. Prinzipiell sind auch die Amplitude des maximalen Druckabfalls oder eine Prozentuale Angabe vom Ausgangsniveau möglich. Mittels der Quantifizierung durch die Amplitude kann die für jeden Stimulus und jedes Tier spezifische maximal erreichbare Dilatation ermittelt werden. Der Nachteil dieser Quantifizierungsmethode ist jedoch, dass die Dauer der Dilatation, also der Zeitfaktor, nicht berücksichtigt wird. Für die Beurteilung der Endothelfunktion ist es von großem Interesse, eine Aussage über die Gesamtmenge von endothelial freigesetztem NO während einer Vasodilatation machen zu können. Dies gelingt nicht über die Bestimmung der Amplitude, da dieser Parameter den Faktor „Zeit“ nicht berücksichtigt. Eine prozentuale Angabe über den Druckabfall während einer Vasodilatation, ausgehend vom Basaldruckniveau, berücksichtigt den Zeitfaktor ebenfalls nicht. Es ist

von großer Bedeutung, von welchem „Niveau“ aus Gefäße dilatieren. Sind Gefäße beispielsweise maximal kontrahiert, dann ist die vasodilatative Antwort auf einen bestimmten Stimulus stärker, als beim gleichen Stimulus in relaxiertem Zustand. Um diesen Störfaktor möglichst effektiv zu minimieren, wurden Kriterien bezüglich der vasodynamischen Messung aufgestellt. Zum einen wurde der Fluss im extrakorporalen Kreislauf durch die integrierte Rollerpumpe körporgewichtsadaptiert konstant gehalten. Da es trotz diesen Bedingungen zu idiopathischen Vasospasmen mit Druckerhöhungen in dem zu untersuchenden Gefäßgebiet kommen kann, wurden nur die Ratten in die Studie eingeschlossen, dessen femoraler Basaldruck nicht mehr, als 15 % von 120 mmHg abweicht. Durch diese zwei Maßnahmen konnte sichergestellt werden, dass sich die Gefäße aller gemessenen Tiere in einem vergleichbaren Aktivitätszustand befanden.

#### **4.6.3 Methodenkritik der Molekularbiologie**

Die molekularbiologische Untersuchung wurde mit Gefrierschnitten durchgeführt, die zuvor bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt wurden. Bei der Durchführung der vielen molekularbiologischen Methodenschritten besteht immer ein geringes Risiko einer Veränderung der Proteine auf molekularbiologischer Ebene oder eine Veränderung der Quantität der Proteine. Die Messung des tatsächlichen NO-Gehaltes mittels Verfahren wie Chemilumineszenz, Methämoglobin-Bildung oder paramagnetische Elektronen-Resonanz-Spektroskopie (EPR) könnten Aufschluss darüber geben, ob die unter diabetischen Bedingungen massiv erhöhte endotheliale NO-Expression tatsächlich mit einem erhöhten NO-Gehalt einhergeht oder ob dies eine Reaktion auf eine gesteigerte NO-Inaktivierung im Rahmen des inflammatorischen Prozesses der diabetischen Vaskulopathie ist. Da die Produktion von Radikalen, die zu oxidativem Stress in der Endothelzelle führen, einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen Diabetes und endothelialer Dysfunktion darstellt, ist die Aktivitätsmessung der NAD(P)H-Oxidase als Surrogat für die Radikalproduktion ein wichtiger Parameter. Sie wurde im Rahmen dieser Studie von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bestimmt und half die Effekte der pharmakologischen Interventionen besser zu verstehen.