

Aus dem Center for Cardiovascular Research
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Auswirkung von Linagliptin als Mono- und als
Kombinationstherapie mit Telmisartan auf die Morphologie des
Herzens und die kardiale Proteinexpression im renovaskulären
Hypertonie-Modell der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Margarete Luise Hohmann

aus Cottbus

Datum der Promotion: 18.09.2020

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Chaykovska L, Alter ML, von Websky K, Hohmann M, Tsuprykov O, Reichetzedler C, Kutil B, Kraft R, Klein T, Hoher B. Effects of telmisartan and linagliptin when used in combination on blood pressure and oxidative stress in rats with 2-kidney-1-clip hypertension. *J Hypertens* 2013; 31: 2290–2298.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abstract in deutscher Sprache	IX
Abstract in englischer Sprache	XI
1 Einleitung	1
1.1 Arterielle Hypertonie	1
1.1.1 Renale Hypertonie und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	2
1.2 Kardiales Remodeling.....	3
1.2.1 Arterielle Hypertonie und kardiales Remodeling.....	3
1.2.2 AT ₁ -Rezeptorantagonisten und kardiales Remodeling.....	4
1.2.3 Diabetes mellitus und kardiales Remodeling	5
1.3 DPP-4-Inhibitoren	7
1.3.1 DPP-4-Inhibitoren und das kardiovaskuläre System.....	8
1.4 Kardiovaskulär wirksame Substrate der DPP-4.....	10
1.4.1 GLP-1	10
1.4.2 SDF-1 α	12
1.4.3 BNP, NPY und PYY	13
1.5 Fragestellung	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien und Geräte.....	15
2.2 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	16
2.3 Lösungs- und Pufferansätze	18
2.4 Antikörper	20
2.5 Software	21
2.6 Tierexperimentelle Studie	21
2.6.1 Studiendesign.....	21
2.6.2 Tierhaltung.....	22
2.6.3 Induktion der renovaskulären Hypertonie	22
2.6.4 Blutdruckmessung mittels Schwanzplethysmographie	23

2.6.5	Plasmatische DPP-4- und GLP-1-Aktivität	23
2.6.6	Tötung und Organentnahme	24
2.7	Histologie	24
2.7.1	Fixierung	24
2.7.2	Paraffineinbettung	24
2.7.3	Herstellung der Gewebeschnitte	25
2.7.4	Färbung	25
2.7.5	Histologische Auswertung	29
2.8	Proteinbiochemische Analyse	31
2.8.1	Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.8.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.8.3	Western Blotting	33
2.8.4	Quantifizierung der Proteinexpression	34
2.9	Statistische Analyse	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Plasmaparameter des Tiermodells	37
3.2	Arterieller systolischer Blutdruck	39
3.3	Herzmorphologie	41
3.3.1	Herzgewicht absolut und relativ zum Körpergewicht	41
3.3.2	Kardiomyozytendurchmesser	42
3.3.3	Media/Lumen-Ratio	44
3.3.4	Interstitielle Fibrose	46
3.3.5	Perivaskuläre Fibrose	48
3.4	Kardiale Proteinexpression	50
3.4.1	Expression von Kollagen 1 α	50
3.4.2	Expression von BNP	51
3.4.3	Expression des GLP-1-Rezeptors	52
3.4.4	Expression von DPP-4	53
4	Diskussion	54
4.1	Allgemeine Parameter des Versuchsmodells	54
4.2	Arterieller systolischer Blutdruck	55
4.3	Kardiales Remodeling	57

4.3.1	Parameter der kardialen Hypertrophie.....	57
4.3.2	Parameter der kardialen Fibrose.....	59
4.4	Kardiale Proteinexpression.....	61
4.4.1	Expression von BNP.....	61
4.4.2	Expression des GLP-1-Rezeptors.....	62
4.4.3	Expression von DPP-4.....	64
4.5	Limitierungen und Ausblick.....	65
5	Zusammenfassung.....	68
6	Literaturverzeichnis.....	70
7	Eidesstattliche Versicherung /Anteilerklärung.....	83
8	Lebenslauf.....	84
9	Publikationsliste.....	86
10	Danksagung.....	87

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 2-1: Zeitliche Abfolge des Tierversuchs	22
Abbildung 2-2: Repräsentative Aufnahmen der Western Blots	35
Abbildung 3-1: DPP-4-Aktivität (AU/1000) nach 6 Wochen.....	38
Abbildung 3-2: Plasma-GLP-1 gesamt und aktiv (pg/ml)	39
Abbildung 3-3: Entwicklung des arteriellen systolischen Blutdrucks (mmHg)	40
Abbildung 3-4: Kardiomyozytendurchmesser (μm)	42
Abbildung 3-5: Repräsentative Aufnahmen der Kardiomyozytendurchmesser	43
Abbildung 3-6: Media/Lumen-Ratio der myokardialen Arterien	44
Abbildung 3-7: Repräsentative Aufnahmen der Media/Lumen-Ratio der myokardialen Arterien	45
Abbildung 3-8: Kardiale interstitielle Fibrose (Bindegewebeanteil im Interstitium in %).....	46
Abbildung 3-9: Repräsentative Aufnahmen der kardialen interstitiellen Fibrose.....	47
Abbildung 3-10: Kardiale perivaskuläre Fibrose	48
Abbildung 3-11: Repräsentative Aufnahmen der kardialen perivaskulären Fibrose	49
Abbildung 3-12: Relative kardiale Expression von Kollagen 1 α (Kollagen 1 α /Actin)	50
Abbildung 3-13: Relative kardiale Expression von BNP (BNP/Actin)	51
Abbildung 3-14: Relative kardiale Expression des GLP-1-Rezeptors (GLP-1R/Actin).....	52
Abbildung 3-15: Relative kardiale Expression von DPP-4 (DPP-4/Actin)	53
Tabelle 1: Spezifika der verwendeten Antikörper.....	21
Tabelle 2: Absolutes und relatives Herzgewicht.....	41

Abkürzungsverzeichnis

2k1c	2-kidney-1-clip
α -SMA	α -smooth muscle actin
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AGE	Advanced glycation end product
APS	Ammoniumpersulfat
ARB	Angiotensin type 1 receptor blocker
AT ₁	Angiotensin ₁
BCA	Bicinchoninsäure
BNP	Brain Natriuretic Peptide
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD26	Cluster of differentiation 26
cGMP	Cyclisches Gunaosinmonophosphat
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor 4
DPP-4	Dipeptidylpeptidase-4
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK _{1/2}	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GLP-1	Glucagone-like peptide-1
GLP-1R	Glucagone-like peptide-1-Rezeptor
HbA1c	Hämoglobin A1c
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNRNPA1	Heterogenes Kern-Ribonukleoprotein A1

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2
MQ-H ₂ O	mittels Milli-Q Purification System aufbereitetes Wasser (deionisiert)
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaN ₃	Natriumazid
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
PAA	Polyacrylsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PYY	Peptid YY
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDA	Natriumdiacetat
SDF-1 α	Stromal cell-derived factor-1 α
SDS	Natriumdodecylsulfat
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TBS-T	TRIS-buffered Saline-Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming growth factor- β
TGR (mRen-2) ²⁷	Mausgen Ren-2 überexprimierende transgene Ratten
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Abstract in deutscher Sprache

Einleitung:

Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren (DPP-4-Inhibitoren) sind eine relativ neue für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) zugelassene Wirkstoffgruppe. Aufgrund der bei T2DM häufig auftretenden kardiovaskulären Komorbiditäten ist der Effekt einer Therapie mit DPP-4-Inhibitoren auf das Herz-Kreislauf-System von zentraler Bedeutung. Die Ergebnisse präklinischer und klinischer Studien weisen auf eine kardioprotektive Wirkung dieser sogenannten Glip-tine hin. Weitgehend unklar ist jedoch, inwiefern sich die im klinischen Alltag häufig zum Ein-satz kommende Komedikation von DPP-4-Inhibitoren und Angiotensin₁-Rezeptorblockern (AT₁-Rezeptorblockern) auf das kardiovaskuläre System auswirkt. In der vorliegenden Studie wurden daher anhand von Ratten mit einer renovaskulären Hypertonie die Effekte einer Medikation mit dem DPP-4-Inhibitor Linagliptin als Monotherapie und in Kombination mit dem AT₁-Rezeptorblocker Telmisartan auf den arteriellen systolischen Blutdruck und das kardiale Remo-delung untersucht.

Methodik:

63 männliche Wistar-Kyoto Ratten wurden einer 2-kidney-1-clip-Operation (2k1c-Operation) unterzogen. In einer Kontrollgruppe (n = 12) wurde eine Sham-Operation durchgeführt. An-schließend wurden die Tiere randomisiert einer von 5 Behandlungsgruppen (Sham + Placebo, 2k1c + Placebo, 2k1c + Telmisartan, 2k1c + Linagliptin, 2k1c + Kombination aus Telmisartan und Linagliptin) zugeteilt und es wurde zu definierten Zeitpunkten der arterielle systolische Blutdruck gemessen und Blut gewonnen. Nach Abschluss der 17-wöchigen Behandlungsphase erfolgte die Tötung und Organentnahme. Das Herz wurde mittels konventioneller Histologie und Western Blotting auf kardiales Remodeling und Proteinexpression untersucht.

Ergebnisse:

Linagliptin hatte keinen blutdrucksteigernden Effekt, weder in der Monotherapie noch in der Kombination mit Telmisartan. Die protektive Wirkung der AT₁-Rezeptorblockade auf die kar-diale Hypertrophie wurde durch Linagliptin nicht aufgehoben. Die Media/Lumen-Ratio der myo-kardialen Widerstandsgefäße war sogar lediglich in der Kombinationsgruppe signifikant gerin-ger. Es zeigten sich potentiell protektive Veränderungen der kardialen Proteinexpression (DPP-4 und Glucagone-like-peptide-1-Rezeptor) durch den Einsatz der Kombinationstherapie. Aufgrund

eines insgesamt gering ausgeprägten kardialen Remodelings in der Placebogruppe sind Aussagen über den Einfluss der Medikation auf Fibrosierungsvorgänge nicht möglich.

Schlussfolgerungen:

Linagliptin übte in diesem Modell keinen negativen Einfluss auf das kardiovaskuläre System aus. Es gibt hingegen Hinweise für einen synergistisch günstigen Effekt der Kombinationstherapie aus Linagliptin und Telmisartan auf den arteriellen systolischen Blutdruck und das kardiale Remodeling im Rahmen einer renovaskulären Hypertonie der Ratte.

Abstract in englischer Sprache

Introduction:

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors are relatively new pharmacological agents, approved for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM). The fact that patients with T2DM frequently suffer from cardiovascular comorbidities makes the effects of DPP-4 inhibitors on the cardiovascular system highly relevant. Results of preclinical and clinical studies point to a cardioprotective effect of these so-called gliptins. However, the effects of the frequently used comedication of DPP-4 inhibitors and angiotensin type 1 receptor blockers (ARBs) on the cardiovascular system are largely unknown. Therefore, in this study we investigated the effect of a medication with the DPP-4 inhibitor linagliptin as a monotherapy and in combination with the ARB telmisartan on arterial blood pressure and cardiac remodeling.

Methods:

63 male Wistar-Kyoto rats underwent 2-kidney-1-clip (2k1c) surgery. Furthermore, a control group (n = 12) was sham-operated. Then the animals were allocated randomly to one of 5 treatment groups (sham + placebo, 2k1c + placebo, 2k1c + telmisartan, 2k1c + linagliptin, 2k1c + combination of telmisartan and linagliptin). Arterial blood pressure measurements and taking blood samples were performed at predefined time points throughout the study. Following the treatment period of 17 weeks the animals were killed and organ tissue samples were collected. Cardiac remodeling and cardiac protein expression were evaluated by conventional histology and western blotting.

Results:

Linagliptin did not increase blood pressure, neither alone nor in combination with telmisartan. The known protective effect of ARB on cardiac hypertrophy was not abolished by linagliptin. The combination group rather comprised a significantly reduced media/lumen ratio of the myocardial resistance vessels compared to control. Furthermore, potentially protective changes of protein expression (DPP-4 and glucagone-like-peptide-1 receptor) in the combination group were observed. Conclusions regarding effects of the medication on fibrosis are not possible due to a mild cardiac remodeling in the placebo group.

Conclusions:

Linagliptin did not show negative effects on the cardiovascular system in this model. There is rather some evidence for a synergistic beneficial effect of the combination of linagliptin and telmisartan on arterial systolic blood pressure and cardiac remodeling in the context of rat renovascular hypertension.

1 Einleitung

Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) ist eine Wohlstandserkrankung, die mit dem wachsenden Lebensstandard in den Industrie- und den sogenannten Schwellenländern an Häufigkeit zunimmt. Patienten, die an T2DM erkrankt sind, weisen häufig Komorbiditäten mit einer arteriellen Hypertonie und anderen kardiovaskulären Folgeerkrankungen, wie der Herzinsuffizienz und dem Myokardinfarkt auf. In der Todesursachenstatistik von Typ-2-Diabetikern stehen kardiovaskuläre Ereignisse sogar an erster Stelle (1). Da der Diabetes mellitus eine chronische Erkrankung ist, die meist einer lebenslangen medikamentösen Therapie bedarf, sind die Effekte der zum Einsatz kommenden antidiabetischen Substanzgruppen auf das kardiovaskuläre System von hoher Relevanz. Eine relativ neue Wirkstoffgruppe auf dem Markt sind die sogenannten Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren (DPP-4-Inhibitoren). Einige der Präparate sind zurzeit sowohl zur Mono- als auch zur Kombinationstherapie des T2DM zugelassen. Die Auswirkungen dieser Substanzgruppe auf den arteriellen Blutdruck und auf die Struktur und Funktionalität des Herzens sind Gegenstand intensiver Forschung. In einer Vielzahl präklinischer und klinischer Studien konnte ein neutraler bis protektiver Effekt auf das kardiovaskuläre System nachgewiesen werden (2). Jedoch kamen unter anderem durch die Ergebnisse der klinischen Studie SAVOR-TIMI 53 aus dem Jahr 2013 Sicherheitsbedenken bezüglich des Einflusses einer medikamentösen DPP-4-Inhibition auf die Herzfunktion auf (3). Hier zeigte sich unter der Therapie mit Saxagliptin eine erhöhte Hospitalisierungsrate aufgrund einer Herzinsuffizienz. Unklar ist, ob es sich hierbei um einen substanzspezifischen Effekt handelt, oder ob andere Einflussfaktoren, wie die Komedikation mit einem Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer) bei über 50 % der Probanden eine Rolle spielte. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind daher die Untersuchung der Auswirkungen des DPP-4-Inhibitors Linagliptin in der Monotherapie und in Kombination mit dem Angiotensin₁-Rezeptorblocker (AT₁-Rezeptorblocker) Telmisartan auf den Blutdruck, die Herzmorphologie und die kardiale Proteinexpression am renovaskulären Hypertoniemodell der Ratte.

1.1 Arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie ist gemäß der aktuellen Leitlinie der European Society of Cardiology und der European Society of Hypertension definiert als ein systolischer Blutdruck ≥ 140 mmHg

Einleitung

bzw. ein diastolischer Blutdruck ≥ 90 mmHg, der dauerhaft und situationsunabhängig vorliegt (4). In Europa geht man von einer sehr hohen Prävalenz der Erkrankung aus, die zwischen 30 % und 45 % der Gesamtbevölkerung liegt. Es erfolgt die Einteilung in die primäre Hypertonie, die ca. 90 % der Fälle ausmacht und in die sekundäre Hypertonie. Die primäre Hypertonie ist eine multifaktorielle und polygene Erkrankung. Zu den begünstigenden Faktoren gehören u. a. Ernährungs- und Stressfaktoren, Rauchen, Alter, Immobilität und ein niedriger sozioökonomischer Status (5). Die sekundäre Hypertonie hingegen tritt in der Folge einer anderen Grunderkrankung auf, sodass auch deren Genese entsprechend vielfältig ist. Mögliche Ursachen sind renoparenchymatöse Erkrankungen, zu denen die diabetische Glomerulosklerose und die renovaskuläre Hypertonie im Rahmen einer Nierenarterienstenose gehören (6). Auf die hieraus resultierenden pathophysiologischen Veränderungen soll im weiteren Verlauf näher eingegangen werden. Mit zunehmender Erkrankungsdauer einer arteriellen Hypertonie und abhängig von der Höhe des Blutdrucks kommt es zur Ausbildung klinisch manifester kardiovaskulärer Endorganschäden, wie der koronaren Herzerkrankung und der chronischen Herzinsuffizienz (7).

1.1.1 Renale Hypertonie und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Im Rahmen einer renovaskulären Hypertonie sind eine Reihe endokriner und hämodynamischer Veränderungen im kardiovaskulären System zu beobachten, wobei dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine pathophysiologische Schlüsselrolle zukommt. Eine Nierenarterienstenose führt zunächst zu einer Minderperfusion der betroffenen Niere. Um den für eine ausreichende glomeruläre Filtration notwendigen Perfusionsdruck aufrecht zu erhalten, wird gegenregulatorisch vermehrt Renin aus den juxtaglomerulären Zellen des Nierenparenchyms freigesetzt. Aus einer daraufhin ablaufenden Enzymkaskade resultiert die Bildung des Peptidhormons Angiotensin II, das seine Wirkung insbesondere über den AT_1 -Rezeptor entfaltet (8). Lokal übt es vor allem an den efferenten Arteriolen der Glomeruli eine vasokonstriktorische Wirkung aus, was zur gewünschten Aufrechterhaltung des Perfusionsdrucks führt. Zudem entfaltet es systemische Wirkungen, aus denen eine Anhebung des peripheren Gefäßwiderstandes resultiert. Über die Stimulation der Synthese und Freisetzung des Mineralkortikoides Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde wird die renale Natriumreabsorption im proximalen Tubulus der Niere gesteigert, was zu einer intravasalen Volumenexpansion führt, wenn dies nicht durch Drucknatriurese einer kontralateralen gesunden Niere kompensiert werden kann. Folge der genannten Veränderungen ist die Ausbildung einer renovaskulären Hypertonie (9).

Ähnliche pathophysiologische Mechanismen spielen sich im Rahmen einer diabetischen Nephropathie ab. Bei Diagnosestellung eines T2DM leiden 58-70 % der Patienten bereits unter einer arteriellen Hypertonie (10). Ursächlich hierfür sind am ehesten die gemeinsamen Risikofaktoren, die die Entwicklung beider Erkrankungen begünstigen. Die arterielle Hypertonie fördert das Fortschreiten einer diabetischen Nephropathie, messbar an einer zunehmenden renalen Albuminausscheidung. Umgekehrt bedingt eine zunehmende Einschränkung der Nierenfunktion im Rahmen einer diabetischen Nephropathie, die sich bei ungenügender Blutzuckereinstellung auch bei Vorliegen einer Normotonie im Verlauf der Erkrankung entwickeln kann, u. a. über die Aktivierung des RAAS die Ausbildung bzw. Aggravierung einer arteriellen Hypertonie (11). Diese führt in einem wechselseitigen Verstärkungsmechanismus wiederum zu einem Fortschreiten der diabetischen Nephropathie. Zudem bilden Patienten mit einem Diabetes mellitus häufig eine atherosklerotisch bedingte Nierenarterienstenose aus (12).

1.2 Kardiales Remodeling

1.2.1 Arterielle Hypertonie und kardiales Remodeling

Ein dauerhaft erhöhter arterieller Blutdruck hat zudem tiefgreifende Auswirkungen auf das Herz mit dem Ablauf einer Reihe von Remodeling-Prozessen. Aus der konstant erhöhten Nachlast resultiert eine mechanische Druckbelastung des kardialen Gewebes. Die auf das myokardiale Gefäßsystem wirkenden Drücke, Scher- und Zugspannungen induzieren zunächst eine kompensatorische Hypertrophie der glatten Muskelzellen, insbesondere im Bereich der Tunica media (13,14). Im weiteren Verlauf ist die Wirkung lokaler und systemischer neurohumoraler Mediatoren von Bedeutung. So stimulieren unter anderem der transforming growth factor- β (TGF- β) und Angiotensin II die Transition von Fibroblasten zu Myofibroblasten (15). Diese verändern maßgeblich die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix, indem sie verstärkt Kollagen I, das sich zu dicken Fibrillen zusammenlagert, und Kollagen III, das feinere retikuläre Fasern bildet, produzieren. Da Myofibroblasten zu einem großen Teil in der Adventitia der intramyokardialen Gefäße vorzufinden sind, bildet sich zunächst eine perivaskuläre Fibrose aus. Neben dem vaskulären Remodeling sind auch Veränderungen der anderen kardialen Strukturen zu beobachten. Um bei erhöhter Nachlast die kardiale Pumpfunktion aufrechterhalten zu können, kommt es zu einer kompensatorischen Hypertrophie der Kardiomyozyten, insbesondere des linken Ventrikels (16). Bei persistierender Hypertonie fördern auch hier, neben TGF- β , systemisch und lokal gebildete

Einleitung

vasoaktive und proinflammatorische Substanzen wie Angiotensin II, Aldosteron, Endotheline und Katecholamine das Remodeling (13,17). Unter anderem wird durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase die Bildung von Superoxiden und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gefördert. Diese bewirken über verschiedene Wege die Zerstörung von Zellstrukturen (18). Neben der Förderung der Bildung von TGF- β interferieren die ROS mit der inhibierenden Wirkung des tissue inhibitor of metalloproteinase-4 (TIMP-4), die dieser auf die matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) ausübt. Die MMP-2 wird von den Myofibroblasten ohnehin schon vermehrt exprimiert und fördert über die Reorganisation und Degradierung der kardialen extrazellulären Matrix die zunehmende Fibrosierung (19,20). Im weiteren Krankheitsverlauf und mit zunehmender Ventrikelstärke im Rahmen der kompensatorischen Myokardhypertrophie kann durch das bereits geschädigte Gefäßsystem eine suffiziente Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Kardiomyozyten nicht mehr gewährleistet werden, sodass interstitielle Mikroinfarkte entstehen. Im Rahmen der darauffolgenden Reparaturprozesse bilden sich Narben mit konsekutiv vermehrter Kollagen-einlagerung aus (16,21). Folgen dieser sich gegenseitig verstärkenden Umbauprozesse sind eine verminderte Compliance der myokardialen Gefäße und eine erhöhte Wandsteifigkeit der Ventrikel mit diastolischer Dysfunktion. Mit zunehmender Krankheitsdauer entwickeln sich zudem eine systolische Dysfunktion und eine progressive Herzinsuffizienz (15,22). Das Ausmaß der diastolischen Dysfunktion ist ein Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (23). Dies erklärt, weshalb sich durch eine suffiziente Blutdruckkontrolle die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse signifikant reduzieren lässt (24).

1.2.2 AT₁-Rezeptorantagonisten und kardiales Remodeling

Aufgrund der Bedeutung des RAAS in der Ausbildung einer renalen Hypertonie sieht die leitliniengerechte Therapie den Einsatz von Substanzen vor, die in eben dieses System eingreifen. Neben ACE-Hemmern, die die Konversion von Angiotensin I zu Angiotensin II blockieren, finden häufig sogenannte Sartane Verwendung, die als kompetitive Inhibitoren des AT₁-Rezeptors die direkte vasokonstriktorische Wirkung von Angiotensin II aufheben. Eine über den antihypertensiven Effekt hinausgehende kardioprotektive Wirkung von AT₁-Rezeptorantagonisten, die sich aus den zuvor erläuterten pathophysiologischen Zusammenhängen ergibt, ist gut belegt (25). In präklinischen Studien zeigte sich, dass deren Einsatz mit einer Reduktion der kardialen Hypertrophie und Fibrosierung einhergeht (26,27). Hierbei spielt möglicherweise auch die verstärkte Aktivierung des AT₂-Rezeptors durch Angiotensin II eine Rolle, der in vielerlei Hinsicht ge-

genregulatorisch zum AT₁-Rezeptor wirkt. So führt seine Aktivierung u. a. zu einer Vasodilatation und hemmt Zellwachstum und -differenzierung (8). Ein Vertreter dieser Substanzklasse ist Telmisartan. Durch seine lange Halbwertszeit von 24 Stunden ist die einmal tägliche Einnahme zur Aufrechterhaltung eines therapeutischen Wirkspiegels ausreichend. Zudem konnte für Telmisartan, im Vergleich mit anderen Präparaten, ein geringeres Risiko für Krankenhauseinweisungen aufgrund makrovaskulärer Komplikationen nachgewiesen werden (28).

1.2.3 Diabetes mellitus und kardiales Remodeling

Auch im Rahmen eines Diabetes mellitus ist ein kardiales Remodeling zu beobachten, das unabhängig von einer arteriellen Hypertonie und einer koronaren Herzerkrankung auftritt. Dieses wird unter dem Begriff der diabetischen Kardiomyopathie zusammengefasst und führt zu einer Herzinsuffizienz. So wurde 1974 in der Framingham-Studie erstmals die deutlich erhöhte Inzidenz einer Herzinsuffizienz bei Patienten mit einem Diabetes mellitus beschrieben (29). Initial tritt bei diesem Krankheitsbild eine linksventrikuläre Hypertrophie auf. Infolge einer progredienten Fibrosierung des Myokards bildet sich daraufhin eine diastolische Dysfunktion aus. Im weiteren Verlauf kann auch eine systolische Dysfunktion mit eingeschränkter kardialer Pumpfunktion beobachtet werden. Zudem kommt es zu einer vaskulären Dysfunktion mit Ausbildung atheromatöser Plaques und damit einhergehend zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (30,31). Diesen Einschränkungen der Funktionalität des Herzens liegen tiefgreifende Veränderungen des kardialen Metabolismus zugrunde, die jedoch bislang nur unzureichend verstanden und Gegenstand intensiver Forschung sind. Einer der Kernpunkte scheint ein verändertes Substratangebot zu sein. So gewinnt das Myokard unter physiologischen Bedingungen seine Energie zu ca. 30 % aus Glukose und zu ca. 70 % aus freien Fettsäuren. Durch die Insulinresistenz im Rahmen eines T2DM ist die Glukoseaufnahme des myokardialen Gewebes gestört, sodass sich der Anteil freier Fettsäuren an der Energiegewinnung deutlich erhöht (32). Diese Veränderung der Substratutilisation führt langfristig über eine mitochondriale Dysfunktion zu einer vermehrten Bildung von ROS, die das Myokard oxidativem Stress aussetzen. Zudem ist die Energiegewinnung aus freien Fettsäuren nicht so effizient wie aus Glukose, sodass das diabetische Myokard möglicherweise Adenosintriphosphat-defizient ist (30). Aus der andererseits bestehenden Hyperglykämie resultiert die Entstehung von glykierten Endprodukten, sogenannten advanced glycation end products (AGEs), die AGE-Rezeptor-vermittelt die Bildung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine fördern. Diese wiederum aktivieren u. a. profibro-

Einleitung

tische Signaltransduktionswege wie den TGF- β /Smad-Signalweg, der über eine Fibroblastenaktivierung die Bildung von Extrazellulärmatrix nach sich zieht. Durch die Chemokinwirkung scheint es zudem zu einer gesteigerten Einwanderung von Immunzellen, wie Makrophagen und bestimmten Lymphozytenpopulationen, zu kommen, die ebenfalls einen fibrosefördernden Effekt ausüben (31). Darüber hinaus lässt sich auch hier eine vermehrte Aktivität des kardialen RAAS mit entsprechender Erhöhung der lokalen Angiotensin II-Konzentration beobachten. Verstärkt wird der RAAS-Effekt durch eine erhöhte kardiale Dichte an AT₁-Rezeptoren. Deren Aktivierung hat wiederum die Bildung von ROS und die vermehrte Expression von TGF- β zur Folge, was die profibrotischen Effekte verstärkt (31).

Folge dieser Vielzahl an Stoffwechselprozessen ist, analog zum kardialen Remodeling im Rahmen einer arteriellen Hypertonie, die Ausbildung einer kardialen perivaskulären und interstitiellen Fibrose, die bei etwa 40-75 % der Diabetespatienten nachweisbar ist und die zu der genannten diastolischen und systolischen Dysfunktion führt (30). Möglicherweise ist die Fibrose auch Folgeerscheinung eines Untergangs von Kardiomyozyten im Rahmen der kardiotoxischen diabetischen Stoffwechsellage. Über den direkten negativen Einfluss des Diabetes mellitus auf das Myokard hinaus erhöht dieser auch die Empfindlichkeit des Herzens gegenüber anderen Stressoren, wie etwa einer arteriellen Hypertonie (30).

Bedingt durch die starke Assoziation zwischen T2DM und kardiovaskulären Erkrankungen mit entsprechender Morbidität und Mortalität ist eine pharmakologische Therapie wünschenswert, die sich positiv auf das kardiovaskuläre Risiko auswirkt. Sie sollte also möglichst sowohl der Ausbildung der diabetischen Kardiomyopathie als auch der Ausprägung und der Wirkung von Stressoren entgegenwirken. Dies ist umso drängender, seitdem Daten darauf hinweisen, dass der zur Therapie des T2DM eingesetzte Insulin-Sensitizer Rosiglitazone das Risiko für einen Myokardinfarkt signifikant erhöht (33). Nach Bekanntwerden dieser Studienergebnisse wurde im Jahr 2008 von der Food & Drug Administration der USA eine Richtlinie herausgegeben, die Endpunkt-Studien zu kardiovaskulären Ereignissen fordert. Demnach muss jedes Antidiabetikum vor dessen Zulassung zunächst einen neutralen bzw. positiven Effekt auf die entsprechenden Endpunkte nachweisen (34). Ein kardioprotektiver Effekt ist nicht durch die alleinige Kontrolle des Blutglukosespiegels zu erreichen. So reduziert eine strenge Blutzuckereinstellung mit Orientierung am HbA1c-Wert (Hämoglobin A1c-Wert) zwar die Ausbildung mikrovaskulärer Endorganschäden, ist jedoch alleine nicht ausreichend, um die Inzidenz einer Herzinsuffizienz und makrovaskulärer Komplikationen zu reduzieren (35,36). Im Gegenteil geht ein entsprechendes Vorgehen sogar mit einer erhöhten 5-Jahres-Mortalität einher, vorrangig bedingt durch kardiovaskuläre Ereignisse (37). Diese Tatsache macht es umso bedeutsamer, dass in der pharmakologischen

Therapie des T2DM Substanzen zum Einsatz kommen, die unabhängig von einer suffizienten Blutzuckerkontrolle einen protektiven Effekt auf das kardiovaskuläre System ausüben.

1.3 DPP-4-Inhibitoren

In diesem Zusammenhang ist in den letzten Jahren die ursprünglich als Oberflächenprotein auf Lymphozyten, cluster of differentiation 26 (CD26), beschriebene DPP-4 in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt. Diese ist ein proteolytisches Enzym, das als Exoprotease endständige Peptidbindungen einer Aminosäuresequenz abspaltet, wobei Dipeptide entstehen. Die katalytische Spaltung dieser Proteine verändert deren biologische Aktivität, die dadurch abgeschwächt oder auch verstärkt werden kann (38). DPP-4 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das als lösliche Form im Plasma und als membrangebundene Form auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen vorkommt (38). So wird es u. a. auf mikrovaskulären Endothelzellen, der glatten Gefäßmuskulatur, Epithelzellen, Leukozyten (B- und T-Lymphozyten, Monozyten) und Fibroblasten verschiedener Gewebe exprimiert (39–41). Eines der zahlreichen Substrate der DPP-4 ist das Inkretin Glucagone-like peptide-1 (GLP-1), das von den neuroendokrinen L-Zellen, insbesondere des Ileums und des Kolons, produziert wird. Im Nüchternzustand besteht eine basale Sekretionsrate, die bei Nahrungsaufnahme durch hormonale und neuronale Stimuli und den direkten Kontakt mit Nährstoffen auf das 2- bis 3-fache gesteigert wird (42). An den Inselzellen des Pankreas stimuliert GLP-1 Glukose-abhängig die Sekretion von Insulin, fördert die Proliferation und Neubildung von β -Zellen und hemmt die Glukagonausschüttung. Über die entsprechenden Hormonwirkungen wird in der Leber die Produktion von Glukose gehemmt. Zudem verzögert GLP-1 die Magenentleerung und verstärkt das Sättigungsgefühl. Auf diese Weise hat es einen entscheidenden Einfluss auf die Glukosehomöostase (43). Die aktive Form GLP-1 (7-36) hat jedoch nur eine Halbwertszeit von 1-2 Minuten, da es von der DPP-4 zu GLP-1 (9-36) degradiert wird. Dieses besitzt keine Inkretinwirkung mehr und fungiert als schwacher Antagonist bzw. als Agonist mit einer 1000-fach geringeren Affinität am GLP-1-Rezeptor (GLP-1R) (44,45). Wenn nicht anders spezifiziert, ist in dieser Arbeit mit GLP-1 die intakte Form GLP-1 (7-36) gemeint.

Aufgrund des Einflusses von GLP-1 auf die Glukosehomöostase wurden DPP-4-Inhibitoren entwickelt, die die Spaltung von intaktem GLP-1 blockieren. Seit einigen Jahren sind mehrere DPP-4-Inhibitoren für die Therapie des T2DM zugelassen und auf dem Markt verfügbar. Sie führen zu einer suffizienten Senkung des postprandialen Blutglukosespiegels und haben eine effiziente HbA1c-reduzierende Wirkung (46). Zudem zeichnen sie sich durch ein günstiges Ne-

benwirkungsprofil aus. So haben sie kaum Einfluss auf das Körpergewicht der Patienten und aufgrund der Glukose-abhängigen Wirkungsweise ein sehr geringes Hypoglykämierisiko (46). Zudem konnte eine nephroprotektive Wirkung nachgewiesen werden (47). Ein entscheidender Unterschied zwischen den verschiedenen DPP-4-Inhibitoren sind deren pharmakokinetische Eigenschaften. Die Wirkstoffe der ersten Generation (Vildagliptin, Saxagliptin, Sitagliptin) werden überwiegend renal ausgeschieden, sodass bei eingeschränkter Nierenfunktion eine Anpassung der Dosis notwendig wird. Der etwas neuere Wirkstoff Linagliptin wird hingegen nur zu ca. 5 % renal und zu ca. 85 % biliär eliminiert, sodass bei einer Nierenfunktionseinschränkung keine Dosisreduktion erforderlich ist (18). Im August 2011 erhielt Linagliptin von der Europäischen Arzneimittel-Agentur eine Zulassung für den europäischen Markt. Es kann in der Monotherapie des T2DM angewendet werden, wenn eine Unverträglichkeit gegen Metformin besteht oder dieses aufgrund einer fortgeschrittenen Niereninsuffizienz kontraindiziert ist. Darüber hinaus ist eine Kombinationstherapie von Linagliptin mit Metformin und Sulfonylharnstoffen zulässig. Aufgrund einer ungünstigen frühen Nutzenbewertung der Substanz mit sich hieraus ergebenden finanziellen Einbußen für die Herstellerfirmen (Boehringer Ingelheim und Lilly) ist Linagliptin jedoch aktuell nicht auf dem deutschen Markt verfügbar (48).

1.3.1 DPP-4-Inhibitoren und das kardiovaskuläre System

Neben dem Effekt auf die Homöostase der Blutglukose ist aus genannten Gründen der Einfluss einer Inhibition der DPP-4 auf das kardiovaskuläre System von großem Interesse. In einer Reihe präklinischer Studien konnte durch den Einsatz von DPP-4-Inhibitoren eine kardioprotektive Wirkung nachgewiesen werden. So zeigte sich durch eine medikamentöse DPP-4-Inhibition in verschiedenen Modellen der Herzinsuffizienz eine verminderte Myokardhypertrophie und Fibrosierung im Sinne eines reduzierten kardialen Remodelings. Dies ging mit einer Verbesserung kardialer Funktionsparameter einher (49–54). Auch in Modellen der ischämischen Kardiomyopathie führte die Administration eines DPP-4-Inhibitors zu einer Reduktion der Infarktgröße und teilweise zu einer Verbesserung der kardialen Funktion (55–57).

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse präklinischer Studien sind die Daten mehrerer groß angelegter prospektiver klinischer Studien, die die kardiovaskuläre Sicherheit einer medikamentösen DPP-4-Inhibition bei Patienten mit einem T2DM untersuchten, widersprüchlich. Die Häufigkeit schwerwiegender kardiovaskulärer Ereignisse (u. a. Tod durch kardiovaskuläres Ereignis, Myokardinfarkt) zeigte sich unter einer Therapie mit den DPP-4-Inhibitoren Alogliptin (EXA-

Einleitung

MINE trial) und Sitagliptin (TECOS trial) nicht erhöht (58). Unter der Therapie mit Saxagliptin (SAVOR-TIMI 53 trial) war zwar ebenso keine Zunahme kardiovaskulärer Ereignisse zu verzeichnen. Jedoch war in dieser Studie ein um 27 % erhöhtes relatives Risiko für eine Krankenhauseinweisung aufgrund einer Herzinsuffizienz bei Patienten mit einem T2DM und einem hohen kardiovaskulären Risikoprofil auffällig (3,5 % vs. 2,8 % in der Placebogruppe) (3). Interessant ist hierbei, dass über 50 % der Probanden gleichzeitig einen ACE-Inhibitor einnahmen. Auch unter einer Therapie mit Alogliptin (EXAMINE trial) stieg die Rate von Krankenhausaufenthalten aufgrund einer Herzinsuffizienz um 17 % an, wobei dieser Anstieg jedoch nicht signifikant war (59,60). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass die genannten Studien die DPP-4-Inhibitoren nicht explizit bei Patienten mit einer vorbestehenden Herzinsuffizienz untersuchten. Die Erfüllung dieses Einschlusskriteriums war lediglich bei der VIVID-Studie eine Voraussetzung. Diese konnte keinen negativen Einfluss einer Therapie mit Vildagliptin auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion nachweisen. Auffällig ist jedoch eine Zunahme der linksventrikulären Volumina, wobei die diesem Effekt zugrundeliegende Ursache und deren Relevanz unklar sind. Aufgrund der geringen Größe der Studie war die statistische Trennschärfe nicht ausreichend, um Schlüsse über das klinische Outcome zuzulassen (61). Kürzlich wurden die Ergebnisse der CARMELINA-Studie veröffentlicht, die bei Patienten mit einem hohen kardiovaskulären Risiko den Einfluss einer Therapie mit Linagliptin auf die Herzinsuffizienzrate untersucht. Die Häufigkeit von Krankenhausaufenthalten aufgrund einer Herzinsuffizienz nahm in dieser Studie im Vergleich zum Placebo nicht zu (62). Insgesamt ist es aufgrund der inhomogenen Datenlage zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich, den Einfluss einer DPP-4-Inhibition auf das kardiale Remodeling und die kardiale Funktion im klinischen Setting abschließend zu bewerten. Unklar ist auch, ob es sich hierbei um spezifische Substanzeffekte oder möglicherweise um einen Substanzklasseneffekt handelt.

Um zu verstehen, über welche Mechanismen eine DPP-4-Inhibition auf das kardiovaskuläre System wirkt, ist es notwendig, die Substrate der DPP-4 näher zu betrachten. Da es neben der GLP-1 viele weitere Substrate der DPP-4 gibt, sind die potentiellen Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System komplex und nicht einfach vorherzusagen. An dieser Stelle muss jedoch einschränkend erwähnt werden, dass die durch eine DPP-4-Inhibition induzierte Wirkungsverlängerung aller theoretisch möglichen oder nachgewiesenen DPP-4-Substrate nicht immer eine physiologisch relevante Rolle spielt. So werden manche Substrate möglicherweise nur von der DPP-4 gespalten, wenn sie in sehr hohen Konzentrationen vorkommen oder wenn die DPP-4 in großen Mengen vorliegt (63). Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die wesentlichen kardiovaskulär wirksamen Substrate gegeben werden.

1.4 Kardiovaskulär wirksame Substrate der DPP-4

1.4.1 GLP-1

Dass Inkretine, neben der Optimierung des Glukosehaushaltes, eine direkte kardioprotektive Wirkung haben, legen die Ergebnisse einer Reihe präklinischer Studien nahe. So führte die Infusion von GLP-1 in *In-vivo*- und *Ex-vivo*-Modellen der ischämischen Kardiomyopathie zu einer signifikanten Reduktion des infarzierten Areal und zu einer Verbesserung der postischämischen regionalen Funktionalität (64–68). Auch in verschiedenen Modellen der Herzinsuffizienz konnte durch die Applikation von GLP-1 bzw. eines GLP-1-Analogen die Erhaltung der linksventrikulären Funktion und ein vermindertes kardiales Remodeling, assoziiert mit einer geringeren Mortalität, nachgewiesen werden (69–72). Gros und Kollegen beobachteten eine Einschränkung der linksventrikulären Funktionsparameter mit diastolischer und systolischer Insuffizienz bei Mäusen mit einer genetischen Deletion des GLP-1-Rezeptors (73). Dies legt nahe, dass die Wirkung von GLP-1 hauptsächlich über den gleichnamigen membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt wird. Man geht davon aus, dass über die Stimulation des GLP-1-Rezeptors auf Kardiomyozyten intrazelluläre Kinasen aktiviert werden, die einer Apoptose entgegenwirken. So kommt es zu einer Aktivierung des reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway unter Beteiligung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK_{1/2}) mit daraus resultierender Verminderung der Caspase-3-Aktivität, einem Apoptose-Biomarker (74). Zudem wird eine immunmodulatorische Wirkung über die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) mit nachfolgender Aktivierung der Protein-kinase A in Entzündungszellen mit Freisetzung von Zytokinen angenommen (74). Durch die Gabe sowohl eines PI3K- als auch eines cAMP-Inhibitors werden die kardioprotektiven Effekte der GLP-1-Rezeptor-Aktivierung aufgehoben (64). Ein weiterer Erklärungsansatz ist die Verbesserung des kardialen Glukosemetabolismus durch die Stimulation der Expression und der Translokation der Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-4 in die Zellmembran durch GLP-1 mit entsprechend verbesserter Glukoseutilisation der Kardiomyozyten in Stresssituationen (72,75–77). Bei Hunden mit Pacing-induzierter dilatativer Kardiomyopathie führte die Gabe von rekombinantem GLP-1 zu einer signifikanten Zunahme der myokardialen Glukoseaufnahme und zur Verbesserung hämodynamischer Parameter (51). Dadurch wird ein effizienterer myokardialer Metabolismus ermöglicht, da zur Bereitstellung von Energie aus Glukose durch Glykolyse weniger Sauerstoff benötigt wird als bei der Energiegewinnung durch β -Oxidation von freien Fettsäuren (32). Folge ist ein geringeres Risiko einer myokardialen Schädigung während Phasen

Einleitung

der Ischämie. Auch in klinischen Studien hatte die Behandlung von Patienten mit einem T2DM mit den GLP-1-Analoga Exenatide bzw. Liraglutide einen positiven Einfluss auf kardiovaskuläre Risikofaktoren wie das Körpergewicht, den arteriellen Blutdruck oder eine Dyslipoproteinämie (78,79). Bei T2DM-Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz im Stadium III und IV der Klassifikation der New York Heart Association und bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt bewirkte eine GLP-1-Infusion über einen definierten Zeitraum eine Verbesserung der kardialen Funktionsparameter (80,81). Des Weiteren zeigte sich in einer retrospektiven Analyse klinischer Daten durch die Behandlung mit Exenatide eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse (82).

DPP-4 spaltet GLP-1 (7-36) zu GLP-1 (9-36), das als aktiver Metabolit GLP-1-Rezeptor-unabhängig seine Wirkung entfaltet. Die Gabe von GLP-1 (9-36) führte im Modell der ischämischen Kardiomyopathie sowohl bei GLP-1-Rezeptor-depletierten Mäusen als auch bei Wildtyp-Mäusen zu einer Verbesserung der kardialen Funktionalität und zu einer reduzierten Zellschädigung. Wahrscheinlich erfolgte dies durch eine Steigerung der myokardialen Glukoseaufnahme und eine Aktivierung der NO/cGMP-Signalkaskade über eine Hochregulation der endothelialen NO-Synthase mit nachfolgender Vasodilatation (83,84). Die verminderte Bildung von GLP-1 (9-36) im Rahmen einer DPP-4-Inhibition wäre eine mögliche Erklärung für die teilweise beobachteten unerwünschten Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass GLP-1 (9-36) eine negativ inotrope Wirkung auf das ischämische Myokard entfaltet, wodurch sich ein möglicher kardioprotektiver Effekt ggf. wieder aufhebt (65).

Bei der Interpretation der aufgeführten Studienergebnisse sollte jedoch bedacht werden, dass hier GLP-1(-Analoga) in sehr hohen Konzentrationen appliziert und damit GLP-1-assoziierte Signalwege in supraphysiologischem Ausmaß aktiviert wurden (68). Durch eine DPP-4-Inhibition alleine sind die messbaren Konzentrationen an aktivem GLP-1 naturgemäß deutlich geringer und somit sind deren Effekte auf das kardiovaskuläre System schwächer ausgeprägt oder gar differierend (53,63). Zudem hat, wie bereits erwähnt, eine medikamentöse DPP-4-Inhibition die verlängerte Aktivität weiterer Substrate zur Folge, was pleiotrope Effekte auf das kardiovaskuläre System nach sich zieht.

1.4.2 SDF-1 α

Ein weiteres bedeutsames Substrat der DPP-4 ist der stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) (1-68). DPP-4 wandelt dieses durch Abspaltung zweier Peptide an dessen N-terminalem Ende in die inaktive Form SDF-1 α (3-68) um (85). SDF-1 α ist ein Chemokin, das in diversen Geweben gebildet wird und durch seine Fähigkeit, an den CXC-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) zu binden, eine bedeutende Rolle beim Homing von CXCR4⁺ Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark spielt (86). So wiesen Segers und Kollegen nach Applikation eines rekombinanten Exoprotease-resistenten SDF-1 α eine erhöhte Zahl von CXCR4⁺ angiogenetischen Zellen im Myokard der Ratte nach (87). Jedoch ist die Expression von SDF-1 α im diabetischen Organismus gestört (88). Die kardiale Expression von SDF-1 α wird durch hypoxische Zustände, wie sie bei einer ischämischen Kardiomyopathie bestehen, induziert (55,85,89). Dieser Mechanismus wirkt möglicherweise bestimmten Remodelingvorgängen entgegen. Entsprechend konnte durch die Transplantation von SDF-1 α -exprimierenden kardialen Fibroblasten in die Periinfarktregion nach kardialer Ischämie, kombiniert mit der Gabe von Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF), eine Verbesserung kardialer Funktionsparameter nachgewiesen werden (89). Die DPP-4-Inhibition und damit einhergehend eine verlängerte Wirksamkeit von aktivem SDF-1 α scheint daher ein interessanter therapeutischer Ansatz bei der ischämischen Kardiomyopathie zu sein. Am kardialen Ischämie- und Reperfusionmodell der Ratte konnte durch die Vorbehandlung mit den DPP-4-Inhibitoren BI 14361 bzw. Linagliptin nach 7 Tagen eine erhöhte Anzahl von SDF-1 α ⁺-, CXCR4⁺- und CD34⁺-Zellen nachgewiesen werden. Dies ging mit einer deutlichen Reduktion des infarzierten Areal und der kardialen Fibrose einher (55). Auch die Untersuchungen von Zaruba und Kollegen am Mausmodell der ischämischen Kardiomyopathie zeigten, dass sowohl der genetische Verlust als auch die medikamentöse Blockade der DPP-4-Funktion eine Reduktion des kardialen Remodelings mit verminderter Ausbildung von Narbengewebe und einer vermehrten Neovaskularisation im Infarktareal bewirkt. Ebenso waren verbesserte kardiale Funktionsparameter nachweisbar. Voraussetzung scheint jedoch die gleichzeitige Behandlung mit G-CSF zu sein, damit ausreichend Stammzellen im Knochenmark mobilisiert werden können, die daraufhin über SDF-1 α am Myokard gebunden werden (85). Es gibt zudem Hinweise darauf, dass SDF-1 α , neben dem Homing von Stamm- und Progenitorzellen, eine direkte antiapoptotische Wirkung in dem geschädigten Gewebe entfaltet (90). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Chu und Kollegen, die darauf hindeuten, dass durch die Blockade der SDF-1 α /CXCR4-Achse die Ausbildung einer kardialen Fibrose im Rahmen einer diabetischen Kardiomyopathie vermindert werden kann bzw. durch das Homing von CXCR4⁺ mesen-

chymalen Progenitorzellen im Rahmen einer chronischen dilatativen Kardiomyopathie gar die Entwicklung einer kardialen Fibrose gefördert wird (91,92). Auch eine klinische Studie, die das Langzeit-Outcome nach einer Behandlung mit dem DPP-4-Inhibitor Sitagliptin in Kombination mit G-CSF im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes untersuchte, konnte keine Verbesserung des klinischen Outcome durch ein solches Behandlungsregime nachweisen (93).

1.4.3 BNP, NPY und PYY

Auch das Brain Natriuretic Peptide (1-32), kurz BNP, ist ein Substrat der DPP-4, das durch diese in die biologisch weniger aktive Form (3-32) gespalten wird (94). BNP (1-32) wird von den Kardiomyozyten des Ventrikels als Reaktion auf eine erhöhte Wandspannung synthetisiert und sezerniert. Über die Bindung an den natriuretic peptide receptor A, eine membranständige Guanylatzyklase, und die daraufhin ablaufende intrazelluläre Signalkaskade, nimmt die intrazelluläre Calciumkonzentration ab, woraufhin es zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur mit konsekutiver Vasodilatation kommt. Zudem fördert es die renale Natrium- und Wasserausscheidung und hat damit einen entscheidenden Einfluss auf die Flüssigkeitshomöostase des Körpers. Die Effekte werden verstärkt durch eine Hemmung der Renin- und Aldosteronausschüttung (95). Über diese Mechanismen führt BNP zu einer Senkung der kardialen Vor- und Nachlast (96). Neben der Wirkung auf den Gefäßtonus und die Flüssigkeitshomöostase des Körpers hat BNP einen Einfluss auf die Funktionalität und die Morphologie des Herzens. So konnte nachgewiesen werden, dass eine experimentelle Überexpression von BNP im kardialen Gewebe der Ratte eine Verbesserung kardialer Funktionsparameter und ein vermindertes kardiales Remodeling bewirkt (97). BNP-defiziente Mäuse hingegen bilden unter kardialer Druckbelastung verstärkt eine myokardiale Fibrose aus (98).

Aufgrund ihres Einflusses auf den Gefäßtonus sollen auch die DPP-4-Substrate Neuropeptid Y (NPY) (1-36) und Peptid YY (PYY) (1-36) nicht unerwähnt bleiben. Sie fungieren in ihrer aktiven Form u. a. als Agonisten des endogenen Y₁-Rezeptors, der eine Vasokonstriktion vermittelt. Beide Substrate verstärken in der Niere spontan hypertensiver Ratten die konstriktorische Wirkung von Angiotensin II auf die renalen Gefäße. Durch eine DPP-Inhibition und somit einer verminderten Spaltung von NPY (1-36) und PYY (1-36) wird dieser Effekt verstärkt (99,100). Dies könnte einen systemischen Blutdruckanstieg durch eine DPP-4-Inhibition zur Folge haben (101).

1.5 Fragestellung

Die Auswirkungen einer DPP-4-Inhibition auf das kardiovaskuläre System sind aufgrund der Beeinflussung der Aktivität diverser DPP-4-Substrate sehr komplex. Bislang existieren keine präklinischen Studien, die den Einfluss einer im klinischen Alltag häufig eingesetzten kombinierten DPP-4-Inhibition und AT₁-Rezeptorblockade auf das kardiale Remodeling untersuchen. Daher soll in dieser Arbeit der Einfluss einer DPP-4-Inhibition mit Linagliptin als Monotherapie und in Kombination mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Telmisartan auf den arteriellen Blutdruck und das kardiale Remodeling am Modell der renovaskulären Hypertonie der Ratte untersucht werden. Im sogenannten Goldblatt- oder auch 2-kidney-1-clip-Modell (2k1c-Modell) wird im Rahmen eines chirurgischen Eingriffes durch unilaterale partielle Ligatur der Nierenarterie eine Stenose derselben induziert, die eine verminderte renale Durchblutung zur Folge hat. Konsekutiv entwickelt sich innerhalb kurzer Zeit über die zuvor schon näher erläuterten Mechanismen eine arterielle Hypertonie und im weiteren Verlauf ein kardiales Remodeling (102,103). Auch im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie ist eine Aktivierung des RAAS zu beobachten, sodass aufgrund der pathophysiologischen Parallelen beider Erkrankungen dieses Modell die Realität relativ gut abbildet.

Anhand des erläuterten Versuchsmodells sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Welche Auswirkung hat die Monotherapie mit Linagliptin auf den Blutdruck und wird die bekannte blutdrucksenkende Wirkung von Telmisartan durch die Koadministration von Linagliptin beeinflusst?
2. Welche Auswirkungen hat die Monotherapie mit Linagliptin auf das Hypertonie-assoziierte kardiale Remodeling und werden die bekannten kardioprotektiven Effekte von Telmisartan in diesem Setting durch die gleichzeitige Gabe von Linagliptin beeinflusst?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

Materialien

96-well Mikrotiterplatten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Amersham Hyperfilm enhanced chemiluminescence (ECL)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Deckgläschen	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Glasflaschen	Schott, Mainz, Deutschland
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München, Deutschland
Objektträger	Super Frost® Plus; Thermo Fisher Scientific Inc., Braunschweig, Deutschland
Pierce Bicinchoninsäure (BCA)	
Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pipetten, versch. Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, versch. Größen	VWR, International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Geräte

Canon Scanner	CanoScan 4400F; Canon, Tokyo, Japan
Elektrophoresekammer	TV200; Biotop, Jahnsdorf, Deutschland
Entwicklungsautomat	Curix 60; Agfa, Köln, Deutschland
Gewebeeinbettautomat	Shandon Citadel 1000, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Inkubator	Thermomixer 5436; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotom	RM 2025; Leica Microsystems Inc., Deerfield, Illinois, USA
Mikroskop	BH-2; Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroskopkamera	CFW-1310 C mit dem dazugehörigen Programm Scion Visicapture Application Version 1.0; Scion Corporation, Frederick, MD, USA

Material und Methoden

Milli Q Wasseraufbereiter	Milli-Q Purification System; Billerica, MA, USA
Paraffin-Ausgießstation	EC 350; Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
PH-Meter	Microprocessor pH211; Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Power-Supply	Standard Power Pack P25; Biometra GmbH, Deutschland
Präzisionswaage	Scaltec SBC22; Scaltec Instruments, Göttingen, Deutschland
Schütteltisch	WT-17; Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spectrophotometer DU 530 UV/Vis	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Ultraschallstab	Sonoplus; Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortex-Mischer	Genie 2 Mixer; Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wärmeschrank	ST 6030; Heraeus GmbH, Berlin, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge fresco; Heraeus GmbH, Berlin, Deutschland

2.2 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

25x complete protease inhibitor	Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DePeX Eindeckmedium	Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA
Desinfektionsmittel Sterillium®	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Eisenhämatoxylin nach Weigert	Lösung A + B; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin G	C.I. 45380; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Formalin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung nach Mayer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Molekulargewichtsmarker	Fermentas PageRuler TM Prestained Protein Ladder; ThermoScientific, UK
Natriumazid (NaN ₃) 0,2 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdiacetat (SDA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Neo-Clear®	Merck. Darmstadt, Deutschland
Paraffin 6 bzw. 9	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Polyacrylsäure (PAA)	Carl Roth GmbH Co. & KG, Karlsruhe, Deutschland
P-Cumarsäure	Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
Resorcin-Fuchsin nach Weigert	Waldeck GmbH & Co., Division Chroma, Münster, Deutschland
Roti®-Load 1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sirius Rot	F3BA; Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co., Köngen, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Van Gieson-Gemisch	Waldeck GmbH & Co., Division Chroma, Münster, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA

2.3 Lösungs- und Pufferansätze

Eisenhämatoxylin nach Weigert enthält:

Lösung A: 1 g Hämatoxylin + 100 ml 96 %iges Ethanol

Lösung B: 1,16 g Eisen(III)-chlorid + 99 ml Aqua dest. + 1 ml 25 %ige HCl-Lösung

Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:2 frisch mischen

Lysepuffer mit Proteaseinhibitor:

(1 mM TRIS, pH 8,5, 150 mM NaCl, 0,5 % (w/v) SDA, 0,1 % (v/v) SDS, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,05 % (w/v) NaN₃, 25x complete protease inhibitor)

	<u>5 ml</u>	<u>20 ml</u>	<u>25 ml</u>
SDA	0,025 g	0,1 g	0,125 g
TRIS	0,25 ml	1 ml	1,25 ml
NaCl	0,5 ml	2 ml	2,5 ml
SDS	0,05 ml	0,2 ml	0,25 ml
Triton X-100	0,05 ml	0,2 ml	0,25 ml
25x complete PI* ¹	0,2 ml	0,8 ml	1 ml
NaN ₃	0,5 ml	2 ml	2,5 ml
MQ-H ₂ O* ²	3,45 ml	13,8 ml	17,25 ml

*¹ 25x complete protease inhibitor = 1 Tablette in 2 ml

*² MQ-H₂O = mittels Milli-Q Purification System aufbereitetes Wasser

Trenngel für SDS-PAGE 25 ml

	<u>8 %</u>	<u>10 %</u>	<u>12 %</u>
MQ-H ₂ O	11,5 ml	9,9 ml	8,2 ml
30 % PAA	6,7 ml	8,3 ml	10 ml
1,5 M TRIS, pH 8,8	6,3 ml	6,3 ml	6,3 ml
10 % SDS	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
10 % APS	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
TEMED	0,015 ml	0,01 ml	0,01 ml

Material und Methoden

Sammelgel für SDS-PAGE, 15 ml

	<u>5 %</u>
MQ-H ₂ O	10,2 ml
30 % PAA	2,53 ml
1 M TRIS pH 6,8	1,88 ml
10 % SDS	0,15 ml
10 % APS	0,15 ml
TEMED	15 µl

Elektrophorese-Laufpuffer:

(25 mM TRIS, 250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS)

5-fach Elektrophorese-Puffer

TRIS	15,25 g
Glycin	94 g
SDS	50 ml

Mit dest. H₂O auf 1 l auffüllen.

1-fach Elektrophorese-Puffer

5-fach Elektrophorese-Puffer	200 ml
Dest. H ₂ O	800 ml

Transfer-Puffer

(184 mM Glycin, 24 mM TRIS, 20 % (v/v) Methanol)

5-fach Transfer-Puffer

Glycin	69,2 g
TRIS	14,5 g

Auf 1 l auffüllen.

Vor dem Transfer in folgendem Verhältnis mit destilliertem Wasser und Methanol mischen.

1 Teil / 100 ml 5-fach Transfer-Puffer

1 Teil / 100 ml Methanol

3 Teile / 300 ml dest. H₂O

Material und Methoden

TRIS-buffered Saline-Tween (TBS-T) Puffer

(20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, pH 7,6)

10-fach TBS

TRIS	24,2 g
NaCl	80 g
PH 7,6 einstellen	

1-fach TBS-T

10-fach TBS	100 ml
dest. H ₂ O	900 ml
Tween 20	1 ml

Mit dest. H₂O auf 1 l auffüllen.

ECL - Lösung 1 (100 ml)

Luminol*	1 ml
P-Cumarsäure**	440 µl
1 M TRIS-HCl, pH 8,5	10 ml
H ₂ O	88,5 ml

ECL - Lösung 2 (100 ml)

30 % H ₂ O ₂	64 µl
1 M TRIS-HCl, pH 8,5	10 ml
H ₂ O	90 ml

*Luminol: 0,8858 g in 20 ml Dimethylsulfoxid, in 1 ml Aliquots bei -20 °C lagern, beim Auftauen/Weiterverarbeiten vor Licht schützen

**p-Cumarsäure: 0,2956 g in 20 ml Dimethylsulfoxid, in 0,5 ml Aliquots bei -20 °C lagern

2.4 Antikörper

Actin-Antikörper	a5060; Sigma-Aldrich, Missouri, USA
BNP-Antikörper	ab19645; Abcam plc, Cambridge, UK
DPP-4-Antikörper	ab28340; Abcam plc, Cambridge, UK
GLP-1R-Antikörper	ab39072; Abcam plc, Cambridge, UK
Kollagen 1 α -Antikörper	Geschenk von Professor Dr. Detlef Schuppan
Meerrettichperoxidase gekoppelter Ziegen anti-Kaninchen	sc-2054; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
Immunglobulin G- (IgG-) Antikörper	

Tabelle 1: Spezifika der verwendeten Antikörper

Antikörper	Konzentration	Medium	Gelkonzentration
Kollagen 1 α	1 : 5000	5 % Milch/TBS-T	8 %
BNP	1 : 2000	5 % Milch/TBS-T	12 %
GLP-1R	1 : 1000	4 % BSA/TBS-T	10 %
DPP-4	1 : 1000	5 % Milch/TBS-T	8 %
Actin	1 : 100 000	5 % Milch/TBS-T	verschieden
Anti-Kaninchen IgG-Antikörper	1 : 10 000	4 % BSA/TBS-T	

2.5 Software

AlphaEaseFC software, Version 3.1.2.	Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., CA, USA
ImageJ, Version 1.45	National Institutes of Health, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation
Zotero, Version 5.0.76	Center for History and New Media, USA

2.6 Tierexperimentelle Studie

2.6.1 Studiendesign

Der Versuch wurde an männlichen Wistar-Kyoto Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland, Körpergewicht ca. 280 g) durchgeführt. Diese wurden randomisiert und in 5 Versuchsgruppen (n = 12-18 je Gruppe) aufgeteilt. Nach einer Eingewöhnungsphase von einer Woche wurde die erste Versuchsgruppe einer Sham-Operation unterzogen. Den Tieren der weiteren 4 Versuchsgruppen wurde im Rahmen eines operativen Eingriffes eine Nierenarterie partiell ligiert (2k1c-Operation). Infolge der Ligatur entwickelten die Tiere eine renovaskuläre Hypertonie. In der darauffolgenden Behandlungsphase erhielten die erste (Sham) und die zweite (2k1c) Versuchsgruppe Leitungswasser und Standardfutter im Sinne einer Placebobehandlung. Die dritte Gruppe wurde mit Telmisartan (10 mg/kg Körpergewicht pro Tag über das Trinkwasser) behandelt. Der

vierten Gruppe wurde Linagliptin (3 mg/kg Körpergewicht pro Tag über das Standardfutter) verabreicht. Die fünfte Gruppe erhielt eine Kombination aus Telmisartan und Linagliptin (10 mg/kg Körpergewicht pro Tag Telmisartan über das Trinkwasser + 3 mg/kg Körpergewicht pro Tag Linagliptin über das Standardfutter). Zweimal wöchentlich wurden die Tiere gewogen. Während der 17 Wochen dauernden Behandlungsperiode wurde 6-mal (0, 2, 4, 8, 12 und 16 Wochen nach Beginn der Behandlung) der arterielle systolische Blutdruck gemessen. Die Entnahme von Blut- und Urinproben erfolgte 5, 9, 13 und 17 Wochen nach Behandlungsbeginn. Das Gewebe zur histologischen und proteinbiochemischen Analyse wurde nach Abschluss der 17-wöchigen Behandlungsphase gewonnen.

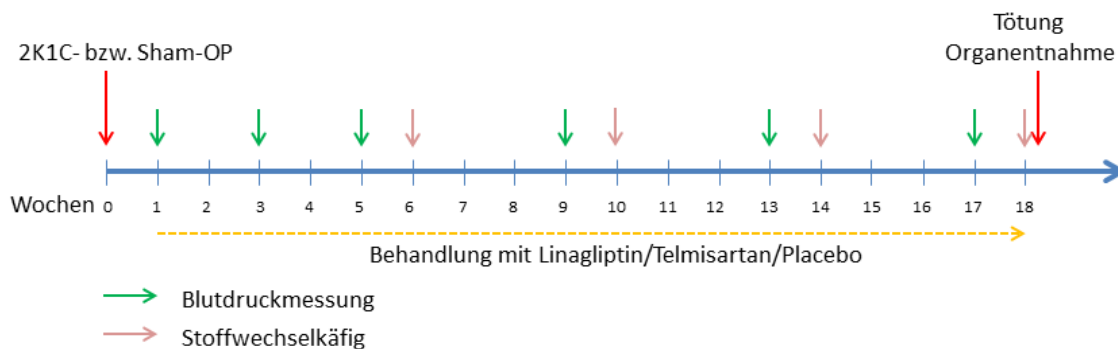


Abbildung 2-1: Zeitliche Abfolge des Tierversuchs

2.6.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden, einer Raumtemperatur von 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 60 % gehalten. Wasser und Standardnahrung standen ihnen ad libitum zur Verfügung.

2.6.3 Induktion der renovaskulären Hypertonie

Zur Induktion der renovaskulären Hypertonie wurde das bereits beschriebene Goldblatt- bzw. 2k1c-Modell verwendet. Um die hierzu notwendige Operation durchführen zu können, wurden die Tiere einer Inhalationsanästhesie mit Isofluran unterzogen. Daraufhin wurde die linke Nie-

renarterie durch eine Laparotomie freigelegt und von der Nierenvene separiert. Dann wurde eine Seidenligatur um die Nierenarterie angelegt. Anschließend wurde eine 23-Gauge-Injektionsnadel in die Ligatur gelegt, diese darüber festgezogen und die Nadel vorsichtig entfernt. Die Shamoperierte Versuchsgruppe wurde der gleichen Prozedur unterzogen. Jedoch wurde bei den Tieren dieser Gruppe nur die Niere mobilisiert und die Gefäße freipräpariert. Eine partielle Ligatur der Nierenarterie erfolgte nicht.

2.6.4 Blutdruckmessung mittels Schwanzplethysmographie

Die Messung des systolischen Blutdrucks erfolgte über die Schwanzarterie mittels der nicht-invasiven „Tail-cuff“-Plethysmographie. Hierzu wurden die Tiere mit einer schmalen Plexiglas-Röhre fixiert und der Blutdruck nach einer angemessenen Eingewöhnungsphase mit einer aufblasbaren Druckmanschette nach der Korotkoff-Methode ermittelt.

2.6.5 Plasmatische DPP-4- und GLP-1-Aktivität

Die Tiere wurden zu vorgegebenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 24 Stunden in einem Stoffwechselkäfig gehalten. Hierbei wurde aus der Schwanzvene Blut gewonnen, wofür die Ratten mit Isofluran anästhetisiert wurden. Das Blut wurde in Ethylendiamintetraacetat-Monovetten (EDTA-Monovetten) überführt und die plasmatischen Anteile mittels Zentrifugation von den zellulären Anteilen getrennt.

Das Messprinzip der plasmatischen DPP-4-Aktivität beruht auf der durch die DPP-4 katalysierten enzymatischen Spaltung eines hinzugegebenen Substrates, das an zweiter Stelle des N-terminalen Endes Prolin oder Alanin enthält. Dieses gespaltene Substrat kann daraufhin mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert werden und hierüber auf die Menge des aktiven DPP-4 rückgeschlossen werden. 20 µl des EDTA-Plasmas wurden mit 30 µl eines DPP-4 Assaypuffers (100 mmol/l TRIS, 100 mmol/l NaCl, HCl entsprechend eines pH-Wertes von 7,8) versetzt und anschließend mit 50 µl des Substrates (100 mmol/l H-Ala-Pro-7-amido-4- trifluoromethylcoumarin) auf einer 96-well Mikrotiterplatte gemischt. Nach einer Inkubation über 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenz mittels des Wallac Victor 1420 Multilabel Counters bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm bestimmt. Das gesamte, d. h. alle endogenen Isoformen umfassende, GLP-1 und das aktive GLP-1 (7-36 und 7-37) wurden Antikörper-basiert im Plasma mittels eines kommerziell verfügbaren Enzyme-

linked Immunosorbent Assays entsprechend der zur Verfügung gestellten Anleitung bestimmt (gesamtes GLP-1: cat. no. K150JVC-1; aktives GLP-1: cat. no. K150JWC-1; Meso Scale Discovery, Rockville, USA).

2.6.6 Tötung und Organentnahme

Am Versuchsende wurden die Tiere durch die Inhalation von 2-3 % Isofluran-O₂ narkotisiert und durch Exsanguination getötet. Dann erfolgten die Entnahme und das Wiegen von Herz und Nieren. Anschließend erfolgte deren histologische und proteinbiochemische Aufbereitung.

2.7 Histologie

2.7.1 Fixierung

Die Herzen wurden sofort nach der Entnahme fixiert, um die unmittelbar einsetzenden Prozesse der Autolyse bzw. Heterolyse aufzuhalten. Hierzu wurden die Organe für 24 Stunden in 4 %ige Formalin-Lösung und anschließend in 70 %ige Ethanol-Lösung überführt.

Bei dem komplexen physikochemischen Prozess der Fixierung werden Proteine vernetzt und das Gewebe erhält eine gummiartige Konsistenz, was den weiteren Prozess der Verarbeitung erleichtert.

2.7.2 Paraffineinbettung

Um die Organe zu stabilisieren und sie in eine für das Schneiden geeignete Konsistenz zu bringen, wurden sie mit Paraffin durchtränkt. Da Paraffin jedoch nicht wasserlöslich ist, mussten die Herzen zuvor in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert werden. Hierzu wurden sie jeweils für eine Stunde in Bäder mit 70 %, 96 % und dreimal 100 % Ethanol gegeben. Zur Entfernung des Alkohols, der sich ebenfalls nicht mit Paraffin vermischt, wurden sie daraufhin zweimal für je 30 Minuten in das Intermedium Neo-Clear® (Xylol-Ersatz) überführt. Im nächsten Schritt wurden die Herzen für zwei Stunden in Paraffin Typ 6 eingebettet, gefolgt von der Einlagerung in Paraffin Typ 9 für mindestens 2 Stunden bis zur Entnahme. Die oben beschriebenen Schritte erfolgten automatisiert mithilfe eines Gewebeeinbettautomaten. Zum Ausgießen der Präparate wurden die Organe den Einbettkassetten entnommen und mit der vorgesehenen Anschnittfläche

nach unten in die schon etwas flüssiges Paraffin 9 enthaltenden Ausgießformen gelegt. Anschließend wurden die Einbettkassetten auf die Ausgießformen gelegt und mit Paraffin 9 aufgefüllt. Nach der Aushärtung des Paraffins auf einer Kühlplatte konnten die Ausgießformen entfernt und die Präparate bei Raumtemperatur eingelagert werden.

2.7.3 Herstellung der Gewebeschnitte

Nach der Einbettung der Organe in jeweils einen Paraffinblock konnten aus diesen mithilfe eines Mikrotoms Schnitte unterschiedlicher Stärke hergestellt werden. Es wurden 1 µm Schnitte für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und 3 µm Schnitte für die Elastica van Gieson- und die Sirius Rot-Färbung gefertigt. Die Gewebeschnitte wurden in ein auf 35-40 °C erwärmtes mit Aqua destillata gefülltes Wasserbad gegeben und daraufhin auf Glasobjektträger aufgezogen. Zur anschließenden Fixierung wurden die Schnitte für 30 Minuten in einen auf 60 °C geheizten Wärmeschrank überführt.

2.7.4 Färbung

Um die verschiedenen Gewebestrukturen im Mikroskop differenzieren und analysieren zu können, ist in der Regel die anschließende Färbung der hergestellten Schnitte notwendig.

Es wurden folgende Färbemethoden angewendet:

1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung für die Vermessung des Kardiomyozytendurchmessers
2. Sirius Rot-Färbung zur Quantifizierung der interstitiellen und perivaskulären Fibrose
3. Elastica van Gieson-Färbung zur Ermittlung der Media/Lumen-Ratio

Das Grundprinzip all dieser Färbemethoden ist gleich und besteht aus den folgenden Schritten:

1. Entparaffinierung und Rehydratation

Um das Paraffin aus den Schnitten zu lösen, wurden diese 2-mal für jeweils 5 Minuten in Xylol gebadet. Anschließend wurde durch Baden in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 % Ethanol für jeweils 2 Minuten) die Hydrophilie der Schnitte gesteigert, um ihre Reaktionsfähigkeit mit den wasserlöslichen Färbelösungen zu erhöhen.

2. Einsatz der Färbelösungen

In diesem Schritt wurde durch den Einsatz verschiedener Färbelösungen die jeweils charakteristische Kontrastierung der Zell- und Gewebestrukturen erreicht.

3. Dehydration und Klärung

Durch darauffolgendes Baden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (kurz in 80 % Ethanol, jeweils für 2 Minuten in 96 % und in 100 % Ethanol) wurden die gefärbten Schnitte dehydriert. Durch die Überführung in ein Xylobad (2-mal für jeweils 5 Minuten) wurde der Alkohol verdrängt und damit eine Verbesserung der Lichtbrechungseigenschaften der Schnitte erreicht.

4. Eindecken

Anschließend wurde DePeX Eindeckmedium auf die Schnitte gegeben und diese mit einem Deckgläschen eingedeckt.

2.7.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine häufig eingesetzte succedane Färbung, bei der mehrere Farbstoffe verschiedene Gewebestrukturen differenziert färben. Der basische Farbstoff Häma-laun, der aus Hämatoxylin aufbereitet wird, führt zu einer bläulich-violetten Färbung basophiler Zellbestandteile, insbesondere der Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure. Der saure Farbstoff Eosin hingegen reagiert mit eosinophilen Strukturen, wie Zellplasmaproteinen und Kollagen, und färbt diese rosa.

Benötigte Färbelösungen

- Häma-laun nach Mayer (fertige Verbrauchslösung)
- 0,5 %ige Eosin-Lösung:
0,5 g Eosin in 100 ml abs. Ethanol lösen und einen Tropfen Eisessig hinzugeben

Durchführung der Färbung

1. Entparaffinierung und Rehydratation
2. Färbung

Kurz spülen mit Aqua dest.

1 Minute baden in Häma-laun nach Mayer

10 Minuten spülen mit fließendem Leitungswasser

Spülen mit Aqua dest.

30 Sekunden baden in 0,5 %iger Eosin-Lösung

Spülen mit Aqua dest.

3. Dehydration und Klärung
4. Eindecken

2.7.4.2 Sirius Rot-Färbung

Die Sirius Rot-Färbung eignet sich zur Visualisierung des Kollagens im Gewebe, da sich die Kollagenfasern rot anfärben, während sich das übrige Gewebe gelb darstellt. Bei dieser Färbung reagieren die anionischen (sauen) Sulfonsäuregruppen des Farbstoffes Sirius Rot mit den kationischen (basischen) Gruppen des Glykoproteins Kollagen bei einem pH-Wert von 2,0. Die anionische Pikrinsäure färbt die Muskulatur und das Zytoplasma gelblich.

Benötigte Färbelösung

0,1 %ige Sirius Rot-Lösung

0,2 g Sirius Rot (als Pulver) in 200 ml gesättigter wässriger Pikrinsäure lösen

Durchführung der Färbung

1. Entparaffinierung und Rehydratation
2. Färbung

60 Minuten baden in 0,1 %iger Sirius Rot-Lösung

Anschließend kurzes Spülen mit 0,01 M HCl in Ethanol
3. Dehydration und Klärung
4. Eindecken

2.7.4.3 Elastica van Gieson-Färbung

Die Elastica van Gieson-Färbung ermöglicht die Darstellung elastischer Bindegewebsfasern und eignet sich damit besonders zur Differenzierung von Gefäßstrukturen. Elastische Fasern bestehen aus dem polymeren Protein Elastin und dem Glykoprotein Fibrillin, die stark sauer sind und den Farbstoff Resorcin-Fuchsin über Oberflächenabsorption binden. Sie kommen dadurch blauviolett

Material und Methoden

zur Darstellung. Das ebenfalls zur Anwendung kommende van Gieson-Gemisch besteht aus zwei Farbstoffen: der feindispersen, hochkonzentrierten Pikrinsäure, die die Muskulatur und das Zytoplasma gelblich färbt und dem grobdispersen, schwachkonzentrierten Säurefuchsin, das in der kurzen Färbezeit nur zu einer Rotfärbung des Bindegewebes führt. Die schwarzbraune Kernfärbung wird mit dem relativ säurefesten Eisenhämatoxylin nach Weigert erreicht.

Benötigte Färbelösungen

Resorcin-Fuchsin nach Weigert

Eisenhämatoxylin nach Weigert

Van Gieson-Gemisch

Durchführung der Färbung

1. Entparaffinierung und Rehydratation (nur bis 80 % Ethanol)

2. Färbung

10 Minuten baden in Resorcin-Fuchsin nach Weigert

3 Minuten spülen mit fließendem Leitungswasser

Mikroskopkontrolle, ob Differenzierung notwendig

Kurzes Spülen mit 1 % HCl-Ethanol, wenn Differenzierung nötig

Mikroskopkontrolle der ausreichenden Differenzierung

Kurzes Spülen mit fließendem Leitungswasser

Spülen mit Aqua dest.

1 Minute baden in 70 % Ethanol

2 Minuten baden in 80 % Ethanol

3 Minuten baden in Eisenhämatoxylin nach Weigert

3 Minuten spülen mit fließendem Leitungswasser

Mikroskopkontrolle

Kurzes Spülen mit 1 % HCl-Ethanol

7 Minuten spülen mit fließendem Leitungswasser

Spülen mit Aqua dest.

Sehr kurzes Baden in van Gieson-Gemisch

3. Dehydratation und Klärung

Entwässerung nur kurz mit 95 % Ethanol, anschließend 2-mal mit 100 % Ethanol je für 1 Minute bzw. 2 Minuten

4. Eindecken

2.7.5 Histologische Auswertung

2.7.5.1 Kardiomyozytendurchmesser

Zur Ermittlung der Kardiomyozytendurchmesser wurden 1 µm dicke, HE gefärbte Schnitte verwendet. Je Präparat wurden mit 100-facher Vergrößerung ca. 30 Aufnahmen von längs angeschnittenen Myozyten des linken Ventrikels und des Kammerseptums angefertigt. Hierzu wurde ein mit einer Farbkamera und dem dazugehörigen Programm Scion Visicapture Application ausgestattetes Mikroskop verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ. Der Durchmesser der Kardiomyozyten wurde auf Höhe des Myozytenkerns quer zum Faserverlauf markiert. Die Länge der Markierung wird durch das Programm in Pixel angegeben. Zur Umwandlung der ermittelten Pixelwerte in die Längeneinheit Meter wurde eine Neubauer-Zählkammer (Kantenlänge eines Quadrates 0,05 mm) mit gleicher Vergrößerung und gleichen Einstellungen abfotografiert, die Kantenlänge eines Quadrates in Pixel vermessen und ein Umrechnungsfaktor bestimmt. Für jedes Organ wurde der Mittelwert aus der Vermessung aller Kardiomyozytendurchmesser berechnet.

2.7.5.2 Interstitielle Fibrose

Zur Analyse des interstitiellen Kollagenfasergehaltes des Myokards wurden von jedem mit Sirius Rot gefärbten Präparat ca. 30 Fotografien gefertigt. Hierzu wurden mit dem Olympus BH-2 Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung Ausschnitte ausgewählt, die möglichst frei von Gefäßen oder Artefakten waren und mit einer integrierten Digitalkamera aufgenommen. Die Aufnahmen wurden dann morphometrisch mithilfe von ImageJ ausgewertet. Hierzu wandelte die Software auf Grundlage von Pixel-Intensitäten eines aus der Originalaufnahme generierten Graustufenbildes die Aufnahme in schwarze und weiße Flächen um. Die schwarzen Areale entsprachen hierbei dem kollagenhaltigen, fibrotisch umgebauten Gewebe. Der Grenzwert für die Pixel-Intensität, ab der das Areal sich schwarz darstellte, wurde im Vergleich zum Originalbild angepasst. Um Risse und Artefakte nicht als vermeintliches Gewebe in die quantitative Analyse miteinzubeziehen, wurde ein zweiter Schwellenwert festgelegt. Der kardiale Kollagenfasergehalt wurde daraufhin als prozentualer Anteil der schwarzen Areale im Verhältnis zum Gesamtgewebe ermittelt. Für jedes Organ wurde der Mittelwert aus der Analyse aller Ausschnitte gebildet.

2.7.5.3 Perivaskuläre Fibrose

Zur Ermittlung des Ausmaßes der Fibrosierung um die myokardialen Arterien wurden in den Sirius Rot gefärbten Präparaten alle quer angeschnittenen Arterien, deren Gefäßwand von gleichmäßiger Stärke war, aufgesucht und abfotografiert. Anhand eines Scoring-Systems wurde der Durchmesser des das Gefäß umgebenden Fibrosegürtels visuell mit dem Durchmesser der Gefäßmedia verglichen. Hierbei wurden 5 Schweregrade unterschieden: 1 (0 % - 25 %), 2 (26 % - 50 %), 3 (51 % - 75 %), 4 (76 % - 100 %), 5 (> 100 %). So entspricht beispielsweise der Score von 2 einem Durchmesser der perivaskulären Fibrose von 26 % - 50 % des Durchmessers der Gefäßmedia. Zur anschließenden Ermittlung des perivaskulären Fibroseindex eines Präparates wurde der Mittelwert aus den jeweiligen Schweregraden des Präparates gebildet.

Da es sich hierbei um eine subjektive Methode handelt, wurde das Scoring von zwei Personen durchgeführt, die in Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit der Präparate verblindet waren. Daraufhin wurde der Mittelwert der Indices beider Personen ermittelt.

2.7.5.4 Media/Lumen-Ratio

Zur Ermittlung der Media/Lumen-Ratio wurden 3 µm dicke mit Elastica van Gieson gefärbte Präparate verwendet. Mit dem Mikroskop wurden bei 20-facher Vergrößerung alle quer angeschnittenen myokardialen Arterien aufgesucht und mit der Farbkamera und dem dazugehörigen Programm Scion Visicapture Application abfotografiert. Die Analyse der Bilder erfolgte mit dem Programm ImageJ. Mithilfe eines Zeichentools des Programms wurden die innere und die äußere Begrenzung der arteriellen Media umfahren und somit der Gesamt- und der Lumenumfang der Gefäße in Pixel bestimmt. Durch Anwendung der Kreisformel ließ sich hieraus der Flächeninhalt der Media und des Gefäßlumens berechnen.

Es gilt: $A = \pi \cdot r^2$ (A = Flächeninhalt, $\pi = \text{ca. } 3,14159$, r = Radius)

$$U = 2 \cdot \pi \cdot r \text{ (U = Umfang)}$$

Durch Umstellen und Einsetzen ergibt sich daraus folgende Formel:

$$A = \pi \cdot (U / (2 \cdot \pi))^2$$

Mit dieser Formel ließen sich anschließend die Mediafläche und die Media/Lumen-Ratio berechnen:

$$A_{\text{Media}} = A_{\text{Gesamt}} - A_{\text{Lumen}}$$

$$\text{Media/Lumen-Ratio} = A_{\text{Media}} / A_{\text{Lumen}}$$

2.8 Proteinbiochemische Analyse

Zur Quantifizierung der Expression verschiedener kardialer Proteine wurde das Western Blot-Verfahren angewendet. Dieses Verfahren beruht auf dem Transfer eines zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteingemisches auf eine Nitrozellulosemembran, auf der die Proteine unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen und densitometrisch quantifiziert werden.

2.8.1 Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Proteinanalyse wurde Herzgewebe aus dem Bereich des Apex verwendet, der neben dem linken Ventrikel auch aus Anteilen des rechten Ventrikels und des Ventrikelseptums besteht. Nach der Präparation wurde das Gewebe zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Zur Extraktion der Proteine wurde das Probenmaterial in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gemörsert, in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Je 100 mg Probenmaterial wurde 1 ml Pufferlösung mit Proteaseinhibitor zugegeben, die zur Lyse der Zellen führte, und dieses mit einem Vortexmischer gründlich durchmischt. Anschließend wurden die Proben einer Ultraschallbehandlung unterzogen, bei der diese in insgesamt 5 Zyklen jeweils 3-mal für 10 Sekunden beschallt wurden. Der mechanische Effekt der Ultraschallwellen bewirkt eine Desintegration der Zellstruktur und ermöglicht somit ein besseres Eindringen des Lysepuffers und die vollständige Freisetzung der zellulären Proteine. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 12 Minuten mit einer Drehzahl von 12 000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Proteinbestimmung abpipettiert. Im nächsten Schritt erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit die kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration in dem lysierten Probenmaterial. Die Methode beruht darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung mit zweiwertigen Kupferionen (Cu^{2+}) Komplexe bilden und diese dabei zu einwertigen Kupferionen (Cu^{+}) reduzieren (Biuret-Reaktion). Die Cu^{+} -Ionen reagieren daraufhin mit BCA und bilden einen violetten Farbkomplex. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde im Photometer bei 562 nm gemessen. Durch den Abgleich der ermittelten Absorptionswerte mit Standardkurven konnte die Konzentration der Proteine bestimmt werden. Die Messung wurde mit 1:50 verdünnten Proteinlysaten in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt. Zur Erstellung der Standardkurven wurde die Messung mit bovinem Serumalbumin als Referenzprotein in den Konzentrationen 50, 100, 250, 500, 750, 1000 und 2000 $\mu\text{g/ml}$ wiederholt. Nach Bestimmung

der Absorption des Referenzproteins bei 562 nm wurde eine Referenzgerade ($y = mx + n$) mittels linearer Regression ermittelt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes x ($\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde anschließend die Absorption der jeweiligen Proteinprobe mit der Referenzgeraden abgeglichen:

$$x = \frac{y - n}{m}$$

y = Absorption bei 562 nm

n = y-Achsenabschnitt

m = Steigung

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben auf eine einheitliche Konzentration von $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Für die Standardreihe wurde ferner ein homogener Mix aus allen Proben ebenfalls mit der Konzentration von $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ hergestellt. Sämtliche Proben wurden anschließend bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

2.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung der einzelnen Proteine des Proteingemisches entsprechend ihrer Größe. Durch die Behandlung mit dem anionischen Detergenz SDS kommt es zu einem Verlust der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine. Zudem wird durch die Anlagerung des SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass diese gleichmäßig negativ geladen sind. Die Wandergeschwindigkeit bei der sich darauf anschließenden Trennung im Polyacrylamidgel hängt folglich von der Länge der Polypeptidketten ab, die die Proteine bilden und ist proportional zur Molekülmasse. Ein weiterer Faktor, der die Geschwindigkeit der Auftrennung beeinflusst, ist die Konzentration des Acrylamids, die den Vernetzungsgrad des Gels bestimmt. Aus diesem Grund wurde die Zusammensetzung der Trenngele der Molekülmasse der nachzuweisenden Proteine angepasst. Für BNP (15 kDa) wurde 12 %iges Acrylamidgel verwendet. Für den Nachweis des GLP-1-Rezeptors (53 kDa) wurde 10 %iges Acrylamidgel und für den Nachweis von kardialem DPP-4 (110 kDa) und Kollagen-1 α (190 kDa) wurde 8 %iges Acrylamidgel verwendet. Für die Auftrennung der Proteine kam das diskontinuierliche elektrophoretische System nach Laemmli zum Einsatz [Laemmli UK, 1970], das aus einem weitporigen Sammelgel und einem engmaschigen Trenngel besteht. Zur Herstellung der Sammel- bzw. Trenngele wurde ein definiertes Acrylamid-

Bisacrylamid-Gemisch (Rotiphorese® Gel 30) mit SDS und einem Sammel- (1,0 M TRIS, pH 6,8) bzw. Trenngelpuffer (1,5 M TRIS, pH 8,8) gemischt. Zur Einleitung der Kettenpolymerisation wurden die Lösungen mit dem Reaktionsstarter APS und dem Katalysator TEMED versetzt. Um einen Abbruch der Polymerisation durch Sauerstoffmoleküle, die freie Radikale abfangen, zu verhindern, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Unter Raumtemperatur waren das Trenngel nach ca. 1 Stunde und das Sammelgel nach ca. 45 Minuten auspolymerisiert. Nach dem Einbringen der Gelhalterung in die Elektrophoresekammer wurden die äußere und dann die innere Kammer mit dem vorbereiteten Elektrophorese-Laufpuffer aufgefüllt. Für die Standardreihe wurde aus dem zuvor hergestellten Probenmix eine Proteinreihe mit ansteigenden Konzentrationen von je 20, 30, 40 und 60 µg/ml hergestellt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Proteinproben und der Probenmix der Standardreihe mit dem gebrauchsfertigen Ladepuffer (Roti®-Load 1) versetzt. Das hierin enthaltene SDS und das β-Mercaptoethanol führten zu der eingangs erwähnten Denaturierung der Proteine und zur Überdeckung ihrer Eigenladung. Nach Durchmischung mit dem Vortexer wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Im nächsten Schritt wurde die Flüssigkeit abzentrifugiert. Die Taschen jedes Gels wurden jeweils mit der Standardreihe und mit den zu untersuchenden Proteinproben (à ca. 40 µg) beladen, wobei jede Probe in einem Gel doppelt aufgetragen wurde. Die Proben wurden zur besseren Orientierung von einem Molekulargewichtsmarker flankiert. Die anschließende Elektrophorese erfolgte im Kühlraum bei einer Temperatur von 4 °C. In der 30-minütigen Sammelphase der Elektrophorese wurde eine Spannung von 80 V angelegt. In der darauffolgenden Auftrennungsphase wurde für 2,5 Stunden eine Spannung von 110 V angelegt.

2.8.3 Western Blotting

Zur Ermöglichung weiterer Analysemethoden wurden die aufgetrennten Proteine durch die Western Blotting-Technik im Semi-Dry-Blot-Verfahren von dem Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Durch hydrophobe Wechselwirkungen und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken wird eine Immobilisierung der Proteine erreicht, sodass sie den weiteren Nachweismethoden besser zugänglich.

Hierfür wurde zunächst eine Nitrozellulosemembran für 2 Minuten in destilliertem Wasser aktiviert. Anschließend wurden die Gele aus der Elektrophoresekammer genommen und das vom Sammelgel separierte Trenngel, die aktivierte Nitrozellulosemembran und vier auf die richtige Größe zugeschnittene Whatman Papiere für 10 Minuten in einen Transferpuffer überführt. Im

nächsten Schritt wurde auf dem Semi-Dry-Blotter ein „Sandwich“ aus zwei Whatman Papieren, der aktivierten Nitrozellulosemembran, dem blasenfrei aufgetragenen Trenngel und abschließend zwei weiteren Whatman Papieren aufgeschichtet. Das Blotting erfolgte bei einer konstant angelegten Spannung von 25 V für 60 Minuten.

2.8.4 Quantifizierung der Proteinexpression

Zur Quantifizierung der Proteinexpression wurde ein primärer Antikörper verwendet, der mit den spezifischen Bindungsregionen der Antigene interagiert. Anschließend wurde ein Enzymgekoppelter sekundärer Antikörper hinzugegeben, der den primären Antikörper bindet und die für den Nachweis genutzte Chemilumineszenzreaktion katalysiert.

Um zu verhindern, dass die verwendeten primären Antikörper unspezifisch an die freien Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran binden, wurden diese mittels fünfprozentiger Milchlösung in TBS-T (5 % (w/v)) geblockt. Der Vorgang dauert 1 Stunde bei Raumtemperatur. Zur Entfernung überschüssiger Milchproteine wurde die Membran anschließend 3-mal für jeweils 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Über Nacht erfolgte daraufhin bei 4 °C die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper (s. Tabelle 1: Spezifika der verwendeten Antikörper). Am darauffolgenden Tag wurden überschüssige Antikörper entfernt, indem die Membran 2-mal kurz und dann 3-mal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG-Antikörper in 4 % (w/v) TBS-T-BSA (bovine serum albumin)) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Auch hier schlossen sich die zuvor genannten Waschschrte an, um ungebundene sekundäre Antikörper zu entfernen. Zur Sichtbarmachung des gebundenen sekundären Antikörpers erfolgte die Inkubation mit einer ECL-Lösung. Hierzu wurden die ECL-Lösung 1 und die ECL-Lösung 2 in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und anschließend die Membranen für 3 Minuten hierin inkubiert. Die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase katalysiert das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol zu Phtalat, wodurch es zu Chemilumineszenz kommt. Das emittierte Licht wurde mittels eines Autoradiographie Films in der Dunkelkammer sichtbar gemacht und dieser nachfolgend in einem vollautomatischen Entwicklungsautomaten entwickelt. Zur Auswertung wurden die Filme eingescannt.

Material und Methoden

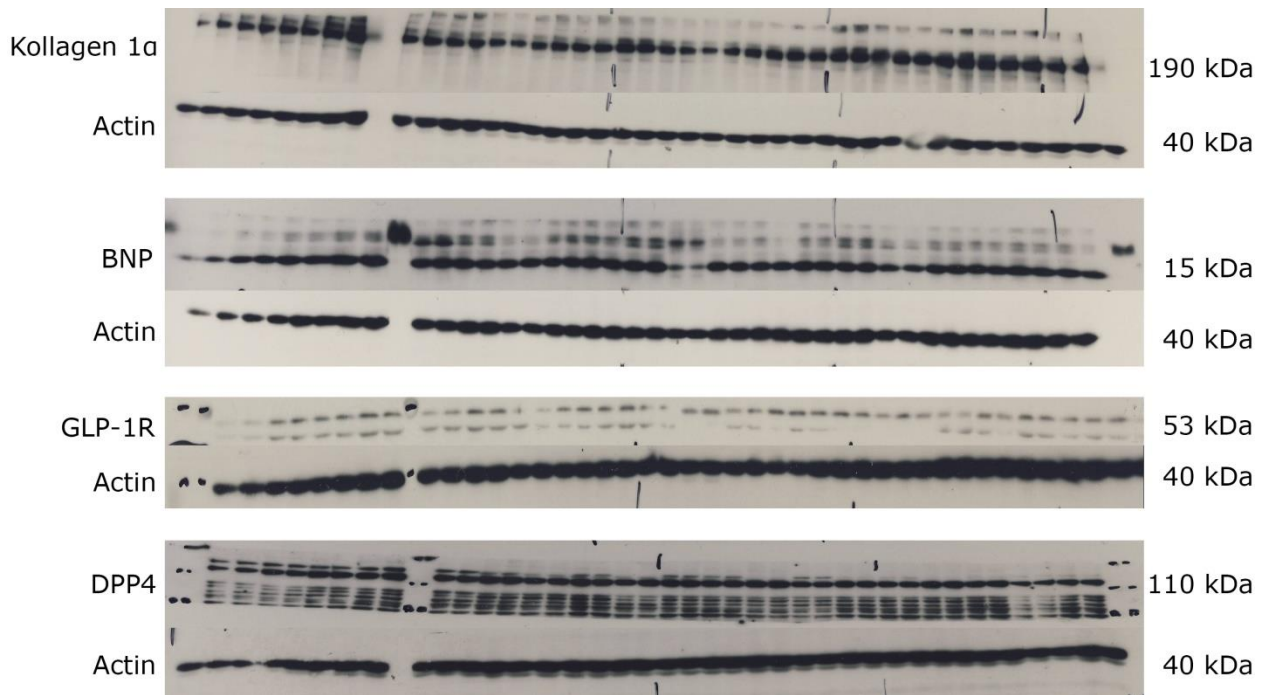


Abbildung 2-2: Repräsentative Aufnahmen der ausgewerteten Proteinbanden mit den korrespondierenden Aktinbanden zur Ermittlung einer zum Aktingehalt der Probe relativen Proteinkonzentration.

Die densitometrische Quantifizierung der Proteine erfolgte mit dem Programm AlphaEaseFC durch Ermittlung der Signalintensitäten der Protein-spezifischen Banden. Hierfür wurde für jede Probe die Signalintensität der Bande (IDV, integrated density value) bestimmt und hiervon das Produkt aus der Fläche (Area) der vermessenen Bande und der durchschnittlichen Intensität des Hintergrundes ($AVG_{\text{Hintergrund}}$) subtrahiert. Um die unterschiedlichen Untersuchungsbedingungen auszugleichen, wurde aus den bei jedem Western Blot-Zyklus mitlaufenden Standardreihen mittels linearer Regression eine Referenzgerade ($y = mx + n$) ermittelt. Analog zum Vorgehen in Abschnitt 2.8.1 wurden die ermittelten Werte der Protein-spezifischen Banden mit der Referenzgeraden abgeglichen.

Im nächsten Schritt wurden die erhaltenen Signalintensitäten durch die auf die gleiche Weise ermittelten Signalintensitäten der Aktinbande dividiert. Hierdurch war es möglich, eine zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration des Zielproteins zu bestimmen, da der Aktingehalt aller Proben identisch sein sollte. Der Proteingehalt der Shamgruppe wurde auf 1 normalisiert.

2.9 Statistische Analyse

Für die Durchführung der statistischen Analysen und die Erstellung der Grafiken wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet. Alle Gruppenparameter werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Extreme Ausreißer ($p < 0,01$) wurden mithilfe des Ausreißertests nach Grubbs ermittelt und aus der Analyse ausgeschlossen. Ein solcher Ausreißer fand sich lediglich bei den Ergebnissen der Media/Lumen-Ratio.

Alle Werte wurden mittels Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung hin untersucht. Die Voraussetzung einer Normalverteilung für die Durchführung einer ANOVA wurde angenommen, wenn mindestens drei der vier Behandlungsgruppen (Placebo, Telmisartan mono, Linagliptin mono, Kombination) diese erfüllten.

Zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den vier genannten Behandlungsgruppen bei den auf einen Zeitpunkt bezogenen Parametern (Plasmaparameter, Herzmorphologie, kardiale Proteinexpression) erfolgte eine einfaktorielle ANOVA. Zur Analyse des arteriellen systolischen Blutdrucks erfolgte eine zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung. Bei einem signifikanten Ergebnis wurde der Bonferroni-Post-Hoc-Test angeschlossen.

Die Analyse statistisch signifikanter Unterschiede zwischen der Sham- und der Placebogruppe erfolgte bei den auf einen Zeitpunkt bezogenen Parametern mittels des ungepaarten t-Tests. Wenn in der Sham- bzw. Placebogruppe keine Normalverteilung angenommen werden konnte, erfolgte die statistische Analyse mittels des Mann-Whitney-Tests.

Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

Die erhobenen Daten zur kardialen Morphologie und Proteinexpression verstehen sich als Teilprojekt im Rahmen eines umfangreichen Tierexperiments. Um die Einbettung der Ergebnisse in den Kontext zu ermöglichen, sind im Folgenden zur Ergänzung einige der im Vorfeld erhobenen und bereits publizierten Daten aufgeführt (Plasmaparameter des Tiermodells, arterieller systolischer Blutdruck, Körper- und Herzgewicht).

3.1 Plasmaparameter des Tiermodells

Als Parameter für die Effektivität der inhibierenden Wirkung von Linagliptin wurde die DPP-4-Aktivität in den Plasmaproben aus der ersten Runde der Untersuchungen im Stoffwechselkäfig 6 Wochen nach der 2k1c-Operation gemessen (Abbildung 3-1). Zwischen der Sham- und der Placebogruppe ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der DPP-4-Aktivität. Jedoch nahm diese durch die Behandlung mit Linagliptin mono um 72,5 % ($p < 0,001$) bzw. durch die Kombinationstherapie um 73,2 % ($p < 0,001$) gegenüber der Placebogruppe ab.

Als weitere Effektivitätsparameter wurden 18 Wochen nach der 2k1c-Operation die Konzentration des Gesamt-GLP-1 (Summe aus aktivem und gespaltenem GLP-1) und des aktiven GLP-1 im Plasma gemessen (Abbildung 3-2). Zwischen der Sham- und der Placebogruppe ergaben sich keine Unterschiede in der Konzentration des Gesamt-GLP-1 und des aktiven GLP-1. Durch die Gabe von Linagliptin mono und durch die Kombination mit Telmisartan kam es zu einem 10 bis 14-fachen Anstieg der Konzentration des aktiven GLP-1 ($p < 0,001$). Auch die Konzentrationen des Gesamt-GLP-1 stiegen durch diese Therapieregime signifikant an.

Ergebnisse

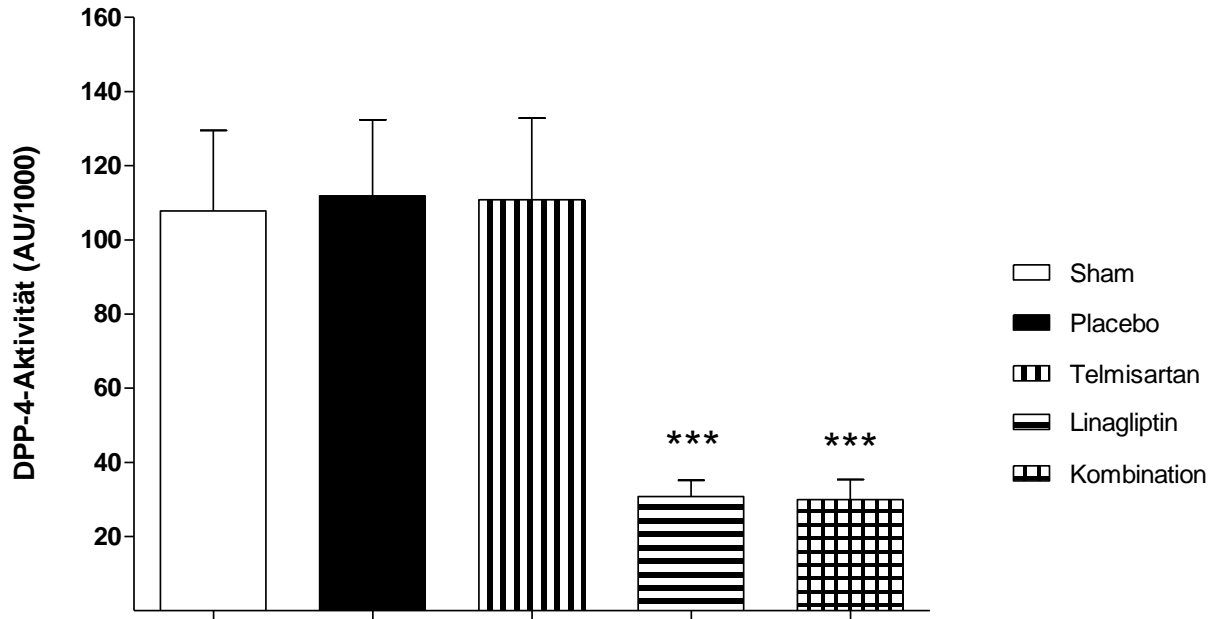


Abbildung 3-1: DPP-4-Aktivität (AU/1000) nach 6 Wochen. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferroni-Post-Hoc-Test für Vergleiche zwischen den Behandlungsgruppen. Ungepaarter t-Test für den Vergleich Sham vs. Placebo; (***) $p < 0,001$ vs. Placebo.

Ergebnisse

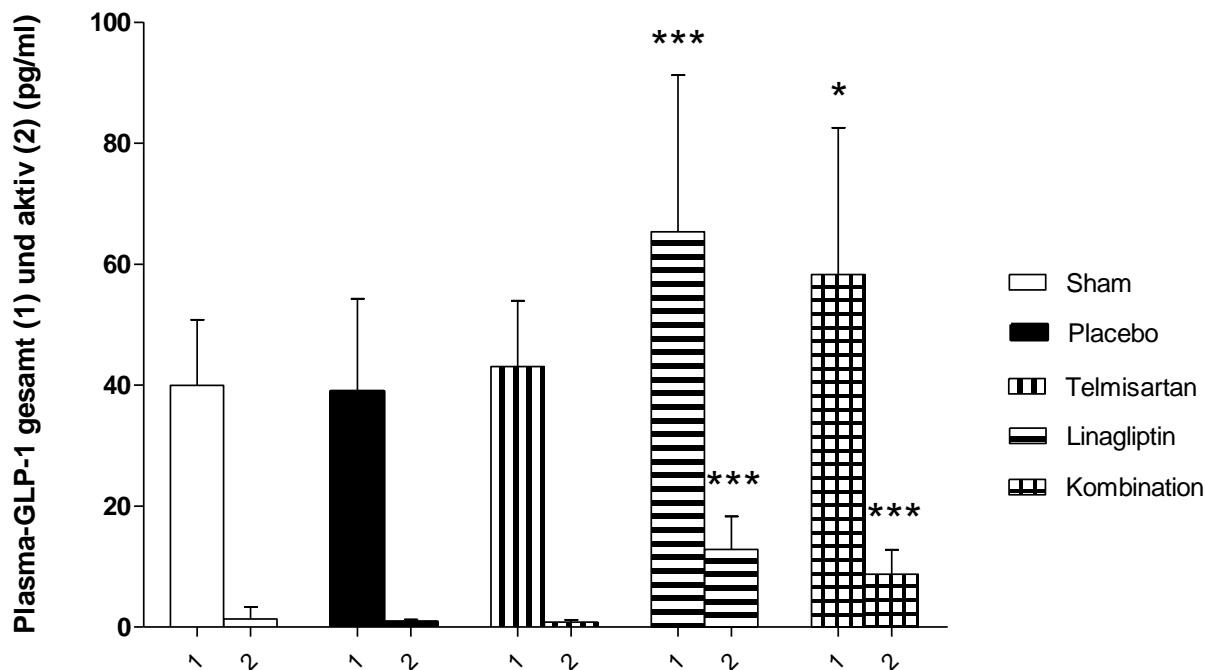


Abbildung 3-2: Plasma-GLP-1 gesamt und aktiv (pg/ml) am Ende des Experiments. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferroni-Post-Hoc-Test für Vergleiche zwischen den Behandlungsgruppen und ungepaartem t-Test (Plasma GLP-1 gesamt) bzw. Mann-Whitney-Test (Plasma GLP-1 aktiv) zwischen Sham und Placebo; (*) $p < 0,05$ vs. Placebo; (***) $p < 0,001$ vs. Placebo.

3.2 Arterieller systolischer Blutdruck

Bei den 2k1c-operierten Ratten war ein signifikanter Blutdruckanstieg im Vergleich zu den Sham-operierten Ratten nachweisbar (Abbildung 3-3). Diese Blutdruckveränderung zeigte sich bereits bei der ersten Messung 7 Tage nach Durchführung der Operation. Insgesamt entwickelten 82,3 % der ligierten und mit Placebo behandelten Tiere eine arterielle Hypertonie, definiert als ein systolischer Blutdruck von ≥ 150 mmHg über einen Zeitraum von mind. 4 Wochen. Der systolische Blutdruck blieb in der Placebogruppe während der gesamten Versuchsdauer signifikant höher als in der Shamgruppe. Die Gabe von Telmisartan mono führte innerhalb von 4 Wochen nach Beginn der Behandlung zu einem signifikanten Absinken des arteriellen systolischen Blutdrucks. Durch die Kombinationstherapie mit Telmisartan und Linagliptin war bereits 2 Wochen nach Beginn der Behandlung eine Reduktion des arteriellen systolischen Blutdrucks auf Normal-

Ergebnisse

niveau zu verzeichnen. Darüber hinaus zeigte sich in der Kombinationsgruppe der Trend zu einem niedrigeren systolischen Blutdruck als bei der Gabe von Telmisartan mono. Auch bei der Gabe von Linagliptin mono zeichnete sich ein Trend zu einem geringeren systolischen Blutdruck im Vergleich zur Placebogruppe ab. Die Werte erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

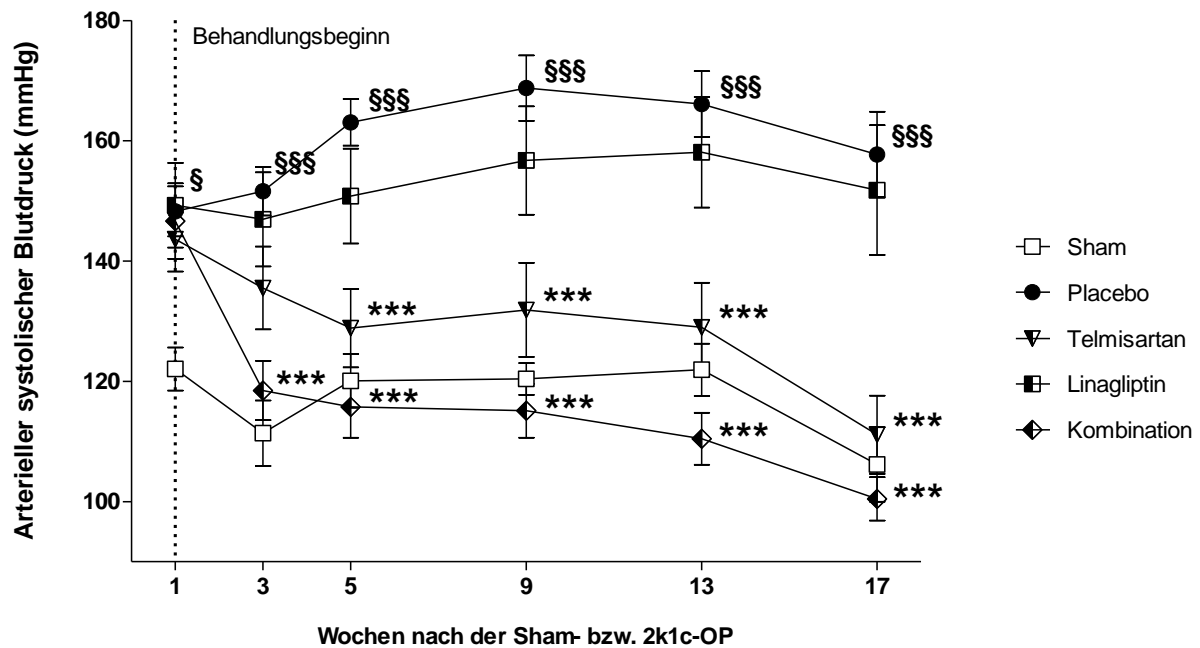


Abbildung 3-3: Entwicklung des arteriellen systolischen Blutdrucks (mmHg) über die Zeit des Experiments. Es sind Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben; statistische Analyse mit zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholung mit Bonferroni-Post-Hoc-Test über die Zeit von 1-17 Wochen nach der Sham- bzw. 2k1c-OP; (§) $p < 0,05$ vs. Sham; (§§§) $p < 0,001$ vs. Sham; (***) $p < 0,001$ vs. Placebo.

3.3 Herzmorphologie

3.3.1 Herzgewicht absolut und relativ zum Körpergewicht

Zur Ermittlung des relativen Herzgewichts wurde das absolute Herzgewicht (in mg) durch das Körpergewicht der Tiere (in g) geteilt. Das relative Herzgewicht war bei den mit Placebo behandelten 2k1c-Tieren signifikant höher als in der Gruppe der Sham-operierten Tiere (Tabelle 2). Durch die Behandlung mit Telmisartan mono und auch durch die Kombinationstherapie aus Telmisartan und Linagliptin konnte eine signifikante Reduktion des relativen Herzgewichts im Vergleich zur Placebogruppe verzeichnet werden. Die Monotherapie mit Linagliptin hatte keinen Einfluss auf das absolute und das relative Herzgewicht.

Tabelle 2: Absolutes und relatives Herzgewicht (g; mg/g) am Ende des Experiments. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferroni-Post-Hoc-Test für den Vergleich der Behandlungsgruppen und ungepaartem t-Test für den Vergleich Sham vs. Placebo; (§) $p < 0,05$ vs. Sham; (§§§) $p < 0,001$ vs. Sham; (**) $p < 0,01$ vs. Placebo; (***) $p < 0,001$ vs. Placebo.

	Sham	Placebo	Telmisartan	Linagliptin	Kombination
Anzahl der Tiere	11	17	14	15	15
Körpergewicht (g)	583,4 \pm 40,6	564,6 \pm 89,8	519,9 \pm 109,8	558,2 \pm 79,5	551,3 \pm 65,5
Herzgewicht (g)	1,39 \pm 0,23	1,77 \pm 0,42 [§]	1,26 \pm 0,49 ^{**}	1,70 \pm 0,33	1,31 \pm 0,27 ^{**}
Herz-/Körpergewicht (mg/g)	2,39 \pm 0,37	3,1 \pm 0,39 ^{§§§}	2,42 \pm 0,67 ^{***}	3,04 \pm 0,43	2,37 \pm 0,31 ^{***}

3.3.2 Kardiomyozytendurchmesser

Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kardiomyozytendurchmessern der Sham- und der Placebogruppe, wobei rein numerisch betrachtet ein etwas größerer mittlerer Kardiomyozytendurchmesser in der Placebogruppe ablesbar war (Abbildung 3-4; Abbildung 3-5). Sowohl durch die Monotherapie mit Telmisartan als auch durch die zusätzliche Gabe von Linagliptin kam es zu einer signifikanten Reduktion des Kardiomyozytendurchmessers im Vergleich zur Placebogruppe ($p < 0,01$). Die Monotherapie mit Linagliptin hatte keinen Einfluss auf den Durchmesser der Kardiomyozyten.

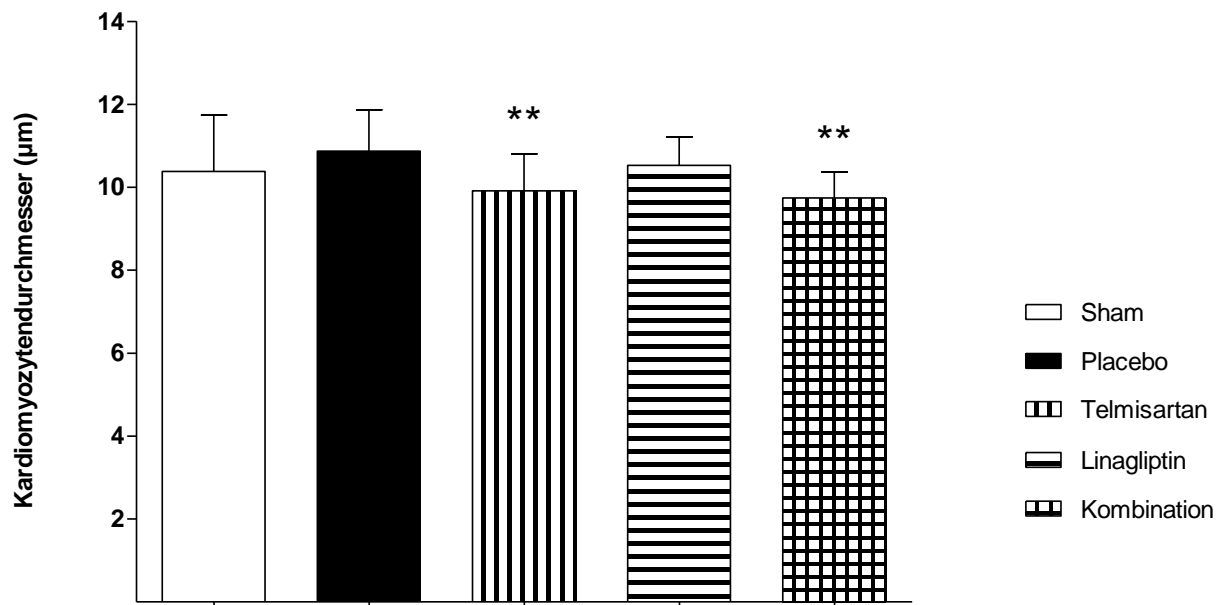


Abbildung 3-4: Kardiomyozytendurchmesser am Ende des Experiments. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferroni-Post-Hoc-Test für die Behandlungsgruppen und ungepaartem t-Test für den Vergleich Sham vs. Placebo; (**) $p < 0,01$ vs. Placebo.

Ergebnisse

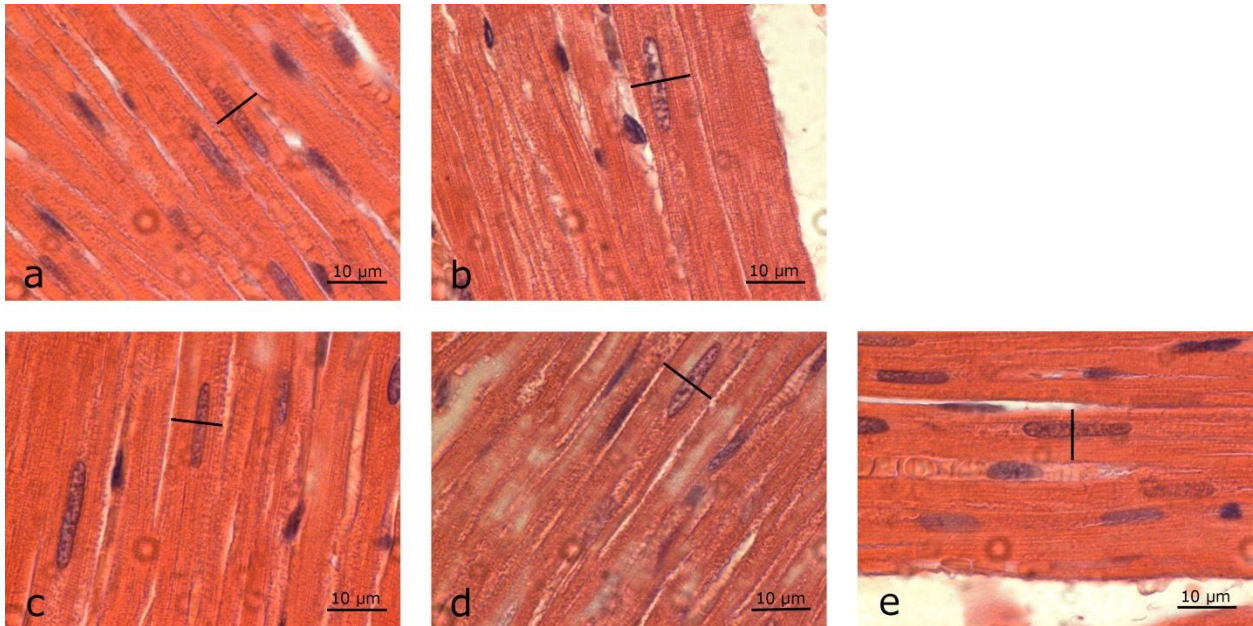


Abbildung 3-5: Repräsentative Aufnahmen der Kardiomyozytendurchmesser am Ende des Experiments. Die Aufnahmen entsprechen der (a) Sham-, (b) Placebo-, (c) Telmisartan mono-, (d) Linagliptin mono-, (e) Kombinationsgruppe.

3.3.3 Media/Lumen-Ratio

Bei den 2k1c-operierten Tieren konnte im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine veränderte Architektur der myokardialen Widerstandsgefäße beobachtet werden. Der erhöhte arterielle Druck führte zu einer Hypertrophie der glatten Muskelzellen der Media und damit einhergehend zu einer Reduktion des intravasalen Lumens. Ausdruck fand dies in einer Zunahme der Media/Lumen-Ratio in der Placebogruppe (Abbildung 3-6; Abbildung 3-7). Die Monotherapie mit Telmisartan bzw. Linagliptin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Media/Lumen-Ratio. Jedoch zeigte sich durch die Kombination beider Substanzen eine signifikant geringere Media/Lumen-Ratio im Vergleich mit der Placebogruppe.

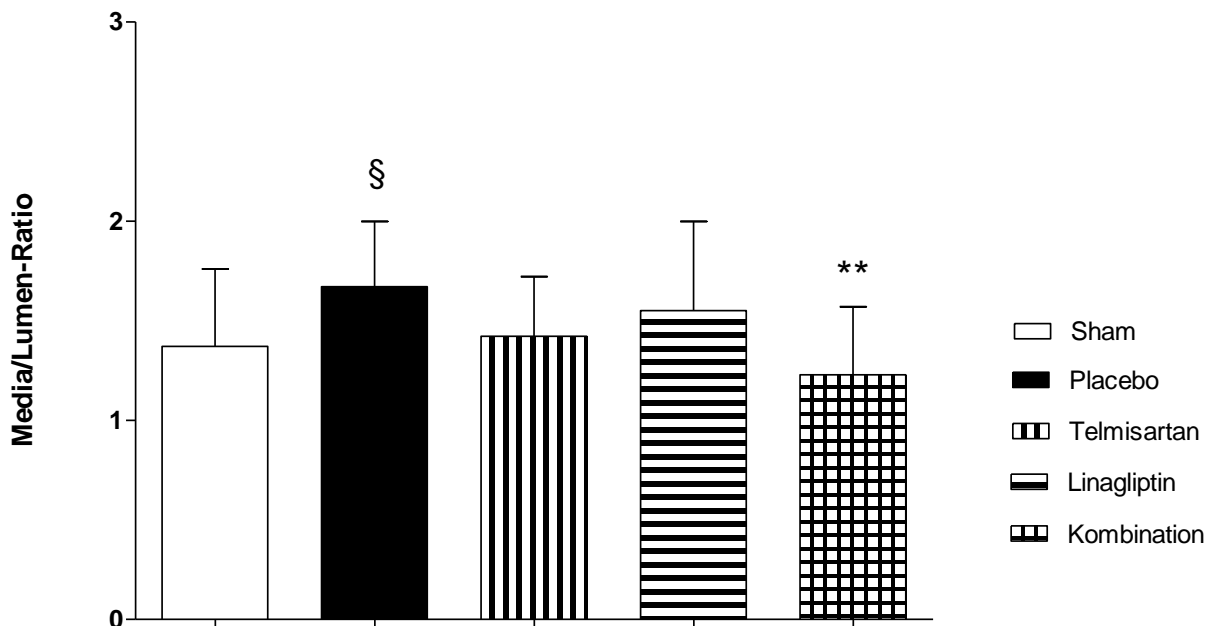


Abbildung 3-6: Media/Lumen-Ratio der myokardialen Arterien am Ende des Experiments.

Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferroni-Post-Hoc-Test für den Vergleich der Behandlungsgruppen und ungepaartem t-Test für den Vergleich Sham vs. Placebo; (§) $p < 0,05$ vs. Sham, (**) $p < 0,01$ vs. Placebo.

Ergebnisse

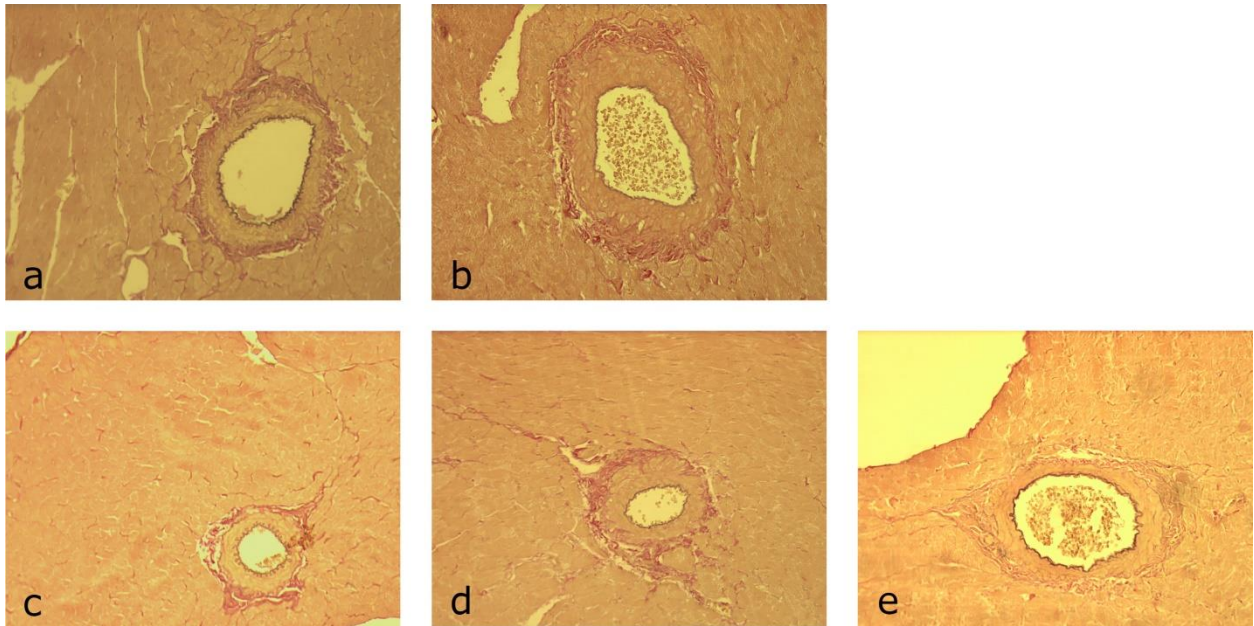


Abbildung 3-7: Repräsentative Aufnahmen der Media/Lumen-Ratio der myokardialen Arterien am Ende des Experiments. Die Aufnahmen entsprechen der (a) Sham-, (b) Placebo-, (c) Telmisartan mono-, (d) Linagliptin mono-, (e) Kombinationsgruppe.

3.3.4 Interstitielle Fibrose

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der kardialen interstitiellen Fibrose zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 3-8; Abbildung 3-9).

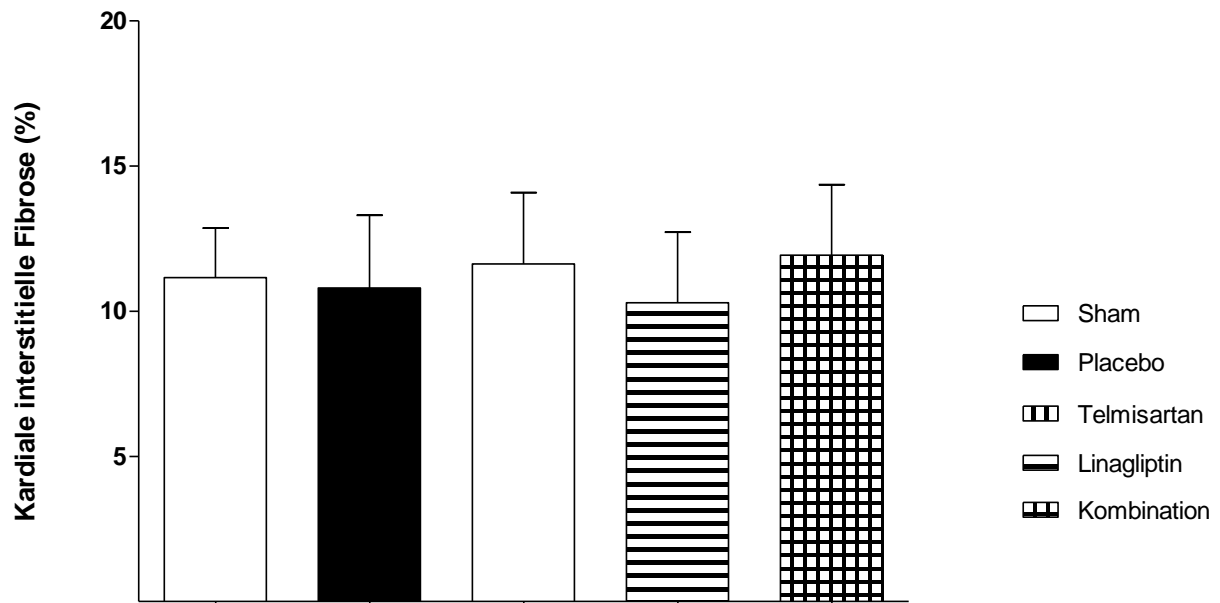


Abbildung 3-8: Kardiale interstitielle Fibrose (Bindegewebeanteil im Interstitium in %) am Ende des Experiments. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferroni-Post-Hoc-Test für die Behandlungsgruppen und ungepaartem t-Test für den Vergleich Sham vs. Placebo; keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Ergebnisse

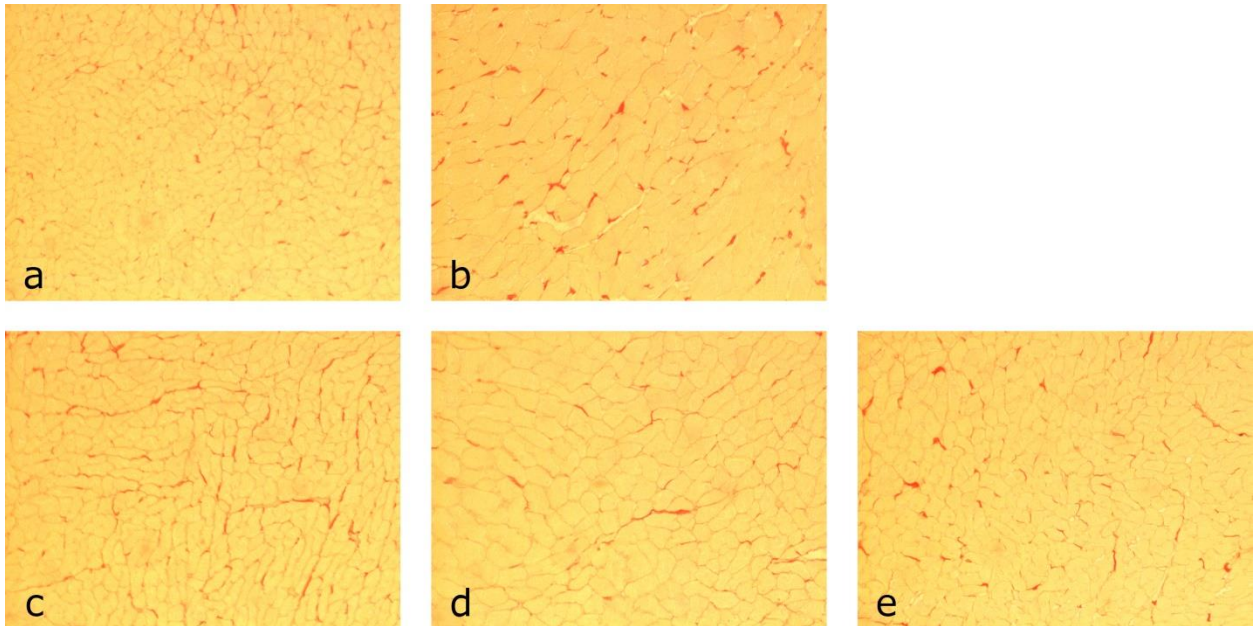


Abbildung 3-9: Repräsentative Aufnahmen der kardialen interstitiellen Fibrose am Ende des Experiments. Die Aufnahmen entsprechen der (a) Sham-, (b) Placebo-, (c) Telmisartan mono-, (d) Linagliptin mono-, (e) Kombinationsgruppe.

3.3.5 Perivaskuläre Fibrose

In der Placebogruppe zeichnete sich der Trend ($p = 0,10$) zu einer vermehrten perivaskulären Fibrose ab, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 3-10; Abbildung 3-11). Auch durch die Behandlung mit Telmisartan bzw. Linagliptin in der Monotherapie und in der Kombinationstherapie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der kardialen perivaskulären Fibrose.

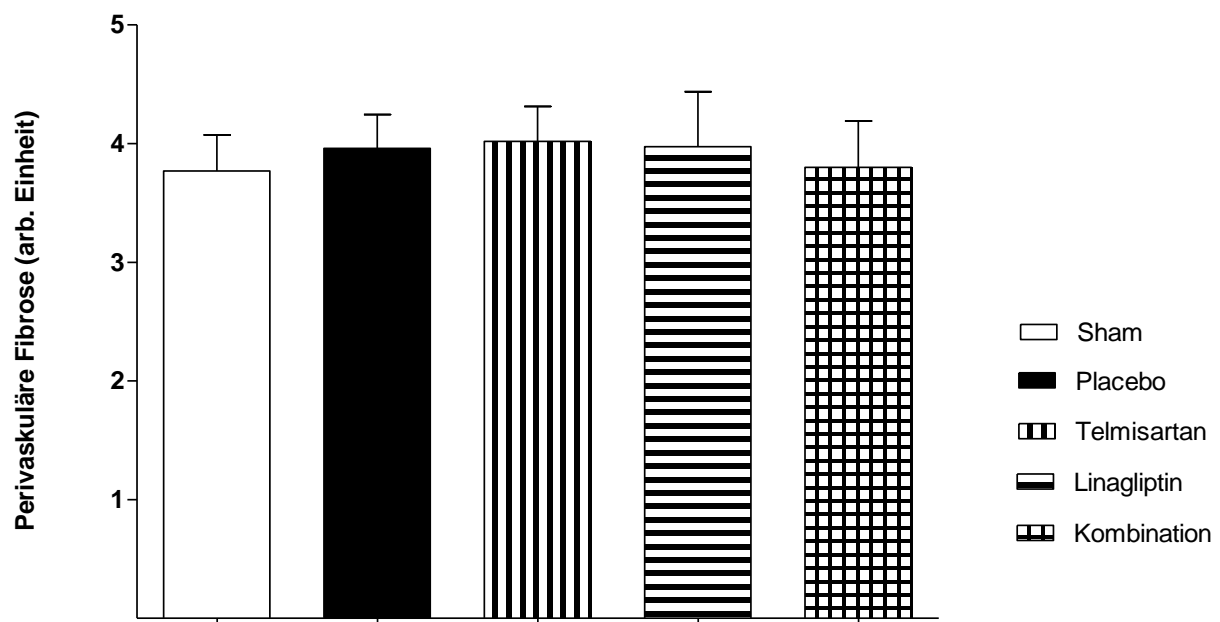


Abbildung 3-10: Kardiale perivaskuläre Fibrose am Ende des Experiments. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferroni-Post-Hoc-Test für den Vergleich der Behandlungsgruppen und ungepaartem t-Test für den Vergleich Sham vs. Placebo; keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen; Sham vs. Placebo ($p = 0,10$).

Ergebnisse

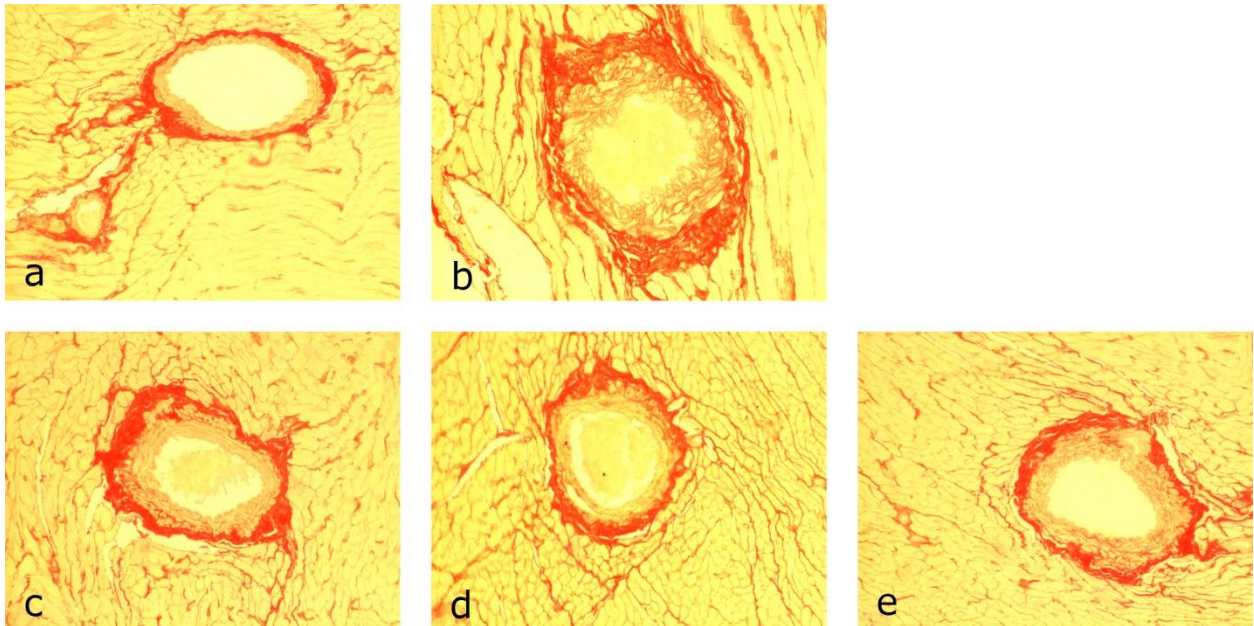


Abbildung 3-11: Repräsentative Aufnahmen der kardialen perivaskulären Fibrose am Ende des Experiments. Die Aufnahmen entsprechen der (a) Sham-, (b) Placebo-, (c) Telmisartan mono-, (d) Linagliptin mono-, (e) Kombinationsgruppe.

3.4 Kardiale Proteinexpression

3.4.1 Expression von Kollagen 1 α

Die Analyse der Expression von Kollagen 1 α erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 3-12).

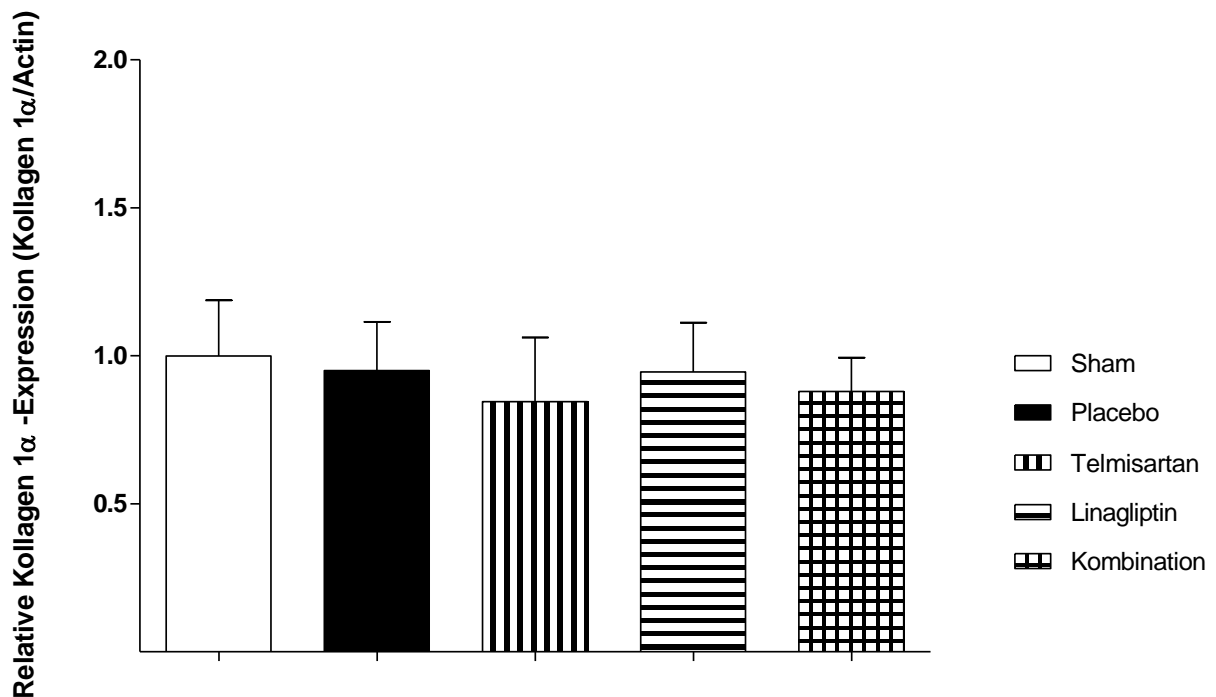


Abbildung 3-12: Relative kardiale Expression von Kollagen 1 α (Kollagen 1 α /Actin) am Ende des Experiments. Die Daten wurden gewonnen durch densitometrische Auswertung der Western Blots. Dargestellt sind die Daten aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferroni-Post-Hoc-Test für den Vergleich der Behandlungsgruppen und Mann-Whitney-Test für den Vergleich von Sham vs. Placebo; keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

3.4.2 Expression von BNP

Die kardiale Expression von BNP unterschied sich in den fünf Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander (Abbildung 3-13).

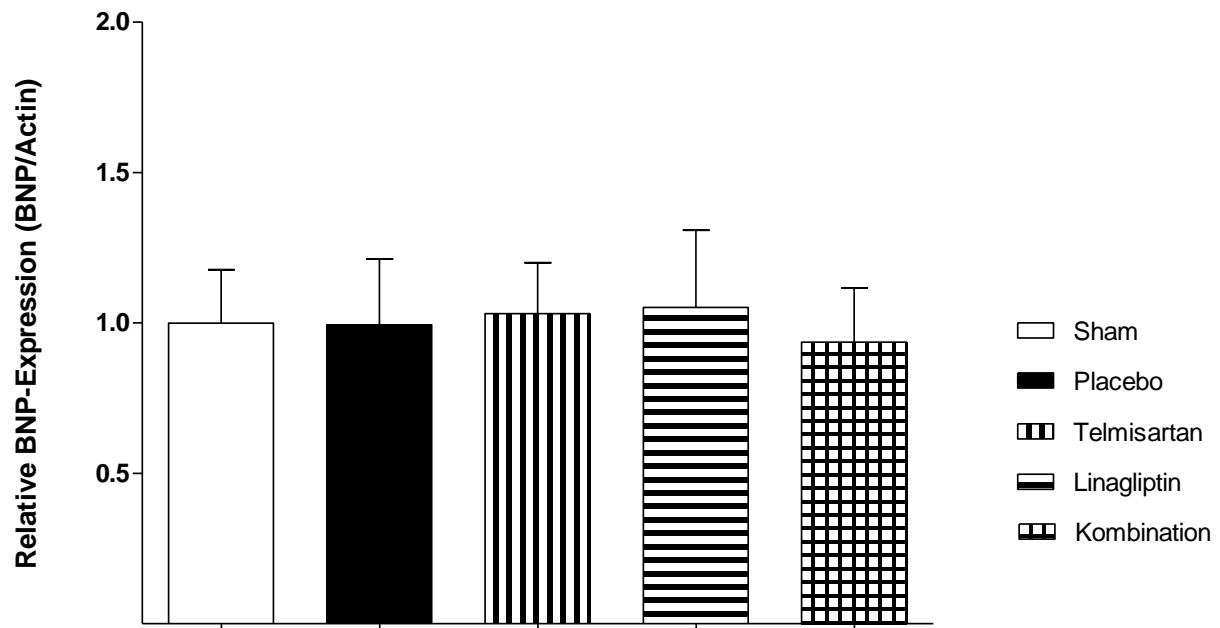


Abbildung 3-13: Relative kardiale Expression von BNP (BNP/Actin) am Ende des Experiments. Die Daten wurden gewonnen durch densitometrische Auswertung der Western Blots. Dargestellt sind die Daten aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferro-ni-Post-Hoc-Test für den Vergleich der Behandlungsgruppen und ungepaartem t-Test für den Vergleich von Sham vs. Placebo; keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

3.4.3 Expression des GLP-1-Rezeptors

Die kardiale Expression des GLP-1-Rezeptors am Ende des Experiments war bei den 2k1c- operierten und mit Placebo behandelten Tieren signifikant höher als bei den Sham-operierten Tieren (Abbildung 3-14). In der mit der Kombinationstherapie behandelten Gruppe zeigte sich eine Reduktion der GLP-1-Rezeptorexpression auf das Niveau der Sham-operierten Tiere. Die Monotherapie mit Telmisartan bzw. Linagliptin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die GLP-1-Rezeptorexpression.

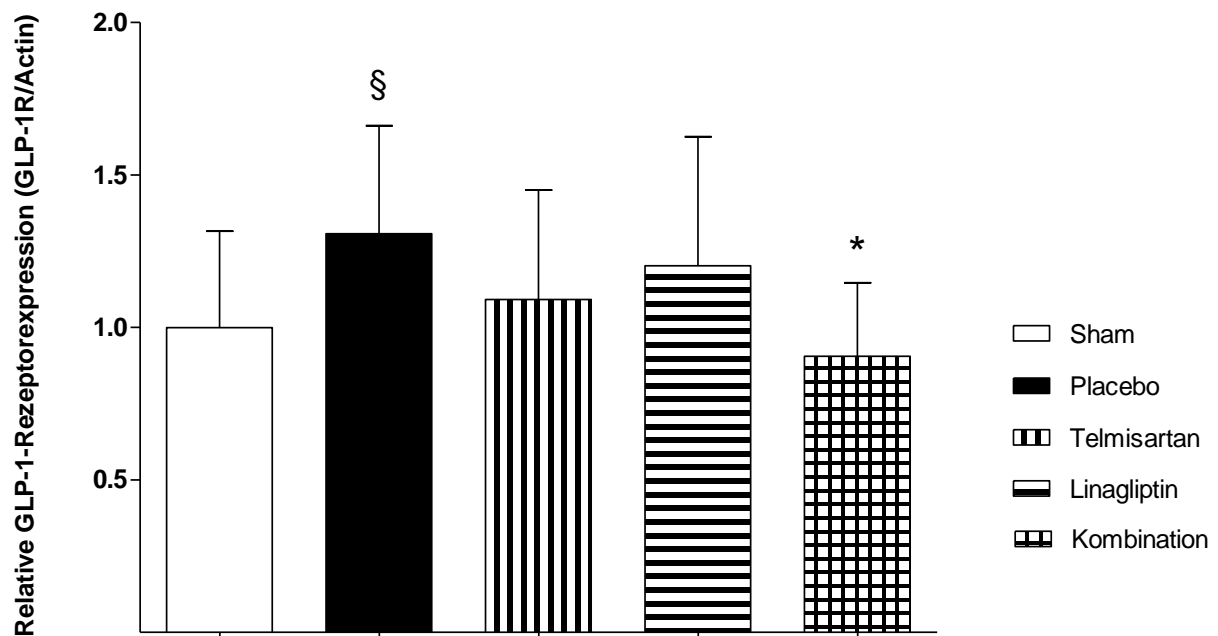


Abbildung 3-14: Relative kardiale Expression des GLP-1-Rezeptors (GLP-1R/Actin) am Ende des Experiments. Die Daten wurden gewonnen durch densitometrische Auswertung der Western Blots. Dargestellt sind die Daten aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferroni-Post-Hoc-Test für den Vergleich der Behandlungsgruppen und ungepaartem t-Test für den Vergleich Sham vs. Placebo; (§) $p < 0,05$ vs. Sham; (*) $p < 0,05$ vs. Placebo.

3.4.4 Expression von DPP-4

Bei den 2k1c-operierten und mit Placebo behandelten Tieren zeigte sich der Trend zu einer gesteigerten Expression ($p = 0,061$) der membrangebundenen DPP-4, der jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 3-15). Die Monotherapie mit Telmisartan bzw. Linagliptin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinexpression. In der Kombinationsgruppe fiel die Expression von DPP-4 im Vergleich mit der Placebogruppe signifikant geringer aus.

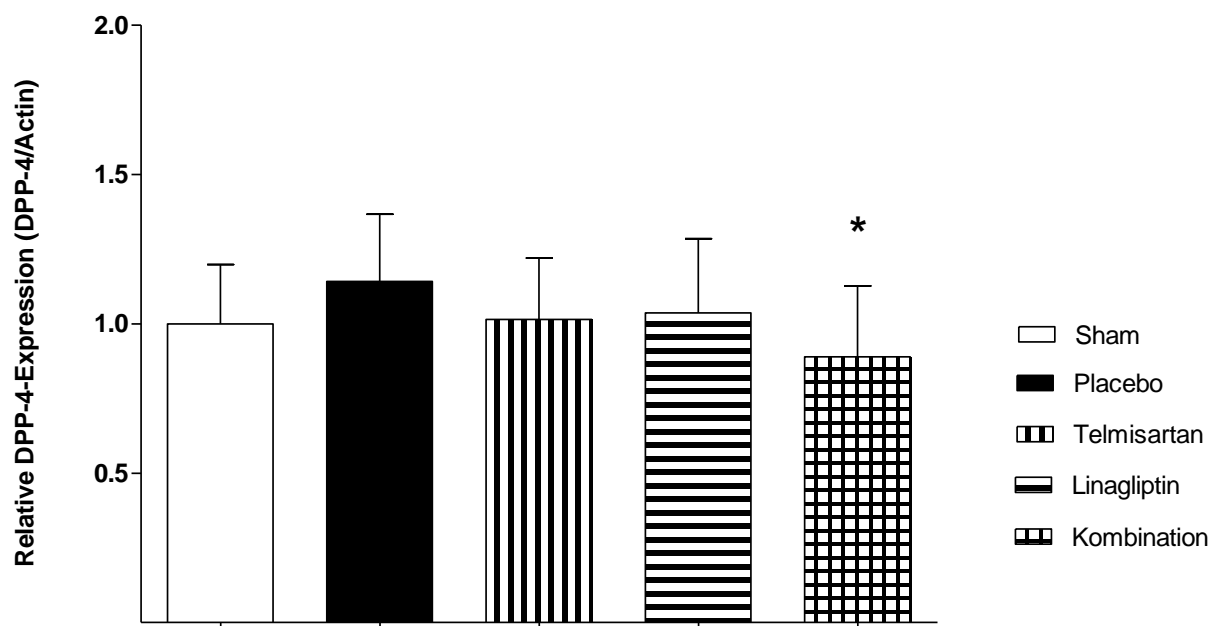


Abbildung 3-15: Relative kardiale Expression von DPP-4 (DPP-4/Actin) am Ende des Experiments. Die Daten wurden gewonnen durch densitometrische Auswertung der Western Blots. Dargestellt sind die Daten aus zwei bis vier unabhängigen Versuchen. Es sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben; statistische Analyse mit einfaktorieller ANOVA und Bonferoni-Post-Hoc-Test für den Vergleich der Behandlungsgruppen und Mann-Whitney-Test für den Vergleich von Sham vs. Placebo; Sham vs. Placebo ($p = 0,061$); (*) $p < 0,05$ vs. Placebo.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Linagliptin als Monotherapie und in Kombination mit dem AT₁-Rezeptorblocker Telmisartan auf den arteriellen Blutdruck und auf das kardiale Remodeling am Modell der renovaskulären Hypertonie der Ratte zu untersuchen. Es gibt bislang keine präklinischen Studien, die die Auswirkungen dieser Kombinationstherapie auf das kardiovaskuläre System zum Gegenstand haben. Diese sind jedoch von großer klinischer Relevanz, da die Kombination von Vertretern dieser beiden Substanzgruppen (DPP-4-Inhibitoren und Sartane) aufgrund der zunehmenden Häufigkeit eines Diabetes mellitus und den hiermit einhergehenden kardiovaskulären Komorbiditäten vermehrt zum Einsatz kommt. Bevor die Resultate im Folgenden im Detail diskutiert werden, hier zunächst eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

Die 2k1c-Operation führte zu einem signifikanten Anstieg des arteriellen systolischen Blutdrucks mit der Ausbildung einer moderaten arteriellen Hypertonie. Linagliptin hatte sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie mit Telmisartan keine blutdrucksteigernde Wirkung. In Folge der renovaskulären Hypertonie kam es zu kardialen Remodelingvorgängen, die jedoch auf hypertrophe Veränderungen, genauer das absolute und relative Herzgewicht und die Media/Lumen-Ratio, beschränkt blieben. Daher waren lediglich Effekte der Medikation auf die Parameter der Myokardhypertrophie und nicht auf Parameter einer kardialen Fibrosierung (Interstitielle Fibrose, Perivaskuläre Fibrose, Expression von Kollagen 1 α) ablesbar. So hatte die Monotherapie mit Linagliptin keinen nachweisbaren aggravierenden Einfluss auf die Myokardhypertrophie und milderte in der Kombination mit Telmisartan dessen bekannte protektive Effekte nicht ab. Im Gegenteil, die Media/Lumen-Ratio war sogar lediglich in der Kombinationsgruppe signifikant geringer. Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Verminderung der in der Placebogruppe gesteigerten GLP-1-Rezeptorexpression durch die Kombinationstherapie. Auch die DPP-4 wurde infolge ebendieser Medikation signifikant geringer exprimiert als in der Placebogruppe.

4.1 Allgemeine Parameter des Versuchsmodells

Es gibt Hinweise darauf, dass die plasmatische DPP-4-Aktivität positiv mit dem Grad einer Herzinsuffizienz korreliert (52). Die partielle Ligatur der Nierenarterie in diesem Experiment hatte hingegen keinen Einfluss auf die DPP-4-Aktivität im Plasma. Durch die Behandlung mit

dem DPP-4-Inhibitor Linagliptin kam es erwartungsgemäß zu einer signifikanten Abnahme der plasmatischen DPP-4-Aktivität, sodass von einer effektiven Enzymhemmung der eingesetzten Medikation ausgegangen werden kann. Da aktives GLP-1 durch die DPP-4 enzymatisch gespalten wird, konnte in den mit Linagliptin behandelten Gruppen eine signifikant höhere Konzentration des aktiven und des Gesamt-GLP-1 im Plasma nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Placebo beziehungsweise Telmisartan hatte keinen Einfluss auf die Plasmakonzentration von aktivem und Gesamt-GLP-1. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener präklinischer und klinischer Studien (104,105).

4.2 Arterieller systolischer Blutdruck

Aufgrund der häufigen Komorbidität mit einem Diabetes mellitus sind die Auswirkungen einer DPP-4-Inhibition als Monotherapie und in Kombination mit einer RAAS-Blockade auf den arteriellen Blutdruck von großer Relevanz. In dieser Studie führte die unilaterale partielle Ligatur der Nierenarterie über die Aktivierung des RAAS innerhalb von einer Woche zu dem erwarteten signifikanten Anstieg des arteriellen systolischen Blutdrucks. Insgesamt wurden systolische Blutdruckwerte im Sinne einer moderaten arteriellen Hypertonie erreicht. Beim Vergleich der Ergebnisse anderer 2k1c-Studien sind große Differenzen bezüglich der Höhe der operativ induzierten renovaskulären Hypertonie auffällig. Im Einklang mit unseren Messungen bewegten sich die Blutdruckwerte in einem Teil der Studien im Bereich einer moderaten arteriellen Hypertonie (24,106,107). Demgegenüber stehen Studien, in deren 2k1c-Gruppen deutlich höhere systolische Blutdruckwerte bis 239 mmHg nachgewiesen wurden (20,108–111). Heterogene inter- und intraexperimentelle Blutdruckerhöhungen sind bei 2k1c-Modellen ein bekanntes Phänomen. Als ursächlich wird eine applikationsbedingte Schwankung der Clipdurchmesser oder gar eine Dislokation der auf die Nierenarterie aufgebrachten Metallclips gesehen (112). Um diesem Problem zu begegnen, wurde in dieser Versuchsanordnung eine Seidenligatur gewählt, deren Durchmesser mithilfe einer Nadel standardisiert wurde. Zudem führte stets derselbe Operateur den Eingriff durch, um entsprechende OP-abhängige Abweichungen zu minimieren. Hierdurch entwickelten 82,3 % der partiell ligierten und mit Placebo behandelten Tiere innerhalb des Versuchszeitraums eine arterielle Hypertonie. Dies entspricht einer Erfolgsquote, die deutlich über der anderer 2k1c-Versuche liegt. Die in diesem Modell im Vergleich mit anderen 2k1c-Modellen über den Zeitverlauf nur moderat erhöhten arteriellen Blutdruckwerte sind möglicherweise Ausdruck einer geringeren Drosselung des Blutflusses durch die Ligaturmethode. Hieraus resultiert

Diskussion

eine geringere Aktivierung des RAAS mit entsprechend vermindertem Anstieg des arteriellen Blutdrucks. Dieser Zusammenhang zwischen Reduktion des inneren Gefäßdurchmessers und Blutdruckerhöhung ist bekannt (113). Durch die Gabe von Telmisartan mono konnte in dieser Studie innerhalb von 4 Wochen eine Normalisierung des Blutdrucks verzeichnet werden. Dieser Effekt einer AT₁-Rezeptorblockade ist gut untersucht, weshalb die Substanzgruppe auch leitliniengerecht zur Therapie der arteriellen Hypertonie eingesetzt wird (114). Die Koadministration von Linagliptin verminderte den blutdrucksenkenden Effekt von Telmisartan nicht. Im Gegenteil zeigte sich sogar eine geringe additive Senkung des arteriellen systolischen Blutdrucks. Ein ähnlicher Trend war auch bei einer Monotherapie mit Linagliptin nachweisbar, wobei der Blutdruck jedoch insgesamt weiterhin deutlich erhöht blieb.

Die Ergebnisse präklinischer und klinischer Studien zeigen überwiegend einen günstigen Einfluss einer DPP-4-Inhibition auf den arteriellen Blutdruck. So wurde hierdurch bei jungen spontan hypertensiven Ratten und bei Insulin-resistenten adipösen (obese) Zucker-Ratten die Ausbildung einer arteriellen Hypertonie abgemildert (115,116). Auch in zwei prospektiven klinischen Studien, in denen T2DM-Patienten mit dem DPP-4-Inhibitor Sitagliptin behandelt wurden, zeigte sich eine signifikante Reduktion des systolischen Blutdrucks (117,118). Diese Wirkung wird möglicherweise durch die Aktivierung der eNOS durch GLP-1 vermittelt, die über die Bildung von Stickstoffmonoxid zu einer Vasodilatation führt (63). Bei Koadministration von DPP-4-Inhibitoren und Wirkstoffen, die hemmend in das RAAS eingreifen, ist die Datenlage hingegen widersprüchlicher. So zeigte sich in einer präklinischen Studie an spontan hypertensiven Ratten, die mit einem ACE-Hemmer vorbehandelt wurden, ein Anstieg des arteriellen systolischen Blutdrucks durch eine DPP-4-Inhibition (101). Auch bei Patienten mit einem metabolischen Syndrom, die eine maximale medikamentöse ACE-Blockade mit 10 mg Enalapril erhielten, verminderte die gleichzeitige Gabe von Sitagliptin dessen antihypertensive Wirkung deutlich (119). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte ein erhöhter Sympathikotonus bei kombinierter DPP-4- und ACE-Inhibition sein. Dieser wird auf eine verstärkte Wirkung von Substanz P zurückgeführt, welches ein Substrat beider medikamentös inhibierter Enzyme ist und das sympathische Nervensystem aktiviert (120). Hingegen zeigte sich in der Studie von Marney und Kollegen bei submaximaler ACE-Hemmung mit 5 mg Enalapril eine Verstärkung der antihypertensiven Wirkung bei zusätzlicher Gabe von Sitagliptin (119). Auch bei nichtdiabetischen Patienten mit milder bis moderater arterieller Hypertonie und bestehender antihypertensiver Therapie (u. a. ACE-Hemmer) führte die Administration von Sitagliptin über 5 Tage zu einer geringen aber signifikanten Reduktion des systolischen und diastolischen Blutdrucks (121). In einer kürzlich veröffentlichten klinischen Studie wiederum hatte die gleichzeitige Gabe von Linagliptin und einem

AT₁-Rezeptorblocker bei Patienten mit T2DM und arterieller Hypertonie keinen Einfluss auf die Höhe des arteriellen Blutdrucks (122).

Dass durch die Inhibition der DPP-4 in Stoffwechselwege eingegriffen wird, die sowohl zu einem Anstieg, als auch zu einem Absinken des Blutdrucks führen könnten, stellt eine mögliche Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse dar. So wird einerseits der Abbau der DPP-4-Substrate PYY (1-36) und NPY (1-36) gehemmt, die dadurch in ihrer aktiven Form erhalten bleiben. Diese verstärken die renovaskulären Effekte von Angiotensin II, indem sie über den Y₁-Rezeptor vasokonstriktorisch wirken (99,100). Der Gi-Signaltransduktionsweg, über den die Wirkung des Y₁-Rezeptors vermittelt wird, ruft möglicherweise jedoch nur bei spontan hypertensiven Ratten eine Verstärkung der Angiotensin II-vermittelten renovaskulären Effekte hervor. Bei den hier verwendeten Wistar-Kyoto-Ratten spielt dieser Pathway höchstwahrscheinlich keine Rolle (100). Weiterhin weisen präklinische Studien darauf hin, dass eine DPP-4-Inhibition im proximalen renalen Tubulus zu einer vermehrten Natriurese und folglich einer verstärkten Diurese führt. Dies wird vermittelt über eine direkte Hemmung des Na⁺/H⁺-Antiportcarriers Typ 3 durch intaktes GLP-1 (115,123). Hierüber übt die DPP-4-Inhibition Einfluss auf die Flüssigkeitshomöostase des Körpers aus. Auch AT₁-Rezeptorblocker setzen hier an, indem sie die Aktivierung des Na⁺/H⁺-Austauschers durch Angiotensin II verhindern. Über diese synergistische Wirkung ließen sich wiederum additive blutdrucksenkende Effekte einer entsprechenden Kombinationstherapie erklären (124). Durch eine längere Studiendauer oder größere Versuchsgruppen wäre der in der vorliegenden Studie als Trend ablesbare niedrigere Blutdruck der Kombinationsgruppe gegenüber der Telmisartangruppe daher möglicherweise statistisch signifikant geworden. Über welche Mechanismen die Wirkung der eingesetzten Kombinationstherapie auf den Blutdruck letztlich vermittelt wird, kann anhand der bisher analysierten Parameter noch nicht beantwortet werden. Hierfür bedarf es weiterer Untersuchungen.

4.3 Kardiales Remodeling

4.3.1 Parameter der kardialen Hypertrophie

Die renovaskuläre Hypertonie bringt eine konstant erhöhte Nachlast für den linken Ventrikel mit sich. Um die Pumpfunktion des Herzens aufrechterhalten zu können, bildet sich in der Folge eine kompensatorische Hypertrophie der Kardiomyozyten aus. Dieser Prozess wird durch die Hormone des RAAS und weitere Zytokine und Chemokine gefördert. In der Framingham Heart Study

zeigte sich, dass die Ausprägung einer linksventrikulären Hypertrophie sowohl mit der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse als auch mit der Gesamtmortalität der Patienten korreliert (15). Dies unterstreicht die Notwendigkeit, dass eine medikamentöse Therapie auf eben diese Remodeling-Prozesse Einfluss nimmt. Als Parameter einer myokardialen Hypertrophie wurden in der vorliegenden Studie das absolute und relative Herzgewicht und der Kardiomyozytendurchmesser verwendet. Die durch die unilaterale Nierenarterienstenose induzierte arterielle Hypertonie führte zu einer signifikanten Zunahme des absoluten und des relativen Herzgewichts und einer geringen, nicht signifikanten, Zunahme des Kardiomyozytendurchmessers im Vergleich mit den Sham-operierten Tieren. Die Ergebnisse zum Herzgewicht sind konsistent mit den Daten anderer Arbeitsgruppen, die die Auswirkung des 2k1c-Modells auf die kardiale Morphologie untersuchten (20,103,109). Durch die Gabe von Telmisartan mono kam es zu einer signifikanten Abnahme des absoluten und des relativen Herzgewichts und des Kardiomyozytendurchmessers. Dieser positive Einfluss einer AT₁-Rezeptorblockade ist bekannt (26). Durch die zusätzliche Gabe von Linagliptin wurde diese Wirkung von Telmisartan nicht negativ beeinflusst. Die Monotherapie mit Linagliptin hatte keinen Einfluss auf die genannten Parameter. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Takahashi und Kollegen, die keine Auswirkungen einer Monotherapie mit Sitagliptin auf die myokardiale Hypertrophie im Modell der druckinduzierten Herzinsuffizienz sahen (51).

Mit der arteriellen Hypertonie geht zudem eine konstante Druckbelastung der arteriellen Widerstandsgefäße einher, weshalb auch diese einen Remodeling-Prozess durchlaufen. Verstärkt wird der Prozess ebenfalls durch die Wirkung des RAAS, das, vermittelt über den AT₁-Rezeptor, eine intrazelluläre proinflammatorische Signalkaskade in Gang setzt (14). Zunächst bilden die glatten Muskelzellen der Tunica media eine kompensatorische Hypertrophie aus. Folge ist eine Verdickung der gesamten Media und eine Verengung des Gefäßlumens, was sich in einer vergrößerten Media/Lumen-Ratio widerspiegelt (14,125). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Zunahme der Media/Lumen-Ratio der partiell ligierten Tiere im Vergleich mit der normotensiven Kontrollgruppe. Lediglich durch die Kombinationstherapie ließ sich eine signifikant geringere und damit normalisierte Media/Lumen-Ratio erzielen. Aus dieser Tatsache lässt sich ein möglicher additiver protektiver Effekt der DPP-4-Inhibition ableiten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Manrique und Kollegen, die eine Reduktion der aortalen Media/Lumen-Ratio durch die Behandlung überernährter Mäuse mit Linagliptin nachweisen konnten (126). Auch die Arbeitsgruppe um Koibuchi sah eine Abnahme der koronaren Media/Lumen-Ratio durch die Behandlung von salzsensitiven hypertensiven Dahl-Ratten mit Linagliptin (127). Analog zu der

Linksherzhypertrophie dient auch das Remodeling der arteriellen Resistenzgefäße als Prädiktor für das kardiovaskuläre Risiko von Patienten mit einer arteriellen Hypertonie (14).

Wie in der Einleitung bereits erläutert, werden die genannten protektiven Effekte möglicherweise über die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors durch GLP-1 vermittelt, der kardioprotektive intrazelluläre Signaltransduktionswege wie den RISK-pathway in Gang setzt (74). Gegebenenfalls spielt hierbei auch die Verbesserung des kardialen Glukosemetabolismus aufgrund der GLP-1 vermittelten Translokation der Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-4 eine Rolle (74). Diese direkten und vom Blutdruck unabhängigen Erklärungsansätze für die protektive Wirkung einer DPP-4-Inhibition werden ergänzt durch präklinische Daten, die darauf hinweisen, dass Linagliptin sowohl die Aktivität des kardialen ACE als auch die kardiale Expression des AT₁-Rezeptors hemmt (127,128). Zudem zeigte sich eine Zunahme der Expression des AT₂-Rezeptors im Myokard und in den intrakardialen Gefäßen, der überwiegend gegenregulatorisch zum AT₁-Rezeptor wirkt (127,128). Vor diesem Hintergrund wirkt die Koadministration der beiden Substanzen Linagliptin und Telmisartan möglicherweise synergistisch. Es existiert ein klarer Zusammenhang zwischen der Höhe des arteriellen Blutdrucks und der Ausprägung einer linksventrikulären Hypertrophie (15). Daher ist der protektive Einfluss der additiven blutdrucksenkenden Wirkung von Linagliptin im Rahmen des kardiovaskulären Remodelings ein möglicher weiterer Erklärungsansatz für das verminderte Remodeling der arteriellen Widerstandsgefäße in der Kombinationsgruppe dieser Studie, auch wenn dieser Effekt auf den Blutdruck im direkten Vergleich mit Telmisartan nur einem Trend entspricht.

4.3.2 Parameter der kardialen Fibrose

Es zeigten sich zwischen den Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der perivaskulären und der interstitiellen Fibrose. Der konventionelle histologische Kollagennachweis wurde ergänzt durch eine Quantifizierung der kardialen Kollagen 1 α -Expression. Entsprechend dem fehlenden Nachweis einer verstärkten Fibrosierung in der Histo-pathologie konnte auch hier kein signifikanter Unterschied in der Expression von Kollagen 1 α nachgewiesen werden, weder zwischen der Sham- und der Placebogruppe noch zwischen der Placebo- und den weiteren medikamentös behandelten Gruppen.

Vorangegangene präklinische Studien haben hingegen zeigen können, dass sich bei anhaltender Belastung durch eine renovaskuläre Hypertonie als weiterer Ausdruck eines kardialen Remodelings eine Fibrose des perivaskulären und interstitiellen Myokardgewebes mit daraus resultieren-

Diskussion

der diastolischer Dysfunktion ausbildet (20,109,110). Im Vergleich zu den zitierten 2k1c-Versuchen fiel die Blutdruckerhöhung in der vorliegenden Studie jedoch deutlich geringer aus, was eine schwächere Wirkung einer der wesentlichen Stimuli des kardialen Remodelings zur Folge hat. Dies dient als mögliche Erklärung für den fehlenden Nachweis von Unterschieden in der Ausprägung der kardialen Fibrose. Eine Aussage über die Auswirkung der medikamentösen Therapie mit Telmisartan und Linagliptin auf die Fibrosierungsvorgänge ist daher nicht möglich. Tierexperimentelle Studien weisen auf einen protektiven Einfluss einer AT₁-Rezeptorblockade auf die kardiale Fibrosierung im Rahmen des Remodelings hin (26,27,129). Auch bei medikamentöser DPP-4-Inhibition zeigte sich in präklinischen Daten überwiegend eine antifibrotische Wirkung. So konnte am Modell der urämischen Kardiomyopathie eine Reduktion der Genexpression von Fibrosemarkern durch eine Therapie mit Linagliptin nachgewiesen werden (49). Die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen, die den Einfluss einer DPP-4-Inhibition auf kardiale Strukturen und Funktionsparameter an Nagermodellen der diastolischen Herzinsuffizienz untersuchten, weisen in die gleiche Richtung (51,127,130). Analog zum Herzen entfaltete Linagliptin bei 5/6-nephrektomierten Mäusen auch im Bereich der Niere eine antifibrotische Wirkung (131). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Mulvihill und Kollegen, die eine Zunahme der Fibrose im kardialen Gewebe dysglykämischer Ratten nachwiesen, welche mit dem DPP-4-Inhibitor MK-0626 behandelt wurden (132). Eine mögliche pathophysiologische Erklärung hierfür ist die Aktivierung von kardialen Fibroblasten durch NPY (1-36) und PYY (1-36) (133). Die Auswirkungen einer Kombinationstherapie aus einem AT₁-Rezeptorblocker und einem DPP-4-Inhibitor auf die genannten Faktoren sind nach wie vor unklar und lassen sich auch durch die vorliegende Studie nicht abschließend beantworten.

Im Rahmen des Druck-induzierten kardialen Remodelings ist die myokardiale Hypertrophie den Veränderungen der interstitiellen Matrix vorgeschaltet. So bildete sich im monogenetischen Hypertoniemodell mit Mausgen Ren-2 überexprimierenden transgenen Ratten (TGR (mRen-2)²⁷-Ratten) eine perivaskuläre und interstitielle Fibrose im Gegensatz zur relativ früh nachweisbaren myokardialen Hypertrophie erst nach einem längeren Versuchszeitraum aus (21). In der vorliegenden Arbeit war ein Effekt der renovaskulären Hypertonie auf die Parameter der myokardialen Hypertrophie nachweisbar. Auch hier hätte eine längere Versuchsdauer und damit einhergehend eine prolongierte Wirkung der schädigenden mechanischen und neurohumoralen Stimuli auf die Synthese der extrazellulären Matrix vermutlich zu signifikanten Unterschieden geführt. Eine mögliche Erklärung für die schwache Ausprägung des kardialen Remodelings ist daher die Kombination aus dem verhältnismäßig milden Stimulus einer moderaten Hypertonie und einer relativ kurzen Versuchsdauer. Möglicherweise wären bei Quantifizierung profibrotisch wirksa-

mer Zytokine wie TGF- β oder Enzyme wie MMP-2 Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachweisbar gewesen. Beide Proteine werden bereits in der frühen Phase der 2k1c-induzierten Hypertonie vermehrt exprimiert (20). Angiotensin II führt über die Aktivierung der NADPH-Oxidase zur Bildung von ROS, die anschließend die MMP-2 aktivieren. MMP-2 fördert neben den ROS die Bildung von TGF- β , das die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu MMP- und Extrazellulärmatrix-produzierenden Myofibroblasten induziert und somit ein treibender Faktor der kardialen Fibrosierung ist. Diese zelluläre Transition wird auch direkt durch Angiotensin II gefördert (20). Daher hätte die zusätzliche Quantifizierung von TGF- β oder α -smooth muscle actin (α -SMA), welches in Myofibroblasten enthalten ist, Veränderungen im frühen Prozess der reaktiven Fibrosierung in dieser Studie möglicherweise sichtbar gemacht.

4.4 Kardiale Proteinexpression

Neben dem bereits diskutierten Kollagen 1 α wurde mittels Western Blotting die Expression von BNP, des GLP-1-Rezeptors und der DPP-4 im kardialen Gewebe quantifiziert.

4.4.1 Expression von BNP

In der vorliegenden Arbeit ließen sich keine Unterschiede in der Stärke der kardialen BNP-Expression nachweisen, weder zwischen der Sham- und der Placebogruppe noch zwischen der Placebo- und den weiteren medikamentösen Behandlungsgruppen.

Der BNP-Spiegel im Blut korreliert mit der kardialen Belastung und hat sich daher in der klinischen Routine als guter Indikator für den Schweregrad einer akuten und chronischen Herzinsuffizienz etabliert (134). So konnten Park und Kollegen bei 2k1c-operierten Ratten eine Zunahme der kardialen BNP-Expression nachweisen (135). Auch in anderen Tiermodellen der Kardiomyopathie ging die kardiale Belastung mit einer Zunahme der BNP-Expression einher (49,50). Die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie auch zwischen der Sham- und der Placebogruppe keine Unterschiede in der Expression von BNP nachzuweisen waren, spricht demzufolge für eine nur moderate Belastung des Herzens durch die renovaskuläre Hypertonie. Eine Aussage über den Einfluss der DPP-4-Inhibition mit Linagliptin und der AT₁-Rezeptorblockade mit Telmisartan auf die kardiale BNP-Expression ist daher nicht möglich. Vorangegangene Studien haben jedoch zeigen können, dass die Gabe von DPP-4-Inhibitoren in kardialen Belastungssituationen die BNP-Expression hemmt (49,50).

4.4.2 Expression des GLP-1-Rezeptors

Man geht davon aus, dass ein relevanter Teil der kardioprotektiven Wirkung des intakten GLP-1 über den gleichnamigen Rezeptor vermittelt wird. Mittels Western Blotting erfolgte daher die Quantifizierung der GLP-1-Rezeptorexpression im Ventrikelmyokard (linker Ventrikel, rechter Ventrikel und Ventrikelseptum). Durch die Ligatur der Nierenarterie kam es zu einer signifikanten Zunahme der kardialen GLP-1-Rezeptorexpression. Unter kombinierter AT_1 -Rezeptorblockade und DPP-4-Inhibition zeigte sich eine mit der Shamgruppe vergleichbare Expression, die somit signifikant niedriger war als in der Placebogruppe.

Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigte sich sowohl bei Hunden mit Pacer-induzierter dilatativer Kardiomyopathie als auch in einem kardialen Ischämie/Reperfusionsmodell an Hasen eine erhöhte kardiale Dichte des GLP-1-Rezeptors. Durch kurzzeitige Behandlung der Versuchstiere mit GLP-1-Infusion bzw. Voglibose, das die GLP-1-Sekretion stimuliert, wurde die GLP-1-Rezeptorexpression nicht signifikant beeinflusst (75,136). Auch in einer klinischen Studie, in der bei Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion eine Myokardbiopsie durchgeführt wurde, konnte eine verstärkte Expression des GLP-1-Rezeptors nachgewiesen werden (137). Demgegenüber zeigte sich im Modell der urämischen Kardiomyopathie eine verminderte kardiale Expression des GLP-1-Rezeptors (49). Auch Zhang und Kollegen wiesen in einer tierexperimentellen Studie an Ratten nach vierwöchiger kontinuierlicher Infusion von Angiotensin II mit konsekutiver Entwicklung einer kardialen Fibrose eine verminderte Expression des kardialen GLP-1-Rezeptors nach (128)(128). Bei simultaner Inkretin-Therapie mit Hinzugabe von Linagliptin bzw. Liraglutide zeigte sich dort ein gegenteiliger Effekt mit Zunahme der Rezeptorexpression (128). Auch Zhou und Kollegen sahen einen vergleichbaren Einfluss auf die Rezeptorregulation bei Phenylephrin-induzierter kardialer Hypertrophie und der Gabe des GLP-1-Rezeptor-Agonisten Exendin-4 bei isolierten Kardiomyozyten der Ratte. Diese medikamentös induzierte Rezeptorexpression war hier jedoch schon nach einer Behandlungsdauer von lediglich 24 Stunden nachweisbar (138).

Als eine mögliche Erklärung für die divergierenden Ergebnisse zur GLP-1-Rezeptorexpression unter kardialer Belastung könnte der Zeitfaktor dienen. Sowohl in dieser Studie als auch in den Untersuchungen, in denen die kardialen Belastungsfaktoren relativ lange bestanden, war eine Hochregulation der Rezeptorexpression zu beobachten. Bei kürzerer Versuchsdauer, wie in der Studie von Zhou und Kollegen, war eher der gegenteilige Effekt zu verzeichnen. Denkbar ist die höhere GLP-1-Rezeptordichte im Rahmen einer chronischen kardialen Belastung als Mechanismus der kardioprotektiven Autoregulation. Folgt man dieser Annahme, könnte die Herunter-

Diskussion

regulation des GLP-1-Rezeptors bei einer kombinierten AT₁-Rezeptor- und DPP-4-Inhibition auch als Ausdruck einer verminderten kardialen Belastung gewertet werden. Alternativ ist ein gegenregulatorischer Mechanismus bei einem durch die DPP-4-Inhibition erhöhten GLP-1-Substratangebotes denkbar. Die potentielle substrat- bzw. phasenabhängige Regulation der Rezeptorexpression bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

In einem Großteil der sich mit der Inkretin-Thematik befassenden Studien, so auch den genannten, wurde die GLP-1-Rezeptorexpression in den Geweben von Säugetieren mittels Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR), Western Blotting oder immunhistochemischer Methoden quantifiziert. Die sich daraus ergebende Datenlage ist sehr uneinheitlich. In mehreren Studien konnte der Nachweis von GLP-1-Rezeptoren auf murinen und humanen kardialen Zellstrukturen erbracht werden (139,140). Ban und Kollegen wiesen den GLP-1-Rezeptor auf Kardiomyozyten, der glatten Muskulatur der Koronargefäße und im Endokard aller Kammern des murinen Herzens nach (84). Wohlfahrt und Kollegen wiederum konnten den GLP-1-Rezeptor auf kardialen Zielstrukturen der Ratte nicht nachweisen (141). Einige Forschergruppen erhoben daher Zweifel an der Sensitivität und Spezifität der bislang eingesetzten Analysemethoden. In der Tat zeigte sich bei den kommerziell verfügbaren und häufig für immunhistochemische Methoden und Western Blotting eingesetzten Antikörpern, u. a. auch dem hier verwendeten „ab39072“, eine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinstrukturen in GLP-1-Rezeptor Knockout-Mäusen, sodass eine Diskriminierung der verschiedenen Versuchsgruppen nicht möglich war (142,143). Auch mit der häufig durchgeführten regulären und Realtime-PCR ist nur die Detektion relativ kurzer Abschnitte des gesamten Gens, das für den GLP-1-Rezeptor kodiert, möglich. Bei diesen könnte es sich daher um nichtkodierende Genabschnitte handeln, sodass eine Korrelation mit der Proteinbiosynthese eines funktionstüchtigen GLP-1-Rezeptors nicht automatisch angenommen werden kann (144). Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse ist es unabdingbar, die mit den genannten Analysemethoden erhobenen Ergebnisse kritisch zu hinterfragen. Daher fordern die Autoren der genannten Publikationen die Etablierung von Validierungsmethoden beim Einsatz von Antikörpern für immunhistochemische Methoden und Western Blot-Verfahren. In der Folge haben Pyke und Kollegen den Primaten-spezifischen monoklonalen GLP-1-Rezeptor-Antikörper „MAb 3F52“ entwickelt (145). Mit diesem ließ sich der GLP-1-Rezeptor bei Affen und Menschen erstaunlicherweise ausschließlich auf den Zellen des Sinusknotens nachweisen. In den restlichen Herzstrukturen, insbesondere im Ventrikelmyokard, gelang kein Nachweis des Rezeptors. Für den neuen für murines Gewebe spezifischen und nach den geforderten Methoden validierten GLP-1-Rezeptor-Antikörper „MAb 7F38A2“ existieren bislang keine publizierten Daten über GLP-1-Rezeptor-Expressionsmuster im kardialen Gewebe

von Nagern (146). In Analogie zu den Ergebnissen bei Primaten ist auch hier ein zu den vorangegangenen Studien differierendes Expressionsmuster möglich. Aufgrund der uneinheitlichen Datenlage und der gerechtfertigten Skepsis gegenüber den bisher publizierten Studienergebnissen bleiben die Regulation und die zugrundeliegenden Mechanismen der GLP-1-Rezeptorexpression weiter offen. In diesem Kontext gewinnen die anderen Substrate der DPP-4 und deren nachgeschaltete Signaltransduktionswege in der Vermittlung einer Kardioprotektion an Bedeutung. Zudem hat eine kürzlich veröffentlichte Studie die GLP-1-Rezeptor-unabhängige Wirkung einer DPP-4-Inhibition stärker in den Fokus gerückt. Die Gabe von Linagliptin führte dort sowohl bei Wildtyp-Mäusen als auch bei GLP-1-Rezeptor Knockout-Mäusen, die einer 5/6-Nephrektomie unterzogen worden waren, zu einer Verringerung der operationsbedingten renalen Fibrose (131). Diese Wirkung wurde der Regulation pro- (u. a. TGF- β 1, Y-Box-Bindungsprotein 1) und antifibrotisch (u. a. Thymosin- β 4, HNRNPA1) wirksamer Schlüsselsubstanzen zugeschrieben. Welche Rolle die verschiedenen DPP-4-Substrate hierbei spielen, bleibt jedoch unklar (131).

4.4.3 Expression von DPP-4

Im Vergleich mit der Shamgruppe zeichnete sich in der Placebogruppe der Trend ($p = 0,061$) zu einer stärkeren kardialen Expression von DPP-4 ab. Weder die Monotherapie mit Telmisartan noch die mit Linagliptin hatte einen signifikanten Einfluss auf die DPP-4-Expression. Jedoch war durch die Kombination beider Substanzen eine im Vergleich zu der Placebogruppe signifikant verminderte und mit der Shamgruppe vergleichbare Enzymmenge nachweisbar.

Die membrangebundene Form der DPP-4 kommt im Herzgewebe insbesondere auf den mikrovaskulären Endothelzellen und den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur vor (95). Neben GLP-1 katalysiert sie den Abbau weiterer Substrate, wie SDF-1 α und BNP, und übt darüber Einfluss auf das kardiovaskuläre System aus. Die Mechanismen, die die Gentranskription der DPP-4 regulieren, sind bislang noch unzureichend verstanden. Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ließ sich in Tiermodellen der arteriellen Hypertonie und der ischämischen Herzinsuffizienz eine erhöhte Expression der DPP-4 in kardialen Strukturen nachweisen (52,130). Auch die Myokardbiopsien von herzinsuffizienten Patienten wiesen eine deutlich stärkere DPP-4-Expression im Vergleich zur herzgesunden Kontrollgruppe auf (147). Neben der membrangebundenen Form ist auch die im Plasma gelöste DPP-4 bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz erhöht. Die Höhe der plasmatischen DPP-4-Aktivität korreliert hierbei positiv mit dem Ausmaß

der diastolischen Dysfunktion (52). Darüber hinaus scheinen metabolische Faktoren Einfluss auf die DPP-4-Expression zu haben. So zeigte sich in präklinischen und klinischen Studien, dass es durch eine besonders glukose- oder fetthaltige Diät bzw. einen T2DM oder Übergewicht zu einer gesteigerten Expression von DPP-4 u. a. auf kardialen Gewebestrukturen kommt (40,148–150). In dem mit den genannten Störungsbildern assoziierten proinflammatorischen Milieu werden bestimmte Zytokine, wie Interleukin-12 und Interferon- γ , verstärkt gebildet. Es gibt eine zunehmende Evidenz dafür, dass diese in verschiedenen Zelltypen die Expression der DPP-4 induzieren (95).

Die Ergebnisse der genannten präklinischen und klinischen Studien sprechen dafür, dass die DPP-4 eine wichtige pathophysiologische Rolle bei den mit einem metabolischen Syndrom einhergehenden kardiovaskulären Erkrankungen, wie einer arteriellen Hypertonie und einer Herzinsuffizienz, spielt. Wahrscheinlich geschieht dies über die verminderte biologische Aktivität der kardiovaskulär wirksamen Substrate der DPP-4. Entsprechend gewinnt eine medikamentöse Blockade der DPP-4 an Bedeutung.

Die Tatsache, dass es unter der Kombinationstherapie mit Telmisartan und Linagliptin zu einer Abnahme der kardialen DPP-4-Expression kam, lässt im Umkehrschluss auf eine synergistische kardioprotektive Wirkung der beiden Substanzen schließen. Möglicherweise wäre bei einem stärker ausgeprägten kardialen Remodeling im Rahmen der renovaskulären Hypertonie bereits durch die Monotherapie mit Linagliptin eine ähnliche Wirkung nachzuweisen gewesen; insbesondere da Dos Santos und Kollegen eine Abnahme der kardialen DPP-4-Expression durch die Behandlung herzinsuffizienter Mäuse mit dem DPP-4-Inhibitor Sitagliptin sahen. Die Therapie ging zudem mit einer Verbesserung der kardialen Funktionalität einher (52). Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Regulation ergibt sich aus den Ergebnissen einer Arbeit von Kanasaki und Kollegen, die verminderte Level der microRNA 29 Familie in den Nieren diabetischer Mäuse nachgewiesen haben (151). Diese hemmt möglicherweise die Bildung von DPP-4. Unter der Behandlung mit Linagliptin war eine Zunahme der Expression von bestimmten Komponenten der microRNA 29 Familie nachweisbar, wodurch wiederum die Bildung von DPP-4 supprimiert wurde (151).

4.5 Limitierungen und Ausblick

Das 2k1c-Modell ist ein seit langem etabliertes und häufig verwendetes Tiermodell der renovaskulären Hypertonie, das die humanen pathophysiologischen Prozesse gut abbildet (152,153).

Diskussion

Jedoch sind inkonsistente Blutdruckerhöhungen, bedingt durch die Methodik der Clip-Applikation, ein bekanntes Problem (112). Daher erfolgte in diesem Versuch die Abwandlung der ursprünglichen Methode nunmehr mit der Ligatur einer Nierenarterie statt der Applikation eines Metallclips. Hierdurch konnte mit 82,3 % eine hohe Erfolgsquote bezüglich der Induktion einer arteriellen Hypertonie erzielt werden. Da diese jedoch insgesamt nur moderat ausfiel, war die Ausprägung des kardialen Remodelings nur unvollständig. In der Folge kann auch der Effekt der eingesetzten pharmakologischen Therapie nur begrenzt sein. Mit einer längeren Versuchsdauer hätte dieser Limitierung ggf. begegnet werden können. Auch mit der zusätzlichen Durchführung kardialer Funktionsanalysen des Herzens (u. a. linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Wandbewegungsstörungen) hätten die Auswirkungen der eingesetzten medikamentösen Therapie auf das kardiale Remodeling weitergehender untersucht werden können. Auf diese Weise wären im Krankheitsprozess früh auftretende funktionelle Veränderungen möglicherweise bereits nachweisbar gewesen. Beispielhaft sei hier die Untersuchung von Aroor und Kollegen genannt, die in adipösen (obese) Zucker-Ratten eine Verminderung der diastolischen Dysfunktion durch die Behandlung mit Linagliptin nachweisen konnten. Ein Unterschied in der Ausprägung der kardialen Proteinexpression von Kollagen I und Kollagen III zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen war auch dort nicht nachweisbar (116). Des Weiteren wäre in alternativen Hypertonie-Modellen mit RAAS-Aktivierung, in denen der blutdrucksteigernde Effekt deutlicher ausgeprägt ist, der Einfluss der Medikation mit Linagliptin und Telmisartan auf das kardiale Remodeling möglicherweise mit aussagekräftigeren Ergebnissen zu untersuchen gewesen. Als Modelle kommen zum Beispiel spontan hypertensive Ratten oder TGR (mRen-2)²⁷-Ratten infrage (152).

Trotz der genannten Limitierungen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Medikation mit dem DPP-4-Inhibitor Linagliptin einen neutralen Effekt auf den Blutdruck und das kardiale Remodeling im Modell der renovaskulären Hypertonie hat. Auch die bekannte kardioprotektive Wirkung des AT₁-Rezeptorblockers Telmisartan wurde durch die Koadministration von Linagliptin nicht abgemildert. Im Gegenteil, es gab Hinweise für einen additiven kardioprotektiven Effekt dieser Kombinationstherapie.

Aktuell können noch keine Aussagen darüber gemacht werden, welche Rolle GLP-1 bei dem beobachteten kardialen Remodeling zukommt, wobei Zweifel an der propagierten GLP-1-Rezeptor-abhängigen Signaltransduktion im Herzen bestehen. Vor allem aufgrund der unklaren Rezeptorverteilung im Myokard und dem Nachweis antifibrotischer Effekte einer DPP-4-Inhibition in der Niere von GLP-1-Rezeptor Knockout-Mäusen (131). Es bedarf weiterführender präklinischer Untersuchungen, die Aufschluss darüber liefern, inwiefern GLP-1 unabhängig vom

Diskussion

gleichnamigen Rezeptor wirkt bzw. welche Rolle die weiteren Substrate der DPP-4 bei der Vermittlung der beobachteten additiven kardioprotektiven Wirkung spielen. Auch die Effekte einer kombinierten DPP-4- und RAAS-Blockade sollten Gegenstand weiterer präklinischer und insbesondere klinischer Studien sein. Letztere sind v. a. deshalb notwendig, weil bei einem metabolischen Syndrom des Menschen bekanntermaßen sehr viele pathophysiologische Mechanismen ineinandergreifen und sich die daraus entstehenden kardiovaskulären Folgeerkrankungen über einen längeren Zeitraum entwickeln. So kann jedes tierexperimentelle Modell, wie auch das etablierte 2k1c-Modell, diese komplexen Vorgänge naturgemäß nur inkomplett abbilden. In der Konsequenz sind die im Rahmen präklinischer Studien erhobenen Daten auch nur begrenzt auf den humanen Organismus übertragbar.

5 Zusammenfassung

Der Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) geht häufig mit kardiovaskulären Komorbiditäten, wie einer arteriellen Hypertonie und einer Herzinsuffizienz einher. Daher ist der Einfluss der eingesetzten antidiabetischen Therapie auf das Herz-Kreislauf-System von zentraler Bedeutung. Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren (DPP-4-Inhibitoren) sind eine relativ neue für die Behandlung des T2DM zugelassene Wirkstoffgruppe. Die Ergebnisse präklinischer und klinischer Studien geben Hinweise darauf, dass diese sogenannten Gliptine kardioprotektive Wirkungen entfalten. Weitgehend unklar ist jedoch, inwiefern sich die Komedikation von DPP-4-Inhibitoren mit Angiotensin₁-Rezeptorblockern (AT₁-Rezeptorblockern) auf das kardiovaskuläre System auswirkt. In der vorliegenden Studie wurden daher anhand von Ratten mit einer 2-kidney-1-clip-Hypertonie (2k1c-Hypertonie) die Effekte einer Therapie mit dem DPP-4-Inhibitor Linagliptin als Monotherapie und in Kombination mit dem AT₁-Rezeptorblocker Telmisartan auf den arteriellen Blutdruck und das kardiale Remodeling untersucht. Erwartungsgemäß entwickelten die Tiere der Placebogruppe eine renovaskuläre Hypertonie und in der Folge strukturelle Veränderungen des Herzwesens im Sinne eines kardialen Remodelings. Diese beschränkten sich jedoch auf eine Myokardhypertrophie, sodass Aussagen bezüglich der Wirkung der eingesetzten Substanzen auf die Ausbildung einer reaktiven kardialen Fibrose nicht möglich sind. Durch die Monotherapie mit Telmisartan kam es innerhalb von 4 Wochen zu einer Normalisierung des Blutdrucks, sodass einer kompensatorischen myokardialen Hypertrophie entgegengewirkt wurde. Die therapeutische Wirkung der AT₁-Blockade sowohl auf den systolischen Blutdruck als auch auf die Myokardhypertrophie wurde durch die Koadministration von Linagliptin nicht aufgehoben. Im Gegenteil waren sogar Veränderungen im Sinne einer zusätzlichen protektiven Wirkung nachweisbar. So zeigten sich durch die Kombinationstherapie ein Trend zu einem niedrigeren systolischen Blutdruck gegenüber der Monotherapie mit Telmisartan und eine signifikant geringere Media/Lumen-Ratio gegenüber der Placebogruppe. Die geringe, wenn auch nicht signifikante, Zunahme der kardialen DPP-4-Expression im Rahmen der renovaskulären Hypertonie weist auf deren mögliche Funktion bei der Entstehung der hiermit verbundenen pathologischen strukturellen und funktionellen kardiovaskulären Veränderungen hin. Auch wurden potentiell protektive Veränderungen der kardialen Proteinexpression, wie eine Abnahme der DPP-4- und der GLP-1-Rezeptorexpression, als Hinweis auf einen synergistischen Effekt erst durch die Kombinationstherapie signifikant. Im Rahmen der Monotherapie mit Linagliptin waren weder negative noch protektive Auswirkungen auf die entsprechenden Parameter nachweisbar. Nach

Zusammenfassung

meiner Kenntnis sind das die ersten publizierten Daten, die eine mögliche kardioprotektive Wirkung einer kombinierten AT₁-Rezeptorblockade und DPP-4-Inhibition nachweisen. Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die in der klinischen Praxis relevante medikamentöse Behandlung von Patienten mit der eingesetzten Wirkstoffkombination möglicherweise einem kardialen Remodeling mit einer konsekutiven Herzinsuffizienz entgegenwirkt. Ein limitierender Faktor des verwendeten Modells ist die Induktion einer lediglich moderaten arteriellen Hypertonie und dadurch bedingt auch eines milden kardialen Remodelings. Folglich waren die Unterschiede der erhobenen Parameter zwischen den Versuchsgruppen gering. Es bedarf weiterer präklinischer und klinischer Studien, um die Auswirkungen der eingesetzten Substanzgruppen auf das kardiovaskuläre System und die zugrundeliegenden Pathomechanismen besser einschätzen und verstehen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*. September 2001;44 Suppl 2:S14-21.
2. Zhong J, Maiseyeu A, Davis SN, Rajagopalan S. Dpp4 in cardiometabolic disease: recent insights from the laboratory and clinical trials of dpp4 inhibition. *Circ Res*. 10. April 2015;116(8):1491–504.
3. Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, Davidson J, Hirshberg B, Ohman P, Frederich R, Wiviott SD, Hoffman EB, Cavender MA, Udell JA, Desai NR, Mosenson O, McGuire DK, Ray KK, Leiter LA, Raz I. Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 3. Oktober 2013;369(14):1317–26.
4. Mancia G, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. :98.
5. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 21. Juli 2013;34(28):2159–219.
6. Rimoldi SF, Scherrer U, Messerli FH. Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? *Eur Heart J*. 1. Mai 2014;35(19):1245–54.
7. Papademetriou V. From Hypertension to Heart Failure. *J Clin Hypertens*. 1. Oktober 2004;6:14–7.
8. Ferrario CM. Role of Angiotensin II in Cardiovascular Disease — Therapeutic Implications of More Than a Century of Research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 3. Januar 2006;7(1):3–14.
9. Oberhuber A, Nitzsche EU, Hupp T. Leitlinie - S2K Erkrankungen der Nierenarterie 004-008. :37.
10. Van Buren PN, Toto R. Hypertension in Diabetic Nephropathy: Epidemiology, Mechanisms, and Management. *Adv Chronic Kidney Dis*. Januar 2011;18(1):28–41.
11. Chawla T. Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy. *World J Diabetes*. 2010;1(5):141.
12. Valabhji J, Robinson S, Poulter C, Robinson AC, Kong C, Henzen C, Gedroyc WM, Feher MD, Elkeles RS. Prevalence of renal artery stenosis in subjects with type 2 diabetes and coexistent hypertension. *Diabetes Care*. 1. April 2000;23(4):539–43.

Literaturverzeichnis

13. Brilla CG. The cardiac structure-function relationship and the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension and heart failure. *Curr Opin Cardiol*. Juli 1994;9 Suppl 1:S2-10; discussion S10-11.
14. Renna NF, de las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of Vascular Remodeling in Hypertension [Internet]. *International Journal of Hypertension*. 2013 [zitiert 23. Januar 2018]. Verfügbar unter: <https://www.hindawi.com/journals/ijhy/2013/808353/>
15. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*. 1. März 2007;117(3):568–75.
16. Bishop JE, Lindahl G. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res*. 1999;42(1):27–44.
17. Azibani F, Fazal L, Chatziantoniou C, Samuel J-L, Delcayre C. Aldosterone Mediates Cardiac Fibrosis in the Setting of Hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 1. August 2013;15(4):395–400.
18. Sorescu D, Griendling KK. Reactive Oxygen Species, Mitochondria, and NAD(P)H Oxidases in the Development and Progression of Heart Failure. *Congest Heart Fail*. 1. Mai 2002;8(3):132–40.
19. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*. 1. Oktober 2008;317(1–2):43–50.
20. Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes DA, Prado CM, Rossi MA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Temporal changes in cardiac matrix metalloproteinase activity, oxidative stress, and TGF- β in renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. *Exp Mol Pathol*. Februar 2013;94(1):1–9.
21. Bishop JE, Kiernan LA, Montgomery HE, Gohlke P, McEwan JR. Raised blood pressure, not renin–angiotensin systems, causes cardiac fibrosis in TGR m(Ren2)27 rats. *Cardiovasc Res*. 7. Januar 2000;47(1):57–67.
22. Weber KT, Janicki JS, Pick R, Capasso J, Anversa P. Myocardial fibrosis and pathologic hypertrophy in the rat with renovascular hypertension. *Am J Cardiol*. 3. April 1990;65(14):1G-7G.
23. Kuznetsova T, Thijs L, Knez J, Herbots L, Zhang Z, Staessen JA. Prognostic Value of Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a General Population. *J Am Heart Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis [Internet]*. 29. April 2014 [zitiert 18. Februar 2018];3(3). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4309065/>
24. Wang J-G, Staessen JA, Franklin SS, Fagard R, Gueyffier F. Systolic and Diastolic Blood Pressure Lowering as Determinants of Cardiovascular Outcome. *Hypertension*. 5. Januar 2005;45(5):907–13.
25. Akhrass PR, McFarlane SI. Telmisartan and cardioprotection. *Vasc Health Risk Manag*. 2011;7:677–83.

Literaturverzeichnis

26. Müller P, Kazakov A, Semenov A, Jagoda P, Friedrich EB, Böhm M, Laufs U. Ramipril and Telmisartan Exhibit Differential Effects in Cardiac Pressure Overload-Induced Hypertrophy Without an Additional Benefit of the Combination of Both Drugs. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 1. Januar 2013;18(1):87–93.
27. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Iwao H. Effects of an AT1 receptor antagonist, an ACE inhibitor and a calcium channel antagonist on cardiac gene expressions in hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1996;118(3):549–556.
28. Antoniou T, Camacho X, Yao Z, Gomes T, Juurlink DN, Mamdani MM. Comparative effectiveness of angiotensin-receptor blockers for preventing macrovascular disease in patients with diabetes: a population-based cohort study. *CMAJ Can Med Assoc J.* 3. September 2013;185(12):1035–41.
29. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. *Am J Cardiol.* 1. Juli 1974;34(1):29–34.
30. Schilling JD, Mann DL. Diabetic Cardiomyopathy. *Heart Fail Clin.* Oktober 2012;8(4):619–31.
31. Russo I, Frangogiannis NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol.* Januar 2016;90:84–93.
32. Gray S, Kim JK. New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab.* Oktober 2011;22(10):394–403.
33. Nissen Steven E., W Kathy. Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myokardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. *N Engl J Med.* 2007;356(1):2457–71.
34. Guidance for Industry. *Diabetes Mellit.* 2008;8.
35. Castagno D, Baird-Gunning J, Jhund PS, Biondi-Zoccai G, MacDonald MR, Petrie MC, Gaita F, McMurray JJV. Intensive glycemic control has no impact on the risk of heart failure in type 2 diabetic patients: evidence from a 37,229 patient meta-analysis. *Am Heart J.* November 2011;162(5):938-948.e2.
36. Gilbert RE, Krum H. Heart failure in diabetes: effects of anti-hyperglycaemic drug therapy. *The Lancet.* 2015;385(9982):2107–2117.
37. Long-Term Effects of Intensive Glucose Lowering on Cardiovascular Outcomes. *N Engl J Med.* 2011;364(9):818–28.
38. Mulvihill EE, Drucker DJ. Pharmacology, Physiology, and Mechanisms of Action of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors. *Endocr Rev.* Dezember 2014;35(6):992–1019.
39. Röhrborn D. DPP4 in diabetes. *Front Immunol [Internet].* 2015 [zitiert 9. November 2016];6. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00386/abstract>
40. Laudes M, Oberhauser F, Schulte D, Schilbach K, Freude S, Bilkovski R, Schulz O, Faust M, Krone W. Dipeptidyl-Peptidase 4 and Attractin Expression is Increased in Circulating

Literaturverzeichnis

- Blood Monocytes of Obese Human Subjects. *Exp Clin Endocrinol Amp Diabetes*. August 2010;118(08):473–7.
41. Post S, van den Broek AJ, Rensing BJ, Pasterkamp G, Goumans M-J, Doevendans PA. Reduced CD26 expression is associated with improved cardiac function after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. Dezember 2012;53(6):899–905.
 42. Dubé PE, Brubaker PL. Nutrient, Neural and Endocrine Control of Glucagon-like Peptide Secretion. *Horm Metab Res*. November 2004;36(11/12):755–60.
 43. Drucker DJ. Glucagon-Like Peptide-1 and the Islet -Cell: Augmentation of Cell Proliferation and Inhibition of Apoptosis. *Endocrinology*. 28. August 2003;144(12):5145–8.
 44. Deacon CF. Circulation and Degradation of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res*. November 2004;36(11/12):761–5.
 45. Grieve DJ, Cassidy RS, Green BD. Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control? *Br J Pharmacol*. 2009;157(8):1340–1351.
 46. Deacon CF, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: comparison, efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother*. Oktober 2013;14(15):2047–58.
 47. Hocher B, Reichetzedder C, Alter ML. Renal and Cardiac Effects of DPP-4 Inhibitors – from Preclinical Development to Clinical Research. *Kidney Blood Press Res*. 2012;36(1):65–84.
 48. A12-11 - Linagliptin - Erneute Nutzenbewertung gemäß § 35a Absatz 5b SGB V. :69.
 49. Chaykovska L, von Websky K, Rahnenfuhrer J, Alter M, Heiden S, Fuchs H, Runge F, Klein T, Hocher B. Effects of DPP-4 Inhibitors on the Heart in a Rat Model of Uremic Cardiomyopathy. *PLoS ONE* [Internet]. 18. November 2011 [zitiert 22. August 2013];6(11). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3220703/>
 50. Gomez N, Touihri K, Matheeußen V, Mendes Da Costa A, Mahmoudabady M, Mathieu M, Baerts L, Peace A, Lybaert P, Scharpe S, De Meester I, Bartunek J, Vanderheyden M, Mc Entee K. Dipeptidyl peptidase IV inhibition improves cardiorenal function in overpacing-induced heart failure. *Eur J Heart Fail*. 1. November 2011;14(1):14–21.
 51. Takahashi A, Asakura M, Ito S, Min K-D, Shindo K, Yan Y, Liao Y, Yamazaki S, Sanada S, Asano Y, Ishibashi-Ueda H, Takashima S, Minamino T, Asanuma H, Mochizuki N, Kitakaze M. Dipeptidyl-peptidase IV inhibition improves pathophysiology of heart failure and increases survival rate in pressure-overloaded mice. *AJP Heart Circ Physiol*. 15. Mai 2013;304(10):H1361–9.
 52. Santos L dos, Salles TA, Arruda-Junior DF, Campos LCG, Pereira AC, Barreto ALT, Antonio EL, Mansur AJ, Tucci PJF, Krieger JE, Girardi ACC. Circulating Dipeptidyl Peptidase IV Activity Correlates With Cardiac Dysfunction in Human and Experimental Heart FailureClinical Perspective. *Circ Heart Fail*. 1. September 2013;6(5):1029–38.

Literaturverzeichnis

53. Miyoshi T, Nakamura K, Yoshida M, Miura D, Oe H, Akagi S, Sugiyama H, Akazawa K, Yonezawa T, Wada J, Ito H. Effect of vildagliptin, a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, on cardiac hypertrophy induced by chronic beta-adrenergic stimulation in rats. *Cardiovasc Diabetol*. 13. Februar 2014;13:43.
54. Bostick B, Habibi J, Ma L, Aroor A, Rehmer N, Hayden MR, Sowers JR. Dipeptidyl Peptidase Inhibition Prevents Diastolic Dysfunction and Reduces Myocardial Fibrosis in a Mouse Model of Western Diet Induced Obesity. *Metabolism*. August 2014;63(8):1000–11.
55. Hocher B, Sharkovska Y, Mark M, Klein T, Pfab T. The novel DPP-4 inhibitors linagliptin and BI 14361 reduce infarct size after myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Int J Cardiol* [Internet]. [zitiert 14. September 2012];(0). Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016752731102167X>
56. Chang G, Zhang P, Ye L, Lu K, Wang Y, Duan Q, Zheng A, Qin S, Zhang D. Protective effects of sitagliptin on myocardial injury and cardiac function in an ischemia/reperfusion rat model. *Eur J Pharmacol*. Oktober 2013;718(1–3):105–13.
57. Chinda K, Palee S, Surinkaew S, Phornphutkul M, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Cardioprotective effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor during ischemia–reperfusion injury. *Int J Cardiol*. Juli 2013;167(2):451–7.
58. Son JW, Kim S. Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors and the Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes: A Tale of Three Studies. *Diabetes Metab J*. 2015;39(5):373.
59. Zannad F, Cannon CP, Cushman WC, Bakris GL, Menon V, Perez AT, Fleck PR, Mehta CR, Kupfer S, Wilson C, Lam H, White WB, EXAMINE Investigators. Heart failure and mortality outcomes in patients with type 2 diabetes taking alogliptin versus placebo in EXAMINE: a multicentre, randomised, double-blind trial. *Lancet Lond Engl*. 23. Mai 2015;385(9982):2067–76.
60. Clifton P. Do Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitors Cause Heart Failure? *Clin Ther*. Dezember 2014;36(12):2072–9.
61. McMurray JJV, Ponikowski P, Bolli GB, Lukashevich V, Kozlovski P, Kothny W, Lewsey JD, Krum H. Effects of Vildagliptin on Ventricular Function in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Heart Failure. *JACC Heart Fail*. Januar 2018;6(1):8–17.
62. McGuire DK, Alexander JH, Johansen OE, Perkovic V, Rosenstock J, Cooper ME, Wanner C, Kahn SE, Toto RD, Zinman B, Baanstra D, Pfarr E, Schnaidt S, Meinicke T, George JT, von Eynatten M, Marx N, On behalf of the CARMELINA Investigators. Linagliptin Effects on Heart Failure and Related Outcomes in Individuals With Type 2 Diabetes Mellitus at High Cardiovascular and Renal Risk in CARMELINA. *Circulation*. 15. Januar 2019;139(3):351–61.
63. Fadini GP, Avogaro A. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: Beyond GLP-1. *Vascul Pharmacol*. Juli 2011;55(1–3):10–6.

Literaturverzeichnis

64. Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, Brand CL, Yellon DM. Glucagon-like Peptide 1 Can Directly Protect the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Diabetes*. 1. Januar 2005;54(1):146–51.
65. Ossum A, van Deurs U, Engstrøm T, Jensen JS, Treiman M. The cardioprotective and inotropic components of the postconditioning effects of GLP-1 and GLP-1(9–36)a in an isolated rat heart. *Pharmacol Res*. November 2009;60(5):411–7.
66. Dokken BB, La Bonte LR, Davis-Gorman G, Teachey MK, Seaver N, McDonagh PF. Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1), Immediately Prior to Reperfusion, Decreases Neutrophil Activation and Reduces Myocardial Infarct Size in Rodents. *Horm Metab Res*. 28. Februar 2011;43(05):300–5.
67. Nikolaidis LA, Doverspike A, Hentosz T, Zourelas L, Shen Y-T, Elahi D, Shannon RP. Glucagon-Like Peptide-1 Limits Myocardial Stunning following Brief Coronary Occlusion and Reperfusion in Conscious Canines. *J Pharmacol Exp Ther*. 1. Januar 2005;312(1):303–8.
68. Zhao T, Parikh P, Bhashyam S, Bolukoglu H, Poornima I, Shen Y-T, Shannon RP. Direct Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Myocardial Contractility and Glucose Uptake in Normal and Postischemic Isolated Rat Hearts. *J Pharmacol Exp Ther*. 6. Januar 2006;317(3):1106–13.
69. Nikolaidis LA, Elahi D, Hentosz T, Doverspike A, Huerbin R, Zourelas L, Stolarski C, Shen Y, Shannon RP. Recombinant Glucagon-Like Peptide-1 Increases Myocardial Glucose Uptake and Improves Left Ventricular Performance in Conscious Dogs With Pacing-Induced Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 24. August 2004;110(8):955–61.
70. Poornima I, Brown SB, Bhashyam S, Parikh P, Bolukoglu H, Shannon RP. Chronic Glucagon-Like Peptide-1 Infusion Sustains Left Ventricular Systolic Function and Prolongs Survival in the Spontaneously Hypertensive, Heart Failure-Prone Rat. *Circ Heart Fail*. 1. September 2008;1(3):153–60.
71. Liu Q, Anderson C, Broyde A, Polizzi C, Fernandez R, Baron A, Parkes DG. Glucagon-like peptide-1 and the exenatide analogue AC3174 improve cardiac function, cardiac remodeling, and survival in rats with chronic heart failure. *Cardiovasc Diabetol*. 16. November 2010;9:76.
72. Vyas AK, Yang K-C, Woo D, Tzekov A, Kovacs A, Jay PY, Hruz PW. Exenatide Improves Glucose Homeostasis and Prolongs Survival in a Murine Model of Dilated Cardiomyopathy. *PLoS ONE* [Internet]. 17. Februar 2011 [zitiert 21. November 2013];6(2). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3040766/>
73. Gros R, You X, Baggio LL, Kabir MG, Sadi AM, Mungrue IN, Parker TG, Huang Q, Drucker DJ, Husain M. Cardiac Function in Mice Lacking the Glucagon-Like Peptide-1 Receptor. *Endocrinology*. 6. Januar 2003;144(6):2242–52.
74. Ravassa S, Zudaire A, Díez J. GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside. *Cardiovasc Res*. 5. Januar 2012;94(2):316–23.
75. Bhashyam S, Fields AV, Patterson B, Testani JM, Chen L, Shen Y -t., Shannon RP. Glucagon-Like Peptide-1 Increases Myocardial Glucose Uptake via p38 MAP Kinase-

- Mediated, Nitric Oxide-Dependent Mechanisms in Conscious Dogs With Dilated Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 1. Juli 2010;3(4):512–21.
76. Ku H-C, Chen W-P, Su M-J. DPP4 deficiency preserves cardiac function via GLP-1 signaling in rats subjected to myocardial ischemia/reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1. August 2011;384(2):197–207.
 77. Giannocco G, Oliveira KC, Crajoinas RO, Venturini G, Salles TA, Fonseca-Alaniz MH, Maciel RMB, Girardi ACC. Dipeptidyl peptidase IV inhibition upregulates GLUT4 translocation and expression in heart and skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 5. Januar 2013;698(1):74–86.
 78. Klonoff DC, Buse JB, Nielsen LL, Guan X, Bowlus CL, Holcombe JH, Wintle ME, Maggs DG. Exenatide effects on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes treated for at least 3 years. *Curr Med Res Opin.* 1. Januar 2008;24(1):275–86.
 79. Garber A, Henry R, Ratner R, Garcia-Hernandez PA, Rodriguez-Pattzi H, Olvera-Alvarez I, Hale PM, Zdravkovic M, Bode B. Liraglutide versus glimepiride monotherapy for type 2 diabetes (LEAD-3 Mono): a randomised, 52-week, phase III, double-blind, parallel-treatment trial. *The Lancet.* 13. Februar 2009;373(9662):473–81.
 80. Sokos GG, Nikolaidis LA, Mankad S, Elahi D, Shannon RP. Glucagon-Like Peptide-1 Infusion Improves Left Ventricular Ejection Fraction and Functional Status in Patients With Chronic Heart Failure. *J Card Fail.* Dezember 2006;12(9):694–9.
 81. Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, Shannon RP. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 in Patients With Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction After Successful Reperfusion. *Circulation.* 3. Februar 2004;109(8):962–5.
 82. Best JH, Hoogwerf BJ, Herman WH, Pelletier EM, Smith DB, Wenten M, Hussein MA. Risk of Cardiovascular Disease Events in Patients With Type 2 Diabetes Prescribed the Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) Receptor Agonist Exenatide Twice Daily or Other Glucose-Lowering Therapies A retrospective analysis of the LifeLink database. *Diabetes Care.* 1. Januar 2011;34(1):90–5.
 83. Nikolaidis LA, Elahi D, Shen Y-T, Shannon RP. Active metabolite of GLP-1 mediates myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 12. Januar 2005;289(6):H2401–8.
 84. Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefler J, Bolz S-S, Drucker DJ, Husain M. Cardioprotective and Vasodilatory Actions of Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Are Mediated Through Both Glucagon-Like Peptide 1 Receptor–Dependent and –Independent Pathways. *Circulation.* 5. Juni 2008;117(18):2340–50.
 85. Zaruba M-M, Theiss HD, Markus Vallaster, Mehl U, Brunner S, David R, Fischer R, Krieg L, Hirsch E, Huber B, Nathan P, Israel L, Imhof A, Herbach N, Assmann G, Wanke R, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G, Franz W-M. Synergy between CD26/DPP-IV Inhibition and G-CSF Improves Cardiac Function after Acute Myocardial Infarction. *Cell Stem Cell.* 3. April 2009;4(4):313–23.

Literaturverzeichnis

86. Zhong J, Rajagopalan S. Dipeptidyl Peptidase-4 Regulation of SDF-1/CXCR4 Axis: Implications for Cardiovascular Disease. *Front Immunol* [Internet]. 25. September 2015 [zitiert 13. Dezember 2017];6. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4585326/>
87. Segers VFM, Tokunou T, Higgins LJ, MacGillivray C, Gannon J, Lee RT. Local Delivery of Protease-Resistant Stromal Cell Derived Factor-1 for Stem Cell Recruitment After Myocardial Infarction. *Circulation*. 9. Oktober 2007;116(15):1683–92.
88. Gallagher KA, Liu Z-J, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG, Nedeau A, Thom SR, Velazquez OC. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 α . *J Clin Invest*. 1. Mai 2007;117(5):1249–59.
89. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, others. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *The Lancet*. 2003;362(9385):697–703.
90. Stokman G, Stroo I, Claessen N, Teske GJD, Florquin S, Leemans JC. SDF-1 provides morphological and functional protection against renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant*. 1. Dezember 2010;25(12):3852–9.
91. Chu P-Y, Mariani J, Finch S, McMullen JR, Sadoshima J, Marshall T, Kaye DM. Bone Marrow-Derived Cells Contribute to Fibrosis in the Chronically Failing Heart. *Am J Pathol*. April 2010;176(4):1735–42.
92. Chu P-Y, Walder K, Horlock D, Williams D, Nelson E, Byrne M, Jandeleit-Dahm K, Zimmet P, Kaye DM. CXCR4 Antagonism Attenuates the Development of Diabetic Cardiac Fibrosis. Wang M, Herausgeber. *PLOS ONE*. 27. Juli 2015;10(7):e0133616.
93. Gross L, Theiss HD, Grabmaier U, Adrion C, Mansmann U, Sohn H-Y, Hoffmann E, Steinbeck G, Franz W-M, Brenner C. Combined therapy with sitagliptin plus granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction — Long-term results of the SITAGRAMI trial. *Int J Cardiol*. Juli 2016;215:441–5.
94. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Harty GJ, Lapp H, Burnett JC. Des-serine-proline brain natriuretic peptide 3–32 in cardiorenal regulation. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 1. Februar 2007;292(2):R897–901.
95. Salles TA, dos Santos L, Barauna VG, Girardi ACC. Potential Role of Dipeptidyl Peptidase IV in the Pathophysiology of Heart Failure. *Int J Mol Sci*. 16. Februar 2015;16(2):4226–49.
96. King L, Wilkins MR. Natriuretic peptide receptors and the heart. *Heart*. 2002;87(4):314–315.
97. Moilanen A-M, Rysä J, Mustonen E, Serpi R, Aro J, Tokola H, Leskinen H, Manninen A, Levijoki J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Intramyocardial BNP Gene Delivery Improves Cardiac Function Through Distinct Context-Dependent MechanismsClinical Perspective. *Circ Heart Fail*. 1. Juli 2011;4(4):483–95.

Literaturverzeichnis

98. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M, Nakao K. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11. April 2000;97(8):4239–44.
99. Jackson EK, Zhang M, Liu W, Mi Z. Inhibition of Renal Dipeptidyl Peptidase IV Enhances Peptide YY1–36-Induced Potentiation of Angiotensin II-Mediated Renal Vasoconstriction in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 11. Januar 2007;323(2):431–7.
100. Tofovic DS, Bilan VP, Jackson EK. Sitagliptin augments angiotensin II-induced renal vasoconstriction in kidneys from rats with metabolic syndrome: Sitagliptin augments renal vasoconstriction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 30. März 2010;37(7):689–91.
101. Jackson EK, Dubinion JH, Mi Z. Effects of dipeptidyl peptidase iv inhibition on arterial blood pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Januar 2008;35(1):29–34.
102. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on Experimental Hypertension I. the Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *J Exp Med*. 3. Januar 1934;59(3):347–79.
103. Smith SH, McCaslin M, Sreenan C, Bishop SP. Regional myocyte size in two-kidney, one clip renal hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. Dezember 1988;20(11):1035–42.
104. Alter ML, Ott IM, von Websky K, Tsuprykov O, Sharkovska Y, Krause-Relle K, Raila J, Henze A, Klein T, Hocher B. DPP-4 Inhibition on Top of Angiotensin Receptor Blockade Offers a New Therapeutic Approach for Diabetic Nephropathy. *Kidney Blood Press Res*. 2012;36(1):119–30.
105. Tsuprykov O, Ando R, Reichetzedler C, von Websky K, Antonenko V, Sharkovska Y, Chaykovska L, Rahnenführer J, Hasan AA, Tammen H, others. The dipeptidyl peptidase inhibitor linagliptin and the angiotensin II receptor blocker telmisartan show renal benefit by different pathways in rats with 5/6 nephrectomy. *Kidney Int*. 2016;89(5):1049–1061.
106. Hocher B, George I, Diekmann F, Zart R, Rebstock J, Schwarz A, Thöne-Reineke C, Neumayer H-H, Bauer C. ETA receptor blockade induces fibrosis of the clipped kidney in two-kidney-one-clip renovascular hypertensive rats. *J Hypertens*. 2000;18(12):1807–1814.
107. Shah A, Oh Y-B, Lee SH, Lim JM, Kim SH. Angiotensin-(1-7) attenuates hypertension in exercise-trained renal hypertensive rats. *AJP Heart Circ Physiol*. 30. März 2012;302(11):H2372–80.
108. Michel JB, Dussaule JC, Choudat L, Auzan C, Nochy D, Corvol P, Menard J. Effects of antihypertensive treatment in one-clip, two kidney hypertension in rats. *Kidney Int*. Mai 1986;29(5):1011–20.
109. Hocher B, Godes M, Olivier J, Weil J, Eschenhagen T, Slowinski T, Neumayer H, Bauer C, Paul M, Pinto YM. Inhibition of left ventricular fibrosis by tranilast in rats with renovascular hypertension. *J Hypertens*. 1. April 2002;20(4):745–51.
110. Thone-Reineke C, Olivier J, Godes M, Zart R, George I, Bauer C, Neumayer H-H, Hocher B. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium channel blockade on

Literaturverzeichnis

- cardiac apoptosis in rats with 2K1C (two-kidney/one-clip) renovascular hypertension. *Clin Sci*. 2003;104(1):79–86.
111. Boissiere J, Eder V, Machet M-C, Courteix D, Bonnet P. Moderate exercise training does not worsen left ventricle remodeling and function in untreated severe hypertensive rats. *J Appl Physiol*. 21. November 2007;104(2):321–7.
 112. Chelko SP, Schmiedt CW, Lewis TH, Lewis SJ, Robertson TP. A novel vascular clip design for the reliable induction of 2-kidney, 1-clip hypertension in the rat. *J Appl Physiol*. 1. Februar 2012;112(3):362–6.
 113. Murphy WR, Coleman TG, Smith TL, Stanek KA. Effects of graded renal artery constriction on blood pressure, renal artery pressure, and plasma renin activity in Goldblatt hypertension. *Hypertension*. 1. Januar 1984;6(1):68–74.
 114. Goebel M, Clemenz M, Unger T. Effective treatment of hypertension by AT(1) receptor antagonism: the past and future of telmisartan. - PubMed - NCBI. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. September 2006;4(5):615–29.
 115. Pacheco BP, Crajoinas RO, Couto GK, Davel APC, Lessa LM, Rossoni LV, Girardi AC. Dipeptidyl peptidase IV inhibition attenuates blood pressure rising in young spontaneously hypertensive rats: *J Hypertens*. März 2011;29(3):520–8.
 116. Aroor AR, Sowers JR, Bender SB, Nistala R, Garro M, Mugerfeld I, Hayden MR, Johnson MS, Salam M, Whaley-Connell A, DeMarco VG. Dipeptidylpeptidase Inhibition Is Associated with Improvement in Blood Pressure and Diastolic Function in Insulin-Resistant Male Zucker Obese Rats. *Endocrinology*. Juli 2013;154(7):2501–13.
 117. Hattori S. Sitagliptin reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes [Rapid Communication]. *Endocr J*. 2011;58(1):69–73.
 118. Ogawa S, Ishiki M, Nako K, Okamura M, Senda M, Mori T, Ito S. Sitagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Decreases Systolic Blood Pressure in Japanese Hypertensive Patients with Type 2 Diabetes. *Tohoku J Exp Med*. 2011;223(2):133–5.
 119. Marney A, Kunchakarra S, Byrne L, Brown NJ. Interactive Hemodynamic Effects of Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibition and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Humans. *Hypertension*. 10. Januar 2010;56(4):728–33.
 120. Devin JK, Pretorius M, Nian H, Yu C, Billings FT, Brown NJ. Substance P increases Sympathetic Activity during Combined Angiotensin Converting Enzyme and Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibition. *Hypertension*. Mai 2014;63(5):951–7.
 121. Mistry GC, Maes AL, Lasseter KC, Davies MJ, Gottesdiener KM, Wagner JA, Herman GA. Effect of Sitagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, on Blood Pressure in Nondiabetic Patients With Mild to Moderate Hypertension. *J Clin Pharmacol*. 2008;48(5):592–598.
 122. Cooper ME, Perkovic V, Groop P-H, Hoher B, Hehnke U, Meinicke T, Koitka-Weber A, van der Walt S, von Eynatten M. Hemodynamic effects of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin with renin–angiotensin system inhibitors in type 2 diabetic patients with albuminuria. *J Hypertens*. Juni 2019;37(6):1294–300.

123. Girardi ACC, Fukuda LE, Rossoni LV, Malnic G, Reboucas NA. Dipeptidyl peptidase IV inhibition downregulates Na⁺-H⁺ exchanger NHE3 in rat renal proximal tubule. *AJP Ren Physiol*. 28. November 2007;294(2):F414–22.
124. Liu C-T, Chen T-H, Chen H-H, Lin Y-C, Chen T-W. Effect of Sitagliptin on Blood Pressure and Estimated Glomerular Filtration Rate in Diabetic Patients Using an Angiotensin II Receptor Blocker. *J Exp Clin Med*. Dezember 2012;4(6):334–7.
125. Rosendorff C. The Renin-Angiotensin System and Vascular Hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. Oktober 1996;28(4):803–12.
126. Manrique C, Habibi J, Aroor AR, Sowers JR, Jia G, Hayden MR, Garro M, Martinez-Lemus LA, Ramirez-Perez FI, Klein T, Meininger GA, DeMarco VG. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition with linagliptin prevents western diet-induced vascular abnormalities in female mice. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. Dezember 2016 [zitiert 7. Juli 2017];15(1). Verfügbar unter: <http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-016-0414-5>
127. Koibuchi N, Hasegawa Y, Katayama T, Toyama K, Uekawa K, Sueta D, Kusaka H, Ma M, Nakagawa T, Lin B, others. DPP-4 inhibitor linagliptin ameliorates cardiovascular injury in salt-sensitive hypertensive rats independently of blood glucose and blood pressure. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:157.
128. Zhang L-H, Pang X-F, Bai F, Wang N-P, Shah AI, McKallip RJ, Li X-W, Wang X, Zhao Z-Q. Preservation of Glucagon-Like Peptide-1 Level Attenuates Angiotensin II-Induced Tissue Fibrosis by Altering AT1/AT2 Receptor Expression and Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activity in Rat Heart. *Cardiovasc Drugs Ther*. Juni 2015;29(3):243–55.
129. Zhang Y, Shao L, Ma A, Guan G, Wang J, Wang Y, Tian G. Telmisartan delays myocardial fibrosis in rats with hypertensive left ventricular hypertrophy by TGF- β 1/Smad signal pathway. *Hypertens Res*. Januar 2014;37(1):43–9.
130. Esposito G, Cappetta D, Russo R, Rivellino A, Ciuffreda LP, Roviezzo F, Piegari E, Berrino L, Rossi F, De Angelis A, Urbanek K. Sitagliptin reduces inflammation, fibrosis and preserves diastolic function in a rat model of heart failure with preserved ejection fraction. *Br J Pharmacol*. 1. November 2017;174(22):4070–86.
131. Hasan AA, von Websky K, Reichetzedder C, Tsuprykov O, Gaballa MMS, Guo J, Zeng S, Delić D, Tammen H, Klein T, Kleuser B, Hocher B. Mechanisms of GLP-1 receptor-independent renoprotective effects of the dipeptidyl peptidase type 4 inhibitor linagliptin in GLP-1 receptor knockout mice with 5/6 nephrectomy. *Kidney Int* [Internet]. Februar 2019 [zitiert 19. Mai 2019]; Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253819300523>
132. Mulvihill EE, Varin EM, Ussher JR, Campbell JE, Bang KWA, Abdullah T, Baggio LL, Drucker DJ. Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Impairs Ventricular Function and Promotes Cardiac Fibrosis in High Fat–Fed Diabetic Mice. *Diabetes*. 1. März 2016;65(3):742–54.
133. Zhu X, Gillespie DG, Jackson EK. NPY1–36 and PYY1–36 activate cardiac fibroblasts: an effect enhanced by genetic hypertension and inhibition of dipeptidyl peptidase 4. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. November 2015;309(9):H1528–42.

Literaturverzeichnis

134. Maisel AS, Duran JM, Wettersten N. Natriuretic Peptides in Heart Failure: Atrial and B-type Natriuretic Peptides. *Heart Fail Clin.* Januar 2018;14(1):13–25.
135. Park BM, Gao S, Cha SA, Kim SH. Attenuation of renovascular hypertension by cyclooxygenase-2 inhibitor partly through ANP release. *Peptides.* 1. Juli 2015;69:1–8.
136. Iwasa M, Kobayashi H, Yasuda S, Kawamura I, Sumi S, Yamada Y, Shiraki T, Yamaki T, Ushikoshi H, Aoyama T, Nishigaki K, Takemura G, Fujiwara T, Fujiwara H, Minatoguchi S. Antidiabetic drug voglibose is protective against ischemia-reperfusion injury through glucagon-like peptide 1 receptors and the phosphoinositide 3-kinase-Akt-endothelial nitric oxide synthase pathway in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* Juni 2010;55(6):625–34.
137. Hattori A, Kawamura I, Yamada Y, Kanamori H, Aoyama T, Ushikoshi H, Kawasaki M, Nishigaki K, Tamemura G, Minatoguchi S. Elevated plasma GLP-1 levels and enhanced expression of cardiac GLP-1 receptors as markers of left ventricular systolic dysfunction: a cross-sectional study. *BMJ Open.* 2013;3(9):e003201.
138. Zhou Y, He X, Chen Y, Huang Y, Wu L, He J. Exendin-4 attenuates cardiac hypertrophy via AMPK/mTOR signaling pathway activation. *Biochem Biophys Res Commun.* Dezember 2015;468(1–2):394–9.
139. Bullock BP, Heller RS, Habener JF. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology.* 7. Januar 1996;137(7):2968–78.
140. Wei Y, Mojsov S. Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett.* 30. Januar 1995;358(3):219–24.
141. Wohlfart P, Linz W, Hubschle T, Linz D, Huber J, Hess S, Crowther D, Werner U, Ruetten H. Cardioprotective effects of lixisenatide in rat myocardial ischemia-reperfusion injury studies. *J Transl Med.* 28. März 2013;11:84.
142. Panjwani N, Mulvihill EE, Longuet C, Yusta B, Campbell JE, Brown TJ, Streutker C, Holland D, Cao X, Baggio LL, Drucker DJ. GLP-1 Receptor Activation Indirectly Reduces Hepatic Lipid Accumulation But Does Not Attenuate Development of Atherosclerosis in Diabetic Male *ApoE*^{-/-} Mice. *Endocrinology.* Januar 2013;154(1):127–39.
143. Pyke C, Knudsen LB. The Glucagon-Like Peptide-1 Receptor—or Not? *Endocrinology.* Januar 2013;154(1):4–8.
144. Drucker DJ. Incretin Action in the Pancreas: Potential Promise, Possible Perils, and Pathological Pitfalls. *Diabetes.* 1. Oktober 2013;62(10):3316–23.
145. Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Ørskov C, Reedtz-Runge S, Kaastrup P, Hvelplund A, Bardram L, Calatayud D, Knudsen LB. GLP-1 Receptor Localization in Monkey and Human Tissue: Novel Distribution Revealed With Extensively Validated Monoclonal Antibody. *Endocrinology.* April 2014;155(4):1280–90.

Literaturverzeichnis

146. Jensen CB, Pyke C, Rasch MG, Dahl AB, Knudsen LB, Secher A. Characterization of the Glucagonlike Peptide-1 Receptor in Male Mouse Brain Using a Novel Antibody and In Situ Hybridization. *Endocrinology*. 1. Februar 2018;159(2):665–75.
147. Kobara Y, Hasegawa H, Hirose M, Takano H, Kobayashi Y. Analysis of the Correlation between the Myocardial Expression of DPP-4 and the Clinical Parameters of Patients with Heart Failure. *Int Heart J*. 30. November 2018;59(6):1303–11.
148. Yang J, Campitelli J, Hu G, Lin Y, Luo J, Xue C. Increase in DPP-IV in the intestine, liver and kidney of the rat treated with high fat diet and streptozotocin. *Life Sci*. Juli 2007;81(4):272–9.
149. Pala L, Mannucci E, Pezzatini A, Ciani S, Sardi J, Raimondi L, Ognibene A, Cappadona A, Vannelli BG, Rotella CM. Dipeptidyl peptidase-IV expression and activity in human glomerular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Oktober 2003;310(1):28–31.
150. Sell H, Bluher M, Kloting N, Schlich R, Willems M, Ruppe F, Knoefel WT, Dietrich A, Fielding BA, Arner P, Frayn KN, Eckel J. Adipose Dipeptidyl Peptidase-4 and Obesity: Correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes Care*. 1. Dezember 2013;36(12):4083–90.
151. Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, He J, Nagai T, Nakamura Y, Ishigaki Y, Kitada M, Srivastava SP, Koya D. Linagliptin-Mediated DPP-4 Inhibition Ameliorates Kidney Fibrosis in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Inhibiting Endothelial-to-Mesenchymal Transition in a Therapeutic Regimen. *Diabetes*. 1. Juni 2014;63(6):2120–31.
152. Pinto Y. Lessons from rat models of hypertension from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*. 1. Juli 1998;39(1):77–88.
153. Doggrell S. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*. 1. Juli 1998;39(1):89–105.

7 Eidesstattliche Versicherung /Anteilserklärung

„Ich, Margarete Hohmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Auswirkung von Linagliptin als Mono- und als Kombinationstherapie mit Telmisartan auf die Morphologie des Herzens und die kardiale Proteinexpression im renovaskulären Hypertonie-Modell der Ratte“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Margarete Hohmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Chaykovska L, Alter ML, von Websky K, Hohmann M, Tsuprykov O, Reichetzedder C, Kutil B, Kraft R, Klein T, Hoher B. Effects of telmisartan and linagliptin when used in combination on blood pressure and oxidative stress in rats with 2-kidney-1-clip hypertension. J Hypertens 2013; 31: 2290–2298;

Beitrag im Einzelnen:

Aus meiner Auswertung sind die Daten zur Herzmorphologie und kardialen Proteinexpression, zusammengefasst in der Tabelle 2 (außer relatives Herzgewicht), entstanden.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Publikationsliste

Publikation im Rahmen der Promotion:

Chaykovska L, Alter ML, von Websky K, Hohmann M, Tsuprykov O, Reichetzedler C, Kutil B, Kraft R, Klein T, Hoher B. Effects of telmisartan and linagliptin when used in combination on blood pressure and oxidative stress in rats with 2-kidney-1-clip hypertension. *J Hypertens* 2013; 31: 2290–2298.

Weitere Publikationen:

Hohmann M, Schmelz R, Hampe J, Zeißig S. Sinnvolle genetische Untersuchungen in der Gastroenterologie. *DMW - Dtsch Medizinische Wochenschrift* 2018; 143: 1477–1480.

Zeissig S, Sulk S, Brueckner S, Matthes K, Hohmann M, Reichel S, Ellrichmann M, Arlt A, Will U, Hampe J. Severe bleeding is a rare event in patients receiving lumen-apposing metal stents for the drainage of pancreatic fluid collections. *Gut* 2019; 68: 945–946.

10 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Berthold Hoher und Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. medic. Christian Freise für die Überlassung des Themas und die fachkundige Betreuung der Arbeit bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. med. vet. Karoline von Websky und Herrn Dr. med. Christoph Reichetzer, die mir stets als wertvolle Ansprechpartner bei Fragen und Unklarheiten zur Seite standen. Durch ihr aufmerksames Korrekturlesen und ihre konstruktiven Verbesserungsvorschläge hat diese Arbeit ihren letzten Schliff bekommen.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dr. rer. medic. Katharina Krause-Relle, die mich in die Laborarbeit rund um die Anfertigung und Auswertung der histologischen Präparate eingewiesen hat. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. Oleg Tsuprykov für die Einweisung in die Methodik des Western Blotting und die geduldige und bereitwillige Unterstützung bei Problemen und immer wieder auftauchenden Fragen in diesem Bereich bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich unterstützt und immer wieder aufgebaut haben, wenn es mal nicht so gut lief. Insbesondere möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, die durch einen sorgfältigen letzten Blick noch die hoffentlich letzten Rechtschreibfehler ausfindig gemacht hat und die durch ihre aufmunternde Art wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.