

**Untersuchung des Einflusses des
Natrium-Glukose-Cotransporter-2-Inhibitors
Dapagliflozin auf die Atherogenese im
Mausmodell der diätinduzierten
Insulinresistenz**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christina Kohlmorgen

aus Schwerte

Düsseldorf, September 2017

aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Breitzkreutz

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Diabetes mellitus Typ 2.....	1
1.2 Atherosklerose	4
1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen bei Diabetes mellitus Typ 2.....	9
1.4 Natrium-Glukose-Cotransporter.....	11
1.5 Natrium-Glukose-Cotransporter-2-Inhibitoren.....	13
1.6 Zielsetzung der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Tierversuche	16
2.1.1 Tiermodell	16
2.1.2 Oraler Glukosetoleranztest.....	17
2.1.3 Kernspinresonanzspektroskopie.....	18
2.1.4 Probengewinnung.....	18
2.1.4.1 Plasmaaufbereitung.....	18
2.1.4.2 Organentnahme für histologische Analysen.....	19
2.1.4.3 Organentnahme für molekularbiologische Analysen	19
2.1.5 Blutdruckmessung	19
2.1.6 Messung des Hämatogramms im Vollblut	20
2.1.7 Blutungszeit	20
2.2 Histologie	21
2.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen	21
2.2.2 Paraffinschnitte des Aortenursprungs.....	21

Inhaltsverzeichnis

2.2.3	Histochemische Färbungen	22
2.2.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	22
2.2.3.2	Antikörper und Bindeproteine in der Histochemie	23
2.2.3.3	α -Glattmuskelaktin und Mac-2	23
2.2.3.4	Hyaluronsäure-Färbung	24
2.2.3.5	Biglykan-Färbung	25
2.2.3.6	Auswertung der Färbungen	25
2.2.4	Öl-Rot-O-Färbung	25
2.3	Durchflusszytometrie	27
2.3.1	Verwendete Puffer und Lösungen	27
2.3.2	Analyse der zirkulierenden Immunzellen im Blut	28
2.3.2.1	Lymphozyten im Blut	28
2.3.2.2	Monozyten und neutrophile Granulozyten im Blut	29
2.3.3	Analyse der Immunzellen in der Aortenwand	30
2.3.3.1	Lymphozyten in der Aorta	31
2.3.3.2	Makrophagen in der Aorta	31
2.3.4	Analyse von CD62P und CD41/61 auf Thrombozyten	32
2.3.5	Antikörper in der Durchflusszytometrie	34
2.4	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>Realtime-PCR</i>	35
2.4.1	RNA-Isolation und cDNA-Umschreibung	35
2.4.2	Quantitative Realtime-PCR (qPCR)	35
2.5	Protein- und Lipoproteinanalytik	37
2.5.1	Bestimmung der Zytokine und Insulin im Plasma	37
2.5.2	Bestimmung des Plasmacholesterins	37
2.6	Kalibrierte automatisierte Thrombographie	38
2.6.1	Bestimmung in murinem Plasma	38
2.6.2	Bestimmung in humanem Plasma	38
2.7	Statistische Auswertung	40
3.	Ergebnisse	41

Inhaltsverzeichnis

3.1	Diabetogene Diät	41
3.1.1	Körpergewicht und Glukosetoleranz	41
3.1.2	CD62P-Expression und Thrombinpotential	43
3.2	Metabolische Parameter und Blutdruck	45
3.2.1	Glukosetoleranz und Insulinresistenz	45
3.2.2	Körpergewicht und Körperfettgehalt	46
3.2.3	Blutdruck und Herzfrequenz	47
3.3	Atherosklerose	49
3.3.1	Plaquescore Aorta	49
3.3.2	Immunzellen	52
3.3.3	Genexpression Aorta	55
3.3.4	Plauekumposition	57
3.4	Zirkulierende Immunzellen und Zytokine	59
3.4.1	Zirkulierende Immunzellen.....	59
3.4.2	Zirkulierende Chemokine und Zytokine	60
3.5	Thrombingenerierung und Thrombozytenaktivierung	62
3.5.1	Thrombozytenzahl und Hämatokrit.....	62
3.5.2	Thrombinpotential	62
3.5.3	CD62P- und CD41/61-Expression.....	64
3.5.4	Blutungszeit	67
3.6	Cholesterinstoffwechsel	69
3.6.1	Cholesterin im Plasma.....	69
3.6.2	Genexpression Leber	70
3.6.3	HDL und Thrombinpotential.....	71
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	73
4.	Diskussion	75
4.1	Einfluss von Dapagliflozin auf Atherosklerose	75
4.2	Einfluss von Dapagliflozin auf HDL-Cholesterin	82
4.3	Einfluss von Dapagliflozin auf Thrombinbildung und Thrombozytenaktivierung	86

Inhaltsverzeichnis

4.4	Ausblick und Limitierung	89
5.	Zusammenfassung	91
6.	Summary.....	92
	Literaturverzeichnis	93
	Veröffentlichungen.....	115
	Originalarbeiten	115
	Kongressbeiträge	115
	Lebenslauf	117
	Danksagung.....	118
	Eidesstattliche Versicherung	119

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Diabetes im Jahr 2015 und 2040	1
Abbildung 2. Aufbau eines arteriellen Gefäßes	4
Abbildung 3. Infiltration von Entzündungszellen in der Atherogenese.	6
Abbildung 4. Tubuläre Glukose-Reabsorbtion	11
Abbildung 5. Glukosetransport in der Epithelzelle des proximalen Tubulus.	12
Abbildung 6. Strukturformel von Dapagliflozin	14
Abbildung 7. Experimentelles Schema der Tierstudie.....	16
Abbildung 8. Gating-Schema der Lymphozyten im Blut.....	29
Abbildung 9. Gating-Schema der Monozyten im Blut.....	30
Abbildung 10. Gating-Schema der Lymphozyten in der Aorta	31
Abbildung 11. Gating-Schema der Makrophagen in der Aorta.....	32
Abbildung 12. Gating-Schema der murinen Thrombozyten	33
Abbildung 13. Diabetogene Diät induziert Adipositas in <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Mäusen.....	42
Abbildung 14. Diabetogene Diät verschlechtert die Glukosetoleranz.	43
Abbildung 15. Diabetogene Diät erhöht die CD62P-Expression auf Thrombozyten und das endogene Thrombinpotential.....	44
Abbildung 16. Dapagliflozin verbessert die Glukosetoleranz.	46
Abbildung 17. Dapagliflozin zeigt keinen Effekt auf das Körpergewicht.....	47
Abbildung 18. Dapagliflozin zeigt keinen Einfluss auf Blutdruck und Herzfrequenz.	48
Abbildung 19. Dapagliflozin hat zum frühen Zeitpunkt keinen Einfluss auf atherosklerotische Läsionen.....	50
Abbildung 20. Dapagliflozin reduziert atherosklerotische Läsionen in der Aorta.	51
Abbildung 21. Dapagliflozin reduziert atherosklerotische Plaques besonders in der thorakalen Aorta.	51
Abbildung 22. Dapagliflozin reduziert die Plaqueeﬂäche in den Aortenklappen im Aortenursprung.....	52
Abbildung 23. Dapagliflozin hat keinen Einfluss auf Makrophageninfiltration zum frühen Zeitpunkt.....	53
Abbildung 24. Dapagliflozin reduziert Gehalt von Makrophagen in Plaques.....	53
Abbildung 25. Dapagliflozin reduziert Anzahl von Immunzellen in der Aorta.	54
Abbildung 26. Reduzierte Anzahl von Makrophagen und T-Lymphozyten in der Aortenwand nach Behandlung mit Dapagliflozin.	55
Abbildung 27. Dapagliflozin hemmt aortale Expression von <i>Arginase1</i>	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 28. Dapagliflozin reduziert Menge an glatten Muskelzellen in atherosklerotischen Läsionen.....	57
Abbildung 29. Dapagliflozin reduziert Gehalt an Molekülen der Extrazellulärmatrix im Aortenursprung.....	58
Abbildung 30. Dapagliflozin hat keinen Einfluss auf die Anzahl der zirkulierenden Immunzellen.....	60
Abbildung 31. Zytokinsekretionsprofil wird durch die Behandlung mit Dapagliflozin nicht verändert.	61
Abbildung 32. Dapagliflozin hat keinen Einfluss auf Hämatokrit und Thrombozytenzahl.....	62
Abbildung 33. Erniedrigtes endogenes Thrombinpotential durch Behandlung mit Dapagliflozin.....	63
Abbildung 34. Dapagliflozin hat keinen direkten Einfluss auf das endogene Thrombinpotential.....	64
Abbildung 35. CD41/61-Expression auf Thrombozyten wird nicht beeinflusst durch Dapagliflozin.....	65
Abbildung 36. CD62P-Expression auf murinen Thrombozyten ist reduziert durch Behandlung mit Dapagliflozin.....	66
Abbildung 37. Verringerte Expression von CD62P nach <i>ex vivo</i> Inkubation muriner Thrombozyten mit Dapagliflozin.....	67
Abbildung 38. Dapagliflozin hat keinen Einfluss auf die Blutungszeit.....	68
Abbildung 39. Dapagliflozin erhöht HDL-Cholesterin.....	70
Abbildung 40. Dapagliflozin beeinflusst die hepatische Expression HDL-Cholesterin-Metabolismus assoziierter Gene.....	71
Abbildung 41. HDL verringert die Bildung von Thrombin in humanem Plasma.....	72
Abbildung 42. Hypothetischer Mechanismus der Atheroprotektion durch Dapagliflozin.....	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Zusammensetzung der diabetogenen Diät.....	17
Tabelle 2. Puffer und Lösungen in der Histologie	21
Tabelle 3. Antikörper und Bindeproteine in der (Immun-)Histochemie.....	23
Tabelle 4. In der Durchflusszytometrie verwendete Puffer und Lösungen.....	27
Tabelle 5. In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper-Kombinationen.....	34
Tabelle 6. In der qPCR verwendete Primersequenzen.	36

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	<i>ATP-binding cassette, sub-family A, member 1</i>
APC	Allophycocyanin
APC/Cy7	Allophycocyanin-Cyanin7 Tandem-Konjugat
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DD	Diabetogene Diät
DMT1	Diabetes mellitus Typ 1
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETP	Endogenes Thrombinpotential
FBS	Fetales bovines Serum
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GLP	<i>Glucagon-like peptide</i>
H&E	Hämatoxylin & Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HABP	<i>Hyaluronic acid binding protein</i> , Hyaluronsäurebindeprotein
HbA _{1c}	<i>Glycated hemoglobin A1_c</i> , glykiertes Hämoglobin A _{1c}
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HDL-C	<i>High density lipoprotein</i> -Cholesterin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
IFN	Interferon
Isoton	Coulter® Isoton II Diluent
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low density lipoprotein</i> Rezeptor
Mac-2	Galektin-3
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> (CCL-2)
MIP	<i>Makrophage inflammatory protein</i>

Abkürzungsverzeichnis

NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
ÖRO	Öl-Rot-O
PAP/PPP	Plättchenarmes Plasma/ <i>plateled poor plasma</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PE/Cy7	Phycoerythrin-Cyanin7 Tandem-Konjugat
qPCR	Quantitative Realtime-PCR
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normally T-Cell Expressed and Secreted</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> -Nährmedium
S.E.M.	<i>Standard error of the mean</i> ; Standardfehler
SD	Standard-Diät
SGLT	<i>Sodium/glucose cotransporter</i> , Natrium-Glukose-Cotransporter
SMC	<i>Smooth muscle cell</i> , glatte Muskelzelle
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
STZ	Streptozotocin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 2

Diabetes mellitus gehört zu den Erkrankungen, welche von den Vereinten Nationen als globale Bedrohung der Menschheit bezeichnet werden.¹

Aufgrund der Erkrankungshäufigkeit, der erhöhten Sterblichkeit und der Folgeerkrankungen kommt Diabetes mellitus eine erhebliche gesundheitspolitische und gesellschaftliche Bedeutung zu. Neben der persönlichen Belastung der Betroffenen durch die Erkrankung stellen die Behandlungskosten eine große Herausforderung für das Gesundheitswesen dar. Im Jahr 2015 wurden etwa 12 % der globalen Gesundheitskosten für die Behandlung des Diabetes mellitus aufgewendet.²

Weltweit sind aktuell etwa 415 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt. Bis 2040 wird die Zahl der erkrankten Menschen weiter steigen und Schätzungen zu Folge bei etwa 642 Millionen liegen (Abbildung 1). An den Folgen der Krankheit starben 2015 etwa 5 Millionen Menschen weltweit.²

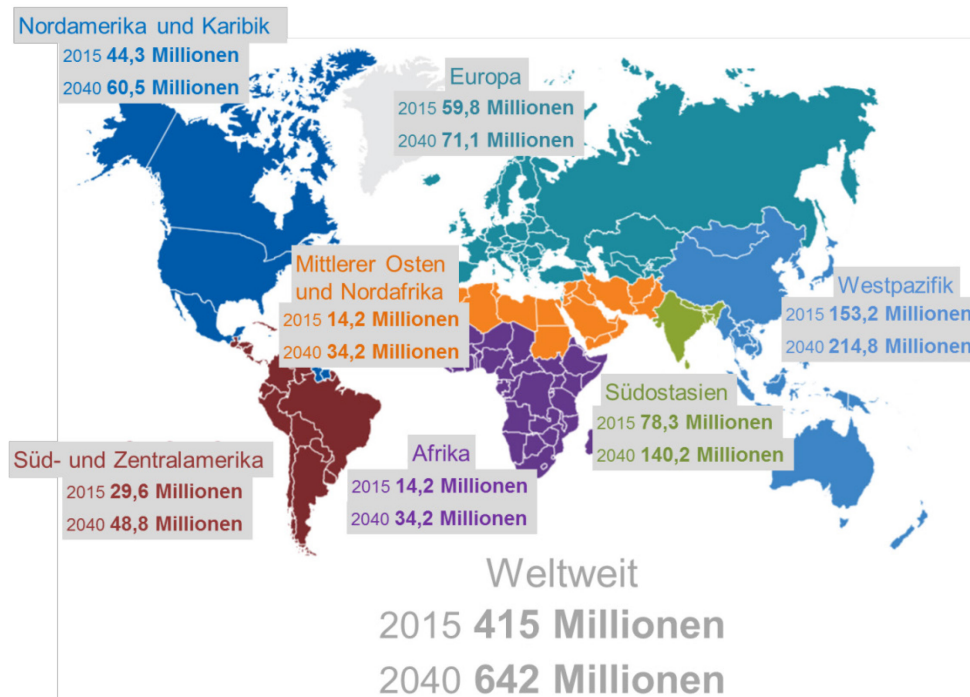


Abbildung 1. Diabetes im Jahr 2015 und 2040
(modifiziert nach IDF Diabetes Atlas 7. Edition, 2015)²

Einleitung

In Deutschland sind über 6 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt. Experten schätzen die Dunkelziffer um etwa 2 Millionen Menschen höher, welche sich ihrer Krankheit aufgrund unspezifischer oder fehlender Symptome nicht bewusst sind.^{2,3}

Die Diabetes-Prävalenz ist abhängig vom Lebensalter und steigt ab dem 50. Lebensjahr deutlich an. Insgesamt nimmt die Prävalenz des DMT2 stetig zu, während das durchschnittliche Alter der Erstdiagnose der Erkrankung sinkt.^{4,5} Aus diesem Grund ist eine langjährige Behandlung der Patienten unabdingbar und stellt hohe Anforderungen an das Sicherheitsprofil der klinischen Therapie. Diese Zunahme ergibt sich aus dem demographischen Wandel der Bevölkerung, aber auch aus den negativen Veränderungen der Lebensbedingungen (Lebensstiländerung, Umweltschadstoffe).⁶

Bei etwa 90 % der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten handelt es sich um Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2), der vor allem mit einem erhöhten Lebensalter, Adipositas und mangelnder Bewegung assoziiert ist.² Die Ursachen, die zur Entstehung des Krankheitsbildes führen, sind multifaktoriell und umfassen sowohl eine genetische Prädisposition wie auch Umwelteinflüsse.⁷

Das Peptidhormon Insulin wird in den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas gebildet und in den Blutkreislauf sezerniert. Seine wichtigste Funktion ist die Regulation des Blutzuckerhaushaltes. Durch Stimulation der β -Zellen nach Glukoseaufnahme wird Insulin freigesetzt, das für die Aufnahme von Glukose, Aminosäuren und Fettsäuren in die Zielgewebe Leber, Muskel und Fettgewebe verantwortlich ist. Zwischen den β -Zellen und Insulin-sensitiven Zielgeweben findet ein stetiger Informationsaustausch statt, so dass Insulin in der jeweils benötigten Menge produziert wird. Bei der Pathogenese des DMT2 kommt es zunächst zu einer Insulinresistenz in den Zielgeweben in deren Folge die Insulinausschüttung deutlich gesteigert wird, um zunächst noch eine physiologische Blutglukosekonzentration zu gewährleisten. Im weiteren zeitlichen Verlauf tritt eine Erschöpfung der β -Zellen auf und die Insulinproduktion nimmt ab. Es entwickelt sich eine Hyperglykämie.⁸

Somit ist das Krankheitsbild des DMT2 schließlich gekennzeichnet durch eine chronische Hyperglykämie in Begleitung metabolischer Stoffwechselstörungen, die sowohl auf eine mangelnde Insulinproduktion als auch eine fehlende Insulinwirkung zurückzuführen sind.⁹

Die Diagnosestellung von Diabetes mellitus erfolgt zweistufig. Zunächst wird der HbA_{1c}-Wert bestimmt. Liegt dieser zwischen 5,7 % bis 6,5 %, muss zur Diagnose in einem zweiten

Einleitung

Schritt der Wert der Nüchternblutglukose bestimmt oder ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt werden. Unterhalb eines HbA_{1c}-Wertes von 5,7 % kann ein Diabetes sicher ausgeschlossen, oberhalb von 6,5 % sicher diagnostiziert werden.¹⁰

Über einen längeren Zeitraum erhöhte Blutzuckerkonzentrationen schädigen Blutgefäße und periphere Nerven. Die Folgen sind ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer Nephropathie, Retinopathie und des diabetischen Fußsyndroms.^{3, 11} Außerdem erleiden Diabetes-Patienten häufiger tödliche und nichttödliche kardiovaskuläre Ereignisse.¹² Aufgrund dieser Folgeschäden ist die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigt und die Lebenserwartung deutlich verringert.

Klinische Studien zeigen, dass eine Veränderung des Lebensstils (Gewichtsreduktion/ gesteigerte körperliche Aktivität) eine geeignete Prävention für Menschen darstellt, die ein erhöhtes Risiko für diese Erkrankung haben.^{13, 14} Daher ist bei der Behandlung nach Diagnosestellung des DMT2 die erste Maßnahme eine Verhaltensänderung. In den meisten Fällen ist dies allerdings nicht ausreichend. Wenn trotz Ernährungsumstellung, Gewichtsabnahme und ausreichender körperlicher Aktivität keine Normalisierung der Blutglukose erzielt wird, muss eine medikamentöse Therapie in Betracht gezogen werden.¹⁵

Die nationale Versorgungsleitlinie zur Therapie des DMT2 empfiehlt nach wie vor den Einsatz von Metformin als Antidiabetikum der ersten Wahl.¹⁵ Neben dieser Standardtherapie mit Substanzen wie Metformin und Insulin, die seit Jahrzehnten für die Behandlung des DMT2 als blutglukosesenkende Medikamente eingesetzt werden, gibt es viele Neuentwicklungen von Arzneimitteln wie Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren, *Glucagon-like peptide* (GLP)-1-Analoga und die Inhibitoren des Natrium-Glukose-Cotransporter (*Sodium/glucose cotransporter*, SGLT)-2, welche die Pharmakotherapie des DMT2 erweitern.¹⁶⁻¹⁹

1.2 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, die in ihrem Verlauf zu Verhärtung, Elastizitätsverlust und Verdickung der Gefäßwand und damit auch zur Verringerung des Gefäßlumens von Arterien führt.²⁰ Risikofaktoren der Atherosklerose wie die arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus fördern die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion, die ursächlich für die Entwicklung von Läsionen ist.²¹⁻²³

Die Therapie der Atherosklerose besteht in erster Linie aus der günstigen Beeinflussung der entsprechenden Risikofaktoren, um eine Progression der Krankheit möglichst lange zu verhindern und das Auftreten von Folgeerkrankungen zu reduzieren.²⁴

Die arterielle Gefäßwand unterteilt sich in drei Schichten. Die äußere Fibroblasten-haltige Bindegewebsschicht (Adventitia), welches das Gefäß umgibt, wird durch die *Lamina elastica externa* von der mittleren Schicht, der Media, abgetrennt. Die Media ist eine Schicht aus glatten Muskelzellen und beeinflusst die Weitstellung der Blutgefäße über Kontraktion und Relaxation. Die innerste Schicht, die Intima, ist über die *Lamina elastica interna* mit der Media verbunden und wird auf der luminalen Seite von Endothelzellen ausgekleidet (Abbildung 2).²²

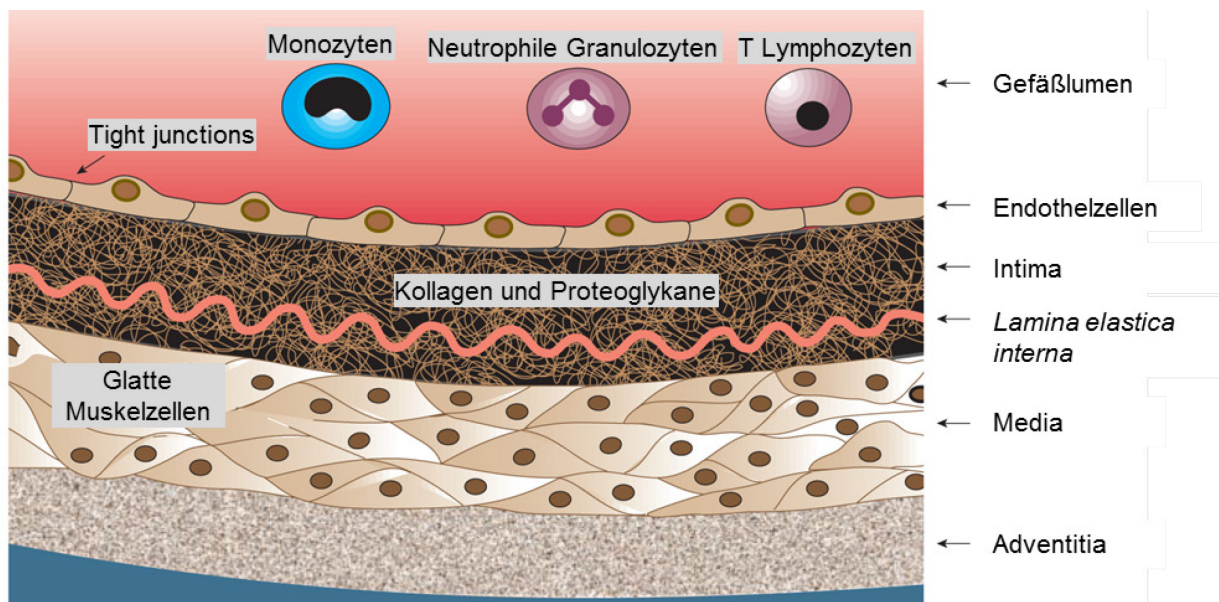


Abbildung 2. Aufbau eines arteriellen Gefäßes (modifiziert nach Lusic, 2000)²⁵

Das Gefäßendothel ist an der Hämostase, Angiogenese und über die Synthese vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid oder Prostacyclin auch an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt.²⁶

Einleitung

Die Dysfunktion der Endothelzellen kann durch Risikofaktoren wie Nikotinabusus, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, verschiedene Infektionskrankheiten und auch erhöhte Mengen von modifiziertem *Low density lipoprotein* (LDL) hervorgerufen werden.^{27, 28} Die Folgen sind eine eingeschränkte Vasokonstriktion und eine erhöhte Permeabilität des Endothels für LDL und andere Bestandteile des Blutes.

Die Infiltration und Retention von LDL in der Intima löst eine entzündliche Reaktion in der Gefäßwand aus.^{29, 30} Die Modifikation des LDL durch Oxidation oder enzymatische Vorgänge führt zu einer Freisetzung von Phospholipiden, die eine Aktivierung von Endothelzellen auslösen, besonders in Gefäßregionen mit hohem hämodynamischen Scherstress wie beispielsweise im Aortenbogen.^{29, 31-33}

Thrombozyten sind die ersten Blutzellen, die mit dem aktivierten Endothel interagieren. Dieser Vorgang spielt eine wichtige Rolle für die nachfolgende Infiltration von Leukozyten.³⁴ Aktivierte Endothelzellen exprimieren eine Reihe von verschiedenen Adhäsionsmolekülen, die das Rollen der Blutzellen über das Gefäßendothel und die nachfolgende Adhäsion vermitteln.³⁵⁻³⁷ Bei diesen Zellen handelt es sich überwiegend um Monozyten und T-Lymphozyten.^{20, 38} Die Einwanderung der adhärenen Immunzellen in die Intima erfolgt Zytokin-vermittelt via Diapedese.³⁹

Für die Migration von Monozyten konnte gezeigt werden, dass das *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) wichtig ist, bei den T-Lymphozyten sind unter anderem Interferon- γ (IFN- γ), *IFN- γ -inducible protein 10* (IP-10) und *IFN-inducible T cell α chemoattractant* (I-TAC) von Bedeutung.^{20, 40, 41} Die eingewanderten Monozyten differenzieren unter Einfluss des *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) zu Makrophagen.⁴² Dieser Schritt ist entscheidend in der Entwicklung der Atherosklerose und ist mit einer Hochregulierung von *Pattern Recognition Receptors* auf der Zelloberfläche verbunden, insbesondere von *Scavenger*-Rezeptoren und *Toll-like* Rezeptoren.⁴²⁻⁴⁴ Die *Scavenger*-Rezeptoren vermitteln die Internalisierung von LDL sowie apoptotischer Zellfragmente oder bakterieller Endotoxine.^{20, 27, 44} Eine Überladung der Makrophagen mit Lipiden führt zur Einlagerung von Lipidtröpfchen und zur Bildung sogenannter Schaumzellen. Aktivierte Makrophagen treiben durch die Produktion inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren die Entzündungsreaktion weiter voran (Abbildung 3).⁴⁵ Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass auch glatte Muskelzellen zu Schaumzellen umgewandelt werden können.^{46, 47}

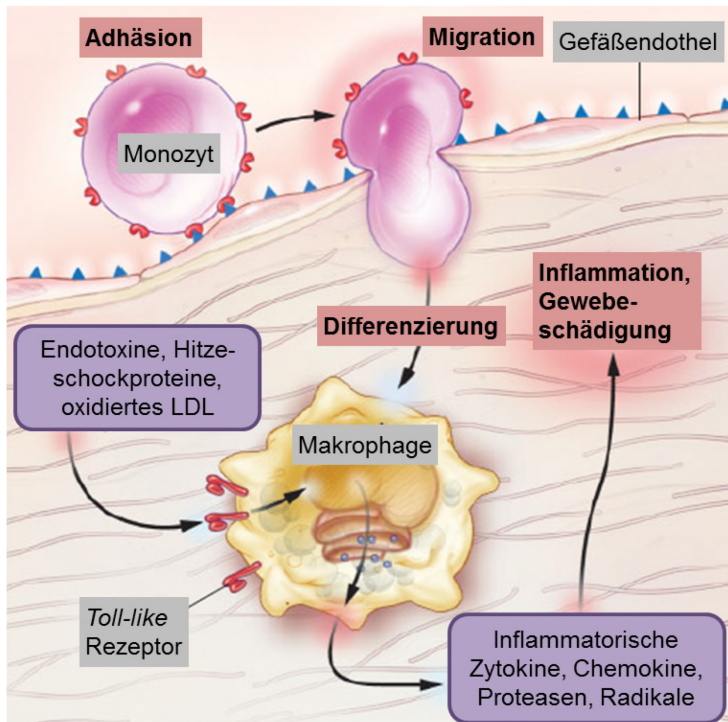


Abbildung 3. Infiltration von Entzündungszellen in der Atherogenese. (modifiziert nach Hansson, 2005)⁴⁵

In den atherosklerotischen Läsionen sind überwiegend T-Lymphozyten vom CD4⁺ Subtyp vorhanden.⁴⁸ Diese Zellen erkennen Antigene, die über *major histocompatibility complex* (MHC)-II von Makrophagen präsentiert werden, und können die Immunreaktion durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ oder CD40-Ligand verstärken.⁴⁹

In der Intima eingelagerte Aggregate aus Schaumzellen und T-Lymphozyten werden als *fatty streaks* bezeichnet.⁵⁰ Sie sind bereits in den ersten Lebensjahren beim Menschen feststellbar.^{51, 52} Die *fatty streaks* verursachen selbst keine klinischen Symptome und können sich wieder zurückbilden.⁵³ Häufig bilden sie jedoch die Grundlage für die Entstehung intermediärer Läsionen⁵⁴.

Die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bedingt die Umwandlung der glatten Muskelzellen (SMC) von einem kontraktilen zu einem sekretorischen Phänotyp und zur Einwanderung der SMC in die Intima.^{55, 56} Diese Umwandlung beeinflusst die Migration sowie Proliferation der SMC und induziert die Synthese von Molekülen der extrazellulären Matrix.⁵⁷⁻

59

Das Gefäßlumen wird durch die wachsende Läsion zunächst nicht vermindert, da bis zu einem gewissen Grad eine kompensatorische Weitstellung des Gefäßes erfolgt.⁶⁰ Es bildet sich in der weiteren Entwicklung der atherosklerotischen Läsion eine fibröse Kappe aus Bindegewebe und glatten Muskelzellen über einem Kern aus Lipiden und nekrotischem Gewebe.⁵⁰ Die Relation der fibrösen Kappe zu dem nekrotischen Kern sowie die

Einleitung

Komposition der extrazellulären Matrix in der atherosklerotischen Läsion lassen Rückschlüsse auf das Risiko einer Plaqueruptur zu, der klinischen Manifestation der Atherosklerose, welche die Hauptursache für das Auftreten von gravierenden kardiovaskulären Ereignissen darstellt (wie z.B. Myokardinfarkt oder Schlaganfall).^{61, 62}

Neben LDL wurde auch die Rolle von HDL in der Atherosklerose in vielen Studien beschrieben.⁶³⁻⁶⁵ In klinischen Untersuchungen wurde beispielsweise gezeigt, dass niedrige Plasmakonzentrationen von HDL-Cholesterin (HDL-C) mit einem höheren Risiko für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen der *Arteria carotis* assoziiert sind.⁶⁶

Cholesterin und Triglyzeride sind nicht wasserlöslich und werden daher im Körper von Lipoproteinen transportiert. Diese können aufgrund ihrer Zusammensetzung und Größe in verschiedene Klassen unterteilt werden: Chylomikronen, Chylomikronen-*Remnants*, *very low density lipoprotein* (VLDL), *intermediate density lipoprotein* (IDL), LDL, Lipoprotein (a) (Lp(a)) und *high density lipoprotein* (HDL).⁶⁷

Humanes HDL stellt eine sehr heterogene Lipoproteinklasse in Bezug auf strukturelle, chemische und biologische Eigenschaften dar und ist charakterisiert durch eine Dichte zwischen 1,063 und 1,21 g/ml und einen Durchmesser von 7-12 nm. HDL besteht aus einem hydrophoben Kern, der zum größten Teil aus Cholesterinestern und einem geringen Teil Triglyzeriden und unverestertem Cholesterin besteht. Diesen umgibt eine Hülle aus Phospholipiden, Cholesterin und Apolipoproteinen.⁶⁸ Die häufigsten Apolipoproteine in HDL sind Apolipoprotein A1 und Apolipoprotein A2.⁶⁹ HDL fungiert als Transportprotein für Lipidstoffwechsellenzyme wie Lecithin-Cholesterin-Acytransferase (LCAT), Cholesterinester-Transferprotein (CETP) oder Phospholipid-Transferprotein.⁷⁰⁻⁷² Im Blut kommt HDL in verschiedenen Modifikationen vor, die sich in Form, Größe und Zusammensetzung unterscheiden und in weitere Subklassen eingeteilt werden können.⁷³ Durch Ultrazentrifugation können HDL-Partikel entsprechend ihrer Größe und Dichte in kleines, dichtes HDL₃ und größeres, weniger dichtes HDL₂ unterteilt werden.⁷⁴

Die Entstehung von HDL-Partikeln stellt einen komplexen Prozess dar. Zunächst findet die Sekretion von Apolipoprotein A1 durch die Leber oder den Dünndarm statt. Durch Interaktion mit *ATP-binding cassette, sub-family A, member 1* (ABCA1) erfolgt die Aufnahme von Phospholipiden und nicht-verestertem Cholesterin. Diese Lipoproteinpartikel stellen die Vorläufer des HDL dar aus denen sich HDL₂ und HDL₃ entwickeln. Die Veresterung des Cholesterins durch das Enzym LCAT führt zu einer Bildung von HDL₃-Partikeln. Durch weitere Aufnahme von Phospholipiden und freiem Cholesterin mittels *ATP-binding cassette, sub-family G, member 1* werden größere, weniger dichte HDL₂-Partikel gebildet.^{75, 76}

Einleitung

HDL spielt eine entscheidende Rolle im Cholesterinstoffwechsel, indem es besonders den reversen Cholesterintransport unterstützt. Dabei wird überschüssiges Cholesterin aus den peripheren Zellen aufgenommen und als HDL-C zur Leber transportiert, um dort abgebaut und ausgeschieden zu werden.⁷⁷⁻⁷⁹

1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen bei Diabetes mellitus Typ 2

Aufgrund der mikro- und makrovaskulären Komplikationen tritt in Patienten mit DMT2 häufig eine beschleunigte Entwicklung atherosklerotischer Läsionen auf, weshalb die Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse erhöht ist.⁸⁰⁻⁸³

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen nach wie vor die häufigste Todesursache in den westlichen Ländern dar und haben trotz erheblicher Fortschritte in der Diagnostik und Behandlung weiter zugenommen.⁸⁴

Die Leitlinien der *Food and Drug Administration (FDA)* und der *European Medicines Agency (EMA)* fordern daher als Voraussetzung für die Zulassung neuer antihyperglykämisch-wirksamer Substanzen den Nachweis, dass diese das kardiovaskuläre Risiko der Patienten nicht erhöhen. Diese kardiovaskulären Sicherheitsstudien sollen besonders Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko einschließen und eine ausreichende Untersuchungsdauer aufweisen.⁸⁵⁻⁸⁷

Aktuell werden in diesen Studien etwa 110.000 Patienten untersucht, die mit den neuen Substanzen wie Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren, SGLT2-Inhibitoren und GLP-1-Analoga behandelt werden. Die ersten Studienergebnisse sind bereits publiziert und zeigen, dass beispielsweise die Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse haben. Eine Nicht-Unterlegenheit gegenüber Placebo ist für diese Substanzen somit belegt.⁸⁸⁻⁹²

Die erste kardiovaskuläre Sicherheitsstudie zu einem SGLT2-Inhibitor, Empagliflozin, zeigte eine über die Nicht-Unterlegenheit hinausgehende signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse. In der *Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes (EMPA-REG Outcome)* Studie wurde der primäre Endpunkt, der sich aus kardiovaskulärem Tod, nicht-tödlichem Herzinfarkt und nicht-tödlichem Schlaganfall zusammensetzte, von 10,5 % der Patienten in der Empagliflozin Gruppe und von 12,1 % der Patienten in der Placebo Gruppe erreicht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Empagliflozin kardiovaskuläre Todesfälle sogar um 38 %, Hospitalisierungen aufgrund von Herzinsuffizienz um 35% und die Gesamtsterblichkeit um 32 % vermindert.⁹² Als zugrunde liegende Mechanismen werden neben der Senkung der Blutglukose unter anderem reduzierter Blutdruck, Gewichtsverlust, Veränderungen der Elastizität der Arterien und kardioresnale Effekte diskutiert.⁹² Ebenso können pleiotrope Effekte der Substanzen bisher nicht ausgeschlossen werden.

Die klinische Studie zur Untersuchung der kardiovaskulären Sicherheit von Dapagliflozin ist derzeit noch nicht abgeschlossen.^{93, 94}

Einleitung

Insgesamt bleibt festzustellen, dass das therapeutische Potential der SGLT2-Inhibitoren außerhalb der Blutglukosesenkung noch nicht ausreichend bekannt ist.⁹⁵

1.4 Natrium-Glukose-Cotransporter

Früher wurde die Niere als Eliminationsorgan mit wichtiger Funktion für die Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes im menschlichen Organismus betrachtet. Eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des DMT2 wurde bisher nicht assoziiert, jedoch ist sie häufig durch Folgeschäden des Diabetes mellitus betroffen. Neuere Forschung hat gezeigt, dass aufgrund von spezifischen renalen Glukosetransportern, den sogenannten SGLT, die Niere maßgeblich an der Regulation der Blutzuckerspiegels beteiligt ist.⁹⁶ Die SGLT gehören zur Familie der *solute-carrier-family* (SLC)-Transporter.^{97, 98} Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind SGLT1 und SGLT2.

In den Nephronen wird fast die gesamte Glukose des Primärharns reabsorbiert. Dies entspricht unter physiologischen Bedingungen durchschnittlich 180 g Glukose täglich. Glukose ist daher im Urin gesunder Menschen nahezu nicht nachweisbar.⁹⁹ Die Reabsorption von 90 % der filtrierten Glukose wird über SGLT2 vermittelt, welcher auf den Epithelzellen im S1 Segment des proximalen Tubulus exprimiert wird. Die restlichen 10 % der Glukose werden über SGLT1 im distalen S2/S3 Segment des proximalen Tubulus reabsorbiert (Abbildung 4).

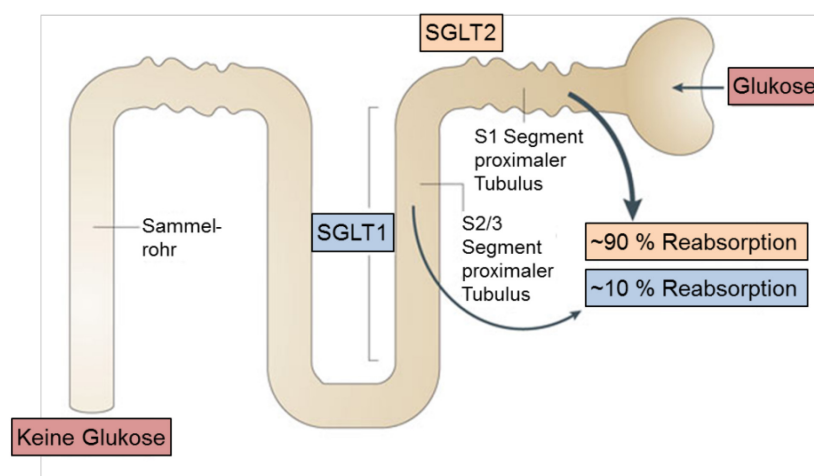


Abbildung 4. Tubuläre Glukose-Reabsorption
(modifiziert nach Chao & Henry, 2010)¹⁰⁰

Die Reabsorption der Glukose aus dem glomerulären Filtrat über die Apikalmembran in das Innere der tubulären Epithelzellen bedarf eines aktiven Transportes gegen einen Konzentrationsgradienten, der durch den Cotransport von Natrium-Ionen ermöglicht wird. Ein zelleinwärts gerichteter Konzentrationsgradient von Natrium entsteht durch die Na^+/K^+ -ATPase, die auf der basolateralen Seite Natrium aus der Zelle schleust. Aus dem

Einleitung

Inneren der Epithelzelle wird Glukose über passive Diffusion in den Blutkreislauf geführt (Abbildung 5).

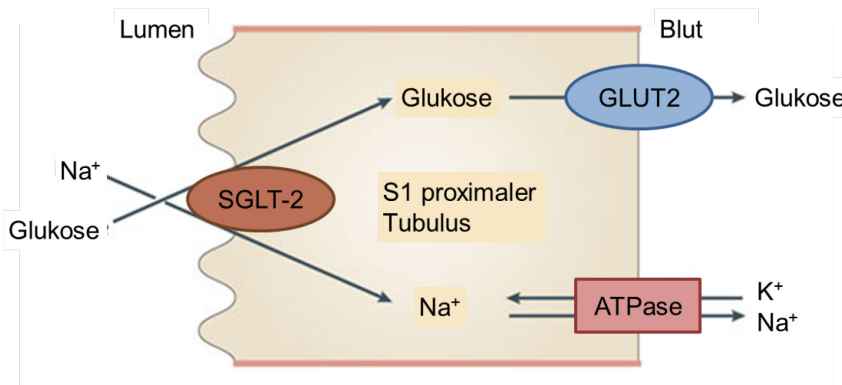


Abbildung 5. Glukosetransport in der Epithelzelle des proximalen Tubulus.
(modifiziert nach Chao & Henry, 2010)¹⁰⁰

Der SGLT1 hat eine hohe Affinität zu Glukose und transportiert je Molekül Glukose zwei Natrium-Ionen. Neben seiner Expression in der Niere ist er überwiegend im Dünndarm lokalisiert. Der niedrigaffine SGLT2, der jedoch eine hohe Kapazität für den Glukosetransport aufweist, besitzt ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 für Glukose und Natriumionen.

Das Ergebnis dieses Prozesses ist die Rückführung von Glukose aus dem proximalen Tubulus in den Blutkreislauf.¹⁰¹

1.5 Natrium-Glukose-Cotransporter-2-Inhibitoren

SGLT2-Inhibitoren sind eine neue Gruppe von oral verfügbaren blutzuckersenkenden Medikamenten, welche zur Behandlung des DMT2 eingesetzt werden. Durch die Hemmung des SGLT2 in der Niere lässt sich die Ausscheidung der Glukose über den Urin steigern was zu einer Reduktion der Glukose im Blut führt. Dieser Mechanismus der Blutzuckersenkung ist unabhängig von der Insulinwirkung und stellt somit ein völlig neuartiges Therapiekonzept dar.¹⁰² Der Vorläufer der heute in der Klinik verwendeten Substanzen ist der Pflanzenstoff Phlorizin aus der Rinde von Apfelbäumen, dessen blutzuckersenkende Wirkung vor über 20 Jahren entdeckt wurde.¹⁰³ Später konnte gezeigt werden, dass Phlorizin eine höhere Affinität als Glukose für den SGLT2 im proximalen Tubulus aufweist und durch dessen Inhibition die renale Glukosereabsorption hemmt. Phlorizin selbst kommt als therapeutische Substanz nicht in Frage, da es bei oraler Gabe eine schlechte Bioverfügbarkeit aufweist und durch eine fehlende Selektivität zwischen SGLT1 und SGLT2 zu gastrointestinalen Störungen führt.¹⁰⁴ Im Jahr 2012 wurde mit Dapagliflozin (Forxiga®) der erste spezifische SGLT2-Inhibitor in der Europäischen Union zugelassen. Darauf folgten 2013 Canagliflozin (Invokana®) und 2014 Empagliflozin (Jardiance®). Die Substanzen unterscheiden sich vor allem in ihrer Selektivität zwischen SGLT1 und SGLT2. Empagliflozin hat die höchste Spezifität für SGLT2 gegenüber SGLT1 (>2500:1), darauf folgt Dapagliflozin (>1200:1), während Canagliflozin (>250:1) durch eine zusätzliche Beeinflussung von SGLT1 auch zu einer verminderten Glukoseaufnahme im Dünndarm führt und so die postprandialen Glukosespiegel erniedrigt. Bisher konnte keine klinische Über- oder Unterlegenheit für die SGLT2-Selektivität gezeigt werden.^{105, 106} In klinischen Studien führte der Einsatz von SGLT2-Inhibitoren in der Monotherapie, initialer Kombinationstherapie oder als Zusatz zur bisherigen Therapie zu einer effektiven Senkung des HbA_{1c}-Wertes.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Die Glukoseausscheidung über den Urin ist verbunden mit einem Verlust an Kalorien, welcher ursächlich für die moderate Gewichtsabnahme von 2-3 kg während einer 3-monatigen Therapie mit SGLT2-Inhibitoren sein könnte.¹¹¹⁻¹¹³ Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion von Fettgewebe auftritt.¹¹⁴ Aufgrund ihrer milden diuretischen Eigenschaften kommt es unter der Therapie mit SGLT2-Inhibitoren zu einer Reduktion des systolischen Blutdruckes um etwa 3-4 mmHg und des diastolischen Blutdrucks um 1-2 mmHg.^{109, 115} Weitere Effekte der SGLT2-Inhibition sind eine geringe Reduktion der Plasmaharnsäurekonzentration und eine verminderte Ausscheidung von Albumin.^{116, 117} Insgesamt ist die Therapie mit SGLT2-Inhibitoren gut verträglich. Im Hinblick auf unerwünschte Arzneimittelwirkungen treten am häufigsten genitale Infektionen auf, die direkt durch den Wirkmechanismus erklärt werden können. Durch Hemmung des SGLT2 wird die Glukosekonzentration im Urin gesteigert. Die Glukose dient als Substrat für Mikroorganismen

Einleitung

und kann deren Wachstum begünstigen.¹¹⁸ Der Zusammenhang zwischen erhöhten Glukosekonzentrationen im Urin und Genitalinfektionen ist bei Patienten mit Diabetes mellitus bekannt.¹¹⁹

Des Weiteren wird über eine Zunahme des Urinvolumens und der Häufigkeit der Blasenentleerung berichtet. Einige Studien zeigen eine geringe Zunahme von Harnwegsinfektionen.^{120, 121}

Dapagliflozin wird zur Behandlung des DMT2 bei volljährigen Patienten in Monotherapie oder in Kombination mit anderen antidiabetischen Arzneimitteln eingesetzt, wenn diese nicht zu einer ausreichenden Blutzuckersenkung führen (Strukturformel in Abbildung 6).

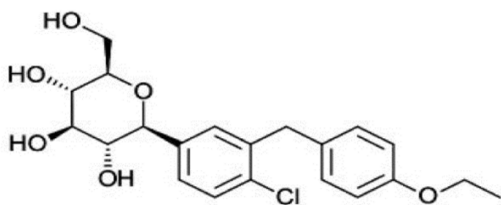


Abbildung 6. Strukturformel von Dapagliflozin
(nach Rizvi, 2015)¹²²

Die empfohlene Tagesdosis sind 10 mg als einmalige Gabe. Vor und während der Gabe von Dapagliflozin muss die Nierenfunktion geprüft werden, da Dapagliflozin bei einer glomerulären Filtrationsrate unter 60 ml/min nicht eingesetzt werden soll.¹²³

Die Bioverfügbarkeit von Dapagliflozin nach oraler Gabe ist gut und wird durch Aufnahme von Nahrung nicht beeinflusst.^{124, 125} Dapagliflozin zeigt weder pharmakokinetische Interaktionen bei gemeinsamer Gabe mit anderen antidiabetisch-wirksamen Substanzen wie Metformin, Glimepirid, Pioglitazon oder Sitagliptin, noch bei Begleitmedikation wie Simvastatin, Valsartan, Warfarin oder Digoxin.^{126, 127}

In verschiedenen klinischen Studien konnte die Wirksamkeit von Dapagliflozin sowohl als Monotherapie wie auch in Kombination mit anderen antidiabetischen Wirkstoffen gezeigt werden.

Des Weiteren belegen Daten aus klinischen Studien, dass die Effekte von Dapagliflozin auf Glukoseparameter und Körpergewicht für mehr als zwei Jahre anhielten.¹²⁸⁻¹³⁰

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die Effekte von Dapagliflozin auf die Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose untersucht, sowie mögliche zugrundeliegende Mechanismen identifiziert werden.

Zu diesem Zweck wurde ein Mausmodell der diätinduzierten Insulinresistenz und akzelerierten Atherosklerose verwendet, welches die Erforschung verschiedener Risikofaktoren ermöglicht. Die Ergebnisse der Grundlagenforschung in Mäusen dienen als Basis für das Verständnis der pharmakodynamischen Effekte der Substanz im Menschen.

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Die gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 erforderliche Genehmigung der tierexperimentellen Untersuchungen erfolgte durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2012.G405.

2.1.1 Tiermodell

Die tierexperimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden an männlichen Mäusen durchgeführt, die einen genetischen Knockout des *Low density lipoprotein receptor* (Ldlr) aufweisen. Dieser Defekt im *Ldlr*-Gen führt zu einem pathologisch veränderten Cholesteringehalt im Blut, so dass es zur Bildung atherosklerotischer Läsionen kommt.¹³¹ Die Tiere wurden von der Firma *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. Die Zucht und Haltung erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Es wurde gewährleistet, dass die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser und Futter hatten und in einem 12 h Tag- und Nachtrhythmus unter standardisierten Bedingungen gehalten wurden.

Ab einem Lebensalter von 8 Wochen wurde bei den Versuchstieren mit der Fütterung einer diabetogenen Diät (DD, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) begonnen. Die Analyse der Tiere erfolgte zu einem frühen Untersuchungszeitpunkt nach 8 Wochen Behandlung mit einem Endalter von 16 Wochen und zu einem späten Untersuchungszeitpunkt nach 25 Wochen Behandlung mit einem Endalter von 33 Wochen (Abbildung 7).

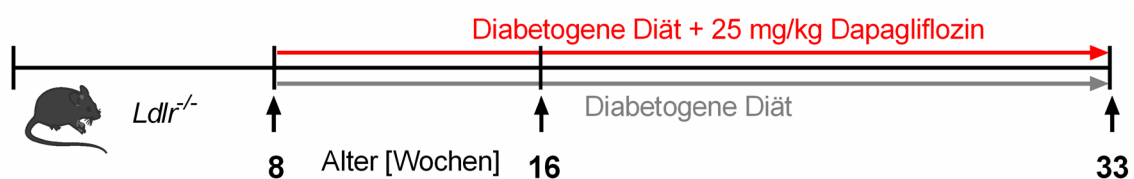


Abbildung 7. Experimentelles Schema der Tierstudie

Die Zusammensetzung der DD ist in Tabelle 1 beschrieben und wurde gemäß Angaben aus der Literatur gewählt.¹³² Die Substanz Dapagliflozin (Forxiga[®], AstraZeneca, Södertälje, Schweden) wurde mit einer Endkonzentration von 25 mg Dapagliflozin/kg DD durch die Firma ssniff in die DD verpresst. Bei einer Nahrungsaufnahme von durchschnittlich 5 g pro Tag pro Maus entspricht dies einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht bei einer 25 g

schweren Maus. Für die Kontrolle der Effekte, die durch die Fütterung der DD vermittelt werden, wurden parallel *Ldlr^{-/-}* Mäuse mit normalem Haltungsfutter gefüttert.

Tabelle 1. Zusammensetzung der diabetogenen Diät.

Inhaltsstoff	Menge (%)
Casein	22,8
Maltodextrin	12
Saccharose	24,02
Schweineschmalz	35,85
Mineralien-Mix	4
Vitamin-Mix	1
Cholinchlorid	0,13
DL-Methionin	0,20
	KCAL (%)
Kohlenhydrate	26
Protein	15
Fett	59

Während der Behandlung wurde bei den Tieren eine wöchentliche Dokumentation des Körpergewichtes vorgenommen. Es wurden zu den genannten Untersuchungszeitpunkten Berechnungen des Body-Mass-Indexes (BMI) sowie nukleare Magnetresonananzanalysen (NMR) durchgeführt. Die Einschätzung der Glukosetoleranz erfolgte durch Bestimmung der Nüchternblutglukose und oraler Glukosetoleranztests nach einer Behandlungsdauer von 8 Wochen. Zu Beginn und Ende der Behandlung mit Dapagliflozin wurde geprüft, ob bei den Tieren Glukose im Urin detektierbar war. Dazu wurde Urin der Tiere mit Glukoseteststreifen analysiert (Biophan G, Kallies Feinchemie AG, Sebnitz, Deutschland). Es wurden nur Tiere in die Analyse eingeschlossen, bei denen ein positiver Glukosenachweis im Urin erfolgte. Dies war bei allen Dapagliflozin-behandelten Tieren der Fall.

2.1.2 Orale Glukosetoleranztest

Bei den Tieren wurde im Alter von 16 Wochen (früher Zeitpunkt) während der Gabe von Dapagliflozin die Glukosetoleranz nach oraler Glukoseapplikation untersucht. Hierzu wurde den Tieren zunächst für eine Dauer von 6 h das Futter entzogen. Vor Applikation der Glukoselösung wurde der Wert der Nüchternblutglukose bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem Tropfen Blut, der durch leichtes Anritzen der Schwanzspitze gewonnen wurde. Als Messgerät wurde das Accu-Chek Compact Plus Gerät (Roche Diabetes Care Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Messung erfolgte als Einfachbestimmung. Die Tiere erhielten anschließend einen oralen Bolus 40 %-iger Glukoselösung in einer Dosis

von 1 g/kg Körpergewicht. Die Blutglukosewerte wurden jeweils 5, 15, 30, 60 und 120 min nach der Applikation gemessen.

Die Auswertung erfolgte anhand der absolut gemessenen Werte und der errechneten Fläche unter der Kurve.

2.1.3 Kernspinresonanzspektroskopie

Die Körperfett- und Magermasse wurden mit Hilfe nuklearer Magnetresonanz im *minispec nuclear magnetic resonance (NMR) analyzer* (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) zu den beiden Untersuchungszeitpunkten bestimmt. Die Berechnung des Körperfettanteils erfolgte durch Division der Fettmasse durch die Summe aus Fett- und Magermasse.

2.1.4 Probengewinnung

Die Behandlung wurde entweder zu einem frühen Zeitpunkt nach 8 Wochen mit einem Endalter von 16 Wochen oder zu einem späten Zeitpunkt nach 25 Wochen mit einem Endalter von 33 Wochen beendet. Für morphologische Untersuchungen wurden die Tiere am Ende des jeweiligen Behandlungszeitraumes durch eine Überdosis von Ketamin (100 mg/kg), Xylazin (5 mg/kg) und nachfolgender Perfusion mit PBS und 4 % Formaldehyd getötet. Die molekularbiologische Analyse erfolgte nach Tötung mit Kohlenstoffdioxid-Begasung. Die Organe und Blutproben wurden unmittelbar nach Eintritt des Todes entnommen und anschließend aufgearbeitet.

2.1.4.1 Plasmaaufbereitung

Die Tiere wurden äußerlich mit Isopropanol 70 % desinfiziert und anschließend wurde der Thorax mit RNase-freiem Besteck geöffnet. Das Blut wurde mittels Herzpunktion aus der rechten Kammer gewonnen. Verwendet wurden 1 ml Spritzen und 24 G Kanülen, die vorher mit 100 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in 0,9 % NaCl gespült wurden und 10 µl davon enthielten.

Die Herstellung des EDTA-Plasmas erfolgte durch Zentrifugation zunächst für 15 min bei 800 x g, 4° C und erneuter Zentrifugation des Überstandes für 5 min bei 15.700 x g bei 4 °C. Das Plasma wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Für die Bestimmung des endogenen Thrombinpotentials (ETP) wurde ebenfalls Blut aus der rechten Herzkammer entnommen. Die Spritzen und Kanülen wurden vor der Blutentnahme mit 3,8 %-iger Natriumcitratlösung gespült. Nach der Entnahme erfolgte die Zugabe von Natriumcitrat bis zu einer Endkonzentration von 0,38 %. Die Aufbereitung wurde durch das

zweimalige Zentrifugieren bei 21.000 x g für 10 min bei Raumtemperatur abgeschlossen. Die Lagerung bis zur Messung des ETP erfolgte bei -20 °C.

2.1.4.2 Organentnahme für histologische Analysen

Das Herz wurde vom umliegenden Gewebe befreit und am vorderen Aortenbogen abgetrennt.

Die Aorta wurde freipräpariert und ebenfalls vom Gewebe befreit. Nach Isolierung aus der Maus wurde sie in eiskaltes PBS überführt. Letzte Reste der Adventitia wurden hier von der Aorta gezupft.

Herz und Aorta wurden für 24 h in Roti[®]-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gelagert und anschließend für die Durchführung von histochemischen Färbungen weiter aufgearbeitet.

2.1.4.3 Organentnahme für molekularbiologische Analysen

Die Entnahme von Leber und Aorta zur Gewinnung von RNA wurde mit sterilem und RNase-freiem Präparierbesteck durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurde eine separate Tiergruppe verwendet, um die Präparationsdauer stets unter 7 min zu halten und damit einer Degradation der RNA vorzubeugen. Nachdem die Tiere wie unter Absatz 2.1.4 beschrieben mit CO₂ getötet und desinfiziert wurden, erfolgte die Öffnung der Bauchhöhle. Die Leber wurde vorsichtig freigelegt und dann die Spitze vom kaudalen Ende des *Lobus sinister lateralis* abgeschnitten, in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und direkt in Stickstoff überführt. Anschließend wurde zügig die Aorta präpariert und entnommen. Nach Überführung in *RNAlater* (RNAlater[®] Stabilization Solution, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde die Aorta sorgfältig von Geweberesten befreit. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -80 °C.

2.1.5 Blutdruckmessung

Die Messung von Blutdruck und Herzfrequenz wurde mit einer nicht invasiven, photoplethysmographischen Methode gemessen, bei der eine Druckmanschette um den Schwanz der Tiere gelegt wird und anschließend der Blutfluss als Änderung der Lichtdurchlässigkeit mittels eines Photosensors bestimmt wird (BP-2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, USA). Die gemessenen Daten wurden über die Software des Herstellers „BP-2000 Analysis Software“ (Visitech Systems, Apex, USA) aufgezeichnet und analysiert.¹³³

Die Messungen wurden an 10 aufeinander folgenden Tagen jeweils zur selben Tageszeit durchgeführt. An jedem Messtag wurden dreimal 10 Einzelmessungen durchgeführt. Statistisch ausgewertet wurden nur die Mittelwerte der letzten drei Messtage, da die Tiere sich zunächst an das Verfahren gewöhnen mussten und nur auf diese Weise zuverlässige Messdaten generiert werden konnten. Dargestellt wurden systolischer und diastolischer Blutdruck sowie die Herzfrequenz.

2.1.6 Messung des Hämatogramms im Vollblut

Eine kleine Menge des EDTA-antikoagulierten Vollblutes (30 μ l) wurde mit Hilfe eines Hämatologiegerätes (scil Vet abc, scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland) analysiert und die Thrombozytenzahl, das mittlere Thrombozytenvolumen und der Hämatokrit ausgewertet.

2.1.7 Blutungszeit

Für die Bestimmung der Blutungszeit wurden die Tiere zunächst durch intraperitoneale Gabe von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) narkotisiert und zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf eine 37 °C warme Heizplatte gelegt.

Vor Beginn der Messung wurde der Schwanz der Tiere für 5 min in ein Gefäß mit 37 °C warmem Wasser gehalten, um die Blutgefäße zu dilatieren. Anschließend wurde mit Hilfe eines Skalpell das distale Ende der Schwanzspitze mit einem geraden Schnitt abgetrennt und der Schwanz umgehend in ein *Falcon* gehalten, welches 37 °C warmes PBS enthielt. Es wurde jeweils per Schablone immer der gleiche Durchmesser des Schwanzes ausgewählt, maximal wurden allerdings 2 mm der Schwanzspitze entfernt. Gemessen wurde die Zeit vom Abtrennen der Schwanzspitze bis zum vollständigen Sistieren der Blutung.

2.2 Histologie

2.2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 2. Puffer und Lösungen in der Histologie

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 8,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ pH 7,4	
1 % Eosin-Lösung	1 % Eosin Y Dinatrium-Salz 0,05 % Essigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Blockierlösung	20 mM Tris 137 mM NaCl 10 % fetales bovines Serum (FBS) 1 % bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
3 % H_2O_2	3 % H_2O_2 in PBS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ÖRO-Lösung	35 ml 0,5 % ÖRO (in Methanol) 10 ml 1M NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hämalaun-Lösung nach Mayer	4,4 g/l Hämatoxylin krist. 28 g/l $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$ 1 g/l $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$	Gebrauchsfertig von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-Puffer (TB)	50 mM Tris pH 7,6	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1 % HCl	1 % HCl in Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ABC Puffer	5 mM Tris 1 mM $\text{NaCH}_3\text{CO}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 5 mM NaCl pH 8 BSA 1mg/ml	

2.2.2 Paraffinschnitte des Aortenursprungs

Nach der Organentnahme und 24-stündiger Lagerung in Roti®-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Herzen in PBS überführt. Die Entwässerung der Gewebeproben wurde maschinell in einem Gewebeentwässerungsautomaten (Tissue-Tek VIP, Sakura Finetek, Europe BV, AV Alphen aan den Rijn, Niederlande) mittels aufsteigender Alkoholreihe und Roticlear® (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und finaler Überführung in flüssiges Paraffin

vorgenommen. Anschließend erfolgte die Einbettung der Proben an einer Paraffin-Ausgießstation Leica EG1150 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Die Anfertigung von 5 µm dünnen Gewebeschnitten über die gesamte Länge des Ursprungs, definiert durch die Aortenklappen, erfolgte mit Hilfe des Leica RM2255 Rotationsmikrotoms (Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland). Die Paraffinschnitte wurden in ein Streckbad (Medax GmbH & Co.KG, Kiel, Deutschland) überführt und auf Objektträger (Adhäsions-Objektträger SuperFrost® plus, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen. Um ein Ablösen während der Färbungen zu vermeiden wurden die Schnitte im Anschluss für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet und danach für 1 h bei 60 °C auf dem Objektträger hitzefixiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Paraffinschnitte in einem geeigneten Objektträgerkasten (A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland) gelagert.

2.2.3 Histochemische Färbungen

Als Vorbereitung auf die histochemischen Färbungen wurde eine Entparaffinierung der Gewebeschnitte durchgeführt. Das auf Objektträgern aufgezogene Gewebe wurde durch dreimalige Behandlung mit Roticlear® (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für jeweils 15 min sowie aufeinanderfolgend für jeweils 2 min mit Ethanol absolut, 96 % (V/V) Ethanol und 70 % (V/V) Ethanol von Paraffinresten befreit. Anschließend erfolgte eine dreimalige Waschung der Schnitte für jeweils 5 min mit PBS.

Das weitere Vorgehen wird entsprechend der jeweiligen Färbung in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung wurde mit Paraffinschnitten durchgeführt, um anschließend die Größe der atherosklerotischen Läsionen im Aortenursprung bestimmen zu können.

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden für 1 min in einer Hämalaun-Lösung nach Mayer (siehe Tabelle 2) inkubiert und anschließend kurz in 1 % HCl getaucht. Das enthaltene Hämalaun lagert sich an den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA des Zellkernes an und färbt diese zunächst braun. Für den Farbumschlag nach blau ist eine Anhebung des pH-Wertes notwendig, der durch 10-minütiges Spülen der Schnitte mit Leitungswasser erreicht wird.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 1 min mit einer 1 % igen (m/V) Eosin-Lösung inkubiert, wodurch basische Strukturen, vor allem Zellplasmaproteine, rötlich gefärbt werden.

Nach erfolgreich durchgeführter Färbung erfolgte die Entwässerung des Gewebes durch Behandlung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % (V/V) Ethanol, 96 % (V/V) Ethanol, Ethanol absolut für jeweils 2 min) sowie Roticlear® (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 5 min. Die Schnitte wurden anschließend mit Roti®-Mount (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt und bis zum Mikroskopieren lichtgeschützt aufbewahrt.

2.2.3.2 Antikörper und Bindeproteine in der Histochemie

Tabelle 3. Antikörper und Bindeproteine in der (Immun-)Histochemie.

Antikörper/Bindeprotein	Konzentration	Katalognummer	Hersteller
anti-Maus Mac-2 (Ratte)	1:1000	CL8942AP	Cedarlane, Burlington, Canada
anti-Maus α -Glattmuskelaktin (Kaninchen)	1:300	Ab5694	<i>Abcam, Cambridge, United Kingdom</i>
anti-Maus Biglykan (Kaninchen)	1:500	LF 159	Larry Fisher, National Institute of Dental and Cranofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	1:400 (α -Glattmuskelaktin) 1:1000 (Biglykan)	Sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Ziege-anti-Ratte IgG2A, HRP-konjugiert	1:1500 (Mac-2)	NB7126	Novus biological, Littleton, CO, USA
Biotinyliertes Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP)	1:100	385911	Calbiochem, Merck KGaH, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin, HRP-konjugiert	1:200	S 5512	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2.3.3 α -Glattmuskelaktin und Mac-2

Die Detektion von glatten Muskelzellen erfolgte durch eine immunhistochemische Anfärbung des α -Glattmuskelaktins während die Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen durch eine Färbung von Mac-2 identifiziert wurden.

Hierfür wurden die vorbereiteten Schnitte bei Raumtemperatur für 1 h mit einer Blockierlösung (siehe Tabelle 2) behandelt. Anschließend wurde der Primärantikörper (siehe

Tabelle 3) verdünnt in 1 % BSA in PBS aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Schnitte dreimalig für 5 min in 1 x PBS gewaschen. Um endogene Peroxidasen zu inaktivieren, wurden die Schnitte für 5 min mit einer 3 %-igen H₂O₂-Lösung (siehe Tabelle 2) behandelt. Im Anschluss daran wurde erneut dreimalig ein Waschschriff mit PBS für 5 min durchgeführt bevor der entsprechende HRP-konjugierte Zweitantikörper (siehe Tabelle 3) verdünnt in PBS für 1 h bei Raumtemperatur auf die Schnitte aufgetragen wurde. Die Detektion erfolgte mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, DAB Substrate Kit, Zytomed, Berlin, Deutschland), indem die Schnitte zunächst für 10 min in Tris-Puffer inkubiert wurden, dann für 5 min in der DAB-Lösung und anschließend erneut für 2 min in Tris-Puffer, bevor im nächsten Schritt die Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer durchgeführt wurde. Die Schnitte wurden permanent (siehe Abschnitt 2.2.3.1) eingedeckt und bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt aufbewahrt.

2.2.3.4 Hyaluronsäure-Färbung

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden für die Detektion des Glykosaminoglykans Hyaluronsäure zunächst mit einem Avidin-Biotin-Blockiersystem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemäß den Angaben des Herstellers vorbehandelt, um endogene Biotin-Strukturen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte mit Blockierlösung (siehe Tabelle 2) für 1 h bei Raumtemperatur.

Im nächsten Schritt der Färbung wurde das Hyaluronsäurebindepotein (HABP) (siehe Tabelle 3) in der angegebenen Verdünnung in 1 % BSA in PBS auf das Gewebe aufgetragen und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die HABP-Lösung durch dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 min entfernt und im Anschluss daran eine Behandlung mit 3 % H₂O₂ (siehe Tabelle 2) für 5 min zur Inaktivierung endogener Peroxidasen durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte erneut für jeweils 5 min mit PBS gewaschen.

Für die Detektion des biotinylierten HABP wurde eine Streptavidin-konjugierte HRP verwendet. Die Schnitte wurden in entsprechender Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur in feuchter Kammer inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Reaktion von DAB (DAB Substrate Kit, Zytomed Systems GmbH, Berlin) mit HRP. Zuletzt wurden die Kerne mit der Hämalaun-Lösung nach Mayer (siehe Tabelle 2) gefärbt und die Schnitte wasserfrei (siehe Abschnitt 2.2.3.1) mit Roti®-Mount als Einschlussmedium (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.2.3.5 Biglykan-Färbung

Die Detektion des leucin-reichen Proteoglykans Biglykan erforderte zunächst eine Vorbehandlung mit 0,02 Enzymeinheiten (Units) Chondroitinase (*Chondroitinase ABC from Proteus vulgaris*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in ABC-Puffer (siehe Tabelle 2) für eine Stunde bei 37 °C. Durch den enzymatischen Verdau wurden die Chondroitin- und Dermatansulfat-Seitenketten abgespalten und die Epitope der Core-Proteine freigelegt. Danach wurden die Schnitte wie bereits bei den vorherigen Färbungen beschrieben mit PBS gewaschen und 1 h in der Blockierlösung inkubiert.

Der Erstantikörper gegen das Biglykan-Core-Protein (siehe Tabelle 3) wird in der entsprechenden Verdünnung in 1 % BSA in PBS auf die Schnitte pipettiert und über Nacht in der feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Darauf folgten ein erneutes Waschen mit PBS und die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper (siehe Tabelle 3) in der entsprechenden Konzentration in PBS.

Nach der Detektion mit DAB und Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer (siehe Tabelle 2) wurden die Schnitte wasserfrei eingedeckt und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.2.3.6 Auswertung der Färbungen

Für die Auswertung der histochemischen und immunhistochemischen Färbungen des Aortenursprunges wurden repräsentative Bilder in 100-facher Vergrößerung an einem Axio Imager.M2 Mikroskop mit AxioCam HRC (426510-9901-000) und Axio Vs 40 V 4.8.2.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) aufgenommen.

Für die Auswertung der mit DAB angefärbten Fläche in den Plaques wurde die Software ImageJ 1.37v (NIH, MD, USA) mit dem Zusatzmodul *Colour Deconvolution* verwendet. Dieses Zusatzmodul trennt die einzelnen Farbkanäle auf, sodass die spezifische DAB-Färbung von der Kernfärbung abgegrenzt werden kann. Durch manuelle Festlegung eines Schwellenwertes kann eine eventuelle Hintergrundfärbung ausgeschlossen werden. Der Schwellenwert wird für alle histologischen Aufnahmen derselben Färbung gleich definiert. Die Auswertung erfolgte als positiv-gefärbte Fläche in μm^2 .

2.2.4 Öl-Rot-O-Färbung

Die Öl-Rot-O-(ÖRO)-Färbung wurde verwendet um Lipideinlagerungen in der Aorta zu detektieren. Die perfundierten Aorten wurden vom Aortenursprung bis zur *Bifurcatio aortae* entnommen und in Roti®-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 24 h bei 4 °C fixiert. Zur Detektion der in den atherosklerotischen Läsionen eingelagerten Lipide wurden die Aorten mit ÖRO gefärbt. Nach der Fixierung mit Formaldehyd wurden die

Material und Methoden

Aorten in PBS überführt und von dem periaortalen Fettgewebe befreit. Die Färbung erfolgte durch vorheriges Waschen für 5 min in 78 % Methanol und anschließender Inkubation für 90 min in der ÖRO-Färbelösung (siehe Tabelle 2). Danach wurden die Aorten erneut für 5 min in 78 % Methanol gewaschen, um Rückstände der Färbelösung zu entfernen. Die gefärbten Aorten wurden in PBS überführt. Zur Auswertung der ÖRO-Färbung wurden die Aorten der Länge nach aufgeschnitten und in *en face* Darstellung aufgenommen. Hierfür wurde eine Kamera der Firma Canon (Canon Power Shot G10, Canon Inc., Tokio, Japan) und ein Stereomikroskop der Firma Zeiss (Stemi 2000C, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. Die Quantifizierung der angefärbten Fläche erfolgte mit der *Software ImageJ 1.37v* (NIH, MD, USA). Es wurden die anteilige Plaquerfläche bezogen auf die gesamte Aorta sowie die Fläche in den einzelnen Abschnitten der Aorta berechnet. Der Aortenbogen wurde über dessen gesamten Verlauf einzeln ausgewertet. Die thorakale Aorta wurde definiert bis zum Zwerchfell inklusive des Aortenbogens. Der restliche Anteil bis zu den Abgängen der Beinarterien wurde als abdominaler Teil gewertet.

2.3 Durchflusszytometrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen der Aorta sowie die Zellen aus dem Blut mit durchflusszytometrischen Verfahren analysiert.

2.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 4. In der Durchflusszytometrie verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
RPMI, 10 %	RPMI Medium 1640 (1X) + GlutaMAX™-I 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	alles von Gibco® Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
Erythrozyten-Lyse- Puffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA	
PEB-Puffer	2 mM EDTA 0,5 % BSA in PBS	
1 % Formaldehyd- Lösung	10 % Roti®-Histofix 10 % in PEB-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase II-Lösung	600 U/ml Kollagenase II 60 U/ml DNase I in <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HBSS	1,26 mM CaCl ₂ 0,49 mM MgCl ₂ 0,41 mM MgSO ₄ 5,3 mM KCl 0,44 mM KH ₂ PO ₄ 4,17 mM NaHCO ₃ 137,39 mM NaCl 0,34 mM Na ₂ HPO ₄ 5,55 mM Glukose	
Tyrode ohne Ca ⁺⁺	2,73 M NaCl 53,6 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 238 mM NaHCO ₃ 0,5 M HEPES 0,1 M MgCl ₂ 0,5 mM Glukose	

2.3.2 Analyse der zirkulierenden Immunzellen im Blut

Das für die Analyse der Immunzellen verwendete Blut wurde durch kardiale Punktion und Antikoagulation mit EDTA gewonnen. Die Aufbereitung für die Untersuchung der Lymphozyten und Monozyten/neutrophilen Granulozyten erfolgte in unterschiedlicher Art und Weise und wird im Folgenden genauer beschrieben.

2.3.2.1 Lymphozyten im Blut

Für die Untersuchung der Lymphozyten wurde das Blut mit hypotonem Erythrozyten-Lyse-Puffer für 7 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 300 x g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Erythrozyten vollständig entfernt wurden. Das Zellpellet wurde in 50 µl PEB resuspendiert und zunächst mit 2 µl eines CD16/32-Antikörpers (Klon 93, Biolegend, San Diego, CA, USA) für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Menge auf Reaktionsgefäße aufgeteilt, bevor es mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Tabelle 5) in einer Verdünnung von 1:25 für 15 min bei 4 °C inkubiert wurde. Parallel wurde auch eine Probe mit den zugehörigen Isotyp-Kontrollen gefärbt. Die Bestimmung der absoluten Zellzahlen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit Flow-Count™ Fluorospheres (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Nach Beendigung der Inkubation wurden 200 µl Isoton zu den Proben gegeben, um die Färbe-Reaktion zu stoppen.

Die Messung der Proben erfolgte an einem Gallios™ Durchflusszytometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) mit einem geeigneten Messprotokoll. Die Auswertung erfolgte mit der Kaluza® Flow Analysis Software 1.5a (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Zunächst wurden die Einzelzellen definiert und Dubletten aus der Analyse ausgeschlossen. Anschließend erfolgte die weitere Einteilung der Gates nach den Isotypkontrollen gemäß dem Schema in Abbildung 8.

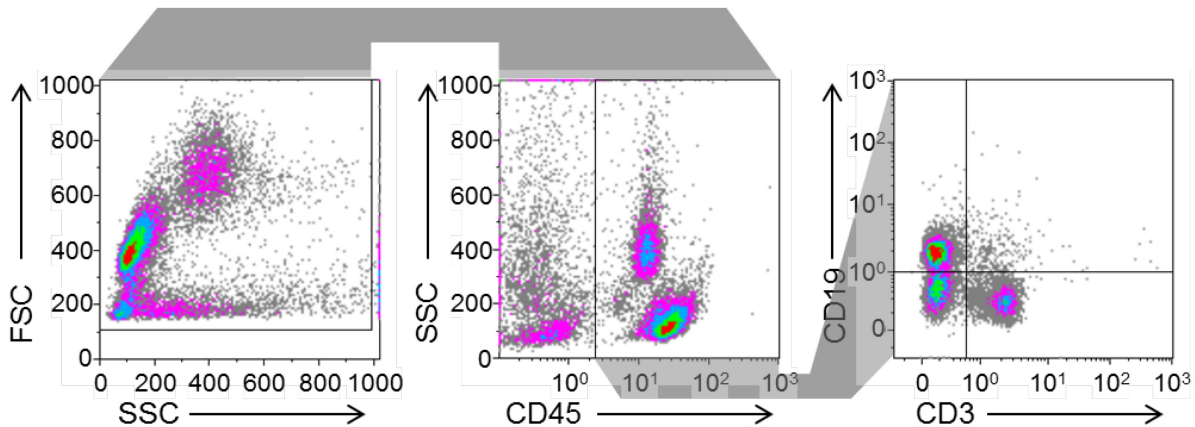


Abbildung 8. Gating-Schema der Lymphozyten im Blut

Detektiert wurden die Leukozyten ($CD45^+$ Zellen), sowie die B- ($CD45^+CD19^+$) und T-Lymphozyten ($CD45^+CD3^+$). Für die statistische Auswertung wurden die absoluten Zellzahlen pro μl Vollblut verwendet. Die Gates wurden nach den entsprechenden Isotyp-Kontrollen eingestellt.

2.3.2.2 Monozyten und neutrophile Granulozyten im Blut

Die Antikörperfärbung für die Monozyten und neutrophilen Granulozyten erfolgte unmittelbar nach der Blutentnahme vor der Lyse der Erythrozyten, da die Oberflächenexpression des CD115-Antigens instabil ist.¹³⁴ Das Blut wurde zunächst ebenfalls mit einem CD16/32-Antikörper (Klon 93, Biolegend, San Diego, CA, USA) inkubiert, bevor die Antikörper (siehe Tabelle 5) und entsprechende Isotypen in einer Verdünnung von 1:25 zugegeben und für 15 min bei 4°C ebenfalls inkubiert wurden. Im Anschluss an die Färbung erfolgte die Lyse der Erythrozyten für 7 min bei 4°C . Nach Zentrifugation bei $750 \times g$ für 10 min bei 4°C wurde das Zellpellet in PEB resuspendiert und durch Zugabe von 1%iger Formaldehydlösung (siehe Tabelle 4) für 20 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Proben erneut für $750 \times g$ 10 min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in PEB Puffer wieder aufgenommen. Nach Zugabe von 200 μl Isoton erfolgte die Messung und Auswertung wie unter 2.3.2.1 beschrieben. Analysiert wurde die absolute Zellzahl pro μl Vollblut der Monozyten ($CD11b^+CD115^+$) und der neutrophilen Granulozyten ($CD11b^+Ly6G^+$).

Das Gating erfolgte nach Ausschluss von Dubletten gemäß dem Schema in Abbildung 9.

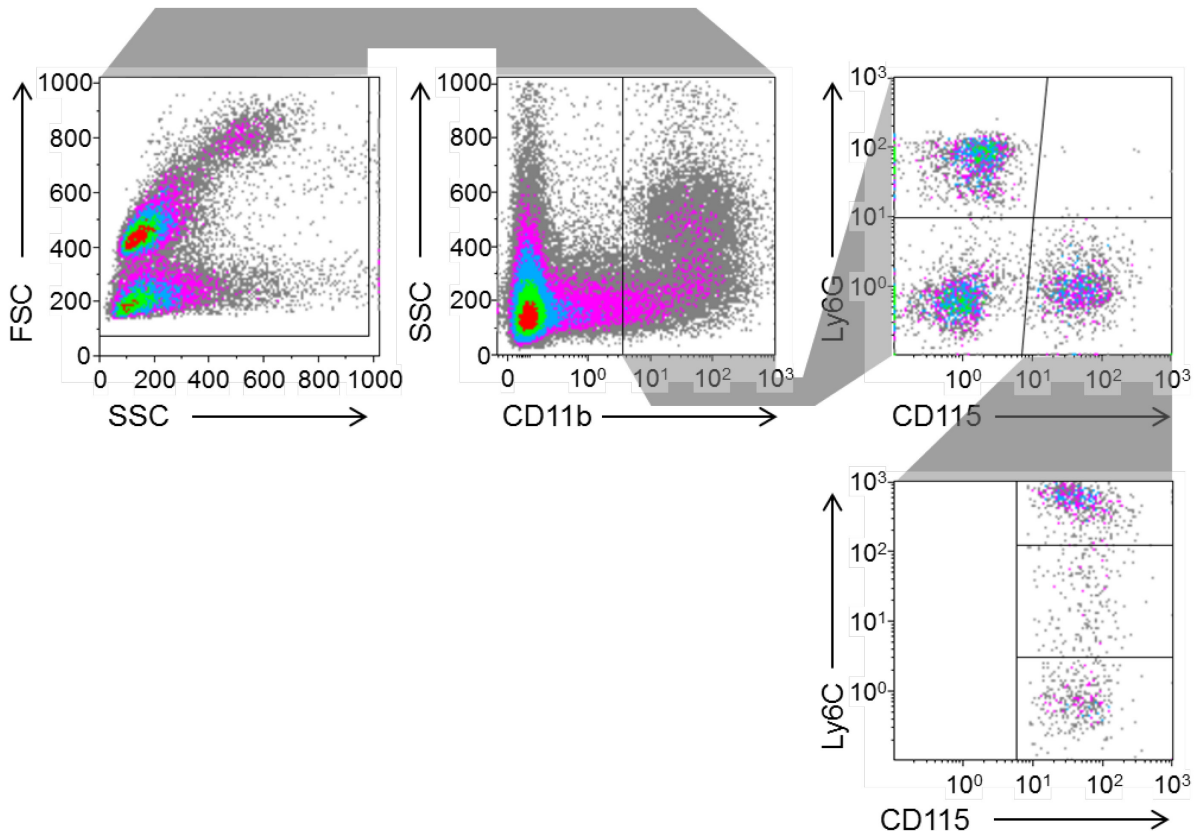


Abbildung 9. Gating-Schema der Monozyten im Blut

2.3.3 Analyse der Immunzellen in der Aortenwand

Die gesamte Aorta vom Aortenbogen bis zu den Abgängen der jeweiligen *Arteria iliaca communis* wurde aus den Tieren isoliert und in Roswell Park Memorial Institute-Nährmedium (RPMI 10%, siehe Tabelle 4) zwecks Säuberung und Entfernung von Fettgewebsresten überführt. Die Aufarbeitung der Aorta erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Butcher *et al* mit Modifikationen.¹³⁵

Die Aorta wurde in kleine Stücke geschnitten und in Kollagenase II-Lösung überführt (siehe Tabelle 4). Der Verdau in dieser Lösung wurde für 60 min bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Lösung kurz gevortext und durch einen 70 µm Filter (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) gegeben um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Nach Zentrifugation bei 300 x g 4 °C für 10 min wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C in Roswell Park Memorial Institute-Nährmedium (RPMI 10%, siehe Tabelle 4) inkubiert. Im Anschluss folgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 300 x g. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in PEB resuspendiert. Zunächst wurde hier analog zur Behandlung der Blutzellproben ein CD16/32 Antikörper (Klon 93, Biolegend, San Diego, CA, USA) eingesetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde *Live Dead Stain* (siehe Tabelle 5) zugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert, um später

tote Zellen aus der Population ausgrenzen zu können. Die anschließende Färbung erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Tabelle 5) in einer Verdünnung von 1:25 für 15 min bei 4 °C. Messung und Auswertung der Proben erfolgten nach Zugabe von 200 µl Isoton wie bereits unter 2.3.2.1 beschrieben.

2.3.3.1 Lymphozyten in der Aorta

Im Rahmen der Auswertung wurde zunächst der Ausschluss von Dubletten vorgenommen. Die nachfolgende Einteilung der Gates und der Ausschluss der toten Zellen erfolgte anschließend gemäß der Isotypkontrollen und ist schematisch in Abbildung 10 dargestellt.

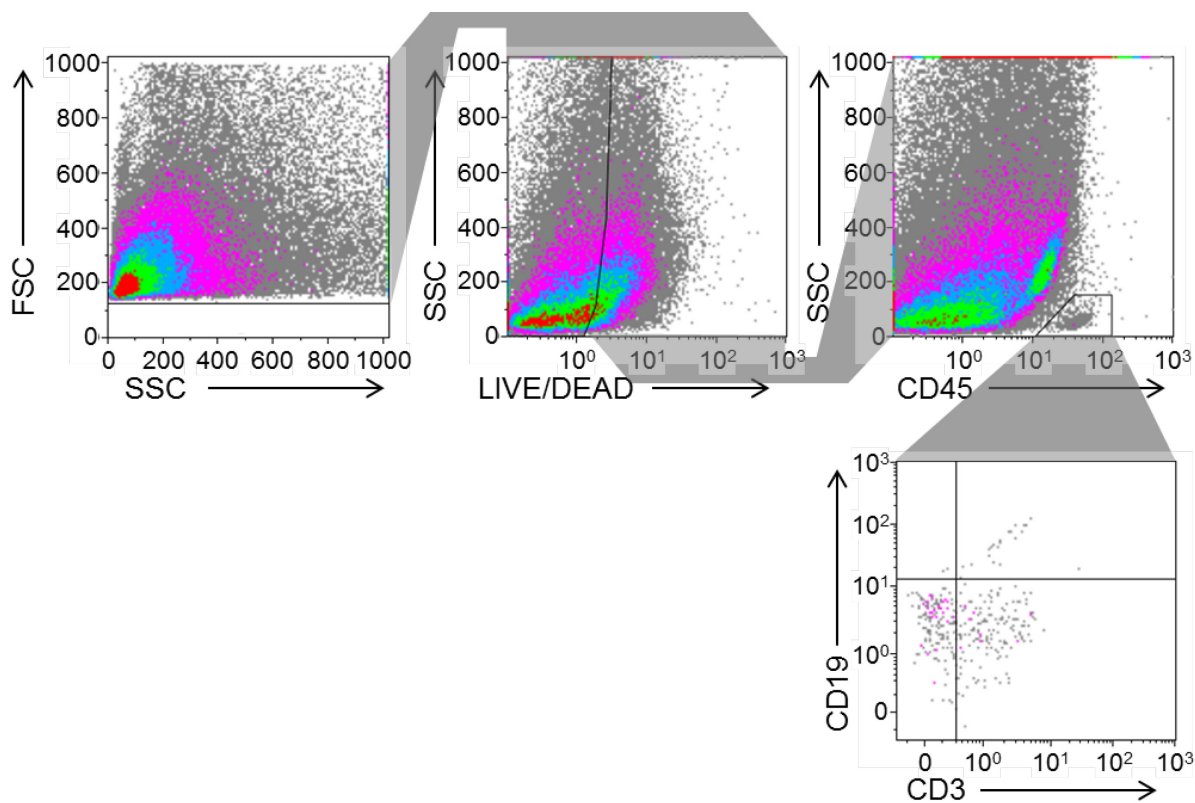


Abbildung 10. Gating-Schema der Lymphozyten in der Aorta

Bezüglich der Analyse der Lymphozyten in der Aorta wurden die Zahl der Leukozyten ($CD45^+$) sowie die Zahl der B-Lymphozyten ($CD45^+CD19^+$) und T-Lymphozyten ($CD45^+CD3^+$) als Gesamtzahl pro Aorta berechnet.

2.3.3.2 Makrophagen in der Aorta

Die Auswertung erfolgte wie unter 2.3.3.1 beschrieben. Dargestellt wurden die absoluten Zahlen der Makrophagen ($CD45^+CD11b^+F4/80^+$) für jede Aorta. Das entsprechende Gating-Schema ist in Abbildung 11 dargestellt.

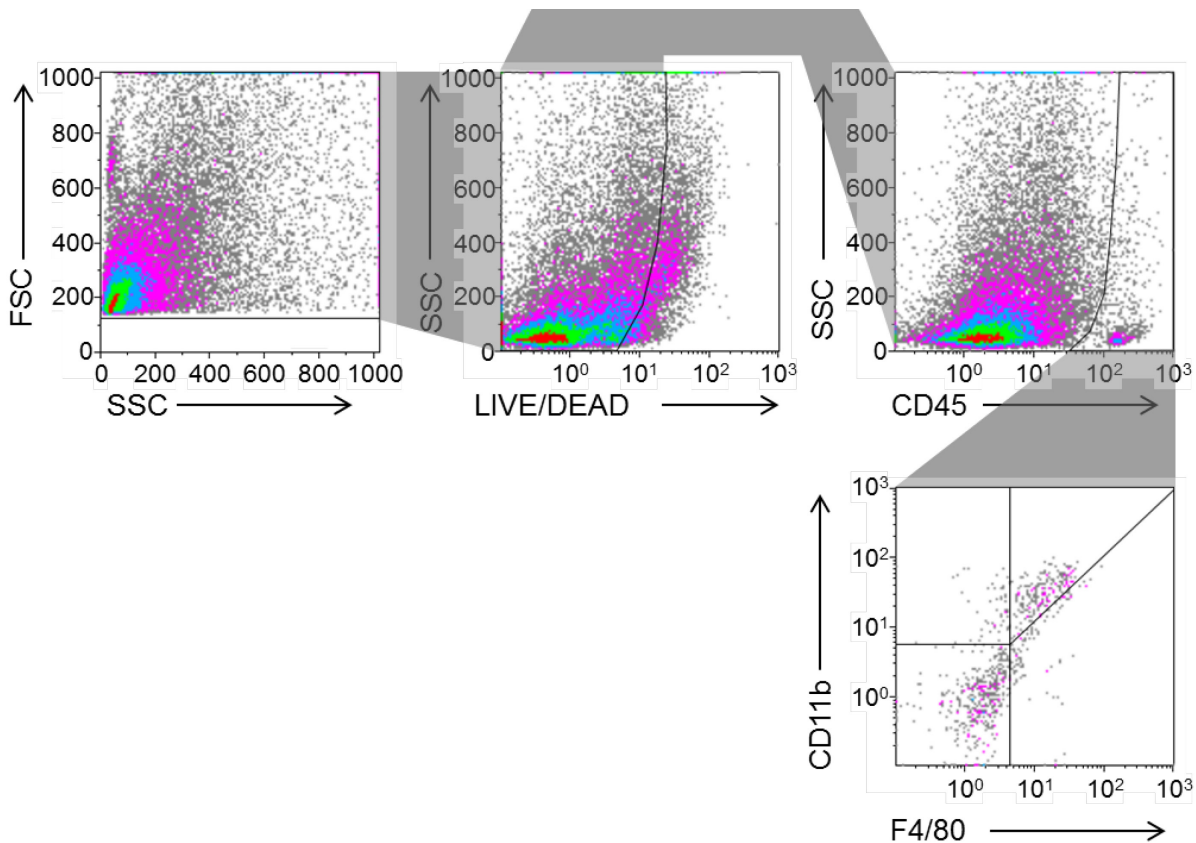


Abbildung 11. Gating-Schema der Makrophagen in der Aorta

2.3.4 Analyse von CD62P und CD41/61 auf Thrombozyten

Die Analyse der Oberflächenmarker CD62P (P-Selektin) und CD41/61 (Glykoprotein IIb/IIIa), welche einen Hinweis auf den Aktivierungsstatus und die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten zulassen, wurde in murinem Vollblut untersucht.

Murines Blut wurde aus der Schwanzspitze entnommen und mit EDTA antikoaguliert. Das Blut wurde anschließend mit calciumfreiem Tyrode-Puffer (siehe Tabelle 4) zweifach gewaschen und am Ende in calciumhaltigem (2 mM CaCl₂) Tyrode-Puffer (siehe Tabelle 4) in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Anschließend wurden 25 µl der Blutsuspension mit 5 µl FITC-konjugiertem monoklonalen Antikörper gegen CD62P oder PE-konjugiertem monoklonalen Antikörper gegen CD41/61 (Glykoprotein IIb/IIIa, GP IIb/IIIa) für 15 min inkubiert (Antikörper siehe Tabelle 5). Als Kontrolle wurden die jeweiligen IgG-Isotypen verwendet. Für die Messung der Oberflächenexpression von CD62P und CD41/61 in stimulierten Thrombozyten wurde *collagen related peptide* (CRP, Abteilung für Biochemie,

Universität von Cambridge, Cambridge; UK) in einer finalen Konzentration von 5 µg/ml während der Inkubation hinzugefügt.

Für die Analyse der direkten Effekte von Dapagliflozin auf die CD62P-Expression wurde eine *ex vivo* Inkubation durchgeführt. Das entnommene Blut wurde nach zweimaligem Waschen und Wiederaufnahme in calciumhaltigem Tyrode-Puffer für 30 min mit 0,5 µM Dapagliflozin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oder Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) als entsprechender Kontrolle bei 37 °C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben weiter für die Messung aufgearbeitet. Die Substanz Dapagliflozin wurde in DMSO gelöst.

Die Messungen wurden anschließend am Gallios™ Durchflusszytometer (Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland) durchgeführt und für die Analyse der Daten wurde die Kaluza *Flow Analysis Software* 1.5a (Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland) verwendet.

Es wurde zur Detektion der Thrombozyten ein Antikörper gegen CD41 eingesetzt (siehe Tabelle 5). Das entsprechende Gating Schema für CD62P ist in Abbildung 12 gezeigt. Das Gating Schema für CD41/61 ist analog aufgebaut. Dargestellt wurden jeweils die CD62P- und CD41/61-positiv angefärbten Thrombozyten als Prozent der Gesamthrombozyten.

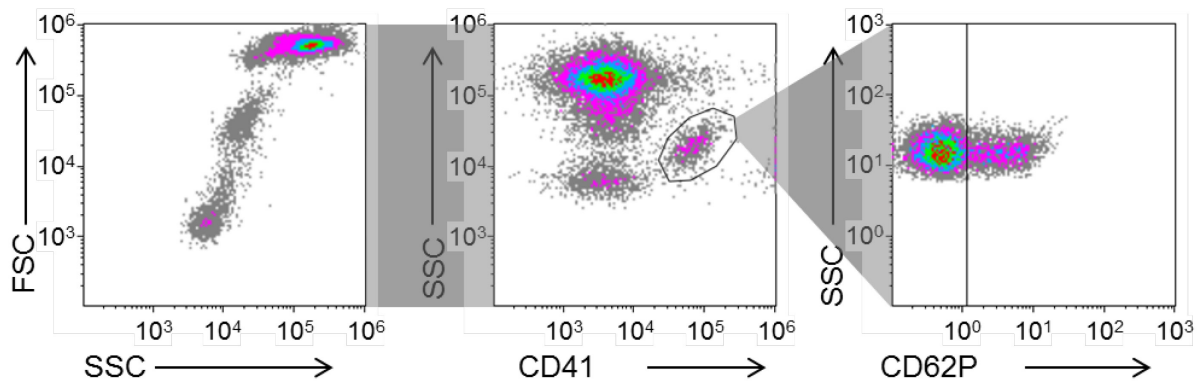


Abbildung 12. Gating-Schema der murinen Thrombozyten

2.3.5 Antikörper in der Durchflusszytometrie

Tabelle 5. In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörper-Kombinationen

Zellen	Antikörper-Kombination	Klon	Hersteller
Lymphozyten Blut	CD45-PE CD3-APC/Cy7 CD19-PacificBlue™	30-F11 17A2 6D5	alle Antikörper von Biolegend, San Diego, CA, USA
Monozyten/ Neutrophile Blut	Ly-6C-AlexaFluor®488 CD11b-PE CD115-APC Ly-6G-PacificBlue™	HK1.4 M1/70 AFS98 1A8	Biolegend, San Diego, CA, USA BD Biosciences, San Jose, USA eBioscience, San Diego, CA, USA Biolegend, San Diego, CA, USA Biolegend, San Diego, CA, USA
Lymphozyten Aorta	CD45-PE CD3-APC/Cy7 CD19-PacificBlue™ Live/Dead-Aqua	30-F11 17A2 6D5	alle Antikörper von Biolegend, San Diego, CA, USA <i>molecular probes®</i> , <i>life</i> <i>technologies™</i> , Eugene, OR, USA
Makrophagen Aorta	F4/80-AlexaFluor®488 CD45-PE CD86-PE/Cy7 Live/Dead-Aqua	BM8 30-F11 GL-1	alle Antikörper von Biolegend, San Diego, CA, USA <i>molecular probes®</i> , <i>life</i> <i>technologies™</i> , Eugene, OR, USA
Thrombozyten	CD62P-FITC CD41/61-PE CD41-PE	Wug.E9 JON/A MWRReg30	beide EMFRET Analytics GmbH & Co.KG, Eibelstadt, Deutschland Biolegend, San Diego, CA, USA

2.4 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *Realtime-PCR*

2.4.1 RNA-Isolation und cDNA-Umschreibung

Die Isolation der RNA aus den bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Geweben erfolgte mit der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode. Ein etwa 50 mg schweres Stück der Leber beziehungsweise die gesamte Aorta wurde in ein *M Tube* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) mit 700 μl peqGOLD TriFastTM Reagenz (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) überführt.

Die Zerkleinerung des Gewebes wurde anschließend im *gentleMACSTM Dissociator* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) mit dem Programm für RNA gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Anschließend folgte zur weiteren Aufarbeitung ein Zentrifugationsschritt für 2 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $1000 \times g$.

Der entnommene Überstand wurde mit Chloroform (Verhältnis 5:1) versetzt und vermischt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 15 min und maximaler Umdrehungszahl. Die obere wässrige Phase wurde entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Ethanol absolut gemischt. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das *RNA Clean & ConcentratorTM* Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA) nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet.

Die Qualität und Konzentration der RNA wurden mittels kapillarelektrophoretischer Analyse (Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) überprüft. Die Messungen erfolgten mit einem *Bioanalyzer* (2100 Bioanalyzer Instruments, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) im biologisch-medizinischem Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Für die Umschreibung in cDNA wurde ausschließlich RNA mit einem RIN-Wert von >8 verwendet. Jeweils 1 μg der isolierten RNA wurde mit dem *QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

2.4.2 Quantitative Realtime-PCR (qPCR)

Die Quantifizierung der Genexpression wurde mit qPCR am StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Life TechnologiesTM, Carlsbad, CA; USA) durchgeführt. Die Methode wurde unter Verwendung des Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Life TechnologiesTM, Carlsbad, CA; USA) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte mit einer Mischung aus 5 μl Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG mit ROX-Referenzfarbstoff, 2,5 μl cDNA und 2,5 μl Primerlösung. Vorwärts- und Rückwärts-Primer wurden zu gleichen Teilen in Wasser gelöst und mit einer Endkonzentration von $0,625\text{ }\mu\text{M}$ im Gesamtreaktionsvolumen eingesetzt.

Die Messungen der Proben erfolgten als Doppelbestimmung mit einer Konzentration von 2,083 ng/µl cDNA.

Die Reaktionsbedingungen für die qPCR und die Dissoziationskurve wurden entsprechend der Angaben im Herstellerprotokoll des Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG gewählt.

Die für die qPCR verwendeten Primersequenzen wurden mit der Primer3Plus Software¹³⁶ und Primer-BLAST¹³⁷ entworfen und auf ihre Spezifität geprüft (siehe Tabelle 6). Die Herstellung der Primer erfolgte durch Invitrogen™ (Life Technologies™ Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Die Auswertung wurde mit der StepOne™ Software Version 2.3 (Life Technologies™ Corporation, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Die Analyse der Schmelzkurven der verschiedenen Primer erfolgte nach jeder Messung und Ansätze mit mehr als einem Maximum in der Schmelzkurve wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Die Berechnung der relativen mRNA-Expression der Zielgene erfolgte gemäß der $\Delta\Delta C_q$ -Methode und 18S als endogener Kontrolle.¹³⁸

Tabelle 6. In der qPCR verwendete Primersequenzen.

Gen	Vorwärts-Primer (5'-3')	Rückwärts-Primer (5'-3')	Literatur
<i>18S</i>	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA	¹³⁹
<i>Abca1</i>	CTACCAACCTGCCCGTTCTA	ATGCCGATGAAGAGGTTTAC	
<i>Apoa1</i>	TATGTGGATGCGGTCAAAGA	CTGCAGCTGACTAACGGTTG	¹⁴⁰
<i>Apoa2</i>	GACGGACCGGATATGCAGAG	AGCTGCTCGTGTGTCTTCTC	
<i>Arg1</i>	ATGGGCAACCTGTGTCCTTT	TTCCCCAGGGTCTACGTCTC	
<i>Arg2</i>	GATGTGGAGCCTCCTGAACA	CTCAGGTGGATTGGCCTCTG	
<i>Icam1</i>	TTCTCATGCCGCACAGAACT	TCCTGGCCTCGGAGACATTA	¹⁴¹
<i>Lcat</i>	CTTCACCATCTGGCTGGATT	GCCCAGAGCTGTGGTTGTAG	
<i>Lpl</i>	TCGTCATCGAGAGGATCCGA	ACACTGCTGAGTCCTTTCCC	¹⁴²
<i>Scarb1</i>	CACCCTTCATGACACCCGAA	TGGCAAACAGAGTATCGGGG	
<i>Sele</i>	CGAGACGCCATCATGCAAAG	CCTGCAACGTGAACTCTGC	
<i>Vcam1</i>	GTCACGGTCAAGTGTGGC	TGTTTCATGAGCTGGTCACCC	

2.5 Protein- und Lipoproteinanalytik

2.5.1 Bestimmung der Zytokine und Insulin im Plasma

Für die Analysen der Zytokine und Adipokine im Plasma wurde eine Multiplex-Analyse durchgeführt.

Die Konzentrationen von IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und TNF- α wurden mit dem *Bio-Plex ProTM Mouse Cytokine 23-plex Assay* gemessen.

Die Messung der Plasmakonzentrationen von Insulin erfolgte mit dem *Bio-Plex ProTM Mouse Diabetes 8-plex Assay*. Die eingesetzten Testsysteme wurden von der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) bezogen.

Für die Analyse wurden die Plasmaproben in einem Verhältnis von 1:4 verdünnt. Die Messung erfolgte in einem *Bio-Plex[®] 200 suspension array* System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und die anschließende Auswertung wurde mit der *Bio-Plex ManagerTM Software* Version 6.0 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt.

Die Darstellung der Plasmakonzentrationen der Zytokine erfolgt als Vielfaches der Kontrolltiere. Die Darstellung der Plasmakonzentrationen von Insulin erfolgte als Absolutwerte.

Die Durchführung der Analysen erfolgte durch Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr am Deutschen Diabetes-Zentrum, Düsseldorf.

2.5.2 Bestimmung des Plasmacholesterins

Die Konzentration von Cholesterin im Plasma wurde mit Hilfe des *HDL and LDL/VLDL Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit* (BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA) bestimmt. Dabei wurde das Gesamt-Cholesterin, sowie das HDL-C und LDL/VLDL-Cholesterin (LDL/VLDL-C) einzeln dargestellt. Die Angabe der Menge erfolgte in mg/dl. Die Analyse wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6 Kalibrierte automatisierte Thrombographie

Die Methode der kalibrierten automatisierten Thrombographie wurde für die Bestimmung des ETP in murinem und humanem Plasma verwendet.^{143, 144} Die Messungen erfolgten jeweils in plättchenarmem Plasma (PAP/*platelet poor plasma* PPP).

2.6.1 Bestimmung in murinem Plasma

Die konventionell erhältlichen Lösungen von *PPP-Reagent*, *Thrombin Calibrator* und *FluCa-Kit* wurden von der Firma DIAGNOSTICA STAGO S.A.S (Asnières sur Seine, Frankreich) bezogen.

Bei der Prüfung von direkten Effekten von Dapagliflozin wurde PAP vor Zugabe der Reagenzien mit 0,5 µM Dapagliflozin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oder Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) als Kontrolle für 30 min bei 33 °C vorinkubiert.

Für die Bestimmung des ETP in murinem Plasma wurden die Reagenzien mit PBS verdünnt. Das *PPP-Reagent* wurde mit PBS verdünnt, um eine Konzentration von 5 pM Gewebefaktor zu erhalten. Die Verdünnung des *Thrombin Calibrators* wurde analog vorgenommen. Für einige Experimente wurden rekombinanter humaner Gewebefaktor (rhTF, Innovin®, Dade Behring, Deutschland) und negativ geladene Thrombozyten-Membranen verwendet.¹⁴⁵

In jedes *Well* wurden 15 µl PAP und 25 µl *PPP-Reagent* oder *Thrombin Calibrator* in der entsprechenden Verdünnung vorgelegt und für 10 min bei 33 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 20 µl FluCa Puffer (FluoBuffer + FluCa Substrat) wurde die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgte im *Fluorocan Ascent Plate Reader* (Exzitation: 390 nm, Emission: 460 nm, Thermo Fisher Labsystems, Finnland) in Dreifachbestimmung bei 33 °C für 90 min. Für die anschließende automatisierte Auswertung wurde die *Thrombinoscope Analysis* Software (Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande) verwendet. Als Parameter wurden der Kurvenverlauf der Thrombinbildung, die Fläche unter der Kurve sowie die Absolutwerte für die Peakhöhe, die Zeit bis zum Peak, die Verzögerungszeit und der Geschwindigkeitsindex angegeben.

2.6.2 Bestimmung in humanem Plasma

Die Gewinnung von humanen Plasmaproben von gesunden Probanden wurde durch die zuständige Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studiennummer: 5789R).

Material und Methoden

Die venöse Blutentnahme erfolgte aus der *Vena cubita* mit Hilfe einer 21 G Kanüle (BD Vacutainer® Safety-Lok™). Das Blut wurde in Citrat-Röhrchen (2,7 ml, BD Vacutainer®) gesammelt.

Die Gewinnung von humanem PAP erfolgte durch Zentrifugation bei 2000 x g für 10 min und anschließende Zentrifugation des Überstandes bei 10.000 x g für 10 min bei Raumtemperatur. Die Messungen in humanem PAP wurden mit unverdünnten Stammlösungen von *PPFlow-Reagent* und *Thrombin Calibrator* durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 80 µl PAP mit 20 µl des *PPFlow-Reagents* beziehungsweise des *Thrombin Calibrators* vermischt und ebenfalls nach Zugabe von 20 µl FluCa Puffer im *Fluorocan Ascent Plate Reader* bei 37 °C für 45 min gemessen.

Für die Untersuchung des Einflusses von HDL wurde das PAP vor Zugabe der Lösungen für 30 min bei 37 °C mit 2 mg/ml HDL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vorinkubiert. Für die Kontrollmessungen wurde die gleiche Menge an Lösungsmittel (150 mM NaCl, 0,1 % EDTA; pH 7,4) zugegeben.

Ebenfalls wurde der Einfluss von 0,5 µM Dapagliflozin auf das humane PAP durch Inkubation für 30 min bei 37 °C untersucht. Hier wurde als Kontrolle DMSO (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Das Vorgehen bezüglich Messung, Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte analog zum murinen PAP.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism Software Version 6.04 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwerte \pm Standardfehler (S.E.M.).

Der Vergleich zweier Datensätze wurde durch Anwendung des ungepaarten, zweiseitigen *student's t-test* durchgeführt.

Die Genexpressionsdaten wurden mit dem nicht-parametrischen *Mann-Whitney test* analysiert.

Die Auswertung der direkten Effekte durch *ex vivo* Inkubation erfolgte durch Anwendung des gepaarten, zweiseitigen *student's t-test*.

Die Verläufe der Blutglukose im Glukosetoleranztest und die Gewichtszunahme über den Behandlungszeitraum wurden mit einer *Two-way ANOVA* und anschließendem *Sidak's multiple comparison test* analysiert.

Für die statistische Auswertung der Multiplexanalysen wurde der *Kruskal-Wallis-Test* (nicht gepaarte Datensätze) mit nachfolgendem *Dunn's multiple comparisons test* durchgeführt.

Ein Wert von $P < 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten beschreiben die kardiovaskulären Effekte einer Hemmung des SGLT2 mit Dapagliflozin in einem Mausmodell, welches eine akzelerierte Atherosklerose durch die genetische Deletion des *Ldlr* aufweist und zusätzlich durch eine diätinduzierte Insulinresistenz charakterisiert ist.

3.1 Diabetogene Diät

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss der verwendeten DD auf verschiedene Parameter beschrieben, um das genutzte Mausmodell zu charakterisieren.

3.1.1 Körpergewicht und Glukosetoleranz

Die in dieser Arbeit untersuchten Effekte von Dapagliflozin sollen im Rahmen der klinischen Anwendung bei DMT2 untersucht werden. Daher wurde zunächst gezeigt, dass sich dieses Modell eignet, um durch die diabetogene Diät eine Adipositas und eine gestörte Glukosetoleranz zu induzieren.

Beim Vergleich von *Ldlr*^{-/-} Mäusen, die oben beschriebene DD erhielten und Standard-Diät (SD)-gefütterten Mäusen zeigt sich eine signifikante Gewichtszunahme durch die Fütterung der DD nach 7 Wochen und 8 Wochen (Abbildung 13 A). Die vergleichende Untersuchung der Körperfettmasse nach 8-wöchiger Fütterung zeigt ebenfalls eine signifikant erhöhte Körperfettmasse in den DD-gefütterten Mäusen (Abbildung 13 B).

Ergebnisse

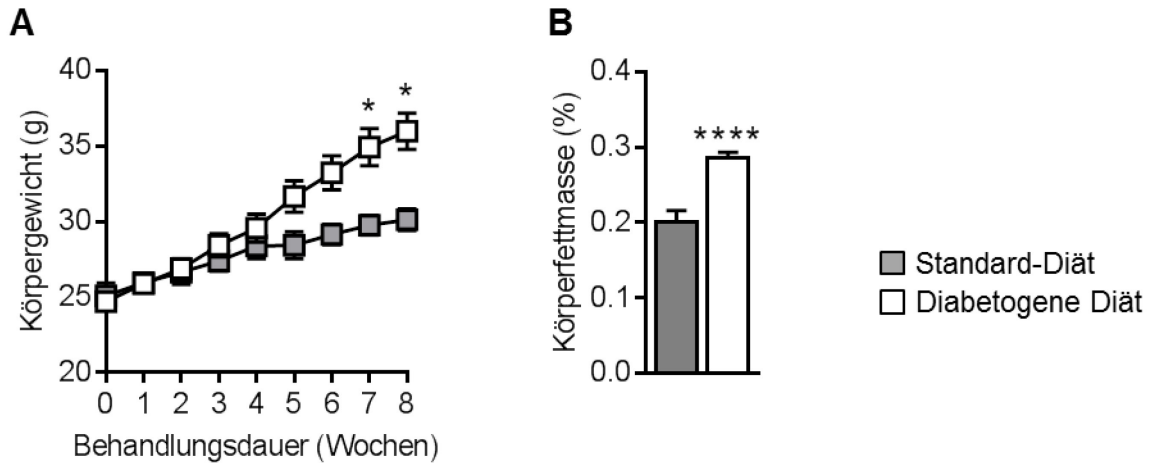


Abbildung 13. Diabetogene Diät induziert Adipositas in *Ldlr*^{-/-}-Mäusen.

A Darstellung des absoluten Körpergewichtes im Verlauf der Fütterung mit diabetogener Diät und Standard-Diät in männlichen *Ldlr*^{-/-} Mäusen; n=4,13. **B** Prozentuale Körperfettmasse 16 Wochen alter Tiere beider Fütterungsgruppen; n=4,19. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit **A** 2way ANOVA, **B** unpaired student's t-test: * $P < 0,05$ / *** $P < 0,0001$ versus Standard-Diät.

Nach einer Fütterungszeit von 8 Wochen wurde ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt, um den Einfluss der DD auf die Glukosetoleranz zu untersuchen. Bereits die nach einer Fastenzeit von 6 h bestimmten Werte für die Nüchternblutglukose waren signifikant erhöht in den Tieren, die mit der DD gefüttert wurden im Vergleich zu den Kontrolltieren mit SD (Abbildung 14 A). Nach oraler Applikation von Glukose zeigten sich ebenfalls deutlich höhere Werte für die Fläche unter der Kurve bei den DD-gefütterten Tieren, welche auf eine schlechtere Verstoffwechselung der Glukose hindeuten (Abbildung 14 B, C).

Ergebnisse

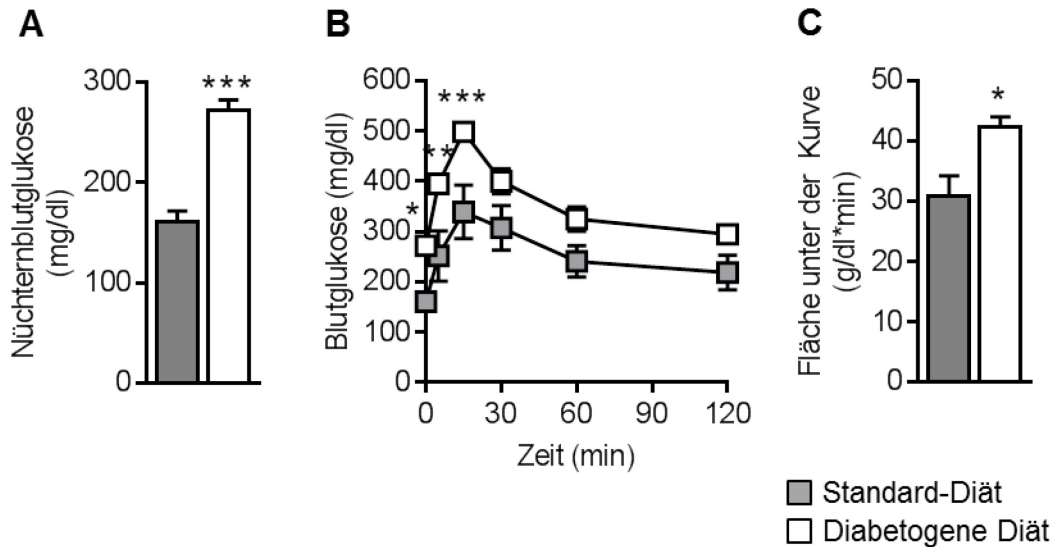


Abbildung 14. Diabetogene Diät verschlechtert die Glukosetoleranz.

A Blutglukose nach einer Fastendauer von 6 h in 16 Wochen alten Mäusen beider Fütterungsgruppen; n=3,6. **B** Kurvenverlauf der Blutglukose über 120 min nach oraler Applikation von Glukoselösung; n=3,6. **C** Errechnete Fläche unter der Kurve der Verlaufskurven der Glukosekonzentration im Blut; n=3,6. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit **A, C** *unpaired student's t-test*, **B** *2way ANOVA*: * $P < 0,05$ /** $P < 0,01$ /***/ $P < 0,001$ versus Standard-Diät.

3.1.2 CD62P-Expression und Thrombinpotential

Für die Bewertung der Effekte von Dapagliflozin auf kardiovaskuläre Risikoparameter wurden auch die Expression von CD62P als Thrombozyten-Aktivierungsmarker und die Bestimmung des Thrombinpotentials im Plasma als Hinweis auf die Aktivität von Thrombin untersucht.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass durch Fütterung der DD die CD62P-Expression der Thrombozyten höher war als in Kontrolltieren mit SD (Abbildung 15 A).

Die Analyse des ETP im plättchenarmen Plasma von Tieren beider Fütterungsgruppen zeigte, dass nach Fütterung der DD das ETP signifikant erhöht war (Abbildung 15 B).

Ergebnisse

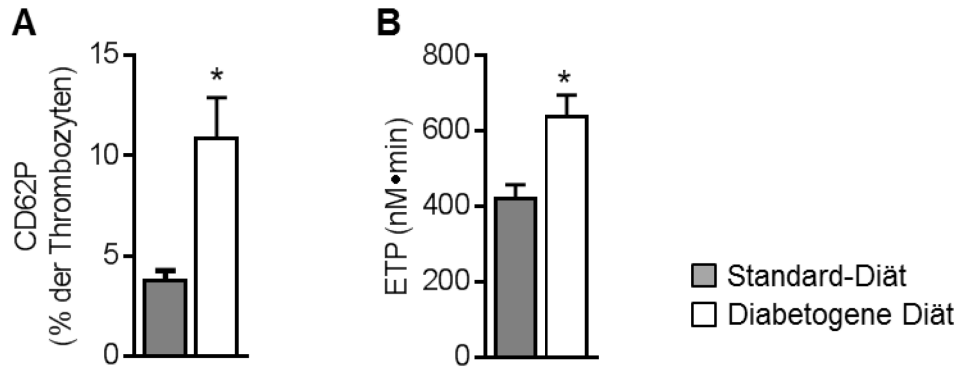


Abbildung 15. Diabetogene Diät erhöht die CD62P-Expression auf Thrombozyten und das endogene Thrombinpotential.

A Expression von CD62P auf murinen Thrombozyten in 33 Wochen alten Mäusen beider Fütterungsgruppen; n=6,14. **B** Endogenes Thrombinpotential (ETP) in 33 Wochen alten Mäusen beider Fütterungsgruppen; n=4,6. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: * $P < 0,05$ versus Standard-Diät.

3.2 Metabolische Parameter und Blutdruck

Dapagliflozin wird in der Behandlung des DMT2 zur Senkung der Blutglukose eingesetzt. In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass auch andere Parameter wie Körpergewicht oder Blutdruck durch die Therapie mit Dapagliflozin beeinflusst werden können.^{146, 147} Aus diesem Grund wurde untersucht, welche Effekte die in dieser Studie eingesetzte Dosierung von Dapagliflozin auf die metabolischen Parameter in den behandelten Tieren zeigt, da diese Mechanismen sich auch auf die Entwicklung der Atherosklerose auswirken können.

3.2.1 Glukosetoleranz und Insulinresistenz

Um die Wirkung von Dapagliflozin auf die Glukosetoleranz zu bestimmen, wurde nach 8-wöchiger Behandlung ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt.

Zunächst wurde die Nüchternblutglukose nach einer 6-stündigen Fastenzeit bestimmt. Hier konnte kein Einfluss von Dapagliflozin festgestellt werden (Abbildung 16 A). Der Verlauf der Blutglukosespiegel nach oraler Gabe von Glukose wurde als Zeitverlauf sowie als berechnete Fläche unter der Kurve dargestellt. Während sich im Verlauf der Blutglukosewerte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, konnte bei Betrachtung der Fläche unter der Kurve eine Reduktion durch Dapagliflozin detektiert werden (Abbildung 16 B, C).

Die Messung der Plasmainsulinspiegel nach 8-wöchiger Behandlung zeigte eine reduzierte Plasmakonzentration an Insulin durch die Applikation von Dapagliflozin (Abbildung 16 D).

Ergebnisse

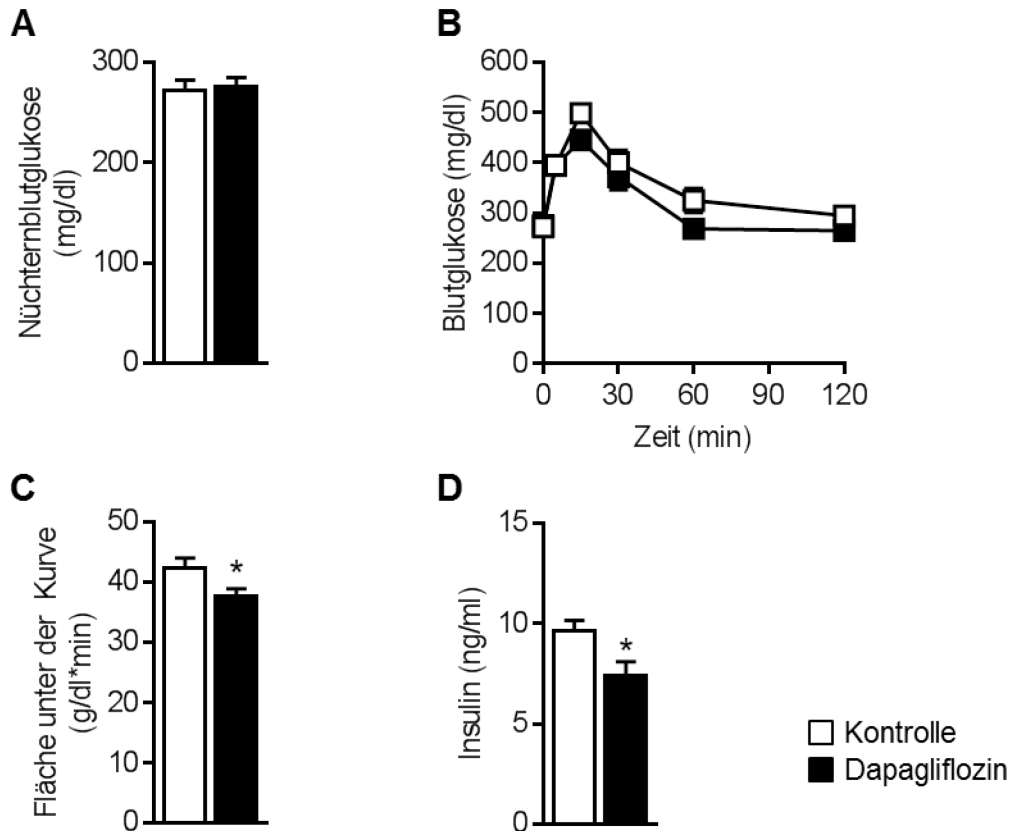


Abbildung 16. Dapagliflozin verbessert die Glukosetoleranz.

A Darstellung der Nüchternblutglukose in 16 Wochen alten Mäusen; n=6,6. **B** Glukosekonzentration im Blut über 120 min nach oraler Applikation von Glukoselösung; n=6,6. **C** Errechnete Fläche unter der Kurve des oralen Glukosetoleranztestes in 16 Wochen alten Mäusen; n=6,6. **D** Konzentration von Insulin im Plasma in 16 Wochen alten Mäusen; n=4,4. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit **A, C, D** *unpaired student's t-test*, **B** *2way ANOVA* : * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

3.2.2 Körpergewicht und Körperfettgehalt

Das Körpergewicht der Tiere wurde über den gesamten Behandlungszeitraum wöchentlich dokumentiert. Durch die Fütterung mit der hochkalorischen Diät kam es in beiden Behandlungsgruppen zu einem Anstieg des Körpergewichtes bezogen auf das Ausgangsgewicht zu Beginn der Behandlung.

Ein Einfluss der Behandlung mit Dapagliflozin auf das Körpergewicht konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Abbildung 17 A).

Die Analyse von Körperfettmasse und BMI zum frühen Untersuchungszeitpunkt nach einer Behandlung von 8 Wochen zeigte eine Reduktion der Körperfettmasse in den mit Dapagliflozin behandelten Tieren, jedoch keinen Unterschied im BMI zwischen den Behandlungsgruppen (Abbildung 17 B, C).

Ergebnisse

Nach 25-wöchiger Behandlung konnte kein Unterschied für die Körperfettmasse und den BMI zwischen den Behandlungsgruppen detektiert werden (Abbildung 17 D, E).

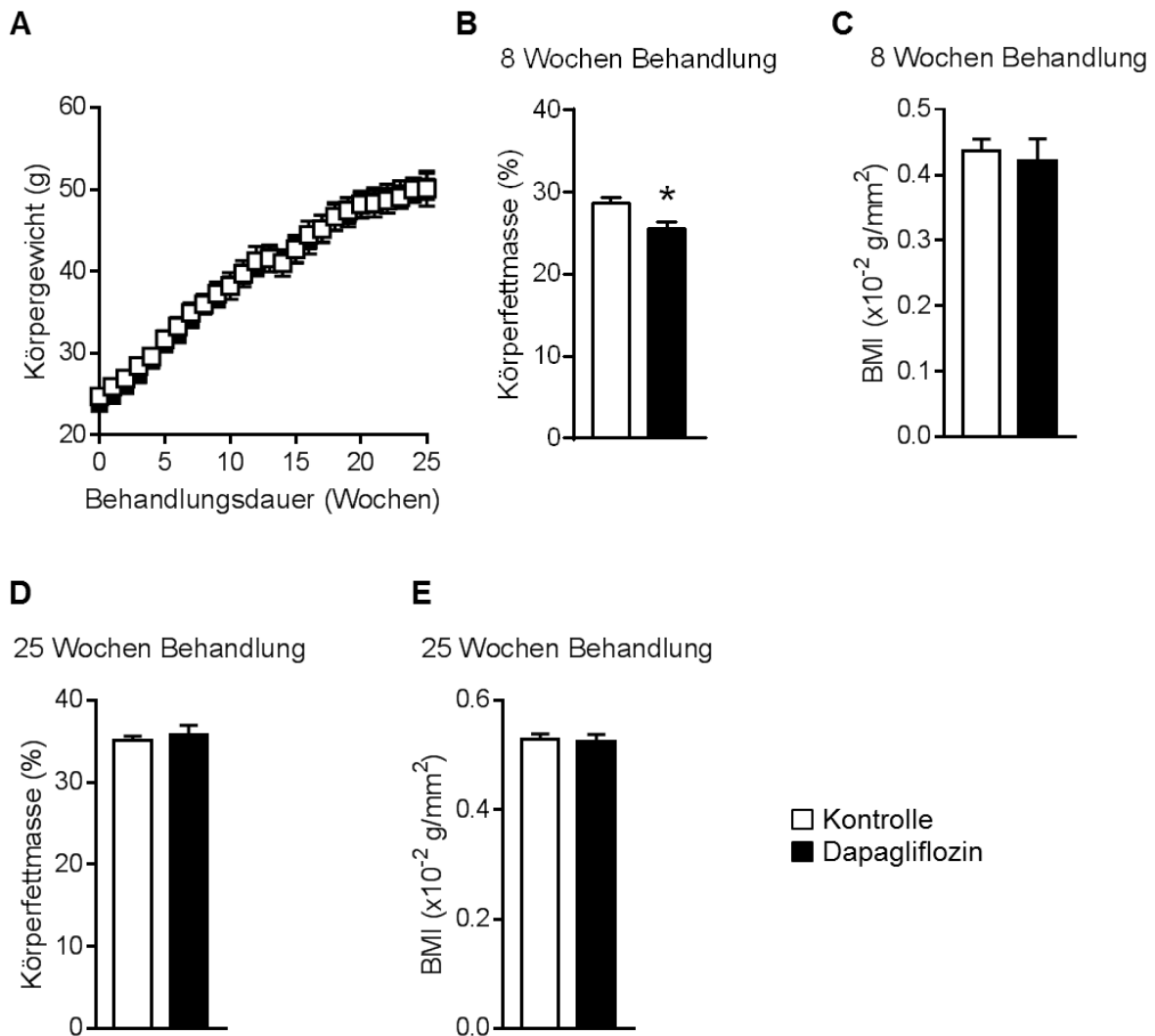


Abbildung 17. Dapagliflozin zeigt keinen Effekt auf das Körpergewicht.

A Darstellung des absoluten Körpergewichtes im Gramm und Gewichtszunahme über den Behandlungsverlauf; n=14,19. **B** Körperfettmasse und **C** Body-Mass-Index (BMI) der Tiere zum Untersuchungszeitpunkt im Alter von 16 Wochen; **B** n=14,19, **C** n=8,5; und **D**, **E** im Alter von 33 Wochen; **D** n=8,10, **E** n=10,10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit **A** 2way ANOVA, **B-E** unpaired student's t-test: **P>0,01 versus Kontrolle.

3.2.3 Blutdruck und Herzfrequenz

Die Messung des systolischen und des diastolischen Blutdruckes wurde zu beiden Untersuchungszeitpunkten in den Behandlungsgruppen durchgeführt. Hierfür wurde eine nicht-invasive Methode angewendet, die zunächst eine Eingewöhnung der Mäuse erforderte. Die Messwerte wurden dann aus den Mittelwerten von 3 Messtagen ermittelt.

Ergebnisse

Zu beiden Behandlungszeitpunkten konnte kein Einfluss von Dapagliflozin auf den systolischen oder diastolischen Blutdruck ermittelt werden (Abbildung 18 A, B).

Die Messung der Herzfrequenz war zu beiden Untersuchungszeitpunkten nicht unterschiedlich zwischen den Behandlungsgruppen (Abbildung 18 A, B).

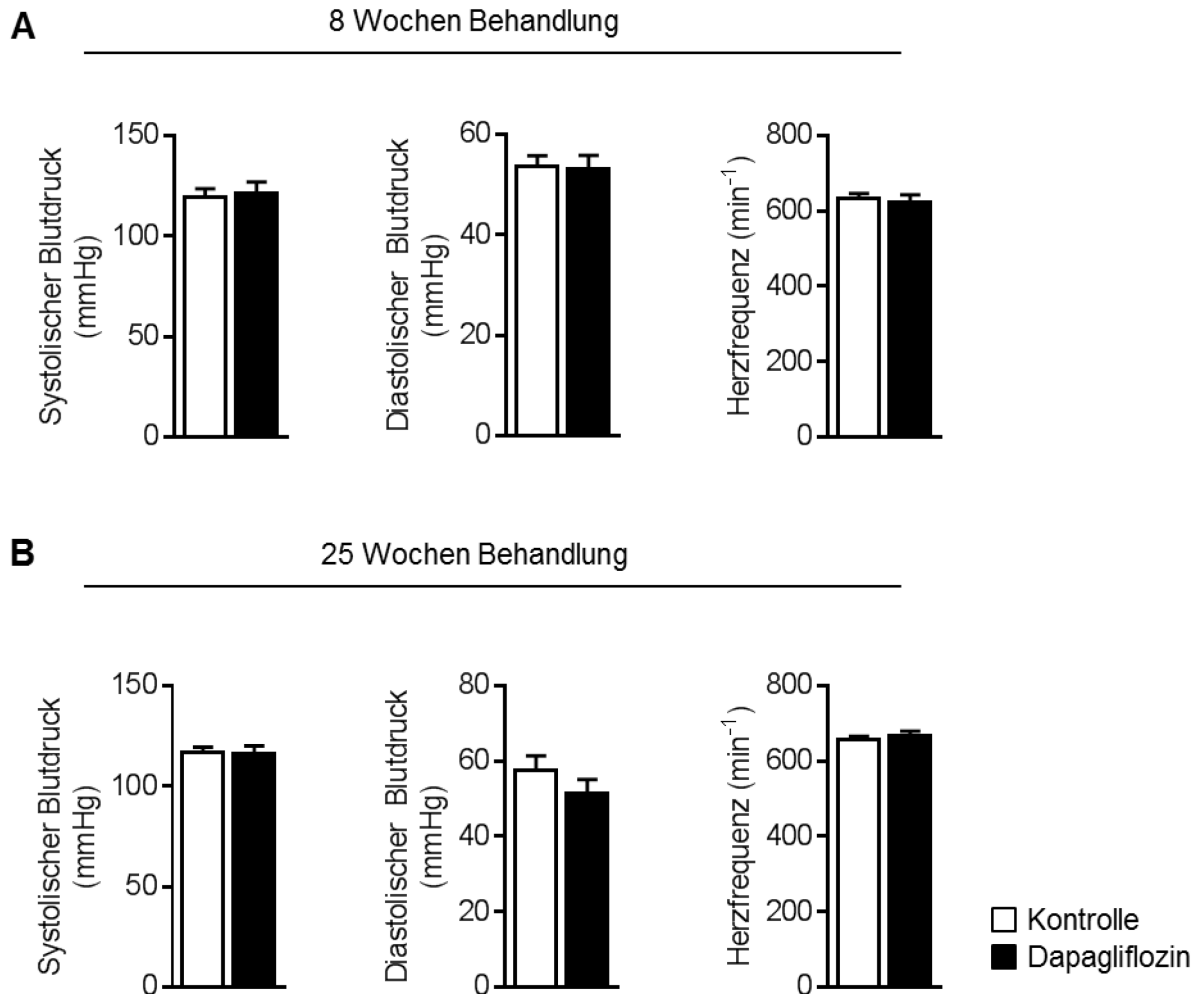


Abbildung 18. Dapagliflozin zeigt keinen Einfluss auf Blutdruck und Herzfrequenz.

Der Blutdruck der Tiere wurde zu beiden Untersuchungszeitpunkten nicht-invasiv gemessen. Aus 90 Messungen an 3 Tagen wurde ein Mittelwert für den systolischen Blutdruck, den diastolischen Blutdruck und die Herzfrequenz für jedes Tier bestimmt. Dargestellt sind die Werte für **A** 8 Wochen behandelte; n=8,7, und **B** 25 Wochen behandelte Tiere; n=6,6. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M..

3.3 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist maßgeblich an der Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse beteiligt.¹⁴⁸ Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung des Einflusses einer Behandlung mit Dapagliflozin auf kardiovaskuläre Risikoparameter zunächst das Ausmaß atherosklerotischer Läsionen in der Aorta bestimmt.

3.3.1 Plaquescore Aorta

Die Behandlung der Tiere mit Dapagliflozin erfolgte durch Beimischung der Substanz in das Futter. Ab einem Alter von 8 Wochen wurden die Tiere mit dem Dapagliflozin-Futter beziehungsweise einem Kontrollfutter ohne Zusatz der Substanz gefüttert und in einem Endalter von 16 Wochen und 33 Wochen wurde die Aorta entnommen und untersucht.

Die Analyse des aortalen Plaquebesatzes erfolgte durch Lipidanfärbung mit ÖRO. Die Fütterung der *Ldlr*-defizienten Mäuse mit der DD resultierte über den Behandlungsverlauf in der Bildung atherosklerotischer Läsionen (Abbildung 19).

Der Vergleich der beiden Behandlungsgruppen im Alter von 16 Wochen zeigt keinen Unterschied durch die Behandlung mit Dapagliflozin auf die Atherosklerose. Während in der gesamten Aorta noch ein Trend zu einem verringerten Plaque Score erkannt werden konnte (Abbildung 19 A, B), war in den Aortenklappen im Aortenursprung kein Unterschied zwischen dem Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen zu erkennen (Abbildung 19 C, D). Zu diesem frühen Zeitpunkt war der aortale Plaquebesatz jedoch erst gering ausgeprägt.

Die atherosklerotischen Läsionen entwickeln sich mit der Zeit und es konnte gezeigt werden, dass ein Lebensalter von 16 Wochen beziehungsweise eine Fütterung mit DD von 8 Wochen zunächst in einer Entwicklung kleiner, noch nicht ausgeprägter, atherosklerotischer Läsionen resultierte (Abbildung 19). Aus diesem Grund wurde ein weiterer, späterer Behandlungszeitpunkt nach 25 Wochen Fütterung analysiert.

Ergebnisse

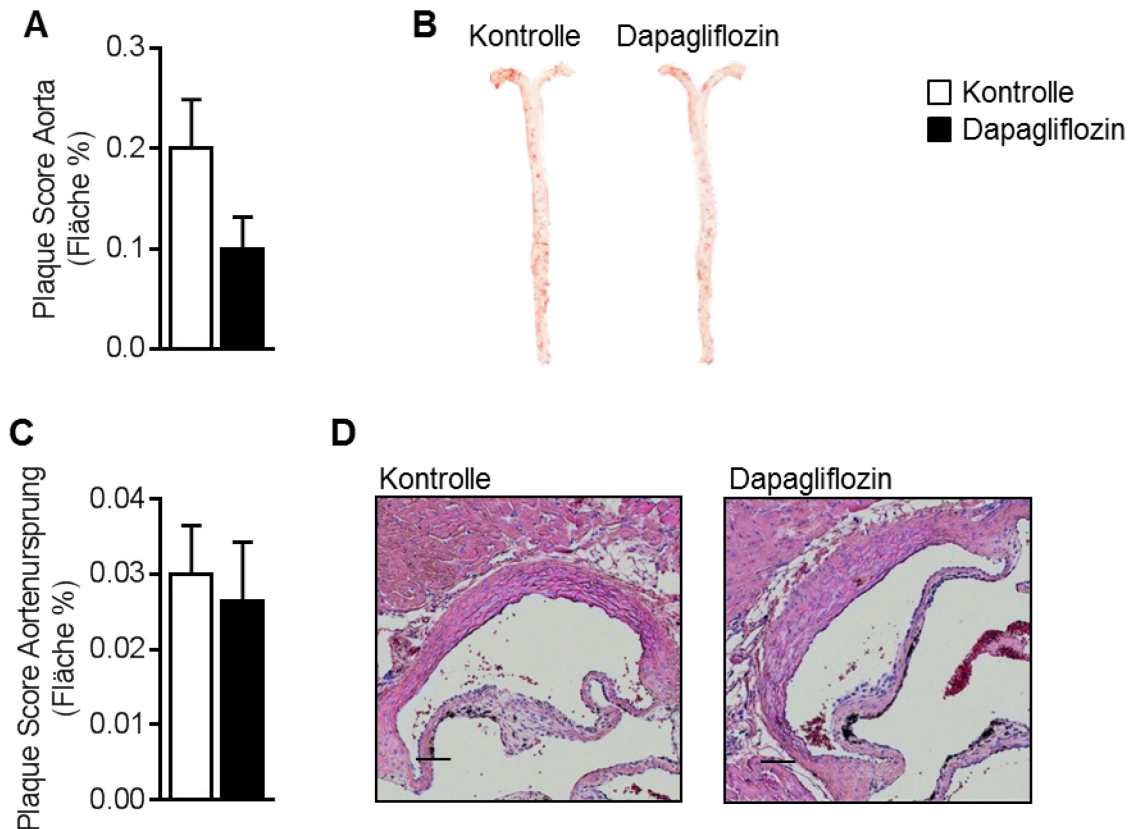


Abbildung 19. Dapagliflozin hat zum frühen Zeitpunkt keinen Einfluss auf atherosklerotische Läsionen.

A Quantifizierung der mit Öl-Rot-O-angefärbten Lipideinlagerungen in Aorten von Tieren beider Behandlungsgruppen zum Untersuchungszeitpunkt im Alter von 16 Wochen und **B** repräsentative Aufnahmen der jeweiligen Gesamtaorta, $n=7,5$. **C** Die Quantifizierung erfolgte als Anteil der Summe der atherosklerotischen Plaques in den Aortenklappen an der Gesamtfläche des Ursprunges 16 Wochen alter Tiere, die für 8 Wochen diabetogene Diät mit oder ohne Zusatz von Dapagliflozin erhielten. **D** Gezeigt sind repräsentative Bilder H&E gefärbter Aortenklappen, $n=10,10$. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M..

Bei der vergleichenden Betrachtung der Plaque Scores zu beiden Untersuchungszeitpunkten ist bei Betrachtung der mit DD gefütterten Kontrolltiere zu erkennen, dass im Alter von 16 Wochen die anteilige Plaquefläche etwa 0,2 % betrug, während im Alter von 33 Wochen diese auf 6,54 % angestiegen war (Abbildung 19 und 20).

Die Analyse des Plaque Scores der gesamten Aorta ergab eine signifikante Minderung der atherosklerotischen Läsionen nach Behandlung mit Dapagliflozin für 25 Wochen [Kontrolle 6.54 ± 0.93 % vs. Dapagliflozin 3.67 ± 0.92 %] (Abbildung 20 A, B).

Ergebnisse



Abbildung 20. Dapagliflozin reduziert atherosklerotische Läsionen in der Aorta.

A Quantifizierung der anteiligen Fläche der Lipideinlagerungen bezogen auf die jeweilige Gesamfläche der Aorta und **B** exemplarische Abbildungen der Öl-Rot-O-gefärbten Aorten von beiden Behandlungsgruppen, n=10,10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

Der aortale Plaque Score wurde anschließend in den verschiedenen Abschnitten der Aorta analysiert. Die Unterschiede, die auch in der Gesamtaorta gezeigt werden konnten, wurden vor allem durch die Betrachtung des Aortenbogens und des thorakalen Anteils der Aorta wiedergespiegelt (Abbildung 21 A, B). Im abdominalen Teil konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Hinblick auf atherosklerotische Läsionen nach Behandlung mit Dapagliflozin festgestellt werden (Abbildung 21 C). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Aortenbogen, aufgrund der hier vorliegenden Turbulenzen des Blutstromes, den größten Anteil an atherosklerotischen Läsionen vorweist (Abbildung 21).

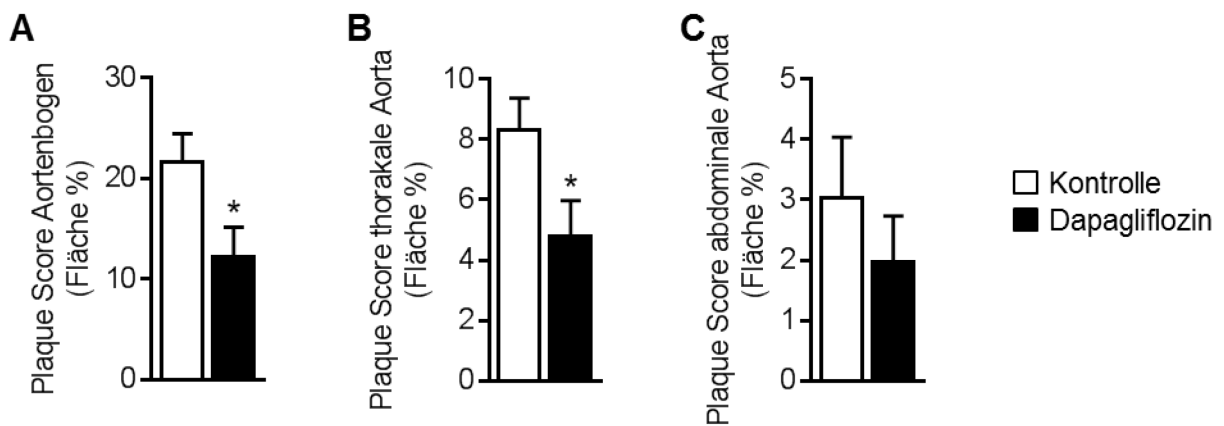


Abbildung 21. Dapagliflozin reduziert atherosklerotische Plaques besonders in der thorakalen Aorta.

Die Fläche der Öl-Rot-O-angefärbten Lipide wurde für die einzelnen Bereiche der Aorta quantifiziert. Die thorakale Aorta ist definiert als Abschnitt oberhalb den Abgängen der Nierenarterien, die abdominale Aorta als Abschnitt unterhalb der Abgänge der Nierenarterien. Dargestellt ist der atherosklerotische Plaquebesatz im **A** Aortenbogen, **B** der thorakalen Aorta und **C** dem abdominalen Teil der Aorta analysiert zum Untersuchungszeitpunkt im Alter von 33 Wochen; n=10,10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

Ergebnisse

Zusätzlich wurde eine Bestimmung der Größe der Plaques im Aortenursprung durchgeführt. Hierzu wurde die Gesamtfläche des Ursprunges gemessen und die anteilige Fläche der Plaques in den Aortenklappen an der gesamten Fläche des Aortenursprunges berechnet. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikant geringere Plaquefläche in den 33 Wochen alten Tieren, die mit Dapagliflozin behandelt wurden im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 22 A, B).

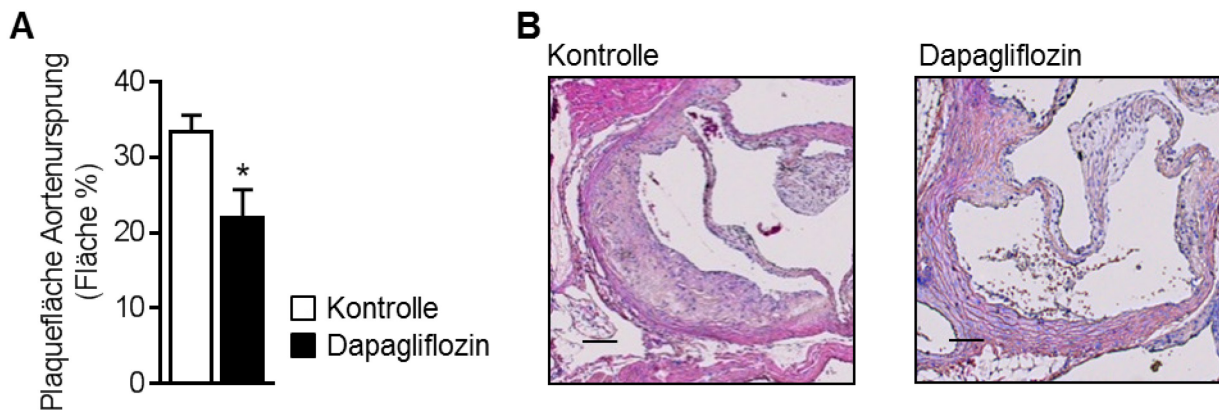


Abbildung 22. Dapagliflozin reduziert die Plaquefläche in den Aortenklappen im Aortenursprung.

A Die Quantifizierung erfolgte als anteilige Fläche der atherosklerotischen Plaques in den drei Aortenklappen an der Gesamtfläche des Ursprunges. **B** Repräsentative Bilder einer H&E gefärbten Aortenklappe im Ursprung mit atherosklerotischen Plaques, n=9,12. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

3.3.2 Immunzellen

Immunzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose.²⁷ Aus diesem Grund wurden die Makrophagen im Aortenursprung immunhistochemisch untersucht und eine detaillierte Analyse der unterschiedlichen Immunzelltypen in der gesamten Aorta durchflusszytometrisch vorgenommen.

Die Analyse der Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen ergab zum frühen Behandlungszeitpunkt nach 8 Wochen Fütterung keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (Abbildung 23 A, B).

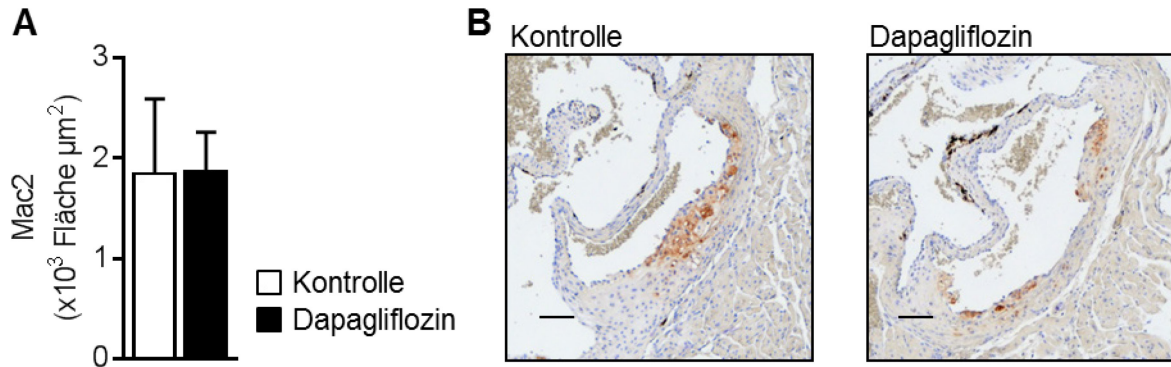


Abbildung 23. Dapagliflozin hat keinen Einfluss auf Makrophageninfiltration zum frühen Zeitpunkt.

A Quantifizierung der Mac2-positiv gefärbten Fläche in den atherosklerotischen Läsionen im Aortenursprung 16 Wochen alter Tiere beider Behandlungsgruppen und **B** exemplarische Aufnahmen der Plaques im Aortenursprung, $n=10,10$. Die Maßstabsbalken entsprechen $100 \mu\text{m}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M..

Der Anteil an Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen im Aortenursprung der 33 Wochen alten Mäuse wurde immunhistochemisch anhand einer Färbung von Mac2 bestimmt. Die Behandlung mit Dapagliflozin reduzierte signifikant die Menge an Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 24 A, B).

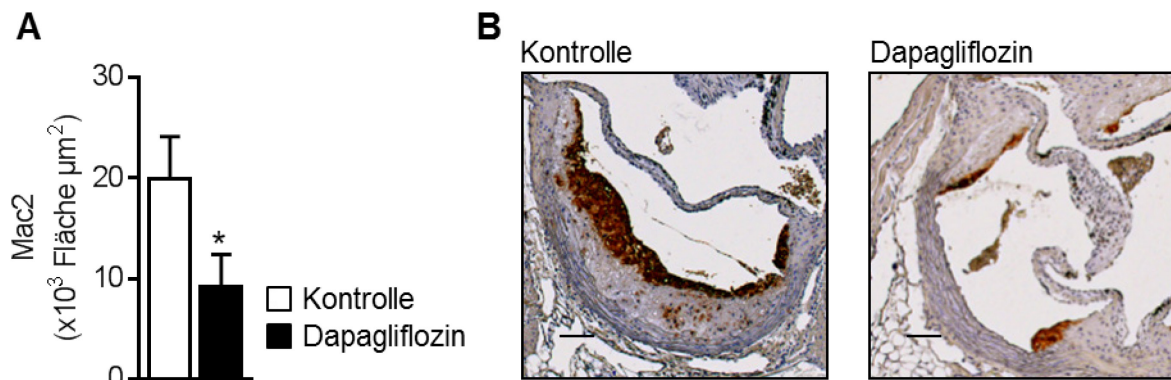


Abbildung 24. Dapagliflozin reduziert Gehalt von Makrophagen in Plaques.

A Quantifizierung der positiv gefärbten Fläche und **B** exemplarische Aufnahmen der Mac-2 Färbung in den atherosklerotischen Plaques im Aortenursprung von 33 Wochen alten Tieren; $n=9,10$. Die Maßstabsbalken entsprechen $100 \mu\text{m}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: $*P<0,05$ versus Kontrolle.

Zusätzlich wurden die Immunzellen in der gesamten Aorta durchflusszytometrisch untersucht. Durch den Einsatz spezifischer Fluorophor-gekoppelter Antikörper wurden Leukozyten (CD45^+), Makrophagen ($\text{CD45}^+\text{CD11b}^+\text{F4/80}^+$) und T-Lymphozyten ($\text{CD45}^+\text{CD3}^+$) identifiziert und quantifiziert. Der Gehalt an B-Lymphozyten ($\text{CD45}^+\text{CD19}^+$) in der Aortenwand wurde nicht quantifiziert, da insgesamt nur sehr wenige Zellen detektiert werden konnten.

Ergebnisse

Die Behandlung mit Dapagliflozin führte zu einer reduzierten Anzahl an Leukozyten in 33 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe (Abbildung 25 A, B).

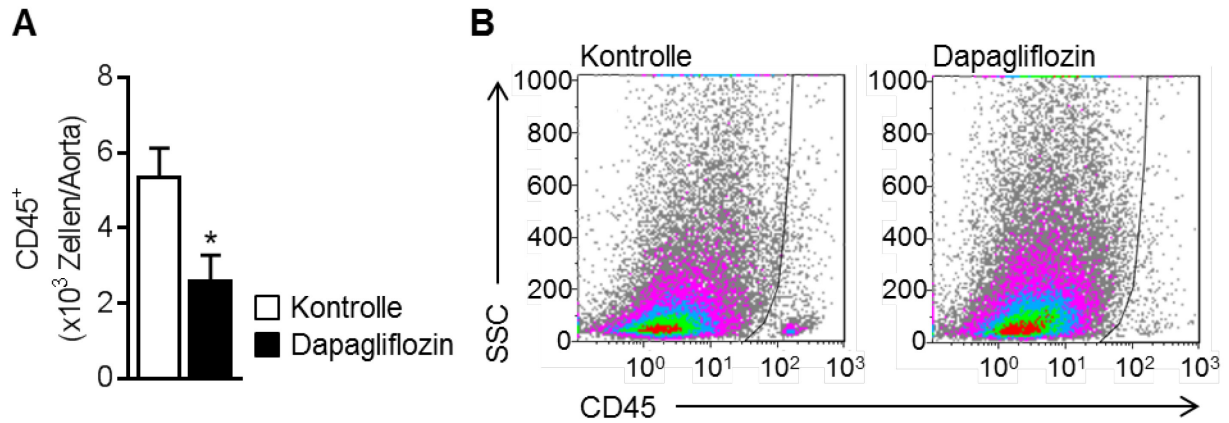


Abbildung 25. Dapagliflozin reduziert Anzahl von Immunzellen in der Aorta.

A Darstellung der absoluten Zellzahlen von Leukozyten (CD45⁺) pro Aorta und **B** exemplarische durchflusszytometrische Plots für die Detektion der Leukozyten (CD45⁺) in der Aorta; n=12,10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

Die Anzahl an Makrophagen und T-Lymphozyten war ebenfalls signifikant geringer in den mit Dapagliflozin-behandelten Tieren (Abbildung 26 A-D).

Ergebnisse

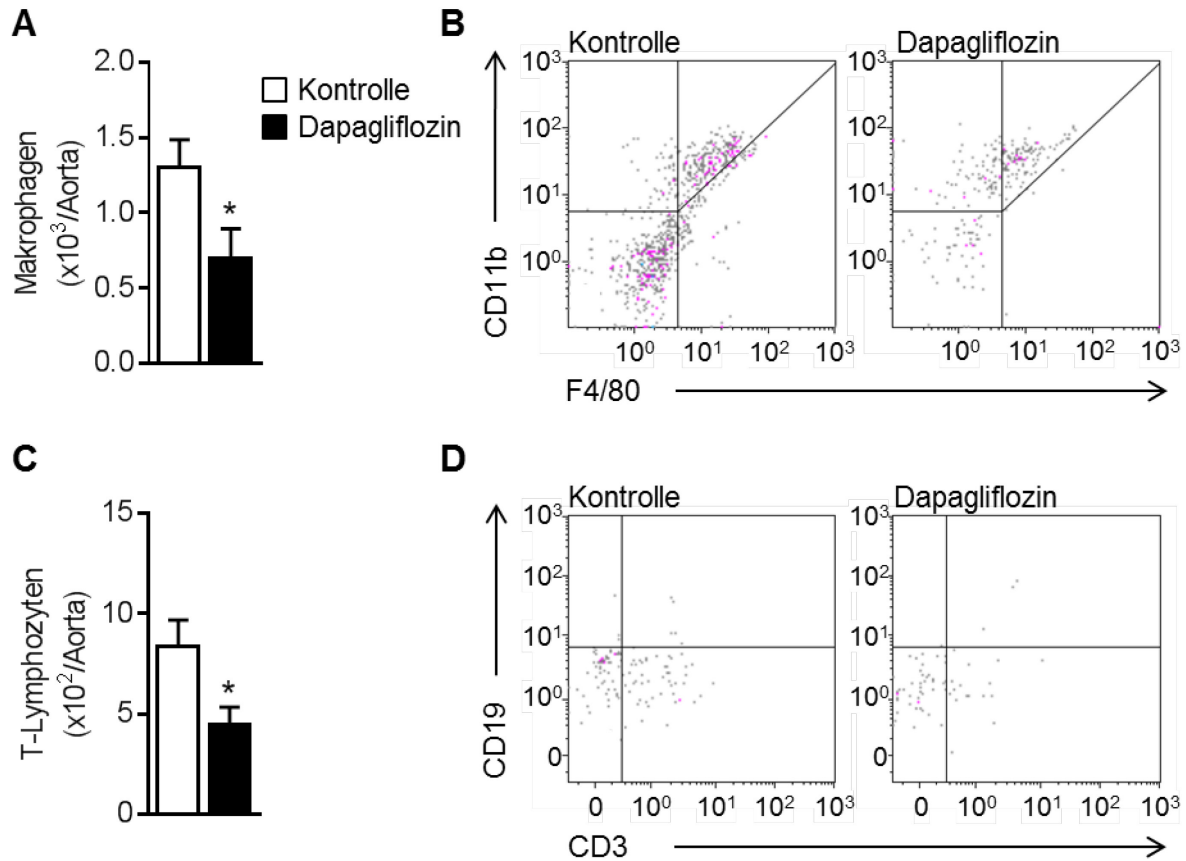


Abbildung 26. Reduzierte Anzahl von Makrophagen und T-Lymphozyten in der Aortenwand nach Behandlung mit Dapagliflozin.

A Quantifizierung der Makrophagenpopulationen (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺) und **B** entsprechende repräsentative Plots von 33 Wochen alten Tieren beider Behandlungsgruppen; n=12,10. **C** Analyse der Lymphozyten und Auswertung der Gesamtzahlen an T-Lymphozyten in der Aorta und **D** repräsentative durchflusszytometrische Plots von 33 Wochen alten Tieren beider Behandlungsgruppen; n=12,10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: *P<0,05 versus Kontrolle.

3.3.3 Genexpression Aorta

Um weitere Hinweise auf zugrundeliegende mechanistische Vorgänge zu erlangen, wurde eine Genexpressionsanalyse in den Aorten der Tiere durchgeführt, die für 25 Wochen mit DD und Dapagliflozin oder DD alleine behandelt wurden. Die aortale Genexpression von Arginase1 mRNA war durch die Behandlung mit Dapagliflozin signifikant reduziert (Abbildung 27 A). Die Arginase2 mRNA Expression, wie auch die Genexpression verschiedener Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, *intercellular adhesion molecule1 (Icam1)* oder *vascular cell adhesion molecule1 (Vcam1)* war nicht unterschiedlich zwischen den beiden Behandlungsgruppen in 33 Wochen alten Tieren (Abbildung 27 B-E).

Ergebnisse

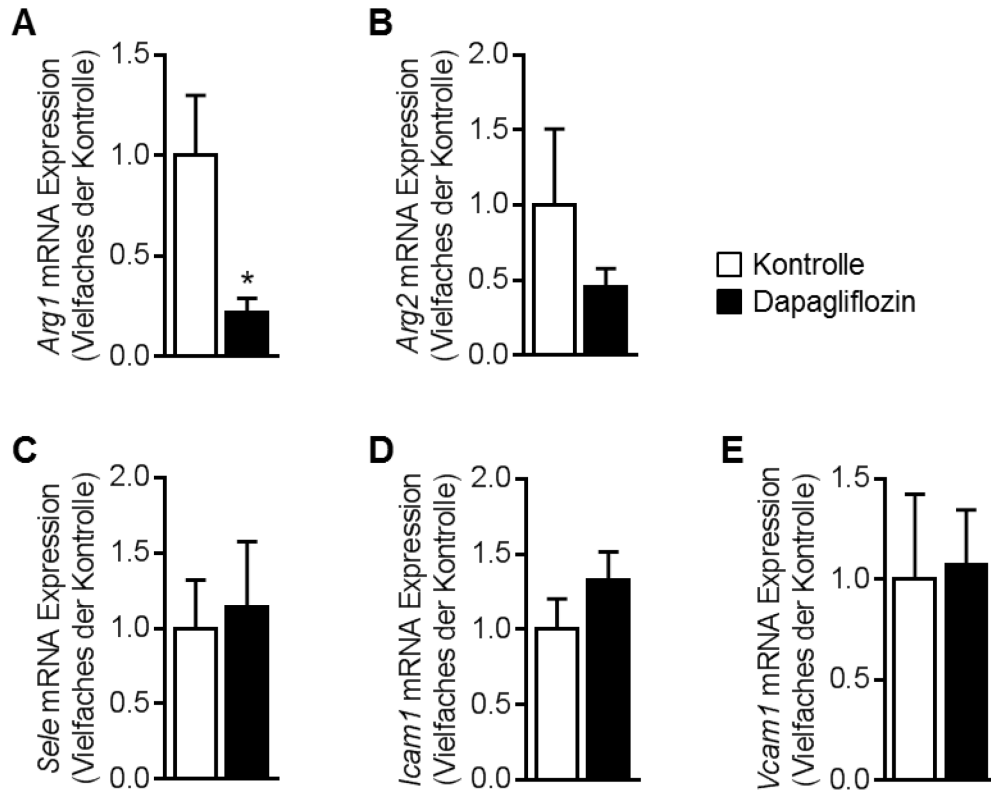


Abbildung 27. Dapagliflozin hemmt aortale Expression von *Arginase1*.

Expression verschiedener Gene in der Aorta von 33 Wochen alten Tieren beider Behandlungsgruppen, n=5,7. **A** Arg1 Arginase1, **B** Arg2 Arginase2, **C** Sele E-Selektin, **D** *Icam1* intercellular adhesion molecule 1, **E** *Vcam1* vascular cell adhesion molecule 1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *Mann-Whitney-Test*: * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

In weiteren Experimenten soll nun untersucht werden, über welche zugrundeliegenden Mechanismen Dapagliflozin an der verringerten Entwicklung atherosklerotischer Läsionen beteiligt ist.

3.3.4 Plaquekomposition

Der Gehalt an verschiedenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix wurde in 5 µm dünnen Paraffinschnitten des Aortenursprunges von 33 Wochen alten Tieren immunhistochemisch untersucht.

Die Analyse der Plaques hat gezeigt, dass die Behandlung mit Dapagliflozin zu einem reduzierten Gehalt von α -Glattmuskelaktin führt (Abbildung 28 A, B).

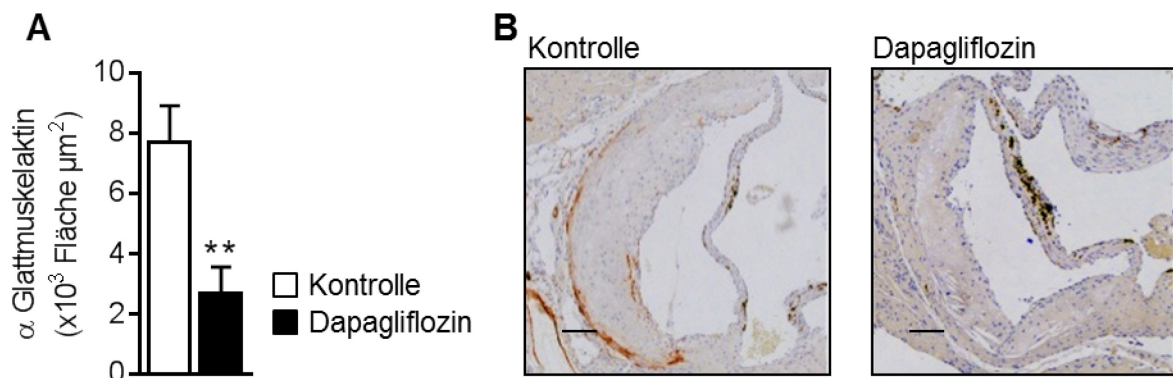


Abbildung 28. Dapagliflozin reduziert Menge an glatten Muskelzellen in atherosklerotischen Läsionen.

A Immunhistochemische Detektion von α -Glattmuskelaktin zur Identifizierung von glatten Muskelzellen in der atherosklerotischen Läsionen von 33 Wochen alten Tieren im Aortenursprung sowie **B** repräsentative Bilder; n=8,12. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: ** $P < 0,01$ versus Kontrolle.

In der vorliegenden Studie ist der Anteil von Biglykan in den atherosklerotischen Läsionen nach Behandlung mit Dapagliflozin im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert (Abbildung 29 A, B).

Das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure ist ebenfalls in geringerer Menge in den Plaques der mit Dapagliflozin behandelten Tiere zu detektieren (Abbildung 29 C, D).

Ergebnisse

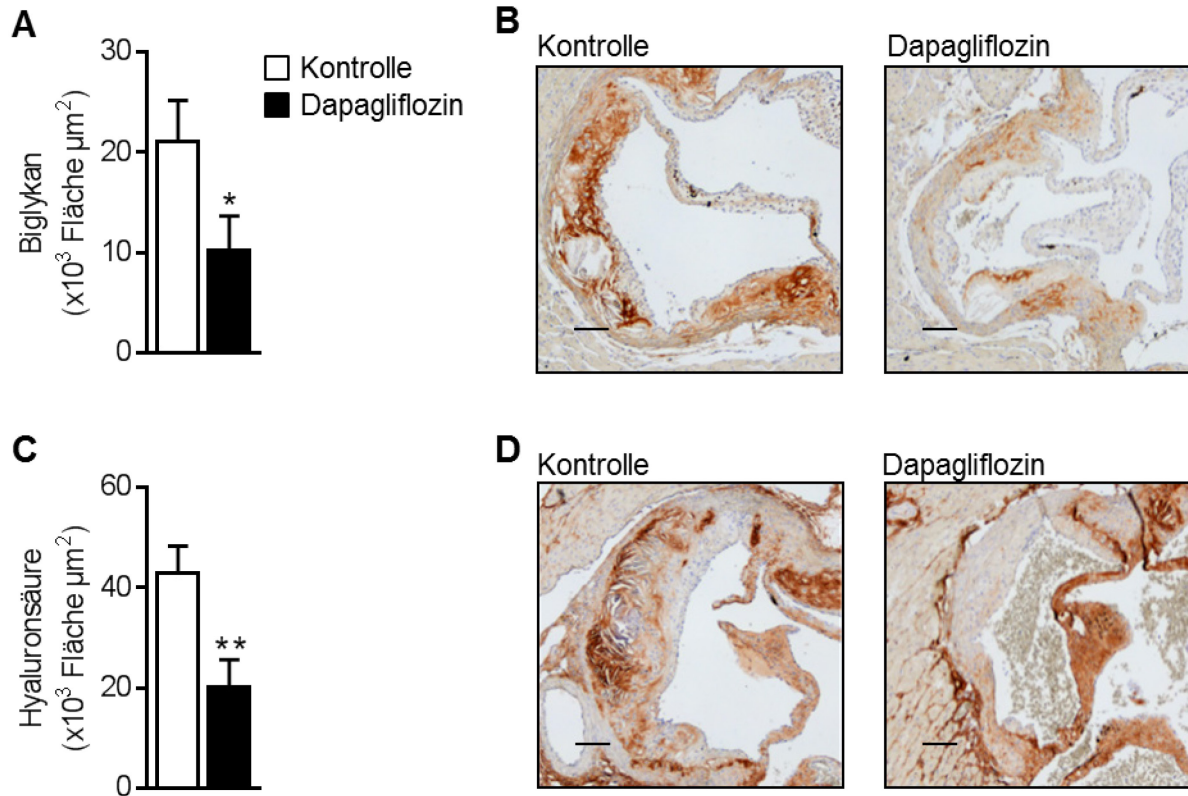


Abbildung 29. Dapagliflozin reduziert Gehalt an Molekülen der Extrazellulärmatrix im Aortenursprung.

A Immunhistochemische Detektion des Proteoglykans Biglykan und **B** Darstellung repräsentativer Aufnahmen; $n=9,10$. **C** Analyse der Hyaluronsäure mit einem Hyaluronsäure-bindenden Protein und **D** exemplarische Aufnahmen angefärbter atherosklerotischer Läsionen im Aortenursprung; $n=9,10$. Die Plaquekomposition wurde in 33 Wochen alten Tieren untersucht. Die Maßstabsbalken entsprechen $100 \mu\text{m}$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: * $P<0,05$ /** $P<0,01$ versus Kontrolle.

3.4 Zirkulierende Immunzellen und Zytokine

Die Beteiligung von inflammatorischen Vorgängen an der Entstehung atherosklerotischer Läsionen ist bekannt und daher kann eine Modulation der Immunzellpopulationen oder Veränderungen im Sekretionsprofil von Zytokinen oder Chemokinen zu veränderten inflammatorischen Vorgängen führen, die sich auch auf die Atherosklerose auswirken können.¹⁴⁹ Aus diesem Grund wurde in den Mäusen eine Analyse der zirkulierenden Immunzellen und des Zytokinsekretionsprofils durchgeführt.

3.4.1 Zirkulierende Immunzellen

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse wurden die zirkulierenden Immunzellen im Blut der Tiere zu beiden Behandlungszeitpunkten untersucht.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Zahl der Leukozyten innerhalb der Behandlungsgruppen zu beiden Zeitpunkten keine Unterschiede zeigte. Insgesamt war die Zahl der Leukozyten zum späten Zeitpunkt etwas höher als zum frühen Zeitpunkt (Abbildung 30 A).

Für die Analyse der verschiedenen Subpopulationen der Immunzellen konnten zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden (Abbildung 30 B-F).

Ergebnisse

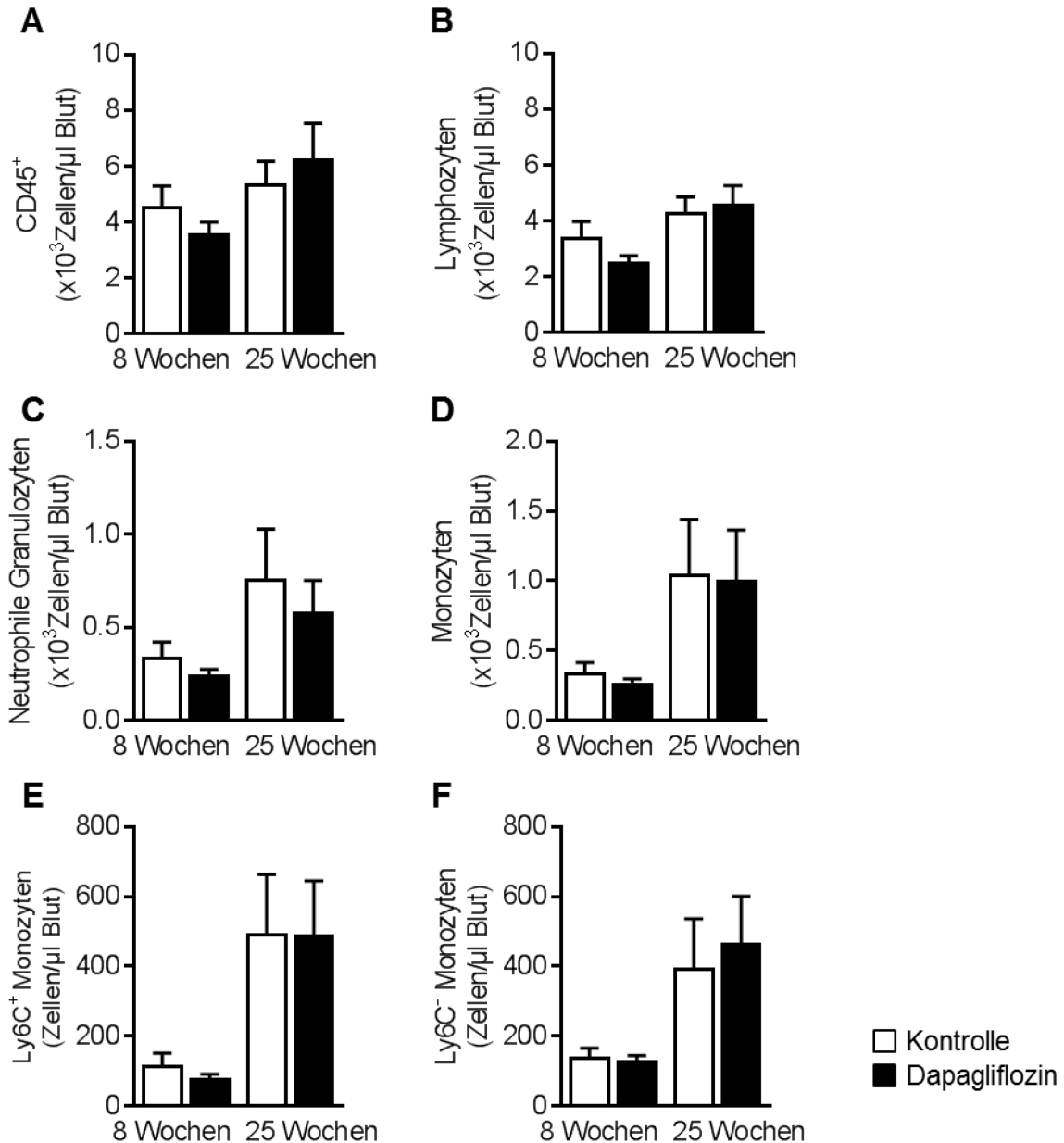


Abbildung 30. Dapagliflozin hat keinen Einfluss auf die Anzahl der zirkulierenden Immunzellen. Immunzellpopulationen von **A** Leukozyten [CD45⁺], **B** Lymphozyten [B-Lymphozyten (CD45⁺CD19⁺)/ T-Lymphozyten (CD45⁺CD3⁺)], **C** neutrophilen Granulozyten [CD11b⁺Ly6G⁺] und **D** Monozyten [CD11b⁺CD115⁺], sowie **E** Ly6C⁺ und **F** Ly6C⁻ Monozyten in Mäusen beider Behandlungsgruppen zu beiden Untersuchungszeitpunkten; n=10,11,9,9. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M..

3.4.2 Zirkulierende Chemokine und Zytokine

Um einen immunologischen Phänotyp, der durch die Behandlung mit Dapagliflozin resultieren könnte, zu detektieren, wurde neben der Analyse der zirkulierenden Immunzellen auch die Konzentration verschiedener Zytokine und Chemokine zu beiden Behandlungszeitpunkten im Plasma der Tiere bestimmt.

Ergebnisse

Diese Messungen wurden von Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr am Deutschen Diabetes-Zentrum, Düsseldorf, durchgeführt.

Hier zeigten sich bei Betrachtung verschiedener proinflammatorischer und antiinflammatorischer Signalmoleküle keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu beiden Untersuchungszeitpunkten (Abbildung 31 A, B).

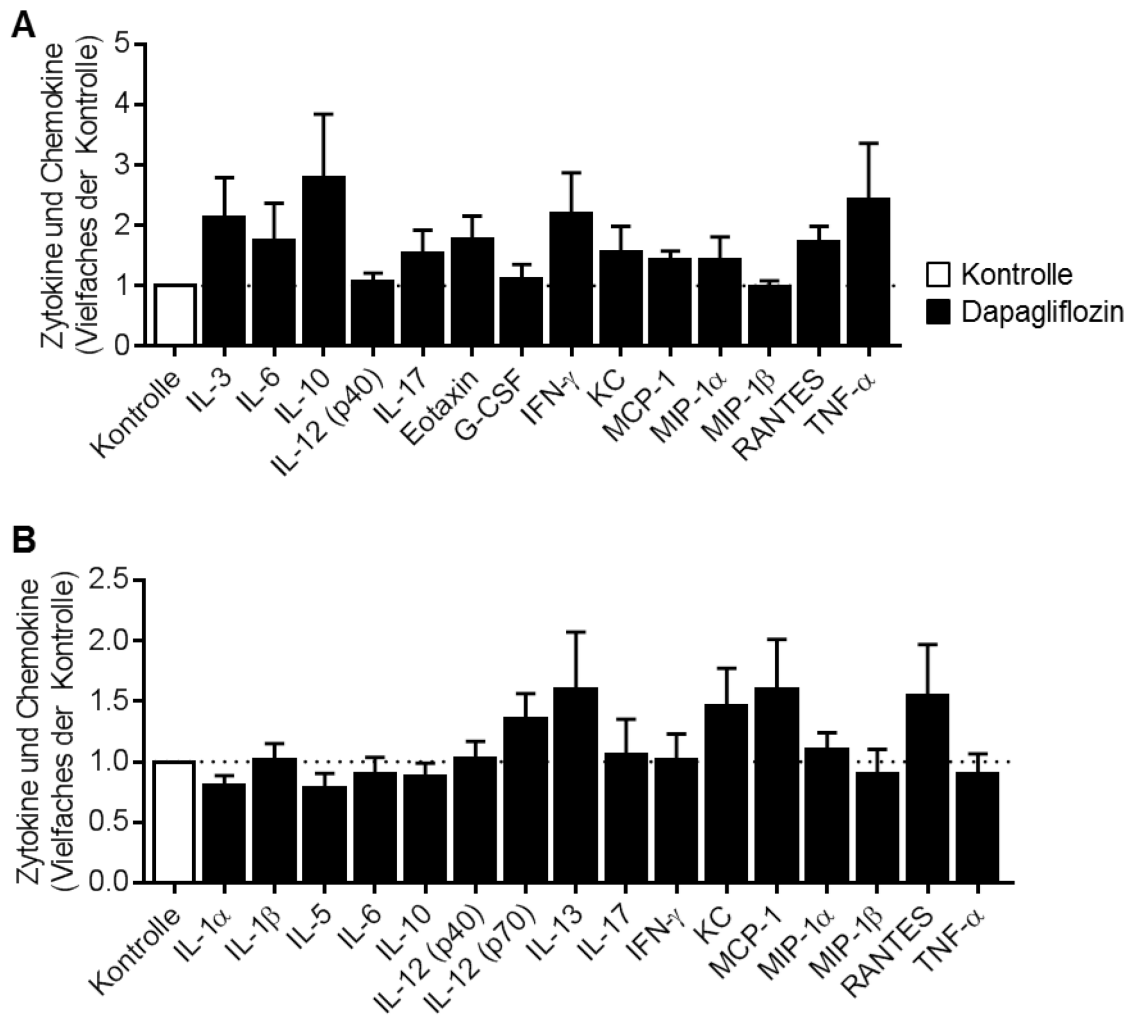


Abbildung 31. Zytokinsekretionsprofil wird durch die Behandlung mit Dapagliflozin nicht verändert.

Eine Multiplexanalyse von Zytokinen und Chemokinen wurde zu beiden Untersuchungszeitpunkten durchgeführt. Zytokin- und Chemokinsekretionsprofil in **A** 16 Wochen und **B** 33 Wochen alten Mäusen beider Behandlungsgruppen; **A** n=4, **B** n=5-8. IL-1 α Interleukin-1 α , IL-1 β Interleukin-1 β , IL-3 Interleukin-3, IL-5 Interleukin-5, IL-6 Interleukin-6, IL-10 Interleukin-10, IL-12 (p40) Interleukin-12 (p40), IL-12 (p70) Interleukin-12 (p70), IL-13 Interleukin-13, IL-17 Interleukin-17, Eotaxin, G-CSF Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor, IFN- γ Interferon- γ , KC CXCL1, MCP-1 *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, MIP-1 α *Makrophage Inflammatory Protein-1 α* , MIP-1 β *Makrophage Inflammatory Protein-1 β* , RANTES *Regulated Upon Activation, Normally T-Expressed, And Presumably Secreted*, TNF- α Tumornekrosefaktor- α . Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M..

3.5 Thrombingenerierung und Thrombozytenaktivierung

Die Serinprotease Thrombin ist an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt.¹⁵⁰ Daher wurden im Folgenden die Effekte von Dapagliflozin auf die Generierung und Aktivität von Thrombin untersucht. Ebenso sind aktivierte Thrombozyten wichtig für die Vermittlung der Adhäsion von Immunzellen an das Gefäßendothel. Ein erhöhter Aktivierungsstatus der Thrombozyten kann das Fortschreiten der Atherosklerose begünstigen.¹⁵¹ Aus diesem Grund wurden auch die Thrombozyten hinsichtlich ihres Aktivierungsstatus durch Analyse der CD62P- und CD41/61-Expression untersucht.

3.5.1 Thrombozytenzahl und Hämatokrit

Zunächst wurde in Vollblut, welches mit EDTA antikoaguliert war, eine Analyse des Hämatokrits, der Thrombozytenzahl und des mittleren Thrombozytenvolumens durchgeführt.

Diese Parameter waren durch die Behandlung mit Dapagliflozin nicht unterschiedlich zwischen den Behandlungsgruppen in 33 Wochen alten Tieren (Abbildung 32 A-C).

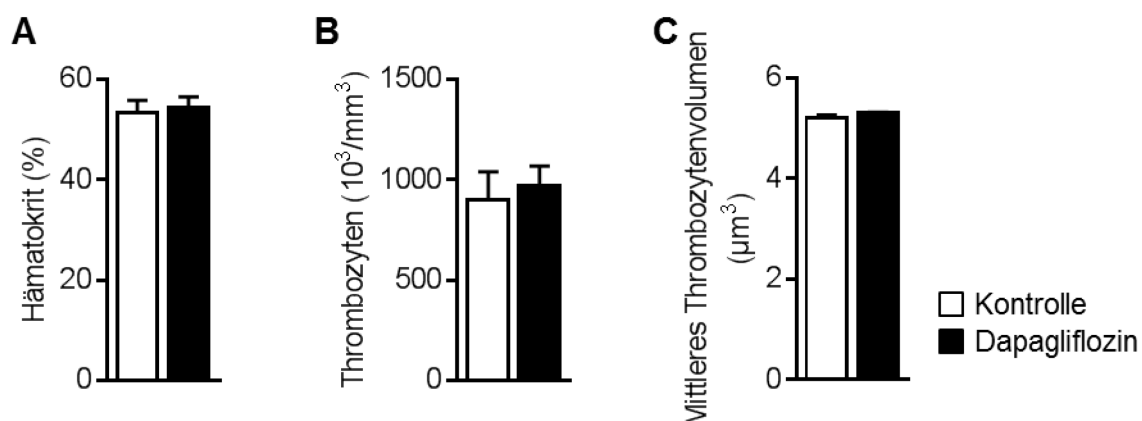


Abbildung 32. Dapagliflozin hat keinen Einfluss auf Hämatokrit und Thrombozytenzahl.

Darstellung von **A** Hämatokrit, **B** Gesamtzahl der Thrombozyten und **C** mittlerem Thrombozytenvolumen im Blut 33 Wochen alter Mäuse beider Behandlungsgruppen, n=5,8. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M..

3.5.2 Thrombinpotential

Die Analyse des ETP erfolgte mit Hilfe der CAT (*Calibrated automated thrombogram*)-Methode in plättchenarmem Plasma zum Untersuchungszeitpunkt nach 25-wöchiger Behandlung.

Ergebnisse

Die Behandlung mit Dapagliflozin resultierte in einer signifikant reduzierten Thrombinbildung (Abbildung 33 A, B). Die maximale Thrombinmenge war ebenfalls deutlich reduziert (Abbildung 33 C). Bezüglich der Kinetik war der Geschwindigkeitsindex der Thrombinbildung durch die Behandlung mit Dapagliflozin erniedrigt (Abbildung 33 D), während die Verzögerungszeit und die Zeit bis zum Peak nicht beeinflusst wurden (Abbildung 33 E, F).

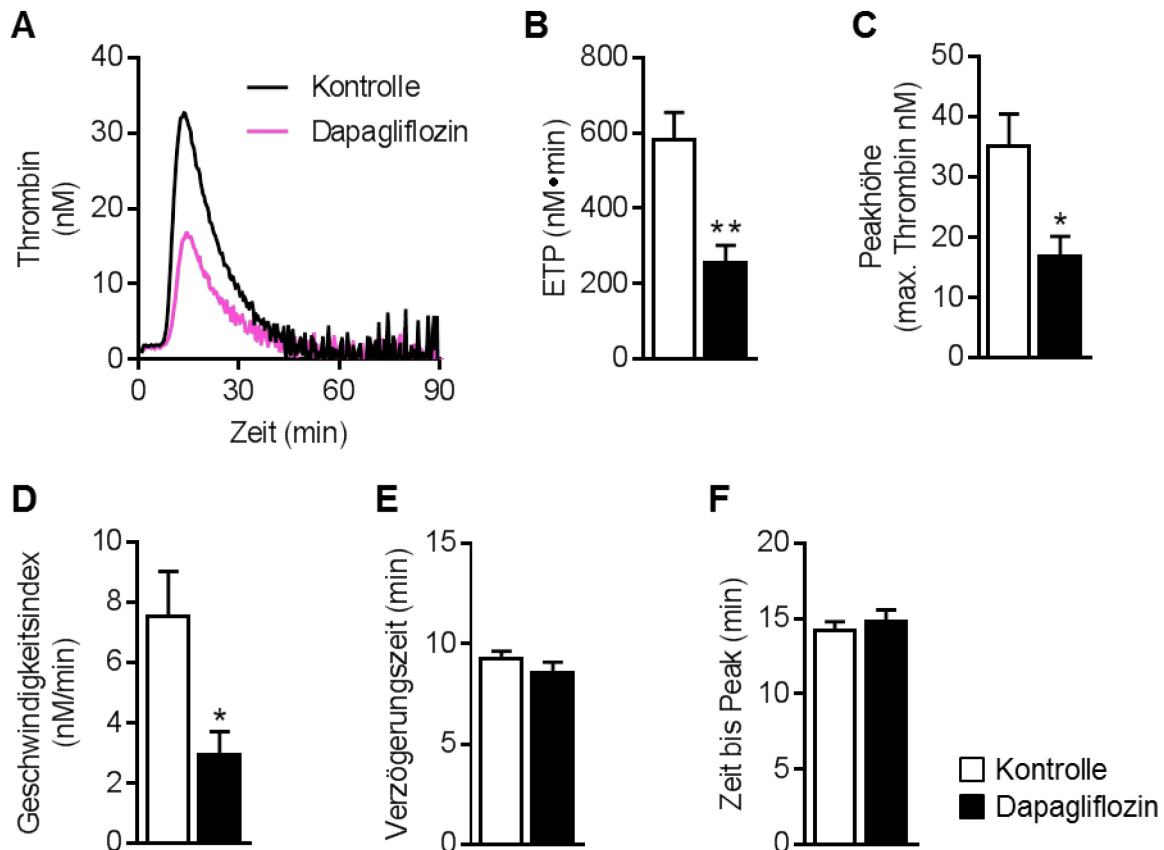


Abbildung 33. Erniedrigtes endogenes Thrombinpotential durch Behandlung mit Dapagliflozin. Die Messung der Thrombingenerierung wurde mit der kalibrierten automatischen Thrombographie durchgeführt. **A** Zeitverlauf der Thrombinbildung im plättchenarmen Plasma in 33 Wochen alten Mäusen beider Behandlungsgruppen. **B** Berechnung des endogenen Thrombinpotentials als Fläche unter der Kurve (ETP) und Darstellung kinetischer Parameter: **C** Peakhöhe, **D** Geschwindigkeitsindex, **E** Verzögerungszeit, **F** Zeit bis Peak, n=5,7. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: *P<0,05/**P<0,01 versus Kontrolle.

Für die Detektion direkter Effekte von Dapagliflozin auf die Bildung von Thrombin wurde eine *ex vivo* Inkubation von plättchenarmem Plasma mit Dapagliflozin (0,5 µM) für 30 min bei 33 °C mit anschließender Messung der Proben durchgeführt.

Direkt konnte kein Einfluss von Dapagliflozin auf die Bildung von Thrombin oder verschiedene kinetische Parameter nachgewiesen werden (Abbildung 34 A-F).

Ergebnisse

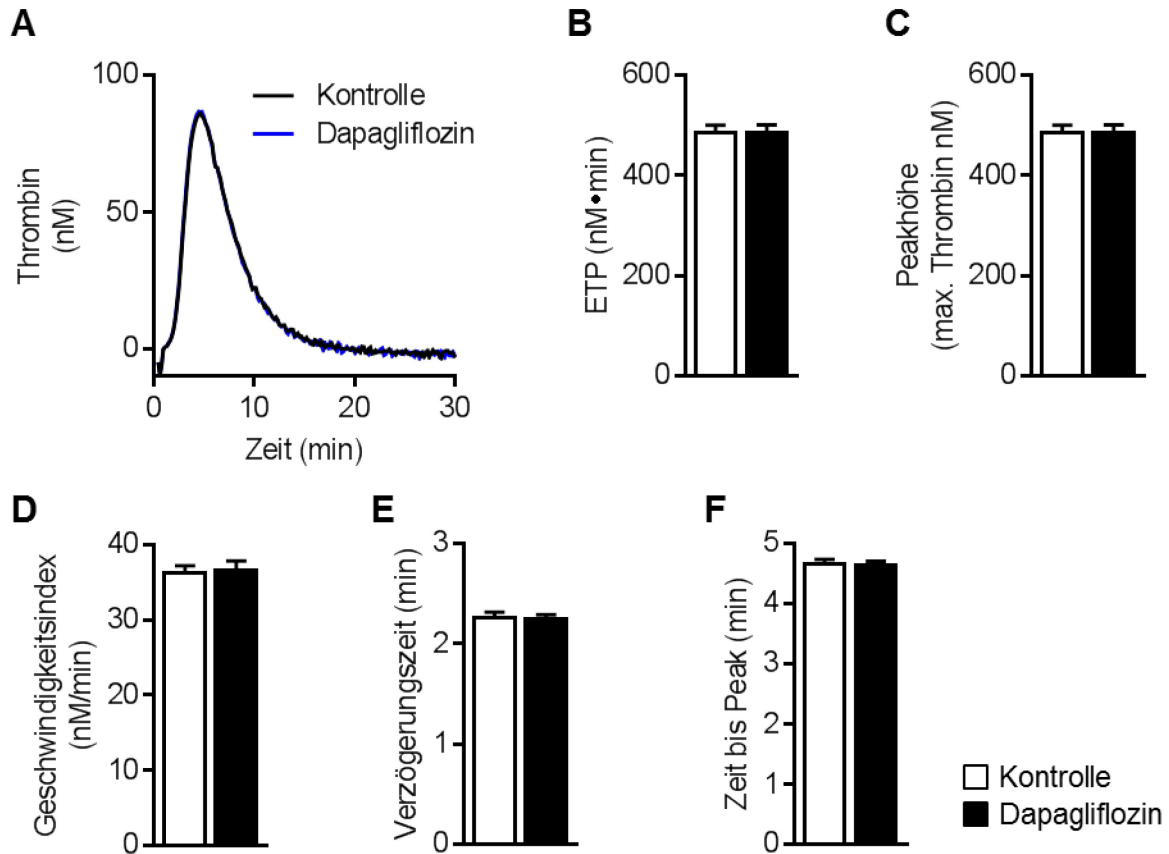


Abbildung 34. Dapagliflozin hat keinen direkten Einfluss auf das endogene Thrombinpotential. Vor Bestimmung des endogenen Thrombinpotentials (ETP) wurde das murine Plasma für 30 min Dapagliflozin (0,5 μ M) *ex vivo* bei 33°C vorinkubiert. **A** Zeitverlauf der Thrombinbildung, **B** Berechnung des ETP als Fläche unter der Kurve und Darstellung kinetischer Parameter: **C** Peakhöhe, **D** Geschwindigkeitsindex, **E** Verzögerungszeit, **F** Zeit bis Peak, n=11,11. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M.

3.5.3 CD62P- und CD41/61-Expression

Die Oberflächen-Expression der Thrombozytenaktivierungsmarker CD41/61 (Glykoprotein IIb/IIIa) und CD62P (P-Selektin) kann einen Hinweis auf einen präaktivierten Status und die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten geben. Aus diesem Grund wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse die CD62P- und CD41/61-Expression auf Thrombozyten beider Behandlungsgruppen untersucht.

Die Analyse der Expression von CD41/61 ergab keine Änderung durch die Behandlung mit Dapagliflozin auf ruhenden oder stimulierten Thrombozyten (Abbildung 35 A-D).

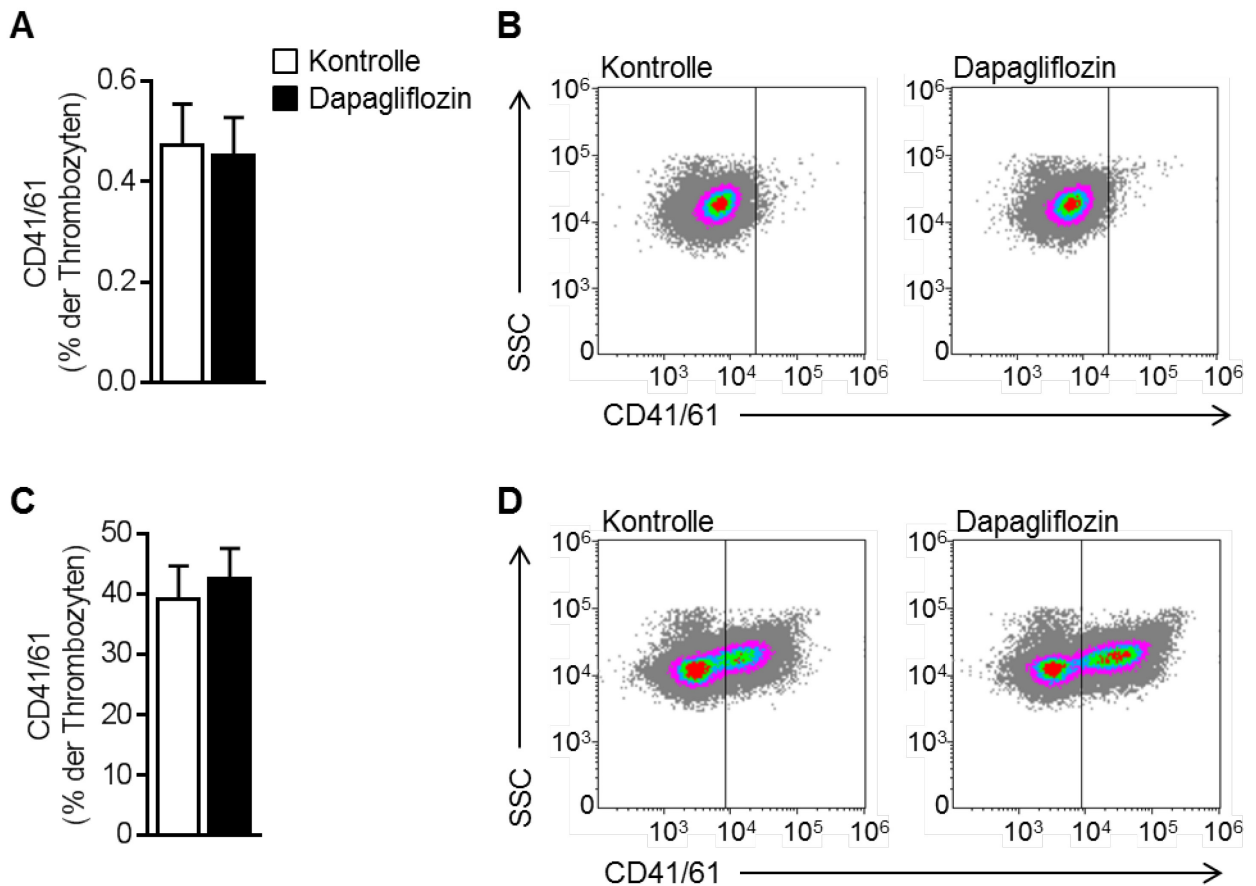


Abbildung 35. CD41/61-Expression auf Thrombozyten wird nicht beeinflusst durch Dapagliflozin.

A Quantifizierung der Expression von CD41/61 (Glykoprotein IIb/IIIa) auf unstimulierten Thrombozyten in 33 Wochen alten Mäusen; n=6,6. **B** Darstellung von durchflusszytometrischen Plots. **C, D** Expression von CD41/61 auf murinen Thrombozyten nach Stimulation mit *collagen related peptide* (CRP, 5 µg/ml); n=6,6. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M..

Zunächst konnte festgestellt werden, dass durch die Fütterung der hochkalorischen Diät und das Fortschreiten der Atherosklerose eine vermehrte Aktivität der Thrombozyten charakterisiert durch erhöhte CD62P-Expression nach 25-wöchiger Behandlung im Vergleich zum Status nach 8-wöchiger Behandlung zu erkennen war (Abbildung 36 A-D).

Bereits nach 8-wöchiger Behandlung war eine geringere CD62P-Expression auf den unstimulierten Thrombozyten der Dapagliflozin-Gruppe erkennbar (Abbildung 36 A, B).

Zum späten Untersuchungszeitpunkt war die Expression von CD62P auf unstimulierten Thrombozyten ebenfalls durch die Behandlung mit Dapagliflozin signifikant reduziert (Abbildung 36 C, D), während nach Stimulation mit *collagen related peptide* (CRP) kein Unterschied hinsichtlich der CD62P-Expression zu detektieren war (Abbildung 36 E, F).

Ergebnisse

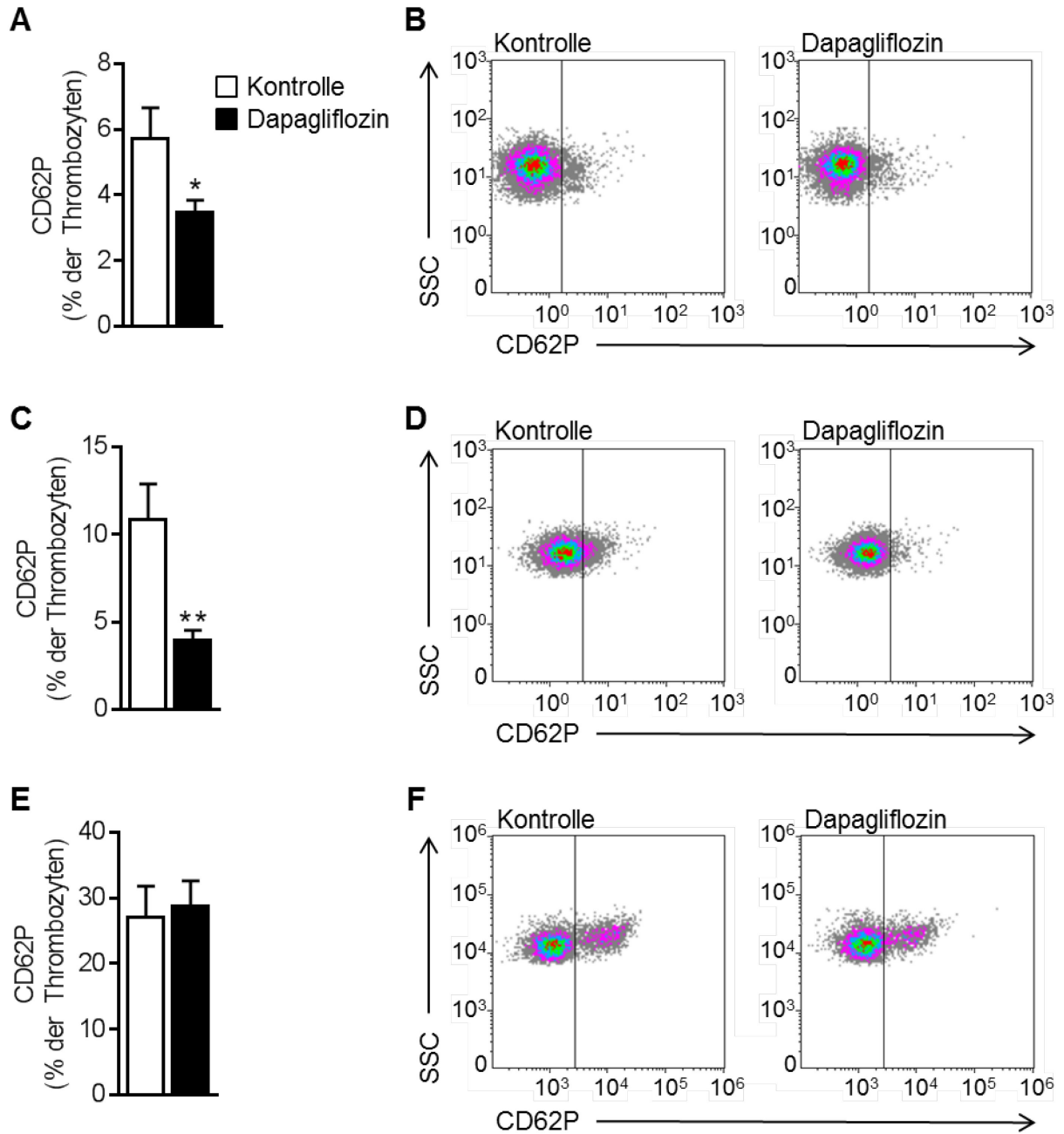


Abbildung 36. CD62P-Expression auf murinen Thrombozyten ist reduziert durch Behandlung mit Dapagliflozin.

A Messung der CD62P-Expression auf unstimulierten Thrombozyten im Blut von 16 Wochen alten Mäusen; n=10,10. **B** Darstellung repräsentativer durchflusszytometrischer Plots 16 Wochen alter Tiere. **C** CD62P-Expression auf unstimulierten Thrombozyten 33 Wochen alter Mäuse, n=14,11. **D** Darstellung von repräsentativen durchflusszytometrischen Plots. **E** Quantifizierung der Expression von CD62P auf Thrombozyten 33 Wochen alter Mäuse beider Behandlungsgruppen, die mit *collagen related peptide* (CRP, 5 µg/ml) stimuliert wurden; n=8,6, und **F** Darstellung repräsentativer Plots. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: * $P < 0,05$ /** $P < 0,01$ versus Kontrolle.

Direkte Effekte von Dapagliflozin auf die Expression von CD62P der murinen Thrombozyten wurden durch *ex vivo* Inkubation von Blut mit der Substanz Dapagliflozin (0,5 µM) für 30 min bei 37 °C untersucht. Hier zeigte sich, dass die Inkubation mit Dapagliflozin die Expression

von CD62P in unstimulierten Thrombozyten verringerte (Abbildung 37 A), während in stimulierten Thrombozyten kein signifikanter Unterschied vorhanden war (Abbildung 37 B). Obwohl diese direkten Effekte von Dapagliflozin eindeutig belegt werden konnten, war es nicht möglich die genetische Expression von *Slc5a2* (kodiert für SGLT2) auf Thrombozyten nachzuweisen (Daten nicht gezeigt), so dass es sich möglicherweise um *off-target* Effekte der Substanz handelt.

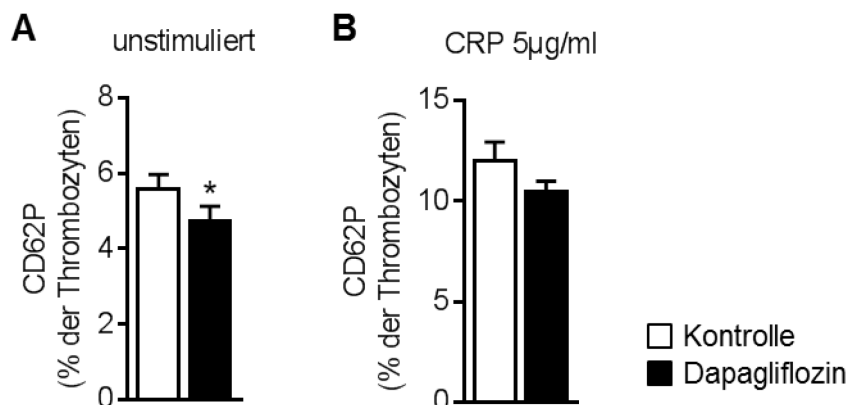


Abbildung 37. Verringerte Expression von CD62P nach ex vivo Inkubation muriner Thrombozyten mit Dapagliflozin.

Das Blut wurde nach Entnahme und Aufreinigung für 30 min bei 37°C mit Dapagliflozin inkubiert, bevor die Antikörperzugabe und Stimulation mit *collagen related peptide* (CRP, 5µg/ml) erfolgten. Abgebildet ist die Quantifizierung der Expression von CD62P auf murinen **A** unstimulierten und **B** stimulierten Thrombozyten; n=10,10. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *paired student's t-test*: *P<0,05 versus Kontrolle.

3.5.4 Blutungszeit

Die Blutungszeit wurde zu beiden Untersuchungszeitpunkten in den Behandlungsgruppen bestimmt um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte auf Plättchenaktivierung und Thrombinaktivität einen Einfluss auf die Blutungsneigung haben.

Es konnte gezeigt werden, dass Dapagliflozin sowohl nach 8-wöchiger Behandlung (Abbildung 38 A) wie auch nach 25-wöchiger Behandlung (Abbildung 38 B) keinen Einfluss auf die Blutungszeit *in vivo* hat.

Ergebnisse

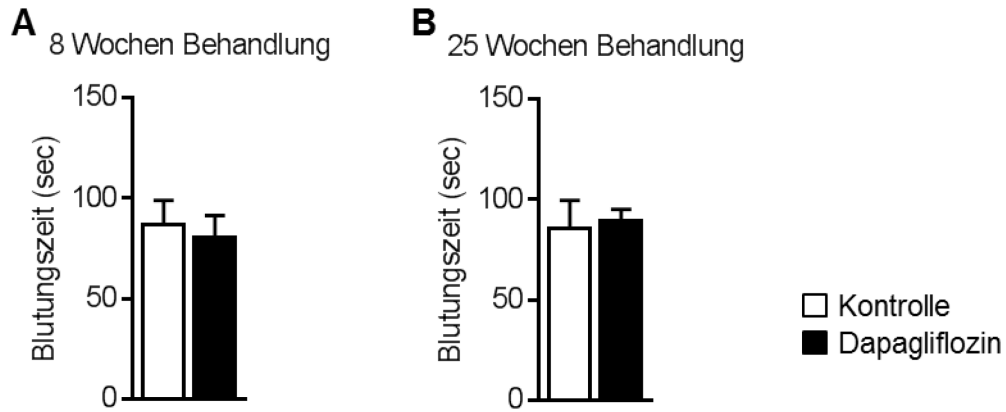


Abbildung 38. Dapagliflozin hat keinen Einfluss auf die Blutungszeit.

Die Zeit vom Abschneiden der Schwanzspitze bis zum Abstoppen der Blutung wurde **A** nach 8-wöchiger und **B** 25-wöchiger Behandlung gemessen und als Blutungszeit dargestellt; n=6,6 (8 Wochen), n=8,8 (25 Wochen). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M..

3.6 Cholesterinstoffwechsel

Cholesterin spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose. Es ist außerdem als kardiovaskulärer Risikofaktor anerkannt und dabei ist neben LDL-C auch der Anteil von HDL-C von Bedeutung. Aus diesem Grund wurden Analysen bezüglich der Cholesterinkonzentrationen im Blut und der Genexpression verschiedener am Cholesterinstoffwechsel beteiligter Gene in der Leber durchgeführt.

3.6.1 Cholesterin im Plasma

Die Cholesterinwerte im Plasma wurden zu beiden Zeitpunkten gemessen und auf den Gehalt von Gesamt-Cholesterin, HDL-C und LDL/VLDL-C analysiert.

Zum frühen Untersuchungszeitpunkt nach einer Behandlungsdauer von 8 Wochen war in den mit Dapagliflozin behandelten Tieren eine signifikant erhöhte Plasmakonzentration von HDL-C zu erkennen (Abbildung 39 B), während das Gesamt-Cholesterin und das LDL/VLDL-C keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen zeigten (Abbildung 39 A, C).

Die Analyse der Cholesterinkonzentrationen im Plasma 33 Wochen alter Mäuse beider Behandlungsgruppen zeigten ebenfalls erhöhtes HDL-C, ohne Effekte auf Gesamt-Cholesterin und LDL/VLDL-C (Abbildung 39 D-F).

Ergebnisse

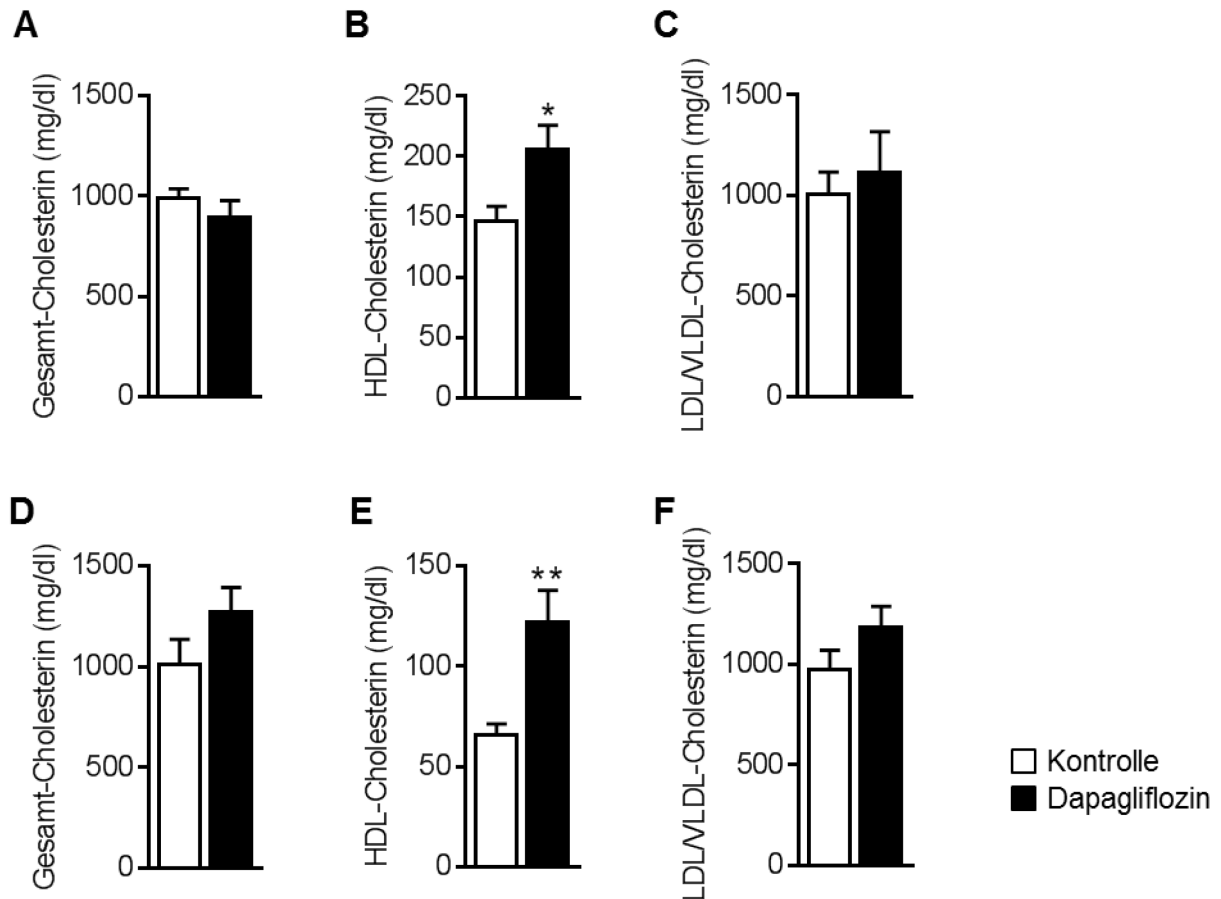


Abbildung 39. Dapagliflozin erhöht HDL-Cholesterin.

Die Konzentrationen von Cholesterin wurden im Plasma beider Behandlungsgruppen gemessen. Darstellung der Menge von **A** Gesamt-Cholesterin, **B** HDL-Cholesterin und **C** VLDL/LDL-Cholesterin nach einer Behandlungsdauer von 8 Wochen; n=9,9. **D** Gesamt-Cholesterin, **E** HDL-Cholesterin und **F** VLDL/LDL-Cholesterin in 33 Wochen alten Tieren; n=15,16. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *unpaired student's t-test*: * $P < 0,05$ /** $P < 0,01$ versus Kontrolle.

3.6.2 Genexpression Leber

Für die Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus, der für die Erhöhung von HDL-C verantwortlich ist, wurde zunächst eine Analyse verschiedener Gene in der Leber durchgeführt, die mit dem HDL-C-Metabolismus in Verbindung stehen.

Es konnte gezeigt werden, dass die hepatische Genexpression von Apolipoprotein A1 sowie Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase nach der Behandlung mit Dapagliflozin bei 33 Wochen alten Mäusen signifikant erhöht war, während die anderen untersuchten Gene durch die Behandlung mit Dapagliflozin nicht beeinflusst wurden (Abbildung 40).

Ergebnisse

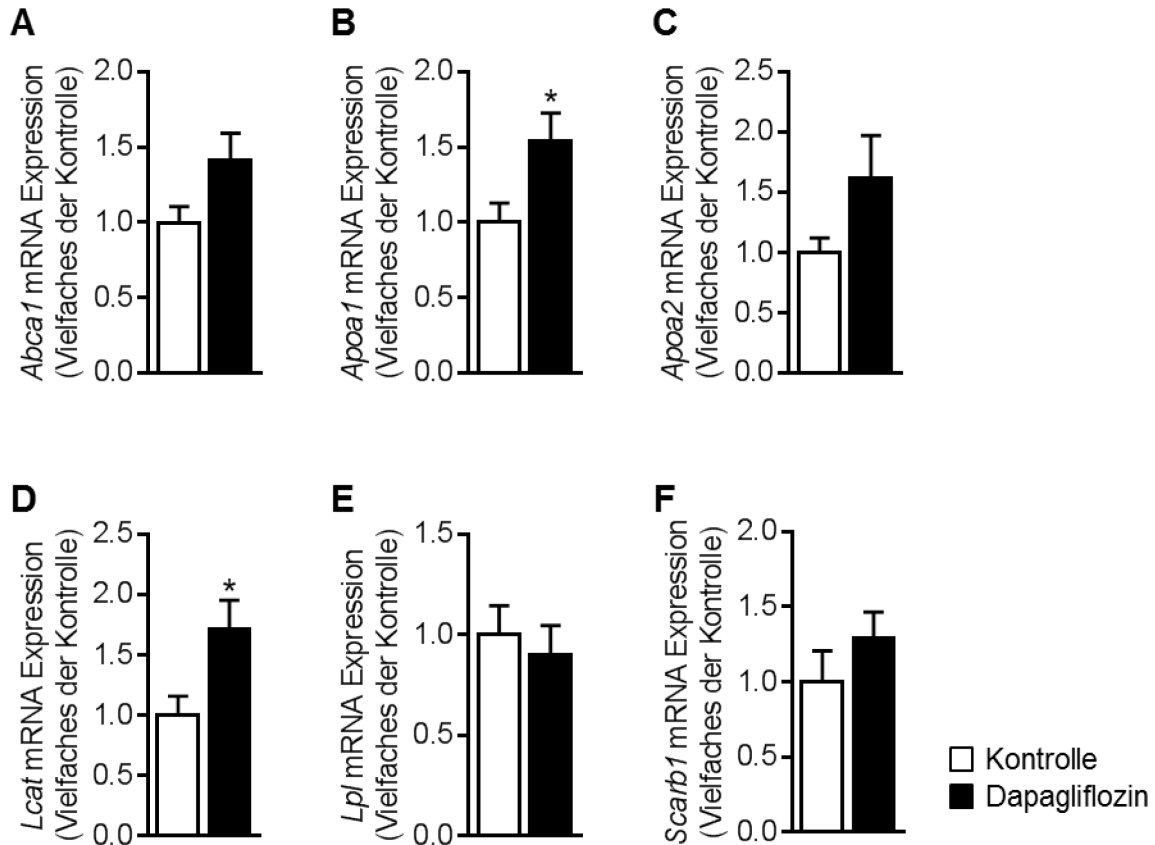


Abbildung 40. Dapagliflozin beeinflusst die hepatische Expression HDL-Cholesterin-Metabolismus assoziierter Gene.

Die hepatische Expression verschiedener, mit dem HDL-Cholesterin-Metabolismus assoziierter, Gene wurde analysiert. **A** *Abca1* ATP-binding cassette transporter 1, **B** *Apoa1* Apolipoprotein A1, **C** *Apoa2* Apolipoprotein A2, **D** *Lcat* Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, **E** *Lpl* Lipoproteinlipase, **F** *Scarb1* Scavenger Rezeptor B1; n=11,11. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit Mann-Whitney test: * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

3.6.3 HDL und Thrombinpotential

Die direkten Effekte von Dapagliflozin wurden auch in humanem Plasma untersucht. Hier konnte analog zu den im Mausmodell erhobenen Daten gezeigt werden, dass Dapagliflozin keinen direkten Einfluss auf das ETP hat (Abbildung 41 A-C).

Aufgrund der beobachteten Erhöhung der Konzentration von HDL-C wurde der Einfluss von HDL auf das ETP untersucht. Hier konnten direkte Effekte von HDL (2 mg/ml) auf das ETP nach Präinkubation für 30 min bei 37 °C gezeigt werden (Abbildung 41 D-F).

Ergebnisse

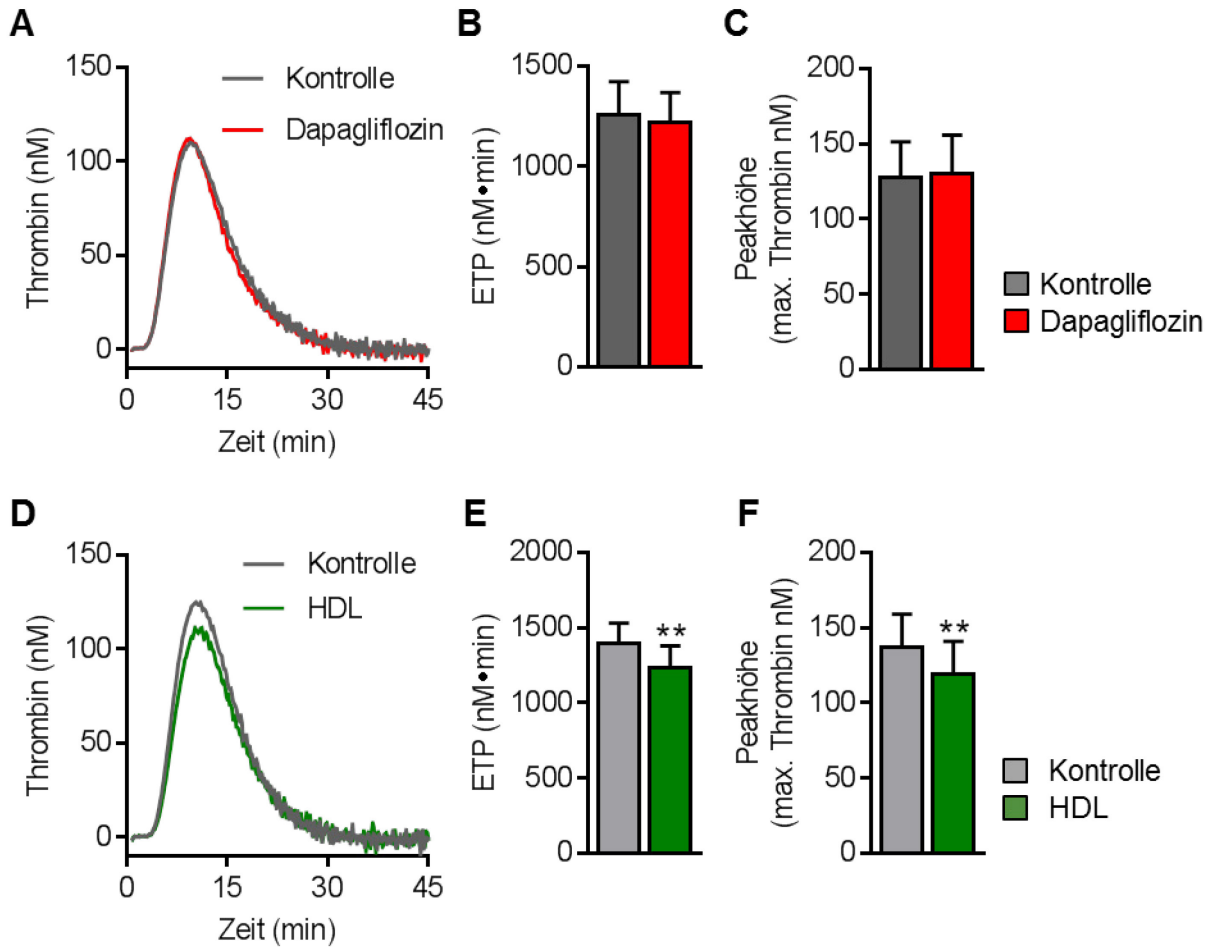


Abbildung 41. HDL verringert die Bildung von Thrombin in humanem Plasma.

A Darstellung der Thrombinaktivität in humanem Plasma nach *ex vivo* Präinkubation mit Dapagliflozin (0,5 μ M), **B** das errechnete endogene Thrombinpotential (ETP) und **C** die Peakhöhe; n=8,8. **D** Kurvenverlauf, **E** ETP und **F** Peakhöhe nach Präinkubation von humanem Plasma mit *High density lipoprotein* (HDL, 2 mg/ml); n=7,7. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., Signifikanzen berechnet mit *paired student's t-test*: *P<0,05/**P<0,01 versus Kontrolle.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen belegen einen hemmenden Einfluss von Dapagliflozin auf die Entwicklung der Atherosklerose im Mausmodell der *Ldlr*-defizienten Maus während der Fütterung einer hochkalorischen DD.

Es konnte gezeigt werden, dass Dapagliflozin in der hier eingesetzten Dosierung die Glukosetoleranz moderat verbessert, jedoch keinen Einfluss auf Nüchternblutglukose, Körpergewicht oder Blutdruck hat.

Ebenfalls konnte kein Einfluss auf die Anzahl der zirkulierenden Immunzellen und die Sekretion von Zytokinen oder Chemokinen beobachtet werden.

Dennoch ließen sich durch Behandlung mit Dapagliflozin eine verringerte Bildung von Thrombin und eine verminderte Expression von CD62P auf Thrombozyten feststellen, letzteres möglicherweise auch durch direkt vermittelte Effekte der Substanz. Parallel wurden erhöhte Plasmakonzentrationen von HDL-C beobachtet, welche möglicherweise auf einer Veränderung der Genexpression in der Leber durch Dapagliflozin beruhen.

Zusätzlich konnten direkte hemmende Einflüsse von HDL auf die Bildung von Thrombin gezeigt werden.

Aufgrund der erhobenen Ergebnisse lässt sich folgende Hypothese bezüglich einer atheroprotektiven Wirkung von Dapagliflozin schlussfolgern:

Dapagliflozin führt nach Einnahme zu einer erhöhten Konzentration von HDL-C im Plasma. HDL-C hemmt die Aktivität der Serinprotease Thrombin und führt zu einer reduzierten Anzahl aktivierter Thrombozyten. Zusätzlich senkt Dapagliflozin auch direkt die Anzahl an aktivierten Thrombozyten. Durch die geringere Zahl an aktivierten Thrombozyten haften weniger Leukozyten am Endothel und es kommt zu einer reduzierten Infiltration von Makrophagen in die aortale Intima. Das Ergebnis dieses Prozesses ist eine verminderte Atherogenese (Abbildung 42).

Die Daten aus dieser Arbeit werden aktuell für die Veröffentlichung vorbereitet und demnächst bei einem wissenschaftlichen Fachjournal eingereicht.

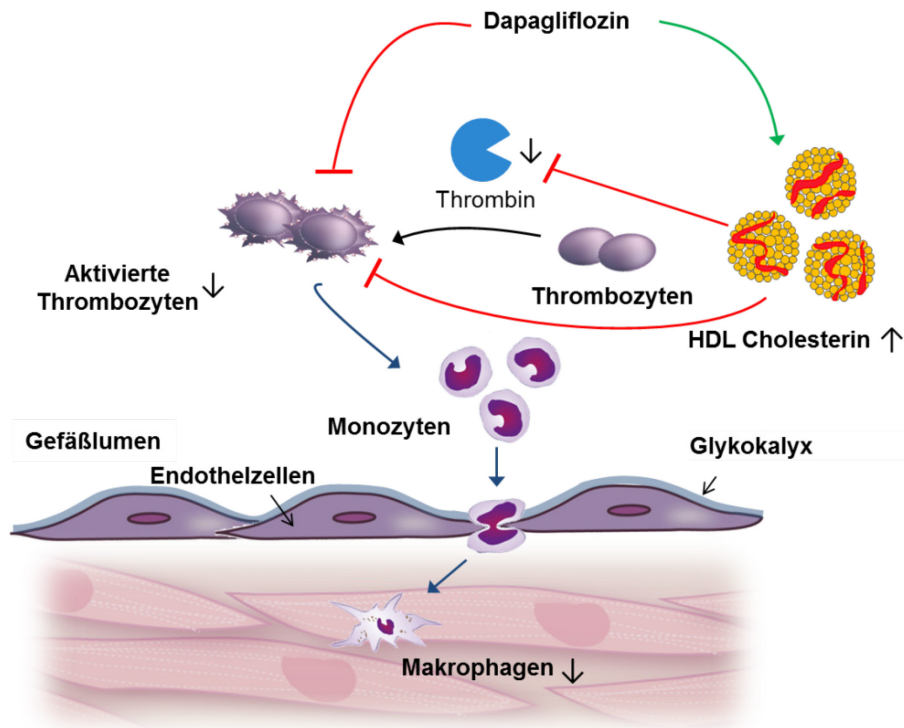


Abbildung 42. Hypothetischer Mechanismus der Atheroprotektion durch Dapagliflozin

4. Diskussion

Aktuell spielt die Suche nach antidiabetischen Medikamenten mit günstigen Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System eine entscheidende Rolle in der wissenschaftlichen Forschung. Erste Studien zeigen bereits protektive Einflüsse einer SGLT2-Inhibition mit Empagliflozin.⁹² Allerdings ist bisher wenig über mögliche zugrundeliegende Mechanismen bekannt. Zudem gibt es bisher keine Untersuchungen, die einen Gruppeneffekt der SGLT2-Inhibitoren belegen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des SGLT2-Inhibitors Dapagliflozin auf kardiovaskuläre Parameter in einem Mausmodell für Atherosklerose und Insulinresistenz untersucht um mögliche zugrundeliegende Mechanismen zu identifizieren.

4.1 Einfluss von Dapagliflozin auf Atherosklerose

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen eine signifikante Reduktion der atherosklerotischen Läsionen durch Behandlung mit dem SGLT2-Inhibitor Dapagliflozin in einem Mausmodell für akzelerierte Atherosklerose und Insulinresistenz.

Die Analyse des Aortenursprunges ergab neben einer Verringerung der Plauefläche ebenfalls eine verminderte Infiltration von Entzündungszellen, wie Makrophagen und T-Lymphozyten, in den mit Dapagliflozin behandelten Tieren.

Die Frage nach einem Zusammenhang zwischen Dapagliflozin und Atherosklerose wurde bereits in früheren Studien adressiert.

Zu diesem Zweck wurden *Apolipoprotein E*-defiziente Mäuse mit Streptozotocin (STZ) behandelt, einem Tiermodell des Diabetes mellitus Typ 1 (DMT1) bei dem eine Hyperglykämie durch den Untergang von β -Zellen induziert wird. Anschließend wurden die Mäuse für 4 Wochen mit Dapagliflozin in einer Dosierung von 1mg/kg Körpergewicht/Tag über das Trinkwasser behandelt. Diese Behandlung resultierte in einer signifikanten Absenkung der Glukose im Blut auf den Wert der Kontrolltiere, die kein STZ erhalten haben. Die Untersuchung der aortalen Plauefläche ergab ebenfalls eine signifikante Reduktion der Plauefläche in den mit Dapagliflozin behandelten hyperglykämischen Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Dapagliflozingabe. In den Kontrolltieren, die nicht mit STZ behandelt wurden und somit auch nicht diabetisch waren, konnte kein Einfluss von Dapagliflozin auf Glukosespiegel im Blut oder den atherosklerotischen Plauescore detektiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Vermutung aufgestellt, dass eine

Reduktion der Blutglukose ursächlich für die Reduktion der atherosklerotischen Läsionen sein müsste.¹⁵²

Eine andere Untersuchung wurde in $Ins2^{Akita}$ Mäusen durchgeführt. Diese Mäuse entwickeln einen spontanen Diabetes durch einen frühen Untergang der β -Zellen im Pankreas, welcher durch eine Mutation des Insulin 2 Genes verursacht wird und stellen ebenfalls ein Modell für den DMT1 dar.¹⁵³ Die Mäuse zeigen deutlich erhöhte Glukosewerte, die durch die Behandlung mit Dapagliflozin in einer Dosierung von 25 mg/kg Körpergewicht täglich über das Trinkwasser signifikant reduziert werden konnten. Mit der Blutzuckersenkung einhergehend wurde auch eine Reduktion der zirkulierenden Monozyten und neutrophilen Granulozyten unter der Behandlung mit Dapagliflozin beobachtet.

Ein weiteres Experiment untersuchte die Regression atherosklerotischer Läsionen in nicht-diabetischen Kontrollmäusen und mit STZ-behandelten diabetischen *Ldlr*-defizienten Mäusen. Zunächst wurden alle Gruppen mit einer cholesterinreichen Diät für 16 Wochen gefüttert. Im Anschluss daran erhielten die Tiere eine SD und wurden zusätzlich mit Dapagliflozin in einer Dosierung von 25 mg/kg Körpergewicht für 6 Wochen behandelt. Hier zeigte sich, dass die Tiere, die Dapagliflozin erhielten, nahezu die gleiche Regression der aortalen Plaquefläche wie die nichtdiabetischen Kontrolltiere aufwiesen. Im Gegensatz dazu wiesen die Tiere nach Gabe von STZ eine deutlich verschlechterte Regression des Plaquebesatzes auf. Auch in diesem Experiment konnte wieder eine gleiche Tendenz für Immunzellen wie $Ly6C^+$ Monozyten und Makrophagen, die mit der Blutzuckersenkung einherging, beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass durch eine Blutzuckersenkung weniger Monozyten im Blut vorhanden sind und somit weniger Monozyten in atherosklerotische Läsionen infiltrieren, so dass hier eine Verbesserung der Regression stattfinden kann.¹⁴⁹

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beobachteten Effekten führten die in der Literatur beschriebenen Tiermodelle, die $Ins2^{Akita}$ -Mäuse und die Behandlung mit STZ, zu einer starken Hyperglykämie ohne Gewichtszunahme oder Einfluss auf das Cholesterin im Plasma. Diese Effekte sind vergleichbar mit dem pathologischen Erscheinungsbild des DMT1 im Menschen. In diesen Mausmodellen wurde durch die Gabe von Dapagliflozin ein deutlicher Effekt auf die Blutzuckersenkung erreicht. Als zugrundeliegender Mechanismus der Atheroprotektion wurde ein Einfluss der Blutzuckersenkung durch SGLT2-Inhibition auf die Immunzellen vermutet.

Eine weitere Studie untersuchte die Gabe von Dapagliflozin (1 mg/kg Körpergewicht/Tag) über 12 Wochen in *Apolipoprotein E*-defizienten Mäusen, die mit cholesterinreicher Diät gefüttert und mit STZ behandelt wurden um eine Hyperglykämie und Atherosklerose zu

erzeugen. In diesem Mausmodell konnte kein Einfluss von der Behandlung mit Dapagliflozin auf das Körpergewicht der Tiere beobachtet werden. Dapagliflozin führte jedoch zu einer deutlichen Senkung der Nüchternblutglukose und zeigte auch hier eine reduzierte Entwicklung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta. Histologisch zeigten die Tiere eine geringere Infiltration von Makrophagen in die atherosklerotischen Läsionen nach Gabe von Dapagliflozin.

In dieser Studie wurde eine höhere Anzahl glatter Muskelzellen in den atherosklerotischen Läsionen der mit Dapagliflozin behandelten Tiere festgestellt, welche im Gegensatz zu der im vorliegenden Modell in dieser Arbeit beobachteten reduzierten Zahl glatter Muskelzellen in der Dapagliflozin-Gruppe steht. Somit könnte der Effekt von der Behandlung mit Dapagliflozin auf die glatten Muskelzellen in atherosklerotischen Läsionen auch abhängig von dem verwendeten Tiermodell sein.

In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausmodell wandern durch die geringere Plaqueläche der mit Dapagliflozin behandelten Tiere möglicherweise weniger glatte Muskelzellen in die atherosklerotischen Läsionen ein. Allerdings kann durch diese Untersuchungen nicht gezeigt werden, ob es sich bei den α -Glattmuskelaktin-exprimierenden Zellen tatsächlich um vaskuläre glatte Muskelzellen, Makrophagen oder Perizyten handelt.^{47,}

154

Die durch die Hyperglykämie und Atherogenese erhöhte Sekretion von IL-1 β und IL-18 nach Aktivierung der *NLR Family Pyrin Domain Containing* (NLRP) 3 konnte durch Dapagliflozin vermindert werden. Ein direkter Einfluss von Dapagliflozin auf Makrophagen *ex vivo* konnte nicht gezeigt werden, so dass als zugrundeliegender Mechanismus die Reduktion der Blutglukose und freien Fettsäuren als Ursache für die verminderte Bildung von IL-1 β und IL-18 vermutet wurde.¹⁵⁵ Auch in dieser Studie wurde das STZ-Modell verwendet, welches den Phänotyp des DMT1 widerspiegelt.

Wichtig hierbei zu betonen, dass Dapagliflozin aktuell ausschließlich zur Behandlung des DMT2 zugelassen ist. Daher wurde für die in dieser Studie beschriebenen Untersuchungen bewusst das Modell der *Ldlr*-defizienten Maus auf C57Bl/6J Zuchthintergrund und Fütterung einer DD eingesetzt, da vorangehende Untersuchungen im Vergleich zu *Apolipoprotein E*-defizienten Tieren und C57Bl/6J Wildtyp-Tieren in den *Ldlr*-defizienten Mäusen eine größere Gewichtszunahme unter Fütterung mit der DD erkennen ließen. Die Entwicklung einer Hyperglykämie und Insulinresistenz war in den *Ldlr*-defizienten Tieren ebenfalls deutlich stärker ausgeprägt als in den *Apolipoprotein E*-defizienten Tieren.¹⁵⁶ Die Entwicklung der Hyperglykämie ist ebenfalls abhängig vom Zuchthintergrund der Mäuse, da in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass C57Bl/6J Mäuse im Vergleich zu A/J Mäusen nach

Fütterung der DD deutlich höhere Nüchternblutglukose- und Insulinplasmaspiegel aufwiesen, so dass sich das verwendete Mausmodell deutlich von den bereits beschriebenen Modell abgrenzt und sich als geeignet zur Untersuchung des diätinduzierten DMT2 mit begleitender Adipositas zeigt.¹⁵⁷

Die aus den bereits veröffentlichten tierexperimentellen Studien hervorgehende Hypothese, dass die protektiven Effekte von Dapagliflozin auf die Atherogenese allein durch die Senkung der Blutglukose bedingt sind, müssen kritisch hinterfragt werden, da auch bei Betrachtung zahlreicher klinischer Studien gezeigt werden konnte, dass eine Blutzuckersenkung allein nicht vor kardiovaskulären Ereignissen schützt.

Die *Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD)* Studie untersuchte den Nutzen einer drastischen HbA1c Senkung im Vergleich zu einer moderaten Senkung des HbA1c. Die Patienten waren im Durchschnitt 62 Jahre alt und die Diagnose DMT2 bestand im Mittel seit 10 Jahren. Der HbA1c Wert vor Therapiebeginn lag durchschnittlich bei 8,1 %. In der Gruppe mit der aggressiven medikamentösen Blutzuckerkontrolle konnte ein mittlerer HbA1c-Wert von 6,4 % erreicht werden, in der Vergleichsgruppe ein mittlerer Wert von 7,5 %. Die Studie wurde vor geplantem Studienende vorzeitig beendet, da beobachtet werden konnte, dass durch eine drastische Senkung des HbA1c-Wertes die Mortalität nicht verringert werden konnte, sondern im Gegenteil sogar erhöht war. Die medikamentöse Therapie beinhaltete vor allem Metformin, Sulfonylharnstoffe, Thiazolidinedione und Insulin. In Bezug auf das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsregimen gezeigt werden. Die aggressive Strategie zur Blutzuckersenkung ging letztlich mit einem Anstieg der Sterblichkeit um 22 % einher.¹⁵⁸

Mit der *Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron-MR Controlled Evaluation (ADVANCE)* Studie untersuchte eine zweite Studie ebenfalls den Einfluss einer aggressiven HbA1c-Senkung auf kardiovaskuläre Ereignisse.

In dieser Studie konnte durch medikamentöse Therapie der HbA1c Wert ebenfalls drastisch auf einen Wert von durchschnittlich 6,5 % gesenkt werden, während in der Vergleichsgruppe im Mittel ein Wert von 7,3 % erreicht wurde. Eine signifikante Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen konnte nicht beobachtet werden. Allerdings zeigte sich in der ADVANCE Studie keine erhöhte Sterblichkeit durch die aggressive Blutzuckersenkung.

Behandelt wurden die Patienten vorwiegend mit Metformin, Sulfonylharnstoffen und Insulin.¹⁵⁹

Die dritte Studie mit der Fragestellung des Nutzens einer drastischen HbA1c Senkung war die *Glucose Control and Vascular Complications in Veterans with Type 2 Diabetes* (VADT). Hier wurden 1791 Veteranen mit DMT2 über 7,5 Jahre beobachtet. Der mittlere HbA1c-Wert in der Gruppe mit aggressiver Blutzuckersenkung lag bei 6,9 %. Ebenso wie in den beiden anderen Studien konnte auch hier keine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse gezeigt werden.¹⁶⁰

Jedoch war in allen drei zitierten Studien eine höhere Zahl an Hypoglykämien und eine stärkere Gewichtszunahme in der Gruppe mit starker HbA1c-Senkung zu erkennen als in der Kontrollgruppe.

Aus diesem Grund ist fraglich, ob der Effekt einer alleinigen Blutzuckersenkung so valide beurteilt werden kann und eventuell durch den Einsatz neuer Medikamente, die nur ein geringes Hypoglykämierisiko aufweisen und keine Gewichtszunahme verursachen, andere Ergebnisse erzielt werden könnten. Jedoch erscheint es wahrscheinlich, dass zur Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse neben der Blutzuckersenkung auch weitere Faktoren berücksichtigt werden müssen. In der Tat werden aktuell verschiedene Mechanismen im Hinblick auf die SGLT2-Inhibitoren neben einer verringerten Glukosetoxizität diskutiert, die sich potenziell günstig auf kardiovaskuläre Ereignisse auswirken könnten. Die Ausscheidung von Glukose über den Urin führt zu einem erhöhten Verlust an Kalorien, welcher sich in einer Reduktion des Körpergewichts auswirkt und zu einer verringerten Körperfettmasse führt.¹⁶¹ Möglicherweise kann so ebenfalls der kardiale Fettgehalt herabgesetzt und die Inflammation und Fibrose des Myokards verhindert werden.¹⁶² Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Elastizität der arteriellen Gefäßwände durch SGLT2-Inhibition verbessert werden konnte.¹⁶³ Die durch den Wirkmechanismus ebenfalls bedingte Natriurese führt zu einem verringerten Plasmavolumen und einer Absenkung des Blutdruckes, unter Ausbleiben einer kompensatorischen Aktivierung des Sympathikus.¹⁶⁴

Bei der Suche nach zugrundeliegenden Mechanismen für die verringerte Bildung atherosklerotischer Läsionen in den hier vorliegenden Experimenten werden abgesehen von der Blutglukosesenkung weitere zugrundeliegende Mechanismen vermutet, da bei der eingesetzten Dosierung im vorliegenden Tiermodell deutlich geringere Unterschiede durch die Behandlung mit Dapagliflozin auf die Blutglukose als in den oben genannten Studien zu beobachten waren.

Die Entstehung und das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen werden durch die Infiltration von Immunzellen begünstigt. In den oben genannten Tierstudien wurden jeweils

Diskussion

Veränderungen der Immunzellen oder Zytokine durch die starke Blutzuckersenkung beobachtet. Im vorliegenden Fall kann jedoch die reduzierte Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen in den mit Dapagliflozin behandelten Tieren nicht auf die zirkulierenden Immunzellen im Blut bezogen werden, da zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu erkennen waren. Die reduzierte Zahl an Makrophagen und T-Lymphozyten in den Läsionen der Dapagliflozin-behandelten Tiere ist somit am ehesten durch eine verringerte Infiltration zu erklären, deren Ursache nicht ausschließlich auf Veränderungen der Blutzuckerwerte beruht.

Das Körpergewicht der Tiere als zugrundeliegende Ursache an den beobachteten Unterschieden im Hinblick auf die Atherosklerose kann ebenso ausgeschlossen werden, da zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen beobachtet werden konnte. Lediglich die Körperfettmasse war zum frühen Behandlungszeitpunkt im Alter von 16 Wochen in der Dapagliflozin-Gruppe geringer als in der Kontrollgruppe. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen aus klinischen Studien. Es konnte gezeigt werden, dass Dapagliflozin als Zusatz zu einer bestehenden Therapie mit Metformin über 24 Wochen in der Lage war das Gesamt-Körpergewicht wie auch die Körperfettmasse zu reduzieren.¹¹⁴ Dapagliflozin konnte auch in der Monotherapie über 12 Wochen das Körpergewicht in Patienten mit DM2 reduzieren.¹⁶⁵ Interessanterweise zeigen auch andere Studien in Mäusen, dass Dapagliflozin in einer Dosierung von 1mg/kg/Tag keinen Einfluss auf das Körpergewicht hat und sogar das Körpergewicht unter der Gabe von Dapagliflozin 0,1 oder 1 mg/kg Körpergewicht/Tag erhöht ist.^{152, 166}

In klinischen Studien wurde gezeigt, dass Dapagliflozin und auch andere SGLT2-Inhibitoren zu einer Senkung des Blutdruckes führen können.^{92, 167-169} Aus diesem Grund wurde bei den Mäusen der Blutdruck untersucht, da auch eine Senkung des Blutdrucks atheroprotektive Auswirkungen haben kann. Allerdings zeigte die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Dosis von Dapagliflozin in dem vorliegenden Mausmodell zu beiden Untersuchungszeitpunkten keinen Einfluss auf systolischen oder diastolischen Blutdruck oder die Herzfrequenz.

Die Plaquekomposition der atherosklerotischen Läsionen im Aortenursprung war nach der Behandlung mit Dapagliflozin dahingehend verändert, dass geringere Mengen des Proteoglykans Biglykan und des Glykosaminoglykans Hyaluronsäure detektiert werden konnten.

Biglykan gehört zu den Chondroitinsulfat-/Dermatansulfat-enthaltenden kleinen leucinreichen Proteoglykanen. Die Rolle von Biglykan in der Atherosklerose ist vielfältig. Zum einen wurde beschrieben, dass Biglykan an der Anreicherung von Lipoproteinen in der Intima in frühen

atherosklerotischen Läsionen beteiligt ist.¹⁷⁰ Allerdings gibt es Untersuchungen in *Biglykan/Apolipoprotein E*-defizienten Mäusen, die eine akzelerierte Atherosklerose im Vergleich zu *Apolipoprotein E*-defizienten Kontrollmäusen beobachteten. Mechanistisch wurde gezeigt, dass die Chondroitinsulfat-Seitenketten des Biglykan-Core-Proteins über Heparin Cofaktor II eine Hemmung von Thrombin vermitteln und somit die Interaktionen zwischen Thrombozyten und dem Endothel reduzieren.¹⁷¹ Welche Funktion Biglykan im Rahmen der Dapagliflozin-vermittelten Atheroprotektion besitzt wurde in dieser Studie nicht untersucht.

Die Plauekomposition kann Hinweise auf die Stabilität und das Rupturrisiko von atherosklerotischen Plaques geben, jedoch kann im vorliegenden Modell der reduzierte Gehalt der untersuchten Extrazellulärmatrixmoleküle auch in der geringeren Plauegröße der Tiere begründet sein.^{172, 173}

Genexpressionsanalysen der Aorta zeigten eine deutlich verringerte Expression von *Arginase1* mRNA, ein hepatisches Enzym mit wichtiger Funktion im Harnsäurezyklus, während kein Einfluss auf die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle detektierbar war.¹⁷⁴ Es ist beschrieben, dass in diabetischen Mäusen erhöhte Mengen von Arginase1 in der Aorta vorhanden sind.¹⁷⁵ Molekularbiologische Untersuchungen haben eine Thrombin-vermittelte Induktion der Genexpression von *Arginase1* über Aktivierung des Transkriptionsfaktors Aktivator-Protein-1 (AP-1) nachgewiesen.¹⁷⁶ Arginase 1 ist am enzymatischen Abbau von L-Arginin beteiligt und kann somit möglicherweise die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid limitieren.¹⁷⁷

Um die genaue Bedeutung von Arginase1 in der Dapagliflozin-vermittelten Atheroprotektion zu identifizieren, müssten jedoch weiterführende Experimente durchgeführt werden.

4.2 Einfluss von Dapagliflozin auf HDL-Cholesterin

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion atherosklerotischer Läsionen, die gleichzeitig mit erhöhten Plasmakonzentrationen von HDL-C beobachtet werden konnte. Dieser Einfluss zeigte sich zum frühen Beobachtungszeitpunkt nach 8-wöchiger Behandlung mit Dapagliflozin und war auch nach 25-wöchiger Behandlung noch vorhanden. Der blutglukosesenkende Effekt von Dapagliflozin war in den aktuellen Untersuchungen eher gering im Vergleich zu bereits publizierten Daten, so dass eine mechanistische Beteiligung der erhöhten HDL-C-Plasmakonzentrationen an der Atheroprotektion naheliegt.

Der inverse Zusammenhang zwischen den Plasmakonzentrationen von HDL-C und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden.¹⁷⁸⁻¹⁸⁵ Über welche zugrundeliegenden molekularen Mechanismen diese Effekte vermittelt werden ist bis heute nicht vollständig bekannt.

In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Plasmakonzentrationen von lipidarmen Apolipoprotein A1 zu einem Anstieg des reversen Cholesterintransportes führt.¹⁸⁶ Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass HDL direkte anti-atherogene Eigenschaften aufweist. So reduzierten wöchentliche Infusionen von HDL bei Kaninchen mit cholesterinreicher Diät die aortalen Lipideinlagerungen signifikant und bewirkten eine Regression der aortalen Atherosklerose um 50 %.¹⁸⁷ Weitere Untersuchungen in genetisch modifizierten Tieren haben gezeigt, dass eine Überexpression von humanem *APOA1* Gen in Kaninchen und Mäusen einen Anstieg der Konzentration von HDL-C bewirkt, welcher die Tiere vor Diät-induzierter Atherosklerose wie auch vor Atherosklerose durch genetische Modifikation in *Apolipoprotein E*-defizienten und *Ldlr*-defizienten Tieren schützen konnte.¹⁸⁸⁻¹⁹¹

Ebenso konnte beim Menschen gezeigt werden, dass eine Infusion von Apolipoprotein A1 Partikeln zu einer Reduktion koronarer atherosklerotischer Plaques führt.¹⁹² Es wird angenommen, dass HDL-C am reversen Cholesterintransport sowie dem Schutz des LDL vor oxidativer Modifikation und auch an der Hemmung der Zytokin-induzierten Expression von Adhäsionsmolekülen beteiligt ist.¹⁹³⁻¹⁹⁵ Unter dem reversen Cholesterintransport wird die Fähigkeit bestimmter Komponenten des HDL verstanden Cholesterin aus arteriellen Schaumzellen aufzunehmen und zur Leber zu transportieren, wo dieses biliär ausgeschieden wird.¹⁹⁶ Durch den Abtransport von Cholesterin aus den Zellen ist HDL möglicherweise in der Lage die intimale Migration und anschließende Oxidation des LDL abzuschwächen.^{197, 198} Später wurde diese Hypothese noch durch die Annahme ergänzt, dass durch den vermehrten Cholesterinabtransport eine verminderte Entzündungsreaktion in

den atherosklerotischen Plaques vorliegt und somit final eine Reduktion der Läsionen in der Gefäßwand resultiert.^{196, 199}

Bei vergleichender Untersuchung des Cholesterin-Efflux durch HDL und Apolipoprotein A1 in Probanden mit und ohne heterozygote *ABCA1*-Defizienz konnte eine enge Korrelation zwischen Intima-Media-Dicke und HDL-C im Plasma gezeigt werden.²⁰⁰ Der Einfluss des Cholesterin-Efflux auf Atherosklerose konnte durch Daten aus Mäusen, in denen selektiv in Makrophagen die Expression von *Abca1* gehemmt wurde, bestätigt werden. Diese Tiere zeigten eine verstärkte Entwicklung atherosklerotischer Läsionen ohne Einfluss auf Lipoproteinkonzentrationen im Plasma.²⁰¹

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Annahme getroffen, dass auch therapeutisch durch Erhöhung des HDL-C das Risiko für eine koronare Herzkrankheit verringert werden könnte.

Zwei große klinische Studien, die den Effekt einer therapeutischen Wirkung von HDL-C untersuchten, wurden aufgrund von fehlendem Nutzen frühzeitig beendet. Die „*Niacin in Patients with Low HDL Cholesterol Levels Receiving Intensive Statin Therapy*“ (AIM-HIGH) Studie untersuchte in einem Patientenkollektiv mit atherosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen, niedrigem HDL-C und Statintherapie, ob die Patienten von einer Erhöhung von HDL-C durch Gabe von Niacin weiter profitieren würden. Niacin führte zu einer Erhöhung der HDL-C-Werte im Plasma von etwa 25 %, ein klinischer Nutzen konnte innerhalb der 36-monatigen Nachbeobachtungsphase nicht belegt werden.²⁰²

In der „*Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome*“ (dal-OUTCOMES) Studie wurden Patienten mit akutem Koronarsyndrom mit dem CETP-Hemmstoff Dalcetrapib oder Placebo als Zusatz zur Standardtherapie behandelt. Dalcetrapib erhöhte die Plasmakonzentration von HDL-C um 30-40 %, konnte aber das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse nicht beeinflussen.²⁰³

Aus diesen Gründen steht die HDL-C Hypothese aktuell auf dem Prüfstand.

Es stellt sich nun die Frage warum die Ergebnisse der klinischen Studien nicht mit den vorher beobachteten positiven Effekten von Apolipoprotein A1 der präklinischen Studien in Einklang stehen.

An dieser Stelle spielt die genaue Zusammensetzung des HDL-C eine wichtige Rolle. Im Tiermodell wurden durch eine genetische Überexpression von *Apoa1* lipidarme Partikel produziert, die besonders gut Cholesterin aufnehmen können. Eine ähnliche Beschaffenheit wiesen die injizierten Partikel aus den humanen Studien auf. Die durch Niacin oder Dalcetrapib produzierten HDL-Partikel waren eher cholesterinreich und hatten somit nicht

das gleiche Potential weiteres Cholesterin aufzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass HDL-Partikel die nach Gabe von Niacin oder Dalcetrapib gebildet werden keinen Einfluss auf den reversen Cholesterintransport haben.^{204, 205}

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen im Mausmodell zeigen eine erhöhte Menge von HDL-C, die zeitgleich mit einer verminderten Entwicklung von atherosklerotischen Plaques vorliegt.

Die Frage, über welchen Mechanismus Dapagliflozin diesen Anstieg verursacht, bleibt jedoch unbeantwortet.

Zur Klärung dieser Frage wurde in der vorliegenden Untersuchung die Expression verschiedener Gene in der Leber untersucht, die eine Bedeutung im HDL-C-Stoffwechsel haben.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die hepatische Genexpression von Apolipoprotein A1 und LCAT durch die Behandlung mit Dapagliflozin erhöht war. Apolipoprotein A1 und LCAT spielen eine Rolle im HDL-C Metabolismus und sind daher möglicherweise an den erhöhten Werten von HDL-C beteiligt.^{69, 75} Während für Apolipoprotein A1 eine atheroprotektive Wirkung bereits beschrieben wurde, wird die Funktion von LCAT im Rahmen der Atherosklerose kontrovers diskutiert.^{192, 206}

Weiterführende Erkenntnisse liefert eine klinische Studie, die 80 Patienten mit DMT2 untersucht hat, die bereits mit oralen antidiabetischen Wirkstoffen behandelt wurden. Hier wurde gezeigt, dass durch die Gabe von Dapagliflozin die Plasmakonzentrationen von HDL-C und Apolipoprotein A1 erhöht waren, während wie bei den gezeigten tierexperimentellen Untersuchungen auch kein Effekt auf LDL-C beobachtet werden konnte. Bei der vergleichenden Untersuchung der HDL-C-Subpopulationen zeigte sich, dass der Anstieg des HDL-C durch einen Anstieg des HDL₂-C verursacht wurde.²⁰⁷

Jedoch wurde in der hier vorliegenden Studie die genaue Zusammensetzung des HDL-C nicht weiter analysiert. Dies wäre der nächste wichtige Schritt, um die Verbindung zwischen dem HDL-C-Anstieg durch Dapagliflozin und den atheroprotektiven Effekten herzustellen.

In jedem Fall sind detailliertere Analysen der Bildung, Metabolisierung und des Abbaus von HDL-C notwendig, um direkte Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Effekte von Dapagliflozin in Bezug auf die erhöhten Konzentrationen von HDL-C zu erhalten.

Diskussion

Da die erhöhten HDL-C Werte nach Gabe von Dapagliflozin mechanistisch die Aktivität von Thrombin und den Aktivierungsstatus der Thrombozyten beeinflussen können, wird dieser Sachverhalt im nächsten Abschnitt diskutiert.

4.3 Einfluss von Dapagliflozin auf Thrombinbildung und Thrombozytenaktivierung

Auf der Suche nach zugrundeliegenden Mechanismen für die verringerte Entwicklung atherosklerotischer Läsionen wurde der Einfluss von Dapagliflozin auf die Thrombinbildung und die Thrombozytenaktivierung untersucht. In den behandelten Tieren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Dapagliflozin zu einer verminderten Aktivität von Thrombin und zu einer verringerten Thrombozytenaktivierung führt.

Das erhöhte Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Ereignisse bei Diabetikern ist unter anderem durch einen erhöhten Aktivitätsgrad von Thrombozyten zu erklären. In klinischen Studien konnte bei Patienten mit Diabetes mellitus eine signifikant erhöhte Anzahl aktivierter Thrombozyten detektiert werden.²⁰⁸ Durch die Verbesserung der metabolischen Kontrolle konnte die höhere Zahl aktivierter Thrombozyten wieder gesenkt werden.²⁰⁹

Auch in der vorliegenden Untersuchung ließ das Mausmodell bei 33 Wochen alten Mäusen eine erhöhte CD62P-Expression nach Fütterung der DD im Vergleich zu Mäusen, die mit einer SD gefüttert wurden, erkennen.

Dieser Effekt war durch die Behandlung mit Dapagliflozin stark verringert. Durch *ex vivo* Experimente konnten zudem erste Hinweise auf mögliche *off-target* Effekte der Substanz Dapagliflozin hinsichtlich der CD62P-Expression der murinen Thrombozyten gewonnen werden.

Es ist außerdem bekannt, dass HDL selbst direkt die CD62P-Expression auf Thrombozyten reduzieren kann.²¹⁰ Dies kann in gewissem Maße die Diskrepanz zwischen den stärkeren *in vivo* beobachteten Effekten und den etwas geringeren *ex vivo* beobachteten Effekten durch Dapagliflozin erklären.

Der selektive Einfluss von Dapagliflozin auf die CD62P-Expression bei unveränderter Expression von CD41/61 legt die Vermutung nahe, dass es in der Folge zu Effekten auf die Thrombozyten-vermittelte Adhäsion von Immunzellen am Gefäßendothel, nicht jedoch zu einer Veränderung der Thrombozytenaggregation selbst kommt.²¹¹⁻²¹³ Diese Hypothese wird auch durch das Ergebnis, dass Dapagliflozin keinen Einfluss auf die Blutungszeit hat, bestätigt.

Die verringerte CD62P-Expression auf Thrombozyten kann ursächlich an der verringerten Bildung atherosklerotischer Läsionen beteiligt sein, da initial die Thrombozytenadhäsion bei der Plaquekomposition eine wichtige Rolle spielt.^{34, 214}

In Übereinstimmung mit den Daten aus der hier vorliegenden Studie am Mausmodell, belegen klinische Studien eine erhöhte Bildung von Thrombin bei Diabetikern.²¹⁵

Im Gegensatz zur CD62P-Expression auf Thrombozyten, legen die vorliegenden Untersuchungen dar, dass Dapagliflozin selbst nicht direkt das ETP beeinflusst. Jedoch kann bei Behandlung mit Dapagliflozin eine Verringerung des ETP erreicht werden, welches parallel mit einer erhöhten Plasmakonzentration von HDL-C einhergeht. Weitergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass HDL selbst durch direkten Einfluss das ETP verringern kann.

Aus diesem Grund wird vermutet, dass Dapagliflozin indirekt durch die Erhöhung von HDL-C das ETP verringert. Mechanistisch wird eine Verbesserung der antikoagulativen Eigenschaften der Proteine C und S durch HDL angenommen.^{216, 217}

Des Weiteren trägt Thrombin auch durch eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte zur Entstehung der Atherosklerose bei. Dazu gehören unter anderem die Förderung einer endothelialen Dysfunktion und die begünstigte Proliferation glatter Muskelzellen.^{218, 219} In den vorliegenden Ergebnissen konnte ebenfalls ein geringerer Anteil glatter Muskelzellen in den atherosklerotischen Läsionen nach Behandlung mit Dapagliflozin nachgewiesen werden.

Es konnte in tierexperimentellen Studien bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von Thrombininhibitoren die Entwicklung der Atherosklerose hemmt.¹⁵⁰

Für eine weitergehende Interpretation der gezeigten Ergebnisse sollte als Hinweis auf die absoluten Konzentrationen von Thrombin die Menge von Prothrombinfragment 1+2 im Plasma gemessen werden. Zusätzlich wäre eine weitergehende Analyse der Protease-aktivierter Rezeptor (PAR)-vermittelten Effekte von Thrombin sinnvoll, um die genaue Beteiligung von Thrombin an der Atheroprotektion durch Dapagliflozin zu identifizieren.

Die Wirkung von Dapagliflozin auf Thrombozytenaktivierung und Thrombinaktivität wurde in einer tierexperimentellen Studie an Ratten bereits untersucht. Zu diesem Zweck wurden weibliche *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF) Ratten mit einer fettreichen Diät gefüttert. Die Gabe von Dapagliflozin in einer Konzentration von 0,3 mg/kg Körpergewicht wurde täglich über 2 Wochen durch orale Gavagierung durchgeführt und resultierte in einer Absenkung der Blutglukose.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen zeigte die Analyse des ETP keinen Einfluss durch die zweiwöchige Gabe von Dapagliflozin. Die HDL-C Konzentrationen wurden in dieser Studie nicht untersucht. CD62P-Expressionsdaten wurden nicht gezeigt, aber als nicht verändert angegeben.²²⁰ Diese Daten stehen im Widerspruch zu

Diskussion

den hier gezeigten Ergebnissen im Mausmodell. Jedoch kann vermutet werden, dass die zweiwöchige Behandlungsdauer nicht ausreichend ist, um entsprechende Effekte auf HDL-C zu bewirken. Dazu müssten weitere Zeitverläufe der HDL-C Konzentrationen untersucht werden. Zudem war die eingesetzte Dosis von Dapagliflozin deutlich geringer als die hier im Mausmodell eingesetzte Dosierung. Eventuell ist auch eine höhere Dosierung notwendig, um die direkten Effekte auf die CD62P-Expression hervorzurufen.

4.4 Ausblick und Limitierung

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen einen protektiven Einfluss des SGLT2-Inhibitors Dapagliflozin auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen. Als mechanistische Grundlagen konnten erhöhte Plasmakonzentrationen von HDL-C sowie eine verminderte Thrombozytenaktivierung und Thrombinbildung durch Dapagliflozin dargelegt werden. Auf Grundlage dieser Beobachtungen liegt die Vermutung nahe, dass durch die Gabe von Dapagliflozin kardiovaskuläre Risikofaktoren günstig beeinflusst werden und somit das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse vermindert werden könnte.

Die gewonnenen Erkenntnisse ergänzen frühere Untersuchungen in anderen Mausmodellen, die primär eine Blutzuckersenkung als zugrundeliegenden Mechanismus postulieren.

Im Hinblick auf die Atheroprotektion durch Dapagliflozin liegt wahrscheinlich insgesamt eine Kombination verschiedener Mechanismen zugrunde, die auch von den jeweiligen Risikofaktoren des Patienten abhängig sein kann.

Die Experimente dieser Arbeit wurden in Mäusen oder isolierten murinen Zellen durchgeführt. Daher ist die direkte Übertragung der Beobachtungen auf den Menschen nicht gesichert.

Erste Hinweise für eine Übertragbarkeit der Ergebnisse beschreiben Daten aus klinischen Studien, die eine vergleichbare Beeinflussung von HDL-C durch Dapagliflozin in Patienten mit DMT2 zeigen.^{107, 221, 222}

In jedem Fall müssen die Ergebnisse in einer klinischen Studie zum Einfluss von Dapagliflozin hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos bestätigt werden. Die *Dapagliflozin Effect on Cardiovascular Events* (DECLARE-TIMI 58) Studie ist eine randomisierte, Placebo-kontrollierte und doppelblinde klinische Studie, die derzeit in verschiedenen Nationen durchgeführt wird und den Einfluss von Dapagliflozin auf den zusammengesetzten Endpunkt von kardiovaskulärem Tod, Myokardinfarkt und ischämischem Schlaganfall untersucht. Die derzeitigen Planungen umfassen etwa 17.000 Patienten mit DMT2 und bekanntem kardiovaskulärem Erkrankungen oder mehreren kardiovaskulären Risikofaktoren. Schätzungsweise wird die Beobachtungsdauer bei etwa 4,5 Jahren liegen. Die ersten Ergebnisse werden im Jahr 2019 erwartet.^{93 94}

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen können nicht die Frage beantworten, ob bei bereits stark fortgeschrittenen Läsionen die Therapie mit Dapagliflozin auch eine Regression der Atherosklerose induzieren kann. Es gibt Hinweise aus bereits veröffentlichten Studien, die eine Regression atherosklerotischer Läsionen unter Gabe von

Diskussion

Dapagliflozin beobachten konnten, allerdings war in diesen Experimenten auch ein starker Einfluss auf die Blutglukose zu beobachten, so dass die Vergleichbarkeit der Modelle nicht gegeben ist.¹⁴⁹ Zur Abklärung, ob der Mechanismus über HDL-C und Thrombozytenaktivierung auch bei der Regression von Bedeutung ist, müssten Untersuchungen mit dem vorliegenden Mausmodell und einer verzögerten Gabe von Dapagliflozin nach Auftreten manifester atherosklerotischer Läsionen durchgeführt werden.

Die orale Gabe von Dapagliflozin ermöglicht theoretisch eine Wirkung auf sämtliche Zellen und Organe im Körper. Eine mögliche Beeinflussung anderer Gewebe als der hier angegebenen durch Dapagliflozin ist nicht untersucht worden. Aufgrund der sehr spezifischen Expression von SGLT2 in der Niere ist es unwahrscheinlich, aber nicht ganz auszuschließen, dass pleiotrope Effekte in anderen Organen zu den Beobachtungen dieser Studie beigetragen haben.

Abschließend konnte der zugrundeliegende Mechanismus für die beobachteten Effekte von Dapagliflozin auf das HDL-C nicht abschließend identifiziert werden. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um die beteiligten Zelltypen, die verantwortlichen Faktoren und vor allem die Veränderungen in der HDL-C Zusammensetzung zu identifizieren. Sinnvoll wäre es, diese Untersuchungen direkt an Patienten mit DMT2 durchzuführen, um Erkenntnisse von dem klinischen Nutzen der Therapie mit Dapagliflozin zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Dapagliflozin gehört zur Substanzklasse der Natrium-Glukose-Cotransporter-2-Inhibitoren und ist zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen. Dapagliflozin senkt die Glukosekonzentration im Blut, indem es die Ausscheidung der Glukose über die Nieren bewirkt. Neben der Senkung der Blutglukose spielt das kardiovaskuläre Sicherheitsprofil von antidiabetischen Substanzen eine wichtige Rolle, da Diabetes mellitus selbst einen Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse darstellt. So geht das gesteigerte kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit Diabetes mellitus mit erhöhter Thrombinaktivität und Thrombozytenaktivierung einher.

In einem Mausmodell, welches durch Hyperglykämie, Insulinresistenz und akzelerierte Atherosklerose gekennzeichnet ist, wurden die Effekte von Dapagliflozin auf verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren untersucht.

Die Blutzuckersenkung war durch die Gabe von Dapagliflozin eher moderat verglichen mit Effekten aus anderen Studien. Dennoch zeigte sich eine deutlich verminderte Entwicklung atherosklerotischer Läsionen mit verringerter Infiltration von Immunzellen nach Behandlung mit Dapagliflozin, während keine Einflüsse von Dapagliflozin auf zirkulierende Immunzellen oder Zytokine zu beobachten waren.

Die Behandlung mit Dapagliflozin resultierte in einem verringerten endogenen Thrombinpotential und einer geringeren CD62P-Expression der Thrombozyten, welche auf eine reduzierte Aktivität der Thrombozyten hinweist. Zusätzlich konnten direkte Effekte von Dapagliflozin auf die CD62P-Expression der murinen Thrombozyten nach *ex vivo* Inkubation bestätigt werden.

Parallel konnten eine veränderte Genexpression HDL-Cholesterin-Metabolismus-assoziierter Gene in der Leber sowie erhöhte Plasmakonzentrationen von HDL-Cholesterin im Blut beobachtet werden. Zusätzlich wurde eine direkte Hemmung der Thrombinaktivität durch HDL *ex vivo* gezeigt

Zusammenfassend zeigt die hier vorliegende Arbeit einen neuen Mechanismus von Dapagliflozin, welcher letztlich zur Atheroprotektion beiträgt. Mechanistisch kommt es nach Einnahme von Dapagliflozin zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von HDL-Cholesterin. In dessen Folge wird die Aktivität von Thrombin gehemmt und der Aktivierungsstatus der Thrombozyten reduziert. Dieses wird durch direkte hemmende Effekte von Dapagliflozin auf die Thrombozytenaktivierung unterstützt. Durch die verringerte Anzahl aktivierter Thrombozyten kommt es zu einer verminderten Adhäsion von Entzündungszellen am Gefäßendothel und nachfolgend zu einer reduzierten Infiltration in die Gefäßwand.

Dieser Vorgang führt letztlich zu einer Verminderung der Atherogenese.

6. Summary

Dapagliflozin, a novel antidiabetic compound, belongs to the group of sodium-glucose-cotransporter-2-inhibitors and is used for therapy of diabetes mellitus type 2. By increasing urinary glucose secretion in the kidney dapagliflozin decreases blood glucose concentration.

In addition to blood glucose control there is a clinical need for cardiovascular safety of antidiabetic drugs since diabetes mellitus itself is an important risk factor for cardiovascular events. Increased cardiovascular risk in diabetes mellitus accompanies with elevated activity of thrombin and platelet activation.

Effects of dapagliflozin on cardiovascular risk factors were investigated in a mouse model of obesity, insulin resistance and accelerated atherosclerosis.

Compared to other animal studies dapagliflozin moderately improves glucose tolerance

Treatment with dapagliflozin inhibited development of atherosclerotic lesions with decreased infiltration of immune cells into the lesions, while dapagliflozin did not influence amount of circulating immune cells or cytokines.

Administration of dapagliflozin leads to decreased endogenous thrombin potential and reduced platelet CD62P-expression which indicates decreased platelet activation. Furthermore dapagliflozin directly influences platelet CD62P-expression after *ex vivo* incubation of murine blood.

Dapagliflozin increases gene expression of HDL-cholesterol-metabolism-associated genes in the liver. Additionally increased plasma levels of high density lipoprotein cholesterol were observed in dapagliflozin-treated animals while no differences in total cholesterol and very low density lipoprotein/low density lipoprotein cholesterol could be detected.

Dapagliflozin mediated increases in HDL-cholesterol could possibly contribute to decreased thrombin generation, since there was a direct inhibition of thrombin generation in human plasma by incubation with HDL.

Mechanistically increased HDL-cholesterol plasma levels after treatment with dapagliflozin subsequently lead to decreased thrombin generation and reduced platelet activation.

In parallel dapagliflozin directly decreases platelet activation.

Leukocyte binding to the endothelium is diminished by decreased amount of activated platelets therefore monocyte/macrophage recruitment into atherosclerotic lesions is reduced.

This mechanism in the end ameliorates atherogenesis and –progression.

Literaturverzeichnis

1. Deutsches Zentrum für Diabetesforschung e.V. Volkskrankheit Diabetes. 2016; Zugriffsdatum: 6. Januar 2017: <https://www.dzd-ev.de/themen/diabetes-die-krankheit/volkskrankheit-diabetes/index.html>
2. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 7 ed.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. 2015; Zugriffsdatum: 6. Januar 2017: <http://www.diabetesatlas.org/>
3. Tamayo T, Rosenbauer J, Wild SH, Spijkerman AM, Baan C, Forouhi NG, Herder C, Rathmann W. Diabetes in Europe: an update. *Diabetes research and clinical practice.* 2014 Feb;103(2):206-217. PubMed PMID: 24300019.
4. World Health Organization. Global report on diabetes. 2016; Zugriffsdatum: 6. Januar 2017: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf?ua=1
5. Koopman RJ, Mainous AG, 3rd, Diaz VA, Geesey ME. Changes in age at diagnosis of type 2 diabetes mellitus in the United States, 1988 to 2000. *Annals of family medicine.* 2005 Jan-Feb;3(1):60-63. PubMed PMID: 15671192. Pubmed Central PMCID: 1466782.
6. Heidemann C, Du Y, Schubert I, Rathmann W, Scheidt-Nave C. [Prevalence and temporal trend of known diabetes mellitus: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz.* 2013 May;56(5-6):668-677. PubMed PMID: 23703485. Prävalenz und zeitliche Entwicklung des bekannten Diabetes mellitus: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1).
7. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 2014 Mar 22;383(9922):1068-1083. PubMed PMID: 24315620. Pubmed Central PMCID: 4226760.
8. Cersosimo E, Triplitt C, Mandarino LJ, DeFronzo RA. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, eds. *Endotext.* South Dartmouth (MA); 2000.
9. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association.* 1998 Jul;15(7):539-553. PubMed PMID: 9686693.

Literaturverzeichnis

10. Kerner W, Bruckel J, German Diabetes A. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2014 Jul;122(7):384-386. PubMed PMID: 25014088.
11. Schunk M, Reitmeir P, Schipf S, Volzke H, Meisinger C, Thorand B, Kluttig A, Greiser KH, Berger K, Muller G, Ellert U, Neuhauser H, Tamayo T, Rathmann W, Holle R. Health-related quality of life in subjects with and without Type 2 diabetes: pooled analysis of five population-based surveys in Germany. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2012 May;29(5):646-653. PubMed PMID: 21978176.
12. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998 Jul 23;339(4):229-234. PubMed PMID: 9673301.
13. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM, Diabetes Prevention Program Research G. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 2002 Feb 7;346(6):393-403. PubMed PMID: 11832527. Pubmed Central PMCID: 1370926.
14. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M, Finnish Diabetes Prevention Study G. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2001 May 3;344(18):1343-1350. PubMed PMID: 11333990.
15. Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen, Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. 2014; Zugriffsdatum: 27. April 2017: http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/NVL_Typ-2_Therapie-lang_Apr_2014.pdf
16. Rojas LB, Gomes MB. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2013 Feb 15;5(1):6. PubMed PMID: 23415113. Pubmed Central PMCID: 3607889.
17. Gupta V. Glucagon-like peptide-1 analogues: An overview. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2013 May;17(3):413-421. PubMed PMID: 23869296. Pubmed Central PMCID: 3712370.
18. Swinnen SG, Hoekstra JB, DeVries JH. Insulin therapy for type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2009 Nov;32 Suppl 2:S253-259. PubMed PMID: 19875560. Pubmed Central PMCID: 2811456.
19. Drucker DJ. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: preclinical biology and mechanisms of action. *Diabetes care*. 2007 Jun;30(6):1335-1343. PubMed PMID: 17337495.

Literaturverzeichnis

20. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-874. PubMed PMID: 12490960.
21. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med*. 1976 Aug 19;295(8):420-425. PubMed PMID: 778621.
22. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976 Aug 12;295(7):369-377. PubMed PMID: 819830.
23. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*. 1986 Feb 20;314(8):488-500. PubMed PMID: 3511384.
24. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994 Nov 19;344(8934):1383-1389. PubMed PMID: 7968073.
25. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):233-241. PubMed PMID: 11001066. Pubmed Central PMCID: 2826222.
26. Michiels C. Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology*. 2003 Sep;196(3):430-443. PubMed PMID: 12891700.
27. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-126. PubMed PMID: 9887164.
28. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular research*. 1999 Aug 15;43(3):562-571. PubMed PMID: 10690328.
29. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*. 2003 Oct;14(5):421-430. PubMed PMID: 14501580.
30. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, Boren J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002 Jun 13;417(6890):750-754. PubMed PMID: 12066187.
31. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998 May;18(5):842-851. PubMed PMID: 9598845.
32. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology*. 2011 Mar;12(3):204-212. PubMed PMID: 21321594.
33. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, Kamm RD, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA, Jr. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

Literaturverzeichnis

- the United States of America. 2004 Oct 12;101(41):14871-14876. PubMed PMID: 15466704. Pubmed Central PMCID: 522013.
34. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Oct 07;196(7):887-896. PubMed PMID: 12370251. Pubmed Central PMCID: 2194025.
 35. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2001 Jul 16;194(2):205-218. PubMed PMID: 11457895. Pubmed Central PMCID: 2193449.
 36. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005 Jun 28;111(25):3481-3488. PubMed PMID: 15983262.
 37. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001 May;107(10):1255-1262. PubMed PMID: 11375415. Pubmed Central PMCID: 209298.
 38. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991 Feb 15;251(4995):788-791. PubMed PMID: 1990440.
 39. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998 Aug 27;394(6696):894-897. PubMed PMID: 9732872.
 40. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular cell*. 1998 Aug;2(2):275-281. PubMed PMID: 9734366.
 41. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest*. 1999 Oct;104(8):1041-1050. PubMed PMID: 10525042. Pubmed Central PMCID: 408576.
 42. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Aug 29;92(18):8264-8268. PubMed PMID: 7667279. Pubmed Central PMCID: 41137.
 43. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002;20:197-216. PubMed PMID: 11861602.

Literaturverzeichnis

44. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Current opinion in immunology*. 2002 Feb;14(1):123-128. PubMed PMID: 11790542.
45. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005 Apr 21;352(16):1685-1695. PubMed PMID: 15843671.
46. Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation*. 2014 Apr 15;129(15):1551-1559. PubMed PMID: 24481950.
47. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016 Feb 19;118(4):692-702. PubMed PMID: 26892967. Pubmed Central PMCID: 4762053.
48. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999 Jul;145(1):33-43. PubMed PMID: 10428293.
49. Robertson AK, Hansson GK. T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006 Nov;26(11):2421-2432. PubMed PMID: 16973967.
50. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):801-809. PubMed PMID: 8479518.
51. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11):2680-2690. PubMed PMID: 9389731. Pubmed Central PMCID: PMC508471.
52. McGill HC, Jr. George Lyman Duff memorial lecture. Persistent problems in the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1984 Sep-Oct;4(5):443-451. PubMed PMID: 6089724.
53. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994 May;89(5):2462-2478. PubMed PMID: 8181179.
54. Faggiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*. 1984 Jul-Aug;4(4):341-356. PubMed PMID: 6466192.

Literaturverzeichnis

55. Masuda J, Ross R. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation. *Arteriosclerosis*. 1990 Mar-Apr;10(2):164-177. PubMed PMID: 2180394.
56. Masuda J, Ross R. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*. 1990 Mar-Apr;10(2):178-187. PubMed PMID: 2317156.
57. Owens GK, Vernon SM, Madsen CS. Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 1996 Dec;14(5):S55-64. PubMed PMID: 9120686.
58. Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *British heart journal*. 1993 Jan;69(1 Suppl):S30-37. PubMed PMID: 8427762. Pubmed Central PMCID: 1025256.
59. Raines EW, Ferri N. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *Journal of lipid research*. 2005 Jun;46(6):1081-1092. PubMed PMID: 15834121.
60. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987 May 28;316(22):1371-1375. PubMed PMID: 3574413.
61. Finet G, Ohayon J, Rioufol G, Lefloch S, Tracqui P, Dubreuil O, Tabib A. Morphological and biomechanical aspects of vulnerable coronary plaque. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*. 2007 Jun-Jul;100(6-7):547-553. PubMed PMID: 17893637.
62. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*. 1995 Sep 15;92(6):1565-1569. PubMed PMID: 7664441.
63. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacological reviews*. 2006 Sep;58(3):342-374. PubMed PMID: 16968945.
64. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WGJ, Linton EF, Vickers KC. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA); 2000.
65. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Boren J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-

Literaturverzeichnis

- density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European heart journal*. 2017 Apr 24. PubMed PMID: 28444290.
66. Salonen R, Seppanen K, Rauramaa R, Salonen JT. Prevalence of carotid atherosclerosis and serum cholesterol levels in eastern Finland. *Arteriosclerosis*. 1988 Nov-Dec;8(6):788-792. PubMed PMID: 3196222.
67. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA); 2000.
68. Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R, Future Forum Editorial B. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis*. 2003 Jun;168(2):195-211. PubMed PMID: 12801602.
69. Rosenson RS, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, Krauss RM, Otvos JD, Remaley AT, Schaefer EJ. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clinical chemistry*. 2011 Mar;57(3):392-410. PubMed PMID: 21266551.
70. Cheung MC, Wolf AC, Lum KD, Tollefson JH, Albers JJ. Distribution and localization of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer activity in A-I-containing lipoproteins. *Journal of lipid research*. 1986 Nov;27(11):1135-1144. PubMed PMID: 3104518.
71. Marcel YL, McPherson R, Hogue M, Czarnecka H, Zawadzki Z, Weech PK, Whitlock ME, Tall AR, Milne RW. Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects. *J Clin Invest*. 1990 Jan;85(1):10-17. PubMed PMID: 2295691. Pubmed Central PMCID: 296380.
72. Tall AR, Forester LR, Bongiovanni GL. Facilitation of phosphatidylcholine transfer into high density lipoproteins by an apolipoprotein in the density 1.20-1.26 g/ml fraction of plasma. *Journal of lipid research*. 1983 Mar;24(3):277-289. PubMed PMID: 6842084.
73. van der Stoep M, Korporaal SJ, Van Eck M. High-density lipoprotein as a modulator of platelet and coagulation responses. *Cardiovascular research*. 2014 Aug 01;103(3):362-371. PubMed PMID: 24891399.
74. Delalla OF, Elliott HA, Gofman JW. Ultracentrifugal studies of high density serum lipoproteins in clinically healthy adults. *The American journal of physiology*. 1954 Nov;179(2):333-337. PubMed PMID: 13218169.
75. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *Journal of molecular medicine*. 2006 Apr;84(4):276-294. PubMed PMID: 16501936.

Literaturverzeichnis

76. Uehara Y, Miura S, von Eckardstein A, Abe S, Fujii A, Matsuo Y, Rust S, Lorkowski S, Assmann G, Yamada T, Saku K. Unsaturated fatty acids suppress the expression of the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and ABCA1 genes via an LXR/RXR responsive element. *Atherosclerosis*. 2007 Mar;191(1):11-21. PubMed PMID: 16730733.
77. Favari E, Chroni A, Tietge UJ, Zanotti I, Escola-Gil JC, Bernini F. Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Handbook of experimental pharmacology*. 2015;224:181-206. PubMed PMID: 25522988.
78. Rohatgi A. High-Density Lipoprotein Function Measurement in Human Studies: Focus on Cholesterol Efflux Capacity. *Progress in cardiovascular diseases*. 2015 Jul-Aug;58(1):32-40. PubMed PMID: 25968932. Pubmed Central PMCID: 4486636.
79. Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Current opinion in lipidology*. 2010 Jun;21(3):229-238. PubMed PMID: 20480549. Pubmed Central PMCID: 3215082.
80. Kemp TM, Barr EL, Zimmet PZ, Cameron AJ, Welborn TA, Colagiuri S, Phillips P, Shaw JE. Glucose, lipid, and blood pressure control in Australian adults with type 2 diabetes: the 1999-2000 AusDiab. *Diabetes care*. 2005 Jun;28(6):1490-1492. PubMed PMID: 15920075.
81. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, Waugh NR, Gatling W, Bingley PJ, Patterson CC. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia*. 2003 Jun;46(6):760-765. PubMed PMID: 12774166.
82. Matheus AS, Tannus LR, Cobas RA, Palma CC, Negrato CA, Gomes MB. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *International journal of hypertension*. 2013;2013:653789. PubMed PMID: 23533715. Pubmed Central PMCID: 3603160.
83. Emerging Risk Factors C, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010 Jun 26;375(9733):2215-2222. PubMed PMID: 20609967. Pubmed Central PMCID: 2904878.
84. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997 May 17;349(9063):1436-1442. PubMed PMID: 9164317.
85. Hirshberg B, Raz I. Impact of the U.S. Food and Drug Administration cardiovascular assessment requirements on the development of novel antidiabetes drugs. *Diabetes care*. 2011 May;34 Suppl 2:S101-106. PubMed PMID: 21525438. Pubmed Central PMCID: 3632144.

Literaturverzeichnis

86. European Medicines Agency. Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment or prevention of diabetes mellitus. 2012; Zugriffsdatum: 1. Januar 2017: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500129256.pdf
87. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Diabetes Mellitus — Evaluating Cardiovascular Risk in New Antidiabetic Therapies to Treat Type 2 Diabetes 2008; Zugriffsdatum: 3. Januar 2017: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm071627.pdf>)
88. Green JB, Bethel MA, Armstrong PW, Buse JB, Engel SS, Garg J, Josse R, Kaufman KD, Koglin J, Korn S, Lachin JM, McGuire DK, Pencina MJ, Standl E, Stein PP, Suryawanshi S, Van de Werf F, Peterson ED, Holman RR, Group TS. Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2015 Jul 16;373(3):232-242. PubMed PMID: 26052984.
89. Pfeffer MA, Claggett B, Diaz R, Dickstein K, Gerstein HC, Kober LV, Lawson FC, Ping L, Wei X, Lewis EF, Maggioni AP, McMurray JJ, Probstfield JL, Riddle MC, Solomon SD, Tardif JC, Investigators E. Lixisenatide in Patients with Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med.* 2015 Dec 03;373(23):2247-2257. PubMed PMID: 26630143.
90. Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, Davidson J, Hirshberg B, Ohman P, Frederich R, Wiviott SD, Hoffman EB, Cavender MA, Udell JA, Desai NR, Mosenzon O, McGuire DK, Ray KK, Leiter LA, Raz I, Committee S-TS, Investigators. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2013 Oct 03;369(14):1317-1326. PubMed PMID: 23992601.
91. White WB, Cannon CP, Heller SR, Nissen SE, Bergenstal RM, Bakris GL, Perez AT, Fleck PR, Mehta CR, Kupfer S, Wilson C, Cushman WC, Zannad F, Investigators E. Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2013 Oct 03;369(14):1327-1335. PubMed PMID: 23992602.
92. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Inzucchi SE, Investigators E-RO. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine.* 2015 Nov 26;373(22):2117-2128. PubMed PMID: 26378978.
93. TIMI Study Group. DECLARE-TIMI 58. 2014; Zugriffsdatum: 24. April 2017: <http://www.timi.org/index.php?page=declare-timi-58>
94. U.S. National Institutes of Health. Multicenter Trial to Evaluate the Effect of Dapagliflozin on the Incidence of Cardiovascular Events (DECLARE-TIMI58). 2016; Zugriffsdatum: 6. Januar 2017: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01730534?term=TIMI+declare&rank=1>

Literaturverzeichnis

95. Vivian EM. Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors: a growing class of antidiabetic agents. *Drugs in context*. 2014;3:212264. PubMed PMID: 25598831. Pubmed Central PMCID: 4295914.
96. Wright EM. Renal Na(+)-glucose cotransporters. *American journal of physiology. Renal physiology*. 2001 Jan;280(1):F10-18. PubMed PMID: 11133510.
97. Wright EM, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2004 Feb;447(5):510-518. PubMed PMID: 12748858.
98. Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *The British journal of nutrition*. 2003 Jan;89(1):3-9. PubMed PMID: 12568659.
99. Whalen K, Miller S, Onge ES. The Role of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Clinical therapeutics*. 2015 Jun 1;37(6):1150-1166. PubMed PMID: 25891804.
100. Chao EC, Henry RR. SGLT2 inhibition--a novel strategy for diabetes treatment. *Nature reviews. Drug discovery*. 2010 Jul;9(7):551-559. PubMed PMID: 20508640.
101. Saeed MA, Narendran P. Dapagliflozin for the treatment of type 2 diabetes: a review of the literature. *Drug design, development and therapy*. 2014;8:2493-2505. PubMed PMID: 25525338. Pubmed Central PMCID: 4267514.
102. Hasan FM, Alsahli M, Gerich JE. SGLT2 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2014 Jun;104(3):297-322. PubMed PMID: 24735709.
103. Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: a review. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2005 Jan-Feb;21(1):31-38. PubMed PMID: 15624123.
104. Rossetti L, Smith D, Shulman GI, Papachristou D, DeFronzo RA. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest*. 1987 May;79(5):1510-1515. PubMed PMID: 3571496. Pubmed Central PMCID: 424427.
105. Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp DE, Bakker RA, Mark M, Klein T, Eickelmann P. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2012 Jan;14(1):83-90. PubMed PMID: 21985634.
106. Polidori D, Sha S, Mudaliar S, Ciaraldi TP, Ghosh A, Vaccaro N, Farrell K, Rothenberg P, Henry RR. Canagliflozin lowers postprandial glucose and insulin by delaying intestinal glucose absorption in addition to increasing urinary glucose excretion: results of a randomized, placebo-controlled study. *Diabetes care*. 2013 Aug;36(8):2154-2161. PubMed PMID: 23412078. Pubmed Central PMCID: 3714520.

Literaturverzeichnis

107. Ferrannini E, Ramos SJ, Salsali A, Tang W, List JF. Dapagliflozin monotherapy in type 2 diabetic patients with inadequate glycemic control by diet and exercise: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Diabetes care*. 2010 Oct;33(10):2217-2224. PubMed PMID: 20566676. Pubmed Central PMCID: 2945163.
108. Inagaki N, Kondo K, Yoshinari T, Maruyama N, Susuta Y, Kuki H. Efficacy and safety of canagliflozin in Japanese patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, 12-week study. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013 Dec;15(12):1136-1145. PubMed PMID: 23782594. Pubmed Central PMCID: 3906835.
109. Vasilakou D, Karagiannis T, Athanasiadou E, Mainou M, Liakos A, Bekiari E, Sarigianni M, Matthews DR, Tsapas A. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine*. 2013 Aug 20;159(4):262-274. PubMed PMID: 24026259.
110. McGill JB. The SGLT2 Inhibitor Empagliflozin for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: a Bench to Bedside Review. *Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders*. 2014 Jun;5(1):43-63. PubMed PMID: 24729157. Pubmed Central PMCID: 4065283.
111. Neumiller JJ, White JR, Jr., Campbell RK. Sodium-glucose co-transport inhibitors: progress and therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2010 Mar 5;70(4):377-385. PubMed PMID: 20205482.
112. Kadowaki T, Haneda M, Inagaki N, Terauchi Y, Taniguchi A, Koiwai K, Rattunde H, Woerle HJ, Broedl UC. Empagliflozin monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, 12-week, double-blind, placebo-controlled, phase II trial. *Advances in therapy*. 2014 Jun;31(6):621-638. PubMed PMID: 24958326.
113. Stenlof K, Cefalu WT, Kim KA, Alba M, Usiskin K, Tong C, Canovatchel W, Meininger G. Efficacy and safety of canagliflozin monotherapy in subjects with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013 Apr;15(4):372-382. PubMed PMID: 23279307. Pubmed Central PMCID: 3593184.
114. Bolinder J, Ljunggren O, Kullberg J, Johansson L, Wilding J, Langkilde AM, Sugg J, Parikh S. Effects of dapagliflozin on body weight, total fat mass, and regional adipose tissue distribution in patients with type 2 diabetes mellitus with inadequate glycemic control on metformin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012 Mar;97(3):1020-1031. PubMed PMID: 22238392.
115. Chilton R, Tikkanen I, Cannon CP, Crowe S, Hach T, Woerle HJ, Broedl UC, Johansen OE. 4b.02: The Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Empagliflozin Reduces Blood Pressure and Markers of Arterial Stiffness and Vascular Resistance in Type 2 Diabetes. *Journal of hypertension*. 2015 Jun;33 Suppl 1:e53. PubMed PMID: 26102848.
116. Davies MJ, Trujillo A, Vijapurkar U, Damaraju CV, Meininger G. Effect of canagliflozin on serum uric acid in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2015 Apr;17(4):426-429. PubMed PMID: 25600248.

Literaturverzeichnis

117. Yale JF, Bakris G, Cariou B, Yue D, David-Neto E, Xi L, Figueroa K, Wajs E, Usiskin K, Meininger G. Efficacy and safety of canagliflozin in subjects with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013 May;15(5):463-473. PubMed PMID: 23464594. Pubmed Central PMCID: 3654568.
118. Geerlings S, Fonseca V, Castro-Diaz D, List J, Parikh S. Genital and urinary tract infections in diabetes: impact of pharmacologically-induced glucosuria. *Diabetes research and clinical practice*. 2014 Mar;103(3):373-381. PubMed PMID: 24529566.
119. Benfield T, Jensen JS, Nordestgaard BG. Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome. *Diabetologia*. 2007 Mar;50(3):549-554. PubMed PMID: 17187246.
120. Scheen AJ. SGLT2 Inhibitors: Benefit/Risk Balance. *Current diabetes reports*. 2016 Oct;16(10):92. PubMed PMID: 27541294.
121. Nauck MA. Update on developments with SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Drug design, development and therapy*. 2014;8:1335-1380. PubMed PMID: 25246775. Pubmed Central PMCID: 4166348.
122. Rizvi SM, Shaikh S, Waseem SM, Shakil S, Abuzenadah AM, Biswas D, Tabrez S, Ashraf GM, Kamal MA. Role of anti-diabetic drugs as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *EXCLI journal*. 2015;14:684-696. PubMed PMID: 27152105. Pubmed Central PMCID: 4849108.
123. AstraZeneca. Fachinformation Forxiga. 2016; Zugriffsdatum: 6. Januar 2017: <http://www.fachinfo.de/pdf/014133#view=FitH&pagemode=none&toolbar=1&statusbar=0&messages=0&navpanes=0>
124. Komoroski B, Vachharajani N, Boulton D, Kornhauser D, Gerald M, Li L, Pfister M. Dapagliflozin, a novel SGLT2 inhibitor, induces dose-dependent glucosuria in healthy subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009 May;85(5):520-526. PubMed PMID: 19129748.
125. Kasichayanula S, Liu X, Zhang W, Pfister M, Reece SB, Aubry AF, LaCreta FP, Boulton DW. Effect of a high-fat meal on the pharmacokinetics of dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, in healthy subjects. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011 Aug;13(8):770-773. PubMed PMID: 21435141.
126. Kasichayanula S, Liu X, Shyu WC, Zhang W, Pfister M, Griffen SC, Li T, LaCreta FP, Boulton DW. Lack of pharmacokinetic interaction between dapagliflozin, a novel sodium-glucose transporter 2 inhibitor, and metformin, pioglitazone, glimepiride or sitagliptin in healthy subjects. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011 Jan;13(1):47-54. PubMed PMID: 21114603.
127. Kasichayanula S, Chang M, Liu X, Shyu WC, Griffen SC, LaCreta FP, Boulton DW. Lack of pharmacokinetic interactions between dapagliflozin and simvastatin, valsartan, warfarin, or digoxin. *Advances in therapy*. 2012 Feb;29(2):163-177. PubMed PMID: 22271159.

Literaturverzeichnis

128. Bailey CJ, Gross JL, Hennicken D, Iqbal N, Mansfield TA, List JF. Dapagliflozin add-on to metformin in type 2 diabetes inadequately controlled with metformin: a randomized, double-blind, placebo-controlled 102-week trial. *Bmc Med.* 2013 Feb 20;11. PubMed PMID: WOS:000318431600001. English.
129. Bolinder J, Ljunggren O, Johansson L, Wilding J, Langkilde AM, Sjostrom CD, Sugg J, Parikh S. Dapagliflozin maintains glycaemic control while reducing weight and body fat mass over 2 years in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on metformin. *Diabetes Obesity & Metabolism.* 2014 Feb;16(2):159-169. PubMed PMID: WOS:000329546800007. English.
130. Wilding JPH, Woo V, Rohwedder K, Sugg J, Parikh S, Grp DS. Dapagliflozin in patients with type 2 diabetes receiving high doses of insulin: efficacy and safety over 2 years. *Diabetes Obesity & Metabolism.* 2014 Feb;16(2):124-136. PubMed PMID: WOS:000329546800004. English.
131. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of clinical investigation.* 1993 Aug;92(2):883-893. PubMed PMID: 8349823. Pubmed Central PMCID: 294927.
132. Subramanian S, Han CY, Chiba T, McMillen TS, Wang SA, Haw A, 3rd, Kirk EA, O'Brien KD, Chait A. Dietary cholesterol worsens adipose tissue macrophage accumulation and atherosclerosis in obese LDL receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2008 Apr;28(4):685-691. PubMed PMID: 18239153. Pubmed Central PMCID: 2767166.
133. Krege JH, Hodgins JB, Hagaman JR, Smithies O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension.* 1995 May;25(5):1111-1115. PubMed PMID: 7737724.
134. Breslin WL, Strohacker K, Carpenter KC, Haviland DL, McFarlin BK. Mouse blood monocytes: standardizing their identification and analysis using CD115. *Journal of immunological methods.* 2013 Apr 30;390(1-2):1-8. PubMed PMID: 21466808.
135. Butcher MJ, Herre M, Ley K, Galkina E. Flow cytometry analysis of immune cells within murine aortas. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2011 (53). PubMed PMID: 21750492. Pubmed Central PMCID: 3196167.
136. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research.* 2012 Aug;40(15):e115. PubMed PMID: 22730293. Pubmed Central PMCID: 3424584.
137. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics.* 2012;13:134. PubMed PMID: 22708584. Pubmed Central PMCID: 3412702.

Literaturverzeichnis

138. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-408. PubMed PMID: 11846609.
139. Asanoma K, Kubota K, Chakraborty D, Renaud SJ, Wake N, Fukushima K, Soares MJ, Rumi MA. SATB homeobox proteins regulate trophoblast stem cell renewal and differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 2012 Jan 13;287(3):2257-2268. PubMed PMID: 22123820. Pubmed Central PMCID: 3265903.
140. Cote M, Provost PR, Tremblay Y. Apolipoprotein A-I, A-II, and H mRNA and protein accumulation sites in the developing lung in late gestation. *BMC research notes*. 2011 Jul 14;4:235. PubMed PMID: 21756353. Pubmed Central PMCID: 3154161.
141. Zhu Y, Tan W, Demetriades AM, Cai Y, Gao Y, Sui A, Lu Q, Shen X, Jiang C, Xie B, Sun X. Interleukin-17A neutralization alleviated ocular neovascularization by promoting M2 and mitigating M1 macrophage polarization. *Immunology*. 2016 Apr;147(4):414-428. PubMed PMID: 26694999. Pubmed Central PMCID: 4799882.
142. Kuramoto K, Sakai F, Yoshinori N, Nakamura TY, Wakabayashi S, Kojidani T, Haraguchi T, Hirose F, Osumi T. Deficiency of a lipid droplet protein, perilipin 5, suppresses myocardial lipid accumulation, thereby preventing type 1 diabetes-induced heart malfunction. *Molecular and cellular biology*. 2014 Jul;34(14):2721-2731. PubMed PMID: 24820416. Pubmed Central PMCID: 4097652.
143. Tchaikovski SN, BJ VANV, Rosing J, Tans G. Development of a calibrated automated thrombography based thrombin generation test in mouse plasma. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007 Oct;5(10):2079-2086. PubMed PMID: 17666016.
144. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Beguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*. 2003;33(1):4-15. PubMed PMID: 12853707.
145. Grandoch M, Kohlmorgen C, Melchior-Becker A, Feldmann K, Homann S, Muller J, Kiene LS, Zeng-Brouwers J, Schmitz F, Nagy N, Polzin A, Gowert NS, Elvers M, Skroblin P, Yin X, Mayr M, Schaefer L, Tannock LR, Fischer JW. Loss of Biglycan Enhances Thrombin Generation in Apolipoprotein E-Deficient Mice: Implications for Inflammation and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2016 May;36(5):e41-50. PubMed PMID: 27034473.
146. Kaku K, Kiyosue A, Inoue S, Ueda N, Tokudome T, Yang J, Langkilde AM. Efficacy and safety of dapagliflozin monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes inadequately controlled by diet and exercise. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2014 Nov;16(11):1102-1110. PubMed PMID: 24909293.
147. Del Prato S, Nauck M, Duran-Garcia S, Maffei L, Rohwedder K, Theuerkauf A, Parikh S. Long-term glycaemic response and tolerability of dapagliflozin versus a sulphonylurea as add-on therapy to metformin in patients with type 2 diabetes: 4-year data. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2015 Jun;17(6):581-590. PubMed PMID: 25735400.

Literaturverzeichnis

148. Barquera S, Pedroza-Tobias A, Medina C, Hernandez-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R, Moran AE. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Archives of medical research*. 2015 Jul;46(5):328-338. PubMed PMID: 26135634.
149. Nagareddy PR, Murphy AJ, Stirzaker RA, Hu Y, Yu S, Miller RG, Ramkhelawon B, Distel E, Westerterp M, Huang LS, Schmidt AM, Orchard TJ, Fisher EA, Tall AR, Goldberg IJ. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell metabolism*. 2013 May 7;17(5):695-708. PubMed PMID: 23663738. Pubmed Central PMCID: 3992275.
150. Kadoglou NP, Moustardas P, Katsimpoulas M, Kapelouzou A, Kostomitsopoulos N, Schafer K, Kostakis A, Liapis CD. The beneficial effects of a direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, on the development and stability of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice : dabigatran etexilate and atherosclerosis. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2012 Oct;26(5):367-374. PubMed PMID: 22940777.
151. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nature medicine*. 2003 Jan;9(1):61-67. PubMed PMID: 12483207.
152. Terasaki M, Hiromura M, Mori Y, Kohashi K, Nagashima M, Kushima H, Watanabe T, Hirano T. Amelioration of Hyperglycemia with a Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Prevents Macrophage-Driven Atherosclerosis through Macrophage Foam Cell Formation Suppression in Type 1 and Type 2 Diabetic Mice. *PloS one*. 2015;10(11):e0143396. PubMed PMID: 26606676. Pubmed Central PMCID: 4659635.
153. Hong EG, Jung DY, Ko HJ, Zhang Z, Ma Z, Jun JY, Kim JH, Sumner AD, Vary TC, Gardner TW, Bronson SK, Kim JK. Nonobese, insulin-deficient Ins2Akita mice develop type 2 diabetes phenotypes including insulin resistance and cardiac remodeling. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2007 Dec;293(6):E1687-1696. PubMed PMID: 17911348.
154. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, Swiatlowska P, Newman AA, Greene ES, Straub AC, Isakson B, Randolph GJ, Owens GK. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature medicine*. 2015 Jun;21(6):628-637. PubMed PMID: 25985364. Pubmed Central PMCID: 4552085.
155. Leng W, Ouyang X, Lei X, Wu M, Chen L, Wu Q, Deng W, Liang Z. The SGLT-2 Inhibitor Dapagliflozin Has a Therapeutic Effect on Atherosclerosis in Diabetic ApoE^{-/-} Mice. *Mediators of inflammation*. 2016;2016:6305735. PubMed PMID: 28104929. Pubmed Central PMCID: 5220517.
156. Schreyer SA, Vick C, Lystig TC, Mystkowski P, LeBoeuf RC. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2002 Jan;282(1):E207-214. PubMed PMID: 11739102.

Literaturverzeichnis

157. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*. 1988 Sep;37(9):1163-1167. PubMed PMID: 3044882.
158. Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study G, Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Jr., Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH, Jr., Probstfield JL, Simons-Morton DG, Friedewald WT. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2008 Jun 12;358(24):2545-2559. PubMed PMID: 18539917. Pubmed Central PMCID: 4551392.
159. Group AC, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, Bompoint S, de Galan BE, Joshi R, Travert F. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2008 Jun 12;358(24):2560-2572. PubMed PMID: 18539916.
160. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD, Investigators V. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2009 Jan 8;360(2):129-139. PubMed PMID: 19092145.
161. Yokono M, Takasu T, Hayashizaki Y, Mitsuoka K, Kihara R, Muramatsu Y, Miyoshi S, Tahara A, Kurosaki E, Li Q, Tomiyama H, Sasamata M, Shibasaki M, Uchiyama Y. SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin reduces body fat mass by increasing fatty acid oxidation in high-fat diet-induced obese rats. *European journal of pharmacology*. 2014 Mar 15;727:66-74. PubMed PMID: 24486393.
162. Iacobellis G. Local and systemic effects of the multifaceted epicardial adipose tissue depot. *Nature reviews. Endocrinology*. 2015 Jun;11(6):363-371. PubMed PMID: 25850659.
163. Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Har R, Fagan N, Johansen OE, Woerle HJ, von Eynatten M, Broedl UC. The effect of empagliflozin on arterial stiffness and heart rate variability in subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Cardiovascular diabetology*. 2014 Jan 29;13:28. PubMed PMID: 24475922. Pubmed Central PMCID: 3915232.
164. Perkins BA, Udell JA, Cherney DZ. No Need to Sugarcoat the Message: Is Cardiovascular Risk Reduction From SGLT2 Inhibition Related to Natriuresis? *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2016 Sep;68(3):349-352. PubMed PMID: 27039253.
165. Kaku K, Inoue S, Matsuoka O, Kiyosue A, Azuma H, Hayashi N, Tokudome T, Langkilde AM, Parikh S. Efficacy and safety of dapagliflozin as a monotherapy for type 2 diabetes mellitus in Japanese patients with inadequate glycaemic control: a phase II multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013 May;15(5):432-440. PubMed PMID: 23194084.

Literaturverzeichnis

166. Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, Eguchi J, Horiguchi CS, Nishii N, Yamada H, Takei K, Makino H. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PloS one*. 2014;9(6):e100777. PubMed PMID: 24960177. Pubmed Central PMCID: 4069074.
167. Kohan DE, Fioretto P, Tang W, List JF. Long-term study of patients with type 2 diabetes and moderate renal impairment shows that dapagliflozin reduces weight and blood pressure but does not improve glycemic control. *Kidney international*. 2014 Apr;85(4):962-971. PubMed PMID: 24067431. Pubmed Central PMCID: 3973038.
168. Matthaehi S, Bowering K, Rohwedder K, Grohl A, Parikh S, Study G. Dapagliflozin improves glycemic control and reduces body weight as add-on therapy to metformin plus sulfonylurea: a 24-week randomized, double-blind clinical trial. *Diabetes care*. 2015 Mar;38(3):365-372. PubMed PMID: 25592197.
169. Roden M, Weng J, Eilbracht J, Delafont B, Kim G, Woerle HJ, Broedl UC, investigators E-RMt. Empagliflozin monotherapy with sitagliptin as an active comparator in patients with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The lancet. Diabetes & endocrinology*. 2013 Nov;1(3):208-219. PubMed PMID: 24622369.
170. Nakashima Y, Wight TN, Sueishi K. Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovascular research*. 2008 Jul 1;79(1):14-23. PubMed PMID: 18430750.
171. Grandoch M, Feldmann K, Gothert JR, Dick LS, Homann S, Klatt C, Bayer JK, Waldheim JN, Rabausch B, Nagy N, Oberhuber A, Deenen R, Kohrer K, Lehr S, Homey B, Pfeffer K, Fischer JW. Deficiency in lymphotoxin beta receptor protects from atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation research*. 2015 Apr 10;116(8):e57-68. PubMed PMID: 25740843.
172. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Wight TN, Virmani R. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002 Oct 01;22(10):1642-1648. PubMed PMID: 12377743.
173. Falk E. Why do plaques rupture? *Circulation*. 1992 Dec;86(6 Suppl):III30-42. PubMed PMID: 1424049.
174. Durante W. Role of arginase in vessel wall remodeling. *Frontiers in immunology*. 2013;4:111. PubMed PMID: 23717309. Pubmed Central PMCID: 3651990.
175. Yao L, Chandra S, Toque HA, Bhatta A, Rojas M, Caldwell RB, Caldwell RW. Prevention of diabetes-induced arginase activation and vascular dysfunction by Rho kinase (ROCK) knockout. *Cardiovascular research*. 2013 Mar 01;97(3):509-519. PubMed PMID: 23250919. Pubmed Central PMCID: 3633399.
176. Zhu W, Chandrasekharan UM, Bandyopadhyay S, Morris SM, Jr., DiCorleto PE, Kashyap VS. Thrombin induces endothelial arginase through AP-1 activation.

Literaturverzeichnis

- American journal of physiology. Cell physiology. 2010 Apr;298(4):C952-960. PubMed PMID: 20032511. Pubmed Central PMCID: 2853217.
177. Hallemeesch MM, Lamers WH, Deutz NE. Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clinical nutrition*. 2002 Aug;21(4):273-279. PubMed PMID: 12135586.
 178. Enger SC, Hjermann I, Foss OP, Helgeland A, Holme I, Leren P, Norum KR. High density lipoprotein cholesterol and myocardial infarction or sudden coronary death: a prospective case-control study in middle-aged men of the Oslo study. *Artery*. 1979 Feb;5(2):170-181. PubMed PMID: 231954.
 179. Goldbourt U, Medalie JH. High density lipoprotein cholesterol and incidence of coronary heart disease--the Israeli Ischemic Heart Disease Study. *American journal of epidemiology*. 1979 Mar;109(3):296-308. PubMed PMID: 222135.
 180. Gordon DJ, Knoke J, Probstfield JL, Superko R, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in hypercholesterolemic men: the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *Circulation*. 1986 Dec;74(6):1217-1225. PubMed PMID: 3536151.
 181. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *The American journal of medicine*. 1977 May;62(5):707-714. PubMed PMID: 193398.
 182. Jacobs DR, Jr., Mebane IL, Bangdiwala SI, Criqui MH, Tyroler HA. High density lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in men and women: the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study. *American journal of epidemiology*. 1990 Jan;131(1):32-47. PubMed PMID: 2293751.
 183. Miller M, Seidler A, Kwiterovich PO, Pearson TA. Long-term predictors of subsequent cardiovascular events with coronary artery disease and 'desirable' levels of plasma total cholesterol. *Circulation*. 1992 Oct;86(4):1165-1170. PubMed PMID: 1394924.
 184. Miller NE, Thelle DS, Forde OH, Mjos OD. The Tromso heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study. *Lancet*. 1977 May 07;1(8019):965-968. PubMed PMID: 67464.
 185. Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkind BM, Tyroler HA. Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1990 Jun 14;322(24):1700-1707. PubMed PMID: 2342536.
 186. Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*. 2003 Aug 12;108(6):661-663. PubMed PMID: 12900335.

Literaturverzeichnis

187. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest.* 1990 Apr;85(4):1234-1241. PubMed PMID: 2318976. Pubmed Central PMCID: 296557.
188. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G, Tailleux A, Fievet C, Fruchart JC, Houdebine LM, Deneffe P. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation.* 1996 Aug 15;94(4):713-717. PubMed PMID: 8772693.
189. Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994 Sep 27;91(20):9607-9611. PubMed PMID: 7937814. Pubmed Central PMCID: 44862.
190. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Cliff SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature.* 1991 Sep 19;353(6341):265-267. PubMed PMID: 1910153.
191. Tangirala RK, Tsukamoto K, Chun SH, Usher D, Pure E, Rader DJ. Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation.* 1999 Oct 26;100(17):1816-1822. PubMed PMID: 10534470.
192. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *Jama.* 2003 Nov 05;290(17):2292-2300. PubMed PMID: 14600188.
193. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 1995 May 01;91(9):2488-2496. PubMed PMID: 7729036.
194. Miller NE, La Ville A, Crook D. Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by high-density lipoprotein in rabbit. *Nature.* 1985 Mar 7-13;314(6006):109-111. PubMed PMID: 3974712.
195. Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochimica et biophysica acta.* 1990 May 22;1044(2):275-283. PubMed PMID: 2344447.
196. Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *Journal of lipid research.* 2009 Apr;50 Suppl:S189-194. PubMed PMID: 19064999. Pubmed Central PMCID: 2674717.
197. Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, Shatilina LV, Kuzmin AA, Plavinsky SL, Teryukova NP. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis.* 1993 Apr;100(1):13-18. PubMed PMID: 8318059.

Literaturverzeichnis

198. Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *The Biochemical journal*. 1993 Sep 15;294 (Pt 3):829-834. PubMed PMID: 8379937. Pubmed Central PMCID: 1134536.
199. Murphy AJ, Westerterp M, Yvan-Charvet L, Tall AR. Anti-atherogenic mechanisms of high density lipoprotein: effects on myeloid cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2012 Mar;1821(3):513-521. PubMed PMID: 21864714. Pubmed Central PMCID: 3234332.
200. Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *Journal of lipid research*. 2001 Nov;42(11):1717-1726. PubMed PMID: 11714841.
201. Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, Coskran T, Haghpassand M, Francone OL. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002 Apr 01;22(4):630-637. PubMed PMID: 11950702.
202. Investigators A-H, Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, McBride R, Teo K, Weintraub W. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med*. 2011 Dec 15;365(24):2255-2267. PubMed PMID: 22085343.
203. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, Chaitman BR, Holme IM, Kallend D, Leiter LA, Leitersdorf E, McMurray JJ, Mundl H, Nicholls SJ, Shah PK, Tardif JC, Wright RS, dal OI. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012 Nov 29;367(22):2089-2099. PubMed PMID: 23126252.
204. Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010 Feb;30(2):139-143. PubMed PMID: 19797709. Pubmed Central PMCID: 2812788.
205. Rader DJ, Tall AR. The not-so-simple HDL story: Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis? *Nature medicine*. 2012 Sep;18(9):1344-1346. PubMed PMID: 22961164.
206. Ossoli A, Pavanello C, Calabresi L. High-Density Lipoprotein, Lecithin: Cholesterol Acyltransferase, and Atherosclerosis. *Endocrinology and metabolism*. 2016 Jun;31(2):223-229. PubMed PMID: 27302716. Pubmed Central PMCID: 4923405.
207. Hayashi T, Fukui T, Nakanishi N, Yamamoto S, Tomoyasu M, Osamura A, Ohara M, Yamamoto T, Ito Y, Hirano T. Dapagliflozin decreases small dense low-density lipoprotein-cholesterol and increases high-density lipoprotein 2-cholesterol in patients with type 2 diabetes: comparison with sitagliptin. *Cardiovascular diabetology*. 2017 Jan 13;16(1):8. PubMed PMID: 28086872. Pubmed Central PMCID: 5237208.
208. Soma P, Swanepoel AC, du Plooy JN, Mqoco T, Pretorius E. Flow cytometric analysis of platelets type 2 diabetes mellitus reveals 'angry' platelets. *Cardiovascular*

- diabetology. 2016 Mar 31;15:52. PubMed PMID: 27036108. Pubmed Central PMCID: 4818425.
209. Eibl N, Krugluger W, Streit G, Schratlbauer K, Hopmeier P, Schernthaner G. Improved metabolic control decreases platelet activation markers in patients with type-2 diabetes. *European journal of clinical investigation*. 2004 Mar;34(3):205-209. PubMed PMID: 15025679.
210. Lerch PG, Spycher MO, Doran JE. Reconstituted high density lipoprotein (rHDL) modulates platelet activity in vitro and ex vivo. *Thrombosis and haemostasis*. 1998 Aug;80(2):316-320. PubMed PMID: 9716159.
211. McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovascular research*. 2015 Aug 01;107(3):331-339. PubMed PMID: 25994174. Pubmed Central PMCID: 4592324.
212. Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *The American journal of cardiology*. 2009 Feb 02;103(3 Suppl):20A-26A. PubMed PMID: 19166709.
213. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell*. 1991 May 03;65(3):359-362. PubMed PMID: 2018971.
214. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood*. 2003 Apr 01;101(7):2661-2666. PubMed PMID: 12480714.
215. Aoki I, Shimoyama K, Aoki N, Homori M, Yanagisawa A, Nakahara K, Kawai Y, Kitamura SI, Ishikawa K. Platelet-dependent thrombin generation in patients with diabetes mellitus: effects of glycemic control on coagulability in diabetes. *Journal of the American College of Cardiology*. 1996 Mar 01;27(3):560-566. PubMed PMID: 8606265.
216. Griffin JH, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernandez JA. High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Jan;103(2):219-227. PubMed PMID: 9916134. Pubmed Central PMCID: 407881.
217. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation research*. 2006 Jun 09;98(11):1352-1364. PubMed PMID: 16763172.
218. McNamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, Fenton JW, 2nd, Coughlin SR, Owens GK. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest*. 1993 Jan;91(1):94-98. PubMed PMID: 8380817. Pubmed Central PMCID: 330000.
219. Lee IO, Kratz MT, Schirmer SH, Baumhake M, Bohm M. The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2012 Nov;343(2):253-257. PubMed PMID: 22837011.

Literaturverzeichnis

220. Shang J, Chen Z, Wang M, Li Q, Feng W, Wu Y, Wu W, Graziano MP, Chintala M. Zucker Diabetic Fatty rats exhibit hypercoagulability and accelerated thrombus formation in the Arterio-Venous shunt model of thrombosis. *Thrombosis research*. 2014 Aug;134(2):433-439. PubMed PMID: 24796819.
221. Matthaei S, Bowering K, Rohwedder K, Sugg J, Parikh S, Johnsson E, Study G. Durability and tolerability of dapagliflozin over 52 weeks as add-on to metformin and sulphonylurea in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2015 Nov;17(11):1075-1084. PubMed PMID: 26212528.
222. Tamez HE, Tamez AL, Garza LA, Hernandez MI, Polanco AC. Dapagliflozin as an adjunct therapy to insulin in the treatment of patients with type 1 diabetes mellitus. *Journal of diabetes and metabolic disorders*. 2015;14:78. PubMed PMID: 26457255. Pubmed Central PMCID: 4600276.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Deficiency in Lymphotoxin β Receptor Protects From Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice

Grandoch M, Feldmann K, Göthert JR, Dick LS, Homann S, **Klatt C**, Bayer JK, Waldheim JN, Rabausch B, Nagy N, Oberhuber A, Deenen R, Köhrer K, Lehr S, Homey B, Pfeffer K, Fischer JW, *Circulation Research*, 2015

Loss of Biglycan enhances thrombin generation in ApoE-deficient mice: Implications for inflammation and atherosclerosis

Grandoch M, **Kohlmorgen C**, Melchior-Becker A, Feldmann K, Homann S, Müller J, Kiene LS, Zeng-Brouwers J, Schmitz F, Nagy N, Polzin A, Gowert NS, Elvers M, Skroblin P, Yin X, Mayr M, Schaefer L, Tannock L, Fischer JW, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2016

Kongressbeiträge

Dapagliflozin reduces atherosclerosis in *LDLr*-deficient mice

Klatt C, Grandoch M, Fischer JW

81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 10.-12. März 2015, Kiel

Enhanced Thrombin Activity in Biglycan-deficient Mice Promotes Vascular Inflammation in Murine Atherosclerosis

Grandoch M, Melchior-Becker A, Feldmann K, Müller J, **Klatt C**, Homann S, Dick LS, Nagy N, Schäfer L, Skroblin P, Yin X, Mayr M, Tannock L, Fischer JW

American Heart Association Scientific Session, 07.-11. November 2015, Orlando, Florida

Biglycan protects from atherosclerosis by inhibiting thrombin generation and platelet activation in *ApoE*-deficient mice

Grandoch M, Melchior-Becker A, **Kohlmorgen C**, Feldmann K, Gowert NS, Müller J, Homann S, Kiene LS, Zeng-Brouwers J, Schmitz F, Nagy N, Polzin A, Skroblin P, Yin X, Elvers M, Mayr M, Schaefer L, Tannock L, Fischer JW

82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 29. Februar - 03. März 2016, Berlin

Genetic deficiency in Biglycan increases thrombin-mediated platelet activation and enhances atherosclerosis in *ApoE*-deficient mice

Grandoch M, Melchior-Becker A, **Kohlmorgen C**, Feldmann K, Gowert NS, Müller J, Homann S, Kiene LS, Zeng-Brouwers J, Schmitz F, Nagy N, Polzin A, Skroblin P, Yin X, Elvers M, Mayr M, Schaefer L, Tannock L, Fischer JW

82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 30. März - 02. April 2016, Mannheim

Veröffentlichungen

Dapagliflozin reduces thrombin generation and atherosclerosis in *LDLr*-deficient mice

Kohlmorgen C, Feldmann K, Grandoch M, Fischer JW

82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 30. März - 02. April 2016, Mannheim

Dabigatran-mediated decrease in pro-inflammatory macrophages in visceral adipose tissue and atherosclerotic lesions of Low density lipoprotein receptor deficient mice

Feldmann K, Grandoch M, **Kohlmorgen C**, Nagy N, Valentin B, Hartwig S, Lehr S, Fischer JW

82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 30. März - 02. April 2016, Mannheim

Reduced pro-inflammatory macrophage polarization in visceral adipose tissue and atherosclerotic lesions of ldl receptor deficient mice treated with the direct thrombin inhibitor dabigatran

Feldmann K, Grandoch M, **Kohlmorgen C**, Valentin B, Gerfer S, Nagy N, Fender AC, Hartwig S, Lehr S, Fischer JW

85. EAS Congress, 23.-26. April 2017, Prag

Lebenslauf

Person

Name Christina Kohlmorgen geb. Klatt
Geburtsdatum 23.03.1988
Geburtsort Schwerte
Staatsangehörigkeit Deutsch
Familienstand verheiratet

Promotion

02/2013-09/2017 Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstraße 5 ,40225
Düsseldorf, Doktorvater Prof. Dr. Jens W. Fischer
Thema Untersuchung des Einflusses des
Natrium-Glukose-Cotransporter-2-Inhibitors Dapagliflozin auf
die Atherogenese im Mausmodell der diätinduzierten
Insulinresistenz

Studium

04/2016-heute Studium der Humanmedizin an der Universität zu Köln
01/2013 Approbation als Apothekerin
12/2012 3. Staatsexamen
05/2012-10/2012 2. Abschnitt Praktisches Jahr in der Adler-Apotheke,
Dortmund
11/2011-04/2012 1. Abschnitt Praktisches Jahr in der Herz-Jesu-Krankenhaus-
Apotheke, Münster
10/2011 2. Staatsexamen
03/2010 1. Staatsexamen
10/2007-08/2011 Studium der Pharmazie an der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Schule

07/2004-07/2007 Max-Planck-Gymnasium Dortmund, Abschluss mit Abitur
07/1998-06/2004 Goethe-Gymnasium Dortmund
08/1994-06/1998 Eintracht-Grundschule Dortmund

Danksagung

Zunächst möchte ich mich sehr bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer für die Überlassung dieses Projektes und die professionelle Betreuung bedanken. Die konstruktiven und motivierenden Diskussionen haben stets zu neuen Ideen und zum Fortschritt des Projektes beigetragen. Ich bin sehr glücklich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen teilzunehmen. Das entgegengebrachte Vertrauen vor allem in der Endphase meiner Promotionszeit weiß ich sehr zu schätzen.

Ein mindestens genauso großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Maria Grandoch. Vielen Dank für die persönliche Betreuung und den großartigen Einsatz für das Projekt. Dankeschön für die ausnahmslose Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit, für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und für die interessanten fachlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Jörg Breitzkreutz danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Danken möchte ich auch Dr. Stefan Lehr und Dr. Sonja Hartwig für die Durchführung der Multiplex-Messungen.

Kerstin Freidel, Kirsten Bartkowski, Petra Rompel, Beate Weyrauther, Irmhild Rüter und ganz besonders Annika Zimmermann standen mir im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite. Für diese Hilfsbereitschaft möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Ich danke allen meinen Kolleginnen und Kollegen für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die vielen schönen Erlebnisse. Besonders die sportlichen Herausforderungen bei zahlreichen Halbmarathons und „Matschläufen“ waren stets eine große Freude. Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Kathrin Feldmann für die gute Zusammenarbeit in allen Projekten und die vielen hilfreichen Gespräche.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich für die organisatorische Unterstützung.

Der größte Dank geht an meine Familie, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht hat. Meinen Eltern und meinen Großeltern danke ich von Herzen für ihren bedingungslosen Beistand. Meinem Mann Philipp bin ich unendlich dankbar für seine Geduld und seine Unterstützung und dass er mich darin bestärkt hat, diesen Weg zu gehen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 11.09.2017

Christina Kohlmorgen