

Aus dem

Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer

**Einfluss der Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren
Saxagliptin und Sitagliptin auf die Entwicklung und
zelluläre Komposition atherosklerotischer Plaques
im Mausmodell der diätinduzierten Insulinresistenz**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephen Gerfer

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Maria Grandoch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Norbert Gerdes

Zusammenfassung

Der Diabetes mellitus (DM), eine Stoffwechselerkrankung mit hoher Prävalenz, weist durch einhergehende Komplikationen eine erhöhte Morbiditäts- und Mortalitätsrate auf. Vor allem kardiovaskuläre Folgeschäden des DM zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Die Atherosklerose, ursächlich für kardiovaskuläre Ereignisse wie periphere arterielle Verschlusskrankheit, Schlaganfall und Herzinfarkt, wird im Rahmen des DM durch erhöhte Blutglukosespiegel und oxidativen Stress begünstigt. Zur Therapie des DM werden neben Insulin auch orale Antidiabetika (OAD) wie Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren (DPP-4-I) eingesetzt. Saxagliptin und Sitagliptin, zwei Vertreter der DPP-4-I, hemmen den Abbau von Inkretinhormonen, was zur Verstärkung postprandialer Insulinsekretion und somit zu einer konsekutiven Blutzuckersenkung führt. Neben der reinen Blutzuckersenkung hat aus den genannten Gründen insbesondere das kardiovaskuläre Risikoprofil OAD einen großen Stellenwert. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Auswirkung von Saxagliptin und Sitagliptin sowohl auf metabolische Parameter als auch Atherosklerose in einem Mausmodell mit gesteigerter Atherosklerosebildung und diätinduzierter Insulinresistenz zu untersuchen und mögliche geschlechts- und substanzspezifische Effekte zu detektieren. Dazu erfolgten metabolische Untersuchungen, Bestimmung der DPP-4 Aktivität und histologische Aufarbeitung muriner Herzen und Aorten. Ein direkter Vergleich zwischen den Geschlechtern hinsichtlich DPP-4-I vermittelter Wirkungen auf metabolische Parameter und Atherosklerose wurden bisher nicht beschrieben. Diese Arbeit zeigt trotz fehlender Effekte auf Glukosespiegel und Körpergewicht im Geschlechtervergleich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Atherogenese und der zellulären Komposition atherosklerotischer Plaques. In den weiblichen Tieren zeigte sich die basale Plaquelast, der Kollagen- und Biglykangehalt im Vergleich zu den Männchen deutlich erhöht und sie reagierten auch hinsichtlich DPP-4-I vermittelter Effekte auf die Plaquematrix deutlich günstiger. So war der Gehalt an dicht gepacktem Kollagen unter DPP-4-I Therapie erhöht, was auf eine erhöhte Plaquestabilität hindeuten könnte. Die atherosklerotischen Läsionen in den männlichen Tieren waren kleiner, wiesen aber einen höheren Makrophagengehalt unter Sitagliptintherapie auf. Der direkte Substanzvergleich zeigte eine deutliche Blutzuckersenkung unter DPP-4-I Therapie im oralen Glukosetoleranztest in den Männchen und Saxagliptin scheint einen Effekt auf den Kollagengehalt unter Steigerung atherosklerotischer Plaques zu haben. Somit wurden für die diskutierten DPP-4-I sowohl geschlechts-, als auch substanzspezifische Unterschiede aufgezeigt.

Summary

Diabetes mellitus (DM) is a highly prevalent metabolic disease with high rates of morbidity and mortality due to disease-mediated complications. Especially cardiovascular complications lead to increased morbidity of patients with DM, which is therefore one of the ten most lethal diseases worldwide. Atherosclerosis causes peripheral arterial disease, stroke and ischemic heart attack and is triggered by high levels of blood glucose and oxidative stress in patients with DM. In the pharmacologic therapy of DM oral antihyperglycemics such as the dipeptidylpeptidase-4-inhibitors (DPP-4-I) are used alongside insulin and other oral antidiabetics. Saxagliptin and sitagliptin, two DPP-4-I, inhibit the degradation of incretin hormones and lead to a reduction of postprandial blood glucose through elevated insulin secretion. In addition to the reduction of the blood glucose, the cardiovascular safety profile plays a major role in antidiabetic drugs. The aim of this study is to examine the effects of saxagliptin and sitagliptin on metabolic parameters and the cardiovascular system with regard to gender- and substance-specific differences. In order to do so, the influence of both mentioned DPP-4-I was investigated by focusing on the genesis of atherosclerosis in a mice model with elevated atherogenesis and diet-induced insulin resistance. Metabolic tests with determination of blood glucose and body fat, determination of DPP-4 activity, as well as histologic investigation of the murine aorta and heart were conducted. In particular, a direct comparison of female and male laboratory animals with regard to DPP-4-I mediated effect on metabolic parameters and their impact on atherosclerosis has not been described in previous studies to date. The present study shows significant differences in atherogenesis and composition of atherosclerotic plaques between the sexes and treatment groups. Nevertheless, no gender-specific effects on blood glucose and body weight were observed. Female mice showed a higher basal plaque load and the content of biglycan and collagen was significantly higher than in males. Furthermore, female mice displayed a more favorable effect regarding DPP-4-I mediated impact on atherosclerotic plaque matrix. The content of densely packed collagen was significantly higher under DPP-4-I therapy, which could hint at a plaque stabilizing effect. The smaller atherosclerotic lesions in the males showed a significantly increased macrophage content under sitagliptin treatment. A direct comparison of the substances exhibited a decrease in the blood sugar levels for both DPP-4-I with regard to the oral glucose tolerance test in the male and saxagliptin seems to have a substance-specific effect on the collagen content when increasing atherosclerotic plaques. Thus, gender and substance-specific effects were shown for the discussed DPP-4-I saxagliptin and sitagliptin.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
ad	addiere
ApoE	Apolipoprotein-E
<i>ApoE^{-/-}</i>	Apolipoprotein-E <i>knock-out</i>
<i>ApoE^{-/-}/BGN⁻⁰</i>	Apolipoprotein-E/-Biglykan doppel <i>knock-out</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BfArM	Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte
BSA	Bovines Serum Albumin
COO-	Carboxygruppe
CVOT	<i>Cardiovascular Outcome Trials</i>
DAB	Diaminobenzidin
DD	Diabetogene Diät
dl	Deziliter
DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus Typ 1
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
DMT3	Diabetes mellitus Typ 3
DPP-4	Dipeptidylpeptidase-4
DPP-4-I	Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMPA-REG	<i>Empagliflozin, Cardiovascular Outcome and Mortality</i>
Outcome	<i>in Type 2 Diabetes</i>
ESPECIAL-ACS	<i>Effect of Sitagliptin on Plaque Changes in Coronary Artery Following</i> <i>Acute Coronary Syndrome in Diabetic Patients</i>
EXAMINE	<i>Examination of Cardiovascular Outcomes with Alogliptin versus</i> <i>Standard of Care Trail</i>
FBS	Fetales bovines Serum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramm
GDM	Gestationsdiabetes

Abkürzungsverzeichnis

GIP	<i>Glucose-dependent insulintropic peptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like-peptide-1</i>
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
H-Gly-Pro-pNA	chromogenes Substrat
pH	pH-Wert
H₂O	Wasser
HA	Hyaluronsäure (<i>Hyaluronic acid</i>)
HBA1_c	Hämoglobin A1 _c
HABP	<i>Hyaluronic Acid Binding Protein</i>
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HHU	Heinrich-Heine-Universität
IB-IVUS	<i>integrated backscatter IVUS</i>
IgG / IgG2A	Immunglobulin G / 2A (Zweitantikörper)
IL-6	Interleukin-6
IVUS	<i>intravascular ultrasound</i>
KCl	Kaliumchlorid
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LADA	<i>Latent autoimmun diabetes in adults</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LDLr	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
Ldlr^{-/-}	<i>Low density lipoprotein receptor knockout</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LEADER	<i>Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results</i>
Mac-2	Immunhistochemische Färbung Mac-2 positiver Zellen/ Makrophagen
MACE	<i>Major-adverse-cardiac events</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i>
Methanol abs.	Methanol absolut
mg	Milligramm
ml	Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

mM	Millimolar
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MODY	<i>Maturity-onset diabetes of the young</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
mU	<i>Milli-Units</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaCH₃CO₂	Natriumacetat
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxyd
NH₂	Aminogruppe
nm	Nanometer
NMR	Nukleare Magnetresonanz
n.s.	nicht signifikant
OAD	Orales Antidiabetikum
oGTT	Oraler Glukose-Toleranz-Test
ÖRO	Öl-Rot-O
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pNA	p-Nitroanilin
SAVOR-	<i>Saxagliptin Assessment of Vascular Outcomes Recorded in Patients</i>
TIMI	<i>with Diabetes Mellitus-Thrombolysis in Myocardial Infarction Trial</i>
S.E.M.	<i>Standard error of the mean</i>
SGLT-2	<i>Sodium/Glucose Cotransporter-2</i>
SGLT-2-I	<i>Sodium/Glucose Cotransporter-2-Inhibitor</i>
SMC	<i>Smooth muscle cell</i>
TECOS	<i>Trail Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i>
vs.	versus
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cell</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Prävalenz des Diabetes mellitus.....	1
Abbildung 2. Vereinfachte Darstellung der Atherogenese.....	6
Abbildung 3. Schematische Darstellung der Dipeptidylpeptidase-4.....	10
Abbildung 4. Strukturformel Saxagliptin.....	12
Abbildung 5. Strukturformel Sitagliptin.....	12
Abbildung 6. Experimentelles Studiendesign.....	14
Abbildung 7. Dipeptidylpeptidase-4 Aktivität im Plasma.....	28
Abbildung 8. Gewicht bei Ernte.....	30
Abbildung 9. Messung des Körperfettgehalts.....	32
Abbildung 10. Messung des Nüchternblutzuckers.....	34
Abbildung 11. Oraler Glukosetoleranztest.....	36
Abbildung 12. Aortaler Plaquescore.....	39
Abbildung 13. Plaquequotient Aortenursprung.....	42
Abbildung 14. Mac-2 Färbung im aortalen Ursprung.....	44
Abbildung 15. Biglykanfärbung des Aortenursprungs.....	46
Abbildung 16. Hyaluronsäurefärbung des Aortenursprungs.....	48
Abbildung 17. Picrosirius-Rot Färbung des Aortenursprungs.....	51
Abbildung 18. Picrosirius-Rot Färbung des Aortenursprungs polarisiert.....	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Komposition der diabetogenen Diät.....	15
Tabelle 2. Pufferzusammensetzungen und Lösungen in der Histologie.....	19
Tabelle 3. Antikörper und Bindeproteine in der Immunhistochemie.....	23
Tabelle 4a. Vergleichende Darstellung der substanzspezifischen Unterschiede.....	56
Tabelle 4b. Vergleichende Darstellung der geschlechtsspezifischen Unterschiede.....	57

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Inhaltsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.2 Atherosklerose	5
1.3 Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen	7
1.4 Inkretinhormone und das Inkretinsystem	8
1.5 Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren als neue Klasse oraler Antidiabetika	10
1.6 Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Tierexperimentelle Arbeiten	14
2.1.1 Tiermodell und Studiendesign	14
2.1.2 Körpergewichtsmessungen	15
2.1.3 Blutzuckerprofile und oraler Glukosetoleranztest	16
2.1.4 Körperfettmessung mittels Kernspinresonanzspektroskopie	16
2.1.5 Probengewinnung	16
2.2 Bestimmung der Dipeptidylpeptidase-4 Aktivität im Plasma	17
2.3 Histologie	18
2.3.1 Puffer und Lösungen	19
2.3.2 Analyse aortaler Plaques	20
2.3.2.1 Präparation der Aorten	21

Inhaltsverzeichnis

2.3.2.2	<i>En face</i> Färbung der Aorta.....	21
2.3.2.3	Aufnahme und Auswertung aortaler Plaquescores.....	21
2.3.3	Plaueanalyse des Aortenursprungs.....	22
2.3.3.1	Gefrierschnitte des Aortenursprungs	22
2.3.3.2	Immunhistochemische Färbungen des Aortenursprungs	22
2.3.3.3	Histologische Färbungen des Aortenursprungs.....	25
2.3.3.4	Aufnahme und Auswertung der Aortenursprungsfärbungen	26
2.4	Statistik.....	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Dipeptidylpeptidase-4 Aktivität im Plasma	28
3.2	Einfluss der Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren auf metabolische Parameter.....	29
3.2.1	Körpergewicht.....	29
3.2.2	Körperfettgehalt	31
3.2.3	Glukosetoleranz.....	33
3.3	Einfluss der Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren auf Atherosklerose.....	38
3.3.1	Plaque Score Aorta	38
3.3.2	Plauegröße im Aortenursprung	41
3.3.3	Plauekomposition im Aortenursprung.....	43
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	55
4.	Diskussion	58
4.1	Auswirkungen der Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren auf metabolische Parameter..	58
4.2	Auswirkungen der Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren auf Atherosklerose.....	60
4.3	Ausblick und Limitierung	71
5.	Schlussfolgerung	73
	Literaturverzeichnis	75
	Anhang	89

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) ist eine weltweit verbreitete Stoffwechselerkrankung pandemischen Ausmaßes mit chronisch erhöhten Blutglukosespiegeln, welche durch eine Störung der Ausschüttung von Insulin, der Wirkung von Insulin oder einer Kombination von beiden hervorgerufen wird.[1, 2]

DM stellte im Jahr 2017 mit 451 Millionen betroffenen Patienten im Alter von 18-99 Jahren eine hochprävalente Erkrankung und eine der größten gesundheitlichen Bedrohungen weltweit dar. Die Zahl der betroffenen Patienten wird für das Jahr 2045 auf 693 Millionen geschätzt. Durch die mit der Erkrankung verbundenen, zumeist kardiovaskulär bedingten, Folgeschäden befindet sich der DM unter den zehn häufigsten Todesursachen weltweit.[1]

2017			2045		
Rank	Country/territory	Number of people with diabetes	Rank	Country/ territory	Number of people with diabetes
1	China	114.4 million (104.1-146.3)	1	India	134.3 million (103.4-165.2)
2	India	72.9 million (55.5-90.2)	2	China	119.8 million (86.3-149.7)
3	United States	30.2 million (28.8-31.8)	3	United States	35.6million (33.9-37.9)
4	Brazil	12.5 million (11.4-13.5)	4	Mexico	21.8 million (11.0-26.2)
5	Mexico	12.0 million (6.0-14.3)	5	Brazil	20.3 million (18.6-22.1)
6	Indonesia	10.3 million (8.9-11.1)	6	Egypt	16.7million (9.0-19.1)
7	Russian Federation	8.5 million (6.7-11.0)	7	Indonesia	16.7million (14.6-18.2)
8	Egypt	8.2million (4.4-9.4)	8	Pakistan	16.1 million (11.5-23.2)
9	Germany	7.5 million (6.1-8.3)	9	Bangladesh	13.7 million (11.3-18.6)
10	Pakistan	7.5 million (5.3-10.9)	10	Turkey	11.2 million (10.1-13.3)

Abb. 1. Prävalenz des Diabetes mellitus. Geschätzte Zahl an Erkrankten weltweit 2017 und Entwicklung für 2045. (Aus IDF Atlas 8th Edition, 2017) [1] **Rank** Rang **Country/ territory** Land **Number of people with diabetes** Anzahl an Diabetes erkrankter Personen **India** Indien **United States** Vereinte Staaten von Amerika **Brazil** Brasilien **Mexico** Mexiko **Indonesia** Indonesien **Egypt** Ägypten **Russian Federation** Russische Föderation **Germany** Deutschland **Bangladesh** Bangladesch **Turkey** Türkei **million** Millionen

Einleitung

Der DM lässt sich nach der Ätiologie klassifiziert in vier Subgruppen untergliedern: Diabetes mellitus Typ 1 (DMT1), Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2), andere Diabetesformen oder Diabetes mellitus Typ 3 (DMT3) und Gestationsdiabetes (GDM).

Der DMT1 betrifft 5–10 % aller Diabetiker und wird durch eine zelluläre Autoimmunreaktion vermittelt. Durch Autoantikörper kommt es zur Zerstörung der beta-Zellen des Pankreas, welche das Insulin produzieren, und zu einem absoluten Insulinmangel mit konsekutiver Hyperglykämie. Häufig sind junge Patienten vom DMT1 betroffen. Eine Sonderform bei über 25-jährigen Patienten ist der „*Latent autoimmune diabetes in adults*“ (LADA) oder DMT1 idiopathischer Genese. Aufgrund des absoluten Insulinmangels sind Patienten mit DMT1 ihr Leben lang auf eine exogene Insulinzufuhr angewiesen.[2, 3]

Die häufigste Form des DM ist mit 90-95 % der DMT2. Dieser stellt ein multifaktorielles Krankheitsbild dar. Der DMT2 ist mit Übergewicht, Adipositas, mangelnder Bewegung und einem erhöhten Lebensalter sowie genetischen Prädispositionen und Umwelteinflüssen assoziiert. Ein erhöhter Körperfettgehalt und eine Hyperalimentation sind mit der Entwicklung eines metabolischen Syndroms und erhöhten Blutzuckerwerten vergesellschaftet. Eine Hyperglykämie wiederum führt zur Erhöhung des Insulinspiegels und langfristig zur Verminderung der Insulinwirkung (Insulinresistenz) der insulinabhängigen Gewebe.[4] Folglich werden höhere Insulinspiegel zur zellulären Glukoseverwertung benötigt. Weiterhin kommt es zur Verstärkung der Hyperglykämie durch Störung der zweiphasigen postprandialen Insulinsekretion, welche mit einer inadäquat erhöhten Glukagonsekretion aus den pankreatischen alpha-Zellen einhergeht und eine Störung des Inkretinsystems (siehe Abschnitt „Inkretinhormone und das Inkretinsystem“) aufzeigt. Eine anhaltende und verstärkte Insulinsekretion führt zum Untergang der beta-Zellen des Pankreas und sekundär zu einer verminderten Insulinsekretion.[3, 5, 6]

Unter DMT3 sind verschiedene seltene Formen des DM subsumiert: Der „*Maturity-onset diabetes of the young*“ (MODY) mit genetischen beta-Zelldefekten und Manifestation bei jungen Patienten; DM ausgelöst durch unwirksames Insulin aufgrund genetischer Defekte; Erkrankungen des exogenen Pankreas durch Infektionen oder Tumore, welche zusätzlich zu einer Affektion des endokrinen Anteils führen; Endokrinopathien (Phäochromozytom, Cushing-Syndrom, etc.); medikamentös-toxisch bedingter DM und DM in Vergesellschaftung mit genetischen Syndromen (*Down-Syndrom*, *Klinefelter-Syndrom*, etc.).[3]

Eine weitere Sonderform des DM ist der GDM. Kennzeichnend für den GDM ist eine erstmals in der Schwangerschaft auftretende, respektive diagnostizierte, Störung der Glukosetoleranz.

Einleitung

Durchschnittlich 7 % aller Schwangerschaften werden von einem GDM als Komplikation begleitet.[2, 3]

Die klinischen Symptome des manifesten DM gehen oft mit unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Müdigkeit und Leistungsminderung einher. Folge der Hyperglykämie können aber auch Polyurie mit Polydipsie und Gewichtsverlust, Sehstörungen und Hautveränderungen sein.[7]

Die oben genannten klinischen Symptome des DM können, in Kombination mit einer entsprechenden Anamnese, erste Hinweise auf das Vorliegen der Erkrankung geben. Die Diagnostik des DM richtet sich jedoch nach definierten Laborparametern. Bei einem Nüchtern-Glukosewert im venösen Plasma von 126 mg/dl oder höher, respektive eines Gelegenheitswertes von mindestens 200 mg/dl in Kombination mit Symptomen eines DM, erfolgt die Diagnosestellung. Als Alternative kann ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT) durchgeführt werden. Liegt der Blutglukosespiegel zwei Stunden nach Aufnahme einer definierten Glukosemenge im oGTT bei 200 mg/dl oder höher, besteht die Diagnose DM. Weiterhin kann der Hämoglobin A_{1c} (HbA_{1c})-Wert, welcher vor allem als Langzeitabbildung des Stoffwechsels dient, zur Diagnosestellung verwendet werden. Der Referenzbereich des HbA_{1c} für Nicht-Diabetiker liegt unterhalb 5,7 %. Ein Diabetes liegt ab einem HbA_{1c} - Wert von 6,5 % vor.[2, 8]

Die verschiedenen Entitäten des DM werden in Abhängigkeit des Stadiums unterschiedlich behandelt.

Die Therapie der Wahl des DMT1 ist die Normalisierung des Blutglukosespiegels durch exogene Insulinzufuhr. Eine Verbesserung der Insulintherapie konnte durch den Einsatz von Insulinpumpen und durch ein intensiveres Monitoring der Blutglukose erreicht werden. Die Verbesserung der Therapieoptionen ist weiterhin Gegenstand der Forschung und umfasst die Entwicklung neuer Insulinanaloga, sowie den Einsatz von Inkretinen und weiteren Hormonen.[9]

Eine phasengerechte Stufentherapie des DMT2 beinhaltet sowohl nicht-medikamentöse als auch medikamentöse Therapieansätze. Eine Umstellung des Lebensstils im Sinne gesteigerter körperlicher Aktivität, gesunder Ernährung und Gewichtsreduktion stellt eine geeignete erste Intervention bei hoch gefährdeten Personen für diese Erkrankung dar und kann die Manifestation des DM verzögern.[10] In der Regel reicht die Lebensstiländerung nicht aus, um eine adäquate Reduktion des Blutglukosespiegel und des HbA_{1c} - Werts zu erreichen, sodass zusätzlich eine pharmakologische Monotherapie initiiert wird. Als Mittel der ersten

Einleitung

Wahl wird Metformin als orales Antidiabetikum (OAD) empfohlen.[11] Bei Metforminunverträglichkeit oder Kontraindikationen werden andere OADs als Monotherapie oder Insulin eingesetzt. Wird auch in dieser zweiten Stufe die gewünschte Einstellung des DM nicht erreicht, erfolgt die Eskalation der Therapie mit den Möglichkeiten einer Insulinmonotherapie, Metformin plus Insulin oder der Zweifachkombination von OADs.[8, 12, 13] In der vierten Stufe der Therapie des DM wird Insulin als fester Kombinationspartner im Rahmen einer intensivierten Therapieform empfohlen, als Kombinationspartner zu OADs oder als Monotherapie nach bestimmten Schemata.[8] Als weitere Pharmaka werden unter anderem neuere OAD aus der Klasse der Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren (DPP-4-I) wie Sitagliptin und Saxagliptin als Kombinationspartner oder als Monotherapeutikum bei Arzneimittelunverträglichkeiten in der Therapie des DM eingesetzt.[8, 14-16]

Eine adäquate Einstellung des Blutzuckers ist sehr wichtig, um die Manifestation von DM assoziierten Komplikationen zu verzögern oder möglicherweise zu vermeiden. Akute Komplikationen treten in Form von Hypoglykämie, diabetischen oder ketoazidotischen Koma und einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen der Haut, aber auch für Tuberkulose, auf.[17] Die chronischen Komplikationen dieser Erkrankung sind mit einem erhöhten Risiko an einem Malignom zu erkranken sowie physischen und mentalen Einschränkungen wie Depressionen assoziiert.[18, 19] Außerdem geht DM mit generalisierten Gefäßschädigungen in vielen Organen des Körpers einher. Eine Gliederung nach betroffenen Gefäßabschnitten für kleine und große Gefäße unterteilt in diabetesspezifische mikrovaskuläre und diabetesunspezifische makrovaskuläre Gefäßschädigungen. Die Folge der mikrovaskulären Schädigungen betreffen Nieren (Nephropathie, Glomerulosklerose), Augen (Retinopathie), Nerven (Neuropathie) und Endstrombahnen der Herzkranzgefäße. Makrovaskuläre Schädigungen begünstigen eine koronare Herzerkrankung (KHK) durch diffuse Stenosierungen der Herzkranzgefäße und können zu Herzinfarkten und Herzinsuffizienz führen. Stenosierungen der hirnversorgenden Gefäße führen zu ischämischen Hirninfarkten. Periphere arterielle Gefäßverschlüsse können unter anderem eine Minderperfusion der unteren Extremitäten mit dem Mischbild des ischämischen diabetischen Fußes und Gewebnekrosen verursachen.[20] Die vaskulären Folgeschäden treten bei Patienten mit DM zwei- bis dreifach häufiger als bei Nicht-Betroffenen auf [21, 22] und stellen mit einer hohen Anzahl von Patienten mittleren Alters die häufigste Todesursache des DMT2 durch zerebrovaskuläre Erkrankungen mit Schlaganfall oder der koronaren Herzerkrankung dar.[1, 23-25] Somit haben Diabetiker ein deutlich erhöhtes Risiko, vergleichbar mit dem eines Nicht-Diabetikers nach erlittenem Herzinfarkt, einen Herzinfarkt als Folge ihrer Erkrankung zu erleiden.[26]

Die Ursachen für die Entwicklung der vaskulären Folgeerkrankungen des DM sind mannigfaltig. Ein wichtiger Faktor in der Genese der makrovaskulären Erkrankungen ist die Atherosklerose, getriggert durch inflammatorische Prozesse.[20, 27]

1.2 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Gefäßwände und häufig ursächlich für kardiovaskuläre Ereignisse wie Herzinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit.[27, 28] Bei der Pathogenese der Atherosklerose handelt es sich um einen multifaktoriellen Prozess mit dem Vorliegen von erhöhten Cholesterinkonzentrationen im Blut, der Proliferation von *smooth muscle cells* (SMC) und oxidativem Stress mit Freisetzung von radikalen Sauerstoffspezies.[29, 30] DM fördert über erhöhte Blutglukosespiegel, oxidativen Stress, häufig assoziierter Hypercholesterinämie und Dyslipidämie, sowie den Begleiterkrankungen Hypertonie und dem metabolischen Syndrom die Entstehung atherosklerotischer Läsionen.[30-33]

Hohe Blutplasmalevel an *very low-density lipoprotein* (VLDL) und *low-density lipoprotein* (LDL) führen zu einer Ansammlung dieser cholesterinreichen Partikel in den Gefäßinnenwänden (Intima).[34] Infolgedessen kommt es dort zu oxidativen und enzymatischen Veränderungen der Lipoproteine mit Freisetzung von Phospholipiden und konsekutiver Aktivierung des Endothels.[35, 36] Die Expression von Leukozyten-bindenden Molekülen und Chemokinen führen über eine Anheftung an das Endothel zur Einwanderung der Leukozyten in die Intima. Die eingewanderten Monozyten differenzieren, stimuliert durch *Macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF), zu aktivierten Makrophagen. Dieser entscheidende Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose ist mit einer Hochregulierung von verschiedenen *pattern recognition receptors* verbunden. Durch diesen Prozess wird die weitere Aufnahme an oxidierten LDL-Partikeln und nachfolgend die Formation der Makrophagen durch Überladung mit Lipiden zu Schaumzellen, sowie die Initiierung einer entzündungsfördernden Kaskade ermöglicht.[37] Neben den aktivierten und mit Lipiden beladenen Makrophagen können auch SMC zu Schaumzellen umgewandelt werden.[38] In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Rate an CD4+ T-Zellen in atherosklerotischen Plaques höher war als die der CD8+ T-Zellen. Durch Erkennung von Antigenen auf Makrophagen und dendritischen Zellen kann es zur Verstärkung einer Immunreaktion durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommen.[39] Die Freisetzung der Zytokine begünstigt weiterhin mit Hilfe von Wachstumsfaktoren die Aktivierung von SMC, die bereits als Konglomerate mit Schaumzellen

und T-Zellen in der Intima als intermediäre Läsionen oder *fatty streaks* vorliegen können, zu einem sekretorischen Phänotyp.[40-43] Dieser Vorgang begünstigt die weitere Einwanderung von SMCs, welche neben der Beteiligung des Proteoglykans Biglykan die Veränderung der Plaquekomposition durch Einflussnahme auf die extrazelluläre Matrix und die Stabilität der atherosklerotischen Plaques beeinflusst.[35, 44, 45] Es kommt zur Volumenzunahme und Veränderung der Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsion mit Ausbildung einer fibrösen Kappe und einem nekrotischen Lipidkern.

Die Gefahr einer Plaqueruptur und damit die akute klinische Manifestation der Atherosklerose steht in Abhängigkeit von der Zusammensetzung respektive des Kollagengehaltes der fibrösen Kappe und der Größe des instabilen Kerns der Plaques.[46, 47] Eine Einengung der Koronarien oder der hirnersorgenden Gefäße kann, wie auch eine Plaqueruptur, klinisch stumm verlaufen, wobei die Ausbildung einer Koronarthrombose infolge einer Plaqueruptur in der Regel zu einem akuten Koronarsyndrom führt.[48]

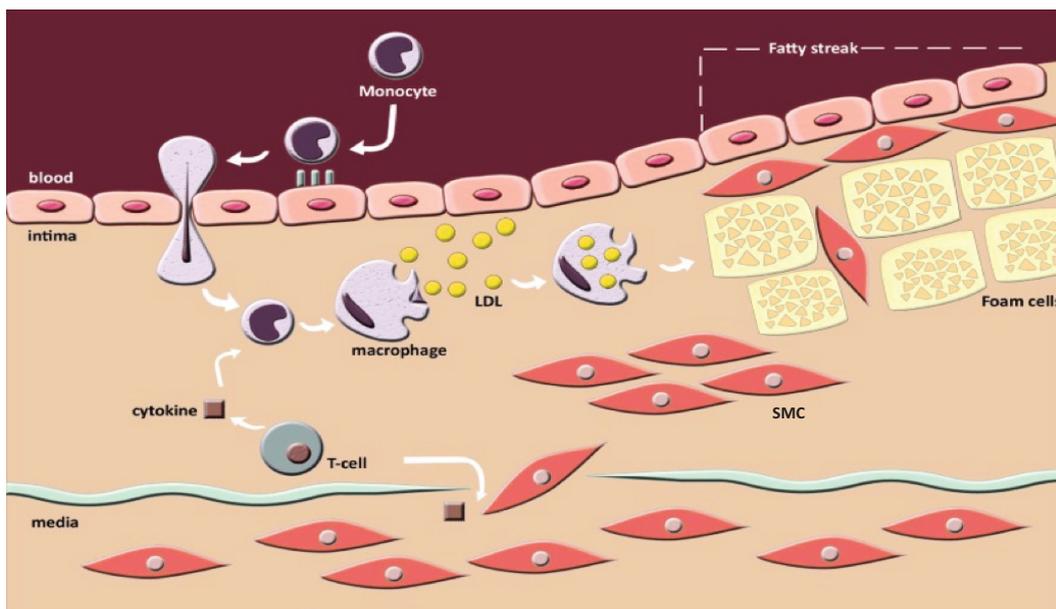


Abb. 2. Vereinfachte Darstellung der Atherogenese. (Modifiziert nach Saleh 2016)[49]

fatty streak Konglomerate von Schaumzellen und SMC **SMC** Smooth muscle cell **Monocyte** Monozyten **blood** Blut/ Blutstrombahn **Intima** Gefäßinnenschicht **LDL** Low density lipoprotein **Macrophage** Makrophage **Cytokine** Zytokine **Foam cells** Schaumzellen **T-cell** T-Zellen **Media** Muskelschicht des Gefäßes

Zur Vermeidung und Entwicklung der Atherosklerose besteht neben präventiven lebensverändernden Maßnahmen die Behandlung der oben genannten Erkrankungen. Dabei kommen Arzneimittel zur Behandlung typischer Risikofaktoren wie der Hypercholesterinämie, respektive der erhöhten Blutfettwerte, der Hypertonie und des DM zum Einsatz.[50, 51]

1.3 Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen

Patienten mit DMT2 haben aufgrund ihrer Erkrankung ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko.[52, 53] Die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität bei Patienten mit DMT2 sind kardiovaskuläre Folgeschäden.[54, 55] Das Risiko für die Entwicklung einer KHK ist bei DMT2, auch bei Nichtvorhandensein anderer klassischer Risikofaktoren (Bluthochdruck, Rauchen, Hypercholesterinämie), erhöht.[56] Darüber hinaus ist das Risiko einer KHK bei DMT2 Patienten ohne vorausgegangenen Herzinfarkt mit dem eines Nicht-Diabetikers und Zustand nach Herzinfarkt gleichzusetzen.[26] Neben einer erhöhten Rate an kardiovaskulären Erkrankungen mit KHK, Schlaganfall und peripheren Durchblutungsstörungen treten kardiovaskuläre Ereignisse in Patienten mit DM in einem früheren Alter auf.[57, 58]

Um die Wirkung neuer antidiabetischer Medikamente einschätzen zu können und eine adäquate Behandlung der kardiovaskulären Komplikationen bei DMT2 zu gewährleisten, forderte die *US Food and Drug Administration (FDA)* im Jahr 2008 für die Zulassung neuer Präparate den Nachweis der kardiovaskulären Sicherheit durch Studien, die belegen, dass diese das kardiovaskuläre Risiko nicht erhöhen.[59, 60] Die *European Medicines Agency (EMA)* fordert mindestens einen neutralen Effekt auf die Auswirkung des kardiovaskulären Risikoprofils von neuen antihyperglykämisch wirkenden Medikamenten. Für die Zulassung neuer antidiabetischer Medikamente werden somit kardiovaskuläre Sicherheitsstudien gefordert, um eine Nichtunterlegenheit zu belegen.[61]

Zu einer der ersten *Cardiovascular Outcome Trials (CVOTs)*, welche einen Nutzen aufweisen konnte, zählt die Empagliflozin, *Cardiovascular Outcome and Mortality in Type 2 Diabetes (EMPA-REG Outcome)* Studie. Diese Pionierstudie untersuchte mit Empagliflozin, einem Natrium/Glukose Cotransporter-2, auf den zusammengesetzten Endpunkt kardiovaskulärer Tod, nicht-tödlicher Herzinfarkt und Schlaganfall, sowie Tod jeglicher Ursache und Hospitalisierung. Für Empagliflozin konnte neben einem Glukose-senkenden Effekt auch die Reduktion des kardiovaskulären Risikos bei DMT2 belegt werden.[62, 63] Eine weitere CVOT mit *Liraglutide Effect and Action in Diabetes: Evaluation of Cardiovascular Outcome Results (LEADER)* untersuchte den Effekt des GLP-1 Rezeptoragonisten Liraglutid mit positivem Nutznachweis und Bestätigung protektiver kardiovaskulärer Eigenschaften.[64] Auch die Vertreter der DPP-4-I wurden in großen randomisierten, kontrollierten Studien auf ihr kardiovaskuläres Risikoprofil geprüft. Dabei konnte im *Trail Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin (TECOS)* keine Erhöhung des kardiovaskulären Risikos unter der Therapie mit Sitagliptin oder andere klinische Bedenken festgestellt werden[65]. Der

Saxagliptin Assessment of Vascular Outcomes Recorded in Patients with Diabetes Mellitus-Thrombolysis in Myocardial Infarction Trial (SAVOR-TIMI) konnte neben einer Verbesserung der Blutglukoseeinstellung einen negativen ischämischen kardiovaskulären Effekt für die Behandlung des DMT2 mit Saxagliptin ausschließen. Allerdings ist zu erwähnen, dass es zu einer gesteigerten Rate an Hospitalisierung wegen Herzinsuffizienz kam.[66] Ähnliche Ergebnisse, mit Bestätigung einer Nicht-Unterlegenheit, wurden im *Examination of Cardiovascular Outcomes with Alogliptin versus Standard of Care Trail (EXAMINE)* für Alogliptin bestätigt.[67] Somit lässt sich für die Gruppe der DPP-4-I trotz der kurzen Studiendauer im Vergleich zur Standardtherapie ein neutrales kardiovaskuläres Risikoprofil hervorheben.[68] Weitere Untersuchungen dieser Substanzen, vor allem mit Langzeit-Follow-up, sind notwendig, um eine endgültige Einschätzung des kardiovaskulären Risikoprofils zu erhalten.

1.4 Inkretinhormone und das Inkretinsystem

Der Begriff Inkretineffekt beschreibt die Tatsache, dass eine äquivalente Menge an Glukose oral verabreicht eine stärkere Insulinausschüttung hervorruft als wenn diese intravenös gegeben wird und zudem unabhängig von der Blutglukosekonzentration auftritt.[69, 70] Durch orale Glukoseaufnahme getriggert, werden unter anderem die Inkretinhormone *Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1)* und *Glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)* aus den endokrinen Zellen der Mukosa des Magen-Darmtraktes freigesetzt. [71-73] Die Inkretine *GLP-1*, genauer *GLP-1 (7-37)* und *GLP-1 (7-36) -Amid*, und *GIP (1-42)* bewirken nach deren Freisetzung eine Insulinsekretion aus den beta-Zellen des Pankreas. *GLP-1* hemmt zusätzlich eine weitere Glukagonsekretion aus den alpha-Zellen des Pankreas und bewirkt eine Verlangsamung der Magenperistaltik. Beide Inkretine erhöhen die Insulinsensitivität peripherer Gewebe und tragen somit entscheidend zur postprandialen Glukoseverwertung bei.[71, 74, 75] Das Enzym Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) ist für den Abbau und somit die Beendigung der Wirkung von *GLP-1* und *GIP* verantwortlich.[76]

Das *GIP* wird hauptsächlich von K-Zellen und das *GLP-1* von L-Zellen im Duodenum, unter anderem G-Protein gesteuert, innerhalb von Minuten nach der Nahrungsaufnahme sezerniert.[77, 78] *GLP-1* wird in verschiedenen Formen sezerniert, von denen nur zwei Unterformen eine biologische Aktivität aufweisen[71]. Ein starker Stimulus sind Fette und Kohlenhydrate.[79] Die beiden Inkretine binden an den *GLP-1* Rezeptor, respektive *GIP* Rezeptor, der beta-Zellen des Pankreas und stimulieren G-Protein vermittelt über die

Aktivierung der Proteinkinase A eine Insulinsekretion.[80, 81] Neben der Expression des *GLP-1* Rezeptors auf den pankreatischen beta-Zellen ist dieser auch auf vielen weiteren Geweben, wie Herz, Gastrointestinaltrakt und Nervensystem, ausgeprägt. Ähnliches gilt für den *GIP* Rezeptor. Dieser ist unter anderem im oberen Magendarmtrakt, Herz, zentralen Nervensystem und Fettgewebe exprimiert.[71] Daher lässt sich erklären, warum das *GLP-1* und *GIP* ähnliche Effekte in ihrer Wirkung aufweisen. Neben der postprandialen, glukoseabhängigen Insulinfreisetzung triggern diese beiden Inkretine auch die Insulinsynthese.[71, 81, 82] Darüber hinaus wird den beiden genannten Inkretinen eine Verminderung der beta-Zell Apoptose und proliferationsstimulierende Wirkung ebendieser zugeschrieben.[83-85] *GLP-1* hat zusätzlich Einfluss auf die Sekretion von Somatostatin und Glukagon, welche ebenfalls regulierend in den Insulin- und Glukosehaushalt eingreifen. *GLP-1* senkt glukoseabhängig die Glukagonsekretion und steigert die Ausschüttung von Somatostatin. Somit wirkt Somatostatin als Antagonist des Insulins im Sinne eines *Feedback*-Mechanismus der Insulinwirkung entgegen.[86] Das *GLP-1* verzögert die gastrale Peristaltik und kann somit zu einer Appetitsenkung und Gewichtsabnahme beitragen. *GIP* und *GLP-1* zeigten beide in präklinischen Studien einen neuro- und knochenprotektiven Effekt auf.[87] Die Expression von *GLP-1* Rezeptoren auf humanen Herzmuskelzellen[88] kann über die Regulierung der Glukoseaufnahme Einfluss auf den myokardialen Stoffwechsel und die Pumpfunktion des Herzens nehmen.[89-91] Weiterhin konnte eine durch *GLP-1* vermittelte Reduktion der Inflammation in atherosklerotischen Läsionen gezeigt werden.[92, 93]

Die Aminopeptidase DPP-4 wurde 1966 entdeckt[94] und ist in Endothelzellen zahlreicher Organstrombahnen[95] wie dem Magendarmtrakt, Leber, Lunge und Nieren exprimiert.[96] Die DPP-4 liegt als lösliches und membrangebundenes Glykoprotein vor und kann als Rezeptor, Bindemolekül und Enzym agieren. Die membrangebundene, ortsständige DPP-4 interagiert mit anderen Membranproteinen der Zellmembran und leitet unter anderem Signale über Bindung einer Adenosin Deaminase, Caveolin-1 und T-Zell Antigen CD45 in das Zellinnere.[97-99] Die DPP-4 steht auch in Interaktion mit extrazellulären Komponenten wie Kollagen und Fibronectin. Die membrangebundene und lösliche Form der DPP-4 hat katalytische Eigenschaften an der C-Region des Enzyms und spaltet Peptide mit Alanin oder Prolin in der zweiten Amino-terminalen Position.[100, 101] Zu den Substraten der DPP-4 zählen die oben diskutierten Peptide *GLP-1* und *GIP*. Die katalytisch aktive Form wird als lösliche DPP-4 von der Plasmamembran sezerniert und zirkuliert im Blutkreislauf.[102, 103] Die DPP-4 ist neben der Spaltung von Inkretinen in der Lage, viele verschiedene Peptide nach oben genanntem Muster zu degradieren. Dabei kommt es, neben der Inaktivierung von

Peptiden, auch zur Produktion aktiver Spaltprodukte, welche weiterhin pathophysiologische Wirkungen besitzen können. Somit ist die DPP-4 mit ihren Substraten in ein komplexes biochemisches System mit Auswirkung auf multiple Organsysteme, wie dem Immunsystem und neuroendokrinen System, eingebunden.[104]

Durch die oben beschriebenen Wirkungen der Inkretine bietet das Inkretinsystem über die Regulation des *GLP-1*, respektive über den *GLP1* Rezeptor und über eine Inhibition der DPP-4, weitere Therapieoptionen des DM.

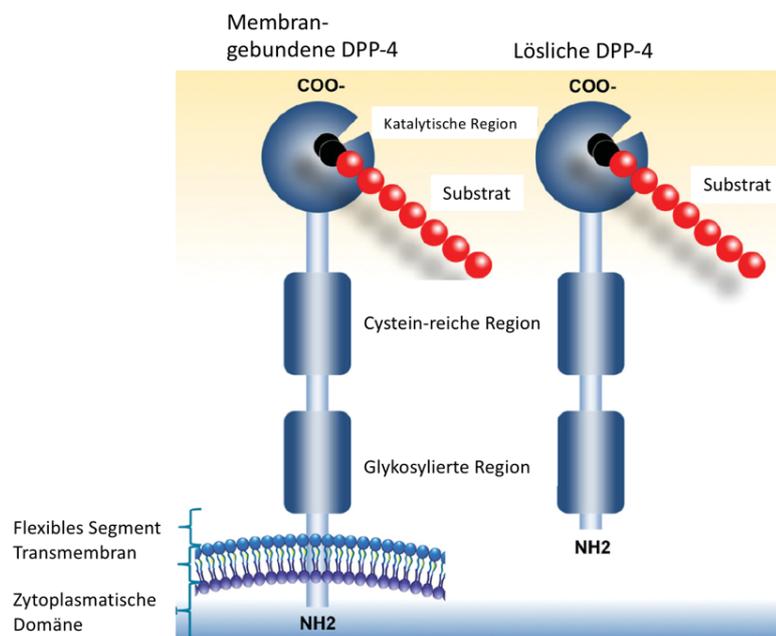


Abb. 3. Schematische Darstellung der Dipeptidylpeptidase-4. (Modifiziert nach Mulvihill 2014)[104]

COO- Carboxygruppe der Enzyms NH2 Aminogruppe der Dipeptidylpeptidase-4

1.5 Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren als neue Klasse oraler Antidiabetika

Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren (DPP-4-I) gehören zu den neueren oralen Antidiabetika und werden in der Therapie des DMT2 eingesetzt.

Initial wurde überlegt die Hemmung der DPP-4 als Modulator in der T-Zell Aktivierung und Proliferation zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis einzusetzen.[105] Die Verwendung von spezifizierten DPP-4-I zur Blockierung der DPP-4 (CD26) auf T-Zellen führte jedoch nicht zur gewünschten T-Zell Inaktivierung, sodass in der Schlussfolgerung die enzymatische Aktivität der DPP-4 nicht in

Einleitung

Zusammenhang mit der T-Zell Aktivierung steht.[106] Die Untersuchung der DPP-4 Inhibition in T-Zell Tumoren, nicht-kleinzelligen Lungentumoren und Metastasen mit hochregulierter DPP-4 zeigte keinen klinisch nachweisbaren Einfluss auf die Tumorprogression.[107, 108]

Der Einsatz der DPP-4-I zur Behandlung von Patienten mit DM beruht auf der Entdeckung, dass die nativen *GLP-1* (7-37) und *GLP-1* (7-36)-Amide im Gegensatz zu dem durch die DPP-4 degradierte *GLP-1* (1-37)-Amid, eine glukoseabhängige Insulinsekretion triggern.[109] Im Jahr 1993 wurde herausgefunden, dass die kurze Halbwertszeit des zirkulierenden und wirksamen *GLP-1* (7-37) und *GLP-1* (7-36)-Amid, sowie des *GIP* (1-42) durch die DPP-4 vermittelte Hydrolyse bedingt ist.[110, 111] In weiteren Studien konnten gezeigt werden, dass die Inhibition der DPP-4 eine verminderte N-terminale Spaltung der glukoseregulierenden Inkretine zufolge hat und das *GLP-1* eines der physiologischen Hauptsubstrate der DPP-4 darstellt.[110, 112] Die Verabreichung eines selektiven DPP-4-I zeigte im Tiermodell eine Verbesserung der oralen Glukosetoleranz und erhöhte Plasmainsulinwerte, welche in Zusammenhang zu gesteigerten *GLP-1*-Konzentrationen standen.[113] Die erste klinische Studie fand mit dem DPP-4-I 1-[[[2-[(5-cyanopyridin-2-yl) amino]ethyl] amino]-acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine (NVP DPP728), als Placebo-kontrollierte Studie in 93 Patienten mit DMT2 statt. Es konnte sowohl eine Reduktion der Nüchternglukosewerte als auch der postprandialen Glukosewerte und eine Reduktion des HbA_{1c} Wertes erreicht werden.[114] Eine Studie mit dem DPP-4-I LAF237 (Vildagliptin) in übergewichtigen Patienten mit DMT2 zeigte eine Reduktion der Plasmaglukagonlevel bei gleichzeitiger Steigerung der *GLP-1* Plasmakonzentrationen und stellte damit eine direkte Korrelation zur Reduktion der Blutglukosewerte dar.[115] Für Vildagliptin konnte neben verminderten Glukagonkonzentrationen im Plasma eine Reduktion der körpereigenen Glukoseproduktion, verstärkte Insulinsekretion und eine Reduktion der Plasmaglukoselevel gezeigt werden.[116] Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen klinische Studien, die Sitagliptin in Patienten mit DMT2 gegen Placebo oder mit Metformin als Kombinationstherapie untersuchten.[117, 118]

Nach der klinischen Zulassung der DPP-4-I wurden diese in besonderen Fällen als Mono- oder Kombinationstherapie bei DMT2 zugelassen und werden aktuell als *Second-* oder *Third-Line*-Therapie in der DMT2-Behandlung empfohlen.[119] Dabei ist Saxagliptin als Monotherapeutikum bei Metforminunverträglichkeit in Deutschland und sonst nur in der Kombinationstherapie, unter anderem in Kombination mit Metformin, einem Sulfonylharnstoff (Glibenclamide), Thiazolidindion (Glitazone) oder Insulin zugelassen. Sitagliptin kann bei Unverträglichkeit von Metformin als Monotherapeutikum eingesetzt werden, auch eine Kombinationstherapie mit Metformin und Insulin ist zugelassen.[8] Ein Vorteil dieser

Einleitung

Substanzklasse als Monotherapie ist das fehlende intrinsische Hypoglykämierisiko und ein gewichtsneutraler bis gewichtsreduzierender Effekt.[120] Weiterhin konnten weniger gastrointestinale Nebenwirkungen für die Gruppe der DPP-4-I im Vergleich zu Metformin, Arcabose und den *GLP-1* Analoga gezeigt werden.[121] Bei eingeschränkter Nierenfunktion ist eine Dosisanpassung der DPP-4-I Sitagliptin und Saxagliptin erforderlich.[8] Bedenken zum klinischen Einsatz der DPP-4-I wurden hinsichtlich einer potenziell erhöhten Rate an akuter Pankreatitis und Pankreastumoren geäußert.[122, 123] Diese Befürchtungen wurden widerlegt und das Risiko einer Pankreatitis scheint nur minimal erhöht zu sein.[124] Das Risiko der Ausbildung eines Pankreastumors wurde als vergleichbar mit einem DMT2 Patient ohne DPP-4-I Therapie beschrieben.[125] In der *SAVOR-TIMI* wurde für Saxagliptin bei DMT2 mit eingeschränkter Nierenfunktion hinsichtlich ischämischer kardiovaskulärer Ereignisse kein ungünstiges Wirkungsprofil festgestellt. Die Rate an Krankenhauseinweisungen aufgrund von Herzinsuffizienz zeigte sich jedoch leicht erhöht.[126] Die kardiovaskuläre Sicherheit konnte auch für Sitagliptin in *TECOS* bei DMT2 mit ebenfalls eingeschränkter Nierenfunktion bestätigt werden.[127] Die Rate an *Major-adverse-cardiac events (MACE)* zeigt sich unter Einsatz von DPP-4-I im Vergleich zu Placebo nicht erhöht.[128] Für die Kombinationstherapie der Inkretinmimetika mit Metformin konnten im Kombinationsvergleich mit Sulfonylharnstoff eine erniedrigte Rate an kardiovaskulären Ereignissen, kardiovaskulärer und genereller Mortalität festgestellt werden.[129]

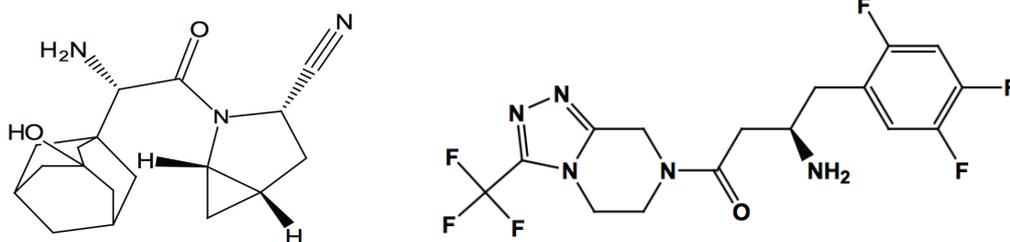


Abb. 4. und 5. Strukturformel Saxagliptin (links) und Sitagliptin (rechts). (El-Bagary 2012 und 2011)[130, 131]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein klinisch sicherer Einsatz der DPP-4-I gewährleistet ist. Ein leicht erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Pankreatitis liegt vermutlich vor. Ein vermehrtes Auftreten an Pankreastumoren konnte nicht festgestellt werden. Das kardiovaskuläre Risikoprofil dieser Substanzklasse zeigt eine Nichtunterlegenheit gegenüber Placebo oder anderen OADs. Lediglich die Klasse der *Natrium/Glucose Cotransporter-2-Inhibitor (SGLT-2-I)* zeigt ein günstigeres Risikoprofil in Patienten mit kardiovaskulärer Vorerkrankung, respektive einer Herzinsuffizienz.[132] Der

Einsatz der DPP-4-I in einer Population älterer Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion scheint dem der *SGLT-2-I* nicht überlegen.[133]

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll die Effekte der DPP-4-I Saxagliptin und Sitagliptin als neuere OADs in Bezug auf Glukosetoleranz, der Genese und Entwicklung der Atherosklerose und Inflammation der atherosklerotischen Plaques vergleichend aufzeigen.

In dem verwendeten Mausmodell mit genetischem *Low density lipoprotein receptor knockout* (*Ldlr*^{-/-}) und diätinduzierter Glukoseintoleranz liegt eine gesteigerte Atheroskleroseentwicklung vor. Somit ist die Erforschung verschiedener Risikofaktoren und die Auswirkung der DPP-4-I auf die Komposition der extrazellulären Matrix und atherosklerotischen Plaques möglich. Der direkte Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren soll dabei mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede der verwendeten DPP-4-I Sitagliptin und Saxagliptin untersuchen. Zudem soll ein direkter Substanzvergleich zwischen Saxagliptin und Sitagliptin mögliche Unterschiede der beiden DPP-4-I aufzeigen. Die in der Grundlagenforschung mit Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse dienen dem weiteren Verständnis dieser Substanzen im Menschen.

2. Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

Die erforderliche Genehmigung nach Paragraph 8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 zur Durchführung experimenteller Tierversuche des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, der Bezirksregierung Düsseldorf, lag unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2012.A405 vor. Die Fütterung der Tiere, etwaige unten aufgeführten Messungen, Tötung, Organentnahme und weitere Verarbeitung der Proben wurden nach Anlernen und Einarbeitung selbstständig unter Anleitung durchgeführt; die Genehmigung zur Durchführung tierexperimenteller Arbeiten liegt vor.

2.1.1 Tiermodell und Studiendesign

Für die tierexperimentellen Arbeiten wurden männliche und weibliche (*Low-density-lipoprotein-receptor (Ldlr) defiziente ($Ldlr^{-/-}$)* Mäuse von der Firma *The Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA)* bezogen. Durch den *Knockout* des *Ldlr* - Gens kommt es durch einen pathologisch gesteigerten Cholesteringehalt im Blut zur verstärkten Bildung atherosklerotischer Läsionen im Gefäßsystem der Versuchstiere.[134] Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine Universität (HHU) Düsseldorf unter der Projektnummer G405/12, Aktenzeichen A405/12, gehalten. Die Versuchstiere wurden dort unter standardisierten Bedingungen mit einem 12-Stunden-Tag- und Nachtrhythmus und freiem Zugang zu Trinkwasser und Futter aufgezogen und gehalten. Ab einem Lebensalter von acht Wochen wurden die Mäuse mit einer hochkalorischen, fetthaltigen diabetogenen Diät (DD, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) ohne, beziehungsweise mit Zusatz der DPP-4-I Sitagliptin (250 mg/kg KG/Tag) oder Saxagliptin (12,5 mg/kg KG/Tag) gefüttert. Die Untersuchung der Tiere erfolgte mit einem Endalter von insgesamt 23 Wochen, respektive nach einer Behandlungszeit von 15 Wochen (Abbildung 6).

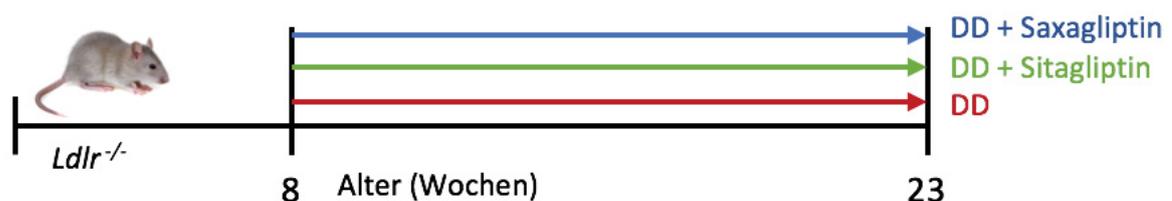


Abb. 6. Experimentelles Studiendesign $Ldlr^{-/-}$ Low-density lipoprotein receptor knockout DD Diabetogene Diät

2. Material und Methoden

In Tabelle 1 ist die Zusammensetzung der fetthaltigen, hochkalorischen Diät (DD) beschrieben. Saxagliptin (Onglyza, AstraZeneca, Wedel, Deutschland) wurde durch die Firma ssniff in die DD mit einer Konzentration von 62,5 mg Saxagliptin pro kg DD verpresst. Sitagliptin (Januvia, MSD SHARP & DOHME, Haar, Deutschland) wurde entsprechend in das Futter mit einer Endkonzentration von 1.250 mg Sitagliptin pro kg DD eingearbeitet. Die Dosierung von Sitagliptin und Saxagliptin erfolgte mittels Berechnung ausgehend von der für Menschen empfohlenen Dosen der Arzneimittel. Für die Berechnung der verwendeten Konzentrationen wurde eine im Mittel 25 g schwere Maus mit 5 g Futteraufnahme pro kg KG zu Grunde gelegt. Bei dem verwendeten *Ldlr^{-/-}* Mausmodell und DD handelt es sich um ein etabliertes Modell mit nachgewiesenem Effekt auf Gewichtszunahme, Zunahme der Körperfettmasse, Einfluss auf die Nüchternblutglukose und Glukosetoleranz, wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe im Vergleich mit einer Kontrollgruppe gezeigt werden konnte.[135]

Am Ende der 15-wöchigen Behandlung der Tiere erfolgte im Endalter von 23 Wochen die Messung des Körpergewichts, eine nukleare Magnetresonanztomographie (NMR), eine Messung der Nüchternblutglukose und ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT).

Inhaltsstoffe	Menge (%)
Cholesterin	0,15
Rohasche	5,6
Rohfaser	0,3
Rohfett	35,6
Rohprotein	20,6
Stärke	10,9
Zucker	22,3

Tabelle 1. Komposition der diabetogenen Diät % Prozent

2.1.2 Körpergewichtsmessungen

Mit einem Endalter von 23 Wochen erfolgte die Messung und Dokumentation des Körpergewichts der Versuchstiere unter standardisierten Bedingungen. Diese erfolgte vor einer Fastenperiode von sechs Stunden als Vorbereitung auf die folgenden Glukosetoleranztests.

2.1.3 Blutzuckerprofile und oraler Glukosetoleranztest

Die Versuchstiere wurden im Alter von 23 Wochen, nach 15-wöchiger Fütterung mit der DD mit und ohne den DPP-4-I Sitagliptin oder Saxagliptin, einem oGTT unterzogen. Als Vorbereitung auf die Untersuchung wurde eine 6-stündige Fastenperiode durch Entzug des Futters initiiert. Daraufhin erfolgte zunächst die Bestimmung der Nüchternblutglukose durch Entnahme eines Tropfen Bluts aus der Schwanzspitze der Mäuse und Auftragen auf einen Blutzuckermessstreifen. Als Blutzuckermessgerät wurde das Gerät Accu-Check Compact Plus (Roche, Diabetes Care Deutschland, Mannheim, Deutschland) verwendet. Im Rahmen des oGTT wurde per Schlundung 1 g pro kg KG 40%-ige Glukoselösung verabreicht. Die Messung der Blutglukose erfolgte nach oben beschriebenem Vorgehen nach 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten nach oraler Applikation des Glukosebolus. Zur Auswertung der gemessenen Werte wurden diese als absolut gemessene Werte als mg/dl im Kurvenverlauf analysiert.

2.1.4 Körperfettmessung mittels Kernspinresonanzspektroskopie

Die Bestimmung des Körperfettgehaltes und der fettfreien Körpermasse wurde im *minispec nuclear magnetic resonance analyzer* (Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, USA) zum Ende der Versuchszeit nach 23 Wochen durchgeführt. Die Ermittlung des Körperfettanteils wurde durch die Division der Fettmasse des Tieres durch die Gesamtmasse aus Fettmasse und Magermasse bestimmt.

2.1.5 Probengewinnung

Mit einem Endalter von 23 Wochen erfolgte nach 15-wöchiger Fütterung der Tiere mit DD, DD + Saxagliptin oder DD + Sitagliptin und nach Durchführung der oben genannten Untersuchungen die Tötung der Mäuse. Nach Eintritt des Todes erfolgte die sofortige Entnahme und Aufarbeitung von Proben und Organen.

Die Entnahme von Vollblut erfolgte nach äußerlicher Desinfektion des Versuchstiers mit 70% Isopropanol und medianer Thorakotomie mittels kardialer Punktion des rechten Ventrikels. In den verwendeten 1 ml Spritzen zur Aspiration des Blutes waren 10 µl vom 100 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,9 % NaCl (B. Braun, Meisungen, Deutschland) enthalten. Zur Gewinnung des Plasmas wurde die Vollblutprobe für 15 Minuten bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach erfolgte die Entfernung des Überstandes

2. Material und Methoden

und eine erneute Zentrifugation des gewonnenen Überstandes für 5 Minuten mit 15.000 x g bei 4 °C. Die Lagerung des Plasmas erfolgt bei -80 °C bis zur weiteren Analyse.

Es erfolgte eine zügige Eröffnung der Bauchdecke und die Entnahme von jeweils zwei Proben an epididymalen und viszeralen Fettgewebe mit RNase freiem Präparierbesteck. Jeweils eine Fettprobe wurde in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß verbracht und sofort in flüssigen Stickstoff tiefgefroren, die weitere Lagerung dieser Proben erfolgte bei -80 °C. Die zweite epididymale und viszerale Fettprobe wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 4 % Paraformaldehydlösung überführt und bis zur weiteren Analyse bei 4 °C gelagert.

Es erfolgte die Entnahme des Herzens *en bloc* mit der Aorta. Die Abtrennung der Aorta erfolgte distal nach Auftrennung in die Arteriae iliacaе. Nach proximaler Abtrennung der Aorta ascendens im Bereich des Aortenursprungs wurde diese zur Fixierung in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 4 % Formaldehydlösung transferiert und bei 4 °C gelagert. Das Herz wurde in einem Eppendorf Reaktionsgefäß für 24 Stunden bei 4 °C in einer 4 %-igen Formaldehydlösung gelagert. Danach erfolgte der Transfer in eine 20 %-ige Sucroselösung (Saccharose) und eine erneute Lagerung des Organs bei 4 °C. Daraufhin wurde der Apex des Herzens mit einem Skalpell abgetrennt und das Herz in mit *Tissue-Tek O.C.T. Compound* (Sakura, Alphen aan de Rijn, Niederlande) gefüllte Cryomolds positioniert. Mit Hilfe von -40 °C kaltem Isopentan erfolgte die Gefrierfixation des Gewebes. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung in einem -80 °C kalten Gefrierschrank aufbewahrt.

2.2 Bestimmung der Dipeptidylpeptidase-4 Aktivität im Plasma

Die Bestimmung der DPP-4 Aktivität erfolgte mit Hilfe eines DPP-4 Assay kit (DPPIV/CD26 Assay kit for biological samples, BML-AK498-0001, Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, New York, USA) aus dem gewonnenen Plasma. Das Assay kit erlaubt entweder eine Bestimmung der DPP-4 Aktivität mittels fluorimetrischer oder colorimetrischer Messung. Bei der hier durchgeführten colorimetrischen Messung wird ein chromogenes Substrat (H-Gly-Pro-pNA) eingesetzt. Durch die DPP-4 vermittelte Abspaltung des p-Nitroanilin (pNA) resultiert eine positiv korrelierende Steigerung der gemessenen Absorption bei 405 nm entsprechend der Enzymaktivität. Hierzu wurde das Plasma, welches bis zum Zeitpunkt des Versuchs bei -80 °C lagerte, in der Vorbereitung bei 4 °C aufgetaut und anschließend für 10 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Verwendet wurde lediglich der klare Überstand; der Bodensatz mit zellreichem Material wurde verworfen. Die Durchführung des Assay kit erfolgte laut Herstellerangaben unter Verwendung der enthaltenen Komponenten. Die Plasmaproben

2. Material und Methoden

wurden, um unerwünschte Nebeneffekte soweit wie möglich zu minimieren, in einer 1:5 Verdünnung und in Doppelbestimmung angesetzt und in die entsprechenden *Wells* verbracht. Nach dem Pipettieren der Inhibitorlösung, zum Ausschluss etwaiger Kreuzreaktivitäten, in die dafür vorgesehenen *Wells* und Inkubation der Komponenten wurde das Assay unter Hinzufügen der vorbereiteten chromogenen Lösung initiiert. Die colorimetrische Messung erfolgte kontinuierlich über 60 Minuten bei 405 nm mittels *Thermo Scientific Multiscan FC Microplate-Reader*, Filter 405 nm (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*). Die verwendeten Messsignale sind Absorptionen, welche nach 60 Minuten gemessen wurden. Die positiv-Kontrolle wurde, mit der bekannten Aktivität (20 µl DPP-4 entsprechen 0,26 mU/*Well*, respektive 13 mU/ml) zugrunde gelegt. Die Darstellung der gemessenen DPP-4 Aktivität erfolgt für die Gruppen DD, DD + Sitagliptin und DD + Saxagliptin entsprechend in mU/ml als absolute Werte.

2.3 Histologie

Nach Entnahme des Herzens und der Aorta wurden die Organe im Rahmen der Doktorarbeit für histologische Analysen aufgearbeitet und analysiert.

Das gewonnene Vollblut, Plasma und die Fettgewebssproben werden im Rahmen weiterer Untersuchungen verarbeitet.

2. Material und Methoden

2.3.1 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
1 % BSA-Lösung	1 g BSA in 100 ml PBS	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
1 % Eosinlösung	1 g Eosin Y Dinatrium-Salz ad 100 ml Aqua dest. + 0,05 % Essigsäure	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
1 % HCl	20 ml 10% HCl ad 200 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
3 % H ₂ O ₂ in PBS	10 ml 30 % H ₂ O ₂ ad 100 ml PBS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
4 % Roti [®] -Histofix	gebrauchsfertig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
10 % Formaldehydlösung	gebrauchsfertig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
20 % Sucroselösung	20 g Saccharose in 100 ml Aqua dest.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
78 % Methanol	Methanol abs. in Aqua dest.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
70 % Ethanol	gebrauchsfertig	Apotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland
95 % Ethanol	gebrauchsfertig	Apotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland
100 % Ethanol	gebrauchsfertig	Apotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland
ABC Puffer	5 mM Tris 1 mM NaCH ₃ CO ₂ • 2 H ₂ O 5 mM NaCl, pH 8 BSA 1 mg / ml	
Avidin-Biotin-Block	gebrauchsfertiges Kit	<i>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA</i>
Blockierlösung	20 mM Tris, 137 mM NaCl 10 % fetales bovines Serum (FBS) 1 % bovines Serumalbumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i> <i>Gibco®, Life Technologies™, Paisley, UK</i>

2. Material und Methoden

Coelestineblaulösung	5 g Ammoniumeisen-III-sulfat 100 ml Aqua dest 0,5 g 14 ml Glycerin	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i> Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Diaminobenzidin (3,3'-DAB)	50 µl DAB Chromogen zu 1 ml DAB Substrat	Zytomed, Berlin, Deutschland
Hämalaun-Lösung (nach Mayer)	gebrauchsfertig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O pH 7,4	
Picro-Siriusrot-Lösung	0,1 g Siriusrot (Direkt Rot 80) ad 100 ml 1,2 %Pikrinsäurelösung	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>
Öl-Rot-O Lösung	35 ml 0,5 % ÖRO (in Methanol) 10 ml 1 M NaOH	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i> Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Roti®-Clear	gebrauchsfertig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Mount Eindeckmedium	gebrauchsfertig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl-Puffer (10x TB)	50 mM Tris, pH 7,6	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>

Tabelle 2. Pufferzusammensetzungen und Lösungen in der Histologie % Prozent g Gramm ml Milliliter
BSA Bovines Serumalbumin **PBS** Phosphatgepufferte Salzlösung **HCl** Salzsäure **H₂O₂** Wasserstoffperoxid **pH** pH-Wert **g** Gramm
Aqua dest. Destilliertes Wasser **mM** Millimolar **Tris** Tris-Puffer **NaCH₃CO₂** Natriumacetat **NaCl** Natriumchlorid **FBS** Fetales
 Bovines Serumalbumin **DAB** Diaminobenzidin **µl** Mikroliter **KH₂PO₄** Kaliumhydrogenphosphat **Na₂HPO₄** Dinatriumhydrogen-
 phosphat **ÖRO** Öl-Rot-O **TB** Tris-Puffer

2.3.2 Analyse aortaler Plaques

Zur Analyse der atherosklerotischen Plaqueablagerungen in der Aorta der Versuchstiere wurden die zuvor entnommenen und bei 4 °C in 4 % Formaldehyd fixierten Aorten verwendet. Nach Präparation der Aorten erfolgte eine Lipidfärbung mittels Öl-Rot-O (Tabelle 2) und die Auswertung des Plaquegehaltes der Aorta.

2.3.2.1 Präparation der Aorten

Die Aorten wurden zunächst aus der 4 %-igen Formaldehydlösung in eine Petrischale mit PBS-Lösung überführt. Unter einem Stereomikroskop der Firma Zeiss (Stemi 2000C, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) erfolgte zunächst eine sorgsame Inspektion der Aorten. Die Aorten wurden von periaortalem Fettgewebe befreit. Danach erfolgte eine sofortige Weiterverarbeitung oder Lagerung der Aorten in PBS bei 4 °C.

2.3.2.2 *En face* Färbung der Aorta

Zur Anfärbung der aortalen Plaques, respektive der Lipideinlagerungen, wurde Öl-Rot-O verwendet. Die Aorten wurden für 5 Minuten in 78 % Methanol gewaschen. Es erfolgte eine 90-minütige Inkubation in der Öl-Rot-O Färbelösung. Daraufhin wurde eine erneute Waschung des Gewebes für 5 Minuten in 78 % Methanol zur Entfernung von Farbrückständen durchgeführt. Danach wurden die Aorten in PBS transferiert und weiter analysiert.

2.3.2.3 Aufnahme und Auswertung aortaler Plaquescores

Die mit Öl-Rot-O gefärbten Aorten wurden in eine Petrischale mit PBS überführt und unter einem Stereomikroskop der Firma Zeiss (Stemi 2000C, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) von proximal nach distal der Länge nach aufgeschnitten. Nach mechanischer Fixierung der aufgetrennten Aorten wurden diese in *en face* Darstellung mit Hilfe einer Kamera (*Canon Power Shot G10, Canon Inc., Tokio, Japan*) und einer speziellen Haltevorrichtung durch das Stereomikroskop fotografiert. Zuvor erfolgte jeweils die Ablichtung der geschlossenen Aorten. Die mittels Öl-Rot-O angefärbte Fläche wurde mit der ImageJ 1.37v Software (*NIH, Bethesda, Maryland, USA*) quantifiziert. Dabei wurde die angefärbte Plaquesfläche auf die abgebildete Gesamtfläche der thorakalen Aorta berechnet. Die distalen Anteile der Aorten unterhalb des Zwerchfells, beziehungsweise die abdominale Aorta, wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

2.3.3 Plaqueanalyse des Aortenursprungs

Zur Analyse des Plaquegehaltes im Aortenursprung wurden Gefrierschnitte der Herzen auf Höhe der Aortenklappe angefertigt. Anschließend wurden immunhistochemische und histologische Färbungen zur Analyse der Plaquekomposition durchgeführt.

2.3.3.1 Gefrierschnitte des Aortenursprungs

Zur Anfertigung der Gefrierschnitte (Kryoschnitte) wurden die mit *Tissue-Tek O.C.T. Compound* (Sakura, Alphen aan de Rijn, Niederlande) eingebetteten Herzen für eine Stunde von -80 °C in -20 °C überführt. Im nächsten Schritt wurden die Kryoblöcke mit den Herzen mit Hilfe des *Tissue-Tek Compound Mediums* bei -20 °C auf Haltestempel befestigt und anschließend wurden mit einem Kryostaten (CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) Schnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt. Nach Erreichen des Aortenannulus mit den Taschenklappen wurden die Schnitte jeweils konsekutiv zu zweit auf einen Objektträger aufgezogen. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und entweder direkt dem Färbeprozess unterzogen oder bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingelagert.

2.3.3.2 Immunhistochemische Färbungen des Aortenursprungs

Die Gefrierschnitte wurden, wenn bei -20 °C gelagert, zunächst bei Raumtemperatur für 2 Stunden aufgetaut. Danach erfolgte die Behandlung der Schnitte nach einem etablierten Färbeprotokoll (siehe einzelne Abschnitte der Färbungen). Die verwendeten Antikörper und Bindeproteine sind in Tabelle 3 aufgeführt

2. Material und Methoden

Antikörper/ Bindeprotein	Konzentration	Katalognummer	Hersteller
Ratte anti-Maus Mac-2 (Galectin-3)	1:200 in 1 % BSA in PBS	CL8942AP	<i>Cedarlane, Burlington, Canada</i>
Ziege anti-Ratte IgG2A (Zweitantikörper HRP)	1:200 in PBS	NB7126	<i>Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA</i>
Kaninchen anti-Maus Biglykan	1:400 in 1 % BSA in PBS	LF 159	<i>Larry Fisher, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA</i>
Ziege anti-Kaninchen IgG Zweitantikörper (HRP)	1:400 in PBS	SC-2004	<i>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA</i>
Biotinyliertes HA- Bindeprotein (HABP)	1:200 in 1 % BSA in PBS	385911	<i>Calbiochem, Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland</i>
Streptavidin Peroxidase (HRP)	1:200 in PBS	S 5512	<i>Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA</i>

Tabelle 3. Antikörper und Bindeproteine in der Immunhistochemie % Prozent **BSA** Bovines Serum Albumin
PBS Phosphatgepufferte Salzlösung **IgG2A** Immunglobulin G2A **HRP** Meerrettichperoxidase Antikörper **IgG** Immunglobulin G

Mac-2 Färbung zur Quantifizierung der Makrophagen in den atherosklerotischen Plaques

Die Analyse des Makrophagengehalts in den atherosklerotischen Plaques der aortalen Taschenklappen wurde mit einer immunhistochemischen Färbung für Mac-2 durchgeführt. Dazu wurden die Kryoschnitte nach Auftauen zunächst für 15 Minuten bei 4 °C in Ethanol absolut fixiert. Nach dreimaliger Waschung mit 1 % PBS (siehe Tabelle 2) für jeweils 5 Minuten erfolgte die Inkubation der Schnitte mit Blockierlösung (siehe Tabelle 2) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurde der Erst-Antikörper gegen Mac-2 (siehe Tabelle 3) aufgetragen und bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Inkubation wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen und es erfolgte im nächsten Teilschritt der Färbung die Inaktivierung der endogenen Peroxidasen mit 3 %-iger H₂O₂-Lösung (siehe Tabelle 2). Nach 5-minütiger Inkubation in der 3 %-igen H₂O₂-Lösung wurden

2. Material und Methoden

die Schnitte erneut in PBS dreimal für 5 Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte das Auftragen des Zweit-Antikörpers Ziege anti-Ratte IgG2A HRP (siehe Tabelle 3). Die Schnitte wurden für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und im nächsten Schritt die Waschung in PBS nach oben genanntem Schema durchgeführt. Für die Detektion der Mac-2 Färbung wurden die Schnitte zunächst für 10 Minuten in Tris-HCl-Puffer (siehe Tabelle 2), dann für 5 Minuten in DAB (siehe Tabelle 2) und erneut für 5 Minuten in Tris-HCl-Puffer inkubiert. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mittels einer Hämalaun Lösung nach Mayer (siehe Tabelle 2) mit 1-minütiger Inkubation, kurzem Abwaschen in Leitungswasser, einem kurzen Eintauchen in HCl 1 % (siehe Tabelle 2), erneutem Eintauchen in Leitungswasser mit 10-minütigem Bläuen und Aqua dest. Im Anschluss an die erfolgreich durchgeführte Färbung folgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 %, 95 % und Ethanol absolut für jeweils 2 und 5 Minuten in *Roti[®]-Clear* (siehe jeweils Tabelle 2). Zum Eindecken der Schnitte wurde *Roti[®]-Mount* (siehe Tabelle 2) verwendet. Die Schnitte wurden in einer trockenen und lichtgeschützten Umgebung gelagert.

BGN-Färbung zur Ermittlung des Biglykananteils in den atherosklerotischen Plaques

Für die Detektion des Proteoglykangehaltes an Biglykan erfolgte nach Auftauen der Schnitte zunächst eine Fixierung mit Formalin 10 % (siehe Tabelle 2) für 20 Minuten bei 4 °C. Danach wurden die Schnitte, analog zur Mac-2 Färbung, in PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die enzymatische Abspaltung der Chondroitinseitenketten und der Dermatan sulfatseitenketten zur Freilegung der Epitope der Core-Proteine durch den Einsatz einer Chondroitinase. Dazu wurden 0,02 Einheiten Chondroitinase (Chondroitinase ABC *from* *Proteus vulgaris*, *Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA*), verdünnt in ABC-Puffer (siehe Tabelle 2), auf das Gewebe gegeben und für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Vor der Auftragung des Erst-Antikörpers erfolgte das Waschen der Schnitte in PBS und die Inkubation in Blockierlösung wie oben beschrieben. Der Erst-Antikörper Kaninchen anti-Maus Biglykan (siehe Tabelle 3), zur Bindung an die freigelegten Epitope des Core-Proteins, wurde über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Die weiteren Teilschritte sind analog zur oben beschriebenen Mac-2 Färbung. Als Zweit-Antikörper wurde HRP-konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG (siehe Tabelle 3) aufgetragen und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für eine Stunde inkubiert. Die weitere Behandlung zur Detektion, Kernfärbung und Eindeckung der Schnitte ist aus dem Färbeprotokoll der Mac-2 Färbung zu entnehmen.

HA-Färbung zur Detektion des Hyaluronsäuregehalts in den atherosklerotischen Plaques

Die Detektion des Glykosaminoglykans Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA) mittels HA-Färbung erfolgte in den ersten Teilschritten mit Fixierung und PBS-Waschung analog zur Mac-2 Färbung. Vor der Inkubation in Blockierlösung zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurden endogene Biotin-Strukturen mit Hilfe eines Avidin-Biotin-Blockiersystems (siehe Tabelle 2) blockiert. Die Inkubation mit dem biotinylierten HA-Bindeprotein (siehe Tabelle 3) erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht. Die weiteren Teilschritte sind gleich der Mac-2 Färbung. Streptavidin Peroxidase wurde anschließend als Zweit-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach erfolgte das Waschen der Schnitte, die Detektion mittels DAB, die Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer und das Entwässern mit Eindecken der Schnitte wie oben beschrieben.

2.3.3.3 Histologische Färbungen des Aortenursprungs

Die histologische Färbung des Aortenursprungs wurde mit Echtfarbstoffen zur Ermittlung des Kollagengehaltes der atherosklerotischen Plaques durchgeführt.

Picrosiriusrot-Färbung zur Detektion des Kollagengehalts in den atherosklerotischen Plaques

Nach Auftauen der Herzschnitte wurden diese für 10 Minuten in Ethanol 70 % (siehe Tabelle 2) bei 4 °C fixiert. Danach erfolgte das Waschen der Schnitte in PBS-Lösung (siehe Tabelle 2) für dreimal 5 Minuten und einmal 1 Minute in destilliertem Wasser. Die Kernfärbung wurde mittels Coelestineblaulösung (siehe Tabelle 2) für 7 Minuten bei Raumtemperatur, einer kurzen Differenzierung der Schnitte in HCl 1 % (siehe Tabelle 2) und Bläuen der Schnitte unter Leitungswasser für 5 Minuten durchgeführt. Zur Anfärbung der Kollagenfasern wurde eine Picro-Siriusrot-Lösung (siehe Tabelle 2) nach Puchtler et al. verwendet.[136] Die Schnitte verblieben für 10 Minuten in der Färbelösung. Es folgte das Entwässern und Eindecken der Schnitte analog zu den immunhistochemischen Färbungen (Abschnitt 2.2.3.2).

2.3.3.4 Aufnahme und Auswertung der Aortenursprungsfärbungen

Aufnahmen der immunhistochemischen und histologischen Färbungen des Aortenursprungs

Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen des Aortenursprungs wurde ein *Axio Imager M2* Mikroskop mit *Axio Cam HRC* und *Axio VS40 V4.8.2.0* Software (beides von Carl Zeiss *Microscopy* GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. Die aortalen Taschenklappen wurden jeweils einzeln mit einer 100-fachen Vergrößerung, entsprechend drei Bildern pro Schnitt und Färbung, aufgenommen. Des Weiteren erfolgte von jedem Schnitt eine Übersichtsaufnahme mit 40-facher Vergrößerung. Für die Aufnahme der Kollagenfärbung Picrosiriusrot wurde neben einer lichtmikroskopischen Aufnahme auch eine identische Aufnahme mit einem Polarisationsfilter erstellt, um die Packungsdichte der Kollagenfasern beurteilen zu können. Durch die Aufnahme der Kollagenfärbungen mit einem Polarisationsfilter wird die natürliche Doppelbrechung des Lichts an den Kollagenfasern verstärkt und lässt damit eine Detektion der Packungsdichte zu.

Auswertung der Färbungen

Die Auswertung der angefärbten Plaques des Aortenursprungs erfolgte mit den angefertigten 100-fach vergrößerten Aufnahmen. Mit Hilfe der *ImageJ Software 1.37v* (*NIH, Bethesda, Maryland, USA*) und unter Einsatz eines *Colour Deconvolution Tools* wurden die einzelnen Färbkanäle in drei verschiedene Sequenzen aufgeteilt und eine spezifische Sequenz für die Detektion von DAB ausgewählt. Die zuvor im Originalbild manuell umfahrene Plauefläche wurde auf die DAB-Sequenz übertragen. Danach erfolgte die Auswertung der mit DAB angefärbten Fläche bezogen auf die Gesamtfläche.

Bestimmung des Plaquescores

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Atherosklerose wurden die Übersichtsaufnahmen des Aortenursprungs in Vergrößerung verwendet und die einzelnen Plaueflächen, sowie die Gesamtfläche des Ursprungs, manuell mit Hilfe der *Software AxioVS40 V4.8.2.0*. (*Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland*) aus allen durchgeführten Färbungen vermessen. Die Gesamtplauegröße errechnet sich aus der Gesamtfläche der ausgemessenen Plaueflächen

2. Material und Methoden

(μm^2) in Bezug auf die Gesamtfläche des Aortenursprungs (μm^2). Zur Mittelung der Ergebnisse wurden jeweils drei Schnittebenen der durchgeführten Färbungen vermessen und berechnet.

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software *GraphPad Prism* 6 Version 6.02 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA*). Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean, S.E.M.*) angegeben. Zum Ausschluss statistischer Ausreißer wurde der *Grubb`s* Test eingesetzt. Zum Vergleich zweier Datensätze wurde der ungepaarte und zweiseitige *Student`s T-test* angewandt. Die Analyse der DPP-4 Aktivität im Plasma erfolgte mittels *OneWay ANOVA* und folgendem *Sidak`s multiple comparison test*. Zur Analyse des Verlaufs der oralen Glukosetests wurde eine *TwoWay ANOVA* mit folgendem *Sidak`s multiple comparison test* durchgeführt. Ein *p*-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten beschreiben vergleichend in beiden Geschlechtern die metabolischen und kardiovaskulären Effekte der DPP-4-I Saxagliptin und Sitagliptin in einem Mausmodell mit genetischer Deletion des *Low density lipoprotein receptor* (*Ldlr*^{-/-}) unter Fütterung einer diabetogenen Diät (DD) zur Induktion einer Glukosetoleranzstörung und Insulinresistenz.

3.1 Dipeptidylpeptidase-4 Aktivität im Plasma

Die Bestimmung der DPP-4 Aktivität im Plasma der Mäuse erfolgte mit Hilfe eines DPP-4 Assay kit. Die Inhibition der DPP-4 Aktivität in den *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach einer Fütterungsdauer von 15 Wochen mit DD + Sitagliptin oder DD + Saxagliptin gegenüber einer alleinigen Fütterung mit DD konnte, wie in Abbildung 7 dargestellt, gezeigt werden. Dabei war die DPP-4 Aktivität im Plasma nach zusätzlicher Verabreichung eines der beiden DPP-4-I gegenüber der DD Kohorte signifikant reduziert. Der Vergleich zwischen Sitagliptin und Saxagliptin ergab keinen Unterschied der beiden Substanzen hinsichtlich der ermittelten DPP-4 Aktivität im Plasma.

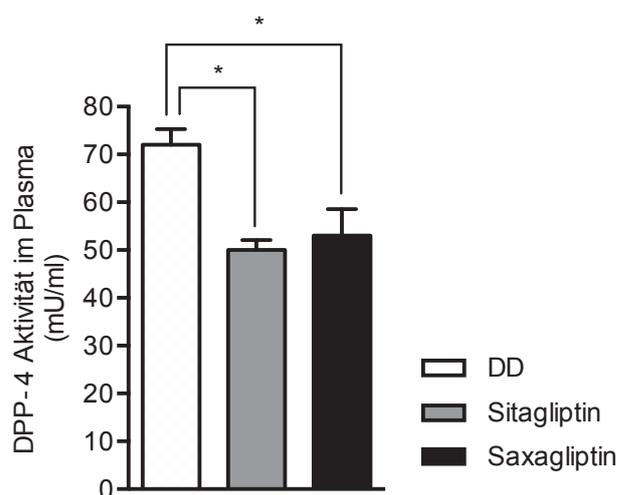


Abb. 7. DPP-4 Aktivität im Plasma. Graphische Darstellung der DPP-4 Aktivität von 23 Wochen alten *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach 15 Wochen Fütterung mit DD (n = 5), DD + Sitagliptin (n = 4) oder DD + Saxagliptin (n = 6). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M., *OneWay ANOVA*, * $p < 0,05$.
DPP-4 Dipeptidylpeptidase-4 **mU** Milli-Units **ml** Milliliter

3.2 Einfluss der Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren auf metabolische Parameter

In den folgenden Abschnitten wird der Einfluss der DD mit und ohne Zusatz der jeweiligen DPP-4-I Saxagliptin und Sitagliptin auf metabolische Parameter unter Einbeziehung substanz- und geschlechtsspezifischer Effekte beschrieben.

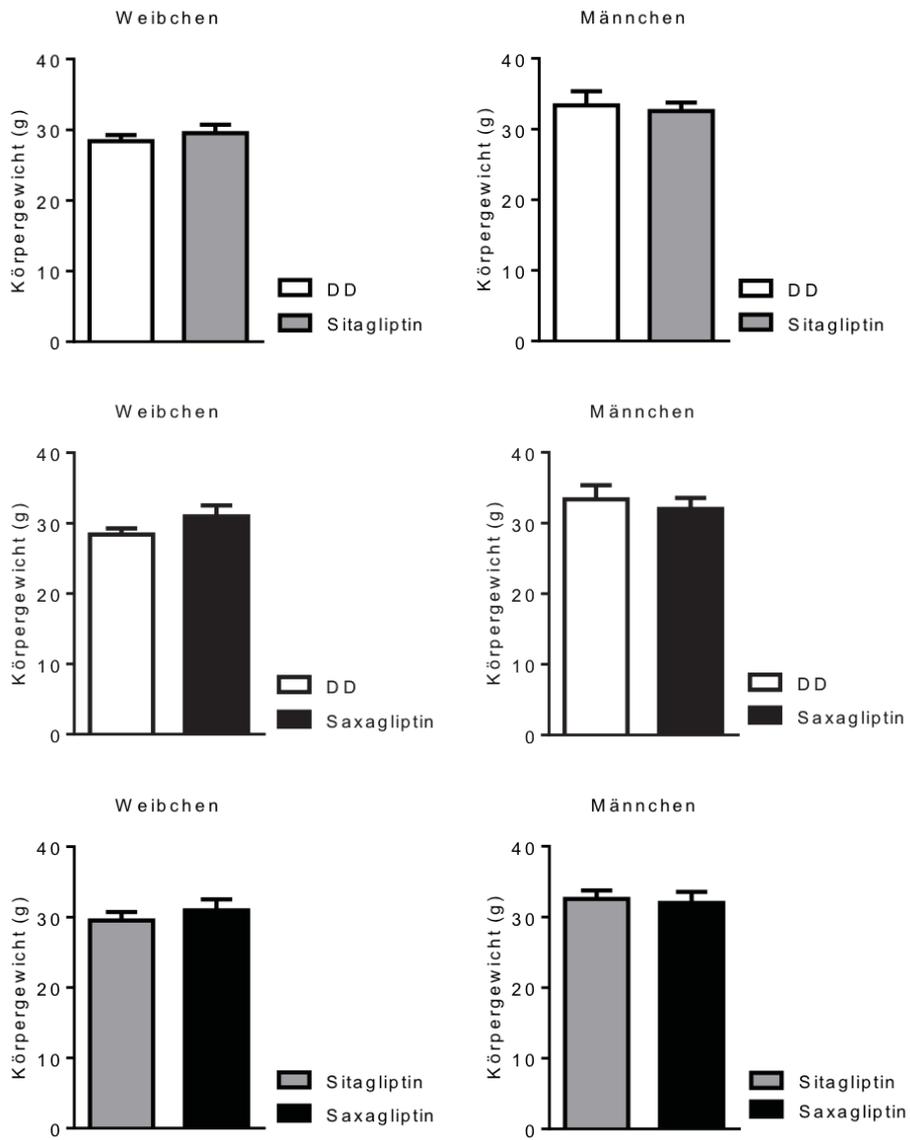
3.2.1 Körpergewicht

Bei der vergleichenden Untersuchung des Einflusses von DD, DD + Saxagliptin und DD + Sitagliptin nach einer Fütterungsdauer von 15 Wochen zeigte sich sowohl in männlichen *Ldlr^{-/-}* Mäusen als auch in weiblichen *Ldlr^{-/-}* Mäusen kein Unterschied im Körpergewicht zwischen den Behandlungsgruppen (Abbildung 8 A).

Im direkten Vergleich der Geschlechter unter jeweils derselben Behandlung konnte hingegen ein signifikanter Unterschied bezüglich des Endgewichtes, mit einem höheren Gewicht in männlichen mit DD gefütterten Mäusen festgestellt werden. Dieser Unterschied war nach Behandlung mit DD + Sitagliptin abgemildert und nur noch als Trend zu einem höheren Körpergewicht der männlichen Versuchstiere zu erkennen ($p = 0,0906$) und bei den mit DD + Saxagliptin behandelten Tieren vollständig aufgehoben (siehe Abbildung 8 B).

3. Ergebnisse

A



3. Ergebnisse

B

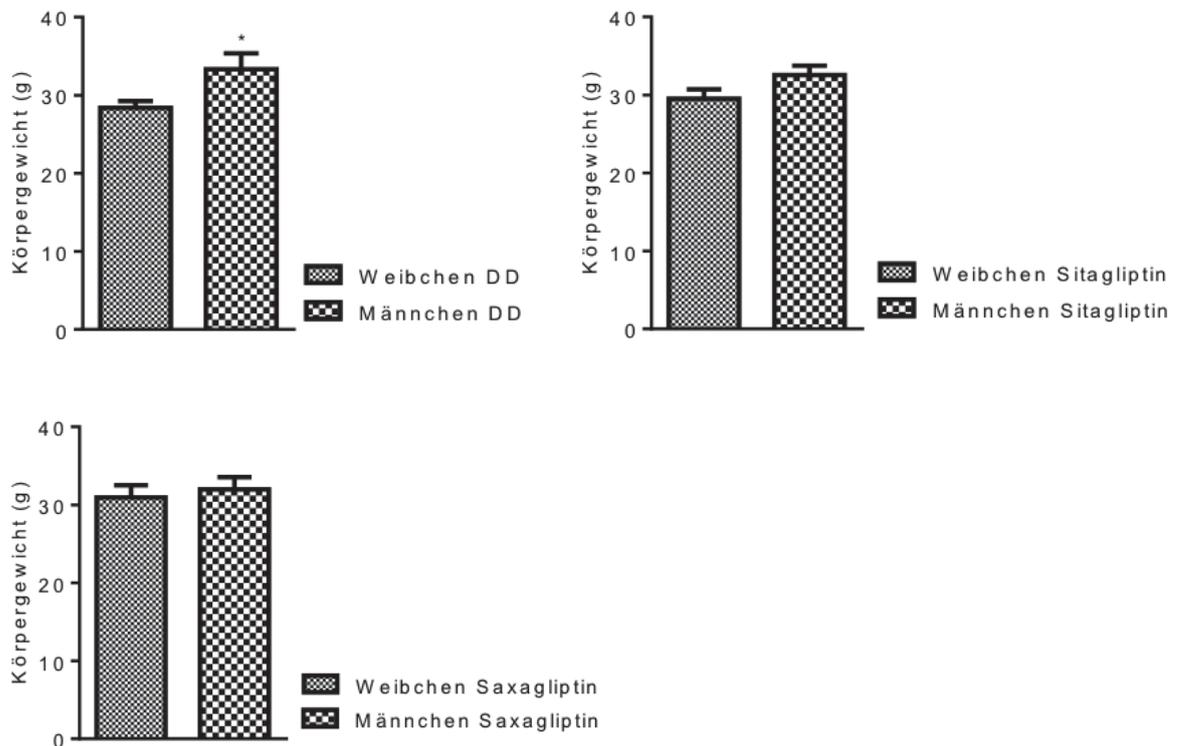


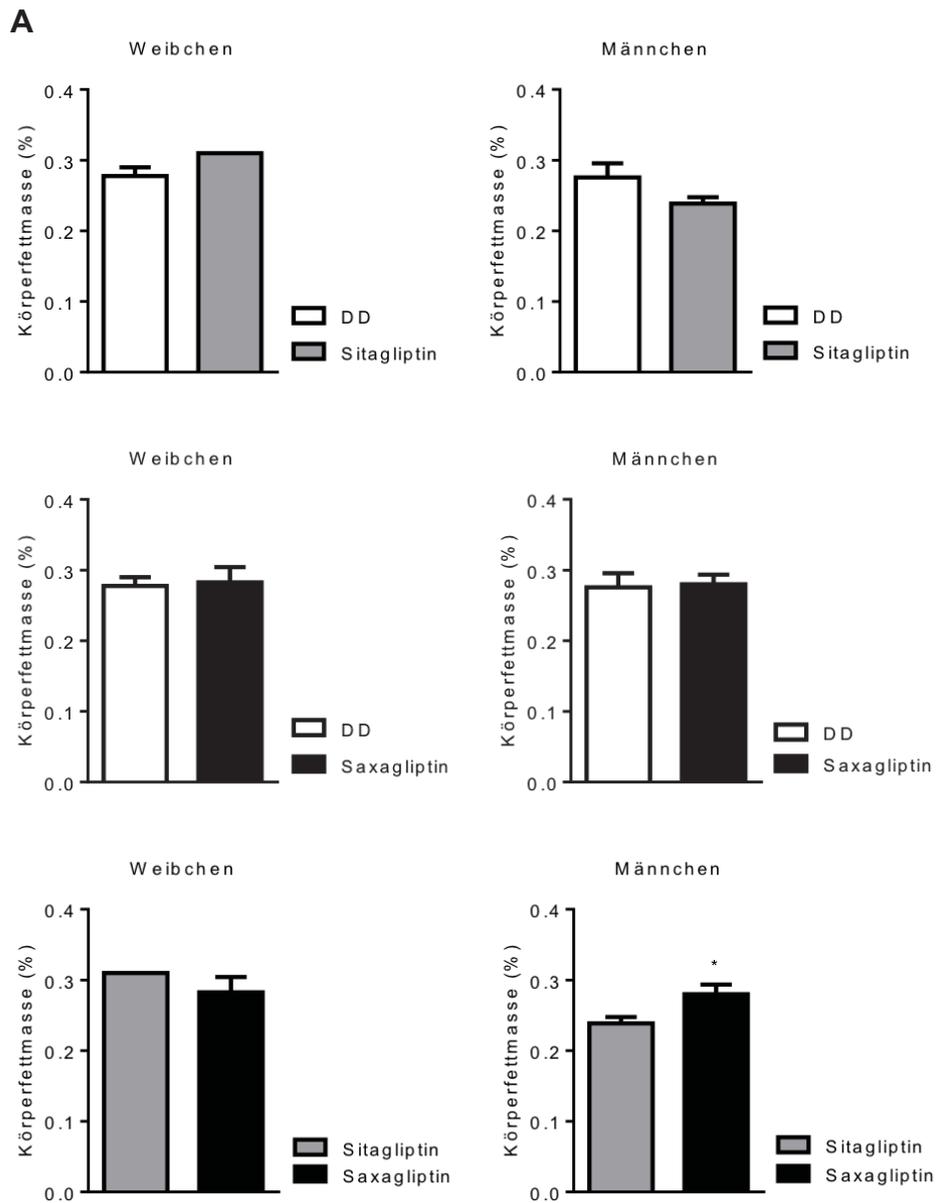
Abb. 8. Körpergewicht. Graphische Darstellung des Körpergewichts der Tiere im Endalter von 23 Wochen. **A** Vergleich der verschiedenen Diäten im selben Geschlecht und Gegenüberstellung der beiden Geschlechter (Weibchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: n = 11,11,12; Männchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: n = 8,11,10). **B** Geschlechtsspezifischer Vergleich des Erntegewichts bei gleicher Futterzusammensetzung von 23 Wochen alten *Ldlr^{-/-}* Mäusen nach 15 Wochen Fütterung mit DD (n = 12,8), DD + Sitagliptin (n = 11,11) oder DD + Saxagliptin (n = 11,10). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. **A** und **B** *unpaired student's t-test*, * $p < 0,05$. g Gramm

3.2.2 Körperfettgehalt

Um den Einfluss von Saxagliptin und Sitagliptin auf den Körperfettgehalt beurteilen zu können, wurde zum Versuchsende, in einem Endalter der Mäuse von 23 Wochen, eine Körperfettmessung mittels Kernspinresonanzspektroskopie durchgeführt. Diese Untersuchung des Körperfettgehaltes nach 15 Wochen Fütterung zeigt im substanzspezifischen Vergleich einen signifikanten Unterschied in der männlichen Versuchsgruppe zwischen einer Fütterung mit DD + Sitagliptin und DD + Saxagliptin. Dabei wurde unter Fütterung mit DD + Sitagliptin eine signifikante Reduktion des Körperfettgehaltes gegenüber DD + Saxagliptin festgestellt. In den weiblichen Versuchstieren zeichneten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen ab (Abbildung 9 A).

3. Ergebnisse

Der geschlechtsspezifische Vergleich (Abbildung 9 B) ergab keinen basalen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren im Körperfettgehalt. Unter Therapie mit Sitagliptin konnte jedoch eine signifikante Körperfettreduktion bei den männlichen Versuchstieren im Vergleich zu den weiblichen Versuchstieren detektiert werden. Dieser Trend war unter Saxagliptintherapie hingegen nicht zu beobachten.



3. Ergebnisse

B

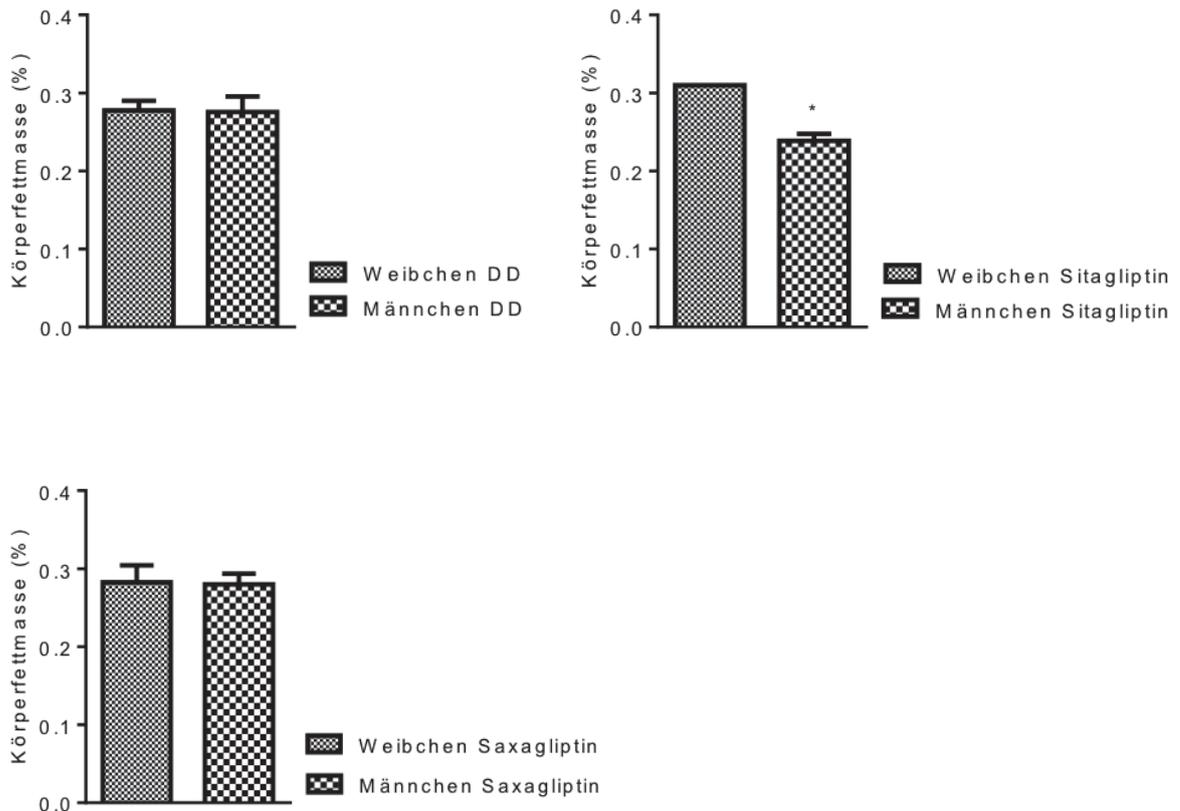


Abb. 9. Körperfettgehalt. Darstellung der Körperfettmasse gemessen als prozentualer Anteil der Gesamtkörpermasse mittels Kernresonanzspektroskopie.

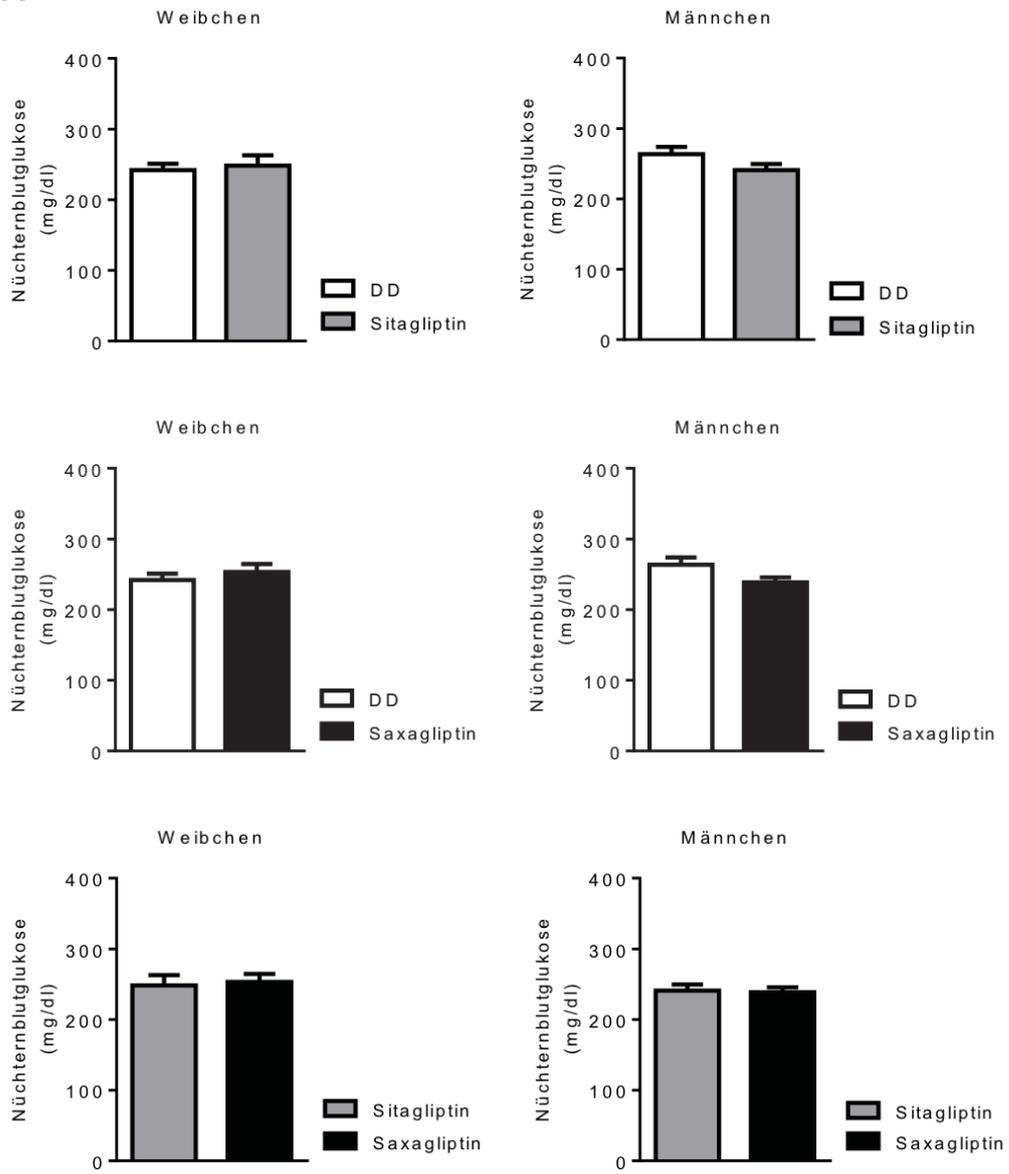
A Substanzspezifischer Vergleich im selben Geschlecht und Gegenüberstellung der beiden Geschlechter (Weibchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: n = 4,3,4; Männchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: n = 7,7,6). **B** Geschlechtsspezifischer Vergleich (DD: n = 4,7; DD + Sitagliptin: n = 3,7; DD + Saxagliptin: n = 4,6) bei jeweils gleicher Fütterung von 23 Wochen alten *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach 15 Wochen Fütterung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. **A** und **B** *unpaired student's t-test*, * $p < 0,05$. % Prozent

3.2.3 Glukosetoleranz

Im Rahmen der Durchführung der oralen Glukosetoleranztests wurde eine Messung der Blutglukose zur Bestimmung der Nüchternblutglukose nach 6 Stunden andauernder Futterkarenz durchgeführt. Die Nüchternblutglukosewerte wiesen nach 15 Wochen Fütterung keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen oder Geschlechtern auf (Abbildungen 10 A und B).

3. Ergebnisse

A



3. Ergebnisse

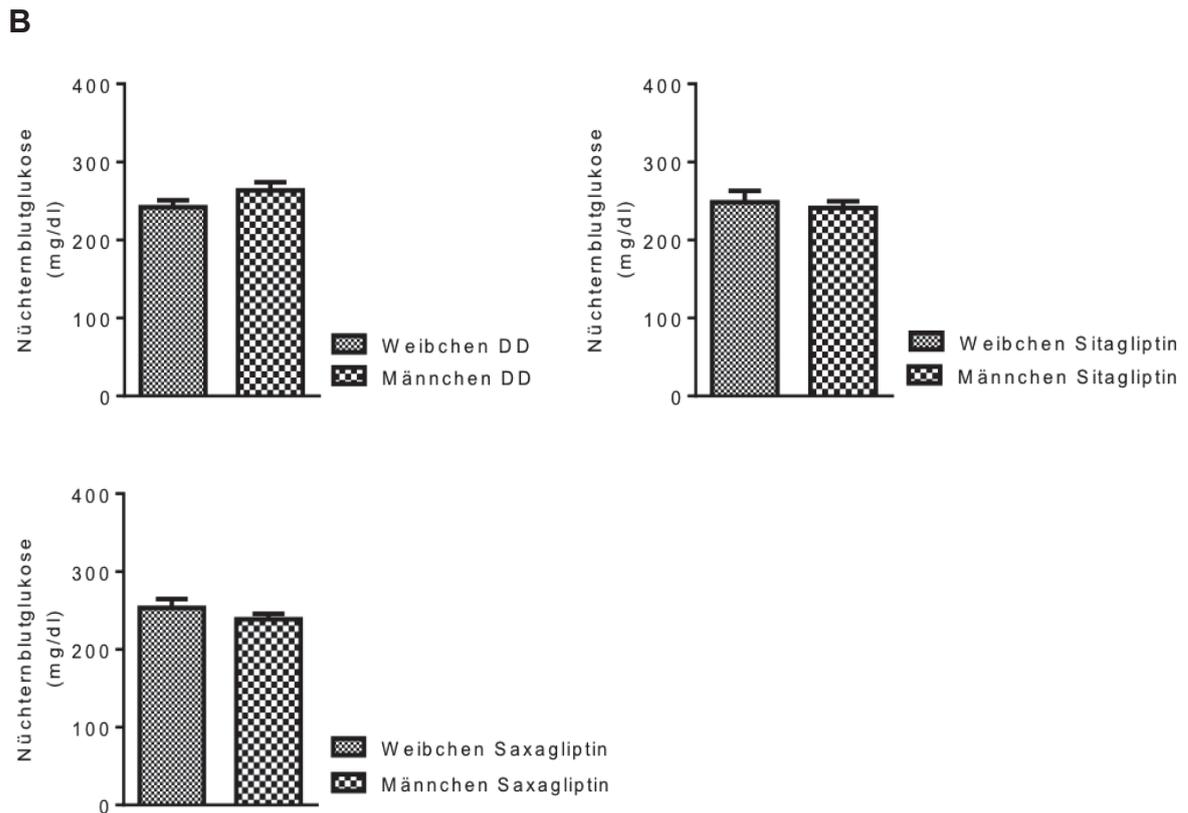


Abb. 10. Messung der Nüchternblutglukose. **A** Substanzspezifischer Vergleich sowie Gegenüberstellung der beiden Geschlechter (Weibchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: n = 12,11,11; Männchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: n = 8,11,10). **B** Geschlechtsspezifischer Vergleich (DD: n = 12,8; DD + Sitagliptin: n = 11,11; DD + Saxagliptin: n = 11,10). Darstellung der Nüchternblutglukose in mg/dl von 23 Wochen alten *Ldlr^{-/-}* Mäusen beider Geschlechter, welche 15 Wochen behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. **A** und **B** *unpaired student's t-test*, * $p < 0,05$.
mg Milligramm dl Deziliter

Für die Analyse des Einflusses der verwendeten DPP-4-I auf die postprandiale Glukoseverwertung wurde zudem ein oGTT, ebenfalls nach vorangegangener 6-stündiger Fastenperiode, durchgeführt. In den Abbildungen 11 A und B sind die Verläufe der Blutglukosewerte im Rahmen des oGTT dargestellt.

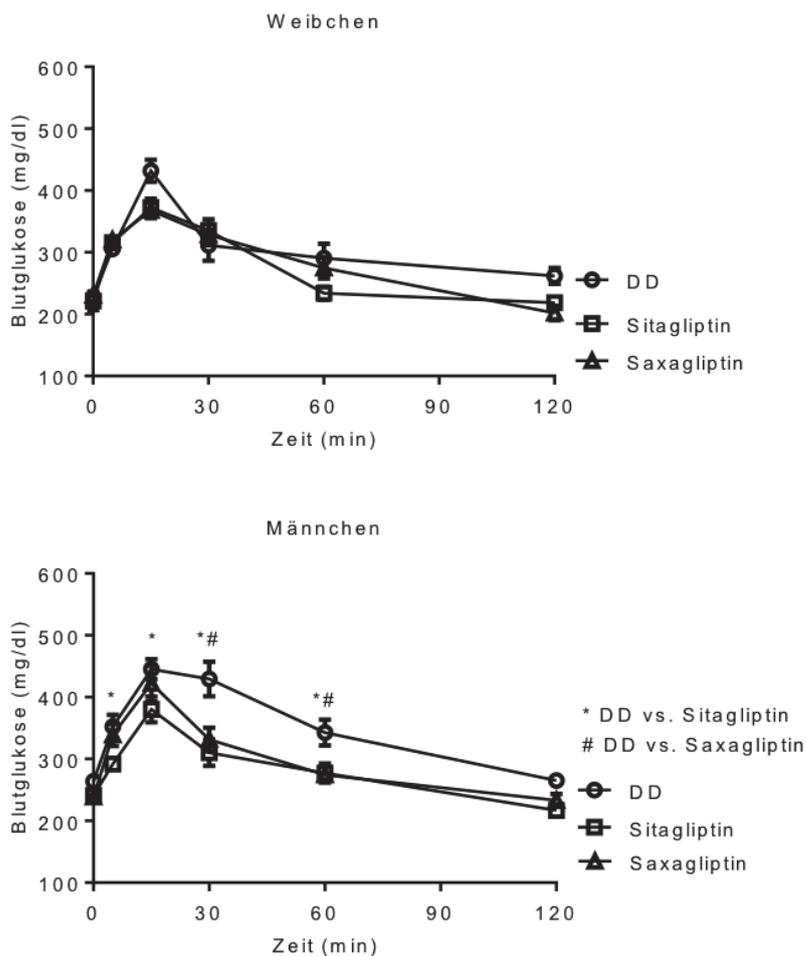
In den männlichen Versuchstieren konnte 15 Minuten nach oraler Verabreichung der Glukose für die Gruppe mit DD + Sitagliptin eine signifikante Reduktion der Blutglukose gegenüber DD alleine festgestellt werden. Diese Beobachtung zeigte sich ebenfalls zum Messzeitpunkt 30 und 60 Minuten nach Glukoseapplikation für die genannten Gruppen. Im Vergleich zu DD wurde auch in der männlichen Kohorte DD + Saxagliptin eine signifikante Reduktion der Blutglukosewerte zum Zeitpunkt 30 und 60 Minuten nach oraler Verabreichung der Glukose festgestellt. Zu den Zeitpunkten 0, 5 und 120 Minuten lagen keine Unterschiede zwischen den Gruppen vor. Der direkte Substanzvergleich wies im oGTT bei den weiblichen Mäusen keinen Unterschied der Blutglukose im Verlauf des Tests auf, sodass lediglich ein Effekt der

3. Ergebnisse

verwendeten DPP-4-I in den männlichen Versuchstieren nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 11 A).

In der geschlechtsspezifischen Darstellung des Blutglukoseverlaufs nach oGTT fanden sich 30 Minuten nach Versuchsbeginn signifikant niedrigere Blutglukosewerte in den mit DD gefütterten weiblichen Mäusen im Vergleich zu den mit DD gefütterten männlichen Versuchstieren. Die Vergleiche zwischen den Geschlechtern wiesen für die Sitagliptin und Saxagliptin - Behandlungsgruppen keine Unterschiede zu den Messzeitpunkten auf (Abbildung 11 B).

A



3. Ergebnisse

B

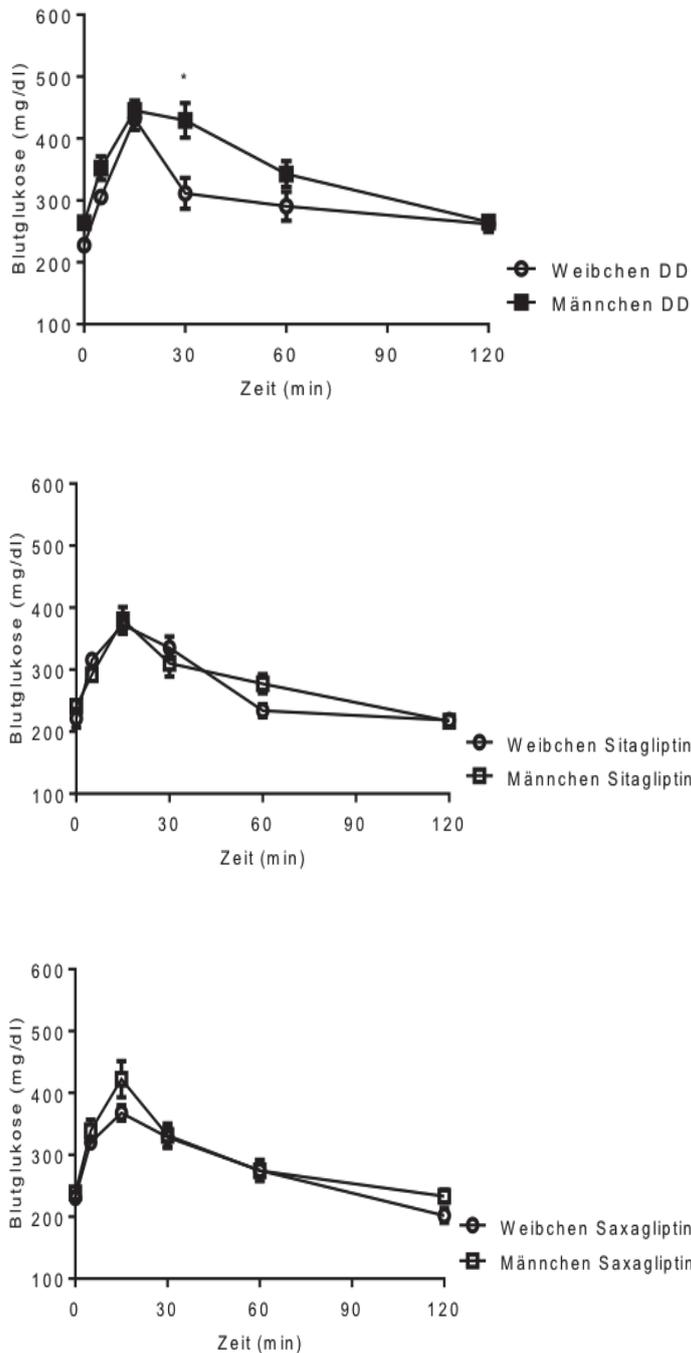


Abb. 11. Orale Glukosetoleranztest

A Vergleichende Darstellung der oralen Glukosetoleranz bei 23 Wochen alten *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach 15 Wochen Fütterung. Die Messung des Blutzuckers erfolgte jeweils vor Verabreichung der Glukose (t = 0) und nach 5, 15, 30, 60, 120 Minuten (Weibchen n = 8,6,7; Männchen n = 8,11,10).

B Geschlechtsspezifische Darstellung der oralen Glukosetoleranz bei 23 Wochen alten *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach 15 Wochen Fütterung mit DD (n = 8,8), DD + Sitagliptin (n = 6,11), DD + Saxagliptin (n = 7,10). Die Messung des Blutzuckers erfolgte jeweils vor Verabreichung der Glukose (t = 0) und nach 5, 15, 30, 60, 120 Minuten. Dargestellt sind Mittelwerte als ± S.E.M. *TwoWay ANOVA*, **p* < 0,05. mg Milligram dl Deziliter

3.3 Einfluss der Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren auf Atherosklerose

Zur Beurteilung des Einflusses der verwendeten DPP-4-I Saxagliptin und Sitagliptin auf die Atherogenese im *Ldlr^{-/-}* Mausmodell werden im Folgenden die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen präsentiert. Nach einer 15-wöchigen Fütterung der Tiere mit entweder DD alleine, DD + Saxagliptin, beziehungsweise DD + Sitagliptin wurden die Aorten und Aortenursprünge der Mäuse im Hinblick auf atherosklerotische Plaques und deren Komposition untersucht. In den mit Öl-Rot-O angefärbten Aorten der Tiere lässt sich die Menge der atherosklerotischen Läsionen in der gesamten Aorta darstellen. Die immunhistochemischen und histologischen Färbungen des Aortenursprungs geben Aufschluss über die Plaquefläche, Zusammensetzung und Kollagendichte der aortalen Plaques.

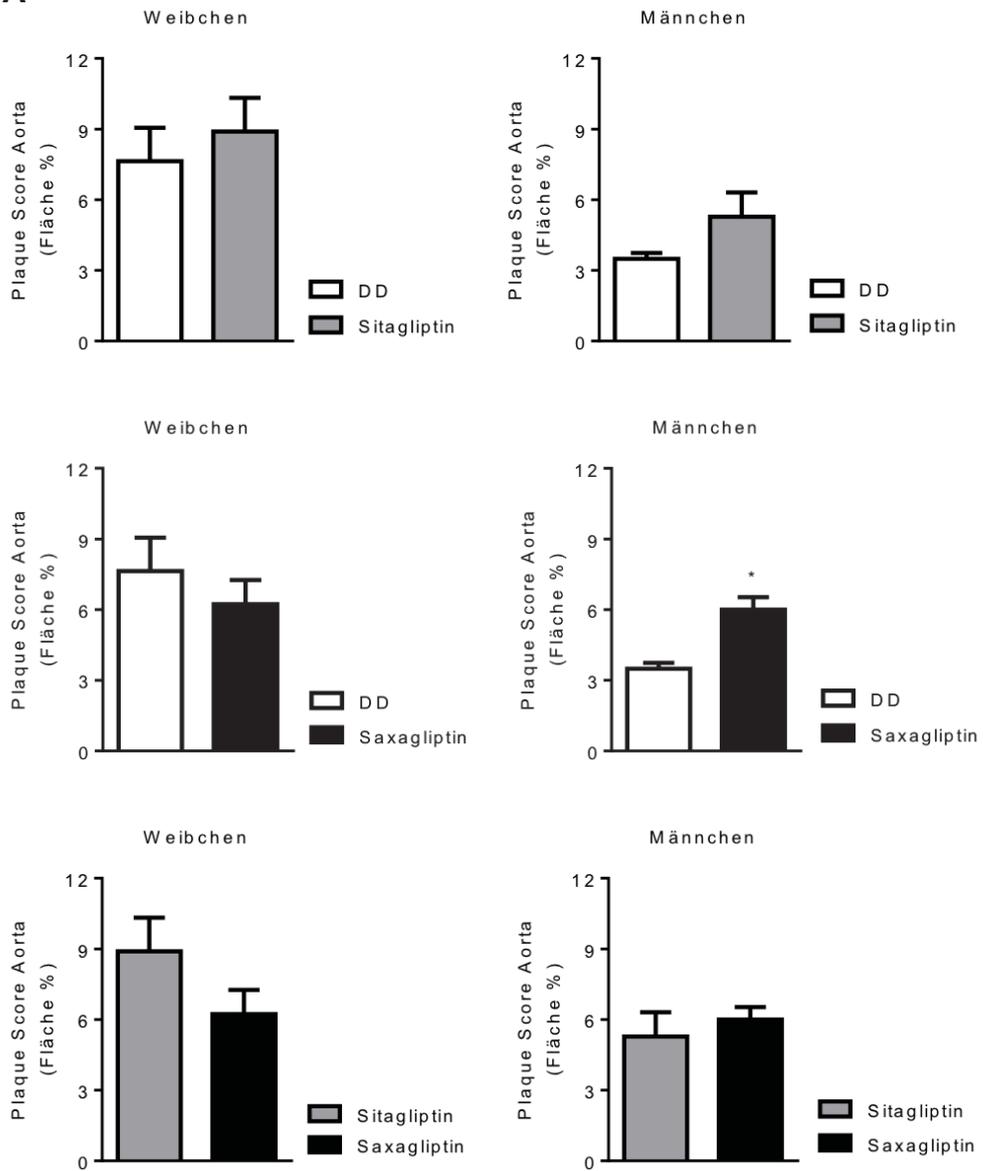
3.3.1 Plaque Score Aorta

Die mit Öl-Rot-O angefärbten Aorten wurden hinsichtlich der Größe lipidreicher Plaques im thorakalen Bereich des Gefäßes ausgewertet. Im direkten Substanzvergleich (Abbildung 12 A) lassen sich in der weiblichen Kohorte keine signifikanten Unterschiede feststellen, jedoch ist generell ein Trend zu einem höheren Plaquegehalt in den Aorten der weiblichen Tiere unter Sitagliptintherapie und einem Trend zu geringeren Plaques unter einer Behandlung mit Saxagliptin gegenüber der DD-Gruppe zu erkennen. In der männlichen Versuchstierkohorte zeigt sich der Plaquebesatz in den Aorten unter einer Fütterung mit DD + Saxagliptin signifikant gegenüber einer alleinigen Fütterung mit DD erhöht. Auch unter DD + Sitagliptin war ein Trend zu einem erhöhten Plaquegehalt im Vergleich zur DD-Gruppe erkennen.

Insgesamt war ein signifikant erniedrigter Plaquegehalt in den DD Männchen zu den DD Weibchen feststellbar (Abbildung 12 B; $p = 0,0258$). Dieser Unterschied blieb abgeschwächt unter Behandlung mit Sitagliptin ($p = 0,0489$), jedoch nicht in der mit Saxagliptin behandelten Gruppe bestehen.

3. Ergebnisse

A



3. Ergebnisse

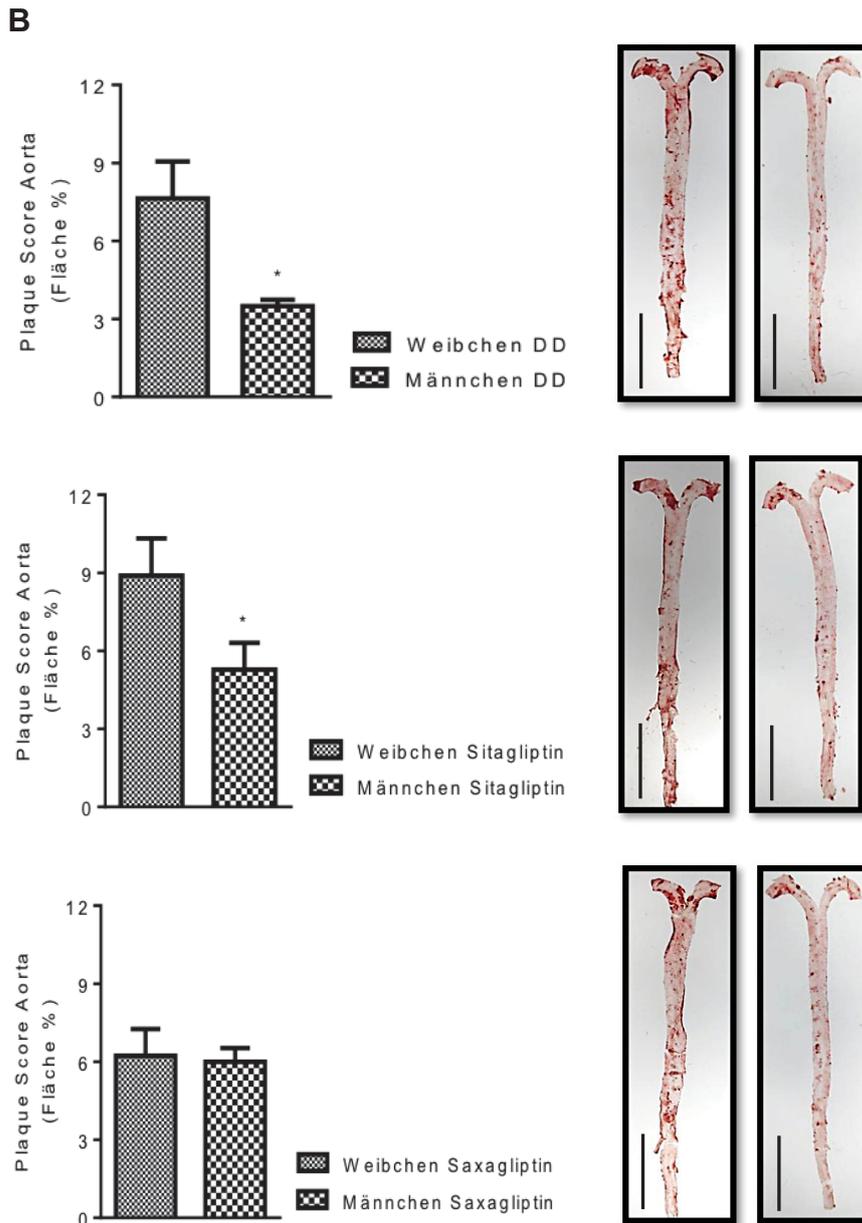


Abb. 12. Aortaler Plaque Score. Öl-Rot-O Färbung zur Bestimmung des aortalen Plaque Scores von 23 Wochen alten *Ldlr*^{-/-} Mäusen nach 15 Wochen Fütterung mit DD, DD + Sitagliptin oder DD + Saxagliptin. (Weibchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: n = 11,8,8; Männchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: n = 8,11,9; DD n = 11,8; DD + Sitagliptin n = 8,11; DD + Saxagliptin n = 8,9) Dargestellt ist die Öl-Rot-O positive Fläche als % der Gesamtfläche. **A** Substanzspezifischer Vergleich des Plaquegehaltes und Gegenüberstellung der Geschlechter sowie **B** als geschlechtsspezifischer Vergleich mit entsprechender Abbildung der angefärbten Aorten v.l.n.r. Ergebnisse sind als Mittelwerte ± S.E.M. aufgeführt. **A** und **B** *unpaired student's t-test*, **p* < 0,05. %: Prozent

Bilder: *En Face* Darstellung der mit Öl-Rot-O angefärbten Plaques in den aufgeschnittenen Aorten, korrelierende Darstellung zu den abgebildeten Graphen, v.l.n.r.

Maßstabsbalken: 1 cm. cm Zentimeter

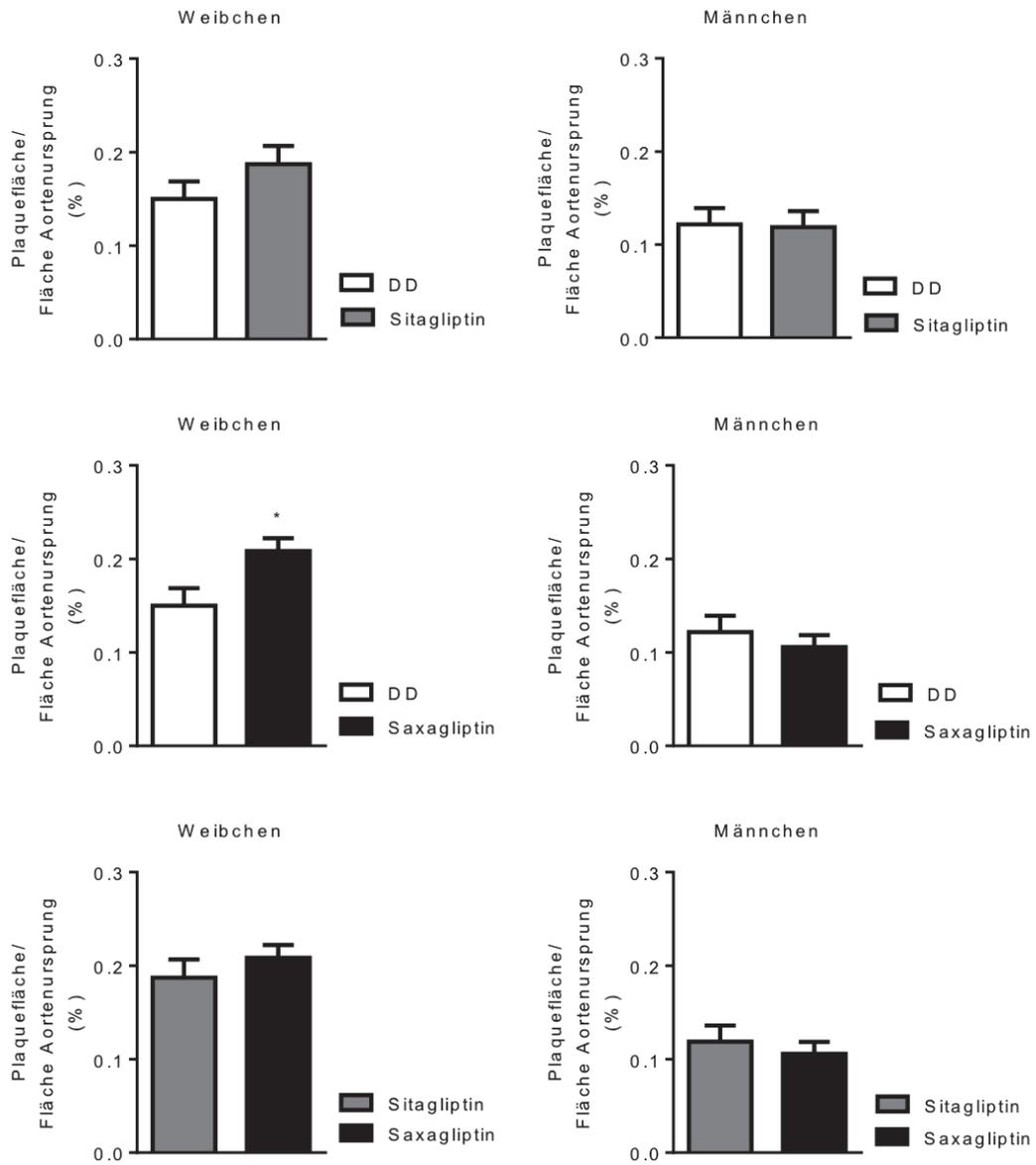
3.3.2 Plaquegröße im Aortenursprung

Die Bestimmung des Plaquequotienten, zur Beurteilung und zum Vergleich der Gesamtplaquefläche, erfolgte zusätzlich zur vorangegangenen Analyse der thorakalen Aorta auch im Aortenursprung. Während in der Gegenüberstellung der Substanzen Saxagliptin und Sitagliptin zur alleinigen Behandlung mit DD in der männlichen Gruppe keine Unterschiede festgestellt wurden (Abbildung 13 A), konnte in der weiblichen Versuchsgruppe eine signifikante Zunahme der Plaquefläche unter Behandlung mit Saxagliptin gegenüber einer alleinigen DD Fütterung festgestellt werden.

Im Gegensatz zur thorakalen Aorta wurde kein Unterschied zwischen den Geschlechtern detektiert (siehe beides Abbildung 13 B). Im direkten Vergleich der Geschlechter wurden unter den verwendeten DPP-4-I insgesamt höhere Plaquequotienten im weiblichen Geschlecht gegenüber den Männchen aufgezeigt (Sitagliptin $p = 0,0208$; Saxagliptin $p = 0,0001$).

3. Ergebnisse

A



3. Ergebnisse

B

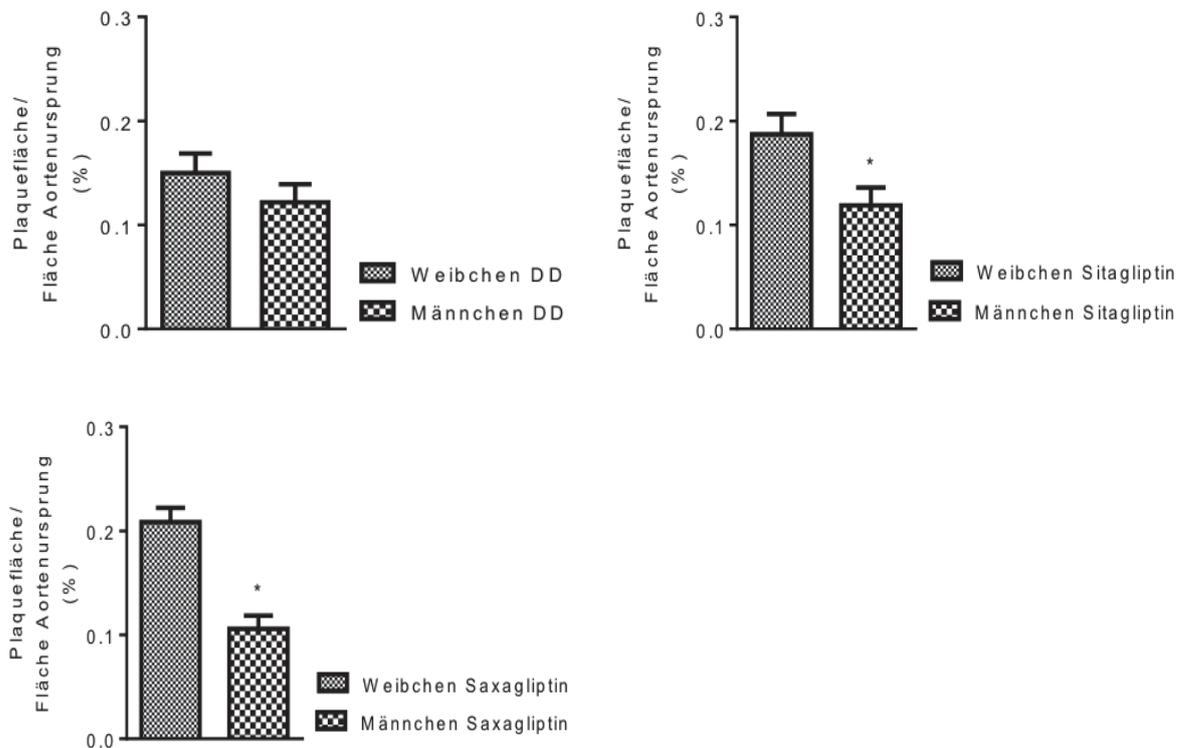


Abb. 13. Plaquetquotient Aortenursprung. Plaquetquotient des Aortenursprungs, gemittelt aus allen Färbungen des Aortenursprungs von 23 Wochen alten *Ldlr*^{-/-} Mäusen beiderlei Geschlechtes nach 15 Wochen Fütterung mit DD, DD + Sitagliptin oder DD + Saxagliptin. Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. **A** und **B** *unpaired student's t-test*, * $p < 0,05$. **A** Substanzspezifischer Vergleich und Gegenüberstellung der Geschlechter (Weibchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: $n = 8,7,6$; Männchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: $n = 6,8,7$) und **B** geschlechtsspezifischer Vergleich (DD $n = 8,6$; DD + Sitagliptin: $n = 7,8$ und DD + Saxagliptin $n = 6,7$). % Prozent

3.3.3 Plaquetkomposition im Aortenursprung

Zur Bestimmung der zellulären Komposition atherosklerotischer Läsionen im Bereich der aortalen Klappenebene wurden immunhistochemische und histologische Färbungen der Aortenursprünge durchgeführt.

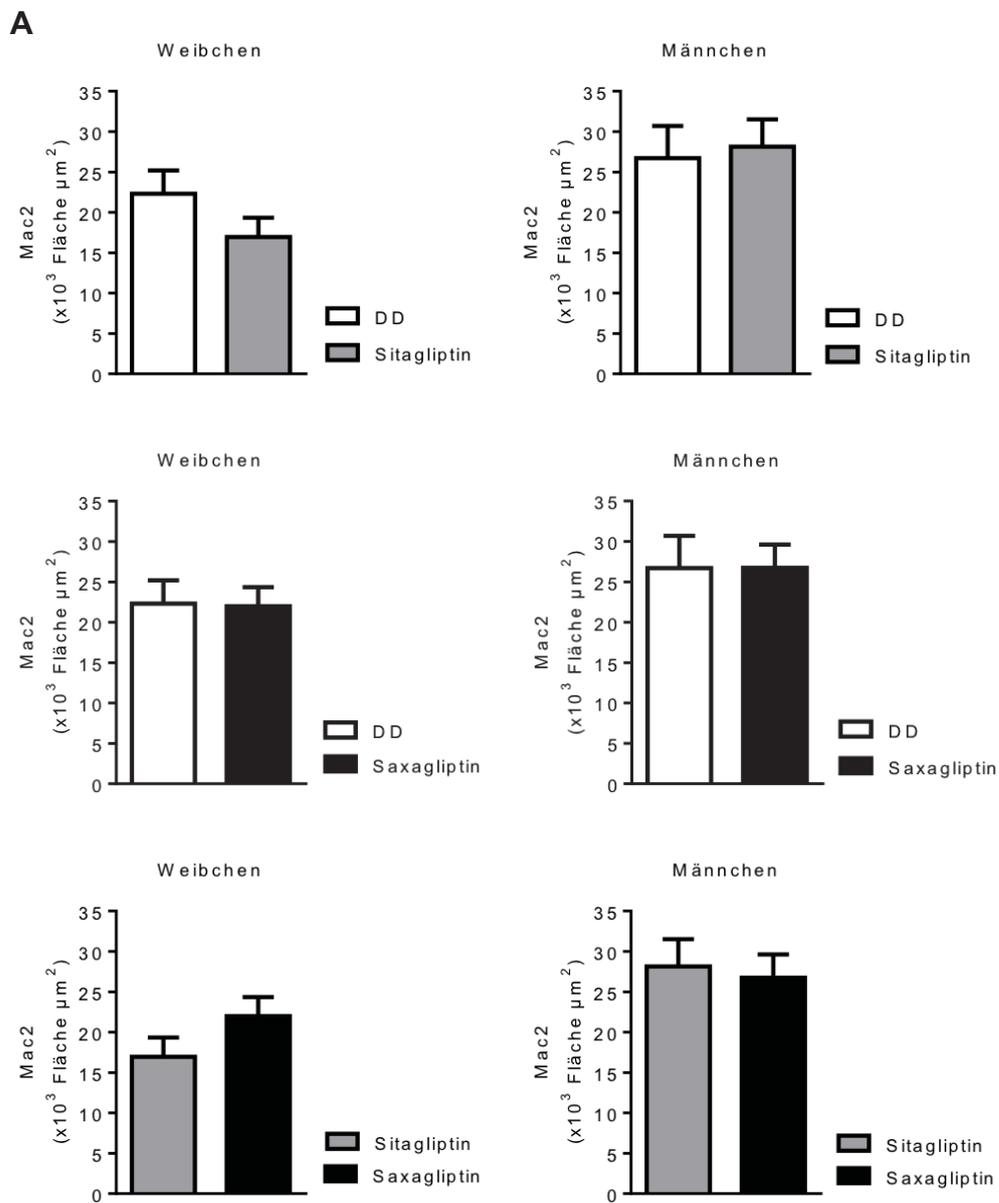
Makrophagengehalt im Aortenursprung

Zur Detektion des Makrophagengehalts und somit zur Beurteilung der Inflammation in den atherosklerotischen Plaques wurde eine Mac-2 Färbung durchgeführt, welche die makrophagenhaltigen Plaquetflächen anfärbt. Diese waren hauptsächlich in der sogenannten Kappe, der dem Lumen nahen Zone, der Plaques abgrenzbar (Abbildung 14).

3. Ergebnisse

Der Substanzvergleich zwischen DD, DD + Sitagliptin und DD + Saxagliptin zeigte zwischen den drei Gruppen keinen Unterschied, weder bei männlichen noch bei weiblichen Tieren (Abbildung 14 A).

Insgesamt konnte in den männlichen Versuchstieren ein tendenziell höherer Gehalt an Makrophagen im Vergleich zu weiblichen Tieren detektiert werden, welcher allein unter Behandlung mit Sitagliptin statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,0155$) (siehe Abbildung 14 B).



3. Ergebnisse

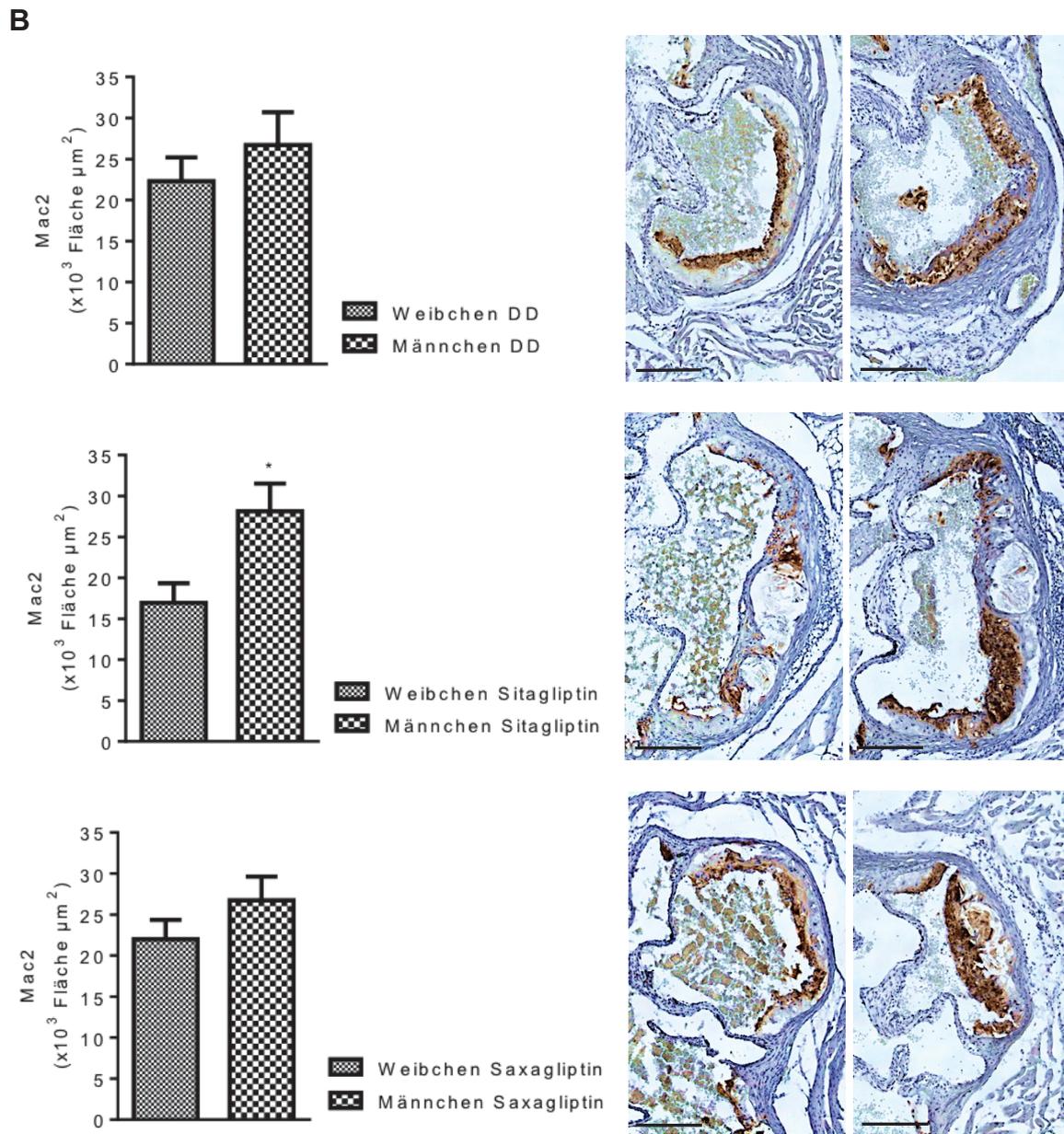


Abb. 14. Makrophagen im aortalen Ursprung. Immunhistochemische Anfärbung von Makrophagen in Plaques des aortalen Ursprungs bei 23 Wochen alten *Ldlr^{-/-}* Mäusen beiderlei Geschlechtes nach 15 Wochen Fütterung mit DD, DD + Sitagliptin oder DD + Saxagliptin. Graphische Darstellung der mit Mac-2 angefärbten Plaquefläche als % der gesamten Plaquefläche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. **A** und **B** *unpaired student's t-test*, $*p < 0,05$. **A** Substanzspezifischer Vergleich mit Gegenüberstellung der Geschlechter (Weibchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: $n = 10,10,8$; Männchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: $n = 7,11,7$) und **B** geschlechtsspezifischer Vergleich (DD $n = 10,7$; DD + Sitagliptin $n = 10,11$; DD + Saxagliptin $n = 8,7$) mit Aufnahmen der entsprechenden Aortenursprungsanfärbungen v.l.n.r. **Bilder:** Aufnahme einer Aortenklappe des Aortenursprungs mit Plaque und Makrophagenfärbung, korrelierende Darstellung zu den jeweiligen Graphen v.l.n.r. in 100facher Vergrößerung. Maßstabsbalken: 200 μm . μm Mikrometer

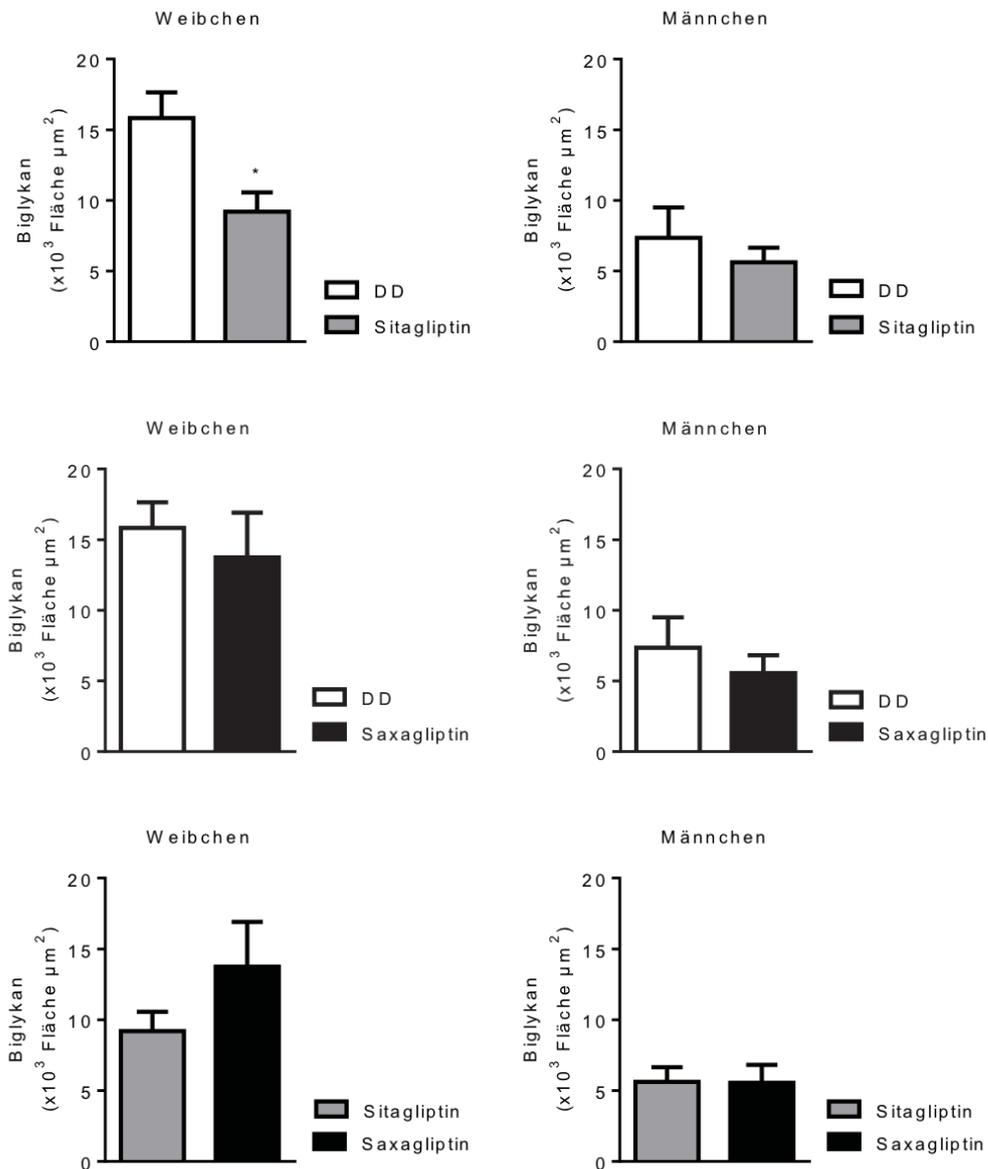
3. Ergebnisse

Biglykan im Aortenursprung

Die Analyse der auf Biglykan angefärbten Schnitte zeigt im Substanzvergleich der drei Kohorten (DD, DD + Sitagliptin und DD + Saxagliptin) keine Unterschiede in der männlichen Versuchstierkohorte auf. In den weiblichen Tieren zeigt sich eine signifikante Reduktion des Biglykangehalts unter DD + Sitagliptin versus einer alleinigen DD Fütterung, nicht jedoch unter einer Behandlung mit Saxagliptin (Abbildung 15 A).

Insgesamt war der Biglykangehalt der atherosklerotischen Plaques in den männlichen Versuchstieren für DD ($p = 0,0057$) alleine und DD + DDP-4-I (Sitagliptin $p = 0,0438$; Saxagliptin $p = 0,0181$) signifikant niedriger als in den weiblichen Mäusen (Abbildung 15 B).

A



3. Ergebnisse

B

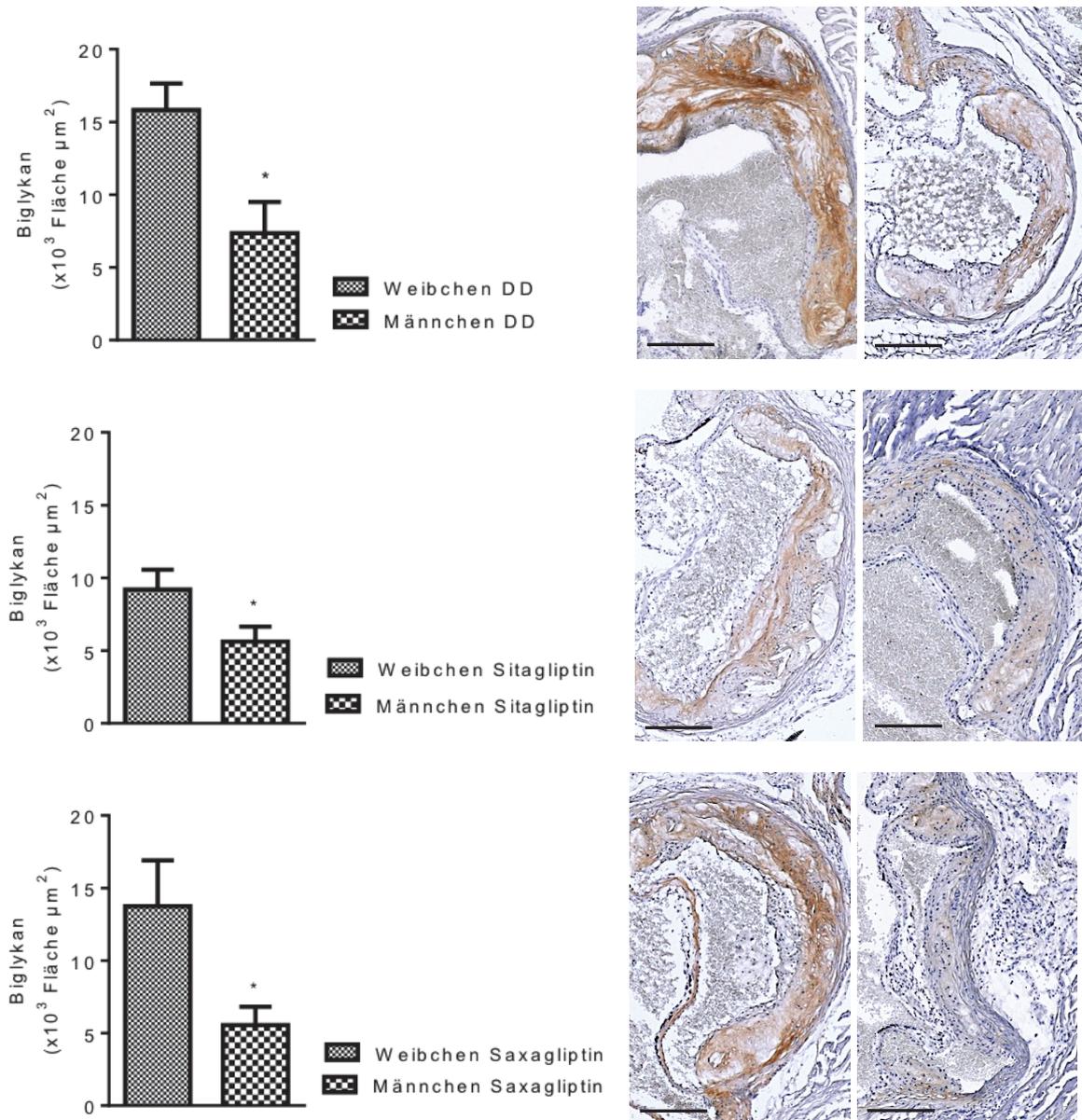


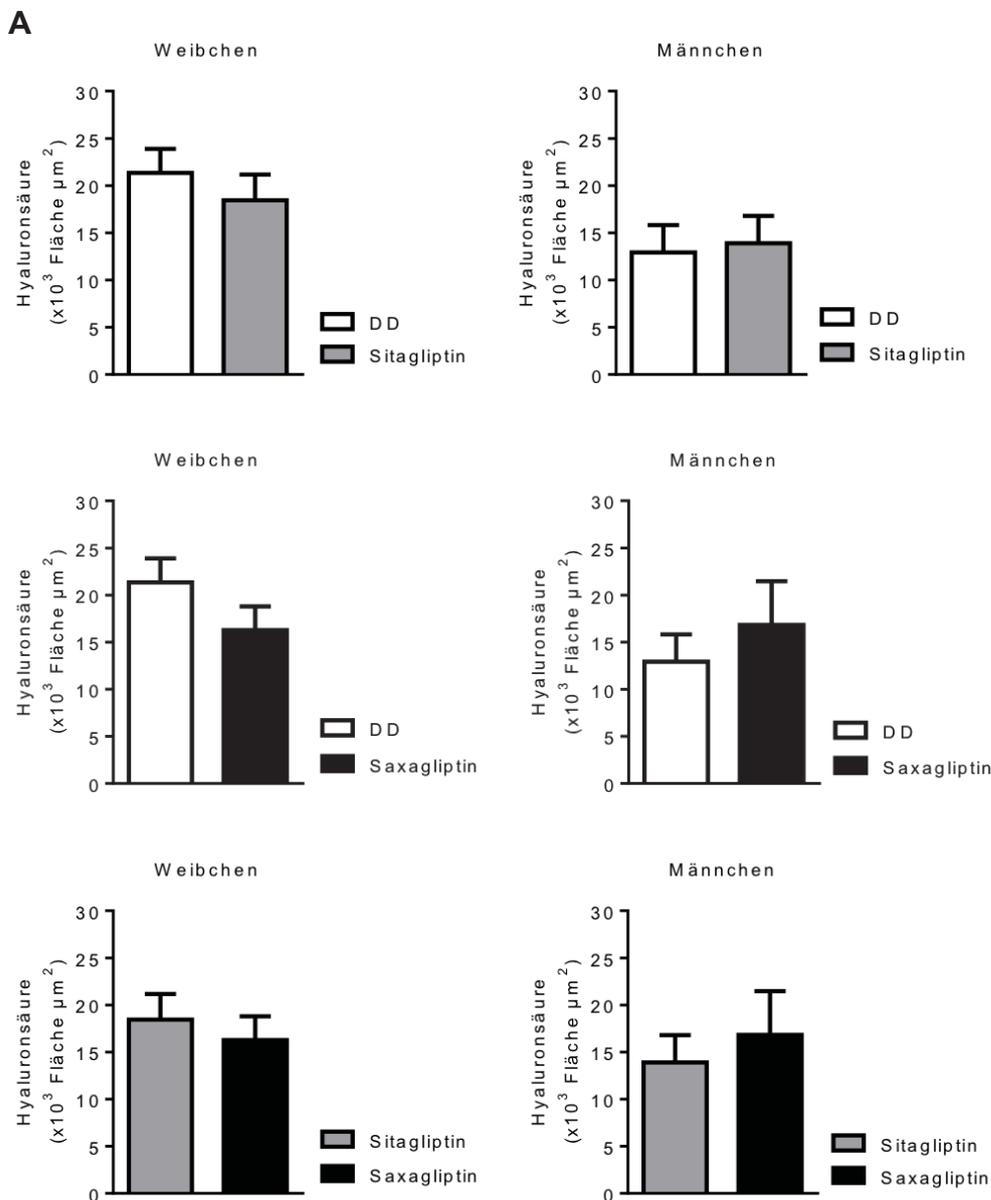
Abb. 15. Biglykan im Aortenursprung. Biglykan Färbung des Aortenursprungs von 23 Wochen alten *Ldlr*^{-/-} Mäusen beiderlei Geschlechtes nach 15 Wochen Fütterung mit DD, DD + Sitagliptin oder DD + Saxagliptin. Darstellung als BGN-positive Fläche (% der gesamten Plaquefläche). Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. **A** und **B** *unpaired student's t-test*, * $p < 0,05$. **A** Substanzspezifischer Vergleich der BGN-positiv angefärbten Plaquefläche und Gegenüberstellung der Geschlechter (Weibchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: $n = 11, 15, 13$; Männchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: $n = 15, 12, 11$) und **B** als geschlechtsspezifischer Vergleich (DD $n = 15, 11$; DD + Sitagliptin $n = 12, 15$ und DD + Saxagliptin $n = 11, 13$) mit Aufnahmen der entsprechenden Aortenursprungsfärbungen v.l.n.r.

Bilder: Abbildung einer aortalen Taschenklappe mit Plaque in Biglykanfärbung, korrelierende Darstellung zu den Graphen v.l.n.r in 100facher Vergrößerung. Maßstabsbalken: 200 μm . μm Mikrometer

3. Ergebnisse

Hyaluronsäure im Aortenursprung

Der Hyaluronsäuregehalt (Abbildung 16 A und B) der Plaques im Aortenursprung war unter den verschiedenen Behandlungen in Männchen und Weibchen jeweils unverändert. Lediglich im Vergleich, der mit DD gefütterten weiblichen und männlichen Versuchstiere konnte ein Unterschied des Hyaluronsäuregehaltes festgestellt werden, welcher mit 20% der positiv angefärbten Fläche in den weiblichen Mäusen deutlich höher war als in Männchen ($p = 0,0471$). Dieser Unterschied verschwand unter DPP-4-I Behandlung aufgrund einer tendenziellen Abnahme des Hyaluronsäuregehaltes in Weibchen und einer gegenläufigen Zunahme der Hyaluronsäure in Männchen.



3. Ergebnisse

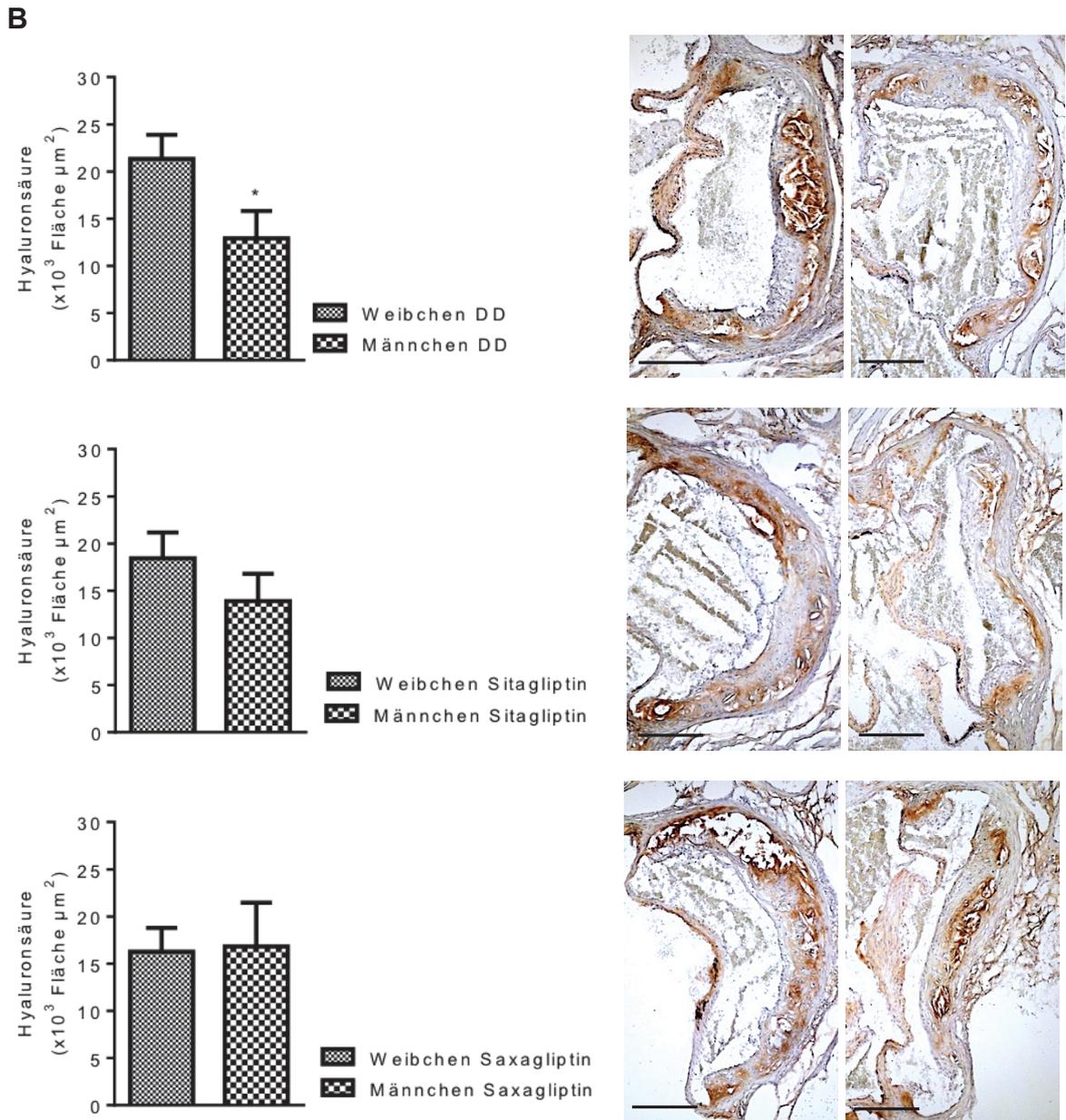


Abb. 16. Hyaluronsäure im Aortenursprung. Hyaluronsäurefärbung des Aortenursprungs von 23 Wochen alten *Ldlr*^{-/-} Mäusen beiderlei Geschlechtes nach 15 Wochen Fütterung mit DD, DD + Sitagliptin oder DD + Saxagliptin. Darstellung als HA-positive Fläche (% der gesamten Plaquefläche). Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. **A** und **B** *unpaired student's t-test*, **p* < 0,05. **A** Substanzspezifischer Vergleich und Gegenüberstellung der Geschlechter (Weibchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: n = 8,10,9; Männchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: n = 7,10,9) und **B** geschlechtsspezifischer Vergleich (DD n = 8,7; DD + Sitagliptin = 10,10; DD + Saxagliptin n = 9,9) mit entsprechenden Aufnahmen der Aortenursprungsfärbungen v.l.n.r.

Bilder: Detailaufnahmen des Aortenursprungs mit Darstellung einer Aortenklappe und Plaque, Hyaluronsäurefärbung, korrelierend zu den abgebildeten Graphen v.l.n.r. in 100facher Vergrößerung. Maßstabsbalken: 200 μm. μm Mikrometer

3. Ergebnisse

Picrosirius-Rot-Färbung

Zur Analyse des Kollagengehaltes und der Packungsdichte der Kollagenfasern in den atherosklerotischen Plaques wurden histochemische Färbungen mit Picrosirius-Rot durchgeführt.

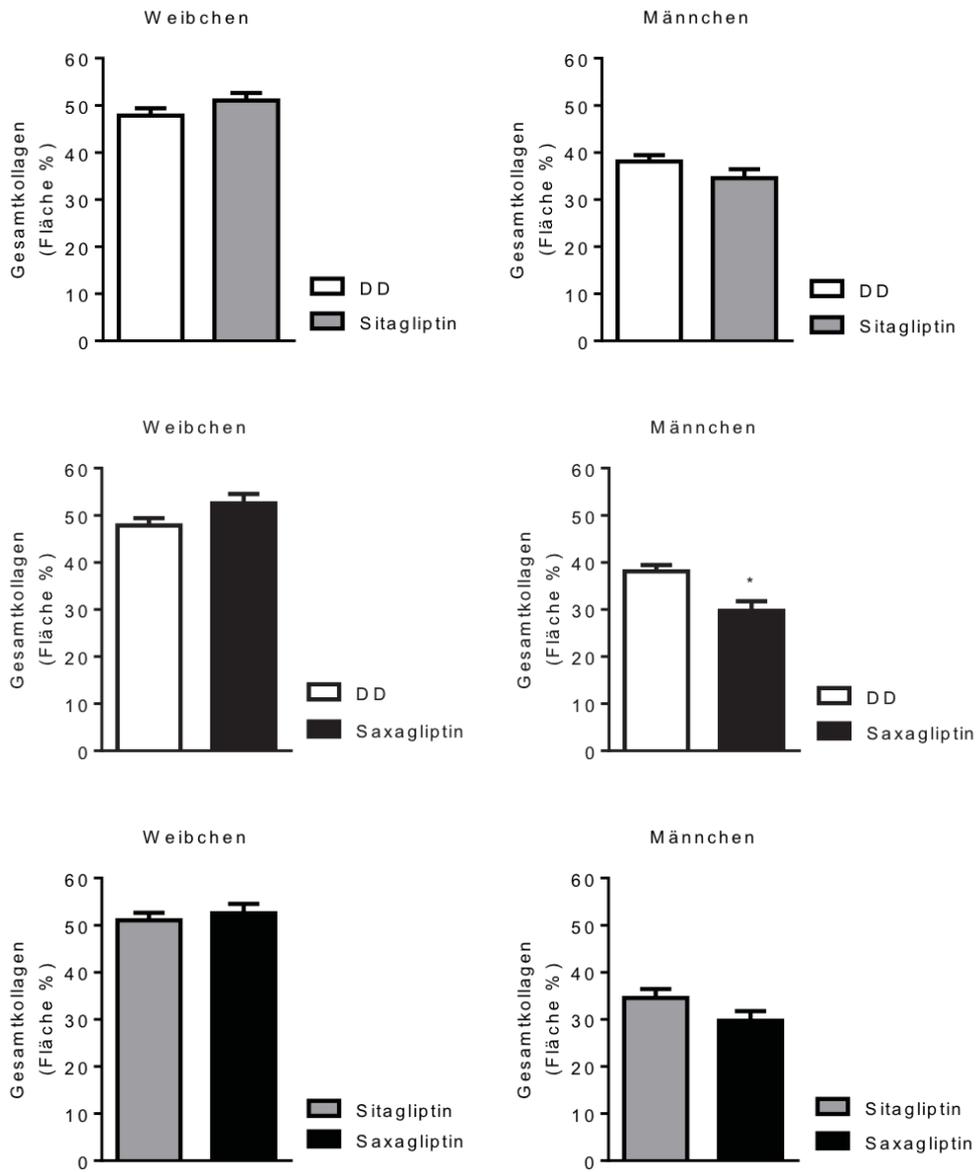
Die Aufnahme und Auswertung der lichtmikroskopischen Picrosirius-Rot Färbungen geben Aufschluss über den Gesamtkollagengehalt. Das Parenchym wird unter der genannten Färbung gelb, die kollagenreichen Anteile rot angefärbt.

Unter einer Therapie mit Saxagliptin konnte in Männchen eine signifikante Reduktion, der für Picrosirius-Rot positiv angefärbten Fläche in den Plaques gegenüber der DD-Gruppe detektiert werden, was jedoch nur tendenziell unter einer Behandlung mit Sitagliptin zu beobachten war (Abbildung 17 A). In den weiblichen Tieren hingegen zeigten sich keinerlei Effekte einer Behandlung mit den beiden DPP-4-I.

Insgesamt konnte in allen drei Behandlungsgruppen, DD, DD + Sitagliptin und DD + Saxagliptin, im direkten Geschlechtervergleich in den aortalen Plaques ein deutlich geringerer Kollagengehalt in den männlichen Versuchstieren verglichen mit weiblichen Tieren detektiert werden ($p < 0,0001$) (Abbildung 17 B).

3. Ergebnisse

A



3. Ergebnisse

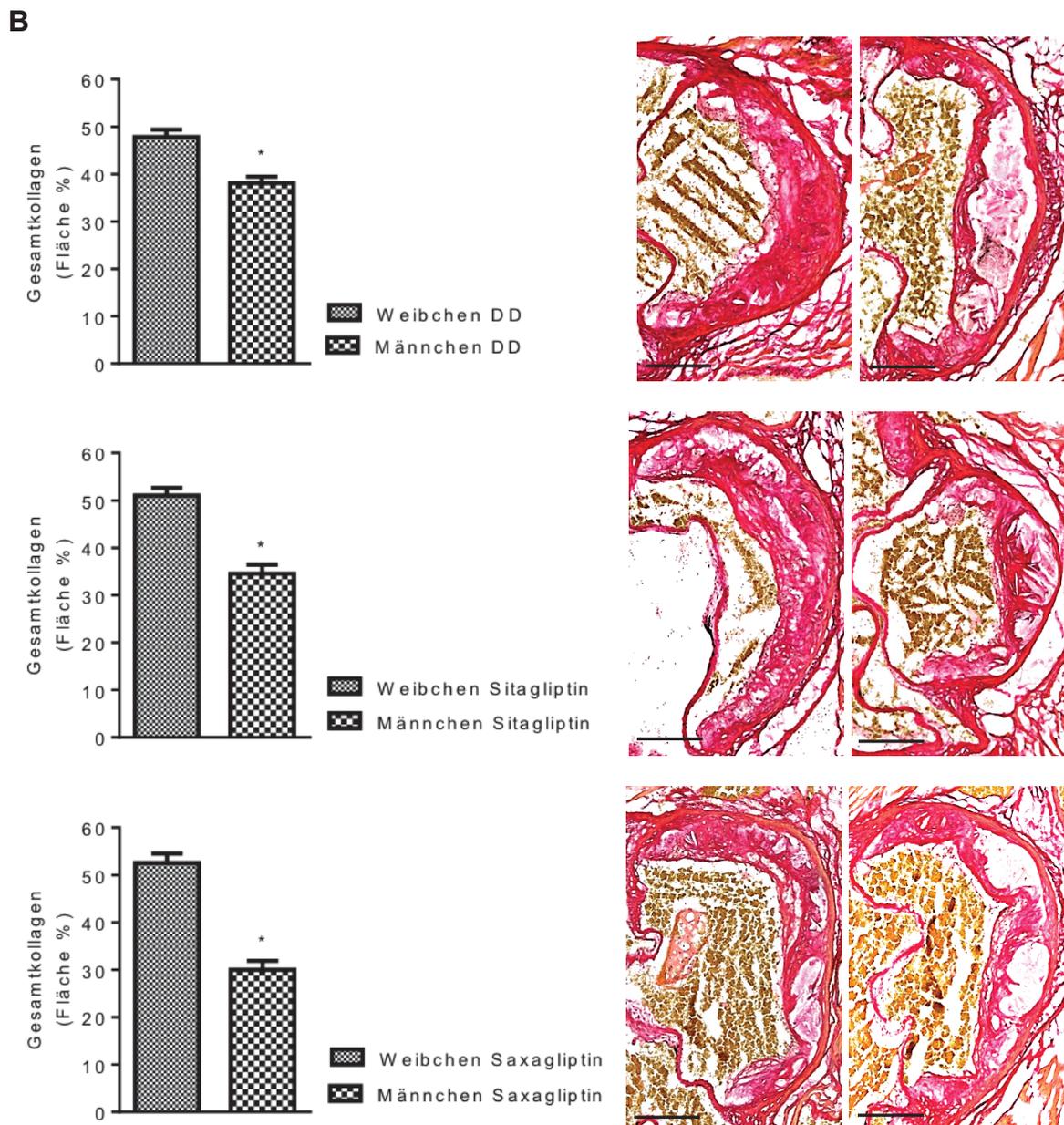


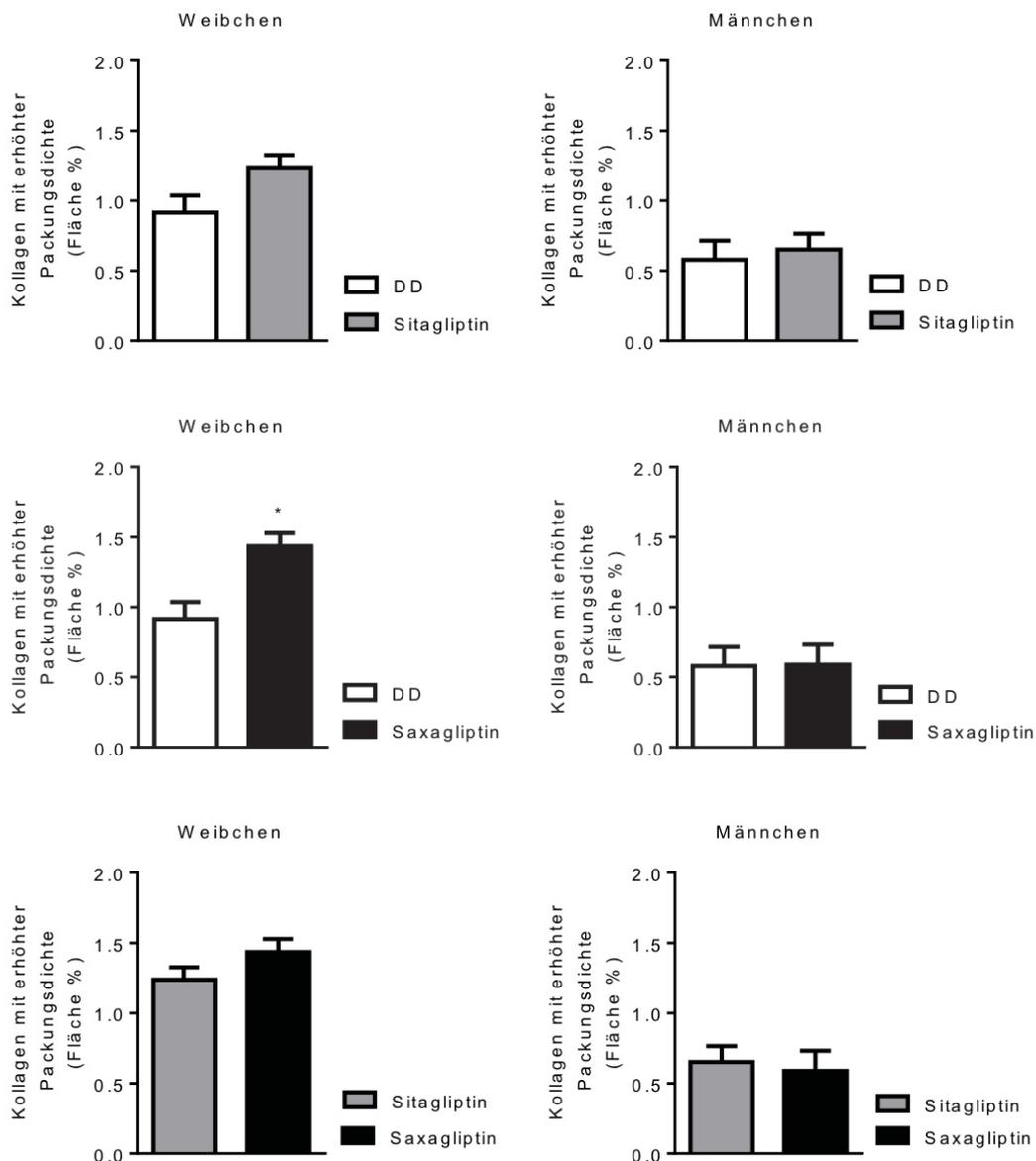
Abb. 17. Picosirius-Rot Färbung des Aortenursprungs. Picosirius-Rot Färbung im Aortenursprung von 23 Wochen alten *Ldlr*^{-/-} Mäusen beiderlei Geschlechtes nach 15 Wochen Fütterung mit DD, DD + Sitagliptin oder DD + Saxagliptin. Darstellung als SR-positive Fläche (% der gesamten Plauefläche). Werte sind Mittelwerte +/- S.E.M. **A** und **B** *unpaired student's t-test*, * $p < 0,05$. **A** Substanzspezifischer Vergleich und Gegenüberstellung der beiden Geschlechter (Weibchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: $n = 14, 11, 12$; Männchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: $n = 14, 16, 13$) und **B** geschlechtsspezifischer Vergleich (DD $n = 14, 14$; DD + Sitagliptin $n = 11, 16$; DD + Saxagliptin $n = 12, 13$) mit Aufnahmen der entsprechenden Aortenursprungsfärbungen v.l.n.r.

Bilder: Detailaufnahmen des Aortenursprungs mit Darstellung einer Aortenklappe und Plaue in Kollagenfärbung, Anordnung korrelierend zu den abgebildeten Graphen v.l.n.r. in 100facher Vergrößerung. Maßstabsbalken: 200 μm . % Prozent

3. Ergebnisse

Auch der Gehalt an dicht gepackten Kollagenfasern, diese leuchten unter polarisiertem Licht rot, war in weiblichen Tieren tendenziell höher als in männlichen Tieren ($p = 0,0769$, Abbildung 18 B). Die Effekte der DPP-4-I offenbarten deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern: Während eine Behandlung mit Sitagliptin in den weiblichen Mäusen dicht gepacktes Kollagen erhöhte und Saxagliptin dies auch tendenziell erkennen ließ (Sitagliptin $p = 0,0012$, Saxagliptin $p = 0,0001$), gab es in der männlichen Mäusekohorte keinerlei Effekte der Substanzen auf den Gehalt an dicht gepackten Kollagen in den atherosklerotischen Plaques (Abbildung 18 A).

A



3. Ergebnisse

B

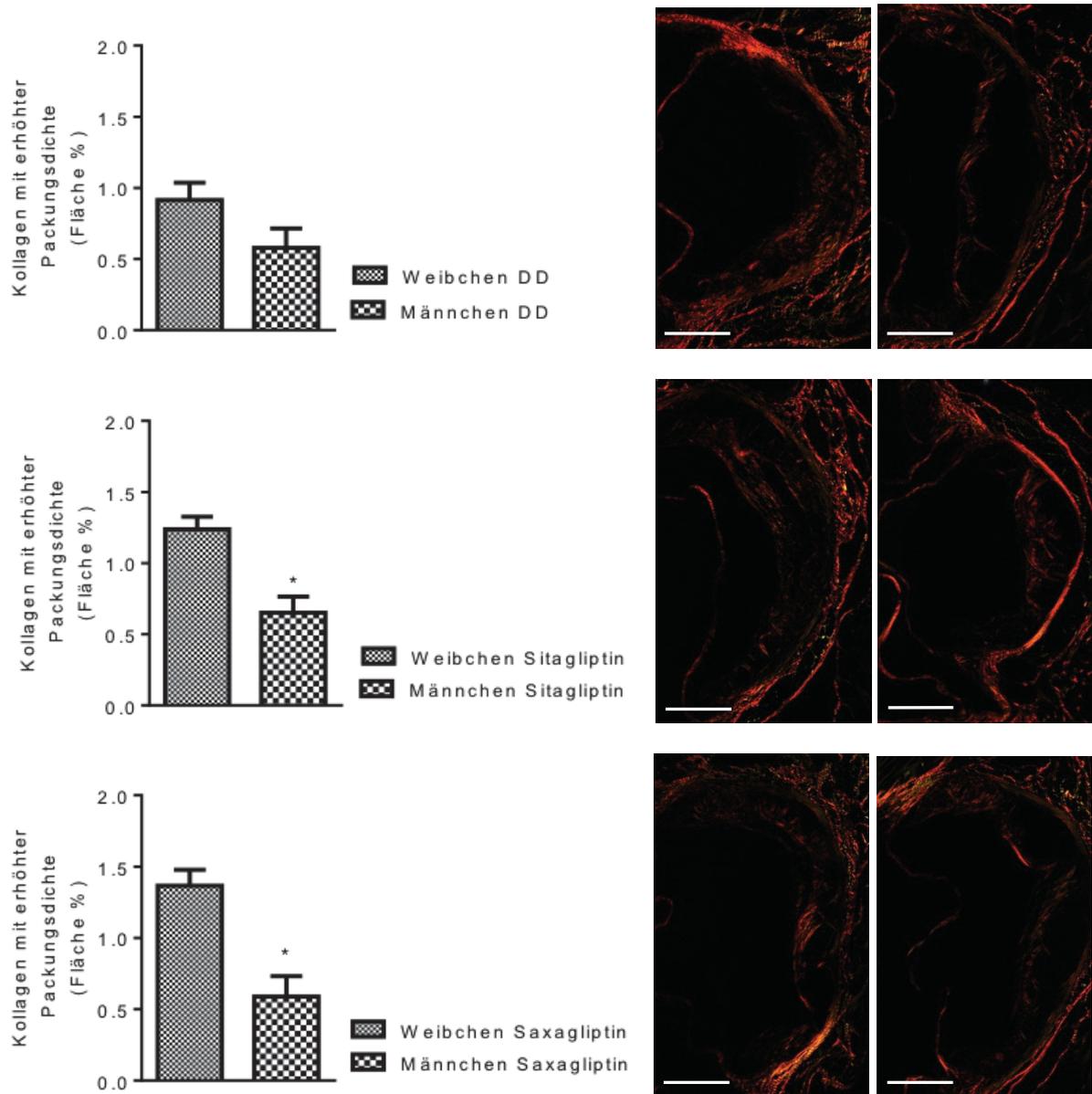


Abb. 18. Picosirius-Rot Färbung des Aortenursprungs polarisiert. Picosirius-Rot Färbung im Aortenursprung von 23 Wochen alten *Ldlr*^{-/-} Mäusen beiderlei Geschlechtes nach 15 Wochen Fütterung mit DD, DD + Sitagliptin oder DD + Saxagliptin. Darstellung der rot polarisierten positiven Fläche (rotes Kollagen, dicht gepacktes Kollagen) als prozentualer Anteil der gesamten Plauefläche. Werte sind Mittelwerte +/- S.E.M. **A** und **B** *unpaired student's t-test*, * $p < 0,05$. **A** Substanzspezifischer Vergleich und Gegenüberstellung der jeweiligen Geschlechter (Weibchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: $n = 14, 10, 10$; Männchen DD, Sitagliptin, Saxagliptin: $n = 14, 16, 14$) und **B** geschlechtsspezifischer Vergleich (DD $n = 14, 14$; DD + Sitagliptin $n = 10, 16$ und DD + Saxagliptin $n = 10, 14$) mit Abbildung der jeweiligen Polarisationsaufnahme des Aortenursprungs v.l.n.r.

Bilder: Detailaufnahmen des Aortenursprungs mit Darstellung einer Aortenklappe und Plaue in Kollagenfärbung und Polarisationsaufnahme, Bilder korrelierend zu den abgebildeten Graphen v.l.n.r. angeordnet, in 100facher Vergrößerung. Maßstabsbalken: 200 μm . % Prozent

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten sowohl a) substanzspezifische Unterschiede zwischen den DPP4-I Sitagliptin und Saxagliptin als auch b) geschlechtsspezifische Unterschiede bei der therapeutischen Applikation und äquieffektiver Dosierung beider Substanzen untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass beide verwendeten DPP-4-I, Sitagliptin und Saxagliptin, die im Plasma gemessene DPP-4 Aktivität in einem vergleichbaren Ausmaß gegenüber der DD-Kohorte signifikant reduziert. Somit konnte deren Wirkung bezüglich der Inhibition der DPP-4 in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Unterschiede zwischen Sitagliptin und Saxagliptin hinsichtlich der DPP-4 Aktivität im Plasma wurden hingegen nicht festgestellt. Es zeigten sich die folgenden Unterschiede, wie zur Übersicht in den Tabellen 4a und 4b dargestellt.

3. Ergebnisse

	Weibchen			Männchen		
	DD vs. Sita	DD vs. Saxa	Sita vs. Saxa	DD vs. Sita	DD vs. Saxa	Sita vs. Saxa
Körpergewicht	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Körperfettanteil	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	Saxa↑
Nüchternblutglukose	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Oraler Glukosetoleranztest	n. s.	n. s.	n. s.	Sita↓	Saxa↓	n. s.
Aortaler Plaque Score	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	Saxa↑	n. s.
Plauegröße aortaler Ursprung	n. s.	Saxa↑	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Makrophagengehalt aortaler Ursprung	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Biglykangehalt aortaler Ursprung	Sita↓	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Hyaluronsäuregehalt aortaler Ursprung	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Kollagengehalt aortaler Ursprung	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	Saxa↓	n. s.
Gehalt dichtes Kollagen aortaler Ursprung	n. s.	Saxa↑	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

Tabelle 4a. Vergleichende Darstellung der substanzspezifischen Unterschiede
 Zusammenfassende Darstellung der oben aufgeführten Ergebnisse für die Gegenüberstellung der verwendeten Substanzen, jeweils in Weibchen und Männchen. **DD** Fütterung mit diabetogener Diät alleine **Sita** Fütterung mit diabetogener Diät + Sitagliptin **Saxa** Fütterung mit diabetogener Diät + Saxagliptin. **vs.** versus **n.s.** nicht signifikant (kein signifikanter Unterschied im direkten Vergleich)

3. Ergebnisse

	Weibchen vs. Männchen		
	DD	Sita	Saxa
Körpergewicht	m↑	n. s.	n. s.
Körperfettanteil	n. s.	w↑	n. s.
Nüchternblutglukose	n. s.	n. s.	n. s.
Oraler Glukosetoleranztest	w↑	n. s.	n. s.
Aortaler Plaque Score	w↑	w↑	n. s.
Plaquegröße aortaler Ursprung	n. s.	w↑	w↑
Makrophagengehalt aortaler Ursprung	n. s.	m↑	n. s.
Biglykangehalt aortaler Ursprung	w↑	w↑	w↑
Hyaluronsäuregehalt aortaler Ursprung	w↑	n. s.	n. s.
Kollagengehalt aortaler Ursprung	w↑	w↑	w↑
Gehalt dichtes Kollagen aortaler Ursprung	n. s.	w↑	w↑

Tabelle 4b. Vergleichende Darstellung der geschlechtsspezifischen Unterschiede
 Zusammenfassende Darstellung der oben aufgeführten Ergebnisse für die Gegenüberstellung der verwendeten Substanzen, jeweils in Weibchen und Männchen. **DD** Fütterung mit diabetogener Diät alleine, **Sita** Fütterung mit diabetogener Diät + Sitagliptin, **Saxa** Fütterung mit diabetogener Diät + Saxagliptin. **vs.** versus, **n.s.** nicht signifikant (kein signifikanter Unterschied im direkten Vergleich)

4. Diskussion

Aufgrund der gravierenden kardiovaskulären Folgeschäden des Diabetes mellitus nimmt das kardiovaskuläre Wirkungsprofil antidiabetischer Substanzen eine bedeutende Rolle in der Therapie dieser Erkrankung ein. Um sicherzustellen, dass antidiabetische Pharmaka ein positives kardiovaskuläres Risikoprofil oder zumindest einen neutralen Effekt aufweisen, wurde für die Zulassung neuer Antidiabetika die Durchführung von kardiovaskulären Sicherheitsstudien gefordert.[61]

Für die in dieser Arbeit untersuchten DPP-4-I wurde mit *TECOS* für Sitagliptin und *SAVOR-TIMI* für Saxagliptin eine Nicht-Unterlegenheit gegenüber eines Placebos hinsichtlich kardiovaskulärer Auswirkungen und Eigenschaften in zwei großen randomisierten, kontrollierten Studien gezeigt und somit die klinische Sicherheit dieser Substanzen bestätigt.[65, 66] Mögliche geschlechts- und substanzspezifische Unterschiede in der Wirkung der beiden DPP-4-I Saxagliptin und Sitagliptin hinsichtlich metabolischer und atheroprotektiver Parameter wurden bisher nicht im direkten Vergleich untersucht und diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher diese Punkte adressiert und genauer betrachtet werden. Es wurden die metabolischen und kardiovaskulären Auswirkungen einer DPP-4-I Therapie mit Saxagliptin und Sitagliptin im Hinblick auf die Entstehung und Zusammensetzung atherosklerotischer Läsionen in einem Mausmodell mit akzelerierter Atherogenese und diätinduzierter Insulinresistenz untersucht. Der tierexperimentelle Ansatz lässt dabei ein enges Monitoring der metabolischen Verlaufparameter zu und erlaubt eine spezifische histologische Analyse der von Atherosklerose betroffenen Lokalisationen.

Im Folgenden wird die aktuelle Datenlage unter Einbezug der vorliegenden Ergebnisse zur Wirkung von DPP-4-I auf metabolische Parameter sowie die Atherosklerose diskutiert.

4.1 Auswirkungen der Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren auf metabolische Parameter

Für die orale *First-Line* Therapie des DMT2 mittels Metformin konnte neben anderen positiven klinischen Eigenschaften auch eine Gewichtsreduktion, vor allem bei übergewichtigen, Patienten, gezeigt werden.[137] Effekte der OADs auf das Körpergewicht spielen bei Patienten mit DMT2 und tendenziellem Übergewicht eine wichtige Rolle. Aufgrund dessen werden Substanzen mit positiver oder zumindest neutraler Auswirkung auf das Körpergewicht in der

4. Diskussion

Therapie bevorzugt. Hinsichtlich möglicher Effekte der DPP-4-I Saxagliptin und Sitagliptin sind gewichtsneutrale Effekte in der Behandlung des DMT2 beschrieben[138, 139], welche ebenfalls in der vorliegenden Arbeit für die Therapie mit Saxagliptin und Sitagliptin gezeigt wurden. Es zeigte sich keine Veränderung des Körpergewichts, auch gab es weder im direkten Vergleich der beiden DPP-4-I noch in der geschlechtsspezifischen Gegenüberstellung detektierbare Unterschiede der beiden Substanzen. Wie zu erwarten wiesen männliche Tiere ein basal höheres Körpergewicht unter alleiniger Fütterung mit DD als Weibchen auf. Dieser Unterschied war unter einer Behandlung mit den beiden DPP-4-I jedoch nicht mehr evident, was möglicherweise durch einen leichten, jedoch nicht signifikanten Trend zur Gewichtssteigerung bei den weiblichen Tieren unter Therapie begründet zu sein scheint.

Weiterhin zeigte sich bei Messungen des Körperfettgehaltes im geschlechtsspezifischen Vergleich ein signifikant geringerer Körperfettgehalt in männlichen Versuchstieren nach 15 Wochen Fütterung mit DD + Sitagliptin gegenüber der weiblichen mit Sitagliptin behandelten Kohorte, ohne eine signifikante Reduktion gegenüber einer alleinigen Fütterung der Tiere mit DD. Dies ging mit substanzspezifischen Effekten der beiden DPP-4-I in Männchen einher: Während Sitagliptin zu einer tendenziellen Abnahme des Körperfetts führte, war dies bei Saxagliptin nicht der Fall, sodass hier ein signifikanter Unterschied zwischen den DPP-4-I auftrat. Somit ist zu schlussfolgern, dass lediglich Sitagliptin in der männlichen Kohorte als untersuchter DPP-4-I einen Effekt auf das Körperfett hat und vergleichend zu Saxagliptin positive Auswirkungen auf den genannten Parameter nimmt.

Während in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede bezüglich der Nüchternblutglukose zwischen den Geschlechtern und Behandlungsgruppen festgestellt wurden, fielen signifikant unterschiedliche Werte im Rahmen des oGTT auf. Die Substanzklasse der DPP-4-I unterstützen die postprandiale Insulinsekretion und Blutglukoseregulation[140], wie auch in unseren männlichen Versuchstieren für beide DPP-4-I Substanzen im Vergleich zur alleinigen DD im Rahmen des oGTT gezeigt werden konnte. Weitere substanzspezifische und geschlechtsspezifische Effekte waren hier nicht zu erkennen und beide Substanzen reduzierten die Blutglukose in einem ähnlichen Umfang.

Eine Arbeit von Matsubara et al. konnte unter Sitagliptintherapie in *ApoE*^{-/-} Mäusen ähnliche Effekte wie die hier vorliegende Arbeit zeigen. In *ApoE*^{-/-} Mäusen hatte Sitagliptin in dieser Untersuchung keinen Einfluss auf das Körpergewicht, das Lipidprofil und die Nüchternblutglukose, jedoch deutliche Effekte im oGTT.[141]

4. Diskussion

Der direkte Substanzvergleich wies im oGTT bei den weiblichen Mäusen keinen Unterschied der Blutglukose unter Behandlung mit den DPP-4-I im Verlauf des Tests auf, sodass in dem hier diskutierten Versuchssetting lediglich ein Effekt in männlichen Versuchstieren hinsichtlich der verwendeten DPP-4-I auf den postprandialen Blutglukoseverlauf nachgewiesen werden konnte. Die unterschiedliche Auswirkung der verabreichten DPP-4-I zwischen den beiden Geschlechtern weist möglicherweise auf einen geschlechterspezifischen Wirkungsunterschied von Sitagliptin und Saxagliptin hin. Zu bedenken ist hierbei, dass die männlichen Tiere basal einen höheren Blutglukosespiegel in der DD-Gruppe als die korrelierende weibliche Kohorte aufweisen. Somit könnte basierend auf den vorliegenden Daten vermutet werden, dass die weibliche Kohorte zum Messzeitpunkt eine weniger stark ausgeprägte diabetische Stoffwechsellage aufweist und eventuell erst ein höherer Krankheitsgrad des Diabetes mellitus notwendig ist, um einen Effekt der DPP-4-I auf die postprandiale Blutzuckerwertung zu messen. Diese Mutmaßung muss allerdings erst in weiteren Studien untersucht werden.

Unter Heranziehung von Erfahrungswerten des Labors hinsichtlich des metabolischen Profils weiblicher Tiere auf nicht-diabetogener Diät bleibt festzuhalten, dass dennoch von prädiabetischen weiblichen Tieren ausgegangen werden kann und sich die metabolischen Parameter deutlich von solchen Kontrolltieren auf nicht-diabetogener Diät unterscheiden. Für die weitere Interpretation der Daten bleibt festzuhalten, dass die weiblichen Tiere eine weniger ausgeprägte Störung der Stoffwechsellage aufweisen. Auf der anderen Seite werden so Blutzucker unabhängige Effekte der Substanzen möglich, was eine differenzierte Analyse der Ergebnisse ermöglicht.

4.2 Auswirkungen der Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren auf Atherosklerose

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen in einem Mausmodell mit akzelerierter Atherogenese sowie Glukosetoleranzstörung weisen hinsichtlich der beiden DPP-4-I Sitagliptin und Saxagliptin unterschiedliche substanzspezifische und geschlechtsspezifische Auswirkungen in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen auf.

Einleitend lässt sich festhalten, dass die Futterzusammensetzung, der genetische Hintergrund der Versuchstiere und auch die jeweiligen analysierten Gefäße, respektive Gewebe, bei der Interpretation der Ausprägung und der Komposition atherosklerotischer Läsionen eine wichtige Rolle spielen. Zudem ist die unterschiedliche Progression der metabolischen

4. Diskussion

Erkrankungen als auch der Atherosklerose, mit möglicherweise lokoregionalen Unterschieden zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren, ein wichtiger Parameter für die nachfolgende Beurteilung der verabreichten Substanzen.[142-144]

Der aortale Plaquescore, ermittelt durch Öl-Rot-O Färbung, zeigt im geschlechtsspezifischen Vergleich signifikant höhere Werte für die angefärbte Plauefläche in den weiblichen Tieren unter DD und DD + Sitagliptin gegenüber der männlichen Kohorte. Dieser Effekt war unter DD + Saxagliptin nicht mehr detektierbar. Dieser Unterschied scheint in der Erhöhung des aortalen Plaquescores in der männlichen Kohorte unter Saxagliptin gegenüber der alleinigen Fütterung mit DD begründet zu sein.

Die basal gemittelte Plauegröße im aortalen Ursprung der mit DD gefütterten Tiere zwischen den Geschlechtern war gleich. Interessanterweise wiesen Weibchen jedoch unter DPP-4-I Therapie eine höhere atherosklerotische Plauelast im aortalen Ursprung auf als Männchen. Dieser Effekt scheint in der Erhöhung des Plauequotienten unter DPP-4-I Therapie begründet zu sein, zumal im geschlechterspezifischen Vergleich im weiblichen Geschlecht eine signifikante Erhöhung der gemittelten Plauegröße unter Saxagliptintherapie gegenüber einer Fütterung mit DD beobachtet wurde. In den männlichen Tieren hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

Bezüglich der Plauekomposition wurden im Geschlechtervergleich deutliche Unterschiede beobachtet. Der Anteil an Bestandteilen der extrazellulären Matrix sowohl unter DD alleine als auch unter den beiden diskutierten DPP-4-I, war speziell bezüglich Biglykan und Kollagen in der weiblichen Kohorte gegenüber den Männchen erhöht. Auch der Hyaluronsäuregehalt zeigte sich in der weiblichen DD Kohorte erhöht; unter zusätzlicher Verabreichung der diskutierten DPP-4-I konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Geschlechtern detektiert werden. Auch der Gehalt an dicht gepackten Anteilen des Kollagens, welcher unter einer alleinigen DD Fütterung keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern zeigte, wurde unter Verabreichung von Sitagliptin und Saxagliptin im weiblichen Geschlecht signifikant erhöht. Wahrscheinlich bedingt die fortgeschrittenere Plaueprogression mit größeren atherosklerotischen Plaues im weiblichen Geschlecht eine zunehmende Akkumulation extrazellulärer Matrix und nimmt möglicherweise Einfluss auf die Plauestabilität.[145]

Die Makrophagenfärbung des Aortenursprungs zeigte einen erhöhten Anteil an Entzündungszellen in den mit Sitagliptin behandelten männlichen Mäusen gegenüber der weiblichen Kohorte auf. Dies wiederum wäre im Einklang mit einem früheren Zeitpunkt in der Entstehung atherosklerotischer Plaues in den männlichen Tieren, welcher durch eine

4. Diskussion

gesteigerte Inflammationsreaktion in den atherosklerotischen Plaques gekennzeichnet ist. Die weiblichen Tiere haben mit einem geringeren Makrophagenanteil in den atherosklerotischen Plaques und einem höheren Anteil an extrazellulärer Matrix zu dem genannten Zeitpunkt der Untersuchung bereits einen vermutlich späteren Zeitpunkt in der Plaqueprogression erreicht.[37, 146, 147]

Im substanzspezifischen Vergleich zeigt sich, dass der aortale Plaque Score in den männlichen Mäusen unter DD + Saxagliptin signifikant höher war als unter alleiniger DD. Unter einer Verabreichung von DD + Sitagliptin konnte in der männlichen Kohorte kein signifikanter Unterschied gegenüber der alleinigen DD Fütterung mehr festgestellt werden. In den Weibchen hingegen wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen evident.

Der höhere Plaquescore in den Weibchen unter DD + Saxagliptin gegenüber einer alleinigen DD-Fütterung im substanzspezifischen Vergleich steht darüber hinaus im Einklang mit einem erhöhten Plaquescore unter DPP-4-I Therapie im geschlechtsspezifischen Vergleich.

Der Gehalt an Gesamtkollagen in den Ursprungsfärbungen zeigte sich unter DD + Saxagliptin gegenüber DD in den männlichen Tieren vermindert, wohingegen der Gehalt an dicht gepacktem Kollagen unter genannter Therapie mit DD + Saxagliptin in den Weibchen gegenüber einer alleinigen Fütterung mit DD erhöht war. Während der Makrophagengehalt und der Gehalt an Hyaluronsäure im den aortalen Ursprung im geschlechtsspezifischen Vergleich keine Unterschiede aufwies, wurde ein geringerer Gehalt an Biglykan unter DD + Sitagliptin in der weiblichen Kohorte gegenüber einer alleinigen DD Fütterung festgestellt. Somit scheint vor allem der DPP-4-I Saxagliptin abhängig vom Geschlecht Einfluss auf die Plaqueverteilung zwischen Aorta und aortalen Ursprung sowie auf den Kollagengehalt der atherosklerotischen Plaques zu nehmen.

Diese Beobachtung unterstützt die oben genannte These hinsichtlich einer verschiedenen stark ausgeprägten Plaqueprogression und Plaquekomposition zwischen den diskutierten Gruppen im geschlechts- und substanzspezifischen Vergleich.

Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich Atherogenese und Atherosklerose sollen im Folgenden unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur genauer diskutiert werden.

Eine Arbeit mit therapeutischem Ansatz von Shah et al. untersuchte die Auswirkung von DPP-4-I auf Inflammation und Atherosklerose in männlichen *Ldlr^{-/-}* Mäusen mit dem DPP4-I Alogliptin versus Placebo für 12 Wochen. Ein paralleler Versuchsansatz untersuchte dabei die Effekte von Sitagliptin in *ApoE^{-/-}* Mäusen. Für die mit DPP-4-I Alogliptin behandelten Tiere konnte eine Reduktion des Plaquegehaltes im Aortenursprung und ein atheroprotektiver Effekt

4. Diskussion

der DPP-4-I durch eine Modulation inflammatorische Prozesse, wie zum Beispiel der Inhibierung der Makrophagenmigration, festgestellt werden.[148]

Vittone et al. untersuchten an männlichen *ApoE^{-/-}* Mäusen unter Sitagliptin 576 mg/kg KG/Tag als supra-therapeutische Dosierung und einer Kontrollgruppe aufgeteilt ebenfalls metabolische Parameter und Auswirkungen auf Atherosklerose. Während DPP-4 Aktivität und Blutglukose nach oGTT in der DPP-4-I Gruppe signifikant reduziert waren, konnte weder ein Unterschied in der absoluten Größe der aortalen atherosklerotischen Läsionen noch im Aortenursprung detektiert werden. Der Makrophagengehalt in den atherosklerotischen Plaques zeigte sich in der Sitagliptinkohorte ebenfalls signifikant reduziert. Der Gehalt an Kollagenfasern in atherosklerotischen Plaques mit Sitagliptin behandelte Tiere war in dieser Arbeit im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Schließlich wurde auch hier durch die DPP-4 Inhibition ein hemmender Effekt auf die Makrophageninfiltration der Plaques vermittelt, welcher wohlmöglich auch Einfluss auf die Stabilität atherosklerotischer Plaques nimmt.[149]

Die zitierten Arbeiten zeigen zum Teil unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich mit der hier vorliegenden Arbeit.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine Unterschiede in der Ausprägung atherosklerotischer Läsionen oder deren Gehalt an Kollagen in den männlichen Tieren unter DPP-4-I Therapie festgestellt werden. Unter der Verabreichung von DD + Saxagliptin wurde in der männlichen Kohorte sogar eine höhere aortale Plaquelast, bei einem niedrigeren Gehalt an Kollagenfasern im Aortenursprung als in der DD Kontrollgruppe, detektiert.

Folgende Aspekte sind hierbei bei der Interpretation jedoch zu beachten: Zum einen wurden die diskutierten Arbeiten lediglich in männlichen Mäusen durchgeführt, womit ein Vergleich zu der weiblichen Kohorte aus der vorliegenden Arbeit aufgrund möglicher Unterschiede hinsichtlich Progression der Atherosklerose mit möglicherweise lokoregionalen Unterschieden zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren nicht sinnvoll erscheint.[142-144]

Im Gegensatz zu der Arbeit von Shah et al. wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein prophylaktischer Ansatz, also mit sofortiger Verabreichung von DPP-4-I Sitagliptin und Saxagliptin zur DD zu Beginn des Versuchs, gewählt. Darüber hinaus wurden die DPP-4-I für unterschiedliche Zeiträume und in unterschiedlichen Dosierungen zu der zitierten Arbeit verabreicht.

Auch die Wahl des Mausstammes (*ApoE^{-/-}* versus *Ldlr^{-/-}*) war unterschiedlich und kann Varianzen in den Ergebnissen begründen.

4. Diskussion

Zeng et al. untersuchten die Auswirkung von Sitagliptin in *ApoE*^{-/-} Mäusen, welche unter DPP-4-I Therapie womöglich eine andere Kinetik in der Ausbildung der Atherosklerose als *Ldlr*^{-/-} Mäuse zeigen. Darüber hinaus erfolgte eine deutlich längere (15 Wochen versus 24 Wochen) Behandlung. Diese Unterschiede des Sitagliptineffektes sind somit möglicherweise auch in der beschriebenen Diskrepanz des Untersuchungszeitraums begründet.[150]

Die untersuchten metabolischen Parameter in einer Arbeit von Matsubara et al. unter Sitagliptintherapie in männlichen *ApoE*^{-/-} Mäusen zeigten, wie auch in dieser Arbeit, keine Unterschiede hinsichtlich des Körpergewichts und der Nüchternblutglukose auf, obschon eine Reduktion des aortalen Plaque Scores mit einer verminderten Einwanderung inflammatorischer Zellen gezeigt wurde. Die Auswirkung des DPP-4-I auf den oGTT zeigten sich zwischen den Gruppen verschieden und weisen damit ebenfalls eine Parallele der hier vorliegenden Arbeit auf.[141]

Somit scheint der Prozess der Atherogenese und die Komposition der atherosklerotischen Plaques in der männlichen Mauskohorte unabhängig von Körpergewicht, des Körperfettgehalts und der Nüchternblutglukose aufzutreten. Dennoch wurde im Geschlechtervergleich unter einer Fütterung mit DD + Sitagliptin ein signifikant höherer Körperfettgehalt in der weiblichen Kohorte gegenüber den männlichen Mäusen unter gleicher Therapie gemessen. Dieser Unterschied bestand unter alleiniger DD Fütterung nicht. Der erhöhte Körperfettgehalt in der weiblichen Kohorte unter DD + Sitagliptin korreliert positiv mit der Ausprägung des aortalen Plaque Scores sowie mit der Größe der atherosklerotischen Plaques im aortalen Ursprung und deren erwähnte Zunahme an extrazellulärer Matrix.

Bisher wurden in keiner Studie mögliche Wirkunterschiede der DPP-4-I Sitagliptin und Saxagliptin, respektive der in dieser Arbeit untersuchten Auswirkung auf die Atherogenese und Komposition der atherosklerotischen Plaques, zwischen dem weiblichen und männlichen Geschlecht adressiert. Diese Punkte sollen im Folgenden genauer diskutiert werden:

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich im Geschlechtervergleich zwischen männlichen und weiblichen Mäusen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Atherogenese und Komposition atherosklerotischer Plaques: Obschon die Läsionen männlicher Tiere verglichen mit denen weiblichen Tieren deutlich kleiner waren, wiesen Männchen insgesamt höhere Anteile an Makrophagen auf. Dies könnte in der unterschiedlichen Kinetik der Atherogenese in den Geschlechtern begründet liegen, bei welcher die Plaques in den Weibchen in einem deutlich fortgeschrittenerem Stadium analysiert wurden als die der Männchen. Genau dies spiegelt sich im höheren Anteil gefärbter Makrophagen wider, für welche in der Atherogenese und

4. Diskussion

Atheroprogression eine wichtige Rolle gerade in der Frühphase beschrieben ist und welche sich in der Umwandlung zu lipidreichen Schaumzellen widerspiegelt.[146]

Die Makrophageninvasion stellt dabei ein früheres Event in der Entstehung der Atherosklerose dar. Durch die Expression von Leukozyten-bindenden Molekülen und Chemokinen des Endothels kommt es zu einer Anheftung und Einwanderung der Leukozyten in die Gefäßintima. Die eingewanderten Monozyten differenzieren zu aktivierten Makrophagen. Es folgt daraufhin die weitere Aufnahme an oxidierten *LDL*-Partikeln und nachfolgend die Formation der Makrophagen durch Überladung mit Lipiden zu Schaumzellen. Die Initiierung einer entzündungsfördernden Kaskade wird weiterhin dadurch ermöglicht.[37] Die Freisetzung von Zytokinen begünstigt mit Hilfe von Wachstumsfaktoren die Aktivierung von *SMC* und deren weitere Einwanderung, welche neben der Beteiligung des Proteoglykans Biglykan die Veränderung der Plaquekomposition durch Einflussnahme auf die extrazelluläre Matrix und die Stabilität der atherosklerotischen Plaques beeinflusst.[34, 35, 44, 45] Es kommt zur Volumenzunahme und Veränderung der Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsion, respektive des Kollagengehaltes der fibrösen Kappe und der Größe des instabilen Kernes der Plaques.[46, 47]

Die Auswertung der Gesamtplaquefläche gemessen an der Größe des Aortenursprunges zeigte einen erhöhten Plaquequotienten mit den DPP-4-I behandelten weiblichen Versuchstieren gegenüber der männlichen Kohorte. Dieser Unterschied bestand unter alleiniger Fütterung mit DD nicht. Ein weiterer Unterschied hinsichtlich des Plaquequotienten ergab sich zudem im Substanzvergleich mit einem erhöhten Plaquequotienten in der weiblichen DD + Saxagliptin Kohorte gegenüber DD alleine.

Auch hinsichtlich der Matrixkomposition der atherosklerotischen Läsionen stellten sich Unterschiede zwischen den Geschlechtern dar. In unserer Arbeit zeigte sich der Biglykangehalt für Weibchen in allen drei Behandlungsgruppen (DD, DD + Saxagliptin, DD + Sitagliptin) gegenüber den Männchen erhöht. Sitagliptin führte zu einer Reduktion des Biglykans gegenüber der alleinigen DD Fütterung in der weiblichen Kohorte. Auch der Anteil an Hyaluronsäure in den atherosklerotischen Plaques wies einen erhöhten Anteil in der weiblichen DD Kohorte gegenüber den männlichen Versuchstieren auf. Dieser Unterschied zwischen den Geschlechtern war bei zusätzlicher Verabreichung einer der beiden diskutierten DPP-4-I nicht mehr zu detektieren, was vermutlich in einem erniedrigten Hyaluronsäuregehalt in den atherosklerotischen Plaques unter Verabreichung von Sitagliptin, respektive Saxagliptin, begründet war.

4. Diskussion

Der Gesamtkollagengehalt war, wie auch der Biglykan- und Hyaluronsäuregehalt, in den Weibchen für alle drei Gruppen gegenüber den männlichen Mäusen signifikant erhöht. Es konnten keinerlei Effekte unter Behandlung mit den DPP-4-I beobachtet werden. Interessanterweise führte jedoch die Verabreichung von Saxagliptin in den männlichen Versuchstieren zu einer Reduktion des Gesamtkollagens in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs, wohingegen unter Sitagliptin nur ein nicht signifikanter Trend zu sehen war. Passend zu dem erhöhten Anteil des Gesamtkollagens zeigte sich auch der Gehalt an dicht gepackten Kollagenfasern in den weiblichen Tieren für alle drei Gruppen im Vergleich zu den Männchen erhöht. Unter einer Fütterung mit DD + Saxagliptin wurde darüber hinaus eine Steigerung im Vergleich zur alleinigen DD Fütterung in den Weibchen beobachtet. In den männlichen Versuchstieren konnte eine Erhöhung des dicht gepackten Kollagens unter Saxagliptinverabreichung, jedoch nicht für Sitagliptin verzeichnet werden. Ein niedrigerer Gehalt an Biglykan und Kollagen, auch schon in der männlichen DD Kohorte, gegenüber der weiblichen Kohorte unterstützt die oben genannte These und erklärt darüber hinaus den Größenunterschied der Plaques im aortalen Ursprung. Der Gehalt an extrazellulärer Matrix hat darüber hinaus einen Einfluss auf die Komposition der Plaques, dessen Stabilität und Gefahr der Plaqueruptur.[151, 152]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die größeren atherosklerotischen Plaques in den aortalen Ursprungsfärbungen und der höhere Gehalt an extrazellulären Matrixmolekülen wie Hyaluronsäure, Biglykan, Gesamtkollagen und dicht gepacktem Kollagen in den weiblichen Tieren miteinander einhergehen. Daraus lässt sich für den hier diskutierten Untersuchungszeitpunkt eine höhere Plaquestabilität in den weiblichen Versuchstieren annehmen, die in der Interaktion zwischen den diskutierten extrazellulären Matrixanteilen begründet liegt.[151, 152]

Für Biglykan wurde die Einflussnahme im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose gezeigt. Dabei kommt es über eine Interaktion von löslichem Biglykan mit *toll-like receptors* (TLR) zu einer Aktivierung von Makrophagen und einer daraus resultierende inflammatorische Reaktion.[44] Die Eigenschaft des sich in der Intima der Gefäßwände befindlichen Biglykan mit LDL-Partikeln zu interagieren, diese zu binden und damit letztlich auch eine Makrophageninvasion zu triggern, schreibt diesem Proteoglykan eine Steigerung der Atherogenese zu.[35, 147] Darüber hinaus hat Biglykan als ein mit Kollagen bindendes und interagierendes Proteoglykan modulierende Eigenschaften auf dessen Faserdichte und darüber vermittelte Stabilität der Gefäßintima.[153, 154] Ein erhöhter Gehalt an Biglykan und Kollagen, vor allem an dicht gepackten Kollagenfasern, führt zu einer Stabilisierung der

4. Diskussion

atherosklerotischen Läsionen. In einer Arbeit mit *ApoE^{-/-}/BGN^{+/0}* (ApolipoproteinE/-Biglykan doppel-defizienten Tieren) in Mäusen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Biglykan eine atheroprotektive Rolle über die Eindämmung der Thrombinaktivität, der Plättchenaktivierung und immunmodulatorische Eigenschaften über eine Makrophagen vermittelte Plaqueinflammation aufweist.[155] Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein erniedrigter Kollagengehalt in atherosklerotischen Plaques über das Fehlen eines proteolytischen Spaltprodukt des Kollagens (Endostatin) eine Steigerung der Lipidretention durch erhöhte Interaktion des *LDL* mit Biglykan nach sich zieht.[156] Somit kann eine Änderung in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und deren Interaktion Einfluss auf die Atherogenese, deren Kinetik und Stabilität der atherosklerotischen Plaques nehmen. Dabei spielt der Kollagengehalt eine tragende Rolle in der Stabilität der Kappenregion des Plaques und wird durch die Aktivität von Matrixmetallo-proteinasen (*matrix metalloproteinase*, *MMP*), sezerniert durch Makrophagen, reguliert, was eine Spaltung der Kollagenfasern verursacht.[47] Neben des Gehalts an Kollagen kommt der Anordnung der Kollagenfibrillen, reguliert durch dessen Bindung und Interaktion unter anderem von Biglykan, eine bedeutende Rolle im Rahmen der Stabilisierung von atherosklerotischen Plaques zu.[145, 157]

Der erhöhte Hyaluronsäureanteil in den Plaques des aortalen Ursprungs der weiblichen DD Tiere gegenüber der männlichen Mäusen konnte unter der Verabreichung von Sitagliptin und Saxagliptin nicht mehr festgestellt werden und stützt die oben genannte These, dass die Verabreichung der beiden diskutierten DPP-4-I einen plaquestabilisierenden Einfluss in den weiblichen Versuchstieren aufweisen. Für Hyaluronsäure als wichtigen Bestandteil der Extrazellulärmatrix der Neointima in atherosklerotischen Plaques wurden im Tiermodell proinflammatorische Eigenschaften festgestellt. Die Hemmung der Hyaluronsäuresynthetase-3 und die konsekutiv verminderte Hyaluronsäure in den atherosklerotischen Plaques führten zu einer verminderten Entzündungsreaktion und einer geringeren Plaquebildung durch Eindämmung der Inflammationskaskade mit T-Helferzellen, Interleukinen und Makrophagen.[158] Weiterhin ist bekannt, dass ein gesteigerter Umsatz der Hyaluronsäure unter inflammatorischen Umständen mit einem erhöhten Gehalt an Hyaluronsäurefragmenten einhergeht, welcher über *TLR* eine Aktivierung von Makrophagen oder die Reifung Dendritischer Zellen begünstigt.[159] Jedoch wurden in der Literatur auch atheroprotektive Wirkungen der Hyaluronsäure beschrieben. Nagy et al. zeigten, dass eine Hemmung der Hyaluronsäuresynthese Einfluss auf die protektive Barrierefunktion der endothelialen Glykokalix nimmt. Dabei kommt es über eine durch Leukozyten vermittelte Entzündungsreaktion zu einem Progress der Atherogenese und Bildung atherosklerotischer

4. Diskussion

Plaques.[160] Aufgrund der inhomogenen Studienlage hinsichtlich der Bedeutung der Hyaluronsäure im Rahmen der Atherogenese und Atheroprogression erscheinen weitere Studien auf diesem Gebiet sinnvoll.

Die DPP-4-I Sitagliptin und Saxagliptin scheinen zum einen über einen höheren Gehalt an plaquestabilisierenden Extrazellulärmatrixbestandteilen Biglykan und Kollagen, sowie über eine Reduktion der Entzündungsreaktion, unter verminderter Makrophageneinwanderung und reduziertem Hyaluronsäuregehalt, einen positiven Einfluss auf die Plauekomposition in den weiblichen Versuchstieren zu nehmen. Das Fehlen dieser Effekte in den männlichen Versuchstieren ist unter Umständen auf eine andere Kinetik in der Atheroskleroseausbildung mit verzögerter Plauebildung zurückzuführen oder deutet tatsächlich auf einen Effekt der DPP-4-I zwischen den Geschlechtern hin.

Ein direkter Zusammenhang zu den untersuchten metabolischen Parametern Körpergewicht, Körperfettmasse und Blutglukose konnte im Substanzvergleich im selben Geschlecht und im männlichen Geschlecht nicht festgestellt werden. Allerdings besteht ein möglicher Zusammenhang zu dem beschriebenen erhöhten Körperfettanteil im weiblichen Geschlecht unter DPP-4-I Therapie mit Sitagliptin, im Vergleich zur korrelierenden männlichen Kohorte, und die dazu positiv korrelierende verstärkte Plaueelast in der Aorta und im aortalen Ursprung mit Zunahme an extrazellulär Matrixbestandteilen.

Zur differenzierten Interpretation werden allerdings weitere Untersuchungen mit direktem Geschlechtervergleich und späteren Untersuchungszeitpunkten benötigt.

Die klinische Relevanz der oben beschriebenen Auswirkungen der DPP-4-I auf die Atherosklerose und deren kardiovaskuläres Risikoprofil wurden unter anderem in großen randomisierten, kontrollierten Nicht-Unterlegenheitsstudien mit *SAVOR-TIMI* für Saxagliptin und *TECOS* für Sitagliptin untersucht. Im Gegensatz zu den positiven Effekten in einigen Tierstudien scheinen die atheroprotektiven Effekte der DPP-4-I im klinischen Setting nicht so deutlich und konsequent ausgeprägt zu sein.[161-164]

Eine Untersuchung zur Auswirkung von Sitagliptin auf koronararterielle Plaueentwicklung und Plauestabilität in Patienten mit akutem Koronarsyndrom und DMT2 wurde im Rahmen einer prospektiven, randomisierten Studie (*ESPECIAL-ACS, Effect of Sitagliptin on Plaue Changes in Coronary Artery Following Acute Coronary Syndrome in Diabetic Patients*) in Japan durchgeführt. Es erfolgte die Randomisierung in eine Sitagliptin Gruppe mit *Lifestyle*-Änderung und 50-100 mg Sitagliptin pro Tag über sechs Monate und eine Kontrollgruppe unter gleichem Setting ohne Sitagliptin. Eingeschlossen wurden Patienten mit nicht-interventionsbedürftiger

4. Diskussion

Stenosierungen sogenannter *culprit lesions*, atherosklerotische Plaques, die für eine Angina pectoris-Symptomatik verantwortlich sein können, ohne abgelaufene Plaqueruptur. Die stenotischen Gefäßbereiche wurden mittels intravaskulären Ultraschalls (*IVUS*, *intravascular ultrasound*; *IB-IVUS*, *integrated backscatter IVUS*) hinsichtlich ihrer Quantität untersucht. Nach 6-monatigem *Follow-up* zeigte sich ein Trend zu einem höheren Plaquevolumen in der Sitagliptinkohorte, der prozentuale Anteil der Lipide wurde in der Behandlungsgruppe signifikant gesenkt. Somit schlussfolgern die Autoren, dass Sitagliptin womöglich einen plaquestabilisierenden Effekt auf koronararterielle Plaques hat.[165] In der *ESPECIAL-ACS* Studie wurde allerdings keine Unterscheidung hinsichtlich des behandelten Geschlechts gemacht und die Zusammensetzung der Plaques nicht histologisch aufgearbeitet. Nichtsdestotrotz ist die Argumentation der Autoren in Bezug auf die Plaquestabilität durch Reduktion des Lipidanteils in den Plaques insofern stringent, als dass die hier detektierte Veränderung der extrazellulären Matrix in den Plaques auch gleichzeitig Einfluss auf den Lipidgehalt nehmen kann *et vice versa*. Somit stützen die Beobachtungen der *ESPECIAL-ACS* Studie die Annahme, dass die Verabreichung von Sitagliptin einen Einfluss auf die Plaquekomposition und Plaquestabilität hat, allerdings bedarf es weiterer dezidierter histologischer Untersuchungen zur Klärung dieser Fragestellung und Aufarbeitung der Komposition der atherosklerotischen Plaques.

In einer randomisierten Studie (*The Effect of Sitagliptin on Carotid Artery Atherosclerosis in Type 2 Diabetes: The PROLOGUE Randomized Controlled Trial*) zur Untersuchung möglicher kardiovaskulär protektiver Eigenschaften wurde die Auswirkung des DPP-4-I Sitagliptin auf die Intima-Media Dicke der Arteria carotis untersucht. Sitagliptin wurde dabei als Zusatz zur konventionellen Therapie, bestehend aus lebensverändernden Maßnahmen, respektive medikamentöser Therapie, in der Behandlungsgruppe verabreicht. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass Sitagliptin keinen positiven Einfluss die carotidale Intima-Media Dicke als Surrogatparameter für Atherosklerose nimmt und damit keine atheroprotektive Eigenschaften aufweist.[166] Allerdings wurde bemängelt, dass die gleichzeitige Verabreichung anderer Diabetesmedikamente in dieser Studie einen möglichen atheroprotektiven Effekt des Sitagliptins, dargestellt durch Einflussnahme auf die Intima-Media Dicke der Arteria carotis, beeinflusst haben könnte.[167]

In der *SAVOR-TIMI* Studie wurden 16.496 Patienten mit einem atherosklerotischen Risikoprofil unter Randomisierung in eine Saxagliptin-Gruppe (5mg/Tag, respektive 2,5mg/Tag bei Niereninsuffizienz) oder eine Placebogruppe aufgeteilt und hinsichtlich der primären Endpunkte kardiovaskulärer Tod, Myokardinfarkt und Schlaganfall untersucht. Bezüglich der

4. Diskussion

primären Endpunkte konnten keine Unterschiede detektiert werden. Weiterhin wurden keine relevanten Differenzen in Bezug auf die sekundären Endpunkte instabiler Angina pectoris mit stationärer Behandlung und Häufigkeit an Herzkatherterinterventionen festgestellt. Allerdings kam es zu einer gesteigerten Rate an Herzinsuffizienz assoziierten Krankenhauseinweisungen in der Saxagliptinkohorte.[66] Diese Beobachtung konnte in anderen Studien für die Gruppe der DPP-4-I nicht bestätigt werden, sollte allerdings weiterhin kritisch beobachtet werden.[65, 67, 168]

Mit der *TECOS* Studie wurde Sitagliptin (100mg/Tag, bei eingeschränkter Nierenfunktion 50mg/Tag) in einer placebokontrollierten Studie an 14.735 Patienten mit atherosklerotischen Vorerkrankungen wie koronarer Herzerkrankung, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und zerebrovaskulärer Vorerkrankung das kardiovaskuläre Risikoprofil untersucht. Es konnte eine Nicht-Unterlegenheit für Sitagliptin im Placebovergleich bestätigt werden. Die Rate an Hospitalisierung aufgrund einer sich verschlechternden Herzinsuffizienz war nicht erhöht.[65, 169]

In Metaanalysen zur Beurteilung der kardiovaskulären Sicherheit, unter Betrachtung der klinischen Endpunkte mit unter anderem: Kardiovaskulär bedingtes Versterben, Herzinfarkt, Schlaganfall und Krankenhauseinweisung aufgrund von Herzinsuffizienz, wurden neben der Klasse der DPP-4-I auch *SGLT-2-I* und *GLP-1* Rezeptoragonisten untersucht. Zur Einschätzung der DPP-4-I hinsichtlich der oben genannten Punkte wurden die großen *CVOTs* mit *SAVOR-TIMI*, *TECOS*, *EXAMINE*, aber auch für die beiden DPP-4-I Linagliptin und Omarigliptin, eingeschlossen. Die Autoren beschreiben aufgrund Ihrer Ergebnisse einen neutralen Effekt der DPP-4-I Therapie bezüglich der Endpunkte Herzinfarkt, Schlaganfall, sowie für kardiovaskulär bedingtes Versterben und den kombinierten Endpunkte Herzinfarkt und Schlaganfall. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die Gruppe der DPP-4-I als sicheres OAD in der Therapie des DMT2 bei Patienten mit Herzinsuffizienz zu bewerten ist. Lediglich Saxagliptin scheint, wie oben bereits diskutiert, einen spezifischen Einfluss auf Herzinsuffizienz zu nehmen. Für die Klasse der *SGLT-2-I* mit Canagliflozin, Dapagliflozin und Empagliflozin, wurde unter Berücksichtigung dreier *CVOTs*, ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der kardiovaskulären Sicherheit für diese Wirkstoffgruppe gezeigt. Allerdings kommt es unter dem Einsatz dieses OAD zu einer signifikanten Reduktion der Hospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienz gegenüber eines Placebos. Interessanterweise wird für die Gruppe der *GLP-1* Rezeptoragonisten eine Reduktion der atherosklerotisch bedingten kardiovaskulären Endpunkte Herzinfarkt, Schlaganfall, sowie dem zusammengesetzten Endpunkt aus beiden

4. Diskussion

und kardiovaskulär bedingtes Versterben beschrieben. Die Rate an Herzinsuffizienz hingegen scheint nicht beeinflusst unter einer Therapie GLP-1 Rezeptoragonisten.[170-172]

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die der diskutierten Literatur liefern Erkenntnisse und Ansätze, die in weiteren Studien näher analysiert werden sollten. Dabei sollten die oben beschriebenen Unterschiede zwischen den verschiedenen Vertretern der Klasse der DPP-4-I und vor allem ein vergleichender Ansatz zu geschlechtsspezifischen Unterschieden für das männliche und weibliche Geschlecht, auch im Menschen, weiterhin von Interesse sein und in klinischen Studien untersucht werden.

4.3 Ausblick und Limitierung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen unterschiedliche Ergebnisse unter Sitagliptin- und Saxagliptinbehandlung auf Atherogenese und Atheroprogression im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen *Ldlr^{-/-}* Mäusen auf. Metabolische Parameter, wie Gewicht, Körperfettgehalt und Blutzucker blieben in den weiblichen Tieren weitgehend unbeeinflusst. Somit kann zumindest bei Weibchen aufgrund weitgehend fehlender Beeinflussung der metabolischen Parameter durch Sitagliptin und Saxagliptin von einem blutzuckerunabhängigen Effekt der DPP-4-I auf Atherogenese und zelluläre Komposition der atherosklerotischen Plaques ausgegangen werden. In Männchen wurde für beide untersuchte DPP-4-I Senkungen der Blutglukose im oGTT und eine Reduktion des Körperfettgehalts unter Sitagliptintherapie beobachtet. Die metabolischen Auswirkungen in den männlichen Versuchstieren spiegeln sich dabei möglicherweise in einer geringeren Plaquelast und der zellulären Komposition der atherosklerotischen Plaques wider.

Dabei ist zu beachten, dass der Prozess der Atherogenese selbst von sehr vielen Faktoren abhängig ist und hoch spezifische Effekte beobachtet werden können. Unterschiede des genetischen Hintergrunds der Versuchstiere, Geschlechts, der verabreichten Diät und des Untersuchungszeitpunktes nehmen Einfluss auf die Ergebnisse und können durch Schwankungen die Vergleichbarkeit erschweren. Darüber hinaus erscheint die Durchführung der genannten Untersuchungen in größeren Gruppen sinnvoll, um mögliche Unterschiede besser detektieren und Trends zwischen den Geschlechtern und Substanzen belegen zu können. Zu den unterschiedlichen Auswirkungen der DPP-4-I Therapie mit Sitagliptin und Saxagliptin im männlichen und weiblichen Geschlecht, vor allem mit Fokussierung auf deren kardiovaskuläres Sicherheitsprofil und Atherosklerose, gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine vergleichenden Arbeiten. Unabhängig davon zeigt diese Arbeit die sehr heterogene

4. Diskussion

Studienlage, sowohl in Tiermodellen als auch in Patienten zur Auswirkung der DPP-4-I auf Atherosklerose und deren kardiovaskuläre Sicherheit, auf.

Weitere Studien zur Untersuchung des unterschiedlichen Wirkungsprofils der beiden Substanzen und direkte Vergleiche zwischen den Geschlechtern sind notwendig, um das kardiovaskuläre Risikoprofil dieser Medikamente besser stratifizieren zu können.

Darüber hinaus ist unklar, ob die hier beschriebenen Effekte auf die atherosklerotischen Plaques und deren Zusammensetzung aus dem Tiermodell auf den Menschen zu übertragen sind und wie sich diese unter einer typischen Polypharmazie, eines beispielsweise von koronarer Herzkrankheit betroffenen Diabetikers, verhalten.

5. Schlussfolgerung

Die Therapie des DMT2 mit den neueren OADs Sitagliptin und Saxagliptin stellt im klinischen Alltag eine gute und sichere Behandlungsoption der Erkrankung bei einem niedrigem Hypoglykämierisiko dar.[65, 66, 173] Hinsichtlich des kardiovaskulären Risikoprofils der beiden Substanzen konnte in den in großen klinischen Studien mit *SAVOR-TIMI* für Saxagliptin und *TECOS* für Sitagliptin lediglich eine Nicht-Unterlegenheit gegenüber eines Placebos gezeigt werden, eine wohlmöglich erhöhte Rate an Hospitalisierungen unter Saxagliptin aufgrund einer sich verschlechternden Herzinsuffizienz bleibt kritisch zu beurteilen.[65, 66, 170-172, 174] Die Studienlage bezüglich des kardiovaskulären Risikoprofils, respektive der Atherogenese und zellulärer Komposition atherosklerotischer Plaques in den oben diskutierten Tierstudien ist bezüglich des Designs und der Ergebnisse sehr heterogen.[141, 148-150] Dabei ist nicht eindeutig, welches Geschlecht, Tiermodell oder welcher genetische Hintergrund für die Untersuchung der Atherogenese, Atheroprogression und zellulärer Komposition unter DPP-4-I Therapie am besten geeignet ist. Es wurden darüber hinaus verschiedene Dosierungen der DPP-4-I, in der Regel in einem supra-therapeutischen Bereich, verwendet.

Diese Arbeit untersucht, neben der Gegenüberstellung der DPP-4-I Sitagliptin und Saxagliptin, einen bisher nicht vorhandenen, direkten Vergleich der Substanzen zwischen den Geschlechtern in einem *Ldlr^{-/-}* Mausmodell. Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, dass die beiden Substanzen unterschiedliche Effekte auf metabolische Parameter und Atherogenese, respektive der zellulären Komposition atherosklerotischer Plaques, in den Geschlechtern aufweisen. Diese Effekte zeigten sich unabhängig der im Plasma gemessenen DPP-4 Aktivität der Mäuse, zumal beide Substanzen eine vergleichbare, signifikante Reduktion der DPP-4 Aktivität gegenüber der DD Kontrollgruppe zeigten. Das Körpergewicht und der Nüchternblutzucker waren vergleichbar zwischen den Geschlechtern. Ein blutzuckersenkender Effekt während des oGTT konnte zu verschiedenen Zeitpunkten nur in der männlichen Kohorte unter den beiden DPP-4-I, nicht aber in der weiblichen Versuchsgruppe bestimmt werden. Weiterhin nimmt Sitagliptin in der männlichen Kohorte der *Ldlr^{-/-}* Tiere einen positiven Einfluss auf den Körperfettgehalt und wirkt sich nicht steigernd auf den aortalen Plaquescore aus, wohingegen dieser Effekt in den Aorten unter Saxagliptin nicht mehr zu beobachten ist. Bei einer erhöhten Anzahl von Makrophagen im aortalen Ursprung in der männlichen Sitagliptinkohorte zeigten sich der Biglykangehalt und der Kollagengehalt in der gesamten männlichen Kohorte gegenüber den Weibchen (DD, Sitagliptin, Saxagliptin)

5. Schlussfolgerung

vermindert. Der Hyaluronsäuregehalt war unter DPP-4-I Therapie vergleichbar zwischen den Geschlechtern. Die Menge an dicht gepackten, stabilen Kollagenfasern und die Plauefläche war in den Männchen unter DPP-4-I Therapie gegenüber der weiblichen Kohorte signifikant reduziert. Die größeren aortalen Plaques der weiblichen Tiere wiesen dagegen einen geringeren Inflamationsanteil bei einem gleichzeitig höheren Gehalt an Biglykan, Kollagen und dicht gepacktem Kollagen. Die Komposition der atherosklerotischen Läsionen im aortalen Ursprung der weiblichen Mäuse spricht daher für stabilere Plaques als in der männlichen Kohorte.[145, 153, 154] Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Modulation der Atherogenese und die Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques unter DPP-4-I Therapie einen klinischen Einfluss auf die Rupturgefahr der Plaques und damit an thrombembolischen Events, mit einem verminderten Risiko in der weiblichen Kohorte, aufweist.[151, 152] Dieser Effekt scheint darüber hinaus unabhängig einer Regulation des Blutzuckers vorzuliegen.

Unerwarteter Weise konnte unter Verabreichung von Saxagliptin eine erhöhte Plaquelast in den Aorten der männlichen Tiere und eine Reduktion des Gesamtkollagengehalts vergleichend zur DD Kohorte festgestellt werden. Ebenfalls wurde für Saxagliptin in den weiblichen Tieren mehr Plaques im aortalen Ursprung mit einem erhöhten Gehalt an dicht gepackten Kollagenfasern im Vergleich zu DD bestimmt. Dieser möglicherweise spezifische Effekt für Saxagliptin in der Verteilung und Komposition der Atherosklerose scheint ebenfalls unabhängig von metabolischen Parametern und der Blutzuckerregulation durch den eingesetzten DPP-4-I aufzutreten. Diese Beobachtung lässt sich dadurch begründen, dass durch beide DPP-4-I in den Männchen eine vergleichende Blutzuckersenkung gegenüber der DD Kohorte im oGTT vorlag. In der weiblichen Kohorte hingegen blieb dieser Effekt für Sitagliptin und Saxagliptin gleichermaßen aus.

In dieser Arbeit mit einem *Ldlr^{-/-}* Mausmodell wurde gezeigt, dass die beiden untersuchten DPP-4-I Sitagliptin und Saxagliptin in Abhängigkeit des Geschlechts unterschiedlich starke Auswirkung auf den Metabolismus und die Atherogenese, respektive der zellulären Komposition der atherosklerotischen Plaques, nehmen. Des Weiteren konnten substanzspezifische Effekte vergleichend zur DD Kontrollgruppe festgestellt werden.

Zur endgültigen Klärung der Auswirkung einer DMT2 Behandlung mit Sitagliptin und Saxagliptin auf den Metabolismus, das kardiovaskuläre System und Atherosklerose sind jedoch weitere Untersuchungen in größeren Kollektiven mit einem direkten Vergleich der Substanzen und deren Wirkung in den Geschlechtern notwendig. Darüber hinaus sollten klinische Studien die Relevanz im Menschen untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium., 2017.
2. Kerner, W., J. Bruckel, and A. German Diabetes, *Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014. 122(7): p. 384-6.
3. American Diabetes, A., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2014. 37 Suppl 1: p. S81-90.
4. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. 15(7): p. 539-53.
5. Cersosimo, E., et al., *Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
6. Kahn, S.E., M.E. Cooper, and S. Del Prato, *Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future*. Lancet, 2014. 383(9922): p. 1068-83.
7. Pippitt, K., M. Li, and H.E. Gurgle, *Diabetes Mellitus: Screening and Diagnosis*. Am Fam Physician, 2016. 93(2): p. 103-9.
8. Bundesärztekammer (BÄK), K.r.B.K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). *Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. Version 4. 2013, zuletzt geändert: November 2014. Available from: www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de; [cited: 24.01.2018]; DOI: 10.6101/AZQ/000213.*
9. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W. Michels, *Type 1 diabetes*. Lancet, 2014. 383(9911): p. 69-82.
10. Hemmingsen, B., et al., *Diet, physical activity or both for prevention or delay of type 2 diabetes mellitus and its associated complications in people at increased risk of developing type 2 diabetes mellitus*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. 12: p. CD003054.
11. Saenz, A., et al., *Metformin monotherapy for type 2 diabetes mellitus*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(3): p. CD002966.

Literaturverzeichnis

12. Gross, J.L., et al., *Effect of antihyperglycemic agents added to metformin and a sulfonylurea on glycemic control and weight gain in type 2 diabetes: a network meta-analysis*. Ann Intern Med, 2011. 154(10): p. 672-9.
13. McIntosh, B., et al., *Second-line therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin monotherapy: a systematic review and mixed-treatment comparison meta-analysis*. Open Med, 2011. 5(1): p. e35-48.
14. Monami, M., et al., *Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010. 20(4): p. 224-35.
15. Charbonnel, B., et al., *Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone*. Diabetes Care, 2006. 29(12): p. 2638-43.
16. Amori, R.E., J. Lau, and A.G. Pittas, *Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2007. 298(2): p. 194-206.
17. Jeon, C.Y. and M.B. Murray, *Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies*. PLoS Med, 2008. 5(7): p. e152.
18. Roy, T. and C.E. Lloyd, *Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review*. J Affect Disord, 2012. 142 Suppl: p. S8-21.
19. Carstensen, B., M.E. Jorgensen, and S. Friis, *The epidemiology of diabetes and cancer*. Curr Diab Rep, 2014. 14(10): p. 535.
20. Cade, W.T., *Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting*. Phys Ther, 2008. 88(11): p. 1322-35.
21. Danaei, G., et al., *Global and regional mortality from ischaemic heart disease and stroke attributable to higher-than-optimum blood glucose concentration: comparative risk assessment*. Lancet, 2006. 368(9548): p. 1651-9.
22. Emerging Risk Factors, C., et al., *Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies*. Lancet, 2010. 375(9733): p. 2215-22.
23. Shah, A.D., et al., *Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. 3(2): p. 105-13.
24. Winell, K., et al., *Trends in population attributable fraction of acute coronary syndrome and ischaemic stroke due to diabetes in Finland*. Diabetologia, 2011. 54(11): p. 2789-94.

Literaturverzeichnis

25. Williams, E.D., et al., *Risk of cardiovascular and all-cause mortality: impact of impaired health-related functioning and diabetes: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle (AusDiab) study*. Diabetes Care, 2012. 35(5): p. 1067-73.
26. Haffner, S.M., et al., *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. 339(4): p. 229-34.
27. Hansson, G.K., A.K. Robertson, and C. Soderberg-Naucler, *Inflammation and atherosclerosis*. Annu Rev Pathol, 2006. 1: p. 297-329.
28. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. 105(9): p. 1135-43.
29. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. 109(23 Suppl 1): p. III27-32.
30. Singh, R., S. Devi, and R. Gollen, *Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life*. Diabetes Metab Res Rev, 2015. 31(2): p. 113-26.
31. Giacco, F. and M. Brownlee, *Oxidative stress and diabetic complications*. Circ Res, 2010. 107(9): p. 1058-70.
32. Zeadin, M.G., C.I. Petlura, and G.H. Werstuck, *Molecular mechanisms linking diabetes to the accelerated development of atherosclerosis*. Can J Diabetes, 2013. 37(5): p. 345-50.
33. Chapman, M.J. and A.C. Sposito, *Hypertension and dyslipidaemia in obesity and insulin resistance: pathophysiology, impact on atherosclerotic disease and pharmacotherapy*. Pharmacol Ther, 2008. 117(3): p. 354-73.
34. Hansson, G.K., *Inflammatory mechanisms in atherosclerosis*. J Thromb Haemost, 2009. 7 Suppl 1: p. 328-31.
35. Skalen, K., et al., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. Nature, 2002. 417(6890): p. 750-4.
36. Shih, P.T., et al., *Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating beta1 integrin*. J Clin Invest, 1999. 103(5): p. 613-25.
37. Yan, Z.Q. and G.K. Hansson, *Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis*. Immunol Rev, 2007. 219: p. 187-203.

Literaturverzeichnis

38. Allahverdian, S., et al., *Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis*. *Circulation*, 2014. 129(15): p. 1551-9.
39. Robertson, A.K. and G.K. Hansson, *T cells in atherogenesis: for better or for worse?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(11): p. 2421-32.
40. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 801-9.
41. Faggiotto, A. and R. Ross, *Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque*. *Arteriosclerosis*, 1984. 4(4): p. 341-56.
42. Masuda, J. and R. Ross, *Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation*. *Arteriosclerosis*, 1990. 10(2): p. 164-77.
43. Masuda, J. and R. Ross, *Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque*. *Arteriosclerosis*, 1990. 10(2): p. 178-87.
44. Schaefer, L., et al., *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages*. *J Clin Invest*, 2005. 115(8): p. 2223-33.
45. Raines, E.W. and N. Ferri, *Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease*. *J Lipid Res*, 2005. 46(6): p. 1081-92.
46. Finet, G., et al., *Morphological and biomechanical aspects of vulnerable coronary plaque*. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2007. 100(6-7): p. 547-53.
47. Shah, P.K., et al., *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. 92(6): p. 1565-9.
48. Santos-Gallego, C.G., B. Picatoste, and J.J. Badimon, *Pathophysiology of acute coronary syndrome*. *Curr Atheroscler Rep*, 2014. 16(4): p. 401.
49. Saleh Al-Shehabi, T., R. Iratni, and A.H. Eid, *Anti-atherosclerotic plants which modulate the phenotype of vascular smooth muscle cells*. *Phytomedicine*, 2016. 23(11): p. 1068-81.
50. Hanefeld, M., et al., *[Metabolic syndrome: "common soil" for diabetes and atherosclerosis. Novel approaches to an integrated therapy]*. *Herz*, 2006. 31(3): p. 246-54; quiz 255.

Literaturverzeichnis

51. Tian, J., et al., *Effect of statin therapy on the progression of coronary atherosclerosis*. BMC Cardiovasc Disord, 2012. 12: p. 70.
52. Kannel, W.B. and D.L. McGee, *Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study*. JAMA, 1979. 241(19): p. 2035-8.
53. Stamler, J., et al., *Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial*. Diabetes Care, 1993. 16(2): p. 434-44.
54. Matheus, A.S., et al., *Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update*. Int J Hypertens, 2013. 2013: p. 653789.
55. Laing, S.P., et al., *Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes*. Diabetologia, 2003. 46(6): p. 760-5.
56. Schernthaner, G., *Cardiovascular mortality and morbidity in type-2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 1996. 31 Suppl: p. S3-13.
57. Booth, G.L., et al., *Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study*. Lancet, 2006. 368(9529): p. 29-36.
58. *International Diabetes Federation. Diabetes and cardiovascular disease. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2016.*
59. *Food and Drug Administration. Guidance for Industry Diabetes Mellitus — Evaluating Cardiovascular Risk in New Antidiabetic Therapies to Treat Type 2 Diabetes 2008; Zugriffsdatum: 21. Februar 2018.*
60. Schernthaner, G., et al., *Advances in the management of cardiovascular risk for patients with type 2 diabetes: perspectives from the Academy for Cardiovascular Risk, Outcomes and Safety Studies in Type 2 Diabetes*. Ther Clin Risk Manag, 2017. 13: p. 69-79.
61. *European Medicines Agency. Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment or prevention of diabetes mellitus. 2012; Zugriffsdatum: 21. Februar 2018.*
62. Schernthaner, G., et al., *Relevance of positive cardiovascular outcome trial results in clinical practice: perspectives from the Academy for Cardiovascular Risk, Outcomes and Safety Studies in Type 2 Diabetes (ACROSS T2D)*. Ther Clin Risk Manag, 2017. 13: p. 1569-1576.
63. Zinman, B., et al., *Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2015. 373(22): p. 2117-28.

Literaturverzeichnis

64. Marso, S.P., et al., *Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2016. 375(4): p. 311-22.
65. Green, J.B., et al., *Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2015. 373(3): p. 232-42.
66. Scirica, B.M., et al., *Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2013. 369(14): p. 1317-26.
67. White, W.B., et al., *Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2013. 369(14): p. 1327-35.
68. Gallwitz, B. and S. Nitschmann, *[New antihyperglycemic drugs. Examination of cardiovascular outcomes with alogliptin versus standard of care (EXAMINE) and saxagliptin assessment of vascular outcomes recorded in patients with diabetes mellitus-thrombolysis in myocardial infarction (SAVOR-TIMI 53)]*. Internist (Berl), 2014. 55(7): p. 859-62.
69. Elrick, H., et al., *Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration*. J Clin Endocrinol Metab, 1964. 24: p. 1076-82.
70. McIntyre, N., C.D. Holdsworth, and D.S. Turner, *New Interpretation of Oral Glucose Tolerance*. Lancet, 1964. 2(7349): p. 20-1.
71. Baggio, L.L. and D.J. Drucker, *Biology of incretins: GLP-1 and GIP*. Gastroenterology, 2007. 132(6): p. 2131-57.
72. Martin, J.H., et al., *Incretin-based therapies--review of the physiology, pharmacology and emerging clinical experience*. Intern Med J, 2011. 41(4): p. 299-307.
73. Nauck, M.A., *Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications*. Am J Med, 2011. 124(1 Suppl): p. S3-18.
74. Nauck, M.A., et al., *Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(3): p. 1239-46.
75. Nauck, M.A., et al., *Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans*. Am J Physiol, 1997. 273(5 Pt 1): p. E981-8.
76. Deacon, C.F., et al., *Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects*. Diabetes, 1995. 44(9): p. 1126-31.

Literaturverzeichnis

77. Mortensen, K., et al., *GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine*. Regul Pept, 2003. 114(2-3): p. 189-96.
78. Jang, H.J., et al., *Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(38): p. 15069-74.
79. Brubaker, P.L., *The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1070: p. 10-26.
80. Mayo, K.E., et al., *International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family*. Pharmacol Rev, 2003. 55(1): p. 167-94.
81. Drucker, D.J., et al., *Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(10): p. 3434-8.
82. Mojssov, S., G.C. Weir, and J.F. Habener, *Insulintropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas*. J Clin Invest, 1987. 79(2): p. 616-9.
83. Hui, H., et al., *Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway*. Endocrinology, 2003. 144(4): p. 1444-55.
84. Buteau, J., et al., *Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity*. Diabetologia, 2004. 47(5): p. 806-15.
85. Kim, S.J., et al., *Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression*. J Biol Chem, 2005. 280(23): p. 22297-307.
86. Fehmann, H.C. and J.F. Habener, *Functional receptors for the insulintropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) on a somatostatin secreting cell line*. FEBS Lett, 1991. 279(2): p. 335-40.
87. Phillips, L.K. and J.B. Prins, *Update on incretin hormones*. Ann N Y Acad Sci, 2011. 1243: p. E55-74.
88. Wei, Y. and S. Mojssov, *Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences*. FEBS Lett, 1995. 358(3): p. 219-24.

Literaturverzeichnis

89. Nikolaidis, L.A., et al., *Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion*. *Circulation*, 2004. 109(8): p. 962-5.
90. Read, P.A., F.Z. Khan, and D.P. Dutka, *Cardioprotection against ischaemia induced by dobutamine stress using glucagon-like peptide-1 in patients with coronary artery disease*. *Heart*, 2012. 98(5): p. 408-13.
91. Sokos, G.G., et al., *Glucagon-like peptide-1 infusion improves left ventricular ejection fraction and functional status in patients with chronic heart failure*. *J Card Fail*, 2006. 12(9): p. 694-9.
92. Derosa, G., et al., *Exenatide versus glibenclamide in patients with diabetes*. *Diabetes Technol Ther*, 2010. 12(3): p. 233-40.
93. Arakawa, M., et al., *Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4*. *Diabetes*, 2010. 59(4): p. 1030-7.
94. Hopsu-Havu, V.K. and G.G. Glenner, *A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide*. *Histochemie*, 1966. 7(3): p. 197-201.
95. Fukasawa, K.M., et al., *Immunohistochemical localization of dipeptidyl aminopeptidase IV in rat kidney, liver, and salivary glands*. *J Histochem Cytochem*, 1981. 29(3): p. 337-43.
96. Deacon, C.F., *What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones?* *Regul Pept*, 2005. 128(2): p. 117-24.
97. Abbott, C.A., et al., *Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene*. *Immunogenetics*, 1994. 40(5): p. 331-8.
98. Ohnuma, K., et al., *CD26 up-regulates expression of CD86 on antigen-presenting cells by means of caveolin-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(39): p. 14186-91.
99. Ohnuma, K., et al., *Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1*. *J Biol Chem*, 2007. 282(13): p. 10117-31.
100. Engel, M., et al., *The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(9): p. 5063-8.
101. Busek, P., R. Malik, and A. Sedo, *Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(3): p. 408-21.

Literaturverzeichnis

102. Nagatsu, I., T. Nagatsu, and T. Yamamoto, *Hydrolysis of amino acid beta-naphthylamides by aminopeptidases in human parotid saliva and human serum*. *Experientia*, 1968. 24(4): p. 347-8.
103. Cordero, O.J., F.J. Salgado, and M. Nogueira, *On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. 58(11): p. 1723-47.
104. Mulvihill, E.E. and D.J. Drucker, *Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors*. *Endocr Rev*, 2014. 35(6): p. 992-1019.
105. Cordero, O.J., et al., *Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis*. *Rheumatol Int*, 2001. 21(2): p. 69-74.
106. Hegen, M., et al., *Enzymatic activity of CD26 (dipeptidylpeptidase IV) is not required for its signalling function in T cells*. *Immunobiology*, 1993. 189(5): p. 483-93.
107. Nemunaitis, J., et al., *Phase I trial of PT-100 (PT-100), a cytokine-inducing small molecule, following chemotherapy for solid tumor malignancy*. *Cancer Invest*, 2006. 24(6): p. 553-61.
108. Eager, R.M., et al., *Phase II trial of talabostat and docetaxel in advanced non-small cell lung cancer*. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2009. 21(6): p. 464-72.
109. Campbell, J.E. and D.J. Drucker, *Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action*. *Cell Metab*, 2013. 17(6): p. 819-37.
110. Kieffer, T.J., C.H. McIntosh, and R.A. Pederson, *Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV*. *Endocrinology*, 1995. 136(8): p. 3585-96.
111. Mentlein, R., B. Gallwitz, and W.E. Schmidt, *Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum*. *Eur J Biochem*, 1993. 214(3): p. 829-35.
112. Pauly, R.P., et al., *Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. A novel kinetic approach*. *J Biol Chem*, 1996. 271(38): p. 23222-9.
113. Balkan, B., et al., *Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with NVP-DPP728 increases plasma GLP-1 (7-36 amide) concentrations and improves oral glucose tolerance in obese Zucker rats*. *Diabetologia*, 1999. 42(11): p. 1324-31.

Literaturverzeichnis

114. Ahren, B., et al., *Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2002. 25(5): p. 869-75.
115. Ahren, B., et al., *Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(5): p. 2078-84.
116. Balas, B., et al., *The dipeptidyl peptidase IV inhibitor vildagliptin suppresses endogenous glucose production and enhances islet function after single-dose administration in type 2 diabetic patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(4): p. 1249-55.
117. Muscelli, E., et al., *Mechanisms for the antihyperglycemic effect of sitagliptin in patients with type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. 97(8): p. 2818-26.
118. Solis-Herrera, C., et al., *Mechanisms of glucose lowering of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin when used alone or with metformin in type 2 diabetes: a double-tracer study*. Diabetes Care, 2013. 36(9): p. 2756-62.
119. Inzucchi, S.E., et al., *Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes*. Diabetes Care, 2015. 38(1): p. 140-9.
120. Scheen, A.J., *A review of gliptins in 2011*. Expert Opin Pharmacother, 2012. 13(1): p. 81-99.
121. Scheen, A.J., *Safety of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for treating type 2 diabetes*. Expert Opin Drug Saf, 2015. 14(4): p. 505-24.
122. Lai, Y.J., et al., *Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors and the Risk of Acute Pancreatitis in Patients With Type 2 Diabetes in Taiwan: A Population-Based Cohort Study*. Medicine (Baltimore), 2015. 94(43): p. e1906.
123. Elashoff, M., et al., *Pancreatitis, pancreatic, and thyroid cancer with glucagon-like peptide-1-based therapies*. Gastroenterology, 2011. 141(1): p. 150-6.
124. DeVries, J.H. and J. Rosenstock, *DPP-4 Inhibitor-Related Pancreatitis: Rare but Real!* Diabetes Care, 2017. 40(2): p. 161-163.
125. Scheen, A.J., *The safety of gliptins : updated data in 2018*. Expert Opin Drug Saf, 2018.
126. Udell, J.A., et al., *Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and moderate or severe renal impairment: observations from the SAVOR-TIMI 53 Trial*. Diabetes Care, 2015. 38(4): p. 696-705.

Literaturverzeichnis

127. Cornel, J.H., et al., *Effect of Sitagliptin on Kidney Function and Respective Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes: Outcomes From TECOS*. Diabetes Care, 2016. 39(12): p. 2304-2310.
128. Mannucci, E. and M. Monami, *Cardiovascular Safety of Incretin-Based Therapies in Type 2 Diabetes: Systematic Review of Integrated Analyses and Randomized Controlled Trials*. Adv Ther, 2017. 34(1): p. 1-40.
129. Wang, F., et al., *Combination therapy of metformin plus dipeptidyl peptidase-4 inhibitor versus metformin plus sulfonylurea and their association with a decreased risk of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus patients*. Medicine (Baltimore), 2017. 96(36): p. e7638.
130. El-Bagary, R.I., E.F. Elkady, and B.M. Ayoub, *Spectrophotometric methods based on charge transfer complexation reactions for the determination of saxagliptin in bulk and pharmaceutical preparation*. Int J Biomed Sci, 2012. 8(3): p. 204-8.
131. El-Bagary, R.I., E.F. Elkady, and B.M. Ayoub, *Spectrophotometric methods for the determination of sitagliptin and vildagliptin in bulk and dosage forms*. Int J Biomed Sci, 2011. 7(1): p. 55-61.
132. Marathe, P.H., H.X. Gao, and K.L. Close, *American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes 2017*. J Diabetes, 2017. 9(4): p. 320-324.
133. Scheen, A.J., *SGLT2 Inhibitors: Benefit/Risk Balance*. Curr Diab Rep, 2016. 16(10): p. 92.
134. Ishibashi, S., et al., *Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery*. J Clin Invest, 1993. 92(2): p. 883-93.
135. Kohlmorgen, C., *Untersuchung des Einflusses des Natrium-Glukose-Cotransporter-2-Inhibitors Dapagliflozin auf die Atherogenese im Mausmodell der diätinduzierten Insulinresistenz*, in *Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*. 2017, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf.
136. Puchtler, H., F.S. Waldrop, and L.S. Valentine, *Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA*. Beitr Pathol, 1973. 150(2): p. 174-87.
137. *Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34)*. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet, 1998. 352(9131): p. 854-65.

Literaturverzeichnis

138. Lau, D.C. and H. Teoh, *Impact of Current and Emerging Glucose-Lowering Drugs on Body Weight in Type 2 Diabetes*. Can J Diabetes, 2015. 39 Suppl 5: p. S148-54.
139. Lind, M., *Incretin therapy and its effect on body weight in patients with diabetes*. Prim Care Diabetes, 2012. 6(3): p. 187-91.
140. Ahren, B. and J.E. Foley, *Improved glucose regulation in type 2 diabetic patients with DPP-4 inhibitors: focus on alpha and beta cell function and lipid metabolism*. Diabetologia, 2016. 59(5): p. 907-17.
141. Matsubara, J., et al., *A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice*. J Am Coll Cardiol, 2012. 59(3): p. 265-76.
142. Getz, G.S. and C.A. Reardon, *Animal models of atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. 32(5): p. 1104-15.
143. Teupser, D., A.D. Persky, and J.L. Breslow, *Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. 23(10): p. 1907-13.
144. Mansukhani, N.A., et al., *Sex Differences in the LDL Receptor Knockout Mouse Model of Atherosclerosis*. Artery Res, 2017. 20: p. 8-11.
145. Iozzo, R.V., *The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1997. 32(2): p. 141-74.
146. Nakashima, Y., T.N. Wight, and K. Sueishi, *Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans*. Cardiovasc Res, 2008. 79(1): p. 14-23.
147. Nakashima, Y., et al., *Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27(5): p. 1159-65.
148. Shah, Z., et al., *Long-term dipeptidyl-peptidase 4 inhibition reduces atherosclerosis and inflammation via effects on monocyte recruitment and chemotaxis*. Circulation, 2011. 124(21): p. 2338-49.
149. Vittone, F., et al., *Sitagliptin reduces plaque macrophage content and stabilises arteriosclerotic lesions in ApoE (-/-) mice*. Diabetologia, 2012. 55(8): p. 2267-75.
150. Zeng, Y., et al., *The DPP-4 inhibitor sitagliptin attenuates the progress of atherosclerosis in apolipoprotein-E-knockout mice via AMPK- and MAPK-dependent mechanisms*. Cardiovasc Diabetol, 2014. 13: p. 32.

Literaturverzeichnis

151. Falk, E., *Why do plaques rupture?* Circulation, 1992. 86(6 Suppl): p. III30-42.
152. Kolodgie, F.D., et al., *Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. 22(10): p. 1642-8.
153. Heegaard, A.M., et al., *Biglycan deficiency causes spontaneous aortic dissection and rupture in mice.* Circulation, 2007. 115(21): p. 2731-8.
154. Theocharis, A.D. and N.K. Karamanos, *Decreased biglycan expression and differential decorin localization in human abdominal aortic aneurysms.* Atherosclerosis, 2002. 165(2): p. 221-30.
155. Grandoch, M., et al., *Loss of Biglycan Enhances Thrombin Generation in Apolipoprotein E-Deficient Mice: Implications for Inflammation and Atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. 36(5): p. e41-50.
156. Zeng, X., et al., *Endostatin binds biglycan and LDL and interferes with LDL retention to the subendothelial matrix during atherosclerosis.* J Lipid Res, 2005. 46(9): p. 1849-59.
157. Ameye, L. and M.F. Young, *Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases.* Glycobiology, 2002. 12(9): p. 107R-16R.
158. Homann, S., et al., *Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession.* Matrix Biol, 2018. 66: p. 67-80.
159. Grandoch, M., P.L. Bollyky, and J.W. Fischer, *Hyaluronan: A Master Switch Between Vascular Homeostasis and Inflammation.* Circ Res, 2018. 122(10): p. 1341-1343.
160. Nagy, N., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis.* Circulation, 2010. 122(22): p. 2313-22.
161. Ou, H.T., et al., *Risks of cardiovascular diseases associated with dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and other antidiabetic drugs in patients with type 2 diabetes: a nation-wide longitudinal study.* Cardiovasc Diabetol, 2016. 15: p. 41.
162. Kankanala, S.R., et al., *Cardiovascular safety of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: recent evidence on heart failure.* Am J Transl Res, 2016. 8(5): p. 2450-8.
163. Son, J.W. and S. Kim, *Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors and the Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes: A Tale of Three Studies.* Diabetes Metab J, 2015. 39(5): p. 373-83.

164. Secret, M.H., J.A. Udell, and K.B. Filion, *The cardiovascular safety trials of DPP-4 inhibitors, GLP-1 agonists, and SGLT2 inhibitors*. Trends Cardiovasc Med, 2017. 27(3): p. 194-202.
165. Kuramitsu, S., et al., *Effect of sitagliptin on plaque changes in coronary artery following acute coronary syndrome in diabetic patients: The ESPECIAL-ACS study*. J Cardiol, 2017. 69(1): p. 369-376.
166. Oyama, J., et al., *The Effect of Sitagliptin on Carotid Artery Atherosclerosis in Type 2 Diabetes: The PROLOGUE Randomized Controlled Trial*. PLoS Med, 2016. 13(6): p. e1002051.
167. Tanaka, A., et al., *Differential effect of concomitant antidiabetic agents on carotid atherosclerosis: a subgroup analysis of the PROLOGUE study*. Heart Vessels, 2019. 34(2): p. 375-384.
168. Rosenstock, J., et al., *Effect of Linagliptin vs Placebo on Major Cardiovascular Events in Adults With Type 2 Diabetes and High Cardiovascular and Renal Risk: The CARMELINA Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2019. 321(1): p. 69-79.
169. Bethel, M.A., et al., *Regional, age and sex differences in baseline characteristics of patients enrolled in the Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin (TECOS)*. Diabetes Obes Metab, 2015. 17(4): p. 395-402.
170. Sinha, B. and S. Ghosal, *Meta-analyses of the effects of DPP-4 inhibitors, SGLT2 inhibitors and GLP1 receptor analogues on cardiovascular death, myocardial infarction, stroke and hospitalization for heart failure*. Diabetes Res Clin Pract, 2019. 150: p. 8-16.
171. Alfayez, O.M., et al., *Network meta-analysis of nine large cardiovascular outcome trials of new antidiabetic drugs*. Prim Care Diabetes, 2019. 13(3): p. 204-211.
172. Home, P., *Cardiovascular outcome trials of glucose-lowering medications: an update*. Diabetologia, 2019. 62(3): p. 357-369.
173. Ervinna, N., et al., *Anagliptin, a DPP-4 inhibitor, suppresses proliferation of vascular smooth muscles and monocyte inflammatory reaction and attenuates atherosclerosis in male apo E-deficient mice*. Endocrinology, 2013. 154(3): p. 1260-70.
174. Ahren, B., *DPP-4 Inhibition and the Path to Clinical Proof*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. 10: p. 376.

Anhang

Anmerkung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Projekts „Untersuchung des kardiovaskulären Nutzen- / Risiko-Verhältnisses von DPP-4- Inhibitoren im Vergleich zu Exenatid und Metformin – Antidiabetika und Atherothrombose“ des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie unterstützt durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM).