

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

# **Exenatid induzierte Kardioprotektion bei Mäusen mit Diät-induzierter Adipositas**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Leonard Baensch

2025

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. med. Lisa Kristina Dannenberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock

***Für die wichtigsten Menschen in meinem Leben.***

## **Hinweise zur Erstellung der Dissertation**

### Genderklausel

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit auf eine geschlechterspezifische Differenzierung verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

### Hinweis zur Nutzung von KI-Tools

Für die Erstellung dieser Dissertation wurden die KI-gestützten Tools ChatGPT und DeepL zur Unterstützung bei Formulierungen und sprachlicher Überarbeitung eingesetzt. Der wissenschaftliche Inhalt, die Datenerhebung sowie sämtliche Analysen und Schlussfolgerungen stammen jedoch ausschließlich von dem Autor selbst.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

**Posterpräsentation DGK Jahrestagung 2023** – „*Exenatide treatment improves cardiac diastolic dysfunction in diet induced obesity and increases GLUT4 expression and mitochondrial respiration*“: Khatereh Shahjerdi<sup>1\*</sup>, **Leonard Baensch<sup>1\*</sup>**, Jessica Weber<sup>1</sup>, Süreyya Saffak<sup>1</sup>, Aylin Celik<sup>1</sup>, Julia Kielb<sup>1</sup>, Silvana Glugla<sup>1</sup>, Hao Hu<sup>1</sup>, Marcel Benkhoff<sup>1</sup>, Alexander Lang<sup>1</sup>, Oscar Chavez-Talavera<sup>1</sup>, Amin Polzin<sup>1</sup>, Tobias Zeus<sup>1</sup>, Malte Kelm<sup>1</sup>, Bodo Levkau<sup>2</sup>, Sarah Weske<sup>2</sup>, Lisa Dannenberg<sup>1</sup>

**Posterpräsentation DGK Herbsttage 2024** – „*Exenatide Treatment improves functional post-ischemic outcome in mice with diet induced obesity without infarct size reduction*“: Aylin Celik<sup>1\*</sup>, **Leonard Baensch<sup>1\*</sup>**, Khatereh Shahjerdi<sup>1</sup>, Jessica Weber<sup>1</sup>, Süreyya Saffak<sup>1</sup>, Julia Kielb<sup>1</sup>, Sally Riek<sup>1</sup>, Nora Farahat<sup>1</sup>, Oscar Chavez-Talavera<sup>1</sup>, Hao Hu<sup>1</sup>, Marcel Benkhoff<sup>1</sup>, Amin Polzin<sup>1</sup>, Tobias Zeus<sup>1</sup>, Malte Kelm<sup>1</sup>, Bodo Levkau<sup>2</sup>, Sarah Weske<sup>2#</sup>, Lisa Dannenberg<sup>1#</sup>

**Symposium des Sonderforschungsbereiches SFB1116, Projekt B11:** „*Exenatide treatment in diabetic acute myocardial infarction*“: **Leonard Baensch**, Lisa Dannenberg

## Zusammenfassung

*Glucagon-like Peptide-1*-Rezeptor-Agonisten (GLP1-RA) stellen eine fest etablierte Therapieoption für den Typ-2-Diabetes mellitus (T2D) dar und nehmen in der modernen medizinischen Versorgung eine zunehmende Rolle ein. Vorläufige Studien deuten darauf hin, dass der kurz wirksame GLP1-Agonist Exenatid (Exe) die Infarktgröße (IS) unter nicht-diabetischen Bedingungen verringern kann. Diese Wirkung wird mit einer Hochregulierung der Translokation des Glukose-Transporters (GLUT) 4 in Verbindung gebracht. Diese Dissertation befasst sich mit den potenziellen Vorteilen von Exe bei der Abschwächung von Diabetes-induziertem Herzversagen und der Verbesserung der post-ischämischen Erholung unter diabetischen Bedingungen. Es werden die Auswirkungen einer Exe-Behandlung im *murinen* Tiermodell mit diätetischer Adipositas (DIO) sowohl *in-vivo* als auch *ex-vivo* untersucht. Zu diesem Zweck wurden über einen Zeitraum von 24 Wochen Versuchstiere an einer fett- und zuckerreichen Diät untersucht, wobei nach 16 Wochen zusätzlich die Verabreichung von Exe an jedem zweiten Tag über insgesamt acht Wochen erfolgte. Im Anschluss wurde eine Ischämie/Reperfusion (I/R), bestehend aus einer 30-minütigen Ischämie, gefolgt von einer 24-stündigen Reperfusion, induziert. Dies wurde durch einen chirurgischen Verschluss und einer anschließenden Wiedereröffnung der linken anterioren absteigenden Koronararterie (LAD) realisiert. Die Herzfunktion wurde vor und nach der Ischämie mittels Echokardiographie untersucht. Während der *ex-vivo*-Ischämie wurden die explantierten Herzen mit dem Langendorff-System perfundiert und einer vierzigminütigen Ischämie gefolgt von einer zweistündigen Reperfusion unterzogen. Anschließend wurde die Infarktgröße und die funktionelle Erholung bewertet. Die Quantifizierung der GLUT1- und GLUT4-Proteinspiegel erfolgte mittels Western Blot-Analyse, während die Mitochondrienfunktion mittels dem OROBOROS® erfasst wurde.

Die Behandlung mit Exe führte bei DIO-Mäusen zu einer signifikanten Verbesserung der diastolischen Dysfunktion und zu einer verbesserten Herzfunktion nach Ischämie, unabhängig von der Reduktion der Infarktgröße. In vorausgegangenen Studien konnte zwar eine Reduktion der Infarktgröße beobachtet werden, jedoch wurden diese Versuche nicht im diabetischen Tiermodell durchgeführt

## Abstract

Glucagon-like peptide-1 receptor agonists (GLP1-RA) are a well-established therapeutic option the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2D) and are playing an increasing role in modern medical care. Preliminary studies have suggested that the short-acting GLP1 agonist exenatide (Exe) can reduce infarct size (IS) under non-diabetic conditions. This effect is hypothesized to be linked to an upregulation of glucose transporter (GLUT) 4 translocation. However, the potential benefits of Exe in mitigating diabetes-induced heart failure and improving post-ischemic recovery under diabetic conditions remain unexplored. This dissertation investigates the effects of Exe treatment in a murine model with diet-induced obesity (DIO), both *in-vivo* and *ex-vivo*. The experimental animals were subjected to a high-fat, high-sugar diet for 24 weeks, with Exe administration beginning after the sixteenth week and repeated every two days, for the next eight weeks. Ischemia/reperfusion (I/R) injury was established through 30 minutes of ischemia, succeeded by 24 hours of reperfusion. This was achieved through surgical occlusion and subsequent reopening of the left anterior descending coronary artery (LAD). Cardiac function was assessed via echocardiography before and after the induction of ischemia. During *ex-vivo* ischemia, explanted hearts were perfused using the Langendorff system, undergoing 40 minutes of ischemia, succeeding by two hours of reperfusion. Infarct size and functional recovery were then evaluated. Western blot analysis was used to quantify GLUT1 and GLUT4 protein levels, while mitochondrial function was assessed using the OROBOROS® system.

Exe treatment led to an improvement in diastolic dysfunction in DIO mice, and post-ischemic cardiac function was enhanced, independent of infarct size reduction. The findings of this study aligned with other animal research demonstrating improved cardiac function following treatment with Exe. Previous studies were able to show a reduction in infarct size, but these investigations were exclusively conducted in non-diabetic animal models.

## Abkürzungsverzeichnis

AAR = Area at risk

Akt = Ak strain transforming

AMPK = Adenosin-Monophosphate-Kinase

ATP = Adenosin-Triphosphat

Bpm = Beats per minute

KHK = Koronare Herzkrankheit

DIO = Diet induced obesity

CO = Cardiac output

DP = Derivate Pressure

DPmax = Derivate pressure maximum

DPmin = Derivate pressure minimum

EDV = Enddiastolisches Volumen

EF = Ejektionsfraktion

ESV = Endystolisches Volumen

Erk = Extracellular signal-regulated kinases

Exe = Exenatid

FCCP = Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

FS = Fractional shortening

GLP1 agonist = Glucagone-like-peptide-1 Rezeptor Agonist

GLUT = Glukose Transporter

GTT = Glukosetoleranztest

HD = Highdose

HF = Heart failure

HFpEF = Heart failure with preserved ejection fraction

HFD = High fat diet

HR = Heart rate

HWZ = Halbwertszeit

I.p. = Intraperitoneal

I/R = Ischemia Reperfusion

IS = Infarct Size

IVS;d = Intraventricular septum diameter

LAD = Left anterior descending coronary artery

LD = Lowdose

LV = Linker Ventrikel

M = Molarität

MI = Myokardinfarkt

MiR05 = Mitochondrial respiration medium

NCD = Normal chow diet

PED = Post-enddiastolischer Druck

PES = Post-endsystolischer Druck

PI3K = Phosphoinositid 3-Kinase

ROS = reactive oxygen species

SGLT2-Inhibitor = Natrium-Glucose-Transporter-2-Inhibitor

SV = Schlagvolumen

TTC = 2, 3, 5- Triphenyltetrazolium-Chlorid

T2D = Diabetes Mellitus Typ 2

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Diabetes Mellitus.....	1
1.1.1 Physiologische Grundlagen und die Wirkung von Insulin .....	3
1.1.2 Diabetes Mellitus als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen...	3
1.1.3 Diabetisches Mausmodell und GLUT4 .....	4
1.2 GLP1-Agonisten.....	6
1.2.1 Wirkweise von GLP1-Agonisten.....	6
1.2.2 GLP1-Agonisten zur Gewichtsreduktion .....	7
1.2.3 GLP1-Agonisten zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen	8
1.2.4 Der GLP-1 Agonist Exenatid .....	8
1.2.5 Exenatid bei einem Myokardinfarkt .....	9
1.3 Ziel dieser Arbeit.....	9
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Studiendesign.....	11
2.2 Genehmigung des Versuchsvorhabens .....	13
2.3 Versuchstiere, Zucht- und Haltungsbedingungen .....	13
2.3 Langendorff-Versuche .....	14
2.4 Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung.....	22
2.5 Glukosetoleranztest.....	26
2.6 Murine Echokardiographie.....	26
2.7 <i>In-Vivo</i> Operation: Ischämie und Reperfusion der LAD.....	29
2.8 OROBOROS-Analyse .....	32
2.9 Western Blot-Analyse .....	33
2.10 Statistik und Auswertungsprogramme .....	33
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
3.1 <i>Ex-Vivo</i> -Ergebnisse .....	35
3.1.1 Nicht-Diabetisches Mausmodell (NCD) .....	35
3.1.2 Diabetisches Mausmodell (DIO).....	37
3.2 <i>In-Vivo</i> -Ergebnisse .....	40
3.2.1. Basisdaten und Echokardiografie-Parameter vor MI .....	40
3.2.2 Echokardiografie-Parameter, Strain und Infarktgröße nach MI.....	44
3.3. Western Blot sowie OROBOROS-Ergebnisse.....	47
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>50</b>
4.1 Die Wirkung von Exenatid auf die diastolische Dysfunktion .....	50

---

4.1.1	Exenatidwirkung im Tiermodell.....	50
4.1.2	Exenatidwirkung im Menschen.....	52
4.2	Die postischämische Verbesserung der Herzfunktion durch Exenatid.....	53
4.2.1	Im Mausmodell.....	53
4.2.2	Im Menschen.....	54
4.3	Exenatidwirkung auf zellulärer Ebene.....	54
4.4	Limitationen der Dissertation.....	56
4.4.1	Das DIO-Mausmodell.....	56
4.4.2	Vergleichbarkeit von Maus und Mensch.....	57
4.4.3	Stichprobengröße.....	58
<b>5.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>59</b>
5.1	Die zukünftige Rolle von GLP1-Agonisten.....	59
5.1.1	GLP1-Agonisten zur Behandlung der Adipositas.....	59
5.1.2	GLP1-Agonisten zur Behandlung der Herzinsuffizienz.....	59
5.1.3	Die Rolle von Exenatid im Vergleich zu anderen GLP1-Agonisten.....	61
<b>6.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
	<b>Danksagung.....</b>	

## 1. Einleitung

Der Typ 2 Diabetes Mellitus (T2D) zeichnet sich als komplexes Krankheitsbild aus, welches durch eine gestörte Insulinsekretion sowie eine Insulinresistenz von insulin-sensitivem Gewebe gekennzeichnet ist<sup>1</sup>. Die Prävalenz von Herzerkrankungen ist unter Diabetikern erhöht: So zeigte eine Meta-Analyse aus 2010 ein deutlich erhöhtes *Hazard Ratio* für die koronare Herzkrankheit, den ischämischen Schlaganfall sowie andere vaskuläre Todesursachen bei Diabetikern<sup>2</sup>. Die Inzidenz von Herzinsuffizienz (HF) ist bei T2D-Patienten ebenfalls um ein Vielfaches erhöht<sup>3</sup>. So weisen in etwa 28% der T2D-Patienten eine HF auf, wobei die HF mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF) den Großteil der diabetischen HFs ausmacht<sup>4</sup>.

*Glucagon-like peptide* (GLP)-1-Rezeptoragonisten (GLP1-RAs) sind bewährte Medikamente für Patienten mit T2D und werden als Erstlinientherapie neben Metformin oder *SGLT2*-Inhibitoren (Natrium-Glukose-Transporter-2-Inhibitoren) empfohlen<sup>5</sup>. GLP-1-RAs konnten zeigen, dass sie das Auftreten kardiovaskulärer Endpunkte reduzieren und die Diabeteskontrolle bei Patienten mit T2D verbessern<sup>6</sup>. Einer der Hauptgründe für die hohe antidiabetische Wirksamkeit dieser Medikamentenklasse ist der Gewichtsverlust bei den behandelten Patienten<sup>7</sup>.

Es lässt sich jedoch ableiten, dass der Gewichtsverlust allein nicht der einzige Grund für eine Verbesserung der Herzfunktion zu sein scheint, sondern ebenfalls eine erhöhte Translokation von GLUT4 an die Zelloberfläche eine bessere Energieversorgung der Kardiomyozyten gewährleisten kann<sup>8</sup>.

### 1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus lässt laut des Fachausschusses für Berufspraxis der Amerikanischen Diabetesassoziation<sup>9</sup> sich in verschiedene Subformen kategorisieren: Klinisch werden hauptsächlich 4 Subtypen von Diabetes Mellitus differenziert. Der Typ-1-Diabetes beschreibt dabei eine absolute Insulinresistenz, welche in der Regel durch ein autoimmunes Geschehen ausgelöst wird und mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Kindheit

bzw. in der Jugend auftritt, wohingegen der Typ-2-Diabetes eine Insulinresistenz beschreibt, welche meist in einem späteren Lebensabschnitt auftritt und eng mit dem Lebensstil assoziiert wird. In die Klasse des Typ-3 Diabetes fallen verschiedene spezifische Subtypen, unter anderem Erkrankungen des exokrinen Pankreas, neonataler Diabetes, infektions-/oder medikamentenbedingter Diabetes sowie Altersdiabetes bei jungen Menschen (*maturity-onset diabetes of the young*; MODY). Der Typ-4-Diabetes wird klinisch als Gestationsdiabetes klassifiziert, welcher nach Austragung der Schwangerschaft in der Regel rückläufig ist, jedoch im weiteren Lebensverlauf ein erhöhtes Risiko besteht, an T2D zu erkranken<sup>9,10</sup>.

Um der Heterogenität der Krankheitsätiologie gerechter zu werden, sind in der Wissenschaft weitere Ansätze zur Einteilung des Diabetes Mellitus diskutiert, wie die Einteilung in fünf verschiedene Cluster: *Severe autoimmune diabetes* (SAID) – schwerer Autoimmundiabetes; *Severe insulin-deficient diabetes* (SIDD) – schwerer Insulinmangel-Diabetes; *Severe insulin-resistant diabetes* (SIRD) – schwerer insulinresistenter Diabetes; *Mild obesity-related diabetes* (MOD) – milder, mit Fettleibigkeit assoziierter Diabetes; sowie *Mild age-related diabetes* (MARD) – milder alters-assoziierter Diabetes<sup>11</sup>.

Laut einer Studie aus dem Jahr 2021 gilt der T2D gilt als Krankheit mit einer Prävalenz von 6,1%, was einer absoluten Zahl von 529 Millionen erkrankten Menschen entspricht. Die Autoren beschreiben zudem einen stetigen Anstieg der T2D-Prävalenz auf der ganzen Welt: Die Prognosen legen nahe, dass bis zum Jahr 2050 über 1,3 Milliarden Menschen an T2D erkrankt sein werden<sup>12</sup>.

Die T2D-Prävalenz in Deutschland liegt bei 9,5% (Stand 2015), wobei hier ein deutliches Gefälle zwischen West- und Ostdeutschland zu verzeichnen ist (11,5% in Ostdeutschland vs. 9% in Westdeutschland)<sup>13</sup>.

Ätiologisch gilt der T2D als multifaktoriell: Die Risikofaktoren des T2D lassen sich in nicht-modifizierbare Risikofaktoren (Alter, familiäre Disposition, Ethnie, stattgehabter Typ-3-Diabetes, Polyzystisches Ovar Syndrom) sowie modifizierbare Risikofaktoren (Übergewicht, körperliche Inaktivität, Metabolisches Syndrom, Ernährung, diabetogene Medikamente, Depression, niedriger sozioökonomischer Status und weitere) einteilen<sup>14</sup>.

### 1.1.1 Physiologische Grundlagen und die Wirkung von Insulin

Ursache des T2D stellt eine Insulinresistenz dar. Bei nicht-erkrankten Menschen gelangt das aus dem Pankreas ausgeschüttete Insulin über den Insulin Rezeptor an die jeweilige Zielzelle; dort wird über die Insulin-Rezeptor Substratproteine 1/2 (IRS1/2) die Lipidkinase PI3K und Akt (*Ak strain transforming*) ein Signal für multiple zelluläre Veränderungen ausgelöst, sodass vermehrt GLUT4 auf die Zelloberfläche transportiert wird<sup>15</sup>. Die GLUT4 ermöglichen nun eine Diffusion von Glukosemolekülen aus dem Blut in die Zielzelle, was sowohl eine Senkung des Blutzuckerspiegels als auch die Energieversorgung der Körperzellen gewährleistet<sup>16</sup>.

Die Translokation wird über die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Akt/Erk (Ak-Stamm transformierende/extrazelluläre signalregulierte Kinasen)<sup>17</sup> und Rac1/ROCK (Ras-verwandtes C3-Botulinumtoxin-Substrat 1/Rho-assoziierte Proteinkinase)<sup>18</sup> und RABs (Ras-verwandt im Gehirn)<sup>19</sup> vermittelt.

Mechanistisch wird der T2D aufgrund der bestehenden Insulinresistenz mit einer verringerten Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) in Verbindung gebracht<sup>17</sup>. Laut Szablewski<sup>8</sup> stellt der GLUT4 ebenfalls den entscheidenden Glukosetransporter in Kardiomyozyten für die Glukoseaufnahme und Glykolyse im erwachsenen Herzen dar: Unter normalen Bedingungen erzeugen Kardiomyozyten ihre Energie hauptsächlich durch den Verbrauch freier Fettsäuren und nur zu einem geringen Teil durch den Glukosestoffwechsel. Unter ischämischen Bedingungen steigt jedoch die Bedeutung der Glykolyse und der GLUT4-Oberfläche, was eine substratabhängige Energieerzeugung ermöglicht<sup>8</sup>.

### 1.1.2 Diabetes Mellitus als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen

Die Insulinresistenz im nicht therapierten T2D führt zu Hyperinsulinämie, Inflammation, Adipokinausschüttung sowie Dyslipidämie, was eine Tumorentstehung, -progression oder -metastasierung sowie Erkrankungen der Leber zur Folge haben kann<sup>20</sup>. Als wichtige Komorbidität des T2D sind jedoch vor allem Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems zu nennen (*Cardiovascular disease*; CVD): Zu den CVDs zählen generell die koronare Herzkrankheit (KHK), zerebrovaskuläre Erkrankungen, rheumatische Herz-

erkrankungen sowie weitere Zustände<sup>21</sup>, wobei der T2D vor allem mit dem Tod jeglicher Ursache, mit einem akuten Myokardinfarkt (MI), mit einem Schlaganfall sowie mit einer HF in Verbindung steht<sup>22,4</sup>. Hierbei gilt erneut zu erwähnen, dass perspektivisch eine Zunahme der Prävalenz von T2D besteht<sup>12</sup>. Durch den beschriebenen Zusammenhang zwischen T2D und kardiovaskulären Erkrankungen<sup>2,3</sup> ist anzunehmen, dass innerhalb der nächsten Jahre ein Anstieg von kardiovaskulären Erkrankungen, einschließlich der HF, zu verzeichnen sein wird.

Bereits im Jahre 1996 haben Howard et al. aufgezeigt, dass ein höheres Level an Insulinresistenz mit Atherosklerose assoziiert ist<sup>23</sup>. Die zugrundeliegende Pathophysiologie wird von Vlassara und Uribarri zusammengefasst: Aufgrund der Hyperglykämie entsteht vermehrt oxidativer Stress an den Kardiomyozyten. Der langfristig erhöhte Blutglukosespiegel begünstigt die Entstehung von *Advanced Glycation End Products* (AGEs), welche Komplikationen an den Gefäßwänden bewirken können<sup>24</sup>. Weitere Risikofaktoren wie erhöhtes Plasmacholesterin, Bluthochdruck, Rauchen, männliches Geschlecht sowie erhöhte Entzündungsparameter gelten hierbei ebenfalls als atherogene Stimuli<sup>25</sup>.

Die Hauptkomplikation der Atherosklerose stellt die KHK, mit ihrer Maximalform dem Myokardinfarkt, dar<sup>26</sup>. Weiterhin ist bekannt, dass T2D-Patienten ein mindestens zweifach erhöhtes Risiko für Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse besitzen<sup>27</sup>.

Die Entstehung der HF durch T2D wird durch eine verringerte Translokation des GLUT4 auf die Zelloberfläche der Kardiomyozyten erklärt<sup>28</sup>. Durch die unzureichende Glukoseversorgung werden vermehrt Fettsäuren durch Oxidation zur Energieversorgung genutzt; diese Metabolite wirken lipotoxisch und führen zu pathologischem kardialen Remodellierung sowie Apoptose der Kardiomyozyten und somit zu kardialer Dysfunktion<sup>29</sup>.

### 1.1.3 Diabetisches Mausmodell und GLUT4

In Vorstudien wurde aufgezeigt, dass Mäuse mit einem Mangel an GLUT4, der spezifisch für Kardiomyozyten ist, nach einer Ischämie in Langendorff-perfundierten Herz-

modellen eine schlechtere kardiale Erholung zeigen; zudem entwickeln die Mausherzen eine systolische sowie diastolische Dysfunktion bei Ischämie<sup>30</sup>. Umgekehrt verbesserte die Induktion der GLUT4-Translokation die kardiale Erholung<sup>17,31,32</sup>.

Bei T2D-Erkrankungen ist der myokardiale Stoffwechsel aufgrund einer verminderten Expression von GLUT4 in Kardiomyozyten verändert<sup>33,34,28</sup>. Im nicht-diabetischen Stoffwechsel wird zwar eine vermehrte Translokation von GLUT4 der Kardiomyozyten durch eine Ischämie induziert<sup>35</sup>, jedoch wurde ebenfalls gezeigt, dass die durch Ischämie induzierte Zunahme von GLUT4 bei diabetischen Mäusen abgeschwächt ist<sup>36</sup>.

Aktuell existieren verschiedene Ansätze für das diabetische Mausmodell. Hier sind vor allem das STZ (Streptozotocin), das NZO (*New Zealand Obese*), das db/db und das ob/ob sowie das DIO-Mausmodell zu nennen:

STZ ist ein Glucosamin-Nitroharnstoff, welcher aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zu Glucose über den GLUT 2 in das Pankreas aufgenommen wird und dort zu einer Zerstörung der Beta-Zellen führt und somit einen Diabetes Mellitus auslöst<sup>37</sup>.

NZO-Mäuse stellen ein polygenetisches Modell des Typ-2-Diabetes mit Betazellverlust, verringerter Glucose-Toleranz sowie Übergewicht dar und zeichnen sich darüber hinaus bereits durch ein höheres Geburtsgewicht aus; zudem kommt es bei diesen Mäusen nahezu vollständig zur Manifestation eines Typ-2-Diabetes nach 16 bis 20 Wochen postpartal, allerdings nur bei den männlichen Tieren<sup>38</sup>.

Die als "db/db"- und "ob/ob"-Mäuse bezeichneten Mäuse weisen genetisch veränderte Leptinrezeptoren auf, die infolge von Mutationen einen Funktionsverlust erfahren; die daraus resultierende, als starkes Übergewicht charakterisierte Störung ist mit diversen metabolischen Veränderungen verbunden, insbesondere Hyperglykämie und Hyperinsulinämie<sup>39</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bewusst das DIO-Mausmodell verwendet, da dieses das Frühstadium des T2D am besten abbildet<sup>40</sup>. Zudem ähnelt die Ätiologie der T2D-Entstehung am ehesten der Realität. Die Funktionsweise des DIO-Modells wird an anderer Stelle innerhalb dieser Dissertation diskutiert.

## 1.2 GLP1-Agonisten

GLP1-Rezeptoragonisten stellen eine Medikamentengruppe dar, die zur Senkung des Blutzuckerspiegels und somit zur Diabetestherapie zugelassen wurde. Es sind verschiedene Wirkstoffe auf dem Markt (Exenatid, Semaglutid, Liraglutid, Lixisenatid, Albiglutid, Dulaglutid)<sup>41</sup>. Die Studienlage zu den verschiedenen GLP1-RAs zeigt vielversprechende antidiabetische Wirkung<sup>42</sup>, jedoch sind, neben der Therapie des T2D, auch weitere positive Effekte aufgefallen, wie beispielsweise die Gewichtsreduktion durch Semaglutid<sup>43</sup>.

### 1.2.1 Wirkweise von GLP1-Agonisten

GLP1 ist ein im Körper natürlich vorkommendes Hormon, welches bei Nahrungsaufnahme aus enteroendokrinen L-Zellen aus dem Gastrointestinaltrakt in die Blutbahn abgegeben wird<sup>44</sup>. GLP1 erfüllt im Körper diverse Funktionen: Es verlangsamt die Magenentleerung, erhöht die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe, verringert die Glukoseproduktion in der Leber, verringert durch neuronale Wirkmechanismen den Appetit und zeigt ebenfalls eine neuroprotektive Wirkung<sup>45</sup>. Hervorzuheben ist die Wirkung von GLP1 am Pankreas: Dort wird die Insulinproduktion und -sekretion der Beta-Zellen glukoseabhängig erhöht, wodurch dessen Wirkung bei Normoglykämie ausbleibt. Weiterhin führt GLP1 zu erhöhter Beta-Zellproliferation und verringert Beta-Zellapoptose<sup>46</sup>.

Die Insulinsekretion in den Beta-Zellen des Pankreas beruht auf einem Depolarisationsmechanismus, welcher durch Prentki et al. dargestellt wird: Glukose gelangt über den insulinunabhängigen GLUT-2 in die Beta-Zellen. Innerhalb der Zelle wird Glukose zu ATP (Adenosintriphosphat) umgewandelt. Durch den Anstieg von ATP entsteht vermehrt Adenylatcyclase und somit Proteinkinase A, welche nun einen auswärts gerichteten Kaliumkanal blockiert. Durch den verringerten Ausfluss von Kalium aus der Zelle kommt es zur Depolarisation der Zelle. Durch diese Depolarisation werden spannungsgesteuerte Calciumkanäle geöffnet, sodass Calcium aus dem extrazellulären Raum in die Zelle strömt und dort für eine Ausschüttung der Insulingranula sorgt<sup>47</sup>. GLP1 verstärkt den genannten Effekt, indem es durch Bindung an den GLP1-Rezeptor an der

Beta-Zelloberfläche die Bildung von Adenylatcyclase verstärkt und somit mehr Proteinkinase A gebildet werden kann<sup>48</sup>. Da dieser Mechanismus glukoseabhängig ist, tritt die glukosesenkende Wirkung von GLP1 nur bei Anwesenheit von Glukose auf<sup>49</sup>.

Die Medikamentenklasse der GLP1-Agonisten wird hierbei in der Regel subkutan appliziert<sup>50</sup>. Die Häufigkeit richtet sich nach der Substanz: Exenatid (Byetta) wird beispielsweise zweimal täglich appliziert, Semaglutid hingegen einmal wöchentlich. Der kurzwirksamste GLP1-Agonist stellt Exe (Byetta) mit einer HWZ (Halbwertszeit) von zwei bis drei Stunden dar und sollte somit zwei Mal täglich appliziert werden. Die längste Wirkdauer besitzt Semaglutid mit einer HWZ von 13 Stunden bis sieben Tagen, weshalb es einmal wöchentlich injiziert werden soll. Ein Beispiel für ein mittellanges Wirkspektrum mit einmal täglicher Injektion stellt zum Beispiel Liraglutid dar. Die genannten Häufigkeiten der jeweiligen Injektionen sowie die Wirkdauer der verschiedenen GLP-1-RA lassen sich aus Gentilella et al.<sup>51</sup> entnehmen. Außerdem ist ebenfalls orales Semaglutid auf dem Markt verfügbar<sup>52</sup>.

Mögliche Nebenwirkung der Therapie mit GLP1-Agonisten sind Übelkeit, Magen-Darm-Beschwerden, Kopfschmerzen, Reaktionen an der Einstichstelle, Gewichtsreduktion sowie ein erhöhtes Hypoglykämierisiko bei Kombinationstherapie mit anderen Antidiabetika sowie eine selten beschriebene Pankreatitis<sup>41</sup>.

### 1.2.2 GLP1-Agonisten zur Gewichtsreduktion

GLP1-Agonisten sind in den letzten Jahren vor allem durch ihren Effekt bezüglich einer Gewichtsreduktion aufgefallen, weshalb es zeitweise zu Lieferengpässen für die Medikation kam<sup>53</sup>. Nach der S3-Leitlinie der Deutschen Adipositas Gesellschaft ist der GLP-1 Agonist Semaglutid (Ozempic) zur Therapie der Adipositas in Deutschland zugelassen; es konnte gezeigt werden, dass Semaglutid eine Senkung der Plasmalipide sowie des systolischen Blutdrucks induzierte und Entzündungen reduziert wurden<sup>54</sup>. Nach aktueller S3-Leitlinie soll eine medikamentöse Therapie der Adipositas jedoch „nur in Kombination mit einer multimodalen Basistherapie zur Gewichtsreduktion durchgeführt werden“<sup>54</sup>. Hierbei scheint es unerheblich, ob ein diabetischer Phänotyp vorliegt, da sowohl in Studien mit T2D-Patienten<sup>55</sup>, als auch mit nicht-Diabetikern<sup>56</sup> eine signifikante Verringerung des Körpergewichts festgestellt wurde.

### 1.2.3 GLP1-Agonisten zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen

Aus den großen randomisierten kontrollierten Studien lässt sich ableiten, dass bei den verfügbaren GLP1-Rezeptoragonisten unterschiedliche Potenziale zur Reduzierung kardiovaskulärer Ereignisse, einschließlich HF, existieren. In der ELIXA-Studie wurde Lixisenatid bei Patienten mit T2D und einem kürzlich aufgetretenen akuten Koronarsyndrom untersucht. Es zeigte sich kein Unterschied in der Häufigkeit schwerwiegender kardiovaskulärer Ereignisse einschließlich HF<sup>57</sup>. In der LEADER-Studie wurde die Wirkung von Liraglutid analysiert. Hier konnte eine Reduktion der kardiovaskulär bedingten Todesfälle nachgewiesen werden. Die Rate der Krankenhauseinweisungen aufgrund von HF wurde nicht signifikant reduziert<sup>58</sup>. Eine Subanalyse für Patienten mit und ohne HF in der Vorgeschichte konnte zeigen, dass beide Gruppen von der Behandlung mit Liraglutid profitierten<sup>59</sup>. Dulaglutid (untersucht in REWIND<sup>60</sup>) und Efpeglenatid (Amplitude O<sup>61</sup>) konnten kardiovaskuläre Endpunkte in ähnlicher Weise reduzieren. Daten der SELECT-Studie (Semaglutid) zeigten eine Reduktion der Mortalität und der wichtigsten kardiovaskulären Endpunkte bei adipösen Patienten auch ohne T2D<sup>62</sup>. In der SUSTAIN-6-Studie (ebenfalls Semaglutid) wurde jedoch auch bei T2D-Patienten eine starke Schutzwirkung nachgewiesen, da bei den behandelten Patienten niedrigere Raten von kardiovaskulären Todesfällen, nicht tödlichen Myokardinfarkten oder nicht tödlichen Schlaganfällen verzeichnet wurden, die Anzahl der Krankenhauseinweisungen aufgrund von HF war jedoch, im Vergleich zur Placebogruppe, gleich hoch<sup>63</sup>. Im Gegensatz dazu konnte in der PIONEER-6-Studie Semaglutid als orale Medikation keine Überlegenheit gegenüber eines Placebo zeigen<sup>52</sup>.

Exe-Behandlung wurde in EXSCEL mit einmaliger schwacher Behandlung bei Patienten mit T2D auf kardiovaskuläre Ergebnisse untersucht. In dieser Kohorte gab es keinen klinischen Nutzen durch die Exe-Behandlung<sup>64</sup>.

### 1.2.4 Der GLP-1 Agonist Exenatid

Exenatid (Wirkstoff: Exendin-4) wurde in dem Speichel von Gila monster (*Heloderma suspectum*) entdeckt, wird als Medikament jedoch synthetisch hergestellt<sup>65</sup> und ist ein aus 39 Aminosäuren bestehendes Peptid<sup>66</sup>. Das kurzwirkende Exe(=Byetta) besitzt eine Plasma-Halbwertszeit von 2,4 Stunden und eine Wirkdauer von ca. 13 Stunden<sup>67</sup>, während das langwirkende Exe einmal wöchentlich injiziert wird<sup>51</sup>.

In einer großen klinischen Studie des wöchentlich applizierten Exe zur Auswirkung auf das kardiovaskuläre *Outcome* (EXSCEL-Studie<sup>64</sup>) zeigte sich eine signifikante Verringerung des HbA1C, des Körpergewichts, des systolischen Blutdrucks sowie der Herzfrequenz unter Exe-Injektion. Dennoch zeigte sich unter Exe kein signifikant besseres *Outcome* bezüglich des Todes an jeglicher Ursache, des Todes durch kardiovaskuläre Geschehnisse sowie bezüglich der Hospitalisierung durch Herzversagen.

Aus Vorstudien ist bekannt, dass Exe auch die Translokation von GLUT4 an die Zelloberfläche erhöht<sup>17</sup>. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass Exe auch eine Aktivierung der Adenosinmonophosphatkinase (AMPK) bewirkt<sup>68</sup>. AMPK ist in Kardiomyozyten als ein Faktor bekannt, der die Translokation von GLUT4 erhöht<sup>69</sup>.

#### 1.2.5 Exenatid bei einem Myokardinfarkt

In einer weiteren Studie zu Exe zeigte eine retrospektive Analyse von über 39.000 Patienten, dass die Inzidenz von Myokardereignissen, Krankenhausaufenthalten aufgrund von Myokardereignissen und Krankenhausaufenthalten aus anderen Gründen bei Exe signifikant niedriger war<sup>70</sup>.

In einigen Studien bezüglich einer Wirkung von Exe auf die Infarktgröße konnte gezeigt werden, dass Exe Effekte auf die Infarktgröße nach einem MI haben kann<sup>71,72</sup>.

### 1.3 Ziel dieser Arbeit

Es ist von großer klinischer und sozio-ökonomischer Relevanz, sowohl das Auftreten als auch die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen bei T2D-Patienten eingehend zu untersuchen.

GLP1-Agonisten haben einen komplexen Wirkmechanismus, der über ihre antidiabetischen Eigenschaften hinausgeht. Exenatid scheint kardioprotektive Effekte im Sinne einer Infarktgrößenreduktion sowie einer Erhöhung des GLUT4 zu haben, wie frühere Studien in nicht-diabetischen Tiermodellen gezeigt haben. Diese Eigenschaft macht Exe zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Untersuchung seiner Wirkung in diabetischen Modellen mit kardiovaskulären Komplikationen.

---

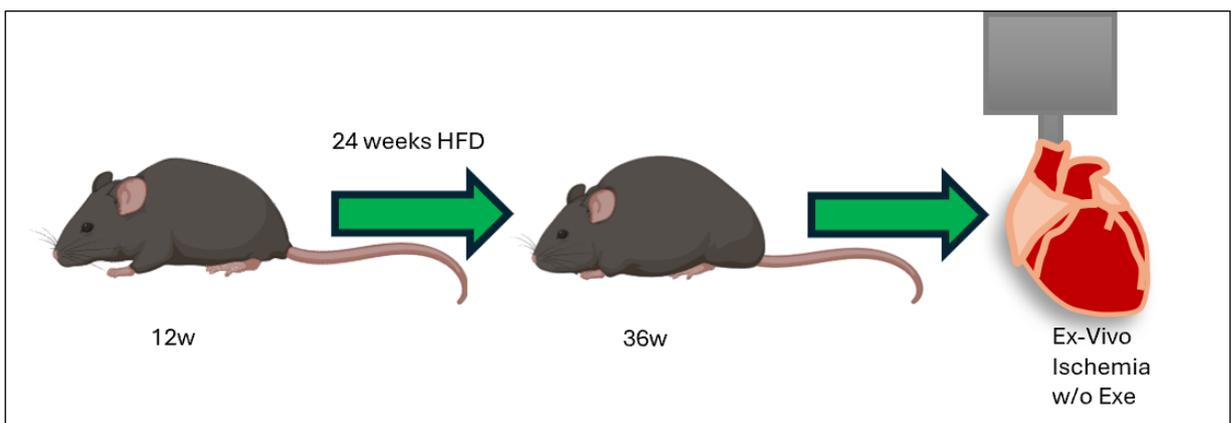
Ziel dieser Arbeit ist es, die kardioprotektiven Eigenschaften von Exe im diabetischen Mausmodell zu analysieren. Die Untersuchung konzentriert sich auf folgende Fragestellungen: 1) Exe-Wirkung vor Myokardinfarkt: Untersuchung der kardioprotektiven Effekte im lebenden diabetischen Mausmodell. 2) Exe-Wirkung nach Myokardinfarkt: Analyse der kardioprotektiven Effekte im lebenden diabetischen Mausmodell. 3) Untersuchung an isolierten Herzen: Vergleich der kardioprotektiven Effekte von Exe an isolierten diabetischen und nicht-diabetischen Mausherzen. Hierbei wurde jeweils untersucht, ob Exe eine T2D induzierte HF sowie die Infarktgröße und das funktionelle *Outcome* nach MI (*in- und ex-vivo*) beeinflusst. Zur Beurteilung möglicher Mechanismen wurde im Rahmen weiterer Arbeiten der Arbeitsgruppe eine Assoziation der GLUT4 Expression und der mitochondrialen Funktion hergestellt.

GLP1-Agonisten haben bereits einen hohen Stellenwert in der Behandlung des T2D. In dieser Arbeit wird untersucht, ob die Behandlung mit Exe bei T2D-Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko oder bereits bestehender kardiovaskulärer Erkrankung Vorteile gegenüber anderen Therapien bietet. Die Ergebnisse könnten dazu beitragen, die Behandlung von T2D gezielt zu optimieren und gleichzeitig kardiovaskuläre Komplikationen effektiv zu reduzieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Um die kardioprotektiven Eigenschaften von Exe zu untersuchen, wurden *murine* Versuche durchgeführt. Die Versuche lassen sich in einen *Ex-Vivo* Teil und einen *In-Vivo* Teil unterteilen. Der *Ex-Vivo* Teil beschreibt einen induzierten Infarkt nach Tötung der Maus und Herzexplantation bei unbehandelten Mäusen: Zunächst wurden die Mäuse für 24 Wochen mittels *High-Fat Diet* (HFD) gefüttert. Hierauf erfolgten die Tötung und Herzentnahme der Mäuse. Die Herzen wurden im Langendorff *Apparatus* perfundiert. Mithilfe des Langendorff *Apparatus* wurden die Herzen in globale Ischämie versetzt und die Erholung nach dem Infarkt gemessen. Darauffolgend wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung (2, 3, 5- Triphenyltetrazolium-Chlorid-Färbung) analysiert. Insgesamt wurden folgende Subgruppen miteinander verglichen: NCD (*Normal Chow Diet*)-Kontrollgruppe, NCD-Mäuse mit Exe-versetztem Perfusat, DIO-Mäuse sowie DIO-Mäuse mit Exe-versetztem Perfusat in geringen und hohen Dosierungen. Insgesamt wurden ausschließlich männliche Mäuse des Typs C57BL/6 verwendet, welche wir durch Bestellung bei Janvier erhielten. (Abb. 1)



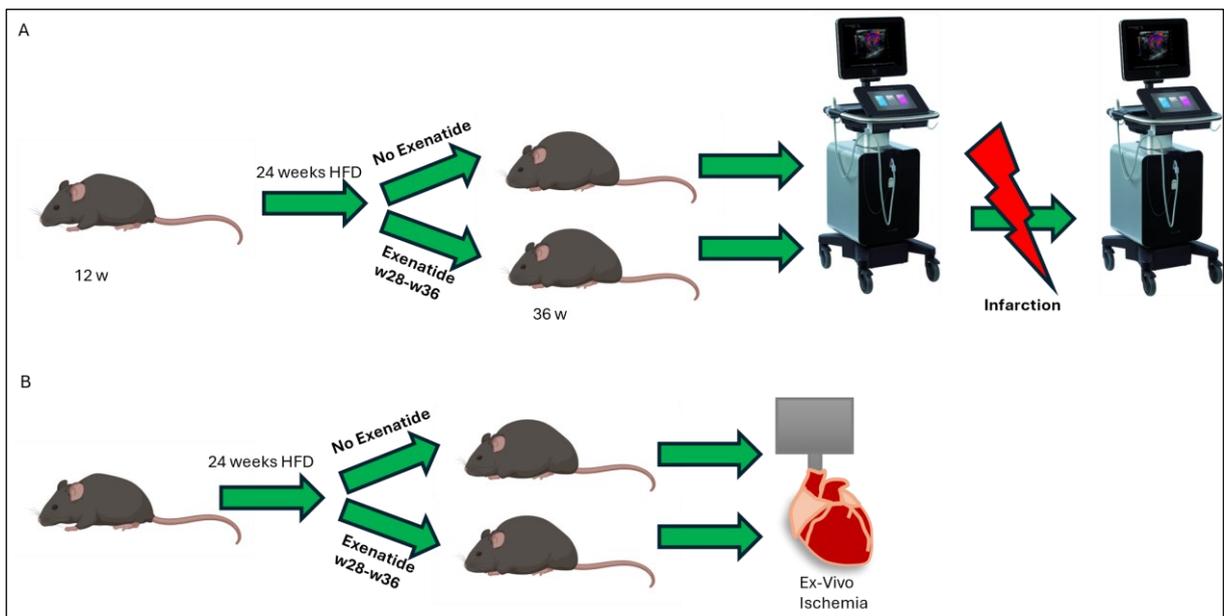
**Abb. 1: Grafische Darstellung der Ex-Vivo Experimente** (Die Abbildungserstellung erfolgte mithilfe der Internet-Anwendung „Biorender“)

Im Rahmen des *In-Vivo* Teils wurden die Mäuse zunächst für 16 Wochen mittels HFD gefüttert. Anschließend wurde, zusätzlich zur weitergeführten HFD, für weitere acht Wochen Exe (1 mmol/kg; alle 2 Tage intraperitoneal; Dosierung gemäß Park et al.<sup>73</sup>

und gemäß Mansur et al.<sup>74)</sup> verabreicht. Die Mäuse hatten bei Versuchsstart ein Alter von 10-12 Wochen, weshalb die Versuche bei einem Mausalter von 36 Wochen beendet waren. Die mit Exe behandelten DIO-Mäuse sowie unbehandelte DIO-Mäuse wurden zunächst mittels Echokardiografie untersucht. Hierfür wurden die Mäuse zuvor mittels Isofluran narkotisiert. Hierdurch konnte ein Ultraschall der Mausherzen in verschiedenen Ebenen aufgenommen werden. Hierbei waren die systolische- sowie diastolische Funktion und die strukturellen Herzparameter von Bedeutung.

Nach Erhebung der echokardiografischen Basis-Werte wurde die LAD für 30 Minuten operativ verschlossen und daraufhin wiedereröffnet. Nach 24h Reperfusion erhielten die Mäuse eine erneute Echokardiografie. Die behandelten sowie unbehandelten DIO-Mäuse wurden nun hinsichtlich systolischer und diastolischer Herzfunktion sowie strukturellen Parametern jeweils vor und nach der Operation untersucht (Abb. 2A).

Zusätzlich wurden weitere mit Exe behandelte DIO-Mausherzen mittels Langendorff-*Apparatus* perfundiert und eine globale Ischämie induziert. Die Auswertung erfolgte entsprechend dem Protokoll der *Ex-Vivo* Experimente. Ziel dieses Experimentes war der Vergleich zwischen einer systemischen Exe-Wirkung und der isolierten Wirkung von Exe auf das Myokard (Abb. 2B).



**Abb. 2: Grafische Darstellung der In-Vivo Experimente;** A) Versuchsaufbau Echokardiografie sowie B) Versuchsaufbau Langendorff-*Apparatus* (Die Abbildungserstellung erfolgte mithilfe der Internet-Anwendung „Biorender“)

Am Ende der Versuchsreihe wurden die Mäuse mittels finaler Narkose getötet und eine Herzentnahme durchgeführt. Teile des Herzens wurden zu weiterer Untersuchung mittels Western Blot sowie OROBOROS hinsichtlich Genexpression sowie Mitochondrienaktivität analysiert. Anhand des übrigen Herzens wurde die TTC-Färbung bestimmt. Die zusätzliche Entnahme von Blut, Aorta, Leber, Skelettmuskel sowie Tibia wurde zum *Biosampling* durchgeführt. Weiterhin wurde eine Gruppe von Exe-behandelten Mäusen ohne vorherige Operation getötet und es wurde, analog zu den operierten Tieren, eine Organentnahme durchgeführt.

## 2.2 Genehmigung des Versuchsvorhabens

Das Projekt erhielt die Genehmigung zur Durchführung von der Bezirksregierung Düsseldorf (Aktenzeichen: 81-02.04.2021.A218). Der Nachweis der erfolgreich absolvierten Schulung „Versuchstierkundliche Einführung“ ist dem *Addendum* beigelegt.

## 2.3 Versuchstiere, Zucht- und Haltungsbedingungen

Die Versuche basierten auf den männlichen Mäusen der Gattung C57BL/6, die von Janvier Labs (Saint-Berthevin, Frankreich) bezogen wurden. Während der Haltungsphase befanden sich die Tiere in Makrolon-Käfigen Typ II (350 cm<sup>2</sup>). Zur Einstreu wurde entstaubtes Weichholzgranulat verwendet. Die Tiere wurden mit dem Zuchtfutter M-Zucht der Firma sniff® oder im DIO-Modell entsprechendes HFD-Futter sowie mit ozonisiertem, mit HCl angesäuerten Wasser (pH=2,8-3) versorgt. Die Temperatur der Räumlichkeiten lag konstant bei 22 ± 2 °C und die Luftfeuchtigkeit bei 55 ± 5 %. Es erfolgten 12-20 Luftwechsel pro Stunde, wobei Luftzusammensetzung, Luftdruck und elektrische Ladung konstant gehalten wurden. Für Rückzugs- und Nestbaumöglichkeiten wurde autoklavierter Zellstoff in die Käfige gegeben.

Einmal pro Woche wurden die Mäuse in saubere Käfige umgesetzt und dabei auf Anzeichen von Krankheiten oder Verletzungen untersucht. Die Mäuse, die mit Exe behandelt wurden, erhielten montags, mittwochs und freitags intraperitoneal 1 mmol/kg Exe.

Im Rahmen des Diabetischen Mausmodells wurden ebenfalls männliche Mäuse der Gattung C57BL/6J verwendet. Die Bedingungen für diese Mausgruppe war identisch zu den NCD-Mäusen mit der Ausnahme des Futters: Die Mäuse wurden mit einer *High-Fat-Diet* (Sniff, S7200-E010, F1850, 60KJ% fat, 24% Sucrose) *ad libitum* gefüttert. Es erfolgte einmal wöchentlich eine Eintragung in *Score-Sheets*, um den Zustand der Mäuse zu objektivieren. Ein hoher *Score* zeigte eine hohe Belastung für das Tier an, sodass aus tierschutzrechtlichen Gründen eine Euthanasie durchgeführt wurde.

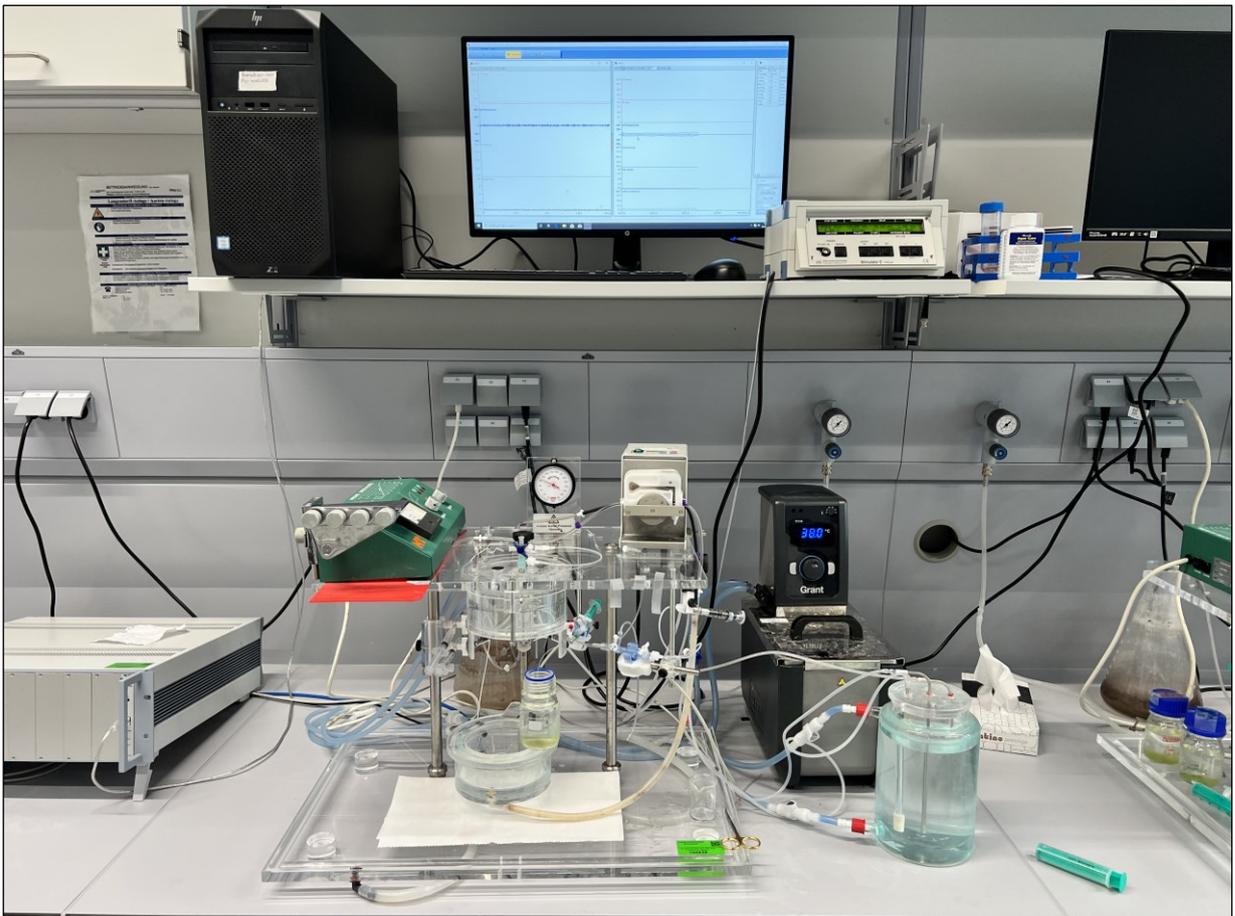
Nach der Operation wurden die Tiere einzeln gehalten, um zu verhindern, dass sie sich gegenseitig die Nähte entfernen. Sie erhielten weiterhin *ad libitum* das Sniff®-Haltungsfutter, bzw. eine *High-Fat-Diet*.

Die Räume waren von 07:00 bis 19:00 Uhr (MEZ) mit 200 Lux beleuchtet. Die postoperative Versorgung, einschließlich Gewichtskontrolle, Nahtkontrolle, sowie Verabreichung von Schmerzmedikation und Glukoselösung erfolgte in speziellen Stationen mit Luftabzug. Bei der Handhabung der Tiere wurde stets Schutzkleidung getragen.

### 2.3 Langendorff-Versuche

Für die Experimente am Langendorff-perfundierten Herzmodell wurde das Modell der Firma (Hugo Sachs) verwendet. Das zuvor entnommene Herz wurde zunächst über die Aorta auf einer Perfusionskanüle fixiert, welche darauffolgend an dem Langendorff-Gerät angebracht wurde. So wurde das Herz retrograd über die Aorta mit Pufferlösung versorgt, was zu einem erneuten Herzschlag führte. Die Pufferlösung wurde zuvor in einem Wärmebad auf 37 Grad Celsius erwärmt und mittels Umwälzpumpe und Schläuchen dem Langendorff-Gerät zugeführt. Die Perfusionskanüle mitsamt dem Herzen waren hierbei von einer doppelwandigen Kammer umgeben, welche ebenfalls mit 37 Grad Celsius erwärmt wurde, um die Umgebungstemperatur des Herzens konstant zu halten. Diese Kammer konnte eröffnet und verschlossen werden, um Arbeiten an dem Herzen vorzunehmen. Abtropfender Puffer wurde innerhalb dieser Kammer aufgefangen und mittels eines Ablaufschlauches in einen Ablaufbehälter befördert. Nun wurde ein selbst hergestellter Ballon über ein zuvor eröffnetes Loch in die linke Herzkammer implementiert. Der mit destilliertem Wasser gefüllte Ballon wurde über ein Schlauchsystem mit einem Druckmesser verbunden. Nun konnte über den angeschlossenen

Computer eine Druckkurve des linken Ventrikels abgelesen werden. Erfasst wurden hierbei der Endsystolische Druck (PES), der Enddiastolische Druck (PED), die Druckdifferenz zwischen Systole und Diastole (DP), die Geschwindigkeit der Kontraktion (DPmax) sowie Relaxation (DPmin), der maximale Durchfluss durch die Koronarien (Flow) und die Herzfrequenz (HF). Die Herzfrequenz wurde bei allen Versuchen mittels *Pacer* konstant bei 600 Schlägen pro Minute gehalten, um eine identische Ausgangslage für alle Herzen zu schaffen.



**Abb. 3: Darstellung des Langendorff-Apparatus**

### Vorbereitung der Langendorff-Versuche

Am jeweiligen Vortag der Versuche wurde der Puffer für die Experimente hergestellt. Hierfür wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Mengenangaben mit jeweils zwei Liter Millipor-H<sub>2</sub>O (der Firma Merck, Gerät Milli-Q-7000) abgewogen und mittels Rührfisch aufgelöst und anschließend für 15 Minuten begast, um einen pH-Wert von 7,4 zu er-

reichen. Hierbei war darauf zu achten das Calciumchlorid erst nach der Begasung hinzugeben, da dieses bei zu sauren pH-Werten ausfallen und die Koronarien verschließen würde. Im Anschluss wurde die Lösung durch Filterpapier mittels Vakuums-Tülle filtriert, um Unreinheiten und größere Partikel innerhalb der Lösung zu vermeiden. Die Lösung wurde bis zum Folgetag bei 4 Grad Celsius gelagert.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration in Gramm (g)/Molarität (M) / Firma</b>
NaCl (Natriumchlorid)	13,8g/118mM / KMF
KCl (Kaliumchlorid)	0,7g/4,7mM / Merck
MgSo <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (Magnesiumsulfat)	0,4g/0,8mM / Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumphosphat)	0,32g/1,2mM / Merck
NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	4,18g/25mM / Merck
Glukose, wasserfrei	1,8g/5,0mM / Sigma
NaPyruvat (Natriumpyruvat)	0,44g/110mM / Sigma
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Calciumchlorid)	0,74g/2,5mM / Sigma
<b>Gas</b>	
Carbogen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 % CO<sub>2</sub></li> <li>• 95 % O<sub>2</sub></li> </ul>
<b>Geräte</b>	
Heiz-/Magnetrührer	IKAMAG RET-GS
Waage	Sartorius BP 210 D

**Tabelle 1: Verwendete Materialien bei der Herstellung Langendorff-Puffers**

### Vorbereitung am Versuchstag

Zunächst wurden das Langendorff-Gerät, das Wärmebad, der Pacer sowie der Computer angeschaltet und die entsprechende *Software* (HSE Isoheart Software) gestartet. Der Aortendruck des Gerätes wurde auf 100mmHg eingestellt. Der hergestellte Puffer wurde in das entsprechende doppelwandige Behältnis gefüllt und durch das Wärmebad mittels Zu- und Ablaufschläuchen auf 37 Grad erwärmt. Die Umwälzpumpe

---

wurde auf 3,5mL/min eingestellt. Der Puffer wurde mittels Zulaufschlauch konstant mit Carbogen begast, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu erhalten. Während auf das Aufwärmen des Puffers gewartet wurde, wurde das Gerät mit destilliertem Wasser für 10 Minuten gespült, um Gerät und Schläuche zu reinigen. Mit Erreichen der Zieltemperatur wurde der Zulaufschlauch für das Langendorff-Gerät nun in das Puffer-Behältnis gegeben und das Gerät für weitere 2-3 Minuten mit Puffer gespült, um das destillierte Wasser aus dem System zu spülen. Währenddessen wurden ebenfalls sämtliche Maßnahmen für die Herzpräparation vorbereitet: Hierzu wurde eine Kältschale auf 4 Grad Celsius heruntergekühlt, ein Mikroskop eingeschaltet und auf die ca. 1,25-Fache Vergrößerung eingestellt. Außerdem wurde weitere Pufferlösung in einer Eisschale gelagert und mit Carbogen begast und die Perfusionskanüle in der dafür vorgesehenen Präparationsvorrichtung befestigt. Ein Faden wurde vorbereitet, indem dieser bereits vorgeknotet locker um die Perfusionskanüle gelegt wurde, um das Herz schnell an der Kanüle zu fixieren. Grund für die Kühlung der Präparationsstelle war die daraus resultierende Asystolie des Herzens, da eine Präparation am schlagenden Herzen nicht durchführbar ist.

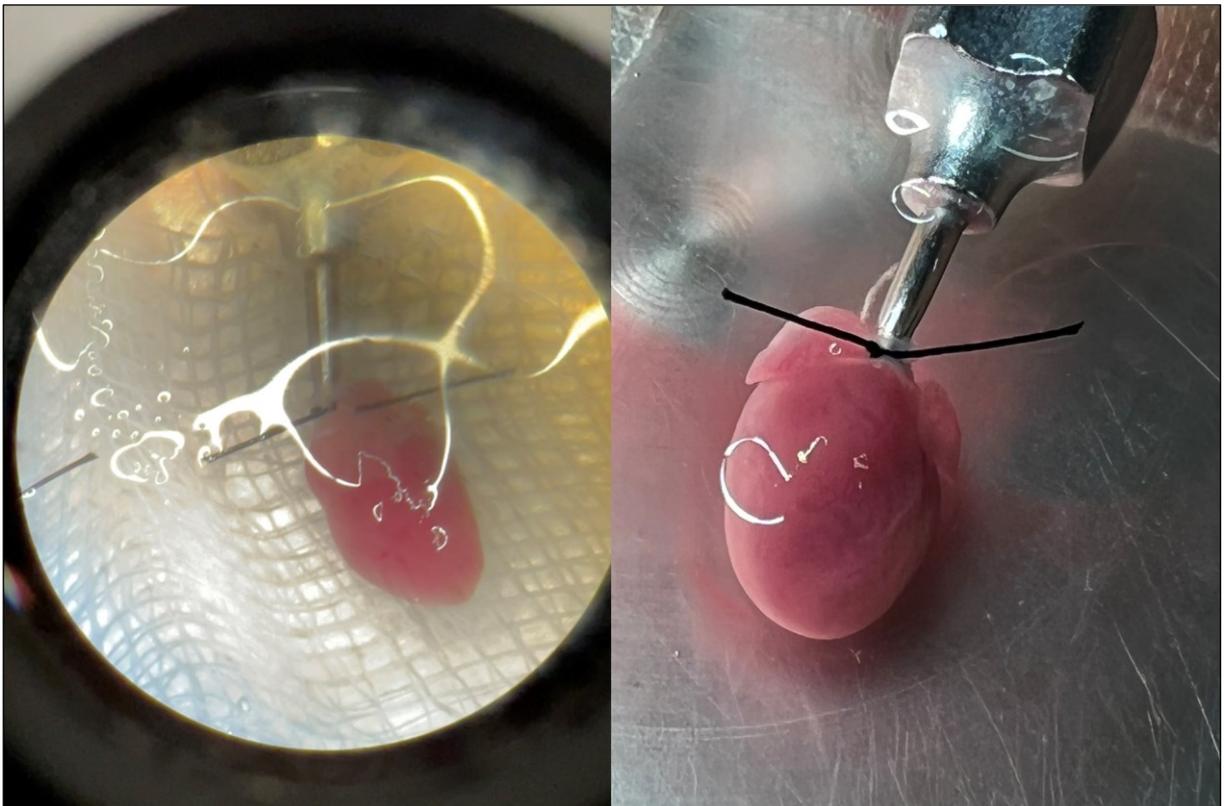


**Abb. 4: Material zur Herzpräparation:** Fixiertisch, Kaltschale, Mikroskop, Präparationsbesteck sowie die Präparationsvorrichtung

### Entnahme und Präparation der Herzen

Den Versuchstieren wurde eine finale Narkose mit Ketamin (100 mg/kg; Pfizer Pharma PFE GmbH, Berlin, Deutschland) sowie Xylazin (10 mg/kg; Bayer, Leverkusen, Deutschland) intraperitoneal verabreicht. Daraufhin wurde eine vollständige Anästhesie abgewartet. Dies wurde mittels Schmerzreizsetzung überprüft: Bei vollständigem Fehlen von Reflexen wurde den Mäusen Heparin (1000 IU/Maus; Rotexmedica, Trittau, Deutschland) intraperitoneal verabreicht, um Gerinnselbildung zu verhindern. Danach wurde die gekühlte und begaste Pufferlösung in die Kaltschale sowie die Präparationsvorrichtung gegeben. Auch hier wurden 5000IU (*International Units*) Heparin hinzugegeben. Dann wurden die Mäuse unmittelbar auf dem Präparationstisch fixiert und eine Sternotomie vorgenommen, das Zwerchfell geöffnet und das Sternum nach

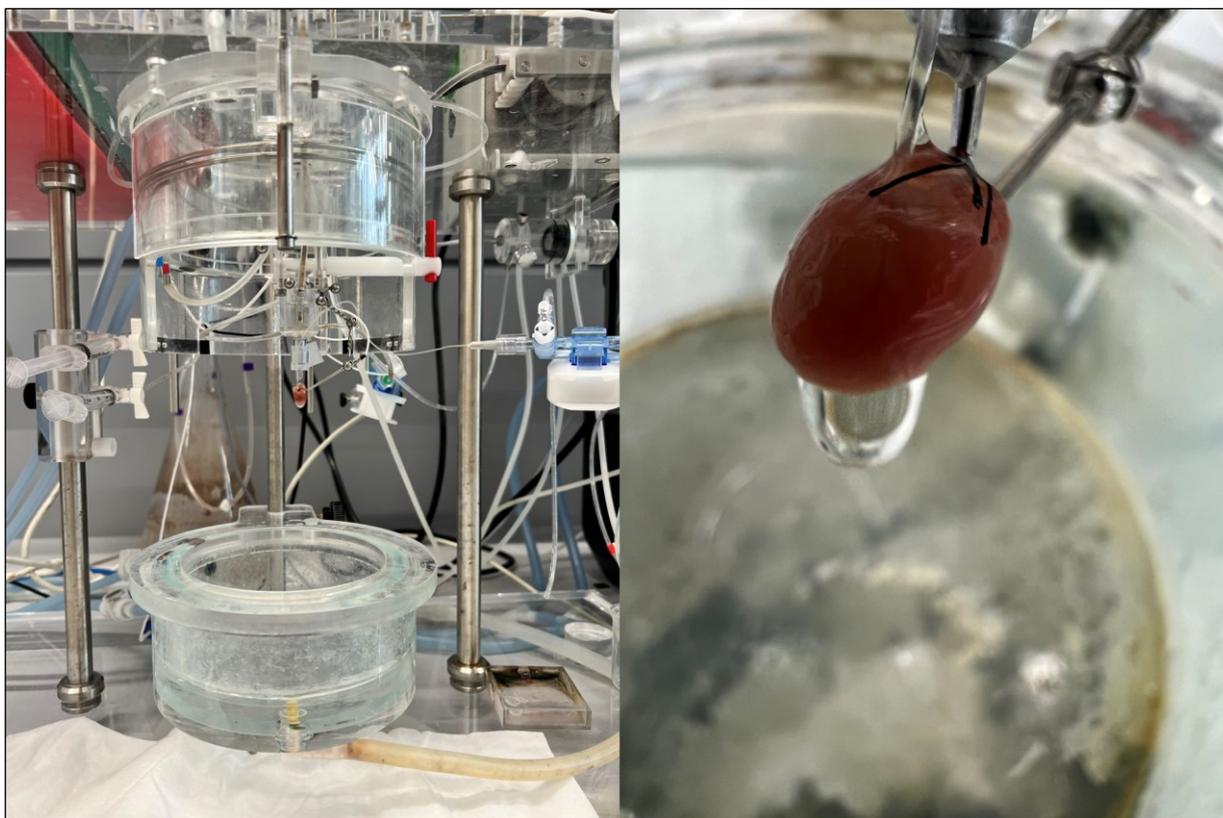
oben geklappt, sodass die Sicht auf das schlagende Herz frei wurde. Mithilfe von Pinzette und Schere wurden Herz und Lunge beiseitegeschoben und die thorakale Aorta Descendens durchtrennt. Im Anschluss wurden das Herz sowie die Lunge aus dem Thorax entnommen und in die zuvor Präparierte Kaltschale gegeben. Nun wurde das Herz mittels feiner Pinzette und Schere unter Sicht durch das Mikroskop präpariert um umliegende Strukturen wie Fettgewebe, Thymus, Ösophagus sowie weitere Gefäße zu entfernen. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, ein kleines Loch von wenigen Millimetern in die Rückwand des linken Ventrikels zu präparieren. Die Aorta wurde so lang gelassen, dass diese im Anschluss in der Präparationsvorrichtung mittels zwei Pinzetten auf die Perfusionskanüle gezogen werden konnte. Hierbei war darauf zu achten, dass die Aorta vor dem Abgang von Truncus brachiocephalicus sowie A. subclavia bzw. A. carotis communis gekürzt wird, da ansonsten ein Pufferverlust über diese Abgänge zu erwarten wäre. Nun wurde die Aorta mittels vorbereitetem Faden an der Kanüle verknotet. Das präparierte Herz wurde nun über die Kanüle am Langendorff-Gerät angebracht und die Perfusion gestartet.



**Abb. 5:** Freipräpariertes Herz auf der Perfusionskanüle

### Durchführung des Versuchs

Nach Starten der Perfusion fingen die Herzen nach wenigen Sekunden an, erneut zu schlagen. Durch die Erwärmung von 4 auf 37 Grad Celsius schlugen die Herzen erst nach einigen Minuten suffizient. Aus diesem Grund wurde zunächst eine 20-minütige Äquilibrationsphase durchlaufen, nachdem der Ballon in den linken Ventrikel eingeführt sowie der Pacer am linken Vorhof platziert wurde. Hierbei wurde schnell gearbeitet, um die Wärmekammer möglichst rasch schließen zu können. Nach durchlaufenen zwanzig Minuten wurden die ersten Werte (Flow, DP, PED, PES, DPmax, DPmin, HF) erhoben. Ein Indikator für die korrekte Präparation war zudem der angegebene Koronarfluss. Bei zu hohem Koronarfluss war die Option einer Fehlpräparation denkbar, da der Puffer an den Koronarien vorbeifloss. Um die Eventualität der Fehlpräparation auszuschließen, wurde eine Testischämie durchgeführt, indem der Zuflusshahn zur Perfusionskanüle zugedreht und nach 20 Sekunden erneut eröffnet wurde. Hierbei wurde der maximale Flussanstieg im Vergleich zu den vorherigen Flusswerten betrachtet: Bei einem Flussanstieg von  $>150\%$  war von einer korrekten Präparation auszugehen. Da der durchschnittliche Flow bei korrekter Präparation bei etwa 3mL/min lag, war die von uns gesetzte Grenze bei einem Fluss von über 5ml/min erreicht. Bei Überschreiten dieses Wertes oder bei einem Unterschreiten des Flussanstieges von  $<150\%$  wurden die Parameter dieses Herzens nicht mit in die Auswertung übernommen. Nach weiteren 5 Minuten wurden nun die Basis-Werte erhoben. Hiernach wurde eine vierzigminütige Ischämie induziert, indem der Zufluss erneut zugedreht wurde. Zudem wurde die Umwälzpumpe abgeschaltet und der Aortendruck auf 0mmHg gesenkt. Die Wärmekammer wurde kurz eröffnet, um das Herz in ein mit 37 Grad Celsius erwärmtes perfusatgefülltes Glasbehältnis zu hängen, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach abgelaufenen 40 Minuten wurde der Aortendruck zurück auf 100mmHg gestellt, die Umwälzpumpe eingeschaltet, der Zuflusshahn aufgedreht sowie das Glasbehältnis entfernt. Nach wenigen Minuten begannen die Herzen erneut zu schlagen. Sämtliche genannten Werte wurden nun alle 15 Minuten für insgesamt 120 Minuten erhoben.



**Abb. 6: Präpariertes Herz im Langendorff-Gerät**

### Abschluss des Versuchs

Nach Erhebung der letzten Testwerte wurde die Perfusionskanüle mitsamt Herz aus dem Gerät genommen und der Knoten durchtrennt. Das Herz wurde abgetrocknet und gewogen. Zur weiteren Untersuchung mittels TTC-Färbung wurde das Herz zunächst bei -20 Grad Celsius für 24 Stunden eingefroren. Das Gerät wurde erneut mit destilliertem Wasser für insgesamt eine Stunde bei 44 Grad gereinigt.

Geräte/Instrumente/Lösungen	Hersteller/Gerätebezeichnung
Analyse-Software	LabChartPro® 7.2.1
Langendorff-Apparatus	Hugo Sachs Havard
Laborschläuche	PVC-Schläuche
Glasfritte zur Pufferbegasung	Duran®
Operationsmikroskop	Nikon SMZ645
Operationslicht	KL 1500 LCD

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Materialien bei den Stimulationsversuchen am Langendorff-perfundierten Herzen**

## 2.4 Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung

Durch Färbung mittels TTC wird vitales Gewebe Rot angefärbt, während der infarzierte Bereich weiß erscheint, weshalb diese Methode zur Infarktgrößenbestimmung genutzt wurde. Hierfür wurden die Herzen geschnitten und eingefärbt und danach unter dem Mikroskop fotografiert und anschließend ausgewertet.

### Durchführung

Zunächst wurde der Thermomixer auf 38 Grad Celsius erwärmt. Parallel hierzu wurde der TTC-Puffer vorbereitet: Es wurden 25mg Triphenyltetrazoliumchlorid auf 2,5mL Pufferlösung, bestehend aus (Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat sowie Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat) gegeben. Dies wurde mittels Thermomixer vermischt. Darauffolgend wurden 6 Mikroreaktionsgefäße vorbereitet und in den vorgewärmten Thermomixer gestellt. Nun wurden jeweils 400µL der TTC-Mischung in jedes Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Von den am Vortag bei -20 Grad Celsius eingefrorenen Maus Herzen wurden mittels Skalpell 6 möglichst gleich große Scheiben der Ventrikel geschnitten und gewogen. Die Scheiben wurden mit einer Pinzette in die Mikroreaktionsgefäße transportiert und die Gefäße geschlossen. Der Thermomixer wurde auf 38

Grad Celsius belassen und die Durchmischung mittels Bewegung auf leichter Stufe gestartet. Nach 7 Minuten wurden die Herzschnitte aus den Gefäßen entnommen, auf einen Objektträger gelegt und mittels Deckglas abgedeckt (Abb. 7). Der Objektträger wurde unter ein Mikroskop gelegt. Der entsprechende Computer mitsamt Software wurde gestartet und von den Schnitten wurden nun Bilder angefertigt.



**Abb. 7: Geschnittene und gefärbte Herzpräparate auf Objektträgern**

### Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Diskusviewer (Version 4.8.1.1620). Die einzelnen Schnitte wurden visuell beurteilt und die jeweiligen infarzierten Bereiche markiert. Die markierte Fläche wurde durch die gesamte Fläche dividiert, um den prozentualen Anteil des infarzierten Bereiches zu berechnen. Zur Berechnung wurde das

Gewicht des jeweiligen Schnittes erhoben und in die Rechnung integriert. Im Anschluss wurde aus den 6 Schnitten der Mittelwert gebildet. So konnte ein prozentualer Wert des Infarktbereiches pro Herz ermittelt werden. Dieser Wert wurde unter den verschiedenen Gruppen verglichen.

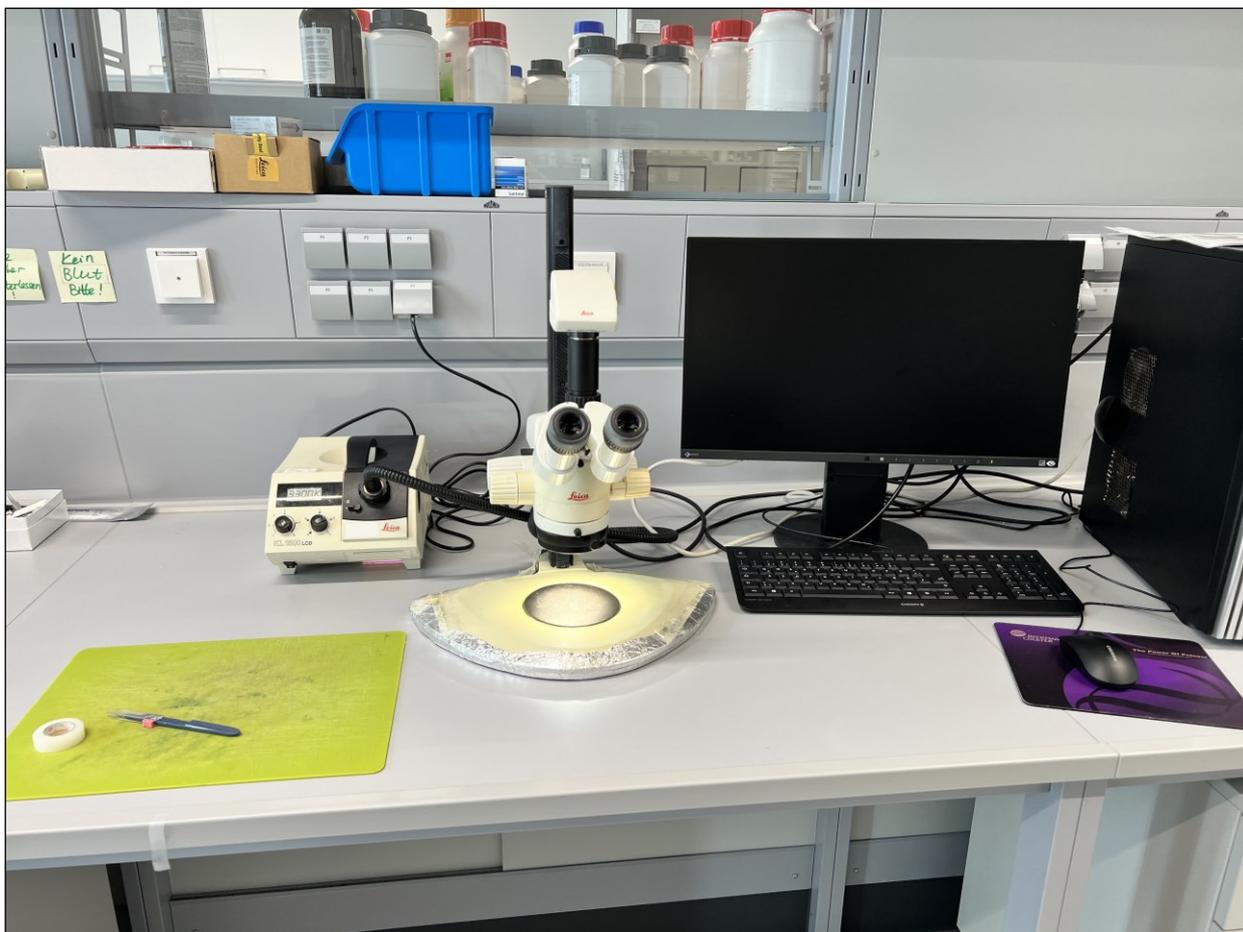
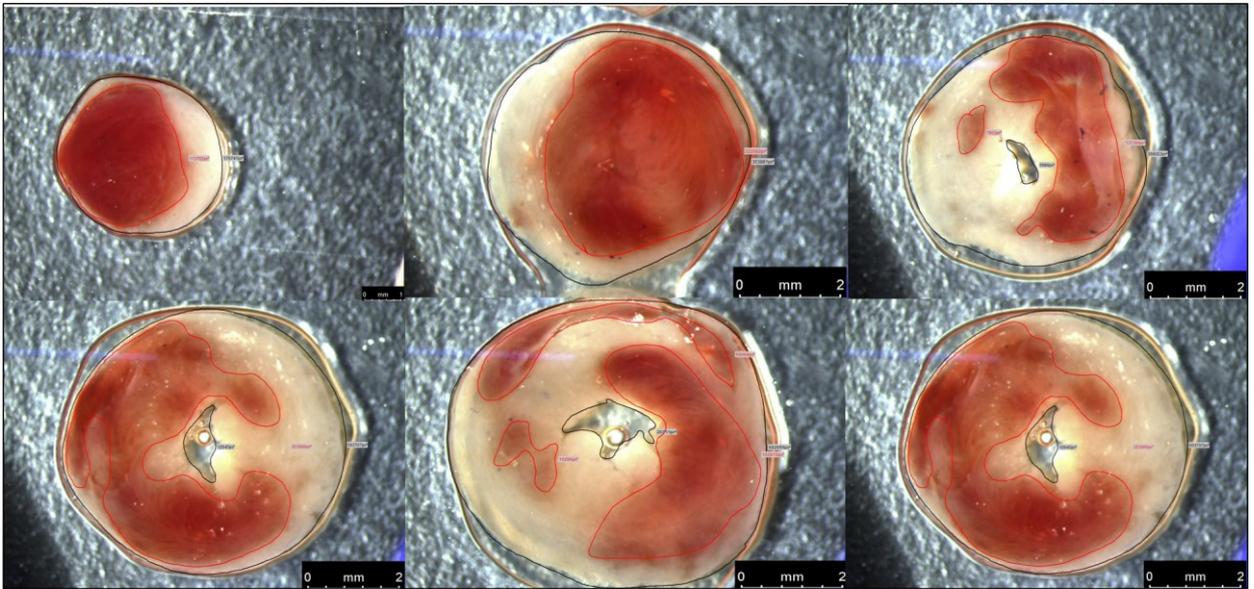


Abb. 8: Mikroskop für die TTC-Färbung



**Abb. 9: Beispielschnitte eines Herzens unter dem Mikroskop nach TTC-Färbung** mit markiertem vitalen Gewebe von Apex (oben links) bis zum Übergang der Klappenebene der Ventrikel (unten rechts)

Substanz	Spezifikation / Firma
2-,3-,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	25mg pro 6 Herzschnitte / Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
TTC-Lösungsmedium	Puffer bestehend aus Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (14,2g/L) und Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (12g/L); 2,5mL pro 6 Herzschnitte / Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Mikroskop	1500 LCD / Leica
Software	LAS X 3.3.3.16958 / Leica
Behältnisse	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf

**Tabelle 3: Verwendete Materialien bei der Herstellung und Analyse des TTC-Puffers**

## 2.5 Glukosetoleranztest

Zur Überprüfung der Exe-Wirkung wurde ein Glukosetoleranztest (GTT) sowohl bei DIO-Mäusen als auch bei DIO+Exe-Mäusen durchgeführt. Die Durchführung sowie die Erstellung der zugehörigen Grafiken wurde in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Medizin III der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Bodo Levkau, von Frau Dr. rer. nat. Sarah Weske, durchgeführt. Die anschließende Analyse und Einordnung der Daten im Rahmen der Dissertation erfolgten durch den Doktoranden selbst.

Für den GTT wurde den Versuchstieren zunächst für fünf Stunden das Futter entzogen. Anschließend wurde der Nüchtern-Blutzuckerwert bestimmt. Danach erfolgte eine intraperitoneale Injektion von Glukose, die zuvor in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf eine Konzentration von 20 % (w/v) gelöst wurde. Die applizierte Dosis betrug 2 mg Glukose pro Gramm Körpergewicht, basierend auf dem zuvor ermittelten Körpergewicht der Tiere.

Die Messung der Blutglukosekonzentration erfolgte mithilfe des Geräts „Accu-Chek“ (Firma ROCHE) zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten nach Injektion. Dafür wurde jeweils ein Tropfen Kapillarblut aus der Schwanzspitze gewonnen. Die Schwanzvene wurde hierzu mit einer Kanüle punktiert und im Anschluss desinfiziert. Um Messungenauigkeiten zu vermeiden, wurde der erste austretende Blutstropfen verworfen.

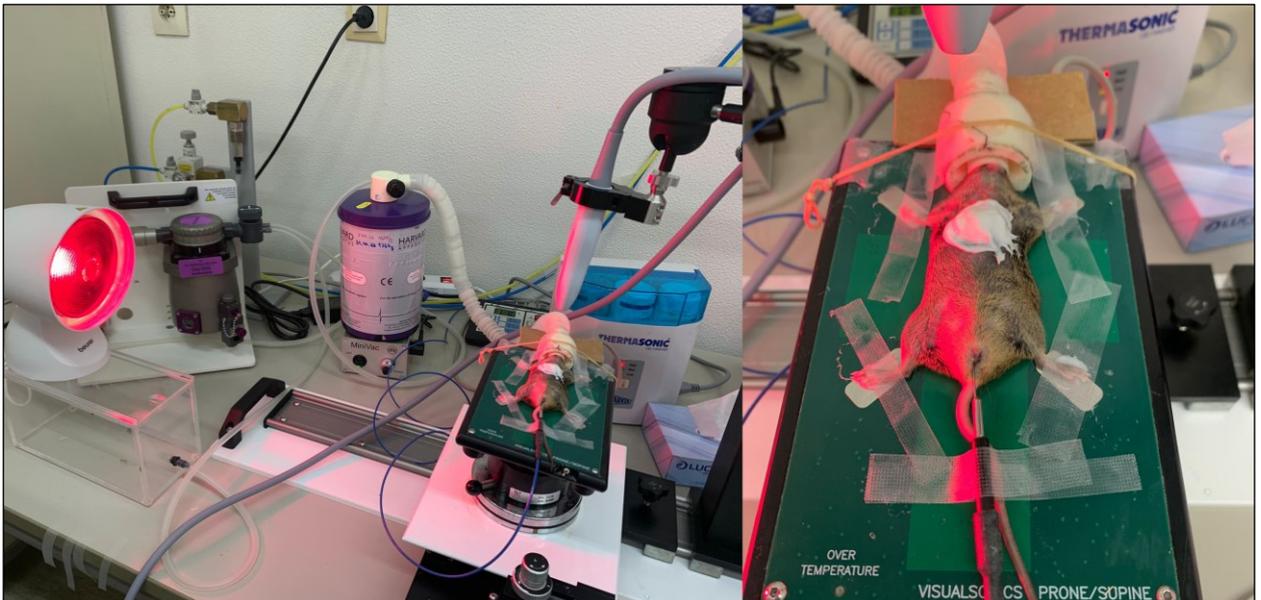
## 2.6 Murine Echokardiographie

Die diabetischen Mäuse ohne Exe-Behandlung sowie die diabetischen Mäuse mit Exe-Behandlung wurden in einem Alter von 36 Wochen jeweils vor und nach der Operation mittels transthorakaler Echokardiografie untersucht. Hierfür wurde das hochauflösende Gerät „MS400, VEVO 3100“ von VisualSonics Inc. mit Toronto-Schallkopf verwendet. Die Mäuse wurden anästhesiert, enthaart und auf dem Echokardiografietisch befestigt. Hierbei wurde der Fokus auf die Lange Achse (PLAX) und die Kurze Achse (PSAX), jeweils im M-Mode und im B-Mode, sowie auf den Mitralklappenfluss und den

Gewebedoppler gesetzt. Für den Fall einer später gewünschten Analyse wurde ebenfalls der Aortenklappenfluss gemessen. Die Bilder wurden digital gespeichert und mithilfe des Programmes VevoLab ausgewertet.

### Vorbereitung des Versuches

Zunächst wurden das Echokardiografiegerät sowie die Wärmelampe angeschaltet. Um dem Tierschutz gerecht zu werden wurde überprüft, ob ausreichend Isofluran in dem entsprechenden Behältnis vorhanden war, um ein zu frühes Erwachen der Maus zu verhindern. Anschließend wurde die jeweilige Maus in einer Induktionskammer mit einem 0,3% Isofluran-Sauerstoff-Gemisch für 3 Minuten anästhesiert und auf dem beheizten Echokardiografietisch positioniert. Hier wurde die Inhalationsnarkose mit einem 0,2% Isofluran-Sauerstoff-Gemisch aufrechterhalten. Die Pfoten der Maus wurden auf Elektroden positioniert, um ein murines EKG abzuleiten und die Vitalfunktionen der Maus zu überwachen und somit die Narkosetiefe steuern zu können. Außerdem wurde die Temperatur der Maus mittels Rektalsonde überwacht. Anschließend wurde das thorakale Fell mittels elektrischem Trimmer gekürzt. Auf das gekürzte Fell wurde Enthaarungscreme verteilt, um die Auflösung der Echokardiografie zu steigern.



**Abb. 10: Vorbereitete Maus auf dem Echokardiografietisch mit aufgetragener Enthaarungscreme** (Die Abbildung wurde nicht selbst aufgenommen und wird identisch in anderen Dissertationen der Arbeitsgruppe „AG Dannenberg“ verwendet)

### Durchführung des Versuches

Es wurde Ultraschallgel auf den enthaarten Thorax der Maus gegeben. Dann wurde der Ultraschallkopf aufgesetzt. Nun wurde die parasternal lange Achse (PLAX) im M-Mode sowie im B-Mode dargestellt. Im Anschluss daran wurde durch Drehung des Schallkopfes die kurze Achse (PSAX) in M-Mode und B-Mode dargestellt. Hierauf folgte die Einstellung des Vier-Kammer-Blickes, in welchem die Darstellung des Mitralklappenflusses (MV-Flow) und des Gewebedopplers (E') erfolgte. Abschließend wurde eine suprasternale Aufnahme des Aortenklappenflusses durchgeführt. Zu jeder genannten Einstellung erfolgte eine Aufnahme mittels des Ultraschallgerätes.

### Beendigung der Echokardiografie

Nach Anfertigung von entsprechenden Aufnahmen wurde die Narkose ausgeschlichen und die Maus zurück in ihren Käfig gesetzt. Bis die Maus vollständig erwachte, wurde eine durchgängige Wärmezufuhr mittels Wärmelampe sichergestellt. Von Beginn der Vorbereitung bis zum Ende des Versuches vergingen pro Maus in etwa 15-20 Minuten. Abschließend wurden die Aufnahmen gespeichert.

### Auswertung der Aufnahmen

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels VevoLab (Version 3.2.6). Durch die Aufnahmen konnten systolische, diastolische und strukturelle Parameter der Mausherzen erhoben werden. Die Systolischen und Diastolischen Parameter „Enddiastolisches Volumen“ (EDV), „Endsystolisches Volumen“ (ESV), „Ejektionsfraktion“ (EF), „Schlagvolumen“ (SV), „*Cardiac Output*“ (CO) sowie „*Fractional Shortening*“ (FS) wurden anhand der PLAX (Longitudinalen Achse) im *B-Mode* erhoben. Die strukturellen Parameter „diastolische Intraventrikuläre Septumdicke“ (IVSD;d), „MV E/E'“ sowie E/A wurden anhand der PLAX im *M-Mode* erhoben.

Weiterhin wurde anhand des B-Modes der PSAX (Kurze Achse) und der PLAX die myokardiale Strain ermittelt. Hierfür wurde das Myokard sowohl in der Enddiastole als auch in der Endsystole markiert. Das Programm errechnete durch Analyse der Bewegung der einzelnen Pixel die Verkürzung des Myokards.

<b>Gerät/Material</b>	<b>Typ und Hersteller/Konzentration</b>
Ultraschallkopf	MS400, VEVO 3100, VisualSonicsInc., Toronto
Ultraschallgerät	Vevo 3100, Visual Sonics, Fujifilm
Isofluran-Sauerstoff-Gemisch	3% Isofluran (Piramal), 40% Sauerstoff und 57% Raumluft
Ultraschallgel	Aquasonic, Roeser Mecica
Beheizte Kontaktplatte	Heated small animal op-table, 50-1247, Hugo Sachs
Enthaarungscreme	Veet, Reckitt Benckiser
Rotlichtlampe	Beurer IL-21

**Tabelle 4: Benötigte Materialien zur Durchführung der murinen Echokardiografie**

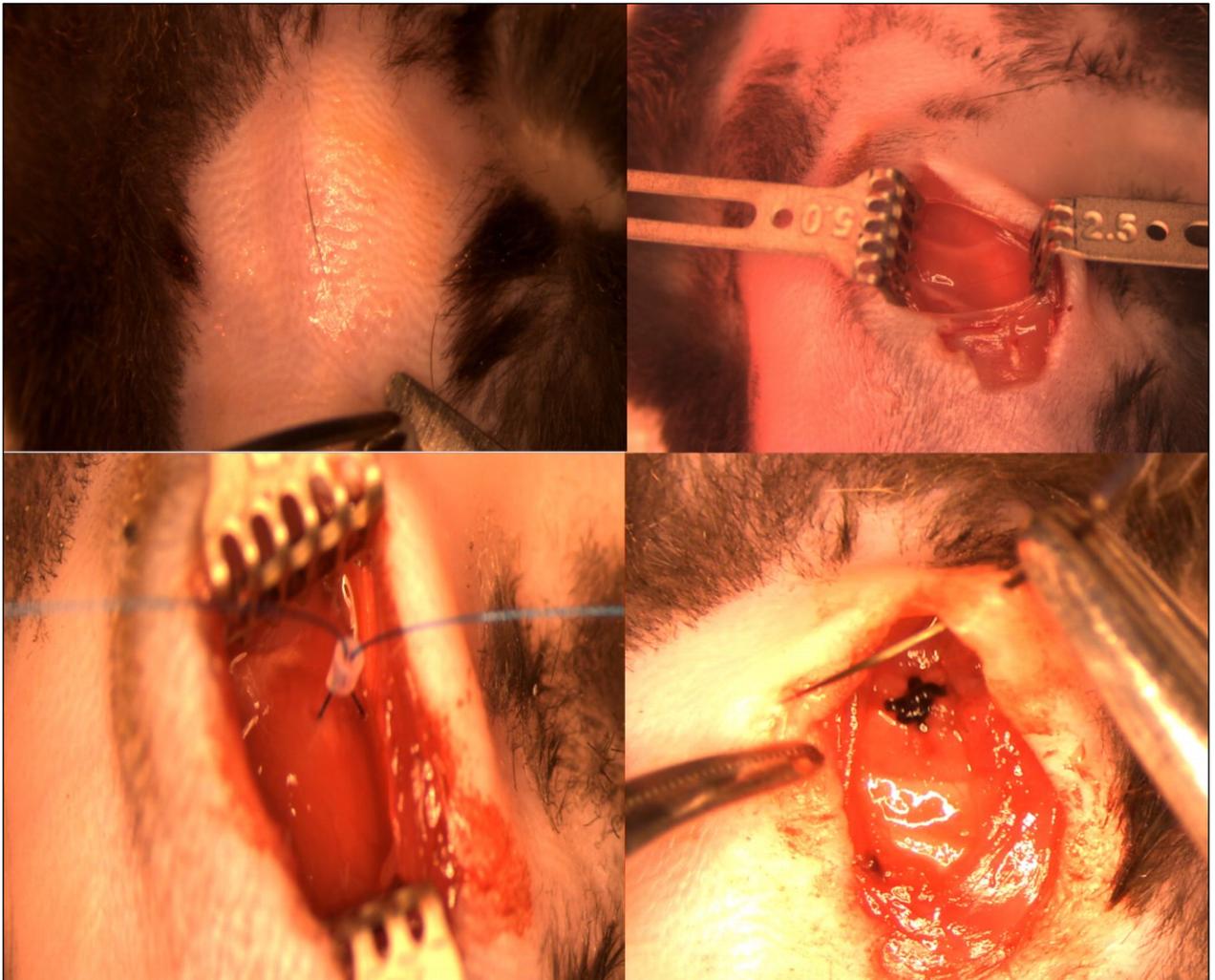
## **2.7 In-Vivo Operation: Ischämie und Reperfusion der LAD**

Die zuvor echokardiografierten DIO-Mäuse mit- und ohne Exe-Behandlung durchliefen eine Operation des Herzens, bei welcher die linke Vordere Koronararterie mittels Fäden für 30 Minuten okkludiert und danach wiedereröffnet wurde. Hierdurch soll das Modell des akuten Herzinfarktes des Menschen simuliert werden. Die Operationen wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe durch die Tierärztin und PhD-Doktorandin Frau Aylin Celik durchgeführt. Die Aufgabe des Doktoranden war die Assistenz bei dem Eingriff.

Zunächst wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Injektion mit Ketamin/Xylazin betäubt. Nach vollständigem Fehlen von Schmerzreflexen wurden die Mäuse mittels 20G Venenverweilkatheter intubiert. Über diesen Katheter wurde eine Beatmung mittels eines Gemisches aus 2% Isofluran und mit 40% Sauerstoff angereicherter Raumluft ermöglicht. Die intubierte Maus wurde, entsprechend dem Vorgehen der murinen Echokardiografie, an der ventralen Thoraxseite enthaart, ein EKG abgeleitet und die Sonde zur Messung der Rektaltemperatur eingeführt sowie die Wärmelampe eingeschaltet.

Zusätzlich erhielten die intubierten Mäuse eine Augencreme (Marke Bayer) zum Schutz der Cornea.

Nun wurde der Operationsbereich desinfiziert (Mittels Bacillol, Firma Hartmann). Die Operation der Mäuse erfolgte ab hier unter sterilen Bedingungen: Der Thorax wurde durch eine laterale Thorakotomie eröffnet und das Herz mit Sicht auf die LAD präpariert und dargestellt. Die LAD wurde mittels 7-0 Prolene Naht angeschlungen. Hiernach wurde eine Ligatur durch Aufnahme eines 0,6mm Polyethylenschlauches durchgeführt. Hierbei war darauf zu achten, dass die Naht bei jedem Mausherz an derselben Stelle zu liegen kam, um die infarktgefährdete Zone (*Area At Risk*) gleich groß zu halten. Die Okklusion wurde durch Nachweis eines Erblässens des Myokardes distal der Ligatur sowie einer ST-Streckenhebung im EKG nachgewiesen. Nach 30 Minuten erfolgte die Wiedereröffnung der LAD durch Durchtrennung der Ligatur. Die Rippen wurden mithilfe eines 4-0 Seide Fadens angenäht, hiernach Muskulatur und Haut mittels 5-0 Prolene-Naht. Darauf folgte die Extubation der Maus. Anschließend wurde die Maus in den Käfig zurückgesetzt und mittels Wärmelampe bis zum Erwachen warmgehalten. Postoperativ wurde den Mäusen Temgesic, 0,1mg/kg zur Analgesie verabreicht. Der gesamte Eingriff dauerte ca. 50-60 Minuten pro Maus.



**Abb. 11: Darstellung des operativen Verschlusses der LAD** (Die Abbildung wurde nicht selbst aufgenommen und wird identisch in anderen Dissertationen der Arbeitsgruppe „AG Dannenberg“ verwendet)

Gerät/Material/Chemikalie	Typ und Hersteller/Konzentration
Analgesie	Temgesic, 0,1mg/kg, s.c., maximal 10 ml/kg BW
Intubationsmaterial	Vasofix Safety Kanüle 20 G 1,1x25 mm, B.Braun
Isofluran-Sauerstoff-Gemisch	Isofluran 3-4vol% in 40% Sauerstoff angereicherter Raumluft
Muriner Respirator	MiniVent Type 845, Hugo Sachs
OP-Tisch mit Beheizungseinheit	Heated small animal op-table, 50-1247, Hugo Sachs
Oberflächen EKG	(Powerlab 8/35, <i>Software</i> : LabChart, ADInstruments)
Augensalbe	Bepanthen Augensalbe, Bayer AG
Nahtmaterial	7-0 Prolene, 5-0 Prolene, 4-0 Seide, Ethicon
LAD Ligatur	0,6mm Polyethylenschlauch
Octenidin Desinfektionsmittel	Octenisept, SCHÜLKE & MAYR GmbH
Enthaarungscreme	Veet, Reckitt Benckiser

**Tabelle 5: Benötigte Materialien zur I/R-Operation**

## 2.8 OROBOROS-Analyse

Das Verfahren zur Beurteilung der Mitochondrienfunktion in Kardiomyozyten mittels des OROBOROS O2k-Geräts umfasste die folgende Vorgehensweise:

Gewebeproben aus Mausherzen wurden in sauerstoffangereicherte Kammern gegeben. Die Organe wurden zuvor von dem Doktoranden selbst entnommen, während die anschließende Durchführung der OROBOROS-Analysen von der PhD-Studentin Frau Khatereh Shahrjerdi übernommen wurde: Aus standardisierten 10 mg Gewebeproben des linken Ventrikels, gewaschen mit MiR05-Puffer, wurden kleinere Stücke à 0,7 mg präpariert.

Die Kammern des Geräts wurden mit vorgewärmtem MiR05 (37°C) gefüllt, kalibriert und die Gewebeproben bei einer Sauerstoffkonzentration von 450 nmol/L eingebracht. Anschließend erfolgte die Zugabe von Substraten wie Malat, Octanoylcarnitin, ADP,

Glutamat und Succinat, gefolgt von spezifischen Hemmstoffen der Atmungskette (Oligomycin, FCCP, Antimycin A). Nach jeder Substanzgabe wurde der Sauerstoffverbrauch bestimmt.

## 2.9 Western Blot-Analyse

Die Western Blot-Analyse ermöglicht die Isolierung und Detektion spezifischer Proteine im Gewebe. In diesem Projekt wurden die Glukosetransporter GLUT4 und GLUT1 in Kardiomyozyten untersucht. Während die Organentnahme und Gewebepreparation von dem Doktoranden selbst durchgeführt wurden, übernahm die PhD-Studentin Frau Khaterah Shahrjerdi die Durchführung sowie Auswertung dieses Versuchs:

Etwa 10 mg Gewebe aus dem linken Ventrikel der DIO-Herzen (behandelt und unbehandelt) wurden entnommen, verdünnt und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Proteintrennung erfolgte per SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel)-Elektrophorese: Zunächst wurden 70 V angelegt, bis die Proben durch das Gel wanderten, anschließend wurden 120 V für zwei Stunden angelegt. Danach wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (90 Minuten, 40 V). Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Membran geblockt, mit primären Antikörpern über Nacht inkubiert, gewaschen und anschließend mit Sekundärantikörpern behandelt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels LI-COR *Imaging*, die Auswertung wurde mit ImageJ und Empiria Studio™ durchgeführt.

## 2.10 Statistik und Auswertungsprogramme

Zur quantitativen Erhebung aller Ergebnisse wurden statistische Tests unter Verwendung der *Software* GraphPad-Prism® durchgeführt. Zunächst wurde jede Gruppe auf eine vorliegende Normalverteilung mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Der Shapiro-Wilks-Test zeigt sich als passende Methode zur Feststellung einer Normalverteilung bei kleineren Versuchsgruppen<sup>75</sup>. Sofern nicht anders angegeben, wurde das Vorliegen einer Normalverteilung ermittelt und ein zweiseitiger parametrischer t-Test für zwei unverbundene Stichproben durchgeführt. Hiermit wird überprüft, ob sich die

Mittelwerte zwischen zwei unabhängigen Gruppen unterscheiden<sup>76</sup>. In Einzelfällen lag keine Normalverteilung vor, sodass ein nichtparametrischer Mann-Whitney-U-Test durchgeführt wurde. Dieser Test eignet sich als Alternative zum t-Test, wenn keine Normalverteilung vorliegt<sup>77</sup>. In diesen Fällen wird im Ergebnisteil explizit auf die Anwendung des U-Tests hingewiesen. Zur besseren Vergleichbarkeit werden in allen Gruppen, unabhängig vom ausgewählten Test, die Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der jeweiligen Anzahl von Tieren (n) dargestellt. Hinsichtlich der Signifikanz wurde ein p-Wert von  $<0,05$  als signifikant, ein p-Wert von  $<0,01$  als sehr signifikant und ein p-Wert von  $<0,001$  als hochsignifikant angenommen.

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
GraphPad-Prism <sup>®</sup> 5 for Windows	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA 92037 USA
DiskusViewer Version 4.8.1.1620	Technisches Buero Hilgers, Königswinter

**Tabelle 6: Benötigte Software für die Auswertung der generierten Daten dieser Dissertation**

### 3. Ergebnisse

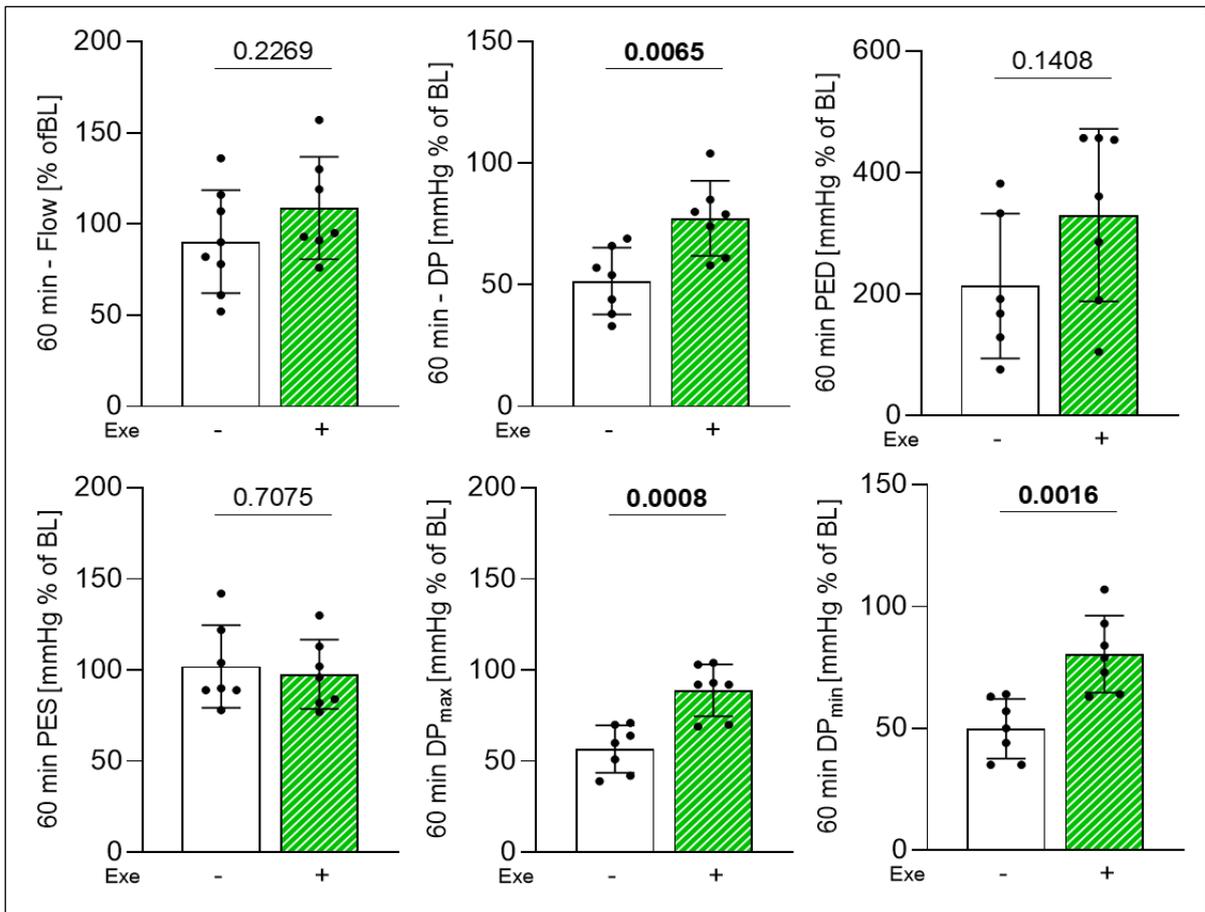
Im folgenden Ergebnisteil werden sämtliche Resultate dargestellt, die im Methodenteil beschrieben wurden. Einzelne Experimente wurden im Rahmen einer engen Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe „AG Dannenberg“ sowie mit kooperierenden Forschungseinrichtungen durchgeführt und konnten aus technischen oder organisatorischen Gründen nicht vollständig durch den Doktoranden allein ausgeführt werden.

Die konzeptionelle Planung, das Verfassen des Amendments zum Tierversuchsantrag, die Bestellung, Pflege und Behandlung der Tiere sowie die Entnahme der erforderlichen Organe wurden jedoch eigenständig vom Doktoranden übernommen. Die anschließende Einordnung der erhobenen Daten im Rahmen dieser Dissertation erfolgten ebenfalls durch den Doktoranden, weshalb die betreffenden Ergebnisse in den Ergebnisteil aufgenommen wurden.

#### 3.1 *Ex-Vivo*-Ergebnisse

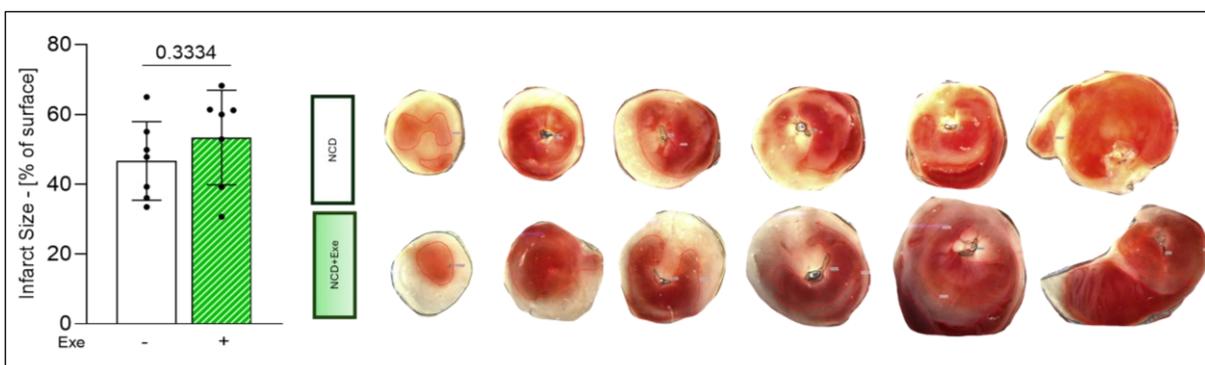
##### 3.1.1 Nicht-Diabetisches Mausmodell (NCD)

Die kurzzeitige Behandlung Exe (25ng/mL) verbessert die Kontraktionskraft bei NCD-Mäusen: Es zeigte sich eine Verbesserung der myokardialen Kontraktion (DP NCD  $51,57 \pm 13,75\%$  des BL vs. NCD+Exe  $77,29 \pm 15,45\%$  des BL,  $p = 0,0065$ ; DPmax NCD  $56,71 \pm 12,96\%$  des BL vs. NCD+Exe  $89,00 \pm 14,24\%$  des BL,  $p = 0,0008$ ; DPmin NCD  $49,71 \pm 12,24\%$  des BL vs. NCD+Exe  $80,43 \pm 15,85\%$  des BL,  $p = 0,0016$ ) bei unverändertem *Flow* (NCD  $90,25 \pm 28,22\%$  des BL vs. NCD+Exe  $108,7 \pm 28,02\%$  des BL,  $p = 0,2269$ ). Der Enddiastolische- sowie der Endsystolische Druck unterschieden sich ebenfalls nicht zwischen den Gruppen (PED NCD  $213,3 \pm 119,4\%$  des BL vs. NCD+Exe  $330,0 \pm 141,9\%$  des BL,  $p = 0,1408$ ); PES NCD  $102,0 \pm 22,59\%$  des BL vs. NCD+Exe  $97,71 \pm 18,98\%$  des BL,  $p = 0,7075$ ; Abb. 12).



**Abb. 12:** Grafische Darstellung der Langendorff-Ergebnisse von NCD-Mäusen vs. NCD-Mäusen mit Exe-versetztem Perfusat

Weiterhin konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Infarktgröße zwischen den Gruppen festgestellt werden (IS NCD  $46,66 \pm 11,23\%$  des BL vs. NCD+Exe  $53,37 \pm 13,5\%$  des BL,  $p = 0,334$ ; Abb. 13).

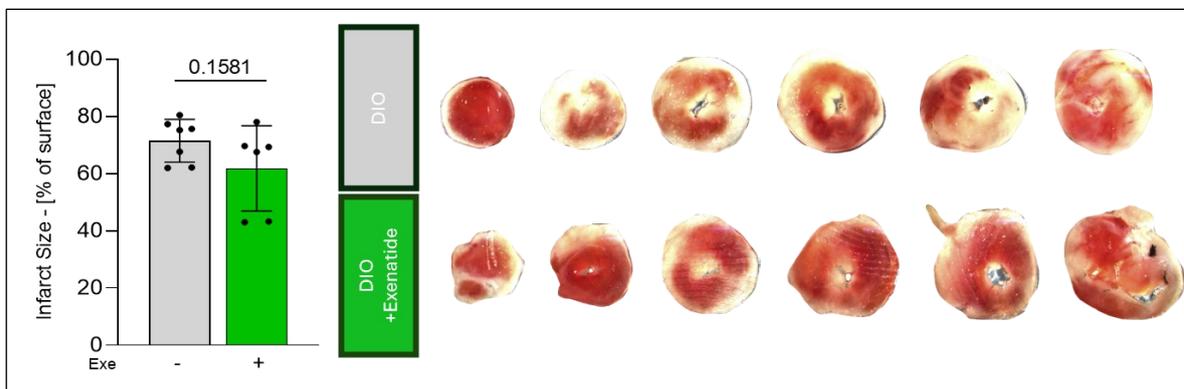


**Abb. 13:** Grafische Darstellung der Infarktgröße nach Langendorff-induziertem Infarkt von NCD-Mäusen vs. NCD-Mäusen mit Exe-versetztem Perfusat

### 3.1.2 Diabetisches Mausmodell (DIO)

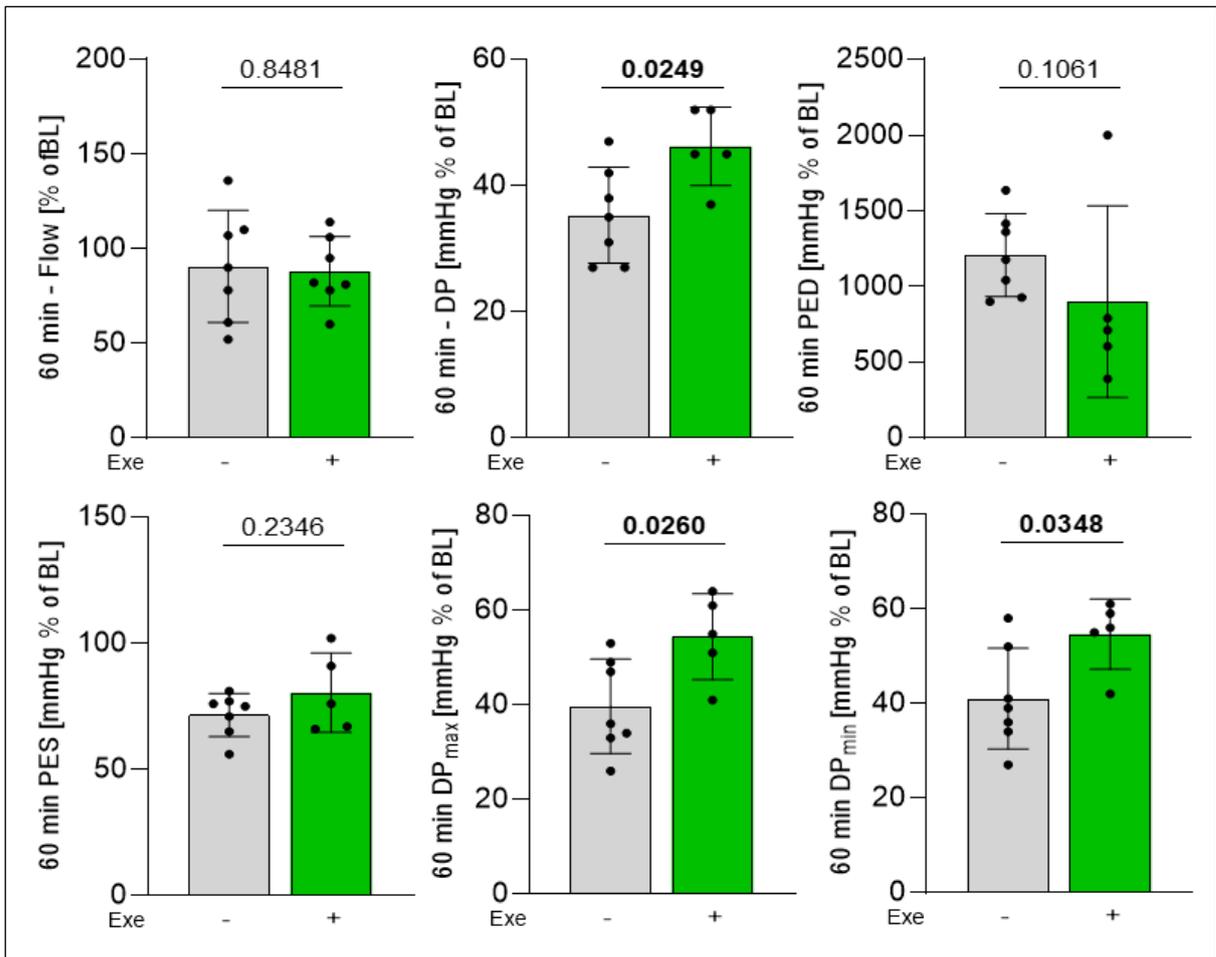
Exe-Behandlung verbessert die Kontraktilität nach MIs von DIO-Mäusen im *ex-vivo* Modell:

In diesem Rahmen wurden Herzen von langzeitbehandelten Mäusen in das Langendorff-perfundierte Herzmodell überführt und anschließend einer 40-minütigen globalen Ischämie unterzogen. Im Anschluss erfolgte eine 2-stündigen Reperfusion. Hier war die Infarktgröße ebenfalls unbeeinflusst (DIO  $71,49 \pm 7,50\%$  des BL vs. DIO+Exe  $61,81 \pm 14,92\%$  des BL,  $p = 0,1581$ , Abb. 14).



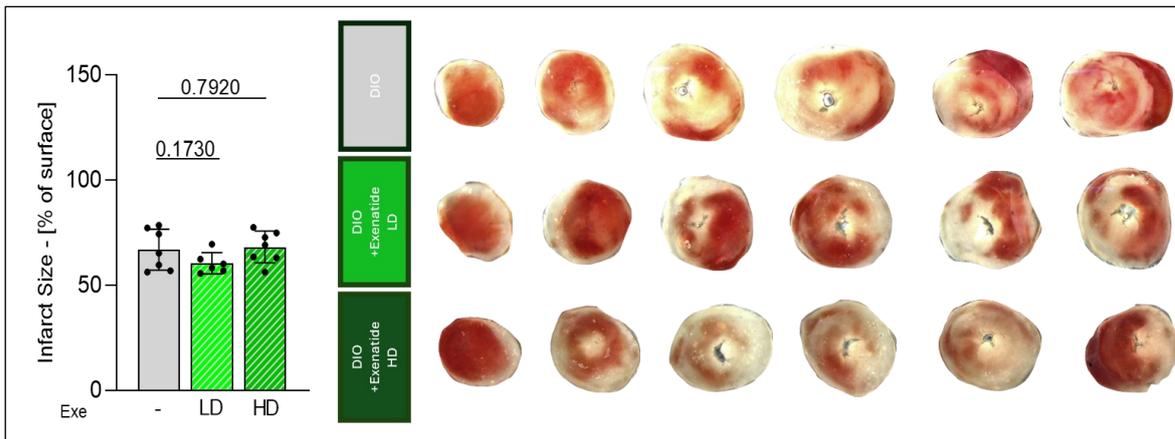
**Abb. 14: Grafische Darstellung der Infarktgröße nach Langendorff-induziertem Infarkt von DIO-Mäusen vs. DIO+Exe behandelten Mäusen**

Dennoch wiesen die Herzen der behandelten Mäuse eine verbesserte kardiovaskuläre Erholung auf, die sich in einem erhöhten Derivatdruck (DP DIO  $35,29 \pm 7,59\text{mmHg\%}$  des BL vs. DIO+Exe  $46,20 \pm 6,22\text{mmHg\%}$  des BL,  $p=0,0249$ ) sowie einer verbesserten Kontraktion (dpmax DIO  $39,71 \pm 9,96\text{mmHg\%}$  des BL vs. DIO+Exe  $54,40 \pm 9,04\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,0260$ ) und Relaxation (dpmin DIO  $41,00 \pm 10,68\text{mmHg\%}$  des BL vs. DIO+Exe  $54,60 \pm 7,44\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,0348$ ) äußerten, wobei der Koronarfluss (*Flow* DIO  $90,57 \pm 29,53\text{mL/min\%}$  des BL vs. DIO+Exe  $88,0 \pm 18,34\text{mL/min\%}$  des BL,  $p = 0,8481$ ), der enddiastolische Druck (PED DIO  $1208,0 \pm 273,9\text{mmHg\%}$  des BL vs. DIO+Exe  $899,6 \pm 633,2\text{mmHg\%}$  des BL,  $899,6 \pm 633,2$ ;  $p = 0,1061$ ) und der end-systolische Druck (PES DIO  $71,57 \pm 8,52\text{mmHg\%}$  des BL vs. DIO+Exe  $80,40 \pm 15,69\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,2346$ ; Abb. 15) unverändert blieben. Bei der Berechnung des PED wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, da in der DIO+Exe-Gruppe keine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 15:** Grafische Darstellung der Langendorff-Ergebnisse von DIO-Mäusen vs. DIO+Exe behandelten Mäusen

Zur weiteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen zirkulierenden und lokalen kardiovaskulären Effekten wurde die *Ex-vivo*-Perfusion von DIO-Herzen mit einem mit Exe angereicherten Puffer im Vergleich zu normalen Pufferbedingungen mit zwei verschiedenen Dosierungen analysiert. (*Lowdose* (LD): 25ng/mL; *Highdose* (HD): 420ng/mL). Es konnte festgestellt werden, dass die Größe des Infarktes in diesem Fall ebenfalls nicht signifikant verändert ist (IS DIO  $66,90 \pm 9,71\%$  vs. DIO+Exe LD  $60,47 \pm 5,04\%$ ,  $p = 0,1730$  und DIO vs. DIO+Exe HD  $68,16 \pm 7,56\%$ ,  $p = 0,7920$ ; Abb. 16).



**Abb. 16: Grafische Darstellung der Infarktgröße nach Langendorff-induziertem Infarkt von DIO-Mäusen vs. DIO-Mäusen mit Exe-versetztem Perfusat, Lowdose (LD) sowie Highdose (HD)**

Es konnte weder durch die Anwendung einer niedrigen Dosierung von Exe-Puffer noch durch die Anwendung einer hohen Dosierung eine signifikante Verbesserung der kardialen Kontraktilität erreicht werden (*Flow* DIO  $90,57 \pm 29,53\text{mL/min\%}$  des BL vs. DIO+Exe LD  $71,33 \pm 10,05\text{mL/min\%}$  des BL,  $p = 0,1582$  und DIO vs. DIO+Exe HD  $68,29 \pm 24,88\text{mL/min\%}$  des BL,  $p = 0,1527$ ; *DP* DIO  $35,29 \pm 7,59\text{mmHg\%}$  des BL vs. DIO+Exe LD  $38,00 \pm 7,01\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,5195$  und DIO vs. DIO+Exe HD  $41,00 \pm 16,35\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,3946$ ; *PED* DIO  $1208,0 \pm 273,9\text{mmHg\%}$  des BL vs. DIO+Exe LD  $952,4 \pm 277,6\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,1440$  und DIO vs. DIO+Exe HD  $1227,0 \pm 688,0\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,9462$ ; *PES* DIO  $71,57 \pm 8,52\text{mmHg\%}$  des BL vs. DIO+Exe LD  $67,67 \pm 9,89\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,4602$  und DIO vs. DIO+Exe HD  $87,43 \pm 27,89\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,1758$ ; *DPmax* DIO  $39,71 \pm 9,96\text{mmHg\%}$  des BL vs. DIO+Exe LD  $36,20 \pm 10,2\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,5568$  und DIO vs. DIO+Exe HD  $44,14 \pm 22,03\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,6366$ ; *DPmin* DIO  $41,00 \pm 10,68\text{mmHg\%}$  des BL vs. DIO+Exe LD  $38,67 \pm 7,99\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,6691$  und DIO vs. DIO+Exe HD  $44,14 \pm 14,92\text{mmHg\%}$  des BL,  $p = 0,6584$ ; Abb. 17).

Bei der Berechnung des *DPmax* zwischen den Gruppen „DIO“ sowie „DIO+Exe LD“ wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, da in der DIO+Exe LD-Gruppe keine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte.

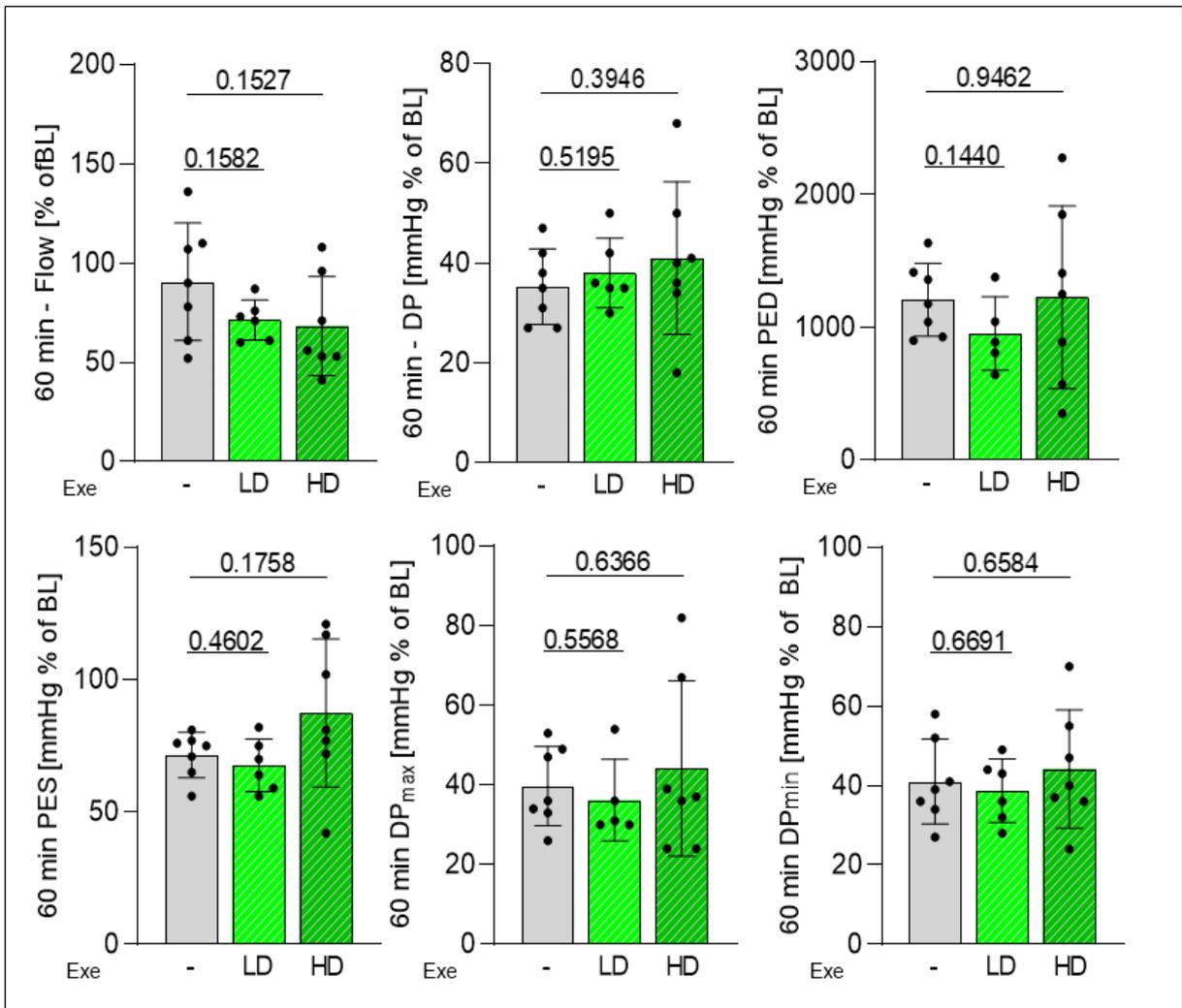


Abb. 17: Grafische Darstellung der Langendorff-Ergebnisse von DIO-Mäusen vs. DIO-Mäuse mit Exe-versetztem Perfusat, *Lowdose* (LD) sowie *Highdose* (HD)

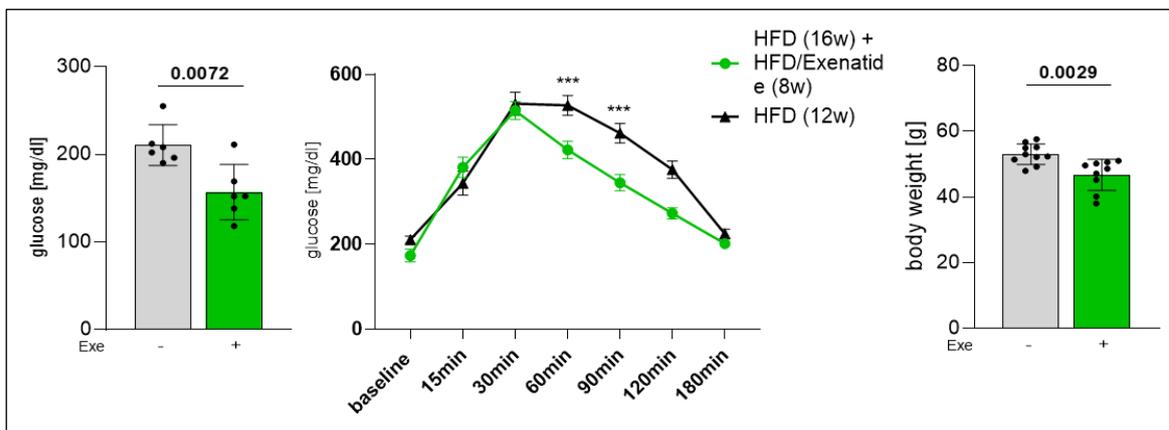
### 3.2 *In-Vivo*-Ergebnisse

#### 3.2.1. Basisdaten und Echokardiografie-Parameter vor MI

Im Rahmen dieser Untersuchung konnte eine verbesserte diastolische Funktion sowie eine Optimierung struktureller Parameter bei DIO-Mäusen vor einem MI festgestellt werden. *In-vivo*-Langzeit-Exe scheint einen signifikanten Einfluss auf diese Parameter zu haben:

Im Rahmen der Studie wurde über einen Zeitraum von acht Wochen eine Behandlung von Mäusen mit Exe durchgeführt. Im Anschluss an die Behandlung wurde mittels Echokardiografie eine Untersuchung der Herzfunktion vorgenommen. Die Ergebnisse

zeigen, dass Mäuse, die mit Exe behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten DIO-Mäusen signifikant bessere Nüchternblutzuckerspiegel, eine verbesserte Glukosetoleranz und ein geringeres Körpergewicht aufwiesen (Blutzucker DIO  $210,5 \pm 23,2$  mg/dl vs. DIO+Exe  $156,7 \pm 31,60$  mg/dl,  $p = 0,0072$ ; Körpergewicht DIO  $53,03 \pm 3,1$  g vs. DIO+Exe  $46,71 \pm 4,7$  g,  $p = 0,0029$ , Abb. 18). Die Durchführung sowie die Erstellung der zugehörigen Graphiken der hierfür notwendigen GTTs, der Basis-Glukosewerte sowie der Körpergewichtswerte nach acht Wochen Exe-Injektion wurden in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Medizin III der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Bodo Levkau, von Frau Dr. rer. nat. Sarah Weske durchgeführt.

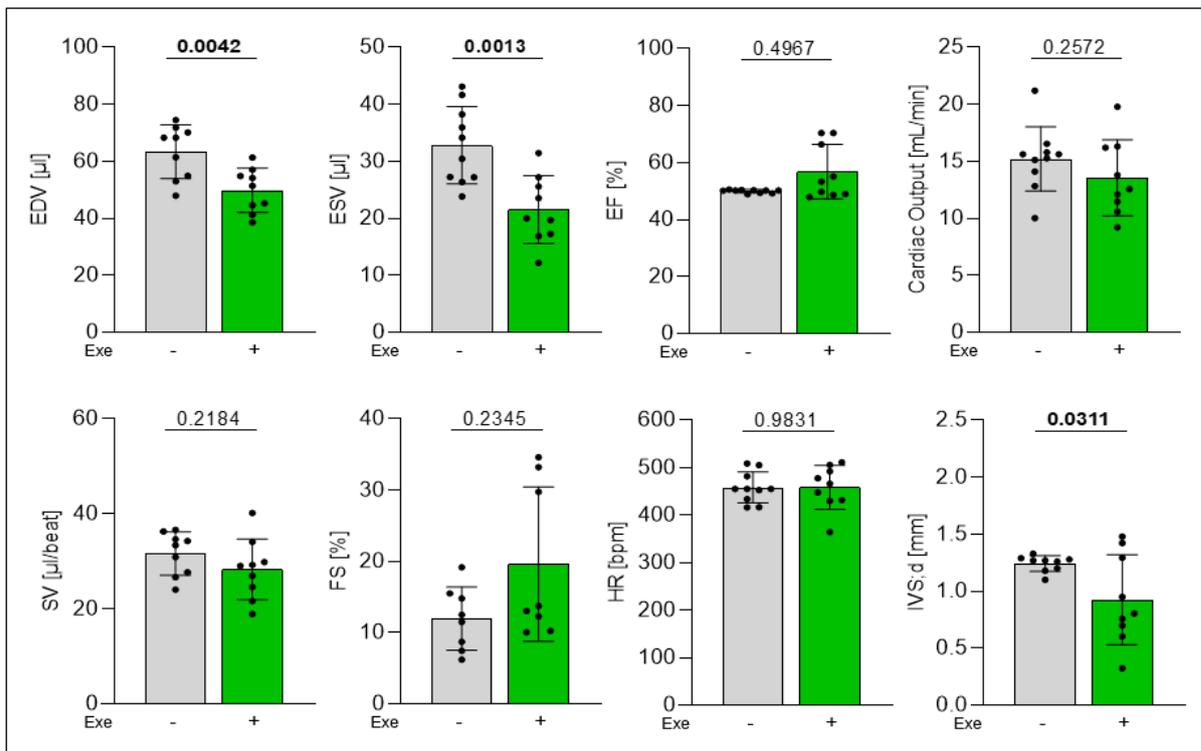


**Abb. 18: Grafische Darstellung der Wirksamkeit der Exe-Behandlung im DIO-Modell**, die Durchführung des Versuchs sowie die Abbildungserstellung erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Sarah Weske. Zu sehen sind (von links nach rechts) die basalen Glukosewerte, ein Glukosetoleranztest sowie die Körpergewichte von DIO-Mäusen nach zwölf Wochen HFD, im Vergleich zu DIO-Mäusen nach 16 Wochen HFD und weiteren acht Wochen HFD+Exe

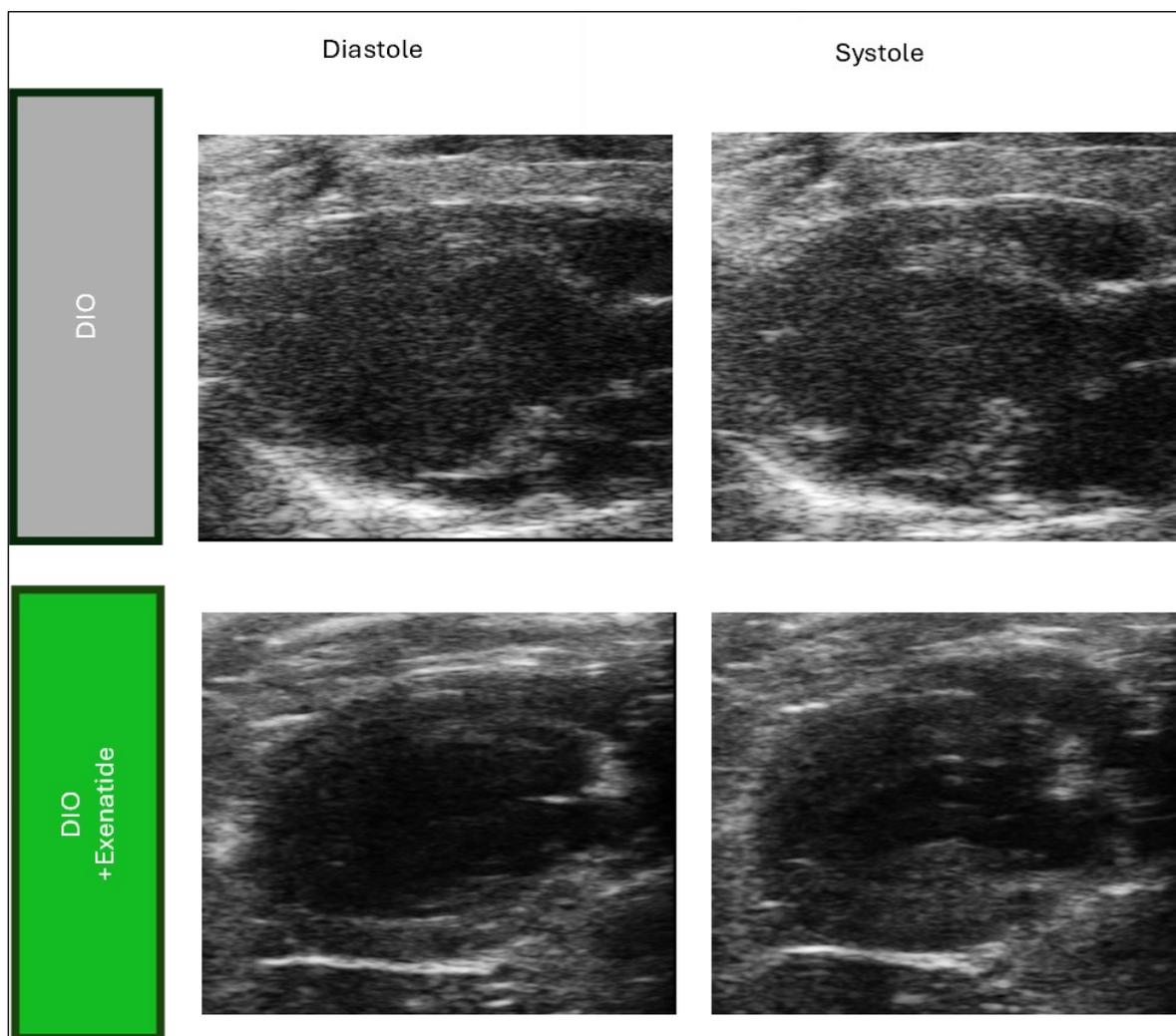
Die Echokardiografie von Mäusen offenbarte eine verbesserte kardiale Remodellierung, die sich in einer Reduktion des enddiastolischen und des endsystolischen Volumens manifestierte (EDV DIO  $63,37 \pm 9,42\mu\text{L}$  vs. DIO+Exe  $49,82 \pm 7,73\mu\text{L}$ ,  $p = 0,0042$ ; ESV DIO  $32,82 \pm 6,79\mu\text{L}$  vs. DIO+Exe  $21,53 \pm 5,95\mu\text{L}$ ,  $p = 0,0013$ ). Die Ejektionsfraktion, die kardiale Auswurfleistung, das Schlagvolumen, sowie die fraktionelle Verkürzung blieben unverändert. (EF DIO  $49,98 \pm 0,57\%$  vs. DIO+Exe  $56,8 \pm 9,57\%$ ,  $p = 0,4967$ ; CO DIO  $15,22 \pm 2,83\text{mL}/\text{min}$  vs. DIO+Exe  $13,56 \pm 3,33\text{mL}/\text{min}$ ,  $p = 0,2572$ ; SV DIO  $31,63 \pm 4,54\mu\text{L}/\text{Schlag}$  vs. DIO+Exe  $2829 \pm 6,39\mu\text{L}/\text{Schlag}$ ,  $p = 0,2184$ ; FS DIO  $11,98 \pm 4,42\%$  vs. DIO+Exe  $19,62 \pm 10,86\%$ ,  $p = 0,2345$ ). Des Weiteren zeigte

sich eine Reduktion der Interventrikelseptumdicke (IVS;d DIO  $1,24 \pm 0,07\text{mm}$  vs. DIO+Exe  $0,93 \pm 0,40\text{mm}$ ,  $p = 0,0311$ ). Die Analyse der Herzfrequenz ergab keine signifikanten Unterschiede (HR DIO  $458,2 \pm 32,37\text{bpm}$  (beats per minute) vs. DIO+Exe  $458,6 \pm 46,21\text{bpm}$ ,  $p = 0,9831$ ; Abb. 19).

Bei der Berechnung der EF und des FS wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, da in beiden Fällen keine Normalverteilung in allen Gruppen nachgewiesen werden konnte (EF: DIO und DIO+Exe nicht normalverteilt, FS: DIO+Exe nicht normalverteilt).



**Abb. 19: Systolische sowie strukturelle Echokardiografische Parameter DIO vs. DIO+Exe jeweils vor einem MI**



**Abb. 20:** Beispielhafte Darstellung DIO vs. DIO+Exe in der Longitudinalen Achse in der Echokardiografie, jeweils in der Diastole sowie in der Systole

Im Hinblick auf die Herzfunktion wurde bei den behandelten Mäusen eine signifikante Verbesserung der diastolischen Dysfunktion beobachtet. Diese äußerte sich in einem erhöhten E/A- und reduzierten E/E'-Wert. (E/A DIO  $1,28 \pm 0,12$  vs. DIO+Exe  $1,49 \pm 0,14$ ,  $p = 0,0054$ ; E/E' DIO  $37,34 \pm 9,14$  vs. DIO+Exe  $-15,45 \pm 3,79$ ,  $p = <0,0001$ , Abb. 21).

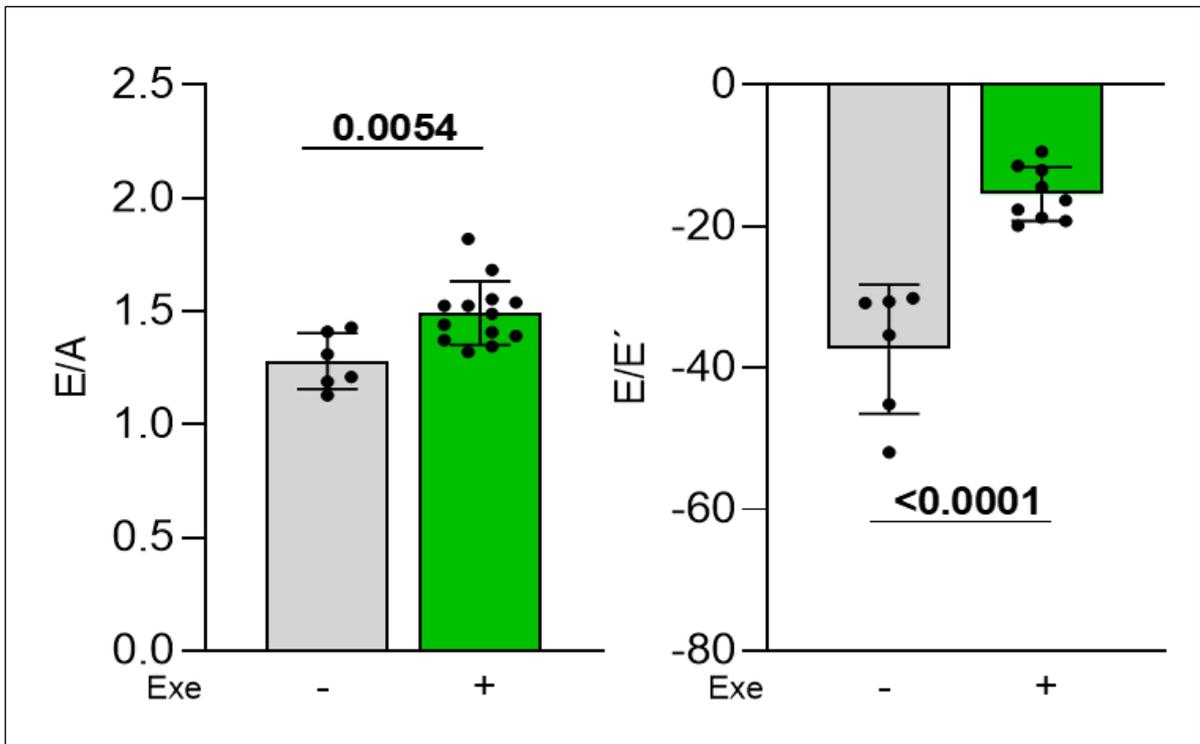
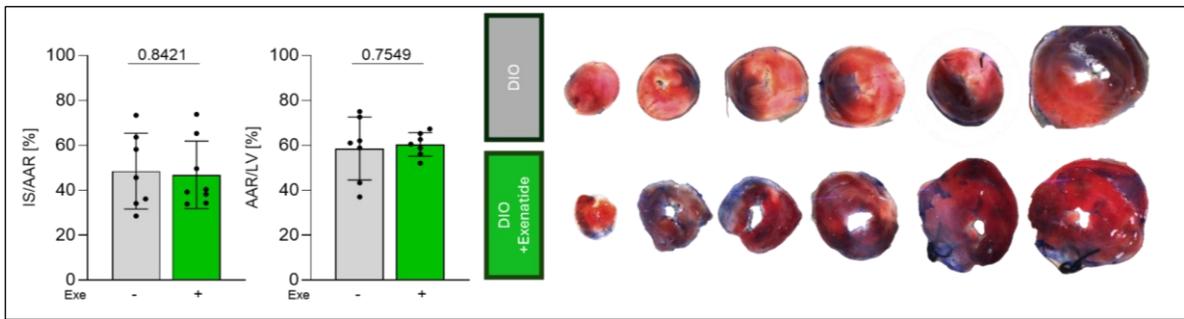


Abb. 21: Diastolische Echokardiografie-Parameter DIO vs. DIO+Exe jeweils vor einem MI

### 3.2.2 Echokardiografie-Parameter, Strain und Infarktgröße nach MI

*In-Vivo*-Langzeit-Exe führt zu einer Verbesserung des systolischen Funktionsergebnisses bei DIO-Mäusen über die Verringerung der Infarktgröße hinaus:

Im Rahmen der Untersuchung der Auswirkungen von Exe auf die Myokardischämie *in-vivo* wurden langfristig behandelte Mäuse in die IR-Operation überführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Infarktgröße in unserem Modell durch die Exe-Behandlung nicht reduziert wurde. (AAR (Area at risk)/LV DIO  $58,61 \pm 14,05\%$  vs. DIO+Exe  $60,42 \pm 5,27\%$ ,  $p = 0,7549$ ; IS/AAR DIO  $48,56 \pm 16,87\%$  vs. DIO+Exe  $46,89 \pm 14,99\%$ ,  $p = 0,8421$ , Abb. 22).

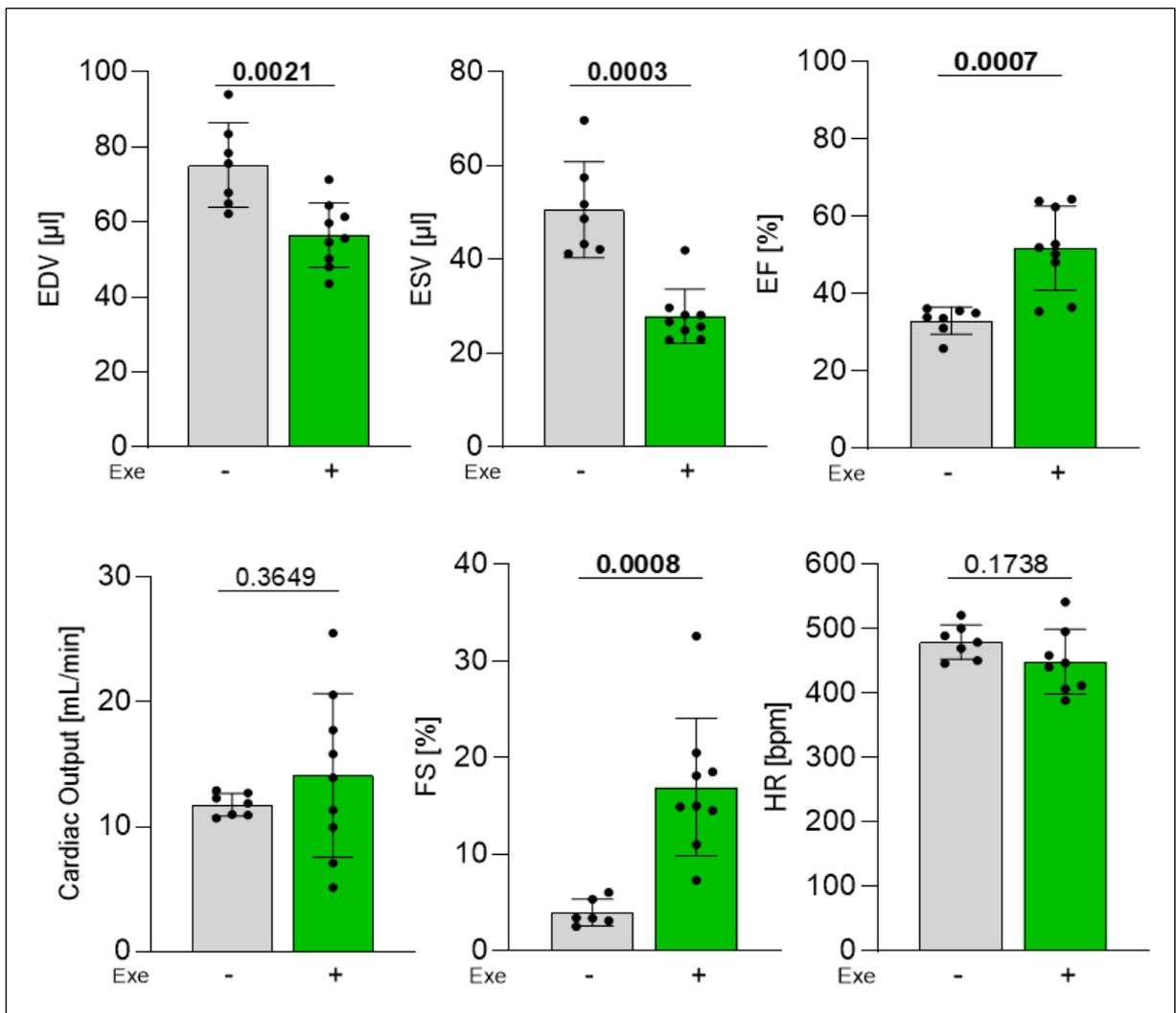


**Abb. 22: Grafische Darstellung der Infarktgrößenbestimmung nach TTC-Färbung DIO vs. DIO+Exe**

Es konnte eine signifikante Verbesserung der systolischen Herzfunktion 24 Stunden nach I/R mit erhöhter Auswurfraction und fraktioneller Verkürzung im Vergleich zu den unbehandelten DIO-Kontrollen beobachtet werden (EF DIO  $33,05 \pm 3,57$  % vs. DIO+Exe  $51,8 \pm 10,86$  %,  $p = 0,0007$ ; FS DIO  $3,97 \pm 1,93$  % vs. DIO+Exe  $16,95 \pm 7,11$  %,  $p = 0,0008$ ). Die Herzen erschienen kompakter (EDV DIO  $75,22 \pm 11,26$   $\mu\text{l}$  vs. DIO+Exe  $56,57 \pm 8,63$   $\mu\text{l}$ ,  $p = 0,0021$ ; ESV DIO  $50,65 \pm 10,23$   $\mu\text{l}$  vs. DIO+Exe  $27,93 \pm 5,77$   $\mu\text{l}$ ,  $p = 0,0003$ ) bei unverändertem Herzzeitvolumen (CO DIO  $11,76 \pm 0,89$   $\mu\text{l}$  vs. DIO+Exe  $14,12 \pm 6,55$   $\mu\text{l}$ ,  $p = 0,3649$ ) und unveränderter Herzfrequenz (HR DIO  $479,7 \pm 26,77$   $\mu\text{l}$  vs. DIO+Exe  $449 \pm 50,32$   $\mu\text{l}$ ,  $p = 0,1738$ ; Abb. 23).

Bei der Berechnung des ESV wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, da in der DIO+Exe-Gruppe keine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte.

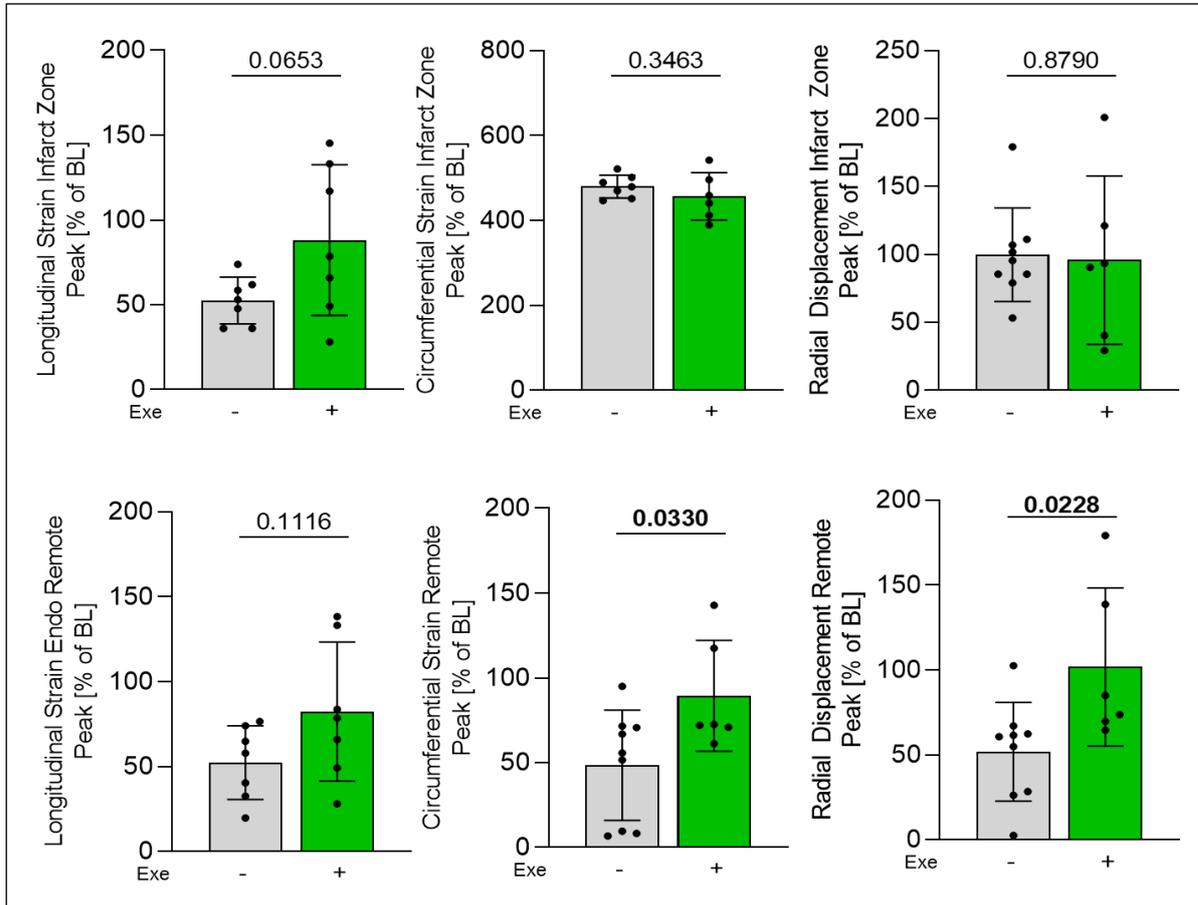
Bei den postischämischen Ergebnissen wurden die Parameter „SV“, „IVSD;d“, „E/A“ sowie „E/E“ nicht in die Auswertung aufgenommen, da bei einem Teil der Mäuse aufgrund unvollständiger Messwerte keine valide Interpretation stattfinden konnte.



**Abb. 23:** Grafische Darstellung der systolischen Echokardiografie-Parameter DIO vs. DIO+Exe nach MI

Aufgrund der systolischen Funktionsverbesserung wurde eine Untersuchung der Myokardfunktion getrennt nach Infarktgebiet und nicht infarziertem Myokard (*Remote*-Bereich) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Verschlechterung der Herzmuskelfunktion in Prozent gegenüber dem Ausgangswert durch die Exe-Behandlung nur im Remote-Bereich verbessert wurde. (Infarktzone: *Longitudinal Strain* Endo DIO  $52,47 \pm 13,81\%$  vs. DIO+Exe  $88,15 \pm 44,44\%$ ,  $p = 0,0653$ ; *Circumferential Strain* DIO  $479,7 \pm 26,77\%$  vs. DIO+Exe  $456,4 \pm 55,86\%$ ,  $p = 0,3463$ , *Radial Displacement* DIO  $99,69 \pm 34,44\%$  vs. DIO+Exe  $95,85 \pm 61,92\%$ ,  $p = 0,8790$ ; *Remote Zone: Longitudinal Strain* Endo DIO  $52,28 \pm 21,77\%$  vs. DIO+Exe  $82,36 \pm 40,92\%$ ,  $p = 0,1116$ ; *Circumferential Strain* DIO  $48,46 \pm 32,54\%$  vs. DIO+Exe  $89,45 \pm 32,73\%$ ,  $p = 0,0330$ , *Radial*

*Displacement* DIO  $51,82 \pm 29,00\%$  vs. DIO+Exe  $101,8 \pm 46,53\%$ ,  $p = 0,0228$ ; Abb. 24).



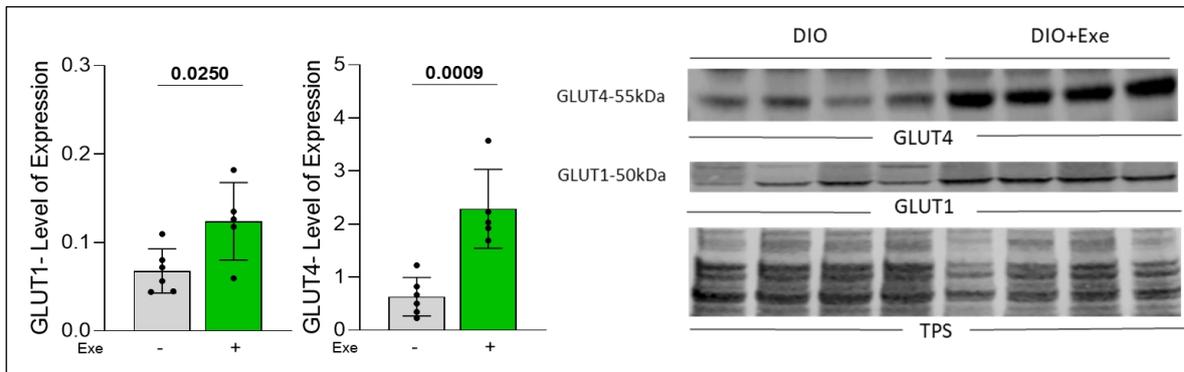
**Abb. 24:** Grafische Darstellung der Strain-Parameter DIO vs. DIO+Exe in der Echokardiografie im Infarkt- sowie im *Remote*-Bereich nach MI

### 3.3. Western Blot sowie OROBOROS-Ergebnisse

Es konnte eine erhöhte Expression von GLUT1 und GLUT4 nachgewiesen werden. Zudem führte die Behandlung mit Exe zu einer Verbesserung der mitochondrialen Atmung in DIO-Mäusen:

Es wurde ein möglicher Mechanismus auf Basis des Expressionsmusters der Glukose-Transporter 1 und 4 analysiert. Basierend auf vorangegangenen Studien war bekannt, dass Exe unter regulären Bedingungen die Translokation von GLUT4 bedingt. Die Behandlung mit Exe resultierte in den Versuchen in einer erhöhten Expression von

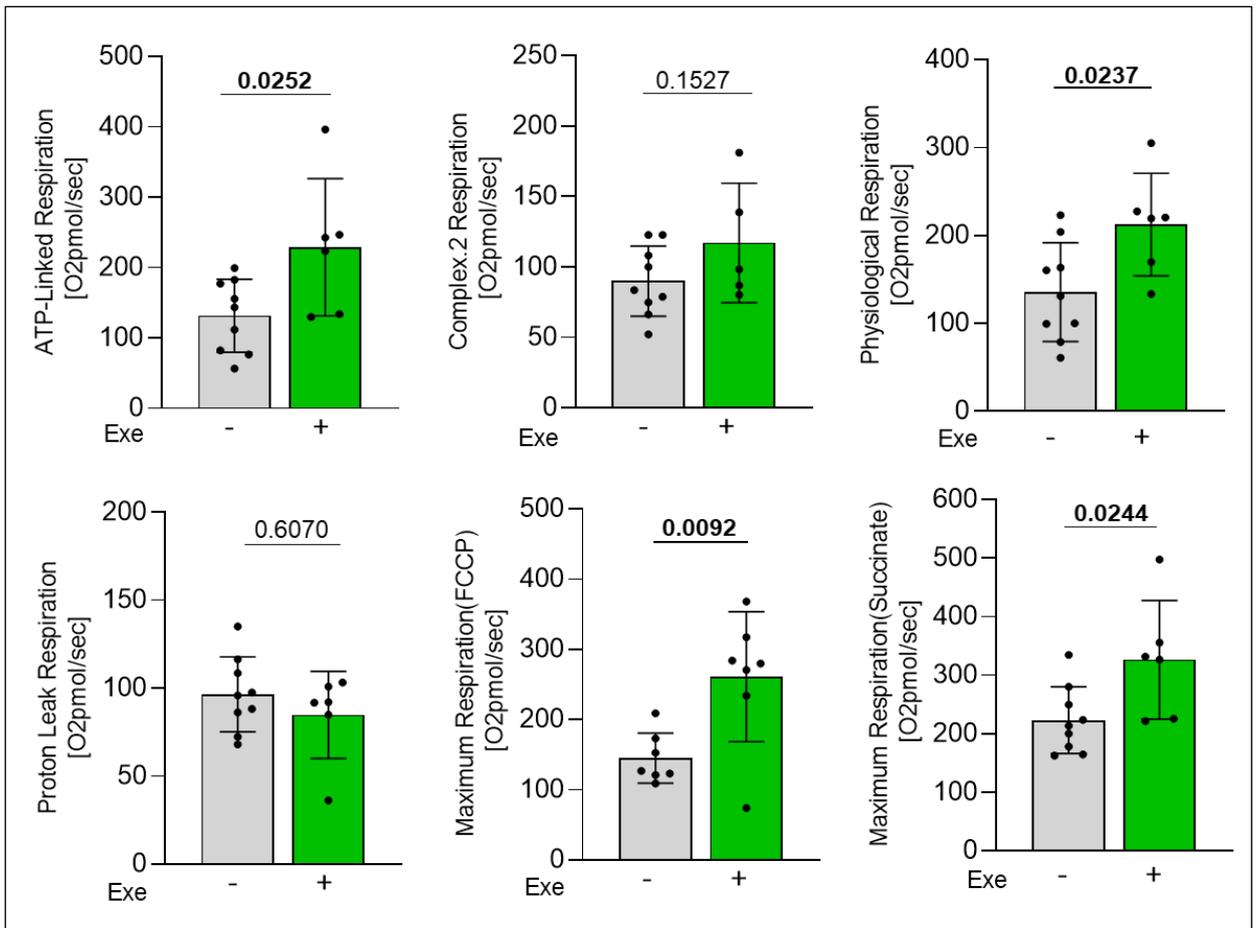
GLUT1 und GLUT4 (GLUT1 DIO  $0,068 \pm 0,25$  vs. DIO+Exe  $0,124 \pm 0,44$ ,  $p = 0,0250$ ; GLUT4 DIO  $0,630 \pm 0,361$  vs. DIO+Exe  $2,287 \pm 0,743$ ,  $p = 0,0009$ ; Abb. 25).



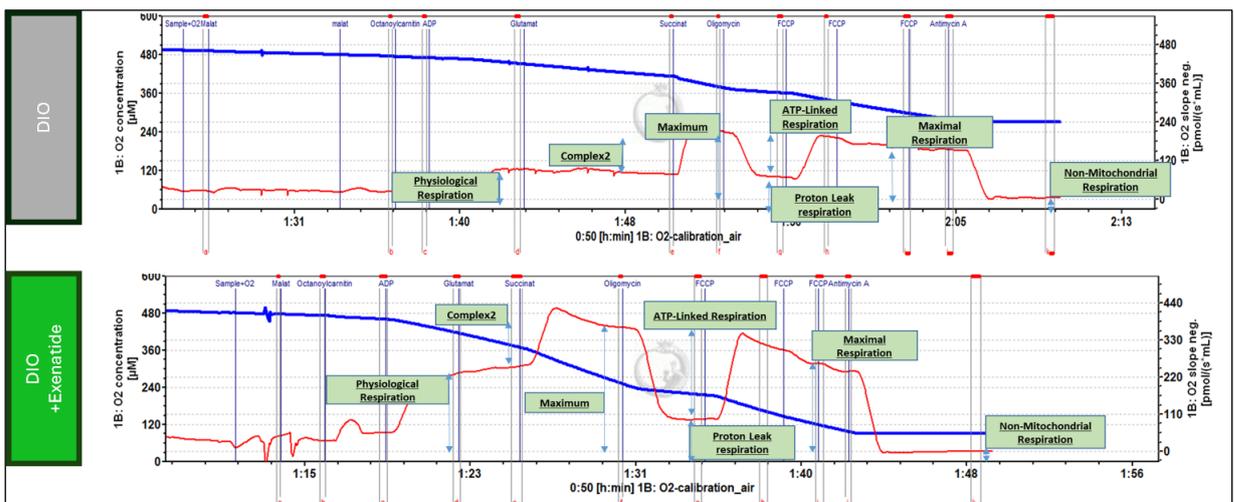
**Abb. 25: Grafische Darstellung der GLUT1- sowie GLUT4-Expression DIO vs. DIO+Exe** (die Durchführung der Versuche sowie die Abbildungserstellung erfolgte durch die PhD-Studentin Frau Khatereh Shahrjerdi.)

Zusätzlich konnte die mitochondriale Funktion durch die *in-vivo* Langzeitbehandlung verbessert werden (*ATP-Linked Respiration* (DIO  $131,7 \pm 51,88$  vs. DIO+Exe  $228,8 \pm 97,54$ ,  $p = 0,0252$ ; *Complex2 Respiration* DIO  $90 \pm 24,93$  vs. DIO+Exe  $117,1 \pm 42,40$ ,  $p = 0,1527$ ; *Physiological Respiration* DIO  $135,7 \pm 56,13$  vs. DIO+Exe  $212,6 \pm 58,31$ ,  $p = 0,0237$ ; *Proton Leak Respiration* DIO  $96,51 \pm 21,22$  vs. DIO+Exe  $84,86 \pm 24,72$ ,  $p = 0,6070$ ; *Maximum Respiration* (FCCP) DIO  $145,0 \pm 35,59$  vs. DIO+Exe  $261,1 \pm 92,57$ ,  $p = 0,0092$ ; *Maximum Respiration* (Succinat) DIO  $223,1 \pm 57,07$  vs. DIO+Exe  $326,6 \pm 101,3$ ,  $p = 0,0244$ ; Abb. 26).

Bei der Berechnung der *Proton Leak Respiration* wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, da in der DIO+Exe-Gruppe keine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 26: Grafische Darstellung der Mitochondrienfunktion mittels OROBOROS DIO vs. DIO+Exe** (die Durchführung der Versuche die Abbildungserstellung erfolgte durch die PhD-Studentin Frau Khatereh Shahrjerdi.)



**Abb. 27: Exemplarische Auswertung der OROBOROS-Versuche DIO vs. DIO+Exe** (die Abbildungserstellung erfolgte durch die PhD-Studentin Frau Khatereh Shahrjerdi.)

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass eine Langzeitbehandlung mit Exe a) die diastolische Dysfunktion reduziert, b) die postischämische Herzfunktion verbessert, ohne die Infarktgröße zu reduzieren, und c) die GLUT4- und GLUT1-Gehalte sowie die mitochondriale Funktion im Herzgewebe von DIO-Mäusen steigert.

### 4.1 Die Wirkung von Exenatid auf die diastolische Dysfunktion

#### 4.1.1 Exenatidwirkung im Tiermodell

In dieser Dissertation wurde Mäusen alle zwei Tage eine hohe Dosis Exe verabreicht. Es existieren mehrere andere Grundlagenstudien, in denen GLP1-Rezeptor-Agonisten auf ihre kardiovaskuläre Funktion und die zugrundeliegenden Mechanismen untersucht wurden; als beispielhafte Arbeiten seien hierfür Leivaditis et al.<sup>78</sup> sowie Robinson et al.<sup>79</sup> genannt. Es konnte gezeigt werden, dass GLP1-Agonisten neben der Reduktion des Körpergewichts weitere kardioprotektive Effekte besitzen, wie z. B. eine Verbesserung der Herzfunktion, eine Verbesserung der Herzstruktur sowie der linksventrikulären Endothelfunktion<sup>80</sup>. Darüber hinaus scheinen GLP1-Agonisten die kardiale Remodellierung zu hemmen, indem sie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) reduzieren und das Immunsystem herunterregulieren<sup>79,81</sup>. Auch auf die Mitochondrien scheinen GLP1-Agonisten eine schützende Wirkung zu haben<sup>82,83,84</sup>. Bezüglich des Zellstoffwechsels konnte gezeigt werden, dass Exe die AMPK hochreguliert.<sup>68</sup> Yen-Chun Lai et al. konnten zeigen, dass über den SIRT-Akt-AMPK-Signalweg GLUT4 erhöht wird, was eine insulinunabhängige Glukoseaufnahme in Myozyten gewährleistet und zu einer Verbesserung der kardiopulmonalen Hämodynamik bei HFpEF führte<sup>85</sup>. Im Rahmen dieser Dissertation konnten wir nun bestätigen, dass Exe auch unter diabetischen Bedingungen noch das Potenzial besitzt, GLUT4 zu erhöhen. Dies wirkt sich auf eine verbesserte mitochondriale Funktion und somit potentiell auf eine verbesserte Herzstruktur und -funktion aus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Untersuchung der subzellulären Signalwege, die den dargestellten Effekten zugrunde liegen, nicht vorgenommen. Die Untersuchung der dosisabhängigen Wirkung von Exe auf den oben genannten Signalweg sowie die

Untersuchung weiterer Effekte sollten daher Gegenstand zukünftiger Studien darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Vergleich von LD Exe mit HD Exe in unseren *Ex-vivo*-Daten vorgenommen: Während in den LD-Experimenten eine kontinuierliche Verabreichung von Exe über den Puffer erfolgte, wurde in den HD-Experimenten ein kurzfristiges *Loading* mit Exe durchgeführt. In beiden Ansätzen konnten keine signifikanten Verbesserungen der Parameter im Langendorff-Gerät nachgewiesen werden. Um eine therapeutische Wirkung von Exe in der Kurzzeitanwendung zu untersuchen, wären für beide Analysegruppen weitere Dosiserhöhungen erforderlich.

Aus den vorliegenden klinischen Daten sowie den Ergebnissen der Tierversuche geht hervor, dass Patienten, die an T2D leiden und gleichzeitig an DCM erkrankt sind, eine ventrikuläre Dilatation entwickeln<sup>86</sup>. In dieser Dissertation konnte im Tierversuch eine Reduktion des Herzvolumens durch Exe beobachtet werden, was in Einklang mit den Ergebnissen anderer Tierversuche zu GLP-1-RAs steht. Monji et al. konnten ebenfalls ein verringertes systolisches sowie diastolisches Herzvolumen bei DIO-Mäusen nachweisen, die Exe-Injektionen erhielten. Darüber hinaus wird in der vorliegenden Arbeit dargelegt, dass Exe eine verbesserte kardiale Insulinsignalisierung und eine reduzierte kardiale Steatosis im diabetischen Mausmodell bewirkt<sup>83</sup>.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde Exe sowohl auf lange als auch auf kurze Sicht untersucht. Es konnten nur bei der *In-vivo*-Langzeitbehandlung positive Ergebnisse erzielt werden, während dies bei der *Ex-vivo*-Perfusion nicht möglich war. Dies deutet darauf hin, dass Exe möglicherweise keine direkte Wirkung auf das Myokard hat. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Almutairi et al. zu erwähnen: Dort wird darlegt, dass durch den GLP-1-RA Liraglutid eine Verbesserung der myokardialen Glukoseoxidation durch indirekte Mechanismen erfolgt, welche zu einer positiven Auswirkung auf die kardiale Ausprägung im diabetischen Modell führten<sup>87</sup>. Es ist anzunehmen, dass ähnliche Effekte auch für Exe denkbar sind, da durch Exe ebenfalls systemische Effekte durch die *In-vivo*-Behandlung erzielt wurden. So wiesen die Mäuse infolge der Exe-Verabreichung ein geringeres Körpergewicht und eine verbesserte Glukosetoleranz auf. Diese Effekte könnten folglich die Verschlechterung der Herzfunktion unter diabetischen Stoffwechselbedingungen verringern und somit die Herzfunktion im Vergleich zur DIO-Gruppe verbessern, ohne die Herzfunktion direkt zu beeinflussen.

#### 4.1.2 Exenatidwirkung im Menschen

HFpEF (*Heart failure with preserved ejection fraction*) tritt bei 20–30 % der Diabetespatienten auf<sup>88,89</sup>. Zu den gängigen Therapien gehören aktuell ACE-Hemmer, Betablocker, Mineralokortikoid-Antagonisten und SGLT2-Inhibitor als HF-Medikamente<sup>90</sup>. Aktuelle Studien empfehlen ebenfalls GLP1-Rezeptoragonisten für T2D-Patienten mit vorbestehender KHK<sup>91</sup>. Unsere Ergebnisse unterstreichen jedoch auch den potenziellen Einsatz bei diabetischen Patienten mit bestehender HF. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit aktuellen klinischen Studien zu GLP1-Agonisten bei HFpEF, die ebenfalls eine Verringerung der mit HF verbundenen Symptome, eine verbesserte körperliche Funktionsfähigkeit, eine geringere Entzündungsreaktion bei Patienten mit T2D und weniger schwerwiegende unerwünschte Ereignisse zeigen<sup>92,93,6</sup>. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass intravenös verabreichtes Exe bei diabetischer Kardiomyopathie kurz nach der Infusion zu einem Anstieg des Herzindex und der Herzfrequenz führt<sup>94</sup>.

Wie in großen randomisierten kontrollierten Studien gezeigt wurde<sup>95</sup>, gibt es bei den verfügbaren GLP1-Rezeptoragonisten unterschiedliche Potenziale zur Reduzierung kardiovaskulärer Ereignisse, einschließlich HF. Die Ergebnisse der großen Studien zu den verschiedenen GLP-1-RAs (ELIXA, LEADER, REWIND, Amplitude O, SELECT, SUSTAIN-6, PIONEER-6, EXSCEL) wurden diesbezüglich in der Einleitung dieser Dissertation thematisiert.

In der zuvor beschriebenen EXSCEL-Studie wurde die Exe-Behandlung jedoch ausschließlich einmal wöchentlich mit vergleichsweise geringer Dosierung (2 mg/Woche) bei Patienten mit T2D auf kardiovaskuläre Ergebnisse untersucht. In dieser Kohorte konnte kein klinischer Nutzen der Exe-Behandlung festgestellt werden<sup>64</sup>. Die kurze Halbwertszeit von Exe im Vergleich zu anderen GLP1-Rezeptoragonisten könnte eine mögliche Erklärung für die beobachteten Phänomene darstellen<sup>96</sup>. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass die einmal täglich verabreichte Dosierung nicht ausreichend hoch war. Im Vergleich dazu konnte die zweimal täglich verabreichte Dosierung eine Verbesserung von kardiovaskulären Risikomarkern wie den HDL-Cholesterin-Spiegeln (HDL-C), dem Körpergewicht und hsCRP (hochsensitives C-reaktives Protein) als Marker für subklinische Entzündungen bewirken<sup>97</sup>. Des Weiteren wurde bei mehr als

40 % der Probanden ein vorzeitiger Abbruch der Exe-Injektion beobachtet<sup>98</sup>, was die Schutzwirkung potenziell verringert haben könnte.

## 4.2 Die postischämische Verbesserung der Herzfunktion durch Exenatid

### 4.2.1 Im Mausmodell

Die Datenlage einer IS-Steigerung unter diabetischen Konditionen im Tiermodell scheint bisher nicht eindeutig: Miki et al.<sup>99</sup> fassten in einem Literatur-Review im Jahr 2012 die verschiedenen Studien bezüglich einer Änderung der IS in diabetischen Konditionen zusammen: Die Autoren beschrieben, dass in zwei (nicht näher bezeichneten) Mausmodellen und in drei ob/ob Mausmodellen eine IS-Erhöhung unter diabetischen Konditionen festzustellen war. Es konnte keine einzige Studie zur IS-Senkung bei Mäusen unter diesen Bedingungen gefunden werden. Bezüglich einer gleichbleibenden IS wurde eine Studie zu (nicht näher bezeichneten) Mäusen und eine weitere Studie zu ob/ob-Mäusen gefunden<sup>99</sup>. In dieser Dissertation wurde das DIO-Modell verwendet, um ein Lebensstil-bedingtes Frühstadium des T2D zu imitieren.

Jedoch hat die Gabe von Exe in unseren Versuchen weder im DIO- noch im NCD-Modell eine Infarktgrößenreduktion bewirken können. Allerdings wurde im NCD-Modell ausschließlich eine Kurzzeit-Exe-Wirkung am isolierten Herzen im Langendorff-Apparatus untersucht. Es ist also anzunehmen, dass die Exe-Wirkung weitere systemische Effekte haben muss, oder die Exe-Wirkung nicht ausreichend lang war, um eine IS-Reduktion im Mausmodell zu erzielen.

Hinsichtlich des DIO-Modells ist bekannt, dass Mäuse nach einer Operation eine andere Chemokinreaktion zeigen als NCD-Mäuse und dass weniger Makrophagen den kardialen Umbau beeinflussen<sup>100</sup>. Diese beiden Mechanismen könnten mögliche Gründe dafür sein, dass wir im diabetischen Mausmodell keine Verringerung der Infarktgröße unter Exenatidwirkung nachweisen können. Dennoch gibt es viele Tierstudien, in denen Exe eine Verringerung der Infarktgröße bewirken konnte<sup>101,102,103</sup>. In diesen Studien wurden jedoch weder diabetische- noch Mausmodelle getestet, weshalb wir hypothetisieren, dass Exe die Kardiomyozyten im diabetischen Mausmodell nicht schützt, sondern vielmehr die Funktion des erhaltenen Myokards verbessert.

#### 4.2.2 Im Menschen

In einer weiteren Studie zu Exe zeigte eine retrospektive Analyse, dass die Inzidenz von Myokardereignissen, Krankenhausaufenthalten aufgrund von Myokardereignissen und Krankenhausaufenthalten aus anderen Gründen bei Exe signifikant niedriger war<sup>70</sup>.

die Datenlage zur Infarktgrößenreduktion ist unter Exe beim Menschen jedoch widersprüchlich: García Del Blanco et al. und Roos et al. konnten in MRT-Studien keine Infarktgrößenreduktion nach Exe-Gabe zeigen<sup>104,105</sup>. In anderen Studien konnten Lønborg et al. eine Verringerung der Infarktgröße bei Patienten mit ST-Strecken-Hebung nachweisen und Woo et al. beschrieben eine Verringerung der Infarktgröße durch Messung der Kreatinkinase-MB, der Troponin-Werte sowie durch Magnetresonanztomographie<sup>71,72</sup>.

Bestehender T2D scheint der relevante Aspekt für eine mögliche Verringerung der Infarktgröße zu sein. Studien am Menschen zeigen auch, dass der Entzündungsprozess bei Diabetikern verändert zu sein scheint: Marfella et al. haben nachgewiesen, dass hyperglykämische Patienten im Vergleich zu normoglykämischen Patienten in Proben aus dem peri-infarzierten Bereich mehr Makrophagen, T-Lymphozyten, HLA-DR-Zellen und mehr NFkappaB-Aktivität, TNF-alpha und Caspase-3 aufweisen<sup>106</sup>. Im Hinblick auf die Infarktgröße unter diabetischen Bedingungen beim Menschen ergaben sich in Studien im Vergleich zu nicht-diabetischen Bedingungen keine Hinweise auf eine vergrößerte Infarktfläche<sup>107,108</sup>.

### 4.3 **Exenatidwirkung auf zellulärer Ebene**

Es ist weiterhin zu berücksichtigen, dass das menschliche Herzgewebe Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten, glatte Muskelzellen, Immunzellen, Adipozyten, Mesothelzellen sowie neuronale Zellen als zusätzliche Zelltypen enthält.<sup>109</sup> Aus diesem Grund ist denkbar, dass diese Zelltypen für das komplexe Zusammenspiel der myokardialen Stoffwechselanpassung bei MI, insbesondere unter T2D-Bedingungen, relevant sein

könnten. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass auch neonatale Fibroblasten GLUT4 exprimieren<sup>110</sup>. Im Erwachsenenalter scheint jedoch der Glukoseaufnahmetransporter GLUT1 die vorherrschende Funktion zu erfüllen<sup>111</sup>. Für Endothelzellen stellt die Glykolyse die primäre Energiequelle dar, die in erster Linie auf GLUT1 basiert<sup>112</sup>. Dennoch wird GLUT4 zusätzlich exprimiert und scheint spezifischen krankheitsbedingten Veränderungen zugrunde zu liegen<sup>113,114</sup>. T2D-Kardiomyozyten exprimieren weniger GLUT4<sup>34</sup>; diese Rezeptoren werden jedoch während einer Ischämie hochreguliert<sup>35</sup>. Es wurde auch nachgewiesen, dass eine verstärkte Translokation von GLUT4 an die Zelloberfläche eine schützende Wirkung auf Kardiomyozyten besitzt<sup>115,69</sup>. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass antidiabetische Medikamente mit Exe auch die Translokation von GLUT4 an die Zelloberfläche erhöhen<sup>69</sup>. Darüber hinaus gibt es die bereits beschriebenen Hinweise darauf, dass Exe auch eine Aktivierung der AMPK bewirkt.<sup>68</sup> Basierend auf diesen Daten schließen wir, dass ein möglicher Mechanismus für die verschlechterten funktionellen und strukturellen Parameter im diabetischen Stoffwechsel auf eine verringerte Expression von GLUT4 auf der Oberfläche von Kardiomyozyten zurückzuführen sein könnte. Exe könnte durch eine erhöhte GLUT4-Translokation zu einer verbesserten lokalen Glukoseaufnahme und damit zu einer Verbesserung der strukturellen und funktionellen Parameter beitragen.

In der Literatur sind zusätzlich weitere Effekte durch Exe beschrieben: So wird Exe ein positiver Effekt auf das *Calciumcycling* durch eine Erhöhung der SERCA2a-Aktivität zugesprochen, was sich wiederum positiv auf eine HF-Symptomatik auswirken kann<sup>102,116,117</sup>.

Weiterhin wird Exe in der Literatur eine Inhibierung der kardialen Remodellierung zugesprochen, wobei hier unterschiedliche Ansätze bezüglich dessen Funktionsweise zu existieren scheinen<sup>118, 81</sup>.

## 4.4 Limitationen der Dissertation

### 4.4.1 Das DIO-Mausmodell

Das DIO-Mausmodell wurde im Jahr 1988 von Surwit et al. eingeführt. Hierbei wurden C57BL/6J Mäuse einer 6-monatigen Diät mit hohem Fettanteil, kurzkettigen Kohlenhydraten sowie geringem Ballaststoffanteil zugeführt. Die Mäuse zeigten einen phänotypischen Diabetes mit einem Blutglukosespiegel  $>240$  mg/dl und einem Insulinlevel  $>150\mu\text{U/mL}$ . Hieraus wurde geschlossen, dass C57BL/6J-Mäuse eine genetische Prädisposition zur Entwicklung eines T2D besitzen<sup>119</sup>. Weiterhin zeigte sich eine Insulinresistenz in Glukose-toleranz-Tests<sup>120</sup>. In weiterführenden Studien wird beschrieben, dass das DIO-Mausmodell ein effizientes Modell für die gestörte Glukosetoleranz sowie einen Frühstadium des T2D darstellt und als gutes Hilfsmittel für therapeutische Interventionen des T2D gilt<sup>40</sup>. Aus Nguyen-Phuong et al.<sup>121</sup> geht hervor, dass durch die HFD nach 4 Wochen ein Modell des metabolischen Syndroms mit Fettleibigkeit, erhöhtem Plasmacholesterinlevel, erhöhtem C-Peptid sowie Nüchternglukoselevel dargestellt wird, bevor im weiteren Verlauf das Stadium des Prä-Diabetes eintritt. Nach 12 Wochen HFD und einer Gewichtszunahme von  $>16,23\text{g}$  kann von einer Entwicklung eines T2D ausgegangen werden<sup>121</sup>.

Die Mäuse, die im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurden, wurden für 24 Wochen mit einer HFD gefüttert. Weiterhin wurde bei den verwendeten Mäusen eine gestörte Glukosetoleranz im Glukosetoleranztest aufgezeigt. Jedoch ist eine Limitation dieser Dissertation, dass nicht sichergestellt werden kann, ob bei sämtlichen Mäusen eine volle Ausprägung eines T2D vorlag, sodass hier eher von einem Zustand des metabolischen Syndroms mit einhergehendem Prädiabetes bzw. einem Frühstadium des T2D ausgegangen wird. Um die vollständige Ausprägung eines T2D bei Mäusen annehmen zu können, wäre die Kombination des DIO-Modells mit dem STZ-Modell eine denkbare Alternativmöglichkeit. Von Venkata et al.<sup>122</sup> wird die Kombination von STZ- und DIO-Modell als einfache Methode beschrieben, um ein adipöses T2D-Modell mit moderater Hyperglykämie und Insulindefizienz zu erreichen.

#### 4.4.2 Vergleichbarkeit von Maus und Mensch

Das Mausmodell ist in der medizinischen Forschung essenziell, da das Erbgut der Mäuse vollständig entschlüsselt ist<sup>123</sup>. Das Erbgut von Mäusen und Menschen ähnelt sich zudem stark<sup>124</sup>. Viele Erkrankungen haben bei beiden Spezies somit dieselbe genetische Ursache<sup>125</sup>.

Die Forschung an Mäusen zählt dabei grundsätzlich zur Grundlagenforschung<sup>126</sup> und findet in der Regel vor der klinischen Testung am Menschen statt<sup>127</sup>. Um die Grundlagenforschung statistisch aussagekräftig zu machen, bedarf es einer Elimination von Störfaktoren, weshalb alle Mäuse dieselbe Diät- und Zuchtbedingungen erhalten können. Weiterhin können die Mäuse mit nahen Verwandten verpaart werden, was zu einer geringen genetischen Variabilität beiträgt<sup>128</sup>. Diese Art von kontrollierten Bedingungen ist nicht auf den Menschen übertragbar. Beim Menschen müssen deshalb weitere Einflussfaktoren wie genetische Prädisposition, Komorbiditäten, Medikamenteneinnahme sowie Lebensstil bedacht werden. Einen weiteren Einflussfaktor stellt das Geschlecht dar: In dieser Dissertation wurden ausschließlich männliche Mäuse untersucht, da die weiblichen Hormone ebenfalls einen Einfluss auf das kardiovaskuläre System zu haben scheinen<sup>129</sup>.

In unserem Modell erhielten die Mäuse jeden zweiten Tag 0,2µg Exe. Bei einem Durchschnittsgewicht der Mäuse von 47,3g entspricht dies in etwa 4,2mg Exe pro Kilogramm Körpergewicht und somit einer kumulativen Wochendosis von 12,6mg Exe pro Kilogramm Körpergewicht. Die Dosis beim Menschen beträgt 5-10µg Exe zweimal täglich<sup>130</sup>, was (bei einem Schätzwert von 100 Kilogramm) einer kumulativen Wochendosis von 0,7-1.4µg pro Kilogramm Körpergewicht beträgt. Die kumulative Exe-Wochendosis bei den Mäusen betrug somit 3000-6000% der Dosis von T2D-Patienten. Durch die vergleichbar kurze HWZ von Exe wurde dessen Wirkspiegel im Vergleich zum Menschen jedoch nicht identisch abgebildet, was bei einer Übertragung unserer Daten auf den Menschen zusätzlich bedacht werden sollte.

Weiterhin wurde den Mäusen durch die i.p.-Injektion (intraperitoneale Injektion) alle 2 Tage 0,2mL Flüssigkeit verabreicht. Die DIO-Gruppe ohne Exe-Injektion erhielt aus Tierschutzgründen keine Injektion von Flüssigkeit. Somit muss ein möglicher Volumeneffekt auf die kardiale Funktion bedacht werden.

#### 4.4.3 Stichprobengröße

Um die Anzahl der verwendeten Versuchstiere möglichst gering zu halten und gleichzeitig eine ausreichende Aussagekraft zu gewährleisten, wurde eine Gruppengröße von  $n=6$  pro Gruppe angestrebt. Diese Entscheidung basiert auf den Vorgaben des Tierschutzes im Sinne des 3R-Prinzips (*Replacement, Reduction, Refinement*): Dieses Prinzip wurde 1959 von Russel und Burch veröffentlicht und gilt weltweit als ethischer Ansatz für die Regulierung tierabhängiger Wissenschaft<sup>131</sup>. Weiterhin weisen vergleichbare tierexperimentelle Studien ähnliche Gruppengrößen auf<sup>82, 101</sup>.

Eine post-hoc Power-Analyse wurde exemplarisch mit dem Programm G\*Power anhand der Körpergewichtsdaten in Abbildung 18 durchgeführt. Basierend auf einer errechneten Effektstärke von  $d = 1,59$ , einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  und einer Gruppengröße von  $n = 6$  wurde eine Power von ca. 69% ermittelt. Somit erlaubt diese Teststärke trotz geringer Gruppengröße eine sinnvolle Interpretation der Daten.

Aufgrund variabler Erfolgsraten bei den Versuchen streut die Anzahl der Tiere pro Auswertungsgruppe in den Langendorff-Versuchen pro Gruppe zwischen  $n = 5$  und  $n = 7$ . Im Rahmen der Echokardiografie- sowie der I/R-Versuche streut die Anzahl der Tiere pro Gruppe zwischen  $n = 7$  und  $n = 9$ .

Die vorliegenden Ergebnisse sind explorativ einzuordnen und können als Grundlage für weiterführende Studien mit erweiterten Stichproben dienen.

## 5. Ausblick

### 5.1 Die zukünftige Rolle von GLP1-Agonisten

#### 5.1.1 GLP1-Agonisten zur Behandlung der Adipositas

Semaglutid s.c. wurde im Jahr 2021 zur Behandlung der Adipositas zugelassen<sup>132</sup>. Später wurde orales Semaglutid mit bis zu 14mg pro Tag eingeführt<sup>133</sup>. Aktuell findet eine klinische Studie statt (PIONEER-PLUS), in welcher Semaglutid p.o. mit 50mg/Tag an adipösen Patienten ohne T2D getestet wird. Der Gewichtsverlust hat sich hierbei fast verdoppelt<sup>134</sup>.

Tirzepatid als GLP-1-RA und gleichzeitig GIP (*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) -RA wurde im SURPASS-Programm getestet und hat ebenfalls zu einem klinisch relevanten Gewichtsverlust geführt<sup>135</sup>. GIP ist ein Hormon, welches aus dem Jejunum nach Nahrungsaufnahme ausgeschüttet wird und Insulinsekretion, Glucagonsekretion und Lipidpufferkapazität des Fettgewebes erhöht.<sup>136</sup> Aus diesem Grund finden aktuell viele Studien bezüglich der Kombination von GLP1-RA mit GIP-RAs statt<sup>137</sup>.

Ein zentrales Problem der GLP1-Agonisten ist jedoch eine erneute Zunahme des Körpergewichts nach Absetzen des Medikamentes<sup>138</sup>. Eine Umstellung der Lebensgewohnheiten als Primärtherapie wird empfohlen<sup>54</sup>. Eine weitere Therapiemöglichkeit mit dem Ziel der Gewichtsreduktion stellt die bariatrische Operation dar: Eine Übersicht über die Behandlung der Adipositas mittels bariatrischer Operation wird durch Wolfe et al. dargestellt<sup>139</sup>.

#### 5.1.2 GLP1-Agonisten zur Behandlung der Herzinsuffizienz

Aktuelle Studien untersuchen den Einsatz von GLP1-Agonisten bei einer bestehenden HF: Hier ist vor allem der GLP-1-RA Semaglutid zu nennen, welcher in der STEP-HFpEF-Studie untersucht wurde: Hier wurde Semaglutid einmal wöchentlich bei fett-

leibigkeitsassoziierter HF ohne T2D mit erhaltender Ejektionsfraktion (EF>45%) verabreicht. Es wurden signifikante Verbesserungen bezüglich der körperlichen Limitationen sowie einem stärkeren Gewichtsverlust gegenüber einem Placebo aufgezeigt<sup>140</sup>.

Eine weitere Studie zu Semaglutid (STEP-HFpEF DM) untersuchte die Auswirkungen bezüglich der Gewichtsreduktion bei T2D-Patienten<sup>141</sup>, jedoch haben die Studienteilnehmer in der STEP-HFpEF DM weniger Körpergewicht verloren als die Teilnehmer in der STEP-HFpEF ohne T2D.

In weiteren Analysen der genannten Studien wird zusammengefasst, dass Semaglutid im Vergleich zu einem Placebo die HF-Symptomatik sowie die körperlichen Funktionen und das Körpergewicht unabhängig von anderen Cofaktoren verbessert; Semaglutid wurde dabei insgesamt gut toleriert<sup>93</sup>.

GLP-1-RA bekommen, ähnlich zu den SGLT2-Inhibitoren, in den aktuellen Leitlinien einen zunehmenden Stellenwert bei kardialer Symptomatik. GLP1-RA werden von dem *American College of Physicians* aktuell zur Reduktion der Mortalität, schwerwiegender unerwünschter kardiovaskulärer Ereignisse sowie Schlaganfällen empfohlen<sup>142</sup>. In aktuellen klinischen Studien zu GLP1-Agonisten bei HFpEF wird ebenfalls eine Verringerung der mit HF verbundenen Symptome, eine verbesserte körperliche Funktionsfähigkeit, eine geringere Entzündungsreaktion bei Patienten mit T2D und weniger schwerwiegende unerwünschte Ereignisse beschrieben<sup>92,93,6</sup>.

Trotz der aktuell durchlaufenden Studien bezüglich HF und GLP1-RA ist diese Medikamentenklasse aktuell noch nicht für HF zugelassen. Die aktuelle Anwendung beschränkt sich auf T2D sowie Adipositas; bezüglich der Behandlung einer HF-Symptomatik werden aktuell vermehrt SGLT-2-Inhibitor empfohlen<sup>5</sup>. Aufgrund der aktuellen Studienlage und aufgrund der Daten dieser Dissertation ist denkbar, dass GLP1-Agonisten bei einer HF-Symptomatik ähnliche Vorzüge wie die SGLT-2-Inhibitor besitzen können.

### 5.1.3 Die Rolle von Exenatid im Vergleich zu anderen GLP1-Agonisten

Yao et al.<sup>55</sup> verglichen die verschiedenen GLP-1-RA untereinander: zu anderen GLP-1-RA zeigt Exe einen vergleichsweise geringeren Effekt auf den HbA1c, den Nüchtern-glukosespiegel sowie das Körpergewicht. Bezüglich möglicher Nebenwirkungen zeigt Exe ein ähnlich hohes Risiko für Diarrhoe, Übelkeit sowie Erbrechen. Die Wahrscheinlichkeit für einen Abbruch der Einnahme von Exe war unter allen GLP1-RA am höchsten<sup>55</sup>. Zusätzlich konnte Exe in der EXSCEL-Studie keine signifikante Verbesserung des kardiovaskulären Outcomes aufzeigen<sup>64</sup>.

Exenatid wurde als erster GLP-1-RA zur Behandlung von T2D im Jahr 2005 zugelassen<sup>42</sup> und ist deshalb als wichtiger Vertreter der GLP-1-RA anzusehen, scheint in der aktuellen klinischen Praxis jedoch in den Hintergrund getreten zu sein.

Durch die hier beschriebenen Effekte auf die GLUT4-Translokation könnte Exe jedoch weiterhin einen klinischen Nutzen bei T2D-Patienten zeigen. Um hierzu weitere Aussagen zu tätigen bedarf es weiterer Untersuchungen bezüglich einer möglichen GLUT4-Translokation bei Patienten.

---

## 6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien bei der Herstellung Langendorff-Puffers .....	16
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Materialien bei den Stimulationsversuchen am Langendorff-perfundierten Herzen .....	22
Tabelle 3: Verwendete Materialien bei der Herstellung und Analyse des TTC-Puffers .....	25
Tabelle 4: Benötigte Materialien zur Durchführung der murinen Echokardiografie .....	29
Tabelle 5: Benötigte Materialien zur I/R-Operation.....	32
Tabelle 6: Benötigte Software für die Auswertung der generierten Daten dieser Dissertation .....	34

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Grafische Darstellung der Ex-Vivo Experimente (Die Abbildungserstellung erfolgte mithilfe der Internet-Anwendung „Biorender“)	11
Abb. 2: Grafische Darstellung der In-Vivo Experimente; A) Versuchsaufbau Echokardiografie sowie B) Versuchsaufbau Langendorff-Apparatus (Die Abbildungserstellung erfolgte mithilfe der Internet-Anwendung „Biorender“)	12
Abb. 3: Darstellung des Langendorff-Apparatus	15
Abb. 4: Material zur Herzpräparation: Fixiertisch, Kaltschale, Mikroskop, Präparationsbesteck sowie die Präparationsvorrichtung	18
Abb. 5: Freipräpariertes Herz auf der Perfusionskanüle	19
Abb. 6: Präpariertes Herz im Langendorff-Gerät	21
Abb. 7: Geschnittene und gefärbte Herzpräparate auf Objektträgern	23
Abb. 8: Mikroskop für die TTC-Färbung	24
Abb. 9: Beispielschnitte eines Herzens unter dem Mikroskop nach TTC-Färbung mit markiertem vitalen Gewebe von Apex (oben links) bis zum Übergang der Klappenebene der Ventrikel (unten rechts)	25
Abb. 10: Vorbereitete Maus auf dem Echokardiografietisch mit aufgetragener Enthaarungscreme (Die Abbildung wurde nicht selbst aufgenommen und wird identisch in anderen Dissertationen der Arbeitsgruppe „AG Dannenberg“ verwendet)	27
Abb. 11: Darstellung des operativen Verschlusses der LAD (Die Abbildung wurde nicht selbst aufgenommen und wird identisch in anderen Dissertationen der Arbeitsgruppe „AG Dannenberg“ verwendet)	31
Abb. 12: Grafische Darstellung der Langendorff-Ergebnisse von NCD-Mäusen vs. NCD-Mäusen mit Exe-versetztem Perfusat	36

---

Abb. 13: Grafische Darstellung der Infarktgröße nach Langendorff-induziertem Infarkt von NCD-Mäusen vs. NCD-Mäusen mit Exe-versetztem Perfusat .....	36
Abb. 14: Grafische Darstellung der Infarktgröße nach Langendorff-induziertem Infarkt von DIO-Mäusen vs. DIO+Exe behandelten Mäusen.....	37
Abb. 15: Grafische Darstellung der Langendorff-Ergebnisse von DIO-Mäusen vs. DIO+Exe behandelten Mäusen .....	38
Abb. 16: Grafische Darstellung der Infarktgröße nach Langendorff-induziertem Infarkt von DIO-Mäusen vs. DIO-Mäusen mit Exe-versetztem Perfusat, <i>Lowdose</i> (LD) sowie <i>Highdose</i> (HD).....	39
Abb. 17: Grafische Darstellung der Langendorff-Ergebnisse von DIO-Mäusen vs. DIO-Mäuse mit Exe-versetztem Perfusat, <i>Lowdose</i> (LD) sowie <i>Highdose</i> (HD).....	40
Abb. 18: Grafische Darstellung der Wirksamkeit der Exe-Behandlung im DIO-Modell, die Durchführung des Versuchs sowie die Abbildungserstellung erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Sarah Weske. Zu sehen sind (von links nach rechts) die basalen Glukosewerte, ein Glukosetoleranztest sowie die Körpergewichte von DIO-Mäusen nach zwölf Wochen HFD, im Vergleich zu DIO-Mäusen nach 16 Wochen HFD und weiteren acht Wochen HFD+Exe .....	41
Abb. 19: Systolische sowie strukturelle Echokardiografische Parameter DIO vs. DIO+Exe jeweils vor einem MI .....	42
Abb. 20: Beispielhafte Darstellung DIO vs. DIO+Exe in der Longitudinalen Achse in der Echokardiografie, jeweils in der Diastole sowie in der Systole.....	43
Abb. 21: Diastolische Echokardiografie-Parameter DIO vs. DIO+Exe jeweils vor einem MI.....	44
Abb. 22: Grafische Darstellung der Infarktgrößenbestimmung nach TTC-Färbung DIO vs. DIO+Exe.....	45
Abb. 23: Grafische Darstellung der systolischen Echokardiografie-Parameter DIO vs. DIO+Exe nach MI .....	46

- 
- Abb. 24: Grafische Darstellung der Strain-Parameter DIO vs. DIO+Exe in der Echokardiografie im Infarkt- sowie im *Remote*-Bereich nach MI .....47
- Abb. 25: Grafische Darstellung der GLUT1- sowie GLUT4-Expression DIO vs. DIO+Exe (die Durchführung der Versuche sowie die Abbildungserstellung erfolgte durch die PhD-Studentin Frau Khatereh Shahrjerdi.) .....48
- Abb. 26: Grafische Darstellung der Mitochondrienfunktion mittels OROBOROS DIO vs. DIO+Exe (die Durchführung der Versuche die Abbildungserstellung erfolgte durch die PhD-Studentin Frau Khatereh Shahrjerdi.).....49
- Abb. 27: Exemplarische Auswertung der OROBOROS-Versuche DIO vs. DIO+Exe (die Abbildungserstellung erfolgte durch die PhD-Studentin Frau Khatereh Shahrjerdi.) .49

## 8. Literaturverzeichnis

1. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
2. Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, 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):2215-2222.
3. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol.* 1974;34(1):29-34.
4. Boonman-de Winter LJ, Rutten FH, Cramer MJ, et al. High prevalence of previously unknown heart failure and left ventricular dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2012;55(8):2154-2162.
5. Marx N, Federici M, Schütt K, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiovascular disease in patients with diabetes. *Eur Heart J.* 2023;44(39):4043-4140.
6. Kristensen SL, Rørth R, Jhund PS, et al. Cardiovascular, mortality, and kidney outcomes with GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(10):776-785.
7. Ma H, Lin YH, Dai LZ, et al. Efficacy and safety of GLP-1 receptor agonists versus SGLT-2 inhibitors in overweight/obese patients with or without diabetes mellitus: a systematic review and network meta-analysis. *BMJ Open.* 2023;13(3):e061807.
8. Szablewski L. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *Int J Cardiol.* 2017;230:70-75.
9. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care.* 2022;45(Suppl 1):S17-s38.
10. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care.* 2021;44(Suppl 1):S15-s33.
11. Ahlqvist E, Storm P, Käräjämäki A, et al. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(5):361-369.
12. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet.* 2023;402(10397):203-234.
13. Benjamin Goffrier MS, Jörg Bätzing-Feigenbaum. Administrative Prävalenzen und Inzidenzen des Diabetes mellitus von 2009 bis 2015 Available: [https://www.versorgungsatlas.de/fileadmin/ziva\\_docs/79/VA-79-Bericht\\_Final.pdf](https://www.versorgungsatlas.de/fileadmin/ziva_docs/79/VA-79-Bericht_Final.pdf). Accessed 18.06.2025, 14:45 Uhr.
14. Paulweber B, Valensi P, Lindström J, et al. A European evidence-based guideline for the prevention of type 2 diabetes. *Horm Metab Res.* 2010;42 Suppl 1:S3-36.
15. Gehart H, Kumpf S, Ittner A, et al. MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? *EMBO Rep.* 2010;11(11):834-840.
16. Rose AJ, Richter EA. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiology (Bethesda).* 2005;20:260-270.

17. Zheng A, Cao L, Qin S, et al. Exenatide Regulates Substrate Preferences Through the p38 $\gamma$  MAPK Pathway After Ischaemia/Reperfusion Injury in a Rat Heart. *Heart Lung Circ.* 2017;26(4):404-412.
18. Tsuchiya A, Kanno T, Shimizu T, et al. Rac1 and ROCK are implicated in the cell surface delivery of GLUT4 under the control of the insulin signal mimetic diDCP-LA-PE. *J Pharmacol Sci.* 2015;128(4):179-184.
19. Sun Y, Bilan PJ, Liu Z, et al. Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(46):19909-19914.
20. Herzig S, Roden M. [Diabetes and the liver]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2013;138(23):1204-1206.
21. Cardiovascular diseases (CVDs) Available: [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1). Accessed 18.06.2025, 14:45 Uhr.
22. Rawshani A, Rawshani A, Franzén S, et al. Risk Factors, Mortality, and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2018;379(7):633-644.
23. Howard G, O'Leary DH, Zaccaro D, et al. Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Circulation.* 1996;93(10):1809-1817.
24. Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep.* 2014;14(1):453.
25. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8 Suppl):C7-12.
26. Donahoe SM, Stewart GC, McCabe CH, et al. Diabetes and mortality following acute coronary syndromes. *Jama.* 2007;298(7):765-775.
27. Rao Kondapally Seshasai S, Kaptoge S, Thompson A, et al. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med.* 2011;364(9):829-841.
28. Dannenberg L, Weske S, Kelm M, et al. Cellular mechanisms and recommended drug-based therapeutic options in diabetic cardiomyopathy. *Pharmacol Ther.* 2021;228:107920.
29. Murtaza G, Virk HUH, Khalid M, et al. Diabetic cardiomyopathy - A comprehensive updated review. *Prog Cardiovasc Dis.* 2019;62(4):315-326.
30. Tian R, Abel ED. Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. *Circulation.* 2001;103(24):2961-2966.
31. Costa R, Morrison A, Wang J, et al. Activated protein C modulates cardiac metabolism and augments autophagy in the ischemic heart. *J Thromb Haemost.* 2012;10(9):1736-1744.
32. Liu X, Guo Y, Yang Y, et al. DRD4 (Dopamine D4 Receptor) Mitigate Abdominal Aortic Aneurysm via Decreasing P38 MAPK (mitogen-activated protein kinase)/NOX4 (NADPH Oxidase 4) Axis-Associated Oxidative Stress. *Hypertension.* 2021;78(2):294-307.
33. Bugger H, Chen D, Riehle C, et al. Tissue-specific remodeling of the mitochondrial proteome in type 1 diabetic akita mice. *Diabetes.* 2009;58(9):1986-1997.
34. Maria Z, Campolo AR, Lacombe VA. Diabetes Alters the Expression and Translocation of the Insulin-Sensitive Glucose Transporters 4 and 8 in the Atria. *PLoS One.* 2015;10(12):e0146033.
35. Sun D, Nguyen N, DeGrado TR, et al. Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation.* 1994;89(2):793-798.

36. Yoshii A, Nagoshi T, Kashiwagi Y, et al. Cardiac ischemia-reperfusion injury under insulin-resistant conditions: SGLT1 but not SGLT2 plays a compensatory protective role in diet-induced obesity. *Cardiovasc Diabetol.* 2019;18(1):85.
37. Bonnevie-Nielsen V, Steffes MW, Lernmark A. A major loss in islet mass and B-cell function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. *Diabetes.* 1981;30(5):424-429.
38. Laboratory TJ. NZO Mice Available: <https://www.jax.org/strain/002105>. Accessed 18.06.2025, 14:45 Uhr.
39. River C. Db/Db Mice Available: <https://www.criver.com/products-services/find-model/jax-dbdb-mice?region=23>. Accessed 18.06.2025, 14:45 Uhr.
40. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 3:S215-219.
41. Versorgungsleitlinien N. Medikamentöse Therapie des Glukosestoffwechsels. 2023.
42. Nauck MA, Quast DR, Wefers J, et al. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes - state-of-the-art. *Mol Metab.* 2021;46:101102.
43. Tan HC, Dampil OA, Marquez MM. Efficacy and Safety of Semaglutide for Weight Loss in Obesity Without Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J ASEAN Fed Endocr Soc.* 2022;37(2):65-72.
44. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1409-1439.
45. Lovshin JA, Drucker DJ. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(5):262-269.
46. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 2006;3(3):153-165.
47. Prentki M, Matschinsky FM. Ca<sup>2+</sup>, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev.* 1987;67(4):1185-1248.
48. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, 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):3434-3438.
49. Holz GG, Kühtreiber WM, Habener JF. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature.* 1993;361(6410):362-365.
50. Landgraf R, Aberle J, Birkenfeld AL, et al. Therapy of Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2019;127(S 01):S73-s92.
51. Gentilella R, Pechtner V, Corcos A, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes treatment: are they all the same? *Diabetes Metab Res Rev.* 2019;35(1):e3070.
52. Husain M, Birkenfeld AL, Donsmark M, et al. Oral Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2019;381(9):841-851.
53. Ärzteblatt D. Ozempic-Engpässe mindestens bis Jahresende Available: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/153717/Ozempic-Engpaesse-mindestens-bis-Jahresende>. Accessed 18.06.2025, 14:45 Uhr.
54. e.V. DA-GD. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“ Available: [https://register.awmf.org/assets/guidelines/050-0011\\_S3\\_Praevention-Therapie-Adipositas\\_2024-10.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/050-0011_S3_Praevention-Therapie-Adipositas_2024-10.pdf). Accessed 18.06.2025, 14:45 Uhr.

55. Yao H, Zhang A, Li D, et al. Comparative effectiveness of GLP-1 receptor agonists on glycaemic control, body weight, and lipid profile for type 2 diabetes: systematic review and network meta-analysis. *Bmj*. 2024;384:e076410.
56. Iqbal J, Wu HX, Hu N, et al. Effect of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on body weight in adults with obesity without diabetes mellitus-a systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *Obes Rev*. 2022;23(6):e13435.
57. Pfeffer MA, Claggett B, Diaz R, et al. Lixisenatide in Patients with Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2015;373(23):2247-2257.
58. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, et al. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(4):311-322.
59. Marso SP, Baeres FMM, Bain SC, et al. Effects of Liraglutide on Cardiovascular Outcomes in Patients With Diabetes With or Without Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(10):1128-1141.
60. Gerstein HC, Colhoun HM, Dagenais GR, et al. Dulaglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes (REWIND): a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2019;394(10193):121-130.
61. Gerstein HC, Sattar N, Rosenstock J, et al. Cardiovascular and Renal Outcomes with Efglenatide in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2021;385(10):896-907.
62. Lincoff AM, Brown-Frandsen K, Colhoun HM, et al. Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Obesity without Diabetes. *N Engl J Med*. 2023;389(24):2221-2232.
63. Marso SP, Bain SC, Consoli A, et al. Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1834-1844.
64. Holman RR, Bethel MA, Mentz RJ, et al. Effects of Once-Weekly Exenatide on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017;377(13):1228-1239.
65. Triplitt C, Chiquette E. Exenatide: from the Gila monster to the pharmacy. *J Am Pharm Assoc* (2003). 2006;46(1):44-52; quiz 53-45.
66. Eng J, Kleinman WA, Singh L, et al. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem*. 1992;267(11):7402-7405.
67. Cai Y, Wei L, Ma L, et al. Long-acting preparations of exenatide. *Drug Des Devel Ther*. 2013;7:963-970.
68. Lei X, Wu Q, Leng W, et al. Exenatide reduces cardiomyocyte apoptosis by stimulating adiponectin secretion and activating APPL1-AMPK-PPAR $\alpha$  axis. *Ann Transl Med*. 2019;7(14):326.
69. Ji L, Zhang X, Liu W, et al. AMPK-regulated and Akt-dependent enhancement of glucose uptake is essential in ischemic preconditioning-alleviated reperfusion injury. *PLoS One*. 2013;8(7):e69910.
70. Best JH, Hoogwerf BJ, Herman WH, et al. Risk of cardiovascular disease events in patients with type 2 diabetes prescribed the glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor agonist exenatide twice daily or other glucose-lowering therapies: a retrospective analysis of the LifeLink database. *Diabetes Care*. 2011;34(1):90-95.
71. Lønborg J, Kelbæk H, Vejlsstrup N, et al. Exenatide reduces final infarct size in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction and short-duration of ischemia. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012;5(2):288-295.

72. Woo JS, Kim W, Ha SJ, et al. Cardioprotective effects of exenatide in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of exenatide myocardial protection in revascularization study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(9):2252-2260.
73. Park CW, Kim HW, Ko SH, et al. Long-term treatment of glucagon-like peptide-1 analog exendin-4 ameliorates diabetic nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(4):1227-1238.
74. Mansur SA, Mieczkowska A, Flatt PR, et al. The GLP-1 Receptor Agonist Exenatide Ameliorates Bone Composition and Tissue Material Properties in High Fat Fed Diabetic Mice. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:51.
75. Mishra P, Pandey CM, Singh U, et al. Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Ann Card Anaesth.* 2019;22(1):67-72.
76. Kim TK. T test as a parametric statistic. *Korean J Anesthesiol.* 2015;68(6):540-546.
77. Hart A. Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. *Bmj.* 2001;323(7309):391-393.
78. Leivaditis V, Koletsis E, Tsopanoglou N, et al. The Coadministration of Levosimendan and Exenatide Offers a Significant Cardioprotective Effect to Isolated Rat Hearts against Ischemia/Reperfusion Injury. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2022;9(8).
79. Robinson E, Cassidy RS, Tate M, et al. Exendin-4 protects against post-myocardial infarction remodelling via specific actions on inflammation and the extracellular matrix. *Basic Res Cardiol.* 2015;110(2):20.
80. Withaar C, Meems LMG, Nollet EE, et al. The Cardioprotective Effects of Semaglutide Exceed Those of Dietary Weight Loss in Mice With HFpEF. *JACC Basic Transl Sci.* 2023;8(10):1298-1314.
81. Eid RA, Alharbi SA, El-Kott AF, et al. Exendin-4 Ameliorates Cardiac Remodeling in Experimentally Induced Myocardial Infarction in Rats by Inhibiting PARP1/NF- $\kappa$ B Axis in a SIRT1-Dependent Mechanism. *Cardiovasc Toxicol.* 2020;20(4):401-418.
82. Lee KH, Ha SJ, Woo JS, et al. Exenatide Prevents Morphological and Structural Changes of Mitochondria Following Ischaemia-Reperfusion Injury. *Heart Lung Circ.* 2017;26(5):519-523.
83. Monji A, Mitsui T, Bando YK, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reverses cardiac remodeling via normalizing cardiac steatosis and oxidative stress in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;305(3):H295-304.
84. Cao YY, Chen ZW, Gao YH, et al. Exenatide Reduces Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Apoptosis in Cardiomyocytes by Alleviating Mitochondrial Dysfunction. *Chin Med J (Engl).* 2015;128(23):3211-3218.
85. Lai YC, Tabima DM, Dube JJ, et al. SIRT3-AMP-Activated Protein Kinase Activation by Nitrite and Metformin Improves Hyperglycemia and Normalizes Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation.* 2016;133(8):717-731.
86. Prandi FR, Evangelista I, Sergi D, et al. Mechanisms of cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy: molecular abnormalities and phenotypical variants. *Heart Fail Rev.* 2023;28(3):597-606.
87. Almutairi M, Gopal K, Greenwell AA, et al. The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide Increases Myocardial Glucose Oxidation Rates via Indirect Mechanisms and Mitigates Experimental Diabetic Cardiomyopathy. *Can J Cardiol.* 2021;37(1):140-150.

- 
88. Boyer JK, Thanigaraj S, Schechtman KB, et al. Prevalence of ventricular diastolic dysfunction in asymptomatic, normotensive patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2004;93(7):870-875.
89. From AM, Scott CG, Chen HH. The development of heart failure in patients with diabetes mellitus and pre-clinical diastolic dysfunction a population-based study. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(4):300-305.
90. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2023 Focused Update of the 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2023;44(37):3627-3639.
91. Kan M, Fu H, Xu Y, et al. Effects of once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonists on type 2 diabetes mellitus complicated with coronary artery disease: Potential role of the renin-angiotensin system. *Diabetes Obes Metab.* 2023;25(11):3223-3234.
92. Kosiborod MN, Petrie MC, Borlaug BA, et al. Semaglutide in Patients with Obesity-Related Heart Failure and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2024;390(15):1394-1407.
93. Butler J, Shah SJ, Petrie MC, et al. Semaglutide versus placebo in people with obesity-related heart failure with preserved ejection fraction: a pooled analysis of the STEP-HFpEF and STEP-HFpEF DM randomised trials. *Lancet.* 2024;403(10437):1635-1648.
94. Nathanson D, Ullman B, Löfström U, et al. Effects of intravenous exenatide in type 2 diabetic patients with congestive heart failure: a double-blind, randomised controlled clinical trial of efficacy and safety. *Diabetologia.* 2012;55(4):926-935.
95. Cimino G, Vaduganathan M, Lombardi CM, et al. Obesity, heart failure with preserved ejection fraction, and the role of glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *ESC Heart Fail.* 2024;11(2):649-661.
96. Lechleitner M, Roden M, Weitgasser R, et al. [Injection therapy of diabetes]. *Wien Klin Wochenschr.* 2023;135(Suppl 1):45-52.
97. Simó R, Guerci B, Scherthaner G, et al. Long-term changes in cardiovascular risk markers during administration of exenatide twice daily or glimepiride: results from the European exenatide study. *Cardiovasc Diabetol.* 2015;14:116.
98. Lipscombe LL. Exenatide did not reduce major cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *Ann Intern Med.* 2017;167(12):Jc67.
99. Miki T, Itoh T, Sunaga D, et al. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:67.
100. Thakker GD, Frangogiannis NG, Bujak M, et al. Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(5):H2504-2514.
101. Bose AK, Mocanu MM, Carr RD, et al. Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes.* 2005;54(1):146-151.
102. Chen J, Wang D, Wang F, et al. Exendin-4 inhibits structural remodeling and improves Ca(2+) homeostasis in rats with heart failure via the GLP-1 receptor through the eNOS/cGMP/PKG pathway. *Peptides.* 2017;90:69-77.
103. Eid RA, Zaki MSA, Alaa Eldeen M, et al. Exendin-4 protects the hearts of rats from ischaemia/reperfusion injury by boosting antioxidant levels and inhibition of JNK/p(66) Shc/NADPH axis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2020;47(7):1240-1253.

104. García Del Blanco B, Otaegui I, Rodríguez-Palomares JF, et al. Effect of COMBINAtion therapy with remote ischemic conditioning and exenatide on the Myocardial Infarct size: a two-by-two factorial randomized trial (COMBAT-MI). *Basic Res Cardiol.* 2021;116(1):4.
105. Roos ST, Timmers L, Biesbroek PS, et al. No benefit of additional treatment with exenatide in patients with an acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2016;220:809-814.
106. Marfella R, Di Filippo C, Portoghese M, et al. Tight glycemic control reduces heart inflammation and remodeling during acute myocardial infarction in hyperglycemic patients. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(16):1425-1436.
107. Eitel I, Hintze S, de Waha S, et al. Prognostic impact of hyperglycemia in nondiabetic and diabetic patients with ST-elevation myocardial infarction: insights from contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2012;5(6):708-718.
108. Reinstadler SJ, Stiermaier T, Eitel C, et al. Relationship between diabetes and ischaemic injury among patients with revascularized ST-elevation myocardial infarction. *Diabetes Obes Metab.* 2017;19(12):1706-1713.
109. Litviňuková M, Talavera-López C, Maatz H, et al. Cells of the adult human heart. *Nature.* 2020;588(7838):466-472.
110. Prata C, Zambonin L, Rizzo B, et al. Glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni Possess Insulin-Mimetic and Antioxidant Activities in Rat Cardiac Fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:3724545.
111. Gorski DJ, Petz A, Reichert C, et al. Cardiac fibroblast activation and hyaluronan synthesis in response to hyperglycemia and diet-induced insulin resistance. *Sci Rep.* 2019;9(1):1827.
112. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813-820.
113. Li X, Jin SJ, Su J, et al. Acid Sphingomyelinase Down-regulation Alleviates Vascular Endothelial Insulin Resistance in Diabetic Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2018;123(6):645-659.
114. Amor S, Martín-Carro B, Rubio C, et al. Study of insulin vascular sensitivity in aortic rings and endothelial cells from aged rats subjected to caloric restriction: Role of perivascular adipose tissue. *Exp Gerontol.* 2018;109:126-136.
115. Kiss A, Podesser BK. Cardioprotection by PEDF: A novel form of GLUT4 membrane translocation to reduce myocardial ischemic injury. *Int J Cardiol.* 2019;288:119-120.
116. Younce CW, Burmeister MA, Ayala JE. Exendin-4 attenuates high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress and activation of SERCA2a. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;304(6):C508-518.
117. Younce CW, Niu J, Ayala J, et al. Exendin-4 improves cardiac function in mice overexpressing monocyte chemoattractant protein-1 in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;76:172-176.
118. Eid RA, Khalil MA, Alkhateeb MA, et al. Exendin-4 Attenuates Remodeling in the Remote Myocardium of Rats After an Acute Myocardial Infarction by Activating  $\beta$ -Arrestin-2, Protein Phosphatase 2A, and Glycogen Synthase Kinase-3 and Inhibiting  $\beta$ -Catenin. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2021;35(6):1095-1110.
119. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, et al. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes.* 1988;37(9):1163-1167.
120. Ahrén B, Pacini G. Insufficient islet compensation to insulin resistance vs. reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283(4):E738-744.

121. Nguyen-Phuong T, Seo S, Cho BK, et al. Determination of progressive stages of type 2 diabetes in a 45% high-fat diet-fed C57BL/6J mouse model is achieved by utilizing both fasting blood glucose levels and a 2-hour oral glucose tolerance test. *PLoS One*. 2023;18(11):e0293888.
122. Meda Venkata SP, Li H, Xu L, et al. The Impact of Obesity on Diabetes Onset and Neovascularization in Mouse Models of Metabolic Stress. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2).
123. Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, et al. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol*. 2009;7(5):e1000112.
124. Peltonen L, McKusick VA. Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science*. 2001;291(5507):1224-1229.
125. Kraft K, Geuer S, Will AJ, et al. Deletions, Inversions, Duplications: Engineering of Structural Variants using CRISPR/Cas in Mice. *Cell Rep*. 2015;10(5):833-839.
126. Bosenberg M, Liu ET, Yu CI, et al. Mouse models for immuno-oncology. *Trends Cancer*. 2023;9(7):578-590.
127. Umscheid CA, Margolis DJ, Grossman CE. Key concepts of clinical trials: a narrative review. *Postgrad Med*. 2011;123(5):194-204.
128. Duisburg-Essen U. Gentechnisch veränderte Mäuse Available: <https://www.uni-due.de/zentrales-tierlabor/gentechnisch-veraenderte-maus.php#:~:text=Die%20Zucht%20und%20Haltung%20von,genetisch%20belasteter%20Mauslinien%E2%80%9C%20beantragt%20werden>. Accessed 18.06.2025, 14:45 Uhr.
129. Kielb J, Saffak S, Weber J, et al. Transformation or replacement - Effects of hormone therapy on cardiovascular risk. *Pharmacol Ther*. 2024;254:108592.
130. Kommission E. Byetta: ANHANG I, ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS Available: [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2019/20190606145132/anx\\_145132\\_de.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2019/20190606145132/anx_145132_de.pdf). Accessed 18.06.2025, 14:45 Uhr.
131. Kirk RGW. Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. *Sci Technol Human Values*. 2018;43(4):622-648.
132. Wilding JPH, Batterham RL, Calanna S, et al. Once-Weekly Semaglutide in Adults with Overweight or Obesity. *N Engl J Med*. 2021;384(11):989-1002.
133. Thethi TK, Pratley R, Meier JJ. Efficacy, safety and cardiovascular outcomes of once-daily oral semaglutide in patients with type 2 diabetes: The PIONEER programme. *Diabetes Obes Metab*. 2020;22(8):1263-1277.
134. Nordisk N. Oral semaglutide 25 mg and 50 mg demonstrate superior reductions in HbA1c and body weight versus 14 mg in people with type 2 diabetes in the PIONEER PLUS phase 3 trial Available: <https://www.novonordisk.com/news-and-media/news-and-ir-materials/news-details.html?id=165597>. Accessed 18.06.2025, 14:45 Uhr.
135. Sinha R, Papamargaritis D, Sargeant JA, et al. Efficacy and Safety of Tirzepatide in Type 2 Diabetes and Obesity Management. *J Obes Metab Syndr*. 2023;32(1):25-45.
136. Baggio LL, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor co-agonists for treating metabolic disease. *Mol Metab*. 2021;46:101090.

- 
137. Melson E, Miras AD, Papamargaritis D. Future therapies for obesity. *Clin Med (Lond)*. 2023;23(4):337-346.
138. Kubota M, Yamamoto K, Yoshiyama S. Effect on Hemoglobin A1c (HbA1c) and Body Weight After Discontinuation of Tirzepatide, a Novel Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide (GIP) and Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Receptor Agonist: A Single-Center Case Series Study. *Cureus*. 2023;15(10):e46490.
139. Wolfe BM, Kvach E, Eckel RH. Treatment of Obesity: Weight Loss and Bariatric Surgery. *Circ Res*. 2016;118(11):1844-1855.
140. Kosiborod MN, Abildstrøm SZ, Borlaug BA, et al. Semaglutide in Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction and Obesity. *N Engl J Med*. 2023;389(12):1069-1084.
141. Davies M, Færch L, Jeppesen OK, et al. Semaglutide 2·4 mg once a week in adults with overweight or obesity, and type 2 diabetes (STEP 2): a randomised, double-blind, double-dummy, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2021;397(10278):971-984.
142. Qaseem A, Obley AJ, Shamliyan T, et al. Newer Pharmacologic Treatments in Adults With Type 2 Diabetes: A Clinical Guideline From the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2024;177(5):658-666.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich meiner Betreuerin, PD Dr. med. Lisa Dannenberg, meinen tiefsten Dank aussprechen. Ihre Unterstützung während der gesamten Dissertation war für mich von unschätzbarem Wert. Besonders hervorheben möchte ich ihr stets offenes Ohr, ihre exzellente Expertise und die unaufhörliche Förderung meiner persönlichen und fachlichen Weiterentwicklung. Ohne Ihre fachliche Führung und Motivation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein herzlichster Dank gilt auch meiner Verlobten Jessica Weber, die mich während des gesamten Projekts auf unermüdliche Weise emotional unterstützt hat. Ihre ständige Unterstützung und ihr Verständnis bei schwierigen Momenten sowie in arbeitsreichen Phasen hat mir stets geholfen, den Fokus zu behalten und nie die Motivation zu verlieren. Durch die enge Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe bin ich auch dankbar für ihre inhaltliche Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir sowohl finanzielle als auch emotionale Unterstützung gewährt haben. Ihr Verständnis für meine Entscheidung, im Rahmen der Experimente ein Freisemester zu nehmen, war für mich von enormer Bedeutung. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung in all den Jahren wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.

Ein weiterer Dank geht an meinen Bruder, der mir mit seiner Unterstützung bei den Formalien und der Formkorrektur der Dissertation zur Seite stand. Seine präzisen Hinweise und seine zusätzliche emotionale Unterstützung haben mir sehr geholfen, die Arbeit in der finalen Phase erfolgreich abzuschließen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Arbeitsgruppe meinen Dank aussprechen. Innerhalb der Gruppe konnten wir uns gegenseitig unterstützen und Schwierigkeiten der Projekte diskutieren. Diese gedankliche Unterstützung hat diese Dissertation außerordentlich vorangetrieben.

Weiterhin danke ich allen anderen, die auf ihre Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben.