

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

Effekte von Pioglitazon auf das linksventrikuläre
Remodeling nach Myokardinfarkt an der Maus

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Catharina-Clara Witzel
aus Hildburghausen

Würzburg, März 2007

Referent: Privatdozent Dr. med. S. Frantz
Koreferent: Professor Dr. med. G. Ertl
Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Danksagung:

Ich bedanke mich bei meinen Eltern und meinem Lebensgefährten für die Hilfe und Unterstützung.

Des weiteren gilt mein Dank meinem Priv. Doz. Dr. S. Franz für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit sowie seiner steten Hilfe und guten Betreuung.

Für die nette und unkomplizierte Hilfe danke ich allen Mitarbeitern des medizinischen Institutes. Insbesondere gilt hierbei mein Dank Frau Barbara Bayer und Frau Helga Wagner.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Fragestellung.....	5
2. Grundlagen.....	6
2.1. Definition der Herzinsuffizienz.....	6
2.2. Pathogenese der Herzinsuffizienz.....	6
2.3. Remodeling nach Myokardinfarkt.....	7
2.4. Thiazolidindione.....	8
2.4.1. Chemie und Pharmakokinetik von Pioglitazon.....	8
2.4.2. Indikation von Pioglitazon.....	9
2.4.3. Nebenwirkungen von Pioglitazon.....	10
2.4.4. Kontraindikationen von Pioglitazon.....	10
2.4.5. Überdosierung von Pioglitazon.....	10
2.4.6. Wirkungsweisen der Thiazolidindione (TZD).....	11
2.4.7. Effekte der Therapie mit Thiazolidindionen.....	12
2.5. Peroxisome Proliferator Aktivator Rezeptor γ (PPAR γ).....	14
2.6. Nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B).....	16
2.7. Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α).....	17
2.8. Endothelin-1.....	17
2.9. Interleukin-1 β	19
3. Methodik.....	20
3.1. Tiere	20
3.2. Herzinfarktchirurgie.....	20
3.3. Versuchsaufbau.....	20
3.4. Bildgebendes Verfahren und Echokardiographische Analyse	21
3.5. Probensammlung	23
3.6. Infarktgrößenbestimmung und ventrikuläres Remodeling.....	24
3.7. Kollagengehalt.....	24
3.8. Biochemie.....	25
3.9. Zytokine und NF- κ B.....	25
3.9.1. Präparation des nukleären Proteins.....	25
3.9.2. Real-Time PCR zur Messung von IL-1 β , TNF- α und Endothelin-1.....	25
3.9.3. ELISA NF- κ B	26
3.10. Gefäßreaktionsstudien.....	26
3.11. Statistische Analyse.....	27

Inhaltsverzeichnis

4. Ergebnisse.....	28
4.1. Mortalität und Eingruppierung	28
4.2. Körpergewicht, Herzgewicht, Infarktgröße.....	29
4.3. Serumchemie.....	29
4.4. Echokardiographische Ergebnisse.....	30
4.5. Kollagenanalyse.....	31
4.6. Proinflammatorische Zytokine und Endothelin-1.....	32
4.7. Gefäßreaktion der Aortenringe.....	32
5. Diskussion.....	35
6. Zusammenfassung.....	40
7. Literaturverzeichnis.....	41

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzym
ACh	Acetylcholin
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
(ANP	Atriales Natriuretisches Peptid)
AP-1	aktiviertes Protein-1
AT	Angiotensin
CCR2	C-C Chemokine Receptor
COX	Cyclooxygenase
CRP	C- reaktives Protein
dP/dtmax	maximaler Druckanstieg im linken Ventrikel
dP/dtmin	minimaler Druckanstieg im linken Ventrikel
PG	Prostaglandin
EF	Ejektionsfraktion
ET-1	Endothelin-1
FS	fraktionelle Verkürzungsfraction
GOT	Glutamat-Oxalazetat-Transaminase
HBA1c	Hämoglobin A1c = spezieller Subtyp, der durch Glykierung entsteht
HDL	high density lipoprotein
HR	Herzfrequenz
IGF	insulin growth factor
IGFBP-1	insulin growth factor binding protein- 1
IL	Interleukin
IκB	inhibitorisches Protein κB
KG	Körpergewicht
LAD	left arteria descendens
LDL	low-density lipoprotein
L-NAC	N-Nitro-C-Arginin
LVEDA	linksventrikuläre enddiastolische Fläche

Abkürzungsverzeichnis

LVEDD	linksventrikuläre enddiastolischer Durchmesser
LVESA	linksventrikuläre endsystolische Fläche
LVESD	linksventrikuläre endsystolischer Durchmesser
LVDP	linksventrikulärer systolischer Druck
LVSP	linksventrikulärer diastolischer Druck
MAP	mean arterial pressure
MAP	mitogen-activated protein
MI	Myokardinfarkt
NF- κ B	Nukleärer Faktor - κ B
NIDDM	non insulin dependent diabetes mellitus, nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus
NYHA	New York Heart Association
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor
PPAR	peroxisomal proliferator- activated receptor
PPRE	PPAR- Response- Element
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RWT	relative Wanddicke
RXR	Retinoid X- Rezeptor
SAP	systolischer Vorhofdruck
Sham	Schein-OP
SNP	Sodium Nitroprussid
SOD	Superoxid Dismutase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TZD	Thiazolidindione, auch als Glitazone oder Insulinsensitizer bezeichnet

1. Einleitung

Laut dem Kompetenznetz-Herzinsuffizienz, zählt das Syndrom Herzinsuffizienz, an dem in Deutschland mehr als 1 Million Menschen erkrankt sind, zu den häufigsten Volkskrankheiten. Die Anzahl der Erkrankten steigt.

Ihre medikamentöse Therapie erfolgt durch ACE-Hemmer, Aldosteron-Antagonisten, Betarezeptorenblocker, Nitrate sowie Herzglykoside, welche orientierend an der NYHA-Klassifikation (New York Health Association) eingesetzt werden.

Die Ätiologie der Herzinsuffizienz ist vielfältig. Es sind Erkrankungen, die ursächlich für Füllungsbehinderung, Volumenbelastung, Druckbelastung, Herzrhythmusstörungen und die direkte Myokadschädigung, z.B. nach Herzinfarkt, sind.

Bei vielen Patienten, vor allem Älteren, besteht heute eine Multimorbidität. Darunter findet sich auch verstärkt die Kombination von Herzinsuffizienz und Diabetes, bzw. das metabolische Syndrom.

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine chronisch progressive Erkrankung. Er zählt zu den häufigsten Volkskrankheiten mit deutschlandweit ca. 5 Millionen Erkrankten [1]. Seit Juli 2000 ist mit Rosiglitazon und seit Oktober 2000 mit Pioglitazon eine kausale Diabetestherapie auf dem Markt. Beide Thiazolidindione (TZD, Glitazone, auch als Insulinsensitizer bezeichnet) verbessern die Insulinsensitivität bei Typ 2 Diabetikern. Beide Wirkstoffe sind in Kombinationstherapie mit Sulfonylharnstoffen beziehungsweise Metformin zugelassen, seit Herbst 2007 auch als Monotherapie und können unabhängig zu den Mahlzeiten eingenommen werden.

Glitazone aktivieren den nukleären PPAR γ (peroxisomal proliferator-activated receptor gamma), der überwiegend im Fettgewebe exprimiert wird, aber auch in geringerer Anzahl im Herzen. Glitazone verbessern die Insulinwirkung, indem die Transkription von Genen des Lipid- und Glucose-Metabolismus sowie der Adipozyten-Differenzierung [2] gesteigert werden. Sie wirken antiphlogistisch durch Unterdrückung der Proliferation proinflammatorischer Zytokine, wie der NF- κ B Aktivität und Interleukinexpression [3]. Thiazolidindione sind Fibratabkömmlinge (Fibrate sind PPAR α -Agonisten), weshalb sie ebenfalls günstig auf den Fettstoffwechsel einwirken. Sie steigern die Lipolyse, senken den Triglyzeridwert und erhöhen den HDL Spiegel.

Problematisch beim Einsatz von Glitazonen ist die Tatsache der derzeit befürchteten Progression einer bestehenden Herzinsuffizienz [4]. Vor allem durch Flüssigkeitsretention führen TZDs zur Gewichtserhöhung, aber auch durch die verbesserte Insulinwirkung. 2002 wurden im „Canadian Adverse Reaktion Monitoring Program“ Fälle dokumentiert, bei denen es im Rahmen von TZD-Einnahmen zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz kam (acht Fälle durch Rosiglitazon und zwei Fälle durch Pioglitazon). Darauf basiert die Kontraindikation für TZD ab NYHA II und einer entsprechenden Symptomatik [4]. Wang et al. vermuten in ihrem klinischen Update in der Flüssigkeitsretention die vordergründige Ursache für die glitazoninduzierte Erhöhung der Vorlast [3]. Die Daten der retrospektiven populationsbasierten Kohortenstudie von Delea et. al. evaluieren die Beziehung zwischen der Glitazonbehandlung und dem Herzinsuffizienzrisiko bei Typ 2 Diabetikern. Dabei kann eine verstärkte Entwicklung einer Herzinsuffizienz unter TZD-Therapie beobachtet werden, unabhängig vom Alter oder anderen Risikofaktoren [5]. In einer 2005 veröffentlichten Studie kann der kausale Zusammenhang für die massive therapiebedingte Gewichtszunahme und die Vorlasterhöhung eruiert werden. Der über PPAR γ im Sammelrohr vermittelte Einbau von Na-Kanälen führt zu einer vermehrten renalen Natriumreabsorption mit resultierender Wasserretention und Erhöhung des hydrostatischen Druckes (siehe 2.4.7.) [6].

Auf Grund der bestehenden Studienlage werden immer wieder protektive Effekte von Pioglitazon auf kardiovaskuläre Erkrankungen postuliert, die jedoch bisher nicht eindeutig nachgewiesen sind. Insgesamt ist die Funktion der TZDs und ihres Rezeptors PPAR γ am Herzen und speziell bei kardiovaskulären Erkrankungen bisher nur ungenügend untersucht [7] (siehe Kapitel 2.4.5.).

Für einen unproblematischen, teilweise sogar protektiven Einsatz der TZDs, kann in der bisher vorhandenen Literatur vermehrt Anhalt gefunden werden. In einer klinischen Studie, bei der insgesamt 154 NIDDM-Patienten (nicht insulinabhängige Diabetes mellitus Erkrankte) unter Troglitazon bzw. Glyburid- Therapie verglichen werden, kann gezeigt werden, dass die Troglitazonbehandlung keine negativen Effekte auf Herz und Kreislauf zeigt. Es ergaben sich nicht nur bessere Diabetes- (HbA1c, C-Peptid, Nüchternzucker) und Fettwerte (HDL \uparrow , Triglyceride \downarrow), sondern auch eine Senkung des

peripheren Widerstandes und des Blutdrucks. Bei beiden Behandlungsgruppen können negative Effekte, wie sie bei einem natürlichen Verlauf vorkommen, detektiert werden. Diese Effekte waren zum Beispiel eine leichte LDL- Erhöhung, wobei die Veränderungen in der mit Troglitazon behandelten Gruppe geringer waren [8]. Im „Clinician Update“ wird im Artikel von Wang et al. sogar davon ausgegangen, dass eine frühzeitige Anwendung von Glitazonen vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz schützt, jedoch bei einer bereits bestehenden Herzinsuffizienz zur Vorsicht und bei einer Verschlechterung zum Absetzen geraten wird [3].

Anhand bislang verfügbarer Glitazonstudien wird keine Korrelation mit einer kardialen Dekompensation verzeichnet [5]. Verschiedene Faktoren, die ursächlich mit der Progression einer Herzinsuffizienz in Zusammenhang gebracht werden, wie TNF α -, NF- κ B-, IL-1 β - und die Endothelin-Expression, werden durch Glitazone gesenkt [9][10]. TNF α spielt eine kausale Rolle bei der Pathogenese verschiedenster Herzerkrankungen. Bei einem starken TNF α -Anstieg entwickeln sich eine transmyokardiale Dilatation und Fibrose sowie eine Myozytenapoptose. Daraus ergibt sich eine Verschlechterung für eine bereits bestehende Herzinsuffizienz [11]. Auch andere Mediatoren, wie NF- κ B sind bei einer Progression einer Herzinsuffizienz beteiligt. Die Senkung dieser Parameter könnte somit den Verlauf der Herzinsuffizienz günstig beeinflussen.

Bedeutend für die Protektion der Herzinsuffizienzentwicklung ist der agonistische Effekt am PPAR γ -Rezeptor, der in verschiedene Stoffwechselwege eingebunden ist. Diesbezüglich erwägen Frey et al. in ihrer Studie als Ursache für den dämpfenden Effekt auf die Herzmuskelhypertrophie unter TZD-Gabe drei Hypothesen. Zum einen könnte es durch kardiomyozytenautonome Funktionen begründet sein, die über Glitazone angeregt werden. Als zweite Hypothese wäre ein indirekter protektiver Effekt durch die Verbesserung der Insulinsensitivität denkbar und als dritte sei eine Isoformspezifität des PPAR denkbar, da es bei einer Hypertrophie zu einer Reduktion von PPAR α - und PPAR γ -Effektoren kommt. Unter anderem wird durch diesen Mechanismus die Aktivität von NF- κ B, iNOS, Endothelin-1 und TNF α gesenkt [12].

Yamamoto et al. zeigen, dass TZD und Prostaglandin J(15d-PGJ2) eine Myozytenhypertrophie, induziert durch mechanische Beanspruchung, Angiotensin II und Phenylephrine, inhibieren. Dabei ist vor allem die Aktivitätsminderung von NF- κ B in

diesen antihypertrophen Effekt involviert. Auch senken diese die BNP mRNA-Expression. Das Peptid NT-pro BNP, das von der Herzmuskelzelle vor allem in Folge von Dehnungsreizen und neurohumeraler Stimulation gebildet wird, gilt als Marker für die Herzinsuffizienz und zeichnet sich durch seine vasodilatatorische und natriuretische Wirkung aus [13].

Tsuji et. al. gelingt der Nachweis, dass es bei Ratten unter Pioglitazongabe über eine Reduktion des oxidativen Stresses zu einer Verringerung der Kollagenakkumulation und darüber indirekt zur Verringerung der linksventrikulären diastolischen Funktion kommt. [14].

Diep et. al. untersuchen die Effekte einer Pioglitazontherapie mittels Hypertrophie-modell am Rattenherzen. Dazu behandeln sie die Tiere mit Angiotensin II und vergleichen eine Pioglitazon behandelte mit einer unbehandelten Gruppe der Tiere. Dabei können folgende positive Ergebnisse verzeichnet werden: die Entwicklung der Hypertension wird verringert, das Zellwachstum normalisiert, die Angiotensin II bedingte endotheliale Dysfunktion verbessert und die Hochregulation von Angiotensin II Typ 1 Rezeptoren, proinflammatorischer Zytokine und der NF- κ B- Aktivität verhindert [15].

Haffner et al. können die antiinflammatorische Wirkung von TZD aufzeigen, welche sich unter anderem protektiv auf die atherosklerotische Entwicklung und wie bereits aufgeführt, als entscheidenden Fakt auf die Herzinsuffizienzentwicklung auswirken können [16].

Die antiatherosklerotische Wirkung als Hauptaspekt der Arbeit von Diep et al. wird vermutlich nicht nur durch Inhibition der Expression inflammatorischer Gene, wie Zytokine und Adhäsionsmoleküle, sondern auch direkt durch die Verbesserung der Insulinsensitivität, der Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und durch Reduktion der intimalen Hyperplasie hervorgerufen. Letztere Effekte senken das Restenoserisiko [17] [18].

Ishibashi et al. untersuchen mit positivem Ergebnis den antiinflammatorischen und antiatherosklerotischen Effekt mittels Pioglitazon anhand der Reduktion der CCR2-Expression (C-C Chemokine receptor) und der ACE-Aktivität (angiotensin converting enzyme) [19].

Die zuvor genannten Studien zeigen in Bezug auf die Effekte von Pioglitazon nur ein uneinheitliches Bild. Entscheidend für die Entwicklung der vorliegenden Studie sind die zahlreichen experimentellen Studien, die zeigen konnten, dass TZDs die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, NF- κ B und Endothelin senken [9][10] und dass diese Mediatoren auch bei der Progression der Herzinsuffizienz beteiligt sind.

In dieser Studie soll der Einfluss von Pioglitazon auf das linksventrikuläre Remodeling nach experimentellem Myokardinfarkt und der daraus resultierenden Entwicklung einer Linksherzinsuffizienz an Mäusen evaluiert werden. Insbesondere soll die Frage geklärt werden, inwieweit Pioglitazon positiven oder negativen Einfluß auf das Remodeling nach Herzinfarkt hat und ob sich daraus Folgen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz oder das Ausmaß des Infarktes ergeben könnten [20].

1.1. Fragestellung

Welche Effekte zeigen sich unter dem Einfluss einer Pioglitazonbehandlung auf das linksventrikuläre Remodeling am Modell des experimentellen Myokardinfarktes (MI) bei Mäusen?

2. Grundlagen

2.1. Definition der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist eine Funktionsstörung des Herzens, in deren Folge ungenügend Blut in die Körperperipherie gepumpt wird, wodurch der metabolische Bedarf der Organe nicht hinreichend gedeckt werden kann. Sie wird als Syndrom verschiedenster Symptome und Störungen sowohl kardialer als auch extrakardialer Ursachen, welche die Herzinsuffizienz bedingen oder begünstigen, zusammengefasst. Zu diesen Störungen zählen unter anderem die systolische myokardiale Herzinsuffizienz, die diastolische Ventrikelfunktionsstörung, die Funktionsstörungen der Herzklappen und Arrhythmien. Die häufigste Ursache mit 75 % ist die koronare Herzkrankheit und in 50 % der Fälle ist es laut Framingham-Offspring-Studie eine Hypertonie [21].

2.2. Pathogenese der Herzinsuffizienz

Bei der Herzinsuffizienz als Folge eines Myokardinfarktes kommt es im Rahmen der Zerstörung von Herzmuskelgewebe in den Endstrombahnen der minder versorgten Koronararterie zu einer Verschlechterung des Kontraktionsvermögens und als nachfolgende Konsequenz zu einer Behinderung der diastolischen Füllung [22].

Somit führt die Herzmuskelschädigung zu einer hämodynamischen Fehlbelastung. Hierfür stehen dem Organismus primäre Kompensationsmechanismen, mit denen er das Herzzeitvolumen zu stabilisieren versucht und sekundäre Kompensationsmechanismen, mit denen er sich an das verminderte HZV anpasst, zur Verfügung:

Primäre Kompensationsmechanismen:

- Frank-Starling-Mechanismus
- Mobilisierung der myokardialen Kontraktionsreserve durch Neurohumorale Regulation
- myokardiale Hypertrophie

Sekundärer Kompensationsmechanismus:

- Neurohumorale Regulation [23]

2.3. Remodeling nach Myokardinfarkt

Die erste Reaktion innerhalb der ersten 72 h nach einem Myokardinfarkt ist die Ventrikeldilatation. Diese wird zum einen durch die Dehnung des Infarktareals und zum anderen durch das Auseinandergleiten nekrotischer Myofibrillen verursacht. Dieser Vorgang kann stattfinden, da sich das Infarktgewebe in der Frühphase noch nicht ausreichend durch kollagene Fasern stabilisiert hat.

Eine zweite Reaktion, die beim Menschen Monate bis Jahre, bei der Maus wenige Wochen dauert, ist die Kombination aus einer Dilatation und Hypertrophie des nichtinfarzierten Myokardgewebes und bezieht den gesamten Ventrikel ein. Durch die Zunahme des Ventrikelumfanges und die Veränderung der Ventrikelarchitektur erhöht sich die systolische und diastolische Wandspannung, welche kompensatorisch zur Hypertrophie des gesunden Gewebes führen. Im Folgenden kommt es, bedingt durch diastolische Minderperfusion und durch Faserüberdehnung, zur systolischen Funktionseinschränkung und zur weiteren Zunahme der Füllungsdrücke. Als Folge dieses Circulus vitiosus schreitet die linksventrikuläre Dilatation weiter voran. Der myokardiale Sauerstoffverbrauch wiederum steigt an. Dieser zunehmende Bedarf kann, bedingt durch den diastolisch erhöhten Druck, fortschreitend geringer gedeckt werden.

Beide Vorgänge basieren auf der Grundlage des Verlustes funktionsfähiger Myozyten und führen zu einer Änderung der gesamten Ventrikelarchitektur. Dies wird unter dem Begriff des Remodeling zusammengefasst.

Das Ausmaß des Remodeling wird durch die Infarktgröße mitbestimmt. Der klinisch sichtbare Hauptmechanismus, die Vergrößerung des infarzierten Areals durch Myozytenhypertrophie, erfolgt vornehmlich in Längsrichtung. Im Infarktareal werden apoptotische Myozyten durch Fibroblastenhyperplasie ersetzt. Da dem hierbei neu entstandenen Bindegewebe die Kontraktionsfähigkeit fehlt, wird die diastolische Relaxation behindert.

Die Ventrikeldilatation gilt als entscheidender Prädiktor der Mortalität nach Herzinfarkt. Dieser Sachverhalt kann durch das Gesetz von Laplace verdeutlicht werden ($K=pr^2\pi/n$; K =Kraftentfaltung, p =Ventrikeldruck, n =Ventrikelwanddicke, r =Ventrikelradius), wobei eine Vergrößerung des Ventrikelradius zur Entfaltung der selben Kraft einer höheren Wandspannung bedarf. Somit kommt es bei einer

erheblichen Dilatation auch zu einer systolisch stärkeren Myokardbelastung und entsprechend zu einer Vergrößerung des Afterloads. Ein Anstieg des Afterloads hat wiederum einen Anstieg des Preload zur Konsequenz, was einer Zunahme des enddiastolischen Volumens entspricht. Der wachsende Preload mündet in eine Steigerung der Dilatation und somit in einen Circulus vitiosus ein.

Für die Pathogenese sind hämodynamische, endokrine, auto- und parakrine Faktoren entscheidend:

- Hämodynamische Faktoren: Durch die ischämischen Folgen beim Myokardverlust gehen kontraktionsfähige Herzmuskelfasern verloren. Diesen Funktionsverlust kompensieren die noch intakten Myozyten durch vermehrte Arbeit und hypertrophieren in Folge. Die Kompensation ist jedoch nicht vollständig und es verbleibt ein verminderter systolischer Blutauswurf, der zu einem Anstieg des enddiastolischen Volumens führt. Das erhöhte enddiastolische Volumen hat wiederum eine erhöhte Wandbelastung zur Folge und führt zur Herzdilatation. Die Dilatation und Hypertrophie sind (wie oben beschrieben) progredient.
- Endokrine Faktoren:
Katecholamine und Angiotensin II sind hierbei entscheidend.
- Auto- und paraendokrine Faktoren:
Vor allem Proto-Onkogene, proinflammatorische Zytokine, Endothelin-1 und Angiotensin II wirken als wichtige Informationsträger [24].

2.4. Thiazolidindione

2.4.1. Chemie und Pharmakokinetik von Pioglitazon

Pioglitazon gehört zur Wirkstoffgruppe der Thiazolidindione (Thiazol 2,4 dion), welche über die Aktivierung eines spezifischen Kernrezeptors (PPAR γ) agieren.

Pioglitazon wird unter dem Handelsnamen Actos seit Oktober 2000 von Takeda angeboten. Es zeigt einen verzögerten Wirkungseintritt mit maximaler Wirkungsentwicklung erst nach 4-12 Wochen. Actos wird nach oraler Verabreichung schnell absorbiert. Der maximale Plasmaspiegel wird dabei ca. 2 Stunden nach Einnahme erreicht. Proportionale Anstiege der Plasmakonzentration können in den Dosisbereichen von 2-60 mg beobachtet werden. Der Steady-state wird nach ca. 4-7

Tagen erreicht. Die Daten von älteren und jüngeren Patienten sind vergleichbar. Die absolute Bioverfügbarkeit beträgt über 80 %; dafür wird die i.v. Injektion als Vergleichsgröße verwendet. Die Absorption wird durch die Nahrung nicht beeinflusst, so dass Pioglitazon nahrungsunabhängig eingenommen werden kann. Das geschätzte Verteilungsvolumen beträgt 0,25 l/kg. Pioglitazon wird zu fast 100 % an Plasmaproteine gebunden, jedoch kaum von Erythrozyten aufgenommen.

Der Abbau erfolgt in der Leber durch Hydroxylierung der aliphatischen Methylengruppen. Hieran sind Cytochrom P450 2A1, 3A4, 2C8 und 2C9 beteiligt. Drei der sechs Metaboliten von Pioglitazon sind aktiv. Die beiden Hauptmetaboliten M IV und M III haben eine 3-mal längere Halbwertszeit und auch die Plasmaspiegel bestehen 8 h länger als die Muttersubstanz. Die Plasmaproteinbindung von M II, M III und M IV ist mit der Muttersubstanz vergleichbar.

55 % der Substanz werden über den Fäzes und 45 % über die Nieren eliminiert. Die mittlere Plasmaeliminationszeit der Muttersubstanz beträgt 5-6 h, die der Metaboliten ca. 16-23 h.

Bei Patienten mit Leberinsuffizienz nimmt das Verteilungsvolumen und die ungebundene Fraktion zu, die Gesamtkonzentration von Pioglitazon im Plasma jedoch bleibt erhalten. Bei niereninsuffizienten Patienten ist die Plasmakonzentration von Pioglitazon und seinen Metaboliten niedriger als bei Gesunden, wobei die Clearance der Muttersubstanz aber ähnlich ist und somit die Konzentration von freiem Pioglitazon unverändert bleibt.

2.4.2. Indikation von Pioglitazon

Pioglitazon kommt zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 vor allem in oraler Kombinationstherapie mit Metformin oder Sulfonylharnstoffen in Frage [25].

Seit Herbst 2007 ist es auch als Monotherapie zugelassen.

2.4.3. Nebenwirkungen von Pioglitazon

Als häufigere Nebenwirkungen treten Gewichtszunahme, periphere Ödeme (Häufigkeit 1-5 %), Infekte der oberen Atemwege, Gastroenteritis, Sehstörungen, Kopfschmerz, Arthralgien, Myalgien und Parästhesien auf. Nach Markteinführung kam es in einzelnen Fällen zu erhöhten Leberenzymwerten und hepatozellulärer Dysfunktion ohne nachgewiesenen Kausalzusammenhang.

In Kombination mit Metformin kann es zu Anämie, Gelenkschmerzen, Hämaturie, Impotenz kommen. In Kombination mit Sulfonylharnstoffen sind Benommenheit, seltener Glykosurie, Hypoglykämie, Anstieg der Laktatdehydrogenase, Appetitsteigerung, Schwindel, Schwitzen, Proteinurie und Müdigkeit bekannt.

An Laborwerten fanden sich eine Erhöhung der Kreatininkinase in 15 % und der LDH in 10 %. Transaminasenerhöhungen fanden sich in einzelnen Fällen.

Kardiale Funktionseinschränkungen und hepatische Dysfunktion wurden bisher vereinzelt berichtet. Diese traten bei älteren Patienten mit kardialer Vorbelastung sowie bei Patienten mit weiteren Herz-Kreislauf-Risikofaktoren auf.

2.4.4. Kontraindikationen von Pioglitazon

Pioglitazon ist bei Diabetes mellitus vom Typ I, bei Patienten mit Herzinsuffizienz NYHA III und IV sowie in Schwangerschaft und Stillzeit kontraindiziert.

Zur Vorsicht wird geraten für die Kombination mit Sulfonylharnstoffen und Insulin, da Pioglitazon die Wirkung beider Stoffe verstärken kann. So kann zum Beispiel die Fahrtüchtigkeit durch mögliche Verstärkung der hypoglykämischen Wirkungen im Rahmen der Kombinationstherapie beeinträchtigt sein.

Die Kontrolle der Leberenzymwerte vor Behandlung und in geeigneten Abständen während der Behandlung wird empfohlen. Bei mehr als 2,5-mal erhöhten Ausgangsleberwerten über dem Normalwert wird von einer Pioglitazontherapie abgeraten.

2.4.5. Überdosierung von Pioglitazon

Die maximal untersuchte Dosis beträgt 60 mg. „Eine maximal tolerierte Dosis wurde nicht etabliert. Bei einer Überdosierung sind symptomatische und allgemein unterstützende Maßnahmen zu ergreifen (in Abhängigkeit von Schwere und Art der Krankheitserscheinungen).“

2.4.6. Wirkungsweisen der Thiazolidindione (TZD)

Im Gegensatz zu anderen Antidiabetika haben Thiazolidindione keine direkte Wirkung auf die Betazellfunktion.

Auf Zellebene aktivieren sie den nukleären PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (siehe 2.5.). Nach Rezeptoraktivierung wird der Transkriptionsfaktor

für weitere Signaltransduktionen gebildet. Dieser besteht aus PPAR γ , RXR sowie den Liganden für PPAR γ und/oder RXR (Retinoi X- Rezeptor) und dem PPAR γ -response element (PPRE). Zuerst verbinden sich, aktiviert durch einen geeigneten Liganden, PPAR γ und RXR zu einem 99-heterodimeren Komplex. Dieser bindet mit seiner DNA-Bindungsdomäne an das PPRE und wirkt somit induzierend oder inhibierend auf die Expression bestimmter Zielgene im Glucose- und Lipidstoffwechsel sowie der Adipogenese (siehe 2.5.).

Ein Teil der gebildeten Proteine ist für die Übertragung des Insulinsignals innerhalb der Zelle verantwortlich. Die Verbesserung der Insulinsensitivität erfolgt wahrscheinlich unter anderem auch PPAR γ unabhängig durch Stimulation der Expression von IGFBP-1 (insulin growth factor binding protein) -mRNA und die vermehrte Sekretion von IGFBP-1. IGFBP-1 moduliert die Verfügbarkeit von IGF (insuline growth factor) zum Erhalt der Glucosehomöostase [26].

PPAR γ -Aktivatoren senken den Triglyceridgehalt im Blut über die Beeinflussung der Lipolyse und der Clearance triglyceridreicher Lipoproteine [27][28][29]. Die weitere Beeinflussung des Fettsäurespiegels könnte indirekt auf der Senkung des Insulinlevels beruhen oder durch einen direkten Effekt auf den Lipidmetabolismus und die Fettzellendifferenzierung begründet sein [8].

Die antiphlogistische und antiatherogene Wirkung wird durch Unterdrückung der Gentranskription bei ihrer DNA-Bindung, z.B. bei der Expressionsunterdrückung von TNF- α , aber auch durch Protein- Protein Interaktion, z.B. bei der Inhibition der Expression der Thromboxansynthase, hervorgerufen [30]. Verrier et al. können im November 2004 die antiphlogistische Wirkungsweise von PPAR γ intrazellulär nachvollziehen: PPAR γ -Agonisten führen zur Aktivierung der Diacylglycerolkinase. Das bewirkt eine Senkung des Diacylglycerollevels und eine Inhibition der Proteinkinase C Aktivierung. Über die letzten Parameter wird eine Inhibition der Expression von Adhäsionsmolekülen und eine Inhibition der Adhäsion von Monozyten an aktivierten Endothelzellen vermittelt [31]. Die antiphlogistische Wirkung über den PPAR γ -Weg zur Deaktivierung von NF- κ B wird teilweise nur den synthetischen Agonisten zugeschrieben, während die asynthetischen direkt deaktivierend wirken [32].

Die Senkung des Blutdruckes erfolgt durch Beeinflussung der NaCl-Kotransporter-Aktivität in der Niere [33]. Die Ödembildung wurde bisher mit einer verbesserten Insulinwirkung und der damit verbundenen Na-Retention (Insulinödeme) erklärt [5]. Mittels einer experimentellen Studie an kultivierten Sammelrohren aus Mäusen konnte der molekulargenetische Mechanismus zwischen der PPAR γ abhängigen Scnn1g mRNA Signaltransduktion und der damit verbundenen Kodierung des epithelialen Na-Kanals (EnaC γ) aufgezeigt werden [6].

2.4.7. Effekte der Therapie mit Thiazolidindionen

Die Wirkstoffgruppe wird auch als Insulinsensitizer bezeichnet, da sie zu einer erhöhten Insulinsensitivität und Glucoseaufnahmekapazität in Leber, Fettgewebe und Skelettmuskel führen. Somit greifen sie in einen pathogenetisch wichtigen Punkt beim Typ 2 Diabetes mellitus ein. Sie verbessern zudem die Gluconeogenese, die Lipidsynthese und die Differenzierung von Fettzellen, vornehmlich durch Erhöhung der Lipidwirkung. Dabei wird die Fähigkeit des Insulins zur Unterdrückung der Glucoseproduktion der Leber und zur Erhöhung des peripheren Glucoseverbrauchs wiederhergestellt. Durch ihre Einnahme werden die Glucosereserven im Skelettmuskel erhöht [9].

Der Nüchtern- und postprandiale Blutzucker sowie der Langzeitblutzuckerwert HBA1c werden gesenkt und auch die Nüchtern- und postprandialen Plasmainsulinkonzentrationen sinken unter TZD Gabe. Es zeigt sich weiterhin ein günstiger metabolischer Effekt durch Senkung der Gesamttriglyzeride und der freien Fettsäuren sowie durch Erhöhung des HDL-Spiegels. Der LDL-Spiegel hingegen bleibt unverändert [9]. Im Fettgewebe stimuliert PPAR γ die Transkription von Genen, die in den Lipidmetabolismus eingebunden sind und unterstützt die Adipozytenproliferation und -Differenzierung [34].

Neuere Studien können protektive Effekte auf die Gefäßwand detektieren. Unter anderem zeigt sich in einem Tiermodell, dass sich unter Glitazontherapie die Arterioskleroseentstehung signifikant verringert, eine überschießende Neointimabildung reduziert wird und es zu einer signifikanten Reduktion der atherosklerotischen Surrogatparameter, E-Selektin, Plasminogen Activator Inhibitor, CRP, PAI-1-Plasmaspiegel (Plasminogen Activator Inhibitor) und Endothelin kommt [35][10]. Die

Reduktion einer Schaumzellbildung in der Gefäßwand durch den verbesserten Cholesterintransport und das verbesserte Lipidprofil lässt weiterhin eine antiatherosklerotische Wirkung vermuten [36]

In den Monozyten supprimieren TZD die Bildung proinflammatorischer Zytokine und in den glatten Gefäßmuskelzellen inhibieren sie die Proliferation und Migration [12][37]. Japanische Studien können eine Zunahme der flussvermittelten, endothelabhängigen Vasodilatation bei Diabetikern unter der Glitazontherapie aufzeigen [35]; auch die Intimadicke wird neben der Restenoserate reduziert und als Ausdruck dieser Verbesserungen die Angina pectoris-Häufigkeit gesenkt.

In humanen T-Zellen hemmen die TZD die Sekretion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen, in Makrophagen die Freisetzung matrixdegradierender Enzyme (beteiligt an Umwandlung stabiler in instabile Plaques [38]). Sie hemmen die Monozyten- und T-Zellaktivierung und Leukozytenrekrutierung in die Gefäßwand [39], ferner die Migration glatter Gefäßmuskelzellen.

Weiterhin wird über antihypertensive Effekte von Pioglitazon berichtet [39].

Tierexperimentelle Untersuchungen und klinische Studien erbringen darüber hinaus Nachweise für eine nephroprotektive Wirkung der Glitazone, bei denen sich die Proteinausscheidung bei Patienten mit Mikroalbuminurie signifikant senkte [5]. Zudem kann 2005 die Flüssigkeitsretention unter TZD-Therapie von Guan et al. verifiziert werden, die in ihrer klinischen Studie an Mäusen mit PPAR γ -Deletion und kultivierten Sammelrohren einen signifikanten Zusammenhang zwischen der TZD abhängigen Wasserretention und dem in der Niere vorhandenen PPAR γ finden. Die Scnn1g mRNA-Expression, die vom renalen PPAR γ -Signalweg reguliert wird, kodiert für den epithelialen Na⁺-Kanal EnaC γ . Ein vermehrter Einbau dieses Kanals führt zur Zunahme der Na-Retention und in Konsequenz zur Zunahme der Körperflüssigkeit. [6]

2.5. Peroxisome Proliferator Aktivator Rezeptor γ (PPAR γ)

Die PPAR-Familie gehört zur Gruppe der Schilddrüsenhormonrezeptoren und teilt sich in drei Subtypen , α , β/δ und γ auf.

Die aktivierte Form des Rezeptors besteht aus einer Heterodimerform, die aus zwei nukleären Faktoren gebildet wird. Im Fall des PPAR γ ist der korrespondierende Partner

der Retinoid X- Rezeptor (RXR). Von diesem existieren drei verschiedene Isoformen: $RXR\alpha$, $RXR\gamma$, $RXR\beta$. $RXR\gamma$ ist auf dem Chromosom 1 p22-23 lokalisiert und besitzt zwei Isoformen: $RXR\gamma1$ und $RXR\gamma2$. Auch RXR wird wie sein Kofaktor in vielen Geweben und Zellen exprimiert. Die RXR-Isoformen werden durch 9-cis Retinoidsäure, welche als Ligand fungiert, aktiviert. Sie können sich auch an andere Rezeptoren binden sowie homodimerisieren [7]. Die inaktive Form ist an ein Korepressorprotein gebunden, wovon er unter Ligandenaktivierung dissoziiert [40]. PPARs sind Phosphoproteine. Die Transkriptionsaktivität des $PPAR\gamma$ -Proteins wird nach der Translation durch Phosphorylierung des Serinrestes reguliert. Die Phosphorylierung durch mitogen-activated protein (MAP) -Kinase führt zur Inhibition von $PPAR\gamma$ [41].

Die PPAR- Struktur enthält nicht nur eine DNA- und C- terminale Ligandenbindungsdomäne, welche die Ligandenspezifität reguliert, sondern auch eine Domäne für den Kofaktor und eine N- terminale Domäne zur Regulation der PPAR-Aktivität [42]. Die Bindung der verschiedenen Aktivatoren induziert eine Konformationsänderung in der Co-Aktivator-domäne. Über diesen Vorgang kommt es zur Rekrutierung verschiedener Co-Aktivatoren und somit zu differenziellen biologischen Antworten [30].

$PPAR\gamma$ ist auf dem Chromosom 3 p25 lokalisiert. Beim Menschen existieren drei Isoformen: $PPAR\gamma 1$, 2 und 3 . Am häufigsten im menschlichen Gewebe ist das Vorkommen von $PPAR\gamma 1$. Nur im Fettgewebe ist $PPAR\gamma2$ stärker vertreten. $PPAR\gamma 3$ wird nur im Kolonepithel und im Fettgewebe exprimiert [43].

Die PPARs sind ligandenaktivierte Regulatoren der Genexpression. $PPAR\gamma$ kann durch natürliche, aber auch durch synthetische Liganden aktiviert werden. Zu den natürlichen Liganden gehören zum Beispiel Eicosanoide, wie Prostaglandin D2 Derivate (z.B. 15-dPGJ), Fettsäuren, wie Arachidonsäure, oxidierte Linolsäureprodukte und Komponenten des oxidierten und nativen LDL (Eicosapentaenoic Säure und Docosahexaenoic Säure). Als synthetische Liganden des $PPAR\gamma$ sind bisher die Insulinsensitizer, zu denen Rosiglitazon und Pioglitazon gehören, als auch nichtsteroidale Antiphlogistika, wie Indometacin, Ibuprofen, Fenoprofen sowie L-Thyrosin-Derivate, wie Fluoromethyloxy-carbonyl bekannt [43][7]. Die verschiedenen Liganden haben unterschiedliche Effekte und Transkripte, so dass sich für jeden Rezeptorisotyp ein anderes Expressionsprofil

ergibt. Die Ligandenbindungsdomäne in allen drei Isoformen ist jedoch gleich. Sie ähneln sich auch in ihrem mRNA-Level. Der Heterodimerkomplex, aus Rezeptor und Ligand (siehe Wirkungsweise der Thiazolidindione, Kapitel 2.4.6.), interagiert an der DNA mit dem PPAR response Element (PPRE). PPRE besteht aus sich wiederholenden Hexametersequenzen (AGGTCA), welche durch ein oder zwei Nukleotide getrennt sind. Dadurch wird die Transkription verschiedener Zielgene über eine DNA-bindungsabhängige Art verändert [44][43]. PPAR γ , speziell die 2 Pro12Ala-Variante, verbessert die Insulinsensitivität in Verbindung mit Adipositas [45].

In den inflammatorischen und Gefäßmuskelzellen wird die Produktion von Zytokinen über PPAR γ abhängige Signale [46] sowie die Proliferation und Migration von Entzündungszellen supprimiert [37]. In experimentellen Studien kann dazu gezeigt werden, dass es zum einen unter TZD-Gabe zur Reduktion von Endothelin [10], zum anderen jedoch auch, wie bereits oben beschrieben, zu einer Senkung der Zytokinproduktion kommt [32][17] (weiteres siehe Wirkung der Thiazolidindione 2.4.7.). Weitere Funktionen des Rezeptors in den biologischen Prozessen des kardiovaskulären Systems werden vermutet [31][47]. Definierte Funktionen der PPAR's werden für den Lipidkatabolismus, die Peroxisomenproliferation in der Leber und der Adipozytengenese beschrieben [47]. Speziell PPAR γ inhibiert die Zellproduktion von Tumorzellen, wie Lungenkarzinomzellen [48].

Die Menge von exprimiertem PPAR wird durch unterschiedliche Faktoren reguliert. Körperstimuli wie der circadiane Rhythmus, Fasten, Stress und Substanzen wie Kortikosteroide, Insulin, verschiedene Zytokine, aber auch PPAR- und RXR- Liganden sind bisher bekannt [30].

PPAR γ wird in den verschiedensten Geweben exprimiert, hauptsächlich jedoch im Fettgewebe, im Kolonepithel und in kolonlokalisierten Makrophagen und in Zellen des Immunsystems. In einem geringeren Anteil ist es auch im Magen, Dünndarm, Leber, Pankreas, Knorpel, Haut, Nervenzellen, Niere usw. und im Herzen detektierbar [49][43].

2.6. Nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B)

NF- κ B als proinflammatorisches Zytokin gehört zur Familie von Proteinen mit sogenannter Rel Domäne [50]. Es existieren zwei Klassen des Rel-Bindungsproteins. Die eine Klasse besitzt eine lange C-terminale Domäne, welche durch Proteolyse aktiviert wird (p105 bis p50, p100 bis p52). Diese erste Klasse kann erst als Dimer in Verbindung mit der zweiten Klasse zum Transkriptionsaktivator werden. Die zweite Klasse besitzt die entscheidenden C-terminalen Aktivator-domänen. Proteine mit c-Rel und Rel A (p65) gehören dieser Klasse an. Alle Vertebraten-Rel-Proteine können Homo- oder Heterodimere ausbilden. Den Haupt-Rel-Komplex von NF- κ B in den meisten Zellen und Organen, einschließlich des Herzens, stellt ein p50-p65 (Rel A) Dimer dar [51]. Die Aktivität von NF- κ B wird im Zytoplasma eng durch Interaktion mit dem inhibitorischen Protein I κ B kontrolliert. Dabei existieren verschiedene I κ B-Proteine mit jeweils unterschiedlichen Affinitäten zu den einzelnen NF- κ B-Komplexen. Durch die Interaktion von NF- κ B und I κ B wird die nukleäre Translokation und entscheidend auch die DNA-Bindung von NF- κ B blockiert. Durch Aktivierung der I κ B-Kinase (IKK) wird I κ B phosphoryliert. Dieser Schritt führt zur Dissoziation der beiden Bindungspartner. NF- κ B kann nun in den Nukleus gelangen und die Transkription des Zielgens aktivieren. Zur Aktivierung von NF- κ B existieren über 150 Stimuli. Die meisten von ihnen sind in die angeborene Immunantwort involviert. In experimentellen und menschlichen Herzinsuffizienz-Studien wurde über die Aktivierung zahlreicher inflammatorischer Zytokine, wie TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, und iNOS berichtet. Diese Zytokine und iNOS sind an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt [52] und nachfolgend an der Expression vieler verschiedener Zielgene. Dabei sind auch hier wieder viele dieser Zielgene in die Wirtsantwort eingebunden, unter anderem auch 27 verschiedene Zytokine und Chemokine. NF- κ B reguliert somit viele Signalwege, vor allem in Entzündungsreaktionen [53].

NF- κ B ist an der Regulation verschiedener Gene, die im Remodeling, der Zellstruktur und Wundheilung (wie Vimentin, Laminin, Kollagenase, Gelatinase) wichtig sind, beteiligt [54][52]. Darüber hinaus auch an Prozessen der Apoptose, Immunfunktion und embryonalen Entwicklung [55]. Im Herzen spielt NF- κ B eine spezielle Rolle im Ischämie/Reperfusionsexperiment oder in der frühen Phase des Myokardinfarktes[56].

2.7. Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)

TNF- α ist ein multifunktionales Zytokin, das bei verschiedenen Herzerkrankungen wie Myokardinfarkt, Myokarditis, Herzinsuffizienz und Kardiomyopathie erhöht ist. Es greift in die Pathogenese diverser Herzerkrankungen ein. Des Weiteren ist es am Kachexiesymptom bei Tumorerkrankungen, am Schock durch Infektionen und an inflammatorischen Prozessen bei Allergien beteiligt. Es wird durch Endotoxinstimulation und hämodynamische Druckbelastung in Myozyten gebildet. In vitro verursacht TNF- α die Depression der Myozytenkontraktilität sowie die Apoptose und Hypertrophie der Myozyten. In vivo führt die kardiomyozytenspezifische Überexpression von TNF zu globaler Herzdilatation, bilateralem Pleuraerguss, Myozytenapoptose, biventrikulärer Fibrose und zu atrialen Thrombosen [11]. Er ist unter anderem durch die Aktivierung von NF- κ B an der Entzündungsreaktion beteiligt [57].

2.8. Endothelin-1

Endothelin-1 (ET-1) ist ein potentes vasokonstriktorisches Peptid aus 21 Aminosäuren. Es wirkt vermutlich multifunktional, das heißt durch die Regulation des basalen Gefäßtonus, der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, des Blutdruckes und der Natrium- und Wasser- Homöostase. Des Weiteren wirkt es regulatorisch auf inflammatorischer Ebene und zwar als Wachstumsfaktor in der Tumorgenese, ist am atherosklerotischen Prozess beteiligt und wirkt am Herzen positiv inotrop und chronotrop [58]. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz, pulmonalem Hochdruck, Hypertonie und Hyperlipoproteinämie finden sich erhöhte ET-1 Werte. Es induziert Zelladhäsionsmoleküle in endothelialen Zellen und entfaltet die chemotaktische Wirkung bei Monozyten [59][60][61][62]. Derzeit wird davon ausgegangen, dass die Produktion von ET-1 durch inflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1), IL-8 und TNF- α , Thrombin, Epinephrin, Interferon- γ , Angiotensin II, freie Radikale und oxidiertes LDL angeregt wird [60][61][63]. NO, cyclisches GMP (Guanodinmonophosphat), atriales natriuretisches Peptid und Prostazyklin reduzieren die Sekretion von ET-1 [63].

Der ET-1 Genpromotor besitzt zwei wichtige regulatorische Regionen. An die Region A mit einer GATA-Nukleotidsequenz bindet ein bisher unbekannter, nukleärer Faktor. Die Proteine der aktivierten Protein-1 (AP-1) Familie interagieren an der Region B. Für einen hohen Transkriptionsgradienten von Endothelin-1 ist wahrscheinlich die Bindung an beide Regionen ausschlaggebend. Die Inhibition der Expression und Sekretion durch PPAR γ -Liganden findet auf Transkriptionsebene sowie durch Interferenz mit dem AP-1 Signalweg statt. Im letzteren Fall wird die Bindung des AP-1 Proteins an die Zielsequenz verhindert [59][60]. ET-1 wirkt begünstigend auf das kardiale Remodeling, welches die Herzinsuffizienzentwicklung begünstigt [64]. Bei einer Herzinsuffizienz wird ET-1 aktiviert und führt zu deren Progredienz [65].

Verschiedene Studien können eine Inhibition der thrombininduzierten ET-1 Sekretion durch eine negative Interferenz von aktivierten PPAR γ (z.B. durch Rosiglitazon) und dem AP-1 Signalweg feststellen [59]. ET-1 wird des weiteren auch im Zustand des Schocks und der Sepsis freigesetzt [66]. Es wird bei einer Entzündungsreaktion in verschiedenen Zellen produziert und sezerniert, unter anderem in Fibroblasten, polymorphkernigen Leukozyten, Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen, Myozyten und endothelialen Zellen [59][61][67][58]. Es wirkt lokal über den Endothelin-A Rezeptor (ET_A) vasokonstringierend auf die glatten Gefäßmuskelzellen. Für einen weiteren, im Endothel befindlichen Endothelin-B (ET_B) Rezeptor, wird ein vasodilatativer Effekt vermutet [67]. Endothelin-1 wird durch das Endothelin-converting Enzyme-1 (ECE-1) abgebaut. Über diesen enzymatischen Weg wird der Blutdruck indirekt reguliert [66].

2.9. Interleukin-1 β

Für Interleukin-1 sind zwei Rezeptortypen bekannt. Beide, Typ I (IL-1RI) und Typ II (IL-1RII), kommen als membranöse (m) und lösliche (s) Form vor. Bei einer IL-1 Bindung an den mIL-1RI wird eine inflammatorische Antwort initiiert, jedoch nicht bei einer IL-1RII-Bindung.

IL-1 existiert in den Isoformen α und β , die viele Gemeinsamkeiten besitzen und an gleichartige Rezeptoren binden. Im Menschen ist die Konzentration an IL-1 β höher als IL-1 α [68]. Beide Isoformen sind in die Entzündungsantwort eingebunden und

verstärken die Immunreaktion durch Aktivierung von Lymphozyten und induzieren außerdem deren Migration. IL-1 β wird vorwiegend von Lymphozyten, aber auch luminalen coronaren Endothelzellen, Makrophagen und anderen gebildet. Die Produktion in den Endothelzellen und Makrophagen steigt korrelierend zum Schweregrad bei ischämischen Herzerkrankungen an [69].

Von antigenpräsentierenden Zellen gebildetes IL-1 spielt eine wichtige Rolle im T-Zell-Priming und deren klonalen Expansion [70]. Interleukin-1 induziert die Produktion von IL-6, das für die Aktivierung der glatten Gefäßmuskelzellen und Prostaglandin wichtig ist. Die Prostaglandinproduktion wird durch Inhibierung der Expression der Cyclooxygenase-2 gefördert [53].

Unter den Bedingungen der Sepsis, der extrakorporalen Zirkulation und des Myokardinfarktes werden verstärkt Interleukin-1 und Interleukin-6 gebildet, die durch negative Inotropie und Verringerung des intrazellulären Calciumtransienten am Kardiomyozyten die ventrikuläre Pumpfunktion am Herzen einschränken [71].

3. Methodik

Das Tierschutzkomitee der Universität Würzburg hat seine Genehmigung zu diesem Versuch gegeben.

3.1. Tiere

Die Experimente wurden mit 8-12 Wochen alten männlichen C57B16 Mäusen, mit einem Grundgewicht von 20-28 g, durchgeführt. Die Tiere werden in Käfigen zu 2-6 Tieren gehalten und mit Nagerfutter und Wasser ad libitum versorgt. Licht und Dunkelheit wechseln im 12 Stunden Rhythmus.

3.2. Herzinfarktchirurgie

Die Tiere werden unter einer Glocke mit einem Isoflurane 2 % und Sauerstoff ad 100 %-Gemisch anästhesiert. Danach werden die Mäuse auf den direkt beleuchteten Operationstisch gelegt, mittels einer Venenverweilkanüle intubiert (Venflon Pro 22GA 0,98IN, 0,9x 25 mm, von Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Schweden). Über einen speziellen Kleintier-Respirator mit dem Isoflurane-Sauerstoffgemisch wird volumenkontrolliert mit 115 Zyklen/min beatmet. Nun erfolgt ein links thorakaler Haut- und Faszienschnitt. Die Faszierränder werden mit einem Faden jeweils zu beiden Seiten ligiert und mit einer Gefäßklemme zur Seite gehalten. Nach einem Interkostalschnitt wird das Perikard eröffnet. Der LAD (left arteria descendens) wird aufgesucht und mit einem Prolenefaden (blau monophil Polypropylen 75 cm, 0,7 metric, BV-1) proximal, 3-4 mm vom linken Herzohr entfernt, ligiert. Anschließend werden die vorher eröffneten Anteile mit einer Faszien- oder Hautnaht (Prolenefäden) versorgt. Ist die Eigenatmung ausreichend, werden die Tiere extubiert. Bei den Sham-Tieren wurde der Faden zwar richtig platziert, aber für eine postoperativ erkennbare Myokardischämie nicht bzw. nicht ausreichend ligiert.

3.3. Versuchsaufbau

Am siebten Tag post operationem werden die Tiere in zwei Gruppen (Verum- und Placebogruppe) randomisiert, welche gleich viele Sham (Tiere ohne erkennbare Myokardinfarktzeichen) und MI(Myokardinfarkt)- Tiere enthalten. Ab diesem Zeitpunkt

erhalten die Tiere sechs Wochen lang über eine Schlundsonde entweder Pioglitazon in einer Standarddosis von 20 mg/kg KG in 0,5 %-iger Methylcellulose oder Placebo in Form der 0,5 %-igen Methylcellulose ohne Zusatz. Die Dosierung von 20 mg/kg KG wird gewählt, da diese Dosis bei Mäusen der bei Menschen vergleichbar ist [72].

Die Schlundsonde gewährleistet, dass alle Tiere, sowohl die Placebo- als auch die Verumgruppe, eine gesicherte tägliche und vor allem gleichbleibende Menge aufnehmen.

Den Tieren wird am OP-Tag und eine Woche später ein EKG geschrieben (Cardiofax GEM, von Nitton Kott Den). Sie werden wöchentlich mittels einer Digitalwaage gewogen (Digi 200, von Wedo) und alle drei Wochen, ab dem siebten Tag post OP, echokardiographiert.

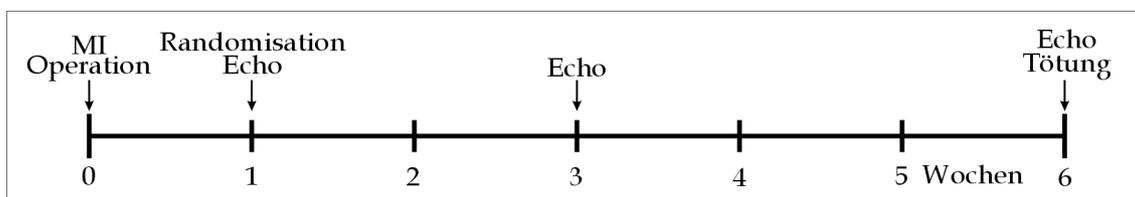


Abbildung 1: zeitlicher Studienaufbau

Mäuse ohne erkennbare echokardiographische und histologische Zeichen eines Myokardinfarktes werden als Shamtiere klassifiziert. Die Tiere erhalten während der Studie laufende Nummern und werden an den Ohren mittels Defektschnitten gekennzeichnet.

3.4. Bildgebendes Verfahren und Echokardiographische Analyse

Die nicht invasive, zweidimensionale Echokardiographie eignet sich besonders für serielle Verlaufsbeobachtungen der linksventrikulären Diameter und somit der Beobachtung des Remodelings. Durch sie können wesentliche prognostische Parameter über den Spontanverlauf und zur Beurteilung medikamentöser oder interventioneller Maßnahmen im Postinfarktverlauf erfasst werden [73].

Die Echokardiographie, die am 7, 21 und am 42 Tag unmittelbar vor Tötung der Tiere durchgeführt wird, erfolgt unter leichter Anästhesie mit spontaner Eigenatmung. Dazu werden intraperitoneal Tribromoethanol/Amylene Hydrat (Avertin) 2,5 % w/v Lösung

in 8 $\mu\text{l/g}$ KG injiziert. Avertin wird wegen seines bei dieser Dosis zu vernachlässigenden Effektes auf die Hämodynamik gewählt [74]. Anschließend werden die Tiere mit handelsüblichem Enthaarungsschaum enthaart. Für die Echokardiographie werden die Mäuse auf ein Wärmekissen gelegt und an den Extremitäten mit allergiefreiem Heftpflaster fixiert. Die Echokardiographie wird von einem in der Mäusesonographie erfahrenen Echokardiographen mittels eines Toshiba Power Vision 6000 Gerätes und eines 15 MHz Ultraschallkopfes (Kontaktgel: Aquasonic 100, Ultrasound Transmission Gel, Hypoallergen, von Parker) durchgeführt. In der kurzen Achse werden zweidimensionale echokardiographische Bilder in Höhe des mittleren Papillarmuskels und des Spitzenniveaus aufgenommen und als digitale Loops gespeichert. Die Auflösungsraten des Loop-Modus erreichen ca. 200 MHz, was eine sehr gute zeitliche Auflösung für eine zweidimensionale Analyse ermöglicht. In denselben anatomischen Bereichen werden M-Mode Bilder mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 100 mm/s aufgezeichnet. Alle Aufnahmen werden auf einer Daten-CD gespeichert.

In beiden Mode-Varianten werden die echokardialen Grenzen in der Systole und Diastole bestimmt. Diese Messungen werden vom mittleren Papillarmuskellevel und dem apikalen Drittel des Ventrikels, des maximalen 2D Durchmessers, durchgeführt. Die Merkmale für das Remodeling im B-Mode sind die linksventrikuläre endsystolische Fläche (LVESA) und die linksventrikuläre enddiastolische Fläche (LVEDA), im M-Mode der linksventrikuläre endsystolische Diameter (LVESD) und der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDD).

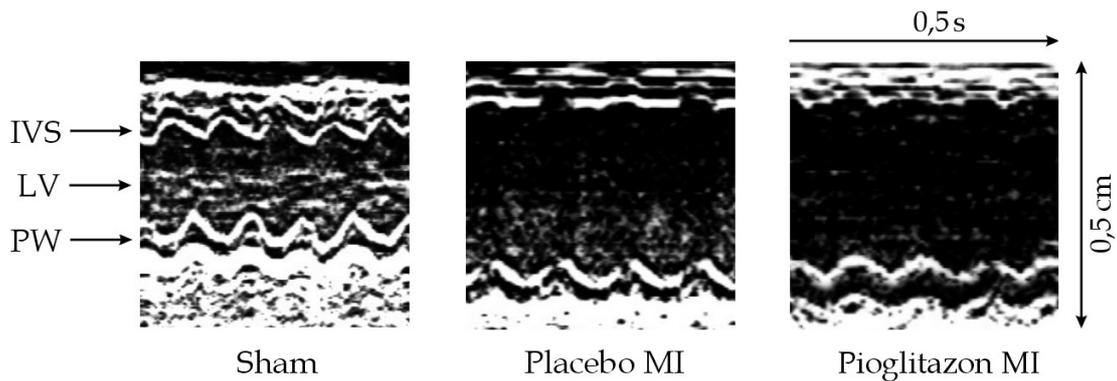


Abbildung 2: Repräsentative echokardiographische M-Mode Bilder auf Papillarebene von Shamtieren, MI-Tieren unter Placebothherapie und MI-Tieren unter Pioglitazontherapie. Die echokardiographischen Bilder der Infarkttiere zeigten im Vergleich zu den Sham-Tieren eine vergrößerte linksventrikuläre Diameter. Zwischen den beiden Behandlungsgruppen lassen sich keine wesentlichen Differenzen erkennen. PW= Hinterwand, IVS= interventrikuläres Septum, LV= linksventrikuläre Diameter

Die endsystolische bzw. kleinste (LVESA) und die enddiastolische bzw. größte (LVEDA) Innenfläche des Herzens wird aus den maximalen B-Mode Durchmessern ermittelt. Unter Zuhilfenahme dieser Flächenangaben wird die fraktionelle Verkürzung als Prozentangabe berechnet. Aus den 2D M-Mode-Bildern wird der enddiastolische (LVEDD) und der endsystolische (LVESD) Durchmesser bestimmt. Mit diesen Werten wird die fraktionelle Ventrikelverkürzung ($FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD \cdot 100$) und die relative Wanddicke ($RWT = (2 \cdot I) / LVEDD$) berechnet.

Alle echokardiographischen Aufnahmen werden ohne Wissen über die Behandlung des jeweiligen Tieres off-line analysiert [75]. Für die Auswertung wird ein Prototyp eines Off-line Analyse Systems (NICE, Toshiba Medical Systems, Niederlande) verwendet. Die Ergebnisse werden jeweils als Mittelwerte aus drei Messungen ermittelt.

3.5. Probensammlung

Am 42. Tag werden die Tiere mit Avertin peritoneal anästhesiert, siehe 3.4.. Das Herz mit der gesamten thorakalen Aorta wird entnommen. Nach Säuberung des Herzens von Geweberesten, wird es in Vorhof, rechten Ventrikel und linken Ventrikel, einschließlich Septum separiert. Von diesen Anteilen wird jeweils das Gewicht bestimmt. Der linke Ventrikel wird in drei weitere Abschnitte zerschnitten: die Spitze, einen mittlerer Ring und die Basis [76]. Der mittlere Ring des linken Ventrikels wird in Formalin gegeben. Der obere Ring des linken Ventrikels wird in Isopentanol gelegt. Der rechte Ventrikel,

der linke Vorhof und die Herzspitze werden in flüssigen Stickstoff gegeben. Alle Herzanteile werden anschließend einzeln in verschlossene Eppendorfcups auf Trockeneis gelegt und in einem Tiefkühlschrank bei -80°C für die nachfolgenden zytologischen Untersuchungen und Proteinbestimmungen aufbewahrt.

3.6. Infarktgrößenbestimmung und ventrikuläres Remodeling

Der mittlere Ring wird nach histologischem Standardverfahren paraffiniert. Mittels Schlittenmikrotom (Reichert-Jung Hn40) werden im Abstand von $1\ \mu\text{m}$ und $5\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte gewonnen und auf Deckgläschen getrocknet. Nach dem Trocknen werden die Schnitte entparaffiniert und mit Picosiriusrot gefärbt.

Die gefärbten Schnitte des mittleren Ringes werden in den Grenzlängen des infarzierten und nichtinfarzierten Endokards und der epikardialen Oberfläche mit einem digitalen Planimeter Bild-Analysegerät abfotografiert, computerprogrammgestützt verarbeitet und berechnet. Die Infarktgröße wird als Prozentgehalt der Länge des Präparatumfanges errechnet [76].

3.7. Kollagengehalt

Am Picosiriusrot-gefärbtem Myokardgewebe wird unter dem Polarisationsmikroskop interstitielles Kollagen detektiert, gemäß einer modifizierten Methode nach Junqueira [74]. Die Doppelreflexion unter polarisiertem Licht dient der Identifizierung von Kollagen, inklusive des Typ I und Typ III Kollagen [77]. Zehn dieser gefärbten Schnitte von Mäusen, die den 42-tägigen Versuch mit ähnlichen Infarktgrößen überleben, werden für die Infarktgrößenbestimmung ausgewählt. Die frisch eingefrorenen Schnitte ($100\ \mu\text{m}$) werden in 10 % neutral gepuffertem Formalin fixiert, mit destilliertem Wasser abgespült und mit 0,1 % Picosiriusrot als gesättigte Picric-Säure 90 min inkubiert. Danach werden die Schnitte zweimal für jeweils eine Minute mit 0,01 NHCl gespült und in destilliertes Wasser eingetaucht. Nach der Dehydratation mit 70 % Ethanol für 30 s werden die Schnitte unter polarisiertem Licht mikroskopiert und jeweils mit der gleichen Belichtungszeit im infarzierten und im nichtinfarzierten Bereich bei niedriger Stärke ($\times 40$) abfotografiert und analysiert.

3.8. Biochemie

Nach der Tötung der Tiere werden Blutproben entnommen, die zur Bestimmung der Triglyceride (Labor) und Serum-Glucose („Glucometer elite sensor“, Bayer AG, Leverkusen, Germany) dienen.

3.9. Zytokine und NF- κ B

3.9.1. Präparation des nukleären Proteins

Das nukleäre Protein für die Bestimmung von NF- κ B wird vom linksventrikulären Myokard extrahiert.

Nach Dounce-Homogenisierung wird das Myokard für 10 Minuten auf Eis in einer Lösung, welche aus 10 mM Hepes (pH 7,6), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0,5 % Nonidet-40, 1 mM Dithiothreitol (DDT) und 0,5 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) besteht, lysiert. Danach wird durch Zentrifugieren mit 800 x g für 30 s die Zellkernfraktion gewonnen. Der Überstand wird als zytosolisches Extrakt entnommen und aufbewahrt. Die nukleären Bestandteile werden in einer Lösung aus 20 mM Hepes (pH 7,6), 420 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DDT) und 0,5 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation, mit 13000 x g wird der Überstand abgenommen und eine gleichgroße Menge an glycerolhaltiger Pufferlösung dazu gegeben (20 mM Hepes [pH 7,6], 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA und 20 % Glycerol) [52].

3.9.2. Real-Time PCR zur Messung von IL-1 β , TNF- α und Endothelin-1

Die inflammatorischen Zytokine, myokardiales TNF, IL-1 β und Endothelin-1, werden mittels der Real-Time-PCR gemessen. Die RNA- Gewinnung erfolgt aus basalem Myokardgewebe (siehe 3.9.1.). Nach Synthese der cDNA mittels Random Hexameren (Superscript, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) wird entsprechend der Firmenprotokolle eine Real-Time PCR (iCycle BioRad, München, Germany) mit kommerziell erhältlichen TaqMan Proben für 18S und murines Interleukin 1 β (IL-1 β), Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Endothelin-1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A) durchgeführt.

Die RNA wird mit 18S rRNA standardisiert, um die unterschiedlichen cDNA- Ausgangswerte zu korrigieren.

3.9.3. ELISA NF- κ B

Nach Isolation des nukleären Proteins aus dem myokardialen Gewebe wird p65 vom nukleären Extrakt mittels ELISA, entsprechend dem Firmenprotokoll (Trans AM, „Active Motif“), bestimmt.

Die OD Werte werden durch eine positive Kontrolle normalisiert. Alle Messergebnisse werden doppelt bestimmt. Der p65 -ELISA wird durch Vergleich mit einem Standard-Gel- Shift validiert (n=48) [52].

3.10. Gefäßreaktionsstudien

Aus jeder Gruppe werden ca. 4 Aorten verwendet. Ein Anteil der Aorta descendens wird nach Entfernung des Herzens entnommen. Die Aorten werden durchgespült und somit im Inneren von Blutresten befreit, vom Bindegewebe mechanisch gereinigt und in Ringe von 3 mm Länge geschnitten. In einem Organbad (Föhr Medical Instruments, Seeheim, Germany) wird die isometrische Stärkemessung durchgeführt. Die Ringe werden 30 min lang unter einer mechanischen Vorspannung von 1,25 g in oxygenierter (59 % O₂, 5 % CO₂) Krebs-Henseleit Lösung (NaCl 118 mmol/l, KCl 4,7 mmol/l, MgSO₄ 1,2 mmol/l, CaCl₂ 1,6 mmol/l KH₂PO₄ 1,2 mmol/l, NaHCO₃ 25 mmol/l, Glucose 12 mmol/l; pH 7,4, 37°C) äquilibriert. Im Anschluss wird eine O-Punkt Korrektur durchgeführt. Danach wird wiederholt mittels KCl (100 mmol/l) kontrahiert, bis vergleichbare Antworten erhalten werden können. Anschließend wird das Organbad ausgewaschen und durch frische Krebs-Henseleit Lösung ersetzt [78].

Dann werden die Ringe mit kumulativen Dosen von Phenylephrin (1 μ mol/l) bis zur Maximaldosis (5 μ l) kontrahiert. Im weiteren Verlauf werden in umgekehrter Reihenfolge die Relaxationsantworten der Aortenringe auf Zugabe sich verringernder Dosen von ACh ausgemessen. Im Anschluss an diese Messung wird das Bad gewaschen und neue Krebs- Henseleit Lösung eingefüllt.

Für den Endotheltest werden 20 % Phenylephrin (von der Kontraktion bei der Maximaldosis von 5 μ l) ins Organbad pipettiert. Nach Abwarten der Kontraktionsantwort wird L-NAC (N-Nitro-C-Arginin) dazugeben und 45 min inkubiert. Nach

Zugabe des restlichen Phenylephrins wird Natrium Nitroprussid ($\text{Na}_2 \text{Fe}(\text{CN})_5 \text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) hinzupipetiert, die dilatative Antwort abgewartet und wiederholt ausgewaschen. Die ACh- und SNP-Antworten werden mit beziehungsweise auch ohne vorherige Inhibition der endogenen Superoxid Dismutase (SOD) unter Verwendung von Diethyldithiocarbamate (DETC, 1 mmol/L, 40 min mit nachfolgendem wiederholtem Auswaschen) bestimmt [78].

Alle Chemikalien für die Aortenrelaxation werden von der Firma SIGMA Chemical Co aus St. Louis, USA geliefert.

3.11. Statistische Analyse

Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die absoluten Unterschiede werden mittels eines zweiseitigen ANOVA mit post HOC-Analyse nach der Fischerregel ermittelt. Alle Werte werden hinsichtlich ihrer statistischen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen untersucht. Bei einem p-Wert $< 0,05$ werden die Unterschiede als statistisch signifikant definiert. Für die statistischen Analysen wird das „StatView statistic program“ benutzt (Abacus Concepts, Inc., von Berkley, CA, U.S.A.) [52].

4. Ergebnisse

4.1. Mortalität und Eingruppierung

Insgesamt erhalten 100 Tiere die Koronararterienligation. Davon sterben 56 % der Tiere vor der Randomisierung am siebten Tag (in Kongruenz zum klinischen Therapiebeginn). Diese postoperative Mortalität korreliert mit vergleichbaren Studien. Die Sterblichkeit im Behandlungsverlauf ist zwischen den einzelnen Gruppen nicht unterschiedlich. Während dieses eigentlichen Studienzeitraums versterben acht Mäuse mit Myokardinfarkt. Von diesen acht Tieren versterben vier durch die Narkose für die Echokardiographie und die anderen in ihren Käfigen, jeweils zwei aus der Placebogruppe und zwei aus der Pioglitazongruppe, verdeutlicht in Abbildung 3. Der Tod tritt wahrscheinlich als Folge von Herzversagen und Arrhythmien ein.

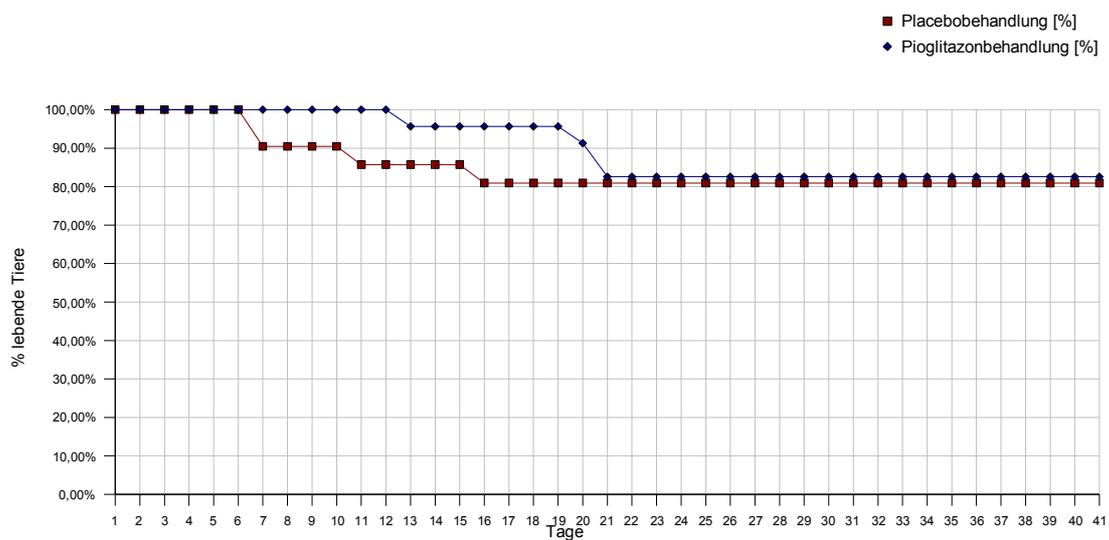


Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurve - kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit über die Zeit anhand der an der Studie beteiligten 45 Tiere.

Anzahl der verstorbenen Mäuse während des Therapieverlaufs, aufgetrennt in die Behandlungsgruppen Pioglitazon und Placebo, ab dem 7. Tag post op. und vor Therapiebeginn.

Zwölf Tiere zeigen histologisch eine Infarktgröße unter 30 % und werden deshalb von der weiteren Berechnung ausgeschlossen. Darunter sind sechs Placebo- und sechs Pioglitazontiere, sodass sich keine statistische Veränderung ergibt ($P=NS$). Insgesamt

überleben 36 Tiere bis zum 42. Tag nach der Operation. Somit gehen in die Statistik in Tabelle 1 ein:

	Pioglitazonbehandlung	Placebobehandlung
MI	13	11
Sham	6	6

Tabelle 1: Anzahl der überlebenden Mäuse am Ende der Studie, eingeteilt an Hand der echokardiographischen Infarktbestimmung

4.2. Körpergewicht, Herzgewicht, Infarktgröße

Das Körpergewicht zeigt während der Studie keine signifikanten Schwankungen und ist mit Ausgangsgewicht und Endgewicht vergleichbar.

Der Vergleich des Gewichtes des linken Ventrikels zwischen der mit Pioglitazon und Placebo behandelten Gruppe weist keinen signifikanten Unterschied auf.

Die Infarktgröße, die nach der 6. Woche ermittelt wird, ergibt für die Placebogruppe 45.7 ± 9.4 % versus der Pioglitazongruppe mit 45.7 ± 6.7 %. Somit ergibt sich zwischen beiden Gruppen keine signifikante Differenz, siehe Tabelle 2.

	Sham Placebo	Sham Pioglitazone	MI Placebo	MI Pioglitazone
n	5	4	6	10
Infarktgröße [%]			45.7 ± 9.4	45.7 ± 6.7
Körpergewicht, am Anfang [g]	24.2 ± 0.9	26.3 ± 0.8	25.3 ± 0.7	24.4 ± 0.4
Körpergewicht, nach 6 Wochen [g]	25.0 ± 0.3	26.0 ± 0.4	25.8 ± 0.9	25.2 ± 0.4
LV Gewicht [mg]	97 ± 16	86 ± 3	104 ± 7	98 ± 4
Glucose [mmol/l]	11.0 ± 1.6	12.3 ± 2.0	9.2 ± 1.2	10.2 ± 1.0

Tabelle 2: Organ- und Körpergewichte und Serumchemie. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben, n stellt die Anzahl der Tiere dar, LV = linker Ventrikel

4.3. Serumchemie

Beim Vergleich der Serumglucosewerte der Sham-Placebo- und Sham-Pioglitazon-Tiere sowie der MI-Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar, siehe dazu Tabelle 2.

Die Triglyzeridlevel weisen in dieser Studie eine signifikante Reduktion bei den mit Pioglitazon behandelten Mäusen mit Myokardinfarkt im Vergleich zu den placebobehandelten Tieren auf. Ihre Werte sind mit 50.8 ± 5.8 mg/dl signifikant niedriger ($p < 0.05$) als die der placebobehandelten Tiere mit 79.8 ± 12.2 mg/dl.

4.4. Echokardiographische Ergebnisse

Es gibt in keiner Gruppe und zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der Herzfrequenz, siehe Tabelle 3.

Die infarzierten Ventrikel tendieren von Woche eins bis sechs zur progredienten Dilatation mit signifikant größer werdendem LVESA und LVEDA im B-Mode und LVESD und LVEDD im M-Mode. Im Vergleich zeigen die Tiere mit Myokardinfarkt zwischen den pioglitazonbehandelten und den placebobehandelten Mäusen keine statistischen Unterschiede, siehe Abbildung 4.

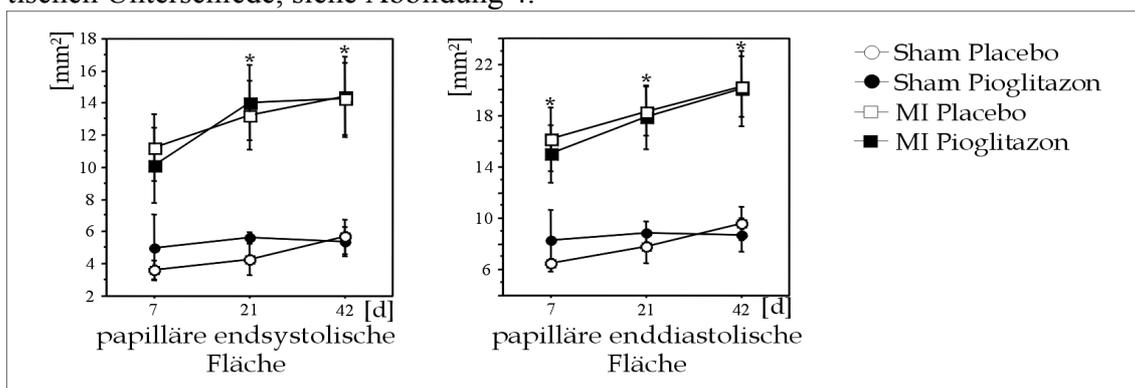


Abbildung 4: linksventrikuläre Dilatation als Folge des Myokardinfarktes

Die Verkürzungsfraction (FS) verringert sich im Verlauf der Studie. Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zeigt sich keine signifikante Differenz, siehe Tabelle 3.

	Sham Placebo	Sham Pioglitazon	MI Placebo	MI Pioglitazon
n	5	4	6	10
Herzfrequenz (bpm)	417±29	431±78	443±22	422±34
papillar				
LVESA [mm ²]	5.70±1.07	5.38±0.90	14.40±2.48*	14.79±2.89*
LVEDA [mm ²]	9.60±1.29	8.70±1.28	20.26±2.38*	20.36±3.36*
2D FS [%]	41.4±4.8	38.3±4.0	30.6±5.2	28.5±7.2
LVESD [mm]	2.58±0.24	2.25±0.41	4.72±0.68*	4.10±0.40*
EDD [mm]	3.68±0.33	3.38±0.38	5.68±0.46*	5.15±0.39*
FS [%]	30.2±3.2	34.2±5.5	18.7±5.4	21.3±2.8*
apikal				
LVESA [mm ²]	6.80±0.58	5.13±1.66	14.70±2.57*	17.64±3.05*
LVEDA [mm ²]	10.80±1.16	9.25±1.84	19.15±2.21*	22.43±3.23*
2D FS [%]	34.0±7.3	46.3±8.1	24.7±6.1	23.2±3.1*
LVESD [mm]	2.90±0.51	2.68±0.41	4.95±0.66*	4.53±0.60*
LVEDD [mm]	4.14±0.53	4.00±0.44	5.82±0.50*	5.80±0.33*
FS [%]	32.2±5.2	34.2±4.1	16.2±3.7	24.4±8.7

Tabelle 3: Echokardiographieergebnisse nach 6 Wochen: Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben, n stellt die Anzahl der Tiere in der Studie dar, LVEDA = linksventrikuläre enddiastolische Fläche, LVESA = linksventrikuläre endsystolische Fläche, FS = Verkürzungsfraction, 2D = Zweidimensional, LVESD = linksventrikulärer endsystolischer Diameter, LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Diameter. (* p<0.05 Sham vs. MI der Behandlungsgruppe)

4.5. Kollagenanalyse

Im Septum liegt die Kollagenvolumenfraktion der Herzen der placebobehandelten Tiere bei 6.30±1.68; bei Herzen mit Pioglitazonbehandlung bei 4.43±1.32 (P= NS). Für die Narbe ergibt sich ein Wert von 74.57±6.61 für die placebobehandelten versus 86.64±5.13 % für die pioglitazonbehandelten Mäuse (P= NS). Die Kollagenmessung zeigt somit zwischen den beiden Therapiegruppen keine signifikanten Unterschiede.

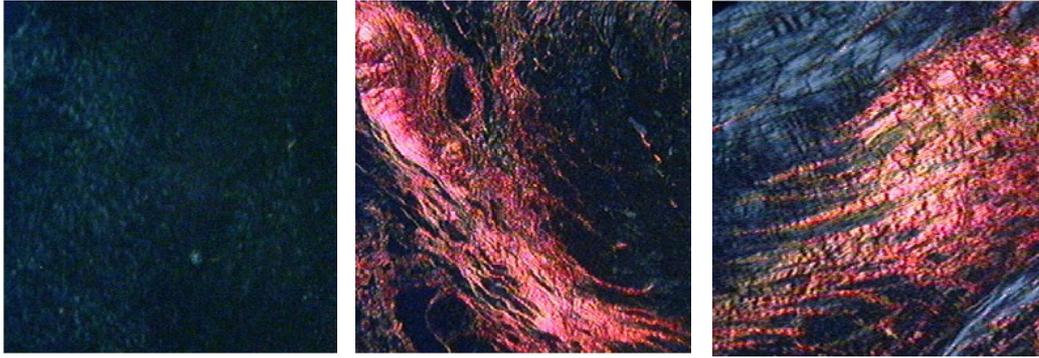


Abbildung 5: Kollagenanalyse 6 Wochen nach Myokardinfarkt für Sham, Placebo MI, Pioglitazon MI (von links nach rechts). Repräsentative Beispiele für Picrosiriusrot gefärbte Herzen unter polarisiertem Licht.

4.6. Proinflammatorische Zytokine und Endothelin-1

Die Messungen ergeben keine Veränderung im Zytokingehalt zwischen den Behandlungsgruppen. Der TNF- α Gehalt der placebobehandelten Tiere beträgt 11.2 ± 1.78 versus 14.48 ± 0.51 der pioglitazonbehandelten Gruppe (P=NS). Der IL-1 β Gehalt in der Placebogruppe beträgt 12.47 ± 0.26 versus 12.74 ± 0.27 in der pioglitazonbehandelten Gruppe (P=NS).

Auch die Endothelin-1 Expression weist keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen auf. Der Wert liegt bei der Placebogruppe bei 10.9 ± 1.53 versus 11.3 ± 1.28 (P=NS) bei den mit Verum behandelten Tieren.

4.7. Gefäßreaktion der Aortenringe

Die durch Phenylephrin induzierte Kontraktion ist zwischen den beiden Behandlungsgruppen nicht unterschiedlich. Auch die mittels ACh und SNP ausgelöste Relaxation erbringt keine Differenz, siehe dazu Abbildung 6 und Abbildung 7.

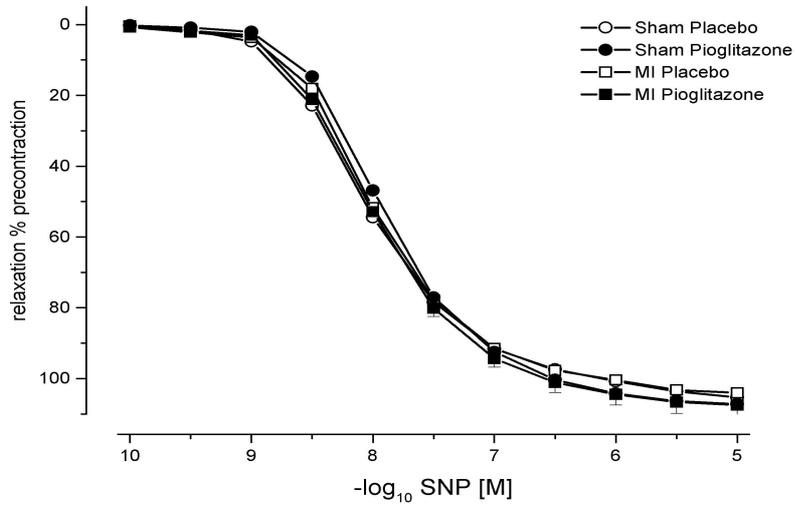


Abbildung 6: Relaxationsantwort der Mäuseaorten unter Natrium Nitroprussid (SNP). Die Relaxationsergebnisse unter SNP zeigten keine gruppenspezifische Differenz.

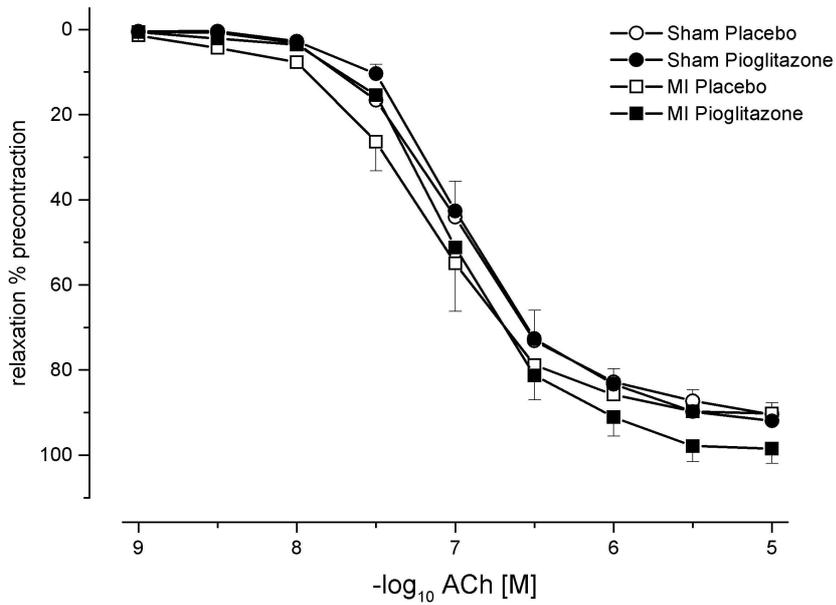


Abbildung 7: Relaxationsantworten der Mäuseaorten unter Acetylcholin. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Acetylcholinrelaxationsergebnissen in den unterschiedlichen Gruppen.

5. Diskussion

Das entscheidende Resultat der vorliegenden Arbeit ist das Fehlen von Effekten einer Pioglitazonbehandlung bezüglich der Mortalität, des linksventrikulären Remodelings, der Zytokinexpression, des Kollagenverhältnisses und der endothelialen Funktion bei Mäusen mit chronischem Myokardinfarkt [20]. Dagegen postulieren eine relevante Anzahl vorausgegangener Studien eine zentrale Rolle dieser Therapie bei der Entwicklung und Progression der Herzinsuffizienz. Vermittelt werden könnte die Wirkung der TZDs über inhibitorische Effekte auf verschiedenen proinflammatorischen Stoffwechselwegen. So ist zum Beispiel die Aktivierung von TNF mit einer Herzinsuffizienz verknüpft. Die Expression von TNF -mRNA und -Protein bei Patienten und im Tiermodell mit progredienter Herzinsuffizienz mit unterschiedlicher Ursache ist erhöht [79][80]. Gentechnisch veränderte Mäuse mit einer Überexpression von TNF zeigen ein Fortschreiten der Herzhypertrophie und letztendlich eine Herzinsuffizienz mit vielen Charakteristika der menschlichen Kardiomyopathie [81][11]. Patienten mit Herzinsuffizienz haben erhöhte Plasma-TNF- α -Werte, welche pathophysiologisch relevante Konzentrationen für diese Erkrankung zu sein scheinen [82]. Folglich könnte erwartet werden, dass es durch die Aktivierung von PPAR γ zur Verbesserung der linksventrikulären Dilatation kommt, bedingt durch die Inhibition der TNF-Produktion. Diese Tatsache konnten Jiang, C. et al. in ihrer Studie an Kardiomyozyten durch Gabe von Lipopolysacchariden nachweisen [49].

Weder die Reduktion der TNF- oder IL-1 β - Expression noch die Abschwächung des linksventrikulären Remodelings können in unserer Studie beobachtet werden [20]. Somit scheint die erwartete Verringerung der Produktion pro-inflammatorischer Enzyme in diesem verwendeten Untersuchungsmodell nicht effektiv zu sein.

Weiterhin können die TZDs die Endothelinproduktion inhibieren [10][60][59]. Sowohl bei herzinsuffizienten Patienten als auch im entsprechenden Tiermodell steigen die Plasmawerte von Endothelin an [83] und korrelieren mit dem Grad der Herzinsuffizienz. Tatsächlich zeigen Langzeitbehandlungen mit einem Endothelinrezeptorantagonisten oder einem TZD bei Ratten mit Herzinsuffizienz und resultierendem Herzinfarkt ein signifikant verlängertes Überleben der Tiere. Dieser Effekt ist mit einer Verbesserung der Hämodynamik und des linksventrikulären

Remodelings verbunden [84]. In der Studie von Iglarz et al. an genveränderten DOCA-salt Ratten kann ein positiver Effekt unter Rosiglitazonebehandlung auf das kardiale Remodeling, das durch mineralkortikoidinduzierten Bluthochdruck verursacht wird, aufgezeigt werden. Dieser Effekt ist teilweise mit einer herabgesetzten Produktion von Endothelin-1 assoziiert [85]. Die Endothelinexpression in der vorliegenden Studie weist keine wesentlichen Veränderungen auf [20], weshalb es für die hier untersuchten Daten ohne funktionell entscheidende Bedeutung zu sein scheint.

TZDs haben außerdem eine Wirkung auf die Aktivierung von NF- κ B. Die Wirkungsweise von PPAR γ auf die inflammatorische Antwort durch Antagonismus auf die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 lässt sich z. B. durch Studien an Makrophagen aufzeigen [86][32][87]: „In-vitro“ zeigte sich der inhibitorische Effekt der TZD (speziell Rosiglitazone, Pioglitazone und Troglitazone) auf die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α an THP-1-Monozyten. Dieser Effekt scheint mit einer hohen Expression von PPAR γ verbunden zu sein [88]. In der Studie von Diep et al., die pioglitazonebehandelte und -unbehandelte Tiere untersuchen, die zuvor einer Angiotensin II Infusion ausgesetzt werden, wird eine Senkung der proinflammatorischen Zytokine und NF- κ B nachgewiesen [15]. In einer „in-vitro“ Studie an neonatalen Rattenkardiomyozyten lässt sich ein Zusammenhang zwischen der NF- κ B-Aktivierung und der kardialen Hypertrophieantwort feststellen, indem es die Expression von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) induziert und die Vergrößerung von Kardiomyozyten beeinflusst [89]. Ferner zeigt sich eine herzhypertrophiereduzierende Wirkung, basierend auf der PPAR γ aktivierenden Wirkung in einem Kontraktionsmodell „in-vitro“ [13] und in einem Überdruckmodell „in-vivo“ [90], wobei der hypertrophiereduzierende Effekt zumindest teilweise über den NF- κ B Signalweg vermittelt zu sein scheint. Somit könnte das kardiale Remodeling durch PPAR γ -Signalwege zumindest indirekt abgeschwächt werden [91]. Nach Beendigung der vorliegenden Studie kann in zwei weiteren inhaltlich ähnlichen Nachfolgestudien der positive Effekt auf das kardiale Remodeling unter Pioglitazongabe nachgewiesen werden. Beide Studien detektieren eine Aktivitätssenkung von NF- κ B als entscheidenden proinflammatorischen Vermittlungsfaktor unter PPAR γ -Aktivatoren [47][92]. Im vorliegenden Modell zeigt sich keine Differenz zwischen der Placebo- und

der Pioglitazongruppe hinsichtlich der NF- κ B Aktivierung, sodass die Glitazonthherapie im vorliegenden Modell keine Auswirkung auf die linksventrikuläre Hypertrophie zu haben scheint [20].

Zusätzlich könnten TZDs einen positiven Effekt auf das Ausmaß des infarzierten myokardialen Gewebes haben. So zeigten zwei „in-vivo“ Studien zunächst unter Vorbehandlung mit Rosiglitazon [93] und weiter unter Verwendung verschiedener PPAR γ -Aktivatoren [94], dass unter TZD-Behandlung die Infarktgröße reduziert und die kontraktile Dysfunktion verbessert wird.

In der vorliegenden Studie wird eine Woche nach Infarktoperation mit der Behandlung begonnen. Effekte von TZD auf die Myokardinfarktgröße können somit ausgeschlossen werden [20]. Dennoch könnte eine Verminderung der Myokardinfarktgröße durch einen frühzeitigeren Behandlungsstart von zentraler Bedeutung für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz sein.

In zwei Studien [47][92] wird der Einfluss von Pioglitazon auf den Kollagenmetabolismus erfasst. Remodelingbedingte Faktoren wie das Fibroblastenwachstum und die Synthese von Kollagen Typ I reduzieren sich unter der Behandlung, was sich positiv auf das linksventrikuläre Remodeling auswirken könnte.

In der vorliegenden Studie kann allerdings bezüglich der Kollagenanalyse kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden [20].

Neben den positiven Effekten auf die Myozyten des Herzens wirken PPAR γ -Aktivatoren deutlich vasoprotektiv. Entsprechend inhibieren Glitazone die Aktivität und die Radikalproduktion von Makrophagen, die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Entstehung des potenten Vasokonstriktors Endothelin in endothelialen Zellen [60][10]. Im vorliegenden eigenen Modell kann kein Effekt von Pioglitazon auf die aortale Endothelfunktion festgestellt werden [20].

Unsere Studie steht im Gegensatz zu Resultaten anderer Gruppen [95]. Shiomi et al. können positive Wirkungen einer Pioglitazonbehandlung auf die linksventrikuläre Dilatation und die Herzinsuffizienzentwicklung in einem vergleichbaren Modell des chronischen Myokardinfarktes an der Maus feststellen. Es bestehen allerdings deutliche Unterschiede zu unserer Studie: Erstens werden verschiedene Mausarten verwendet. Die vorliegende Studie verwendet C57B16 Mäuse, während in der anderen CD-1 Mäuse

eingesetzt werden. Diesem Unterschied zufolge könnten TZD- Effekte art- bzw. speziesspezifisch sein. Ein weiterer Unterschied betrifft die Verabreichungsart von Pioglitazon. Während in unserer Studie für eine garantierte orale Aufnahme den Tieren per Sonde eine regelmäßige und gleichbleibende Menge Pioglitazon verabreicht wird, wird bei Shiomi et al. Pioglitazon dem Futter beigemischt, was verschiedene Spitzen- und Steady-State-Konzentrationen zur Folge hat. Zudem werden auch unterschiedliche Dosierungen verwendet. Shiomi et al. verwendeten eine Dosierung von 3 mg/kg KG und in der vorliegenden sind es 20 mg/kg KG, eine Dosis, von der bekannt ist, dass sie eine vollständige glukosesenkende Wirkung bei Mäusen hat. Als letztes unterscheiden sich die Infarktgrößen der Studientiere und der Beginn der Behandlung. Bei Shiomi et al. finden sich ausgedehntere Infarkte (durchschnittlich 59 %) als in unserer Studie. Zusätzlich wird in der vergleichbaren Studie bereits sechs Stunden nach der OP mit der Pioglitazonbehandlung begonnen. Somit könnten die Effekte erst bei extensiveren Myokardinfarkten als in der vorliegenden Studie messbar sein. Auch der frühere Behandlungsbeginn könnte ein entscheidendes Kriterium der Differenzen sein.

Unsere Ergebnisse werden durch eine Studie von Lygate et al. [96], die Ratten acht Wochen lang in einem ähnlichen Myokardinfarktmodell Rosiglitazon verabreichen, unterstützt. Hierbei werden vergleichbar mit der vorliegenden Studie keine Unterschiede im Remodeling des linken Ventrikels zwischen den Behandlungsgruppen erzielt. Außerdem ist die Rosiglitazonbehandlung mit einer erhöhten Mortalitätsrate assoziiert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass protektive Effekte von Pioglitazon auf das linksventrikuläre Remodeling nicht einheitlich beobachtet werden können.

Klinische Einschätzung

Thiazolidindione werden mit positiven, aber auch mit negativen Wirkungen im Rahmen der Herzinsuffizienz in Zusammenhang gebracht. Im Rahmen unserer tierexperimentellen Studie können keine Veränderungen unter Pioglitazonbehandlung auf das postmyokardiale Remodeling erfasst werden.

In klinischen Studien an Patienten mit Glitazonbehandlung ist die periphere Flüssigkeitsretention bekannt [97], weshalb Thiazolidindione bei Patienten mit Herzinsuffizienz kontraindiziert sind [98]. Dieser Mechanismus ist mit einer TZD-

vermittelten amiloridabhängigen Na^+ -Absorption im Sammelrohr assoziiert [6]. Allerdings können Tang et. al. in ihrer klinischen Studie keinen Zusammenhang zwischen der Flüssigkeitsretention und der Verschlechterung der Herzinsuffizienz feststellen [97]. In unserer Studie kann bei den pioglitazonbehandelten Tieren keine erhöhte Flüssigkeitsretention erfasst werden. Das Gewicht aller Tiere verändert sich im Studienverlauf nicht erheblich.

Weitere klinische Studien sollten erfolgen, um die Glitazoneffekte auf die Herzinsuffizienz beim Mensch zu klären.

6. Zusammenfassung

Thiazolidindione, die zunehmend als gut wirkende Insulinsensitizer in der Diabetestherapie im Einsatz sind, besitzen als indikationslimitierende Nebenwirkung eine starke Flüssigkeitsretention mit Kontraindikation bei Herzinsuffizienz. Andererseits wird ihnen in der derzeitigen experimentellen Studienlage auf Zellebene ein positiver Effekt auf kardiale und vaskulär bedingte Erkrankungen zugesprochen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese untersucht, inwieweit Pioglitazon einen positiven oder negativen Einfluss auf das Remodeling nach Myokardinfarkt hat und ob sich Folgen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ergeben.

Dazu wird eine Untersuchung an Mäusen nach Myokardinfarktoperation unter Pioglitazonbehandlung, (ab dem siebten Tag nach OP) und einer entsprechenden Sham-Kontrollgruppe durchgeführt. Die Verabreichung von Pioglitazon versus Placebo erfolgt täglich körpergewichtsbezogen per Schlundsonde. Im Verlauf der Studie werden die Tiere am siebten, 21. und 42. Tag in apikaler Ebene und in Höhe des Papillarmuskels echokardiographiert und die Daten als M- und B-Mode aufgezeichnet und ausgewertet. Weiterhin wird das Gewicht der Tiere am Operationstag und nachfolgend wöchentlich erfasst. Nach Studienende werden die entfernten Herzen der Tiere gewogen sowie der Glucose- und GOT-Wert des Blutes erfasst. Weiterhin erfolgt die Messung der Aortenrelaxation, die Infarktgrößenbestimmung und Kollagenmessung sowie die Bestimmung von $\text{TNF}\alpha$, $\text{NF-}\kappa\text{B}$, $\text{IL-1}\beta$ und Endothelin-1.

Wie erwartet, kann infarktbedingt eine Dilatation des Ventrikels und eine Zunahme des Kollagengehaltes echokardiographisch und polarisationsmikroskopisch dokumentiert werden. Vergleichend lassen sich weder bezüglich des Gewichtes der Herzen und der Tiere, der Myokardinfarktgröße, des Kollagengehalts im gesunden und infarzierten Myokardgewebe, des Remodeling, der proinflammatorischen Enzyme und Endothelin-1, noch in der Gefäßreaktion signifikante Unterschiede feststellen. Während der Serumglukosewert bei den verwendeten nicht an Diabetes mellitus erkrankten Tieren keinen Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen zeigt, lässt sich in der pioglitazonbehandelten Gruppe eine deutliche Senkung der Triglyceridspiegel feststellen. Auf Basis der vorliegenden Messungen zeigt die Pioglitazonbehandlung keinen positiven oder negativen Effekt auf das Remodeling von infarzierten Mäusen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Matthaei, St.; Stumvoll, M.; Häring, H.-U. (2001). Thiazolidindione, Neue Aspekte in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2, Deutsches Ärzteblatt Nr. 14, S. 912-918
- [2] Krentz, A.J.; Bailey, C.J.; Melander, A. (2000). Thiazolidinediones for type 2 diabetes, BMJ Nr. 321, S. 252-253
- [3] Wang, C.-H.; Weisel, R.; Liu, P.P.; Fedak, P.W.M., Verma, S. (2002). Glitazones and Heart Failure critical Appraisal for the Clinical, Circulation Nr. 107, S. 1350-1354
- [4] Wooltorton, E. (2002). Rosiglitazone(Avandia) and pioglitazone(Actos) and heart failure, CMAJ Nr. 166, S. 219
- [5] Marx, N. (2001). Sonderdruck: Medical Expert - Was leisten Glitazone? S. 17-27, Takeda Plasma GmbH
- [6] Guan, Y.F.; Chuanming, H.; Cha, D.R.; Rao, R.; Lu, W.; Kohan, D.E.;Magnuson, M.A.; Redha, R.; Zhang, Y.; Breyer, M.D. (2005). Thiazolidindiones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption, Nature Medicine Nr. 11, S. 861-866
- [7] Bishop-Bailay, D. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system, Br. J. Pharmacol. Nr. 129, S. 823-834
- [8] Ghazzi, M.N.; Perez, J.E.; Antonucci, T.K. (1997). Cardiac and Glycemic Benefits of Troglitazone Treatment in NIDDM, Diabetes Nr. 46, S. 433-439
- [9] Schoonjans, K.; Auwerx, J. (2000). Thiazolidindiones: an update, Lancet Nr. 355, S. 1008-1010
- [10] Buchanan, T.A.; Meehan, W.P.; Jeng, Y.Y.; Yang, D.; Chan, T.M.; Nadler, J.L.; Scott, S.; Rude, R.K.; Hsueh, W.A. (1995). Blood pressure lowering by pioglitazone. Evidence for a direct vasculareffect, J. Clin. Invest. Nr. 96, S. 254-260
- [11] Bryant, D.; Becker, L.; Richardson, L.; Shelton, J.; Franko, F.; Peshock,R.; Tompson, M.; Giroir, B. (1998). cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha, Circulation Nr. 97, S. 1375-1381

- [12] Frey, N.; Olson, E.N. (2002). Modulating Cardiac Hypertrophy by Manipulating Myocardial Lipid Metabolism?, *Circulation* Nr. 105, S. 1152-1154
- [13] Yamamoto, K.; Ohki, R.; Lee, R.T.; Ikeda, U.; Shimada, K. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit cardiachypertrophy in cardiac myocytes, *Circulation* Nr. 104, S. 1670-1675
- [14] Tsuji, T.; Mizushige, K.; Noma, T.; Murakami, K.; Ohmori, K.; Miyatake, A. (2001). Pioglitazone improves left ventricular diastolic function and decrease collagen accumulation in prediabetic stage of a type II diabetic rat, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* Nr. 38, S. 868-874
- [15] Diep, Q.N.; Mabrouk, M.E.; Cohn, J.S.; Endemann, D.; Amiri, F.; Viridis, A.; Neves, M.F.; Schiffrin, E.L.; (2002). Structure, endothelial Function, Cell Growth, and Inflammation in Blood Vessels of Angiotensin II- Infused Rats, *Circulation* Nr. 105, S. 2296-2302
- [16] Haffner, S.M.; Greenberg, A.S.; Weston, W.M.; Chen, H.; Williams, K.; Freed, M.I. (2002). Effect of Rosiglitazone Treatment on Nontraditional Markers of Cardiovascular Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus, *Circulation* Nr. 106, S. 679-684
- [17] Sidhu, J.S.; Kaski, J.C. (2001). Peroxisome proliverator- activated receptor gamma:a potential therapeutic target in the management of ischaemic heart disease, *Heart* Nr. 86, S. 255-258
- [18] Peuler, J.D.; Phare, S.M.; Iannucci, A.R.; Hodorek, M.J. (1996). Differential Inhibitory Effects of Antidiabetic Drugs on Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation, *AHJ(American Journal of Hypertension)* Nr. 9, S. 188-192
- [19] Ishibashi, M.; Egashira, K.; Hiasa, K.; Inoue, S.; Ni, W.; Zhao, Q.; Usui, M.; Kitamoto, S.; Ichiki, T. (2002). Antiinflammatory and antiarteriosklerotic Effects of Pioglitazone, *Hypertension* Nr. 40, S. 687
- [20] Frantz, S.; Hu, K.; Widder, J.; Bayer, B.; Witzel, C.-C.; Schmidt, I.; Galuppo, P.; Strotmann, J.; Ertl, G.; Bauersachs, J. (2003). Peroxisome proliferator activated-receptor agonism and left ventricular remodeling in mice with chronic myocardial infarction, *British Journal of Pharmacology* Nr. 141, S. 9-14
- [21] Herold, G. (2004). *Innere Medizin*

- [22] Renz-Polster, H.; Braun, J., Urban und Fischer Verlag München, Jena (2001). Basislehrbuch Innere Medizin, kompakt-greifbar-verständlich, ISBN: 3-437-41051-2
- [23] Baenkler, H.-W.; Fritze, D.; Fießl, H.S.; Goeckenjan, G.; Hamm, C., Georg Thime Verlag Stuttgart (2001). Innere Medizin, ISBN: 3-13-128751-9
- [24] Frantz, K.S.H-W. (1996). Einfluss einer Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer-Behandlung mit Quinipril auf den Energiestoffwechsel des chronisch infarzierten Rattenherzens, Medizinische Universität Würzburg
- [25] Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main; Edition Cantor Verlag, Aulendorf (2002). Rote Liste
- [26] Agneta, H.; Hall, K.; Skogsberg, J.; Ehrenborg, E.; Lewitt, M.S. (2003). Troglitazone stimulates IGF-binding protein-1 by a PPARgamma-independent mechanism, Biochemical and Biophysical Research Communication Nr. 303, S. 693-699
- [27] Way, J.M.; Harrington, W.W.; Brown, K.K.; Gottschalk, W.K.; Sundseth, S.S.; Mansfield, T.A.; Ramachandran, R.K. (2001). Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues, Endocrinology Nr. 142, S. 1269-1277
- [28] Stevenson, R.; Hutson, N.; Krupp, M.; Volkmann, R.; Holland, G.; Egger, J.; Clark, D.; McPherson, R.; Hall, K. (1990). Actions of novel antidiabetic agent troglitazone in hyperglycemic hyperinsulinemic ob/ob mice, Diabetes Nr. 39, S. 1218- 1227
- [29] Kemnitz, J.W.; Elson, D.F.; Roecker, E.B.; Baum, S.T.; Bergman, R.N.; Meglasson, M.D. (1994). Pioglitazone increases insulin sensitivity, reduces blood glucose, insulin, and lipid levels, and lowers blood pressure in obese, insulin-resistant rhesus monkeys, Diabetes Nr. 43, S. 204- 211
- [30] Barbier, O.; Pineda, T.; Duguay, Y.; Blanquart, C.; Fruchart, J.-C.; Glineur, C. (2002). Pleiotropic Actions of Peroxisome Proliferator- Activated Receptor in Lipid Metabolism and Atherosclerosis, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Nr. 22, S. 717

- [31] Verrier, E.; Wang, L.; Wadham, C.; Albanese, N.; Hahn, C.; Gamble, J.; Jeniffer, R (2004). PPAR(γ) Agonists Ameliorate Endothelial Cell Activation via Inhibition of Diacylglycerol-Protein Kinase C Signaling Pathway: Role of Diacylglycerol Kinase, *Circulation Research* Nr. 94 (11), S. 1515- 1522
- [32] Kaplan, J.; O'Conner, M.; Zingarelli, B. (2004). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) is required for the Inhibitory Effect of Ciglitazone but not 15-Deoxy-12,14-Prostaglandin J2 on the NF-B Pathway in Human, *Critical Care Medicine* Nr. 32 (12), S. A18
- [33] Ecelbarger, C.; Riazi, S.; Song, J.; Kahn, O. (2004). Decreased Blood Pressure and Thiazide-sensitive Na-Cl Cotransporter (NCC) Abundance and Activity in Rosiglitazone- Treated Obese Zucker Rats, *Hypertension* Nr. 44 (4), S. 500
- [34] Rosen, E.D., Sarraf, P.; Troy, A.E.; Bradwin, G.; Moore, K.; Milstone, D.S.; Spiegelman, B.M.; Mortensen, R.M. (1999). PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue in Vivo and in Vitro, *Molecular Cell* Nr. 4, S. 611-617
- [35] Marx, N. (2002). Die Bedeutung von Glitazonen, *Journal of Kardiologie* Nr. 9 (12), S. 563-566
- [36] Francis, G.A.; Anicotte, J.-S.; Auwerx, J. (2003). PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis, *Current Opinion in Pharmacology* Nr. 3, S. 186-191
- [37] Marx, N.; Schonbeck, U.; Lazar, M.A.; Libby, P.; Plutzky, J. (1998). Peroxisome proliferator- activated receptor gamma activators inhibit geneexpression and migration in human vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.* Nr. 83, S. 1097-1103
- [38] Marx, N.; Hombach, V (2001). Peroxisome proliferator- activated receptors (PPARs) in the vessel wall:new regulators of gene expression in vascularcells, *Z. Kardiol.* Nr. 90, S. 470-477
- [39] Marx, N.; Libby, P.; Plutzky, J. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptos(PPARs) and their role in thevessell wall: possible mediators of cardiovascular risk?, *J. of Card. Risk* Nr. 8, S. 203-210

- [40] Ljipenberg, A.; Jeanni, E.; Wahli, W.; Desvergne, B. (1997). Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator- activated receptor/ retinoid X receptor heterodimer binding to DNA, *Journal of Biological Chemistry* Nr. 272, S. 20108- 20117
- [41] Montague, C. T. (2002). Adipose depot-specific effects of PPAR gamma agonists: a consequence of differential expression of PPAR gamma in adipose tissue depots?, *Diabetes, Obesity and Metabolism* Nr. 4, S. 356-361
- [42] Tugwood, J.D.; Issemann, I.; Anderson, R.G.; Bundell, K.R.; McPheat, W.L.; Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene, *EMBO Journal* Nr. 11, S. 433- 439
- [43] Dubuquoy, L.; Dharancy, S.; Nutten, S.; Petterson, S.; Auwerx, J.; Desreumaux, P. (2002). Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X-receptor heterodimer in hepatogastroenterological disease, *The Lancet* Nr. 360, S. 1410-1418
- [44] Desvergne, B.; Wahl, W. (1999). Peroxisome proliferator activated receptors: nuclear control of metabolism, *Endocr. Rev.* Nr. 20, S. 649- 688
- [45] Buzzetti,R.; Petrone,A.; CaiazzoA.; Alemanoo,I.; Zavarella,S.; Capizzi,M.; Mein,C.; Osborn,J. (01/2005). PPAR-(gamma)2 Pro12Ala Variant Is Associated with Greater Insulin sensitivity in Childhood Obesity, *Pediatric Research* Nr. 57(1), S. 138-140
- [46] Jiang, C.; Ting, A.T.; Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of myocyte inflammatory cytokines, *Nature* Nr. 391, S. 82-86
- [47] Chen, K.; Li, D.; Zhang, X.; Hermonat, P.; Mehta, J.L. (2004). Anoxia-Reoxygenation Stimulates Collagen Type-I and MMP-1 Expression in Cardiac Fibroblasts: Modulation by the PPAR-(gamma) Ligand Pioglitazone, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* Nr. 44 (6), S. 682- 687
- [48] Keshamouni,V.; Reddy,R.; Arenberg,D.; Joel,B.; Thannickal,V.; Kalemkerian,G.; Stanford,T. (01/2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-(gamma) activation inhibits tumor progression in non-small-cell lung cancer, *Oncogene* Nr. 23(1), S. 100-108

- [49] Takano, H.; Nagai, T.; Asakawa, M.; Toyozaki, T.; Oka, T.; Komuro, I.; Saito, T. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor-alpha Expression in Neonatal Rat Cardiac Myocytes, *Circ. Res.* Nr. 87, S. 596-602
- [50] Gilmore, T. (1999). The Rel/NF-kappa B signal transduction pathway: introduction, *Oncogene* Nr. 18, S. 6841-6844
- [51] Normann, D.; Yacoub, M.; Barton, P. (1998). Peroxisome proliferator- activated receptors in the cardiovascular system subunits and activation by interleukin-1 beta in cardiac myocytes in vitro, *Br. J. Pharmacol.* Nr. 129, S. 823-834
- [52] Frantz, S.; Fraccarollo, D.; Wagner, H.; Behr, T.M.; Philip, J.; Angermann, C.E.; Ertl, G.; Bauersachs, J. (2003). Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure, *Cardiovascular Research* Nr. 57, S. 749-756
- [53] Staels, B.; Koenig, W.; Habib, A.; Merval, R.; Lebret, M.; Torra, I.P.; Delerive, P.; Fadel, A.; Chinetti, G. (1998). Action of human smooth-muscle cells is inhibited by PPAR alpha but not by PPAR gamma activators, *Nature* Nr. 393 (6687), S. 790-793
- [54] Pahl, H. (1999). Aktivators and target genes of REL/NF-kappa B transcription factors, *Oncogene* Nr. 18, S. 6853-6866
- [55] Baeuerle, P.; Baltimore, D. (1996). NF-kappa B: 10 years later, *Cell* Nr. 87, S. 13-20
- [56] Valen, G.; Yan, Z; Hansson, G. (2001). Nuclear factor- kappa B an the heart, *J. Am. Coll. Cardiol.* Nr. 38, S. 307-314
- [57] Ji, H.D.; Cheon, H.; Jun, J.B.; Choi, S.J.; Kim, Y.R.; Lee, Y.H.; Kim, T.H.; Chae, I.J. (2001). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes, *Journal of Autoimmun* Nr. 17 (3), S. 215-221
- [58] Iemitsu, M.; Maeda, S.; Otsuki, T.; Goto, K.; Miyauchi, T. (2006). Time course alterations of myocardial endothelin-1 production during the formation of exercise training-induced cardiac hypertrophy, *Exp. Biological Med.* Nr. 231 (6), S. 871-875

- [59] Martin-Nizard, F.; Furman, C.; Delerive, P.; Kandoussi, A.; Fruchart, J.C.; Staels, B.; Duriez, P. (2002). Peroxisome Proliferator-activated Receptor Activators Inhibit Oxidized Low-density Lipoprotein-induced Endothelin-1 Secretion in Endothelial Cells, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* Nr. 40 (6), S. 822-831
- [60] Delerive, P.; Martin-Nizard, F.; Chinetti, G.; Trottein, F.; Fruchard, J.C.; Najib, J.; Duriez, P.; Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activatorprotein-1 signaling pathway, *Circulation Research* Nr. 85, S. 394-402
- [61] Yamamoto, E.; Awano, S.; Koseki, T.; Ansai, T.; Takehara, T. (2003). Expression of endothelin-1 in gingival epithelial cells, *Journal of Periodontal Research* Nr. 38 (4), S. 417-421
- [62] Kim, T.H.; Xiong, H.; Zhang, Z.; Ren, B. (2005). (beta)-Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells, *Nature Oncogene* Nr. 24 (4), S. 597-604
- [63] Marasciulo, F.; Montagnani, M.; Potenza, M. (2006). Endothelin-1: the ying and yang on vascular function, *Current Medical Chemistry* Nr. 13 (14), S. 1655-1665
- [64] Shimojo, N.; Jesmin, S.; Zaedi, S.; Soma, M.; Yamaguchi, I.; Goto, K.; Miyauchi, T. (2006). Changes in Important apoptosis-related molecules in the endothelin-1-induced hypertrophied cardiomyocytes: effect of the pretreatment with eicosapentaenoic Acid., *Exp. Biol. Med.* Nr. 231 (6), S. 932-936
- [65] Schirger, J.; Chen, H.H.; Jougasaki, M.; Lisy, O.; Boerrigter, G.; Cataliotti, A.; Burnett, J.C. (2004). Endothelin A Receptor Antagonism in Experimental Congestive Heart Failure Renin- Angiotensin System and Sustained Sodium Retention, *Circulation* Nr. 109 (2), S. 249-254
- [66] Funalot, B.; Courbon, D.; Brousseau, Th.; Poirier, O.; Berr, C.; Cambien, F.; Amouyel, P.; Schwartz, J-C. (2004). genes encoding endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 interact to influence blood pressure in women: The EVA study, *Hypertension* Nr. 22 (4), S. 739-743

- [67] Victorino, G.P.; Newton, C.R.; Curran, B. (2004). Endothelin-1 Decreases Microvessel Permeability after Endothelial Activation, *The Journal of Trauma* Nr. 56 (4), S. 832-836
- [68] Gupta, K., Bewtra, A. (1999). Il-1 receptor-type expression in relation to atopy, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* Nr. 103 (6), S. 1100-1107
- [69] Galea, J.; Armstrong, J.; Gadsdon, P.; Holden, H.; Francis, S.; Holt, C. (1996). Interleukin-1 β in Coronary Arteries of Patients With Ischemic Heart Disease, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* Nr. 16 (8), S. 1000-1006
- [70] Nakae, S.; Naruse-Nakajimal, C.; Sudo, K.; Horai, R.; Asano, M.; Iwakura, Y. (2001). Il-1(alpha), but not Il-1(beta), is required for contact-allergen-specific T-cell activation during the sensitization phase in contact hypersensitivity, *International Immunology* Nr. 13 (12), S. 1471-1478
- [71] Doll, M.; Kayhan, N.; Vahl, C.; Hagl, S. (2002). Kontraktionsverhalten des isolierten Kardiomyozyten Einfluss von Interleukin-1 und Interleukin-6., *Zeitschrift für Herz-, Thorax-, Gefäßchirurgie* Nr. 16, S. 10-20
- [72] Ikeda, H.; Taketomi, S.; Sugiyama, Y.; Shimura, Y.; Sohda, T.; Meguro, K.; Fujita, T. (1990). Effects of Pioglitazone on glucose and lipid metabolism in normal and insulin resistant animals, *Arzneimittelforschung* Nr. 40, S. 156-162
- [73] Erdmann, Springer Verlag (2000). *Klinische Kardiologie; Krankheiten des Herzens, des Herzkreislaufs und der herznahen Gefäße*, ISBN: 3-540-66725-3
- [74] Ducharme, A.; Frantz, S.; Aikawa, M.; Rabkon, E.; Lindsey, M.; Rohde, L.E.; Schoen, F.J. (2000). Target deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction, *J.Clin.Invest.* Nr. 106, S. 55-62
- [75] Rhode, L.E.; Ducharme, A.; Arroyo, L.H.; Aikawa, M.; Sukhova, G.H.; Lopez-Anaya, A. (1999). Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice, *Circulation* Nr. 99, S. 3063-3070

- [76] Bauersachs, J.; Galuppo, A.; Fraccarollo, D.; Christ, M.; Ertl, G. (2001). Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzym a reductase inhibition with cerivastatin in rats with heart failure after myokardial ifection, *Circulation* Nr. 104, S. 982-985
- [77] Junqueira, L.C.; Bignolas, G.; Brentani, R.R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections, *Histochemical Journal* Nr. 11, S. 447-455
- [78] Bauersachs, J.; Bououmie, A.; Fraccarollo, D.; Hu, K.; Busse, R.; Ertl, G. (1999). Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production, *Circulation* Nr. 100, S. 292-298
- [79] Torre-Amione, G.; Kapadia, S.; Benedict, C.; Oral, H.; Young, J.B.; Mann, D.L. (1996). Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular, *J. Am. Coll. Cardiol.* Nr. 27, S. 1201-1206
- [80] Testa, M.; Yeh, M.; Lee, P.; Fanelli, R.; Loperfido, F.; Berman, J.W.; Lejemtel, (1996). Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients, *J. Am. Coll. Cardiol.* Nr. 28, S. 964-971
- [81] Kubota, T.; McTiernan, C.F.; Frye, C.S.; Slawson, S.E.; Lemster, B.H.; Koretsky, A.P.; Demetris, A.J.; Feldmann, A.M. (1997). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardia-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha, *Circulation Research* Nr. 81, S. 627-635
- [82] Bozkurt, B.; Kribbs, S.B.; Clubb, J.R.; Michael, L.H.; Didenko, V.V.; Hornsby, P.J.; Seta, Y.; Oral, H.; Spinale, F.G.; Mann, D. (1998). Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats, *Circulation* Nr. 97, S. 1382-1391
- [83] Murray, J.J.; Ray, S.G.; Abdullah, I.; Dargie, H.J.; Morton, J.J. (1992). Plasma endothelin in chronic heart failure, *Circulation* Nr. 85, S. 1374-1379

- [84] Fraccarollo, D.; Hu, K.; Galuppo, P.; Gaudron, P.; Ertl, G. (1997). Chronic endothelin receptor blockade attenuates progressive ventricular dilation and improves cardiac function in rats with myocardial infarction: possible involvement of myocardial endothelin system in ventricular remodeling, *Circulation* Nr. 96, S. 3963-3973
- [85] Jglarz, M.; Touyz, R.M.; Viel, E.C.; Paradis, P.; Amiri, F.; Diep, Q.N.; Schiffrin, E.L. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and receptor-gamma activations prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension, *Hypertension* Nr. 42 (4), S. 737-743
- [86] Ricote, M.; Li, A.C.; Willson, T.M.; Kelly, C.J.; Glass, C.K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, *Nature* Nr. 391, S. 79- 82
- [87] Liu, Y.; Zhu, Y.; Rannou, F.; Lee, T-S.; Formentin, K.; Zeng, L.; Yuan, X.; Wang, N.; Chien, S.; Forman, B.; Shyy, J.Y.-J. (2004). Laminar Flow Activates Peroxisome Proliferator- Activated Receptor-(gamma) in Vascular Endothelial Cells, *Circulation* Nr. 110 (9), S. 1128- 1133
- [88] Meier, C.A.; Chicheportiche, R.; Juge-Aubry, C.E.; Dreyer, M.G.; Dayer, J.M. (2002). Regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in THP-1 cells by ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *Cytokine* Nr. 18 (6), S. 320-328
- [89] Purcell, N.H.; Tang, G.; Yu, C.; Mercurio, F.; DiDonato, J.A.; Lin, A. (2001). Activation of NF-kappa B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes, *Proc. Natl. Academy of Science USA* Nr. 98, S. 6668- 6673
- [90] Asakawa, M.; Takano, H.; Nagai, T.; Uozumi, H.; Hasegawa, H.; Kubota, N.; Saito, T.; Masuda, Y.; Kadowako, T.; Komuro, I. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo, *Circulation* Nr. 105, S. 1240-1246
- [91] Schiffrin, E.L.; Amiri, F.; Benkirane, K.; Jglarz, M.; Diep, Q.N. Hypertension (2003). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors; Vascular and Cardiac Effects in Hypertension, Nr. 42, S. 664

- [92] Chen, K.; Chen, J.; Li, D.; Zhang, X.; Mehta, J.L. (2004). Angiotensin II Regulation of Collagen Type I Expression in Cardiac Fibroblasts: Modulation by PPAR-(gamma) Ligand Pioglitazone, *Hypertension* Nr. 44 (5), S. 655-661
- [93] Yue, T.-L.; Chen, J.; Bao, W.; Narayanan, P.; Bril, A.; Jiang, W.; Lysko, P.; Gu, J.-L.; Boyce, R.; Zimmerman, D. (2001). In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferated-activated receptor-agonist rosiglitazone, *Circulation* Nr. 104, S. 2588-2594
- [94] Waymann, N.S.; Hattori, Y.; Mc Donald, M.C.; Mota-Filipe, H.; Cuzzocrea, S.; Pisano, B.; Chatterjee, P.K. (2002). Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size, *FASEB Journal* Nr. 16, S. 1027-1040
- [95] Shiomi, T.; Tsutsui, H.; Hayashidani, S.; Suematsu, N.; Ikeuchi, M.; Wen, J.; Ishibashi, M.; Kubota, T.; Egashira, K. (2002). Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction, *Circulation* Nr. 106, S. 3126-3132
- [96] Lygate, C.A.; Hulbert, K.; Monfared, M.; Cole, M.; Clarke, K.; Neubauer, S. (2003). The PPARg-activator rosiglitazone does not alter remodeling but increase mortality in rats postmyocardial infarction, *Cardiovascular Research* Nr. 85, S. 632-637
- [97] Tang, W.H.; Francis, G.S.; Hoogwerf, B.J.; Young, J.B. (2003). Fluid retention after initiation of thiazolidindione Therapy in diabeticpatients with established chronic heart failure, *J. Am. Coll. Cardiol.* Nr. 41, S. 1394-1398
- [98] Kaplan, F.; Al-Majali, K.; Betteridge, D.J. (2001). PPAR's, insuline resistance and type 2 diabetes, *Journal of Cardiovascular Risk.* Nr. 8, S. 211-217