Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Rottbauer

Effekte des DPP-IV Inhibitors Sitagliptin auf die Ausdehnung und Stabilität arteriosklerotischer Läsionen in Apolipoprotein E defizienten Mäusen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin der medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Von
Rahel Ostertag
Heidenheim an der Brenz
2011

Amtierender Dekan: Prof Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof Dr. Nikolaus Marx

2. Berichterstatter: Prof Dr. Bernhard Böhm

Tag der Promotion: 10.05.12

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 Diabetes mellitus Typ 2 1
1.2 Arteriosklerose 1
1.3 GLP-1 3
1.4 Vergleich von GLP-1 Analoga mit DPP-IV Inhibitoren 7
1.5 Mausmodell 8
1.6 Ziel 8
2 Material und Methoden 10
2.1 Geräte 10
2.2 Lösungen 10
2.3 Mausmodell 12
2.4 Herstellung der Präparate 13
2.5 Oil-red-O Färbung der Lipidablagerungen 14
2.6 Immunhistochemische Färbung 16
2.6.1 Avidin-Biotin-Methode 16
2.6.2 Mac-3 Färbung 17
2.7 Picrosirius rot Färbung des Kollagen 21
2.8 DPP-IV Aktivität 21
2.9 Statistische Analyse 21
3 Ergebnisse 22
3.1 Metabolisches Profil 22
3.2 Ausdehnung arteriosklerotischer Läsionen 24
3.3 Makrophageninfiltration arteriosklerotischer Läsionen 27
3.4 Kollagengehalt arteriosklerotischer Läsionen 32
4 Diskussion 37
4.1 DPP-IV Inhibitoren 37
4.1.1 Inkretine 37
4.1.2 Bedeutung der vaskulären Effekte von Inkretinen für Patienten mit Diabetes mellitus 38

4.2 Effekt von Sitagliptin auf die Ausdehnung und Zusammensetzung der arteriosklerotischen Läsionen 38
4.2.1 Makrophagen 39
4.2.2 Kollagen 39
4.3 Physiologische Bedeutung 40
4.4 Vergleich zu GLP-1 Analoga 40
5 Zusammenfassung 42
6 Literaturverzeichnis 43

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ABC	Avidin-Biotin Komplex
AEC	3-amino-9-ethylcarbazol Komplex
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE $^{-/-}$	Apolipoprotein E defizient
Aqua dest	Aqua destillata
CTR	Kontrollgruppe mit Placebo
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase-IV
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fc-Region	Fragment crystallizable
g	Gramm
GIP	Glukose-abhängiges insulinotropes Polypeptid
GLP	Glucagon-like peptide
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HbA1c	Hämoglobin A1c
HCl	Chlorwasserstoffsäure
H-Gly-Pro-pNA	Glycin-Prolin p-Nitroanilid
Ig G	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LDL	Low density Lipoprotein
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
N	Normalität

n	Anzahl
Na_2HPO_4 x $2H_2O$	Di- Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
nmol	Nanomol
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pNA	p-Nitroanilid
RNA	Ribonukleinsäure
SITA	Gruppe mit der Behandlung von Sitagliptin
VLDL	Very low density Lipoprotein
wt	Gewicht

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 2

Im Jahr 2007 sind durchschnittlich 246 Millionen Menschen weltweit an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt. Es wird erwartet, dass diese Zahl bis ins Jahr 2025 auf über 380 Millionen Diabetiker weltweit ansteigen wird. Das bedeutet eine Steigerung von 55 % (Sicree et al., 2006).

Die Ursache für Diabetes mellitus Typ 2 ist ein Zusammenspiel von genetischer Prädisposition sowie verhaltens- und umweltbedingten Risikofaktoren (Tuomilehto et al., 2001). Ein relativer Insulinmangel durch Insulinresistenz und / oder ein sekretorischer Defekt mit Insulinresistenz führen zu einer Hyperglykämie (Alberti et al., 1998). Personen mit Adipositas und im mittleren Lebensalter sind besonders häufig betroffen (Kalofoutis et al., 2007). Oftmals kann es bei Diabetikern zu Spätkomplikationen kommen, dazu gehören zum Beispiel Retinopathie diabetica, diabetische Glomerulosklerose, Neuropathien, Arteriosklerose und kardiovaskuläre Krankheiten (Frercks et al., 2004). Dabei gelten Übergewicht und Adipositas für Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 als unabhängige Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten (Davidson, 2009). Dementsprechend kommt es in dieser Bevölkerungsgruppe häufig zu kardiovaskulären Erkrankungen und Todesfällen, die einen hohen Kostenfaktor für das Gesundheitssystem bedeuten (Kalofoutis et al., 2007). Vor dem Hintergrund, dass Patienten mit Diabetes mellitus ein erhöhtes Risiko haben, an einer schweren und diffusen Atherosklerose zu erkranken, kommt den vaskulären Effekten von Antidiabetika eine besondere Rolle zu. Zu den neuen auf Inkretinhormonen basierenden Antidiabetika gehören Glucagon-like peptide-1 Analoga (GLP-1 Analoga) und Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitoren (DPP-IV Inhibitoren) (Davidson, 2009).

1.2 Arteriosklerose

In Europa und den Vereinigten Staaten sind kardiovaskuläre Krankheiten eine der Haupttodesursachen (Ross, 1999). 38 % aller Todesfälle in Nordamerika sind kardiovaskulären Ursprungs. In Europa sind kardiovaskuläre Krankheiten bei

Männer unter 65 Jahren die häufigste und bei Frauen die zweithäufigste Todesursache (Hansson, 2005).

Arteriosklerose ist ein entzündliches Geschehen in der Gefäßwand. In einer arteriosklerotischen Läsion laufen eine Reihe von hoch spezifischen molekularen Reaktionen ab (Ross, 1999). Betroffen sind vor allem große und mittelgroße Arterien, wobei es infolge der Arteriosklerose zu Ischämie von Herz, Gehirn und Extremitäten bis hin zum Infarkt kommen kann.

Ausgangspunkt der Arteriosklerose ist die endotheliale Dysfunktion. Eine der Ursachen dafür ist erhöhtes und modifiziertes LDL, das unter anderem durch Oxidation und Glykosylierung modifiziert wird. Weitere Ursachen sind durch Nikotin freigesetzte Radikale, Bluthochdruck und Diabetes mellitus. Es kommt zu einer kompensatorischen Antwort und damit zu einer Änderung der normalen homöostatischen Eigenschaften des Endothels. Die Permeabilität und Adhäsion in Bezug auf Thrombozyten und Leukozyten ist erhöht und die Endothelzellen bilden vasoaktive Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren (Ross, 1999). Monozyten wandern auf diese Weise durch das aktivierte Endothel ein und differenzieren zu pro-inflammatorischen und pro-atherosklerotischen Makrophagen (Hansson, 2005). Die stimulierten Makrophagen und Lymphozyten setzen Cytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Metalloproteasen und Cysteinproteasen frei. Diese greifen Kollagen sowie andere Komponente der Gewebematrix an und schädigen diese (Hansson, 2005; Ross, 1999). Modifizieren Makrophagen LDL und nehmen es in sich auf, entstehen sogenannte Schaumzellen (Ross, 1999).

Dauert die Entzündungsreaktion an, immigrieren immer mehr Monozyten aus dem Blut in die Läsion und vervielfältigen sich dort. Durch Ansammlung von mononukleären Zellen, Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen und Bildung von fibrösem Gewebe wächst die Läsion an und strukturiert sich neu (Ross, 1999). Aufgebaut ist die Läsion wie folgt: im Zentrum des Atheroms befinden sich Schaumzellen und extrazelluläre Fetttröpfchen, sie bilden die Kernregion. Diese ist umgeben von einer Kapsel aus glatten Muskelzellen und kollagenreicher Matrix. T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen befinden sich gehäuft in der Schulterregion; die Stelle an der das Atherom wächst (Hansson, 2005). Man spricht nun von einer fortgeschrittenen Läsion (Ross, 1999).

Voneinander unterschieden werden stabile und instabile Läsionen. Die Stabilität einer Läsion ist abhängig von der Größe ihres Fettkerns. Je größer dieser ist,

desto instabiler ist die Läsion. Für die Stabilität sind außerdem die Dicke und die Unversehrtheit der fibrösen Kapsel und seine Resistenz gegen einen möglichen Riss wichtig. Dies ist wiederum abhängig von der extrazellulären Kollagenmatrix, aus der sich die fibröse Kapsel zusammensetzt. Makrophagen können dazu beitragen, die fibröse Kapsel zu schwächen. Der Grund dafür ist, dass sie verschiedene Enzyme exprimieren, welche die Matrix zerstören können. Auf diese Weise können die Makrophagen Einfluss auf die Stabilität der Läsion nehmen (Libby et al., 1996).

Wird die Läsion instabil, kann es durch erhöhten Blutdruck zu einer Ruptur kommen. Oft ist der Bruch in der Schulterregion einer Läsion, ein Bereich, in dem sich vor allem Makrophagen aufhalten (Ross, 1999). Infolge der Ruptur kommt der prothrombotische Inhalt der Plaques mit den Gerinnungsfaktoren des Blutes in Kontakt. Durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt es zur Bildung eines Thrombus. Nicht okklusive Thromben können ohne Symptome vorübergehen oder eine belastungsabhängige Angina infolge von Ischämie hervorrufen (Libby, 2005). Okklusive Thromben sind häufig Ursache für das klinische Bild eines akuten Koronarsyndroms und eines Myokardinfarktes (Ross, 1999).

1.3 GLP-1

Neben dem Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptid (GIP) ist GLP-1 das wichtigste Inkretinhormon im menschlichen Körper. Inkretine sind Hormone, welche nach der Nahrungsaufnahme aus dem Darm in das Blut freigesetzt werden und die postprandiale Insulin- und Glucagonsekretion modulieren (Ahren, 2003; Kim et al., 2008). Die Ausschüttung von GLP-1 erfolgt innerhalb von Minuten nach der Nahrungsaufnahme (Baggio et al., 2007).

GLP-1 entsteht durch posttranslationale Spaltung des Pre-Proglucagons in intestinalen L-Zellen. Bei allen Säugetieren wird es im Pankreas, in intestinalen L-Zellen, im Gehirn und in Geschmackszellen exprimiert (Kim et al., 2008) und liegt entsprechend der vom Pre-Proglucagon abgespaltenen Aminosäuren in wenigstens sechs aktiven Formen vor: 1-36, 1-37, 7-36, 7-37, 9-36 und 9-37. Die Inkretinwirkung wird hauptsächlich den beiden Formen 7-36 und 7-37 zugeschrieben. Ihre blutzuckersenkenden Effekte werden durch Bindung an den

GLP-1 Rezeptor ausgelöst. Dieser ist ein 7-Transmembran G-Proteingekoppelter Rezeptor (Thorens, 1992). Er wurde in den verschiedensten Geweben, wie Lunge, Herz, glatte Gefäßmuskelzellen, Nervengewebe, Pankreas und Gastrointestinaltrakt identifiziert (Bullock et al., 1996; Goke et al., 1995). Eine Aktivierung dieses Rezeptors führt zur Insulinausschüttung und Proliferation der ß-Zellen des Pankreas und somit zu einer vermehrten peripheren Aufnahme von Glukose in Zellen. Die glukoseabhängige Hemmung der Glucagonsekretion aus den α-Zellen des Pankreas vermindert die Synthese von Glukose in der Leber. Diese beiden Mechanismen führen zu einer Reduktion der Blutglukosekonzentration (Eissele et al., 1992; Nauck et al., 1996). Zudem kommt es bei GLP-1 Rezeptoraktivierung zur verlangsamten Leerung des Magens und zu einem gesteigerten Sättigkeitsgefühl. Auch ist eine nachhaltige GLP-1 Rezeptoraktivierung mit einem Gewichtsverlust verbunden (Baggio et al., 2007). Folgende Abbildung zeigt die Modulation des Stoffwechsels durch GLP-1 Rezeptoraktivierung.

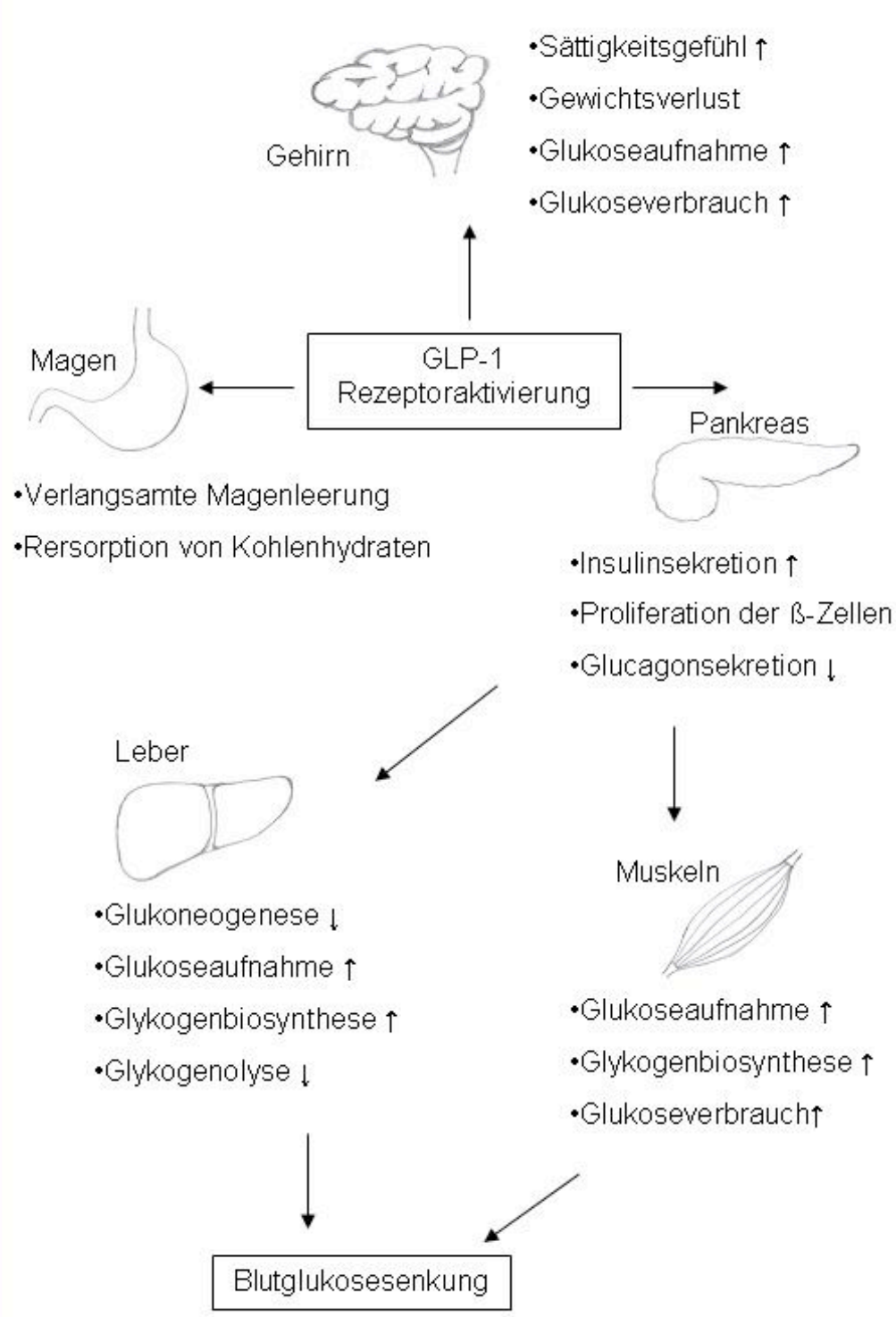


Abbildung 1: Modulation der Glucagon- und Insulinsekretion durch die Aktivierung des Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) Rezeptors durch GLP-1 zur Senkung des Blutglukosespiegels.

Abgebaut wird GLP-1 durch das Enzym DPP-IV. Dieses Enzym wird in Leber, Lunge, Niere, Lymphozyten, epithelialen Zellen und Endothelzellen exprimiert (Davidson, 2009). DPP-IV ist eine Serinprotease, welche Polypeptide, wie auch GLP-1, durch Abspaltung von Dipeptiden am N-terminalen Ende abbaut und

dadurch die Halbwertszeit von GLP-1 auf unter zwei Minuten reduziert (Davis et al., 2010).

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 kommt es häufig zu Abweichungen in der Hormonsekretion unter anderem von GLP-1. Dabei ist die Produktion von GLP-1 vermindert. Dies führt zu einer Erniedrigung des Inkretineffektes und somit zu einer Verringerung der Insulinsekretion. Die Therapie mit auf GLP-1 basierenden Medikamenten ist für Erwachsene mit Diabetes mellitus Typ 2 eine alternative Behandlungsmöglichkeit zu herkömmlichen Antidiabetika. Seit 2005 werden GLP-1 Rezeptor Agonisten, wie beispielsweise Exenatide, zur Behandlung von Patienten mit Typ 2 Diabetes eingesetzt. DPP-IV Inhibitoren, zu denen Sitagliptin zählt, sind seit Oktober 2006 auf dem Arzneimittelmarkt erhältlich (Amori et al., 2007). Sitagliptin ist ein kompetitiver, reversibler, schnell und fest bindender DPP-IV Inhibitor (Davis et al., 2010).

Folgende Abbildung stellt schematisch die Ausschüttung, den Abbau von GLP-1 durch DPP-IV und die Insulinausschüttung dar.

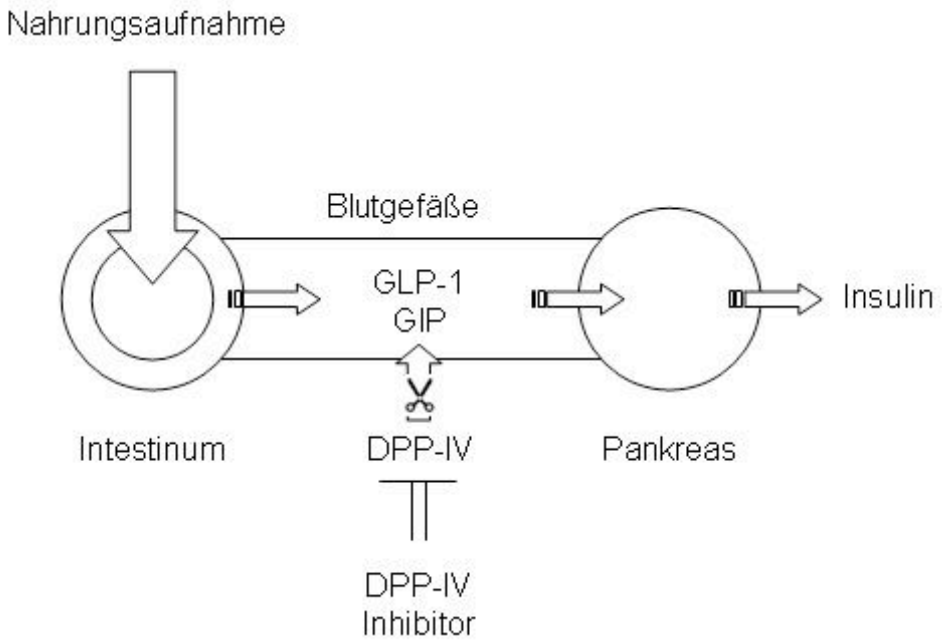


Abbildung 2: Die Freisetzung von Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) und Glukose-abhängigem insulinotropem Polypeptid (GIP) aus intestinalen Zellen ins Blut erfolgt nach der Nahrungsaufnahme. Dadurch kommt es zur Insulinausschüttung der ß-Zellen im Pankreas. Abgebaut wird GLP-1 und GIP durch Dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV). Dieser Abbau kann durch DPP-IV Inhibitoren, wie beispielsweise Sitagliptin, gehemmt werden.

Positive vaskuläre Effekte durch die Therapie mit auf GLP-1 basierenden Substanzen sind bereits nachgewiesen. Beispielsweise verbessert GLP-1 bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und koronarer Herzkrankheit die endotheliale Dysfunktion (Nystrom et al., 2004). Bei Patienten mit leichtem bis moderaten Bluthochdruck sinkt der Blutdruck durch die Behandlung mit Sitagliptin um 2-3 mmHg (Mistry et al., 2008). Weitere positive Effekte von Sitagliptin sind die Reduktion des Nüchternglucosewertes im Plasma und des HbA1c, die gute Verträglichkeit und ein konstantes Körpergewicht (Scott et al., 2007).

Es ist jedoch noch nicht bekannt, inwieweit GLP-1 einen Effekt auf die Atherogenese hat und ob GLP-1 die Zusammensetzung der arteriosklerotischen Plaques bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 beeinflusst.

1.4 Vergleich von GLP-1 Analoga mit DPP-IV Inhibitoren

Da sich die Wirkungsweise von GLP-1 Analoga zu der von DPP-IV Inhibitoren unterscheidet, sollen diese Unterschiede hier erläutert werden.
GLP-1 Analoga, wie Exendin-4 und Liraglutide, wirken direkt an dem GLP-1 Rezeptor und aktivieren diesen. Ihre Verabreichung erfolgt durch subkutane Injektion und in Kombination mit oralen Medikamenten, es treten daraufhin verhältnismäßig mehr unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf als bei der Gabe von DPP-IV Inhibitoren (Pratley, 2008). DPP-IV Inhibitoren, wie Sitagliptin, Vildagliptin und Saxagliptin, verhindern den Abbau von GLP-1 und führen damit indirekt zu einer Erhöhung des GLP-1 Spiegels. Die dabei entstehenden körpereigenen Formen von GLP-1 sind nicht nur an den GLP-1 Rezeptoren wirksam, sondern sind auch unabhängig von dem bekannten GLP-1 Rezeptor aktiv (Ban et al., 2008). Die Verabreichung der DPP-IV Inhibitoren erfolgt oral (Pratley, 2008).
DPP-IV ist nicht nur Substrat für GLP-1, sondern auch noch für weitere Chemokine und Peptide (Hildebrandt et al., 2008). Bei einer Hemmung von DPP-IV ist somit nicht nur GLP-1 betroffen, ebenso werden andere Chemokine und Peptide beeinflusst.
Inwieweit diese Unterschiede Auswirkungen auf den antiinflammatorischen Effekt bezüglich der Atherogenese und die Zusammensetzung der arteriosklerotischen

Plaques bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 haben könnten, ist noch unbekannt.

1.5 Mausmodell

Für die vorliegende Studie wurde das Modell der Apolipoprotein E defizienten Maus (ApoE $^{-/-}$) ausgewählt. Der Vorteil gegenüber anderen Mausmodellen, wie beispielsweise dem LDL-Rezeptor knockout Modell, besteht darin, dass die Läsionsentwicklung und die Zusammensetzung der Plaques von ApoE $^{-/-}$ Mäusen dem der humanen Plaques, insbesondere ihr Anteil inflammatorischer Zellen, entsprechen (Pendse et al., 2009; Williams et al., 2002).

Apolipoprotein E spielt durch die Verstoffwechslung von Triglycerid-reichen Lipoproteinbestandteilen eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel (Pendse et al., 2009). Die Besonderheit dieser genetisch veränderten Mäuse liegt darin, dass sich bei ihnen im Verlauf ihres Lebens spontan arteriosklerotische Läsionen bilden, da sich durch das fehlende Apolipoprotein E im Blutplasma vermehrt VLDL und Überreste von Chylomicronen ansammeln und es in den Gefäßwänden vermehrt zu Schaumzellakkumulationen kommt (Pendse et al., 2009). Im Alter von drei Monaten entwickeln sich in der proximalen Aorta Beläge mit Schaumzellen. Diese spontanen Läsionen schreiten fort und können im Alter von acht Monaten zu schwerwiegenden Gefäßverschlüssen führen (Zhang et al., 1992). Durch eine Hochcholesterindiät kann die Entstehung der arteriosklerotischen Läsionen weiter gefördert werden (Shamshiev et al., 2007; Chiba et al., 2006).

1.6 Ziel

Mithilfe des Modells der Apolipoprotein E defizienten Maus soll geklärt werden, inwieweit die Erhöhung des GLP-1 Spiegels durch den DPP-IV Inhibitior Sitagliptin eine antiinflammatorische und antiatherogene Wirkung zeigt. Dazu wird das Ausmaß der arteriosklerotischen Läsionen in der Aorta descendens, der Aortenwurzel und dem Aortenbogen von Mäusen mit normalen und erhöhten GLP-1 Plasmaspiegeln verglichen. Hierfür werden Apo E $^{-/-}$ Mäuse mit Sitagliptin oder Placebo behandelt. Außerdem wird ihre Plaquezusammensetzung in der Aortenwurzel und dem Aortenbogen in Bezug auf die Makrophageninfiltration und den Kollagenfasergehalt hin untersucht. Folglich werden die Entzündungslast und

die Plaquestabilität, die im Zusammenhang mit dem Kollagenfasergehalt steht, untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Deckgläser	Menzel (Braunschweig, Deutschland)
Eppendorf tubes	Eppendorf (Österreich)
Faltenfilter	Whatman (Dassel, Deutschland)
Mikroskop	Zeiss (Jena, Deutschland)
pH-Meter	Mettler (Toledo, Schweiz)
Pinzette	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Pipetten	Gilson (Middleton, Wi, USA)
Pipettenaufsätze	Eppendorf (Österreich)
Pipetus	Hirschmann (Deutschland)
Rührgerät	Neolab (Heidelberg, Deutschland)
Stahlnadeln	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Spektrofotometer	Beckman Coulter Fullerton (CA, USA)
Wärmeschrank	Heraeus (Haunau, Deutschland)

2.2 Lösungen

Aceton	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland)
3-amino-9-ethylcarbazol	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland)
AB-Komplex	Vector Laboratories (Peterborough, United Kingdom)
Alpha Actin Antikörper	Actin (I-19) Goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Aprotinin	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EDTA	Sigma Diagnostics (USA)
Eisessig (100 % Essigsäure)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)

Ethanol 100%	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Goat anti rabbit biotyniliert	Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated, Dako (Glostrup, Dänemark)
Goat Serum	Goat Serum (Normal), Dako (Glostrup, Dänemark)
H_2O_2 – 30%	Otto Fischer
Hämatoxylin	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland)
HCl 1M	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
H-Gly-Pro-pNA	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
KCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KH_2PO_4	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Mac-3 Antikörper	BD Pharmigen™ purified Rat Anti-Mouse Mac-3 (M3/84), BD Biosciences Pharmingen (NJ; USA)
Methanol	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland)
N'N-dimethylformamid	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland)
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland)
NaCl	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumacetattrihydrat	Riedel de Haen (Seelze, Deutschland)
Oil-red-O	Sigma - Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Picric acid	Sigma - Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Propylen Glycol	Sigma – Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Rabbit Anti Goat biotinyliert	Polyclonal Rabbit Anti Goat Immunoglobulins/Biotinylated, Dako (Glostrup, Dänemark)
Rabbit anti rat biotinyliert	Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins/Biotinylated, Dako (Glostrup, Dänemark)
Rabbit Serum	Rabbit Serum (Normal), Dako (Glostrup, Dänemark)
Sirius red	Polysciences (Eppelheim, Deutschland)

2.3 Mausmodell

Als Versuchstiere für die Studie wurden zwanzig C57 BL/6 Apolipoprotein E defiziente Mäuse ausgewählt. Sie wurden im Alter von sieben Wochen von dem Charles River Laboratorium, Germany, erworben. Die Eingewöhnungszeit für die Mäuse in der neuen Umgebung betrug zwei Wochen.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in der Versuchstierhaltung der Universität Ulm in Einzelkäfigen. Während des gesamten Versuchsablaufs hatten die Mäuse freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Umgebung war frei von Pathogenen und es bestand ein Zwölfstundenrhythmus von hell und dunkel.

Ab dem Alter von neun Wochen bekamen alle Mäuse eine hochfetthaltige Ernährung (D12108, Forschungsernährung). Dieses Futter wurde zuvor schon verwendet, um die Atherogenese in diesem Mausmodell zu beschleunigen (Shamshiev et al., 2007; Chiba et al., 2006).

Die Mäuse wurden randomisiert in zwei Gruppen zu jeweils zehn Mäusen aufgeteilt. Eine der beiden Gruppen bekam zusätzlich Sitagliptin verabreicht. Die Gabe erfolgte oral, indem das Sitagliptin mit der fetthaltigen Nahrung zu 1,1% (wt/wt, ~ 576 mg Sitagliptin / kg Körpergewicht, n=10) vermischt wurde. Diese Gruppe wird im Folgenden als SITA abgekürzt. Sitagliptin in dieser Dosis und mit derselben Gabeweise wurde bereits zuvor benützt, um die DPP-IV Aktivität erfolgreich zu hemmen (Mu et al., 2006). Die Placebogruppe diente als Kontrollgruppe. Ihre Abkürzung lautet CTR.

Nach zwölf Wochen hochfetthaltiger Ernährung wurden die Mäuse beider Gruppen mit einer intraperitonealen Injektion von 2,2,2-Tribromethanol (0,25 mg / g

Körpergewicht) betäubt. Durch eine Herzpunktion und darauf folgender Ischämie wurde der Tod der Mäuse herbeigeführt.
Die nachfolgende Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der Studie und den Beginn der Behandlung sowie die Aufteilung der zwanzig ApoE $^{-/-}$ Mäuse in zwei Gruppen im Alter von neun Wochen dar.

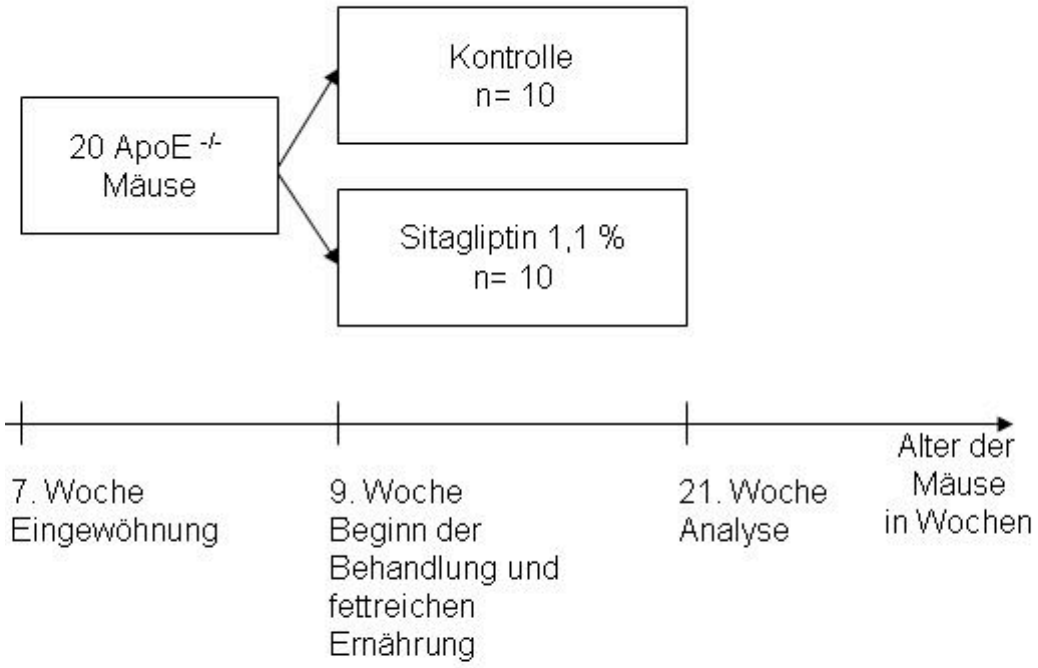


Abbildung 3: Schema Studienverlauf. Der Zeitstrahl gibt das Alter der Mäuse in Wochen wieder. Die Aufteilung der 20 Apolipoprotein E defizienten Mäuse (ApoE $^{-/-}$) in zwei gleich große Gruppen (n=Anzahl) erfolgte in der 9. Woche. Ab diesem Zeitpunkt erhielten beide Gruppen eine fettreiche Ernährung. Eine der beiden Gruppen bekam Nahrung, die zusätzlich Sitagliptin in der Konzentration von 1,1 % (Gewicht/Gewicht) enthielt, verabreicht. Wohingegen die Kontrollgruppe keine Medikamente erhielt. Die Analyse wurde im Alter von 21 Wochen vorgenommen, folglich nach 12 Wochen Behandlung.

Bewilligt wurde das Studienprotokoll durch das Regierungspräsidium in Tübingen. Die Vorgehensweise wurde stets in Übereinstimmung und mithilfe der Empfehlung der Versuchstierhaltung der Universität Ulm durchgeführt.

2.4 Herstellung der Präparate

Die Präparation der Mäuse erfolgte direkt nach ihrem Ableben. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Präparate durch Isolierung des Herzens und der Aorta von der Aortenwurzel bis zur iliakalen Bifurkation gewonnen. Die Basis des Herzens und der Aortenbogen bis einschließlich des

Abgangs der Arteria subclavia sinistra wurden herauspräpariert und eingebettet. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.
Die folgende Abbildung stellt eine Übersicht über die Anatomie der Aorta und ihre wichtigsten Abgänge dar.

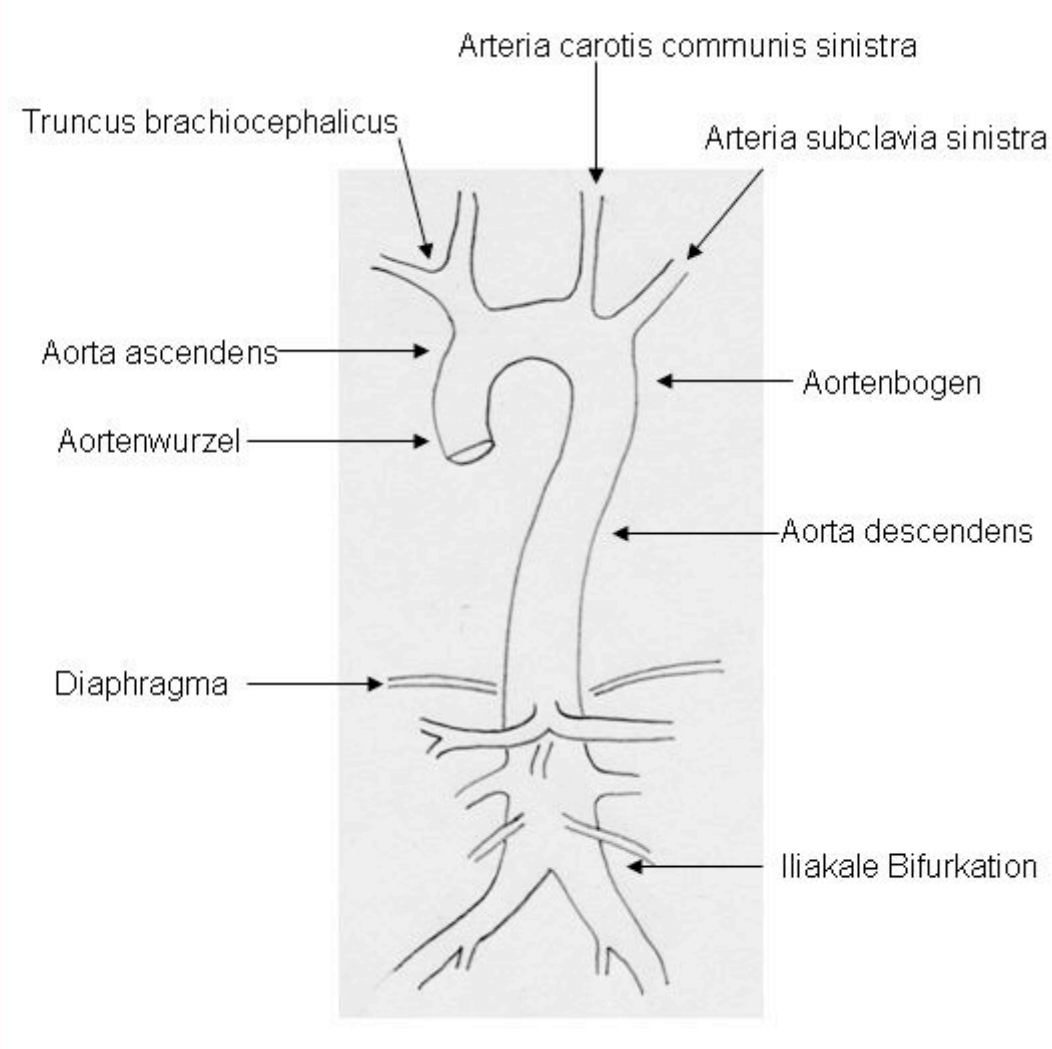


Abbildung 4: Überblick über die Anatomie der Aorta mit ihren wichtigsten Abgängen. Für die Versuche wurden die Präparate von der Basis des Herzens (hier nicht abgebildet) und die Aorta bis zur iliakalen Bifurkation isoliert. Eingebettet wurde der Bereich von der Aortenwurzel bis einschließlich des Abgangs der Arteria subclavia sinistra. Die Aorta descendens wurde mit der Enface-Methode weiterverarbeitet.

2.5 Oil-red-O Färbung der Lipidablagerungen

Damit die Ausdehnung der Plaques der ApoE $^{-/-}$ Mäuse quantitativ bestimmt werden kann, wurde eine Darstellung der Lipidablagerungen mithilfe der Oil-red-O Färbung, eines Lysochrom-Dyazofarbstoffs, durchgeführt. Dabei wurde einerseits

die Aorta descendens mithilfe der Enface-Methode, andererseits die Aortenwurzel und der Aortenbogen in histologischen Schnitten betrachtet.
Lipide spielen in allen Phasen der Arteriosklerose eine wichtige Rolle. Anfangs in den Schaumzellen, später in den Fettstreifen und extrazellulären Fetttropfen, bis hin zum fettreichen Kern in der fortgeschrittenen Läsion (Stary et al., 1995). Deswegen wurden sie ausgewählt, um die Läsionsgröße zu beurteilen. Die Oil-red-O Färbung dient zur allgemeinen Lipiddarstellung. Der Färbemechanismus beruht darauf, dass der Fettfarbstoff eine bessere Löslichkeit in den Lipiden gegenüber dem Lösungsmittel, in dem es gelagert wird, hat. Bei dieser Färbung werden das Fett rot und die Kerne blau gefärbt.

Um die in Formalin gelagerten absteigenden Aorten von dem Formalin zu befreien, wurden sie mit PBS gewaschen. Mithilfe von 100% Propylenglycol wurde das PBS abgewaschen. Danach wurden die Aorten mit frisch filtrierter Oil-red-O Lösung für drei Stunden gefärbt, welche anschließend mit 85% Propylenglycol entfernt wurde. Nun wurden die Aorten längs geöffnet und mit Stahlnadeln auf die Oberfläche von schwarzem Silikon gepinnt (Enface-Methode).

Um die arteriosklerotische Läsionen in den Aortenwurzeln und den Aortenbögen quantitativ bestimmen zu können, wurden die auf Objektträgern formaldehydfixierte Schnitte der Aortenwurzel und des Aortenbogens mit PBS rehydriert und in 100% Propylenglycol gewaschen. Die Inkubation mit frisch gefilterter Oil-red-O Lösung erfolgte bei 60°C für 20 Minuten.
Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin für eine Minute. Zum Schluss wurden die Objektträger zehn Minuten sorgfältig unter fließendem Wasser abgespült und mit Kaisers Glyceringelatine abgedeckt.
Die Ausdehnung der Läsionen wurde mithilfe eines Bildbearbeitungsprogramms (Image Pro- plus; Media Cybernetics) ausgewertet.

2.6 Immunhistochemische Färbung

2.6.1 Avidin-Biotin-Methode

Um die Makrophageninfiltration in den arteriosklerotischen Plaques zu ermitteln, wurde eine immunohistochemische Färbung mittels der Avidin-Biotin-Methode durchgeführt.

Dieses Verfahren beruht auf der starken Affinität zwischen Avidin und Biotin und der Ausbildung von Komplexen. Biotin ist ein Harnstoffderivat und dient als Coenzym für Carboxylierungsreaktionen im Körper. Es kommt in nahezu allen Nahrungsmitteln vor und wird auch von Bakterien der Darmflora produziert. Das Glykoprotein Avidin kommt in Hühnereiweiß vor und hat mehrere Bindungsstellen für Biotin (Löffler, 2005).

Die Applikation beginnt mit der Inkubation mit einem Serum, um die unspezifische Hintergrundfärbung von Kollagen- und Bindegewebselementen zu reduzieren. Die Wahl des Serums ist abhängig von der Spezies, in welcher der zweite Antikörper hergestellt wurde. Der 1. Antikörper ist ein Immunglobulin G, welches mit seiner variablen Region an das gesuchte Antigen bindet. Hinzu kommt ein 2. Antikörper, der als Anti-Antikörper an die Fc-Region des ersten Antikörpers bindet. Zusätzlich ist an ihn Biotin gebunden. Anschließend wird ein AB-Komplex hinzu gegeben, der aus Avidin, Biotin und einem daran gebundenen Enzym besteht, dabei sind jeweils drei Enzymmoleküle über Biotin an ein Avidinmolekül gebunden. Dieser AB-Komplex kann an das Biotin binden, welches bereits an den 2. Antikörper gekoppelt ist. Um das auf diese Weise markierte gesuchte Antigen sichtbar zu machen, wird ein 3-amino-9-ethylcarbazol Komplex (AEC-Komplex) hinzu gegeben. Er ist ein Substrat für das Enzym des AB-Komplexes und mit dessen Hilfe man schließlich als Enzym-Substrat-Reaktion ein rosenrotes Endprodukt erhält. Durch das ungleiche Verhältnis von Avidin und Enzym zu Gunsten des Enzyms, wird eine erhöhte Sensitivität und Intensivität erzeugt.

Folgende Abbildung zeigt ein Schema der Avidin-Biotin-Methode.

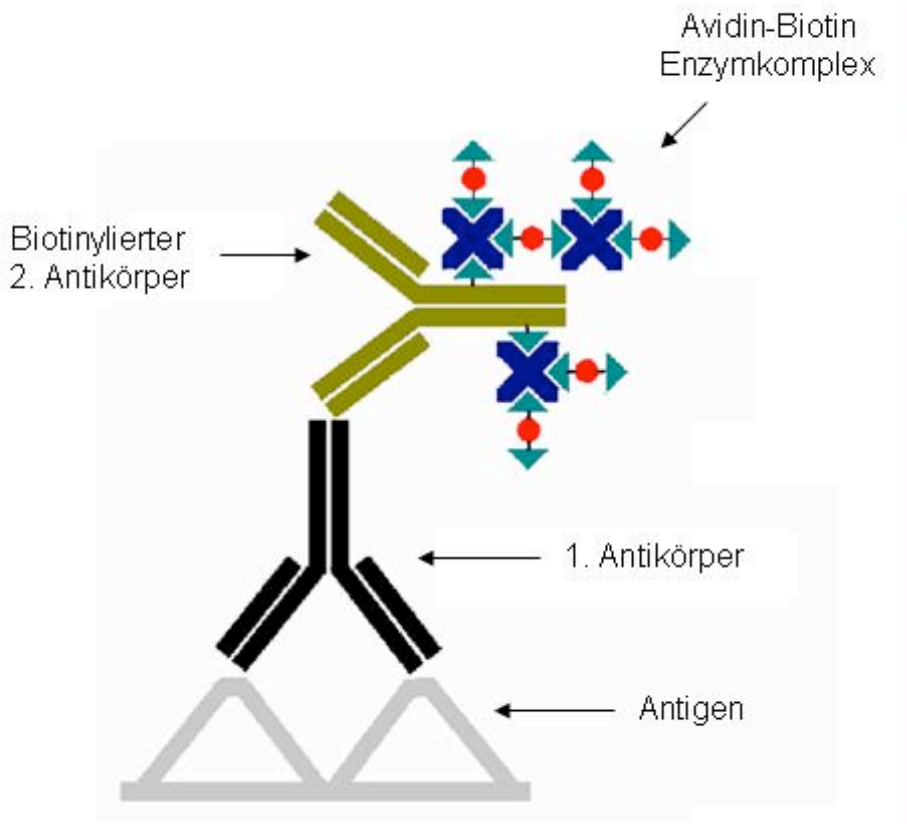


Abbildung 5: Avidin-Biotin-Methode. Der 1. Antikörper bindet an das gesuchte Antigen. Der 2. Antikörper bindet an den 1. Antikörper und ist zugleich Bindungsstelle für den Avidin-Biotin Enzymkomplex. Über den biotinylierten 2. Antikörper bindet der Avidin-Biotin Enzymkomplex an den 1. Antikörper.

Mithilfe dieser Methode wurden in den Versuchen dieser Arbeit spezifische Proteine auf der Zelloberfläche bestimmter Zellen sichtbar gemacht. Die abschließende Kernfärbung wurde mit Hämatoxylin durchgeführt. Diese Methode beruht auf der unterschiedlichen Affinität des Farbstoffes zu bestimmten Gewebsbestandteilen und deren elektrostatischen Interaktionen. Hämatoxylin ist ein basischer Naturfarbstoff, dessen kationische Anteile an anionische Bestandteile der Zellen binden. Die im Zellkern befindliche anionische DNA und RNA wird dadurch blau-violett eingefärbt (Lüllmann-Rauch, 2003).
Die Auswertung erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops und digitaler Bildanalyse.

2.6.2 Mac-3 Färbung

Um die Makrophageninfiltration in den arteriosklerotischen Plaques zu ermitteln, wurde eine immunohistochemische Färbung des Aortenbogens und der

Aortenwurzel mittels der Avidin-Biotin-Methode und einem Mac-3 Antikörper durchgeführt.

Allgemeines zu Mac-3

Die Färbung der Makrophagen erfolgte mit einem Mac-3 Antikörper. Mac-3 ist ein Glycoprotein, das durch Makrophagen synthetisiert und auf deren Oberfläche exprimiert wird. Es ist ein spezifischer Marker für Makrophagen und kann dazu verwendet werden, sie von Lymphozyten, Erythrozyten oder Zellen des Knochenmarks zu unterscheiden (Ho et al., 1983).

Lösungen

Für die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurden 16 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,4 g KH_2PO_4 und 2,9 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ auf 2 l destilliertem Wasser benötigt.
Zur Herstellung des später benötigten 0,1 M Acetatpuffer wurden aus 5,7 ml Eisessig in 1 l destilliertem Wasser 0,1 N Essigsäure und aus 13,61 g Natriumacetattrihydrat in 1 l destilliertem Wasser 0,1 M Natriumacetat hergestellt. Es wurden 210 ml 0,1 N Essigsäure und 700 ml 0,1 M Natriumacetat zusammengegeben. Das ergibt 910 ml Acetatpuffer, der mithilfe eines pH-Meters und HCl auf pH 5,2 eingestellt wurde.

Etablierung des 1. Antikörpers

Um ein optimales Färbeergebnis zu erhalten, wurde die Konzentration, in welcher der 1. Antikörper aufgetragen werden muss, ermittelt. Dazu wurde der 1. Antikörper in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, die nachfolgenden Färbeschritte sind identisch. Die folgende Abbildung zeigt Färbungen mit dem 1. Antikörper in den folgenden Konzentrationen: a) 1:50, b) 1:100 und c) 1:200. Aus diesem Ergebnis der Färbungen mit unterschiedlichen Konzentrationen ist ersichtlich, dass die höhere Konzentration in a) und b) zu unspezifischen Färbungen führt. Somit wurde für den folgenden Versuch die Konzentration 1:200, wie in c), ausgewählt.

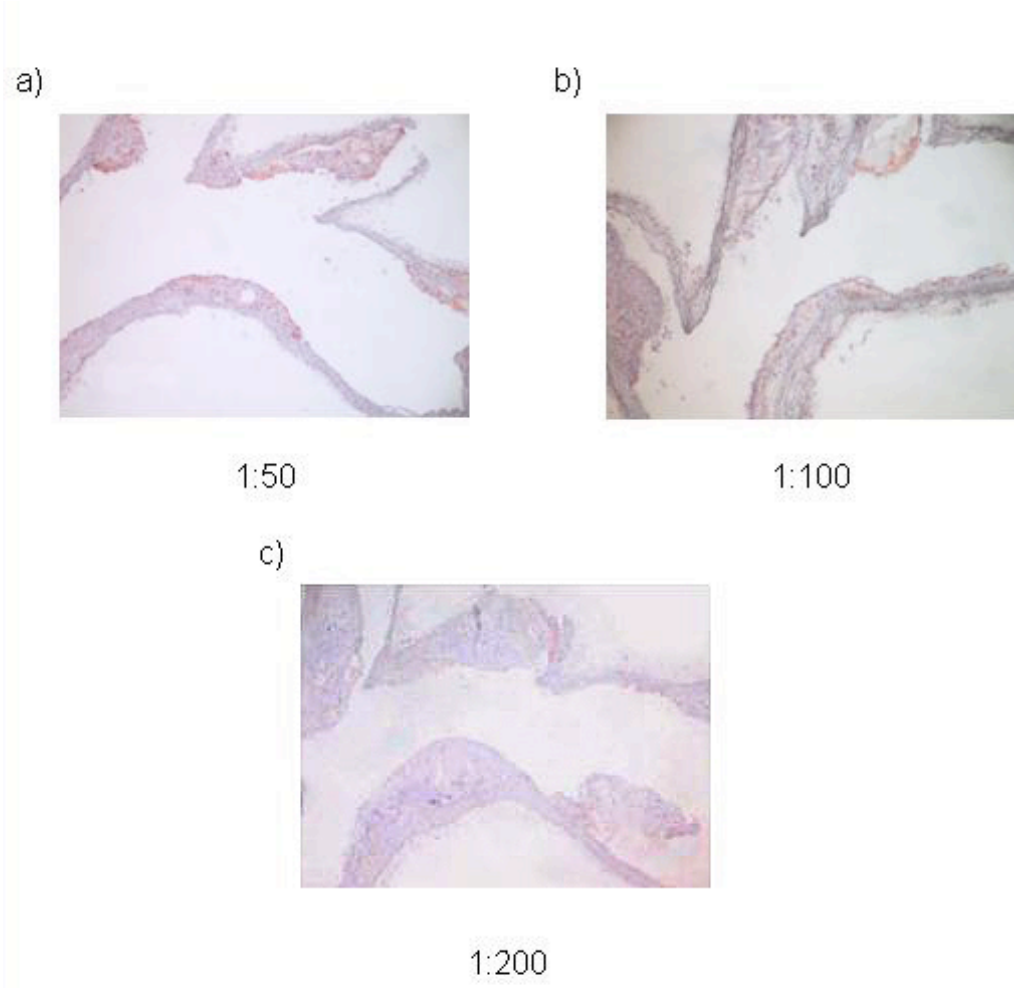


Abbildung 6: Die Etablierung der Konzentration des 1. Antikörpers Mac-3 bei der Avidin-Biotin-Methode. Die gefärbten Gewebeschnitte zeigen Färbungen verschiedenster Konzentrationen an Mac-3 Antikörpern: a) 1:50, b) 1:100 und c) 1:200. Die höheren Konzentrationen in a) und b) führen zu unspezifischen Färbungen, wohingegen die Konzentration 1:200 ein optimales Färbeverhalten verspricht.

Versuchsablauf

Auf jedem Objektträger befindet sich eine negative Kontrolle. Es handelt sich dabei um einen benachbarten Gewebeabschnitt, der zur Kontrolle der Färbung dient. Die in Aceton bei -80°C fixierten Schnitte wurden an der Luft getrocknet. Zur Rehydratation wurden die Schnitte danach in PBS (Herstellung der PBS siehe oben) gespült. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 10 Minuten in 1% H_2O_2 in Methanol (5 ml 30% H_2O_2 zu 200 ml Methanol) inkubiert, damit die endogenen Peroxidasenaktivitäten beseitigt wurden. Daraufhin wurden die Schnitte in 37°C warmer PBS gespült. Nun folgte die Inkubation in Rabbit Serum im Verhältnis 1:10 in PBS, dafür wurden auf jedes Präparat 50 µl aufgetragen und für 30 Minuten in den Wärmeschrank bei 37°C gestellt.

Anschließend folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper. Auf die positive Kontrolle wurden 50 µl Mac-3 Antikörper in der Konzentration 1:200 in PBS und auf die negative Kontrolle noch einmal 50 µl Rabbit Serum in der Konzentration 1:10 aufgetragen. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper wurde bei 37°C im Wärmeschrank für 45 Minuten durchgeführt, während dieser Zeit bindet der 1. Antikörper an die spezifischen Antigene im Gewebe.
Um die nicht gebundenen Antikörper wieder zu entfernen, wurden anschließend die Schnitte in 37°C warmer PBS gespült.
Als nächstes folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper. Im Verhältnis 1:200 in PBS wurde der Antikörper Rabbit anti Rat biotyniliert auf beide Präparate, also auf positive und negative Kontrolle, aufgetragen und für 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.
Es folgte die Spülung mit 37°C warmer PBS um die verbliebenen Antikörper zu entfernen. Für die Inkubation mit dem AB-Komplex wird dieser bei Raumtemperatur auf 1:100 mit PBS verdünnt, auf beide Präparate aufgetragen und für 30 Minuten in den Wärmeschrank bei 37°C gestellt. Inzwischen wurde der AEC-Komplex hergestellt, indem 4 mg 3-amino-9-ethylcarbazole in 1 ml N'N-dimethylformamid gelöst werden. Unter Rühren wurden 14 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 5,2 (Herstellung siehe oben) und 15 µl 30% H_2O_2 hinzugefügt. Wenn ein Präzipitat auftrat, wurde die Mischung filtriert.
Bevor der AEC-Komplex aufgetragen wurde, wurden die Schnitte in 37°C warmer PBS gespült. Auf jedes Präparat wurden nun 100 µl AEC-Komplex aufgetragen. Nach drei bis vier Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit 37°C warmer PBS gespült. Danach wurden die Schnitte kurz in Leitungswasser gespült und kamen anschließend für eine Minute in Hämatoxylin um die Zellkerne anzufärben.
Die Schnitte wurden nun für 10 Minuten in Leitungswasser gewässert. Abschließend wurden die Schnitte in Kaisers Glyceringelatine eingebettet. Dafür wurden 60 µl für einen Schnitt verwendet.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Image Pro- plus; Media Cybernetics).

2.7 Picrosirius rot Färbung des Kollagen

Damit der Kollagengehalt von Typ I und III in den Läsionen bestimmt werden kann, wurden formaldehydfixierte Schnitte der Aortenwurzel und des Aortenbogens mit Picrosirius rot Lösung gefärbt. Die Kollagenfasern werden damit rot gefärbt.

Dazu wurden die Schnitte rehydriert und für 90 Minuten in einer 0,1% Lösung von Sirius red in einer 1,2%gen Picric Acid Lösung gefärbt. Es folgte eine Spülung mit 0,01 M HCl und destilliertem Wasser. Nach einer kurzen Dehydrierung mit 70% Ethanol, wurden die mit Kaisers Glyceringelatine Schnitte abgedeckt.
Die Analyse der Schnitte erfolgte unter dem Polarisationsmikroskop.

2.8 DPP-IV Aktivität

Zur Messung der DPP-IV Aktivität wurde am Tag des Ablebens der Mäuse unmittelbar nach der Entnahme dem Blut Aprotinin und EDTA hinzugefügt. Zur Messung der enzymatischen DPP-IV Aktivität wurden je 5 µl Plasma mit je 3,3 mg H-Gly-Pro-pNA, einem DPP-IV Substrat, bei 37°C inkubiert. Zur Ermittlung der entstandenen Menge an pNA pro Minute wurde mithilfe eines Spektrofotometers die Lichtadsorption bei einer Wellenlänge von 405 nm nach 30, 60 und 120 Minuten gemessen. Anhand einer Standardkurve erfolgte so der Rückschluss auf die enzymatische Aktivität von DPP-IV. Diese Methode ist bereits zuvor benutzt worden, um die DPP-IV Aktivität im Serum zu bestimmen (Underwood et al., 1999; Durinx et al., 2000; Nagakura et al., 2003).

2.9 Statistische Analyse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mithilfe des Student-t-Test analysiert. Die statistische Signifikanz ist bestimmt für $P< 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Metabolisches Profil

Das Körpergewicht der neun Wochen alten Mäuse unterscheidet sich zu Beginn der Fütterungsperiode zwischen den beiden Gruppen nicht. Die wöchentlich durchgeführten Kontrollen zeigen, dass sich die Futteraufnahme und die Gewichtszunahme zwischen den Mäusen, die mit Sitagliptin behandelt wurden (SITA), und der Kontrollgruppe (CTR) nicht signifikant unterscheiden.
Abbildung 7 zeigt in a) das Körpergewicht und in b) die wöchentliche Futteraufnahme der Mäuse jeweils in Gramm über 12 Wochen.

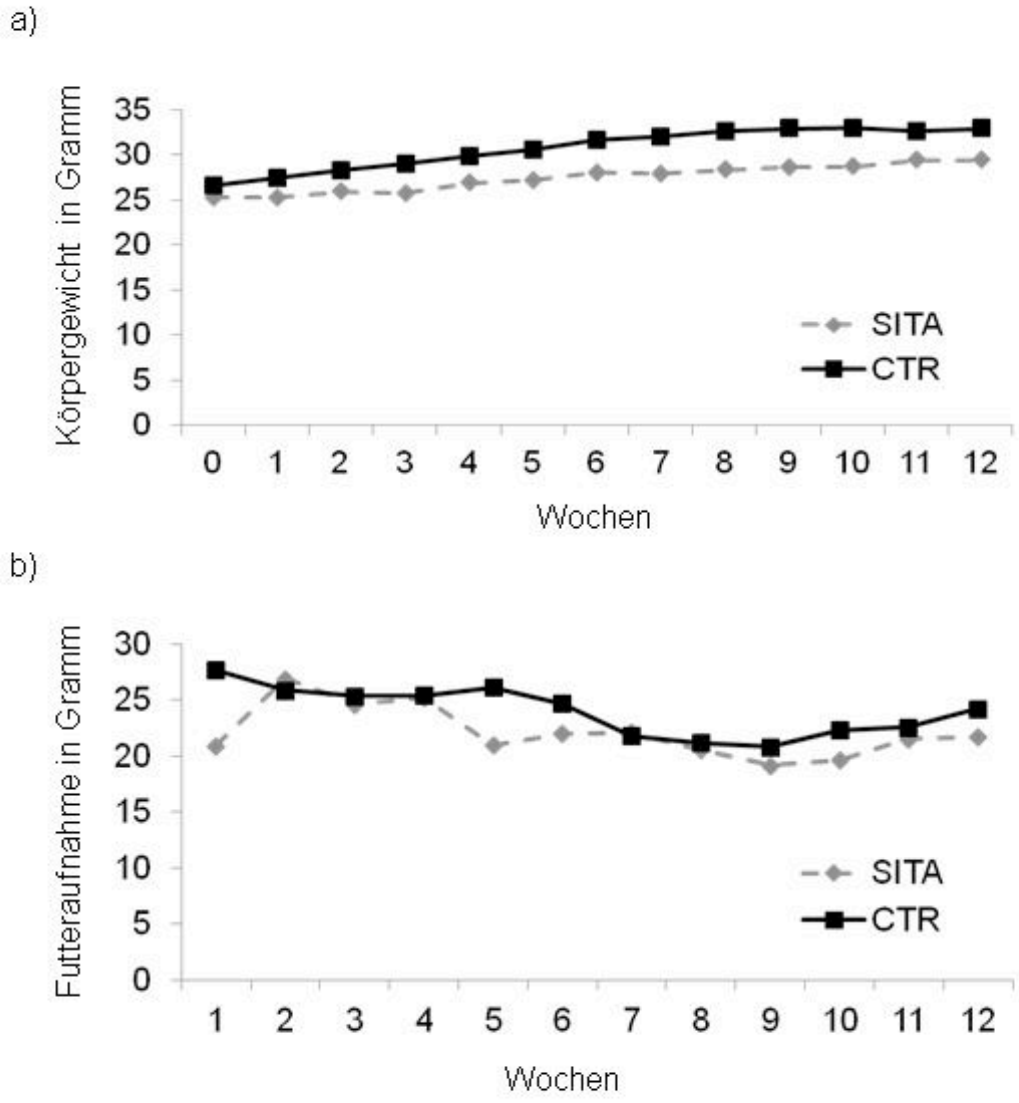


Abbildung 7: In a) ist das Körpergewicht in Gramm der Apolipoprotein E defizienten (ApoE $^{-/-}$) Mäuse, die einer fettreichen Diät unterzogen wurden, über 12 Wochen aufgetragen. Dabei wird das Körpergewicht der Kontrollgruppe (CTR) und der mit Sitagliptin (SITA) behandelten

Mäuse, das heißt die ApoE $^{-/-}$ Mäuse, die über 12 Wochen zusätzlich Sitagliptin mit der Nahrung in der Konzentration von 1,1 % (Gewicht/Gewicht) verabreicht bekamen, verglichen. Jede Gruppe besteht aus zehn Versuchstieren. In b) ist die wöchentliche Futteraufnahme in Gramm der ApoE $^{-/-}$ Mäuse über 12 Wochen aufgetragen. Verglichen wird hier die wöchentliche Futteraufnahme der SITA Gruppe und der CTR Gruppe. Weder das Körpergewicht noch die wöchentliche Futteraufnahme unterscheiden sich zwischen den beiden Gruppen signifikant.

Die DPP-IV Aktivität wurde am Tag des Ablebens nach 12 Wochen Diät und Behandlung mit Sitagliptin in einer Plasmaprobe gemessen. Bei der SITA Gruppe wurde 0,3 ± 0,6 nmol / min / ml DPP-IV Substrat generiert, wohingegen bei der CTR Gruppe ein wesentlich höherer Wert von 2,5 ± 1 nmol / min / ml gemessen wurde. Folgende Abbildung stellt die quantitative Auswertung dar.

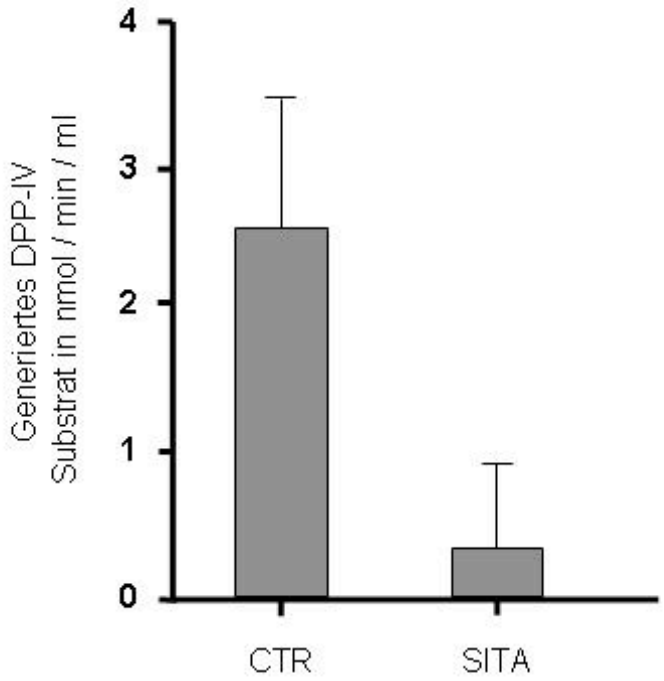


Abbildung 8: Die Abbildung (Balkendiagramm mit Standartabweichung) zeigt die quantitative Auswertung an generiertem Dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV) Substrat p-Nitroanilid (pNA) in nmol / min / ml (Nanomol / Minute / Milliliter). Dies wurde am Tag des Ablebens der Apolipoprotein E defizienten (ApoE $^{-/-}$) Mäuse, die einer fettreichen Diät unterzogen wurden, im Blutplasma ermittelt. Verglichen wird hier die Menge an generiertem DPP-IV Substrat in der Kontrollgruppe (CTR) und in der SITA Gruppe, das heißt die ApoE $^{-/-}$ Mäuse, die über 12 Wochen zusätzlich Sitagliptin mit der Nahrung in der Konzentration von 1,1 % (Gewicht/Gewicht) verabreicht bekamen. Jede Gruppe besteht aus zehn Versuchstieren.

Das Ergebnis lautet, dass bei der CTR Gruppe signifikant mehr DPP-IV Substrat generiert wurde als in der SITA Gruppe (2,5 ± 1 versus 0,3 ± 0,6 nmol / min / ml pNA für CTR versus SITA).

Dies zeigt, dass die in dem vorliegenden Mausmodell verwendete Dosis an Sitagliptin effektiv in der Hemmung der DPP-IV Aktivität war und es die DPP-IV Aktivität um mehr als 85 % verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant reduziert.

3.2 Ausdehnung arteriosklerotischer Läsionen

Um herauszufinden, ob sich die Ausdehnung der arteriosklerotischen Läsionen in ApoE $^{-/-}$ Mäusen durch die Einnahme des DPP-IV Inhibitors Sitagliptin beeinflussen lässt, wurde die Größe der arteriosklerotischen Plaques in der Aorta descendens mithilfe der Enface-Methode, in der Aortenwurzel und dem Aortenbogen mit einer Fettfärbung (Oil-red-O) quantitativ bestimmt.

Folgende Abbildung zeigt die Läsionsausdehnung in der Aorta descendens von ApoE $^{-/-}$ Mäusen ohne und mit der Behandlung von Sitagliptin über 12 Wochen. In a) sind repräsentative Abbildungen der Enface-Methode der Aorta descendens mit Oil-red-O der CTR und SITA Gruppe zu sehen. Das rechte Diagramm (b)) zeigt die Quantifizierung der Läsionsgröße. Daraus ist ersichtlich, dass verglichen mit der Kontrollgruppe Sitagliptin die Läsionsgröße nicht signifikant beeinflusst (n=10 / Gruppe). Bei der SITA Gruppe wird 8,1 ± 3,5 % der Gesamtfläche angefärbt. Für die CTR Gruppe liegt der Wert bei 5,1 ± 2,5 % (p=nicht signifikant).

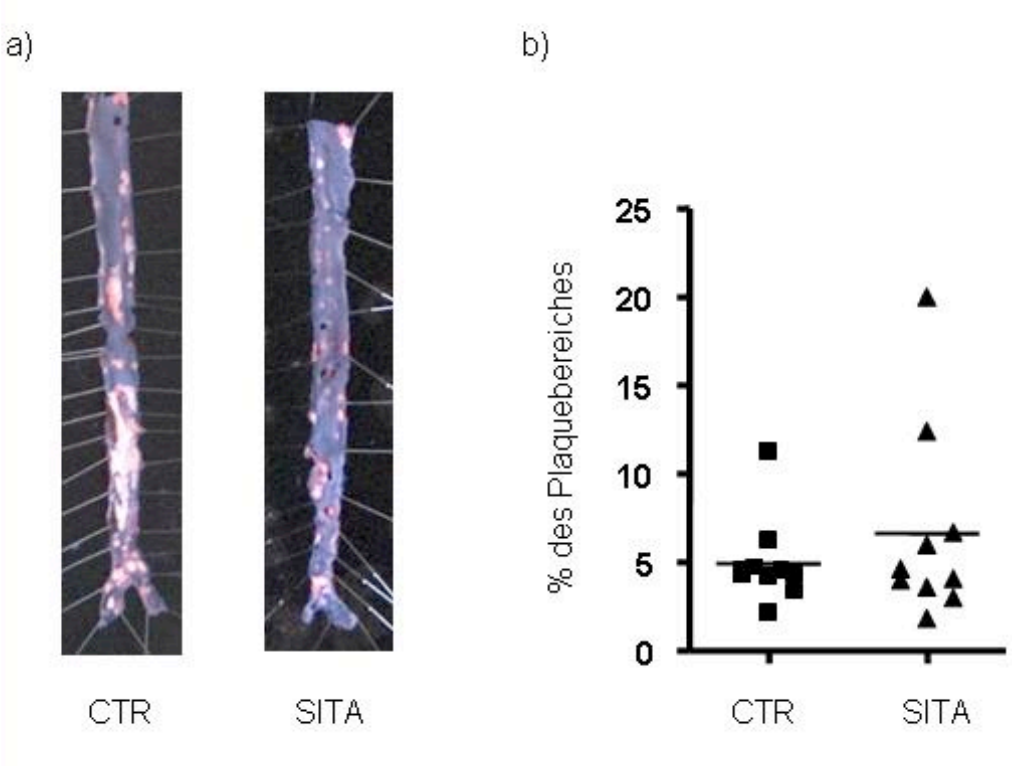


Abbildung 9: In der Aorta descendens in Apolipoprotein E defizienten (ApoE $^{-/-}$) Mäusen, die einer fettreichen Diät unterzogen wurden, wird mithilfe der Oil-red-O Färbung die Ausdehnung der Plaques bestimmt. Verglichen wird hier die Ausdehnung der arteriosklerotischen Läsionen in der Kontrollgruppe (CTR) und in der SITA Gruppe, das heißt in den ApoE $^{-/-}$ Mäusen, die über 12 Wochen zusätzlich Sitagliptin mit der Nahrung in der Konzentration von 1,1 % (Gewicht/Gewicht) verabreicht bekamen. Jede Gruppe besteht aus zehn Versuchstieren. Die Abbildungen in a) zeigen die Enface-Methode. Die Abbildungen sind repräsentativ aus 20 Versuchen. In b) ist die quantitative Auswertung dargestellt, dabei ist die Ausdehnung des Plaquebereiches in Prozent der Gesamtfläche dargestellt. Das Ergebnis lautet, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gibt (8,1 ± 3,5 % versus 5,1 ± 2,5 % für SITA versus CTR, p=nicht signifikant).

Abbildung 10 zeigt in a) beispielhaft eine Oil-red-O Färbung der Aortenwurzel der SITA Gruppe und der CTR Gruppe. In b) ist die quantitative Auswertung dargestellt (n=10 / Gruppe). Für die SITA Gruppe beträgt das Ausmaß der Fläche 0,7 ± 0,2 %. Der Wert für die CTR Gruppe ist 0,7 ± 0,3 % (p=nicht signifikant). Diese weiteren Resultate bestätigen die Ergebnisse der Enface-Methode der Aorta descendens, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Läsionsausdehnung zwischen den beiden Gruppen SITA und CTR gibt.

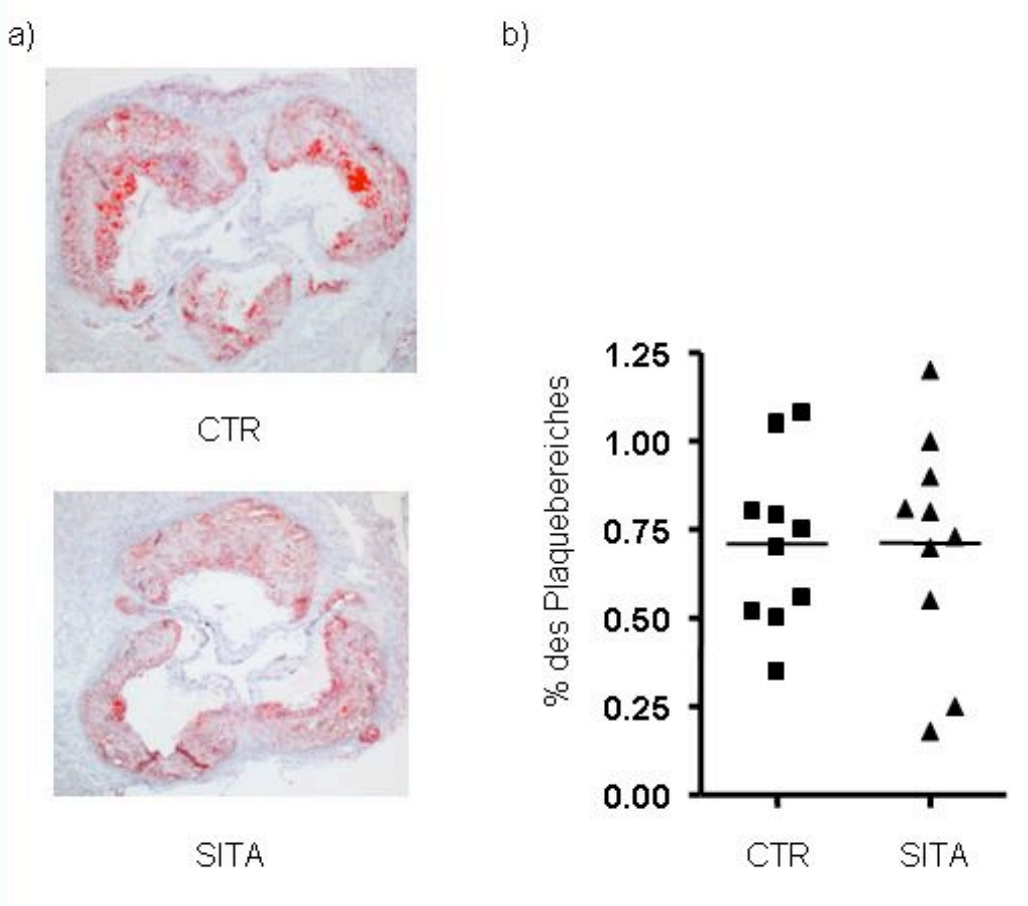


Abbildung 10: In der Aortenwurzel Apolipoprotein E defizienter (ApoE $^{-/-}$) Mäuse, die einer fettreichen Diät unterzogen wurden, wird mithilfe der Oil-red-O Färbung die Ausdehnung der Plaques bestimmt. Verglichen wird hier die Ausdehnung der arteriosklerotischen Läsion in der Kontrollgruppe (CTR) und in der SITA Gruppe, das heißt die ApoE $^{-/-}$ Mäuse, die über 12 Wochen zusätzlich Sitagliptin mit der Nahrung in der Konzentration von 1,1 % (Gewicht/Gewicht) verabreicht bekamen. Jede Gruppe besteht aus zehn Versuchstieren. Die Abbildungen in a) zeigen repräsentativ Oil-red-O Färbungen der Aortenwurzel der SITA Gruppe und CTR Gruppe. In b) ist die quantitative Auswertung dargestellt, dabei ist die Ausdehnung des Plaquebereiches in Prozent der abgemessenen Fläche dargestellt. Das Ergebnis lautet, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gibt (0,7 ± 0,2 % versus 0,7 ± 0,3 % für SITA versus CTR, p=nicht signifikant).

Auch die Oil-red-O Färbung des Aortenbogens, welche in Abbildung 11 gezeigt wird, weist darauf hin, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Läsionsausdehnung zwischen den beiden Gruppen gibt (n=10 / Gruppe). Die gefärbte Fläche beträgt in der SITA Gruppe 2,4 ± 1,3 % der Gesamtfläche. In der CTR Gruppe liegt sie bei 1,5 ± 1,0 % (p=nicht signifikant).

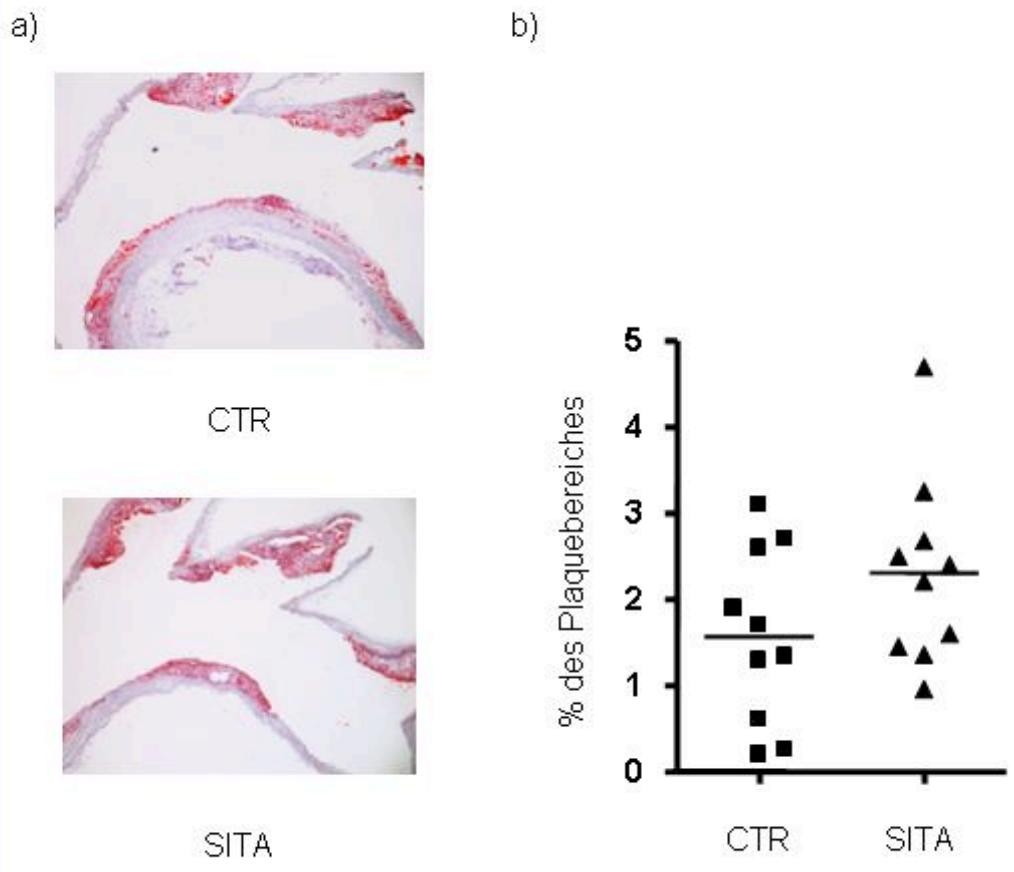


Abbildung 11: In dem Aortenbogen Apolipoprotein E defizienter (ApoE $^{-/-}$) Mäuse, die einer fettreichen Diät unterzogen wurde, wird mithilfe der Oil-red-O Färbung die Ausdehnung der Plaques bestimmt. Verglichen wird hier die Ausdehnung der arteriosklerotischen Läsionen in der Kontrollgruppe (CTR) und in der Gruppe der Mäuse (SITA), die über 12 Wochen zusätzlich Sitagliptin mit der Nahrung in der Konzentration von 1,1 % (Gewicht/Gewicht) verabreicht bekamen. Jede Gruppe besteht aus zehn Versuchstieren. Die Abbildungen in a) zeigen repräsentativ Oil-red-O Färbungen des Aortenbogens der SITA Gruppe und CTR Gruppe. In b) ist die quantitative Auswertung dargestellt, dabei ist die Ausdehnung des Plaquebereiches in Prozent der Gesamtfläche dargestellt. Das Ergebnis lautet, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen gibt (2,4 ± 1,3 % versus 1,5 ± 1,0 % für SITA versus CTR, p=nicht signifikant).

3.3 Makrophageninfiltration arteriosklerotischer Läsionen

Um die Makrophageninfiltration arteriosklerotischer Läsionen der ApoE $^{-/-}$ Mäuse ohne und mit der Behandlung von Sitagliptin über 12 Wochen zu bestimmen, wurde eine immunhistochemische Färbung der Makrophagen mit einem Mac-3 Antikörper von Gewebeschnitten der Aortenwurzel und des Aortenbogens durchgeführt.

In der Abbildung 12 sind unter a) repräsentative Gewebeschnitte der Aortenwurzel der CTR und SITA Gruppe dargestellt. Sie wurden mit Mac-3 Antikörpern gefärbt, welche die Makrophagen anfärben. Die negative Kontrolle ist ein jeweils benachbarter Gewebsabschnitt, der ohne den 1. Antikörper gefärbt wurde. Bestimmt wird die Fläche, welche von den Makrophagen eingenommen wird, in Prozent der Gesamtfläche. Das Diagramm in b) zeigt die quantitative Auswertung. Bei der SITA Gruppe nehmen die Makrophagen 0,03 ± 0,02 % der Gesamtfläche ein. Wohingegen bei der CTR Gruppe ein Wert von 0,09 ± 0,05 % ($p < 0,05$) erreicht wird. Dies bedeutet eine dreifach reduzierte Anzahl an Makrophagen in Plaques der Aortenwurzel von mit Sitagliptin behandelten Mäusen verglichen mit der Kontrollgruppe (n=10 / Gruppe).

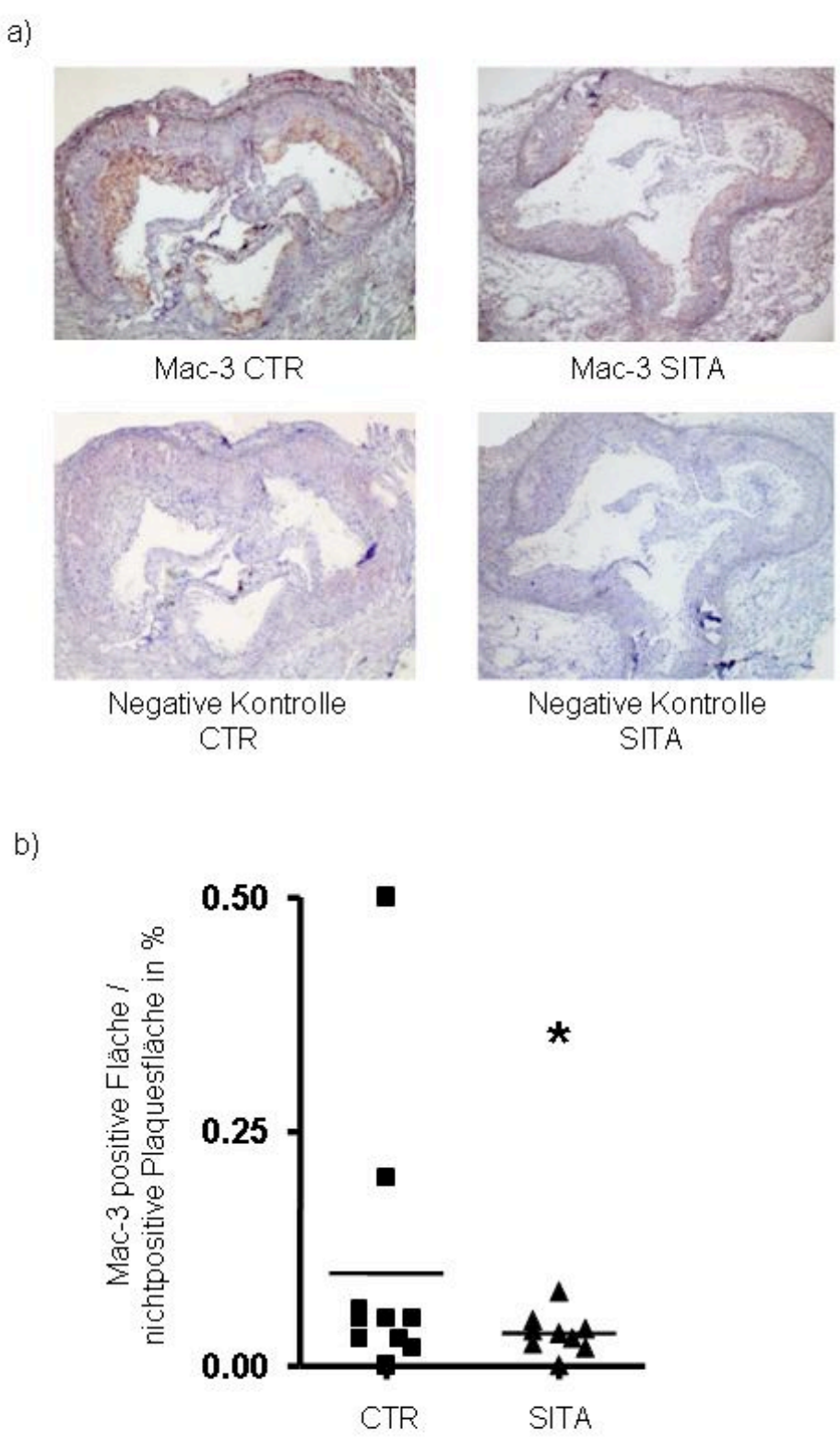
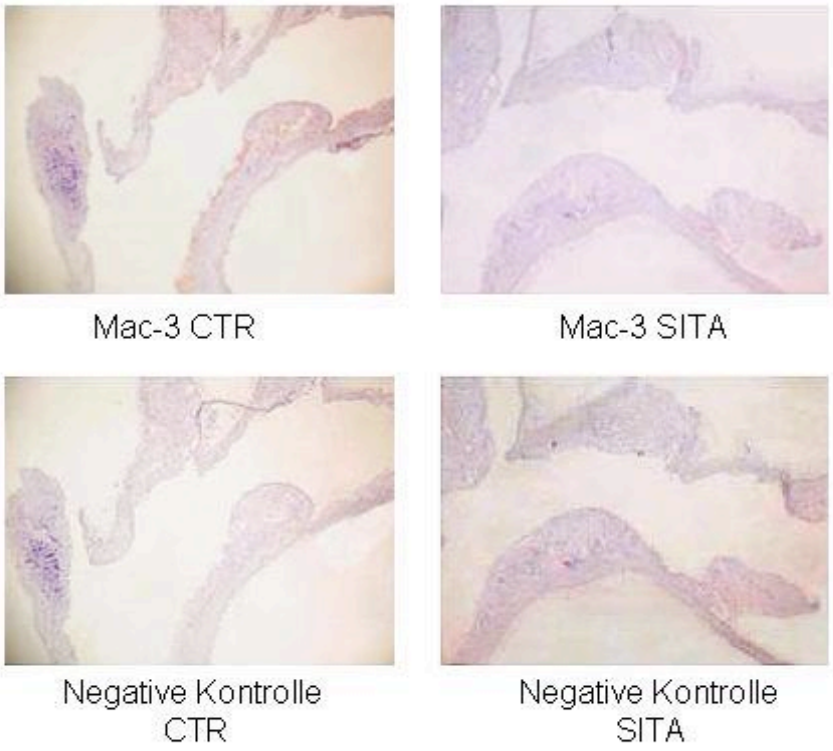


Abbildung 12: In der Aortenwurzel Apolipoprotein E defizienter (ApoE $^{-/-}$) Mäuse, die einer fettreichen Diät unterzogen wurden, wird mithilfe immunhistochemischer Färbung mit einem spezifischen Mac-3 Antikörper die Makrophageninfiltration in die Plaques bestimmt. Verglichen wird die Ausdehnung der angefärbten Fläche, welche mit der Makrophagenanzahl korreliert, in der Kontrollgruppe (CTR) und in der SITA Gruppe, die über 12 Wochen zusätzlich Sitagliptin mit der Nahrung in der Konzentration von 1,1 %

(Gewicht/Gewicht) verabreicht bekamen. Jede Gruppe besteht aus zehn Versuchstieren. Die Abbildungen in a) zeigen repräsentative Gewebeabschnitte der Aortenwurzel. Oben mit Mac-3 Antikörper gefärbt, unterhalb davon die jeweils passende negative Kontrolle, die ohne Mac-3 Antikörper gefärbt wurde. In b) ist die quantitative Auswertung dargestellt, dabei ist die von den Makrophagen eingenommene Fläche in Prozent der Gesamtfläche dargestellt. Das Ergebnis lautet, dass die Ausdehnung der Fläche und dementsprechend die Makrophageninfiltration in die Plaques in der CTR Gruppe dreifach höher ist als in der SITA Gruppe (0,03 ± 0,02 % versus 0,09 ± 0,05 % für SITA versus CTR, * p<0,05).

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde zusätzlich eine Färbung des Aortenbogens mit Mac-3 Antikörpern vorgenommen. Abbildung 13 zeigt repräsentative Gewebeschnitte des Aortenbogens, die analog zu den immunhistochemischen Färbungen der Aortenwurzeln durchgeführt worden sind. Hier zeigt sich, dass die Makrophagen bei der SITA Gruppe 0,04 ± 0,02 % der Gesamtfläche einnehmen. Wohingegen bei der CTR Gruppe ein Wert von 0,1 ± 0,05 % ($p<0,05$) erreicht wird.
Das Ergebnis entspricht dem der Mac-3 Färbung der Aortenwurzel und zeigt eine reduzierte Makrophageninfiltration in dem Aortenbogen, der mit Sitagliptin behandelten Mäusen, verglichen mit der Kontrollgruppe (n=10 / Gruppe).

a)



b)

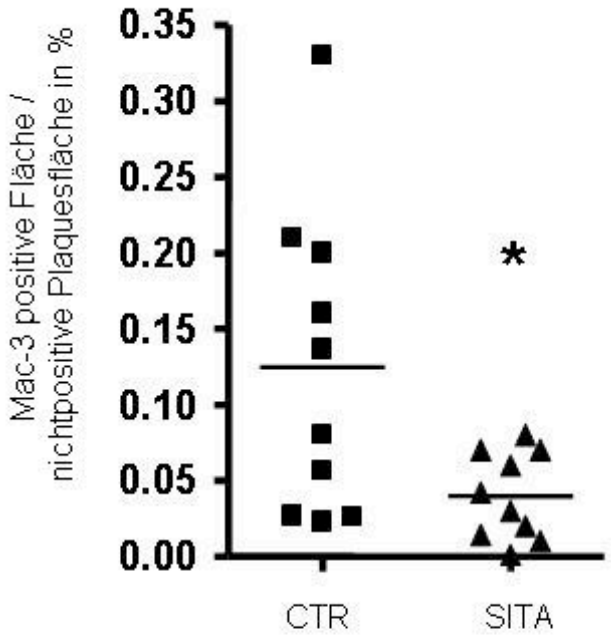


Abbildung 13: In dem Aortenbogen Apolipoprotein E defizienter (ApoE $^{-/-}$) Mäuse, die einer fettreichen Diät unterzogen wurden, wird mithilfe immunhistochemischer Färbung mit einem spezifischen Mac-3 Antikörper die Makrophageninfiltration in die Plaques bestimmt. Verglichen wird die Ausdehnung der angefärbten Fläche, welche mit der Makrophagenanzahl korreliert, in der Kontrollgruppe (CTR) und in der SITA Gruppe, die über 12 Wochen zusätzlich Sitagliptin mit der Nahrung in der Konzentration von 1,1 %

(Gewicht/Gewicht) verabreicht bekamen. Jede Gruppe besteht aus zehn Versuchstieren. Die Abbildungen in a) zeigen repräsentative Gewebeabschnitte des Aortenbogens oben mit Mac-3 Antikörper gefärbt, unterhalb davon die jeweils passende negative Kontrolle, die ohne Mac-3 Antikörper gefärbt wurde. In b) ist die quantitative Auswertung dargestellt, dabei ist die von den Makrophagen eingenommene Fläche in Prozent der Gesamtfläche dargestellt. Das Ergebnis lautet, dass die Ausdehnung der Fläche und dementsprechend die Makrophageninfiltration in die Plaques in der CTR Gruppe höher ist als in der SITA Gruppe (0,04 ± 0,02 % versus 0,1 ± 0,05 % für SITA versus CTR, * p<0,05).

Das Ergebnis ist, dass die Behandlung mit Sitagliptin, verglichen mit der Kontrollgruppe, signifikant die Fläche, die von den Makrophagen in den Plaques eingenommen wird, reduziert. Dies entspricht einer Verringerung der Makrophageninfiltration in der Plaque.

3.4 Kollagengehalt arteriosklerotischer Läsionen

Die sich in den arteriosklerotischen Plaques befindenden Makrophagen sezernieren Metalloproteinasen. Diese können die extrazelluläre Matrix abbauen und auf diese Weise den Kollagengehalt der Plaques und die Stabilität der arteriosklerotischen Läsionen beeinflussen. Um diesen Vorgang zu untersuchen wurde der Effekt von Sitagliptin auf Typ I und III Kollagen in den Läsionen der ApoE $^{-/-}$ Mäuse ohne und mit der Behandlung von Sitagliptin über 12 Wochen untersucht.

Abbildung 14 zeigt in a) repräsentative Gewebeschnitte der Aortenwurzel der CTR und SITA Gruppe. Sie wurden mit Picrosirius rot gefärbt und stellen so Kollagen Typ I und III dar. Zu sehen ist die Färbung ohne (untere Abbildungen) oder mit Polarisation (obere Abbildungen) zur Darstellung des Kollagengehalts. Bestimmt wird die Fläche, welche das Kollagen einnimmt, in Prozent der Gesamtfläche. Das Schaubild in b) zeigt die quantitative Bestimmung des Kollagengehalts der Plaques in der Aortenwurzel. Bei der SITA Gruppe nimmt das Kollagen 1,2 ± 0,6 % der Gesamtfläche ein. Wohingegen die CTR Gruppe einen Wert von 0,5 ± 0,3 % ($p< 0,01$) erreicht. Dies bedeutet, dass der Kollagengehalt in den mit Sitagliptin behandelten Mäusen erhöht ist verglichen mit der der Kontrollgruppe (n=10 / Gruppe).

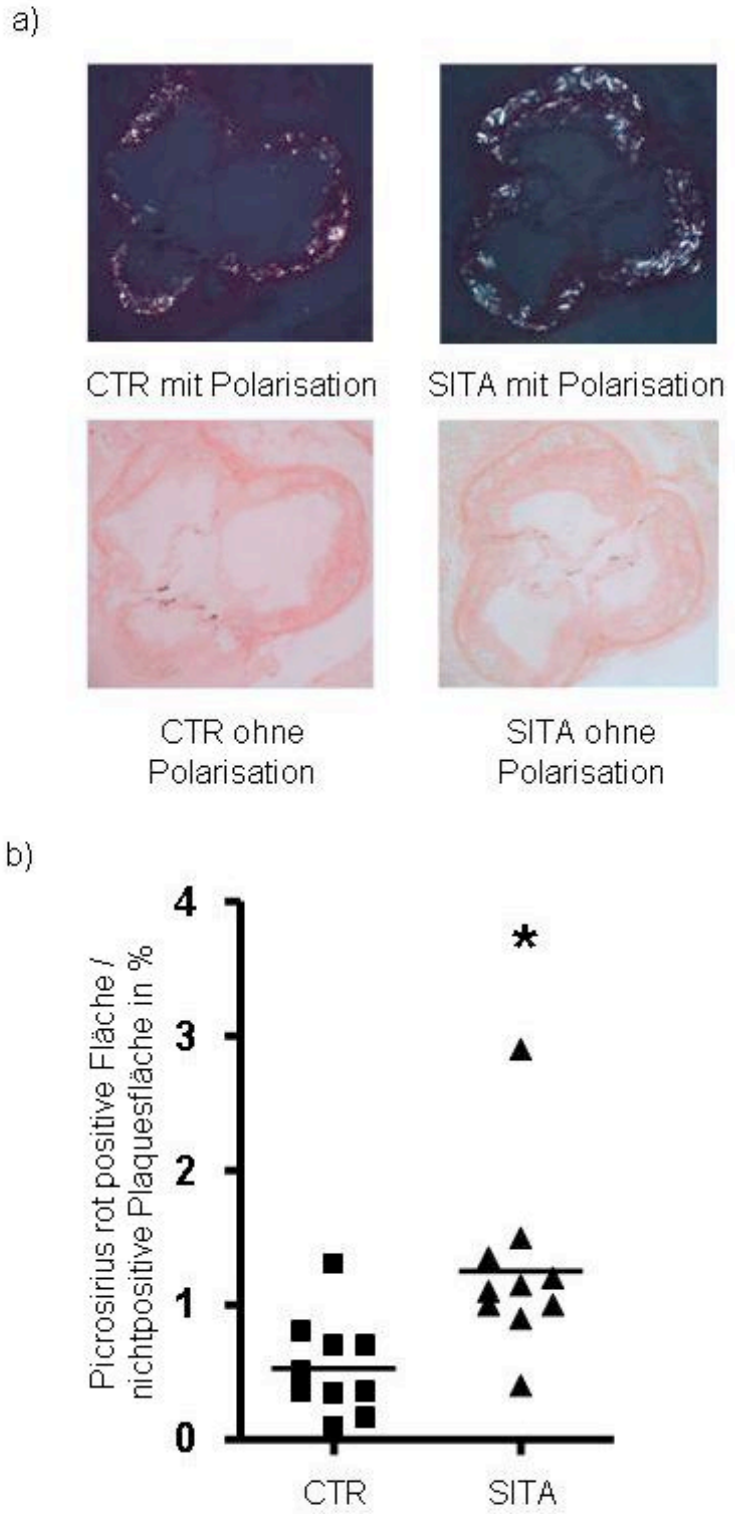


Abbildung 14: In der Aortenwurzel Apolipoprotein E defizienter (ApoE $^{-/-}$) Mäuse, die einer fettreichen Diät unterzogen wurden, wird mithilfe Picrosirius rot Färbung der Kollagengehalt in den Plaques bestimmt. Verglichen wird hier der Kollagengehalt in der Kontrollgruppe (CTR) und in der Gruppe der Mäuse (SITA), die über 12 Wochen zusätzlich Sitagliptin mit der Nahrung in der Konzentration von 1,1 % (Gewicht/Gewicht) verabreicht bekamen. Jede Gruppe besteht aus zehn Versuchstieren. Die Abbildungen in a) zeigen repräsentative Gewebeabschnitte der Aortenwurzel, die mit Picrosirius rot gefärbt sind. Die unteren

Abbildungen sind ohne und die oberen Abbildungen entsprechend mit Polarisation, um den Kollagengehalt zu zeigen. In b) ist die quantitative Auswertung des Kollagengehalts in den Plaques dargestellt, dabei ist die von dem Kollagen eingenommene Fläche in Prozent der Gesamtfläche dargestellt. Das Ergebnis lautet, dass der Kollagengehalt in der CTR Gruppe niedriger ist als in der SITA Gruppe (1,2 ± 0,6 % versus 0,5 ± 0,3 % für SITA versus CTR, * p<0,01).

Um die Ergebnisse der Picrosirius rot Färbung der Aortenwurzel zu bestätigen, wurde zusätzlich eine Färbung des Aortenbogens mit Picrosirius rot durchgeführt. Sie ist in Abbildung 15 analog zu den Färbungen der Aortenwurzel dargestellt. Hier zeigt sich, dass bei der SITA Gruppe das Kollagen 2,6 ± 0,07 % der Gesamtfläche einnimmt, wohingegen die CTR Gruppe einen Wert von 0,7 ± 0,9 % ($p < 0,05$) erreicht. Dies bedeutet, dass der Kollagengehalt in den mit Sitagliptin behandelten Mäusen verglichen mit der Kontrollgruppe (n=10 / Gruppe) erhöht ist und somit die Ergebnisse der Aortenwurzel bestätigt.

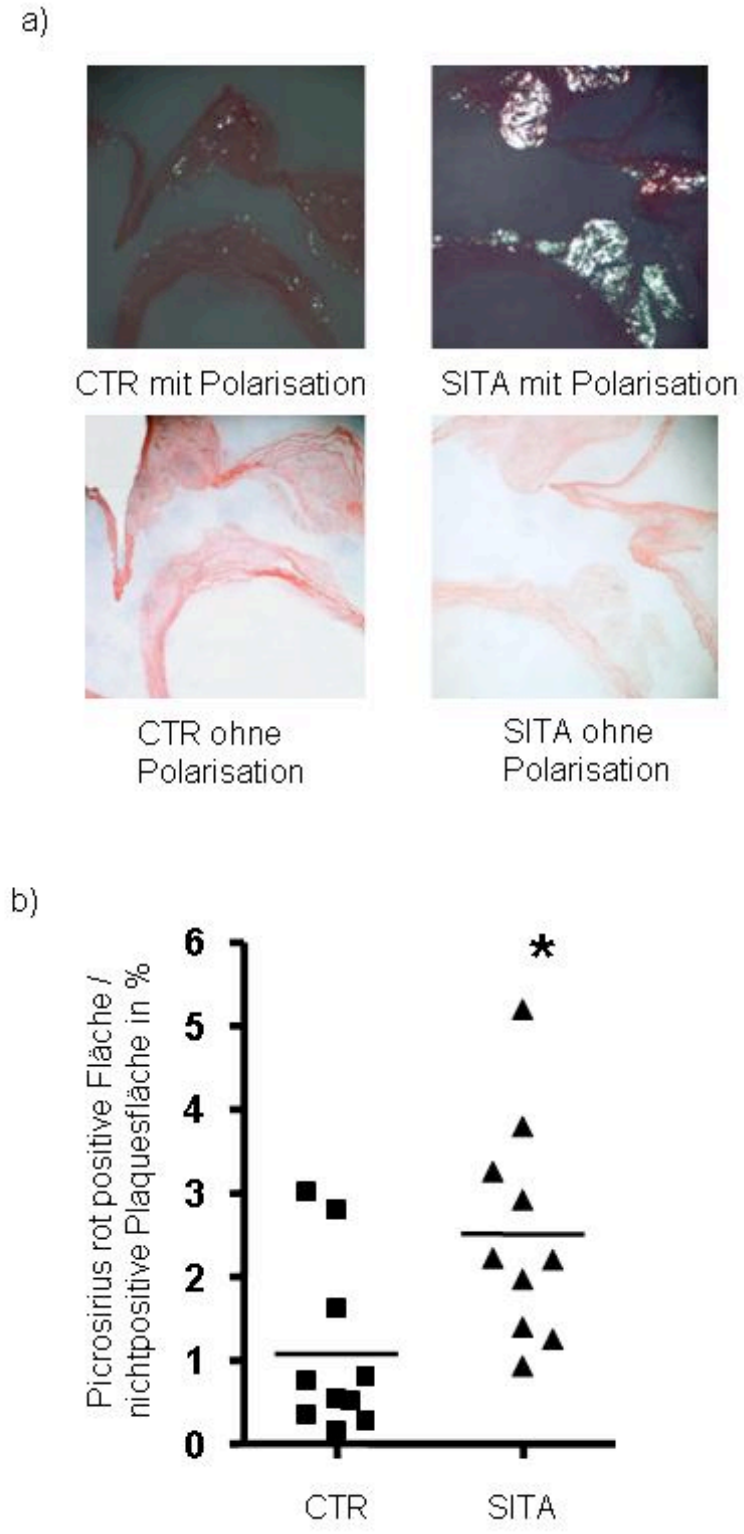


Abbildung 15: In dem Aortenbogen Apolipoprotein E defizienter (ApoE $^{-/-}$) Mäuse, die einer fettreichen Diät unterzogen wurden, wird mithilfe Picrosirius rot Färbung der Kollagengehalt in den Plaques bestimmt. Verglichen wird hier der Kollagengehalt in der Kontrollgruppe (CTR) und in der Gruppe der Mäuse (SITA), die über 12 Wochen zusätzlich Sitagliptin mit der Nahrung in der Konzentration von 1,1 % (Gewicht/Gewicht) verabreicht bekamen. Jede Gruppe besteht aus zehn Versuchstieren. Die Abbildungen in a) zeigen repräsentative Gewebeabschnitte des Aortenbogens, die mit Picrosirius rot gefärbt sind. Die unteren

Abbildungen sind ohne und die oberen Abbildungen entsprechend mit Polarisation, um den Kollagegehalt zu zeigen. In b) ist die quantitative Auswertung des Kollagengehalts in den Plaques dargestellt, dabei ist die von dem Kollagen eingenommene Fläche in Prozent der Gesamtfläche dargestellt. Das Ergebnis lautet, dass der Kollagengehalt in der CTR Gruppe niedriger ist als in der SITA Gruppe (2,6 ± 0,07 % versus 0,7 ± 0,9 % für SITA versus CTR, * $p<0,05$).

Die Picrosirius rot Färbung hat ergeben, dass in unserem ApoE $^{-/-}$ Modell der Kollagengehalt von Typ I und III Kollagen in den Läsionen der mit Sitagliptin behandelten Mäusen sowohl in der Aortenwurzel als auch im Aortenbogen verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht ist.

4 Diskussion

In der gegenwärtigen Studie wurde der Effekt des DPP-IV Inhibitors Sitagliptin auf die Quantität und Zusammensetzung der arteriosklerotischen Plaques in ApoE $^{-/-}$ Mäusen untersucht.

Als Ergebnis konnte festgestellt werden, dass Sitagliptin keinen Effekt auf die arteriosklerotischen Läsionen quantitativ hat, es aber signifikant die Makrophageninfiltration in der Aortenwurzel und dem Aortenbogen reduziert. Die Abnahme der Makrophageninfiltration in den Plaques geht mit einer Erhöhung an Kollagen Typ I und III in der Läsion der mit Sitagliptin behandelten Mäuse einher.

4.1 DPP-IV Inhibitoren

4.1.1 Inkretine

GLP-1 ist ein Peptidhormon, das im distalen Gastrointestinaltrakt produziert und bei Nahrungsaufnahme freigesetzt wird. Es wird rasch verstoffwechselt, indem es durch das Enzym DPP-IV gespalten wird. GLP-1 Analoga und DPP-IV Inhibitoren wie Sitagliptin, welche die GLP-1 Konzentration im Plasma erhöhen, gehören derzeit zu den aktuellen Behandlungsmöglichkeiten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (Geelhoed-Duijvestijn, 2007; Drucker, 2007).

Bei der Therapie mit auf GLP-1 basierenden Medikamenten konnten einige positive Effekte festgestellt werden. So fördert GLP-1 die glucoseabhängige Produktion und Sekretion von Insulin und erhöht bei Diabetikern zudem die Empfindlichkeit auf Insulin (Holst, 2007). In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass GLP-1 neben den bekannten Effekten auf den Glukosemetabolismus zusätzlich Effekte auf kardiovaskuläre Risikofaktoren hat. Es senkt beispielsweise den systolischen Blutdruck und verbessert die Lipidparameter während des Fastens und postprandial. Zudem verbessert es die endotheliale Dysfunktion (Rizzo et al., 2009).

Darüber hinaus gibt es Anzeichen für einen antiinflammatorischen Effekt von GLP-1 in verschiedenen Geweben (Iwai et al, 2006), sowie dafür, dass DPP-IV in der Modulation des Entzündungsprozesses eine Rolle spielt (Kim et al., 2009; van Lingen et al., 2008). Zudem inhibiert GLP-1 die Chemokin-induzierte Migration von

menschlichen CD4-positiven Lymphozyten, ein früher und entscheidender Schritt der Arteriosklerose (Marx et al., 2010).

4.1.2 Bedeutung der vaskulären Effekte von Inkretinen für Patienten mit Diabetes mellitus

Patienten mit Diabetes mellitus haben ein erhöhtes Risiko, an einer diffusen und schweren Arteriosklerose zu erkranken. Ihre arteriosklerotischen Plaques weisen eine hohe Last an Entzündungszellen auf und sind verglichen mit den Plaques von Nicht-Diabetikern weniger stabil (Ross, 1999; Marx et al., 2002; Beckman et al., 2002). Vor diesem Hintergrund kommt den vaskulären Effekten von GLP-1 und GLP-1 Analoga bzw. DPP-IV Inhibitoren eine besondere Rolle zu. Mit der vorliegenden Studie soll das Wissen über die Rolle von GLP-1 und DPP-IV Inhibitoren in dem kardiovaskulären System erweitert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem DPP-IV Inhibitor Sitagliptin zu einer geringeren Makrophageninfiltration und einem erhöhten Kollagengehalt der Plaques führt.

Vor dem Hintergrund, dass der Kollagengehalt mit der Stabilität atherosklerotischer Plaques korreliert (Nadkarni et al., 2009; Plenz et al., 2003; Rekhter, 1999), führen diese Ergebnisse zu der Annahme, dass die arteriosklerotischen Plaques in ApoE $^{-/-}$ Mäusen durch Sitagliptin stabilisiert werden und die Gefahr einer Plaqueruptur mit konsekutivem Gefäßverschluss vermindert wird.

Daher könnte eine medikamentöse Behandlung mit Sitagliptin ein interessantes therapeutisches Konzept sein, die Plaquestabilität von Hochrisikopatienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zu beeinflussen

4.2 Effekt von Sitagliptin auf die Ausdehnung und Zusammensetzung der arteriosklerotischen Läsionen

Die Studie zeigt, dass Sitagliptin keine Auswirkung auf die Ausdehnung der arteriosklerotischen Läsionen hat. Umso wichtiger ist hingegen der Effekt auf die Makrophagenanzahl und den Kollagengehalt.

In unserem Mausmodell konnte mit Sitagliptin eine signifikante Reduktion der in die Plaques infiltrierenden Makrophagen beobachtet werden.

4.2.1 Makrophagen

Monozyten sind Vorläuferzellen der Makrophagen und spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Arteriosklerose.

Die Anzahl der Makrophagen wurde mithilfe der Avidin-Biotin-Methode bestimmt. Diese immunohistochemische Färbung ist eine einfache und sensitive Methode, um Antigene in Formalin-fixiertem Gewebe zu lokalisieren. Sie hat eine hohe Farbintensität und ist besser als die Methode mit nicht markierten Antikörpern (Hsu et al., 1981). Der dafür verwendete Antikörper Mac-3 wurde zuvor schon erfolgreich in anderen Studien mit ApoE $^{-/-}$ Mäusen eingesetzt. Beispielsweise wurde mithilfe immunhistochemischer Färbung mittels Mac-3 Antikörpern die Makrophagenanzahl in Venentransplantaten von ApoE $^{-/-}$ Mäusen bestimmt (Ali et al., 2008).

In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Zahl an Monozyten mit einer koronaren Arteriosklerose assoziiert ist (Schlitt et al., 2004). Eine geringere Anzahl an Makrophagen deutet auf einen niedrigeren Entzündungsgrad der arteriosklerotischen Plaques hin. Die Entzündungsreaktion nimmt eine zentrale Rolle in allen Phasen des arteriosklerotischen Prozesses ein (Libby et al., 2002).

4.2.2 Kollagen

Aktivierte Makrophagen produzieren Metalloproteinasen, welche zu einem Abbau der extrazellulären Matrix in der fibrösen Kappe der Plaques führen. Dies resultiert in einer Verringerung der Kollagenfasern und somit in einem Verlust der Stabilität und einer Schwächung der fibrösen Kappe der Plaques, was mit einer erhöhten Rupturneigung einhergeht (Libby, 2005). Diese enzymatische Degradation der Matrix ist ein Grund für die Entstehung instabiler Plaques (Lee et al., 1997). Neben dem Abbau an Kollagenfasern, trägt eine inadäquate Synthese von Kollagen dazu bei, arteriosklerotische Plaques zu schwächen (Rekhter, 1999). Umso bedeutender ist die Verringerung der Anzahl an Makrophagen in den Plaques und folglich einer verringerten Anzahl an Matrix-zerstörender Enzyme.

Die für die Ermittlung der Kollagenanzahl verwendete Picrosirius rot Polarisationsmethode ist eine zuverlässige und sensitive Methode, um spezifisch Kollagen Typ I und III darzustellen (Montes et al., 1991).
Die in der vorliegenden Studie beobachtete Erhöhung an Typ I und III Kollagen könnte folglich im Zusammenhang mit der Verringerung der Makrophageninfiltration in den Plaques stehen, da weniger Matrix-zerstörende Enzyme freigesetzt werden. Dadurch können die atherosklerotischen Plaques stabilisiert werden.

4.3 Physiologische Bedeutung

Für Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, die für eine Therapie mit Sitagliptin in Frage kommen, ist nicht nur die Atherosklerose quantitativ entscheidend, sondern auch die Plaquestabilität und damit das Risiko, eine Plaqueruptur mit dem akuten klinischen Ereignis zu erleiden. Eine Therapie mit Sitagliptin könnte daher ein interessantes Konzept sein, um die Entzündungslast der Plaques zu verringern und durch eine Erhöhung des Kollagengehalts eine Stabilisierung der Plaques zu erreichen. Somit könnte das Risiko eines akuten vaskulären Ereignisses vermindert werden. Diese Ergebnisse sind von besonderer klinischer Bedeutung, da Patienten mit Diabetes mellitus zu der Hochrisikogruppe zählen, an einer diffusen und schweren Arteriosklerose zu erkranken. Eine Erhöhung der Plaquestabilität durch DPP-IV Inhibitoren könnte infolgedessen ein interessanter therapeutischer Ansatz sein, um Gefäßkrankheiten bei Patienten mit Diabetes Typ 2 zu reduzieren.
Um die positiven Effekte von Sitagliptin auf den Kollagengehalt der Plaques, wie in dieser Studie beobachtet wurde, in einer Reduktion von kardiovaskulären Erkrankungen und Sterblichkeit übertragen zu können, braucht es weitere klinische Untersuchungen.

4.4 Vergleich zu GLP-1 Analoga

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Arakawa et al. konnte zeigen, dass durch eine Behandlung mit dem GLP-1 Rezeptor Agonist Exendin-4 die Monozytenadhäsion an Endothelzellen reduziert wird. Auf diese Weise wird die Akkumulation von diesen Entzündungszellen verringert und die arteriosklerotische

Läsionen in ApoE $^{-/-}$ Mäusen vermindert (Arakawa et al., 2010). Während die Verringerung der Monozytenadhäsion mit dem vorliegenden Ergebnis der reduzierten Infiltration an Makrophagen in die Plaques übereinstimmt, konnte eine Reduktion der Läsionsgröße in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Die Gründe für diese Diskrepanz können unterschiedlich sein:

GLP-1 und glukoseabhängige insulinotrope Polypeptide sind endogene Substrate für DPP-IV und sind hauptsächlich für die Wirkung auf den Glukosemetabolismus verantwortlich. Einer der Gründe für die Diskrepanz der beiden Studien könnte sein, dass es noch andere Substrate für DPP-IV gibt (Hildebrandt et al., 2008). Einige von diesen verschiedenen Chemokinen und Peptiden spielen eine kritische Rolle in der Atherogenese. Bei einer Hemmung von DPP-IV werden auch diese Chemokine und Peptide beeinflusst. Bei der Behandlung mit GLP-1 Rezeptor Agonisten wird jedoch vermutlich die DPP-IV Aktivität nicht beeinflusst. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien könnten dadurch erklärt werden, dass durch DPP-IV Inhibitoren weitere biologisch aktive Peptide in ihrem Abbau gehemmt werden, während GLP-1 Rezeptor Agonisten spezifisch am GLP-1 Rezeptor wirken.

Weiter muss beachtet werden, dass GLP-1 Analoga spezifische Stimulatoren am GLP-1 Rezeptor sind, wohingegen vom körpereigenen GLP-1(7-36), welches bei der Behandlung mit DPP-IV Inhibitoren erhöht ist, rezeptorabhängige und –unabhängige Wirkungen bekannt sind (Ban et al., 2008). Weitere Studien sind abzuwarten um festzustellen in welchem Umfang die beobachteten Effekte GLP-1 Rezeptor vermittelt sind.

5 Zusammenfassung

Derzeit sind Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitoren (DPP-IV Inhibitoren), welche die Plasmakonzentration von Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 erhöhen, Behandlungsoptionen für Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. Da diese Patienten ein hohes Risiko besitzen, an einer schweren und diffusen Atherosklerose zu erkranken, erforschten wir den Effekt des DPP-IV Inhibitors Sitagliptin auf die Atherogenese und die Plaquestabilität in einem Mausmodell der Atherosklerose.

Apolipoprotein E defiziente (ApoE $^{-/-}$) Mäuse wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und über 12 Wochen entweder mit (SITA-Gruppe; 1,1% Sitagliptin / Futter (Gewicht/Gewicht)) oder ohne (CTR-Gruppe) Sitagliptin behandelt.

Die Ausdehnung der arteriosklerotischen Läsionen, ermittelt mithilfe einer Lipidfärbung mit Oil-red-O, unterschied sich in der Aorta descendens (8,1 ± 3,5 % versus 5,1 ± 2,5 % für SITA versus CTR, p=nicht signifikant), in der Aortenwurzel (0,7 ± 0,2 % versus 0,7 ± 0,3 % für SITA versus CTR, p=nicht signifikant) und ebenso im Aortenbogen (2,4 ± 1,3 % versus 1,5 ± 1,0 % für SITA versus CTR, p=nicht signifikant) in beiden Gruppen nicht signifikant.

Eine spezifische Mac-3 Antikörperfärbung zeigte, dass die Makrophageninfiltration der Plaques von mit Sitagliptin behandelten Mäusen verglichen mit der Kontrolle signifikant geringer ist (0,03 ± 0,02 % versus 0,09 ± 0,05 % für SITA versus CTR in der Aortenwurzel und 0,04 ± 0,02 % versus 0,1 ± 0,05 % für SITA versus CTR in dem Aortenbogen, $p<0,05$).

Eine Picrosirius rot Färbung wies einen höheren Gehalt an Typ I und III Kollagenfasern in der SITA-Gruppe im Vergleich zur CTR-Gruppe (1,2 ± 0,6 % versus 0,5 ± 0,3 %, $p< 0,01$ für SITA versus CTR in der Aortenwurzel und 2,6 ± 0,07 % versus 0,7 ± 0,9 %, $p< 0,05$ für SITA versus CTR in dem Aortenbogen) nach.

Sitagliptin reduziert folglich die Makrophageninfiltration und erhöht den Kollagengehalt in arteriosklerotischen Läsionen im ApoE $^{-/-}$ Modell. Auf GLP-1 basierende Medikamente könnten daher ein interessantes Therapiekonzept darstellen, um die Plaquestabilität bei Hochrisikopatienten mit Typ 2 Diabetes mellitus zu beeinflussen.

6 Literaturverzeichnis

1. AHREN, B: Gut peptides and type 2 diabetes mellitus treatment. Curr Diab Rep 3 (2003), 365-72
2. ALBERTI, K.G.; ZIMMET, P.Z.: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of Diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation (clone). Diabet Med 15 (1998), 539-53
3. ALI, Z; BURSILL, C; DOUGLAS, G; MCNEILL, E; PAPASPYRIDONOS, M; TATHAM, A; BENDALL, J; AKHTAR, A; ALP, N; GREAVES, D; CHANNON, K: CCR2-mediated antiinflammatory effects of endothelial tetrahydrobiopterin inhibit vascular injury-induced accelerated atherosclerosis. Circulation 118 (2008), 71-7
4. AMORI, R; LAU, J; PITTAS, A: Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. JAMA 298 (2007), 194-206
5. ARAKAWA, M; MITA, T; AZUMA, K; EBATO, C; GOTO, H; NOMIYAMA, T; FUJITANI, Y; HIROSE, T; KAWAMORI, R; WATADA, H: Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. Diabetes 59 (2010), 1030-7
6. BAGGIO, L; DRUCKER, D: Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology 132 (2007), 2131-57
7. BAN, K; NOYAN-ASHRAF, M; HOEFER, J; BOLZ, S; DRUCKER, D; HUSAIN, M: Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. Circulation 117 (2008), 2340-50
8. BECKMAN, J; CREAGER, M; LIBBY, P: Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. JAMA 287 (2002), 2570-81
9. BULLOCK, B; HELLER, R; HABENER, J: Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. Endocrinology 137 (1996), 2968-78
10. CHIBA, T; KONDO, Y; SHINOZAKI, S; KANEKO, E; ISHIGAMI, A; MARUYAMA, N; UMEZAWA, K; SHIMOKADO, K: A selective NFkappaB

inhibitor, DHMEQ, reduced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. J Atheroscler Thromb 13 (2006), 308-13

11. DAVIDSON, J: Advances in therapy for type 2 diabetes: GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. Cleve Clin J Med 76 Suppl 5 (2009), 28-38
12. DAVIS, J; SINGH, S; SETHI, S; ROY, S; MITTRA, S; RAYASAM, G; BANSAL, V; SATTIGERI, J; RAY, A: Nature of action of Sitagliptin, the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor in diabetic animals. Indian J Pharmacol 42 (2010), 229-33
13. DRUCKER, D: Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: preclinical biology and mechanisms of action. Diabetes Care 30 (2007), 1335-43
14. DURINX, C; LAMBEIR, AM; BOSMANS, E; FALMAGNE, JB; BERGHMANS, R; HAEMERS, A; SCHARPE, S; DE MEESTER, I: Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. Eur J Biochem 267 (2000), 5608-13
15. EISSELE, R; GÖKE, R; WILLEMER, S; HARTHUS, HP; VERMEER, H; ARNOLD, R; GÖKE, B: Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. Eur J Clin Invest 22 (1992), 283-91
16. FRERCKS, HJ; RENZ-POLSTER, H: Stoffwechsel und Ernährung – Diabetes mellitus. In: Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (Hrsg): Basislehrbuch Innere Medizin, 3. Aufl., Urban&Fischer, München Jena (2004), S. 804-40
17. GEELHOED-DUIJVESTIJN, P: Incretins: a new treatment option for type 2 diabetes? Neth J Med 65 (2007), 60-4
18. GOKE, R; LARSEN, P; MIKKELSEN, J; SHEIKH, S: Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. Eur J Neurosci 7 (1995), 2294-300
19. HANSSON, G: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 352 (2005), 1685-95
20. HILDEBRANDT, M; SCHABATH, R: SDF-1 (CXCL12) in haematopoiesis and leukaemia: impact of DPP IV/CD26. Front Biosci 13 (2008), 1774-9
21. HO, M; SPRINGER, T: Tissue distribution, structural characterization, and biosynthesis of Mac-3, a macrophage surface glycoprotein exhibiting molecular weight heterogeneity. J Biol Chem 258 (1983), 636-42

22. HOLST, J: The physiology of glucagon-like peptide 1. Physiol Rev 87 (2007), 1409-39
23. HSU, S; RAINE, L; FANGER, H: Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase Techniques. J Histochem Cytochem 29 (1981), 577-80
24. IWAI, T; ITO, S; TANIMITSU, K; UDAGAWA, S; OKA, J: Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1beta production in cultured rat astrocytes. Neurosci Res 55 (2006), 352-60
25. KALOFOUTIS, C; PIPERI, C; KALOFOUTIS, A; HARRIS, F; PHOENIX, D; SINGH, J: Type II diabetes mellitus and cardiovascular risk factors: Current therapeutic approaches. Exp Clin Cardiol 12 (2007), 17-28
26. KIM, S; NIAN, C; DOUDET, D; MCINTOSH, C: Dipeptidyl peptidase IV inhibition with MK0431 improves islet graft survival in diabetic NOD mice partially via T-cell modulation. Diabetes 58 (2009), 641-51
27. KIM, W; EGAN, J: The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. Pharmacol Rev 60 (2008), 470-512
28. LEE, R; LIBBY, P: The unstable atheroma. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17 (1997), 1859-67
29. LIBBY, P; GENG, YJ; AIKAWA, M, SCHOENBECK, U; MACH, F; CLINTON, SK; LEE, RT: Macrophages and atherosclerosis plaque stability. Curr Opin Lipidol (1996), 330-5
30. LIBBY, P; RIDKER, P; MASERI, A: Inflammation and atherosclerosis. Circulation 105 (2002), 1135-43
31. LIBBY, P: Pathogenese der Atherosklerose. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg): Harrisons Innere Medizin, 16. Aufl., Band 1, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin (2005), S. 1528-32
32. LÖFFLER, G: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 6. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2005), S. 597-624
33. LÜLLMANN-RAUCH, R: Histologie Verstehen-Lernen-Nachschlagen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2003), S. 514-15
34. MARX, N; KEHRLE, B; KOHLHAMMER, K; GRUB, M; KOENIG, W; HOMBACH, V; LIBBY, P; PLUTZKY, J: PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. Circ Res 90 (2002), 703-10

35. MARX, N; BURGMAIER, M; HEINZ, P; OSTERTAG, M; HAUSAUER, A; BACH, H; DURST, R; HOMBACH, V; WALCHER, D: Glucagon-like peptide-1(1-37) inhibits chemokine-induced migration of human CD4-positive lymphocytes. Cell Mol Life Sci 67 (2010), 3549-55
36. MISTRY, G; MAES, A; LASSETER, K; DAVIES, M; GOTTESDIENER, K; WAGNER, J; HERMAN, G: Effect of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on blood pressure in nondiabetic patients with mild to moderate hypertension. J Clin Pharmacol 48 (2008), 592-8
37. MONTES, G; JUNQUEIRA, L: The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. Mem Inst Oswaldo Cruz 86 Suppl 3 (1991), 1-11
38. MU, J; WOODS, J; ZHOU, Y; ROY, R; LI, Z; ZYCBAND, E; FENG, Y; ZHU, L; LI, C; HOWARD, A; MOLLER, D; THORNBERRY, N; ZHANG, B: Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. Diabetes 55 (2006), 1695-704
39. NADKARNI, S; BOUMA, B; DE BOER, J; TEARNEY, G: Evaluation of collagen in atherosclerotic plaques: the use of two coherent laser-based imaging methods. Lasers Med Sci 24 (2009), 439-45
40. NAGAKURA, T; YASUDA, N; YAMAZAKI, K; IKUTA, H; TANAKA, I: Enteroinsular axis of db/db mice and efficacy of dipeptidyl peptidase IV inhibition. Metabolism 52 (2003), 81-6
41. NAUCK, MA; WOLLSCHLÄGER, D; WERNER, J; HOLST, JJ; ORSKOV, C; CREUTZFELDT, W; WILLMS, B: Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. Diabetologia 39 (1996), 1546-53
42. NYSTROM, T; GUTNIAK, M; ZHANG, Q; ZHANG, F; HOLST, J; AHREN, B; SJOHOLM, A: Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. Am J Physiol Endocrinol Metab 287 (2004), 1209-15
43. PENDSE, A; ARBONES-MAINAR, J; JOHNSON, L; ALTENBURG, M; MAEDA, N: Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. J Lipid Res 50 Suppl (2009), 178-82

44. PLENZ, G; DENG, M; ROBENEK, H; VOLKER, W: Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis (clone). Atherosclerosis 166 (2003), 1-11
45. PRATLEY, R: Overview of glucagon-like peptide-1 analogs and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for type 2 diabetes. Medscape J Med 10 (2008), 171
46. REKHTER, M: Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. Cardiovasc Res 41 (1999), 376-84
47. RIZZO, M; RIZVI, A; SPINAS, G; RINI, G; BERNEIS, K: Glucose lowering and anti-atherogenic effects of incretin-based therapies: GLP-1 analogues and DPP-4-inhibitors. Expert Opin Investig Drugs 18 (2009), 1495-503
48. ROSS, R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med (1999), 115-26
49. SCHLITT, A; HEINE, G; BLANKENBERG, S; ESPINOLA-KLEIN, C; DOPHEIDE, J; BICKEL, C; LACKNER, K; IZ, M; MEYER, J; DARIUS, H; RUPPRECHT, H: CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. Thromb Haemost 92 (2004), 419-24
50. SCOTT, R; WU, M; SANCHEZ, M; STEIN, P: Efficacy and tolerability of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy over 12 weeks in patients with type 2 diabetes. Int J Clin Pract 61 (2007), 171-80
51. SHAMSHIEV, A; AMPENBERGER, F; ERNST, B; ROHRER, L; MARSLAND, B; KOPF, M: Dyslipidemia inhibits Toll-like receptor-induced activation of CD8alpha-negative dendritic cells and protective Th1 type immunity. J Exp Med 204 (2007), 441-52
52. SICREE, R; SHAW, J; ZIMMET, P: Prevalence and Projections. In: International Diabetes Federation, Diabetes Atlas, Third Edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation (2006), S. 19
53. STARY, H ; CHANDLER, A; DINSMORE, R; FUSTER, V; GLAGOV, S; INSULL, W; ROSENFELD, M; SCHWARTZ, C; WAGNER, W; WISSLER, R: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15 (1995), 1512-31

54. THORENS, B: Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992), 8641-5
55. TUOMILEHTO, J; LINDSTROM, J; ERIKSSON, J; VALLE, T; HAMALAINEN, H; ILANNE-PARIKKA, P; KEINANEN-KIUKAANNIEMI, S; LAAKSO, M; LOUHERANTA, A; RASTAS, M; SALMINEN, V; UUSITUPA, M: Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. N Engl J Med 344 (2001), 1343-50
56. UNDERWOOD, R; CHIRAVURI, M; LEE, H; SCHMITZ, T; KABCENELL, AK; YARDLEY, K; HUBER, BT: Sequence, purification, and cloning of an intracellular serine protease, quiescent cell proline dipeptidase. J Biol Chem 274 (1999), 34053-8
57. VAN LINGEN, R; VAN DE KERKHOF, P; SEYGER, M; DE JONG, E; VAN RENS, D; POLL, M; ZEEUWEN, P; VAN ERP, P: CD26/dipeptidyl-peptidase IV in psoriatic skin: upregulation and topographical changes. Br J Dermatol 158 (2008), 1264-72
58. WILLIAMS, H; JOHNSON, JL; CARSON, K G S; JACKSON, C L: Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22 (2002), 788–92
59. ZHANG, S; REDDICK, R; PIEDRAHITA, J; MAEDA, N: Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. Science 258 (1992), 468-71