

Diplomarbeit

**Der Einfluss von Glucose
auf den positiv inotropen Effekt durch
GLP-1-Rezeptor-Aktivierung**

eingereicht von

Thomas Krainer

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Kardiologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv. Doz. Dr. med. Dirk von Lewinski

und

Dr. med. univ. Ewald Kolesnik

Graz, 29. Oktober 2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 29. Oktober 2017

Thomas Krainer eh.

Danksagung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnte ich einen tieferen Einblick in die Methoden und Möglichkeiten der medizinischen Forschung erlangen. Nur mit Hilfe von versierten Forschern in diesem Bereich war es mir möglich von Beginn an den Überblick in dieser Arbeit zu bewahren und schließlich mein Interesse an der Medizin zu festigen. Allererstes möchte ich mich bei meinem Erstbetreuer Assoz. Prof. PD. Dr. Dirk von Lewinski für seine herausragende Rolle als Wegbereiter sowie für seine fachliche Führung und das Schaffen vieler Möglichkeiten im Rahmen dieser Diplomarbeit bedanken. Besonderen Dank möchte ich meinem Zweitbetreuer Dr. Ewald Kolesnik aussprechen, der sein Wissen mit außerordentlicher Geduld und Freundlichkeit an mich weitergegeben, mich in vielfältiger Hinsicht unterstützt und mein Interesse an Kardiologie geweckt hat. Auch der klinischen Abteilung für Herzchirurgie möchte ich für ihre Zusammenarbeit danken.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei meiner Partnerin, meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets verständnisvoll und motivierend in dieser Zeit begleitet haben, für ihre Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Zusammenfassung.....	XI
Abstract.....	XII
1 Einleitung	13
1.1 Kohlehydratstoffwechsel.....	13
1.1.1 Von Glucose zum ATP.....	13
1.1.2 Rolle des Insulins.....	16
1.1.3 Die Physiologie von Inkretinen.....	16
1.2 Diabetes Mellitus	19
1.2.1 Einteilung von Diabetes Mellitus	19
1.2.2 Therapiemöglichkeiten von Diabetes Mellitus	22
2 Das Myokard, Inkretine und die Inotropie	26
2.1 Physiologische Grundlagen der Herzmuskelkontraktion	26
2.1.1 Das Aktionspotential	26
2.1.2 Die elektromechanische Koppelung	27
2.1.3 Der Frank-Starling-Mechanismus	28
2.1.4 Der Energiestoffwechsel von Kardiomyozyten.....	29
2.2 Wirkungen von Inkretinen auf das Myokard.....	29
2.3 Fragestellung und Ziele	32
3 Material und Methoden.....	33
3.1 Einverständniserklärung	33
3.2 Vorhofgewebe	33

3.2.1 Puffer- und Nährlösungen.....	33
3.3 Erhalt und Transport von Vorhofgewebe	35
3.4 Präparation von Vorhoftrabekel.....	36
3.5 Streifenanlage und Experimentvorbereitungen.....	36
3.6 Substanzen.....	39
3.7 Patientendaten	39
3.8 Versuchsprotokoll	41
3.8.1 Single dose Inkretinmimetika	41
3.8.2 Transiente positiv inotrope Effekte.....	41
3.9 Auswertung.....	41
3.10 Statistik.....	42
4 Ergebnisse	43
4.1 Inotrope Effekte und Rundown	43
4.2 Inotrope Effekte von Exenatide.....	43
4.3 Inotrope Effekte von GLP-1(7-36)NH ₂	47
4.4 Einfluss von GLP-1(9-36)NH ₂ auf atriales Gewebe	51
5 Diskussion	54
5.1 Der positiv inotrope Effekt auf den Vorhof.....	54
5.2 GLUT-1 Translokation	55
5.3 Limitationen	57
5.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	58
6 Literaturverzeichnis.....	59

Abkürzungsverzeichnis

<i>AACE</i>	<i>American Association of Clinical Endocrinologists</i>
<i>AC</i>	<i>Adenylatzyklase</i>
<i>ACE</i>	<i>American College of Endocrinology</i>
<i>ACE-Hemmer</i>	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
<i>ADP</i>	<i>Adenosin Diphosphat</i>
<i>AKE</i>	<i>Aortenklappenersatz-Operationen</i>
<i>AMP</i>	<i>Adenosin Monophosphat</i>
<i>AMPK</i>	<i>Adenosin Monophosphat aktivierte Proteinkinase</i>
<i>ANP</i>	<i>atriales natriuretisches Peptid</i>
<i>ATII</i>	<i>Angiotensin II</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosintriphosphat</i>
<i>AV-Knoten</i>	<i>Atrioventrikular-Knoten</i>
<i>BMI</i>	<i>Body Mass Index</i>
<i>Ca²⁺</i>	<i>Calcium-Ion</i>
<i>CABG</i>	<i>coronary-artery-bypass-graft</i>
<i>CaCaM</i>	<i>Ca²⁺-Calmodulin</i>
<i>CaCl₂·2H₂O</i>	<i>Calciumchlorid</i>
<i>CaMKII</i>	<i>Calmodulinkinase II</i>
<i>cAMP</i>	<i>cyklisches Adenosinmonophosphat</i>
<i>CO₂</i>	<i>Kohlendioxid</i>
<i>DM I</i>	<i>Typ-1 Diabetes</i>
<i>DM II</i>	<i>Typ 2- Diabetes</i>
<i>DPP-4</i>	<i>Dipeptidylpeptidase-4</i>
<i>EF</i>	<i>ejection fraction</i>
<i>Epac</i>	<i>cAMP-activated guanine nucleotide exchange factor</i>
<i>FADH/H⁺</i>	<i>Flavinadenindinukleotid</i>
<i>GCK</i>	<i>Glucokinase</i>
<i>GIP</i>	<i>glucose-dependent-insulintropic-polypeptide</i>
<i>GLP</i>	<i>glucagon-like-peptide</i>
<i>GLP-1R</i>	<i>GLP-1-Rezeptor</i>

GLUT	Glucosetransportsysteme
GPR40	g-protein coupled receptor 40
H ₂ O	Wasser
HCN-Kanäle	hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated
HDL	high density lipoprotein
K ⁺	Kalium-Ion
K _{ATP} -Kanäle	ATP-sensitive Kaliumkanäle
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LAEF	linksatriale Auswurfleistung
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	low density lipoprotein
LVEF	linksventrikulären Auswurfleistung
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Magnesiumsulfat
MODY	Maturity-onset diabetes of the young
MPC	Mitochondrialen Pyruvat Carrier
NaCl	Natriumchlorid
NADH/H ⁺	Nikotinamidenedindinukleotid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NCX	Natrium-Calcium-Exchanger
O ₂	Sauerstoff
OXPHOS	oxydative Phosphorylierung
PDC	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PKA	Proteinkinase A
PPAR _γ	Peroxisom-proliferator-aktivierte-Rezeptoren von typ γ
RAA	renin-angiotensin-aldosteron
RyR	Ryanodin-Rezeptoren
SERCA	sarko/endoplasmatic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SGLT	Natrium/Glucose-Cotransporter
SR	Sinusrhythmus
T-ASS	Acetylsalicylsäure
VHFA	Vorhofflimmerarrythmie
GLP-1(7-36)NH ₂	Glukagon-like Peptide 1 (7-36) Amid
GLP-1(9-36)NH ₂	Glukagon-like Peptide 1 (9-36) Amid

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> <i>Schematische Darstellung des Kohlehydratstoffwechsels in Zellen</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 2 :</i> <i>Schematische Darstellung der Insulinsekretion und Wirkung von Inkretinen/Inkretinmimetika in Beta-Zellen des Pankreas.....</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 3</i> <i>Therapieschema des Diabetes Mellitus Typ 2.....</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 4</i> <i>Schematische Darstellung der Wirkung von Inkretinen an der Herzmuskelzelle..</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 5</i> <i>Fotographie der Messanlage für Muskelstreifen.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 6</i> <i>Fotographie der Messeinheit, Force Transducer und Organbad.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 7</i> <i>Fotographie von Herzmuskelstreifen.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 8</i> <i>Fotographie von Herzohr.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 9</i> <i>Originalaufzeichnung des Experiments E-29 vom 22.03.2017</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 10</i> <i>Originalaufzeichnung des Experiments E-4 vom 29.09.2016.....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 11</i> <i>Effekt von Exenatide auf in Tyrode-Glucose-Lösung bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung inkubierten Muskelstreifen (%)</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 12</i> <i>Vergleich der Exenatide-Wirkung in Tyrode-Glucose-Lösung bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung zum Zeitpunkt STEADY STATE.</i>	<i>41</i>

<i>Abbildung 13</i>	
<i>Effekt von Exenatide auf in Tyrode-Glucose-Lösung bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung inkubierten Muskelstreifen (absolute Werte)</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 14</i>	
<i>Originalaufzeichnung des Experiments E-25 vom 22.02.2017</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 15</i>	
<i>Originalaufzeichnung des Experiments E-14 vom 27.10.2016</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 16</i>	
<i>Effekt von GLP-1(7-36) auf in Tyrode-Glucose-Lösung bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung inkubierten Muskelstreifen (%)</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 17</i>	
<i>Vergleich der GLP-1(7-36)-Wirkung in Tyrode-Glucose-Lösung bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung zum Zeitpunkt STEADY STATE</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 18</i>	
<i>Effekt von GLP-1(7-36) auf in Tyrode-Glucose-Lösung bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung inkubierten Muskelstreifen (absolute Werte).....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 19</i>	
<i>Originalaufzeichnung des Experiments E-21 vom 02.01.2017.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 20</i>	
<i>Originalaufzeichnung des Experiments E-20 vom 14.12.2016.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 21</i>	
<i>Effekt von GLP-1(9-36) auf in Tyrode-Glucose-Lösung bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung inkubierten Muskelstreifen (%)</i>	<i>48</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1

Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Puffer (Tyrode-Lösung) und der BDM-Tyrode-Lösung 34

Tabelle 2

Zusammensetzung der Tyrode-Glucose-Lösung und der Tyrode-Pyruvat-Lösung 35

Tabelle 3

PatientInnenendemographie 40

Zusammenfassung

Als Diabetes mellitus Typ 2 wird eine Erkrankung des Glucosestoffwechsels bezeichnet, die durch komplexe Mechanismen zu einer Schädigung des Gefäßsystems führt und weltweit für eine steigende Sterberate bei den Erkrankten verantwortlich ist. Eine neue therapeutische Strategie gegen diese Erkrankung stellen Inkretinmimetika dar. Diese bewirken als Agonisten des Glucagon-like-peptide (GLP)-1-Rezeptors an der pankreatischen Beta-Zelle eine glucoseabhängige Insulinfreisetzung und führen so zu einem antidiabetischen Effekt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich Inkretinmimetika positiv auf das kardiovaskuläre System auswirken. In atrialen Herzmuskelzellen führt die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors zu einem proteinkinase A-abhängigen positiv inotropen Effekt sowie zu einer vermehrten Translokation des Glucosetransporters-1 (GLUT1). Die Bedeutung des GLUT1 in diesem Zusammenhang ist jedoch unklar. Daher wurden in dieser Arbeit Herzmuskelstreifen (Trabekel) von humanem atrialen Herzmuskelgewebe elektrisch stimuliert und mit Exenatide, GLP-1(7-36)NH₂ sowie GLP-1(9-36)NH₂ inkubiert. Für die Nährlösung der Trabekel wurde entweder Glucose oder Pyruvat als Energiesubstrat verwendet und folglich die Unterschiede beider Substratgruppen in Bezug auf entwickelte Kraft, diastolische Spannung und Relaxationszeit untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei Vorhandensein von Glucose sowie auch Pyruvat Exenatide und GLP-1(7-36)NH₂, nicht jedoch GLP-1(9-36)NH₂, einen transienten positiv inotropen Effekt ausüben. Interessanterweise scheint dieser Effekt unter der Verwendung von Glucose als Energiesubstrat stärker ausgeprägt zu sein. Dies könnte im Zusammenhang mit der oben genannten vermehrten Translokation von GLUT1 stehen.

Abstract

Type-2 Diabetes is a worldwide metabolic disease which leads through complex pathophysiological mechanisms to an impaired vascular function and furthermore to cardiovascular death. Incretins are agonists of the GLP-1-receptor and exert an antidiabetic effect through glucose-dependent insulin-secretion from pancreatic beta-cells, representing an new therapeutic strategy against type-2 diabetes. Additionally, it is shown that incretins cause beneficial effects on the cardiovascular system. In atrial cardiomyocytes, the GLP-1-receptor activation leads to a protein kinase-A-dependent positive-inotropic effect and promotes the translocation of the glucose transporter 1 (GLUT1). In this context, the relevance of this GLUT1 translocation is unclear. Therefore electrically stimulated muscle strips from human atrial tissue were treated with the incretins exenatide, GLP-1(7-36)NH₂ and GLP-1(9-36)NH₂. Either glucose or pyruvate were used as energy substrates and subsequently analysed on differences in developed force, diastolic tension and relaxation parameters between the groups. This study shows that exenatide, GLP-1(7-36)NH₂ but not GLP-1(9-36)NH₂ exert an positive-inotropic effect when using both, glucose and pyruvate, as energy substrates. Interestingly, this effect tends to be more pronounced in muscle strips when glucose served as energy substrate. This could be linked to a promoted translocation of GLUT1.

1 Einleitung

1.1 Kohlenhydratstoffwechsel

1.1.1 Von Glucose zum ATP

Die Hauptfunktion von Kohlenhydraten im menschlichen Organismus besteht in der Bereitstellung und Speicherung von Energie auf zellulärer Ebene. Außerdem sind sie wichtige Bestandteile von Zellstrukturen und fungieren in verschiedenen Signaltransduktionsvorgängen.⁽¹⁾

Über die Nahrung aufgenommene Kohlenhydrate werden im Gastrointestinaltrakt enzymatisch gespalten, um als Monosaccharide über Enterozyten in den Blutkreislauf aufgenommen zu werden. Wichtigster Metabolit im Kohlenhydratstoffwechsel ist die Glucose. Galactose und Fructose werden hauptsächlich bereits in der Leber zu Glucose umgewandelt.

Der membranständige Natrium/Glucose-Cotransporter (SGLT) bewirkt unter gemeinsamer Einschleusung von Natrium-Ionen einen Glucosetransport in die Zelle. SGLT-1 wird unter anderem in Zellen des Dünndarms exprimiert und ist dort in der Regulation der Aufnahme von Glucose und Galactose in Enterozyten involviert. SGLT-2 ist hauptsächlich im proximalen Tubulus der Niere lokalisiert und fördert dort die Reabsorption von Glucose aus dem Primärharn.⁽²⁾

Je nach Bedarf erfolgt eine Distribution der Nährstoffe im Organismus. Unter anderem spielt bei einem Mangel an Glucose das Enzym Adenosinmonophosphat (AMP) aktivierte Proteinkinase (AMPK) eine wichtige Rolle in der Regulation des intrazellulären Energiehaushaltes und signalisiert einen zellulären Hungerzustand.⁽³⁾

Glucose bzw. Fructose gelangen über membranständige, zellspezifische Glucosetransportsysteme (GLUT1-14) in die Zelle um in der Glykolyse zu

Benztraubensäure (Pyruvat) abgebaut zu werden, welches dann wiederum in den Citrat-Zyklus eingeschleust wird.⁽⁴⁾

In beiden Stoffwechselwegen wird Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen, welches in weiterer Folge der Zelle als Energiesubstrat zur Verfügung steht.

In anaeroben Zuständen (z.B. bei körperlicher Belastung) katalysiert das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) die Akkumulation von Laktat, das von der Zelle in den Blutkreislauf abgegeben wird, um im sogenannten CORI-Zyklus in der Leber wieder zu Glucose aufgebaut zu werden.

Steht der Zelle ausreichend Sauerstoff zur Verfügung wird Pyruvat durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDC) zu AcetylCoA umgebaut. Angereichertes AcetylCoA dient der Zelle in Zeiten geringen Energieverbrauchs einerseits zur Synthese von Cholesterin und Fettsäuren, die im Rahmen der Lipogenese zu Triglyceriden aufgebaut werden und andererseits zur Bildung von Glucose durch Gluconeogenese.

Herrscht intrazellulär ein Zustand von erhöhtem Energiebedarf, wird Pyruvat in den Zitrat-Zyklus eingeschleust, um neben Kohlendioxid (CO_2) die Reduktionsäquivalente Nikotinamidnucleinukleotid (NADH/H^+) und Flavinadeninukleotid (FADH/H^+) zu bilden.

An der inneren Mitochondrienmembran werden NADH/H^+ und FADH/H^+ durch Enzymkomplexe der Elektronentransportkette oxidiert. Unter Verbrauch von Sauerstoff (O_2) und Bildung von Wasser (H_2O) kommt es zu einer Ausschleusung von Protonen in den mitochondrialen Intermembranraum und dem Aufbau eines Membranpotentials. Dieses elektrochemische Potential ist letztlich der Antrieb für das Transmembranprotein ATP-Synthase und der Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP. Dieser Vorgang wird als oxydative Phosphorylierung (OXPHOS) bezeichnet. ATP wird für den Großteil energieverbrauchender Vorgänge in der Zelle benötigt.^(5, 6)

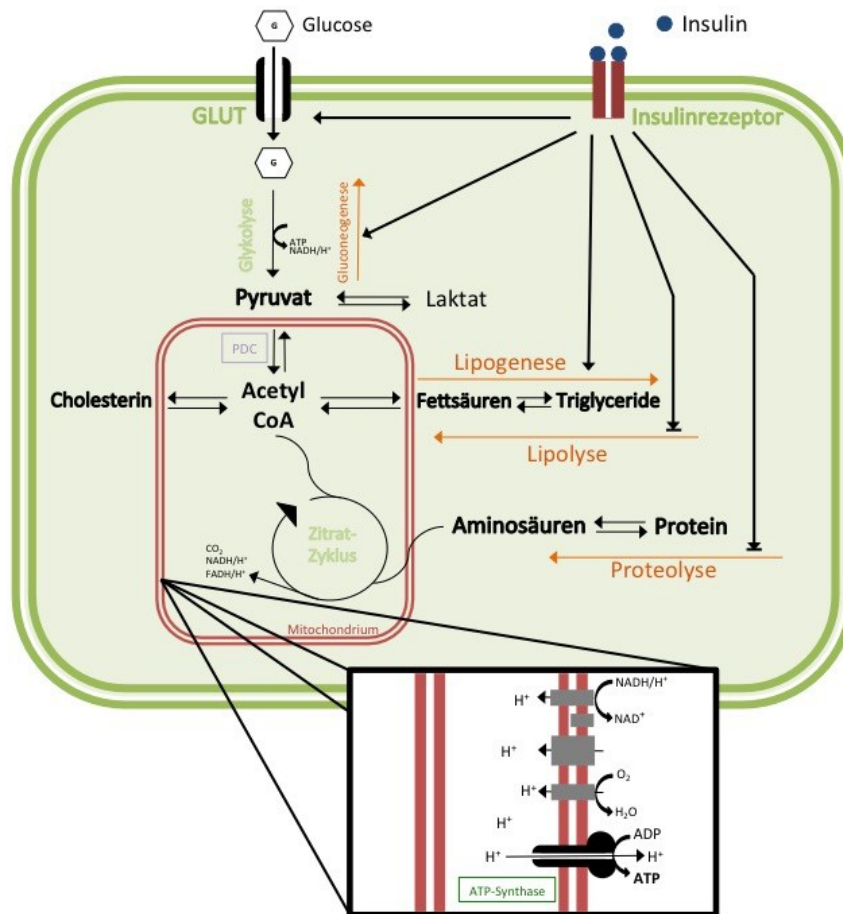


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Kohlenhydratstoffwechsels in Zellen. Nach der Aufnahme über GLUT wird Glucose intrazellulär durch die Glykolyse enzymatisch unter Verbrauch von ATP zu Pyruvat abgebaut. Dabei entstehen 2 Moleküle ATP und 2 NADH/H⁺. Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat umgewandelt. Durch den Pyruvatdehydrogenase-Complex (PDC) entsteht unter aeroben Bedingungen aus Pyruvat AcetylCoA, das in den Zitratzyklus eingeschleust wird. Hauptprodukt des Zitrat-Zyklus ist NADH/H⁺. Durch die Abgabe von Elektronen an die Enzymkomplexe der Atmungskette entsteht in weiterer Folge ein Protonengradient entlang der inneren Mitochondrienmembran. Das elektrochemische Membranpotential treibt die membranständige ATP-Synthase zur Produktion von energiereichem ATP an. Insulin bewirkt durch Aktivierung des Insulinrezeptors neben vermehrtem Glucoseeinstrom in die Zelle eine Hemmung des Fett- und Eiweißabbaus sowie eine Förderung des Zucker- und Fettaufbaus.

1.1.2 Rolle des Insulins

Insulin bewirkt, neben der Regulation verschiedener Stoffwechselfvorgänge, einen Glucoseeinstrom in die Zelle. Über Insulinrezeptoren wird eine Kaskade in Gang gesetzt die zu einer Translokation membranständiger, insulinabhängiger Glucosetransporter (GLUT2) führt.

Das heterodimere Hormon Insulin besteht aus 51 Aminosäuren, die als A- und B-Ketten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es wird im Pankreas in den Beta-Zellen der Langerhans-Inseln synthetisiert und in sogenannten Insulingranula gespeichert. Über den GLUT2 wird Glucose in die Betazelle aufgenommen, um durch Glykolyse und den Zitrat-Zyklus unter anderem energiereiches ATP zu generieren. Durch den intrazellulären Anstieg von ATP werden ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) gehemmt, was zu einer Membrandepolarisation und zu einer Aktivierung spannungsabhängiger L-Typ Calciumkanäle (voltage gated calcium channel; vgCaCh) führt. Letztlich kommt es zu einem Anstieg der zytosolischen Calcium (Ca^{2+})-Konzentration und dadurch zur Stimulation der Insulinsekretion aus den Insulingranula.

Neben Erhöhung des Plasmaglutose-Spiegels spielen auch freie Fettsäuren durch Stimulation von g-protein coupled receptor 40 (GPR40) und Aminosäuren eine Rolle in der Sekretion von Insulin in Beta Zellen.^(7, 8)

Außerdem scheint, dem Mitochondrialen Pyruvat Carrier (MPC) eine wichtige Rolle in der Glucose-vermittelten Insulinsekretion in Beta-Zellen zu zukommen.⁽⁹⁾

1.1.3 Die Physiologie von Inkretinen

Neben dem Insulinrezeptor befinden sich an der Membran der pankretischen Beta-Zelle Rezeptoren für glucagon-like-peptide (GLP)-1 und glucose-dependent-insulinotropic-polypeptide (GIP). Beide Peptide gehören zur Gruppe der Inkretine und werden hauptsächlich von enteroendokrinen Zellen des Intestinaltraktes produziert. Nach einer Mahlzeit werden diese Inkretine ausgeschüttet und führen in den Betazellen des Pankreas zu einer Ausschüttung von Insulin. 50 bis 70 % der postprandialen Insulinsekretion sind auf GLP-1 und GIP zurückzuführen.

Dieser sogenannte Inkretin-Effekt ist jedoch nicht bei niedrigen Plasmaglucoosespiegel zu beobachten und somit glucoseabhängig.⁽¹⁰⁾

GIP wird in Beta-Zellen nur mangelhaft exprimiert. Während GLP-1 die Glukagonaussüttung vermindert, induziert GIP über GIPR in den Alphazellen der Langerhans-Inseln die Sekretion von Glukagon und führt somit zu einem Anstieg des Plasmaglucoosespiegels.⁽¹¹⁾

Generell kommt GIP jedoch nur eine vernachlässigbare klinische Relevanz zu.

1.1.3.1 GLP-1 und seine Wirkungen

GLP-1 wird neben Fettgewebe und Alpha-Zellen des Pankreas in den L-Zellen vom distalen Jejunum, Ileum und Colon gebildet und dort durch neuronale und endokrine Faktoren als postprandialer Stimulus sezerniert. Von dem Protein Proglucagon wird durch eine Prohormon-Convertase unter anderem das inaktive, aus 37 Aminosäuren bestehende GLP-1(1-37) abgespalten. Durch post-translationalen processing kommt es zur Abspaltung von 6 Aminosäuren wobei zwei Bioaktive Isoformen, GLP-1(7-36)NH₂ und GLP-1(7-36)NH₂, entstehen. Mit 80% ist GLP-1(7-36)NH₂ die häufiger im Menschen vorkommende Isoform.⁽¹²⁾

Über den Blutweg gelangt GLP-1 zu den Betazellen der pankreatischen Langerhans-Inseln, um an seinen Rezeptor zu binden. Der GLP-1-Rezeptor (GLP-1R) gehört zur Klasse B der G-protein-gekoppelten-Rezeptoren und ist ein heptahelicales Transmembranprotein. Bindet der passende Ligand an den Rezeptor, so wird über heterotrimere G-Proteine die membranständige Adenylatzyklase (AC) aktiviert. Diese bildet aus ATP in weiterer Folge cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Der entstehende erhöhte cAMP-Spiegel aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA), die in der Beta-Zelle einen hemmenden Effekt auf K_{ATP}-Kanäle ausübt sowie die Leitfähigkeit spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle erhöht. Beide Effekte bestehen nur beim Vorhandensein hoher Glucosespiegel und begünstigen die Sekretion von Insulin aus den Insulingranula (siehe 1.1.2 Rolle des Insulins).

GLP-1 hat eine Halbwertszeit von etwa 2 Minuten. Abgebaut durch das proteolytische Enzym Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) in die zwei Abbauprodukt-

Isoformen GLP-1(9-36)NH₂ bzw. GLP-1(9-37)NH₂. GLP-1(9-36)NH₂ bindet an den GLP-1R ohne eine intrinsische Kaskade auszulösen und spielt somit als funktioneller Antagonist eine Rolle in der Regulation der Wirkung von GLP-1(7-36)NH₂.^(11, 13) Neben den Wirkungen auf die Beta-Zellen, verlangsamt GLP-1 außerdem die Entleerung des Magens, vermindert den Appetit und zeigte positive Effekte auf das Kardiovaskuläre- und Immunsystem.⁽¹⁰⁾

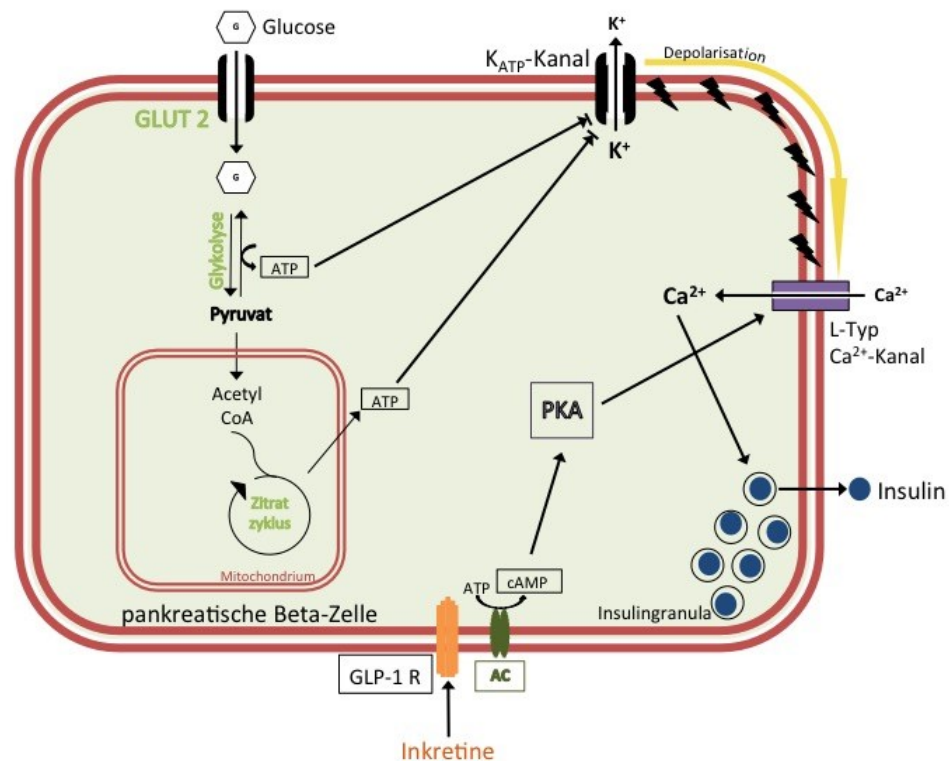


Abbildung 2 : Schematische Darstellung der Insulinsekretion und Wirkung von Inkretinen/Inkretinmimetika in Beta-Zellen des Pankreas. Glukose gelangt über einen insulinabhängigen Glukosetransporter (GLUT2) in die Beta-Zelle und dient in der Glykolyse und letztlich im Zitrat-Zyklus der Generierung von ATP. K_{ATP}-Kanäle an der Zellmembran werden durch das gesteigerte intrazelluläre ATP gehemmt, was zu einer Depolarisation der Zellmembran (gelber Pfeil) und einer Aktivierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen von L-Typ führt. Der konsekutive Ca²⁺-Einstrom in die Zelle stimuliert die Sekretion von Insulin aus den Insulingranula. Die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors führt über die Aktivierung von Adenylatzyklase, die die Umwandlung von ATP zu cAMP katalysiert, zu einer Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Das steigende cAMP aktiviert die PKA, welche die Konduktivität des spannungsabhängigen L-Typ Ca²⁺-Kanals herabsetzt und eine Insulinausschüttung fördert.

1.2 Diabetes Mellitus

Bei einer Störung dieser komplexen Verhältnisse rund um den Glucosestoffwechsel kann die Erkrankung Diabetes mellitus auftreten. Diese bezeichnet eine Gruppe von ätiologisch abgrenzbaren Erkrankungen, die zu chronischer Hyperglykämie und damit verbunden zu Schädigungen in verschiedenen Organen beziehungsweise Organsystemen führen. Ursächlich für eine langfristige Erhöhung des Blutglucosespiegels sind Defekte in der Wirkung und/oder Sekretion des Hormons Insulin, was zu einer Störung des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsels führt.

Pathophysiologisch beruhen diabetesbedingte Folgeerkrankungen auf spezifischen Veränderungen kleiner und großer Blutgefäße die zu Nieren-, Netzhaut- und Nervenschädigungen (Mikroangiopathie) sowie zu einem erhöhten kardiovaskulären und cerebrovaskulären Erkrankungsrisiko (Makroangiopathie) führen. Hohe Dosen von Glucose schädigen auch Kardiomyozyten direkt.⁽¹⁴⁾

Die diabetische Nephropathie stellt die Hauptursache für terminale Niereninsuffizienz in der westlichen Welt dar und bildet außerdem einen großen Risikofaktor für die Entwicklung makroangiopathischer Erkrankungen wie Myokardinfarkt und Insult. Die diabetische Retinopathie ist eine potentielle und häufige Ursache für Blindheit und Sehbeeinträchtigung. Die diabetische Neuropathie präsentiert sich in Form von Störungen des autonomen Nervensystems, neuropathischen Schmerzen und Empfindungsstörungen, die mit der Entstehung des diabetischen Fußes assoziiert sind.^(15, 16) Im Jahr 2012 war Diabetes Ursache für etwa 1,5 Millionen Todesfälle weltweit.⁽¹⁷⁾ Bis 2030 wird eine Verdoppelung der Prävalenz von Diabetes prognostiziert.⁽¹⁸⁾

1.2.1 Einteilung von Diabetes Mellitus

Anhand ätiologischer Gesichtspunkte wird Diabetes mellitus folgendermaßen klassifiziert.

1.2.1.1 Diabetes Mellitus Typ I

Der Typ-1-Diabetes (DM I) (früher: juveniler Diabetes) ist in der Regel durch einen absoluten Mangel an Insulin gekennzeichnet. Dieser kommt durch eine irreversible Destruktion insulinproduzierender Betazellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas zustande, die im Rahmen einer sogenannten Insulitis durch betazellspezifische autoaggressive T-Lymphozyten ausgelöst wird. Die genaue Ursache ist nicht bekannt. Für bestimmte HLA-Typen besteht ein erhöhtes Risiko an DM I zu erkranken. Außerdem geben bestimmte Umgebungsfaktoren (Enteroviren, intrauterine Rötelnvirusinfektion, Gabe von Kuhmilch im Säuglingsalter)⁽¹⁹⁾ Hinweise darauf, eine Rolle in der Krankheitsentstehung zu spielen. Die Häufigkeit von DM I und das Risiko am DM I zu erkranken steigt in westlichen Staaten.⁽¹⁵⁾ Therapeutisch sind Typ-1-Diabetiker auf die Substitution von Insulin angewiesen.

1.2.1.2 Diabetes Mellitus Typ II

Bei Typ-2-Diabetes (DM II) (früher: adulter Diabetes) kommt es neben peripherer Insulinresistenz zu einer kompensatorisch vermehrten Insulinsekretion in den Langerhans-Inseln und gleichzeitig zu einer Insulinresistenz sämtlicher Zellen. Dadurch stellt sich zunächst ein relativer Insulinmangel ein, im Laufe der Erkrankung nimmt die insulinsekretorische Funktion der Betazellen ab und es kommt zu einem absoluten Insulinmangel. Somit wird im Zuge der Erkrankung die zelluläre Aufnahme von Glucose aus dem Blut vermindert, als Folge manifestiert sich eine chronische Hyperglykämie.⁽²⁰⁾

Die Insulinresistenz ist vor allem in Skelettmuskulatur, der Leber und in Fettgewebe zu beobachten. Genetische Faktoren und Adipositas stehen in engem Zusammenhang mit der Entwicklung von DM II, wobei das vermehrte Vorkommen von freien Fettsäuren und Hyperinsulinismus über spezifische Wege zu einer peripheren Insulinresistenz führen.⁽²¹⁾

Die Verringerung der Insulinsekretion kommt unter anderem auch durch eine chronische Hyperinsulinämie zustande. Außerdem stört auch die Hyperglykämie

die Insulinantwort auf Glucosereize in den Betazellen.⁽²²⁾

Außerdem steht DM II im Zusammenhang mit Veränderungen der Inkretinwirkung bzw. –sekretion.⁽²³⁾

Etwa 85% der Diabetiker leiden an diesem DM II. Die steigende Inzidenz dieser Krankheit wird dem Lebensstil in westlichen Ländern (verminderte körperliche Bewegung, kalorienreiche Ernährung) zugeschrieben. Durch Modifikation dieser Risikofaktoren ist DM II potenziell reversibel und heilbar.⁽²⁴⁾

1.2.1.3 Andere spezifische Typen von DM

Ein pathologisch erhöhter Plasmaglucoosespiegel kann durch verschiedenste Mechanismen verursacht werden. Erkrankungen des exokrinen Pankreas, wie chronische Pankreatitis, führen zu einer Schädigung pankreatischen Gewebes und so zu einer Verminderung von Beta-Zell-Masse.⁽²⁵⁾ Auch bei Hämochromatose und zystischer Fibrose kann der konsekutive Untergang von Beta-Zellen einen Diabetes mellitus verursachen.^(26, 27)

Im Rahmen von Erkrankungen endokriner Organe wie Morbus Cushing und Akromegalie kommt es durch hormonelle Wirkungen (Cortisol, Somatotropin) zu einer Herabsetzung der Insulinwirkung aber auch zu Störungen der Beta-Zell-Funktion.^(28, 29)

Gleichsam stehen diverse medikamentös-chemische Ursachen (Alpha-Interferon, HIV/AIDS-Therapie) im Zusammenhang mit der Entstehung von Diabetes.⁽³⁰⁾⁽³¹⁾

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) ist eine Gruppe monogenetischer Erkrankungen, die zu einer Störung des Glucosestoffwechsels führt. Die häufigsten Formen weisen Mutationen in den Genloci für Glucokinase (GCK), sowie für Transkriptionsfaktoren der Insulintranskription (HNF-1 α 1A u. 4A) auf.⁽³²⁾

Dem erstmaligen Auftreten von Diabetes mellitus während der Schwangerschaft (Gestationsdiabetes) liegt eine bereits vor der Konzeption bestehende, subklinisch verlaufende metabolische Dysfunktion (unter anderem Insulinresistenz und beeinträchtigte Insulinantwort) zu Grunde. Da während einer normalen Schwangerschaft die Insulinsensitivität um bis zu 60 % sinkt, kommt es zur Manifestation des Gestationsdiabetes.⁽³³⁾

Die Wahrscheinlichkeit im Laufe des Lebens einen Typ 2 Diabetes zu entwickeln ist bei Frauen, die einen Gestationsdiabetes bereits in der frühen Schwangerschaft entwickeln, erhöht.⁽³⁴⁾

1.2.2 Therapiemöglichkeiten von Diabetes Mellitus

Die chronische Erhöhung des Plasmaglucoosespiegels geht mit einer Vielzahl von Komplikationen einher, die im Zusammenhang mit erhöhter Mortalität und verminderter Lebensqualität stehen.⁽³⁵⁾

Verschiedene therapeutische Ansätze lassen sich in orale und subcutane Antidiabetika einteilen, wobei die Modifikation von Lebensstilfaktoren (Diät, körperliche Aktivität, Schlafgewohnheiten) bei DM II im Vordergrund steht.^(24, 36)

1.2.2.1 Insulin und die oralen Antidiabetika

Bei fehlenden Kontraindikationen stellt **Metformin** die Therapie der ersten Wahl dar. Es gehört zur Wirkstoffgruppe der Biguanide und vermindert durch Hemmung der Gluconeogenese in der Leber den Blutglucosespiegel. Neben dem Antidiabetischen Effekt zeigt sich ebenfalls ein positiver Einfluss auf das kardiovaskuläre System sowie auf die Blutfettwerte (freie Fettsäuren, Triglyceride, LDL, HDL).^(36, 37)

Sulfonylharnstoffe und Glinide senken den Glucosespiegel durch Förderung der Insulinsekretion aus pankreatischen Beta-Zellen. Wirkstoffe beider Substanzklassen binden an unterschiedlichen Stellen an den membranständigen K_{ATP} -Kanal, hemmen diesen und führen dadurch zu einer Depolarisation der Zellmembran mit konsekutivem Ca^{2+} -Einstrom und darauffolgender Insulinsekretion.^(38, 39) Sulonylharnstoffe stellen eine alternative bei Kontraindikation für Metformin dar.⁽³⁶⁾

Acarbose und Miglitol sind natürlichen Oligosacchariden strukturell sehr ähnlich,

weisen jedoch eine höhere Affinität zu α -Glucosidase, einem im Dünndarm befindlichen Enzym zur Spaltung von Mehrfachzuckern in Einfachzucker, auf. Als **α -Glucosidase-Hemmer** vermindern bzw. hemmen sie dadurch die Glucoseaufnahme im Dünndarm und können somit postprandialen Hyperglykämien vorbeugen.⁽⁴⁰⁾ Unverdaute Kohlenhydrate gelangen folglich in weiter distal gelegene Abschnitte des Dünndarms und stimulieren direkt die Ausschüttung von GLP-1. Durch den verminderten Blutglucosespiegel, der durch α -Glucosidase-Hemmer verursacht wird, kommt es jedoch zu keiner Insulinsekretion.⁽³⁶⁾

Thiazolidindione oder **Glitazone** wirken als PPAR γ -Agonisten (Peroxisomproliferator-aktivierte-Rezeptoren vom Typ γ) an hauptsächlich im Zellkern von Adipozyten befindlichen Rezeptoren. PPAR γ ist der Hauptregulator der Entwicklung und Funktion von Fettgewebe. Der Agonismus führt zu einer Verbesserung der Speichertätigkeit von Adipozyten und verringert somit das Vorkommen erhöhter Blutfettwerte und folglich die periphere Insulinresistenz.⁽⁴¹⁾

SGLT-2-Inhibitoren sind eine neue Gruppe Antidiabetika. Sie senken den Blutglucosespiegel durch Blockierung des Natrium/Glucose-Cotransporters (SGLT, sodium/glucose-cotransporter) 2, der Glucose aus dem proximalen Tubuli der Niere rückresorbiert. Folge der Inhibition ist eine Vermehrte Ausscheidung von Glucose mit dem Harn.⁽⁴²⁾ Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff Empagliflozin dieser Gruppe bei Typ 2 Diabetikern mit hohem kardiovaskulären Risiko die Hospitalisierung durch Herzversagen und von kardiovaskulären Todesfällen signifikant senken konnte.⁽⁴³⁾

Insulin kommt bei Patienten mit Typ 2-Diabetes zum Einsatz, wenn die Anwendung von nicht-Insulin Präparaten nicht ausreichend ist oder die Verabreichung von Insulin aufgrund einer symptomatischen Hyperglykämie notwendig wird.⁽⁴⁴⁾

Es muss subcutan verabreicht werden, da bei einer oralen Applikation die Insulinwirkung pharmakokinetisch nicht möglich wäre. Der First-Pass-Effekt spielt dabei unter anderem eine Rolle.⁽⁴⁵⁾

1.2.2.2 Inkretin-basierende Therapien

GLP-1-Rezeptor-Agonisten stellen eine neuere Therapieform von Diabetes mellitus Typ 2 dar. Substanzen wie Exenatide, Liraglutide, Lixisenatid, Albiglutid und Dulaglutid können subkutan verabreicht werden und wirken durch Bindung am GLP-1-Rezeptor. Sie lösen so an der pankreatischen Betazelle eine intrinsische Signalkaskade aus, die zu einer glucoseabhängigen Insulinfreisetzung führt.

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass GLP-1-Rezeptor-Agonisten zu einer effizienten Kontrolle des Blutzuckerspiegels, zu Gewichtsreduktion sowie zu Verringerung des Blutdrucks beitragen können.⁽⁴⁶⁾ Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Liraglutide zu einer Senkung der Mortalitätsrate führt.⁽⁴⁷⁾

Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) -Inhibitoren wie Sitagliptin, Saxagliptin, Alogliptin, Vildagliptin oder Linagliptin sind ebenfalls eine neue Möglichkeit der Therapie von Diabetes Typ 2. Sie werden auch als Gliptine bezeichnet und senken den Blutzuckerspiegel durch Verlängerung der Halbwertszeit von GLP-1(7-36)NH₂ und GIP durch Hemmung der Enzymaktivität von DPP-4. Neben dem Abbau von Inkretinen wird auch vermutet, dass DPP-4 weitere wichtige Funktionen im Metabolismus ausübt.⁽⁴⁸⁾ In verschiedenen experimentellen Untersuchungen konnte auf den günstigen Effekt von Inkretin-basierenden Therapien im Bezug auf Komplikationen durch Diabetes mellitus Typ 2 hingewiesen werden.⁽¹¹⁾

1.2.2.3 Therapieschema von Diabetes Mellitus

Die American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) und das American College of Endocrinology (ACE) veröffentlichten 2017 ein aktuelles und umfassendes Therapieschema des Diabetes Mellitus Typ 2. Abb.3 veranschaulicht die therapeutische Vorgehensweise abhängig von HbA_{1c}-Wert,

Symptomatik und entsprechendem Therapieerfolg bereits verwendet Antidiabetika. Vorgehend stellt die Lebensstilmodifikation mit Gewichtsreduktion zu jedem Zeitpunkt der Krankheit einen wichtigen therapeutischen Faktor dar.⁽⁴⁹⁾

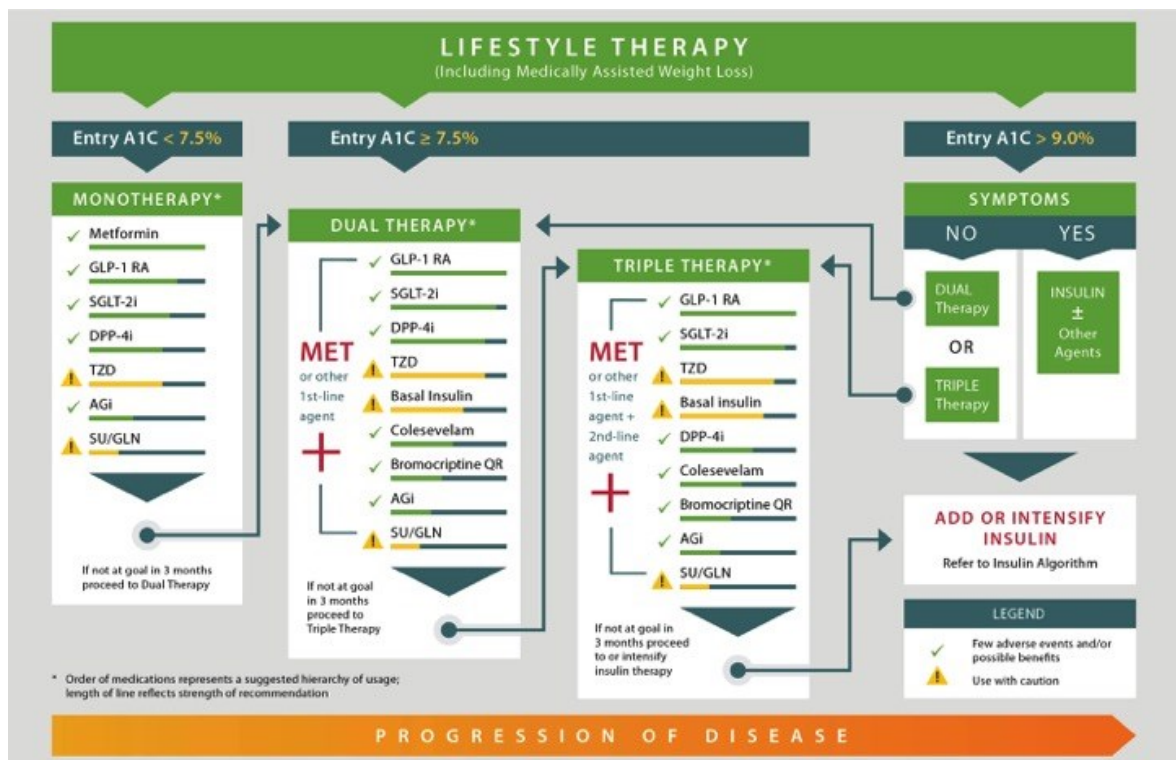


Abbildung 3 Therapieschema des Diabetes Mellitus Typ 2

2 Das Myokard, Inkretine und die Inotropie

2.1 Physiologische Grundlagen der Herzmuskelkontraktion

Die adäquate Herzaktion ist von einer koordinierten elektrischen Reizleitung durch das Myokard abhängig. Das sogenannte Erregungsbildungs- und -leitungssystem besteht aus spezialisierten Herzmuskelfasern, die elektrische Impulse an das Arbeitsmyokard weiterleiten und so zur Kontraktion des Herzens führen. Die elektrische Aktivität im Herzen wird sequenziell in speziellen Herzmuskelzellen im rechten Atrium, dem Sinusknoten, generiert und über das Reizleitungssystem (AV-Knoten, His-Bündel, Tawara-Schenkel, Purkinje-Fasern) zum Ventrikel weitergeleitet.

Ziel der daraus resultierenden Herzmuskelkontraktion ist die Aufrechterhaltung des Blutkreislaufes.⁽⁵⁰⁾

2.1.1 Das Aktionspotential

Durch die ungleiche Verteilung elektrisch geladener Ionen entlang der Zellmembran entsteht ein elektrochemischer Gradient. Die elektrische Aktivität im Herzen kommt durch Aktivierung von Ionenkanälen und damit verbundenen Ionenströmen von Kationen zustande.⁽⁵¹⁾

In den Herzmuskelzellen des Sinusknoten sind im Sarcolemma spezielle Ionenkanäle (HCN-Kanäle, hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated) exprimiert. Über diese Kanäle kommt es durch den langsamen Einstrom von Na^+ - und K^+ -Ionen in die Zelle zu einer Änderung des elektrischen Potentials über der Membran.⁽⁵²⁾

Wird ein bestimmtes Schwellenpotential erreicht, öffnen sich auch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle was einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und die Depolarisation der Zelle zu Folge hat. Das nun positive Membranpotential führt zu einer Aktivierung von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen, die für einen Ausstrom

von K^+ -Ionen aus der Zelle sorgen, bis das Membranpotential wieder in den negativen Spannungsbereich repolarisiert ist.

Die Zellen des Sinusknoten besitzen eine Schrittmacherfunktion da sie kein Ruhepotential besitzen. Unmittelbar nach der Repolarisation kommt es durch Ionenströme über HCN-Kanäle zu einer Wiederholung des Aktionspotentials.

Die Na^+/K^+ -ATPase ist ein Antiporter, der Natrium aus der Zelle und Kalium wieder zurück in die Zelle befördert. Der NCX (Natrium-Calcium-Exchanger) befördert Calcium wieder aus der Zelle heraus.⁽⁵³⁾

Der entstandene elektrische Impuls führt über das Reizleitungssystem im gesamten Herzen zu einer koordinierten Depolarisation von Kardiomyozyten, die über gap-junctions miteinander verbunden sind.⁽⁵⁴⁾

Anders als im Sinusknoten werden Kardiomyozyten im Arbeitsmyokard initial durch die Aktivierung von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen, mit konsekutiven Einstrom von Na^+ -Ionen in die Zelle, depolarisiert. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle werden dadurch geöffnet und Ca^{2+} -Ionen gelangen in die Herzmuskelzelle um für die Kontraktion zu Verfügung zu stehen.

2.1.2 Die elektromechanische Koppelung

Die Verbindung zwischen der Depolarisation von Muskelzellen und der mechanischen Kontraktion derselben wird als elektromechanische Koppelung bezeichnet. Calcium dient dabei als zentraler Vermittler dieses Prozesses. In Myozyten dient das Sarcoplasmatische Retikulum (SR) als Calciumspeicher. Durch das Aktionspotential strömen Ca^{2+} -Ionen vom Extrazellulärraum in das Zellinnere und akkumulieren in der sogenannten „junctionalen Zone“ zwischen Sarkolemma und SR.

Ansteigende zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen führen zur Öffnung von Ryanodin-Rezeptoren (RyR) die sich in der Membran des SR befinden und bewirkt dadurch eine starke Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels im Zytosol („calciuminduzierte Calciumfreisetzung“). Dieser Mechanismus wird durch Ca^{2+} -Calmodulin (CaCaM),

das hemmend auf den RyR wirkt, limitiert. CaCaM aktiviert jedoch auch Calmodulinkinase II (CaMKII), die wiederum die Leitfähigkeit von RyR für darauffolgende Aktionspotentiale erhöht. Dieser Mechanismus spielt vor allem bei erhöhten Kontraktionsfrequenzen eine wichtige regulative Rolle in Myozyten.⁽⁵³⁾

Auch Proteinkinase A (PKA), das durch β -adrenerge Stimulation aktiviert wird, führt durch Phosphorylierung des RyR zu einer Erhöhung seiner Calciumfreisetzung.⁽⁵⁵⁾ Das im Zytosol angereicherte Calcium steht nun für die Kontraktion der Kardiomyozyte zur Verfügung.

Die Myofibrillen Aktin und Myosin bilden eine kontraktile Einheit. Aktin wird im Ruhezustand von Proteinkomplexen (Troponine) umhüllt. Troponin C verdeckt die Bindungsstelle von Myosin an Aktin. Unter der Anwesenheit von Calcium wird diese Bindungsstelle freigegeben und Myosin kann an Aktin binden. Unter Verbrauch von ATP ändert Myosin anschließend seine Konformation und die beiden Myofibrillen werden zueinander verschoben, was eine Verkürzung der kontraktile Einheit und die Kontraktion der gesamten Zelle nach sich zieht.⁽⁵⁶⁾

Um die Relaxation der Herzmuskelzelle einzuleiten, muss Ca^{2+} von Troponin wieder dissoziieren und daher vom Zytosol wieder entfernt werden. Dies geschieht durch Rückführung von Calcium zurück in das Sarkoplasmatische Retikulum mittels SERCA (sarko/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase), durch Austausch mit Na^+ -Ionen aus dem Extrazellulärraum durch NCX, durch sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase sowie durch mitochondrialem Ca^{2+} -Uniport.⁽⁵⁵⁾

2.1.3 Der Frank-Starling-Mechanismus

Um den Anforderungen einer optimalen Auswurfleistung für den Organismus gerecht zu werden, verfügen kardiale Myozyten über einen molekularen Mechanismus, der die Kontraktionskraft an gegebene Verhältnisse anpassen kann. Durch den sogenannten Frank-Starling-Mechanismus kommt es in Herzmuskelzellen, aufgrund des direkten Zusammenhangs zwischen der Länge von Myofilamenten und deren Ca^{2+} -Sensitivität, zu einer der erhöhten Vordehnung entsprechend stärkeren Kontraktion. Sequeira et al., 2017 konnten zeigen, dass

das Protein Titin ein wichtiger Vermittler einer vermehrten Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Troponin C darstellt.⁽⁵⁷⁾

2.1.4 Der Energiestoffwechsel von Kardiomyozyten

Die Zellen des Herzens sind auf eine ununterbrochene Energiebereitstellung angewiesen. Daher sind Kardiomyozyten im Stande alle Arten von energiereichen Substraten (Lipide, Kohlenhydrate, Aminosäuren und Ketonkörper) zur Produktion von ATP zu verwerten und besitzen von allen Zelltypen des menschlichen Körpers die höchste Anzahl an Mitochondrien. Unter normalen Bedingungen stellen freie Fettsäuren und Pyruvat die hauptsächliche Energiequelle dar.⁽⁵⁸⁾

AMPK (Adenosine-monophosphate activated Protein Kinase) spielt eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel von Kardiomyozyten indem es unter anderem den Stoffwechsel von freien Fettsäuren reguliert. Außerdem fördert AMPK die Aufnahme von Glucose in die Herzmuskelzelle über GLUT (GLUT1 und GLUT4) und aktiviert die Glykolyse.⁽⁵⁹⁾

In menschlichen Herzmuskelzellen ist neben dem insulinabhängigen GLUT-4 und dem insulinunabhängigen GLUT1 auch SGLT-1 exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass Insulin in-vitro positiv-inotrop auf das humane atriale Myokard wirkt und, dass dieser Effekt nur teilweise substratabhängig (glucoseabhängig) ist und über GLUT4 und SGLT-1 vermittelt wird.⁽⁶⁰⁾

2.2 Wirkungen von Inkretinen auf das Myokard

Neben den pankreatischen Betazellen wird der GLP-1 Rezeptor auch unter anderem von Herzmuskelzellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Aktivierung dieses GLP-1-Rezeptors zu einem positiv inotropen Effekt im humanen atrialen Myokard kommt.⁽⁶¹⁾

Durch den GLP-1-Rezeptor wird Adenylatzyklase aktiviert, was die Konversion von ATP zu cAMP katalysiert. Der steigende intrazelluläre cAMP-Spiegel wiederum aktiviert unter anderem PKA und cAMP-activated guanine nucleotide

exchange factor (Epac). Diese beiden second messenger führen nun über verschiedene Wege zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und zu einer verbesserten elektromechanischen Koppelung was zu einer Steigerung der Kontraktionskraft der kardialen Myozyten beiträgt. PKA erhöht einerseits die Konduktivität von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, was zu einem vermehrten Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum und folglich auch zu einer calciuminduzierten Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den Ryanodin-Rezeptor führt. Andererseits erhöht es gemeinsam mit Epac die Ca^{2+} -Sensitivität von Myofilamenten. Epac aktiviert zusätzlich auch über Calmodulinkinase II (CaMKII) den Ryanodin-Rezeptor direkt.⁽⁶²⁾

Neben dem positiv inotropen Effekt, wurde im Mausmodell gezeigt, dass in atrialen Kardiomyozyten der durch die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors steigende intrazelluläre cAMP-Spiegel zu einer vermehrten Translokation von Epac2 und einer Steigerung der Sekretion von atrialem natriuretischen Peptid (ANP) führt.⁽⁶³⁾

ANP spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des arteriellen Blutdruckes. Sein hypotensiver Effekt entsteht einerseits durch die Inhibierung des sympathischen- und renin-angiotensin-aldosteron (RAA) Systems und andererseits durch die erhöhte renale Natriurese, Vasodilatation sowie gesteigerte vaskuläre Permeabilität.⁽⁶⁴⁾

Tingcun Zhao et al., 2006 haben ebenfalls gezeigt, dass GLP-1 im Myokard von Mäusen die Aufnahme von Glucose fördert und dies mit einer vermehrten Translokation des Glucosetransporters-1 (GLUT1) assoziiert ist.⁽⁶⁵⁾

Dieser Effekt der vermehrten GLUT1-Translokation konnte von Wallner et al., 2015 außerdem in menschlichen Kardiomyozyten durch die Applikation von Exenatide nachgewiesen werden.⁽⁶¹⁾

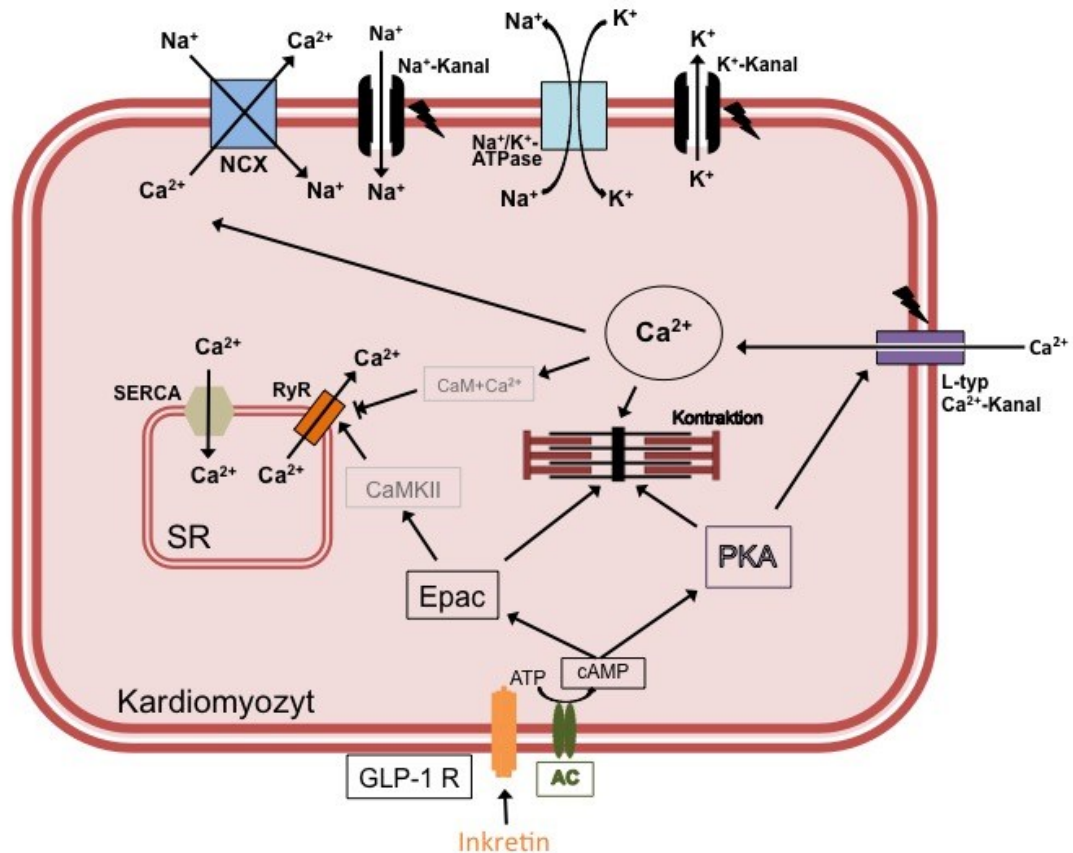


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Wirkung von Inkretinen an der Herzmuskelzelle und Kanäle des Aktionspotentials. Nach Aktivierung des GLP-1-Rezeptors kommt es über Adenylatzyklase zu einer vermehrten Umwandlung von ATP zu cAMP. Das intrazellulär steigende cAMP aktiviert PKA und Epac. PKA erhöht einerseits die Konduktivität von spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanälen und erhöht somit den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und andererseits gemeinsam mit Epac die Calciumsensitivität der Myofibrillen. Epac aktiviert über die Calmodulinkinase II auch den Ryanodin-Rezeptor (RyR) und fördert so den Ca^{2+} -Ausstrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). SERCA transportiert Ca^{2+} -Ionen vom Zytosol ins SR. Ca^{2+} -Calmodulin ($\text{CaM}+\text{Ca}^{2+}$) wirkt hemmend auf den RyR. Der NCX befördert Ca^{2+} -Ionen im Austausch mit Na^{+} -Ionen in den Extrazellulärraum. Spannungsabhängige Na^{+} -, K^{+} - und Ca^{2+} -Kanäle werden im Rahmen des Aktionspotentials geöffnet und führen zu Ionen-Ein- bzw. Ausstrom. $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase führt durch den Austausch von intrazellulären Na^{+} -Ionen mit extrazellulären K^{+} -Ionen die ursprünglichen Ionenverhältnisse wieder herbei.

2.3 Fragestellung und Ziele

- 1.) Ist der positiv inotrope Effekt von Exenatide Substrat-spezifisch?
- 2.) Ist der positiv inotrope Effekt von GLP-1(7-36)NH₂ Substrat-spezifisch?
- 3.) Ist der positiv inotrope Effekt von GLP-1(9-36)NH₂ Substrat-spezifisch?
- 4.) Liegen quantitative Unterschiede in der GLP-1-Rezeptor vermittelten Inotropie in Abhängigkeit des verwendeten Energiesubstrates vor?

3 Material und Methoden

3.1 Einverständniserklärung

Sämtliche Gewebeproben wurden von PatientInnen gewonnen, die diesbezüglich zuvor eine Einwilligung unterzeichneten. Die Studie wurde von der Ethikkommission bewilligt.

3.2 Vorhofgewebe

In dieser Arbeit wurde für die funktionellen Messungen ausschließlich rechtsatriales Gewebe eingesetzt, welches von insgesamt 20 Patienten und 6 Patientinnen gewonnen wurde. Im Rahmen von Bypass- (coronary-artery-bypass-graft; CABG) und/oder Aortenklappenersatz-Operationen (AKE) wird der rechte Vorhof am Herzohr (auricula atrii) kanüliert. Diese Kanülierung dient dem venösen Anschluss an eine Herz-Lungen-Maschine, die während des operativen Eingriffes eine extrakorporale Zirkulation gewährleistet. Das dabei abgesetzte rechte Herzohr hat eine durchschnittliche Größe von 2x1x1 cm (Länge x Breite x Tiefe).

3.2.1 Puffer- und Nährlösungen

Nach Absetzen des Herzohres und im Laufe des Experimentes wurden Puffer- bzw. Nährlösungen verwendet, um einen raschen Gewebsuntergang zu vermeiden. Um einen kardioplegischen Zustand des Gewebes zu erreichen wurde Tyrode-Lösung (Krebs-Henseleit-Puffer; siehe Tabelle 1) mit BDM (3g/L) versetzt. BDM (2,3 Butanedione-monoxime) ist ein reversibler Myosin ATPase-Inhibitor, der unter anderem durch die Herabsetzung der Ca^{2+} -Sensitivität von Myofilamenten kardioprotektive Eigenschaften besitzt.

Diese Lösung eignete sich für den Transport und Präparation des Herzgewebes. Tabelle 1 zeigt eine genaue Auflistung der Zusammensetzung und Konzentrationen der verwendeten Lösungen.

Krebs-Henseleit-Puffer		BDM-Tyrode-Lösung	
Anionen/ Kationen	Konzentration	Feststoff	Einwaage (1 Liter)
Na⁺	152,0 mmol/L	NaCl	7,422 g
Cl⁻	129,5 mmol/L	2,3-BDM	3,000 g
HCO₃⁻	25,0 mmol/L	NaHCO₃	2,100 g
K⁺	3,6 mmol/L	Glucose	2,018 g
H₂PO₄⁻	1,3 mmol/L	KH₂PO₄	0,177 g
Mg²⁺	0,6 mmol/L	KCl	0,172 g
SO₄²⁻	0,6 mmol/L	MgSO₄·7H₂O	0,148 g
Ca²⁺	0,2 mmol/L	CaCl₂·2H₂O	0,029 g

Tabelle 1: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Puffer (Tyrode-Lösung) und der BDM-Tyrode-Lösung

Während des Experimentes hingegen wurde, um den Vergleich der Substratabhängigkeit der Wirksubstanzen anstellen zu können, Tyrode-Lösung mit 11,2 mM Glucose oder 22,4 mM Pyruvat als Energiesubstrat verwendet. Diese Substratlösungen werden in weiterer Folge als Tyrode-Glucose-Lösung bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung bezeichnet. Ihre genauen Zusammensetzungen werden in Tabelle 2 aufgelistet.

Tyrode-Glucose-Lösung		Tyrode-Pyruvat-Lösung	
<i>Feststoff</i>	Einwaage (1 Liter)	<i>Feststoff</i>	Einwaage (1 Liter)
<i>NaCl</i>	7,422 g	<i>NaCl</i>	7,422 g
<i>NaHCO₃</i>	2,100 g	<i>NaHCO₃</i>	2,100 g
<i>Glucose</i>	2,018 g	<i>Pyruvat</i>	2,48 g
<i>KH₂PO₄</i>	0,177 g	<i>KH₂PO₄</i>	0,177 g
<i>KCl</i>	0,172 g	<i>KCl</i>	0,172 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0,148 g	<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0,148 g
<i>CaCl₂·2H₂O</i>	0,029 g	<i>CaCl₂·2H₂O</i>	0,029 g
<i>Altinsulin</i>	5 I.E.	<i>Altinsulin</i>	5 I.E.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Tyrode-Glucose-Lösung und der Tyrode-Pyruvat-Lösung

3.3 Erhalt und Transport von Vorhofgewebe

Das im Operationssaal abgesetzte Herzohr wurde direkt vom Operateur mittels Pinzette in einen vorbereiteten Kunststoffbehälter mit circa 100mL BDM-Tyrode-Lösung (NaCl 7,422 g/l, NaHCO₃ 2,1 g/l, Glucose 2,018 g/l, KH₂PO₄ 0,177 g/l, KCl 0,172 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,148 g/l, CaCl₂·2H₂O 0,029 g/l, BDM 3g/l) eingebracht. Die BDM-Tyrode-Lösung wurde zuvor ausreichend mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast, um einen stabilen pH-Wert von 7,4 sicherzustellen. Unmittelbar nach Erhalt des Gewebes wurde es in das Labor transportiert und die Präparation der Muskelstreifen begonnen. Ab Erhalt des Herzohres bis zum Beginn der Präparation vergingen maximal 10 Minuten.

3.4 Präparation von Vorhoftrabekel

Vor der Präparation wurde das Herzohr in eine mit gekühlter und mit Carbogen begaster BDM-Tyrode-Lösung befüllten Präparierschale überführt. Unter Verwendung einer Kunststoffpipette wurden zunächst vorsichtig grobe Verunreinigungen (Blut) ausgewaschen. Mittels Stereomikroskop und mikrochirurgischen Instrumenten (Pinzette, Mikroschere) wurden danach Muskelstreifen (Trabeculae carni) aus dem Herzohr herauspräpariert, wobei auf eine atraumatische Vorgehensweise geachtet wurde, um irreversible Gewebsdefekte an den Muskelstreifen zu vermeiden. Vorzugsweise wurden Trabekel verwendet, die unverzweigt und eine kleinere Querschnittsfläche als $0,6 \text{ cm}^2$ aufwiesen. Bei einem größeren Querschnitt bestünde die Gefahr einer Hypoxie zentraler Anteile des Muskelstreifens. Anschließend wurden die präparierten Muskelstreifen in einem Kunststoffbehälter mit carbogen-gesättigter BDM-Tyrode-Lösung gesammelt um in weiterer Folge für das Experiment in die Streifenanlage eingehängt werden zu können.

3.5 Streifenanlage und Experimentvorbereitungen

Abb. 5 bis 8 zeigen die Messanlage, mit welcher sämtliche Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestehend aus folgenden Anteilen:

- Messeinheit (Abb. 5) mit Force Transducer (Scientific Instruments, Deutschland)
- Stimulator STM1 (Scientific Instruments, Deutschland)
- Rollpumpe MC MS (Ismatec, Schweiz)
- Stereomikroskop VMT (Olympus, Japan)
- 4-Kanal-Thermoschreiber Graphtec Linearcorder WR 3320 (Graphtec, Japan)
- Computer mit Softwareprogramm Labview

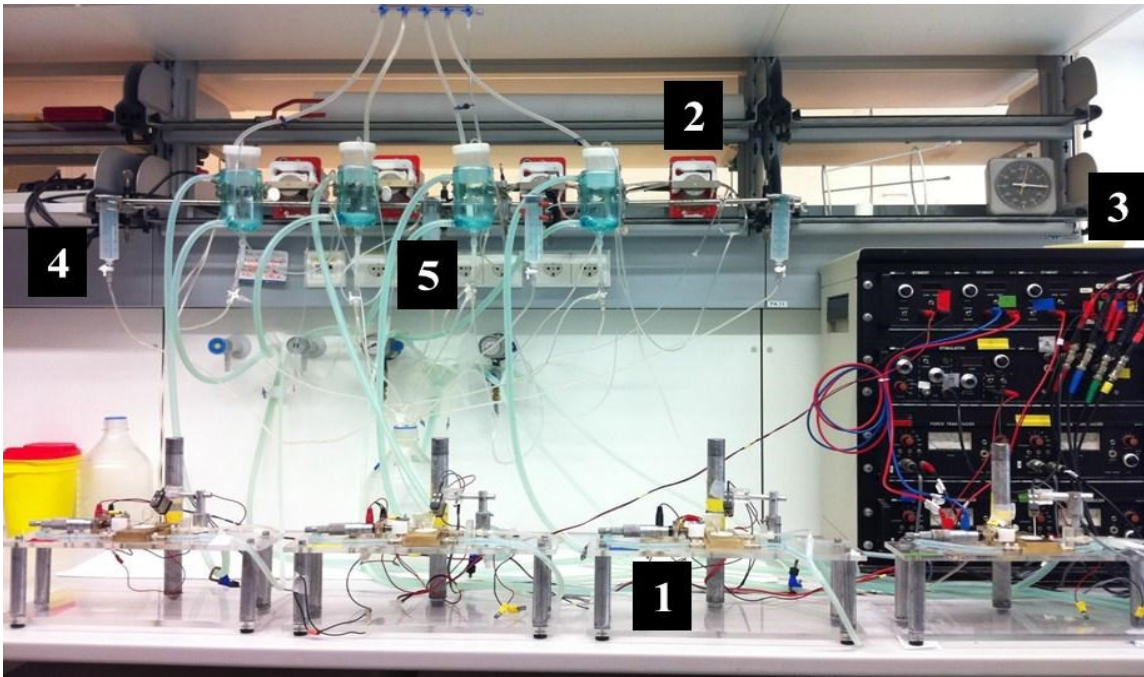


Abbildung 5 Messanlage. 1: Messeinheit mit Organbad und Force Transducer, 2: Rollpumpe, 3: Stimulator, 4: Perfusorspritze (50 ml) zum Ablassen von Flüssigkeiten, 5: Nährlösungs-Becken mit Schlauchsystem.

Abbildung 6 (unten links): Force Transducer mit Nadel für Kraftübertragung, Organbad in Thermoblock eingefasst, Stellschraube links

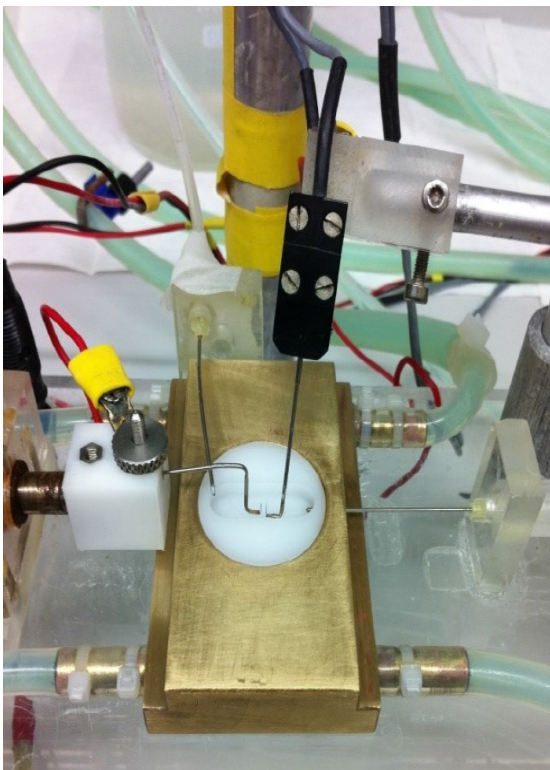


Abbildung 5 (oben): Blick durch Mikroskop Herzmuskelstreifen (aus Herzohr isoliert) und auf Minuriennadel fixiert



Abbildung 6 (oben): Blick durch Mikroskop; Herzohr

Die Anlage besteht aus vier Kanälen, die eine simultane Messung (von bis zu vier Experimenten) ermöglicht. Jeder Kanal verfügt über ein Organbad, welches das zentrale Element der Anlage darstellt. Dieses besteht aus Teflon (21x8x3 mm) und ist in einem Thermoblock eingefasst. Über Nährlösungsreservoirs und mittels Schlauchsysteme bildet jeder Kanal einen eigenen geschlossenen Kreislauf, der durch eine Rollpumpe die Zirkulation der Nährlösung bzw. der Substanzen gewährleisten soll. Nährlösungsreservoir, Organbad und weite Teile des Schlauchsystems werden nach dem Gegenstromprinzip über eine Wärmepumpe auf einer Temperatur von 37°C gehalten. Dabei ist der vom Reservoir zum Organbad führende Schlauch in ein eigenes Schlauchsystem der Wärmepumpe integriert, um vor Eintritt der Nährlösung in das Organbad eine konstante Temperatur zu gewährleisten. Über eine Nadelkanüle wird die Nährlösung vom Organbad in das Reservoir geleitet und so der Kreislauf wieder geschlossen. Um den pH-Wert auf 7,4 konstant zu halten wird die Nährlösung permanent über eine Fritte, die in das Reservoir gehängt wird, mit Carbogen begast. Im Organbad befinden sich zwei gegenüberstehende eigens angefertigte Minutiennadeln auf denen die präparierten Trabekel aufgehängt werden. Diese werden schlaff („slack“) auf die Nadeln aufgesetzt. Die Nadel auf der einen Seite ist über eine Nadelkanüle mit dem Force Transducer verbunden und registriert so die Kontraktionskraft des Trabekels. Die gegenüberliegende Nadel ist mit einer Mikrometerschraube verbunden, was eine spätere optimale Vordehnung des Muskelstreifens ermöglicht. Nach Aufhängen des Trabekels wird die diastolische Spannung genullt („zero adjustment“).

Das Nährstoffreservoir wird mit 90ml Glucose-Tyrode-Lösung (NaCl 7,422 g/l, NaHCO₃ 2,1 g/l, Glucose 2,018 g/l, KH₂PO₄ 0,177 g/l, KCl 0,172 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,148 g/l, CaCl₂·2H₂O 0,029 g/l, Altinsulin 5 I.E.) bzw. mit Pyruvat-Tyrode-Lösung (NaCl 7,422 g/l, NaHCO₃ 2,1 g/l, Pyruvat 2,48 g/l, KH₂PO₄ 0,177 g/l, KCl 0,172 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,148 g/l, CaCl₂·2H₂O 0,029 g/l, Altinsulin 5 I.E.) befüllt und die Rollpumpe solange eingeschaltet, bis sich im Organbad ein ausreichend hoher Nährlösungsspiegel gebildet hat. Anschließend wird die Rollpumpe angehalten und der präparierte Trabekel kann von der BDM-Tyrode-Lösung mittels Pipette in das Organbad überführt werden. Nach vorsichtigem Einhängen der Trabekel auf

die beiden Nadeln werden die darauffolgenden 40ml des Durchflussvolumens der Nährlösung verworfen und anschließend der Kreislauf wieder geschlossen. Dadurch kann erreicht werden, dass BDM-Reste durch das Überführen des Trabekels aus dem System ausgewaschen werden.

Für das eigentliche Experiment wird die Nährlösung auf eine physiologische Ca^{2+} -Konzentration aufgesättigt. Die in der Nährlösung vorhandene Ca^{2+} -Konzentration wird von zunächst 0,2 mmol/L auf 1,2 mmol/L durch Zugabe einer 1 M CaCl_2 -Lösung in das Nährstoffreservoir erhöht und nach Beginn der elektrischen Stimulation mit 1 Hz auf eine Endkonzentration von 2,5 mmol/L gesteigert. Die entwickelte Kraft wird über den Force Transducer einerseits als digitale Daten an einen Computer und andererseits als analoge Daten an einen Thermoschreiber weitergegeben. Mit der Mikrometerschraube kann der Trabekel nun auf seine optimale Länge (L_{max}) gedehnt werden. Durch die Dehnung steigt die isometrische Kontraktion durch den Frank-Starling-Mechanismus an. Es wird dadurch eine steigende Vorlast (preload) simuliert.

Nach Erreichen von L_{max} , kann die Intervention bzw. die Zugabe der gewünschten Substanz beginnen. Die stimulierten Trabekel verlieren mit fortschreitender Versuchsdauer an Kontraktionskraft. Dieser Effekt wird physiologischer Rundown genannt. Anhaltende arrhythmische Aktivitäten bzw. das Vorhandensein eines Eigenrhythmus vor Erreichen von L_{max} , führte zum Ausschluss des jeweiligen Trabekels.

3.6 Substanzen

Die Wirksubstanzen Exenatide, GLP-1(7-36)NH_2 und GLP-1(9-36)NH_2 wurden von TOCRIS (Bristol, Vereinigtes Königreich), Glucose von MERCK (Darmstadt, Deutschland) käuflich erworben. Alle weiters verwendeten Substanzen wurden von SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen, Deutschland) gekauft.

3.7 Patientendaten

Insgesamt konnte Vorhofgewebe von 26 Patienten gewonnen werden. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Demographie.

Alle Patienten, N=26			
Geschlecht [w], N(%)	6 (23)	SR (präoperativ), N(%)	23 (88)
Alter (Jahre)	66,7 ± 11,2	VHFA (+intermitt.), N(%)	3 (11)
BMI	28,8 ± 6,1	Diabetes Mellitus II, N(%)	5 (19)
CABG, N(%)	15 (58)	Art. Hypertonie, N(%)	22 (85)
AKE, N(%)	3 (11)	Diast. Dysfunktion, N(%)	2 (8)
CABG + AKE, N(%)	7 (27)	EF [%] (N)	55,2 ± 11 (25)
Andere OP, N(%)	1 (4)		
Medikation			
Statine (%)	19 (73)	Metformin (%)	2 (8)
Sulfanylharstoffe (%)	1 (4)	DPP-4-Inhibitoren (%)	3 (11)
Insulin (%)	3 (11)	T-ASS (%)	18 (69)
Ca²⁺-Rezeptor Blocker (%)	11 (42)	ACE-Hemmer (%)	17 (65)
ATII-Antagonisten (%)	1 (4)	β-Blocker (%)	15 (58)

Tabelle 3 PatientInnen-demographie; w = weiblich, BMI = Body Mass Index, CABG = coronary artery bypass graft, AKE = Aortenklappenersatz, SR = Sinusrhythmus, VHFA = Vorhofflimmerarrhythmie, EF = ejection fraction, ATII = Angiotensin II, DPP-4 = Dipeptidylpeptidase 4, T-ASS = Acetylsalicylsäure, ACE = Angiotensin converting enzyme

3.8 Versuchsprotokoll

3.8.1 Single dose Inkretinmimetika

In dieser Arbeit wurde die Substratabhängigkeit des positiv inotropen Effektes von Inkretinen bzw. Inkretinanaloga näher charakterisiert. Nach Setzen des zweiten Messpunktes wurden den Nährlösungen mit den jeweiligen Energiesubstraten Einzeldosen der Wirksubstanzen Exenatide (15nM), GLP-1(7-36)NH₂ (180nM) oder GLP-1(9-36)NH₂ (200nM) zugefügt und für weitere 25 Minuten inkubiert. Es konnte nun die Kraftentwicklung der Trabekel über diesen Zeitraum durch den Drucker registriert und aufgezeichnet werden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der dritte und letzte Messpunkt gesetzt und die entwickelte Kraft sowie die diastolische Spannung des Trabekels gemessen. So konnte die Kraftentwicklung der Trabekel durch die einzelnen Wirksubstanzen in den jeweiligen Nährlösungen miteinander verglichen werden.

3.8.2 Transiente positiv inotrope Effekte

Durch die Wirksubstanzen eingetretene transiente Effekte konnten mittels Druckeraufzeichnungen näher charakterisiert werden. Hierbei wurden die Daten der entwickelten Kraft zum Zeitpunkt des zweiten Messpunktes, des maximalen Effektes und des dritten Messpunktes (steady state) mittels manueller Ausmessung von dem Druckerausdruck ermittelt.

3.9 Auswertung

Die an den Messpunkten durch den Computer registrierten kinetischen Daten ergeben sich durch den Mittelwert von fünf unmittelbar aufeinanderfolgenden Kontraktionen. Es wurden die Diastolische Spannung, die Systolische Kraft sowie die Relaxationszeit für die Auswertung ermittelt.

3.10 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden aus den jeweiligen Experimenten Mittelwerte gebildet und zu den entsprechenden Zeitpunkten Mittelwertsvergleiche durchgeführt. In der Annahme, dass die Daten normalverteilt sind wurden hierbei T-Tests eingesetzt. Signifikante Unterschiede wurden bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen. Als Software zu dieser Berechnung wurde Excel (Microsoft Office, Redmont, Vereinigte Staaten von Amerika) eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Inotrope Effekte und Rundown

Die in dieser Arbeit untersuchten Effekte zeigen die Änderung der Kontraktionskraft durch die Aktivierung des GLP-1 Rezeptors am humanen Myokard in Abhängigkeit der verwendeten Energiesubstrate. Eine Erhöhung der Kontraktilität wird als positive Inotropie, die Verringerung als negative Inotropie bezeichnet. In vorangegangenen Arbeiten konnte die positiv inotrope Wirkung der GLP-1-Rezeptor-Aktivierung gezeigt werden.⁽⁶¹⁾

Natürlicherweise nimmt die Kontraktionskraft der stimulierten Muskelstreifen ohne Zugabe einer Wirksubstanz sukzessive ab. Dieser Effekt wird als physiologischer Rundown bezeichnet.

4.2 Inotrope Effekte von Exenatide

Hinsichtlich der inotropen Effekte konnte gezeigt werden, dass es bei elektrisch stimulierten Muskelstreifen (n=20) durch die Zugabe von 15 nM Exenatide, unter Verwendung der Energiesubstrate Glucose (n=9) und Pyruvat (n=11), zu einem transienten positiv inotropen Effekt kommt. Abbildung 9 zeigt die Originalaufzeichnung eines mit Exenatide inkubierten Muskelstreifens. Wenige Minuten nach Applikation von Exenatide kann ein starker Anstieg der Kraftentwicklung des Trabekels gezeigt werden. Gefolgt von einer Abnahme der entwickelten Kraft und deren Stabilisierung nach 25 Minuten (steady state).

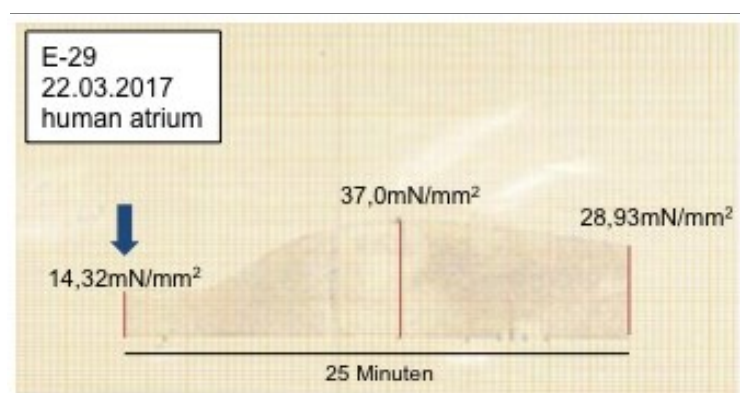


Abbildung 7 Originalaufzeichnung des Experiments E-29 vom 22.03.2017. Humanes Vorhofgewebe, 37 °C, 1Hz. Der positiv inotrope Effekt von Exenatide (15nM) bei in Tyrode-Glucose-Lösung (siehe Tab. 2) inkubierten Muskelstreifen. Linke rote Linie = Kraftamplitude zum Zeitpunkt der Exenatide-Gabe (blauer Pfeil); mittlere rote Linie = Kraftamplitude zum Zeitpunkt des maximalen Effektes; rechte rote Linie: Kraftamplitude im steady state nach 25 Minuten.

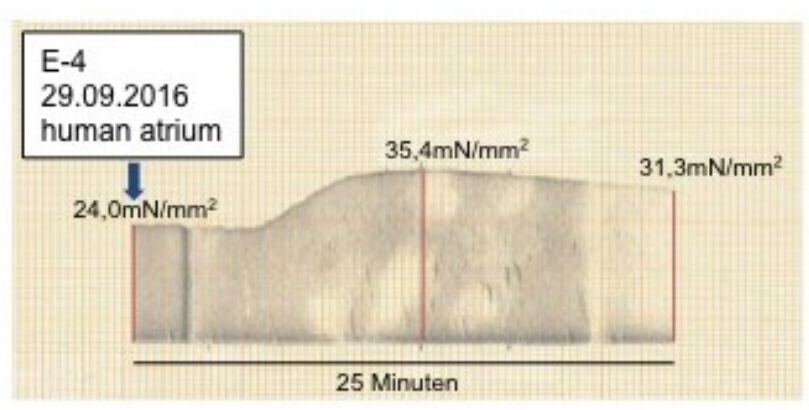


Abbildung 8 Originalaufzeichnung des Experiments E-4 vom 29.09.2016. Humanes Vorhofgewebe, 37 °C, 1Hz. Der positiv inotrope Effekt von Exenatide (15nM) bei in Tyrode-Pyruvat-Lösung (siehe Tab. 2) inkubierten Muskelstreifen. Linke rote Linie = Kraftamplitude zum Zeitpunkt der Exenatide-Gabe (blauer Pfeil); mittlere rote Linie = Kraftamplitude zum Zeitpunkt des maximalen Effektes; rechte rote Linie: Kraftamplitude im steady state nach 25 Minuten.

Abb. 11 und 12 veranschaulichen die relative [%] Kraftentwicklung der Muskelstreifen durch die Wirkung von Exenatide zu den Zeitpunkten Baseline, maximaler Effekt und steady state nach 25 Minuten. Es kann gezeigt werden, dass der transiente positiv inotrope Effekt bei Trabekel, welche Nährlösungen mit Glucose als Energiesubstrat hatten zum Zeitpunkt des maximalen Effektes ($194.1 \% \pm 27.0 \%$ bei Glucose versus $141.2 \% \pm 10.5 \%$ bei Pyruvat (beides gemessen zur Baseline) sowie zum Zeitpunkt des steady state nach 25 Minuten ($156.5 \% \pm 15.7 \%$ bei Glucose versus $116.1 \pm 5.1 \%$ bei Pyruvat; beides gemessen zur Baseline) stärker ausgeprägt war ($p=0,055$).

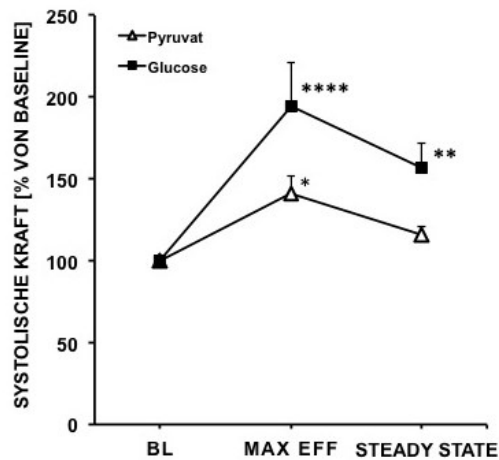


Abbildung 9 : Effekt von Exenatide auf in Tyrode-Glucose-Lösung (schwarze Quadrate) bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung (weiße Dreiecke) (siehe Tab. 2) inkubierten Muskelstreifen, 37 °C, 1Hz. Die Messzeitpunkte Baseline (BL), maximaler Effekt (MAX EFF) und STEADY STATE zeigen in beiden Gruppen einen transienten Kraftanstieg ([%] ± SEM verglichen zur Baseline). Der positiv inotrope Effekt ist bei mit Tyrode-Glucose-Lösung inkubierten Muskelstreifen deutlich stärker ausgeprägt ($p=0,055$ verglichen zu Gruppe mit Tyrode-Pyruvat-Lösung)., $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $****=p<0,0001$ (verglichen zur Baseline)

Der Vergleich der beiden Substratgruppen zum Zeitpunkt des steady state (Abb. 12) zeigt einen signifikant stärkeren relativen [%] Kraftanstieg bei Glucose als bei Pyruvat. Während mit Glucose die Steigerung der Kraft im steady state nach 25 Minuten ($56.5 \% \pm 15.7 \%$ (verglichen zur Baseline) betrug, blieb der entwickelte Kraftanstieg mit Pyruvat bei $16.1 \pm 5.1 \%$ (verglichen zur Baseline) ($p=0,03$).

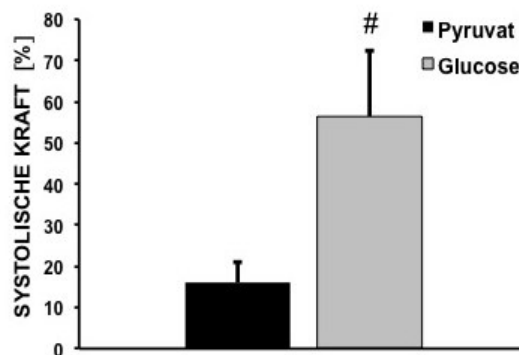


Abbildung 10 Vergleich der Exenatide-Wirkung in Tyrode-Glucose-Lösung (grauer Balken) bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung (schwarzer Balken) (siehe Tab. 2) zum Zeitpunkt STEADY STATE. $\# = p < 0,05$, vergleich beider Gruppen)

In Abbildung 13 A wird die Exenatidewirkung in beiden Substratgruppen in absoluten Werten veranschaulicht. Der Vergleich der Kraftanstiege zeigt keinen signifikanten Unterschied. Wie im Diagramm ersichtlich betragen die Werte der Kraftentwicklung zum Zeitpunkt Baseline durchschnittlich $18,7 \text{ mN/mm}^2 \pm 4 \text{ mN/mm}^2$ bei Trabekel mit Glucose als Energiesubstrat. In der Pyruvatgruppe wurde ein deutlich höherer durchschnittlicher Wert von $29,57 \text{ mN/mm}^2 \pm 4,1 \text{ mN/mm}^2$ Kraftentwicklung zum Zeitpunkt Baseline gemessen. Auch die in Abb. 13 B gezeigten zum Mittelwert standardisierten absoluten Werte der Kraftentwicklung weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Substratgruppen auf.

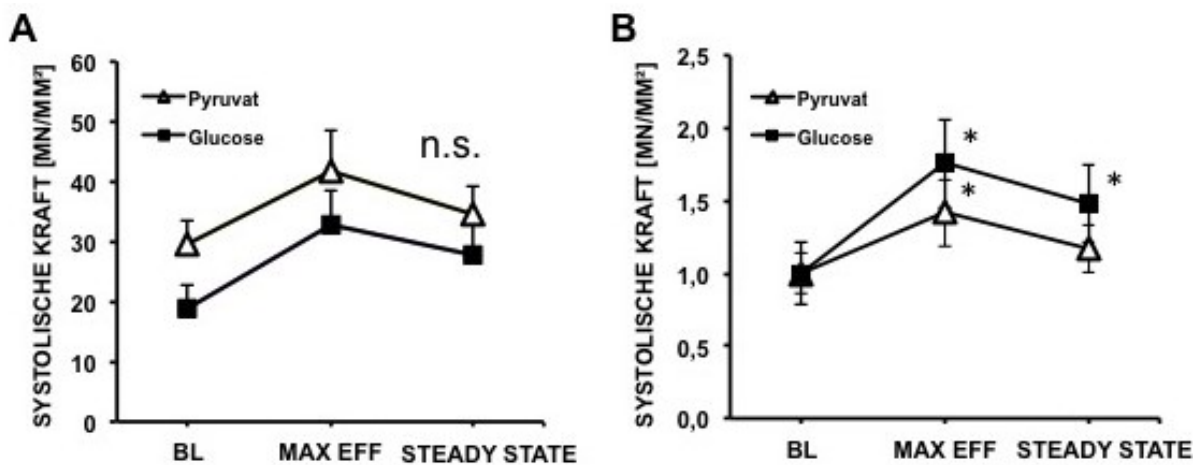


Abbildung 11 A u. B : Effekt von Exenatide auf in Tyrode-Glucose-Lösung (schwarze Quadrate) bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung (schwarze Dreiecke) (siehe Tab. 2) inkubierten Muskelstreifen, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 1Hz. (A): Exenatide-Wirkung in absoluten Werten; Muskelstreifen, die mit Tyrode-Pyruvat-Lösung inkubiert wurden, zeigen eine durchschnittlich höhere systolische Kraft zum Zeitpunkt BASELINE (BL) im Vergleich zur Glucose-Gruppe. n.s.=nicht signifikant (im Vergleich beider Gruppen). (B) Exenatide-Wirkung in zum Mittelwert standardisierten, absoluten Werten. $*=p<0,05$ (verglichen zur Baseline)

Interessanterweise zeigten einige Trabekel keinen Kraftanstieg bzw. keine Änderung der Kraftentwicklung. 33% der Muskelstreifen aus der Glucosegruppe und 18 % aus der Pyruvatgruppe zeigten einen physiologischen Rundown trotz Applikation von Exenatide (non-responder). Im Vergleich der Patientendaten dieser Gruppe non-responder konnten keine patientenspezifischen Charakteristika

aufgezeigt werden. Keine mit Exenatide behandelten Muskelstreifen zeigten eine Änderung der diastolischen Spannung oder Relaxationszeit.

4.3 Inotrope Effekte von $GLP-1(7-36)NH_2$

Auch bei der Applikation von $GLP-1(7-36)NH_2$ konnte ein ähnlicher positiv inotroper Effekt wie bei der Gabe von Exenatide gezeigt werden. Unter Verwendung von sowohl Glucose (n=13) als auch Pyruvat (n=13) als Energiesubstrat zeigten die elektrisch stimulierten Muskelstreifen (n=26) wenige Minuten nach Zugabe von 180 nM $GLP-1(7-36)NH_2$ einen Anstieg der Kraftentwicklung gefolgt von einer Abnahme und Stabilisierung der Kraft nach 25 Minuten im steady state. Abbildung 14 zeigt eine Originalaufzeichnung des durch $GLP-1(7-36)NH_2$ induzierten transienten positiv inotropen Effektes bei einem mit Glucose als Substrat verwendeten Muskelstreifen.

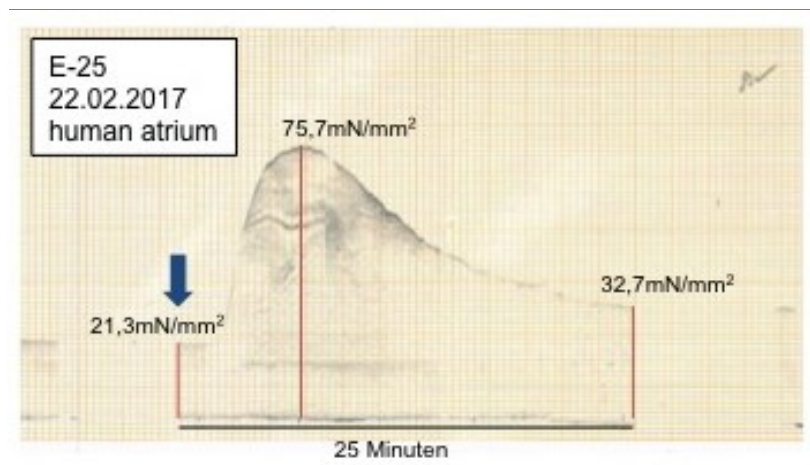


Abbildung 12 Originalaufzeichnung des Experiments E-25 vom 22.02.2017. Humanes Vorhofgewebe, 37 °C, 1Hz. Der positiv inotrope Effekt von $GLP-1(7-36)NH_2$ (180nM) bei in Tyrode-Glucose-Lösung (siehe Tab. 2) inkubierten Muskelstreifen. Linke rote Linie = Kraftamplitude zum Zeitpunkt der $GLP-1(7-36)NH_2$ -Gabe (blauer Pfeil); mittlere rote Linie = Kraftamplitude zum Zeitpunkt des maximalen Effektes; rechte rote Linie: Kraftamplitude im steady state nach 25 Minuten.

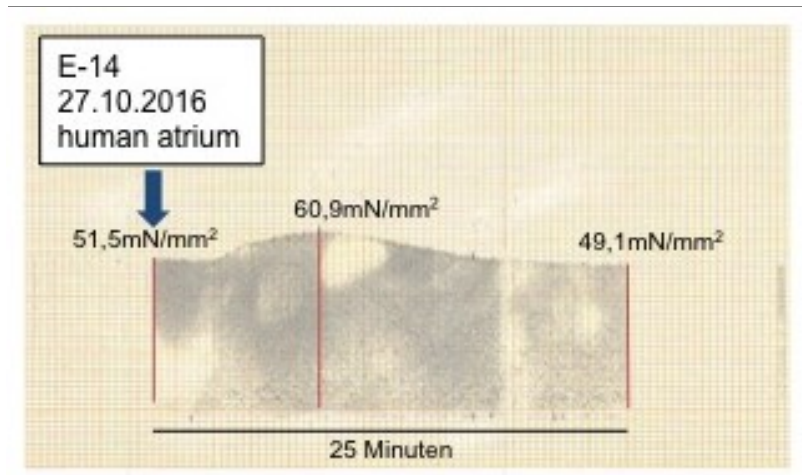


Abbildung 13 Originalaufzeichnung des Experiments E-14 vom 27.10.2016. Humanes Vorhofgewebe, 37 °C, 1Hz. Der positiv inotrope Effekt von GLP-1(7-36)NH₂ (180nM) bei in Tyrode-Pyruvat-Lösung (siehe Tab.2) inkubierten Muskelstreifen. Linke rote Linie = Kraftamplitude zum Zeitpunkt der GLP-1(7-36)NH₂-Gabe (blauer Pfeil); mittlere rote Linie = Kraftamplitude zum Zeitpunkt des maximalen Effektes; rechte rote Linie: Kraftamplitude im steady state nach 25 Minuten

Abb. 16 zeigt die Kraftentwicklung der Muskelstreifen zum Zeitpunkt Baseline, zum Zeitpunkt des maximalen Effektes und im steady state nach 25 Minuten in der jeweiligen Substratgruppe in relativen Werten [%]. In der Glucosegruppe wie auch in der Pyruvatgruppe zeigte sich ein transienter Anstieg der Kraftentwicklung. Muskelstreifen, bei denen Glucose als Energiesubstrat verwendet wurde, konnte zum Zeitpunkt des maximalen Effektes (198.6 % ± 34.6 % in Glucose versus 110.0 % ± 4.4 % in Pyruvat; p = 0.0007) sowie im steady state nach 25 Minuten (138.7 % ± 18.8 % in Glucose versus 99.9 % ± 3.3 % in Pyruvat; p = 0.25) zeigten einen stärkeren Kraftanstieg.

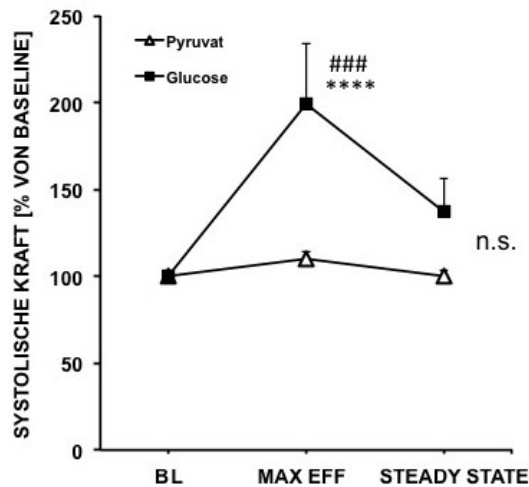


Abbildung 14 Effekt von GLP-1(7-36)NH₂ auf in Tyrode-Glucose-Lösung (schwarze Quadrate) bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung (weiße Dreiecke) (siehe Tab. 2) inkubierten Muskelstreifen, 37 °C, 1Hz. Die Messzeitpunkte Baseline (BL), maximaler Effekt (MAX EFF) und STEADY STATE zeigen in beiden Gruppen einen transienten Kraftanstieg ([%] ± SEM verglichen zur Baseline). Der positiv inotrope Effekt ist bei mit Tyrode-Glucose-Lösung inkubierten Muskelstreifen deutlich stärker. n.s.= nicht signifikant (Vergleich beider Gruppen), ###= p<0,001 (Vergleich beider Gruppen), ****=p<0,0001 (verglichen zur Baseline).

Abb. 17 veranschaulicht den relativen [%] Kraftanstieg in beiden Substratgruppen zum Zeitpunkt des steady state nach 25 Minuten verglichen zur Baseline. Obwohl in der Glucosegruppe eine Kraftentwicklung von 38.7 % ± 18.8 % und in der Pyruvatgruppe ein Kraftverlust von -0.1 % ± 3.3 % zu beobachten war, konnte im Vergleich der beiden Gruppen aufgrund der hohen Streuung der Ergebnisse, nur annähernd eine statistische Signifikanz aufgezeigt werden. (p=0,052).

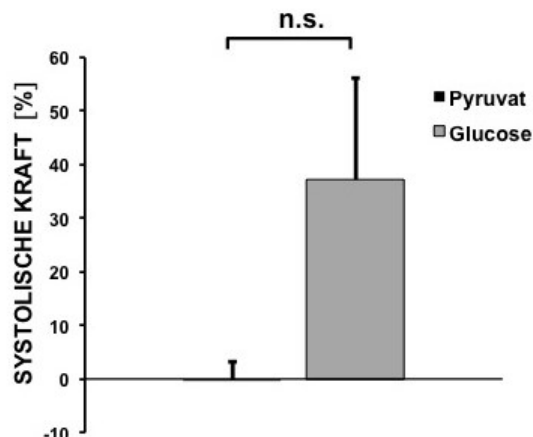


Abbildung 15 Vergleich der GLP-1(7-36)NH₂-Wirkung in Tyrode-Glucose-Lösung (grauer Balken) bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung (schwarzer Balken) (siehe Tab. 2) zum Zeitpunkt STEADY STATE. n.s.=nicht signifikant (Vergleich beider Gruppen).

Die absoluten Werte der Kraftentwicklung durch GLP-1(7-36)NH₂ in beiden Substratgruppen werden in Abb. 18 A dargestellt. Auch hier zeigte sich im Vergleich der beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Kraftentwicklung. Wie bei Exenatide unterschieden sich die absoluten Kraftwerte zum Zeitpunkt der Baseline erheblich voneinander. Während in der Glucosegruppe im Durchschnitt eine Kraft von 22,0 mN/mm² ± 4,2 mN/mm² gemessen wurde beliefen sich die absoluten Werte der in der Pyruvatgruppe auf 52,4 mN/mm² ± 6,8 mN/mm². Ein signifikanter Unterschied bei den zum Mittelwert standardisierten absoluten Werten konnte auch hier nicht angezeigt werden. (Abb. 18 B)

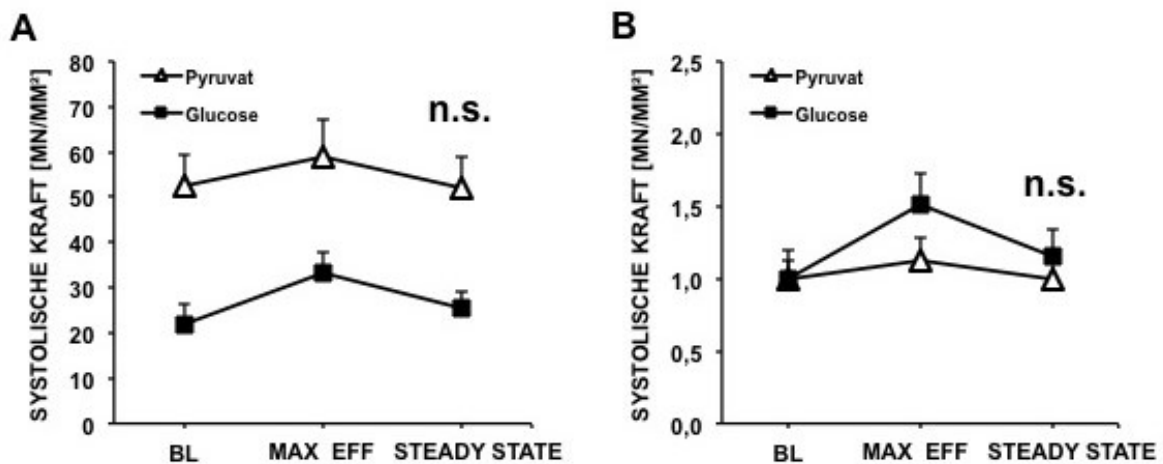


Abbildung 16 A u. B: Effekt von GLP-1(7-36)NH₂ auf in Tyrode-Glucose-Lösung (schwarze Quadrate) bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung (weiße Dreiecke) (siehe Tab. 2) inkubierten Muskelstreifen, 37 °C, 1Hz. (A): GLP-1(7-36)NH₂-Wirkung in absoluten Werten; Muskelstreifen, die mit Tyrode-Pyruvat-Lösung inkubiert wurden, zeigen eine durchschnittlich höhere systolische Kraft zum Zeitpunkt BASELINE (BL) im Vergleich zur Glucose-Gruppe. n.s.=nicht signifikant (im Vergleich beider Gruppen). (B) GLP-1(7-36)NH₂-Wirkung in zum Mittelwert standardisierten, absoluten Werten. n.s.=nicht signifikant (Vergleich beider Gruppen).

Wie auch bei Exenatide, konnte bei Muskelstreifen, bei denen GLP-1(7-36)NH₂ als Wirksubstanz appliziert wurde, ein Ausbleiben des positiv inotropen Effektes beobachtet werden. In der Glucosegruppe belief sich der Anteil an non-responer auf 31%, während in der Pyruvatgruppe sogar 54% der Muskelstreifen nur einen physiologischen Rundown zeigten. Es konnten keine Effekte auf die diastolische Spannung oder Relaxationszeit der Muskelstreifen beobachtet werden (Daten nicht angezeigt). Insgesamt zeigten Exenatide und GLP-1(7-36)NH₂ sehr ähnliche funktionale Effekte auf das in dieser Arbeit verwendete Vorhofgewebe.

4.4 Einfluss von GLP-1(9-36)NH₂ auf atriales Gewebe

In dieser Arbeit wurde auch auf den Einfluss von GLP-1(9-36)NH₂ in Hinblick auf die Substratabhängigkeit näher betrachtet. Anders als Exenatide oder GLP-1(7-36)NH₂ stellt GLP-1(9-36)NH₂ einen kompetitiven Hemmer des GLP-1-Rezeptors dar. Muskelstreifen, bei denen Glucose (n=6) oder Pyruvat (n=6) als Energiesubstrat verwendet wurde, zeigten nach der Applikation von 200nM GLP-1(9-36)NH₂ eine konstante Reduktion der Kraftentwicklung (Abb. 19).

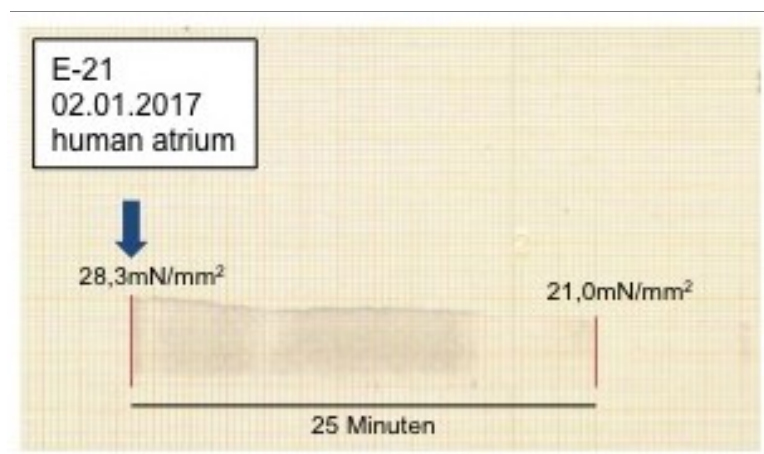


Abbildung 17 Originalaufzeichnung des Experiments E-21 vom 02.01.2017. Humanes Vorhofgewebe, 37 °C, 1Hz. Die Kraftabnahme nach Gabe von GLP-1(9-36)NH₂ (200nM) bei in Tyrode-Glucose-Lösung (siehe Tab. 2) inkubierten Muskelstreifen. Linke rote Linie = Kraftamplitude zum Zeitpunkt der GLP-1(9-36)NH₂-Gabe (blauer Pfeil); rechte rote Linie: Kraftamplitude im steady state nach 25 Minuten

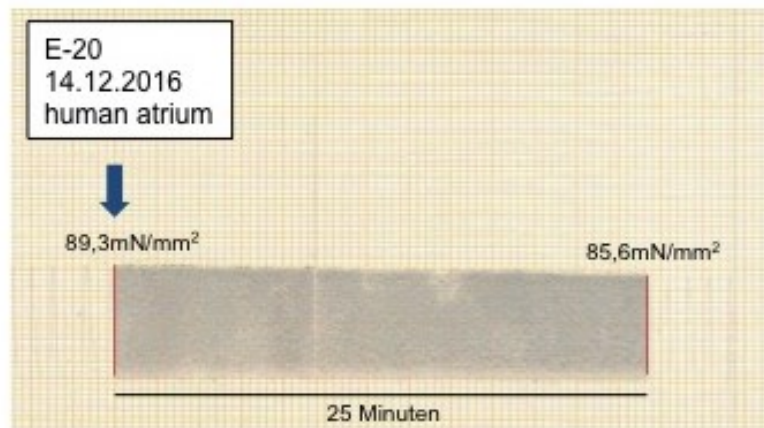
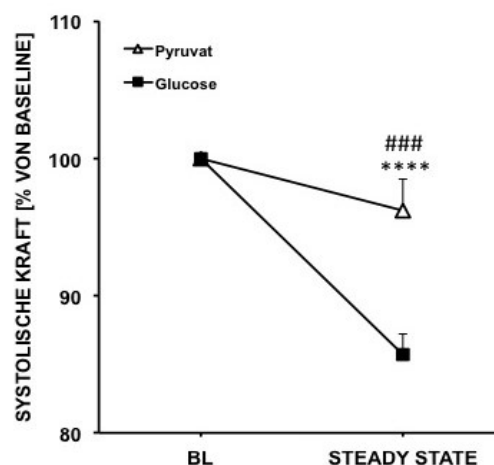


Abbildung 18 Originalaufzeichnung des Experiments E-20 vom 14.12.2016. Humanes Vorhofgewebe, 37 °C, 1Hz. Die Kraftabnahme nach Gabe von GLP-1(9–36)NH₂ (200nM) bei in Tyrode-Pyruvat-Lösung (siehe Tab. 2) inkubierten Muskelstreifen. Linke rote Linie = Kraftamplitude zum Zeitpunkt der GLP-1(9–36)NH₂-Gabe (blauer Pfeil); rechte rote Linie: Kraftamplitude im steady state nach 25 Minuten

Der in der Glucosegruppe zu beobachtende relative Kraftverlust gemessen vom Zeitpunkt Baseline bis steady state nach 25 Minuten kann als physiologischer Rundown interpretiert werden (85.7 % ± 1.7 %, verglichen zur Baseline). Muskelstreifen, bei denen Pyruvat als Energiesubstrat verwendet wurden zeigten interessanterweise einen signifikant geringeren Kraftverlust (96,2 % ± 2,4 %, verglichen zur Baseline) (p=0,0001 Glucose vs. Pyruvat). Diese Beobachtung könnte auf die inotropen Effekte von Pyruvat selbst zurückzuführen sein, das dem physiologischen Rundown entgegenwirkt.⁽⁶⁶⁾



*Abbildung 19 : Effekt von GLP-1(9-36)NH₂ auf in Tyrode-Glucose-Lösung (schwarze Quadrate) bzw. Tyrode-Pyruvat-Lösung (weiße Dreiecke) (siehe Tab. 2) inkubierten Muskelstreifen, 37 °C, 1Hz. In beiden Gruppen ist ein Kraftverlust ([%] ± SEM verglichen zur Baseline) ersichtlich. Der Kraftverlust ist bei mit Tyrode-Pyruvat-Lösung inkubierten Muskelstreifen deutlich geringer ausgeprägt. ###=p<0,001 (vergleich beider Gruppen), ****= p0,0001 (verglichen zur Baseline).*

Ebenso wie Exenatide und GLP-1(7-36)NH₂, führte die Applikation von GLP-1(9-36)NH₂ zu keiner Änderung der diastolischen Spannung oder Relaxationszeit der Muskelstreifen (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Substratabhängigkeit des positiv inotropen Effektes der GLP-1-Rezeptor-Aktivierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass (1) die GLP-1-Rezeptor-Agonisten Exenatide und GLP-1(7-36)NH₂ in der Anwesenheit von Glucose, sowie auch Pyruvat einen positiv inotropen Effekt auf elektrisch stimulierte Herzmuskelstreifen ausüben und dass (2) dieser Effekt bei dem physiologischen, kompetitiven Hemmer des GLP-1-Rezeptors, GLP-1(9-36)NH₂, nicht auftritt. Ebenfalls konnte demonstriert werden, dass (3) die Steigerung der Kraftentwicklung durch GLP-1(7-36)NH₂ und Exenatide stärker war, wenn Glucose als Energiesubstrat verwendet wurde.

5.1 Der positiv inotrope Effekt auf den Vorhof

Der Vorhof des Herzens übernimmt eine wichtige Rolle in der Herzmuskelaktion. Während der Diastole entsteht durch Erschlaffung der Herzmuskulatur ein Unterdruck und aus der Peripherie, über die untere und obere Hohlvene, bzw. aus dem Lungenkreislauf, über die Pulmonalvenen, strömt Blut über die Vorhöfe (Atria) in die Kammern (Ventrikel). In der späten Diastole führt die Vorhofkontraktion zu einer effizienten Füllung der Kammern, bevor die in der Systole stattfindende Kammerkontraktion den Körper bzw. die Lunge mit ausreichend Blut versorgt. Das durch die Kontraktion des linken Vorhofs transportierte Blut macht bis zu 30% der Füllung der linken Herzkammer beim Gesunden aus.

Tatsächlich konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass sich eine verminderte linksatriale Auswurfleistung (LAEF) bei Patienten mit Herzversagen negativ auf die globale Herzfunktion auswirkt. Sie ist mit einer Verringerung der linksventrikulären Auswurfleistung (LVEF) einer verminderten funktionellen Leistungskapazität sowie einer erhöhten Hospitalisierungsrate von Herzinsuffizienz-Patienten assoziiert.^(67, 68) Darüber hinaus geht Vorhofflimmern, das einer Aufhebung der Vorhoffunktion gleichkommt, mit einem signifikant erhöhten Mortalitätsrisiko bei Patienten mit symptomatischem sowie asymptomatischem Herzversagen einher.^(69, 70)

Zusätzlich stellt die Funktionsstörung des linken Vorhofes eine unabhängige Determinante für die Hospitalisierungsrate durch Herzversagen sowie der Mortalität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit oder Herzinfarkt dar.^(71, 72)

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors durch die antidiabetisch wirkenden Substanz Exenatide am Vorhofmyokard positiv inotrop wirkt.⁽⁶¹⁾ Eine erhöhte Kontraktionsfähigkeit des Vorhofes könnte somit zu einer Verbesserung der linksventrikulären Füllung und damit verbundenen Folgeerscheinungen beitragen.⁽⁷³⁾ Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist auch, dass Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind an chronischem Herzversagen und Funktionsstörungen der Vorhöfe zu erkranken.^(74, 75)

Hinsichtlich der Ergebnisse, dass eine bessere linksatriale Funktion mit einer verbesserten Herzleistung bei herzinsuffizienten Patienten einhergeht, könnten von einer Verbesserung der Vorhofskontraktilität besonders Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 profitieren.

5.2 GLUT1-Translokation

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass elektrisch stimulierte Muskelstreifen unter Verwendung der beiden Energiesubstrate Glucose und Pyruvat einen vergleichbaren inotropen Effekt nach GLP-1-Rezeptor-Aktivierung aufweisen. Beginnend mit einem schnellen Anstieg der Kraftentwicklung, gefolgt von einem Zeitpunkt des maximalen Effektes und einer konsekutiven Abnahme der Kraft. Nach 25 Minuten zeigte sich vor allem bei Muskelstreifen, welche Glucose als Substrat zur Verfügung hatten eine im Vergleich zur Baseline größere Kraftentwicklung im steady state.

Dieser transiente positiv inotrope Effekt wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen dargestellt. Es wird angenommen, dass der rasche Abfall der Kraft nach dem maximalen Effekt in einer Desensibilisierung des GLP-1-Rezeptors begründet ist. Außerdem wurde gezeigt, dass Exenatide in atrialen

Herzmuskelzellen zu einer vermehrten Translokation des Glucosetransporters 1 (GLUT1) führt. Dieses Ergebnis wurde gemessen nach einer Inkubation mit 2nM Exenatide über einen Zeitraum von 3 Stunden.⁽⁶¹⁾

Allgemein spielt der GLUT1 eine wichtige Rolle im Zuckerstoffwechsel von kardialen Myozyten. Für das erwachsene Herz stellt jedoch der GLUT4 den wichtigsten Glucosetransporter dar.⁽⁷⁶⁾ GLUT1 und GLUT4 werden bei entsprechendem Signal von ihren intrazellulären Kompartimenten an die Zelloberfläche transportiert.⁽⁷⁷⁾

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass pathophysiologische Prozesse im Rahmen von Herzmuskelhypertrophie oder chronischer Herzmuskelhypoxie oder –ischämie zu einer vermehrten Hochregulierung des GLUT1 führen können.^(76, 78)

Jedenfalls könnte der in dieser Arbeit zu beobachtende stärkere positiv inotrope Effekt bei Muskelstreifen mit Glucose als Energiesubstrat im Zusammenhang mit der vermehrten Translokation von GLUT1 stehen. Der durch GLUT1 bewerkstelligte vermehrte Glucoseeinstrom in die Herzmuskelzellen würde so durch eine gesteigerte Bildung von ATP diesen Effekt nach sich ziehen.

Im Gegensatz zum GLUT4 sind zurzeit jedoch keine Daten über die intrazelluläre Signalkaskade, die zur GLUT1-Translokation nach GLP–1-Rezeptor-Aktivierung führt, bekannt.

5.3 Limitationen

Obwohl in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass der positiv inotrope Effekt der GLP-1-Rezeptor-Aktivierung stärker auftritt, wenn Glucose als Energiesubstrat verwendet wurde, sollten die Ergebnisse kritisch betrachtet werden. Eine große Limitation dieser Arbeit stellt unweigerlich die Tatsache dar, dass ausschließlich auf funktionelle Eigenschaften der Substratabhängigkeit dieses Effektes eingegangen wurde. Mechanismen und Signaltransduktionswege wurden nicht näher betrachtet. Die hier diskutierte Translokation von GLUT1 nach der Zugabe von Exenatide wurde aufgrund von Daten einer kürzlich publizierten Arbeit angenommen und nicht in dieser Arbeit gezeigt. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass ausschließlich für Exenatide Daten über eine GLUT1-Translokation vorhanden sind. Bis dato wurden keine Untersuchungen bezüglich einer solchen Translokation nach Zugabe von GLP-1(7-36)NH₂ durchgeführt.

In den hier gezeigten Daten ist auch ersichtlich, dass Muskelstreifen, welche Pyruvat als Energiesubstrat zur Verfügung hatten, zum Zeitpunkt der Baseline eine deutlich stärkere Kontraktionskraft aufwiesen, als jene mit Glucose als Energiesubstrat. Der weniger ausgeprägte inotrope Effekt in der mit Pyruvat inkubierten Muskelstreifen könnte daher aufgrund einer partialen inotropen Inkompetenz durch die von Beginn der Untersuchung gegebenen höheren Kontraktilität herrühren, während mit Glucose inkubierte Muskelstreifen adäquat auf die GLP-1-Rezeptor-Aktivierung reagieren konnten.

Im Vergleich zu Glucose wurde die doppelte Konzentration an Pyruvat verwendet da ein Molekül Glucose während der Glykolyse zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut wird und dabei ATP gebildet wird. Der Hauptteil der ATP-Synthese sowie des Energiestoffwechsels gehen vom Zitat-Zyklus aus.

Außerdem verfügt Pyruvat laut Beobachtungen selbst über positiv inotrope Eigenschaften.^(79, 80) Somit wurden im Nachhinein betrachtet die direkten Effekte auf die Kontraktilität durch Pyruvat wurden in dieser Arbeit wohl unterschätzt.

Der geringere positiv inotrope Effekt durch GLP-1(7-36)NH₂ in den Muskelstreifen mit Pyruvat als Energiesubstrat ist jedoch auch das Ergebnis einer hohen Anzahl

von Experimenten, bei denen die Muskelstreifen trotz Zugabe der positiv inotropen Wirksubstanz keine Änderung der Kontraktionskraft zeigten (non-responder). Für die Ursache dieser non-responder kann in dieser Arbeit keine adäquate Erklärung gegeben werden.

Die Stärke dieser Untersuchung liegt darin, dass die Experimente mit humanem Vorhofgewebe durchgeführt werden konnten. Die Muskelstreifen wurden in einer mit Bikarbonat gepufferten Lösung bei 1 Hz elektrisch stimuliert, was ein in-vitro Modell unter physiologischen Bedingungen darstellt. Außerdem unterstrichen die hier sorgfältig untersuchten funktionalen inotropen Effekte von Exenatide und GLP-1(7-36)NH₂ die bereits vorhandenen Daten über GLP-1-Rezeptor-Agonisten und ihre pleiotropen Effekte auf Herzmuskelgewebe. Diese GLP-1-Rezeptor-Agonisten werden bereits im klinischen Bereich angewandt.

5.4 Zusammenfassung

Die Applikation von GLP-1-Rezeptor-Agonisten führt zu einem transienten positiv inotropen Effekt unter der Verwendung von Glucose sowie Pyruvat als Energiesubstrate. Dieser Effekt ist jedoch stärker ausgeprägt, wenn Glucose als Energiesubstrat verwendet wird. Dieses Ergebnis deutet auf eine Substratabhängigkeit des positiv inotropen Effektes nach GLP-1-Rezeptor-Aktivierung hin, was im Zusammenhang mit der hier erwähnten GLUT1-Translokation stehen könnte.

6 Literaturverzeichnis

1. Al Quobaili F, Montenarh M. CK2 and the regulation of the carbohydrate metabolism. *Metabolism: clinical and experimental*. 2012;61(11):1512-7.
2. Koepsell H. The Na⁺-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 are targets for the treatment of diabetes and cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2016.
3. Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell metabolism*. 2006;3(6):403-16.
4. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34(2-3):121-38.
5. Dashty M. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clinical biochemistry*. 2013;46(15):1339-52.
6. Matlin KS. The Heuristic of Form: Mitochondrial Morphology and the Explanation of Oxidative Phosphorylation. *Journal of the history of biology*. 2016;49(1):37-94.
7. Feng XT, Leng J, Xie Z, Li SL, Zhao W, Tang QL. GPR40: a therapeutic target for mediating insulin secretion (review). *International journal of molecular medicine*. 2012;30(6):1261-6.
8. Kaufman BA, Li C, Soleimanpour SA. Mitochondrial regulation of β -cell function: maintaining the momentum for insulin release. *Molecular aspects of medicine*. 2015;42:91-104.
9. McCommis KS, Hodges WT, Bricker DK, Wisidagama DR, Compan V, Remedi MS, et al. An ancestral role for the mitochondrial pyruvate carrier in glucose-stimulated insulin secretion. *Molecular metabolism*. 2016;5(8):602-14.
10. Graaf Cd, Donnelly D, Wootten D, Lau J, Sexton PM, Miller LJ, et al. Glucagon-Like Peptide-1 and Its Class B G Protein–Coupled Receptors: A Long March to Therapeutic Successes. *Pharmacological reviews*. 2016;68(4):954-1013.
11. Kawanami D, Matoba K, Sango K, Utsunomiya K. Incretin-Based Therapies for Diabetic Complications: Basic Mechanisms and Clinical Evidence. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(8).
12. Orskov C, Rabenhoj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes*. 1994;43(4):535-9.

13. Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, Sanlioglu S. Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2014;30(5):354-71.
14. Yu X-Y, Song Y-H, Geng Y-J, Lin Q-X, Shan Z-X, Lin S-G, et al. Glucose induces apoptosis of cardiomyocytes via microRNA-1 and IGF-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;376(3):548-52.
15. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological reviews*. 2013;93(1):137-88.
16. Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, et al. Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments. *Diabetes Care*. 2010;33(10):2285-93.
17. Wahid A, Manek N, Nichols M, Kelly P, Foster C, Webster P, et al. Quantifying the Association Between Physical Activity and Cardiovascular Disease and Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Heart Association*. 2016;5(9).
18. Hardigan T, Ward R, Ergul A. Cerebrovascular complications of diabetes: focus on cognitive dysfunction. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2016;130(20):1807-22.
19. Virtanen SM. Dietary factors in the development of type 1 diabetes. *Pediatric diabetes*. 2016;17 Suppl 22:49-55.
20. Purrello F, Rabuazzo AM. Metabolic factors that affect beta-cell function and survival. *Diabetes, nutrition & metabolism*. 2000;13(2):84-91.
21. Patel TP, Rawal K, Bagchi AK, Akolkar G, Bernardes N, Dias Dda S, et al. Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart failure reviews*. 2016;21(1):11-23.
22. Del Prato S, Leonetti F, Simonson DC, Sheehan P, Matsuda M, DeFronzo RA. Effect of sustained physiologic hyperinsulinaemia and hyperglycaemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man. *Diabetologia*. 1994;37(10):1025-35.
23. Kolic J, Spigelman AF, Smith AM, Manning Fox JE, MacDonald PE. Insulin Secretion Induced by Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide Requires Phosphatidylinositol 3-Kinase γ in Rodent and Human β -Cells. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(46):32109-20.
24. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *The New England journal of medicine*. 2002;346(6):393-403.

25. Choudhuri G, Lakshmi CP, Goel A. Pancreatic diabetes. *Tropical gastroenterology : official journal of the Digestive Diseases Foundation*. 2009;30(2):71-5.
26. Creighton Mitchell T, McClain DA. Diabetes and hemochromatosis. *Current diabetes reports*. 2014;14(5):488.
27. Yung B, Hodson ME. Diabetes in cystic fibrosis. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1999;92(Suppl 37):35-40.
28. Mazziotti G, Gazzaruso C, Giustina A. Diabetes in Cushing syndrome: basic and clinical aspects. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2011;22(12):499-506.
29. Alexopoulou O, Bex M, Kamenicky P, Mvoula AB, Chanson P, Maiter D. Prevalence and risk factors of impaired glucose tolerance and diabetes mellitus at diagnosis of acromegaly: a study in 148 patients. *Pituitary*. 2014;17(1):81-9.
30. Devendra D, Jasinski J, Melanitou E, Nakayama M, Li M, Hensley B, et al. Interferon-alpha as a mediator of polyinosinic:polycytidylic acid-induced type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(9):2549-56.
31. Takarabe D, Rokukawa Y, Takahashi Y, Goto A, Takaichi M, Okamoto M, et al. Autoimmune diabetes in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(8):4056-60.
32. Anik A, Catli G, Abaci A, Bober E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2015;28(3-4):251-63.
33. Catalano PM. Trying to understand gestational diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2014;31(3):273-81.
34. Ben-Haroush A, Yogev Y, Hod M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2004;21(2):103-13.
35. Simó R, Hernández C. Treatment of Diabetes Mellitus: General Goals and Clinical Practice Management. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2002;55(08):845-60.
36. Marin-Penalver JJ, Martin-Timon I, Sevillano-Collantes C, Del Canizo-Gomez FJ. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes*. 2016;7(17):354-95.
37. Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *The Biochemical journal*. 2015;471(3):307-22.

38. Chen M, Hu C, Jia W. Pharmacogenomics of glinides. *Pharmacogenomics*. 2015;16(1):45-60.
39. Holstein JD, Kovacs P, Patzer O, Stumvoll M, Holstein A. The Ser1369Ala variant of ABCC8 and the risk for severe sulfonylurea-induced hypoglycemia in German patients with Type 2 diabetes. *Pharmacogenomics*. 2012;13(1):5-7; author reply 9-10.
40. Nakamura K, Oe H, Kihara H, Shimada K, Fukuda S, Watanabe K, et al. DPP-4 inhibitor and alpha-glucosidase inhibitor equally improve endothelial function in patients with type 2 diabetes: EDGE study. *Cardiovascular diabetology*. 2014;13:110.
41. Soccio Raymond E, Chen Eric R, Lazar Mitchell A. Thiazolidinediones and the Promise of Insulin Sensitization in Type 2 Diabetes. *Cell metabolism*. 2014;20(4):573-91.
42. Riggs K, Ali H, Taegtmeier H, Gutierrez AD. The Use of SGLT-2 Inhibitors in Type 2 Diabetes and Heart Failure. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2015;13(7):292-7.
43. Fitchett D, Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Hantel S, Salsali A, et al. Heart failure outcomes with empagliflozin in patients with type 2 diabetes at high cardiovascular risk: results of the EMPA-REG OUTCOME(®) trial. *European heart journal*. 2016;37(19):1526-34.
44. Handelsman Y, Bloomgarden ZT, Grunberger G, Umpierrez G, Zimmerman RS, Bailey TS, et al. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY – CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR DEVELOPING A DIABETES MELLITUS COMPREHENSIVE CARE PLAN – 2015. *Endocrine Practice*. 2015;21(Supplement 1):1-87.
45. Heinemann L, Jacques Y. Oral Insulin and Buccal Insulin: A Critical Reappraisal. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2009;3(3):568-84.
46. R. Drab S. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists for Type 2 Diabetes: A Clinical Update of Safety and Efficacy. *Current Diabetes Reviews*. 2016;12(4):403-13.
47. von Lewinski D, Kolesnik E, Wallner M, Resl M, Sourij H. New Antihyperglycemic Drugs and Heart Failure: Synopsis of Basic and Clinical Data. *BioMed research international*. 2017;2017:10.
48. Bae EJ. DPP-4 inhibitors in diabetic complications: role of DPP-4 beyond glucose control. *Archives of pharmacal research*. 2016;39(8):1114-28.

49. Garber AJ, Abrahamson MJ, Barzilay JI, Blonde L, Bloomgarden ZT, Bush MA, et al. CONSENSUS STATEMENT BY THE AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS AND AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY ON THE COMPREHENSIVE TYPE 2 DIABETES MANAGEMENT ALGORITHM – 2017 EXECUTIVE SUMMARY. *Endocrine Practice*. 2017;23(2):207-38.
50. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiological reviews*. 2005;85(4):1205-53.
51. Amin AS, Tan HL, Wilde AA. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2010;7(1):117-26.
52. Milanesi R, Bucchi A, Baruscotti M. The genetic basis for inherited forms of sinoatrial dysfunction and atrioventricular node dysfunction. *Journal of interventional cardiac electrophysiology : an international journal of arrhythmias and pacing*. 2015;43(2):121-34.
53. Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD. Calcium Signaling in Cardiac Myocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(11):a004242.
54. Rohr S. Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cardiovascular research*. 2004;62(2):309-22.
55. Kane C, Couch L, Terracciano CMN. Excitation–contraction coupling of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2015;3:59.
56. Chang AN, Battiprolu PK, Cowley PM, Chen G, Gerard RD, Pinto JR, et al. Constitutive Phosphorylation of Cardiac Myosin Regulatory Light Chain in Vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(17):10703-16.
57. Sequeira V, van der Velden J. The Frank–Starling Law: a jigsaw of titin proportions. *Biophysical reviews*. 2017.
58. Kolwicz SC, Purohit S, Tian R. Cardiac Metabolism and its Interactions With Contraction, Growth, and Survival of Cardiomyocytes. *Circulation research*. 2013;113(5):603-16.
59. Heidrich F, Schotola H, Popov AF, Sohns C, Schuenemann J, Friedrich M, et al. AMPK - Activated Protein Kinase and its Role in Energy Metabolism of the Heart. *Current Cardiology Reviews*. 2010;6(4):337-42.
60. von Lewinski D, Rainer PP, Gasser R, Huber M-S, Khafaga M, Wilhelm B, et al. Glucose-transporter–mediated positive inotropic effects in human myocardium of diabetic and nondiabetic patients. *Metabolism: clinical and experimental*. 2010;59(7):1020-8.

61. Wallner M, Kolesnik E, Ablasser K, Khafaga M, Wakula P, Ljubojevic S, et al. Exenatide exerts a PKA-dependent positive inotropic effect in human atrial myocardium: GLP-1R mediated effects in human myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;89(Pt B):365-75.
62. Khaliulin I, Bond M, James AF, Dyar Z, Amini R, Johnson JL, et al. Functional and cardioprotective effects of simultaneous and individual activation of protein kinase A and Epac. *British Journal of Pharmacology*. 2017;174(6):438-53.
63. Kim M, Platt MJ, Shibasaki T, Quaggin SE, Backx PH, Seino S, et al. GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nature Medicine*. 2013;19(5):567-75.
64. Holtwick R, Gotthardt M, Skryabin B, Steinmetz M, Potthast R, Zetsche B, et al. Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(10):7142-7.
65. Zhao T, Parikh P, Bhashyam S, Bolukoglu H, Poornima I, Shen Y-T, et al. Direct Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Myocardial Contractility and Glucose Uptake in Normal and Postischemic Isolated Rat Hearts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;317(3):1106-13.
66. Torres CAA, Varian KD, Canan CH, Davis JP, Janssen PML. The Positive Inotropic Effect of Pyruvate Involves an Increase in Myofilament Calcium Sensitivity. *PLoS one*. 2013;8(5):e63608.
67. Terzi S, Dayi SU, Akbulut T, Sayar N, Bilsel T, Tangurek B, et al. Value of left atrial function in predicting exercise capacity in heart failure with moderate to severe left ventricular systolic dysfunction. *International heart journal*. 2005;46(1):123-31.
68. Kuhl JT, Kofoed KF, Moller JE, Hammer-Hansen S, Kristensen T, Kober L, et al. Assessment of left atrial volume and mechanical function in ischemic heart disease: a multi slice computed tomography study. *International journal of cardiology*. 2010;145(2):197-202.
69. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Vasan RS, Leip EP, Wolf PA, et al. Temporal Relations of Atrial Fibrillation and Congestive Heart Failure and Their Joint Influence on Mortality. *The Framingham Heart Study*. 2003;107(23):2920-5.

70. Dries D, Exner D, Gersh B, Domanski M, Waclawiw M, Stevenson L. Atrial fibrillation is associated with an increased risk for mortality and heart failure progression in patients with asymptomatic and symptomatic left ventricular systolic dysfunction: a retrospective analysis of the SOLVD trials. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998;32(3):695-703.
71. Kuhl JT, Moller JE, Kristensen TS, Kelbaek H, Kofoed KF. Left atrial function and mortality in patients with NSTEMI an MDCT study. *JACC Cardiovascular imaging*. 2011;4(10):1080-7.
72. Welles CC, Ku IA, Kwan DM, Whooley MA, Schiller NB, Turakhia MP. Left atrial function predicts heart failure hospitalization in subjects with preserved ejection fraction and coronary heart disease: longitudinal data from the Heart and Soul Study. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(7):673-80.
73. Scherr J, Jung P, Schuster T, Pollmer L, Eisele G, Goss F, et al. Left ventricular diastolic function is strongly correlated with active emptying of the left atrium: a novel analysis using three-dimensional echocardiography. *Cardiovascular Ultrasound*. 2016;14(1):43.
74. Mondillo S, Cameli M, Caputo ML, Lisi M, Palmerini E, Padeletti M, et al. Early detection of left atrial strain abnormalities by speckle-tracking in hypertensive and diabetic patients with normal left atrial size. *J Am Soc Echocardiogr*. 2011;24(8):898-908.
75. Graca B, Ferreira MJ, Donato P, Gomes L, Castelo-Branco M, Caseiro-Alves F. Left atrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus: insights from cardiac MRI. *European radiology*. 2014;24(11):2669-76.
76. Shao D, Tian R. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. *Comprehensive Physiology*. 2015;6(1):331-51.
77. Becker C, Sevilla L, Tomàs E, Palacin M, Zorzano A, Fischer Y. The Endosomal Compartment Is an Insulin-Sensitive Recruitment Site for GLUT4 and GLUT1 Glucose Transporters in Cardiac Myocytes. *Endocrinology*. 2001;142(12):5267-76.
78. Szablewski L. Glucose transporters in healthy heart and in cardiac disease. *International journal of cardiology*. 2017;230:70-5.
79. Torres CA, Varian KD, Canan CH, Davis JP, Janssen PM. The positive inotropic effect of pyruvate involves an increase in myofilament calcium sensitivity. *PloS one*. 2013;8(5):e63608.
80. Hasenfuss G, Maier LS, Hermann HP, Luers C, Hunlich M, Zeitz O, et al. Influence of pyruvate on contractile performance and Ca(2+) cycling in isolated failing human myocardium. *Circulation*. 2002;105(2):194-9.