

**Aus dem Ernährungsphysiologischen Institut der
Universität Potsdam,
eingereicht über das Institut für Pharmakologie des
Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Effekte des DPP-4 Inhibitors Linagliptin
auf das Herz im Vergleich zum und in
Verbindung mit dem
Angiotensin-Rezeptorblocker Telmisartan
Eine Untersuchung an Ratten mit urämisch bedingter
Kardiomyopathie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lisa Leiner
Tierärztin aus Aschaffenburg

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3896

**Aus dem Ernährungsphysiologischen Institut der
Universität Potsdam,
eingereicht über das Institut für Pharmakologie des
Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Effekte des DPP-4 Inhibitors Linagliptin
auf das Herz im Vergleich zum und in
Verbindung mit dem
Angiotensin-Rezeptorblocker Telmisartan
Eine Untersuchung an Ratten mit urämisch bedingter
Kardiomyopathie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lisa Leiner
Tierärztin aus Aschaffenburg

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3896

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erste Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Berthold Hocher
Dritte Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. Mahtab Bahramsoltani

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
rats; cardiomyopathy; type 2 diabetes; renal insufficiency,
chronic (MeSH); cardio-renal syndrome (MeSH); blood
pressure; histology

Tag der Promotion: 12.04.2017

INHALT

<i>Inhalt</i>	4
<i>1 Einleitung</i>	7
1.1 Die chronische Niereninsuffizienz	7
1.1.1 Definition der chronischen Niereninsuffizienz	7
1.1.2 Epidemiologie	8
1.1.3 Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz	9
1.2 Die urämische Kardiomyopathie	15
1.2.1 Definition der urämischen Kardiomyopathie	15
1.2.2 Epidemiologie	16
1.2.3 Pathophysiologie der urämischen Kardiomyopathie..	16
1.2.4 Bisherige Therapiekonzepte zur Behandlung der urämischen Kardiomyopathie.....	18
1.3 Histologischer Hintergrund und Beschreibung des Tiermodells	26
1.3.1 Histologischer Hintergrund	26
1.3.2 Die 5/6-Nephrektomie als Modell einer urämischen Kardiomyopathie	27
1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	30
<i>2 Material und Methoden</i>	33
2.1 Tiere und Haltung	33
2.2 Versuchsaufbau und Durchführung	35
2.3 Materialien	37

2.3.1	Behandlungen Versuchstiere und Datensammlung ...	37
2.3.2	Organentnahme, Histologie und histologische Auswertung	38
2.3.3	DotBlot	41
2.3.4	Wirkstoffe.....	43
2.4	Methoden.....	44
2.4.1	Blutdruckmessung (RR)	44
2.4.2	Die 5/6-Nephrektomie	45
2.4.3	Organentnahme.....	46
2.4.4	Vorgang Paraffineinbettung	47
2.4.5	Angewandte histologische Färbemethoden	48
2.4.6	Histologische Auswertung der Schnitte.....	51
2.4.7	DotBlot	56
2.4.8	Statistische Auswertung	60
3	<i>Ergebnisse.....</i>	63
3.1	Allgemeine Parameter	63
3.1.1	Körpergewicht	63
3.1.2	Herzgewicht und relatives Herzgewicht	64
3.1.3	Blutdruck (RR)	65
3.1.4	Korrelation zwischen Blutdruck und Herzgewicht....	71
3.2	Histologische Auswertung.....	72
3.2.1	Media-Lumen-Ratio	72
3.2.2	Myozytendicke	73
3.2.3	Korrelation zwischen Blutdruck und histologischen Befunden.....	75
3.2.4	Interstitielle Fibrose.....	77
3.3	DotBlot	79
3.3.1	Kollagen Typ I.....	79
3.3.2	Kollagen Typ III.....	79

3.3.3	Transforming-growth-factor- β 1	81
3.3.4	SMAD2	82
3.3.5	Connective tissue growth factor	83
4	<i>Diskussion</i>	85
4.1	Blutdruck und Herzgewicht	87
4.2	Herzmorphologie	91
4.2.1	Myozytendicke und Media-Lumen-Ratio	91
4.2.2	Interstitielle Fibrose und DotBlot.....	94
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblick	97
5	<i>Zusammenfassung</i>	100
7	<i>Summery</i>	102
8	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	104
9	<i>Diagramm- und Tabellenverzeichnis</i>	105
10	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	108
11	<i>Literaturverzeichnis</i>	110
	<i>Danksagung</i>	122
	<i>Selbstständigkeitserklärung</i>	124

1 EINLEITUNG

1.1 DIE CHRONISCHE NIERENINSUFFIZIENZ

1.1.1 Definition der chronischen Niereninsuffizienz

Der Begriff chronische Niereninsuffizienz (CNI) beinhaltet alle Stadien der Nierenerkrankung durch permanente Einschränkung glomerulärer, tubulärer und endokriner Funktionen infolge eines irreversiblen Ausfalls funktionstüchtiger Nephrone. Dies umfasst sowohl den frühen Verlust der Funktionalität von Glomeruli (erste Anzeichen: Proteinurie über mehrere Monate) als auch das terminale Stadium mit gravierenden Funktionseinbußen, tubulärer Atrophie und Nierenversagen. In diesem Zustand ist die Notwendigkeit gegeben, die renale Filtration extern durch Apherese/Dialyse zu ersetzen oder gar eine Nierentransplantation durchzuführen (Edwards N.C. et al. 2014).

Die meisten Nierenerkrankungen, gleich welcher Ursache, können zu einer Niereninsuffizienz führen. Hierbei spielen nicht nur primäre Erkrankungen der Nephrone eine Rolle, sondern auch indirekte Schädigungen durch beispielsweise vaskuläre Erkrankungen, Stoffwechselstörungen oder Läsionen der ableitenden Harnwege. Zudem spielt das Alter der Patienten eine Rolle (Moe S.M., Chen N.X. 2004). Im Alter steigt die Gefahr, an Bluthochdruck zu erkranken. Dies wiederum erhöht das Risiko für eine Niereninsuffizienz.

Folgen der chronischen Niereninsuffizienz können sich zum einen in Allgemeinsymptomen wie Hautproblemen, Gerinnungsstörungen, erhöhte Neigung zu Infekten und anderen widerspiegeln. Aber auch kardiovaskuläre Folgeerkrankungen, renale Osteopathie, Neuro- und Myopathien durch Azidose sowie metabolische Veränderungen wie eine gestörte Glukosetoleranz sind für die Morbidität der chronischen Niereninsuffizienz von Bedeutung (Murtagh Fliss E.M., Addington-Hall J., Higginson I.J. 2007).

Der Verlauf einer chronischen Niereninsuffizienz wird somit zusammenfassend bestimmt durch Art und Ausmaß der renalen Läsion, die Reaktion des Organismus und die Begleiterkrankungen der betroffenen Patienten (Geiger, H., Becken W.D. 2003).

1.1.2 Epidemiologie

Die CNI ist eine weltweit auftretende Erkrankung, die nicht nur ein hohes Mortalitätsrisiko für Betroffene bedeutet, sondern auch hohe Kosten für das Gesundheitssystem. In den USA verdoppelte sich die Zahl der terminal niereninsuffizienten Patienten in den vergangenen zehn Jahren. Laut der Homepage der *National Kidney Foundation* sind aktuell 26 Millionen Erwachsene in Amerika an CNI erkrankt. Im Jahr 1998 wurde in den USA bei 85.000 Personen ein erhöhtes Risiko für eine CNI festgestellt, Ende 1998 befanden sich über 320.000 Personen im Stadium einer terminalen Niereninsuffizienz. Dies entspricht einer Prävalenz von 1160 pro einer Million

Einwohner, wobei 72 % der Betroffenen per Dialyse behandelt wurden und 28 % eine Nierentransplantation erhalten hatten. Im gleichen Jahr wurden 63.000 Todesfälle durch chronische Niereninsuffizienz verzeichnet (National Kidney Foundation 2002).

In Deutschland waren Ende 2006 laut einer Studie des Bundesverbands Niere e.V. (QUASI-Niere) knapp 91.000 Patienten in chronischer Nierenersatztherapie. Dies entspricht einer Prävalenz von 1114 pro einer Million Einwohner. Knapp 12.000 Patienten verstarben 2006 infolge einer Niereninsuffizienz (Frei U., Schober-Halstenberg H-J. 2007). Seit 1995 ist die Zahl der Dialysepatienten in Deutschland um 53 % gestiegen, die der Nierentransplantierten um 78 %.

Der frühe Zeitpunkt der Diagnosestellung und der Beginn einer entsprechenden Therapie sind somit entscheidend für den Erfolg einer Behandlung. Aufgrund des teilweise späten Auftretens von Beschwerden und der damit meist hinausgezögerten Vorstellung des Patienten beim Arzt, ist ein früher Einsatz von Medikamenten jedoch nicht immer möglich (Edwards N.C. et al. 2014; Heywood J.T, Fonarow G.C., Costanzo M.R. et al. 2007).

1.1.3 Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz

Eine gesunde Niere ist verantwortlich für eine Reihe lebensnotwendiger Funktionen. Hierzu gehören die Regelung des Flüssigkeitshaushaltes, die Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen (und Medikamenten) aus

dem Organismus über den Urin, die Regelung der Konzentration von Elektrolyten wie Natrium, Kalium, Phosphat und Kalzium und die Regelung des Säure-Basen-Gleichgewichts. Zudem hat die Niere Einfluss auf die hormonelle Regelung von Blutdruck und Blutvolumen, die Bildung von Erythrozyten und den Knochenstoffwechsel.

Ist eine oder sind mehrere dieser Funktionen durch Nierenschädigung gestört, folgen Erkrankungen, die sich auf den gesamten Organismus auswirken. Entscheidend hierbei sind die Reduktion der Ausscheidungskapazität für Wasser, Elektrolyte und Säureäquivalente sowie die Beeinträchtigung von endokrinen Funktionen (Silbernagl S., Despopoulos A. 2012).

Im klinischen Alltag können Störungen der Nierenfunktion im Labor mittels Urinsediment, der Erfassung einer Proteinurie oder aber der Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) festgestellt werden. Von diesen Untersuchungen ist die Erfassung der GFR als Summe der Filtrationsrate aller funktionierenden Nephrone der beste Marker zur globalen funktionellen Kapazität der Nieren (Ronco C., Bellomo R., Kellum J. A. 2009).

1.1.3.1 Die chronisch kranke Niere

Der Funktionsausfall der Nephrone, der kleinsten funktionellen Einheit einer Niere, ist gekennzeichnet durch zwei wesentliche Veränderungen im Aufbau:

Erstens kommt es zu Schädigungen der Nierenkörperchen, die aus Glomeruli und Bowman-Kapsel bestehen. Hier

findet in der gesunden Niere die Ultrafiltration des Blutes zum Primärharn statt. Durch die Schädigung der Nierenkörperchen und einer damit verbundenen erhöhten Durchlässigkeit für größere Moleküle kommt es zu einer vermehrten Exkretion von Proteinen, hauptsächlich Albuminen und Globulinen, aus dem Blut. Dies führt zu einer Hypoproteinämie und damit zu einer Imbalance des Flüssigkeitshaushaltes im Blutsystem. Diese Imbalance zeichnet sich durch einen erniedrigten kolloidosmotischen Druck innerhalb der Gefäße durch den Proteinverlust aus, was des Weiteren zu einer Hypovolämie führt. Diese Hypovolämie aktiviert das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), es kommt zu einer Verengung der Blutgefäße, um den Blutdruck zu steigern und die Hypovolämie auszugleichen, damit zu einer Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate, was weitere Proteinverluste mit zusätzlicher Schädigung der Nierenkörperchen zur Folge hat (Geiger, H., Beecken W.D. 2003). Die chronische Aktivierung des RAAS spielt des Weiteren eine zentrale Rolle in der Entstehung der arteriellen Hypertonie (McFarlane S.I., Kumar A., Sowers J.R. 2003). Als Hypertonie wird eine dauerhafte Erhöhung des arteriellen Blutdrucks bezeichnet.

Zweitens kommt es zu Schädigungen des Tubulussystems in dem die Rückresorption und teilweise Sekretion von Wasser, Elektrolyten, Kohlenhydraten und niedermolekularen Proteinen stattfinden. Die Schädigung des Tubulussystems zieht eine Dysregulation der Konzentration von Elektrolyten wie unter anderem Natrium und Kalium nach sich. Die Folgen sind zum einen eine

positive Natriumbilanz und damit verbunden eine erhöhte Retention von Wasser, was die Entstehung von Ödemen in verschiedenen Geweben fördert. Zum anderen führt die gestörte Ausscheidung von Kalium zu einer Hyper- oder auch Hypokaliämie. Beide Zustände können zu atrialen/ventrikulären Arrhythmien sowie Schwäche bis hin zur Paralyse der betroffenen Patienten führen (Lehnhardt A., Kemper M.J. 2011; Schrier R.W. 1999).

Neben den Veränderungen im Wasser-, Elektrolyt- und auch im Säure-Basen-Haushalt des Blutes spielt die Entwicklung einer Urämie, die durch die tubuläre Zellschädigung in der Niere entsteht, eine große Rolle. Harnpflichtige Stoffe können nicht mehr in ausreichendem Maße aus dem Blutsystem gefiltert werden und verbleiben in diesem. Durch die Anreicherung von Kreatinin, Harnstoff und weiteren Urämietoxinen im Blut kommt es durch metabolischen, endothelialen und koagulativen Einfluss zu Entzündungserscheinungen innerhalb der Gefäße (Ross R. 1999). Dies fördert die Entstehung von Arteriosklerose durch fortgeschrittene vaskuläre Atherogenese, Instabilität von Plaques und Kalzifizierungsvorgängen (Moe S.M., Chen N.X. 2004; Santoro A., Mancini E. 2002).

1.1.3.2 Kardiovaskuläre Folgen

Die chronische Niereninsuffizienz führt in einem hohen Maß zu kardiovaskulären Folgeerkrankungen. Sie stellt die Hauptursache von Morbidität und Mortalität in Patienten dar, die ursächlich von einer chronischen

Niereninsuffizienz betroffen sind (Di Lullo L., House A., Gorini A. et al. 2015). Hierzu zählen die urämische Kardiomyopathie mit Herzinsuffizienz, die urämische Perikarditis, Herzklappenfehler, die koronare Herzkrankheit, die Arteriosklerose und die renoparenchymatöse Hypertonie (Geiger, H., Becken W.D. 2003).

Obwohl das kardiovaskuläre Risiko bei Patienten im terminalen Stadium einer Niereninsuffizienz sehr viel größer ist, geht die Prävalenz von Herzkreislauferkrankungen eher mit dem frühen Stadium der chronischen Niereninsuffizienz einher (Edwards N.C., Moody W.E., Yuan M. et al. 2015). Hier können beispielsweise morphologische Veränderungen des Herzens, wie eine diffuse Fibrose des Myokards, festgestellt werden (Edwards N.C., Moody W.E., Yuan M. et al. 2015). Diese müssen jedoch nicht zwingend bereits zu sichtbaren Symptomen und Beschwerden der Patienten führen. Dennoch sind schwere kardiovaskuläre Folgen nicht nur auf das Endstadium einer Niereninsuffizienz beschränkt. Auch im frühen Stadium kann es bereits z. B. zu Herzversagen kommen (Kottgen A., Russell S.D., Loehr L.R. et al. 2007).

Erwartete Herzerkrankungen bei Nierenpatienten wären somit behandel- und vermeidbar, sofern eine frühe Therapie zum Einsatz käme (National Kidney Foundation 2002; Edwards N.C. et al. 2014; Heywood J.T, Fonarow G.C., Costanzo M.R. et al. 2007). Nierenerkrankungen stellen jedoch insgesamt ein komplexes

pathophysiologisches System dar, dessen Therapie sich häufig als schwierig erweist. Um in der Komplexität der Interaktionen zwischen Nieren und Herz eine „Ordnung“ zu schaffen, wurde 2008 durch die Acute Dialysis Quality Initiative der Begriff des kardiorenenalen Syndroms geprägt. Dieser umfasst das gesamte Spektrum der gegenseitigen Beeinflussung beider Organe und beschreibt die gleichzeitige Erkrankung von Herz und Niere, die mit einer direkten Störung des jeweils anderen Organs in Verbindung steht (Ronco et al. 2010; Schamberger B., Lutz J., Bruck H., Münzel T. 2013). Das kardiorenale Syndrom gliedert sich entsprechend dem führenden Schädigungsmechanismus (Niereninsuffizienz oder Herzinsuffizienz) in verschiedene Formen auf. Im Falle der vorliegenden Arbeit interessiert uns die chronische Niereninsuffizienz als Ursache für Erkrankungen des Herzens. Wir sprechen somit etwas konkreter vom *renokardialen Syndrom* (nach Ursache-Wirkungs-Beziehung) bzw. von der *urämischen Kardiomyopathie* (Edwards N.C. et al. 2014).

1.2 DIE URÄMISCHE KARDIOMYOPATHIE

1.2.1 Definition der urämischen Kardiomyopathie

In den 1990er-Jahren wurde die urämische Kardiomyopathie anhand von echokardiografischen Studien definiert als die Summe struktureller und funktionaler Veränderungen am Herzen in Zusammenhang mit einer terminalen Niereninsuffizienz (Foley R.N. et al. 1995a). Neuere Studien zeigen funktionale Einbußen der Herzleistung durch eine Linksherzhypertrophie (Gross M.-L., Ritz E. 2008). Mark und Johnston et al. beschreiben sogar die Linksherzhypertrophie als die vorherrschende Kardiomyopathie infolge einer Urämie (Mark P.B., Johnston N., Groenning B. A. et al. 2006). Andere Autoren erwähnen als zusätzliche Folgen der Urämie eine Linksherzdilatation und systolische bzw. diastolische Dysfunktionen (Gross M.-L., Ritz E. 2008). Diese Erkrankungen sind assoziiert mit einer reduzierten kardiovaskulären Leistung, die wiederum zu Herzversagen führen kann (Foley R.N. et al. 1995b). Das Herzversagen als direkte Folge der chronischen Niereninsuffizienz selbst wird ebenfalls von einigen Autoren als Synonym zur urämischen Kardiomyopathie verwendet (Chinnappa S., Hothi S.S., Tan L-B. 2014). Doch auch die koronare Herzerkrankung und das Auftreten von Ischämien am Herzen werden als Folge der urämischen Kardiomyopathie und der damit verbundenen Entzündungserscheinungen innerhalb der Blutgefäße genannt (Santoro A., Mancini E. 2002; Alhaj E., Alhaj N., Rahman I. et al. 2013). Zudem spielen Prozesse wie Arteriosklerose und arterielle

Gefäßsteifigkeit als Folgen der Urämie eine Rolle (Go A.S., Chertow G.M., Fan D., McCulloch C.E., Hsu C. 2004).

1.2.2 Epidemiologie

Patienten mit chronischer oder terminaler Niereninsuffizienz zeigen eine erhöhte Mortalität durch Myokardinfarkt und plötzlichen Herztod/Herzversagen mit einem prozentualen Anteil von 40–50 % (Heywood J.T, Fonarow G.C., Costanzo M.R. et al. 2007; Chinnappa S., Hothi S.S., Tan L-B. 2014; Go A.S., Chertow G.M., Fan D., McCulloch C.E., Hsu C. 2004). Von funktionalen Einbußen der Herzleistung durch eine Linksherzhypertrophie sind ca. 72 % der Patienten mit chronischer und terminaler Niereninsuffizienz betroffen (Gross M.-L., Ritz E. 2008).

1.2.3 Pathophysiologie der urämischen Kardiomyopathie

Die chronische Niereninsuffizienz wirkt sich zum einen über die Aktivierung des RAAS, zum anderen durch die bereits in Punkt 1.1.3.1 erwähnte Anreicherung von harnpflichtigen Substanzen im Blutsystem direkt auf das Herz aus.

Hypertonie und Hypervolämie, als Folge der Schädigung der Nierenkörperchen (vergleiche Kapitel 1.1.2.2), führen zu einer Hypertrophie des linken Herzens als anfänglich sinnvoller Kompensationsvorgang. Dieser mündet jedoch

in eine ventrikuläre Dilatation, die systolische Dysfunktionen durch eine damit verbundene Unterdrückung der myokardialen Kontraktilität sowie eine verringerte Auswurfleistung des linken Ventrikels nach sich zieht. Neben einer Größenzunahme des Herzens aufgrund von Hypertrophie der Myozyten, kommt es des Weiteren auch zur Einlagerung von fibrotischem Gewebe (Mall G., Huther W., Schneider J., Lundin P., Ritz, E. 1990). Zudem kann eine Zunahme der Intima-Media-Dicke in den Gefäßen festgestellt werden, was zur Entwicklung von Gefäßplaques führt (Alhaj E., Alhaj N., Rahman I. et al. 2013). Es folgen atherothrombotische Komplikationen wie Arteriosklerose (einschließlich der koronaren Herzerkrankung), eine zusätzliche linksventrikuläre Hypertrophie und ggf. auch Myokardinfarkt und Herzversagen (Santoro A., Mancini E. 2002; McFarlane S.I., Kumar A., Sowers J.R. 2003). Auch eine Hypertrophie des rechten Ventrikels konnte in experimentellen Studien festgestellt werden (Gross M.-L., Ritz E. 2008).

Das urämische Milieu im Blutssystem selbst, ausgelöst durch die Anreicherung harnpflichtiger Substanzen, zieht Entzündungserscheinungen und oxidativen Stress nach sich. Dieser Zustand wird aktuell als ein Status beschrieben, in dem eine Akute-Phase-Antwort innerhalb der Gefäße induziert wird. Hierbei werden im Serum hohe Konzentrationen an Entzündungsmarkern wie z. B. das C-reaktive Protein und Interleukin-6 gefunden (Locatelli F. 2003). Es folgen Zellschädigungen an Kardiomyozyten und die Anreicherung von fibrotischem Gewebe im Herzen (Chinnappa S., Hothi S.S., Tan L-B. 2014).

1.2.4 Bisherige Therapiekonzepte zur Behandlung der urämischen Kardiomyopathie

Eine konventionelle Hämodialyse stellt die häufigste Therapie bei urämischer Kardiomyopathie dar und wird auch im Zusammenhang mit verbesserter systolischer Funktion und ventrikulärer Auswurfleistung bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz beschrieben (Adhyapak S. M., Iyengar S. S. 2011).

In der medikamentösen Behandlung findet eine Blutdruckreduktion durch entsprechende Medikamente wie ATII-Rezeptor-Blocker oder auch ACE-Hemmer statt (Akhrass P.R., McFarlane S.I. 2011; Alhaj E., Alhaj N., Rahman I. et al. 2013). Darüber hinaus deuten einige Studien darauf hin, dass auch Gliptine, die derzeit vor allem bei Diabetes mellitus Typ 2 im Einsatz sind, ebenfalls kardioprotektive Eigenschaften besitzen (Murohara T. 2012; Kiwon B. und Noyan-Ashraf M.N. et al. 2008).

1.2.4.1 Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein hormonelles System, das den Blutdruck und den Flüssigkeitshaushalt im Körper reguliert. Eine Verminderung der renalen Perfusion durch Blutdruckabfall führt zu einer erhöhten Ausschüttung des Enzyms Renin, eine Peptidase, die von den Zellen des juxtaglomerulären Apparates in der Niere sezerniert wird und vom Reninsubstrat Angiotensinogen das Angiotensin I (ATI)

abspaltet. Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) wiederum spaltet vom Angiotensin I zwei Aminosäuren ab. Hierbei entsteht Angiotensin II (ATII). Gemeinsam mit Aldosteron, dessen Sekretion in der Nebennierenrinde durch ATII stimuliert wird, kommt es zu einem (Wieder-)Anstieg des Blutdrucks. Zudem wirkt Aldosteron positiv auf die Natriumretention und Kaliumausscheidung und erhöht somit das Flüssigkeitsvolumen im Körper (Dasgupta C., Zhang L. 2011). Die Ausschüttung von Renin wird negativ rückgekoppelt, sodass es nun auch zu einer verminderten Sekretion von Renin kommt. Der Normalzustand der renalen Perfusion ist wiederhergestellt.

Zur Verminderung eines chronisch hohen Blutdrucks kommen Medikamente zum Einsatz, die das RAAS hemmen, wie z. B. Angiotensin-Rezeptorblocker (ARBs) (Chaykovska L., Alter M.L., von Websky K. et al. 2013), welche effektiv und nebenwirkungsarm den Blutdruck senken. Diese Medikamentengruppe wird auch als „Sartane“ bezeichnet.

ATII selbst ist ein multifunktionales Peptidhormon, das den Blutdruck über das RAAS, das Plasmavolumen im Blut und kardiale, neuronale und renale Funktionen reguliert. Zudem steuert es das Durstgefühl.

In der medikamentösen Hemmung des RAAS spielt vor allem der ATII-Rezeptor Subtyp1 eine Rolle. Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor wird im Erwachsenen in allen Organen exprimiert, inklusive Herz, Nieren und Gefäßen.

1.2.4.1.1 Telmisartan als Angiotensin-Rezeptorblocker
Telmisartan ist ein ARB der neuen Generation, der im Jahr 2009 in den USA von der Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung der Hypertonie und der Vorbeugung kardiovaskulärer Erkrankungen, vor allem bei ACE-intoleranten Patienten, zugelassen wurde. Es ist der erste ARB, der vielversprechende Einflüsse auf die Vermeidung kardiovaskulärer Erkrankungen bei Risikopatienten hat Akhrass P.R., McFarlane S.I. (2011). In mehreren, teilweise sehr großen Studien konnten die Wirksamkeit von Telmisartan und die geringere Rate an Nebenwirkungen im Vergleich z. B. zu Ramipril als ACE-Hemmer (Marzona I., O'Donnell M. et al. 2012) bestätigt werden. Es verdrängt ATII mit sehr hoher Affinität und Selektivität von seiner spezifischen Bindungsstelle auf dem ATII-Rezeptor Subtyp 1. Diese kompetitive Bindung ist lange andauernd, sodass eine Gabe von Telmisartan alle 24 h ausreicht. Somit kann ATII, das direkt an der Entstehung des Bluthochdrucks durch Gefäßverengung beteiligt ist, nicht mehr wirken.

Telmisartan zeigt keine Affinität zu anderen Rezeptoren, einschließlich der anderen ATII-Subtypen. Durch die Spezifität können eine gezielte Reduktion des Blutdrucks, sowohl systolisch als auch diastolisch, sowie eine gefäßerweiternde Wirkung ohne Beeinflussung der Pulsfrequenz erreicht werden. Die Ausscheidung erfolgt renal.

1.2.4.2 DPP-4-Inhibitoren

Die auf dem Weltmarkt verfügbaren DPP-4-Inhibitoren, eine junge Klasse von Glukosesenkern zur oralen Therapie bei Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM), schließen ein: Sitagliptin (*Merck*), Saxagliptin (*AstraZeneca*), Linagliptin (*Boehringer Ingelheim*), Vildagliptin (*Novartis*) und Alogliptin (*Takeda*). Sitagliptin und Saxagliptin sind die derzeit einzigen beiden frei verfügbaren Wirkstoffe, welche international im Einsatz sind. Die Zulassung erfolgte 2006 für Sitagliptin in den USA durch die Food and Drug Administration (FDA), in der EU im Jahr 2007 durch die Europäische Kommission. Saxagliptin folgte nach Vildagliptin in der Zulassung 2009 sowohl in den USA als auch in der EU. Linagliptin wurde 2011 zwar für Deutschland zugelassen, jedoch 2012 wieder vom Markt genommen. Auch Vildagliptin ist inzwischen nicht mehr verfügbar. Alogliptin wurde 2011 zugelassen, jedoch besteht bis dato noch kein verfügbares Medikament. Im Gegensatz dazu sind alle fünf Wirkstoffe z.B. in der Schweiz zugelassen. Alle genannten DPP-4-Inhibitoren sind in Wirkung, Dosierung und Potenz ähnlich.

Die urämische Kardiomyopathie ist eine relevante und sehr präzente Folge der chronischen Stoffwechselerkrankung T2DM. Infolge einer diabetischen Nephropathie mit zunehmender Funktionsuntüchtigkeit der Nieren treten auch kardiovaskuläre Erkrankungen auf. In mehreren Studien, allen voran die Framingham Studie von 1979, konnte bestätigt werden, dass der Myokardinfarkt eine der häufigsten Todesursachen von Menschen mit Diabetes darstellt (Kannel W.B. 1979).

Klinisch sind DPP4-Inhibitoren aufgrund ihrer blutzuckersenkenden Wirkung, die auf der Erhöhung der postprandialen Insulinausschüttung beruht und eine Verbesserung der Glukosetoleranz beinhaltet (Pratley R.E., Salsali A. 2007), als orale Antidiabetika bei Patienten mit T2DM im Einsatz. In Studien wurde erweiternd nachgewiesen, dass es bei Patienten nach Behandlungen mit einem DPP-4-Inhibitor (hier: Sitagliptin) zu einem erhöhten linksventrikulären Auswurfvolumen sowie einem schnelleren Verschluss der Mitralklappe kam. Hierbei wurden die größten Signifikanzen in ischämischen Bereichen des Herzens gefunden (versus Placebobehandlung) (Read P.A., Khan F.Z. et al. 2010). In einer weiteren Studie aus der Humanmedizin bezüglich der kardioprotektiven Wirkung der DPP-4-Blockierung von McCormick 2015 konnte eine akute Verbesserung der myokardialen Aktivität während Dobutamin-Stress in nicht-diabetischen Patienten festgestellt werden (McCormick L.M., Kydd A.C., Read P.A., et al. 2014, S. 275). Dies erfolgte bereits nach einer einzigen Dosis von Sitagliptin, in Kombination mit einer oralen Glukosedosis.

Ergänzend konnten in einigen Studien blutdrucksenkende Effekte durch die Anwendung von DPP-4-Inhibitoren nachgewiesen werden, die allerdings sehr kontrovers auszufallen scheinen (McCormick L.M., Kydd A.C., Read P.A., et al. 2014).

1.2.4.2.1 Linagliptin

Linagliptin wird als Ausnahme der oben genannten aktuell auf dem Markt verfügbaren DPP-4-Inhibitoren non-renal ausgeschieden. Anders als andere Vertreter der Wirkstoffgruppe wird Linagliptin in unveränderter Form hauptsächlich über Leber, Galle und Darm ausgeschieden und hat daher kaum bis keine Auswirkungen auf die Nierenfunktion. Nur ein kleiner Anteil (ca. 5%) wird über die Nieren metabolisiert, so dass Linagliptin bei Patienten mit Niereninsuffizienz auch ohne Dosisanpassung eingesetzt werden kann (Graefe-Mody U., Rettich S. 2012; Chaykovska L., Alter M.L., von Websky K. et al. 2013; Barnett A.H. 2011; Blech S., Ludwig-Schwellinger E., Gräfe-Mody E.U. et al. 2010, Mikhail N. 2012).

Linagliptin ((R)-8-(3-aminopiperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydropurine-2,6-dione) hemmt als Xanthinderivat selektiv und reversibel das Enzym Dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4), das im Organismus weit verbreitet ist. Es wird sowohl in zahlreichen Geweben (u. a. in Leber, Dünndarm und Niere) exprimiert, wo es membranassoziiert vorkommt, als auch im Blutkreislauf in gelöster Form vorgefunden (Pratley R.E., Salsali A. 2007). Die DPP-4 ist eine Serinprotease, die durch Abtrennung von zwei Aminosäuren (daher der Name „Dipeptidyl“) des N-terminalen Endes eine Umwandlung der Zielproteine zum inaktiven Metaboliten herbeiführt. Eine Abspaltung kommt bevorzugt beim Zielprotein zustande, wenn an Position 2 des N-terminalen Endes Prolin oder Alanin stehen (Havale S.H., Pal M. 2009).

Linagliptin hemmt dabei die DPP-4 Aktivität um mehr als 80 % über einen Zeitraum von 24 h und ermöglicht somit eine einmalige Gabe pro Tag (Barnett A.H. 2011). Die Halbwertszeit liegt bei 12 Stunden, der maximale Plasmaspiegel ist nach 1,5 Stunden erreicht. Die Bioverfügbarkeit liegt bei 30%.

1.2.4.2.2 Wirkungsweise von Linagliptin

Ein Zielprotein von DPP-4, das durch Linagliptin gehemmt wird, stellt das Inkretinhormon Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) dar, das bei Nahrungsaufnahme von den L-Zellen des distalen Jejunums und des Colons produziert wird und unter anderem zu einer Suppression der glukoseabhängigen postprandialen Glukagonausschüttung aus den α -Zellen als auch zu einer potenzierten Insulinausschüttung aus den β -Zellen des Pankreas führt (Ussher J.R., Drucker D.J. 2012). Die Unterdrückung von DPP-4 durch kompetitive Hemmung erhöht die Halbwertszeit von GLP-1 und damit die Bioverfügbarkeit des aktiven Inkretinhormons. Dies wiederum hat eine Verstärkung des biologischen Effektes auf den Organismus zur Folge.

GLP-1 liegt zudem deutlich im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Da es oxidativen Stress verhindert, spielt das Inkretinhormon GLP-1 in der Verhinderung einer frühen Arteriosklerose mit all ihren Folgeerkrankungen eine wichtige Rolle (Nyström et al. 2004). GLP-1 induziert eine vaskuläre Dilatation über eine verbesserte endotheliale Funktion in den Arterien inklusive der genannten Verminderung von oxidativem Stress und der reduzierten

Entzündungsreaktion der Endothelzellen. Seine protektive Wirkung auf Endothelzellen entfaltet GLP-1 über eine GLP-1-Rezeptor vermittelte cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A (Oeseburg H., de Boer R.A., Buikema H. et al. 2010). Als Synonym für diesen Vorgang kann auch das „vaskuläre Altern“ genannt werden. Oxidativer Stress entsteht durch DNA-Schädigung im Zellkern selbst und kann zu Apoptose oder zum zellulären „Altern“ führen, was vor allem bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit beobachtet werden konnte (Minamino T., Miyachi H. et al. 2004). Oxidativer Stress und Entzündungsreaktionen spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, inklusive kardiale Hypertrophie, vaskuläre endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose. Linagliptin reduziert oxidativen Stress in kardialem und endothelialelem Gewebe durch Reduktion von kardiovaskulärem Superoxid (Koibuchi N. et al. 2014).

Ein weiterer kardioprotektiver Effekt von Linagliptin scheint antifibrotischer Natur zu sein und basiert auf einer positiven Förderung der Herzfunktionen durch GLP-1 (Chaykovska L. et al. 2011). Wie oben bereits beschrieben wirkt GLP-1 auch am Herzen unter anderem durch Förderung der Glukoseaufnahme, Reduktion von oxidativem Stress und der Apoptose von Myozyten protektiv (Ussher J.R., Drucker D.J. 2012).

1.3 HISTOLOGISCHER HINTERGRUND UND BESCHREIBUNG DES TIERMODELLS

1.3.1 Histologischer Hintergrund

In einem gesunden Herzen überwiegen im Myokard myokardiale Zellen, die in der Extrazellulärmatrix eingebettet sind. Der nicht myozytäre Anteil besteht aus glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, interstitiellen und perivaskulären Fibroblasten (Weber K.T. 2000).

Eine Urämie führt zu Veränderungen des kardialen Gewebes. Eine linksventrikuläre Hypertrophie ist bei über 70–75 % der Dialysepatienten bereits zu Beginn der Therapie per Echokardiografie feststellbar (Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M. 1996; London G. M., Pannier B. et al. 2001). Dies geht einher mit einer Myozytenhypertrophie und einer vermehrten Kollagenbildung sowohl perivaskulär als auch interstitiell (Brilla C.G., Matsubara L., Weber K.T. 1996). Hierbei weisen 91 % der chronisch urämischen Patienten eine diffuse, nicht koronare intermyokardiale Fibrose auf, unabhängig davon, ob die Patienten bereits eine Dialyse erhalten oder nicht (Mall G., Huther W., Schneider J., Lundin P., Ritz, E. 1990).

Es werden zwei Subtypen des Kollagens unterschieden: Kollagen Typ I und Kollagen Typ III. Eine Verschiebung im Verhältnis der beiden Subtypen von Typ III zu Typ I führt zu einer Zunahme der Gefäß- und Zellsteifigkeit, denn Kollagen Typ III ist nachgiebiger und flexibler als Kollagen Typ I. Eine Zunahme von Kollagen Typ I in der

Extrazellulärmatrix spiegelt somit eine pathologische Fibrosierung wider. Insgesamt kommt es durch die Summe aller Faktoren neben steigender Dysfunktion der Ventrikel (durch reduzierte elektrische Leitfähigkeit, verminderte Nährstoffaufnahme und Steifigkeit (Gross M.-L., Ritz E. 2008)) zu einer Erhöhung des Herzgewichtes (Brilla CG. et al. 1991).

Eine weitere Schlüsselfunktion bei fibrotischen Prozessen wird mehreren Zytokinen zugeschrieben. Hierbei spielt der *Transforming Growth Factor β* (TGF β) eine große Rolle, der durch SMAD2, ein zelluläres Signalprotein, vermittelt wird. Über Phosphorylierungsvorgänge werden eine Genexpression induziert sowie eine Anreicherung der extrazellulären Matrix durch Effektorproteine, wie den profibrotischen Faktor *connective tissue growth factor* (CTGF). CTGF wird bei der Fibrose, unter anderem des kardiovaskulären Systems, hochreguliert (Accornero F., van Berlo J. H., Correll R.N. et al. 2015).

1.3.2 Die 5/6-Nephrektomie als Modell einer urämischen Kardiomyopathie

Um die Auswirkungen der renokardialen Erkrankungen und den Einfluss der angewandten Medikamente auf Herz und Blutdruck wissenschaftlich untersuchen zu können, wurde die 5/6-Nephrektomie als Modell der urämischen Kardiomyopathie gewählt. Dieses Modell wird bereits in vielen Studien bei der Ratte angewandt und hat sich als Standard etabliert (Liu Z.C., Chow K.M., Chang T.M-S. 2003).

Hierbei werden die Versuchstiere durch eine 5/6-Nephrektomie infolge der umfassenden Reduktion funktionalen Nierengewebes in einen Zustand der chronischen Niereninsuffizienz versetzt. Diesen Effekt wiesen zum Beispiel Kimpe J. de, Cornelis R., Mees L., Vanholder R., Verhoeven G. im Jahr 1999 oder Rutherford W.E. et al. im Jahr 1977 nach. Die subtotale Entfernung der Nieren führt zu einer kompensatorischen Hypertrophie und einer funktionalen Adaptation des verbliebenen Gewebes mit Hyperperfusion und Hyperfiltration. Die steigende Arbeitsbelastung für die verbliebenen Nephrone charakterisiert das Fortschreiten einer renalen Insuffizienz. Es folgt eine stetige Reduktion in der glomerulären Filtrationsfähigkeit (Liu Z.C., Chow K.M., Chang T.M-S. 2003).

Aus der höheren Belastung des verbliebenen Nierengewebes nach operativer Reduktion resultieren Anpassungsvorgänge zur Steigerung der Filtrationsoberfläche. Unter dem Lichtmikroskop kann während dieses Vorgangs eine Hypertrophie der Glomeruli beobachtet werden sowie eine Hypertrophie der viszeralen glomerulären Epithelzellen. Im Verlauf kommt es zu einer Zunahme der mesangialen Matrix (interstitielles Gewebe), Endothel- und Epithelzellen verschwinden. Die Zunahme der Matrix führt schließlich zu einer Einengung der kapillären Lumina und des bowmanschen Raums. Massive Funktionseinschränkungen der Glomeruli sind die Folge (Tetsuo S., Ashton B.M. 1975).

Pathophysiologisch kann bei Tieren, die einer 5/6-Nephrektomie unterzogen wurden, eine Änderung kardiovaskulärer Parameter festgestellt werden. Diese sind vergleichbar mit den Parametern urämischer Patienten und schließen eine Hypertension, eine erhöhte Herzfrequenz und eine Hypertrophie des linken Herzens mit ein (Šviglerová J., Kunková J. et al. 2010).

1.4 FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Experimentelle Studien der letzten Jahre zeigen für DPP-4-Inhibitoren neben der antidiabetischen Wirkung auch eine pleiotrope kardioprotektive Eigenschaft, unabhängig von der Wirkungsweise auf Diabetes mellitus. DPP-4-Inhibitoren scheinen Arteriosklerose vorzubeugen, endotheliale Dysfunktionen zu verbessern, den Blutdruck zu senken und präventiv auf myokardiale Schädigungen zu wirken (Kiwon B. und Noyan-Ashraf M.N. et al. 2008; da Silva Júnior W.S., de Godoy-Matos A.F., Kraemer-Aguiar L.G. 2015; Hocher B., Reichetzeder C., Alter, M.L. 2012; Hocher B., Sharkovska Y., Mark M., Klein Th., Pfab T. 2013; Chrysant S.G., Chrysant G.S. 2012).

In dieser Arbeit wird daher zum einen untersucht, inwiefern sich der DPP-4 Inhibitor Linagliptin im Vergleich zum und in Verbindung mit dem Angiotensin-Rezeptorblocker Telmisartan auf den Blutdruck unterschiedlicher Tierkollektive (Ratten) auswirkt. Um ein umfassenderes Bild der Wirkungsweise von Linagliptin zu erhalten und die Auswirkungen auf eine erwartete urämisch bedingte Hypertonie besser bewerten zu können, wird Telmisartan als Vergleich hinzugezogen. Angiotensin-Rezeptorblocker wie Telmisartan sind bereits seit den 1990er-Jahren erfolgreich als Antihypertensiva im Einsatz. Sie erniedrigen den Blutdruck durch die Reduktion des systemischen Gefäßwiderstandes ohne Einfluss auf Herzfrequenz oder Herzauswurfleistung zu nehmen (Atlas S. 2007).

Als zweiter Punkt stand der potenziell kardioprotektive Effekt von Linagliptin im Fokus der Arbeit. In einer rezenten Kurzzeitstudie konnte im Tierversuch durch den Einsatz von Linagliptin eine Reduktion von Fibrosemarkern in kardialem Gewebe festgestellt werden (Chaykovska L. et al. 2011). Dieser Ansatz soll in der vorliegenden Arbeit ebenfalls berücksichtigt werden.

Da sich auch Telmisartan positiv auf die Herzmorphologie auszuwirken scheint, ist auch in diesem Punkt der Vergleich beider Wirkstoffe interessant. Akhrass und McFarlane betrachten Telmisartan beispielsweise als einen wichtigen Beitrag zur Vermeidung kardiovaskulärer Folgeerkrankungen bei Risikopatienten (Akhrass P.R., McFarlane S.I. 2011). Kawai et al. konnten des Weiteren bei der auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Dosis von 5 mg/Tag/kg KG eine signifikant verminderte Zunahme der Myozytendicke in hypertensiven Ratten feststellen. Zudem kam es zu einer deutlichen Unterdrückung fibrotischer Vorgänge im Herzgewebe (Kawai M., Hongo K. et al. 2009).

Zusammenfassend sollen somit die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Führt der Einsatz von Linagliptin alleine oder in Kombination mit Telmisartan zu einer Reduktion des urämisch bedingten Bluthochdrucks?

2. Kommt es zu morphologischen Veränderungen im Herzgewebe und in dessen Gefäßen? Wenn ja, wie äußern sich diese?

Wenngleich der Fokus der Arbeit auf der Erforschung der Wirkungsweise von Linagliptin im Vergleich zu Telmisartan liegt, soll eine grundlegende Fragestellung nicht unberücksichtigt bleiben: die Auswirkung des durch die chronische Niereninsuffizienz erhöhten Blutdrucks auf das Herz. Sie soll ebenfalls mit untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 TIERE UND HALTUNG

Für den Versuch wurden männliche Ratten der Rasse Wistar-Han im Alter von acht Wochen und mit einem Gewicht von 250-300g von der Firma Charles River Deutschland GmbH bezogen. Nach der Lieferung erfolgte eine Eingewöhnungsphase der Tiere von circa einer Woche, um den transportbedingten Stress vor Versuchsbeginn zu minimieren.

Alle Tiere wurden in normierten Makrolonkäfigen der Größe vier mit erhöhten Gitterdeckeln und Standardstreu für Labortiere gehalten. Die Versuchstierhaltung erfolgte im Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité Berlin in eigens dafür vorgesehenen Räumen (Tierhaltung). Die Räume waren klimatisiert und mit einer automatischen Luftwechsel- und Lichtenanlage ausgestattet. Damit unterlag die Tierhaltung kontrollierten Umgebungsbedingungen von 20 °C (± 1 °C) Raumtemperatur, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % (± 5 %) und einem 12-Stunden-Lichtregime (Künstliches Licht von 6–18 h).

Die gemeinsam gehaltenen Tiere hatten eine Gruppengröße von zwei bis drei Ratten pro Käfig. Pelletiertes Futter der Firma Altromin (Alleinfuttermittel für Ratten, je nach Gruppe mit oder ohne Linagliptin, s. o.) und Wasser (je nach Gruppe mit oder ohne Telmisartan, s. o.) standen ad libitum zur Verfügung.

Um die Aktivität und das Wohlbefinden der Tiere zu fördern, wurden zusätzliche Strukturen wie Zellstofftücher

als Nestbaumaterial, Plastikhäuschen und Knabberhölzer eingebracht (Käfig-Enrichment).

Die Durchführung des Tierexperimentes wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) in Berlin nach §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland unter der Versuchsnummer G 0401/10 genehmigt.

2.2 VERSUCHSAUFBAU UND DURCHFÜHRUNG

Der Versuch wurde als Blindstudie aufgebaut und durchgeführt. Die Tiere wurden randomisiert auf vier Versuchsgruppen aufgeteilt:

- 1. Versuchsgruppe (n=16): 5/6 Nephrektomie und Placebo**
- 2. Versuchsgruppe (n=14): 5/6 Nephrektomie und Telmisartan im Trinkwasser (5 mg/kg KG/ Tag)**
- 3. Versuchsgruppe (n=16): 5/6 Nephrektomie und Linagliptin (BI 1356) im Futter (3mg /kg KG/ Tag)**
- 4. Versuchsgruppe (n=14): 5/6 Nephrektomie und Telmisartan/Linagliptin kombiniert (Gabe s. Gruppen 2 und 3)**

Bei allen Tieren wurde zu Beginn des Versuchszeitraumes der Blutdruck gemessen (RR1). Eine Woche später erfolgte die erste Operation als Uni-Nephrektomie (OP1/Uni-Nx). Zwei Wochen danach fand die zweite Operation als Polamputation (OP2/Polamp.) statt. Anschließend wurde bei den Gruppen zwei, drei und vier mit der Medikamentengabe begonnen. Diese erfolgte insgesamt über 14 Wochen.

In der siebten und der zwölften Woche wurde der Blutdruck von allen Versuchstieren erneut aufgezeichnet (vgl. Diagramm 2-1).

Alle Tiere wurden täglich gesehen und einmal pro Woche gewogen, um ihren Allgemeinzustand zu überwachen.

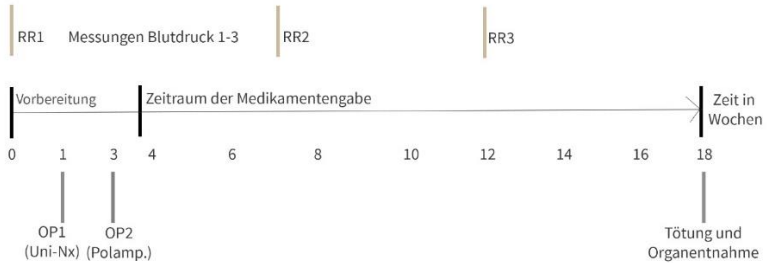


Diagramm 2-1: Überblick über den gesamten Versuchszeitraum als Zeitachse in Tagen.

RR = Blutdruck / OP = Operation / Uni-Nx = Uni-Nephrektomie / Polamp. = Polamputation (Niere)

2.3 MATERIALIEN

Folgend werden die Materialien aufgeführt, die für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen verwendet wurden (siehe Tabelle 2-1 bis Tabelle 2-3).

2.3.1 Behandlungen Versuchstiere und Datensammlung

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Materialien: Behandlung und Datensammlung

Geräte:
Blutdruckmessgerät NIBP Controller mit Druckmanschette und Pulsaufnehmer, AD Instruments, Oxford, UK
4-Kanal Analog-Digital Umsetzer Powerlab 4/25, AD Instruments, Oxford, UK
Restrainer (Plexiglasröhre zur nicht-invasiven Blutdruckmessung), hauseigene Produktion Charité, Berlin
Kanülen in Größe 22 G, wdt, Garbsen
Kompaktwaage CS 2000, Ohaus, Parsippany, NJ, USA
Biofuge 13 Zentrifuge, Heraeus, Hanau bei Frankfurt
Medikamente und Chemikalien:

Desinfektionsmittel Sterillium®, Bode Chemie, Hamburg
Isofluran Forene®, Abbott AG, Wiesbaden
Linagliptin (BI 1356), Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Telmisartan (5 mg/kg), Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein

2.3.2 Organentnahme, Histologie und histologische Auswertung

*Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Materialien:
Organentnahme, Histologie, Auswertung*

Geräte:
Deckgläschen 24 × 60 mm, Carl Roth, Karlsruhe
Digitalkamera Digital Color Camera Model CFW-1310C, Scion Corporation, Ontario, NY 14519, USA
Digitalkamera Nikon Digital Site – DS Ri1 von Nikon, Tokio, Japan
Einbettvorrichtung Shandon Citadel 1000, Thermo Electron GmbH, Dreieich
Kanülen in Größe 22 G, wdt, Garbsen

Kühlplatte EC-350, Microm International GmbH, Walldorf
Mikroskop Axioskop HBO 50/AC, Carl Zeiss, Berlin
Mikroskop Axiovert 100, Carl Zeiss, Berlin
Mikroskop BH-2, Olympus, Tokio, Japan
Mikrotom RM2025, Leica, Wetzlar
Objekträger 76 × 26 mm, Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen, Ø 50 mm × H 9 mm, Carl Roth, Karlsruhe
Präparierschere und Knüpfpinzette, Bayer, Leverkusen
Präzisionswaage SBC 22, SCALTEC INSTRUMENTS GmbH, Göttingen
Thermo Scientific Microm EC 350, Microm International GmbH, Walldorf
Chemikalien und Pufferlösungen:
Aceton, J.T. Baker, Deventer, Holland
Desinfektionsmittel Sterillium®, Bode Chemie, Hamburg
Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert, Carl-Roth, Karlsruhe
Ethanol 100 %, 96 % und 70 %, Herbeta Arzneimittel, Berlin
Flüssiger Stickstoff
Formaldehydlösung 37 %, J.T.Baker, Deventer, Holland

HCl 37%ig, rauchend, Carl Roth, Karlsruhe
NeoClear, Merck Millipore, Darmstadt
Paraffin Typ 6, Richard-Allan-Scientific, Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig
Paraffin Typ 9 von Richard-Allan-Scientific, Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig
Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert, Waldeck GmbH & Co KG, Waldeck
Sirius Rot F3B, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
van-Gieson-Lösung, Waldeck GmbH & Co KG, Waldeck
Xylol, Carl-Roth, Karlsruhe
Software:
GraphPad Prism 5 für Windows (Version 5.0, März 2007, Graph Pad Software)
GraphPad Prism onlineProgramm: graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/
IBM SPSS Statistics Software (Version 20, IBM Corporation 2011)
Live Imaging mit der Kamera Nikon Digital Site – DS Ri1
NIS-Element AR V3.22.01 (Labatory Imaging)

2.3.3 DotBlot

Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Materialien für die DotBlot-Auswertung

Geräte:
Scanner Canon CanoScan 4400F, Tokio, Japan
Spektrophotometer xMark Microplate Spectrophotometer, Bio-Rad, München
Biofuge 13 Zentrifuge, Heraeus, Hanau bei Frankfurt
Verbrauchsmaterialien:
Nitrozellulose Membran, Amersham TM Hybond TM ECL; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Puffer, Substrate und Waschlösungen:
Alkalischer Phosphatasepuffer (100 mM NaCl, 0,1 M Tris-HCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 9,5), eigene Herstellung Charité, Berlin
BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Toluidinsalz) Carl Roth Art.N. 155.3, Karlsruhe
Fettreduzierte Vollmilch (Carl Roth, Art.Nr. T145.3), Karlsruhe
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) Carl Roth Art.Nr. 4421.3, Karlsruhe
Protease Inhibitor (Roche, Mini, Cat. No. 11 697 498 001),

Berlin
Protein quantitation assay (Roti-Nanoquant; Carl Roth Art.Nr. K880.1), Karlsruhe
Tris-Buffered Saline with Tween TM 20 detergent (TBS-T, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween), eigene Herstellung Charité, Berlin
Urea/Thiourea Puffer (2 M Thiourea, 7 M Urea, 2 % SDS, 1 % DTT und Protease Inhibitor), eigene Herstellung Charité, Berlin
Enzyme, Proteine, Antikörper:
AP-konjugierte sekundäre Antikörper (Ziege anti-Maus IgG-AP, sc-2008), Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA
HRP-konjugierte sekundäre Antikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP, sc-2054), Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA
NBT/BCIP (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Toluidinsalz), Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig
Primärer AK anti-GAPDH (Maus-IgG, MAB374, Konzentration 1:10000), Merck Millipore, Darmstadt
Primärer AK Collagen Typ I (Konzentration 1:10000), bereitgestellt von Prof. D. Schuppan, Universität Mainz
Primärer AK Collagen Typ III (Konzentration 1:10000),

bereitgestellt von Prof. D. Schuppan, Universität Mainz
Primärer AK SMAD2 (Konzentration 1:2500, sc-6200), Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA
Primärer AK TGF- β 1 (Konzentration 1:2500, sc-146), Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA
Software:
AlphaEaseFC TM software version 3.1.2., Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA

2.3.4 Wirkstoffe

Die zu untersuchenden Wirkstoffe Telmisartan und Linagliptin wurden von Boehringer Ingelheim Pharma zur Verfügung gestellt. Linagliptin wurde vom Hersteller in das pelletierte Futter mit einer Dosis von 83mg/kg Futter eingemischt. Die Dosis für das einzelne Tier entsprach bei einer durchschnittlichen Futterraufnahme von ca. 40g / kg KG etwa 3mg / kg KG / Tag.

Für den aktuellen Versuch wurde Telmisartan in einer Dosis von 5 mg / kg KG / Tag über das Trinkwasser verabreicht.

2.4 METHODEN

2.4.1 Blutdruckmessung (RR)

Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurde bei allen Tieren ein Blutdruckbasiswert gemessen (RR1). Die Aufnahme der Blutdruckdaten erfolgte nicht-invasiv an der Schwanzwurzel mit einer kleinen Druckmanschette. Um stressbedingte Blutdruckschwankungen zu minimieren und die Tiere an die Messbedingungen zu gewöhnen, wurden die Ratten vor Aufnahme der Daten mehrfach mit dem Versuchsprozedere konfrontiert. Zudem erfolgte ein tägliches Handling der Tiere durch die Mitarbeiter/-innen der Tierhaltung sowie auch der Doktorandin kurz vor Versuchsbeginn, um den Tieren durch die Umsetzungsvorgänge keinem zusätzlichen Stress auszusetzen.

Während der Blutdruckmessung waren die Tiere bei Bewusstsein. Eine Immobilisierung erfolgte mithilfe einer speziellen Plexiglasröhre („Restrainer“), die durch einen Frontalverschluss mit Atemöffnungen und eine Rückwand mit einer Aussparung für den Schwanz geschlossen wurde. Der Einsatz einer Rotlichtlampe über ca. 5 min führte zur Hyperämisierung und damit optimalen Durchblutung der Schwanzarterie. Im Anschluss wurde die aufblasbare Druckmanschette an der Schwanzwurzel und ca. 1,5 cm distal davon der Pulsabnehmer angelegt.

Eine erste effektive Messung fand statt, sobald sich eine auswertbare Pulskurve eingestellt hatte, und bestand aus mehreren Einzelmessungen. Zuerst wurde der Druck konstant mit einer Geschwindigkeit von 5 mmHg/s bis zu einem kompletten Stau der Schwanzvenen erhöht. Im

Anschluss erfolgte ein langsamer Abfall des Drucks und damit verbundenen ein Abstauen der Venen. Der systolische Blutdruck konnte dann ab einem gewissen Wert vom elektronischen Transducer distal der Manschette erfasst und aufgezeichnet werden.

Im Verlauf des Versuches wurde insgesamt drei Mal eine indirekte, schmerzlose Blutdruckmessung (Schwanzplethysmographie) durchgeführt. Der Aufenthalt im Restrainer selbst belief sich pro Tier auf unter 15 Minuten.

2.4.2 Die 5/6-Nephrektomie

Eine Woche nach Generierung der Basiswerte von Blutdruck bzw. Herzfrequenz erfolgte eine erste Operation an allen Tieren als Uninephrektomie unter Isofluran-Narkose durch die zuständige Tierärztin. Eine antibiotische, antiinflammatorische analgetische OP-Nachsorge in Form einer s.c.-Injektion fand noch am schlafenden Tier statt. Die Analgesie wurde über die darauffolgenden Tage durch wiederholte s.c.-Injektionen aufrechterhalten. Zwei Wochen nach der ersten OP erfolgte die zweite Operation, bei der eine Polamputation der verbliebenen Niere durchgeführt wurde.

Vier Tiere mussten aufgrund chirurgischer Komplikationen während der Operation unter Narkose frühzeitig euthanasiert werden. Sie fielen damit noch vor der Randomisierung auf die Behandlungsgruppen aus.

2.4.3 Organentnahme

Nach einem Versuchszeitraum von insgesamt 18 Wochen wurden die Tiere mittels Isofluran-Narkose betäubt und anschließend durch Blutentzug getötet.

Allen Tieren wurde das Herz entnommen und direkt im Anschluss gewogen. Es wurde transversal auf Höhe der Herzkammern mit einem Skalpell durchgeschnitten, die Herzspitze in eine Biopsiekassette überführt und 24 h in 4 % Formalin PBS fixiert, um der umgehend einsetzenden Auto- bzw. Heterolyse der entnommenen Organteile entgegenzuwirken. Formalin ist eine gepufferte und verdünnte Formaldehydlösung, die das Vernetzen der Proteine bewirkt. Durch dieses Netz kommt es zu einer langfristigen Gewebestabilisierung und -festigkeit, die auch die nachfolgenden Einbettungsprozesse ermöglicht.

Im Anschluss erfolgte ein 24-Stunden-Bad in einer 70%igen Ethanollösung zur vollständigen Entwässerung der Gewebeteile. Nach dem Entwässerungsprozess kann mit der Paraffineinbettung begonnen werden (s. u.).

Die Herzbasis wurde umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um einer Auto- bzw. Hämolyse entgegenzuwirken. Die in Stickstoff schockgefrorenen Organe wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischengelagert und für die molekularbiologischen Untersuchungen sowie DotBlot verwendet.

Da vor der Perfusion das Körpergewicht (KG) der Tiere bestimmt worden war, konnte unter Einbeziehung der

ermittelten Herzgewichte (HG) das relative Herzgewicht mittels der folgenden Formel errechnet werden:

$$\text{Relatives Herzgewicht} = \text{HG} / \text{KG} \times 1000 \text{ [mg/g]}$$

2.4.4 Vorgang Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung von Organen ist eine wichtige Methode, um eine geeignete Schnitthärte für möglichst dünne Schnitte zu erhalten. Das Gewebe wird mit einem härtenden Mittel durchtränkt und kann somit im Anschluss am Mikrotom in gewünschter Stärke (i. d. R. zwischen 1 und 40 μm) für die Mikroskopie geschnitten werden.

Das Einbetten erfolgte in dem Einbettautomaten Shandon Citadel 1000 nach folgendem Protokoll:

1. Aufsteigende Alkoholreihe:
 - a. Ethanolbad 70%ig für 1 h
 - b. Ethanolbad 96%ig für 1 h
 - c. Dreimaliges Waschen im Ethanolbad 100%ig für je 1 h
2. Zweimaliges Baden in NeoClear (Xylol-Ersatz) für je 30 min
3. Einbetten in Paraffin Typ 6 für 2 h
4. Einlagern in Paraffin Typ 9 bis zur Entnahme nach mind. 2 h

Für die Vorbereitung der histologischen Schnitte wurden die Proben anschließend in das Paraffinbad der

Ausbettstation Microm EC 350 überführt. Die Organe wurden den Einbettungskassetten entnommen und in Metallformen eingelegt, mit der vorgesehenen Anschnittfläche nach unten. Die Einbettungskassette wurde auf der Metallkassette festgedrückt, mit Paraffin aufgefüllt und anschließend vorsichtig auf eine Kühlplatte gelegt. Nach dem Aushärten des Paraffins wurden die fertigen Blöckchen aus der Metallkassette gelöst und bei Raumtemperatur eingelagert.

Die eingeblockten Organe konnten nun in 4 µm dicke Gewebedünnschnitte am Mikrotom (RM2025 von Leica) geschnitten und nach dem Strecken auf dem 45 °C warmen Wasserbad auf Glas-Objektträger aufgezogen werden. Folgend wurden die Schnitte auf einer Wärmeplatte getrocknet und für 30 min in einem 60 °C warmen Wärmeschrank endgültig fixiert.

2.4.5 Angewandte histologische Färbemethoden

Vor den Färbungen mussten die Schnitte als Vorbereitung zweimal für 10 min in Xylol gebadet werden, um das Paraffin zu entfernen. In einer absteigenden Ethanolreihe (jeweils 5 min in absolutem, 96%igem, 80%igem und 70%igem Ethanol) wurde die Hydrophilität der Schnitte gesteigert und somit für die anschließenden Färbungen vorbereitet.

2.4.5.1 *Elastica-van-Gieson-Färbung*

Die *Elastica-van-Gieson-Färbung* dient der Darstellung von elastischen Fasern in histologischen Schnitten und stellt

eine Kombination der van-Gieson- mit der Elastica-Färbung nach Weigert dar. Sie ermöglicht eine sehr gute Differenzierung zwischen Kernen, Bindegewebe, Muskulatur und elastischen Fasern.

Dabei werden in einem ersten Schritt mit einer Resorcin-Fuchsin-Lösung alle Gewebestrukturen zuerst aufgeraut (Resorcin) und anschließend rötlich gefärbt (Fuchsin). Im Mikroskop erscheinen nun elastische Fasern dunkelviolett auf hellrosa Grund.

Danach erfolgt eine Kernfärbung mit Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert. Die Lösung färbt die Zellkerne säurefest an, sodass diese ihre Farbe auch nach der folgenden Pikrinsäurefärbung beibehalten.

Eine Bindegewebsfärbung folgt in einem dritten Schritt mit der van-Gieson-Lösung. Diese besteht aus zwei Farbstoffen: der Pikrinsäure, die alle Gewebestrukturen gelb einfärbt, und dem Säurefuchsin, das in einer kurzen Einwirkzeit die Pikrinsäure in kollagenen Bindegewebsstrukturen rot überfärbt.

Hierbei wird das folgende Protokoll angewandt:

1. Färben mit Resorcin-Fuchsin-Lösung 20–30 min, anschließend Spülen unter fließendem Leitungswasser, bis die Farbe komplett ausgewaschen ist. Danach kurzes Spülen mit Aqua dest.
2. Differenzieren in Ethanol 80 %, anschließend kurzes Spülen mit Aqua dest., um den Differenzierungsvorgang zu unterbrechen

3. Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert für 5–10 min, anschließend mit Aqua dest und folgend 10 min in Leitungswasser abspülen
4. Färbung mit van-Gieson-Lösung 1–3 min
5. Aufsteigende Ethanolreihe (jeweils kurz in 70%igem, 80%igem, 96%igem und zum Abschluss in absolutem Ethanol, dies zweimalig)
6. Im Anschluss zweimaliges Baden in Xylol für 10 min
7. Eindecken

Im Ergebnis konnten die Zellkerne schwarzblau, die elastischen Fasern schwarzviolett, kollagene Fasern rot und das Zytoplasma bzw. die Muskulatur gelb dargestellt werden.

Diese Schnitte wurden für die histologische Auswertung der Media-Lumen-Ratio und der Myozytendicke verwendet.

2.4.5.2 Sirius-Rot-Färbung

Mithilfe der Sirius-Rot-Färbung können Kollagenfasern Typ III und I für die mikroskopische Untersuchung rot dargestellt werden. Die rötliche Färbung ergibt sich aus einer Interaktion basischer Gruppen im Kollagenmolekül mit Sulfonsäuregruppen des anionischen Farbstoffes Sirius-Rot.

Für die Färbung kommen hierbei eine 0,1%ig Sirius-Rot-Lösung (entspricht 0,2 g Sirius-Rot in 200 ml gesättigter

wässriger Pikrinsäure, gelöst, gemischt und filtriert) und 0,01 M HCl (entspricht 0,5 ml HCl in 199,5 ml abs. Ethanol) zum Einsatz.

Nach dem Entparaffinisieren in Xylol und der absteigenden Ethanolreihe wurden die Schnitte für 60 min in der 0,1%igen Sirius-Rot-Lösung gefärbt, im Anschluss kurz in 0,01 M HCl gespült, entwässert und zur histologischen Auswertung eingedeckt.

Anhand dieser Schnitte erfolgte die histologische Auswertung der interstitiellen Fibrose am Herzen.

2.4.6 Histologische Auswertung der Schnitte

2.4.6.1 *Media-Lumen-Ratio der Herzarterien*

Zur Analyse der Media-Lumen-Ratio der Herzarterien wurden 4 µm dicke Elastica-van-Gieson gefärbte Schnitte von Ventrikelwand und Septum verwendet. Im Durchschnitt dienten 30 quer angeschnittene, möglichst runde Arterien bei vierzig- oder zwanzigfacher Vergrößerung (je nach Größe der Arterie) der Auswertung bzw. Datensammlung. Die Fotos wurden mit einer Digitalkamera Nikon Digital Site – DS Ri1 von Nikon aufgenommen und gespeichert. Die Analyse der Fotos erfolgte per ImageJ, Version 1.61.

Zur Berechnung der Media-Lumen-Ratio (= Verhältnis der Wanddicke des Gefäßes zum Lumen) wurde die innere als auch die äußere Begrenzung der Tunica media der Arterien sorgfältig mit einem Zeichentool von ImageJ

nachgezeichnet (vgl. Abbildung 2-1). Anhand dieser Umfahrung konnten sowohl die Gesamtfläche als auch die Lumenfläche der jeweiligen Arterien mithilfe folgender Formel errechnet werden:

$$A = \pi \cdot r^2 \quad (A = \text{Flächeninhalt}; \pi = \text{ca. } 3,141; r = \text{Radius})$$

$U = 2 \cdot \pi \cdot r$ ($U = \text{Umfang}$) Daraus ergibt sich durch Einsetzen und Umstellen folgende Formel:

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

Aus diesen Flächeninhalten wurde das Verhältnis von Gefäßdicke zu Lumen (Media-Lumen-Ratio) wie folgt berechnet:

$$A_{\text{Mediafläche}} = A_{\text{Gesamtfläche}} - A_{\text{Lumenfläche}}$$

$$\text{Media zu Lumen Ratio} = A_{\text{Mediafläche}} / A_{\text{Lumenfläche}}$$

Der Quotient aus der Berechnung entspricht der Media-Lumen-Ratio (MLR).

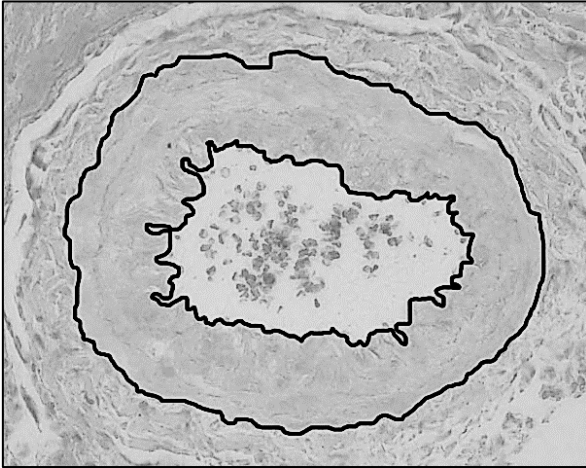


Abbildung 2-1: Bsp. einer Herzarterie mit grafischer Auswertung der Media-Lumen-Ratio

2.4.6.2 Messung der Myozytendicke

Die 4 μm dicken Schnitte in Elastica-van-Gieson-Färbung wurden unter Ölimmersion mit 100-facher Vergrößerung mikroskopiert, unter Verwendung des Programmes NIS-Element AR V3.22.01 von Laboratory Imaging und Live Imaging mit der Kamera Nikon Digital Site – DS Ri1.

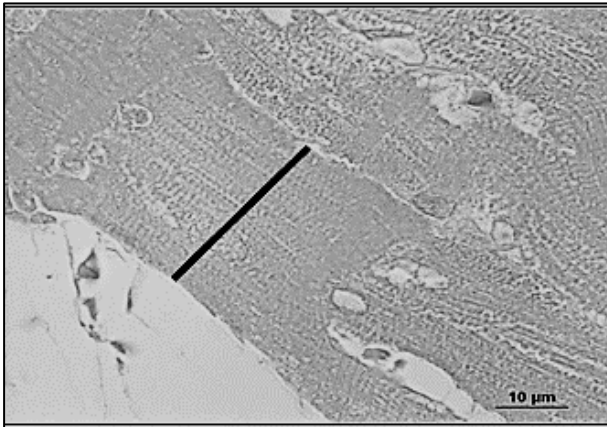


Abbildung 2-2: Bsp. einer Kardiomyozyte mit grafischer Auswertung der Myozytendicke

Die ausgewählten Kardiomyozyten aus linker Ventrikelwand und Septum waren längs angeschnitten und der Kern war gut zu erkennen. Zudem ließen sich die Ränder der Myozyten identifizieren, sodass der einzelne Myozyt eindeutig abgrenzbar war (vgl. Abbildung 2-2).

Der Durchmesser der Kardiomyozyten wurde in Höhe des Kardiomyozytenkerns möglichst im rechten Winkel zum Faserverlauf markiert, vom o. g. Programm in μm gemessen und tabellarisch gespeichert.

2.4.6.3 Interstitielle Fibrose

Für die morphologische Beurteilung und Quantifizierung der interstitiellen Fibrose wurden in vierzigfacher

Vergrößerung Fotografien von interstitiellen Ausschnitten angefertigt, in denen keine Gefäße oder Artefakte vorhanden waren (vgl. Abbildung 2-3). Anschließend erfolgte die Auswertung der etwa 30 Aufnahmen pro Schnitt mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ.

Hierbei wurde der prozentuale Anteil des mit Sirius-Rot gefärbten Kollagens und somit auch des fibrotisch veränderten Interstitiums bestimmt.

Im Programm ImageJ wurden die farbigen Originalbilder in 8-bit (Graustufen) konvertiert und des Weiteren eine Hell-Dunkel-Grenze festgelegt. Die schwarzen Anteile entsprachen dem Sirius-Rot-gefärbten Gewebe in Pixel. Die interstitielle Fibrose wurde dann als prozentualer Anteil des Sirius-Rot-positiven Areal an der Gesamtfläche des Fotos angegeben und für jedes Organ der Mittelwert aus der Analyse aller Ausschnitte gebildet.

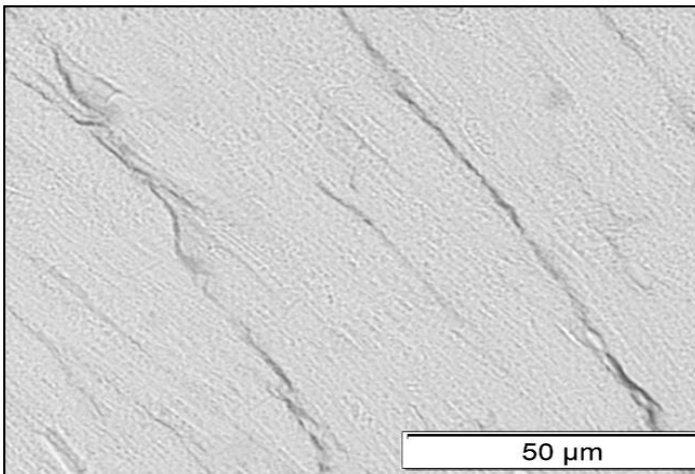


Abbildung 2-3: Bsp. einer Herzarterie mit grafischer Auswertung der interstitiellen Fibrose

2.4.7 DotBlot

Ein „Blot“ beschreibt im Labor die Übertragung von Nukleinsäuren oder Proteinen auf eine Trägermembran. Die Anwendung des DotBlots ist ein relativ neues Schnellverfahren, um große Mengen an Proteinen mit verschiedenen Molekulargewichten, aber auch DNA oder RNA auf Basis einer Immunreaktion auszuwerten. Hierbei werden die Proben ohne vorherige Gelelektrophorese punktförmig (engl. dot = Punkt / Fleck) auf eine Membran aufgetropft und anschließend detektiert. Analog zum Southern-, Northern- oder Western-Blot wird überprüft, ob die gesuchten DNA-, RNA-Sequenzen oder Proteine in der Probe vorhanden sind.

Eine modifizierte Version des DotBlot-Verfahrens ermöglicht zudem nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Auswertung von Probenmaterial. Mit diesem etablierten Verfahren können pro Blot zwei Signale unterschiedlicher Proteine detektiert werden. Damit wird eine Normalisierung auf ein „housekeeping“ Protein, also einem bereits bekannten Protein in vorgegebener Menge, möglich (Putra S. E., Tsuprykov O., Websky K. von et al. 2014).

2.4.7.1 Ablauf DotBlot-Verfahren

Das schockgefrorene Herzgewebe wurde in Urea/Thiourea Puffer (2 M Thiourea, 7 M Urea, 2 % SDS, 1 % DTT und Proteaseinhibitor) aufgelöst und auf Eis für 1,5 min gevortexed. Im Anschluss ruhten die Proben für 10 min bei Raumtemperatur (RT), um danach wiederum 10 min lang

auf höchster Stufe zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde abgenommen und die gelösten Proteine mit einer Konzentration von 5 µg/µl und einer Menge von 1 µg/µl manuell auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Der gleiche Ablauf erfolgte mit weiteren Membranen, die mit 0,125 µg, 0,25 µg, 0,5 µg und 1 µg/µl reinem Protein als Positivkontrolle punktuell versehen wurden.

Im Anschluss wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Membranen bei RT 5 min lang trocknen
2. Dreimaliges Waschen für jeweils 10 min in TBS-T
3. Fixierung der Membranen in 5%iger fettfreier Milch/TBS-T fixiert (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1 % Tween-20 bei pH 7,6) für 1 h bei RT
4. Inkubation mit primären Antikörpern (vgl. Tabelle 2-3) über Nacht bei 4 °C
5. Dreimaliges Waschen für jeweils 10 min in TBS-T
6. Inkubation mit HRP-konjugierten Antikörpern bei RT für 1 h (HRP = Meerrettich-Peroxidase)
7. Sichtbarmachen des Signals durch verbesserte Chemolumineszenz (ECL)
8. Erneute Inkubation derselben Membranen mit anti-GAPDH primären AK über Nacht bei 4 °C (um eine Vergleichbarkeit mit gesuchtem Protein zu erreichen)
9. Dreimaliges Waschen für jeweils 10 min in TBS-T
10. Inkubation mit AP-konjugierten sekundären Antikörpern bei RT für 1 h (AP = Alkalische Phosphatase)

11. Waschen in 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (BCIP/NBT) Substrat zur Sichtbarmachung der Dots

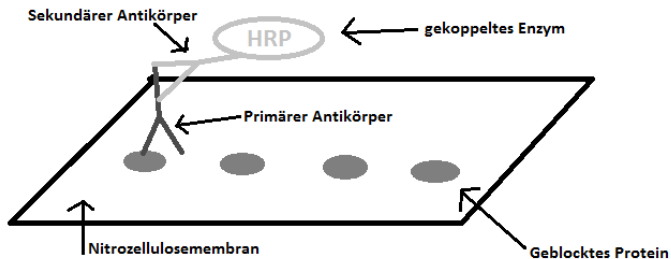


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung des DotBlot-Verfahrens
Hier abgebildet ist die Detektion des Zielproteins mithilfe von HRP

Mit diesem Ablauf (vgl. Abbildung 2-4) wird Folgendes erreicht:

Freie Bindungsstellen auf der Membran werden mit der Milchlösung geblockt. Mit einem im Anschluss aufgetragenen primären Antikörper wird das zu detektierende Protein spezifisch erkannt. Der Waschvorgang spült alle nicht gebundenen Antikörperreste aus der Membran heraus. Der nächste Schritt dient der Sichtbarmachung des gesuchten Proteins via Chemolumineszenz. Hierbei erfolgt eine Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der spezifisch auf den

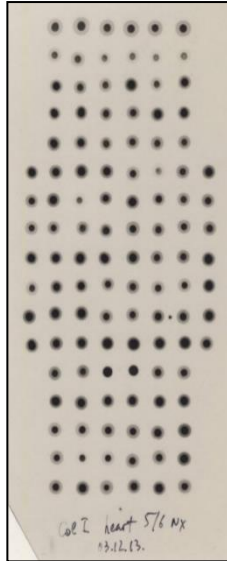
primären Antikörper reagiert und dem ein Enzym angehängt ist. Dieses Enzym katalysiert eine Lichtproduktion des vorher zugegebenen Chemolumineszenzsubstrats, die später radiologisch detektiert werden kann. Dies ermöglicht eine Detektion von Proteinen bis in den Femtomolbereich.

Die entwickelten Membranen wurden mit einem 600dpi Scanner digitalisiert und mithilfe des Programms AlphaEaseFC™ Software Version 3.1.2. (Alpha Innotech Corporation) quantitativ ausgewertet.

Hierbei wird zum einen die Intensität des Signals gemessen, das vom Zielprotein kommt, und zum anderen die Intensität des Signals vom Standard- oder Vergleichsprotein (hier: GAPDH). Die Expression der Signalproteine steht hierbei im direkten Verhältnis zur Dichte bzw. Farbintensität der Dots (vgl. Abbildung 2–5). Wird nun der Parameter des Zielproteins durch den Parameter des Vergleichsproteins geteilt, erhält man einen Quotienten. Dieser Quotient wird final zu 1 normalisiert.

Ausgewertet wurden folgende Parameter:

- Kollagen Typ 1
- Kollagen Typ 3
- TFG- β 1 = Transforming growth factor
- SMAD2
- CTGF



*Abbildung 2-5: Ansicht eines DotBlots als
Beispiel*

2.4.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte zum einen mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 und zum anderen mit SPSS Software Version 20. Des Weiteren wurden Gruppenausreißer mit einem Online-Programm von GraphPad (graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/) ausgewertet und aus den Endberechnungen herausgenommen. Dieses Online-Programm basiert auf dem Grubbs-Test, der davon

ausgeht, dass die gewählten Stichproben annähernd normal verteilt sind. Das Signifikanzlevel lag bei $\alpha = 0,05$. Als Ausreißer wird ein Messpunkt definiert, der sich numerisch deutlich von den anderen Messwerten der Messreihe unterscheidet bzw. entscheidend vom Trend der anderen Werte in der Datenreihe abweicht.

Alle Daten wurden gruppenspezifisch mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung untersucht, um im Anschluss die korrekten weiterführenden statistischen Analysen durchführen zu können.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden bei allen normal verteilten Werten mittels einfaktorieller ANOVA („*Analysis of variance*“-Berechnung) und Post Hoc Tukey-HSD ermittelt. Waren die Daten nicht normal verteilt, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Als PostHoc-Test erfolgte der Dunn's Multiple Comparison Test.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden wie folgt gekennzeichnet:

$p < 0,05 = *$

$p < 0,01 = **$

$p < 0,001 = ***$

Standardabweichungen der Mittelwerte sind in den Grafiken mithilfe von Positiv-Balken angezeigt.

Zur Berechnung von Korrelationskoeffizienten für die Messung des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen wurde im Programm SPSS eine Korrelationsanalyse nach Spearman gewählt.

Die Interpretation des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach der folgenden Tabelle 2-4:

Tabelle 2-4: Interpretation von Korrelationskoeffizienten

Betrag des Korrelationskoeffizienten	Interpretation
0	Keine Korrelation
> 0-0,2	Sehr schwache Korrelation
0,2-0,4	Schwache Korrelation
0,4-0,6	Mittlere Korrelation
0,6-0,8	Starke Korrelation
0,8 - <1	Sehr starke Korrelation

3 ERGEBNISSE

3.1 ALLGEMEINE PARAMETER

3.1.1 Körpergewicht

Alle Parameter werden als Mittelwerte mit Standardabweichungen der einzelnen Gruppen angegeben. Beim Vergleich des mittleren Körpergewichts zwischen den Versuchsgruppen zeigen sich keine signifikanten Abweichungen (vgl. Diagramm 3–1).

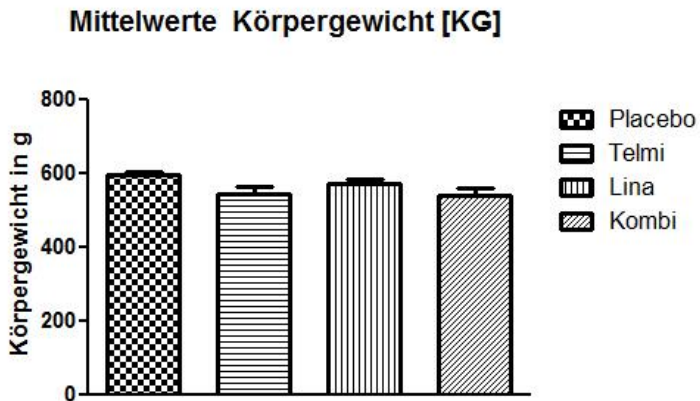


Diagramm 3-1: Mittleres Körpergewicht der Versuchstiere vor abschließender Narkose \pm Standardfehler
Placebo: 593,5 \pm 11,1 g; Telmisartan: 542,1 \pm 19,7 g; Linagliptin: 568,8 \pm 14,6 g; Kombi: 539,9 \pm 17,8 g

3.1.2 Herzgewicht und relatives Herzgewicht

In der folgenden Grafik (Diagramm 3-2) ist das absolute Herzgewicht der einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Der Vergleich zeigt ein signifikant niedrigeres Herzgewicht der Versuchsgruppen mit Medikamentenbeteiligung gegenüber der Placebogruppe.

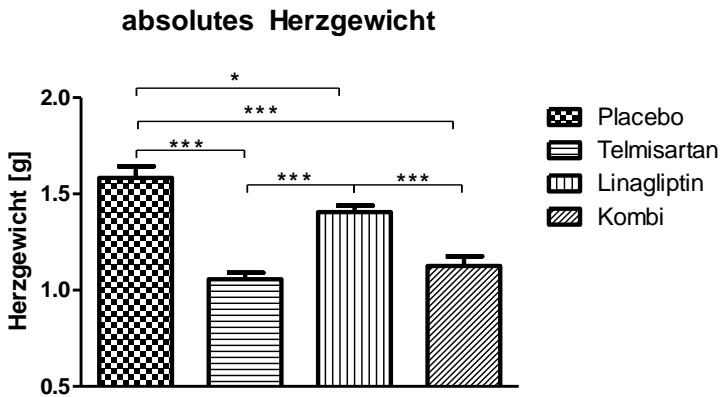


Diagramm 3-2: Absolutes Herzgewicht, Mittelwerte pro Gruppen in g ± Standardfehler

Placebo: 1,58 ± 0,06 g; Telmisartan: 1,06 ± 0,03 g; Linagliptin: 1,41 ± 0,03 g; Kombi: 1,13 ± 0,05 g

Die Werte der relativen Herzgewichte sind bei den Tieren mit Telmisartanbeteiligung jeweils niedriger als in den Gruppen Placebo und Linagliptin. Die Placebogruppe weist das höchste relative Herzgewicht von 2,7 mg/g aus. Ein signifikanter Unterschied zu den Tieren, die mit Linagliptin behandelt wurden, besteht nicht (vgl. Diagramm 3-2).

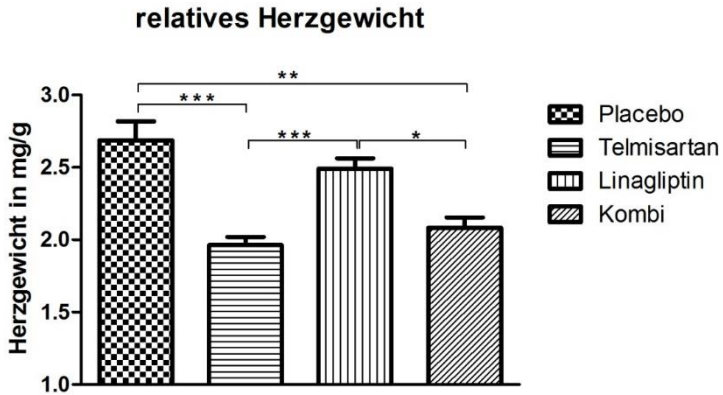


Diagramm 3-3: Relatives Herzgewicht, Mittelwerte pro Gruppen in mg/g ± Standardfehler

Placebo: $2,69 \pm 0,13$ mg/g; Telmisartan: $1,96 \pm 0,06$ mg/g; Linagliptin: $2,49 \pm 0,07$ mg/g; Kombi: $2,08 \pm 0,07$ mg/g

3.1.3 Blutdruck (RR)

Der Blutdruck wurde im Verlauf des Versuches insgesamt dreimal nicht-invasiv an der Schwanzwurzel gemessen.

Die Basisdaten zu Beginn des Versuchszeitraumes zeigen nach Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (vgl. Diagramm 3-4). Alle Tiere liegen im erwarteten Normbereich um 115–120 mmHg.

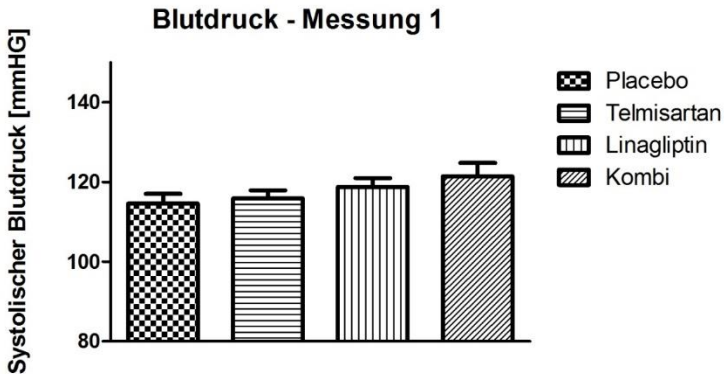


Diagramm 3-4: Mittlerer Blutdruck bei erster Messung \pm Standardfehler
Placebo: $114,6 \pm 2,41$ mmHg, Telmisartan: $115,8 \pm 2,05$ mmHg;
Linagliptin: $118,8 \pm 2,22$ mmHg; Kombi: $121,4 \pm 3,38$ mmHg

In der zweiten Messung, sieben Wochen nach Versuchsbeginn, können hoch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p < 0,001$). Die unbehandelten Tiere zeigen den höchsten Blutdruck mit 125,6 mmHg und unterscheiden sich signifikant von den medikamentös behandelten Gruppen. Innerhalb der medikamentös behandelten Gruppen wiesen die Tiere, die mit Linagliptin behandelt wurden, den höchsten Blutdruck mit 113,9 mmHg auf. Die beiden übrigen Gruppen, die Telmisartan erhielten, hatten mit knapp 91 mmHg einen deutlich niedrigeren Blutdruck (vgl. Diagramm 3-4).

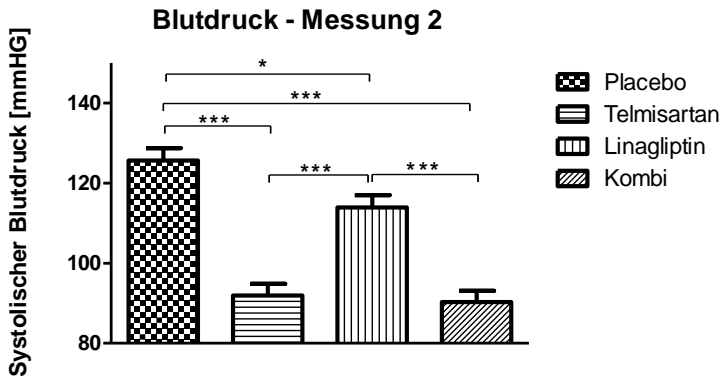


Diagramm 3-5: Mittlerer Blutdruck bei zweiter Messung ± Standardfehler

Placebo: $125,6 \pm 3,14$ mmHg; Telmisartan: $91,9 \pm 2,96$ mmHg;
Linagliptin: $113,9 \pm 3,06$ mmHg; Kombi: $90,3 \pm 2,79$ mmHg

Zwölf Wochen nach Versuchsbeginn erfolgte die dritte Blutdruckmessung. Hier zeigt sich eine deutliche Signifikanz ($p < 0,001$) in Bezug auf die Werte der Placebo-respektive der Linagliptin-Gruppe zu den Werten der beiden Gruppen Telmisartan-solo und Kombi. Eine Signifikanz zwischen der Placebo-Gruppe und der mit Linagliptin behandelten Gruppe besteht in dieser Messung nicht mehr (vgl. Diagramm 3-4).

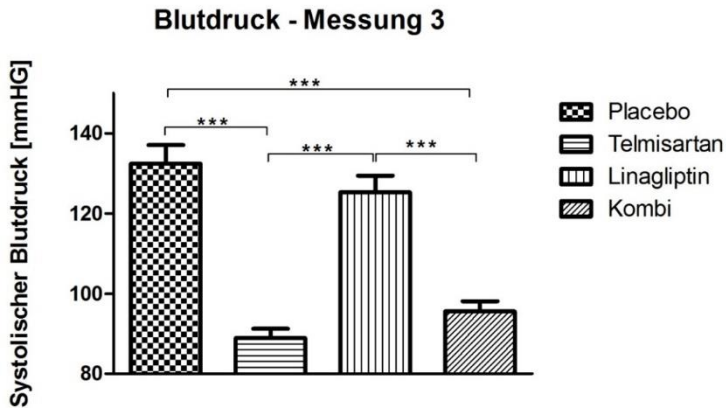


Diagramm 3-6: Mittlerer Blutdruck bei dritter Messung ± Standardfehler

Placebo: $132,4 \pm 4,65$ mmHg; Telmisartan: $88,9 \pm 2,34$ mmHg;
Linagliptin: $125,3 \pm 4,14$ mmHg; Kombi: $95,5 \pm 2,61$ mmHg

In der Darstellung des Blutdruckverlaufes, über die drei Messzeitpunkte hinweg und nach Gruppen sortiert (vgl. Diagramm 3-4), zeigt sich ein deutlicher Anstieg des Blutdrucks in der Placebo- sowie der Linagliptin-Gruppe. In der zweiten Blutdruckmessung bildet das Diagramm zudem signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen den Gruppen mit Medikamentenbeteiligung versus der Placebogruppe ab. Der Blutdruck ist in der dritten Messung nur noch bei den Gruppen mit Telmisartangabe signifikant erniedrigt.

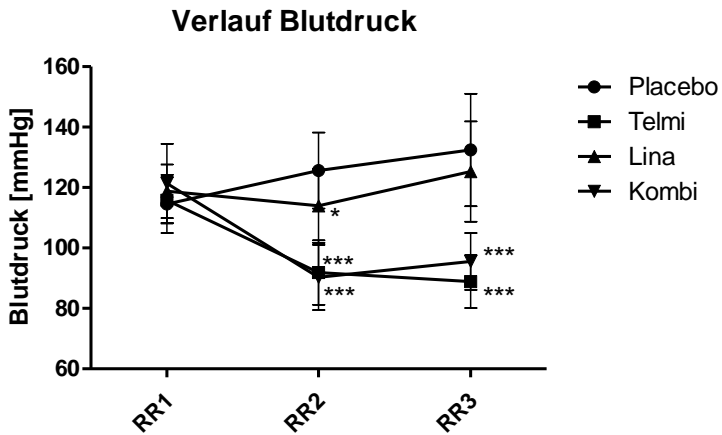


Diagramm 3-7: Blutdruck, aufgeteilt nach Gruppen im Verlauf der Zeit
 Vergleich jeder Gruppe mit Placebo/two-way-ANOVA mit Bonferroni
 Posttest

Vergleicht man die erste Blutdruckmessung (RR1) mit der dritten Blutdruckmessung (RR3) für alle Gruppen, so lässt sich bei der Placebogruppe ein signifikanter Anstieg des Blutdrucks feststellen, wohingegen die Gruppen mit Telmisartan eine signifikante Erniedrigung des Blutdrucks erfahren. Die Linagliptin-Gruppe zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen der ersten und dritten Blutdruckmessung (Diagramm 3-8 a–d).

Vergleich RR1 zu RR3

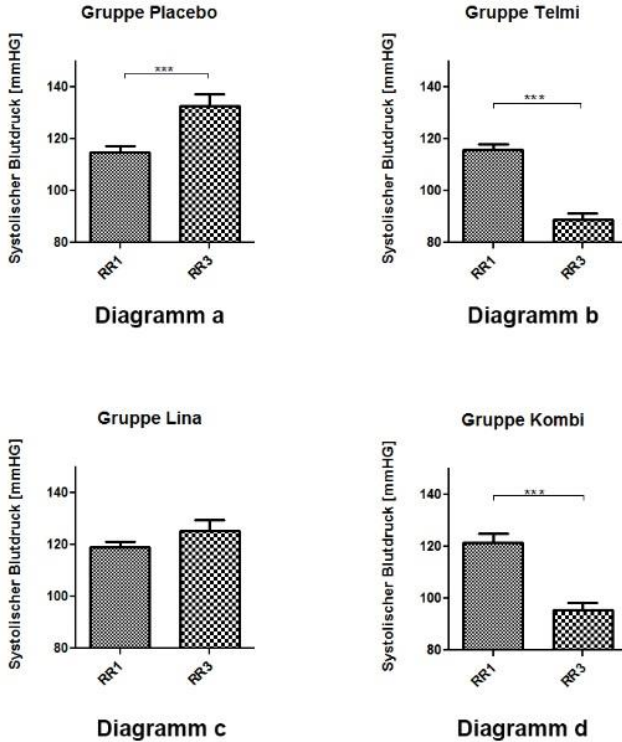


Diagramm 3-8: Vergleich Blutdruck 1. Messung (RR1) versus 3. Messung (RR3) innerhalb der Versuchsgruppen: Gruppe Placebo RR1: $114,6 \pm 2,41$ mmHg, RR3: $132,4 \pm 4,65$ mmHg; Gruppe Telmi RR1: $115,8 \pm 2,05$ mmHg, RR3: $88,9 \pm 2,34$ mmHg; Gruppe Lina RR1 $118,8 \pm 2,22$ mmHg, RR3: $125,3 \pm 4,14$ mmHg; Gruppe Kombi RR1: $121,4 \pm 3,38$ mmHg, RR3: $95,5 \pm 2,61$ mmHg

3.1.4 Korrelation zwischen Blutdruck und Herzgewicht

Ab der zweiten Blutdruckmessung zeigte sich eine signifikante schwache bis mittelstarke Korrelation zwischen Blutdruck und absolutem Herzgewicht. Noch stärker ausgeprägt war die Korrelation zwischen Blutdruck und relativem Herzgewicht. Hier fand sich ab der ersten Blutdruckmessung ein signifikanter schwacher bis mittelstarker Zusammenhang zwischen Blutdruck und relativem Herzgewicht (vgl. Tabelle 3-1).

*Tabelle 3-1: Spearman-Korrelation von Blutdruck und Herzgewicht
RR1-3 = Blutdruckmessung 1-3*

	RR1	RR2	RR3	Absolutes Herzgewicht	Relatives Herzgewicht
Korrelationskoeffizient	1,000	,078	,079	-,012	,273*
RR1 Sig. (2-tailed)		,549	,544	,927	,035
N	61	61	61	60	60
Korrelationskoeffizient	,078	1,000	,781**	,458**	,437**
RR2 Sig. (2-tailed)	,549		,000	,000	,000
N	61	61	61	60	60
Korrelationskoeffizient	,079	,781**	1,000	,387**	,505**
RR3 Sig. (2-tailed)	,544	,000		,002	,000
N	61	61	61	60	60

3.2 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG

3.2.1 Media-Lumen-Ratio

Die Auswertung der Media-Lumen-Ratio der intramyokardialen Arterien ergibt keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (vgl. Diagramm 3-9). Sowohl die Tiere mit medikamentöser Behandlung als auch die Placebogruppe zeigten ein ähnliches Bild der durchschnittlichen Wanddicke im Vergleich zum Gefäßlumen der histologisch untersuchten Herzarterien (Abbildung 3–1).

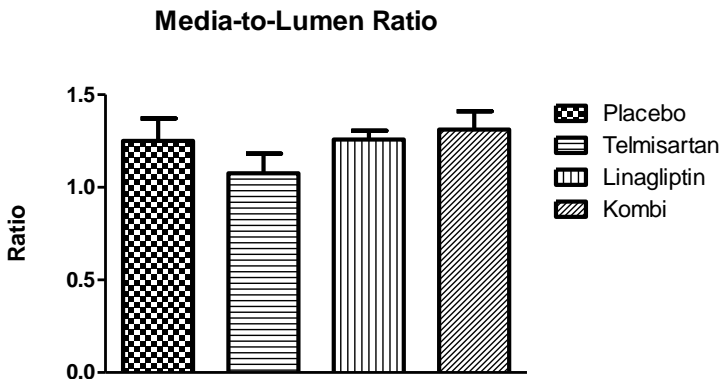


Diagramm 3-9: Media-Lumen-Ratio, Mittelwerte pro Gruppen
Quotient \pm Standardfehler

Placebo: $1,25 \pm 0,12$; Telmisartan: $1,08 \pm 0,10$; Linagliptin: $1,28 \pm 0,06$; Kombi: $1,31 \pm 0,09$

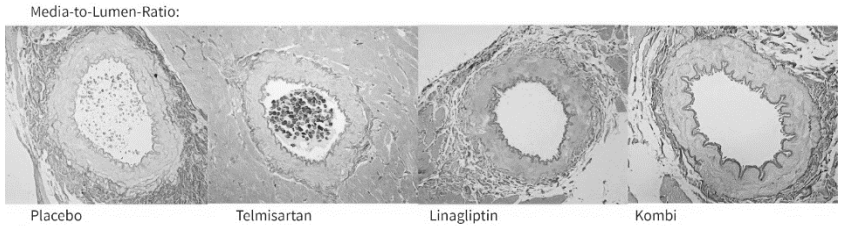


Abbildung 3-1: Elastica-van-Gieson-Färbung der Herzarterien. Selektive Darstellung der histologischen Auswertung der Media-Lumen-Ratio der Placebo-, Telmisartan-solo-, Linagliptin-solo- und Kombigruppe

3.2.2 Myozytendicke

Ein Vergleich der Myozytendicke zwischen den einzelnen Gruppen weist statistisch keine signifikanten Unterschiede auf. Im Mittel liegen die Werte der Myozytendicken bei 12,5 μm (Kombigruppe) bis 13,7 μm (Placebogruppe) (vgl. Diagramm 3-9, Abbildung 3–2).

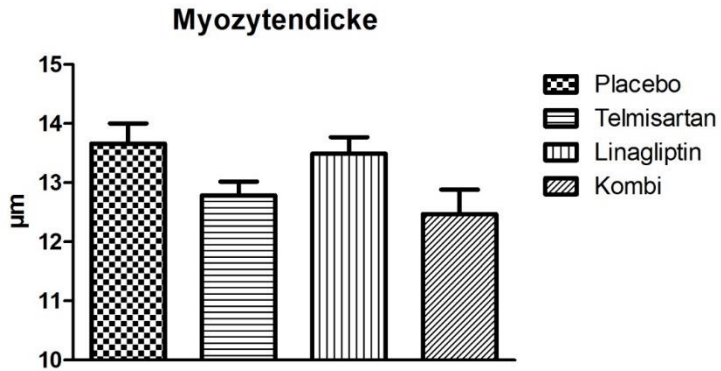


Diagramm 3-10: Myozytendicke, Mittelwerte pro Gruppen in μm \pm Standardfehler

Placebo: $13,66 \pm 0,34 \mu\text{m}$; Telmisartan: $12,78 \pm 0,24 \mu\text{m}$; Linagliptin: $13,49 \pm 0,28 \mu\text{m}$; Kombi: $12,47 \pm 0,41 \mu\text{m}$

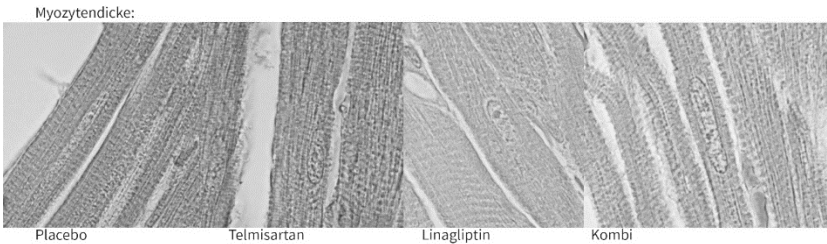


Abbildung 3-2: Selektive Darstellungen der histologischen Auswertung der Myozytendicke der Placebo-, Telmisartan-solo-, Linagliptin-solo- und Kombigruppe

3.2.3 Korrelation zwischen Blutdruck und histologischen Befunden

Korrelationsanalysen wurden auch zwischen dem Blutdruck und in dieser Arbeit erhobenen histologischen Befunden durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante schwach positive Korrelation zwischen der zweiten, beziehungsweise der dritten Blutdruckmessung und der Myozytendicke.

Des Weiteren ließ sich bei der dritten Blutdruckmessung eine schwach positive Korrelation zwischen Blutdruck und Media-Lumen-Ratio feststellen (vgl. Tabelle 3–2).

Tabelle 3-2: Spearman-Korrelation zwischen Blutdruckmessungen und Myozytendicke sowie Media-Lumen-Ratio | RRI-3 = Blutdruckmessung 1–3

	RR1	RR2	RR3	Myozytendicke Mittelwert	Media- Lumen- Ratio	
RR1	Korrelationskoeffizient	1,000	,078	,079	,031	,078
	Sig. (2-tailed)		,549	,544	,812	,550
	N	61	61	61	60	61
RR2	Korrelationskoeffizient	,078	1,000	,781**	,263*	,180
	Sig. (2-tailed)	,549		,000	,042	,164
	N	61	61	61	60	61
RR3	Korrelationskoeffizient	,079	,781**	1,000	,275*	,255*
	Sig. (2-tailed)	,544	,000		,033	,047
	N	61	61	61	60	61

Zwischen dem absoluten Herzgewicht und der Myozytendicke kann keine Korrelation festgestellt werden. Auch das relative Herzgewicht zeigt keine Korrelation zur Myozytendicke. Tabelle 3-3 zeigt des Weiteren die Korrelationsberechnung des absoluten respektive relativen Herzgewichtes und der Media-Lumen-Ratio. Hier kann ebenfalls keine Korrelation festgestellt werden.

Tabelle 3-3: Spearman Korrelation zwischen Herzgewicht und Myozytendicke sowie Media-Lumen-Ratio

		Myozytendicke Mittelwerte	Media- Lumen- Ratio
Absolutes Herzgewicht	Korrelationskoeffizient	,204	,177
	Sig. (2-tailed)	,118	,176
	N	60	60
Relatives Herzgewicht	Korrelationskoeffizient	,149	,100
	Sig. (2-tailed)	,256	,449
	N	60	60

Eine schwach positive Korrelation ist in den Ergebnissen der Korrelationsberechnung von Media-Lumen-Ratio und Myozytendicke zu erkennen (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Spearman-Korrelation zwischen Media-Lumen-Ratio und Myozytendicke

		Media-Lumen-Ratio
Myozytendicke Mittelwerte	Korrelationskoeffizient	,262*
	Sig. (2-tailed)	,043
	N	60

3.2.4 Interstitielle Fibrose

Die statistische Auswertung der interstitiellen Fibrose zur Beurteilung einer pathologischen Zunahme von kollagenen Strukturen im Herzgewebe ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (vgl. Diagramm 3–11, Abbildung 3–3). Der Mittelwert des prozentualen Anteils des Sirius-Rot-gefärbten Kollagens und somit auch des fibrotisch veränderten Interstitiums lag bei allen Gruppen zwischen 0,025 % und 0,035 %.

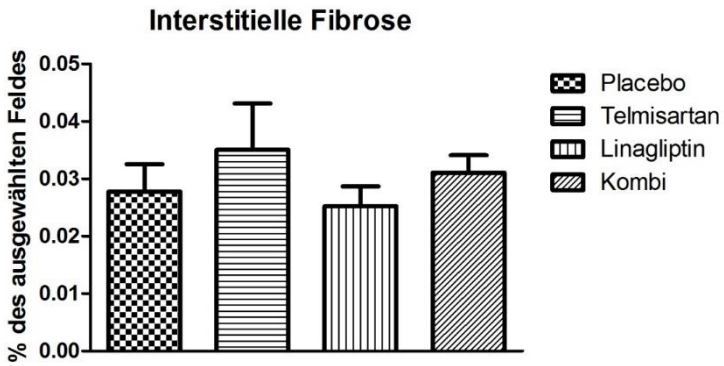


Diagramm 3-11: Interstitielle Fibrose, Mittelwerte pro Gruppen in % des jeweils ausgewählten Feldes \pm Standardfehler
Placebo: $0,027 \pm 0,005$ %; Telmisartan: $0,035 \pm 0,008$ %; Linagliptin: $0,025 \pm 0,003$ %;
Kombi: $0,031 \pm 0,003$ %

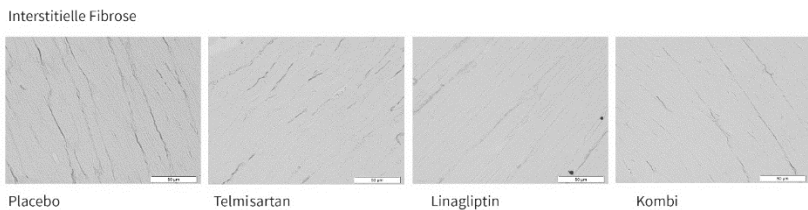


Abbildung 3-3: Beispielfotografien der histologischen Auswertung der interstitiellen Fibrose der Placebo-, Telmisartan-, Linagliptin- und Kombigruppe

3.3 DOTBLLOT

3.3.1 Kollagen Typ I

Diagramm 3-12 stellt die Auswertung von Kollagen Typ I im DotBlot-Verfahren dar. Dabei zeigt sich ein nicht signifikanter Unterschied im Gruppenvergleich. Alle Versuchsgruppen weisen eine geringfügig niedrigere Expression als das Vergleichsprotein GAPDH auf.

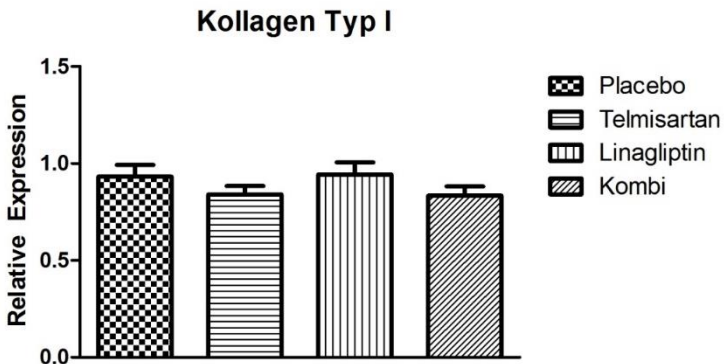


Diagramm 3-12: Mittelwerte der relativen Expression von Kollagen Typ I als Quotient \pm Standardabweichung. Normalisiert auf Vergleichsprotein GAPDH.

Placebo: $0,93 \pm 0,06$; Telmisartan: $0,84 \pm 0,04$; Linagliptin: $0,94 \pm 0,06$; Kombi: $0,83 \pm 0,05$

3.3.2 Kollagen Typ III

Diagramm 3-13 zeigt die Auswertung des Kollagens Typ III. In diesem Diagramm besteht kein signifikanter

Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Alle Mittelwerte liegen unter dem Wert von 1,0 und stellen damit eine geringfügigere Expression als das Vergleichsprotein GAPDH dar.

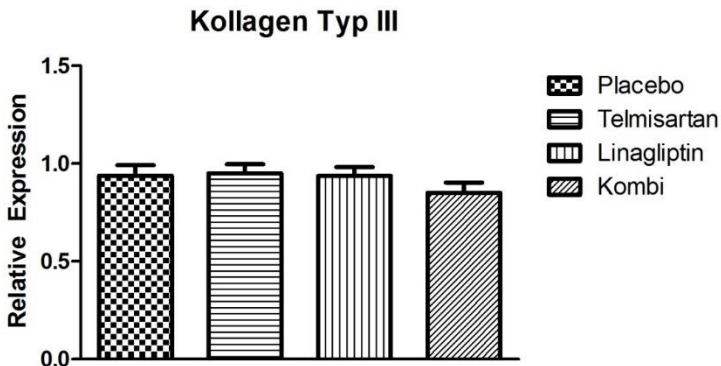


Diagramm 3-13: Mittelwerte der relativen Expression von Kollagen Typ 3 als Quotient mit Standardabweichung

Placebo: $0,94 \pm 0,05$; Telmisartan: $0,95 \pm 0,05$; Linagliptin: $0,94 \pm 0,05$; Kombi: $0,85 \pm 0,05$

Durch die standardgemäße Normalisierung der Ergebnisse auf GAPDH ist ein direkter Vergleich zwischen den Ergebnissen für Kollagen Typ I- und Kollagen Typ III-DotBlots möglich. Dieser zeigt keine sichtbare Verschiebung des Kollagenanteils im Herzen von Kollagen Typ III zu Kollagen Typ I, was für eine Zunahme einer Gefäß- und Zellsteifigkeit sprechen würde.

Signifikanzen können innerhalb der Gruppen nicht festgestellt werden (vgl. Diagramm 3-12).

Vergleich Expression Kollagen Typ III zu Kollagen Typ I

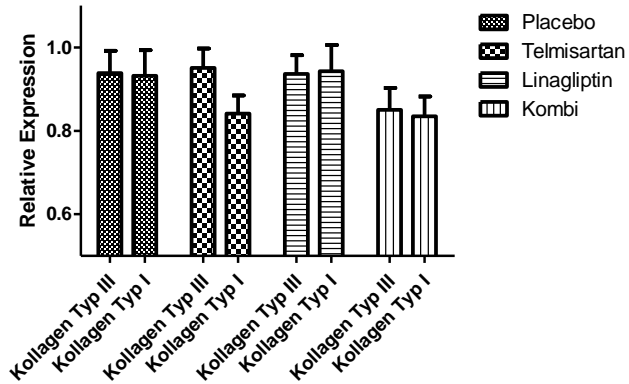


Diagramm 3-14: Vergleich der Expression von Kollagen Typ III und Kollagen Typ I im Myokard
Angezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte mit Standardfehler

3.3.3 Transforming-growth-factor- β 1

Diagramm 3-12 zeigt die Auswertung des Zytokins TGF- β 1, das eine Schlüsselfunktion bei fibrotischen Prozessen durch die Induktion von Genprozessen innehat, im Herzgewebe. Es sind die jeweiligen Mittelwerte dargestellt. Signifikante Unterschiede lassen sich in der relativen Expression zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht nachweisen. Die Expression von TGF- β 1 ist geringer als die Expression des Vergleichsproteins GAPDH.

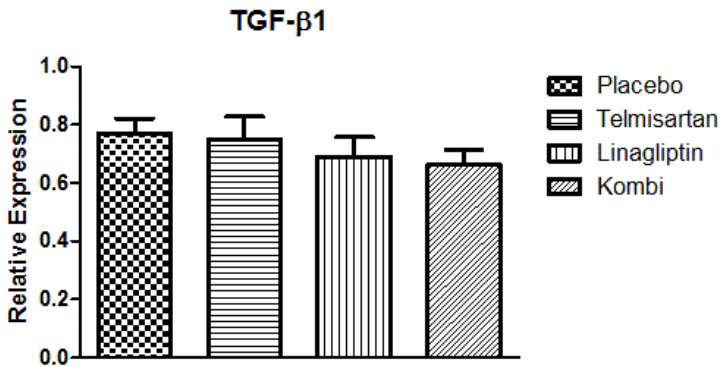


Diagramm 3-15: Mittelwerte der relativen Expression von TGF- β 1 als Quotient mit Standardabweichung

Placebo: $0,77 \pm 0,05$; Telmisartan: $0,75 \pm 0,08$; Linagliptin: $0,69 \pm 0,07$; Kombi: $0,66 \pm 0,05$

3.3.4 SMAD2

Diagramm 3-16 stellt die relative Expression des Signalproteins SMAD2, das TGF β aktiviert, im Herzgewebe dar. Für die gemittelten Werte der Versuchsgruppen lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die Placebogruppe weist eine ähnliche Expression wie das Vergleichsprotein GAPDH auf, wohingegen die anderen Gruppen Telmisartan, Linagliptin und Kombi eine geringfügig erniedrigte relative Expression zeigen.



Diagramm 3-16: Mittelwerte der relativen Expression von SMAD2 als Quotient mit Standardabweichung

Placebo: $1 \pm 0,09$; Telmisartan: $0,79 \pm 0,08$; Linagliptin: $0,83 \pm 0,09$; Kombi: $0,94 \pm 0,1$

3.3.5 Connective tissue growth factor

In Diagramm 3-17 wird die Auswertung des Proteins CTGF dargestellt. Unter den verglichenen Gruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied. Die relative Expression von CTGF, das bei fibrotischen Vorgängen im Gewebe hochreguliert wird, entspricht in der Telmisartangruppe der Expression des Vergleichsproteins GAPDH. Die anderen Gruppen zeigen eine geringfügig niedrigere Expression.

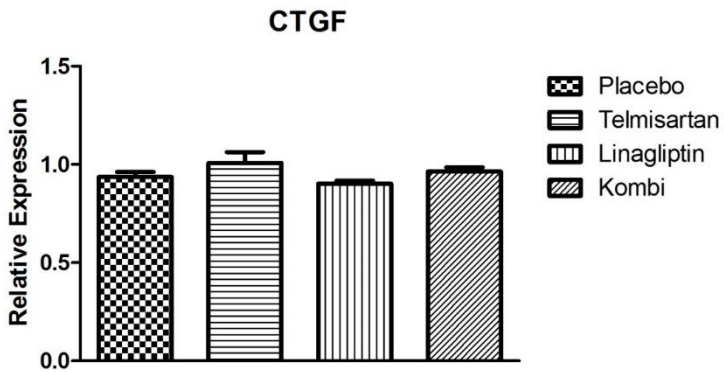


Diagramm 3-17: Mittelwerte der relativen Expression von CTGF als Quotient mit Standardabweichung
Placebo: $0,94 \pm 0,03$; Telmisartan: $1 \pm 0,06$; Linagliptin: $0,9 \pm 0,02$;
Kombi: $0,96 \pm 0,02$

4 DISKUSSION

Zur Erforschung der Effektivität einer DPP-4 Inhibition durch den Einsatz von Linagliptin alleine und in Kombination mit einem Angiotensin-Rezeptorblocker, hier Telmisartan, wurde das Modell der urämischen Kardiomyopathie durch 5/6-Nephrektomie bei Ratten der Rasse Wistar-Han gewählt. Diese Methode stellt ein etabliertes Modell zur urämischen Kardiomyopathie bei Ratten dar, einhergehend mit Hypertension (Šviglerová J., Kunková J. et al. 2010).

Die Tiere wurden gemäß den Anforderungen des Versuchsaufbaus in vier Gruppen aufgeteilt, wobei alle Gruppen einer 5/6-Nephrektomie unterzogen wurden. Somit war es möglich erkrankte Tiere mit und ohne Behandlung zu vergleichen.

In der Erforschung des Wirkspektrums von Linagliptin können durch die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse gewonnen und bereits vorgestellte Ergebnisse untermauert werden. Der Fokus der Studie lag konkret auf den morphologischen und physiologischen Auswirkungen von Linagliptin auf Herz und Blutdruck, um Aussagen darüber treffen zu können, wie sich Linagliptin auf das Herz-Kreislauf-System auswirkt. Hierbei konnte bei alleinigem Einsatz von Linagliptin keine deutliche Reduktion, in Kombination mit Telmisartan jedoch eine signifikante Reduktion des urämisch bedingten Bluthochdrucks festgestellt werden. Morphologische Veränderungen der

Gefäße im Herzen waren im Gruppenvergleich nicht nachweisbar. Auch kommt es durch den Einsatz von Linagliptin im Vergleich zur Placebogruppe und den Gruppen mit Telmisartanbeteiligung zu keinen morphologischen Veränderungen im Herzgewebe.

Der Versuchszeitraum umfasste insgesamt 18 Wochen. Die Medikamentengabe erfolgte ab der vierten Versuchswoche bis zur Tötung. Somit ergibt sich eine Behandlungszeit von 14 Wochen.

4.1 BLUTDRUCK UND HERZGEWICHT

Für die durchgeführte 5/6-Nephrektomie beträgt der systolische Blutdruck bei allen Gruppen im Mittel 118 mmHg und entspricht damit dem physiologischen Blutdruck bei Ratten (Mueller F. 1954). Im Vergleich mit der Studie von Šviglerová J., Kunková J. et al. (2010) erweist sich dies sogar als ein niedrigerer Blutdruckwert. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen bei der ersten Blutdruckmessung nicht, sodass diese als Basismessung und ihre Ergebnisse als Ausgangswerte des physiologischen Blutdrucks verwendet werden können.

Die Auswirkungen von Linagliptin auf den systolischen Blutdruck sind im Vergleich zur Placebogruppe im Verlauf der Messungen im Anschluss an die 5/6-Nephrektomie nur in der zweiten Messung signifikant. Diese Signifikanz ist in der dritten Messung jedoch nicht mehr nachweisbar. Telmisartan hingegen zeigt im Ergebnis eine Reduktion des Blutdrucks, sodass sich die Ergebnisse der Gruppen, die mit Telmisartan behandelt wurden, signifikant von den Gruppen unterscheiden, die kein Telmisartan erhalten haben. Diese Unterschiede im Blutdruck können bereits in der zweiten Blutdruckmessung drei Wochen nach Behandlungsbeginn festgestellt werden. Schlussendlich kommt es bei der dritten Messung zu einem Anstieg auf 132 mmHg bei den unbehandelten kranken Tieren (Placebo) respektive 125 mmHg bei der Linagliptin-Gruppe. Die beiden anderen Gruppen mit Telmisartanbeteiligung liegen hingegen unter 95 mmHg, was bereits als Hypotonie diskutiert werden könnte, denn dieser Wert liegt deutlich unter den Messwerten der oben genannten Vergleichsstudie

von Sviglerová. Der normale systolische Blutdruck einer Ratte beträgt, auch im Vergleich mit weiterer Literatur, ca. 84–134 mmHg (Dobson G.P. 2003; Mueller F. 1954), sodass trotz der signifikanten Unterschiede alle Werte noch im Normbereich sind.

Vergleicht man die erste mit der dritten Blutdruckmessung zeigen die Ergebnisse einen signifikanten Anstieg des Blutdrucks bei den kranken Tieren der Placebogruppe und eine signifikante Reduktion des Blutdrucks bei den Tieren mit Telmisartanbeteiligung. Telmisartan stellt hiermit seine bereits bekannte Wirkung als Blutdrucksenker unter Beweis. Interessant ist der Vergleich der ersten zur dritten Blutdruckmessung bei der Linagliptin Gruppe. Hier kann keine signifikante Veränderung festgestellt werden, der Blutdruck erhöht sich nur geringgradig von 118 auf 125 mmHg. Linagliptin scheint somit der Entstehung einer Hypertonie entgegenzuwirken, ohne dabei deutliche Auswirkungen auf den Blutdruck zu zeigen. Der Vergleich mit anderen Studien bestätigt diese Aussage. Aroor et al. als Beispiel konnten zwar keine direkt blutdrucksenkende Wirkung von Linagliptin beschreiben, jedoch eine gewissermaßen ausgleichende Wirkung eines zu hohen Blutdrucks durch Verbesserung arterieller Funktionen im Muskelgewebe (Aroor A.R., Sowers J.R., Bender S.B. et al. 2013). Auch Chaykovska et al. konnten keine signifikant blutdrucksenkende Wirkung von Linagliptin feststellen (Chaykovska L. et al. 2011; Chaykovska L., Alter M.L., von Websky K. et al. 2013).

Das Herzgewicht der Versuchsgruppen rangiert zwischen 1,06 g (Telmisartangruppe) und 1,58 g (Placebogruppe). Verglichen mit den Werten von Dobson 2003 sprechen diese Werte insgesamt eher für leichte Herzen. Nimmt man das Endgewicht der Tiere vor der endgültigen Narkose hinzu, so ergibt sich für die verschiedenen Gruppen ein relatives Herzgewicht von 1,96 mg/g (Telmisartangruppe) bis 2,69 mg/g (Placebogruppe). Dobson kommt bei seinen Untersuchungen auf ein relatives Herzgewicht von 6 mg/g (Dobson G.P. 2003). Diese Unterschiede können jedoch rasse- und züchtungsbedingt sein, denn Dobson geht von einem Körpergewicht von 300 g aus, das von Müller (Mueller F. 1954) noch unterboten wird (ca. 260 g), wohingegen die Werte des Körpergewichts der in der vorliegenden Studie verwendeten Versuchstiere um 560 g liegen.

Trotz der Unterschiede mit der Literatur kann in dieser Studie ein sowohl höheres absolutes als auch relatives Herzgewicht bei den beiden Gruppen Placebo und Linagliptin festgestellt werden, wobei die Placebogruppe als kranke und unbehandelte Gruppe das höchste Herzgewicht aufweist. Ein signifikanter Unterschied zur Linagliptin-Gruppe besteht nur in der Auswertung des absoluten Herzgewichtes. Die beiden Gruppen mit Telmisartanbeteiligung hingegen haben sowohl beim absoluten als auch relativen Herzgewicht einen signifikant bis hoch signifikant niedrigeren Wert. Akhrass und McFarlane beschreiben Telmisartan als wichtiges Medikament zur Vermeidung kardiovaskulärer Folgeerkrankungen bei Risikopatienten (Akhrass P.R.,

McFarlane S.I. 2011). In ihrem Artikel berichten sie über den signifikanten Rückgang einer Linksherzhypertrophie nach fünfjähriger Telmisartantherapie im Vergleich zur Placebogruppe. Dies könnte somit eine erste Erklärung des erniedrigten Herzgewichtes im Vergleich zu den Gruppen ohne Telmisartangabe darstellen.

Eine weitere Erklärung für das erhöhte Herzgewicht bieten die Ergebnisse der Korrelationsberechnungen. Der Vergleich zwischen Blutdruck und Herzgewicht zeigt einen bis zu mittelstarken Zusammenhang zwischen dritter Blutdruckmessung und relativem Herzgewicht. Ein erhöhter Blutdruck korreliert somit mit einem erhöhten relativen Herzgewicht. Die Massenzunahme des linken Ventrikels bei urämischen Versuchstieren nach 5/6-Nephrektomie wird auch von Amann bestätigt (Amann K., Tyralla K. 2003). In der ersten Blutdruckmessung kann zudem bereits eine schwache Korrelation zwischen Blutdruck und relativem Herzgewicht festgestellt werden. Tiere mit einem initial höheren Blutdruck scheinen somit auch ein initial höheres Herzgewicht aufzuweisen.

Der Vergleich von Linagliptin zu Telmisartan zeigt somit, dass Telmisartan durch seine blutdrucksenkende Wirkung scheinbar auch positive Effekte auf das Herzgewicht hat, wohingegen Linagliptin zwar den Blutdruck über die Zeit hinweg relativ konstant hält, dies jedoch keine deutlichen Auswirkungen auf das Herzgewicht nach sich zieht.

4.2 HERZMORPHOLOGIE

4.2.1 Myozytendicke und Media-Lumen-Ratio

Der Vergleich der unbehandelten Placebogruppe zu den mit Linagliptin, Telmisartan oder mit einer Kombination aus beiden Wirkstoffen behandelten Tiere ergab sowohl in der Auswertung der Myozytendicke als auch der Media-Lumen-Ratio keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Hier wären nach der Literatur signifikante Unterschiede zu erwarten gewesen. Brilla und Pick z. B. beschreiben in ihren Untersuchungen zu verschiedenen Modellen der Hypertension einen Zusammenhang von Bluthochdruck respektive Herzgewicht und Myozytenhypertrophie (Brilla C.G., Pick R. et al. 1990). Alle Versuchsgruppen zeigten hierbei im Vergleich zur Kontrollgruppe ein höheres linksspezifisches Herzgewicht einhergehend mit einer Hypertrophie der Myozyten. Somit hätten der niedrigere Blutdruck und das niedrigere Herzgewicht vor allem bei den Gruppen mit Telmisartanbeteiligung auch zu einer sichtbaren Reduktion der Myozytendicke führen müssen.

Dass ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung des Blutdrucks und einer Zunahme der Myozytendicke besteht, kann durch die Korrelationsanalysen bestätigt werden, wenn auch nur in schwacher Ausprägung. In medizinischen und physiologischen Lehrbüchern wird die myozytäre Hypertrophie als Anpassungsvorgang an höhere Wandspannungen durch ventrikuläre Lastenbedingungen beschrieben. Der Herzmuskel muss diese zusätzliche Anforderung kompensieren und reagiert mit einer

Herzmuskelhypertrophie (Sviglerova et al. 2010) und damit mit einer Zunahme der Muskelfaserdicke. Diese wiederum bedingt ein höheres Herzgewicht.

Das beobachtete und im vorhergehenden Absatz bereits erwähnte höhere Herzgewicht in der Placebo- und Linagliptin-Gruppe in Verbindung mit dem erhöhten Blutdruck könnte somit auf eine beginnende Myozytenhypertrophie hinweisen, die in der aktuellen Studie noch keine Signifikanzen aufweist, weil sie noch nicht weit genug fortgeschritten ist. Auch zeigt das Ergebnis der Korrelationsberechnung von Myozytendicke und Herzgewicht einen nur sehr schwachen Zusammenhang.

Die Auswertung der histologischen Daten der Media-Lumen-Ratio zeigt ebenfalls keine Unterschiede zwischen den kranken Tieren in der Placebogruppe und den Gruppen mit Medikamentengabe (Telmisartan, Linagliptin, Kombi). Allerdings kommt es zu einer schwach positiven Korrelation zwischen der dritten Blutdruckmessung und der Media-Lumen-Ratio. Dieser Zusammenhang wird sowohl von Quek als auch Sihm beschrieben (Quek K.J., Boyd R., Ameer O.Z. et al. 2016; Sihm I., Schroeder A. P., Aalkjær C et al. 1995). Bei Quek handelt es sich hierbei um eine signifikant positive Korrelation zwischen Wand-Lumen-Ratio und erhöhtem systolischem Blutdruck, Sihm hingegen beschreibt in seiner Studie den positiven Zusammenhang zwischen Media-Lumen-Ratio und Hypertension. Warum die Ergebnisse in der vorliegenden

Studie eher schwach ausfallen, könnte unter anderem wie folgt zu erklären sein:

Eine Erhöhung der Ratio ist wie auch die Zunahme der Myozytendicke eine Folge von Hypertension. Die betroffenen Gefäße reagieren auf den erhöhten Blutdruck. Eine Veränderung der Media-Lumen-Ratio ist jedoch nur eine von mehreren Anpassungsvorgängen, die in Gefäßen stattfinden. Mulvany beschreibt die Auswertung der Media-Lumen-Ratio als prinzipiell wichtigen Vorgang bei der Beurteilung der Gefäße in hypertensiven Patienten. Er weist aber auch darauf hin, dass Veränderungen in den Gefäßen stattfinden können, ohne dass dies einen Einfluss auf die Media-Lumen-Ratio hat (vgl. Abbildung 4–1). Er beschreibt hierbei eine Achse von hypotrophen Gefäßen mit einer Reduktion des Gefäßlumens zu hypertrophen Gefäßen mit einer Zunahme des Lumens. In beiden Fällen bleibt die Media-Lumen-Ratio gleich (Mulvany M.J. 1999).

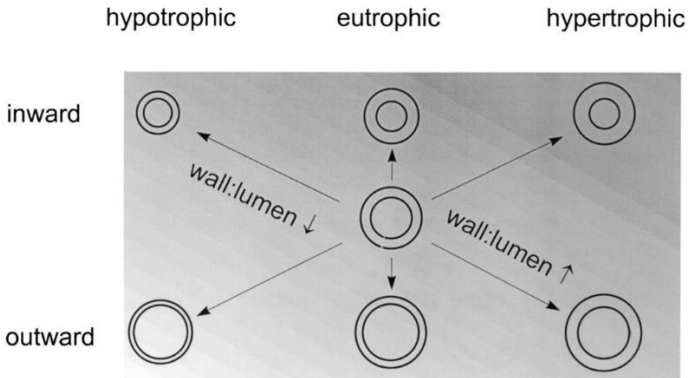


Abbildung 4-1: Von Prof. J.G.R. DeMey, University of Maastricht. Die Abbildung beschreibt die Anpassung von Blutgefäßen an eine Hypertonie ohne eine Veränderung der Media-Lumen-Ratio
 Quelle: Mulvany M.J. 1999

Vergleicht man abschließend den Zusammenhang zwischen Media-Lumen-Ratio und der Myozytendicke, ergibt dies eine schwach positive Korrelation. Aufgrund dieser positiven Korrelation von Media-Lumen-Ratio respektive Myozytendicke zu Blutdruck ist dieser Zusammenhang zu erwarten.

4.2.2 Interstitielle Fibrose und DotBlot

Eine chronische Niereninsuffizienz zieht unter anderem fibrotische Veränderungen am Herzen nach sich (Edwards N.C. et al. 2014; Alhaj E., Alhaj N., Rahman I. et al. 2013) sowie eine damit verbundene Zunahme des Herzgewichtes (Brilla C.G., Matsubara L., Weber K.T. 1996). Eine Fibrosierung im Herzen ist gekennzeichnet durch die

Akkumulation von kollagener Extrazellulärmatrix, die die Dilatationsfähigkeit des Herzens reduziert und neben verschiedenen biochemischen Problemen die Leitfähigkeit von elektrischen Impulsen beeinträchtigt (van Putten S., Shafieyan Y., Hinz B. 2015). Chaykovska et al. konnten 2011 in einer Vergleichsstudie, in der die DPP-4-Inhibitoren Sitagliptin, Linagliptin und Alogliptin untersucht wurden, einen positiven kardiogenen Effekt von Linagliptin während einer Kurzzeittherapie von acht Wochen feststellen (Chaykovska L. et al. 2011). Hierbei kam es zu einer signifikanten Reduktion von Fibrosemarkern im Herzen (TGF β -1, Kollagen I und Kollagen III) durch den Einsatz von 7 μ mol/kg KG Linagliptin, evaluiert über eine quantitative Realtime PCR. Linagliptin schien in dieser Studie einen neuen Weg für die unterstützende Behandlung von urämisch bedingter Kardiomyopathie in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz darzustellen.

Die Untersuchung auf fibrotische Veränderungen im Herzen sowohl histologisch als auch im DotBlot-Verfahren ergab in der vorliegenden Studie insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Da sich auch die kranken Tiere der Placebogruppe nicht signifikant von den medikamentös behandelten Gruppen unterscheiden, muss davon ausgegangen werden, dass keine fibrotischen Vorgänge stattfanden. Somit kann die aufgestellte Hypothese von Chaykovska et al. weder bestätigt noch widerlegt werden. Eine Untersuchung von Aroor et al. jedoch widerspricht den Aussagen von Chaykovska. In seiner Studie konnten keine signifikanten

Veränderungen in der Expression von Kollagen Typ I respektive Typ III in myokardialen Homolysaten nach Linagliptinbehandlung beobachtet werden. Eine Verschiebung dieser Typen von I zu III im Extrazellulärraum zieht eine Zunahme der Ventrikelsteifigkeit nach sich (Aroor A.R., Sowers J.R., Bender S.B. et al. 2013).

Das Zytokin Transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) ist ein wichtiger Regulator der kardialen Fibrose. Es stimuliert zum einen die Sekretion des Proteins CTGF, das als fibrotischer Effektor beschrieben wird (Accornero F., van Berlo J. H., Correll R.N. et al. 2015) und fördert somit die Synthese von insbesondere Kollagen Typ I in der Extrazellulärmatrix. Zum anderen löst es durch membrangebundene rezeptorgesteuerte Signalwege eine Phosphorylierung von SMAD2 im Zytoplasma aus, was durch weitere Signalwege im Zellkern zur Transkription von entsprechenden Zielgenen zur Zellproliferation führt (Biernacka A., Frangogiannis N.G. 2011). Die Auswertung der DotBlot-Ergebnisse von TGF- β 1, CTGF und SMAD2 zeigt wie oben bereits erwähnt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

4.3 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des DPP-4 Inhibitors Linagliptin im Vergleich zu und in Kombination mit dem Angiotensin-Rezeptorblocker Telmisartan auf das Herz-Kreislauf-System bei Tieren mit urämischer Kardiomyopathie und damit verbundener Hypertrophie zu untersuchen. Hierbei sollten neue Erkenntnisse in der Wirkungsweise von Linagliptin erlangt werden. Im Versuchsaufbau stand der Vergleich unbehandelter versus behandelter kranker Tiere im Vordergrund.

Bei allen Tieren wurde zur Induktion einer urämischen Kardiomyopathie die 5/6-Nephrektomie als Modell gewählt. Die 5/6-Nephrektomie ist ein schon seit Langem bekanntes Modell zur urämischen Kardiomyopathie. Allerdings konnten Tetsuo und Ashton in einer Studie feststellen, dass sich eine nachweisbare pathologische Nierenerkrankung erst nach mehreren Wochen in diesem Modell etabliert (Tetsuo S., Ashton B.M. 1975). Neuere Studien weisen zudem darauf hin, dass dieses Modell inzwischen durch effektivere Modelle ersetzt werden könnte, die im Vergleich zu einer schnellen und signifikanten Proteinurie, Hypertension und Glomerulosklerose führen (Liu Z.C., Chow K.M., Chang T.M-S. 2003). Hierzu gehört das Infarktmodell, das auf renale Ligaturen setzt und somit die Blutzufuhr an der Niere unterbricht. Die Arterien der linken Niere werden hierbei teilweise ligiert, was einen partiellen Niereninfarkt auslöst. Die rechte Niere wird komplett entnommen, so wie auch in der 5/6-Nephrektomie.

Da in der vorliegenden Studie die Werte der Blutdruckmessungen trotz Erhöhung noch immer im physiologischen Normbereich lagen, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass sich eine pathologische Hypertension noch nicht entwickelt hatte. Dies würde auch erklären, warum die Ergebnisse vor allem bei der Auswertung der histologisch-morphologischen Daten eher schwach ausgeprägt beziehungsweise ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren. Ein längerer Versuchszeitraum zur Entwicklung einer pathologischen Hypertension oder ein Wechsel zum Infarktmodell könnte somit deutlichere Ergebnisse hervorbringen. In diesem Zusammenhang hätte auch der „dämpfende“ Einfluss von Linagliptin auf den Blutdruck noch ausführlicher untersucht werden können. Aktuell kann aber anhand der vorliegenden Ergebnisse keine Auswirkung von Linagliptin auf die Herzmorphologie beschrieben werden.

Nicht abschließend kann auch der Zusammenhang zwischen erhöhtem Blutdruck und Herzgewicht dargestellt werden. Diese Untersuchung lag zwar nicht im Fokus der Arbeit, ist jedoch ein interessanter Aspekt und damit eine Erweiterung der ursprünglichen Fragestellung. Hinweise, dass das Herzgewicht aufgrund einer Myozytenhypertrophie und gegebenenfalls auch durch eine Zunahme der Media-Lumen-Ratio erhöht ist, bestehen, können jedoch nicht eindeutig bewiesen werden. Dass jedoch ein Zusammenhang zwischen Blutdruck und der Erhöhung der Myozytendicke respektive der Zunahme der

Media-Lumen-Ratio besteht kann in dieser Arbeit durch die Korrelationsberechnung bestätigt werden.

Ein erhöhtes Herzgewicht aufgrund fibrotischer Vorgänge im Herzen war in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht festzustellen. Zur Auswertung der Fibrosemarker im Herzen wurde allerdings ein noch recht junges Verfahren zur Detektion von Zielproteinen gewählt. Im DotBlot-Verfahren wird die Densität eines „Dots“, also eines Punktes, mit dem „Dot“ eines „housekeeping“-Proteins verglichen, in unserer Studie war dies GAPDH. Im Anschluss wird das Zielprotein auf das „housekeeping“-Protein normalisiert. Kommt es in der Auswertung zu Werten über 1,0, ist die Ausprägung des Zielproteins stärker, bei Werten unter 1,0 ist die Ausprägung schwächer als die des Vergleichproteins. Eine zusätzliche Auswertung anhand einer etablierten PCR oder eines Immunblots wäre in diesem Falle interessant gewesen, um zu sehen, ob sich die Ergebnisse unterscheiden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die urämische Kardiomyopathie geht mit einer hohen Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz einher. Eine konventionelle Hämodialyse stellt die häufigste Therapie dar, um systolische Funktionen und ventrikuläre Auswurfleistung bei Patienten zu verbessern. Auch durch gezielte Blutdruckreduktion durch ACE-Hemmer oder AT-II-Rezeptor-Blocker werden Herz und Niere entlastet. Auch dem DPP-4- Inhibitor Linagliptin wird in einigen Studien eine kardioprotektive Wirkung zugeschrieben sowie eine positive Wirkung auf die urämisch bedingte Hypertension.

Im hier gewählten Modell der urämischen Kardiomyopathie durch 5/6-Nephrektomie wurde untersucht, wie sich Linagliptin im Vergleich zum Angiotensin-Rezeptorblocker Telmisartan auf Blutdruck und Herzmorphologie auswirkt und ob eine Kombination beider Wirkstoffe möglicherweise von Vorteil ist.

Die angewandten Methoden umfassten die Aufnahme physiologischer Daten wie Blutdruck, Körpergewicht und Herzgewicht sowie eine histologisch-morphologische Auswertung von Herzschnitten mit verschiedenen Färbemethoden. Ergänzend wurde das DotBlot-Verfahren angewandt, um Fibrosemarker im Herzen zu identifizieren.

In der Auswertung der Ergebnisse zeigt Linagliptin insgesamt nur schwache Einflüsse auf Blutdruck und Morphologie des Herzens. Eine signifikante Reduktion des

Blutdrucks kann nicht nachgewiesen werden, allerdings eine geringgradig dämpfende Wirkung auf den urämisch bedingt erhöhten Blutdruck. Dieser steigt im Versuchsverlauf nur minimal und im Gegensatz zur Placebogruppe nicht signifikant. Die Gruppen mit Telmisartanbeteiligung weisen eine signifikante Reduktion des Blutdrucks auf, was die bereits bekannte Wirkungsweise von Telmisartan als Angiotensin-Rezeptorblocker und damit als Blutdrucksenker bestätigt.

Beim Vergleich der Herzgewichte lässt sich ein signifikant höheres Gewicht bei den Gruppen ohne Telmisartanbeteiligung (Linagliptin, Placebo) feststellen. Die untersuchten Herzschnitte zeigten jedoch keine signifikanten morphologisch-histologischen Veränderungen. Auch im DotBlot-Verfahren wurden bei der Untersuchung diverser Fibrosemarker keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Insgesamt zeigt Linagliptin im Vergleich zu Telmisartan signifikant geringere Einflüsse auf Blutdruck und Herzgewicht. Diese Ergebnisse können anhand von Literaturvergleichen bestätigt werden. Eine direkte kardioprotektive Wirkung von Linagliptin kann nicht nachgewiesen werden.

7 SUMMARY

Effects of the DPP-4-Inhibitor Linagliptin on the heart in comparison and in combination with the Angiotensin-Receptorblocker Telmisartan.

A study with induced uremic cardiomyopathy in rats

Uremic cardiomyopathy is responsible for high mortality rates among patients with chronic kidney disease and therefore is a highly prevalent cardiovascular risk factor.

This study is based on the hypothesis that Linagliptin, a DPP-4 Inhibitor, can reduce cardiovascular risk in patients with uremic cardiomyopathy. Prominent features of uremic cardiomyopathy are left ventricular hypertrophy, fibrosis, and hypertension.

In a rat model of chronic renal failure, 5/6-nephrectomized rats were treated orally with Linagliptin and /or Telmisartan, an angiotensin receptor blocker, or Placebo. The rats were treated over 14 weeks after surgery.

Linagliptin showed a balancing effect to blood pressure although no significant changes could be seen. Telmisartan on the other hand showed an expected significant reduction of the uremic hypertension.

There were no significant changes in heart morphology nor histology. Also, the evaluation of heart fibrosis markers like Collagen I and III, TGF- β 1, CTGF or SMAD2 did not show any significant results.

In conclusion, this study could detect low to moderate effects of Linagliptin especially on blood pressure although there was no proof of cardioprotective influence.

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2-1: Bsp. einer Herzarterie mit grafischer Auswertung der Media-Lumen-Ratio	53
Abbildung 2-2: Bsp. einer Kardiomyozyte mit grafischer Auswertung der Myozytendicke	54
Abbildung 2-3: Bsp. einer Herzarterie mit grafischer Auswertung der interstitiellen Fibrose	55
Abbildung 2-4: Schematische Darstellung des DotBlot-Verfahrens	58
Abbildung 2-6: Ansicht eines DotBlots als Beispiel	60
Abbildung 3-1: Elastica-van-Gieson-Färbung der Herzarterien	73
Abbildung 3-2: Selektive Darstellungen der histologischen Auswertung der Myozytendicke	74
Abbildung 3-3: Beispielfotografien der histologischen Auswertung der interstitiellen Fibrose	78
Abbildung 4-1: Von Prof. J.G.R. DeMey, University of Maastricht. Die Abbildung beschreibt die Anpassung von Blutgefäßen an eine Hypertonie ohne eine Veränderung der Media-Lumen-Ratio	94

9 DIAGRAMM- UND TABELLENVERZEICHNIS

Diagramm 2-1: Überblick über den gesamten Versuchszeitraum als Zeitachse in Tagen	36
Diagramm 3-1: Mittleres Körpergewicht der Versuchstiere vor abschließender Narkose \pm Standardfehler.....	63
Diagramm 3-2: Absolutes Herzgewicht, Mittelwerte pro Gruppen in g \pm Standardfehler	64
Diagramm 3-3: Relatives Herzgewicht, Mittelwerte pro Gruppen in mg/g \pm Standardfehler Placebo	65
Diagramm 3-4: Mittlerer Blutdruck bei erster Messung \pm Standardfehler	66
Diagramm 3-5: Mittlerer Blutdruck bei zweiter Messung \pm Standardfehler	67
Diagramm 3-6: Mittlerer Blutdruck bei dritter Messung \pm Standardfehler	68
Diagramm 3-7: Blutdruck, aufgeteilt nach Gruppen im Verlauf der Zeit Vergleich jeder Gruppe mit Placebo/two- way-ANOVA mit Bonferroni Posttest	69
Diagramm 3-8: Vergleich Blutdruck 1. Messung (RR1) versus 3. Messung (RR3) innerhalb der Versuchsgruppen	70
Diagramm 3-9: Media-Lumen-Ratio, Mittelwerte pro Gruppen als Quotient \pm Standardfehler.....	72

Diagramm 3-10: Myozytendicke, Mittelwerte pro Gruppen in $\mu\text{m} \pm$ Standardfehler.....	74
Diagramm 3-11: Interstitielle Fibrose, Mittelwerte pro Gruppen in % des jeweils ausgewählten Feldes \pm Standardfehler	78
Diagramm 3-12: Mittelwerte der relativen Expression von Kollagen Typ1 als Quotient \pm Standardabweichung. Normalisiert auf Vergleichsprotein GAPDH.	79
Diagramm 3-13: Mittelwerte der relativen Expression von Kollagen Typ 3 als Quotient mit Standardabweichung.....	80
Diagramm 3-14: Vergleich der Expression von Kollagen Typ III und Kollagen Typ I im Myokard Angezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte mit Standardfehler	81
Diagramm 3-15: Mittelwerte der relativen Expression von TGF- β 1 als Quotient mit Standardabweichung.....	82
Diagramm 3-16: Mittelwerte der relativen Expression von SMAD2 als Quotient mit Standardabweichung	83
Diagramm 3-17: Mittelwerte der relativen Expression von CTGF als Quotient mit Standardabweichung.....	84
Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Materialien: Behandlung und Datensammlung	37
Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Materialien: Organentnahme, Histologie, Auswertung	38
Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Materialien für die DotBlot-Auswertung.....	41

Tabelle 2-4: Interpretation von Korrelationskoeffizienten	62
Tabelle 3-1: Spearman-Korrelation von Blutdruck und Herzgewicht	71
Tabelle 3-2: Spearman-Korrelation zwischen Blutdruckmessungen und Myozytendicke sowie Media-Lumen-Ratio	75
Tabelle 3-3: Spearman Korrelation zwischen Herzgewicht und Myozytendicke sowie Media-Lumen-Ratio	76
Tabelle 3-4: Spearman-Korrelation zwischen Media-Lumen-Ratio und Myozytendicke.....	77

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ARB	Angiotensin-Rezeptorblocker
ATI	Angiotensin I
ATII	Angiotensin II
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DPP-4	Dipeptidylpeptidase 4
FDA	Food and Drug Administration
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLP-1	Glucagon-like-peptide-1
KG	Körpergewicht
MLR	Media-Lumen-Ratio
OP1 / OP2	Operation 1 / Operation 2
Polamp.	Polamputation
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RR1-3	Blutdruckmessung 1–3

T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TGF β	Transforming Growth Factor
Uni-Nx	Uni-Nephrektomie

11 LITERATURVERZEICHNIS

Accornero F., van Berlo J. H., Correll R.N. et al. (2015): Genetic Analysis of Connective Tissue Growth Factor as an Effector of Transforming Growth Factor β Signaling and Cardiac Remodeling. In: *Molecular and cellular biology* 35 (12), S. 2154–2164. DOI: 10.1128/MCB.00199-15.

Adhyapak S. M., Iyengar S. S. (2011): Characteristics of a subset of patients with reversible systolic dysfunction in chronic kidney disease. In: *Congestive heart failure (Greenwich, Conn.)* 17 (3), S. 120–126. DOI: 10.1111/j.1751-7133.2011.00214.x.

Akhrass P.R., McFarlane S.I. (2011): Telmisartan and cardioprotection. In: *Vascular health and risk management* 7, S. 677–683. DOI: 10.2147/VHRM.S9447.

Alhaj E., Alhaj N., Rahman I. et al. (2013): Uremic cardiomyopathy: an underdiagnosed disease. In: *Congestive heart failure (Greenwich, Conn.)* 19 (4), S. E40-5. DOI: 10.1111/chf.12030.

Amann K., Tyralla K. (2003): Morphology of the heart and arteries in renal failure. Department of Pathology, University of Erlangen, Erlangen, Germany. In: *Kidney International*, 2003 (Vol. 63 Supplement 84), S. pp. S80–S83.

Aroor A.R., Sowers J.R., Bender S.B. et al. (2013): Dipeptidylpeptidase inhibition is associated with improvement in blood pressure and diastolic function in insulin-resistant male Zucker obese rats. In: *Endocrinology* 154 (7), S. 2501–2513. DOI: 10.1210/en.2013–1096.

- Atlas S. (2007): The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. In: *J Manag Care Pharm* (13(8)), S. S.9–20.
- Barnett A.H. (2011): Linagliptin: a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor with a unique place in therapy. In: *Advances in therapy* 28 (6), S. 447–459. DOI: 10.1007/s12325-011-0028-y.
- Biernacka A., Frangiannis N.G. (2011): Aging and Cardiac Fibrosis. In: *Aging and Disease* 2011 (Apr., 2(2)), S. 158–173.
- Blech S., Ludwig-Schwellinger E., Gräfe-Mody E.U. et al. (2010): The metabolism and disposition of the oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, in humans. In: *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 38 (4), S. 667–678. DOI: 10.1124/dmd.109.031476.
- Brilla C.G., Matsubara L., Weber K.T. (1996): Advanced Hypertensive Heart Disease in Spontaneously Hypertensive Rats: Lisinopril-Mediated Regression of Myocardial Fibrosis. In: *Hypertension* 28 (2), S. 269–275. DOI: 10.1161/01.HYP.28.2.269.
- Brilla C.G., Pick R. et al. (1990): Remodeling of the Rat Right and Left Ventricles in Experimental Hypertension. In: *Circulation research* 1990 (67), S. 1355–1364.
- Brilla CG. et al. (1991): Impaired Diastolic Function and Coronary Reserve in Genetic Hypertension. Role of Interstitial Fibrosis and Medial Thickening of Intramyocardial Coronary Arteries. In: *Circulation research*, S. 107–115.

- Chaykovska L.; von Websky K.; Rahnenführer J. et al. (2011): Effects of DPP-4 inhibitors on the heart in a rat model of uremic cardiomyopathy. In: *PLoS one* 6 (11), S. e27861. DOI: 10.1371/journal.pone.0027861.
- Chaykovska L., Alter M.L., von Websky K. et al. (2013): Effects of telmisartan and linagliptin when used in combination on blood pressure and oxidative stress in rats with 2-kidney-1-clip hypertension. In: *Journal of hypertension* 31 (11), S. 2290-8; discussion 2299. DOI: 10.1097/HJH.0b013e3283649b4d.
- Chinnappa S., Hothi S.S., Tan L-B. (2014): Is uremic cardiomyopathy a direct consequence of chronic kidney disease? In: *Expert review of cardiovascular therapy* 12 (2), S. 127–130. DOI: 10.1586/14779072.2014.879040.
- Chrysant S.G., Chrysant G.S. (2012): Clinical implications of cardiovascular preventing pleiotropic effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. In: *The American journal of cardiology* (11), S. 1681–1685. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.01.398.
- da Silva Júnior W.S., de Godoy-Matos A.F., Kraemer-Aguiar L.G. (2015): Dipeptidyl Peptidase 4: A New Link between Diabetes Mellitus and Atherosclerosis? In: *BioMed research international* 2015. DOI: 10.1155/2015/816164.
- Dasgupta C., Zhang L. (2011): Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. In: *Drug discovery today* 16 (1–2), S. 22–34. DOI: 10.1016/j.drudis.2010.11.016.
- Di Lullo L., House A., Gorini A. et al. (2015): Chronic kidney disease and cardiovascular complications. In: *Heart*

failure reviews 20 (3), S. 259–272. DOI: 10.1007/s10741-014-9460-9.

Dobson G.P. (2003): On being the right size: heart design, mitochondrial efficiency and lifespan potential. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003 (Aug; 30(8)), S. 590–597.

Edwards N.C.; Moody W.E.; Chue C.D. et al. (2014): Defining the natural history of uremic cardiomyopathy in chronic kidney disease: the role of cardiovascular magnetic resonance. In: *JACC. Cardiovascular imaging* 7 (7), S. 703–714. DOI: 10.1016/j.jcmg.2013.09.025.

Edwards N.C., Moody W.E., Yuan M. et al. (2015): Diffuse Interstitial Fibrosis and Myocardial Dysfunction in Early Chronic Kidney Disease. In: *The American journal of cardiology*. DOI: 10.1016/j.amjcard.2015.02.015.

Foley R.N.; Parfrey P.S.; Harnett J.D. et al. (1995a): Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. In: *Kidney Int* 47 (1), S. 186–192. DOI: 10.1038/ki.1995.22.

Foley R.N. et al. (1995b): The prognostic importance of left ventricular geometry in uremic cardiomyopathy. In: *J Am Soc Nephrol*. 1995 (Jun;5(12)), S. 2024–31.

Frei U., Schober-Halstenberg H-J. (2007): Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht 2006/2007.

Geiger, H., Beecken W.D. (2003): Nierenerkrankungen: Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie ; mit 94 Tabellen: Schattauer. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=npuVOISERcEC>.

Go A.S., Chertow G.M., Fan D., McCulloch C.E., Hsu C. (2004): Chronic kidney disease and the risks of death,

cardiovascular events, and hospitalization. In: *The New England journal of medicine* 351 (13), S. 1296–1305. DOI: 10.1056/NEJMoa041031.

Graefe-Mody U., Rettich S. (2012):
Linagliptin_Pharmacology. In: *Clin Pharmacokinet* 2012 (51 (7)), S. 411–427.

Gross M.-L., Ritz E. (2008): Hypertrophy and fibrosis in the cardiomyopathy of uremia--beyond coronary heart disease. NOCHMAL VOR PRÜFUNG LESEN!
GUTE ZUSAMMENFASSUNG. In: *Seminars in dialysis* 21 (4), S. 308–318. DOI: 10.1111/j.1525-139X.2008.00454.x.

Havale S.H., Pal M. (2009): Medicinal chemistry approaches to the inhibition of dipeptidyl peptidase-4 for the treatment of type 2 diabetes. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 17 (5), S. 1783–1802. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.01.061.

Heywood J.T, Fonarow G.C., Costanzo M.R. et al. (2007): High prevalence of renal dysfunction and its impact on outcome in 118,465 patients hospitalized with acute decompensated heart failure: a report from the ADHERE database. In: *Journal of cardiac failure* 13 (6), S. 422–430. DOI: 10.1016/j.cardfail.2007.03.011.

Hoher B., Reichtzeder C., Alter, M.L. (2012): Renal and cardiac effects of DPP4 inhibitors--from preclinical development to clinical research. In: *Kidney & blood pressure research* 36 (1), S. 65–84. DOI: 10.1159/000339028.

Hoher B., Sharkovska Y., Mark M., Klein Th., Pfab T. (2013): The novel DPP-4 inhibitors linagliptin and BI

- 14361 reduce infarct size after myocardial ischemia/reperfusion in rats. In: *International journal of cardiology* 167 (1), S. 87–93. DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.12.007.
- Kannel W.B. (1979): Diabetes and Cardiovascular Disease. In: *JAMA* 241 (19), S. 2035. DOI: 10.1001/jama.1979.03290450033020.
- Kawai M., Hongo K. et al. (2009): Telmisartan predominantly suppresses cardiac fibrosis, rather than hypertrophy, in renovascular hypertensive rats. In: *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 32 (7), S. 604–610. DOI: 10.1038/hr.2009.61;
- Kimpe J. de, Cornelis R., Mees L., Vanholder R., Verhoeven G. (1999): 74As-Arsenate Metabolism in Flemish Giant Rabbits with Renal Insufficiency. In: *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 13 (1–2), S. 7–14. DOI: 10.1016/S0946-672X(99)80017-0.
- Kiwon B.; Noyan-Ashraf M.N. et al. (2008): Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. In: *Circulation* 117 (18), S. 2340–2350. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.739938.
- Koibuchi N. et al. (2014): DPP-4 inhibitor linagliptin ameliorates cardiovascular injury in salt-sensitive hypertensive rats independently of blood glucose and blood pressure. In: *Cardiovascular Diabetology* 2014 (13), S. 157.

- Kottgen A., Russell S.D., Loehr L.R. et al. (2007): Reduced kidney function as a risk factor for incident heart failure: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18 (4), S. 1307–1315. DOI: 10.1681/ASN.2006101159.
- Lehnhardt A., Kemper M.J. (2011): Pathogenesis, diagnosis and management of hyperkalemia. In: *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 26 (3), S. 377–384. DOI: 10.1007/s00467-010-1699-3.
- Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M. (1996): Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: Identifying opportunities for intervention. In: *Am J Kidney Dis* 1996 (Mar;27(3)), S. 347–54.
- Liu Z.C., Chow K.M., Chang T.M-S. (2003): Evaluation of Two Protocols of Uremic Rat Model: Partial Nephrectomy and Infarction. In: *Ren Fail* 25 (6), S. 935–943. DOI: 10.1081/JDI-120026028.
- Locatelli F. (2003): Epidemiology of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 18 (90007), S. 2vii. DOI: 10.1093/ndt/gfg1072.
- London G. M., Pannier B. et al. (2001): Alterations of Left Ventricular Hypertrophy in and Survival of Patients Receiving Hemodialysis: Follow-up of an Interventional Study. In: *J Am Soc Nephrol.* 2001 (12), S. 2759–2767.
- Mall G., Huther W., Schneider J., Lundin P., Ritz, E. (1990): Diffuse Intermyocardiocytic Fibrosis in Uraemic

Patients. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 5 (1), S. 39–44. DOI: 10.1093/ndt/5.1.39.

Mark P.B., Johnston N., Groenning B. A. et al. (2006): Redefinition of uremic cardiomyopathy by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging. In: *Kidney Int* 69 (10), S. 1839–1845. DOI: 10.1038/sj.ki.5000249.

Marzona I., O'Donnell M. et al. (2012): Increased risk of cognitive and functional decline in patients with atrial fibrillation: results of the ONTARGET and TRANSCEND studies. In: *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 184 (6), S. E329-36. DOI: 10.1503/cmaj.111173.

McCormick L.M., Kydd A.C., Read P.A., et al. (2014): Chronic dipeptidyl peptidase-4 inhibition with sitagliptin is associated with sustained protection against ischemic left ventricular dysfunction in a pilot study of patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. In: *Circulation. Cardiovascular imaging* 7 (2), S. 274–281. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.113.000785.

McFarlane S.I., Kumar A., Sowers J.R. (2003): Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. In: *The American journal of cardiology* 91 (12), S. 30–37. DOI: 10.1016/S0002-9149(03)00432-6.

Mikhail N. (2012): Use of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease. In: *Postgrad Med.* 124(4):138-44. DOI: 10.3810/pgm.2012.07.2575.

Minamino T., Miyauchi H. et al. (2004): The Role of Vascular Cell Senescence in Atherosclerosis:

- Antisenescence as a Novel Therapeutic Strategy for Vascular Aging. In: *CVP* 2 (2), S. 141–148. DOI: 10.2174/1570161043476393.
- Moe S.M., Chen N.X. (2004): Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. In: *Circulation research* 95 (6), S. 560–567. DOI: 10.1161/01.RES.0000141775.67189.98.
- Mueller F. (1954): Herz- und Kreislaufwerte von normalen Ratten verschiedenen Alters. In: *Pflügers Archiv* 1954 (Bd. 258), S. S. 358–365.
- Mulvany M.J. (1999): Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? In: *Cardiovascular Research* 1999 (41), S. 9–13.
- Murohara T. (2012): Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor: another player for cardiovascular protection. In: *Journal of the American College of Cardiology* 59 (3), S. 277–279. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.09.050.
- Murtagh Fliss E.M., Addington-Hall J., Higginson I.J. (2007): The prevalence of symptoms in end-stage renal disease: a systematic review. In: *Advances in chronic kidney disease* 14 (1), S. 82–99. DOI: 10.1053/j.ackd.2006.10.001.
- National Kidney Foundation (2002): K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification and stratification 2002.
- Nyström, Thomas; Gutniak, Mark K.; Zhang, Qimin; Zhang, Fan; Holst, Jens Juul; Ahrén, Bo; Sjöholm, Ake (2004): Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary

artery disease. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 287 (6), S. E1209-15. DOI: 10.1152/ajpendo.00237.2004.

Oeseburg H., de Boer R.A., Buikema H. et al. (2010): Glucagon-like peptide 1 prevents reactive oxygen species-induced endothelial cell senescence through the activation of protein kinase A. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (7), S. 1407–1414. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.206425.

Pratley R.E., Salsali A. (2007): Inhibition of DPP-4: a new therapeutic approach for the treatment of type 2 diabetes. In: *Current medical research and opinion* 23 (4), S. 919–931. DOI: 10.1185/030079906X162746.

Putra S. E., Tsuprykov O., Websky K. von et al. (2014): Dealing with Large Sample Sizes: Comparison of a New One Spot Dot Blot Method to Western Blot. Beschreibung DotBlot durch Oleg.

Quek K.J., Boyd R., Ameer O.Z. et al. (2016): Progressive vascular remodelling, endothelial dysfunction and stiffness in mesenteric resistance arteries in a rodent model of chronic kidney disease. In: *Vascular pharmacology*. DOI: 10.1016/j.vph.2015.12.004.

Read P.A., Khan F.Z. et al. (2010): DPP-4 inhibition by sitagliptin improves the myocardial response to dobutamine stress and mitigates stunning in a pilot study of patients with coronary artery disease. In: *Circulation. Cardiovascular imaging* 3 (2), S. 195–201. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.109.899377.

Ronco, Claudio; McCullough, Peter; Anker, Stefan D.; Anand, Inder; Aspromonte, Nadia; Bagshaw, Sean M. et al.

(2010): Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. In: *European heart journal* 31 (6), S. 703–711. DOI: 10.1093/eurheartj/ehp507.

Ronco C., Bellomo R., Kellum J. A. (2009): *Critical Care Nephrology*: Saunders/Elsevier. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=XkKn96HThzEC>.

Ross R. (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. In: *The New England journal of medicine* 340 (2), S. 115–126. DOI: 10.1056/NEJM199901143400207.

Rutherford W.E. et al. (1977): Phosphate Control and 25-Hydroxycholecalciferol Administration in Preventing Experimental Renal Osteodystrophy in the Dog. In: *The Journal of Clinical Investigation* (Vol. 60), S. 332–341.

Santoro A., Mancini E. (2002): Cardiac effects of chronic inflammation in dialysis patients. Malpighi Nephrology and Dialysis Division, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna, Italy. In: *Nephrol Dial Transplant* (2002) 17 ([Suppl 8]), S. 10–15.

Schamberger B., Lutz J., Bruck H., Münzel T. (2013): Kardiorenales Syndrom. In: *Nephrologie* 8 (4), S. 298–307. DOI: 10.1007/s11560-012-0736-6.

Schrier R.W. (1999): *Atlas of diseases of the kidney*. Philadelphia: Current Medicine.

Sihm I., Schroeder A. P., Aalkjær C et al. (1995): The relation between peripheral vascular structure, left ventricular hypertrophy, and ambulatory blood pressure in essential hypertension*. In: *Am J Hypertens* 8 (10), S. 987–996. DOI: 10.1016/0895-7061(95)00220-0.

- Silbernagl S., Despopoulos A. (2012): Taschenatlas Physiologie. 8., überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Sviglerova, J.; Kuncova, J.; Nalos, L.; Tonar, Z.; Rajdl, D.; Stengl, M. (2010): Cardiovascular parameters in rat model of chronic renal failure induced by subtotal nephrectomy. In: *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 59 Suppl 1, S. S81–8.
- Šviglerová J., Kunková J. et al. (2010): Cardiovascular Parameters in Rat Model of Chronic Renal Failure Induced by Subtotal Nephrectomy. In: *Physiol. Res. 59 (Suppl. 1)*, S. S81–S88.
- Tetsuo S., Ashton B.M. (1975): A Progressive Glomerulosclerosis Occurring in Partial Five-sixths Nephrectomized Rats. In: *Am J Pathol* 79:95–106, 1975.
- Ussher J.R., Drucker D.J. (2012): Cardiovascular biology of the incretin system. In: *Endocrine reviews* 33 (2), S. 187–215. DOI: 10.1210/er.2011–1052.
- van Putten S., Shafieyan Y., Hinz B. (2015): Mechanical control of cardiac myofibroblasts. In: *Journal of molecular and cellular cardiology*. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.025.
- Weber K.T. (2000): Fibrosis and hypertensive heart disease. In: *Curr Opin Cardiol.* (15:), S. 264–272.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die an der erfolgreichen Umsetzung dieses Projektes mitgewirkt haben.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Berthold Hocher, Leiter des Lehrstuhls Experimentelle Ernährungsmedizin des Instituts für Ernährungswissenschaften der Universität Potsdam für die Möglichkeit zur Promotion innerhalb der Arbeitsgruppe Hocher (später AG Pfab) am Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité Berlin und die Überlassung des Themas.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink, Seniorprofessorin des Instituts für Pharmakologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU Berlin für die Unterstützung, die konstruktive Betreuung und Zusammenarbeit sowie die hilfreichen Korrekturhinweise zur Dissertation bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Karoline Websky, meiner ersten Ansprechpartnerin bei Nachfragen und Problemen. Sie unterstützte mich gemeinsam mit Herrn Dr. Christoph Reichetzedler und Herrn Oleg Tsuprykov in der Umsetzung dieser Arbeit und fanden freundlicherweise stets die Zeit, meine Texte Korrektur zu lesen.

Auch bei Frau Dr. Hannah Hünigen möchte ich mich für das freundliche Bereitstellen eines Arbeitszimmers am Anatomischen Institut der FU Berlin, Standort Koserstraße bedanken. So konnte ich die eingesparte Fahrzeit in die histologische Auswertung meiner Schnitte stecken.

Und zu guter Letzt möchte ich meinem Mann Mario danken, der mir immer den Rücken freigehalten hat, wenn ich mal wieder etwas länger am Computer sitzen musste.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Wegendorf, den 12.04.2017

Lisa Leiner