

## **1 Einleitung**

### **1.1 Diabetes Mellitus**

#### **1.1.1 Entwicklung des Diabetes Mellitus aus historischer Sicht**

Schon im Jahre 1853 erkannte der Begründer der modernen Physiologie, Claude Bernard, die Bedeutung der Konstanz des „internen Milieus“ für Mensch und Tier, in dem die Blutglukosekonzentration eine zentrale Rolle spielt. Heute befindet sich das Verständnis des Diabetes Mellitus in einer stürmischen Entwicklung, vergleichbar mit den zwanziger Jahren, nachdem das Insulin entdeckt worden war. Seit der Einführung der Insulintherapie konnte die Lebenserwartung von Diabetikern entscheidend verlängert werden. Daraus folgte in den letzten Jahren ein grundlegender Wandel in der Häufigkeit der einzelnen Todesursachen. Heute sind die Gefäßkrankheiten, also eine Sekundärkomplikation, für das Schicksal des Diabetikers bestimmend. Angiopathien sind mit über 75 % die häufigste Todesursache für zuckerkrankte Patienten. Diesen engen Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und Angiopathie konnte durch große, prospektive Studien, wie die UKPDS 1998 oder die DCCT- Studie 1993 nachgewiesen werden [1-4].

#### **1.1.2 Definition**

Der entscheidende Befund jeder Form von Diabetes Mellitus ist das Auftreten einer Hyperglykämie. Die Definitionen des Diabetes Mellitus der beiden weltweit maßgebenden Organisationen, die World Health Organisation (WHO) und die American Diabetes Association (ADA) sind nicht ganz identisch. Die WHO fordert seit 1994 eine Nüchternplasma-Glukosekonzentration im venösen Blut von mindestens 140 mg/dl und im Voll- oder Kapillarblut von mindestens 120 mg/dl um die Diagnose Diabetes Mellitus stellen zu dürfen. Die ADA hat 1997 neue Kriterien aufgestellt. Sie gibt einen Nüchternplasma-Glukose Wert von mehr als 125 mg/dl, zweimalig bestimmt, an. Als nüchtern gilt ein Zeitraum von 8 Stunden ohne Nahrungsaufnahme. Dieser niedrigere Richtwert wurde gewählt, da die mikrovaskulären Augen- und Nierenveränderungen bereits bei diesen Glukosekonzentrationen beginnen. Alternativ muss die Diagnose Diabetes Mellitus auch bei einem Wert von mindestens 200 mg/dl nach 2 Stunden im oralen Glukosetoleranztest (oGT) oder als Gelegenheitsplasmaspiegel gestellt werden.

### 1.1.3 Formen des Diabetes Mellitus

Man unterscheidet nach ätiologischen Gesichtspunkten in einen Diabetes Mellitus Typ 1 („*insulin dependent Diabetes Mellitus*“, IDDM) und in einen Typ 2 („*non insulin dependent diabetes mellitus*“, NIDDM). Der Typ-1-Diabetes ist als Insulinmangelsyndrom definiert, das aufgrund einer weitgehend selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas auftritt[5]. Die Krankheit entwickelt sich auf dem Boden einer genetischen Disposition im Zusammenwirken mit noch weitgehend unbekanntem Umweltfaktoren. Der Typ-2-Diabetes ist durch eine variable Kombination aus Insulinmangel und Insulinresistenz gekennzeichnet. Im Unterschied zum Typ-1-Diabetes mit einer genetisch prädestinierten, komplexen Autoimmunpathogenese und den pathophysiologischen Konsequenzen von Insulinmangel auf der einen und Glukagonexzess auf der anderen Seite sind beim Typ-2-Diabetiker Pathogenese und Pathophysiologie in der langen Manifestationsphase untrennbar miteinander verknüpft. Zusammengefasst führt nach gegenwärtigem Kenntnisstand das gleichzeitige Vorliegen einer peripheren Insulinresistenz und einer gestörten Sekretionskinetik[6] in Wechselwirkung mit Umweltfaktoren wie Bewegungsmangel und Adipositas zur Entstehung des manifesten Diabetes Mellitus Typ 2.

### 1.1.4 Epidemiologie

Weltweit ist eine Zunahme der Prävalenz für Diabetes Mellitus zu beobachten. Die globale Zahl der Diabetiker von ca. 150 Millionen im Jahre 2000 wird sich bis zum Jahr 2025 auf 300 Millionen verdoppeln [7].

Die Prävalenz des Diabetes Mellitus unterliegt erheblichen geographischen Schwankungen. Skandinavien hat beispielsweise die höchste Rate an Diabetes Mellitus Typ 1 (Inzidenz in Finnland 35/100.000/Jahr), während die Inzidenz im pazifischen Raum deutlich niedriger ist (in Japan und China 1-3/100.000/Jahr). Nordeuropa und die USA liegen mit 8-17/100.000/Jahr im Mittelfeld. In den USA erkranken jährlich etwa 800.000 Menschen an Diabetes Mellitus. 95 % davon an Diabetes Mellitus Typ 2. Aufgrund des Diabetesregisters der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik (DDR), einer repräsentativen Stichprobe AOK-Versicherter der Stadt Dortmund und der Ergebnisse der deutschen Herz-Kreislauf-Präventionsstudie (DHP) konnte bisher in Deutschland mit einer Diabeteshäufigkeit von über 5% mit mehr als 4 Millionen

Diabetikern in der Erwachsenen-Bevölkerung (Alter 25-80 Jahre) der Bundesrepublik Deutschland gerechnet werden [8]. Da der Diabetes, insbesondere der Typ 2 Diabetes, in der Anfangsphase asymptomatisch verläuft, muss von einer beträchtlichen Zahl nicht-diagnostizierter Diabetesfälle ausgegangen werden. Neue Daten deuten auf eine steigende Zahl von vermutlich 7-8% Diabetiker in Deutschland hin. Der Diabetes ist vor Allem eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Nach dem 40. Lebensjahr verdoppelt sich die Häufigkeit in jeder Altersdekade und erreicht zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr eine Prävalenz von 20% [9].

### **1.1.5 Zunahme des Typ-1-Diabetes**

Der Anteil der Patienten mit Typ-1-Diabetes an allen Diabetespatienten wird derzeit auf mindestens 5-7% geschätzt. Neuere Studien lassen vermuten, dass in der Insulinmangeldiabetes in Deutschland weitaus häufiger vorkommt, als bisher angenommen und möglicherweise für 10-15% aller Diabetesmanifestationen im mittleren und höheren Lebensalter verantwortlich ist [9]. Auch das Vorkommen des jugendlichen Typ-1-Diabetes hat sich dramatisch erhöht. So lag die Inzidenz dieser Patientengruppe Ende der 80er Jahre in Deutschland bei 7,4/100.000/Jahr und wird für Kinder der Altersgruppe 0-14 Jahren im Jahre 2000 mit 14,0/100.000/Jahr angegeben. Als Gründe hierfür werden vor Allem Veränderungen des Geburtsgewichtes, schnelles postpartales Wachstum und perinatale Infektionen vermutet.

### **1.1.6 Diabetes Mellitus als kardiovaskuläre Erkrankung**

Diabetes Mellitus ist nach einer Stellungnahme der American Heart Association (AHA) eine kardiovaskuläre Erkrankung [10]. Die wesentlichen Spätkomplikationen dieser Stoffwechselkrankheit sind die arteriosklerotischen Gefäßveränderungen. Die Bedeutung dieser Sekundärkomplikationen ist für das Schicksal des Diabetikers in den Vordergrund getreten, nachdem das Risiko des Todes im diabetischen Koma abgenommen hat. In einer großen Übersicht konnte festgestellt werden, dass die Todesrate bei Diabetikern durch das diabetische Koma in den Jahren 1895-1957 von 63,8% auf 1,1% sank, während sich die primär kardiale Todesrate im gleichen Zeitraum von 6,1% auf 50,2% erhöhte. Somit ist der Diabetes Mellitus zwar primär eine endokrine, letztlich aber eine kardiovaskuläre Erkrankung. Diese kardiovaskulären Komplikationen

umfassen neben der Makroangiopathie die Mikroangiopathie, die spezifische Kardiomyopathie und die Herzinsuffizienz.

### **1.1.7 Makrovaskuläre Komplikationen des Diabetes Mellitus**

Zu den makrovaskulären Komplikationen des Diabetes Mellitus gehören die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), die Karotisstenose und der zerebrale Apoplex. Diese Komplikationen sind die Manifestation der Atherosklerose an den großen Gefäßen des Herzens, der Extremitäten, der Karotiden und des Gehirns. Die KHK ist durch eine Koronarinsuffizienz, d. h. ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot gekennzeichnet. Die vorrangige Ursache hierfür ist die Atherosklerose an den epikardialen arteriellen Gefäßen (Koronararterien). Zu den Verlaufsformen gehören die stabile und instabile Angina pectoris, der Myokardinfarkt, die Herzinsuffizienz, Arrhythmien und der plötzliche Herztod. Sie bedingt damit die häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Bei der pAVK manifestiert sich die Atherosklerose in über 90 % der Fälle an den großen Becken- und Beinarterien. Die so verursachte Minderperfusion der unteren Extremitäten führt über belastungsabhängige Schmerzen (Claudicatio intermittens) und ischämischen Ruheschmerz der Muskulatur zur Nekrose, Gangrän und Ulkus. Bei einer Stenose im Bereich der Aortenbifurkation (Leriche-Syndrom) kann es außerdem zu ischialgieformen Beschwerden und erektiler Dysfunktion kommen. Entsteht eine atherosklerotische Stenose im Bereich der Karotiden, so folgt eine Minderperfusion des Gehirns. Klinisch manifestiert sich eine hämodynamisch wirksame Karotisstenose in Form von Synkopen oder neurologischen Ausfällen, wie Vertigo. Patienten mit einer Karotisstenose haben darüber hinaus ein erhöhtes Apoplexrisiko.

### **1.1.8 Mikrovaskuläre Komplikationen des Diabetes Mellitus**

Zu den mikrovaskulären Komplikationen gehören die diabetische Retinopathie, die diabetische Nephropathie und der diabetische Fuß. Der Diabetes Mellitus ist in den vereinigten Staaten von Amerika (USA) der häufigste Grund für Blindheit. Man unterscheidet die nichtproliferative und die proliferative Form der Retinopathie. Die nichtproliferative Retinopathie ist durch Mikroaneurismen, punktförmige Hämorrhagien und wolkenförmige Aufhellungen (cotton wool spots) gekennzeichnet. Das

Hauptmerkmal der proliferativen Retinopathie ist die Neovaskularisation in Folge von Hypoxie.

Der Diabetes Mellitus ist der häufigste Grund für nichttraumatische Amputationen der unteren Extremitäten in den USA. Durch Minderperfusion der unteren Extremität kommt es beim diabetischen Fuss spontan oder durch Bagatellverletzungen zu Ulki oder Nekrosen kommen.

Patienten mit Diabetes Mellitus entwickeln in 20-30% eine diabetische Nephropathie im Verlauf ihrer Erkrankung[11]. In Deutschland leiden 59% aller für eine Nierentransplantation gelisteten Patienten an Diabetes Mellitus[12].

## **1.2 Das gesunde Gefäßendothel und seine Funktion**

Das Endothel ist eine einschichtige, kontinuierliche Zellschicht der Innenwand der Gefäße. Es besteht aus ca. 6 mal 10 hoch 13 Zellen und besitzt eine Gesamtoberfläche von ca. 1000 Quadratmetern. Lange Zeit wurde das Endothel lediglich als passive Barriere zwischen Blut und Extravasalraum aufgefasst, dessen einzige Funktion in der Aufrechterhaltung des intravasalen, kolloidosmotischen Druckes bestand. Nach heutiger Erkenntnis stellt es ein eigenständiges Organ dar, welches über seine reine Barrierefunktion zwischen Gefäßlumen und Gefäßwand auch wesentliche autokrine und parakrine Funktionen ausübt. Neben seiner Funktion der Steuerung des Gefäßtonus besitzt das Endothel unter physiologischen Bedingungen über die Produktion einer Vielzahl von Faktoren antithrombotische, antiarteriosklerotische und proliferationmodulierende Eigenschaften [13-17]. Die endothelialen Signalmoleküle wirken als Vasodilatoren, Vasokonstriktoren, Integrine, Chemokine, Zytokine, Wachstums- und Gerinnungsfaktoren. Im Rahmen der Endothelfunktion nimmt das NO auf Grund seiner vielfältigen Wirkungen in vielen Gefäßabschnitten gegenüber den anderen endothelialen Signalmolekülen eine hervorragende Stellung ein und wird als zentraler Bestandteil dieser Arbeit im Folgenden näher erläutert.

## **1.3 Das vaskuläre NO-System**

Furchgott gelang es Anfang der 80iger Jahre eine Substanz, die er „endothelial derived relaxing factor“ (EDRF) nannte, zu identifizieren [18]. Ende der 80iger Jahre war klar, dass es sich bei EDRF um Stickstoffmonoxid (NO) handelt. NO ist das kleinste bioaktive

Molekül. Es wird aus der Aminosäure L-Arginin durch drei Isoformen der NO-Synthase (NOS) synthetisiert: der induzierbaren (iNOS), endothelialen (eNOS) und neuronalen NO-Synthase (nNOS). NOS wird in Endothelzellen und Thrombozyten konstitutiv exprimiert. Die Frage, ob und in welcher Form funktionelle Unterschiede bestehen, wird derzeit kontrovers diskutiert. So wurde die jetzige Gliederung dieser Enzymfamilie auf Grund der Beobachtung vorgenommen, dass eNOS und nNOS permanent exprimiert sind und durch Calcium und Calmodulin aktiviert werden, während iNOS Calcium-unabhängig exprimiert wird. Im Gegensatz dazu steht die Erkenntnis, dass alle 3 Isoformen Calmodulin-Bindungsstellen haben [19]. Aber auch die Aktivität der eNOS kann moduliert werden. Scherkräfte, die am Endothel wirken, aber auch andere Stimuli, wie Proteinkinasen [20, 21] führen über Signalkaskaden [22] und Phosphorylierung zur Modulation von Expression und Aktivität der eNOS [23]. Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist, dass unter pathophysiologischen Bedingungen, wenn nicht genügend Substrat für die enzymale Reaktion vorliegt, eNOS selbst schädliche Radikale produzieren kann [24, 25]. NO ist ein primär physiologisches Radikal. In biologischen Flüssigkeiten reagiert es innerhalb kürzester Zeit mit O<sub>2</sub> und Wasser zu einem Gemisch aus Nitrit (NO<sub>2</sub>-) und Nitrat (NO<sub>3</sub>-). Eine noch schnellere Oxidation (innerhalb von Sekundenbruchteilen) erfolgt durch das Superoxid-Radikal-Anion O<sub>2</sub>- zu Peroxynitrit (ONOO-), das durch molekulare Umlagerung dann zu NO<sub>3</sub>- wird. Anorganisches NO<sub>2</sub>- und NO<sub>3</sub>- sind biologisch etwa 1000fach weniger wirksam als NO, so dass diese Oxidation den Inaktivierungsmechanismus für NO darstellt. NO moduliert und reguliert die Thrombozytenadhäsion sowie -aggregation, das Wachstum von glatten Muskelzellen sowie Adhäsion und Infiltration von Leukozyten und Monozyten am Endothel. NO wirkt durch NO-Akzeptoren (klassische Rezeptoren wurden bisher noch nicht gefunden) antiaggregatorisch, antiproliferativ und antioxidativ. Außerdem moduliert es über Thiole die intrazelluläre Signalübertragung und über Fe-Thyrosyl die Genexpression und DNA-Synthese. Eine Vielzahl von pharmakologischen Stoffen setzen im Endothel NO frei und führen zu einer Vasodilatation. Es wirkt so als Gegenspieler des durch Vasokonstriktion physiologischerweise aufrechterhaltenen Gefäßtonus.

## **1.4 Stadien der Atherosklerose**

### **1.4.1 Das Vorstadium der Atherosklerose: die endotheliale Dysfunktion**

Die frühe Phase der Atherogenese, noch vor Entstehung der arteriosklerotischen Läsion, ist gekennzeichnet durch die so genannte endotheliale Dysfunktion. Dieser Begriff ist nicht klar und in allgemein akzeptierter Weise definiert und wird in erster Linie im Sinne einer „klinischen Beschreibung“ eingesetzt, die darstellen soll, dass die normalen Funktionen des Endothels beeinträchtigt sind. Im Allgemeinen wie auch in dieser Arbeit wird die Endotheldysfunktion als verminderte NO-Aktivität oder NO-Verfügbarkeit definiert. Insofern wird eine gestörte endothelabhängige Vasodilatation als Indikator für eine generelle funktionelle Schädigung des Endothels interpretiert. Dies scheint insofern berechtigt, als NO fundamental nicht nur in den Gefäßtonus, sondern auch in die Regulation anderer Endothelfunktionen eingreift. Eine Reihe unterschiedlicher Risikofaktoren wie z. B. Rauchen, Übergewicht, körperliche Inaktivität, Hyperlipoproteinämie und Typ-2- Diabetes sowie andere bislang noch nicht identifizierte Faktoren führen zu einer Schädigung des Endothels. Die Permeabilität des Endothels für Lipoproteine und andere zirkulierende Stoffe im Plasma nimmt hierdurch zu. In der Folge werden Endothelzellen aktiviert und exprimieren vermehrt so genannte Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche. Bestimmte Adhäsionsmoleküle, vor allem so genannte Selektine, vermitteln zunächst den temporären Kontakt bestimmter Blutzellen wie Monozyten und T-Lymphozyten mit dem Endothel. Durch eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen, so genannte Intracellular Adhesion Molecules (ICAMs), kommt es zur festen Anheftung dieser Zellen an die Gefäßwand [26]. Insbesondere an Gefäßaufzweigungen – den Stellen, an denen gehäuft arteriosklerotische Läsionen entstehen – spielen zudem mechanische Kräfte eine Rolle. Erhöhte Scherkräfte können die Bildung von endothelalem Stickoxid (NO) verringern [27]. NO wirkt gefäßerweiternd und besitzt antiinflammatorische Eigenschaften [28]. Darüber hinaus führen erhöhte Scherkräfte zu gesteigerter Bildung von Adhäsionsmolekülen mit den oben geschilderten Folgen [29]. Ein gestörtes Gleichgewicht des NO-Angebots, wie es bei der Endotheldysfunktion der Fall ist, signalisiert nicht nur eine verminderte NO-Verfügbarkeit und damit eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation, wie oben bereits erklärt, sondern auch eine Dominanz von oxidativem Stress, welcher mit einer Aktivierung von Signaltransduktionswegen verbunden ist, die als proinflammatorisch,

proliferativ und proarteriosklerotisch anzusehen sind. An dieser Stelle sei wegen der Vollständigkeit noch mal darauf hingewiesen, dass, wie oben schon erläutert, die endotheliale NO-Synthase selbst Sauerstoffradikale bilden kann. [24, 25].

#### **1.4.2 Die frühe artherosklerotische Plaque: „Fatty Streak“**

Im weiteren Verlauf dringen vor allem Monozyten und in geringerem Ausmaß T-Lymphozyten in den subintimalen Raum ein [30]. Dies wird durch eine andere Gruppe von Molekülen, zu denen z. B. das Chemokin Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) gehört, vermittelt [31]. Es kommt zur Differenzierung in Makrophagen und nach Lipidbeladung entstehen Schaumzellen, die charakteristischen Zellen der arteriosklerotischen Plaque [30]. Im Rahmen dieses Differenzierungsprozesses setzen die lipidbeladenen Makrophagen und die eingewanderten T-Lymphozyten vermehrt proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha), Interleukine (IL), Wachstumsfaktoren und andere Mediatoren frei. Diese „inflammatorische“ Umgebung aktiviert glatte Muskelzellen in der Gefäßwand. Sie wandern aus der Media in die entstehende intimale Läsion – ein weiterer entscheidender Schritt in der Atherogenese – und teilen sich dort weiter [30]. Endothelzellen und glatte Muskelzellen reagieren außerdem nicht nur auf Botenstoffe, sie sind auch in der Lage, diese zu bilden und auszuschütten und halten damit zusammen mit den Makrophagen und den aktivierten T-Lymphozyten den inflammatorischen Prozess der Plaqueentstehung in Gang [32].

#### **1.4.3 Die fortgeschrittene Läsion**

Zu Schaumzellen transformierte Makrophagen und T-Lymphozyten akkumulieren in der wachsenden Läsion. Apoptose von Zellen und weitere Lipidaufnahme führen zur Bildung eines nekrotischen Kerns in der Läsion. Gleichzeitig wandern weitere glatte Muskelzellen ein und bilden zusammen mit extrazellulärer Matrix eine fibröse Kappe, die das zirkulierende Blut und die arteriosklerotische Plaque voneinander trennt [33].

#### **1.4.4 Plaqueruptur und Thrombusformation**

Unter dem Einfluss von Scherkräften kann die fibröse Kappe aufreißen. Immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass sich Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen vermehrt in der Schulter von arteriosklerotischen Plaques finden,



Stellen, an denen es gehäuft zu Fissuren bzw. Rupturen kommt [34]. Der thrombogene Lipidkern der Plaque und Kollagen in der Gefäßwand werden freigelegt. Die Aktivierung des Hämostasesystems führt zur okkludierenden oder nicht okkludierenden Thrombusbildung [34]. Maßgeblich beteiligt an der Aktivierung der Gerinnungskaskade ist der so genannte Tissue Factor (TF), der von Schaumzellen und Makrophagen exprimiert wird [35]. Klinisch manifestiert sich die Plaqueruptur mit Thrombusformation als instabile Angina pectoris oder akuter Myokardinfarkt.

## **1.5 Pathophysiologische Mechanismen der Atherosklerose**

### **1.5.1 Atherosklerose als inflammatorischer Prozess**

Die unmittelbare Ursache für Mikro- und Makroangiopathien ist die Entwicklung und Manifestation der Atherosklerose. Die Kenntnis der Pathophysiologie der Atherosklerose hat sich in den letzten Jahrzehnten grundlegend gewandelt. Während man früher annahm, dass der artherosklerotische Prozess im Wesentlichen in der Ablagerung von Lipiden und Lipoproteinen in der Gefäßwand besteht, weiß man heute, vor allem aufgrund umfangreicher Daten aus dem Bereich der vaskulären Biologie, dass dies eine sehr vereinfachte Vorstellung war. Atherosklerose muss als ein hoch komplexer, aktiver Prozess betrachtet werden, und ist wesentlich durch eine inflammatorische Reaktion in der Gefäßwand charakterisiert [26]. Die Atherosklerose ist jedoch ebenfalls durch eine systemische, niedriggradige inflammatorische Antwort charakterisiert [36]. Durch eine Reihe proinflammatorischer Stimuli, z. B. verschiedener Risikofaktoren wie Diabetes Mellitus, aber auch Rauchen, Übergewicht, und anderer, bislang nicht identifizierter Faktoren, kommt es zur Bildung primärer proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-(IL)-1 und Tumor Nekrose Faktor (TNF-alpha). Über die Stimulation von Botenzytokinen wie IL-6 wird die Akute-Phase-Reaktion in der Leber induziert, gleichzeitig werden Adhäsionsmoleküle, Hitzeschockproteine etc. aus Endothel- und anderen Zellen freigesetzt. In einer Vielzahl von prospektiven Studien, vor allem während der letzten fünf Jahre, konnte ein starker Zusammenhang zwischen systemisch messbaren Inflammationsmarkern wie Zytokinen (IL-6, TNF-alpha), Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin) und verschiedenen Akute-Phase-Proteinen, z. B. C-reaktives Protein (CRP), und konsekutiven kardiovaskulären Endpunkten gezeigt werden [37].

### **1.5.2 Atherosklerose und oxidativer Stress**

Die oben erläuterten Abgrenzungen der verschiedenen Stadien der Atherosklerose wurden vor allem durch die makro- und mikroskopische Analyse von pathologischen Präparaten möglich. Die historisch gesehen älteste und in wesentlichen Grundzügen immer noch geltende Einteilung ist die nach Stary. Im Zentrum einer kausalen Genese der Atherosklerose steht das Enzym NADPH-Oxidase. Es ist ein induzierbares Elektronentransport-System, das Reduktionsäquivalente von NADPH auf Sauerstoff transferiert; dabei entstehen Superoxidanionen. Die NADPH-Oxidase besteht aus verschiedenen Untereinheiten (membranständige Komponenten wie gp91phox, p22phox sowie zytosolischen Komponenten wie p47phox, p67phox und p21rac), die an Granulozyten, aber auch an vaskulären Endothelzellen nachgewiesen wurden. Die NADPH-Oxidase wird durch verschiedene Faktoren aktiviert. Hierzu zählen Angiotensin II [38, 39], Scherkräfte, proinflammatorische Zytokine [38] und auch LDL-Cholesterin [40]. LDL und Superoxidanionen beeinflussen beide auch die Endothelfunktion. Bereits gebildetes NO reagiert schnell mit Superoxidanionen unter Bildung des instabilen Metaboliten Peroxynitrit. Durch eine Protonierungsreaktion kann letztendlich aus Superoxidanionen das Hydroxylradikal entstehen, das Lipide und Thiolgruppen oxidieren und Membranen schädigen kann [41]. Andererseits steigert eine verminderte NO-Produktion die Ausprägung von Adhäsionsmolekülen [28] und die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten [42] und Thrombozyten am Endothel [43]. Letztlich kann die Produktion von freien Sauerstoffradikalen die Permeabilität mitochondrialer Membranen in Endothelzellen steigern und so über die nachfolgende Freisetzung von Cytochrom C verschiedene Enzymsysteme (z. B. Caspasen) aktivieren. Die Aktivierung von Caspasen induziert den programmierten Zelltod, die Apoptose. Für glatte Gefäßmuskelzellen stellen geringere Konzentrationen an freien Sauerstoffradikalen einen Wachstumsreiz dar. Beides, Endothelzellapoptose und die Proliferation glatter Muskelzellen sind Schlüsselereignisse in der Entstehung und Progression der Atherosklerose.

### **1.5.3 Zellvermittelte Entzündungsreaktion**

Im Folgenden wird der Mechanismus der zellvermittelten Entzündungsreaktion mit Schwerpunkt auf den in dieser Arbeit untersuchten Inflammationsmarker dargestellt.

### **1.5.3.1 Adhäsionsmoleküle**

Neben der Regulation des Gefäßtonus sind auch andere Funktionen des Endothels für die physiologische Regulation der Gefäßwand von großer Bedeutung [44]. Eine Funktion ist die Adhäsion von Zellen auf der Oberfläche des Endothels sowie die Regulation der Permeabilität. Beide Phänomene spielen auch bei pathologischen Veränderungen von Gefäßerkrankungen eine wichtige Rolle [45]. Schon 1958 konnte an Hasen in einem arteriosklerotischen Frühstadium gezeigt werden, dass sich Leukozyten an intakte Endothelzellen heften [46]. Erst Jahrzehnte später konnte gezeigt werden, dass die Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßwand in einer mehrstufigen Kaskade abläuft [47], und dass diese Schritte darüber hinaus nacheinander geordnet ablaufen und in ihrer Reihenfolge aufeinander angewiesen sind [48]. Der erste Schritt besteht in einer Anheftung der Entzündungszellen an das Endothel. Dies wird durch Mediatoren vermittelt, durch so genannte zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAMs) [49]. Hierbei handelt es sich um transmembranäre Glykoproteine, die sich in vier verschiedene, strukturell verwandte Familien ordnen lassen, die hier aus Gründen der Vollständigkeit genannt werden: den Selektinen, verantwortlich vor allem für die initiale Interaktion zwischen Immunzelle und Gefäßendothel, den Integrinen, die besondere Bedeutung in der dynamischen Regulation von Adhäsion und Migration aufweisen, den Cadherinen und den Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie, deren Namengebung auf die strukturelle Ähnlichkeit ihrer Mitglieder mit Immunglobulinen zurückzuführen ist. Zu den letzteren gehören die ICAMs, die bei einer chronischen Stimulation des Endothels durch dasselbige exprimiert werden. Diese Gruppe lässt sich wiederum in drei Unterfamilien unterteilen, von denen die letzten Zwei in dieser Arbeit untersucht wurden: in ICAM-II, ICAM-1 und VCAM-1. Sie sind die Voraussetzung für eine feste Bindung an Leukozyten. Darüber hinaus kommt es mit dieser Bindung gleichzeitig zur Freisetzung intrazellulärer Botenstoffe, welche wiederum zur Freisetzung von freien Radikalen und gefäßaktiven Botenstoffen führen. Letztendlich werden komplexe Signaltransduktionswege aktiviert, die es ermöglichen, dass Lymphozyten und Monozyten in die Gefäßwand einwandern können [50-52].

Zusammenfassend nimmt die Expression von ICAMs eine Schlüsselposition in dem hochkomplexen pathologischen System der Einwanderung von Entzündungszellen in

die Gefäßwand ein. Diese Einwanderung spielt ihrerseits wiederum eine herausragende Rolle in der Entstehung und Progression von entzündlichen Gefäßerkrankungen, wie der Atherosklerose. ICAMs gelten als Entzündungsmarker, deren Expression mit einer pathologischen Glukosekonzentration bei diabetischen Typ 1 und Typ 2 Patienten einhergeht [53-55]. Aber auch ein gesteigertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) kann die Expression von ICAMs erhöhen. So konnte bei Ratten eine erhöhte Expression von VCAM-1 nach einer sechstägigen Behandlung mit Angiotensin II nachgewiesen werden [56].

#### **1.5.3.2 Zusammenhänge von Adhäsionsmolekülen und Stickstoffmonoxid**

Es gibt einige Hinweise dafür, dass die Expression von ICAMs und die Bioverfügbarkeit von NO auch in einem direkten Zusammenhang stehen. Für eine verstärkte Adhäsionsneigung von Leukozyten an die endotheliale Gefäßwand scheint eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit von großer Bedeutung zu sein [57, 58]. So führte die Gabe des NOS-Substrates L-Arginin an Patienten und Tieren zu einer deutlichen Reduktion der Leukozyten-Adhäsion an Endothelzellen [59]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von NOS eine erhöhte Adhäsionsbereitschaft von Leukozyten nach sich zog [57, 60].

#### **1.5.4 Schädigende Einflüsse auf Gefäße durch Diabetes Mellitus**

Eine Überaktivität sonst physiologischer neurohumoraler Regelmechanismen kennzeichnet den artherosklerotischen Prozess bei Diabetes Mellitus durch eine Aktivierung von inflammatorischen Gefäßprozessen. Die zwei wesentlichen Systeme in diesem Zusammenhang sind das Renin–Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) [61] und der Sympathikus. Ein kardiovaskulärer Benefit durch eine Inhibition dieser bei Diabetes Mellitus überstimulierten Systeme konnte mehrfach gezeigt werden [62-64]. In der Vergangenheit wurde auch gezeigt, dass Angiotensin in humanen Zellen glatter Muskulatur eine Inflammation, gemessen an der Expression von Interleukin 6 und nuclear factor kappa-B, auslöst [65]. Auch eine Aktivierung des proinflammatorischen Enzyms NADPH-Oxidase wird durch Angiotensin II induziert [38, 39]. An ApoE knock out Mäusen konnte gezeigt werden, dass das RAAS bei Diabetes Mellitus hoch reguliert ist und darüber hinaus eine diabetesassoziierte Ausbildung der Atherosklerose durch den AT1 Rezeptorsubtyp getriggert wird [63]. Die Tatsache, dass es auch deutliche

Hinweise dafür gibt, dass auch eine neurohumorale Aktivierung selbst zu einer Insulinresistenz führen kann [66], macht die Komplexität dieser Zusammenhänge deutlich. Affen, die ein erhöhtes Gesamtcholesterin hatten entwickelten unter körperlichem und psychischem Stress mehr artherosklerotische Plaques in den Koronararterien als entspannte Tiere. Diese verstärkte Entwicklung der Atherosklerose konnte durch eine Inhibition des Sympathischen Nervensystems durch einen  $\alpha$ -Blocker gehemmt werden [67]. In einer weiteren Studie nahm durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems die Anzahl nekrotischer Endothelzellen in der Aorta zu. Dies konnte durch die Gabe des  $\beta$ -Blocker Metoprolol blockiert werden [68].

## **1.6 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

### **1.6.1 Die Physiologie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems**

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein seit langem bekanntes klassisches Hormonsystem. Bereits im Jahre 1898 entdeckten Tigerstedt und Bergmann eine Substanz aus Kaninchennierenextrakt, mit der eine Blutdrucksteigerung ausgelöst werden konnte: das Renin. Diese Endopeptidase ist eine Hauptkomponente des RAAS. Es wird von der Niere freigegeben und setzt aus dem Plasmaprotein Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I frei. Durch eine Peptidyl-Dipeptidase, das Angiotensin – Konvertierungsenzym (ACE) wird ein Dipeptid abgespalten, es entsteht das aktive Angiotensin II. Angiotensin II ist ein sehr wirksames blutdrucksteigerndes Hormon. Es übt eine Vielzahl an bisher bekannten Effekten im wesentlichen über zwei verschiedene Rezeptor-Subtypen, den Angiotensin-II-Rezeptor 1 (AT1) und den Angiotensin-II-Rezeptor 2 (AT2) aus. Bis heute konnten zwei Rezeptor-Subtypen charakterisiert werden, die klinische Relevanz besitzen. Sie werden als AT1- und AT2- Rezeptoren bezeichnet. Angiotensin-Rezeptorsubtypen wurden in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen [69-71]. AT1- und AT2- Rezeptoren sind im Gewebe unterschiedlich verteilt. Beide Rezeptorsubtypen haben unterschiedliche und vielfältige Wirkungen. Auf periphere Arteriolen wirkt Angiotensin II kontrahierend, besitzt darüber hinaus jedoch eine Vielzahl von physiologischen Wirkungen. Es stimuliert in der Nebennierenrinde die Biosynthese von Aldosteron und greift dadurch in den Natriumhaushalt ein. Auf die Nervenendigungen des Sympathischen Systems wirkt Angiotensin II modulierend. Dort fördert es die Freisetzung von Katecholaminen. Auch

auf das Zentralnervensystem wirkt Angiotensin II. Es stimuliert dort das Bedürfnis zum Trinken und hat natriuretische Effekte; es fördert die Sekretion von Vasopressin und Corticotropin (ACTH) und steigert den Blutdruck. Angiotensin II wird in verschiedenen Geweben auch lokal gebildet und steuert dort lokale Regulationsvorgänge, z. B. im Gehirn, Herzen, Ovar und Hoden. Das im Blutkreislauf zirkulierende endokrine RAAS mit seinem wichtigsten Effektorpeptid Angiotensin II spielt im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung und Regulation der Natrium-, Volumen- und Herz- Kreislauf-Hämostase eine bedeutende Rolle.

### **1.6.2 Wirkung von Angiotensin II auf die Gefäßwand**

Eine Störung der Endothelfunktion, die das Gleichgewicht der Bildung von Vasodilatoren und Vasokonstriktoren in Gefahr bringt, trägt möglicherweise zur Pathogenese der Hypertonie bei. Angiotensin II führt über eine Induktion der Phospholipase 2 in glatten Gefäßmuskelzellen und Arteriolen zu akuten und chronischen Effekten: akut erhöht es den peripheren Gesamtwiderstand, den arteriellen Blutdruck und wirkt vasokonstringierend. Eine chronische Einwirkung von Angiotensin II bewirkt eine Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, Hypertrophie und Hyperplasie. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Stimulierung des AT1 Rezeptors durch Angiotensin II die Produktion von Freien Radikalen, die selbst proarterogen wirken, erhöht [72]. Auch eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Adhäsionsmolekülen in Gefäßzellen kann durch Angiotensin II vermittelt werden [56].

### **1.6.3 AT1 Rezeptorblockade**

AT1 Rezeptoren können durch die Substanzklasse der AT1-Rezeptorantagonisten (Sartane) unter pharmakologischen Gesichtspunkten antagonisiert werden. Die bisher bekannten Sartane haben eine mehr als 10.000fach höhere Selektivität für den AT1- im Vergleich zum AT2-Rezeptor. Sie hemmen die Blutdrucksteigerung durch Angiotensin II, unterdrücken die durch Angiotensin-II-induzierte Aldosteronsekretion und vermindern die Angiotensin-II-induzierte Flüssigkeitsaufnahme. Alle Sartane dissoziieren nur langsam wieder vom Rezeptor ab. Dies bedingt ihre lange Wirkdauer. Bisherige Studien haben den AT1-Rezeptor-Antagonisten ein günstiges Nebenwirkungsprofil bescheinigt.

#### **1.6.4 Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bei der endothelialen Stickstoffmonoxidfreisetzung**

Das RAAS beeinflusst die endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion [73]. Im wie oben Beschriebenen wird die Synthese von Angiotensin II aus Angiotensin I durch ACE katalysiert. ACE inhibiert zudem die Synthese von Bradykinin. Bradykinin fördert über spezifische Bradykinin-2-Rezeptoren (B2) die Freisetzung von NO. Durch eine verminderte Verfügbarkeit von Bradykinin durch ACE kann so die NO-Freisetzung verringert werden. Diese Zusammenhänge haben auch klinische Bedeutung, da über eine Inhibition des ACE durch ACE-Hemmer eine vermehrte NO-Freisetzung über Bradykinin und den B2-Rezeptor erreicht wird [74, 75]. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass Angiotensin II selbst durch den AT2-Rezeptorsubtyp Kinine freisetzen kann [76]. Zusammenfassend kann das RAAS über ACE und möglicherweise auch über Angiotensin II in ein anderes Hormonsystem, das Kinin-System, eingreifen und so die endotheliale NO-Freisetzung modulieren.

### **1.7 Der Sympathikus**

#### **1.7.1 Die Physiologie des Sympathikus**

Der Sympathikus ist der exzitatorische Teil des vegetativen Nervensystems. Die Fasern des ersten efferenten Neurons entstammen dem Grenzstrang. Postganglionäre Aktionspotentiale des Sympathikus induzieren einen Einstrom von Natrium und Kalzium, die dann als Auslöser der elektrosekretorischen Kopplung die Freisetzung von Noradrenalin in den synaptischen Spalt bewirken. Die Inaktivierung von Noradrenalin beruht im Wesentlichen auf einer Wiederaufnahme in Varikositäten über den Noradrenalin Uptake 1-Carrier. Die Noradrenalin-Konzentration im synaptischen Spalt wird so durch die Balance zwischen der Aktivierung der sympathischen Nervenfasern und der Effizienz der Wiederaufnahme von Noradrenalin bestimmt. Die Wirkung entfaltet der Sympathikus über so genannte adrenerge Rezeptoren, die in zwei Hauptsubtypen unterschieden werden ( $\beta$ -Rezeptoren und  $\alpha$ -Rezeptoren). Diese werden wiederum in  $\beta_1$  und  $\beta_2$  bzw.  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  unterteilt. Am Herzen befinden sich fast ausschließlich  $\beta_1$  Rezeptoren, die unter physiologischen Bedingungen der Leistungsanpassung dienen. Eine Stimulierung dieser Rezeptoren steigert die Kontraktilität (positive Inotropie), erhöht die Herzfrequenz (positive Chronotropie) und

verringert die Überleitungszeit am Herzen (negative Dromotropie). Die Stimulierung von  $\alpha$ -Adrenozeptoren hat keine nennenswerte Bedeutung für die myokardiale Funktion [77, 78], induziert aber längerfristig eine myokardiale Hypertrophie [78]. Eine prolongierte, massive Aktivierung von  $\beta$ 1-Adrenozeptoren kann eine myokardiale Apoptose induzieren [79]. Alle Anteile des Gefäßsystems sind von Fasern des vegetativen Nervensystems innerviert. Über die efferente Gefäßinnervation wird der Tonus der glatten Muskulatur beeinflusst. In den meisten Gefäßprovinzen bewirkt eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems eine Vasokonstriktion, die über  $\alpha$ -Adrenozeptoren vermittelt wird. Im Koronarkreislauf sind an den großen Leitungsgefäßen  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren, an den Widerstandsgefäßen überwiegend  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren für die Vasokonstriktion verantwortlich. Daneben gibt es in einigen Gefäßprovinzen eine sympathische Innervation mit dilatierender Wirkung (Skelettmuskel, A. carotis), die über  $\beta$ -Adrenozeptoren vermittelt wird.

### **1.7.2 Die $\beta$ -1-Rezeptorblockade**

Der erste Beta-Adrenozeptor-Antagonist (Beta-Blocker) wurde 1958 beschrieben. Alle diese Antagonisten ähneln chemisch den Katecholaminen, speziell dem Isoprenalin. Ein großer Substituent am Stickstoff macht die Antagonisten so  $\beta$ -Rezeptor-selektiv, dass sie praktisch keinen Einfluss auf  $\beta$ -Adrenozeptoren haben. Meist ist der N-Substituent eine Isopropylgruppe, wie beim Isoprenalin. Man unterscheidet zwei chemische Gruppen. Eine leitet sich vom Phenylethanolamin ab, das auch das Grundgerüst der Catecholamine ist. Die größere Gruppe leitet sich vom Phenoxypropanolamin ab. Hier ist in die Seitenkette eine  $-O-CH_2$ -Brücke eingeschoben, ein Kunstgriff, der den Molekülen eine hohe  $\beta$ -Adrenozeptor-Affinität verleiht. Metoprolol gehört auch zu dieser Gruppe. Drei nennenswerte pharmakodynamische Unterschiede dieser Antagonisten sind unterschiedliche Selektivität für den  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Subtyp, unterschiedliche intrinsische Aktivität und unterschiedliche membranstabilisierende Wirkung. Beta-Blocker wirken auf das Herz negativ inotrop, chronotrop, dromotrop und automatieunterdrückend. Die Wirkungen sind besonders bei hohem Sympathikustonus deutlich. An den peripheren Gefäßen verhindern sie vor Allem die  $\beta$ 2-vermittelte Dilatation von Blutgefäßen.



## **1.8 Die Therapie des Diabetes Mellitus aus kardiovaskulärer Sicht**

Sowohl AT1-Rezeptorantagonisten als auch  $\beta$ -Blocker sind in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen weit verbreitet. Aufgrund der sehr schlechten Prognose von diabetischen Patienten, gerade in Anwesenheit von weiteren Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie ist eine besonders strikte primäre und sekundäre Präventionstrategie notwendig. Die Normalisierung des Blutglukosespiegels ist ein wichtiges Ziel der Diabetestherapie [80]. Große prospektive Studien wie die UKPDS oder die HOT Studie konnten eine zusätzliche Reduktion des kardiovaskulären Risikos durch eine Blutdrucksenkung mit AT1-Rezeptorantagonisten oder  $\beta$ -Blockern bei Diabetikern zeigen [81, 82]. Ob dieser Benefit allein aufgrund ihrer blutdrucksenkenden Wirkung zurückzuführen ist oder ob pleiotrope Effekte dafür verantwortlich sind, konnte bis heute noch nicht geklärt werden.

Während der generelle Benefit durch AT1-Rezeptorantagonisten für Diabetiker als gesichert gilt, existieren speziell für Betablocker kontroverse Daten, obwohl es als gesichert gilt, dass eine Aktivierung des sympathischen Systems in der Pathophysiologie des Diabetes Mellitus eine große Rolle spielt [83]. So wurde in einer Studie mit über 12.000 nicht-diabetischen Patienten ein um 28% erhöhtes Risiko einen Diabetes Mellitus Typ 2 zu entwickeln gezeigt [84]. Andererseits hat diese Substanzklasse anti-ischämische Eigenschaften, die denen anderer Antihypertensiva deutlich überlegen ist [85]. Hinzu kommt, dass in der Bezafibrate Infarction Prevention Study mit insgesamt 14.417 post Infarkt Patienten die Überlebensrate von  $\beta$ -Blocker behandelten diabetischen Patienten um 42% erhöht war im Vergleich zu diabetischen Infarktpatienten, die nicht mit einem  $\beta$ -Blocker behandelt wurden [86].

## **1.9 Fragestellung der Arbeit**

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit konzentriert sich auf Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung und der sich dahinter verbergenden Mechanismen der Diabetes-Mellitus-induzierten endothelialen Dysfunktion. Diese wurden im Streptozotozin (STZ)-induzierten Diabetes-Modell der Ratte untersucht.

Folgende Fragen waren Gegenstand der Studie:

1. Führt ein experimentell induzierter Diabetes Mellitus Typ 1 zu einer endothelialen Dysfunktion?
2. Hat eine pharmakologische Inhibition des RAAS einen Einfluss auf die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion unter diabetischen Bedingungen?
3. Hat eine pharmakologische Inhibition des katecholaminergen Systems einen Einfluss auf die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion unter diabetischen Bedingungen?
4. Ist dieser mögliche Benefit die Folge einer Reduktion des arteriellen Blutdruckes oder handelt es sich um blutdruckunabhängige Effekte?
5. Sind die Veränderungen der Gefäßfunktion mit einer Veränderung der diabetes-induzierten Inflammation assoziiert?