

Universitätsklinikum Ulm  
Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Rottbauer

**Wirkung einer Rosiglitazontherapie auf inflammatorische  
Biomarker bei nicht- diabetischen gesunden Individuen**

Daten einer randomisierten, placebokontrollierten, doppelblinden,  
prospektiven Studie

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

vorgelegt von  
Valérie Juliane Huber  
aus Berlin  
Ulm 2012

**Amtierender Dekan:**

Prof. Dr. Thomas Wirth

**1. Berichterstatter:**

Prof. Dr. Nikolaus Marx

**2. Berichterstatter:**

PD Dr. Martin Bommer

**Tag der Promotion:**

25.10.2013

# Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	6
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1 Die Pathogenese der Arteriosklerose .....	7
1.2 E-Selektin .....	8
1.3 Fibrinogen .....	9
1.4 L-Selektin (CD62L) .....	9
1.5 CD64 , Fc-Gamma Rezeptor 1 (FcγR1).....	9
1.6 Rosiglitazon-Pharmakodynamik .....	10
1.7 Rosiglitazon- Nebenwirkungen .....	11
1.8 Rosiglitazon – antiatherogene Wirkung .....	12
1.9 Fragestellung .....	14
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Probanden .....	15
2.2 Studienaufbau.....	16
2.3 Methode.....	16
2.3.1 Bestimmung der E-Selektin Konzentration mittels ELISA .....	17
2.3.2 Bestimmung der L- Selektin (CD 62) und Fc-Gamma Rezeptor 1 (CD 64) Konzentration mittels FACS.....	18
2.3.3 Ermittlung der Fibrinogenkonzentration mittels Nephelometrie.....	19
2.4 Statistische Auswertung.....	20
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>21</b>
3.1. Studienpopulation .....	21
3.2 Effekt auf die inflammatorischen Serummarker .....	23
3.2.1 Effekt von Rosiglitazon auf das Fibrinogen.....	23
3.2.2 Effekt von Rosiglitazon auf das E-Selektin .....	26
3.2.3 Effekt von Rosiglitazon auf die monozytäre Expression von L-Selektin (CD62) .....	29
3.2.4 Effekt von Rosiglitazon auf Fc-Gamma Rezeptor 1 Expression (CD 64 ) .....	32
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>35</b>
4.1 Rosiglitazon senkt die Fibrinogenkonzentration.....	36
4.2 Rosiglitazon hat keinen signifikanten Effekt auf das E-Selektin.....	37

4.3 Rosiglitazon hat keinen signifikanten Effekt auf die monozytäre L-Selektin und Fc-Gamma Rezeptor 1 Expression (FcγRI) .....	37
4.4 Die kardiovaskuläre Sicherheit von Rosiglitazon .....	38
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>41</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>42</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>47</b>
<b>9. Lebenslauf .....</b>	<b>48</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

AHT:	Arterielle Hypertonie
ALT:	Alanin-Aminotransferase
Apo E:	Apoprotein E
AST :	Aspartat-Aminotransferase
BMI:	Body-Mass-Index
CD:	Cluster of Differentiation
DM:	Diabetes Mellitus
DNS:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS:	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fc $\gamma$ R1:	Fc-Gamma Rezeptor 1
Gamma-GT:	Gamma-Glutamyltransferase
HbA1c:	Glykohämoglobin
HDL:	High Density Lipoprotein
HF:	Herzfrequenz
ICAM:	Intercellular Adhesion Molecule
IFN:	Interferon
IgG:	Immunoglobulin
IL:	Interleukin
kD:	Kilodalton
LDL:	Low Density Lipoprotein
MI:	Myokardinfarkt
OGTT:	Oraler Glukose Toleranz Test
PPAR $\gamma$ :	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RR:	Riva Rocci
RXR:	Retinoic Acid Rezeptor
TH2:	T-Lymphozyten
TNF:	TumorNekroseFaktor
TZD:	Thiazolidindione
VCAM:	Vascular Cell AdhesionMolecule

# **1. Einleitung**

Arteriosklerose ist der Hauptgrund für Morbidität und Mortalität bei Erwachsenen in der westlichen Welt und erreicht auch in Entwicklungsländern mittlerweile schnell steigende, alarmierende Zahlen (Verma et al. 2003). Zu einem der Hauptrisikofaktoren in der Entstehung der Arteriosklerose zählt der Diabetes Mellitus Typ 2, der mehr als 160 Millionen Menschen weltweit betrifft (5% der Weltbevölkerung), (Devchand PR 2008). 50% aller Betroffenen mit Diabetes versterben an kardiovaskulären Erkrankungen wie primärer Herzerkrankung und Schlaganfall. ( [www.who.org](http://www.who.org)).

## **1.1 Die Pathogenese der Arteriosklerose**

Die Arteriosklerose ist ein multifaktorieller Prozess, der schleichend über Jahrzehnte entsteht und durch die bekannten Risikofaktoren wie familiäre Disposition, Hypercholesterinämie, AHT, Übergewicht, DM, Rauchen und andere bedingt wird. Seit den 90er Jahren spielt die Entzündung (Libby et al. 2002) und Infektion sowie in den letzten Jahren das Immunsystem (Jousilahti et al. 2001) in der Pathogenese eine verstärkte Rolle. Im Prozess der Inflammation sind Akute-Phase-Proteine wie Fibrinogen als Ausdruck einer subklinischen, chronischen Entzündung erhöht (Jaber et al. 2002).

Die Arteriosklerose kann in drei Hauptphasen aufgeteilt werden. Adhäsion und subendotheliale Immigration von Monozyten, welche sich zu Makrophagen umwandeln und die Grundlage für Schaumzellen und Fatty-Streaks bilden. Schaumzellen sind in der Lage, Oberflächenrezeptoren und lösliche Mediatoren wie Interleukine, TNF Alpha und Monozyten Chemotactin Protein 1 auszubilden, die andere Monozyten, aktivierte endotheliale Zellen und glatte Muskelzellen anlocken. Der nächste Schritt besteht in der Proliferation glatter Muskelzellen in der Intima und Media. Resultat ist eine schrittweise Beeinträchtigung des Blutgefäßlumens. Myofibroblasten besetzen die Läsion, was zu starker Vergrößerung der extrazellulären Matrix führt. Die Läsionen degenerieren. Es bildet sich ein nekrotischer Lip-

idkern, der aus extrazellulärem Lipid, Cholesterinkristallen, inflammatorischen Zellen und nekrotischen Ablagerungen besteht. Es entsteht eine fibröse Kappe, die die Interaktion von Blutzellen verhindert, Teile von Thrombozyten mit hoch aggregatorischem Material sind darin zu finden. Die weitere Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten beginnt als ein Resultat der Up-Regulation von Adhäsionsmolekülen am Endothel und den Leukozyten, die unter anderem E- und L-Selektin gesteuert ist. (Galkina E; Ley K2007)

Weitere Entzündungsaktivität und erhöhter mechanischer Stress scheint die fibröse Kappe zu schwächen. Es kann zu Plaqueruptur und Thrombozytenaggregation kommen, die zu klinischen Manifestationen wie MI, Schlaganfall oder mesenterialer Ischämie führen können. CD 4<sup>+</sup> Lymphozyten sind allgemeine Komponenten von Atheromen und hauptsächlich auf der Rupturseite lokalisiert. Durch die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF Alpha stehen sie in ständigem Kontakt mit Makrophagen und glatten Muskelzellen, die aktivierte Oberflächenmoleküle exprimieren und in der Lage sind, Antigene zu verarbeiten und zu präsentieren (Lehr et al. 2002), (Lockhart et al. 2006), (Libby P. 2007), (Marx et al. 2002).

## **1.2 E-Selektin**

Die Dysfunktion der Endothelzellen stellt eine der frühesten Manifestationen im Prozess der Arteriosklerose dar. Die besondere Relevanz kommt dem Endothel zu, da es sowohl als Teilnehmer wie auch als Sensor und in diesem Zusammenhang auch als prognostischer Marker für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse fungiert (Ganz P, Vita JA 2003), (Verma et al. 2003), (Głowińska et al. 2004).

Verschiedene Arten von Leukozyten können in arteriosklerotisch betroffenen Arealen nachgewiesen werden. Die Rekrutierung von Monozyten wird unter anderem durch E-Selektin gesteuert (Galkina E; Ley K 2007). In zahlreichen Veröffentlichungen wurden verschiedene Methoden der Erkenntnisgewinnung bezüglich der Funktion des Endothels diskutiert. Die Fragestellung nach dem idealen Endothelmarker ist weiter offen (Verma et al. 2003), (Lockhart et al. 2006).

E-Selektin ist ein etablierter Endothelmarker; erhöhte Serummarker entstehen unter anderem bei einer Erkrankung der Koronararterien und begünstigen das Auf-

treten von DM Typ 2. Rosiglitazon wirkt durch eine Verbesserung der endothelialen Vasodilatation auf das Endothel und senkt die Höhe von inflammatorischen Biomarkern wie dem E-Selektin im Serum ab. So lässt sich laut Hetzel et al. auf einen direkten Effekt von Rosiglitazon auf das Endothel schließen, der unabhängig von Glukosestoffwechsel oder Lipidprofil ist. (Hetzel et al. 2005).

### **1.3 Fibrinogen**

Im Prozess der Arteriosklerose sind Akute-Phase-Proteine wie Fibrinogen erhöht als Reaktion des Organismus auf eine unspezifische Entzündung, weshalb ein erhöhter Fibrinogenspiegel als Zeichen eines kardiovaskulären Risikos gilt (Jaber et al. 2002). Fibrinogen ist das größte Blutgerinnungsprotein in Hinblick auf die Masse und der Vorläufer von Fibrin sowie ein Bestimmungsfaktor der Blutviskosität und Thrombozytenaggregation. Eine Langzeiterhöhung der Plasmafibrinogenwerte über 1g/l ist eng verbunden mit einem fast doppelt so hohem Risiko des Auftretens kardiovaskulärer Erkrankungen, wie der koronaren Herzerkrankung und Schlaganfall, wird von der Fibrinogen Studies Collaboration berichtet (Kaptoge et al. 2007), (Ernst, Resch 1993).

.

### **1.4 L-Selektin (CD62L)**

L-Selektin ist ein 74 kDa Glykoprotein, das zur Selektinfamilie der Gruppe der Oberflächenmoleküle zählt. Die meisten haematopoetischen Zellen exprimieren L-Selektin,

wobei alle Leukozyten L-Selektin exprimieren. L-Selektin fungiert als Zelladhäsionsmolekül und geht Verbindungen mit benachbarten Zellen ein, so zum Beispiel zwischen endothelialen und leukozytären Zellen. Endotheliale Zellen binden an Leukozyten, die L-Selektin auf ihrer Oberfläche exprimieren und ermöglichen so die Migration von T- und B- Zellen in die nicht arteriosklerotische und arteriosklerotische Aorta (Galkina et al. 2006).

## 1.5 CD64 ,Fc-Gamma Rezeptor 1 (FcγR1)

CD64 ist ein integrales Membranglykoprotein, bekannt als Fc-Gamma Rezeptor 1, welches Monomere IgG2a Typ Antikörper mit hoher Affinität bindet. Nach der Bindung von IgG, interagiert CD64 mit einer zusätzlichen  $\gamma$ -Kette, welche ein aktivierendes ImmunoreceptorTyrosine-BasedActivationMotiv (ITBAM) aufweist, das für das Triggern zellulärer Aktivität notwendig ist. IgG2a scheint außerdem die Komplementkaskade zu beeinflussen (Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2006). CD64 ist ein IFN $\gamma$ Gen, das vor allem auf Makrophagen und Monozyten zu finden ist und an Phagozytose und Antigenerfassung beteiligt ist (Marx et al. 2002).

Durch die Behandlung von polymorphnukleären Leukozyten mit Zytokinen wie IFN  $\gamma$  kann die Expression auf diesen Zellen ausgelöst werden (Perussia et al. 1983). Wobei Th1-Zytokine, so von Makrophagen im Prozess der Arteriosklerose exprimiert, einen Klassenswitch zu IgG2a, hingegen Th2-Zytokine einen Klassenswitch zu IgG1 induzieren (Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2006).

## 1.6 Rosiglitazon-Pharmakodynamik

Thiazolidindione (Glitazone: Rosiglitazon und Pioglitazon) sind Antidiabetika, die zur Therapie des DM Typ 2 in Deutschland eingesetzt werden. Glitazone erhöhen die Insulinsensitivität in peripheren Organen. Des Weiteren wirken sie auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel.

Thiazolidindione binden an Zellkernrezeptoren, an Peroxisomeproliferator-activatedreceptorgamma (PPAR $\gamma$ ) und heterodimerisieren anschließend mit dem Retinoid-X-Rezeptor. Dieser Komplex wirkt nach Bindung an die DNA als Transskriptionsfaktor, der bestimmte Zielgene reguliert. Ursprünglich war PPAR Gamma als ein Regulator der Genexpression im Lipidmetabolismus und in der Adipogenese identifiziert worden, doch jüngere Daten in Studien über Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen lassen darauf schließen, dass PPAR $\gamma$  antiinflammatorische Wirkungen in der Atherogenese hat (Marx, N. 2002a). Meisner et al fanden in einer Studie heraus, dass vier Wochen Rosiglitazongabe die vaskuläre Inflammation bei nichtdiabetischen Patienten sig-

nifikant reduziert, was zu einem stabileren Typ der Arteriosklerose führt (Meisner et al. 2006).

Rosiglitazon war in Deutschland seit 2000 zugelassen. Seit 2003 bestand die Zulassung zur Monotherapie bei Kontraindikationen und Unverträglichkeiten von Metformin. Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei 99%, die Eliminationshalbwertszeit beträgt 3-4 Stunden. 75% der Ausscheidung erfolgen renal, 25% über den Darm (Fürstenbusch et al. 2004), (Marx, N. 2002a), (Marx, N. 2002b).

## **1.7 Rosiglitazon- Nebenwirkungen**

Rosiglitazon und Pioglitazon sind im Unterschied zu Troglitazon, dem Glitazon der ersten Generation, nicht lebertoxisch. Die Leberfunktion muss im ersten Behandlungsjahr alle zwei Monate durch Transaminasenbestimmung kontrolliert werden, danach in größeren Abständen. Glitazone können außerdem zu Gewichtszunahme und in seltenen Fällen auch zu peripheren Ödemen und einer geringfügigen Absenkung des Hämoglobins führen. Hypoglykämien traten im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht häufiger auf (Fürstenbusch et al. 2004). Zum Zeitpunkt unserer Studie gab es noch keine Hinweise auf eine kardiovaskuläre Gefahr im Zusammenhang mit Rosiglitazon. Über eine Verschlechterung einer Herzinsuffizienz, insbesondere in Kombination mit Insulin wurde berichtet und deshalb 2008 in der EU eine Kontraindikation festgesetzt (Devchand PR 2008). Im November 2010 wurde Rosiglitazon nach der endgültigen Auswertung aller vorliegenden Studienergebnisse vom europäischen Markt genommen, alle klinischen Studien mit dem Wirkstoff Rosiglitazon wurden beendet. In den USA wurde die Anwendung sehr stark eingeschränkt und reglementiert. (Siehe Abschnitt Diskussion 4.4- Die kardiovaskuläre Gefahr von Rosiglitazon.)

## 1.8 Rosiglitazon – antiatherogene Wirkung

In den letzten Jahren wurde in vielen klinischen Studien neben den bekannten metabolischen Wirkungen schnelle lokale Wirkungen von Rosiglitazon auf die Gefäßwand nachgewiesen (Marx, N. 2002b).

Entzündung spielt inzwischen eine anerkannte Rolle im Prozess der Arteriosklerose und der Entstehung des akuten Koronarsyndroms. PPAR $\gamma$  wird in vielen vaskulären Zellen arteriosklerotischer Plaques exprimiert. PPAR $\gamma$ -aktivierende Glitazone inhibieren die Aktivierung von verschiedenen proinflammatorischen Genen und Mediatoren, die für die Plaqueentwicklung und -reifung verantwortlich sind. In Apo E-defizienten Mäusen wurde durch die Unterbrechung der TNF Alpha-Ausschüttung die Ausdehnung arteriosklerotischer Läsionen gemindert. In vitro Experimente haben gezeigt, dass PPAR Gamma Aktivatoren inflammatorische Proteine wie Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Chemokine in Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen hemmen können. Marx et al. untermauerten die Hypothese, dass T-Lymphozyten PPAR $\gamma$  exprimieren und die Stimulation dieser Zellen mit PPAR $\gamma$  die inflammatorische Zytokinproduktion hemmen (Marx et al. 2002) und somit das Rekrutieren von aktivierten T-Zellen auf die durch TH1 Mediatoren vermittelte Entzündungsseite abschwächen können (Marx et al. 2000).

Rezeptoragonisten wie Rosiglitazon und Pioglitazon sind derzeit zur Behandlung des DM Typ 2 erhältlich und viele Studien legen nahe, dass sie antiatherogene Effekte haben. Insulinresistenz ist mit Inflammation assoziiert und hat eine Schlüsselrolle in der Atherogenese. Rosiglitazon verbessert die Insulinresistenz, die einen Hauptanteil an der endothelialen Dysfunktion des DM Typ2 hat (Pistrosch et al. 2004). Hetzel et al. fanden einen direkten Effekt von Thiazolidindionebehandlung auf die endotheliale Funktion und die Biomarker der Arteriosklerose heraus. Dies unterstützt die These, dass Thiazolidindione, unabhängig von ihren metabolischen Wirkungen, protektiv auf die Blutgefäße wirken (Hetzel et al. 2005). Hafner et al. zeigten, dass die antiinflammatorischen Wirkungen auch bei insulinresistenten Probanden erzielt werden: Rosiglitazon reduzierte u.a. die E-Selectinspiegel, unabhängig von der Verbesserung der Insulinresistenz. Auf Grund dieser Er-

kenntnisse entstand die Idee, Insulinsensitizer auch bei anderen klinischen Indikationen einzusetzen (Fürstenbusch et al. 2004).

In den letzten Jahren fand man zunehmend Beweise dafür, dass die antiatherogenen Effekte der PPAR $\gamma$  Agonisten nicht auf Patienten mit DM Typ 2 beschränkt sind. Die In-vitro-Daten über Glitazone zeigen protektive Effekte in allen drei Phasen der Atherogenese. Glitazone hemmen die Monozyten- und T-Zellaktivierung und Leukozytenrekrutierung in die Gefäßwand, hemmen die Migration glatter Muskelzellen und somit die Bildung von Fatty-Streaks sowie die Stabilisierung arteriosklerotischer Plaques. Dies kann eine Plaqueruptur und so das Auftreten eines akuten Koronarsyndroms verhindern. Des Weiteren konnte in mehreren klinischen Studien eine Reduktion der Intima-Media-Dicke nachgewiesen werden (Fürstenbusch et al. 2004). PPAR $\gamma$  ist in arteriosklerotischen Plaques und Endothelzellen zu finden.

PPAR $\gamma$  inhibieren die Expression von VascularCellAdhesionMolecule1 (VCAM-1) und dem Intrazellular CellAdhesionMolecule1 (ICAM-1) in aktivierten Endothelzellen, die ebenfalls am frühen Prozess der Arteriosklerose bei der Leukzytenadhäsion beteiligt sind. Diese Effekte der PPAR $\gamma$  Agonisten entstehen aus der Insulinsensitivität und einer direkten Modulation der transskriptiven Aktivität in der Blutgefäßwand (Ríos-Vázquez et al. 2006). Die pharmakologische Aktivierung von PPAR $\gamma$ , welche in vitro in Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs) ausgebildet werden, hemmen die Proliferation und Migration dieser Zellen, wodurch potentielle Restenose und Arteriosklerose vermindert wird. So können Glitazone auch der Restenosierung nach Koronarinterventionen entgegenwirken. In vitro konnte auch gezeigt werden, dass die PPAR $\gamma$ -Rezeptoren während vaskulärer Verletzung überexprimiert sind (Law et al. 2000).

## 1.9 Fragestellung

In der vorliegenden Studie soll untersucht werden, ob der PPAR $\gamma$  Aktivator Rosiglitazon bei gesunden, männlichen Probanden ohne DM, unter einer Therapie-dauer von 21 Tagen und im Langzeitverlauf von 24 Wochen nach Absetzen des Medikamentes, zu einer prolongierten Suppression der inflammatorischen Arterio-sklerosemarker Fibrinogen, E-Selektin, L-Selektin und Fc-Gamma-Rezeptor-1 (CD64) führt.

Ausgang dieser Studie ist die Pilotstudie von Hetzel et al. Hier wurde in einer klei-neren Studie an gesunden, männlichen Probanden eine Suppression inflammato-rischer Serummarker, unter anderem von E-Selektin gezeigt. Es konnte sowohl eine Reduktion der Serumlevel von E-Selektin bereits nach einem Tag Rosiglita-zontherapie als auch während des gesamten siebentägigen Nachkontrollzeitrau-mes nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist der Ausgang für unsere Fra-gestellung, ob die inflammatorischen Arteriosklerosemarker während der Therapie und im Langzeitverlauf von 24 Wochen immer noch supprimiert sind.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Probanden**

Nach Vorlage der Genehmigung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission der Universität Ulm erfolgte ab dem 6. Oktober 2006 die Aufnahme von 41 Probanden im Alter von 20 bis 38 Jahren in die Studie. Der Termin mit dem letzten Probanden fand am 20. November 2007 statt. Die Probanden wurden aus dem Studentenkollektiv, wissenschaftlichen Mitarbeitern und Ärzten der Universität Ulm und umliegenden Fachhochschulen rekrutiert.

Einschlusskriterien:

- gesunde männliche Probanden zwischen dem 18. und 70. Lebensjahr

Ausschlusskriterien:

- weibliches Geschlecht
- Gesamtcholesterin LDL ( Cholesterin größer 160mg/dl)
- Diabetes Mellitus Typ 1 oder 2
- Arterielle Hypertonie (RR größer 140/90mmHg)
- Pathologische Glukosetoleranz
- Nikotinkonsum
- Lebererkrankung
- zum Untersuchungszeitpunkt bestehende Infektion
- Medikamenteneinnahme

## **2.2 Studienaufbau**

In die durchgeführte doppelblinde, placebokontrollierte Studie wurden 41 gesunde, männliche Probanden nach den vorliegenden Ein- und Ausschlusskriterien aufgenommen. Nach erfolgter Aufklärung und schriftlicher Einwilligung wurden die Probanden in eine Verum- und Placebogruppe randomisiert. Die Probanden nahmen täglich 2 x 4 mg Rosiglitazon bzw. Placebo über den Zeitraum von 21 Tagen ein. Die Verumgruppe bestand aus 21 Probanden und die Placebogruppe aus 19, wobei ein Proband dieser Gruppe wegen persönlicher Unzuverlässigkeit und Nichteinhalten von Terminen ausgeschlossen werden musste.

Vor Aufnahme in die Studie wurde ein Screening durchgeführt, bestehend aus Anamnese mit anschließender klinischer Untersuchung: Gewicht, Größe, BMI, RR und HF sowie Bestimmung von folgenden Laborparametern wie Nüchternblutzucker, LDL, HDL, Gesamtcholesterin, Na, K, Kreatinin, Gamma-GT, AST, ALT, Blutbild. Es wurde ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt (Nüchterneinnahme von 75 mg Glukose und Kontrolle des Blutzuckers nach zwei Stunden). Nach dem Screening erfolgten 18 Blutentnahmen (Tag 1,2,3,7,14,21 der Rosiglitazoneinnahme, an Tag 1,2,3,7,14,21,28, in Woche 8, 12, 16, 20, 24 des Absetzens). Bei jedem Visit wurde eine Anamnese erhoben und die Laborparameter bestimmt. An Tag 1, 7, 14 und 21 der Rosiglitazontherapie sowie beim letzten Visit, 24 Wochen nach Absetzen, fand sowohl eine Laborkontrolle durch das Labor der klinischen Chemie der Universität Ulm als auch eine klinische Untersuchung statt. Die Blutentnahmen erfolgten jeweils morgens nach achtstündigem Fasten.

## **2.3 Methode**

Den Probanden wurde Blut in jeweils einer 7,5 ml Lithium- Heparin- Monovette, einer 5 ml Citrat- Monovette, einer 2,7 ml und 9 ml EDTA- Monovette sowie einer 9 ml Serum- Monovette abgenommen. Das Serum wurde nach 30 Minuten Ruhezeit mittels einer Tischzentrifuge bei 3500 Umdrehungen/min 10 Minuten zentrifugiert, Lithium-Heparin, Citrat und EDTA wurde ohne vorherige Ruhezeit bei 3000 Umdrehun-

gen/min ebenfalls 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in Aliquots abpipetiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C tiefgefroren.

Der Effekt auf die Entzündungsprozesse und die metabolischen Veränderungen wurde anhand folgender Laborparameter untersucht:

Inflammatorische Parameter:

- Fibrinogen
- E-Selectin
- L-Selektin (CD 62 L)
- Fc-Gamma Rezeptor 1 (CD 64)

Die metabolischen Laborparameter wurden mit standardisierten Messmethoden bestimmt, die als bekannt vorausgesetzt werden. Die inflammatorischen Marker werden wie folgt bestimmt.

### **2.3.1 Bestimmung der E-Selektin Konzentration mittels ELISA**

In die Wells, die mit einem monoklonalen Anti- E-Selektin Antikörper beschichtet sind, werden 100 µl Konjugat hinzugefügt, um eine bessere Bindung zwischen Antikörper und Serum zu erreichen. Anschließend werden 100 µl Standard (definierte Menge humanes E- Selektin) oder 100 µl Probe (Serum) hinzugegeben. Dabei bilden sich zwischen dem E-Selektin aus dem Serum, dem monoklonalen E-Selektin-Antikörper und dem im Konjugat vorhandenen enzymmarkierten, monoklonalen Zweitantikörper Immunkomplexe. Die Platten werden eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Hilfe einer 8-Kanal Multipipette sechsmal gewaschen, um ungebundene Antigene zu entfernen.

In einem nächsten Schritt werden 100 µl/well Substratlösung hinzugefügt, welche an die Immunkomplexe binden (sog. Sandwichmethode). Dieses wird dann eine weitere halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch proportional zur Menge des gebundenen E-Selektins ein Farbumschlag stattfindet. Schwefelsäure beendet diese Reaktion, und die entstehende Lichtabsorption kann in einem computergestützten ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen werden.

Für alle Messungen werden Standardreferenzreihen hergestellt. Als Verdünnungsmedium dient mitgeliefertes Reagenzverdünnungsmittel.

### **2.3.2 Bestimmung der L- Selektin (CD 62) und Fc-Gamma Rezeptor 1 (CD 64) Konzentration mittels FACS**

Die FACS- Analyse (= FluorescenceActivatedCell Sorter) lässt einzelne Zellen in einem Hüllstrom eine Lichtquelle passieren. Man verwendet heute einen Laser mit definierter Wellenlänge als Lichtquelle. Durch die Gabe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern können Zellen, die ein bestimmtes Antigen exprimieren, identifiziert werden. Die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden durch die Anregung des Lasers auf ein höheres Energieniveau gehoben, bei ihrer Rückkehr in das Ursprungsniveau wird Licht einer anderen Wellenlänge emittiert, das dann von Photokollektoren aufgefangen werden kann. Durch die Menge des gestreuten Lichts kann die Größe und Form der Zellen bestimmt werden. So streuen Granulozyten, die eine raue Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel haben, deutlich mehr Licht als die sehr glatten T-Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = SidewardsScatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Diese Daten werden mittels eines Computers ausgewertet und so verschiedene Zellpopulationen dargestellt und u. a. Moleküle auf Zellen nachgewiesen. Zellen, die ein Signal erzeugen, weisen also das gesuchte Antigen auf und werden als „positiv“ bezeichnet. Zum einen wird der Anteil zytokinpositiver Monozyten in %, zum anderen die mittlere Fluoreszenzintensität „mean“ ermittelt. Die Bestimmung der CD62L\_CD45 und CD62L\_CD14 Konzentration mittels FACS- Messung beschreibe ich beispielhaft für CD64L\_CD45 und CD64L\_CD14. Durchführung:

Zu 50 µl Vollblut aus dem Li- Heparin Röhrchen wird jeweils 10µl des entsprechenden Antikörpers hinzugegeben. Zu CD 64L wird jeweils 10µl CD 64 Antikörper und 10µl CD45 zur Messung der Leukozyten hinzugegeben. Zur Messung der Monozyten wird dementsprechend zu CD 64L jeweils 10µl CD64 Antikörper und 10µl CD14 hin-

zugegeben. Die Zellen werden kurz vorgetext (um diese wieder in Suspension zu bringen) und danach 30 Minuten bei Raumtemperatur dunkel gestellt.

Nach der Ruhezeit werden 500 µl Lysepuffer dazugegeben (FACS-Lösung), um die Erythrozyten zu lysieren. Nach kurzem Vortexen folgt eine weitere Dunkelzeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Die lysierten Erythrozyten werden anschließend durch einmaliges Zugeben von 2ml PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) pro Röhrchen ausgewaschen.

Die Zellen werden durch Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wird mit der Wasserstrahlpumpe bis knapp über dem Pellet abgesaugt.

Danach wird zur Fixierung zu jedem Röhrchen 100 µl 1% Formalinlösung hinzugegeben und mit der Pipette mehrmals resuspendiert.

Für die Analysen wurde die mittlere Fluoreszenz der verschiedenen Ansätze ermittelt.

### **2.3.3 Ermittlung der Fibrinogenkonzentration mittels Nephelometrie**

Die Bestimmung von Fibrinogen erfolgte mit Hilfe der partikelverstärkenden Immun-Nephelometrie des Behring-Nephelometer-Systems. Bei dieser Messmethode bilden die zu messenden Proteine mit spezifischen Antikörpern Immunkomplexe, die einstrahltes Licht streuen. Ein Nephelometer misst dann die Konzentration des zu messenden Proteins durch das abgestrahlte Streulicht. Die gemessene Konzentration wird dann mit dem vorgegebenen Standard verglichen.

## 2.4 Statistische Auswertung

Die Auswertungen wurden mit SAS (Statistical Analysis System) Vs. 9.1 durchgeführt. Lag eine Normalverteilung vor, so wurde der Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung ausgerechnet, wobei keine der Zielgrößen normalverteilt war. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurde der Median mit einem Interquantilbereich (25. und 75. Perzentile) angegeben. Als signifikant wurde ein P-Wert  $<0,05$  betrachtet. Die Zielvariablen hatten Missings. Bei den statistischen Testverfahren innerhalb der Gruppen wurde der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest und im Vergleich zwischen den Gruppen der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Studienpopulation**

In die vorliegende klinische Studie wurden 41 gesunde, männliche Nichtraucher unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien aufgenommen.

Die Probanden waren im Alter von 21 bis 38 Jahren.

In Placebo- und Verumgruppe erfolgte eine randomisierte Zuteilung, wodurch sich Teilnehmer der beiden Gruppen nicht signifikant unterschieden.

**Tabelle1: Basismerkmale und Parameter der Studienpopulation**

<b>Merkmale/ Serummarker</b>	<b>Placebo</b>	<b>Rosiglitazon</b>	<b>P</b>
Patientenzahl, n	19	22	
Alter, (Jahre)	25,4 (20; 34)	26,4 (21; 38)	< 0,05
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	23,182 (21,921; 24,652)	22,46 (21,514; 25,796)	0,9376
OGTT-0h (mg/dl) nüchtern	84 (77; 88)	80 (77; 87)	0,6659
Glukose (mg/dl)	89 (86; 94)	92 (87; 99,5)	0,2162
HbA1c (%)	5,1 (5; 5,2)	4,95 (4,75; 5,3)	0,5429
Cholesterin (mmol/l)	5,05 (4,15; 5,45)	4,9 (4,3; 5,2)	0,8343
LDL (mmol/l)	3,1 (2,6; 3,75)	3,1 (2,7; 3,5)	0,7437
HDL (mmol/l)	1,3 (1; 1,4)	1,2 (1,1; 1,4)	0,6625
Triglyzeride (mmol/l)	0,9 (0,6; 1,25)	1 (0,6; 1,2)	0,7140
Blutdruck: Systole (mm Hg)	120 (120; 130)	122,5 (120; 130)	0,6654
Blutdruck: Diastole (mm Hg)	80 (75; 80)	80 (70; 80)	0,3166

Tabelle1: Übersicht über die Basismerkmale der Studienpopulation, im Vergleich zwischen der Verum- und Placebogruppe. Die Daten werden als n=Anzahl, Mittelwerte +-Standardabweichung oder Median (Q1/Q3) angegeben.

## 3.2 Effekt auf die inflammatorischen Serummarker

### 3.2.1 Effekt von Rosiglitazon auf das Fibrinogen

Unter der Therapie mit Rosiglitazon zeigt sich eine signifikante Reduktion der Fibrinogenserumkonzentration auf 2,56 mg/l ((2,2 (LowerQuartile) zu 2,83 (UpperQuartile)), verglichen mit dem Ausgangswert von 2,73 mg/l (2,41 zu 3,04). Der p-Wert liegt bei 0,03. Nach Absetzen des Medikamentes zeigt sich ein weiterhin erniedrigter Spiegel des Serummarkers, der bis zur achten Woche nach Absetzen des Medikamentes bestehen bleibt. Im Anschluss stieg der Spiegel wieder auf das Ausgangsniveau an.

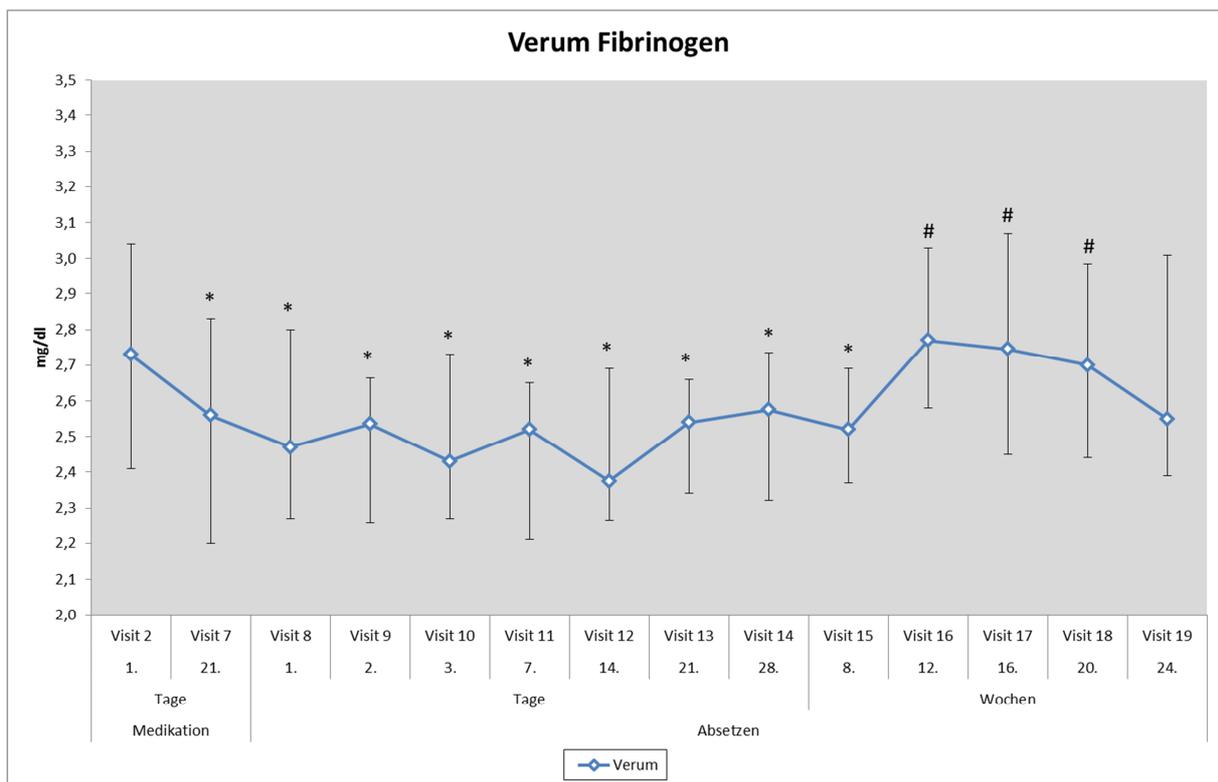


Abb. 1: Fibrinogen unter der Verabreichung von 21 Tagen Rosiglitazon und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median und den Interquartilbereich zwischen der 25. und 75. Perzentile. \*p 0,05 im Vergleich zum Ausgangswert. #p 0,05 im Vergleich zum letzten Tag der Therapie.

Innerhalb der Placebogruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied nach dreiwöchiger Placebothherapie, verglichen zum ersten Tag der Einnahme. Es ergibt sich ein statistisch signifikanter Wert am dritten Tag 2,71 mg/l (2,25 zu 2,925) und zwölf Wochen 2,94 mg/l (2,64 zu 3,14) nach Absetzen im Vergleich zum Ausgangswert 2,7 (2,53 zu 3,06), ( $p < 0,05$ ).

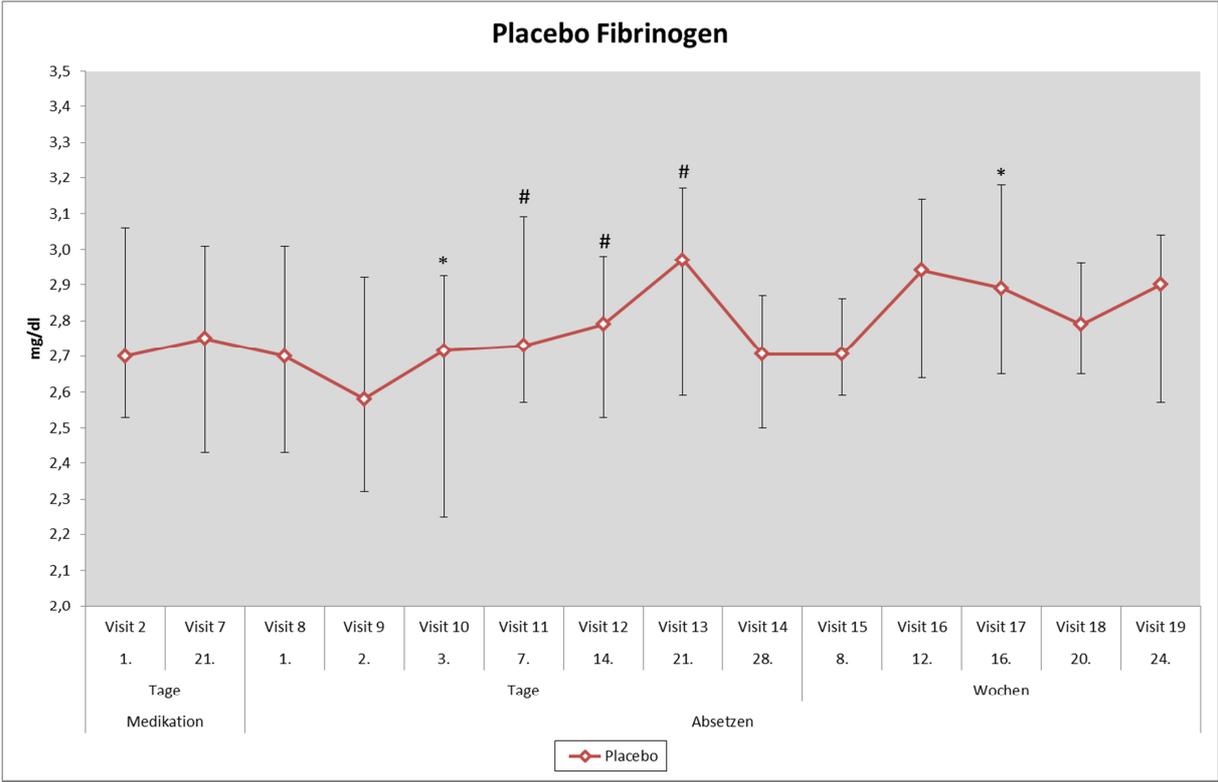


Abb. 2: Fibrinogen unter der Verabreichung von 21 Tagen Placebo und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median und den Interquartilbereich zwischen der 25. und 75. Perzentile. \* $p < 0,05$  im Vergleich zum Ausgangswert. # $p < 0,05$  im Vergleich zum letzten Tag der Placebothherapie.

Auch ergab sich ein signifikanter Unterschied nach drei Wochen Therapiedauer und nach dreiwöchigem Absetzen des Therapeutikums zwischen der Rosiglitazongruppe und der Placebogruppe.

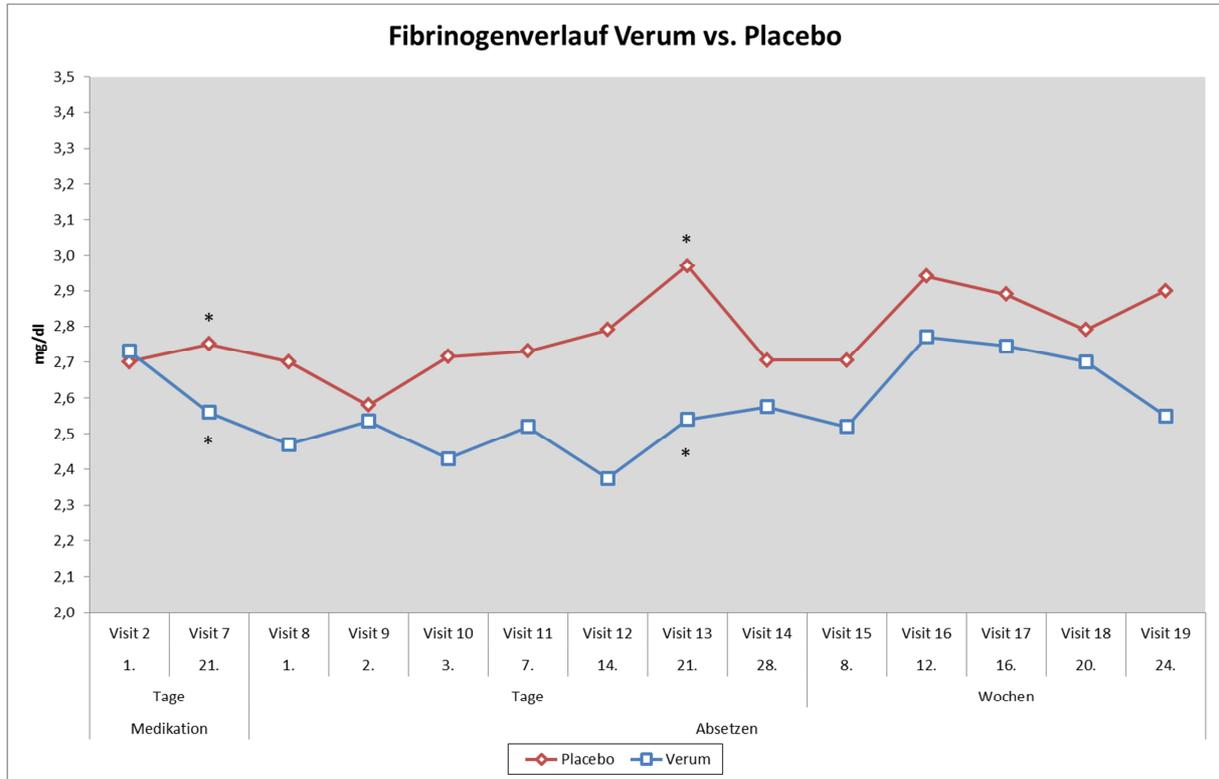


Abb. 3: Fibrinogen unter der Verabreichung von 21 Tagen Rosiglitazon und Placebo und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median und den Interquartilbereich zwischen der 25. und 75. Perzentile. Die obere Kurve zeigt den Placeboverlauf, die untere den Verumverlauf. \* p 0,05 zwischen den Gruppen.

### 3.2.1 Effekt von Rosiglitazon auf das E-Selektin

Es entstand keine signifikante Änderung während der gesamten Studiendauer in der Verumgruppe.

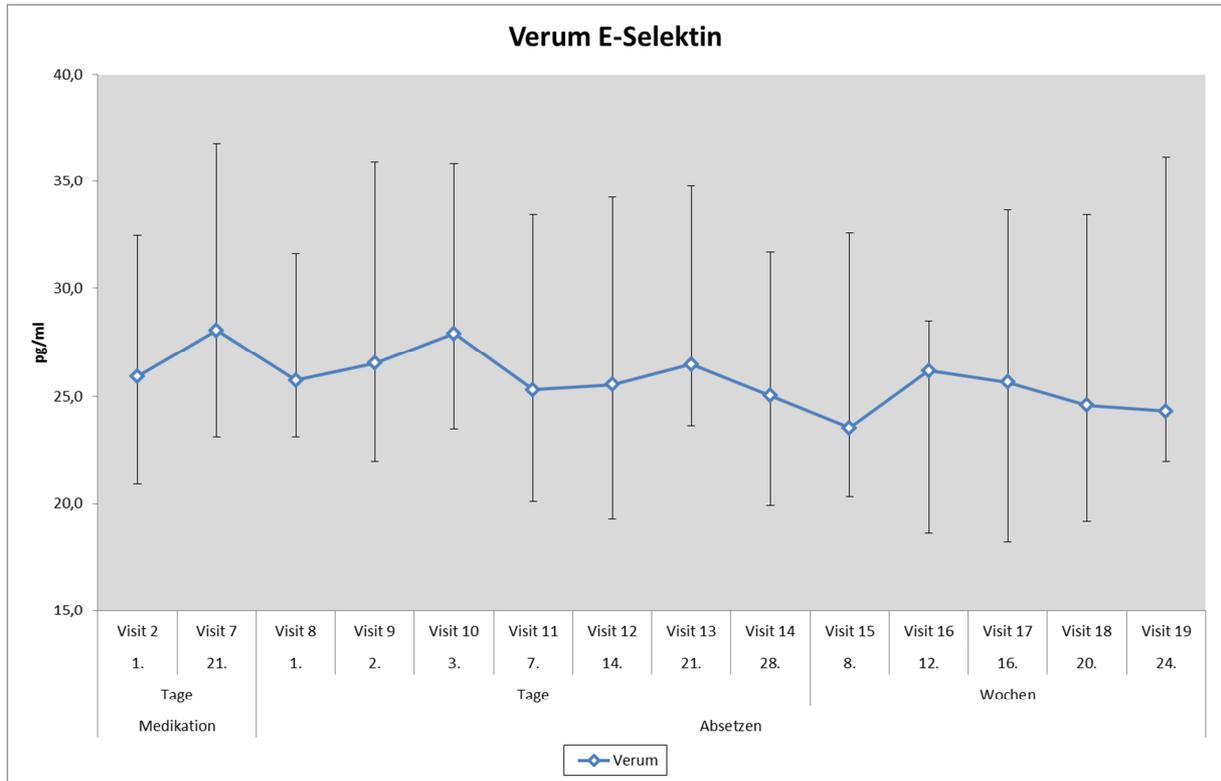


Abb. 4: E-Selektin unter der Verabreichung von 21 Tagen Rosiglitazon und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median und den Interquartilbereich zwischen der 25. und 75. Perzentile.

In der Placebogruppe zeigte sich an Tag 2 nach Absetzen eine signifikante Reduktion der E-Selektin Serummarker 20,49pg/ml (16,79 zu 27,06) im Vergleich zum Ausgangswert 21,86pg/ml (19,52 zu 33,00), ( $p < 0,05$ ) und verglichen mit dem letzten Tag der Placeboeinnahme 21,35 pg/ml (16,79 zu 31,69), ( $p < 0,05$ ). Eine Reduktion der E-Selektin Serummarker zeigte sich auch an Tag 3: 19,37 pg/ml (16,745 zu 28,12) und auch noch nach einer Woche 21,01pg/ml (17,31 zu 33,76) nach Absetzen des Placebos, verglichen zum Ausgangswert ( $p < 0,05$ ).

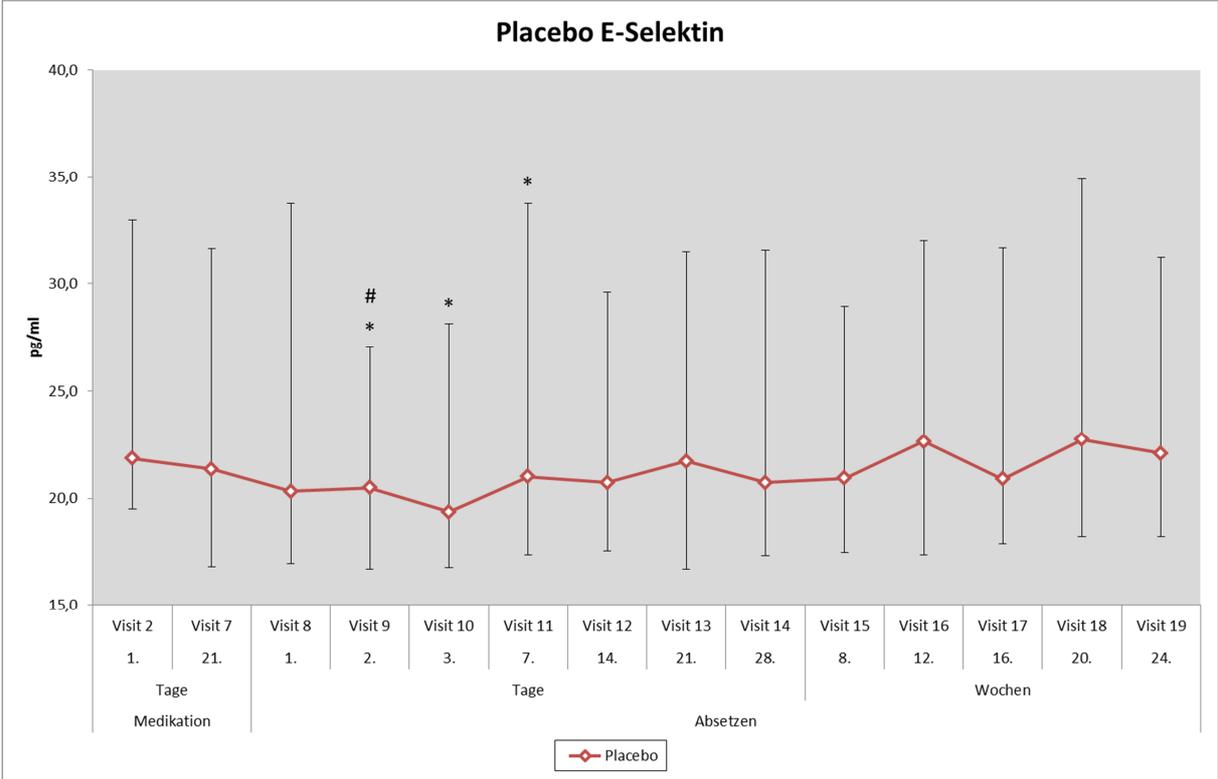


Abb. 5: E-Selektin unter der Verabreichung von 21 Tagen Placebo und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median und den Interquartilbereich zwischen der 25. und 75. Perzentile. \* $p < 0,05$  im Vergleich zum Ausgangswert. # $p < 0,05$  im Vergleich zum letzten Tag der Placebothherapie.

Im Vergleich zwischen den Gruppen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

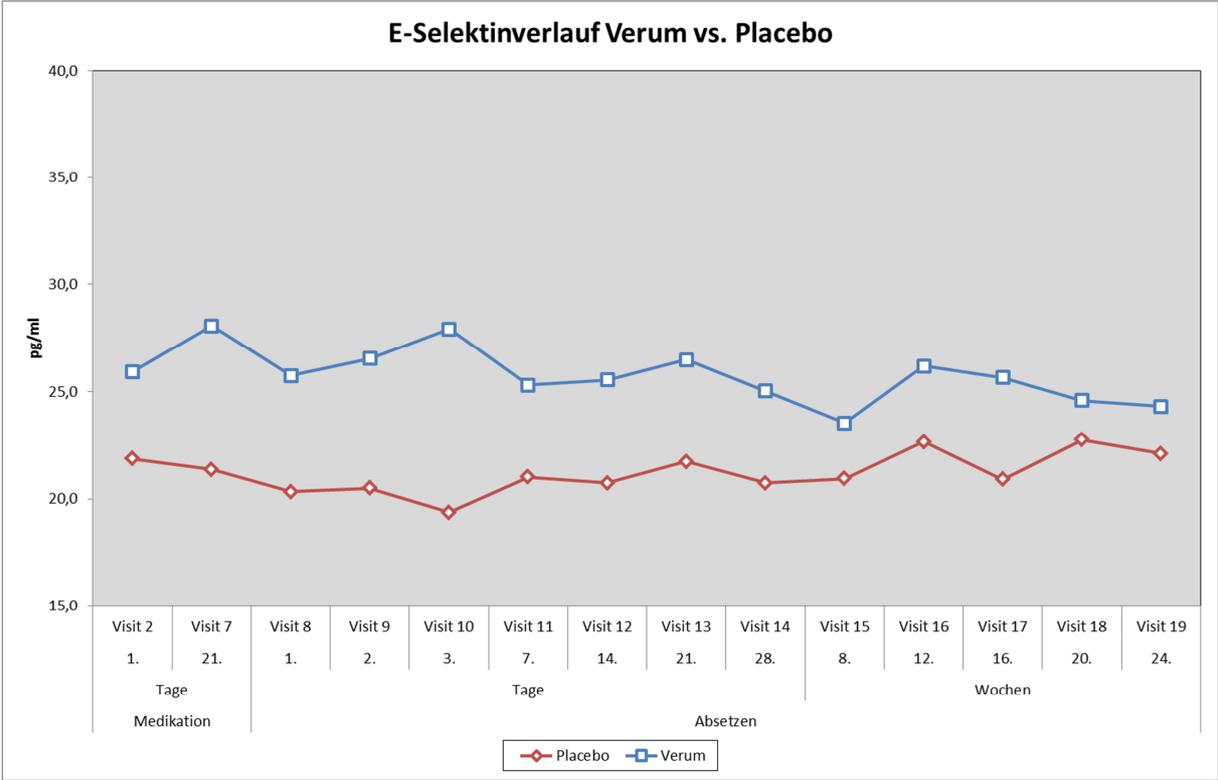


Abb. 6: E-Selektin unter der Verabreichung von 21 Tagen Rosiglitazon und Placebo und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median. Die obere Kurve zeigt den Verumverlauf, die untere den Placeboverlauf.

### 3.2.3 Effekt von Rosiglitazon auf die monozytäre Expression von L-Selektin (CD62)

Unter der gesamten Studiendauer kam es zu keiner signifikanten Reduktion von CD62. 16 Wochen nach Absetzen des Therapeutikums kam es zu einer signifikanten Steigerung von CD62, verglichen mit dem letzten Tag der Medikamenteneinnahme, bis zum Ende der Studienzeit in Woche 24 bis maximal 31.48 mg/l (26.56 zu 37.39), ( $p < 0,05$ ).

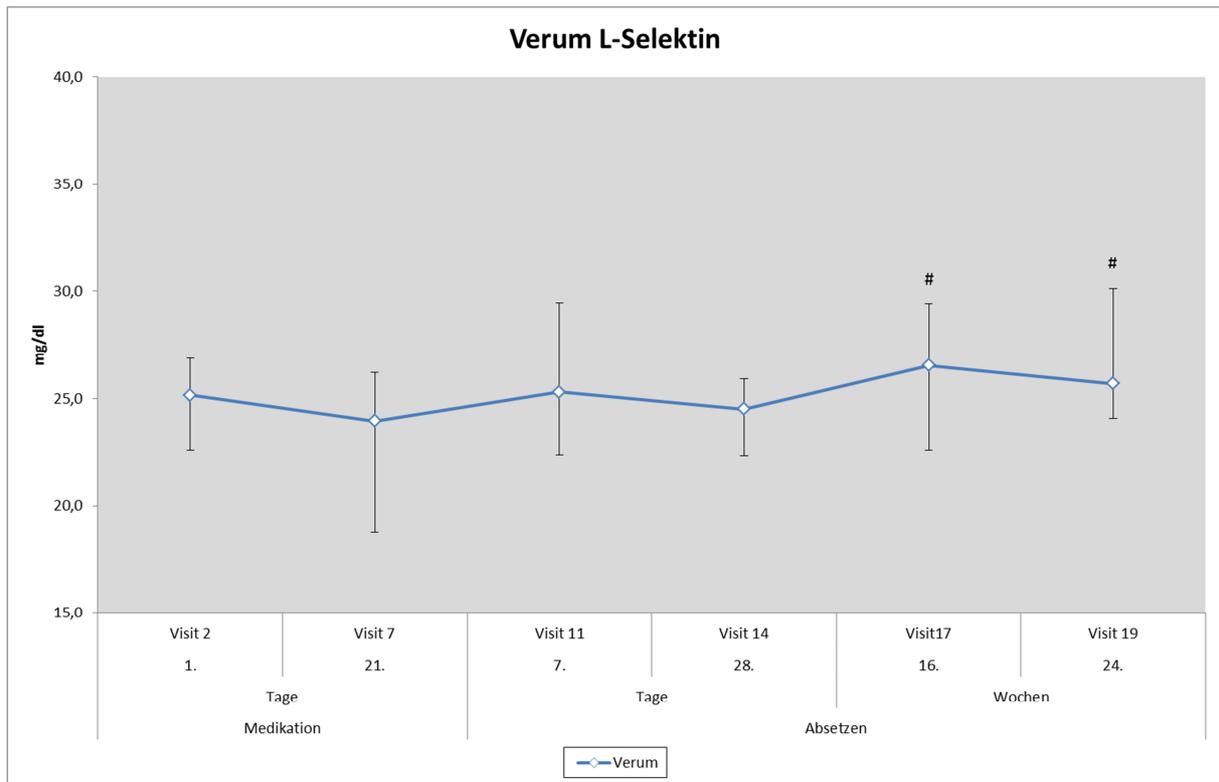


Abb. 7: L-Selektin unter der Verabreichung von 21 Tagen Rosiglitazon und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median und den Interquartilbereich zwischen der 25. und 75. Perzentile. # $p < 0,05$  im Vergleich zum letzten Tag der Therapie.

In der Placebogruppe zeigte sich an Tag 28 nach Absetzen des Therapeutikums eine signifikante Erhöhung: 29,7 mg/l im Vergleich zu dem letzten Tag der Placeboeinnahme: 26,03 mg/l, ( $p < 0,05$ ).

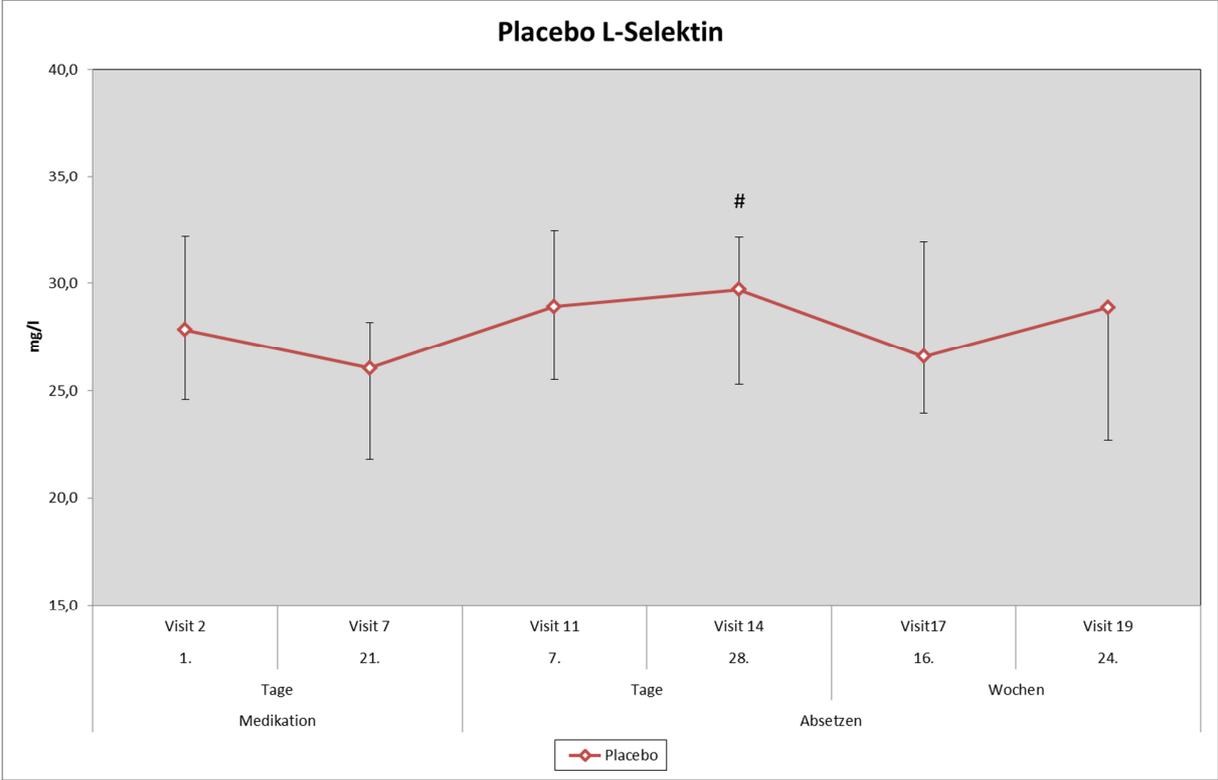


Abb. 8: L-Selektin unter der Verabreichung von 21 Tagen Placebo und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median und den Interquartilbereich zwischen der 25. und 75. Perzentile. #p 0,05 im Vergleich zum letzten Tag der Placebothherapie.

Im Vergleich zwischen den beiden Gruppen zeigte sich an Tag 28 nach Absetzen des Therapeutikums ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ), Verum 28,82 mg/l im Vergleich zu Placebo 36,93 mg/l.

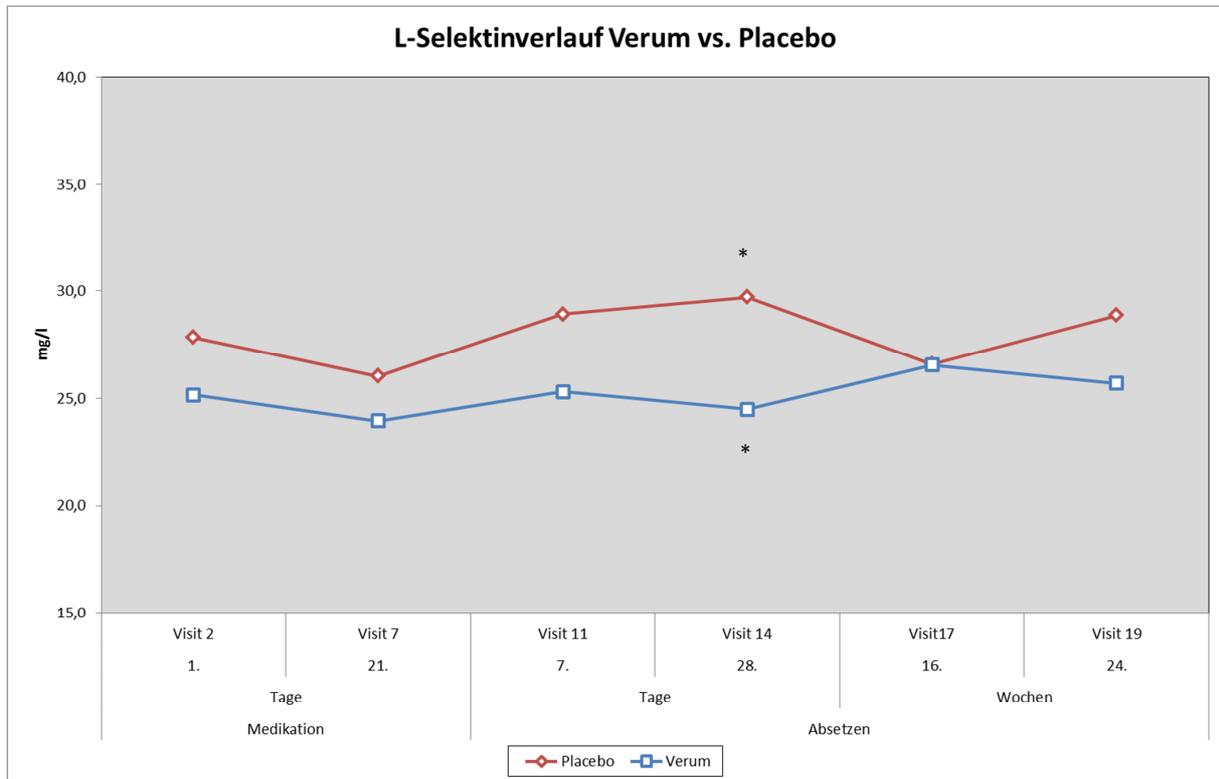


Abb. 9: L-Selektin unter der Verabreichung von 21 Tagen Rosiglitazon und Placebo und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median. Die obere Kurve zeigt den Placeboverlauf, die untere den Verumverlauf. \*  $p < 0,05$  zwischen den Gruppen.

### 3.2.4 Effekt von Rosiglitazon auf Fc-Gamma Rezeptor 1 Expression (CD 64 )

Hier zeigte sich am letzten Tag der Therapie mit Rosiglitazon eine mittlere Fluoreszenz von 15,35 (14,63 zu 18,73) und in Woche 16 nach Absetzen eine mittlere Fluoreszenz von 15,99 (15,165 zu 18,63). Im Vergleich zum Ausgangswert mit einer mittleren Fluoreszenz von 14,21 (12,51 zu 16,46) zeigten die beiden Werte eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ).

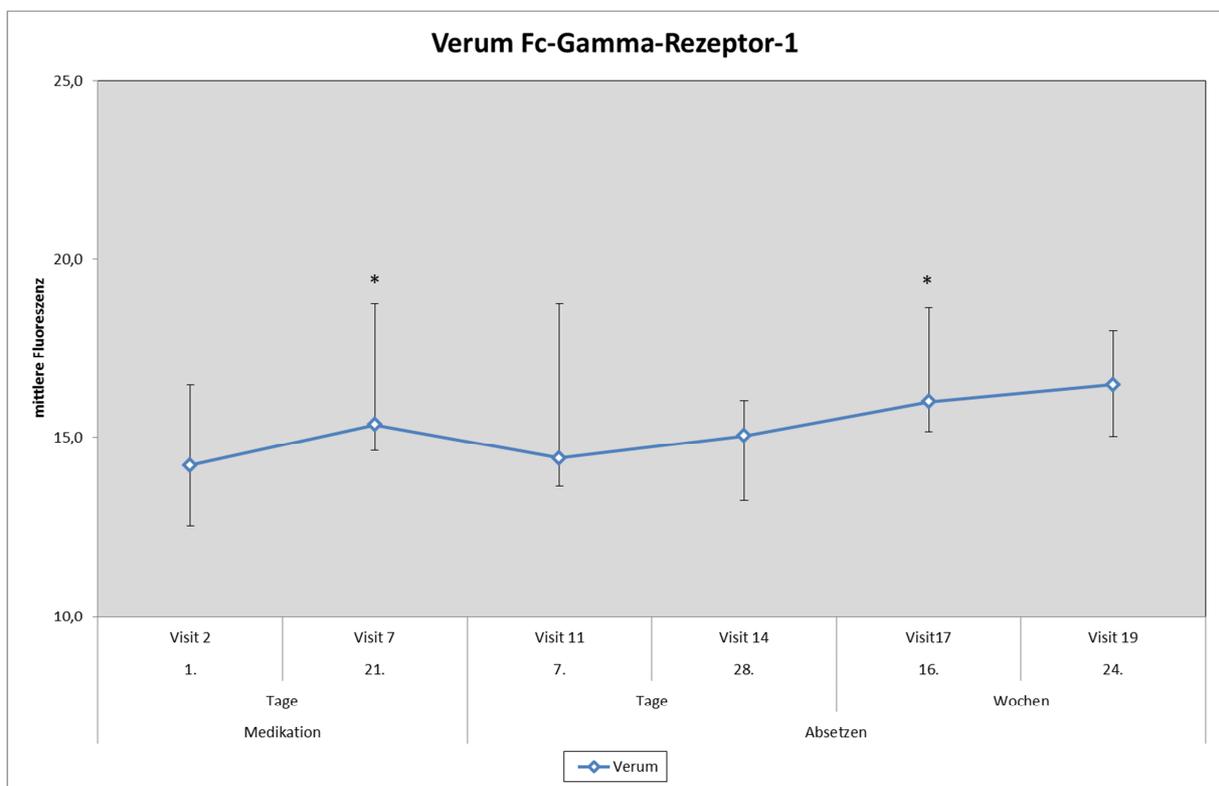


Abb. 10: Fc-Gamma-Rezeptor-1 unter der Verabreichung von 21 Tagen Rosiglitazon und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median und den Interquartilbereich zwischen der 25. und 75. Perzentile. \* $p < 0,05$  im Vergleich zum Ausgangswert.

In der Placebogruppe ist ab der 16. Woche nach Absetzen der Tabletten eine mittlere Fluoreszenz von 17,08 (15,34 zu 18,49) zu verzeichnen. Bis zum Ende der Studienzeit in Woche 24 ist bei einer mittleren Fluoreszenz von 15,53 (14,45 zu 16,33) eine signifikante Erhöhung nachzuweisen; im Vergleich zum letzten Einnahmetag mit einer mittleren Fluoreszenz von 14,21 (12,51 zu 16,46), ( $p < 0,05$ ).

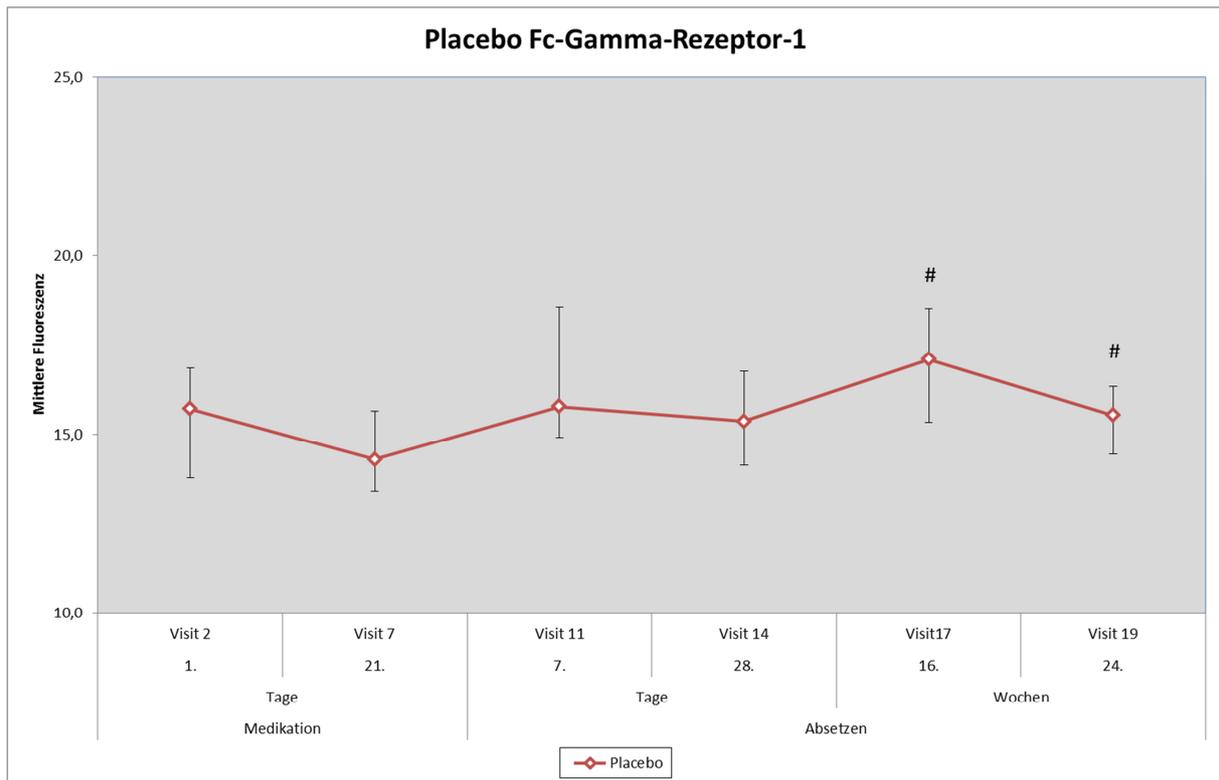


Abb. 11: Fc-Gamma-Rezeptor-1 unter der Verabreichung von 21 Tagen Placebo und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median und den Interquartilbereich zwischen der 25. und 75. Perzentile. #p 0,05 im Vergleich zum letzten Tag der Therapie.

Im Vergleich Verum zu Placebo zeigte sich am Ende der Studienzeit in Woche 24 ein signifikanter Unterschied.

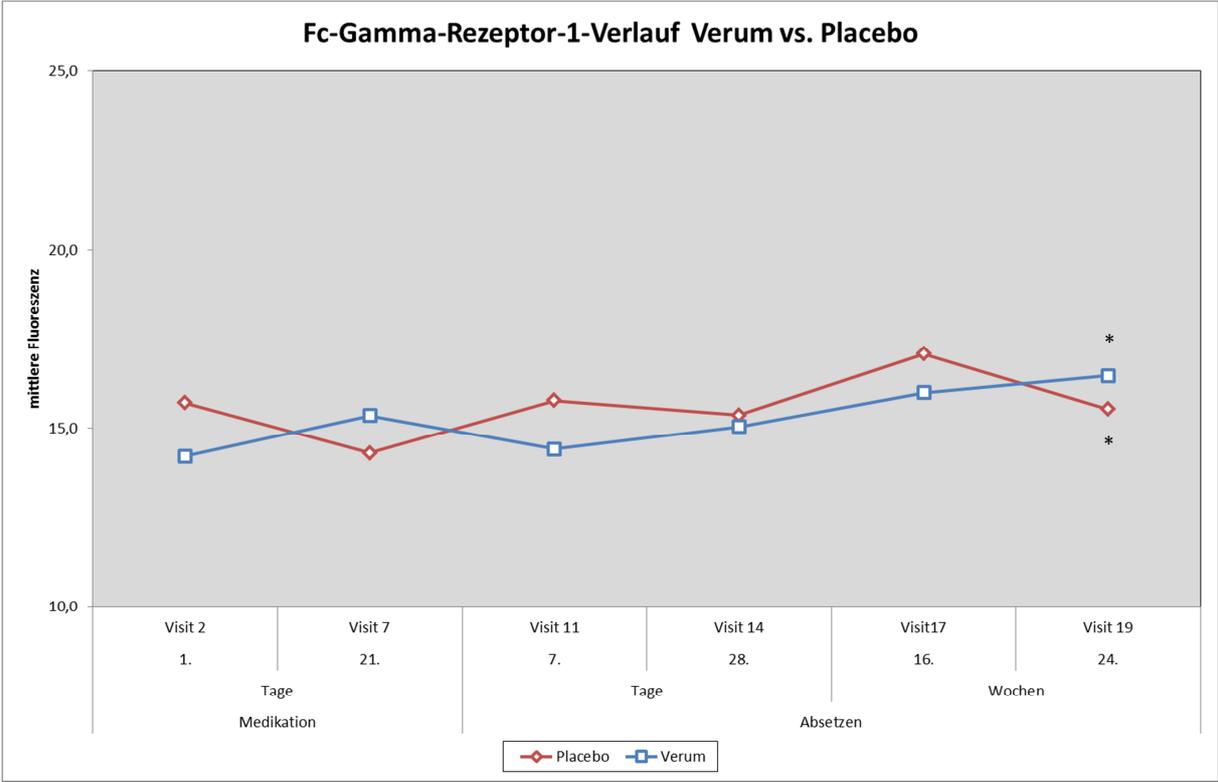


Abb. 12: Fc-Gamma-Rezeptor-1 unter der Verabreichung von 21 Tagen Rosiglitazon und Placebo und bis zu 24 Wochen nach Therapie. Die Ergebnisse zeigen den Median. Die obere Kurve zeigt den Placeboverlauf, die untere den Verumverlauf. \* p 0,05 zwischen den Gruppen.

## **4. Diskussion**

Arteriosklerose ist ein multifaktorieller Prozess, wobei die Entzündung und die Prozesse, die diese hervorrufen, in den letzten Jahren ein wichtiger Bestand der Forschung geworden sind.

Unsere Studie orientiert sich an einer vorherigen Pilotuntersuchung von Hetzel et al., welche den Einfluss von Rosiglitazon auf die endotheliale Funktion und Serumparameter untersuchte. In dieser trat bereits 24 Stunden nach Einnahme von Rosiglitazon eine signifikante Reduktion der endothelabhängigen Vasodilatation und inflammatorischen Arteriosklerosemarker CRP, Serumamyloid A und E-Selektin ein. Die Suppression der Serumlevel war noch 7 Tage nach Absetzen von Rosiglitazon nachweisbar. Diese Effekte traten, im Gegensatz zu älteren Studien, unabhängig vom Einfluss auf den Glukosemetabolismus auf (Hetzel et al. 2005). Die jetzige Untersuchung machte eine höhere Fallzahl erforderlich, da mit einer größeren Streuung gerechnet wurde, außerdem statistisch signifikante Ergebnisse erreicht sowie die Ergebnisse placebokontrolliert werden sollten.

In dieser Studie wurden die inflammatorischen Biomarker Fibrinogen, E-Selektin, L-Selektin und Fc-Gamma-Rezeptor-1 untersucht.

Schließlich konnte allein für das Fibrinogen in Bezug auf den gemessenen Ausgangswert eine signifikante Reduktion während der Therapie und im Verlauf von 8 Wochen nach Therapieende nachgewiesen werden. Für die anderen gemessenen Marker: E-Selektin, L-Selektin und Fc-Gamma-Rezeptor-1 konnte keine statistisch signifikante Reduktion nachgewiesen werden.

E-Selektin ist ein Marker der Frühphase arteriosklerotischer Prozesse. Junge Patienten mit arteriosklerotischen Risikofaktoren haben bereits erhöhte E-Selektinlevel, daher kann E-Selektin als Marker der frühen arteriosklerotischen Phase angesehen werden (Głowińska et al. 2004). E-Selektin und andere etablierte Marker wie das Akute-Phase-Protein Fibrinogen gelten bei einem erhöhten Plasmaspiegel als Zeichen eines erhöhten kardiovaskulären Risikos (Jaber et al. 2002). Eine Langzeiterhöhung der Plasmafibrinogenwerte über 1g/l ist eng verbunden mit einem fast doppelt so hohen Risiko des Auftretens kardiovaskulärer Erkrankungen, wie der koronaren Herzerkrankung und Schlaganfall, wie von der Fibrinogen Studies Collobaration berichtet (Kaptoge et al. 2007), (Ernst, Resch 1993).

E-Selektin, Fibrinogen, L-Selektin und auch Fc-Gamma Rezeptor 1 (FcγRI) können einen Hinweis auf das spätere arteriosklerotische Geschehen und damit Möglichkeiten der Prävention und Früherkennung von Arteriosklerose und Diabetes geben. Patienten, die an einem DM Typ 2 leiden, haben ein deutlich erhöhtes Risiko für das Auftreten makrovaskulärer, arteriosklerotischer Gefäßveränderungen und darauf folgenden Komplikationen wie akuten MI, instabiler Angina Pectoris oder Schlaganfall. Dieses Risiko konnte durch die bisher verfügbaren Antidiabetika nur sehr bedingt reduziert werden (UKPDS Group 1998).

In unserer und auch in anderen Studien mit Rosiglitazon konnte eine statistisch signifikante Senkung des Fibrinogenspiegels gezeigt werden, der bei einer Erhöhung nachgewiesenermaßen zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko führt.

E-Selektin ist ein etablierter Endothelmarker. Erhöhte E-Selektin Serumlevel kommen unter anderem bei einer Erkrankung der Koronararterien vor und begünstigen das Auftreten von DM Typ 2. Rosiglitazon wirkt zum einen auf das Endothel und auf die E-Selektin-Serumlevel und lässt laut Hetzel et al. auf einen direkten Effekt von Rosiglitazon auf das Endothel schließen (Hetzel et al. 2005).

#### **4.1 Rosiglitazon senkt die Fibrinogenkonzentration**

In unserer Studie konnte eine statistisch signifikante Reduktion der Fibrinogenkonzentration ab dem dritten Tag der Rosiglitazontherapie im Vergleich zum Ausgangswert gezeigt werden. Diese statistisch signifikante Suppression ist bis acht Wochen nach Absetzen von Rosiglitazon nachzuweisen. Die schnelle Reduktion der Fibrinogenkonzentration bestätigt die Ergebnisse vorangegangener Studien, die neben den erst nach sechs Wochen eintretenden metabolischen Effekten, einen sehr viel früher einsetzenden antiinflammatorischen Effekt zeigt. Fibrinogen war im Vergleich Verum: Placebo am Ende der Therapie und acht Wochen nach Therapieende signifikant supprimiert. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten von Hetzel et al., dass TZDs einen antiinflammatorischen Effekt, unabhängig von ihrem metabolischen Effekt haben. Dafür spricht, dass diese Studie nur gesunde Nichtdiabetiker sowie Probanden ohne gestörte Glukosetoleranz aufgenommen hat. Es waren keine Änderungen der

Blutglukose oder des Insulinspiegels festzustellen. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, dass eine Kurzzeitrosiglitazonebehandlung keinen Effekt auf den Glukosemetabolismus hat (Hetzl et al. 2005).

## **4.2 Rosiglitazon hat keinen signifikanten Effekt auf das E-Selektin**

Im Gegensatz zu der Studie von Hetzel et al. zeigte sich kein signifikanter Effekt auf das E-Selektin, obwohl in unserer Studie mit einer größeren Fallzahl und mit der gleichen Labormethode gearbeitet wurde. Möglicherweise hat aber die größere Fallzahl eine größere Streuung verursacht. Die Ergebnisse können auch durch ein schon vorher geringeres Level an inflammatorischen Markern bei gesunden Probanden verursacht worden sein. Trotz der größeren Fallzahl als in der Studie von Hetzel et al. können hier zu wenige Probanden eingeschlossen worden sein, um die starken Schwankungen in den Ergebnissen auszugleichen.

In einer Langzeitbetreuung kann die regelmäßige Einnahme des Therapeutikums bei den Probanden nicht sicher kontrolliert werden. Auch die Einnahme anderer Medikamente mit antiinflammatorischer Wirkung kann in der hier durchgeführten Studie nicht sicher ausgeschlossen werden. So kann möglicherweise die Durchführung der Studie die Ausreißer und die breite Streuung in der Messung erklären.

## **4.3 Rosiglitazon hat keinen signifikanten Effekt auf die monozytäre L-Selektin und Fc-Gamma Rezeptor 1 Expression (FcγRI)**

Auch diese Ergebnisse haben keine signifikante Änderung ergeben. In der Zusammenschau der Ergebnisse hatte Rosiglitazon keinen Effekt auf L-Selektin und Fc-Gamma Rezeptor 1 (FcγRI).

#### **4.4 Die kardiovaskuläre Sicherheit von Rosiglitazon**

In letzter Zeit wurde die kardiovaskuläre Sicherheit von Rosiglitazon intensiv diskutiert. Zum Zeitpunkt der Durchführung unserer Studie gab es keine Hinweise auf ein kardiovaskuläres Risiko, verursacht durch Rosiglitazon. Ausgang dieser Diskussionen war eine Metaanalyse von Nissen und Wolski, die den Verdacht aufkommen ließ, dass Rosiglitazon zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko führte. Die Metaanalyse kam zu dem Ergebnis, dass Patienten, die mit Rosiglitazon behandelt wurden, ein um 43 Prozent signifikant erhöhtes Myokardinfarktrisiko hatten. Die Daten für den kardiovaskulären Tod waren knapp nicht signifikant im Vergleich zu Patienten der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse wurden ausschließlich durch schon verfügbare Daten, ohne individuelle Patientendaten erschlossen, so dass keine genauere statistische Analyse durchgeführt werden konnte (Nissen und Wolski 2007).

Der positive Effekt von Rosiglitazon liegt in einer effektiven Senkung des Blutglukosespiegels, andererseits kann es bei vorliegender Herzinsuffizienz zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko kommen. Es wird angenommen, dass die unter Rosiglitazon gebildeten Ödeme zu einer Verschlechterung einer Herzinsuffizienz führen können. Rosiglitazon ist deshalb bei Patienten mit Herzinsuffizienz kontraindiziert und sollte abgesetzt werden, wenn sich die Herzleistung verschlechtert (Nissen und Wolski 2007).

In den durchgeführten Langzeitstudien über Rosiglitazon konnte ein erhöhtes Risiko für kardiale Ischämien nicht sicher festgestellt werden, es gibt jedoch verstärkte Hinweise darauf. In der DREAM-Studie, einer Diabetes-Präventionsstudie, die nicht primär nach kardiovaskulären Ereignissen gesucht hat und deren Beobachtungszeitraum drei Jahre dauerte, wurde in der Rosiglitazongruppe kein statistisch signifikantes Herzinfarktrisiko nachgewiesen. Dagegen wurden vermehrte Fälle von Herzinsuffizienz statistisch signifikant nachgewiesen. In der Studie konnte gezeigt werden, dass Rosiglitazon das Auftreten von DM Typ2 reduzieren kann (Gerstein et al. 2006). Die RECORD-Studie (Rosiglitazone Evaluated for Cardiac Outcomes and Regulation of Glycaemia in Diabetes), eine sechsjährige Langzeitstudie, ist bisher die einzige Langzeitstudie, die ausschließlich die Wirkung von Rosiglitazon auf das kardiovaskuläre Risiko untersuchte. Auch diese Studie bringt keine eindeutige Klarheit bezüglich des kardiovaskulären Risikos. An der RECORD-Studie nahmen über 4000 Patienten

mit DM Typ 2 teil, die aufgrund eines hohen HbA1c, trotz einer Behandlung mit Metformin und Sulfonylharnstoffen einer intensiveren Therapie unterzogen werden sollten. Die Hälfte erhielt Insulin, die andere Hälfte Sulfonylharnstoffe als zusätzliche Therapie (Kontrollgruppe). Unter der Rosiglitazontherapie kam es zu einer signifikant besseren Senkung des HbA1c. Gleichzeitig kam es zu einem erhöhten Anstieg des Körpergewichts, das LDL- Cholesterin wurde weniger stark gesenkt als in der Kontrollgruppe, obwohl in dieser häufiger mit Statinen behandelt wurde. Im primären Endpunkt der Studie, der Hospitalisation von Patienten wegen kardiovaskulären Problemen unterschied sich die Rosiglitazon-Gruppe nicht von der Kontrollgruppe. Der Hersteller von Avandia: Glaxo Smith Kline und auch Philip Home, Leiter der Studie, von der Universität Newcastle upon Tyne, sehen die kardiovaskuläre Sicherheit von Rosiglitazon mit dieser Studie als bewiesen an (Home et al. 2007). Steven Nissen von der Cleveland Clinic, einer der Autoren der Metaanalyse über Rosiglitazon sieht das als strittig an, da in der Rosiglitazongruppe häufiger mit Statinen behandelt wurde als in der Kontrollgruppe.

Bestätigt hat die RECORD-Studie das unumstrittene Risiko einer Herzinsuffizienz. In der Rosiglitazongruppe wurden doppelt so viele Patienten wegen dieser Komplikation hospitalisiert

US-Diabetologen haben sich dafür ausgesprochen, Pioglitazon den Vorzug zu geben (Nathan et al. 2009). Die PROACTIVE-Studie (PROspectivePioglitAzone Clinical Trial In MacroVascular Events) zeigt in einer prospektiven Studie, dass das Antidiabetikum Pioglitazon signifikant das kardiovaskuläre Risiko bei DM Typ 2 senken kann. In der randomisierten, placebokontrollierten Studie wurden vier Jahre 5200 Patienten mit Pioglitazon oder Placebo behandelt. Alle Patienten wiesen bereits manifeste Gefäßerkrankungen auf. Nach drei Jahren sank in der Pioglitazongruppe die Rate der kombinierten, kardiovaskulären Endpunkte aus Todesfällen, Myokardinfarkten und Schlaganfällen signifikant um 16%. Die Übertragung auf Rosiglitazon sei nicht gegeben, weil die positiven Effekte unter anderem durch die günstigere Wirkung von Pioglitazon auf das Lipidprofil zustande kommen. Pioglitazon reduziert im Gegensatz zu Rosiglitazon den Triglyzeridspiegel, führt zu einer Senkung von LDL und zu einer Erhöhung von HDL (Dormandy et al. 2005).

Bestätigt wird dieses Ergebnis nochmals durch eine Metaanalyse, in der nicht nur Hochrisikopatienten von Pioglitazon profitieren, sondern auch Patienten mit einem geringeren kardiovaskulären Risikoprofil. Es reduziert den kombinierten Endpunkt von Tod, Herzinfarkt und Schlaganfall bei Typ-2-Diabetikern (Lincoff et al. 2007).

Dieser Effekt von Pioglitazon wird als Substanzeffekt und nicht als Klasseneffekt, auf andere Glitazone übertragbar gewertet.

Wie schon bekannt, sollte Rosiglitazon bei einer bestehenden Herzinsuffizienz oder Verschlechterung der bestehenden Werte nicht gegeben werden. Trotzdem zeigt Rosiglitazon eine effektive Senkung des HbA1c, es ist also ein effektiver Blutzucker-senker.

Im November 2010 wurde Rosiglitazon nach der endgültigen Auswertung aller vorliegenden Studienergebnisse vom europäischen Markt genommen. Darüber hinaus wurde angeordnet, alle klinischen Studien mit dem Wirkstoff Rosiglitazon zu beenden, womit es nicht mehr möglich sein wird, die kardiovaskuläre Sicherheit zu belegen oder zu widerlegen. In den USA bleibt Rosiglitazon weiter verfügbar, die Anwendung wurde jedoch sehr stark eingeschränkt und reglementiert.

## **5. Zusammenfassung**

In der durchgeführten doppelblinden, placebokontrollierten, klinischen Studie von 42 gesunden Probanden, ohne gestörte Glukosetoleranz oder Diabetes Mellitus, wurde der Effekt von Rosiglitazon auf die inflammatorischen Arteriosklerosemarker, in der Therapiedauer von 21 Tagen und im Langzeitverlauf von 24 Wochen nach Absetzen des Medikamentes untersucht. Zu untersuchen war, ob es zu einer prolongierten Suppression der inflammatorischen Arteriosklerosemarker kommt.

Unsere Studie orientiert sich an einer vorherigen Pilotuntersuchung von Hetzel et al., welche den Einfluss von Rosiglitazon auf die endotheliale Funktion und Serumparame-ter untersuchte. In dieser trat bereits 24 Stunden nach Einnahme von Rosiglitazon eine signifikante Reduktion der endothelabhängigen Vasodilatation und inflammatori-schen Arteriosklerosemarker CRP, Serumamyloid A und E- Selektin ein. Die Sup-pression der Serumlevel war noch 7 Tage nach Absetzen von Rosiglitazon nach-weisbar. Diese Effekte traten, im Gegensatz zu älteren Studien, unabhängig vom Einfluss auf den Glukosemetabolismus auf.

In unserer Studie zeigte sich nach drei Tagen Therapiedauer eine statistisch signifi-kante Abnahme des Fibrinogenspiegels, der bis acht Wochen nach Absetzen des Medikamentes nachzuweisen war und auch im Vergleich Verum: Placebo signifikant war. Rosiglitazon hatte in unserer Studie auf Fibrinogen einen supprimierenden Ef-fekt in einer sehr kurzen Therapiedauer von 21 Tagen und einen Langzeiteffekt Wo-chen nach Absetzen des Medikamentes gezeigt, wobei die inflammatorische Kinetik unabhängig von der metabolischen ist. Somit konnte für Fibrinogen eine prolongierte Suppression nachgewiesen werden.

Für E- Selektin, L- Selektin und Fc- Gamma Rezeptor 1 fand sich keine statistisch signifikante Suppression während des gesamten Untersuchungszeitraumes.

Insgesamt konnte nur Fibrinogen die Ergebnisse der Pilotstudie bestätigen und zu-dem eine prolongierte Suppression nachweisen. Letztendlich hätten weitere Studien die antiinflammatorischen Effekte bestätigen oder widerlegen können. Aufgrund der möglichen kardiovaskulären Gefahr von Rosiglitazon wird weder eine endgültige Klä-rung der antiinflammatorischen Effekte noch der kardiovaskulären Sicherheit möglich sein.

## **6. Literaturverzeichnis**

1 Devchand, PR: Glitazones and the cardiovascular system. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity 15: 188-92 (2008)

2 Dolezalová R, Haluzík MM, Bosanská L, Lacinová Z, Kasalová Z, Stulc T, Haluzík M: Effect of PPAR-gamma agonist treatment on markers of endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca 56: 741-8 (2007)

3 Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefèbvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Korányi L, Laakso M, Mokán M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Schernthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J, PROactive investigators: Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspectivepioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. Lancet 366: 1279-89 (2005)

4 Ernst E, Resch KL: Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. Annals of internal medicine 118: 956-63 (1993)

5 Fürstenbusch M, Standl E, Schatz H (Hrsg): Diabetologie kompakt: Grundlagen und Praxis: Insulinsensitizer: PPAR-γ-Liganden (Glitazone). Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S. 175-87 (2004)

6 Galkina E, Ley K: Leukocyte influx in atherosclerosis. Current drug targets 8: 1239-48 (2007)

7 Galkina E, Kadl A, Sanders J, Varughese D, Sarembock IJ, Ley K: Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. Israel journal of experimental medicine 203: 1273-82 (2006)

8 Ganz P, Vita JA: Testing endothelial vasomotor function: nitric oxide, a multipotent molecule. Circulation 108: 2049-53 (2003)

- 9 Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, Hanefeld M, Hoogwerf B, Laakso M, Mohan V, Shaw J, Zinman B, Holman RR: Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. DREAM (Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication). *Lancet* 368: 1096-105 (2006)
- 10 Głowińska B, Urban M, Peczyńska J, Florys B: [Selectins in the pathogenesis and diagnosis of early atherosclerotic changes in children and adolescents with risk factors (obesity, hypertension and diabetes)]. *Przegląd Lekarski*: 935-939 (2004)
- 11 Hetzel J, Balletshofer B, Rittig K, Walcher D, Kratzer W, Hombach V, Häring, HU, Koenig W, Marx N: Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25: 1804-09 (2005)
- 12 Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Gomis R, Hanefeld M, Jones NP, Komajda M, McMurray JJ, RECORD Study Group: Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes-an interim analysis. *N Engl J Med* 357:28-38(2007)
- 13 Jaber J, Murín J, Kinová S, Gavorník P, GhanemWisam MA, Radman A, Gharai-beh A, Richter P: [The role of infection and inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis]. *Vnitřní lékařství* 48: 657-666 (2002)
- 14 Jousilahti P, Salomaa V, Rasi V, Vahtera E, Palosuo T: The association of c-reactive protein, serum amyloid a and fibrinogen with prevalent coronary heart disease-baseline findings of the PAIS project. *Atherosclerosis* 156: 451-6 (2001)
- 15 Kaptoge S, White IR, Thompson SG, Wood AM, Lewington S, Lowe GD, Danesh J: Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154, 211 adults in 31 prospective studies: the fibrinogen studies collaboration. *American journal of epidemiology* 166: 867-79 (2007)
- 16 Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, HsuehWA: Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101: 1311-1318 (2000)

- 17 Lehr HA, Sagban TA, Kirkpatrick CJ: [Atherosclerosis-progression by nonspecific activation of the immune system]. *Medizinische Klinik (Munich, Germany)* 97: 229-35 (2002)
- 18 Libby P, Ridker PM, Maseri A: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-43 (2002)
- 19 Libby P: Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition reviews* 65: 140-6 (2007)
- 20 Lincoff AM, Wolski K, Nicholls SJ, Nissen SE: Pioglitazone and Risk of Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus  
A Meta-analysis of Randomized Trials. *JAMA* 298: 1180-8 (2007)
- 21 Lockhart CJ, McVeigh GE, Cohn JN: Measuring endothelial function. *Current Science*, S. 267-73 (2006)
- 22 Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grüb M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J: PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circulation research* 90: 703-710 (2002)
- 23 Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoff RM, Libby P, Plutzky J, Luster AD: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J Immunol* 164: 6503-8 (2000)
- 24 Marx N: Die Bedeutung von Glitazonen. *Journal für Kardiologie* 9: 563-566 (2002a)
- 25 Marx N: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and atherosclerosis. *Current hypertension reports* 4: 71-7 (2002b)
- 26 Meisner F, Walcher D, Gizard F, Kapfer X, Huber R, Noak A, Sunder-Plassmann L, Bach H, Haug C, Bachem M, Stojakovic T, März W, Hombach V, Koenig W, Staels B, Marx N: Effect of rosiglitazone treatment on plaque inflammation and collagen

content in nondiabetic patients: data from a randomized placebo-controlled trial. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26: 845-850 (2006)

27 Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B, American Diabetes Association, European Association for Study of Diabetes: Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 32: 193-203 (2009)

28 Nimmerjahn F, Ravetch, JV: Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24: 19-28 (2006)

29 Nissen SE, Wolski K: Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes *NEngl J Med* 356: 2457-71 (2007)

30 Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET: Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-γ activators. *Circulation* 101: 235-8 (2000)

31 Perussia B, Dayton ET, Lazarus R, Fanning V, Trinchieri G: Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *Israel journal of experimental medicine* 158: 1092-113 (1983)

32 Pistrosch F, Passauer J, Fischer S, Fuecker K, Hanefeld M, Gross P: In type 2 diabetes, rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction independent of glucose control. *Diabetes care* 27: 484-490 (2004)

33 Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N: C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *The New England journal of medicine* 342: 836-843 (2000)

34 Ríos-Vázquez R, Marzoa-Rivas R, Gil-Ortega, Kaski JC: Peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonists for management and prevention of vascular disease in patients with and without diabetes mellitus. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 6: 231-42 (2006)

35 UKPDS Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352: 837-53 (1998)

36 Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ: Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation* 108: 2054-9 (2003)

## **7. Danksagung**

Mein herzlichster Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Nikolaus Marx, der mir mit Rat und Tat während der praktischen Arbeit und in der Zeit danach immer zur Seite stand. Lieber Niko, vielen Dank!

Herrn Dr. Daniel Walcher als Betreuer und Ratgeber.

An das Team im und rund um das Labor Prof. Dr. Marx, die jede Frage mit einer unglaublichen Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit beantwortet haben. Ein solches Team kann man sich nur wünschen! Vielen Dank liebe Helga Bach, Ursula Mohr, Gerlinde Tritschler, etc.

An meine Kollegin Nadja Wagner, die mit mir die Studie durchgeführt hat, für die gute Zusammenarbeit und den schnellen Erfolg!

Ich danke ganz herzlich unseren Probanden, die uns trotz so vieler Blutabnahmen am frühen Morgen nie im Stich gelassen haben!

Meiner Familie und meinen Freunden, die mich in meinem Studium und damit auch während dieser Arbeit immer unterstützt haben, ich danke Euch von ganzem Herzen!

## **9. Lebenslauf**

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.