

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Angefertigt im Klinikum Großhadern, Medizinische Klinik II

(Prof. Dr. Klaus Parhofer)

Untersuchung der Effekte des DPP-4 Inhibitors Sitagliptin auf eine Diät induzierte NASH im Mausmodell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

München

Von Alexandra Bianca Stürner

aus Leonberg

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ammer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Aigner

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Meinen Eltern

Und den Mäusen dieser Studie.

INHALTSVERZEICHNIS

Inaugural-Dissertation	1
Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät	2
I Kenntnisstand	1
1 Metabolisches Syndrom	1
1.1 Definition	1
1.2 Diabetes mellitus Typ 2.....	2
1.3 Diabetes mellitus in der Kleintiermedizin.....	3
1.3.1 Therapie in der Kleintiermedizin.....	4
2 Nicht alkoholisch bedingte Steatohepatitis.....	5
2.1 Definition, Pathogenese	5
2.2 Histologie der Nicht alkoholisch bedingten Steatohepatitis	7
2.3 Methionin-Cholin defiziente Diät	8
3 Inkretin-Effekt	10
3.1 Definition	10
3.2 Glucagon-Like Peptid-1	11
3.3 Dipeptidylpeptidase-4	13
3.3.1 DPP-4 Inhibitoren	15
3.3.1.1 Sitagliptin.....	16
II Zielsetzung der Arbeit.....	18
III Material und Methoden	19
1 Material.....	19
2 Methoden.....	29
2.1 Tiermodell	29
2.1.1 Versuchsprotokoll I.....	30
2.1.2 Versuchsprotokoll II	31
2.2 Nüchternblutglukose	32
2.3 Photometrische Messmethode.....	32
2.3.1 Serum Lipidstatus	32
2.3.2 Hepatischer Lipidstatus.....	33
2.3.3 Transaminasen	34
2.3.4 DPP-4 Aktivität.....	34
2.3.5 Hydroxyprolinbestimmung Leber.....	35
2.4 Polymerase-Kettenreaktion	35

2.4.1	RNA Extraktion.....	36
2.4.2	Reverse Transkription	36
2.4.3	Qualitative PCR.....	37
2.4.4	Quantitative Real-time-PCR.....	38
2.5	Western Blot	41
2.5.1	Proteinisolation und -konzentrationsbestimmung	41
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.5.3	Blotting	42
2.6	Histologie.....	44
2.7	Futteranalyse.....	44
2.8	Statistische Auswertung der Messergebnisse	44
IV	Ergebnisse	46
1	Versuchsprotokoll I.....	46
1.1	Matching/Gewicht	46
1.2	Serumanalyse	46
1.2.1	DPP-4 Aktivität	46
1.3	Organanalyse	47
1.3.1	DPP-4 Aktivität	47
2	Versuchsprotokoll II.....	48
2.1	Matching	48
2.2	Gewicht.....	48
2.3	Serumanalysen	48
2.3.1	DPP-4 Aktivität	48
2.3.2	Nüchternblutglukose	49
2.3.3	Lipidstatus	49
2.3.4	Transaminasen.....	50
2.4	Organanalyse	51
2.4.1	Lebergewicht	51
2.4.2	Hepatischer Lipidstatus	51
2.4.3	DPP-4 Aktivität	52
2.4.4	Inflammationsmarker	52
2.4.5	Fibrosemarker.....	52
2.4.6	Histologie	55
3	Futteranalyse	55

V	Diskussion.....	56
1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	56
2	Evaluierung des Tiermodells	57
3	Diskussion Versuchsprotokoll I	58
3.1	DPP-4 Aktivität unter Sitagliptinwirkung.....	58
4	Diskussion Versuchsprotokoll II	59
4.1	Gewichtsentwicklung im Versuchsverlauf.....	59
4.2	Sitagliptinwirkung auf DPP-4 Aktivität unter MCDD.....	59
4.3	Einflüsse von Sitagliptin auf die Nüchternblutglukose.....	60
4.4	Bewertung der Lipide im Serum und der Leber.....	61
4.5	Verlaufsbeurteilung der hepatischen Transaminasen.....	63
4.6	Beurteilung der hepatischen Entzündung anhand von Inflammationsmarkern.....	64
4.7	Evaluierung der Leberfibrose anhand von Lebergewicht, Fibrosemarkern und Histologie der Leber.....	65
5	Bewertung der Futteranalyse	66
6	Schlussfolgerung	67
VI	Zusammenfassung	68
VII	Summary	69
VIII	Anhang.....	70
1	Ergänzende Verlaufsdarstellung Ergebnisse	70
2	Protokoll Futteranalyse.....	72
IX	Literaturverzeichnis	73
X	Danksagung.....	79

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Kenntnisstand

Abbildung 1: Risikofaktoren des metabolischen Syndroms	1
Abbildung 2: Verlaufsformen NAFLD	5
Abbildung 3: Effekte von IR und Hyperinsulinämie auf den Fettstoffwechsel.....	6
Abbildung 4: Zusammenhang zwischen Cholin, Methionin und Phosphatidylcholin.....	9
Abbildung 5: Gewebsspezifische Prozessierung des Proglukagonmoleküls	12
Abbildung 6: Struktur von GLP-1.....	14
Abbildung 7: Strukturformel von Sitagliptin	16

Material und Methoden

Abbildung 8: Versuchsprotokoll I.....	30
Abbildung 9: Versuchsprotokoll II	31
Abbildung 10: Schichtung für Western Blotting	43

Ergebnisse

Abbildung 11: Körpergewicht;Protokoll I.....	46
Abbildung 12: DPP-4 Aktivität; Serum; Protokoll I.....	46
Abbildung 13: hepatische DPP-4 Aktivität; Tag 4; Protokoll I.....	47
Abbildung 14: DPP-4 Aktivität; Niere; Tag 4; Protokoll I.....	47
Abbildung 15: Körpergewicht; Protokoll II.....	49
Abbildung 16: DPP-4 Aktivität Serum; Protokoll II	49
Abbildung 17: Nüchternblutglukose Woche 11; Protokoll II.....	49
Abbildung 18: Gesamtcholesterin Serum Woche 11; Protokoll II	50
Abbildung 19: Triglyzeride Serum Woche 11; Protokoll II	50
Abbildung 20: Serumspiegel AST Woche 11; Protokoll II.....	50
Abbildung 21: Serumspiegel ALT Woche 11; Protokoll II.....	50

Abbildungsverzeichnis/Tabellenverzeichnis

Abbildung 22: Lebergewicht; Protokoll II	51
Abbildung 23: hepatisches Gesamtcholesterin; Protokoll II	51
Abbildung 24: hepatische Triglyzeride; Protokoll II.....	51
Abbildung 25: DPP-4 Aktivität; Leber; Protokoll II.....	53
Abbildung 26: DPP-4 Aktivität; Niere; Protokoll II	53
Abbildung 27: hepatische mRNA-Expression des TNF- α ; Protokoll II	53
Abbildung 28: hepatische mRNA-Expression des MCP-1; Protokoll II.....	53
Abbildung 29: Aktivierung von NF κ B in der Leber; Protokoll II.....	53
Abbildung 30: Western Blot; NF κ B; Leber; Protokoll II.....	53
Abbildung 31: Hydroxyprolin; Leber; Protokoll II.....	54
Abbildung 32: hepatische mRNA-Expression des Col1a1; Protokoll II.....	54
Abbildung 33: hepatische mRNA-Expression des α SMA; Protokoll II.....	54
Abbildung 34: Sirius red-Färbung; Beispiel Kontrollgruppe, Protokoll II	55
Abbildung 35: Sirius red-Färbung; Beispiel Sitagliptin-Gruppe, Protokoll II.....	55
Abbildung 36: hepatischer Kollagenanteil; Protokoll II	55

Anhang

Abbildung 37: Nüchternblutglukose; Protokoll II.....	70
Abbildung 38: Gesamtcholesterin Serum; Protokoll II.....	70
Abbildung 39: Triglyzeride Serum; Protokoll II.....	71

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Kriterien für die klinische Diagnose MetS.....	2
Tabelle 2: Durch MCDD verursachte Effekte nach 10 Wochen.....	9
Tabelle 3: Substrate für DPP-4.....	15
Tabelle 4: Pharmakokinetik von Sitagliptin	17
Tabelle 5: Matching Protokoll II	48

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALT = Alanin-Aminotransferase

aSMA = alpha smooth muscle actin

AST = Aspartat-Aminotransferase

AUC = Area under the Curve

cDM = caniner Diabetes mellitus

Col1a1 = Collagen type 1 alpha 1

CVD = Cardiovascular Disease

DM = Diabetes mellitus

DNA = Desoxyribonuklein Säure (engl. Desoxyribonuklein Acid)

DPP-4 = Dipeptidylpeptidase-4

FFS = freie Fettsäuren

GC = Gesamtcholesterin

GIP = Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid

GLP-1 = Glucagon-like Peptid-1

GLP-2 = Glucagon-like Peptid-2

GRPP = Glycentin-related Polypeptide

HDL = high Density Lipoprotein

HRP = Meerrettichperoxidase

IDDM = Insulin dependent Diabetes Mellitus

Il-6 = Interleukin 6

IP-1 = Intervening Peptid-1

IP-2 = Intervening Peptid-2

IR = Insulin Resistenz

MCDD = Methionin-Cholin defiziente Diät

MCP-1 = Monocyte chemotactic protein-1

MetS = metabolisches Syndrom

MPGF = Major proglucagon fragment

Abkürzungsverzeichnis

MW = Mittelwert

NAFLD = Non alcoholic fatty liver disease

NASH = Non alcoholic steatohepatitis

NF κ B = Nuclear Factor κ B

NIDDM = Non Insulin dependent Diabetes mellitus

OXM = Oxyntomodulin

PCR = Polymeraseketten Reaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)

SEM = Standardfehler (enlg. Standard error of the mean)

SREBP1c = Sterol regulatory element-binding protein 1c

T2DM = Typ 2 Diabetes mellitus

TG = Triglyceride

TNF α = Tumor necrosis factor α

Rpm = rounds per minute

I Kenntnisstand

1 Metabolisches Syndrom

1.1 Definition

Unter dem metabolischen Syndrom (MetS) versteht man das zeitgleiche Auftreten verschiedener Risikofaktoren, die zusammengefasst das Risiko, an Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) und/oder Kardiovaskulären Erkrankungen (cardiovascular Disease, CVD) zu erkranken, erhöhen. Zu diesen in Wechselbeziehung stehenden Risikofaktoren gehören Dysglykämie, ein erhöhter Blutdruck, erhöhte Serum-Triglyceride, sowie ein niedriges HDL (high density Lipoprotein) und abdominale oder zentrale Adipositas (Abbildung 1). Ein Zusammenhang zwischen Insulinresistenz (IR) und dem MetS steht im derzeitigen Forschungsinteresse (Alberti, Eckel et al. 2009).

Das MetS ist in Ländern mit einem Überfluss an Nahrungsmitteln und abnehmender körperlicher Belastung weit verbreitet. Es kann von einer Prävalenz von 20 bis 30 % unter den Westeuropäern ausgegangen werden. Unter T2DM-Patienten besteht sogar eine Prävalenz von 74,5 % (Hanefeld, Schaper et al. 2007).

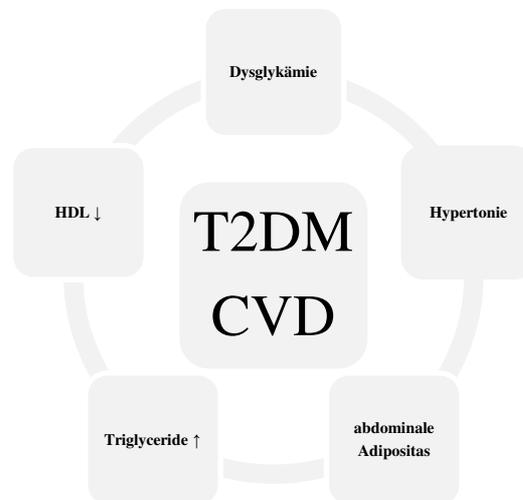


Abbildung 1: Risikofaktoren des metabolischen Syndroms

Es wird diskutiert, ob es sich bei dem metabolischen Syndrom wirklich um ein Syndrom im eigentlichen Sinne handelt oder eher um ein Zusammenspiel diverser Phänotypen. Ein Syndrom ist per definitionem ein gemeinsames Auftreten von Symptomen, welche im Zusammenhang öfter vorkommen als alleine. Im Vergleich zu Patienten ohne MetS ist das Risiko in fünf bis zehn Jahren an CVD zu erkranken bei Patienten mit dem MetS doppelt so hoch. Des Weiteren ist das Risiko T2DM zu entwickeln 5-fach erhöht (Alberti, Eckel et al. 2009).

Bis zum Jahr 2005 gab es verschiedene Definitionen des MetS. Eine stammt von der World Health Organisation, eine andere von der Adult Treatment Panel III. Vier Jahre später, im Jahr 2009, fand von der International Diabetes Föderation und der American Heart Assoziation/National Heart, Lung, and Blood Institute ein Abgleich dieser Definitionen statt, sodass die derzeitige Definition wie folgt lautet: In Tabelle 1 sind die klinischen Kriterien der Risikofaktoren aufgelistet, sofern drei von fünf dieser Faktoren auftreten, liegt das MetS vor. (Alberti, Eckel et al. 2009)

Tabelle 1: Kriterien für die klinische Diagnose MetS (In Anlehnung an (Alberti, Eckel et al. 2009))

Risikofaktor	Einschlusskriterien	
Erhöhter Taillenumfang	<i>Länderspezifische Definitionen</i>	
Erhöhte Triglyzeride	≥150 mg/dl (1,7 mmol/l)	
Niedriges HDL-C	Männer	<40 mg/dl (1,0 mmol/l)
	Frauen	<50 mg/dl (1,3 mmol/l)
Erhöhter Blutdruck	Systolisch	≥130 mmHg
	Diastolisch	≥85 mmHg
Erhöhte Nüchtern glukose	≥100 mg/dl	

1.2 Diabetes mellitus Typ 2

T2DM gilt als Wohlstandskrankheit in Folge von Übergewicht, Bewegungsmangel und Fehlernährung. In Deutschland leiden 7 - 8 % der erwachsenen Bevölkerung an Diabetes mellitus. Davon sind 95 % Typ-2-Diabetiker. Die Prävalenz in Mitteleuropa liegt bei ca. 6 %. Und die Inzidenz steigt mit dem Alter. Bereits jetzt leben in Deutschland achtmal mehr Diabetiker als 1960. Es sind bereits 6 % der erwachsenen Erdbevölkerung erkrankt und es wird damit gerechnet, dass sich bis 2030 die Zahl verdoppeln wird (Renz-Polster and Krautzig 2008).

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselstörung mit Beteiligung des Pankreas. Das Pankreas fungiert im Körper sowohl als endokrine als auch exokrine Drüse. Als exokrine Funktion sezerniert es Verdauungsenzyme und leitet diese an den Magen-Darm-Trakt weiter. Seine endokrine Aufgabe besteht in der Produktion von Hormonen in den so genannten Langerhans-Inseln. Die Langerhans-Inseln bestehen aus endokrinen Epithelzellen und unterteilen sich in α -, β -, δ -, ϵ - und PP-Zellen. Die Unterteilung findet aufgrund der jeweiligen Hormonproduktion statt. So sezernieren α -Zellen Glukagon, welches zur Erhöhung des Blutzuckerspiegels führt. Der Gegenspieler von Glukagon, das Insulin, wird in den β -Zellen produziert und sezerniert. δ -Zellen sind für die Bildung von Somatostatin verantwortlich. Die PP-Zellen produzieren das Pankreatische Polypeptid. Die wichtigste endokrine Funktion des Pankreas ist die Blutzuckerregulation, dessen Hauptregelungshormon das Insulin darstellt, welches die intrazelluläre

Glukoseaufnahme ermöglicht. Liegt eine Funktionsstörung von Insulin vor, kommt es zur Hyperglykämie, welche den Leitbefund von Diabetes mellitus darstellt. Man unterscheidet einen absoluten Insulinmangel von einem relativen Insulinmangel. Beim absoluten Insulinmangel liegt eine Störung der β -Zellen vor. Diese produzieren dann entweder gar kein Insulin oder deutlich zu wenig. Hierunter fällt der Diabetes mellitus Typ-1 (T1DM). Der relative Insulinmangel ist durch eine verminderte Empfindlichkeit der Körperzellen für Insulin charakterisiert und liegt beim T2DM vor (Drenckhahn 2004).

Früher wurde der T2DM als nicht insulinabhängiger Diabetes mellitus (non insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) oder Altersdiabetes bezeichnet. T2DM ist durch eine IR im peripheren Gewebe und eine zum Blutzuckerspiegel inadäquate Insulinsekretion charakterisiert. Eine genetische Prädisposition spielt eine bedeutende Rolle für die Pathogenese. Im Verlauf der Erkrankung kann es von einem relativen Insulinmangel zu einem absoluten Insulinmangel kommen (Renz-Polster and Krautzig 2008). Für die Pathogenese ist ein multifaktorielles Geschehen verantwortlich, jedoch ist aufgrund der Heterogenität der Patienten ein homogenes Konzept nicht möglich. Als Bindeglied zwischen Insulinsekretion und Insulinresistenz steht eine Inflammation verursacht durch potentielle Glukosetoxizität, Lipotoxizität, Amyloid-Toxizität oder einer Kombination davon. Hyperglykämie wird bei der potentiellen Glukosetoxizität demnach als Folge von IR und abnormer Insulinsekretion, sowie als direkter Verursacher gesehen. Die β -Zellen können die erhöhte Sekretionsrate nicht mehr aufrecht erhalten und es kommt zur „ β -Zell-Erschöpfung“ und damit zum Funktionsverlust. Im Muskel führt eine chronische Hyperglykämie zu einer verminderten Translokationsrate der Glukosetransporter und somit zu einer steigenden IR. Eine gesteigerte Lipolyse und hohe Konzentrationen an freien Fettsäuren hemmen die Glykolyse und den Glukosetransport (Starke 2000). Bei mehr als 90 % der Patienten mit T2DM können histologisch Amyloidfibrillen in den Pankreasinseln nachgewiesen werden. Das aus 37 Aminosäuren bestehende Insel-Amyloid-Polypeptid wird neben dem Insulin in den pankreatischen β -Zellen sezerniert. Ob dieses Peptid eine ursächliche Veränderung oder eine sekundäre Erscheinung ist, ist bislang noch nicht geklärt (Powers 2009)

1.3 Diabetes mellitus in der Kleintiermedizin

Diabetes mellitus gehört mit einer Inzidenz von 1 - 5 % zu einer der häufigsten endokrinologischen Erkrankungen in der Kleintiermedizin.

Während in der Humanmedizin eine Klassifikation in T1DM und T2DM vorgenommen wird und die jeweilige Klassifikation für die darauffolgende Behandlung sehr relevant ist, findet in der Tiermedizin eher die Einordnung in insulinabhängigen Diabetes mellitus (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) und in nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus statt. Der Grund dafür ist, dass die diagnostische Differenzierung von T1DM und T2DM beim Kleintier nicht einfach ist. Insulin-Sekretionstests werden selten durchgeführt, zudem ist deren

Interpretation schwierig. Ebenso sind Tests für eine Antikörper-Bestimmung in der Tiermedizin noch nicht verfügbar. Beim Hund gibt es drei Formen des DM. Bei der ersten Form handelt es sich aufgrund einer autoimmunen Zerstörung der β -Zellen um einen IDDM. Die Ätiologie ist mit dem humanen T1DM vergleichbar (Hoenig and Dawe 1992). Bei der zweiten Form findet man histologisch eine Zerstörung der Langerhans-Inseln aufgrund chronischer Pankreatitiden (Hoenig 2002). Die dritte Form steht im Zusammenhang mit Endokrinopathien. Oft sind hier Hündinnen im Diöstrus betroffen, die aufgrund der hohen Progesteronkonzentrationen einen DM entwickeln (Nelson 2005). Bei der Katze kommt ein autoimmunvermittelter DM äußerst selten vor. In einzelnen Fällen wurde eine T1DM ähnliche Form nach einer überstandenen Panleukämie beobachtet. Am häufigsten ist dieser Typ jedoch im Zusammenhang mit einem pankreatischen Adenokarzinom zu beobachten (Rand 1999). Für den felinen Diabetes mellitus existiert zweifellos eine multifaktorielle Ätiopathogenese. Bei der Katze wird häufig eine Amyloidablagerung in den Inselzellen vorgefunden. Bekannt ist dies aus der Humanmedizin beim T2DM (Nelson 2006). Die toxische Wirkung des Amyloids für eine β -Zellerstörung verantwortlich, weshalb sich bei der Katze in vielen Fällen aus einem NIDDM ein IDDM entwickelt (Rand and Marshall 2005; Nelson 2006). Somit ist eine sichere Einordnung in IDDM oder NIDDM schwierig, da sich aus einem NIDDM sehr oft ein IDDM entwickelt. Ebenso ist ein Wechsel beider Formen möglich. Dies wiederum macht eine Charakterisierung nahezu unmöglich (Nelson 2005).

1.3.1 Therapie in der Kleintiermedizin

Die derzeitige Therapie des Diabetes mellitus beim Kleintier besteht in den meisten Fällen aus einer Zufuhr exogenen Insulins und diätetischen Maßnahmen (Nelson 2005). Therapieziel ist es, eine Kontrolle über Blutzuckerschwankungen zu erlangen und somit die Symptome Hyperglykämie und Glukosurie sowie deren Begleitkomplikationen zu lindern. Im Falle eines IDDM ist eine Insulintherapie kombiniert mit einer Diät das Mittel der Wahl. Das Auftreten eines NIDDM bei der Katze stellt die Notwendigkeit der Insulintherapie in Frage. In diesen Fällen könnte der Einsatz oraler Antidiabetika in Kombination mit einer Diät Therapieerfolge bringen. Jedoch ist es, wie bereits oben beschrieben, prospektiv sehr schwierig einen NIDDM von einem IDDM zu unterscheiden. Demnach richtet sich die Therapie nach der Schwere der Symptome (Nelson 2006). Es sollten weitere Forschungen zur oralen antidiabetischen Behandlung bei Katzen durchgeführt werden, da für diese ein großes Interesse unter Tierbesitzern besteht. Ebenso könnten orale Antidiabetika das Risiko einer vom Menschen induzierten Hypoinsulinämie vorbeugen.

2 Nicht alkoholisch bedingte Steatohepatitis

2.1 Definition, Pathogenese

Die nicht alkoholisch bedingte Steatohepatitis (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) ist eine Form der nicht alkoholischen Fettlebererkrankungen (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) (Abbildung 2). Die Bezeichnung NASH wurde von *Ludwig et al.* im Jahr 1980 zum ersten Mal verwendet. Während eine einfache Steatose meist eine benigne Einlagerung von Triglyzeriden (TG) darstellt, kann eine NASH zu einer progressiven Leberzirrhose, portaler Hypertension und Leberkarzinomen führen (Ludwig, McGill et al. 1997). Klinisch weisen die Patienten häufig erhöhte Leberwerte (Aspartat-Aminotransferase, AST und Alanin-Aminotransferase, ALT) auf und die Diagnose kann durch Anamnese in Kombination mit einer Leberbiopsie gestellt werden. Einen Goldstandard zur Diagnose der NASH gibt es derzeit nicht (Duvnjak, Lerotic et al. 2007).

NAFLD weisen eine starke Assoziation mit Adipositas, Dyslipoproteinämie, IR, T2DM sowie Bluthochdruck auf und können demnach als hepatische Manifestation des MetS bezeichnet werden (Targher 2007). IR und oxidativer Stress sind entscheidende Faktoren, die zu einer Entwicklung einer NAFLD führen können (Angulo 2007). Dabei hat die IR eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese. Sie ist verantwortlich für das Zustandekommen einer Inbalance der Leberlipide (Abbildung 3). Zum einen strömen vermehrt freie Fettsäuren (FFS) durch Lipolyse des peripheren Fettgewebes in die Leber ein und die Liponeogenese wird gefördert, zum anderen sind Lipidabtransport sowie β -Oxidation in der Leber gehemmt. Die FFS wiederum lagern sich in der Leber in Form von TG ab (Adams, Angulo et al. 2005).

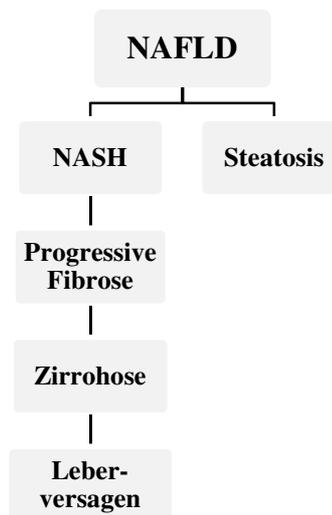


Abbildung 2: Verlaufsformen NAFLD (Ismail 2011)

Der einzige Weg die TG aus den Leberzellen zu schleusen ist der Abtransport mit Hilfe von Very Low Density Lipoproteinen (VLDL). Bei einer IR ist der absolute Export von TG erhöht, reicht jedoch nicht aus, weshalb sich vermehrt TG in den Leberzellen akkumulieren. Die hepatische Synthese von VLDL ist sehr komplex und bietet somit einen Angriffspunkt um von außen den Abtransport von TG zu limitieren (Neuschwander-Tetri 2006).

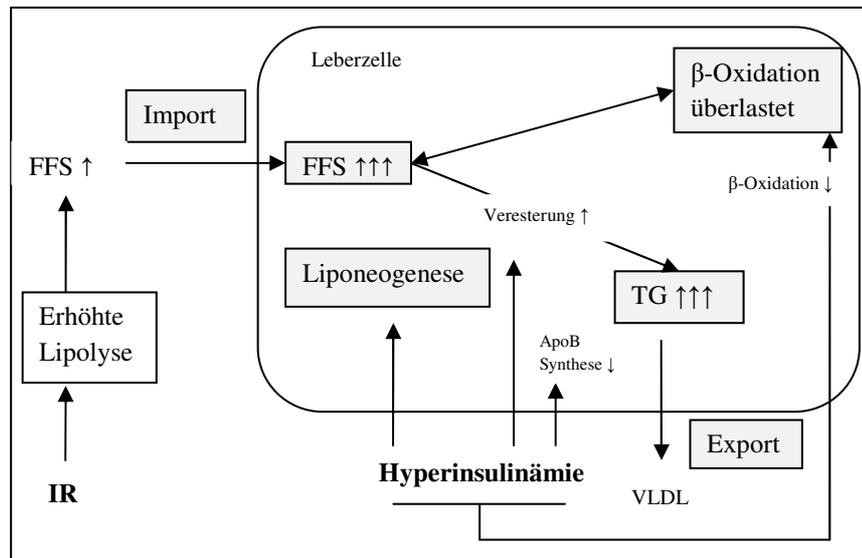


Abbildung 3: Effekte von IR und Hyperinsulinämie auf den Fettstoffwechsel in der Leberzelle; IR = Insulinresistenz; FFS = freie Fettsäuren; TG = Triglyzeride, VLDL = Very low density lipoprotein (modifiziert nach Duvnjak, Lerotic et al. 2007)

Pathogenese

Hyperglykämie und Hyperinsulinämie sind für ein gesteigertes Vorkommen von Sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) und Carbohydrate response element binding Protein verantwortlich. Beide Proteine fördern die Liponeogenese in der Leber. Durch die Aktivierung von SREBP1c wird vermehrt Malonyl-CoA produziert, dies wiederum inhibiert die β -Oxidation von FFS, was zu einem intrazellulären Überschuss an FFS führt. Ein Teil davon wird durch Veresterung zu Triglyzeriden umgebaut, welche sich wiederum in der Leber ablagern (Browning and Horton 2004). FFS tragen entscheidend zu der Entstehung einer IR bei. So aktivieren sie zusammen mit Zytokinen den Signalweg JNK1 (auch bekannt als MAPK8) (Hotamisligil 2006; Jaeschke and Davis 2007). Ist der Signalweg aktiviert, wird am Insulinrezeptor das Substrat 1 der inhibitorischen Bindungsstelle phosphoryliert, wodurch eine direkte IR entsteht. Durch die Induktion von Zytokinen, wie Tumor Necrose Factor α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6), bildet sich aufgrund deren Insulin antagonistischer Wirkung eine indirekte IR (Aguirre, Uchida et al. 2000). Durch Interleukine wird der Signalweg Nuclear Factor κ B (NF κ B) induziert. Dieser setzt zusätzlich Zytokine frei und verstärkt somit die indirekte IR (Rotter, Nagaev et al. 2003). Es entsteht ein Perpetuum mobile aus IR und NAFLD.

Die Lipotoxizität entsteht zum einen durch Peroxidation der freien Fettsäuren, als Folge von oxidativem Stress und zum anderen durch eine direkte Entzündungsreaktion, verursacht durch Zytokine. Durch diese Ereignisse kommt es zur Apoptose. Reaktionsendprodukte wie Aldehyde und Radikale aktivieren hepatische Sternzellen, welche vermehrt Kollagen Typ I produzieren und dadurch zu einer Degeneration von Leberzellen führen (Canbay, Taimr et al. 2003; Duvnjak, Lerotic et al. 2007). Einige Individuen sind in der Lage ihre antioxidative Abwehr so zu regulieren, dass die Entwicklung einer NASH verhindert werden kann (Larter, Chitturi et al. 2010).

NASH und Diabetes mellitus Typ 2

Die Prävalenz von T2DM beträgt 18 - 33 % bei Patienten mit NAFLD, umgekehrt leiden 49 - 62 % der Patienten mit T2DM an einer NAFLD. Patienten mit beiden Erkrankungen leiden an schwerwiegenden Stoffwechselstörungen, wie viszerale Adipositas, IR, hochgradige Dyslipidämie und hohen Inflammationsmarkern (IL-6, TNF). Zudem ist die Mortalitätsrate im Vergleich zu jenen Patienten, die keine NAFLD haben, verdoppelt. Adipöse T2DM Patienten haben eine 21 - 40 %ige Prävalenz eine NASH zu entwickeln. Man vermutet, dass mit dem Vorliegen von NAFLD bei gleichzeitigem T2DM das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen steigt. Diese stellen die Haupttodesursache bei T2DM-Patienten dar, wobei der genaue Mechanismus hierfür noch nicht geklärt ist (Smith and Adams 2011).

2.2 Histologie der Nicht alkoholisch bedingten Steatohepatitis

Die Histologie der NASH ist charakterisiert durch intrazelluläre makrovesikuläre Fetteinlagerungen, hepatozytäre Zellschäden und eine lobuläre Entzündung. Diese histologischen Erscheinungen sind vornehmlich in Zone 3 (perizentral) der Leberläppchen lokalisiert. Eine Fibrosierung muss nicht zwingend für die Diagnosestellung einer NASH vorhanden sein (Brunt and Tiniakos 2010; Tiniakos 2010).

Der Zellschaden zeigt sich in Form von hepatozytärer Ballonierung, Apoptose und Nekrose. Ballionierte Hepatozyten sind vergrößert und zeigen dünnes, blasses, geschwollenes Zytoplasma. Der Zellkern stellt sich groß, hyperchrom und mit vielen Nukleoli dar. Man geht davon aus, dass intrazelluläre Flüssigkeitsansammlungen und/oder ein toxischer Zellschaden dafür verantwortlich sind (Burt, Mutton et al. 1998). Eosinophile Apoptosekörperchen zeigen den Zelltod an und sind bei einer NASH immer vorhanden.

Die Entzündung mit gemischter Entzündungszellpopulation ist von lobulärem Charakter. Verstreute Mikrogranulome und Lipogranulome entstehen wenn einzelne Hepatozyten rupturieren, zu Fettzysten zusammen fließen und dadurch eine Entzündung hervorrufen (Brunt and Tiniakos 2010).

Eine Fibrosierung beginnt vornehmlich in der Zone 3 der Leberläppchen und tritt in Form eines unregelmäßigen Kollagen-Netzwerkes (sogenannte „Chicken-Wire“) auf. Bei fortschreitender Erkrankung entsteht eine Brückenbildung des Kollagens, welche bis hin zur Zirrhose führen kann. Durch Aktivierung von hepatischen Sternzellen zeigt sich wie auch in anderen Lebererkrankungen eine sinusoidale Kollagenansammlung (Ratzl, Giral et al. 2000; Dixon, Bhathal et al. 2001; Brunt and Tiniakos 2010).

Histologisch können zusätzlich noch Mallory-Denk-Körperchen, Megamitochondrien, glykogenhaltige Kerne und Leber-Siderose gefunden werden. Mallory-Denk-Körperchen sind eosinophile, intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen, die sich bei ballonierten Hepatozyten in der Nähe des Zellkerns befinden. Sie deuten auf eine erhöhte nekroinflammatorische Aktivität hin, sind allerdings nicht pathognomisch für eine NASH. Als adaptive Form der Mitochondrien entstehen durch Lipid-Peroxidation Megamitochondrien. Das Vorhandensein von glykogenhaltigen Kernen ist auf eine nichtalkoholische Ätiologie zurückzuführen. Oft kann auch eine milde Leber-Siderose festgestellt werden. Die Ursache und der Zusammenhang mit NAFLD sind zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht bekannt und werden erforscht (Brunt and Tiniakos 2010).

2.3 Methionin-Cholin defiziente Diät

Methionin ist eine Aminosäure, die für den Körper essentiell ist und exogen über die Nahrung zugeführt werden muss. Seit 1998 gehört Cholin offiziell ebenfalls zu den essentiellen Nährstoffen. Cholin kann jedoch im Vergleich zu Methionin durch *de novo* Synthese dem Körper zur Verfügung gestellt werden. Allerdings ist für diese Syntheseform Methionin von Nöten (Zeisel and da Costa 2009). Das Fehlen von Methionin und Cholin beeinflusst massiv die Synthese von Phosphatidylcholin. Phosphatidylcholin ist ein wichtiger Bestandteil von Lipidmembranen. Durch die fehlende Synthese von Phosphatidylcholin ist die Sekretion von VLDL vermindert und damit der TG-Export stark reduziert. Folge davon ist die hepatische Akkumulation von TG (Yao and Vance 1988) (Abbildung 3). Die Synthese von Phosphatidylcholin findet in der Leber auf zwei unterschiedlichen Wegen statt. Zum einen über CDP-Cholin (Cytidin-5'-Diphosphocholin, Citicolin) und zum anderen über Phosphatidylethanolamin Methylation. Dabei stellen Cholin und Methionin für beide Wege essentielle Bestandteile dar (Raubenheimer, Nyirenda et al. 2006) (Abbildung 4).

Die Methionin-Cholin defiziente Diät (MCDD) wird in der Forschung verwendet, um bei Nagetieren eine Steatohepatitis, welche einer NASH gleichkommt, zu induzieren. Charakterisiert ist diese durch starken oxidativen Stress und eine progressive perizelluläre Fibrose (Starkel and Leclercq 2011). Die Tiere verlieren bereits in den ersten drei Wochen bis zu 20 % ihres Körpergewichts. Das Gesamtcholesterin und die TG sinken im Serum, in der Leber entsteht eine makrovesikuläre Steatose. Die für eine NASH charakteristischen ballonierten Leberzellen sind vorhanden, genauso ist eine perizelluläre Fibrosierung zu

beobachten. Es entstehen massive Entzündungsherde, die mit hepatozellulärem Zelluntergang verbunden sind. Die aufzufindenden Entzündungszellen bestehen aus Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten (Tabelle 2).

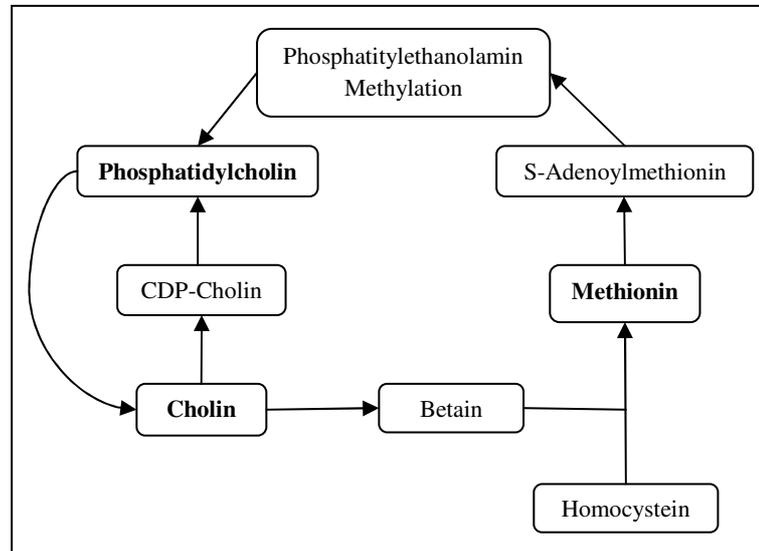


Abbildung 4: Zusammenhang zwischen Cholin, Methionin und Phosphatidylcholin (Raubenheimer, Nyirenda et al. 2006; Zeisel and da Costa 2009)

Bereits nach fünf Tagen MCDD-Aufnahme ist im Serum die ALT erhöht. Nach drei Wochen hat sich eine vollständige Steatohepatitis entwickelt, welche nach 10 Wochen in eine erhebliche Steatose aller Zonen des Leberläppchens mit Ausnahme der periportalen Region übergeht. Zu diesem Zeitpunkt sieht man die für eine NASH charakteristische Fibrosierung bekannt als „Chicken-wire“ (Larter and Yeh 2008).

A: Metabolischer Phänotyp			
Gewicht	Insulinresistenz	Adipokine	Lipide
↓↓↓	Nein Insulin↓ Glucose↓	Adiponektin ↑ Leptin ↓	GC ↓ TG ↓
B: Leberhistologie			
Steatose	Inflammation	Leberzellschaden	Fibrose
Makro-Vesikulär	Lymphozyten Neutrophile G.	Bollonierung Apoptose	Peri-zellulär

Tabelle 2: Durch MCDD verursachte Effekte nach 10 Wochen; GC = Gesamtcholesterin, TG = Triglyzeride (Larter and Yeh 2008; Starkel and Leclercq 2011)

3 Inkretin-Effekt

3.1 Definition

Als Inkretin-Effekt bezeichnet man das Phänomen, dass bei Erzielung gleicher Blutglukosespiegel die Insulinspiegel nach oraler Glukosezufuhr signifikant höher sind, als nach intravenöser Glukosegabe (Ranganath 2008). Diese Beobachtung machten *Zunz* und *LaBarre* bereits im Jahr 1929, jedoch wurden erst 1969 die hierfür verantwortlichen Hormone, die als Inkretine bezeichnet werden, entdeckt (Unger and Eisentraut). Nach oraler Glukosezufuhr werden ca. 50 - 70 % der Insulinsekretion über den Inkretin-Effekt gesteuert. Die zwei derzeit am besten untersuchten Inkretine sind zum einen das glukoseabhängige insulinotrope Peptid (GIP) und zum anderen das Glucagon-like Peptid-1 (GLP-1) (Baggio and Drucker 2007). Sezerniert werden diese von den enteroendokrinen K- und L-Zellen der Darmschleimhaut, welche nahrungsabhängig stimuliert werden. Zur Stimulation dienen Kohlenhydrate, Fette, sowie Eiweiße. Dabei produzieren K-Zellen GIP und L-Zellen GLP-1 (Martin, Deacon et al. 2011). Abgebaut werden GLP-1 und GIP durch das Enzym Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4). GLP-1-Rezeptoren befinden sich in vielen Geweben, unter anderem in Pankreas, Lunge, Herz, Nieren, Magen, Darm, Hypophyse, Haut und im Nervensystem (Baggio and Drucker 2007). Unter dem Inkretin-Effekt versteht man jedoch nur die Effekte, die für die Blutzuckerregulation verantwortlich sind. Die Insulinausschüttung ist aufgrund der nahrungsabhängigen Stimulation stets dem Glukosestatus angepasst. Damit entfällt das Risiko für Patienten, nach Behandlung mit auf Inkretin basierenden Antidiabetika, hypoglykämisch zu werden (Holst, Vilsboll et al. 2009).

Inkretin-Effekt und Diabetes Mellitus Typ 2

Studien zeigen, dass der Inkretin-Effekt bei T2DM-Patienten stark reduziert oder nicht vorhanden ist. Die GLP-1 Antwort nach Nahrungsaufnahme ist um bis zu 50 % bei Patienten mit T2DM im Vergleich zu gesunden Patienten reduziert. Bei adipösen Patienten wurde ebenfalls eine reduzierte GLP-1 Sekretion beobachtet. Wie genau es zu diesem Zusammenhang kommt, ist noch nicht bekannt. Eine fehlerhafte Inkretinsekretion im Zusammenhang mit T2DM ist jedoch wahrscheinlich. Bereits 1993 stellte *Nauck* fest, dass die intravenöse Gabe von hohen Mengen GLP-1 zu einer nahezu normalen Insulinantwort bei Patienten mit T2DM führt. GIP hingegen zeigt keinen Effekt (Holst, Vilsboll et al. 2009).

3.2 Glucagon-Like Peptid-1

GLP-1 ist ein Polypeptid, dessen Aminosäuresequenz durch das Proglukagon-Gen determiniert wird. Proglukagon wird in den α -Zellen des Pankreas, den L-Zellen des Darms und im Gehirn exprimiert. Es besteht aus 180 Aminosäuren und unterscheidet sich in seinen posttranslatorischen Prozessen gewebsspezifisch (Abbildung 5). Im Pankreas sind die Produkte der Prozessierung Glukagon, Glicentin-related Polypeptide (GRPP), Intervening Peptid-1 (IP-1) und das Major Proglucagon Fragment (MPGF). Bisher wurden GRPP, IP-1 und MPGF keine physiologische Bedeutungen im Pankreas zugeordnet, wohingegen Glukagon als Gegenspieler von Insulin eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Blutzuckerspiegels spielt. Die Expression von Proglukagon wird durch Fasten und Hypoglykämie induziert und durch Insulin inhibiert. In den L-Zellen der Darmschleimhaut und im Gehirn entsteht Glicentin, Oxyntomodulin (OXM), Intervening Peptid-2 (IP-2), GLP-1 und GLP-2. Die physiologische Funktion von GRPP in Darm und Gehirn ist noch nicht genau bekannt, bei Nagetieren scheint es jedoch einen trophischen Effekt im Darm zu besitzen. OXM inhibiert die enterogastrische Sekretion und Motilität und fördert die Glukoseaufnahme, sowie die Sekretion von pankreatischen Enzymen. Wie bei IP-1 ist auch bei IP-2 keine physiologische Bedeutung bekannt. GLP-1 besitzt, wie nachfolgend näher erläutert, eine Vielzahl glukoregulatorischer Funktionen. GLP-2 stimuliert in den intestinalen Krypten die Zellproliferation und inhibiert die Apoptose. Es fördert den Glukose Transport im Darm, verbessert die Darmschranke, inhibiert die Nahrungsaufnahme, die Magenentleerung, die Säuresekretion und fördert sowohl neuronale Proliferation, als auch die neuronale Überlebenszeit. Die Expression von Proglukagon in den L-Zellen wird durch Fasten reduziert und durch Nahrungsaufnahme gefördert. Es hat sich gezeigt, dass eine ballaststoffreiche Nahrung und hohe Anteile kurzkettiger Fettsäuren in der Nahrung die Proglukagonsynthese fördern. Ebenso erhöhen Gastrin-releasing peptide und GIP die mRNA Expression von Proglukagon in den enteroendokrinen Zellen der Maus (Baggio and Drucker 2007). Das initial 37 Aminosäuren umfassende und metabolisch inaktive GLP-1 wird nochmals N-terminal gespalten und zum Teil amidiert, so dass GLP-1(7-37) und GLP-1(7-36)amid entstehen, die die bioaktiven Peptidformen darstellen (Parker, Andrews et al. 1998). Im Plasma des Menschen liegt hauptsächlich die aktive Form GLP-1 (7-36)amid vor (80 %), hingegen ist in anderen Spezies (Ratte, Hund und Schwein) mit 50 - 60 % der Plasmaspiegel an GLP-1 (7-37) höher. In ihrer biologischen Funktion sind beide Formen identisch, außer dass GLP-1 (7-36)amid eine etwas längere C-terminale Halbwertszeit aufweist (Deacon 2004). Aufgrund der Degradierung durch DPP-4, zu GLP-1 Metaboliten, beträgt die Plasmahalbwertszeit des aktiven GLP-1 weniger als zwei Minuten (Baggio and Drucker 2007). Es wurde gezeigt, dass ca. 75 % des GLP-1, welches den Darm verlässt bereits zu den inaktiven Metaboliten umgewandelt wurde. Weitere 40 - 50 % werden in der Leber umgebaut, so dass ausschließlich 10 - 15 % des aktiven GLP-1 den systemischen Blutkreislauf erreichen. Grund dafür ist das Vorkommen von DPP-4 im Endothel (Lamina propria) der Kapillaren (Holst and Deacon 2005).

Der GLP-1 Rezeptor gehört zur B-Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranen Domänen und wird in vielen Organsystemen exprimiert. So findet man ihn nicht nur in den α - und β -Zellen des Pankreas, sondern auch im zentralen und peripheren Nervensystem, im Herz, den Nieren, der Lunge und dem Gastrointestinal Trakt. Bei Bindung von GLP-1 an den Rezeptor im Pankreas steigt der intrazelluläre Kalzium-Spiegel an, so dass die Exozytose von Insulin herbeigeführt wird. Ebenso werden durch Bindung an den Rezeptor die Insulin-Biosynthese und die β -Zellproliferation gefördert sowie die β -Zellapoptose gehemmt. Obwohl in den α -Zellen des Pankreas keine GLP-1 Rezeptoren vorhanden sind, wird die Glukagonproduktion inhibiert. Der genaue zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. Es steht aber fest, dass dieser Mechanismus glukoseabhängig ist und einen indirekten parakrinen Weg geht (Drucker and Nauck 2006; Holst, Vilsboll et al. 2009). Durch Aktivierung der Rezeptoren im Sphinkter des Pylorus verzögert sich die Magenentleerung in den Darm. Durch die verzögerte Magenentleerung und der daraus resultierenden Magendehnung werden Sättigungssignale ausgesendet. Im Gehirn wirkt GLP-1 als Neurotransmitter. Die höchsten GLP-1 Konzentrationen werden in der Region des Hypothalamus gemessen. Der Hypothalamus ist unter anderem für die Steuerung der Nahrungsaufnahme und des Appetits verantwortlich. Studien zeigen, dass GLP-1 Konzentrationen im Gehirn einen positiven Effekt auf das Lernzentrum haben. Über die Wirkung von GLP-1 in der Lunge ist noch nichts bekannt. Auch in Osteoblasten der Knochen und im Herzen konnten Rezeptoren gefunden werden. Um die genaue Wirkung zu verstehen, sind jedoch noch weitere Studien notwendig (Ranganath 2008; Holst, Vilsboll et al. 2009).

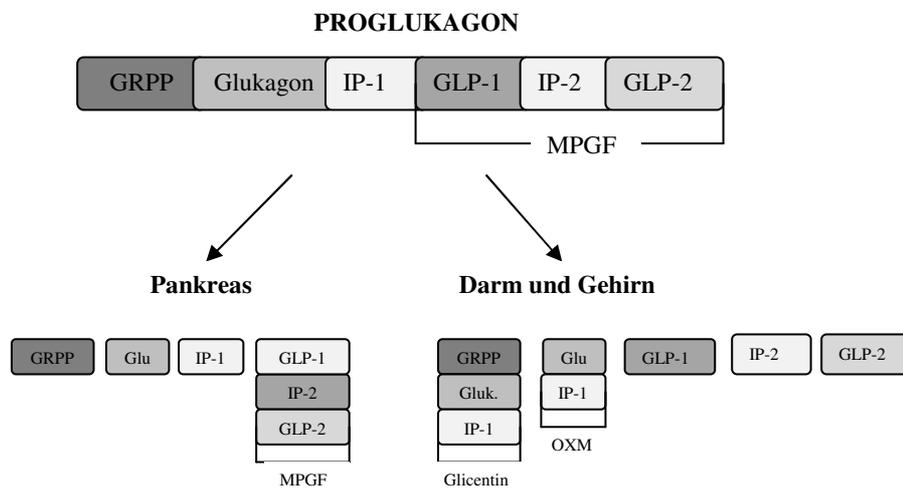


Abbildung 5: Gewebsspezifische Prozessierung des Proglukagonmoleküls; GRPP = Glicentin-related Polypeptide; IP-1 = Intervening Peptid 1; IP-2 = Intervening Peptid 2; GLP-1 = Glucagon-Like peptid 1; GLP-2 = Glucagon-Like peptid 2; MPGF = Major Proglucagon Fragment; Glu = Glukagon; OXM = Oxyntomodulin (Baggio and Drucker 2007; Zeisel and da Costa 2009)

GLP-1 und Inflammation

GLP-1 hat neben der Regulation des Blutzuckers noch weitere Funktionen. Diverse Studien schreiben GLP-1 *in vivo* und *in vitro* eine anti-inflammatorische Wirkung zu (Iwai, Ito et al. 2006; Hadjiyanni, Siminovitch et al. 2010; Hattori, Jojima et al. 2010; Marx, Burgmaier et al. 2010). Die Untersuchungen befassen sich hauptsächlich mit dem Effekt von GLP-1 auf die Immunabwehr. So zeigt eine durch GLP-1 Rezeptor Agonisten reduzierte Makrophageninfiltration der Niere positive Effekte auf T1DM bedingte Nephropathien am Rattenmodell (Kodera, Shikata et al. 2011). Desweiteren beeinflusst GLP-1 das Vorkommen von CD4⁺-T-Lymphozyten im entzündeten Gewebe. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien zeigen, dass sowohl GLP-1 Rezeptor Agonisten als auch DPP-4 Inhibitoren die Überlebenszeit von pankreatischen Inselzellen bei vorliegendem T1DM verlängern. So wird durch eine Sitagliptin-Behandlung von Mäusen die Autoimmunantwort nach Inselzell-Transplantation signifikant reduziert (Kim, Nian et al. 2009). Eine Studie von *Pugazhenti et al.* zeigt zudem in humanen Inselzellen eine reduzierte Entzündung in Verbindung mit GLP-1, aufgrund reduzierter Aktivierung des zyklischen AMP Signalwegs (2010). *In vivo* untersuchten *Hogan et al.* die Auswirkung eines GLP-1 Rezeptor Agonisten auf die Entwicklung von Psoriasis. Sie vermuteten, dass GLP-1 eine direkte Wirkung auf CD8⁺-T-Lymphozyten hat und somit zu einer klinischen Besserung der Psoriasis führt (2011).

3.3 Dipeptidylpeptidase-4

DPP-4, auch bekannt als CD26, gehört zu den Serinproteasen, einer Unterfamilie der Peptidasen. Die Einteilung in diese Gruppe beruht auf der Zusammensetzung des aktiven Zentrums. Dieses wird bei den Serumpeptidasen als katalytische Triade bezeichnet. Bei DPP-4 besteht sie aus den Aminosäuren Serin, Aspariginsäure und Histidin und befindet sich auf dem C-terminalen Teil des Enzyms (Mentlein 1999). DPP-4 sitzt auf der Zelloberfläche und besteht aus drei Domänen. Einer intrazellulären Domäne mit N-Terminus, einer transmembranen und einer aktiven extrazellulären Domäne am C-Terminus. Zudem existiert eine freie Form von DPP-4 in Körperflüssigkeiten. Dieser fehlt der intrazelluläre und transmembrane Teil. Der aktive C-terminale Teil ist verantwortlich für die Inaktivierung vieler bioaktiver Peptide. Dies geschieht durch die Abspaltung von Dipeptiden am N-Terminus des Substrates, welche vornehmlich stattfindet, wenn sich an zweiter Stelle der Aminosäuresequenz des Substrates ein Prolin- oder Alaninrest befindet (Lambeir, Durinx et al. 2003) (Abbildung 6). Neben der Spaltung von GLP-1 aus der Glukagon Familie besitzt DPP-4 noch weitere Substrate (Tabelle 3).

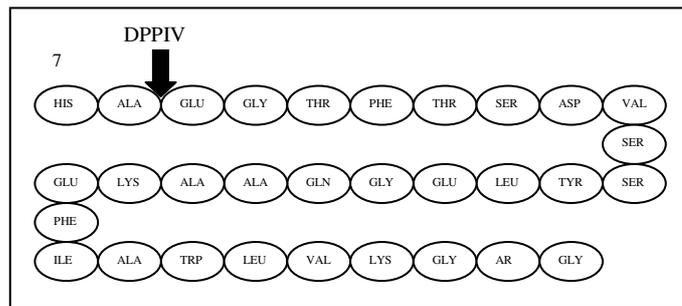


Abbildung 6: Struktur von GLP-1 und proteolytische Interaktion durch DPP-4 (Raubenheimer, Nyirenda et al. 2006; Ranganath 2008)

DPP-4 kommt in vielen Organen des Körpers vor und unterscheidet sich stark in der jeweiligen Expressionsmenge. Zusätzlich findet man DPP-4 auch im zentralen und peripheren Nervensystem, in der Samenflüssigkeit, sowie in Fibroblasten und lymphatischen T-Zellen. Da bei Aktivierung von T-Zellen die Expressionsrate von DPP-4 ansteigt, besteht derzeit ein starkes Interesse in der Inflammationsforschung (Lambeir, Durinx et al. 2003). Nicht nur über die Immunzellen greift DPP-4 in diverse Entzündungsreaktionen ein, sondern auch die diversen DPP-4 Substrate sind an Inflammationsprozessen beteiligt. So zeigen sich niedrige Verhältnisse von Serotonin und dem Peptid YY bei der chronischen Darmerkrankung „Irritable Bowel Syndrome“ (El-Salhy, Gundersen et al. 2011). Dem Substrat vasoaktives Peptid werden sowohl anti-inflammatorische, als auch pro-inflammatorische Effekte zugeschrieben (Huang, Tang et al. 2011). Eine weitere anti-inflammatorische Rolle spielt PACAP bei Atemwegsentzündungen (Elekes, Sandor et al. 2011). Bei zentralnervösen Erkrankungen stehen Substanz P und Neuropeptid als DPP-4 Substrate im Interesse der Entzündungsreaktion (Ferreira, Santos et al. 2011)

Tabelle 3: SUBSTRATE für DPP-4 (Mentlein 1999; Lambeir, Durinx et al. 2003)

Pankreatische Polypeptide	Pankreatisches Polypeptid Neuropeptid Y Peptid YY
Substanz P	
β-Casomorphin	
Analgetische Peptide im Gehirn	Endomorphin-2 Endomorphin-1 Kentsin Tyr-Melanostatin
Glukagon Familie	Glukagon GLP-1 GLP-2 GIP Sekretin Vasoaktives Peptid (VIP) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) Growth hormone-releasing factor (GRF) Peptide histidine methionine (PHM)
Bradykinin	
Interleukine	Interleukin 1β Interleukin2
Insulin-like growth factor (IGF-1)	
Humanes Choriongonadotropin	

3.3.1 DPP-4 Inhibitoren

In den 90er Jahren wurde erstmals L-Threo-Isoleicylthiazolidine am Mausmodell zur Inhibition von DPP-4 verwendet. Darauf folgten rasende Fortschritte in der Entwicklung von DPP-4 Hemmern (Zettl, Schubert-Zsilavec et al. 2010).

Aufgrund der Gruppenzugehörigkeit kann DPP-4 mehr oder weniger effektiv durch Hemmer der Serinproteasen inhibiert werden. Diese Hemmung beruht auf einer kovalenten Bindung an das aktive Zentrum. Als Beispiel können Diisopropyl-Fluorophosphat als sehr potenter Inhibitor, Sulfonylfluorid als relativ uneffektiver Inhibitor und E600 als schwacher Inhibitor von DPP-4 genannt werden. Metallische Ionen wie Pb^{2+} , Hg^{2+} und Zn^{2+} zeigen eine starke Wirkung als DPP-4 Hemmer. Andere Serinprotease-Hemmer haben jedoch keinen Effekt auf die DPP-4-Aktivität gezeigt. Das Interesse liegt jedoch nicht bei den Serinprotease-Inhibitoren, sondern bei spezifischen Hemmern der DPP-4 Aktivität (Mentlein 1999). Als spezifische DPP-4 Inhibitoren sind in Deutschland derzeit die Wirkstoffe Sitagliptin, Vildagliptin, Saxagliptin und Linagliptin zugelassen, wobei Linagliptin noch nicht auf den deutschen Markt gebracht wurde. Die Wirkstoffe kommen in der Therapie von T2DM zum Einsatz. Sitagliptin,

Vildagliptin und Linagliptin sind sowohl als Mono-, als auch als Kombinationspräparate mit Metformin erhältlich (EMA 2011; Rote Liste 2012). Da die Degradierung von GLP-1 durch DPP-4 stattfindet kann durch dessen Hemmung ein GLP-1 Abbau verhindert werden. So wird die Konzentration von aktivem GLP-1 im systemischen Blutkreislauf als auch in der Lamina propria der Darmschleimhaut durch DPP-4 Inhibitoren um den Faktor 2-3 gesteigert (Holst and Deacon 2005).

3.3.1.1 Sitagliptin

Sitagliptin ist der erste kommerzielle DPP-4 Hemmer (Abbildung 7). Derzeit ist er in Deutschland als Monopräparat (Januvia®, Xelevia®) und als Kombinationspräparat mit Metformin (Janumet®, Velmetia®) erhältlich (Rote Liste 2012).

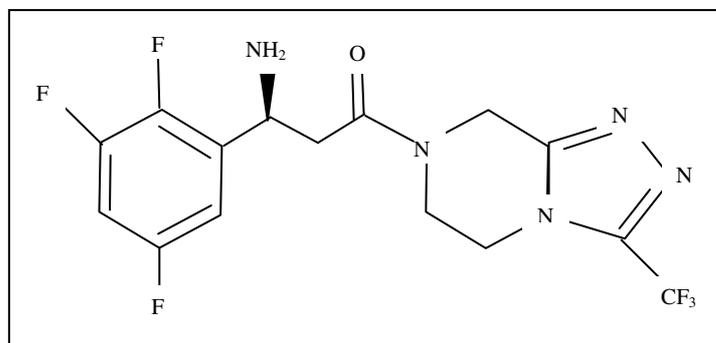


Abbildung 7: Strukturformel von Sitagliptin (Drucker and Nauck 2006)

Sitagliptin ist ein kompetitiver, reversibler und spezifischer DPP-4 Inhibitor. Er weist eine enge Bindung zum Substrat auf (Davis, Singh et al. 2010). Sitagliptin unterläuft keinen starken Metabolismus. Pharmakokinetische Untersuchungen mit [¹⁴C]markiertem Sitagliptin zeigen, dass ca. 87 % der verabreichten Dosis über die Nieren mit dem Urin ausgeschieden werden und die restlichen 13 % mit den Fäzes. Von der Gesamtmenge werden nur ca. 16 % durch CYP3A4 oder CYP2C8 metabolisiert. Der Beitrag des Isoenzym von P450 am Sitagliptinmetabolismus ist allerdings so gering, dass dadurch keine Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten befürchtet werden müssen. Ebenso ist die Bindung an Plasmaproteine mit 38 % so niedrig, dass keine wechselseitigen Wirkungen zu erwarten sind. *In vitro* Studien zeigen eine Plasmahalbwertszeit ($T_{1/2}$) von 8 bis 14 Stunden und eine Konzentrationshöchstmenge (T_{max}) von ein bis vier Stunden. Mit Hilfe der Transporter human organic anion transporter 3 (hOAT3), Organic anion transporting polypeptide (OATP4C1) und multidrug resistant P-Glykoprotein (MDR1) wird Sitagliptin über die Nierentubuli aktiv ausgeschieden (Scheen 2010) (Tabelle 4).

Sitagliptin entfaltet eine Reihe positiver, pharmakodynamischer Wirkungen bei Patienten mit T2DM. So sinken bei langfristiger Therapie sowohl die Nüchternblutglukosespiegel, postprandiale Glukosewerte als auch der HbA_{1c}. Der Anteil des HbA_{1c} am gesamten Hämoglobin ist klinisch für die Kontrolle der

Einstellung eines DM von Bedeutung. Weiterhin ist Sitagliptin in der Lage die Triglyceride, den systolischen und diastolischen Blutdruck und den Entzündungsmarker CRP (C-reaktives Protein) zu senken. Außerdem kann bei der diabetischen Nephropathie eine verminderte Albuminausscheidung ohne gleichzeitige Reduktion der glomerulären Filtrationsrate unter Sitagliptintherapie verzeichnet werden. Sitagliptin zeigt sich als gewichtsneutral und verbessert die β -Zell Funktion (Gallwitz 2007; Hattori 2011).

Tabelle 4: Pharmakokinetik von Sitagliptin (Scheen 2010)

T_{\max}	1 - 4 h	Ausscheidung im Urin	87 %
$T_{1/2}$	12,4 h	Unmetabolisierte Fraktion	79 %
Renale Clearance	70 %	Sekretion über Nierentubuli	ja
Primäre Metaboliten	6	Substrat für P-Glykoprotein	ja
Bioverfügbarkeit	87 %	Substrat für CYP3A4	gering
Proteingebunden	38 %	Substrat für CYP2C8	sehr gering
Fäkale Ausscheidung	13 %	Effekt auf Nahrung	nein

II Zielsetzung der Arbeit

Liegt bei einem Patienten das MetS vor, besteht ein fünffach erhöhtes Risiko an einem T2DM zu erkranken. Des Weiteren leiden viele T2DM Patienten an einer NAFLD. Ein neuer Ansatz in der oralen Antidiabetestherapie beschäftigt sich mit dem Inkretin System. So finden GLP-1 Analoga und DPP-4 Inhibitoren ihren therapeutischen Einsatz. Die Effekte von GLP-1 Analoga und DPP-4 Inhibitoren auf die Glukosehomöostase sind bereits sehr gut erforscht. Sitagliptin war der erste zugelassene DPP-4 Inhibitor in Deutschland und zeichnet sich durch eine sehr spezifische Hemmung der DPP-4 aus. Aufgrund des häufigen Auftretens einer NASH in Zusammenhang mit einem T2DM, stellt sich die Frage, inwieweit Sitagliptin in den Krankheitsprozess der NASH eingreift. Die Effekte von Sitagliptin bei einer NASH wurden bisher noch nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Tierversuch an Mäusen die Auswirkungen von Sitagliptin auf eine diätinduzierte NASH zu untersuchen.

Es wurden folgende Hypothesen mit Hilfe verschiedener Versuchsansätze geprüft:

- Sitagliptin ist gewichtsneutral und hat keinen Effekt auf die Blutglukosespiegel bei einer NASH.
- Sitagliptin vermindert die Leberverfettung im Zusammenhang mit einer NASH.
- Sitagliptin zeigt anti-inflammatorische Wirkungen auf eine NASH.
- Sitagliptin vermindert das Ausmaß der Leberfibrose.

Zur Prüfung der Hypothesen kamen zwei Versuchsprotokolle zu Anwendung. Zum einen ein Protokoll, bei dem durch eine sehr kurze Versuchsdauer mögliche Einflüsse des Diät-induzierten Gewichtsverlusts auf die Sitagliptintherapie minimiert wurden und zum anderen ein Protokoll über elf Wochen, bei dem die Entwicklung verschiedener Krankheits-assoziiertes Parameter bis hin zur Ausbildung der Leberfibrose beobachtet werden konnte.

III Material und Methoden

1 Material

Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose, LE	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Ammoniumperoxidsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Complete, Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
DEPC-Wasser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desoxycholsäure	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim, Deutschland
DNA-Marker (100 bp)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTP Set (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig (C ₂ H ₄ O ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut (C ₂ H ₆ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (1 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Flüssigstickstoff	Linde, München, Deutschland
Glycerin >98 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H-Gly-Pro-pNa HCl	Bachem, St. Helens, Großbritannien
Isofluran	Abott, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol (>99,8 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchloridlösung steril, 0,9 %	Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma, Steinheim, Deutschland
NuPAGE [®] Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
peqGold prestained Protein-Marker V	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Steinheim, Deutschland
p-Nitroanilin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad, München, Deutschland
Roti [®] -Histofix 10 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ROX Reference Dye	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (37 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green I	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Temed	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek [®] , O.C.T. [™]	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tween-20	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Xylencyanol

Roth, Karlsruhe, Deutschland

Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt mit bidestilliertem Wasser (H_2O_{dd}) hergestellt. Bei fehlender Angabe des pH-Wertes handelt es sich um ein neutrales Milieu. Die Einstellung der jeweiligen pH-Werte erfolgte mit Salzsäure (1 M HCl).

APS (10 %)

10 % (m/v) APS, Aliquots bei $-20^{\circ}C$ gelagert

Blockinglösung

5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T

Complete Stocklösung 25x

1 Tablette Complete, 2 ml Aqua bidest

Dithiothreitol (DTT-Stocklösung)

6,5 M, Aliquots bei $-20^{\circ}C$ gelagert

DPP4 Substratlösung

1 mM H-Gly-Pro-pNa HCL in 50 mM Tris Puffer (pH 7,5)

Homogenisationspuffer

25 mM Hepes, 140 mM NaCl, 80 mM $MgCl_2$, 1% Triton X-100, (pH 7,8)

Homogenisationspuffer mit Inhibitoren

Homogenisationspuffer, 4% Complete, 0,5 % PMSF

Ladepuffer DNA 6x

10 mM Tris (pH 7,6), 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 0,03 % (w/v) Xylencyanol, 60 % (v/v) Glycerin, 60 mM

Laufpuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS (pH 8,3)

Lysepuffer 2x

5 % (v/v) Trenngelpuffer, 2 % (v/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin

Lysepuffer 1x mit Inhibitoren	50 % (v/v) Lysepuffer 2x, 4 % Complete, 0,5 % PMSF, 2 mM NaF, 1 mM Na ₃ VO ₄
Natriumfluorid (NaF)	200 mM (w/v)
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	200 mM (w/v)
Paraformaldehydlösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
PBS 10x (pH 7,4)	1,37 M NaCl, 26,8 mM KCl, 81 mM Na ₂ HPO ₄ , 14,7 mM KH ₂ PO ₄
PBS 1x (pH 7,4)	10 % (v/v) PBS (10x)
PMSF	200 mM (w/v)
p-Nitroanilin Standard	1 mM p-Nitroanilin in 50 mM Tris Puffer (pH 7,5), erhitzen
Reagent Diluent (pH 7,4)	10 % (v/v) PBS (10x), 1 % (w/v) BSA
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris
SDS-Lösung (10 %)	10 % (w/v)
SDS-Probenpuffer 6x (Laemmli)	0,375 M Tris-HCL (pH 6,8), 12 % (w/v) SDS, 60 % (v/v) Glycerin, 0,012 % (w/v) Bromphenolblau, 65 mM DTT
TAE 1x	2 % (v/v) TAE (50x)

TAE 50x	2 M Tris, 1 M Eisessig, 0,05 M EDTA
TBS-T 1x	10 % (v/v) TBS (10x), 0,1 % Tween-20
Transferpuffer 1x	5 % (v/v) NuPAGE® Transferpuffer (20x)
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1 M Tris
Tris-HCL Puffer 50 mM (pH 7,5)	50 mM Tris (w/v)

Gele

Agarose- Gel (1 %)	Agarose LE in TAE 1x, Ethidiumbromid
Sammelgel (5 %)	5 % Acrylamid, 0,5 M Tris (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % Ammoniumperoxidsulfat, 0,1 % Temed
Trenngel (8 %)	8 % Acrylamid, 1 M Tris (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,1 % Ammoniumperoxidsulfat, 0,1 % Temed
Trenngel (12 %)	12 % Acrylamid, 1 M Tris (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,1 % Ammoniumperoxidsulfat, 0,1 % Temed

Kits

Bei den angewendeten Kits wurde nach Protokoll des Herstellers mit den gelieferten Lösungen und Puffern gearbeitet.

ALAT (GPT) FS	DiaSys, Holzheim, Deutschland
ASAT (GOT) FS	DiaSys, Holzheim, Deutschland
Cholesterin FS	DiaSys, Holzheim, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript III First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate Thermo Scientific, Rockford, USA

Triglyceride FS DiaSys, Holzheim, Deutschland

Enzyme

Bei der Verwendung von Enzymen wurden die vom Hersteller empfohlenen und gelieferten Lösungen und Puffer eingesetzt.

AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase (5 U/ μ l) Applied Biosystems, Carlsbad, USA

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (1 U/ μ l) Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/ μ l) Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Antikörper

Anti-Aktin aus Kaninchen (A2066) Sigma, Steinheim, Deutschland

Anti-Rabbit Cell Signaling, Danvers, USA

NF- κ B p65 aus Kaninchen Cell Signaling, Danvers, USA

Phospho-NF- κ B p65 aus Kaninchen Cell Signaling, Danvers, USA

PCR-Primer

	Sequenz (5'-3')
GAPDH (mm) forward	CCCTTCATTGACCTCAACTA
GAPDH (mm) reverse	AGATCCACGACGGACACATT
Col1a1 (mm) forward	TCTGACTGGAAGAGCGGAGAG
Col1a1 (mm) reverse	GGCACAGACGGCTGAGTAGG
aSMA (mm) forward	TGACAGAGGCACCACTGAACC
aSMA (mm) reverse	TCCAGAGTCCAGCACAATACCAGT

LightCycler Primer Sets

Zielgen	Primer / Sonde	Sequenz (5'-3')
MCP-1 (mm)	forward	CTTCTGGGCCTGCTGTTCA
	reverse	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
	Sonde	FAM-CTCAGCCAGATGCAGTTAACGCCCC-TAM
18S (mm)	forward	CGGCTACCACATCCAAGG
	reverse	GCTGCTGGCACCAGACTT
	Sonde	FAM-CAAATTACCCACTCCCGACCCG-TAM

Gene Expression AssayTNF- α (Maus)

Applied Biosystems, Carlsbad, USA

Tiere

C57BL/6J

Charles River, Wilmington, USA

Tierfutter

EF R/M TD90262 MCD

ssniff, Soest, Deutschland

EF R/M TD90262 MCD + 0,3 %
Sitagliptin

ssniff, Soest, Deutschland

ssniff® Alleinfuttermittel für Ratten
und Mäuse

ssniff, Soest, Deutschland

Computerprogramme

Excel

Microsoft Corporation

ImageJ

Wayne Rasband

Magellan™ 2 Data Analysis Software

Tecan, Crailsheim, Deutschland

Word

Microsoft Corporation

Geräte

Bio Photometer plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Blutzuckermessgerät Contour®	Bayer Consumer Care, Basel, Schweiz
Cell Disruptor	Branson Sonifier, Danbury, USA
Curix60	AGFA, Düsseldorf, Deutschland
Elektrophoresekammer	C.B.C. Scientific.Co, California, USA
Electrophoresis power supply	Consort, Turnhout, Belgien
Gelgießstand	Bio-Rad, München, Deutschland
Mastercycler® ep Realplex	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Bedfordshire, England
MultiDoc-It™ Imaging System	UVP, Cambridge, England
PCR Sprint Thermal Cycler	Thermo Electron Corporation, Dreieich, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Pac™ Basic	Bio-Rad, München, Deutschland
Sunrise™ ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
X Cell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Zentrifugen

Heraeus Pico 17	Thermo Electron Corporation, Dreieich, Deutschland
Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Waagen

CS 200	OHAUS, Nänikon, Schweiz
H 64	Mettler, Gießen, Deutschland
PL200	Mettler, Gießen, Deutschland
TE 412	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Verbrauchsmaterial / Sonstiges

Blotting Schwämme	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Chromatografie Papier	Whatman, Kent, England
Contour Sensoren zur Blutzuckermessung	Bayer Consumer Care, Basel, Schweiz
Duran Bechergläser	VWR, Bruchsal, Deutschland
Einbettgeschälchen	Polysciences Inc., Warrington, USA
Einmalkanülen 16G, 20G, 30G	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Küvetten, Plastikbrand [®] , PMMA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritzen 1 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fuji Medinal X-Ray	Fujifilm Europe, Düsseldorf, Deutschland
Heatsealing Film	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multiwell-Platten (96-well)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na-Heparin-Kapillarpipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Objektträger SuperFrost Plus	Thermo Scientific, Rockford, USA
PCR-Softtubes 0,5 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Präparierbesteck	Fine Science Tools, Foster City, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Safelock tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Stößel 1,5 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Transfermembran Immobilon-P	Zefa-Laborservice, Harthausen, Deutschland
Twin.tec PCR plate 96, skirted	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2 Methoden

2.1 Tiermodell

In der vorliegenden Studie wurden männliche Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Inzuchtstamm, welcher speziell für Forschungszwecke gezüchtet wird. C.C. Little züchtete diesen Stamm erstmals im Jahr 1921. Heute stellt dieser Stamm die in der Wissenschaft meist verwendete Mauslinie dar. Die Tiere wurden konventionell in einem offenen Regalsystem gehalten. Standardisiert erhielten die Tiere Nistmaterial und Pappröllchen als Versteckmöglichkeit. Da metabolische, endokrine, immunologische sowie diverse Verhaltensparameter einer circadianen Rhythmik unterliegen, wurde im Tierstall ein konstantes Lichtregime geführt mit je 12 Stunden Hell- und 12 Stunden Dunkelphase. Futter und Wasser wurde den Tieren ad libitum zur Verfügung gestellt. Da Mäuse zu den sozialen Tierarten gehören, wurde versucht, soweit es möglich war, sie zu zweit oder zu dritt unterzubringen. Nach Lieferung der Tiere folgte eine Eingewöhnungszeit. Um den Gesundheitszustand der Tiere zu beurteilen, wurde regelmäßig das Verhalten und die Körperhaltung der Tiere beurteilt. Ebenso wurden die Tiere mindestens einmal pro Woche gewogen um anormale Gewichtsschwankungen, welche zum Beispiel durch Zahnfehlstellungen zustande kommen können, schnell zu erkennen. Zur Identifikation der einzelnen Tiere erhielten die Mäuse Ohrclips. Die Versuche wurden mittels Tierversuchsantrag Nr. 55.2-1-54-2531-93-08 von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Eine Maus hat ein Gesamtblutvolumen von ca. 70 - 80 ml/kg Körpergewicht. Es wurde stets darauf geachtet, dass bei den einzelnen Blutentnahmen nicht mehr als 10 % des Gesamtblutvolumens entnommen wurde und die Entnahmemenge im Zeitraum von 14 Tagen 20 % nicht überschritt. Zur Entnahme wurden die Tiere mit Isofluran betäubt und zwei verschiedene Entnahmetechniken angewandt. Zum einen die Blutgewinnung durch Punktion der lateralen Schwanzvene und zum anderen die retrobulbäre Blutentnahme. Bei letzterer wurde mittels Na-Heparin-Kapillarpipetten der retrobulbäre Venenplexus eröffnet und das Blut mittels der Kapillare entnommen. Da eine Heilung in der Regel zwei Wochen dauert, wurde bei erneuter retrobulbärer Entnahme in diesem Zeitraum das andere Auge gewählt. Das entnommene Blut wurde direkt auf Eis gelagert und unter Kühlung (4 °C) 15 min bei 3000 rpm (Mikro 200R) zentrifugiert. Das Serum wurde abpipetiert und bei -80 °C gelagert.

Zu Versuchsende wurden die Tiere nach finaler Blutentnahme unter Anästhesie mittels zervikaler Dislokation getötet. Post mortem wurden Organe für weitere Untersuchungen schnellstmöglich entnommen und in flüssigem Stickstoffschockgefroren. Danach wurden die Organe bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

In der Eingewöhnungszeit erhielten die Tiere ssniff® Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse, sowie Wasser ad libitum. Zu Versuchsbeginn erfolgte eine

Futterumstellung auf eine MCD-Diät (EF R/M TD90262). In beiden Versuchen gab es zwei Tiergruppen (Kontrollgruppe und Sitagliptin-Gruppe), wobei die Sitagliptin-Gruppe die gleiche MCD-Diät, jedoch mit einem 0,3 % igen Sitagliptingehalt, erhielt.

2.1.1 Versuchsprotokoll I

Dieser Versuch diente als Vorversuch um die Wirkung des Diätfuttermittels mit und ohne Sitagliptin auf die DPP-4 Aktivität zu testen. Es wurden zehn Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Die Tiere waren bei Lieferung ca. acht Wochen alt und erhielten eine Eingewöhnungszeit von einer Woche. Zu Versuchsbeginn hatten die Tiere ein durchschnittliches Gewicht von 22,6 g. Die Versuchsdauer erstreckte sich über vier Tage. Am Tag 0 fand die erste Blutentnahme und ein Matching in zwei Gruppen anhand des Gewichts statt. Beide Gruppen erhielten daraufhin die Futterumstellung auf MCD-Diät. Hierbei wurde der Sitagliptin-Gruppe das Futter mit der 0,3 %igen Sitagliptinkonzentration gefüttert. An den drei darauf folgenden Tagen wurden die Tiere täglich zur selben Zeit gewogen und Blut entnommen. Am letzten Tag erfolgte die Tötung und die Entnahme von Lebern und Nieren, welche sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Aus Blutserum und Organlysaten fand die Bestimmung der DPP-4 Aktivität statt (Abbildung 8).

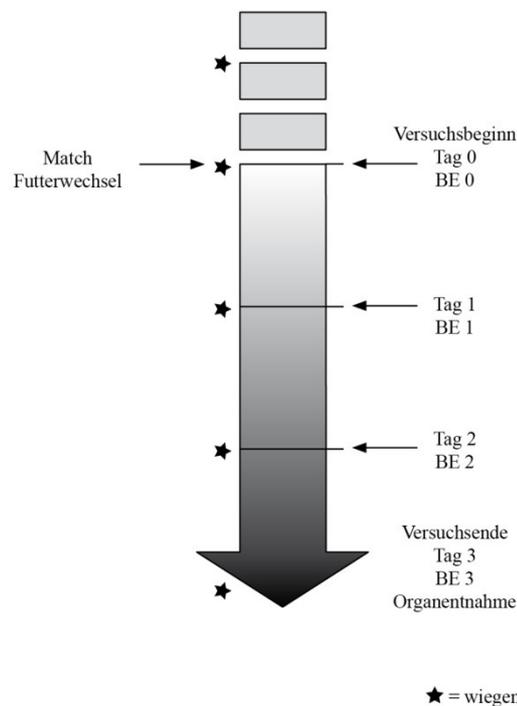


Abbildung 8: Versuchsprotokoll I; BE = Blutentnahme

2.1.2 Versuchsprotokoll II

Im Versuchsprotokoll II wurden 24 Tiere, ebenfalls vom Stamm C57BL/6J, verwendet. Die Tiere wurden im Alter von ca. 24 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von 30 g geliefert. Bis zum Versuchsbeginn hatten die Mäuse ca. drei Monate Eingewöhnungszeit.

Auch bei diesem Versuch fand zu Versuchsbeginn ein Matching der Tiere statt. Dabei wurden sie anhand von Gewicht, Nüchternblutglukose und Serumspiegel von Gesamtcholesterin und Triglyzeriden gleichmäßig in zwei Gruppen aufgeteilt (n=12 Tiere/Gruppe). Wie im Protokoll I erfolgte nach dem Matching die Futterumstellung. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich die MCD-Diät und die Sitagliptin-Gruppe die MCD-Diät mit zugesetztem Sitagliptin (0,3 %). Zum Zeitpunkt Null, nach vier, acht und elf Wochen erfolgte jeweils eine Blutentnahme. Die Tiere wurden ca. 12 Stunden vor der jeweiligen Blutentnahme in neue Käfige ohne Futter und mit Zugang zu Wasser umgesetzt. Nach Versuchsende wurde den Tieren post mortem Lebern und Nieren entfernt. Die Lebern wurden gewogen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, wobei die Nieren direkt schockgefroren wurden. Anschließend wurden die Organe bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung konserviert (Abbildung 9).

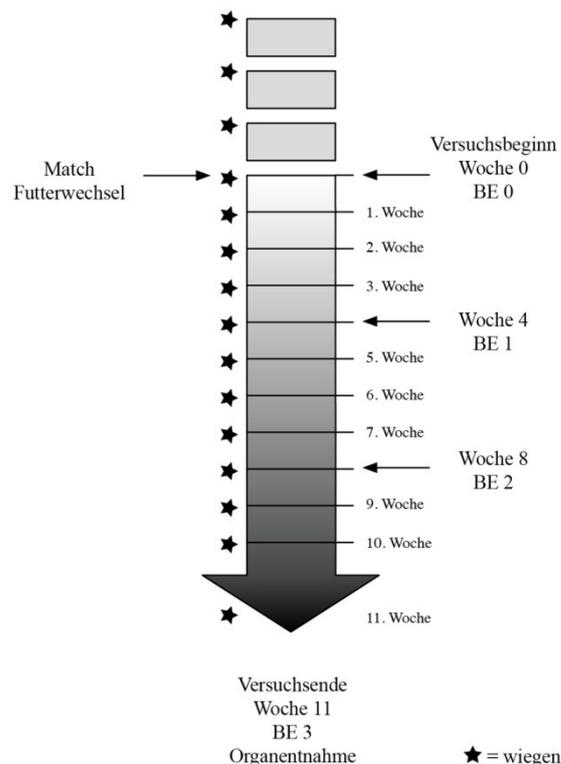


Abbildung 9: Versuchsprotokoll II; BE = Blutentnahme

Mit dem gewonnenen Serum erfolgte eine systemische Auswertung von Nüchternblutglukose, DPP-4 Aktivität, Lipidstatus (GC, TG) und Transaminasen (AST/ALT, einmalig zu Versuchsende). In den Lebern wurde die DPP-4 Aktivität, Lipidstatus und die Expression von Inflammationsmarker (MCP-1 und

TNF α) analysiert. Ebenso wurde die Aktivierung des NF κ B Signalweges in den Lebern untersucht. Zusätzlich fand hier eine histologische Untersuchung zur Charakterisierung des Leberschadens statt. In den Nieren wurde ausschließlich die Aktivität der DPP-4 bestimmt.

2.2 Nüchternblutglukose

In der vorliegenden Studie wurde die Nüchternblutglukose über den gesamten Studienverlauf mit Hilfe des Contour® Blutzuckermessgerätes bestimmt. In einer Studie von *Harrison et al.* (2011) wurde die Genauigkeit des Gerätes ermittelt. Als Ergebnis zeigte sich, dass das Gerät nicht nur die Mindestgenauigkeit der derzeitigen ISO-Norm erfüllte, sondern die gestellten Kriterien sogar übertraf. So lagen 99,3 % der Messwerte im geforderten Bereich. Dieser lässt eine maximale Abweichung von 20 % im Vergleich zu Werten, die im Labor bestimmt wurden zu. Das Testprinzip beruht auf der Glucose-Dehydrogenase-Methode, welches eine enzymatische Bestimmungsmethode darstellt.

2.3 Photometrische Messmethode

Als Photometrie bezeichnet man die Konzentrationsbestimmung einer Substanz mittels Messung der elektromagnetischen Strahlung. Die elektromagnetische Strahlung wird je nach Lösungskonzentration bei Durchtritt der Probe unterschiedlich stark abgeschwächt. Im Falle der photometrischen Messung beschränkt sich das elektromagnetische Spektrum auf den sichtbaren Bereich von 380 bis 780 nm. Das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz besagt, dass die Intensitätsabnahme der Strahlung zu der Konzentration der gelösten, absorbierenden Substanz proportional ist. Somit lässt sich durch Messung der Lichtintensität mathematisch die Probenkonzentration bestimmen.

$$\text{Extinktion} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

mit ε = molarer Extinktionskoeffizient; c = Konzentration; d = Schichtdicke

Bei den durchgeführten photometrischen Messungen wurden stets Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm verwendet.

2.3.1 Serum Lipidstatus

Das Gesamtcholesterin und die Triglyzeride wurden aus dem Blutserum, welches zuvor bei -80 °C konserviert war, bestimmt. Bei der Messung handelt es sich um ein enzymatisch photometrisches Verfahren. Es wurde das jeweilige Versuchsprotokoll des Herstellers angewandt und alle Reagenzien wurden dem jeweiligen Kit (Cholesterin FS bzw. Triglyzeride FS von DiaSys) entnommen. Als Standardgerade wurden folgende Konzentrationen der Stammlösung (200 mg/dl) verwendet.

Leerwert: Reagenz + 0,9 % NaCl
Standard 1 (10 mg/dl)
Standard 2 (20 mg/dl)
Standard 3 (40 mg/dl)
Standard 4 (50 mg/dl)
Standard 5 (80 mg/dl)
Standard 6 (100 mg/dl)

Alle benötigten Verdünnungen wurden mit 0,9 % NaCl hergestellt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen (Sunrise™ ELISA-Reader von Tecan). Anhand der Standardgerade wurden die Serumkonzentrationen mathematisch errechnet.

2.3.2 Hepatischer Lipidstatus

Die Messung erfolgte wie im Serum mittels enzymatisch photometrischer Messung. Eine Homogenisierung der bei -80 °C gelagerten Organe erfolgte mittels Stößel und 3 ml 0,9 % NaCl/g. Zuvor wurde das verwendete Probenmaterial genau abgewogen. Das Homogenat wurde zuerst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C konserviert. Am Tag der Messung wurden die Homogenisate schnell bei 37 °C aufgetaut und nochmals 1:3 mit 0,9 % NaCl verdünnt. Die Proben wurden mit 1 % Desoxycholsäure (DOC) versetzt und anschließend fünf Minuten bei 37°C inkubiert. DOC dient hier als lösungsvermittelnde Substanz. Das weitere Verfahren wurde anhand des dem Kit beigelegten Protokolls (Cholesterin FS bzw. Triglyzeride FS von DiaSys) durchgeführt. Als Standardgerade wurden folgende Konzentrationen der Stammlösung (200 mg/dl) verwendet.

Leerwert: Reagenz + 0,9 % NaCl + 1 % DOC
Standard 1 (10 mg/dl)
Standard 2 (20 mg/dl)
Standard 3 (40 mg/dl)
Standard 4 (50 mg/dl)
Standard 5 (80 mg/dl)
Standard 6 (100 mg/dl)

Alle benötigten Verdünnungen wurden mit 0,9 % NaCl hergestellt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Anhand der Standardgerade und der eingewogenen Menge der jeweiligen Lebern wurde die hepatische Lipidkonzentration mathematisch errechnet.

2.3.3 Transaminasen

Aspartat-Aminotransferase bzw. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Alanin-Aminotransferase bzw. Glutamat-Pyruvat-Transaminase sind leberspezifische Enzyme, deren Aktivität im Plasma bei Leberzellschädigung erhöht nachweisbar ist. Daher kann man anhand der Höhe der Aktivität dieser Transferasen eine Aussage über die hepatozelluläre Desintegration machen. AST ist hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert und deutet daher bei Erhöhung auf einen stärkeren Leberschaden hin als ein alleiniger Anstieg der zytoplasmatischen ALT. Die Messung der Aktivitäten erfolgte photometrisch mit Hilfe der Kits (ASAT (GOT) FS und ALAT (GPT) FS) von DiaSys. Die Auswertung erfolgte mathematisch nach Empfehlung des Herstellers.

2.3.4 DPP-4 Aktivität

Die Methode folgte dem Prinzip, dass DPP-4 Dipeptide am N-Terminus der Substrate abspaltet, sofern sich Prolin oder Alanin an der zweiten Stelle befinden. Bei dem verwendeten Substrat (H-Gly-Pro-pNa) ist dies der Fall. P-Nitroanilin wird somit unter DPP-4 Wirkung freigesetzt und kann photometrisch nachgewiesen werden. Dabei steht die Menge an freigesetztem p-Nitroanilin in direkter Korrelation zum DPP-4 Gehalt. Für den Nachweis von p-Nitroanilin wurde das Protokoll von Prof. Deacon aus Kopenhagen verwendet. Um eine Standardgerade als Rechengrundlage zu erhalten, wurde p-Nitroanilin von Sigma in folgenden Konzentrationen mitgemessen.

Leerwert: DPP-4 Substratlösung

Standard 1 (7,82 μM)

Standard 2 (15,63 μM)

Standard 3 (31,35 μM)

Standard 4 (62,5 μM)

Standard 5 (125 μM)

Standard 6 (250 μM)

Standard 7 (500 μM)

Als Probenmaterial wurden zum einen Serum und zum anderen Leber- und Nierenhomogenisate verwendet. Sowohl Serum als auch Organe waren zuvor bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Es wurden ca. 30 mg der Organe eingewogen und mit 300 μl Homogenisierungspuffer und Inhibitoren mittels Stößel homogenisiert.

Die Messung erfolgte in Duplikaten in einer 96-Well Platte. Zu 5 μl Serum bzw. Organhomogenisat wurden 150 μl DPP-4-Substratlösung zugegeben. Eine photometrische Messung bei 405 nm fand zu den Zeitpunkten $t = 0$, $t = 30\text{ min}$, $t = 60\text{ min}$ und $t = 120\text{ min}$ statt. Die Auswertung erfolgte mit folgender mathematischer Gleichung:

$$\text{Aktivität (Serum)} = \frac{(Y(t) \times 0,155) - (X(0) \times 0,155)}{t} \times \frac{1000}{5} \times \frac{1}{1000} \mu\text{mol/min/ml}$$

$$\text{Aktivität (Organ)} = \frac{((Y(t) \times 0,155) - (X(0) \times 0,155)) \times 60}{t \times \text{Organeinwaage [g]}} \text{ nmol/min/g}$$

Mit $X(0)$ = p-Na Konzentration 0 min und $Y(t)$ = P-Na Konzentration t min

2.3.5 Hydroxyprolinbestimmung Leber

Die auf Hydroxyprolinegehalt zu untersuchenden Lebern wurden nach Aachen gesandt. Dort führte Dr. Christer Bäck in Anlehnung an *Karlmark et al.* die Quantifizierung durch (2009). Hierfür fand zuerst eine 16-stündige Hydrolyse der Leberprobe in 6 M Salzsäure bei 110 °C statt. Nach anschließender Filterung wurde das Lysat mit Methanol versetzt und aufkonzentriert. Die kristalline Probe wurde anschließend in 50 %igem Isopropanol gelöst und mit 0,6 % Chloramin T für 10 Minuten oxidiert. Nach Zugabe von frisch angesetzter Ehrlich-Reagenz erfolgte schüttelnd für 45 Minuten eine Inkubation bei 50 °C. Die Extinktion wurde bei 570 nm gemessen und die Konzentration anhand eines mitgeführten Standards berechnet.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) lassen sich winzige Mengen an Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid = DNA) in kürzester Zeit so stark vervielfältigen, dass sie ohne Probleme nachweisbar und verwendbar sind. Die PCR beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus. Dieser besteht aus drei Schritten: Der Denaturierung, der Hybridisierung und der Elongation. Bei der Denaturierung wird bei 94 - 96 °C der DNS-Doppelstrang aufgetrennt, so dass zwei komplementäre Einzelstränge entstehen. Bei der Hybridisierung wird die Temperatur auf 50 - 65°C herabgesetzt, damit Primer, die als Startpunkte für die Replikation dienen, an die DNS binden. An diesen lagert sich bei der Elongation die Polymerase an, welche komplementäre freie Nukleotide an den Einzelstrang ansetzt und somit den fehlenden Strang synthetisiert. Die ideale Arbeitstemperatur entspricht der jeweiligen Polymerase und liegt bei 68 - 72°C. Durch die ständige Wiederholung dieser drei Schritte verdoppelt sich jedes Mal die Anzahl der kopierten DNS-Moleküle. Dieser Zyklus wird 20 - 40 Mal wiederholt.

Für alle Versuchsansätze wurden stets sterile Pipettenspitzen, sterile Gefäße sowie steriles entionisiertes Wasser verwendet. Zusätzlich wurden immer Negativkontrollen mit Wasser mitgeführt.

2.4.1 RNA Extraktion

Die RNA Extraktion aus Zellen ermöglicht eine Analyse der momentanen Zelltätigkeit. Dies liegt daran, dass nur die Gene als RNA in der Zelle vorliegen, welche auch tatsächlich zu diesem Zeitpunkt transkribiert werden. Die Gewinnung der RNA aus Gewebe erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits. Alle Reagenzien und Materialien sowie das Protokoll wurden dem Kit entnommen. Als Probenmaterial diente 10 - 20 mg Leber, welche bei -80 °C gelagert war. Diese wurde mit RLT-Puffer unter Zuhilfenahme eines Stößels homogenisiert. Dem im Kit enthaltenen RLT-Puffer wurde zur Stabilisation von Enzymen 1 % β -Mercaptoethanol zugefügt. Die DNase wurde wie im RNase-Free DNase Set beschrieben hergestellt und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Der DNase Verdau fand direkt auf der im Kit enthaltenen Säule statt. Eine Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA fand durch photometrische Messung (Bio Photometer plus) statt. Im nächsten Schritt der Reversen Transkriptase wurde maximal 1 μ g RNA eingesetzt, sodass die Anfangsmenge an eingesetzter RNA bei jeder Probe identisch ist.

2.4.2 Reverse Transkription

Eine PCR ist nur mit DNA möglich, da die Polymerasen nicht in der Lage sind RNA zu amplifizieren. Somit muss die RNA zunächst in komplementäre DNA (complementary DNA = cDNA) umgeschrieben werden. Diesen Vorgang nennt man Reverse Transkription. Zur Durchführung fand das „SuperScript III First-Strand Sythesis System for RT-PCR“ von Invitrogen Anwendung. Die im Protokoll verwendeten Reaktionsansätze und PCR-Programme sind nachfolgend aufgelistet und dem Kit entnommen.

Reaktionsansatz für RNA-Denaturierung (RNA/Primer-Mix)	
RNA-Probe	x μ l (max. 1 μ g)
Random Hexamer Primer	1 μ l
dNTPs	1 μ l
DEPEC-treated water	y μ l
	Σ 10 μ l

Dieser Ansatz wurde bei 65 °C 5 min inkubiert

Reaktionsansatz für cDNA Synthese-Mix	
10x RT Buffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT	1 µl
SuperScript III RT	0,5 µl
Wasser	0,5 µl
RNA/Primer-Mix	10 µl
	Σ 20 µl

Programm für cDNA Synthese (PCR Sprint Thermal Cycler)		
Schritt	Temperatur	Zeit
Annealing	25 °C	10 min
cDNA Synthese	50 °C	50 min
Terminale Reaktion	85 °C	5 min
Ende	4 °C	∞

2.4.3 Qualitative PCR

Die qualitative PCR dient allein dem Nachweis von bestimmten DNA-Sequenzen. Sie wurde in einem speziellen Thermocycler (Thermo Electron Corporation) durchgeführt. Als Kontroll-PCR für eine erfolgreiche Umschreibung von RNA in cDNA wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen. Verwendet wurde die Taq-Polymerase (recombinant, 5 U/µl) der Firma Invitrogen mit den dazu bereitgestellten Reaktionskomponenten. Es wurde folgender Reaktionsansatz und folgendes PCR-Programm gewählt:

Reaktionsansatz (einfach) für Standard PCR (GAPDH)	
10x PCR buffer	2,0 µl
dNTP mix (10 mM)	0,4 µl
50 mM MgCl ₂	0,6 µl
Primer forward	1,0 µl
Primer reverse	1,0 µl
Template cDNA	1,0 µl
Taq DANN Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
ddH ₂ O	14,0 µl
	Σ 20 µl

PCR-Programm für Standard-PCR (GAPDH) (PCR Sprint Thermal Cycler)			
Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initialisierung	94 °C	3 min	1x
Denaturierung	94 °C	45 sec	
Hybridisierung	55 °C	30 sec	35 - 40x
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1x
PCR-Ende	4 °C	∞	1x

Durch Agarose-Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt sichtbar gemacht. Hierfür wurde ein 1 % iges Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (1 %) versetzt und in eine Elektrophorese-Kammer gegossen. Den Proben wurde Ladebuffer hinzugefügt und anschließend wurden sie in die Probenvertiefungen des abgekühlten Gels pipettiert. In der ersten Tasche lief ein 100 bp Marker mit. Nach Elektrophorese wurde das Gel fotografiert (MultiDoc-It™ Imaging System). GAPDH wurde bei 635 Basenpaaren sichtbar.

2.4.4 Quantitative Real-time-PCR

Die Real-time-PCR (qRT-PCR oder Echtzeit-PCR) dient zur Nukleinsäurequantifizierung und beruht auf dem Prinzip der qualitativen PCR. Dies geschieht mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, welche an die neu gewonnene DNA gebunden werden und sie somit in Echtzeit messbar machen. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Fluoreszierung TaqMan®-Sonden, sowie der Farbstoff Sybr Green I verwendet. TaqMan®-Sonden sind kurze DNA-Stücke, die mit einem mittleren Bereich der Template-DNA hybridisieren. Sie tragen an einem Ende einen Reporterfarbstoff und am anderen Ende einen Quencher. Unter Quencher versteht man Moleküle, die die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe abfangen, so absorbiert der Quencher die Emission des Reporters im Ruhezustand und das Fluoreszenzsignal wird supprimiert. Die Polymerasen im PCR-Ansatz sind in der Lage, die TaqMan®-Sonden bei der Verdopplung der DNA-Vorlage abzubauen. Dabei wird zunächst der Reporterfarbstoff freigesetzt. Dieser gelangt aus dem Einflussbereich des Quenchers und die Fluoreszenz des Farbstoffs wird messbar (FAM 518nm). Die Molekülanzahl an freigesetztem Reporterfarbstoff ist direkt proportional zu der Anzahl der neu gebildeten DNA-Fragmente. Bei der weniger spezifischen Methode mittels Sybr Green I lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff an doppelsträngige DNA an. Mittels Filtersystemen und einer Computersoftware wird die Fluoreszenzfreisetzung des Signals als ΔR_n [$\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$] berechnet. In diesem Rechenschritt wird die Ausgangsemission von der Emission im Verlauf subtrahiert. Die gemessene Fluoreszenz wurde graphisch gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Man erkennt eine Startphase, in der das zu messende Signal die vorliegende Hintergrundfluoreszenz nicht übersteigt, eine exponentielle Phase sowie eine Plateau-Phase. Solange man sich in der exponentiellen Phase befindet, herrschen optimale Bedingungen für die

Verdopplung der Template-DNA. Zu der Plateau-Phase kommt es aufgrund von Interaktionen zwischen den Produkten. Zur tatsächlichen Quantifizierung wird daher der Anfang der exponentiellen Phase genutzt. Um stets an diesem Punkt messen zu können, wird der Ct-Wert (engl. Cycle Treshold für Schwellenwert-Tyklus) verwendet. Dieser beschreibt den Zyklus, bei dem erstmalig die emittierte Fluoreszenz die Hintergrund Fluoreszenz signifikant übersteigt (Giulietti, Overbergh et al. 2001). Bei Verwendung des Sybr Green I Farbstoffes wurde nach der PCR eine Schmelzkurvenanalyse zur Spezifizierung des Produkts durchgeführt. In dieser Arbeit wurden neben dem Sybr Green I Farbstoff sowohl fertige TaqMan[®] Gene Expression Assays (GEA) der Firma Applied Biosystems (Mix aus Primerpaar und Sonde), als auch einzelne Primerpaare und Sonden eingesetzt.

Um Variationen in der cDNA-Ausgangsmenge auszugleichen, wurde als Referenzgen (Housekeeping Gen) das ribosomale 18S Gen mitgemessen. Mittels der gewonnenen Expressionsdaten dieses Genes fand eine Angleichung statt. Um ein anschauliches Ergebnis darzustellen, wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe auf 1 gesetzt und die entsprechende Expression der Ziel-DNA ermittelt.

Die Messungen erfolgten in Duplikaten, wobei stets ein Reagenzblindwert als Negativkontrolle mitgeführt wurde. In eine 96-Well Platte wurde der unten aufgeführte Reaktionsansatz gegeben und mit einer Folie hermetisch verschlossen. Anschließend wurden mit dem Mastercycler[®] ep Realplex der Firma Eppendorf die Proben gemessen.

Zusammensetzung 2x TaqMan[®] PCR Mastermix	
10x PCR Golf Puffer	1000 µl
MgCl ₂	600 µl
dNTP's	200 µl
ROX	200 µl
AmpliTaq Gold [®] (5 U/µl)	50 µl
DEPC water	2950 µl
	Σ 5000 µl

Zusammensetzung Sybr Green I Mastermix	
HotStarTaq DNA Polymerase	
SYBR GREEN buffer	
dNTP's	
ROX	
SYBR Green I	
ROX	

Reaktionsansatz (einfach) für RT-PCR, Primerpaar und Sonde separat (18S und MCP-1)	
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
Sonde	1 µl
TaqMan [®] PCR Mastermix	12,5 µl
Wasser	8,5 µl
cDNA	1 µl
	Σ 25 µl

Reaktionsansatz (einfach) für RT-PCR, vorgefertigter TaqMan[®] GEA (TNFα)	
TaqMan [®] GEA	1,25 µl
TaqMan [®] PCR Mastermix	12,5 µl
Wasser	10,25 µl
cDNA	1 µl
	Σ 25 µl

Reaktionsansatz (einfach) für RT-PCR, Sybr Green I (Col1a1 und αSMA)	
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
Sybr Green Mastermix	12,5 µl
Wasser	10 µl
cDNA	0,5 µl
	Σ 25 µl

PCR-Programm für RT-PCR mit TaqMan[®]-Sonden (Mastercycler[®] ep Realplex)			
Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initialisierung	94 °C	3 min	1x
Denaturierung	94 °C	45 sec	
Hybridisierung	55 °C	30 sec	40x
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1x
PCR-Ende	4 °C	∞	1x

PCR-Programm für RT-PCR mit Sybr Green I (Mastercycler[®] ep Realplex)			
Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initialisierung	95 °C	15 min	1x
Denaturierung	95 °C	15 sec	45x
Hybridisierung	60 °C	1 min	
	72 °C	30 sec	
Elongation	81 °C	20 sec	
Finale Elongation	50 °C	1 min	1x
Schmelzung	95 °C	1 min	1x
	60 °C	15 sec	
	95 °C	15 sec	
Kühlung	50 °C	1 min	1x
PCR-Ende	4 °C	∞	1x

2.5 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, die dem Nachweis von Proteinen dient. Die Proteine werden hierbei elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf einen geeigneten Träger übertragen. In dieser Arbeit fanden Polyvinylidenfluorid-Membranen (Immobilon-P[®] von Millipor) Anwendung. Die Übertragung entspricht dem eigentlichen „Blotting“. Dabei werden die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken immobilisiert. Unter den geschaffenen Bedingungen bleibt beim Transfer sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine erhalten. Durch diese Tatsache ist es nicht nur möglich die Proteine quantitativ zu bestimmen, sondern auch deren Identifikation zu ermöglichen. Die Identifikation erfolgt mit Hilfe von Antikörpern, wobei der Erstantikörper an das Antigen bindet und der Zweitantikörper wiederum an den Erstantikörper. Für den Nachweis ist der Zweitantikörper an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der dann eine Lumineszenz detektiert werden kann.

2.5.1 Proteinisolation und -konzentrationsbestimmung

Für die Proteinisolation wurden ca. 30 mg je Leber verwendet. Die Leber wurde bis zur Zugabe des Lysepuffers bei -80 °C, bzw. auf Trockeneis gelagert. Mittels Stößel und 300 µl des Lysepuffers mit Inhibitoren wurden die Proben homogenisiert. Um einen Zellaufschluss der Probe zu erzielen, wurden die Lysate für zehn Sekunden sonifiziert. Das Probengefäß stand aufgrund der hohen Wärmeentwicklung während dieser Zeit auf Eis. Anschließend wurden die Proben bei 10 000 rpm und 4 °C 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Verwendung in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford wurde das ProteinAssay von BioRad 1:5 verdünnt. In sterile Einmalküvetten wurde 998 µl dieser Verdünnung mit 2 µl

Probe vereint und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Daraufhin folgte die Konzentrationsmessung im BioPhotometer plus von Eppendorf. Die Proteinkonzentration wurde mit der Gleichung, die sich durch den mitgeführten BSA-Standard ergab, berechnet.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proteinproben bei -80 °C konserviert.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine NFκB und phosphoryliertes NFκB wurden mit Hilfe von SDS-PAGE für das weitere Blotting aufgetrennt. In Vorarbeit wurden die Gele in einem Gelgießstand (von Bio-Rad) gegossen. Hierfür wurde zunächst das Trenngel zwischen die zwei Glasplatten gegeben und 30 - 45 min polymerisiert. Anschließend folgte das Auffüllen der Kammer mit Sammelgel und das Einschieben des Kammes. Nach einer erneuten Polymerisationsphase von 30 - 45 min war das Gel verwendbar. Sofern es am Vortag gegossen wurde, fand eine Lagerung in feuchten Tüchern gekühlt (4 °C) über Nacht statt.

30 µg Protein wurden im Verhältnis 1:5 mit SDS-Probenpuffer 6x (Laemmli) bis zu einem Volumen von 20 µl vereint. Als Negativkontrolle wurden 5 µl SDS-Probenpuffer 6x (Laemmli) mit 20 µl Wasser und 7 µl peqGold prestained Protein-Marker V (von Peqlab) mitgeführt. Das Probenmaterial wurde daraufhin bei 96 °C für 7 min denaturiert. Unmittelbar anschließend wurden die Proben auf das gegossene Gel aufgetragen. Die Kammer (Elektrophoresekammer, C.B.C. Scientific.Co, California, USA) wurde mit Laufpuffer gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld. Als Vorlauf zum Sammeln der Proben wurde eine konstante Stromstärke von 30 mA (ca. 15 min) eingestellt, welche anschließend auf 50 mA hochgestellt wurde. Die Auswertung der Proteintrennung im SDS-PAGE erfolgte im Western Blotting.

2.5.3 Blotting

Mittels „Blotting“ wurden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Transfermembran (Immobilon-P) transferiert. Die Transfermembran wurde für 1 min in 100 % Methanol aktiviert, anschließend mit Wasser abgespült und in Transferpuffer (1x) eingelegt. In dieser Zeit wurden bereits Blotting-Schwämme und Filterpapiere (Whatman) in Transferpuffer eingelegt. Es erfolgte eine Schichtung in das XCell II™ Blot Module nach folgendem Prinzip:

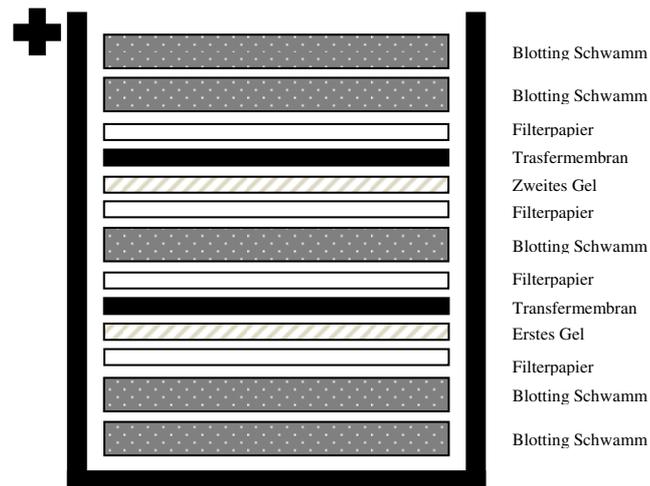


Abbildung 10: Schichtung für Western Blotting in XCell II TM Blot Module

Das „Blotting“ erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25 V für 1 - 2 Stunden.

Nach Beendigung des „Blottings“ wurden die Membranen zuerst drei Mal für fünf Minuten mit TBS-T (1x) gewaschen und anschließend zum Blocken von unspezifischen Proteinbindungen eine Stunde in Blockinglösung (TBS-T + Milchpulver) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Es erfolgte ein erneutes 3-maliges Waschen mit TBS-T (1x), gefolgt von der Primärantikörperinkubation. Hierfür wurde auf die erste Membran der Antikörper NF- κ B p65 in einer Verdünnung 1:1000 und Anti-Actin in einer Verdünnung von 1:2000 aufgetragen (Verdünnung mit Blockinglösung). Auf die zweite Membran wurde der Antikörper Phospho-NF- κ B p65 ebenfalls in einer Verdünnung von 1:1000 aufgetragen. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht unter Schütteln bei 4 °C. Anschließend wurden die Membranen drei Mal für 10 min mit TBS-T (1x) gewaschen und nachfolgend mit dem Zweitantikörper Anti-Rabbit (1:10000 mit Blockinglösung) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit TBS-T (1x).

Zum Nachweis der zu untersuchenden Proteine mit Chemolumineszenz wurden die Membranen mit einer Luminol- und einer Peroxidlösung aus dem Kit SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate behandelt. Die Inkubationszeit einer 1:1 Mischung dieser Lösungen belief sich auf eine Minute. Dabei setzte die HRP in Anwesenheit von Wasserstoff-Peroxid Luminol um. Durch diese Reaktion wurden Anionen angeregt und emittierten Licht, wenn sie wieder in den Grundenergiezustand zurück kehrten. Dieses Licht wurde mittels eines Röntgenfilms (Fuji Medinal X-Ray) aufgefangen und konnte dann nachgewiesen werden. Die weitere Auswertung erfolgte dann mit Hilfe des Programms ImageJ. Durch Darstellung der Dichteverteilung des jeweiligen Blots konnte die AUC dazu ermittelt werden. Daraufhin erfolgte eine Normalisierung der Proteinexpression auf die Ladekontrolle (β -Aktin). Die aktive

(phosphorylierte) und nicht aktive Form von NFκB wurden ins Verhältnis gesetzt und die Kontrollgruppe mit der Sitagliptin-behandelten Gruppe verglichen.

2.6 Histologie

Mittels Sirius Red-Färbung kann Kollagen Typ I und III visualisiert werden. Bei einer Leberfibrose ist ein erhöhter Anteil an extrazellulärer Matrix zu beobachten, welche durch eine verstärkte Synthese und einen verminderten Abbau von Kollagen, Laminin und Proteoglycan zurück zu führen ist (Arthur 2000). In dieser Studie wurde eine Sirius Red-Färbung von Paraffinschnitten der Leber durchgeführt. Diese Aufgabe übernahm freundlicherweise die Arbeitsgruppe PD Dr. Frank Tacke in Aachen, weshalb die Erläuterung der Methodik hier lediglich kurz beschrieben wird.

Vor der Färbung werden die Paraffinschnitte entparaffiniert und gründlich mit destilliertem Wasser gewässert. Die Färbung erfolgt über 90 Minuten in 0,1 %iger Sirius Red Lösung. Nach einer sich anschließenden zweimaligen Waschung für eine Minute mit 0,01 M Salzsäure erfolgen die Entwässerung der Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe und die anschließende Einstellung in Xylol. Zum Schluss werden die gefärbten Schnitte mit Permount Eideckmedium eingebettet. Die Präparate werden digital erfasst und anschließend findet im Dunkelfeld unter Anwendung von ImageJ eine semiquantitative Auswertung des Kollagenanteils im Verhältnis zum Gesamtpräparat statt.

2.7 Futteranalyse

Die Futteranalyse wurde in der Klinik-Apotheke des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus in Dresden durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial wurde folgendes Material eingesandt.

Pellets mit Sitagliptin aus Originalverpackung
Pellets mit Sitagliptin aus Futteraliquot
Pellets ohne Sitagliptin aus Originalverpackung
Pellets ohne Sitagliptin aus Futteraliquot
Sitagliptin (Januvia[®] 100mg Tablette)

2.8 Statistische Auswertung der Messergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels deskriptiver Statistik. So wurde zu allen Ergebnissen ein Mittelwert (MW), eine Standardabweichung und der Standardfehler (standard error of the mean, SEM) ermittelt. In dieser Arbeit wird stets der $MW \pm SEM$ angegeben. Der Begriff des statistisch signifikanten Unterschieds wurde angewandt, wenn $p < 0,05$ war. Dabei ist p die Irrtumswahrscheinlichkeit (englisch „probability“), die quantitativ festlegt, welcher Unterschied zwischen zwei Resultaten rein zufällig auftritt. Dies wiederum bedeutet, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 % ein Unterschied

entstanden sein könnte, obwohl in Wahrheit kein Unterschied bestand (so genannter α -Fehler im Falle der Alternativhypothese). Zur Ermittlung des p-Wertes fand der T-Test Anwendung. Alle statistischen Auswertungen, sowie die Erstellung der zugehörigen Graphen fanden mit Hilfe von Excel (Microsoft) statt.

IV Ergebnisse

1 Versuchsprotokoll I

1.1 Matching/Gewicht

Zehn Mäuse des Stammes C57BL/6J wurden anhand ihres Gewichts in zwei Gruppen zu je fünf Tieren gleichmäßig verteilt. Beide Gruppen erhielten eine MCD-Diät, wobei einer Gruppe der Wirkstoff Sitagliptin zusätzlich oral zugefügt wurde.

Die Diät-induzierte Gewichtsabnahme verhielt sich in beiden Gruppen über die vier Versuchstage weitestgehend identisch. So betrug das durchschnittliche Gewicht der Kontrollgruppe zu Beginn $21,8 \pm 0,4$ g und in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe $21,6 \pm 0,5$ g. Am letzten Tag des Versuches betrug es in der Kontrollgruppe $20,3 \pm 0,4$ g und in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe $20,6 \pm 0,6$ g (Abbildung 11).

1.2 Serumanalyse

1.2.1 DPP-4 Aktivität

Bereits nach dem ersten Versuchstag konnte eine signifikante Hemmung der DPP-4 Aktivität unter der eingesetzten Sitagliptindosis (0,3 %) gezeigt werden. Die DPP-4 Aktivität war in der Kontrollgruppe nach dem ersten Tag mit $10,6 \pm 0,3$ nmol/min/ml bereits doppelt so hoch wie in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe (mit $5,3 \pm 0,5$ nmol/min/ml). Diese signifikante Hemmung der DPP-4 Aktivität konnte über alle drei Versuchstage bestätigt werden (Abbildung 12).

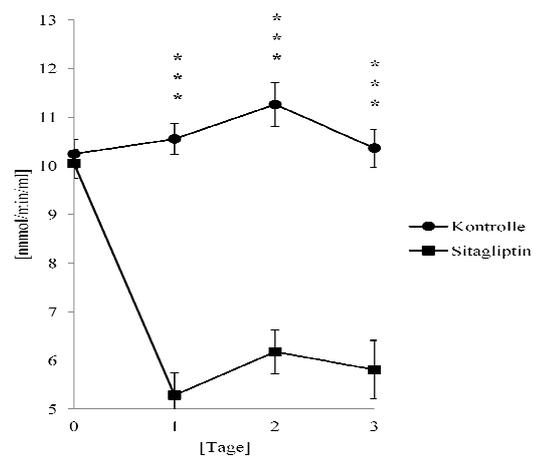
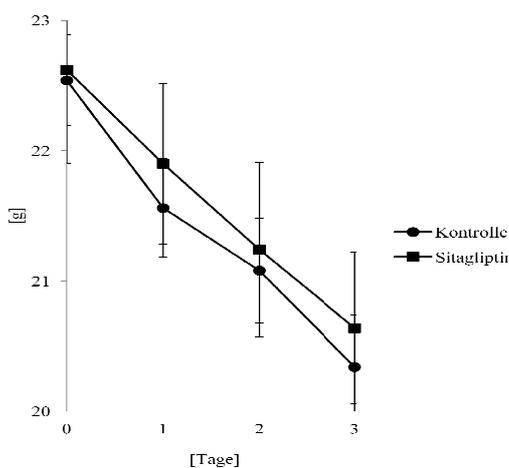


Abbildung 11: Körpergewicht; Protokoll I; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=5); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=5)

Abbildung 12: DPP-4 Aktivität; Serum; Protokoll I; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=5); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=5); *** p<0.001

1.3 Organanalyse

1.3.1 DPP-4 Aktivität

In den Lebern und Nieren ließ sich nach Tag vier eine signifikante Hemmung der DPP4 Aktivität durch die Sitagliptinbehandlung bestätigen. In den Lebern der Kontrolltiere wurde eine durchschnittliche DPP-4 Aktivität von $2121,9 \pm 216,3$ nmol/min/g und in der Sitagliptin-behandelten Gruppe von $410,8 \pm 30,8$ nmol/min/g ermittelt (Abbildung 13). In den Nieren zeigte sich eine um 27 % niedrigere DPP-4 Aktivität infolge der Sitagliptin-Behandlung (Kontrolle: $1255,3 \pm 31,8$ nmol/min/g; Sitagliptin: $340,6 \pm 34,6$ nmol/min/g) (Abbildung 14).

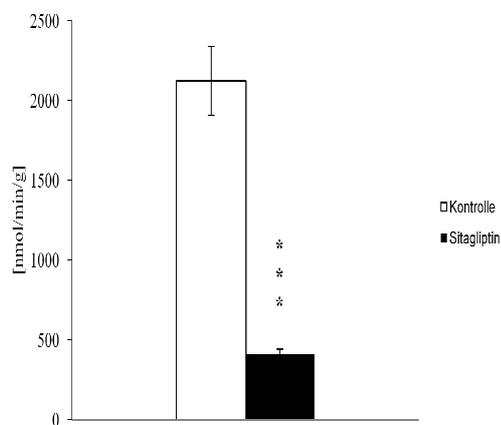


Abbildung 13: hepatische DPP-4 Aktivität; Tag 4; Protokoll I; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=5); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=5); *** p<0,001

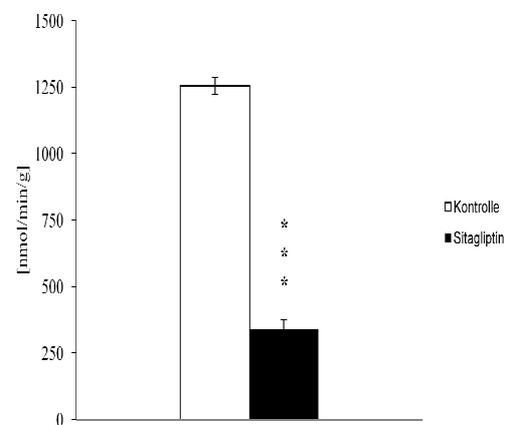


Abbildung 14: DPP-4 Aktivität; Niere; Tag 4 Protokoll I; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=5); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=5); *** p<0,001

2 Versuchprotokoll II

2.1 Matching

Die 24 Tiere wurden in zwei Gruppen anhand von Gewicht, Nüchternblutglukose, sowie Serumspiegel des Gesamtcholesterins und der Triglyzeride gleichmäßig verteilt (Tabelle 5). Beide Gruppen wurden über den kompletten Versuchsverlauf mit einer MCD-Diät gefüttert. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe wurde die Sitagliptin-Gruppe oral mit Sitagliptin behandelt. Nachfolgend sind die jeweiligen Parameter der zwei aufgestellten Gruppen zu Versuchsbeginn aufgelistet.

In der achten Woche verstarb eine Maus aus der Kontrollgruppe. Sie wurde nachträglich aus dem Match und den bis dato erfassten Ergebnissen gestrichen. Die hier ausgewiesenen Ergebnisse, erhalten keine Daten der verstorbenen Maus.

Tabelle 5: Matching Protokoll II; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-Gruppe (n=12); GC = Serumspiegel Gesamtcholesterin; TG = Serumspiegel Triglyzeride

	Gewicht [g]	Glukose [mg/dl]	GC [mg/dl]	TG [mg/dl]
Kontroll-Gruppe	32,93	86,82	83,60	90,82
Sitagliptin-Gruppe	32,85	86,75	86,25	78,50
p-Wert	0,87	0,99	0,68	0,42

2.2 Gewicht

Die MCD-Diät induzierte in beiden Gruppen einen Gewichtsverlust. Das Ausgangsgewicht der Kontrolltiere sank um durchschnittlich $15,0 \pm 0,3$ g (45 %) im Verlauf des Versuches. Die mit Sitagliptin-behandelten Tiere verloren weniger Gewicht ($14,0 \pm 0,3$ g; 42 %). Bereits ab der vierten Interventionswoche konnte ein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den Gruppen konstatiert werden (Abbildung 15).

2.3 Serumanalysen

2.3.1 DPP-4 Aktivität

Die DPP-4 Aktivität im Serum stieg in beiden Gruppen während des Versuches an. Bereits bei der zweiten Blutentnahme (Woche 4) war ein signifikanter Gruppenunterschied zu verzeichnen. Zu Versuchsbeginn lag die Aktivität bei $12,0 \pm 0,6$ nmol/min/ml in der Kontrollgruppe und bei $12,1 \pm 0,7$ nmol/min/ml in der Sitagliptin-behandelten Tiergruppe. Zu Versuchsende betrug die DPP-4 Aktivität in der Kontrollgruppe $17,7 \pm 0,9$ nmol/min/ml und in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe $25,8 \pm 1,6$ nmol/min/ml (Abbildung 16).

2.3.2 Nüchternblutglukose

Im Verlauf des Versuches wurde ein Abfall der Nüchternblutglukose in beiden Gruppen beobachtet (Anhang 1; Abbildung 37). Nach 11-wöchiger Studiendauer wurde eine Nüchternblutglukose von $37,2 \pm 2,4$ mg/dl in der Kontrollgruppe und von $40,7 \pm 1,6$ mg/dl in der Sitagliptin-behandelten Gruppe ermittelt. Zwischen beiden Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 17).

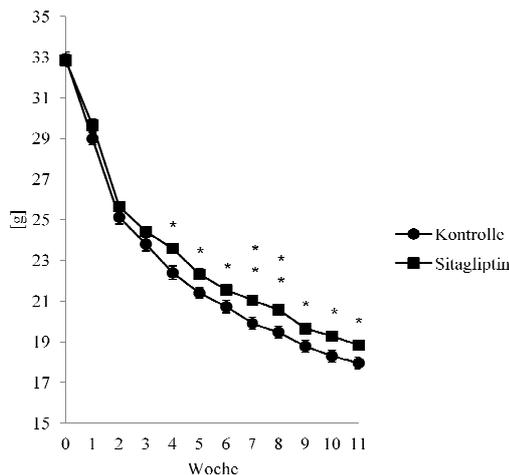


Abbildung 15: Körpergewicht; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12); * p<0,05; ** p<0,01

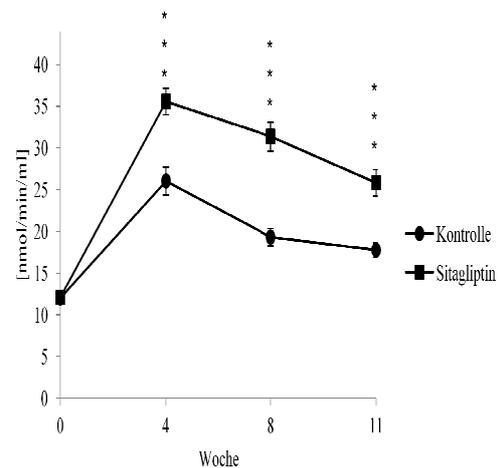


Abbildung 16: DPP-4 Aktivität Serum; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12); *** p<0,001

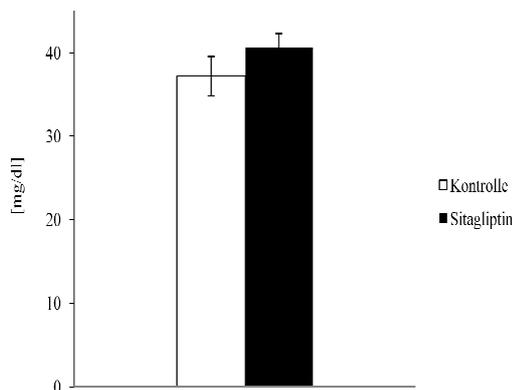


Abbildung 17: Nüchternblutglukose Woche 11; Protokoll II; MW \pm SEM, Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12)

2.3.3 Lipidstatus

In den Wochen 0, 4, 8 und 11 wurde der Lipidstatus im Serum ermittelt. In Folge der MCD-Diät wurde ein drastischer Abfall der Serumlipide beobachtet (Anhang 1, Abbildungen 38/39). Die Level des Gesamtcholesterin sanken in der Kontrollgruppe um 75 % auf $21,0 \pm 1,5$ mg/dl und in der Sitagliptin-Gruppe um

63 % auf $31,7 \pm 2,8$ mg/dl (Abbildung 18). Die Serumtriglyzeride fielen in der Kontrollgruppe auf $29,9 \pm 1,5$ mg/dl und in der Sitagliptin-Gruppe auf $38,8 \pm 2,6$ mg/dl (Abbildung 19). Aufgrund der Sitagliptin-Intervention konnten signifikant höhere Serumspiegel an Gesamtcholesterin und Triglyzeriden ab der achten Woche verzeichnet werden.

2.3.4 Transaminasen

AST und ALT wurden einmalig am Versuchsende aus dem Blutserum bestimmt. Bei beiden Parametern konnte ein signifikanter Gruppenunterschied verzeichnet werden. AST betrug in der Kontrollgruppe $258,5 \pm 23,9$ U/l und in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe $337,3 \pm 23,1$ U/l (Abbildung 20). Bei Messung der ALT ergab sich unter Sitagliptin-Intervention ebenfalls eine signifikant höhere Konzentration (Sitagliptin = $377,8 \pm 40,3$ U/l; Kontrolle = $259,8 \pm 23,9$ U/l) (Abbildung 21).

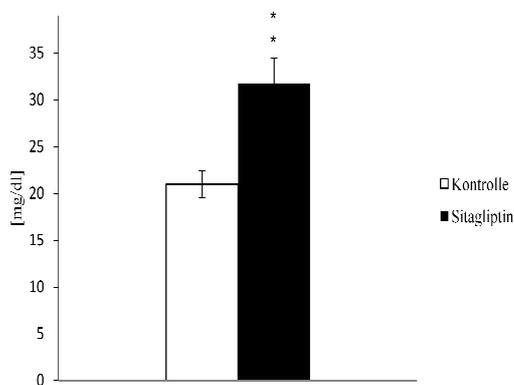


Abbildung 18: Gesamtcholesterin Serum Woche 11; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12); * p<0,05; ** p<0,01

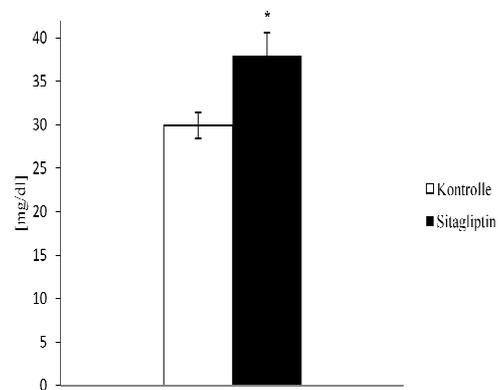


Abbildung 19: Triglyzeride Serum Woche 11; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12); * p<0,05

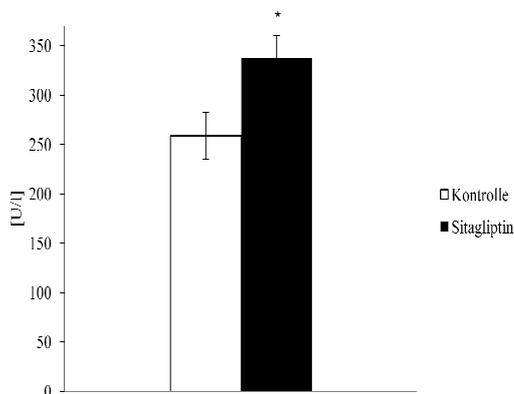


Abbildung 20: Serumspiegel AST Woche 11; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12); * p<0,05

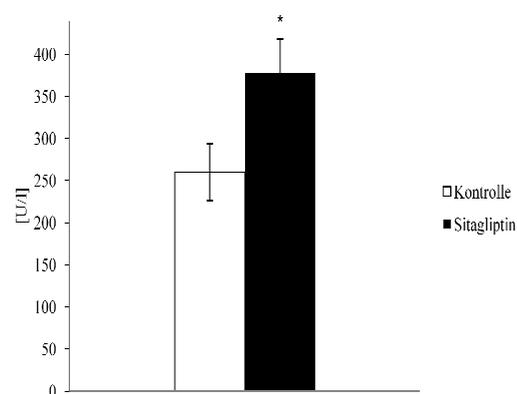


Abbildung 21: Serumspiegel ALT Woche 11; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12); * p<0,05

2.4 Organanalyse

2.4.1 Lebergewicht

Nach Versuchsende wurden die Tiere geopfert und das Gewicht der Lebern ermittelt. Hierbei wurde unter Sitagliptinbehandlung ein signifikant höheres Lebergewicht konstatiert. Während die Kontrolltiere ein Lebergewicht von durchschnittlich $800,6 \pm 34,3$ mg aufwiesen, wurde in der Sitagliptin-Gruppe ein Wert von $907,8 \pm 32,2$ mg ermittelt (Abbildung 22).

2.4.2 Hepatischer Lipidstatus

Bei den erfassten Parametern Gesamtcholesterin und Triglyzeride war kein signifikanter Gruppenunterschied zu verzeichnen. Die Kontrolltiere wiesen mittlere Cholesteringehalte von $2,9 \pm 0,2$ mg/g und die mit Sitagliptin-behandelten Tiere von $2,5 \pm 0,1$ mg/g auf (Abbildung 23). Die hepatische Triglyzeridkonzentration lag in der Kontrollgruppe bei $16,3 \pm 1,6$ mg/g und in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe bei $15,8 \pm 1,6$ mg/g (Abbildung 24).

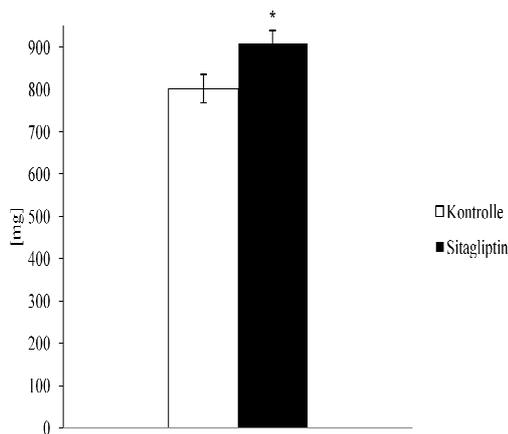


Abbildung 22: Lebergewicht; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12); * $p < 0,05$

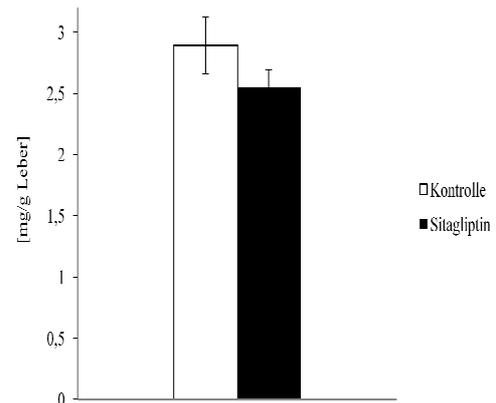


Abbildung 23: hepatisches Gesamtcholesterin; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12)

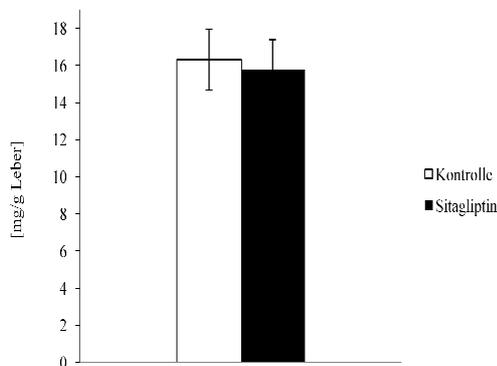


Abbildung 24: hepatische Triglyzeride; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12)

2.4.3 DPP-4 Aktivität

Die DPP-4 Aktivität wurde in den Lebern und Nieren nach Herstellung von Zelllysaten gemessen. Im Mittel betrug die Aktivität $314,9 \pm 24,4$ nmol/min/g in den Lebern der Kontrollgruppe und in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe $320,0 \pm 21,1$ nmol/min/g (Abbildung 25). Der durchschnittliche Wert in den Nieren betrug in der Kontrollgruppe $233,9 \pm 11,6$ nmol/min/g und in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe $270,5 \pm 27,5$ nmol/min/g. Es konnte kein signifikanter Gruppenunterschied ermittelt werden (Abbildung 26).

2.4.4 Inflammationsmarker

Die mRNA Expression der Inflammationsmarker TNF α und Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) wurde in der Leber mittels qPCR quantifiziert. In der Sitagliptin-Gruppe ergab sich ein Expressionsniveau von $1,2 \pm 0,3$ für TNF α (Kontrolle = $1 \pm 0,2$) und von $1,48 \pm 0,3$ für MCP-1 (Kontrolle = $1 \pm 0,2$). Die Sitagliptinbehandlung zeigte somit keinen signifikanten Einfluss (Abbildungen 27/28). Auf Proteinebene wurde zudem die Aktivierung des NF κ B-Signalweges untersucht. Dabei stellt pNF κ B die aktivierte Form dar. Bei einer Normalisierung der Kontrollgruppe auf 1 (Kontrolle = $1 \pm 0,1$) ergab sich nach Sitagliptinbehandlung eine Aktivierung des NF κ B von $0,8 \pm 0,1$. Diese 20%ige Verminderung ist jedoch nicht signifikant (Abbildungen 29/30).

2.4.5 Fibrosemarker

Hydroxyprolinbestimmung

Bei der photometrischen Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in den Lebern ergab sich in der Kontrollgruppe ein Mittelwert von $36,1 \pm 1,8$ μ g/g und in der Sitagliptin-Gruppe ein Mittelwert von $38,4 \pm 1,4$ μ g/g. Der Kollagengehalt der Lebern zeigt somit keinen signifikanten Gruppenunterschied (Abbildung 31).

Colla1 und α SMA

Es wurde die hepatische mRNA Expression von Colla1 und α SMA mittels qPCR untersucht. Für Colla1 ergab sich in der Sitagliptin-Gruppe ein Expressionsniveau von $1,8 \pm 0,8$ (Kontrolle = $1 \pm 0,2$) und für α SMA ein Expressionsniveau von $1,4 \pm 0,4$ (Kontrolle = $1 \pm 0,4$). Der Einfluss von Sitagliptin führte bei diesen Parametern zu keinem signifikanten Unterschied (Abbildung 32/33).

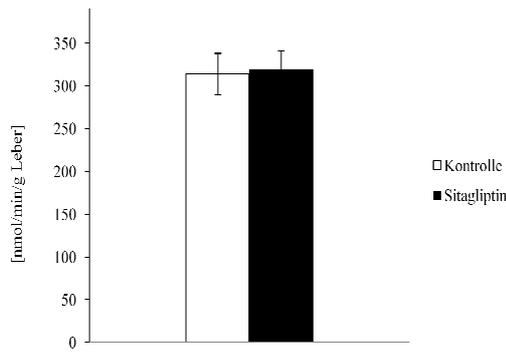


Abbildung 25: DPP-4 Aktivität; Leber; Protokoll II; MW ± SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12)

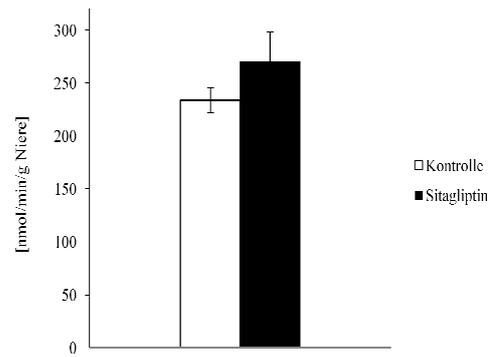


Abbildung 26: DPP-4 Aktivität; Niere; Protokoll II; MW ± SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12)

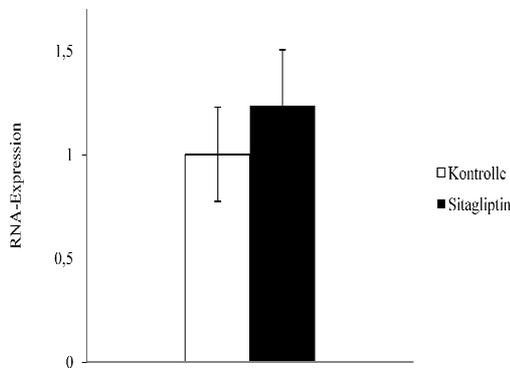


Abbildung 27: hepatische mRNA-Expression des TNF-α; Protokoll II; MW ± SEM; Kontrollgruppe (n=7); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=6)

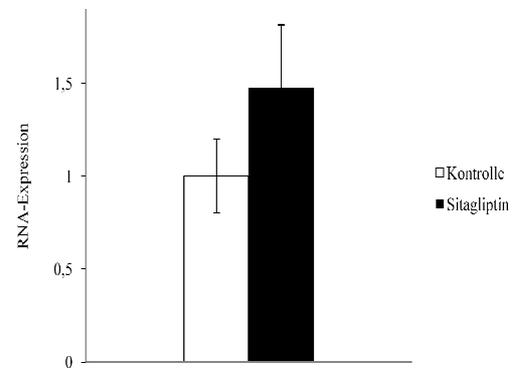


Abbildung 28: hepatische mRNA-Expression des MCP-1; Protokoll II; MW ± SEM; Kontrollgruppe (n=7); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=6)

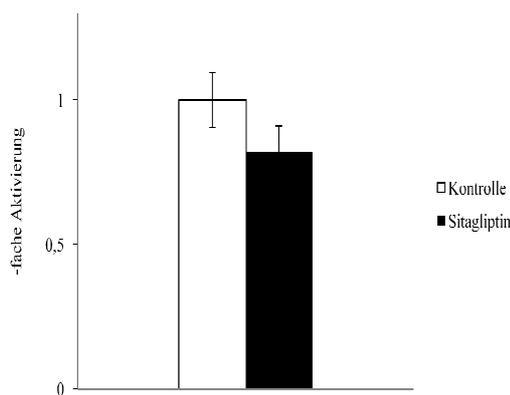


Abbildung 29: Aktivierung von NFκB in der Leber; Protokoll II; Densitometrische Auswertung; MW ± SEM; Kontrollgruppe (n=4); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=4)

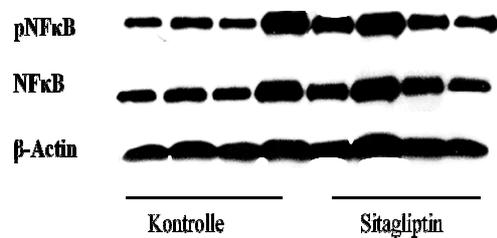


Abbildung 30: Western Blot; NFκB; Leber; Protokoll II; β-Actin als Ladekontrolle (n = 4/Gruppe)

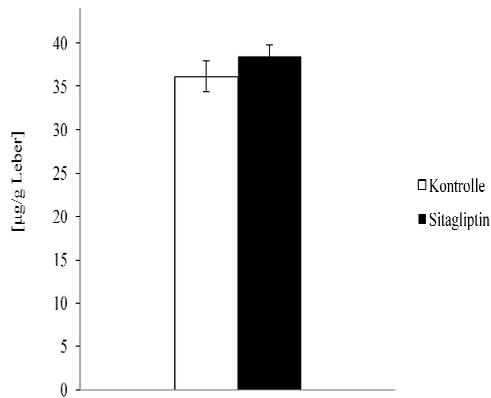


Abbildung 31: Hydroxyprolin; Leber; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12)

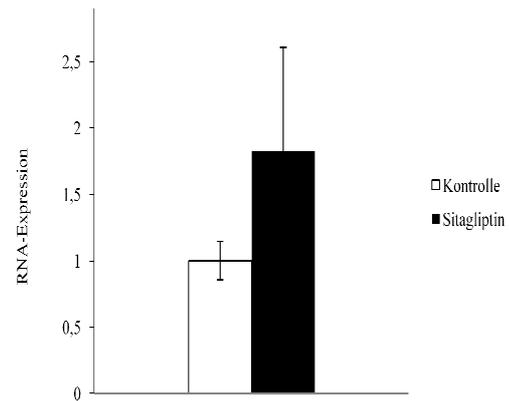


Abbildung 32: hepatische mRNA-Expression des Col1a1; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=5); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=4)

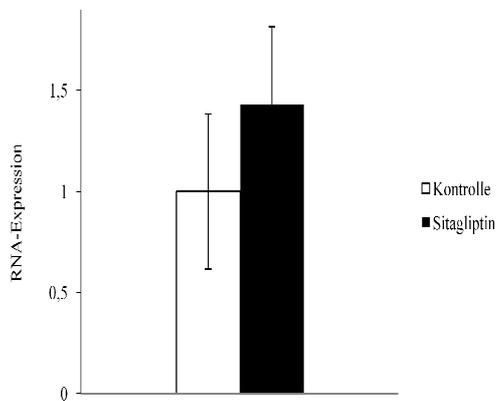


Abbildung 33: hepatische mRNA-Expression des aSMA; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=5); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=4)

2.4.6 Histologie

Mittels Sirius Red-Färbung zeigt sich ein signifikant höherer Kollagenanteil in den mit Sitagliptin-behandelten Lebern. So beträgt die Area Fraction in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe $0,85 \pm 0,09$ (Kontrolle = $0,54 \pm 0,06$) (Abbildung 34/35/36)

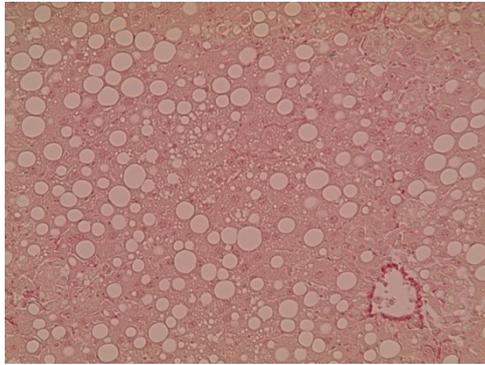


Abbildung 34: Sirius red-Färbung Leber zur Darstellung des Kollagenanteils, Protokoll II; Beispiel aus Kontrollgruppe

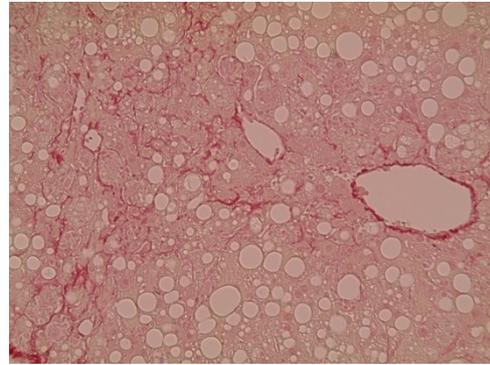


Abbildung 35: Sirius red-Färbung Leber zur Darstellung des Kollagenanteils; Protokoll II; Beispiel aus Sitagliptingruppe

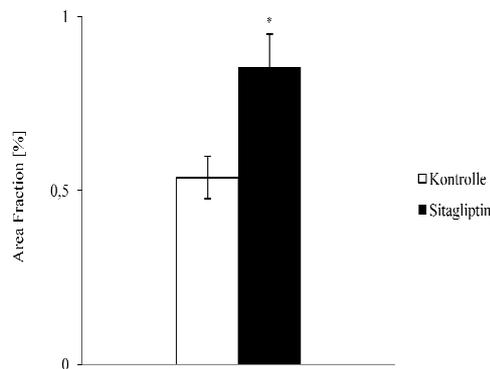


Abbildung 36: hepatischer Kollagenanteil; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=9); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=11); * p<0,05

3 Futteranalyse

Es wurden fünf Proben eingesendet und mittels Dünnschichtchromatographie auf das Vorhandensein von Sitagliptin untersucht. Somit wurde eine Verwechslung oder falsche Deklaration des Futters ausgeschlossen (Anhang 2).

V Diskussion

1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Untersuchung der Effekte von Sitagliptin auf eine Diät-induzierte NASH wurden in der vorliegenden Arbeit in einem *in vivo* Modell die aufgestellten Hypothesen geprüft.

Zunächst wurde die Wirksamkeit des DPP-4 Inhibitors in der angewandten Dosierung geprüft. Im Versuchsprotokoll I zeigte sich über die Versuchsdauer eine signifikante Hemmung der DPP-4 Aktivität sowohl im Serum (Abbildung 12), als auch in Leber und Niere (Abbildungen 13 und 14), der mit Sitagliptin-behandelten Tiergruppe. Entgegen der Erwartungen zeigte sich jedoch im Versuchsprotokoll II eine signifikant höhere DPP-4 Aktivität in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 16).

Überraschenderweise war im Protokoll II ein Gewichtsunterschied zwischen den Tiergruppen zu beobachten (Abbildung 15). Dabei verhielt sich jedoch die Wirkung auf die Nüchternblutglukose neutral (Abbildung 17 und 34).

Die Hypothese, dass Sitagliptin keinen Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichts hat, sowie keine Auswirkungen auf die Nüchternblutglukose hat, bestätigte sich nur im Hinblick auf die Glukose (Abbildung 17 und 34). Ein Gewichtsunterschied der Tiergruppen war entgegen der Erwartungen zu verzeichnen (Abbildung 15).

Des Weiteren galt es zu prüfen, ob Sitagliptin das Ausmaß einer Leberverfettung vermindert und ob dabei die Werte der Serumlipide gleich bleiben. Zu unserer Überraschung zeigten sich in den Lebern keine Unterschiede im Fettanteil (Abbildungen 23 und 24) und entgegen der Vermutung lagen die Werte der Serumlipide in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe über den Werten der Kontrollgruppen (Abbildungen 18 und 19).

Die Annahme, dass Sitagliptin anti-inflammatorische und anti-fibrosierende Wirkungen in Bezug auf eine NASH hat, konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

Die aufgeführten Effekte von Sitagliptin in Bezug auf eine NASH werden nachfolgend ausführlich diskutiert.

2 Evaluierung des Tiermodells

Aufgrund der Substratvielfalt von DPP-4 war in dieser Studie ein *in vivo* Versuch unerlässlich. Zudem bieten Studien am Tiermodell die Gelegenheit, in kurzer Zeit eine größere und damit auch repräsentativere Anzahl an Individuen unter immer gleichen Bedingungen zu untersuchen.

In den meisten Modellen zur Untersuchung von Inkretinen und deren Wirkungsmechanismen haben sich Nagetiere als geeignete Versuchsgruppe durchgesetzt. Aufgrund geringer Anschaffungs- und Unterhaltskosten, sowie dem geringen Platzbedarf, sind sie größeren Säugetieren vorzuziehen. Als weiterer wichtiger Aspekt zur Wahl der Versuchstierspezies galt es eine Spezies zu wählen, bei der eine diätinduzierte NASH provozierbar war. Auch hierfür wird in der Wissenschaft bevorzugt der Nager verwendet.

Es existieren verschiedene Modelle, die zur Untersuchung der Pathologie und dem metabolischen Kontext der NASH zur Verfügung stehen. Einige davon zeigen den metabolischen Kontext ohne dabei jedoch das volle Maß der NASH zu entwickeln. Hierzu gehören unter anderem genetisch veränderte Mausmodelle und Mausmodelle bei denen mittels Hochfett-Diäten eine allgemeine Adipositas mit einhergehender Leberverfettung erzielt wird. Andere hingegen zeigen die Leberveränderungen, wie sie auch beim Menschen zu beobachten sind, jedoch mit einem anderen metabolischen Kontext. Diese Leberveränderungen werden diätetisch durch einen Methionin- und Cholinmangel erzielt. Eine Kombination aus genetisch veränderten Tieren und MCDD ist ebenfalls möglich (Larter and Yeh 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der Methionin-Cholin defizienten Diät an C57BL/6J Mäusen gewählt. Es wurde gezielt der Leberschaden betrachtet, sodass die fehlende Adipositas mit charakteristischer Körperfettverteilung, welche bei der Pathogenese der NASH zum metabolischen Kontext gehört, nicht relevant war. Ein großer Nachteil der MCDD ist der hochgradige Gewichtsverlust, der sich in den ersten drei Wochen mit Einnahme der Diät manifestiert. Dieser kann in den ersten Wochen mehr als 20 % des Ausgangsgewichts betragen. Für Langzeitstudien stellt dies vor allem bei der Maus einen limitierenden Faktor dar. Laut Studien manifestiert sich eine perizelluläre und perisinusoidale Leberfibrose in allen Leberzonen nach zehn Wochen. Hinzu kommen fokale Nekroseinflammationsherde (Larter and Yeh 2008). Um dieses Maß der chronischen Entzündung anzutreffen, wurde eine Versuchsdauer von elf Wochen für den Hauptversuch (Protokoll II) gewählt. Um das Überleben der Tiere zu gewährleisten, begann der Versuch mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 30 g. Durch die Versuchsdauer von elf Wochen und dem damit zusammenhängenden Gewichtsverlust ist davon auszugehen, dass der bestehende Methionin-Cholinmangel sich nicht nur in der Entwicklung einer NASH niederschlägt, sondern auch andere hochgradige Auswirkungen auf den Körper zeigt. Zum derzeitigen Stand der Forschung gibt es hierzu jedoch keine Angaben. In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse, sollte allerdings die Auswahl des Modells in Frage gestellt werden, da es durchaus möglich ist, dass das Modell der MCDD an der Maus für die vorliegenden

Untersuchungen zu dramatisch ist und somit nicht optimal gewählt wurde. Für weitere Studien mit der vorliegenden Fragestellung sollten andere Tiermodelle ihre Anwendung finden. So stellt ein Rattenmodell mit Hochfett-Diät eine alternative Modellwahl dar. Die Leberentzündung entwickelt sich langsamer und der metabolische Kontext kommt dem des T2DM sehr nahe. Auch eine Kombination mit genetisch veränderten Ratten in Kombination mit einer Hochfett-Diät ist denkbar. *Larter et al.* führen hierfür einige Beispiele in ihrer Studie von 2008 auf.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Sitagliptin-Konzentration im Futter von 0,3 % gewählt. Um die Wirksamkeit des Futters mit der gewählten Sitagliptin-Konzentration zu testen, wurde das Protokoll I durchgeführt, bei dem in beiden Versuchstiergruppen das Gewicht nahezu identisch war (Abbildung 11). Es zeigte sich eine signifikante Hemmung der DPP-4 Aktivität bei der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe (Abbildung 12), dies spricht für die Wirkung von Sitagliptin in der angewandten Konzentration.

3 Diskussion Versuchsprotokoll I

3.1 DPP-4 Aktivität unter Sitagliptinwirkung

Im Protokoll I wurde eine kleine Tiergruppe gewählt, um die Wirkung der eingesetzten Sitagliptindosis zu testen. Um möglichst wenig Einfluss anderer Faktoren zu erhalten, wurde eine Versuchsdauer von nur vier Tagen gewählt. Mit einer Plasmahalbwertszeit von 8 bis 14 Stunden und einem Plasmahöchstspiegel nach 1 bis 4 Stunden ist somit schon nach der ersten Blutentnahme eine Aussage über die Wirkung aussagekräftig (Scheen 2010). Diese führte wie erwartet zu einer signifikanten Hemmung der DPP-4 Aktivität in der mit Sitagliptin-behandelten Tiergruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die verminderte DPP-4 Aktivität zeigte sich über alle vier Tage des Versuchsverlaufs im Serum (Abbildung 12). Am Versuchsende wurden Nieren und Lebern auf die DPP-4 Aktivität untersucht. DPP-4 kommt in der Basalmembran der Nierenrinde, den glomerulären Podozyten und im Bürstensaum des proximalen Tubulus vor. In der Leber findet man es in den Gallengängen und umliegenden Hepatozyten (Lambeir, Durinx et al. 2003). Ein großer Anteil des Umbaus von GLP-1 in die inaktiven Metaboliten findet in der Leber statt, weshalb hier mit einer hohen DPP-4 Aktivität gerechnet werden muss. Sitagliptin wird zu 87 % über die Nieren ausgeschieden, dies war der Grund für das Interesse an der DPP-4 Aktivität in diesem Organ. In beiden Organsystemen konnte durch Sitagliptin eine signifikante Hemmung der DPP-4 Aktivität beobachtet werden (Abbildungen 13 und 14). Im Versuchsverlauf waren keine Gewichtsunterschiede zwischen den beiden Gruppen zu verzeichnen (Abbildung 11). Eine Beeinflussung der DPP-4 Aktivität durch das Körpergewicht, wie sie *Kirino et al.* zeigten, ist somit ausgeschlossen (2011).

4 Diskussion Versuchsprotokoll II

4.1 Gewichtsentwicklung im Versuchsverlauf

Das Wohlbefinden bei Tieren mit chronischen Erkrankungen, so auch bei einer NASH, ist reduziert. Folge davon sind unter anderem Gewichtsverlust, Aktivitätsverlust und stumpfes Haarkleid. In der vorliegenden Studie wurden die Versuchstiere täglich in ihrer Aktivität begutachtet und sie wurden wöchentlich gewogen. Es verzeichnete sich bei der Gewichtskontrolle eine stetige Abnahme des Körpergewichts (Abbildung 15), sowie eine damit in Zusammenhang stehende reduzierte Aktivität. Der starke Gewichtsverlust ist eine Folge der Methionin-Cholin defizienten Diät. Dieser kann laut *Larter et al.* (2008) in den ersten drei Wochen bereits über 20 % betragen. Ausgelöst wird dieser durch die chronische Entzündung in der Leber. Der in dieser Studie erzielte Gewichtsverlust war somit vorhersehbar. Auffällig ist jedoch, dass der Gewichtsverlauf der beiden Gruppen signifikant unterschiedlich ist. Es ist nicht eindeutig zu evaluieren, jedoch ergibt sich daraus die Annahme, dass das Ausmaß der NASH unter der Sitagliptinbehandlung vermindert sein könnte. Diese Vermutung ist jedoch ausschließlich bei alleiniger Betrachtung des Körpergewichtsverlaufes zu treffen.

4.2 Sitagliptinwirkung auf DPP-4 Aktivität unter MCDD

Die DPP-4 Messung in dieser Studie erfolgte sowohl im Serum als auch in homogenisierten Lebern und Nieren. *Kirino et al.* untersuchte 2011 die Unterschiede in der DPP-4 Aktivität bei Otsuka Long-Evans Tokushima fatty Ratten welche zum einen ad libitum gefüttert wurden und zum anderen restriktiv ernährt wurden. In den Ergebnissen zeigten sich unter anderem signifikant niedrigere DPP-4 Aktivitäten in den Nieren von der ad libitum gefütterten Tiergruppe.

Unerwarteterweise wurde im Versuchsprotokoll II eine höhere DPP-4 Aktivität im Serum unter Sitagliptinbehandlung beobachtet, obwohl zuvor eine eindeutige Wirksamkeit der verabreichten Sitagliptindosis (0,3 %) im Protokoll I belegt wurde. Diese höhere DPP-4 Aktivität ist bereits nach vier Wochen zu verzeichnen und bleibt über den gesamten Versuchsverlauf erhalten (Abbildung 16). Die DPP-4 Konzentrationen in den Lebern und den Nieren sind jedoch in beiden Gruppen gleich (Abbildungen 25 und 26). *Kirino et al.* zeigten in ihrer Studie eine positive Korrelation zwischen dem Körpergewicht und der DPP-4 Aktivität im Serum (*Kirino, Sato et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit ist das Körpergewicht der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von *Kirino et al.* auf die vorliegende Arbeit ist jedoch sehr kritisch zu betrachten, da es sich um zwei völlig unterschiedliche Tiermodelle handelt. Die vorliegenden Resultate in Bezug auf die DPP-4 Aktivität führen zu der Annahme, dass Sitagliptin in Zusammenhang mit einer MCDD induzierten NASH die erwartete hemmende Wirkung nicht erfüllt. Sitagliptin wurde im Rahmen der Zulassungsuntersuchungen nicht bei

Patienten mit schwerer Leberfunktionsstörung untersucht. Da Sitagliptin jedoch überwiegend renal eliminiert wird, ist davon auszugehen, dass eine schwere Leberfunktionsstörung die Pharmakokinetik nicht beeinflusst (EMA 2007). Inwieweit der Methionin-Cholinmangel Einfluss auf die Pharmakokinetik hat ist jedoch nicht bekannt. Um eine genauere Aussage über die Wirksamkeit von Sitagliptin zu treffen, müsste man die GLP-1 Spiegel messen. Sofern diese unter Sitagliptingabe erniedrigt wären, könnte man anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit behaupten, dass die Verabreichung von Sitagliptin bei T2DM Patienten in Verbindung mit einer NASH kontraindiziert ist. Zur Stützung dieser Annahme sind jedoch noch weitere Studien notwendig.

Eine Erhöhung der DPP-4 Aktivität wurde bei Krebserkrankungen und diversen Lebererkrankungen wie Hepatitis C oder Cholestase festgestellt (Urade, Komatsu et al. 1989; Perner, Gyuris et al. 1999; Firneisz, Lakatos et al. 2001). Ebenso zeigten *Balaban et al.* im Jahr 2007 in einer klinischen Studie, dass die Serum-DPP-4 Konzentrationen beim Vorliegen einer NASH erhöht sind. Sie untersuchten 31 Patienten mit einer diagnostizierten NASH und 17 Kontrollpersonen. Anhand der gewonnenen Ergebnisse gehen sie sogar soweit zu sagen, dass die Höhe der Serum DPP-4 Konzentration mit dem histopathologischen Grad der NASH korreliert. *Firneisz et al.* zeigen in einer Studie im Jahr 2010, dass bei Typ 2 Diabetes Patienten keine Erhöhung der DPP-4 Aktivität vorhanden ist und dass diese erst mit einem Leberschaden auftritt. Trifft diese Aussage zu, so kann man davon ausgehen, dass in der vorliegenden Studie die mit Sitagliptin-behandelte Tiergruppe an einem signifikant höheren Leberschaden leidet. Um diese Aussage zu bekräftigen sind jedoch noch weitere Studien notwendig.

4.3 Einflüsse von Sitagliptin auf die Nüchternblutglukose

Aus der Studie *Rinella et al.* ist bekannt, dass die Nüchternblutglukose in einer Tiergruppe, welche eine MCD-Diät erhielt, signifikant niedriger ist, als bei Tiergruppen, welche andere Diäten gefüttert bekamen. Der Zeitraum von zehn oder 28 Tagen zeigte dabei keinen Unterschied. Die Nüchternblutglukosewerte der MCD-Diät-Gruppe lagen in dieser Studie nach 28 Tagen bei durchschnittlich 83 mg/dl (Rinella and Green 2004). Somit war ein genereller Abfall unter MCDD zu erwarten. In der vorliegenden Studie betrug die Nüchternblutglukose zu Studienbeginn durchschnittlich 86 mg/dl und zeigte unter der MCDD den erwarteten Abfall. Bereits nach der vierten Woche war eine Verminderung um ca. 35 % zu verzeichnen (Abbildungen 17 und 34). Es konnte somit bestätigt werden, dass die Nüchternblutglukose unter MCDD sinkt. Im Vergleich zu der Studie von *Rinella et al.* sind die Glukosewerte ohne vorherige Spezialdiät in beiden Gruppen sehr niedrig. *Rinella et al.* entnahmen den Tieren nüchtern im Wachzustand die Blutprobe. Eine Blutentnahme im wachen Zustand der Tiere stellt einen erheblichen Stressfaktor für die Tiere dar. Unter Adrenalinwirkung erhöhen sich die Glukosewerte. Dies könnte ein Grund für die niedrigeren Werte in der

vorliegenden Arbeit sein, da hier die Probenentnahme im anästhesierten Zustand der Tiere stattfand.

In der Studie von *Dobrain et al.* wird gezeigt, dass Sitagliptin die Nüchternblutglukose signifikant erniedrigt. Als Versuchstiere wurden männliche C57BL/6J-Mäuse auf „Hochfett-Diät“ (plus minus 0,4 % Sitagliptin) verwendet (Dobrian, Ma et al. 2011). Denselben Effekt erzielten *Ferreira et al.* im Jahr 2010 in ZDF-Ratten mit einer Sitagliptin Dosis von 10 mg/kg/Tag über einen Versuchszeitraum von 26 Wochen. *Iwasaki et al.* zeigten in einer klinischen Studie, dass Sitagliptin auch als Therapie der NASH indiziert sei. So erzielten sie die Ergebnisse, dass die Nüchternblutglukose von Patienten mit Typ 2 Diabetes und Fettlebererkrankung signifikant erniedrigt wurde (2011). In der vorliegenden Studie ist der Effekt, dass Sitagliptin die Nüchternblutglukose senkt, nicht nachzuvollziehen. Generell lässt sich jedoch kein Vergleich mit Studien erstellen, die in ihrem Protokoll Hochfett-Diäten einsetzten oder im Falle der klinischen Studie Patienten mit T2DM untersuchten. In beiden Fällen liegt eine gestörte Nüchternblutglukose, eine Glukoseintoleranz, sowie eine IR vor. Mit der Wahl der MCDD induzierten NASH in der vorliegenden Arbeit und des damit fehlenden metabolischen Kontextes ist ein Vergleich mit diesen Studien nicht durchführbar. So zeigt sich in der vorliegenden Studie eine höhere Nüchternblutglukose in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe, jedoch ohne statistische Sicherheit. Als Grund für dieses kontroverse Ergebnis könnte die Tier- und die Diätwahl sein. Das vorgestellte Modell ist das erste, welches die Sitagliptinwirkung in Kombination mit einer MCD-Diät untersucht.

4.4 Bewertung der Lipide im Serum und der Leber

In der vorliegenden Arbeit sinken die Serumlipide im Verlauf der Versuchszeit dramatisch ab, so sind die Werte am Ende des Versuchs über 50 % niedriger als zu Beginn (Abbildungen 18, 19, 35 und 36). Dabei war zu beobachten, dass absolut gesehen in der Sitagliptin Gruppe ein geringerer Abfall der Werte besteht. Bei der Messung der hepatischen Lipide zeigte sich kein Gruppenunterschied (Abbildungen 23 und 24). In der Dissertation von *Zur* (2005) liegen die Referenzbereiche bei Wildtypmäusen für Serumcholesterin bei 89 ± 16 mg/dl und für Serumtriglyzeride bei 102 ± 35 mg/dl. In diese Bereiche fallen auch die Anfangswerte der vorliegenden Studie. *Marcolin* und sein Team untersuchten die Veränderungen von Blutwerten und der Leberhistologie durch MCDD an C57BL/6J Mäusen. Nach zwei Wochen waren die Serumlipide der mit MCDD gefütterten Tiere signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu waren die Lipide in den Lebern der MCDD Gruppe nach histologischer Auswertung erhöht (Marcolin, Forgiarini et al. 2011). Nicht nur histologisch sondern auch biochemisch zeigten *Macfarlane et al.* in ihrer Studie, dass die Triglyzeride in der Leber unter MCD-Diät signifikant erhöht sind. Nach einer Fütterung von zwei Wochen waren die Triglyzeride in der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu verdoppelt (Kontrolle: 24 ± 2 μ mol/Leber; MCDD: 43 ± 4

$\mu\text{mol/Leber}$), während die Serumlipidwerte signifikant niedriger waren als unter Kontrolldiät (Macfarlane, Zou et al. 2011). *Rinella et al.* zeigten diese Auswirkungen einer MCDD bereits bei db/db (insulinresistent) und db/m (insulinsensitiv) Mäusen (Rinella, Elias et al. 2008). Methionin und Cholin sind essentiell für die Synthese von Phosphatidylcholin und somit von VLDL. Durch den fehlenden Abtransport von Lipiden aus der Leber akkumulieren diese im Leberzytosol (Leberverfettung). Folglich werden weniger Lipide im Blut transportiert und die messbaren Serumlipide sind reduziert. Der beobachtete absolute Abfall der Serumlipide ist folglich durch die MCDD bewirkt worden. Die signifikanten Unterschiede in Gesamtcholesterin und TG im Serum zwischen beiden Tiergruppen in dieser Studie müssen allerdings auf die Wirkung von Sitagliptin zurückzuführen sein. Eine Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie von *Tremblay et al.* untersuchte die Auswirkung von Sitagliptin auf postprandiale Lipidwerte bei Patienten mit T2DM. Es wurde gezeigt, dass im Plasma unter Sitagliptinbehandlung die Gesamtcholesterinkonzentration, sowie die Konzentration an freien Fettsäuren signifikant erniedrigt wurde (Tremblay, Lamarche et al. 2011). Aufgrund einer durch Sitagliptin verursachten verbesserten Insulinwirkung scheinen die Konzentrationen von freien Fettsäuren im Blut reduziert. Dies wiederum führt zu einer reduzierten Fettspeicherung in der Leber und in der Muskulatur, da die freien Fettsäuren von der Peripherie weniger stark in diese Gewebe transportiert und vielmehr im peripheren Fettgewebe gespeichert werden. Diese Hypothese stellte *Azuma et al.* auf. Er sagt, dass DPP-4 Inhibitoren und die damit verbundene Inkretinwirkung die Lipotoxizität reduzieren (Azuma, Radikova et al. 2008). *Ferreira et al.* zeigten in diabetischen Ratten, dass unter Sitagliptinbehandlung die TG im Blutserum sanken, während der Cholesterinspiegel unverändert blieb (Ferreira, Teixeira-de-Lemos et al. 2010). Eine Senkung des Cholesterinspiegels durch DPP-4 Inhibitoren zeigte dagegen die Metaanalyse von *Monami et al* im Jahr 2011. Des Weiteren zeigten *Sharma et al. 2011* in einer *in vitro* Studie einen positiven Effekt von GLP-1 auf die Fettablagerungen in Leberzellen. Sie stellten mittels Oil red O Färbung dar, dass sich in humanen Leberzellen, welche mit dem GLP-1 Agonisten Exendin-4 behandelt wurden, weniger Fett ablagerte als ohne GLP-1. Dasselbe Ergebnis erzielten sie bei der Untersuchung von Leberzelllysaten aus Mäusen, welche zuvor mit Hochfett-Diät und dem Zusatz des GLP-1 Analogon Liraglutide gefüttert wurden. Das GLP-1 Analogon Liraglutide bewirkt ebenfalls eine Reduktion von Cholesterin und TG im Plasma, sowie eine reduzierte Fettablagerung in der Leber (Mells, Fu et al. 2012).

Zusammenfassend lässt sich anhand der Literaturdaten sagen, dass in diabetischen Modellen mit IR eine Absenkung der Serumlipide durch eine Sitagliptinbehandlung erzielt wurde. Bei einer MCDD induzierten NASH hingegen liegt keine Insulinresistenz vor und die Diät allein induziert einen Abfall der Serumlipide bei gleichzeitiger Erhöhung der Leberlipide. Ein direkter Vergleich ist deshalb nicht möglich.

Der hochgradige Abfall der Serumlipide in der vorliegenden Arbeit ist durch die Diät zu erklären. Weshalb die Tiergruppe unter Sitagliptinbehandlung höhere Serumlipide als die Kontrollgruppe zeigt, ist bisher nicht zu erklären. Jedoch lässt sich ein Zusammenhang mit dem Körpergewicht vermuten, da dieses in der Sitagliptin-behandelten Gruppe ebenfalls signifikant höher ist. Es besteht demnach die Annahme, dass Sitagliptin der Entwicklung der NASH entgegenwirkt. Die Tiere leiden somit weniger stark an dem chronischen Leberschaden. Dem entgegen sprechen die Werte der Leberlipide. Es bestehen keine Gruppenunterschiede, was wiederum dafür spricht, dass die Leberverfettung von Sitagliptin im beschriebenen Versuch nicht beeinflusst wurde.

4.5 Verlaufsbeurteilung der hepatischen Transaminasen

Die Enzyme ALT und AST liegen intrazellulär vor, wobei die ALT hauptsächlich im Zytosol und die AST an Mitochondrien gebunden in Leberzellen sowie in Zellen von Herz und quergestreifter Muskulatur vorliegt. Eine Freisetzung dieser erfolgt ausschließlich bei Zellschädigung. Eine alleinige Erhöhung der AST geht diagnostisch nicht zwingend mit einem Leberschaden einher. Wohingegen bereits bei leichter Zellschädigung ALT aus dem Zytosol austreten kann und im Blut nachweisbar ist. Ein erhöhter Nachweis der AST im Blut ist jedoch erst bei vollständigem Zugrundegehen der Zelle möglich. Die Höhe der ALT ist folglich proportional mit dem vorliegenden Leberzellschaden. *Marcolin et al.* beschrieben an C57BL/6J Mäusen nach zweiwöchiger Fütterung der MCD-Diät eine 7-fache Erhöhung der ALT im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie eine 4-fache Erhöhung der AST (*Marcolin, Forgiarini et al. 2011*). Erhöhte ALT-Werte im Zusammenhang mit einer MCD-Diät zeigte auch die Studie von *Witek et al.* im Jahr 2009. Sie untersuchten ob der Pan-Caspase Inhibitor VX-166 die Progression einer Leberfibrose vermindert. *Arase et al.* untersuchten in ihrer Studie die Wirkung von Sitagliptin bei chronischem Leberschaden, verursacht durch Hepatitis C am diabetischen Patienten. Die Untersuchungen zeigten, dass weder die ALT noch die AST nach Sitagliptinbehandlung sich veränderten (*Arase, Suzuki et al. 2011*). Das Ausmaß der Transaminasen-Erhöhung in der vorliegenden Arbeit wurde durch die 11-wöchige MCDD induziert. Während die ALT in der Kontrollgruppe eine 5,5-fache Erhöhung zeigt, so ist die in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe 16-fach erhöht (Abbildung 21). Genauso verhält es sich mit der AST. Es zeigt sich in der Kontrollgruppe eine 5,5-fache Erhöhung und in der Sitagliptin-Gruppe eine 11-fache (Abbildung 20). Die Werte sind somit in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe signifikant höher. Anhand der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine Sitagliptinbehandlung den Leberschaden verstärkt.

4.6 Beurteilung der hepatischen Entzündung anhand von Inflammationsmarkern

GLP-1 Analoga haben bereits gezeigt, dass sie anti-inflammatorische Wirkungen besitzen. So wurden die anti-inflammatorischen Effekte von Liraglutide in verschiedenen *in vitro* Studien getestet (Hattori, Jojima et al. 2010). Ebenso beschreiben *Ta et al.* anti-inflammatorische Effekte des DPP-4 Inhibitors Alogliptin (2011). Mit der Annahme, dass der Einsatz von Sitagliptin die endogenen GLP-1 Spiegel stabilisiert und darüber hinaus anti-inflammatorisch wirksam ist, wurden die Inflammationsmarker TNF α und Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in dieser Studie bestimmt.

Mittels quantitativer Realtime PCR wurden in dieser Studie die Inflammationsmarker TNF α und Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in der Leber quantifiziert. Es handelt sich um pro-inflammatorische Zytokine, welche von Makrophagen ausgeschüttet werden und an lokalen als auch an systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Durch deren Quantifizierung kann eine Aussage über das Ausmaß der vorliegenden Entzündung getroffen werden.

Sitagliptin reduziert signifikant eine Fettgewebsentzündung und eine Entzündung der pankreatischen Inseln bei Mäusen, die einer Hochfett-Diät unterzogen wurden. Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch eine reduzierte Makrophagen-einwanderung in das entzündlich veränderte Gewebe. In der Studie von *Dobrian et al.* war im Fettgewebe eine signifikant reduzierte mRNA Expression von TNF α sowie anderer Zytokine zu sehen und im Pankreas war die MCP-1 3,3-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert (Dobrian, Ma et al. 2011). In einer Studie über sechs Wochen untersuchten *Ferreira et al.* am diabetischen Rattenmodell (ZDF-Ratten) die Wirkung von Sitagliptin auf Dysmetabolismus, Inflammation und oxidativen Stress. Als überraschendes Ergebnis konnte unter Sitagliptinbehandlung ein signifikanter Anstieg von TNF α und IL-1 β beobachtet werden (Ferreira, Teixeira-de-Lemos et al. 2010). Der Anstieg ist als ungewünschter Nebeneffekt von Sitagliptin zu betrachten. Grund dafür könnte sein, dass DPP-4 neben den Inkretinen eine große Substratvielfalt (siehe Tabelle 3) aufweist. So scheint eine Inhibition der DPP-4 Aktivität weit mehr Auswirkungen zu haben, als bisher angenommen. Ebenso sind allergische Reaktionen, Halsschmerzen und Schnupfen als Nebeneffekte einer Behandlung mit DPP-4 Inhibitoren beschrieben (Forssmann, Stoetzer et al. 2008). Generell ist davon auszugehen, dass unter MCDD pro-inflammatorische Zytokine (z. Bsp. TNF α) ansteigen (Witek, Stone et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit zeigt Sitagliptin keine Wirkung auf die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine MCP-1 und TNF α (Abbildungen 27 und 28).

Nicht nur auf mRNA Ebene wurde in der vorliegenden Arbeit ein fehlender Effekt von Sitagliptin verzeichnet, sondern auch auf Proteinebene konnte keine verminderte Aktivierung einer Entzündungsreaktion festgestellt werden. *Videla et al.* untersuchten den NF κ B Signalweg bei Patienten mit einer Fettleber, sowie bei Patienten mit einer NASH. Während die Patienten mit der Fettleber keine

erhöhten Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe aufzeigten, waren die Werte der NASH Patienten signifikant erhöht (2009). In der vorliegenden Studie wurde der NFκB Signalweg in der Leber mittels Western Blot untersucht. NFκB liegt physiologischerweise inaktiv im Zytoplasma von Zellen vor. Durch die Aktivierung mittels diverser Stimuli (unter anderem TNFα) gelangen NFκB-Moleküle in den Zellkern und fördern dort eine verstärkte Transkription der betroffenen Gene. Man geht derzeit davon aus, dass etwa 200 verschiedene Gene von NFκB reguliert werden. Darunter fallen viele Zytokine und Adhäsionsmoleküle, welche eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Immunsystems spielen (Karin and Ben-Neriah 2000).

In den Studien mit GLP-1 Analoga wird das physiologische Maß der Expression von GLP-1 überschritten. Mit DPP-4 Inhibitoren wird jedoch das physiologische Maß von GLP-1 nach Nahrungsaufnahme ausschließlich stabilisiert. Des Weiteren hat DPP-4 voraussichtlich ein weit größeres Wirkungsspektrum als GLP-1 Analoga aufgrund der großen Substratvielfalt.

Da in der vorliegenden Arbeit keine Gruppenunterschiede, weder auf Aktivierung des NFκB Signalweges noch auf die Expression von TNFα und MCP-1 zu verzeichnen waren, kann davon ausgegangen werden, dass in beiden Tiergruppen der Entzündungscharakter der Lebern identisch ist.

4.7 Evaluierung der Leberfibrose anhand von Lebergewicht, Fibrosemarkern und Histologie der Leber

Eine NASH zeigt sich histopathologisch wie eine alkoholisch bedingte Steatohepatitis. Im Verlauf verändert sich die makroskopische Morphologie. So ist die Leber im Stadium der Steatose und Steatitis vergrößert und schwerer. Im Endstadium der NASH steht die Zirrhose. Makroskopisch ist die Leber dann verkleinert und die Oberfläche erscheint knotig. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass das durchschnittliche Lebergewicht in der mit Sitagliptin-haltigen Futter gefütterten Tiergruppe signifikant höher ist, als das der Kontrollgruppe. *Rinella et al.* befassten sich mit dem Mechanismus der MCDD induzierten NASH bei insulinresistenten (db/db-Mäuse) und insulinsensitiven (db/m-Mäuse) Tieren. Ein Ergebnis war dabei, dass in beiden Mauslinien die Tiergruppe, welche die MCDD erhielt, ein signifikant niedrigeres Lebergewicht aufwies als die Tiere die mit Kontrollfutter gefüttert wurden. Der Versuch erstreckte sich über einen Zeitraum von vier Wochen (Rinella, Elias et al. 2008). Generell ist nach einer MCDD Gabe von vier Wochen eine vollständige Steatohepatitis bei Mäusen entwickelt. Das Stadium der Fibrose wird jedoch erst mit der zehnten Woche der Fütterung erreicht (Larter and Yeh 2008). Das Resultat, dass die Lebern der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe schwerer sind, könnte zu der Annahme führen, dass die Lebererkrankung noch nicht so weit fortgeschritten ist wie in der Gruppe ohne Behandlung. Eine Konsequenz aus diesem einzigen Parameter zu ziehen ist jedoch nicht möglich, da keine Studien darüber vorliegen, wie sich das Lebergewicht im Verlauf einer MCDD Fütterung verhält. Eine Studie von

Shirakawa et al. zeigte, dass die Fütterung von Sitagliptin keinen Einfluss auf das Lebergewicht hat und sogar eine präventive Wirkung gegen eine Leberverfettung erzielt wird. In dieser Studie wurde jedoch nicht das Modell einer MCDD induzierten NASH verwendet (Shirakawa, Fujii et al. 2011).

Die Charakterisierung der Leberfibrose in dieser Arbeit erfolgte auf drei Wegen. Auf RNA Ebene wurden die Fibrosemarker Collagen type 1 alpha 1 (Col1a1) und alpha smooth muscle actin (aSMA) in der Leber quantifiziert. Col1a1 ist ein Gen, welches den Hauptbestandteil des Kollagen Typ 1 kodiert. Bei aSMA handelt es sich um ein Protein, welches als Marker für das Vorhandensein von Myofibroblasten verwendet wird. Myofibroblasten stellen eine Zwischenform zwischen glatter Muskelzelle und Fibroblast dar. Sie enthalten kontraktile Aktin- und Myosin- Filamente und zeigen eine hohe endogene Produktion von Kollagen (Nagamoto, Eguchi et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Col1a1- und aSMA- Gehalt in den Lebern. Es ist jedoch bei beiden Parametern zu sehen, dass die durchschnittlichen Werte der Sitagliptin-behandelten Tiergruppe über den Werten der Kontrollgruppe liegen (Abbildungen 32/33). Des Weiteren wurde der Hydroxyprolinegehalt der Lebern mittels photometrischer Messung ermittelt. Hydroxyprolin ist eine Aminosäure, die bei der Stabilisierung der Triple-Helix Struktur des Kollagens eine zentrale Rolle spielt. Sie ist ausschließlich im Kollagen in nennenswerter Menge zu finden. Aufgrund des spezifischen Vorkommens von Hydroxyprolin im Kollagen gilt es als repräsentativer Parameter für den Kollagengehalt im Lebergewebe. Hier sind in den Ergebnissen dieser Studie keine Unterschiede zu verzeichnen (Abbildung 31). Den entscheidendsten Untersuchungsschritt stellte eine histologische Untersuchung mit Siriusrot Färbung dar. Diese Färbemethode ist Mittel der Wahl zur histologischen Untersuchung von Kollagen bei Formalinschnitten von Organen. Dr. Christer Bäck von der Arbeitsgruppe PD Dr. Frank Tacke in Aachen führte die Untersuchung verblindet durch, wodurch eine subjektive Beeinflussung der Ergebnisse ausgeschlossen wurde. Anschließend erfolgte die Auswertung semiquantitativ im Dunkelfeld. Es zeigte sich ein signifikant höherer Kollagenanteil in den Lebern der Sitagliptin-behandelten Tiergruppe (Abbildung 34/35/36). Zusammenfassend lässt sich anhand der vorliegenden Studie sagen, dass Sitagliptin keinen positiven Effekt auf eine Leberfibrose hat. Die Ergebnisse zeigen eher, dass die Fibrose durch die orale Verabreichung von Sitagliptin verstärkt wird.

5 Bewertung der Futteranalyse

Zur Identifizierung des Sitagliptingehaltes in den Futterpellets wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Um eine Verwechslung der Futterbeutel beim Abfüllen von portionierten Futtermitteln auszuschließen, wurden Proben aus den Originalfutterbeuteln und den abgefüllten Futterbeuteln eingeschickt. Anhand der Ergebnisse ist eindeutig, dass keine Verwechslung des Futters stattgefunden hat (Anhang 2).

6 Schlussfolgerung

Die Zusammenhänge zwischen Entzündungsprozessen unter der Beteiligung von DPP-4 Inhibitoren stehen im derzeitigen wissenschaftlichen Interesse. Die Untersuchungen der vorliegenden Studie wurden aufgrund der häufigen Ausbildung einer NASH im Zusammenhang mit T2DM durchgeführt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse, ist kein positiver Effekt durch die Gabe von Sitagliptin auf eine NASH zu erkennen. Die Marker für Fibrose und Inflammation der Leber sind in der Kontrollgruppe und der Sitagliptin-behandelten Tiergruppe als gleich zu werten. Die Transaminasen, sowie die Serumlipide zeigen in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe höhere Werte an. Als eine positive Wirkung von Sitagliptin ist in dieser Studie der geringere Gewichtsverlust zu sehen. Die Aussage, dass Sitagliptin voraussichtlich hilfreich in der Therapie von NAFLD ist (Iwasaki, Yoneda et al. 2011), kann mit der vorliegenden Arbeit nicht unterstützt werden. *Iwasaki et al.* zeigten durch Sitagliptin eine Verminderung der Nüchternblutglukose und einen Abfall der hepatischen Transaminasen. In der vorliegenden Arbeit jedoch zeigt Sitagliptin keinerlei Auswirkung auf die Nüchternblutglukose und die hepatischen Transaminasen sind erhöht. Auch ist die Effektivität des DPP-4 Inhibitors beim Vorliegen einer NASH anzuzweifeln. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine deutlich höhere DPP-4 Aktivität in der mit Sitagliptin-behandelten Gruppe. Die bisher existierenden Studien über Sitagliptin im Zusammenhang mit einer NAFLD bestimmten die DPP-4 Aktivität nicht (Iwasaki, Yoneda et al. 2011; Maiztegui, Borelli et al. 2011). Sollte sich in weiteren Untersuchungen bestätigen, dass Sitagliptin die Enzymaktivität beim Vorliegen einer NASH erhöht, würde es bedeuten, dass das Vorliegen einer NASH eine Kontraindikation für die T2DM Behandlung mit Sitagliptin darstellt. Diese Aussage ist jedoch sehr kritisch zu formulieren, da die vorliegende Arbeit das erste Modell ist, in dem Sitagliptin in Verbindung mit einer MCDD am Mausmodell getestet wurde. Um den Ergebnissen eine tatsächliche Aussagekraft zuzuschreiben, müssen weitere Studien folgen um die vorliegenden Ergebnisse zu bestätigen. Diese Studien sollten ein anderes Tiermodell wählen, da die Auswirkungen der MCDD am Mausmodell höchstwahrscheinlich zu dramatisch sind.

VI Zusammenfassung

Das metabolische Syndrom (MetS) ist weltweit verbreitet und stellt eine Zusammenfassung verschiedener Risikofaktoren dar, die eine Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) begünstigen. So leiden bereits 6 % der Weltbevölkerung an T2DM. Auch in der Kleintiermedizin gehört Diabetes mellitus zu den häufigsten metabolischen Erkrankungen. Als hepatische Form des MetS ist die nicht alkoholisch bedingte Steatohepatitis (NASH) zu sehen. Ein zeitgleiches Erkranken von Patienten an NASH und T2DM ist keine Seltenheit, weshalb es interessant ist, diese beiden Erkrankungen im Zusammenhang zu untersuchen. Neueste orale Antidiabetika basieren auf dem Inkretinsystem. So stabilisieren Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) Inhibitoren den physiologischen GLP-1 Spiegel im Blut und regulieren dadurch den Blutzuckerspiegel ohne dabei ein Hypoglykämie-Risiko für den Patienten darzustellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des DPP-4 Inhibitors Sitagliptin in Verbindung mit einer NASH untersucht. Dabei galt es zu prüfen, in wieweit der Blutglukosespiegel, die Leberverfettung, sowie das Ausmaß der Leberfibrose und eventuelle anti-inflammatorische Wirkungen durch Sitagliptingabe beeinflusst werden.

Die NASH wurde bei C57BL/6J-Mäusen mittels Methionin-Cholin defizienter Diät (MCDD) induziert. Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich die MCDD, während der Versuchsgruppe die MCDD in Kombination mit einer 0,3 %igen Sitagliptindosis gefüttert wurde. Anhand eines viertägigen Vorversuchs wurde die Wirksamkeit der Sitagliptindosis getestet. Im Anschluss folgte der elf-wöchige Hauptversuch.

Im Vorversuch zeigte sich sowohl im Serum als auch in Leber und Niere eine signifikante Hemmung der DPP-4 Aktivität unter der angewandten Dosis. Im Hauptversuch konnten folgende Ergebnisse erzielt werden: Die mit Sitagliptin-behandelte Tiergruppe wies signifikant höhere Werte im Körpergewicht, der DPP-4 Aktivität, der Serumlipide (GC und TG), der Transaminasen (AST und ALT), dem Lebergewicht und dem Kollagenanteil in der Leber auf. Es zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede in der Nüchternblutglukose, den hepatischen Lipiden, der DPP-4 Aktivität in Leber und Niere, den Inflammationsmarkern (TNF α , MCP-1, NF κ B) und den Fibrosemarkern (Colla1, α SMA, Hydroxyprolin). Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die mit Sitagliptin-behandelte Tiergruppe einen höheren Leberschaden aufweist. Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, welche die Auswirkungen von Sitagliptin im Zusammenhang mit einer NASH untersucht. Das gewählte Modell ist kritisch zu betrachten, da der durch die Diät verursachte Gewichtsverlust wahrscheinlich starke Beeinträchtigungen der Körperfunktionen bedeutet und damit die Ergebnisse nicht repräsentativ sind. Weitere Studien sind notwendig, um zu zeigen, ob Sitagliptin bei bestehender NASH tatsächlich eine negative Wirkung hat.

VII Summary

The worldwide occurring metabolic syndrome (MetS) is a cluster of risk factors for type 2 diabetes mellitus (T2DM). Currently 6% of the global human population suffer from T2DM. Also in veterinary medicine diabetes mellitus ranks under the most frequent diseases. Non alcoholic steatohepatitis (NASH) is considered as hepatic form of MetS. Simultaneous disease of patients with NASH and T2DM is not uncommon, therefore it is interesting to investigate both diseases in combination. The most recent generation of anti diabetic drugs target the incretin system. It is known, that dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) inhibitors stabilize the physiological GLP-1 blood level and thereby regulate the blood glucose level without putting the patient at risk of hypoglycaemia.

The work presented here examines the effects of the DPP-4 inhibitor Sitagliptin in conjunction with NASH. Particular attention was given to the examination of potential influences of Sitagliptin on blood glucose levels, liver adiposis, the extent of liver fibrosis and possible anti-inflammatory effects.

NASH was induced in C57BL/6J-Mice by feeding them a methionin-choline deficient diet (MCDD). The control group was fed exclusively on MCDD, while the experimental group was fed a MCDD in combination with 0.3 % Sitagliptin. The dose efficacy of Sitagliptin was tested in an initial four day experiment, followed by the main experiment with a duration of eleven weeks.

The four day pre-experiment showed significant inhibition of DPP-4 activity under the dosage applied. The main experiment gave the following results: the group of animals treated with Sitagliptin exhibited significantly higher body weight, DPP-4 activity, serum lipids (GC and TG), transaminases (AST and ALT), liver weight and liver collagen. Both groups showed no significant differences in fasting blood glucose, hepatic lipids, DPP-4 activity in liver and kidneys, as well as inflammatory markers (TNF α , MCP-1, NF κ B) and fibrosis markers (Colla1, aSMA, hydroxyproline).

The results suggest a more severe liver damage in the animal group treated with Sitagliptin. The work presented here is the first study which investigates the effects of Sitagliptin in conjunction with NASH. The experimental approach however requires careful interpretation since the diet applied leads to an excessive weight loss and most likely cause of this to strong adverse effects on body functions. Therefore the result might not be representative. Further studies will be necessary in order to examine potential negative impacts of Sitagliptin treatment in conjunction with NASH.

VIII Anhang

1 Ergänzende Verlaufsdarstellung Ergebnisse

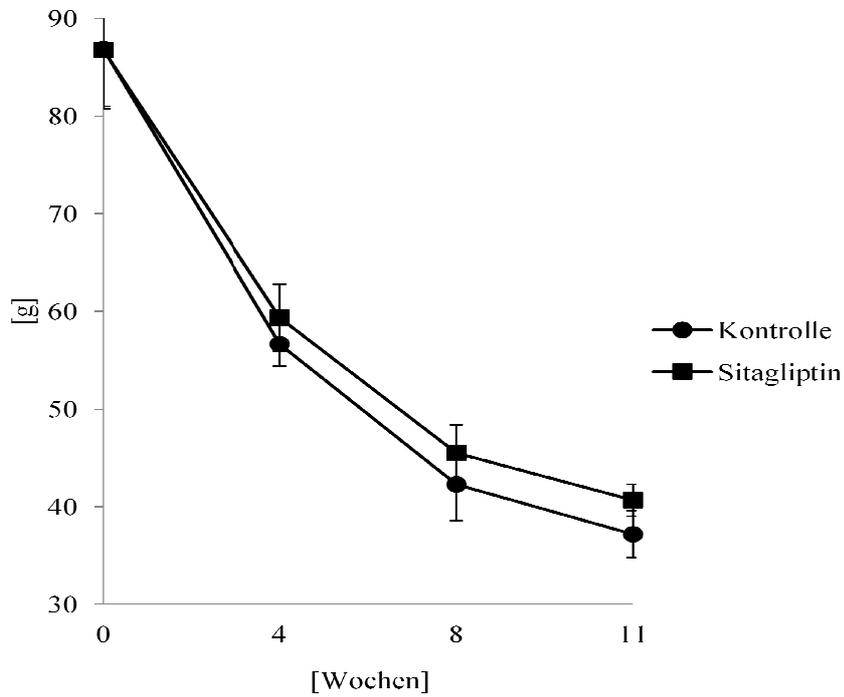


Abbildung 37: Nüchternblutglukose; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12)

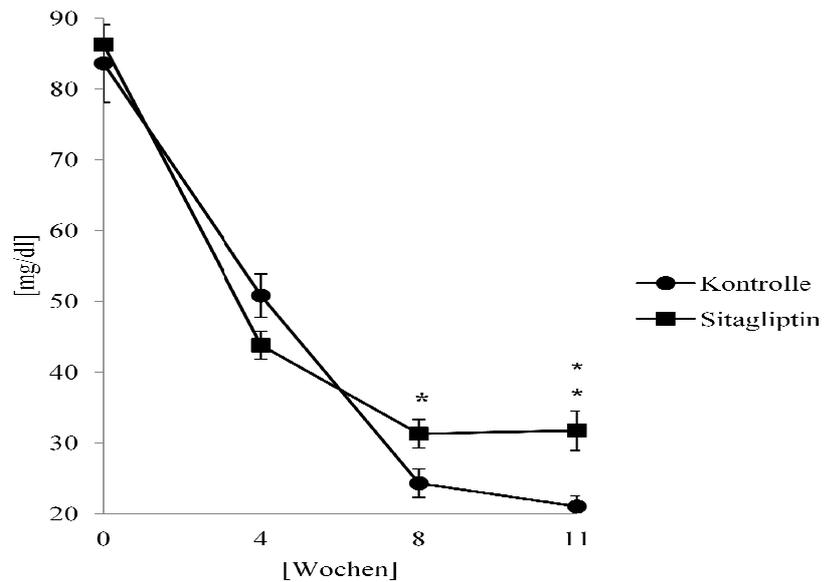


Abbildung 38: Gesamtcholesterin Serum; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12); *p<0,05; **p<0,01

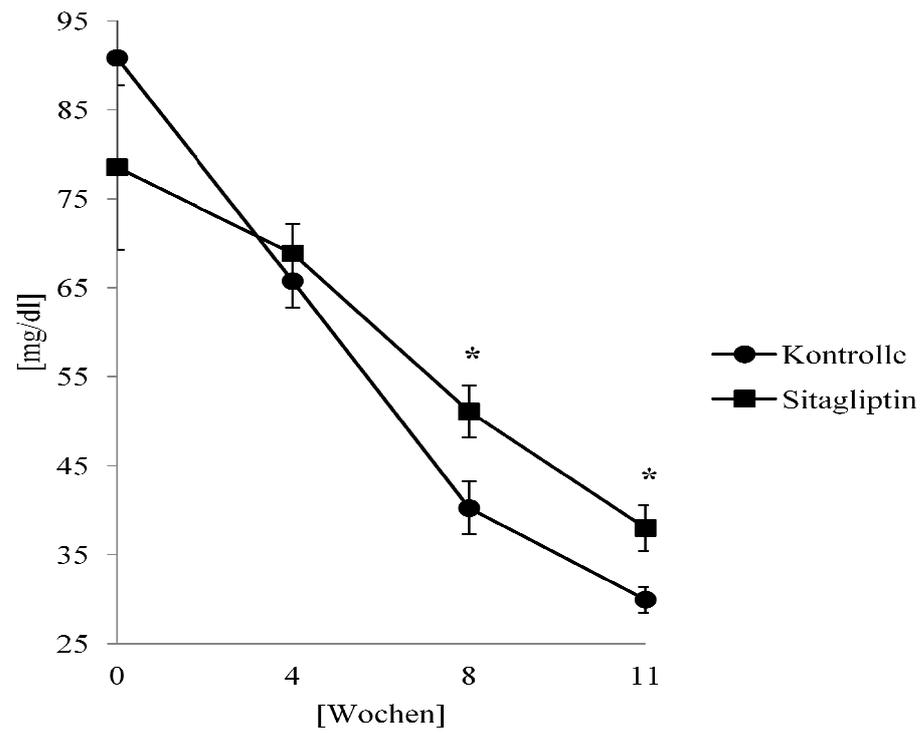


Abbildung 39: Triglyzeride Serum; Protokoll II; MW \pm SEM; Kontrollgruppe (n=11); Sitagliptin-behandelte Gruppe (n=12); *p<0,05

2 Protokoll Futteranalyse

	Klinik-Apotheke Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Fetscherstraße 74 01307 Dresden Tel.: 0351-45812957	Universitätsklinikum Carl Gustav Carus DIE DRESDNER.	
<h3>Protokoll</h3>			

Hersteller: Medizinische Klinik II - Grosshadern Klinikum der Universität München
 Marchioninstr. 15, 81377 München
Eingangsdatum: 15.03.2011
Menge: 5 Proben
Prüfdatum: 16.03. bis 17.03.2011
Untersuchungsmaterial: Verum- und Placebopellets

1. Pellets **mit** Sitagliptin **Originalpackung**
2. Pellets **mit** Sitagliptin Futterbeutel
3. Pellets **ohne** Sitagliptin **Originalpackung**
4. Pellets **ohne** Sitagliptin Futterbeutel
5. Sitagliptin (Januvia® 100mg Tabletten)

Aufgabenstellung: Identifizierung von Sitagliptin in Pellets

Durchgeführte Prüfungen:

IR-Spektralanalyse

Sitagliptin kann mittels IR-Spektralanalyse identifiziert werden. Januvia® 100mg Tabletten wurden zermörsert und ein Spektrum als Referenz aufgenommen.

Die IR-Spektren der zermörserten Pellets führte nicht zu einer ausreichenden Identifizierung von Sitagliptin im Futter. Dazu ist der Wirkstoffanteil mit 0,3% für diese Methode zu gering.

UV-VIS-Spektralanalyse

Ein Spektrum von Januvia® 100mg Tablette (100mg in 100,0ml Methanol) wurde im Bereich von 200nm bis 400nm aufgenommen. Es wurden Maxima bei 217nm und 267nm detektiert. Die Aufnahme der Spektren aus den Pellets mit und ohne Sitagliptin führte zu keinem auswertbaren Ergebnis, da der Futteranteil nicht abgetrennt werden konnte, der gleichen Wellenlängen absorbiert hat.

Dünnschichtchromatografie

Die Proben wurden jeweils in Methanol gelöst und nach Filtration auf eine Kieselgel F254 DC-Platte aufgetragen. Als Fließmittel wurde Ethylacetat-Ethanol-Wasser-Ammoniak (45+45+5+5) verwendet. Nach Trocknung erfolgte die Auswertung im UV-Licht bei 254nm.

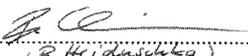
Ergebnis:

Der Wirkstoff konnte aus der Januvia® 100mg Tablette mit zwei Zonen kurz unter der Fließmittelfront nachgewiesen werden. Diese Zonen waren in gleicher Höhe mit ähnlicher Intensität ebenfalls darstellbar in

- Probe 1. Pellets **mit** Sitagliptin **Originalpackung** und
 Probe 2. Pellets **mit** Sitagliptin Futterbeutel.

Ergebnis der Untersuchung:

Durch die dünnschichtchromatografische Untersuchung der Proben 1 bis 5 konnte Sitagliptin in den Proben 1, 2 und 5 nachgewiesen werden. Eine Verwechslung kann nicht festgestellt werden.

Unterschrift Prüfer: 
 (B. Heilmann)

Dresden, ... 17.3.2011

Stier
 Leiterin QK

A. L.

Anlage: DC-Protokoll

IX Literaturverzeichnis

- (2012). Rote Liste 2011 - Arzneimittelverzeichnis für Deutschland Rote Liste Service GmbH.
- Adams, L. A., P. Angulo, et al. (2005). "Nonalcoholic fatty liver disease." *CMAJ* 172(7): 899-905.
- Aguirre, V., T. Uchida, et al. (2000). "The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)." *J Biol Chem* 275(12): 9047-9054.
- Alberti, K. G., R. H. Eckel, et al. (2009). "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." *Circulation* 120(16): 1640-1645.
- Angulo, P. (2007). "GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease." *Aliment Pharmacol Ther* 25(8): 883-889.
- Arase, Y., F. Suzuki, et al. (2011). "Efficacy and safety in sitagliptin therapy for diabetes complicated by chronic liver disease caused by hepatitis C virus." *Hepatol Res* 41(6): 524-529.
- Arthur, M. J. (2000). "Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(2): G245-249.
- Azuma, K., Z. Radikova, et al. (2008). "Measurements of islet function and glucose metabolism with the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor vildagliptin in patients with type 2 diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* 93(2): 459-464.
- Baggio, L. L. and D. J. Drucker (2007). "Biology of incretins: GLP-1 and GIP." *Gastroenterology* 132(6): 2131-2157.
- Balaban, Y. H., P. Korkusuz, et al. (2007). "Dipeptidyl peptidase IV (DDP IV) in NASH patients." *Ann Hepatol* 6(4): 242-250.
- Browning, J. D. and J. D. Horton (2004). "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury." *J Clin Invest* 114(2): 147-152.
- Brunt, E. M. and D. G. Tiniakos (2010). "Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease." *World J Gastroenterol* 16(42): 5286-5296.
- Burt, A. D., A. Mutton, et al. (1998). "Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis." *Semin Diagn Pathol* 15(4): 246-258.
- Canbay, A., P. Taimr, et al. (2003). "Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic." *Lab Invest* 83(5): 655-663.
- Davis, J. A., S. Singh, et al. (2010). "Nature of action of Sitagliptin, the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor in diabetic animals." *Indian J Pharmacol* 42(4): 229-233.
- Deacon, C. F. (2004). "Circulation and degradation of GIP and GLP-1." *Horm Metab Res* 36(11-12): 761-765.
- Dixon, J. B., P. S. Bhathal, et al. (2001). "Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese." *Gastroenterology* 121(1): 91-100.
- Dobrian, A. D., Q. Ma, et al. (2011). "Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(2): E410-421.
- Drenckhahn, D. (2004). Endokrines Pankreas. *Anatomie*. Elsevier. 16: 214-218.

- Drucker, D. J. and M. A. Nauck (2006). "The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes." *Lancet* 368(9548): 1696-1705.
- Duvnjak, M., I. Lerotic, et al. (2007). "Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease." *World J Gastroenterol* 13(34): 4539-4550.
- El-Salhy, M., D. Gundersen, et al. (2011). "Low Densities of Serotonin and Peptide YY Cells in the Colon of Patients with Irritable Bowel Syndrome." *Dig Dis Sci*.
- Elekes, K., K. Sandor, et al. (2011). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays an anti-inflammatory role in endotoxin-induced airway inflammation: in vivo study with gene-deleted mice." *Peptides* 32(7): 1439-1446.
- EMA (2007). Januvia - Product information, Merck Sharp & Dohme Ltd.
- EMA (2011). Trajenta - Product information, Boehringer Ingelheim International GmbH.
- Ferreira, L., E. Teixeira-de-Lemos, et al. (2010). "Effects of sitagliptin treatment on dysmetabolism, inflammation, and oxidative stress in an animal model of type 2 diabetes (ZDF rat)." *Mediators Inflamm* 2010: 592760.
- Ferreira, R., T. Santos, et al. (2011). "Neuropeptide Y inhibits interleukin-1beta-induced phagocytosis by microglial cells." *J Neuroinflammation* 8: 169.
- Firneisz, G., P. L. Lakatos, et al. (2001). "Serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV, CD26) activity in chronic hepatitis C." *Scand J Gastroenterol* 36(8): 877-880.
- Firneisz, G., T. Varga, et al. (2010). "Serum dipeptidyl peptidase-4 activity in insulin resistant patients with non-alcoholic fatty liver disease: a novel liver disease biomarker." *PLoS One* 5(8): e12226.
- Forssmann, U., C. Stoetzer, et al. (2008). "Inhibition of CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances CCL11/eotaxin-mediated recruitment of eosinophils in vivo." *J Immunol* 181(2): 1120-1127.
- Gallwitz, B. (2007). "Sitagliptin: profile of a novel DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes (update)." *Drugs Today (Barc)* 43(11): 801-814.
- Giulietti, A., L. Overbergh, et al. (2001). "An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression." *Methods* 25(4): 386-401.
- Hadjiyanni, I., K. A. Siminovitch, et al. (2010). "Glucagon-like peptide-1 receptor signalling selectively regulates murine lymphocyte proliferation and maintenance of peripheral regulatory T cells." *Diabetologia* 53(4): 730-740.
- Hanefeld, M., F. Schaper, et al. (2007). "Geschichte und Definition(en) des metabolischen Syndroms." *Der Internist* 48: 117-125.
- Harrison, B., C. Leazenby, et al. (2011). "Accuracy of the CONTOUR(R) blood glucose monitoring system." *J Diabetes Sci Technol* 5(4): 1009-1013.
- Hattori, S. (2011). "Sitagliptin reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes." *Endocr J* 58(1): 69-73.
- Hattori, Y., T. Jojima, et al. (2010). "A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells." *Diabetologia* 53(10): 2256-2263.
- Hoening, M. (2002). "Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats." *Mol Cell Endocrinol* 197(1-2): 221-229.

- Hoening, M. and D. L. Dawe (1992). "A qualitative assay for beta cell antibodies. Preliminary results in dogs with diabetes mellitus." *Vet Immunol Immunopathol* 32(3-4): 195-203.
- Hogan, A. E., A. M. Tobin, et al. (2011). "Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the regulation of human invariant natural killer T cells: lessons from obesity, diabetes and psoriasis." *Diabetologia*.
- Holst, J. J. and C. F. Deacon (2005). "Glucagon-like peptide-1 mediates the therapeutic actions of DPP-IV inhibitors." *Diabetologia* 48(4): 612-615.
- Holst, J. J., T. Vilsboll, et al. (2009). "The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus." *Mol Cell Endocrinol* 297(1-2): 127-136.
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." *Nature* 444(7121): 860-867.
- Huang, L., Y. Tang, et al. (2011). "Vasoactive Intestinal Peptide Enhances TNF-alpha-Induced IL-6 and IL-8 Synthesis in Human Proximal Renal Tubular Epithelial Cells by NF-kappaB-Dependent Mechanism." *Inflammation*.
- Ismail, M. H. (2011). "Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: the hidden epidemic." *Am J Med Sci* 341(6): 485-492.
- Iwai, T., S. Ito, et al. (2006). "Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1beta production in cultured rat astrocytes." *Neurosci Res* 55(4): 352-360.
- Iwasaki, T., M. Yoneda, et al. (2011). "Sitagliptin as a novel treatment agent for non-alcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus." *Hepatogastroenterology* 58(112): 2103-2105.
- Jaeschke, A. and R. J. Davis (2007). "Metabolic stress signaling mediated by mixed-lineage kinases." *Mol Cell* 27(3): 498-508.
- Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." *Annu Rev Immunol* 18: 621-663.
- Karlmark, K. R., R. Weiskirchen, et al. (2009). "Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis." *Hepatology* 50(1): 261-274.
- Kim, S. J., C. Nian, et al. (2009). "Dipeptidyl peptidase IV inhibition with MK0431 improves islet graft survival in diabetic NOD mice partially via T-cell modulation." *Diabetes* 58(3): 641-651.
- Kirino, Y., Y. Sato, et al. (2011). "Altered dipeptidyl peptidase-4 activity during the progression of hyperinsulinemic obesity and islet atrophy in spontaneously late-stage type 2 diabetic rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(2): E372-379.
- Kodera, R., K. Shikata, et al. (2011). "Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes." *Diabetologia* 54(4): 965-978.
- Lambeir, A. M., C. Durinx, et al. (2003). "Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV." *Crit Rev Clin Lab Sci* 40(3): 209-294.
- Larter, C. Z., S. Chitturi, et al. (2010). "A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers." *J Gastroenterol Hepatol* 25(4): 672-690.
- Larter, C. Z. and M. M. Yeh (2008). "Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right." *J Gastroenterol Hepatol* 23(11): 1635-1648.
- Ludwig, J., D. B. McGill, et al. (1997). "Review: nonalcoholic steatohepatitis." *J Gastroenterol Hepatol* 12(5): 398-403.

- Ludwig, J., T. R. Viggiano, et al. (1980). "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease." *Mayo Clin Proc* 55(7): 434-438.
- Macfarlane, D. P., X. Zou, et al. (2011). "Metabolic pathways promoting intrahepatic fatty acid accumulation in methionine and choline deficiency: implications for the pathogenesis of steatohepatitis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(2): E402-409.
- Maiztegui, B., M. I. Borelli, et al. (2011). "Sitagliptin prevents the development of metabolic and hormonal disturbances, increased beta-cell apoptosis and liver steatosis induced by a fructose-rich diet in normal rats." *Clin Sci (Lond)* 120(2): 73-80.
- Marcolin, E., L. F. Forgiarini, et al. (2011). "Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis." *Arq Gastroenterol* 48(1): 72-79.
- Martin, J. H., C. F. Deacon, et al. (2011). "Incretin-based therapies--review of the physiology, pharmacology and emerging clinical experience." *Intern Med J* 41(4): 299-307.
- Marx, N., M. Burgmaier, et al. (2010). "Glucagon-like peptide-1(1-37) inhibits chemokine-induced migration of human CD4-positive lymphocytes." *Cell Mol Life Sci* 67(20): 3549-3555.
- Mells, J. E., P. P. Fu, et al. (2012). "Glp-1 analog, liraglutide, ameliorates hepatic steatosis and cardiac hypertrophy in C57BL/6J mice fed a Western diet." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302(2): G225-235.
- Mentlein, R. (1999). "Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides." *Regul Pept* 85(1): 9-24.
- Monami, M., C. Lamanna, et al. (2011). "DPP-4 Inhibitors and lipids: Systematic review and meta-analysis." *Adv Ther*.
- Nagamoto, T., G. Eguchi, et al. (2000). "Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(5): 1122-1129.
- Nauck, M. A., M. M. Heimesaat, et al. (1993). "Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus." *J Clin Invest* 91(1): 301-307.
- Nelson, R. W. (2005). Diabetes mellitus. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. E. Saunders. California. 2: 1563-1591.
- Nelson, R. W. (2006). Endokrinopathien. *Innere Medizin der Kleintiere*. Elsevier. 1: 781-814.
- Neuschwander-Tetri, B. A. (2006). Fatty Liver, Non-alcoholic Steatohepatitis. *Comprehensive clinical hepatology*, Elsevier: 330.
- Parker, J. C., K. M. Andrews, et al. (1998). "Structure-function analysis of a series of glucagon-like peptide-1 analogs." *J Pept Res* 52(5): 398-409.
- Perner, F., T. Gyuris, et al. (1999). "Dipeptidyl peptidase activity of CD26 in serum and urine as a marker of cholestasis: experimental and clinical evidence." *J Lab Clin Med* 134(1): 56-67.
- Powers, A. C. (2009). Diabetes mellitus. *Harrisons Innere Medizin*, abw. 17: 2808-2844.
- Pugazhenthii, U., K. Velmurugan, et al. (2010). "Anti-inflammatory action of exendin-4 in human islets is enhanced by phosphodiesterase inhibitors: potential therapeutic benefits in diabetic patients." *Diabetologia* 53(11): 2357-2368.
- Rand, J. (1999). "Current understanding of feline diabetes: part 1, pathogenesis." *J Feline Med Surg* 1(3): 143-153.

- Rand, J. S. and R. D. Marshall (2005). "Diabetes mellitus in cats." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 35(1): 211-224.
- Ranganath, L. R. (2008). "The entero-insular axis: implications for human metabolism." *Clin Chem Lab Med* 46(1): 43-56.
- Ratziu, V., P. Giral, et al. (2000). "Liver fibrosis in overweight patients." *Gastroenterology* 118(6): 1117-1123.
- Raubenheimer, P. J., M. J. Nyirenda, et al. (2006). "A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet." *Diabetes* 55(7): 2015-2020.
- Renz-Polster, H. and S. Krautzig (2008). Stoffwechsel und Ernährung. *Basislehrbuch Innere Medizin*, Elsevier. 4: 851-887.
- Rinella, M. E., M. S. Elias, et al. (2008). "Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet." *J Lipid Res* 49(5): 1068-1076.
- Rinella, M. E. and R. M. Green (2004). "The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance." *J Hepatol* 40(1): 47-51.
- Rotter, V., I. Nagaev, et al. (2003). "Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects." *J Biol Chem* 278(46): 45777-45784.
- Scheen, A. J. (2010). "Pharmacokinetics of dipeptidylpeptidase-4 inhibitors." *Diabetes Obes Metab* 12(8): 648-658.
- Sharma, S., J. E. Mells, et al. (2011). "GLP-1 analogs reduce hepatocyte steatosis and improve survival by enhancing the unfolded protein response and promoting macroautophagy." *PLoS One* 6(9): e25269.
- Shirakawa, J., H. Fujii, et al. (2011). "Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice." *Diabetes* 60(4): 1246-1257.
- Smith, B. W. and L. A. Adams (2011). "Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment." *Nat Rev Endocrinol*.
- Starke, A. A. R. (2000). Pathobiochemie, Pathophysiologie und Pathogenese des Stoffwechselsyndroms Typ-2 Diabetes. *Diabetes mellitus*. Berger, Urban & Fischer. 2: 423-503.
- Starkel, P. and I. A. Leclercq (2011). "Animal models for the study of hepatic fibrosis." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25(2): 319-333.
- Ta, N. N., C. A. Schuyler, et al. (2011). "DPP-4 (CD26) inhibitor alogliptin inhibits atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice." *J Cardiovasc Pharmacol* 58(2): 157-166.
- Targher, G. (2007). "Non-alcoholic fatty liver disease, the metabolic syndrome and the risk of cardiovascular disease: the plot thickens." *Diabet Med* 24(1): 1-6.
- Tiniakos, D. G. (2010). "Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22(6): 643-650.
- Tremblay, A. J., B. Lamarche, et al. (2011). "Effect of sitagliptin therapy on postprandial lipoprotein levels in patients with type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* 13(4): 366-373.
- Unger, R. H. and A. M. Eisentraut (1969). "Entero-insular axis." *Arch Intern Med* 123(3): 261-266.
- Urade, M., M. Komatsu, et al. (1989). "Serum dipeptidyl peptidase activities as a possible marker of oral cancer." *Cancer* 64(6): 1274-1280.

- Videla, L. A., G. Tapia, et al. (2009). "Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients." *Obesity (Silver Spring)* 17(5): 973-979.
- Witek, R. P., W. C. Stone, et al. (2009). "Pan-caspase inhibitor VX-166 reduces fibrosis in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis." *Hepatology* 50(5): 1421-1430.
- Yao, Z. M. and D. E. Vance (1988). "The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes." *J Biol Chem* 263(6): 2998-3004.
- Zeisel, S. H. and K. A. da Costa (2009). "Choline: an essential nutrient for public health." *Nutr Rev* 67(11): 615-623.
- Zettl, H., M. Schubert-Zsilavecz, et al. (2010). "Medicinal Chemistry of Incretin Mimetics and DPP-4 Inhibitors." *ChemMedChem* 5(2): 179-185.
- Zunz, E. and J. LaBarre (1929). "Contributions a l'etude des variations physiologique de la secretion interne du pancreas: Relations entre les secretions externe et interne du pancreas." *Arch. Intern. Physiol. Biochim* 31: 20-24.
- Zur, B. (2005). Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. *Dissertation*. Düsseldorf.

X Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Prof. Dr. med. vet. H. Ammer bedanken, durch dessen Hilfe die Anfertigung der vorliegenden Arbeit überhaupt ermöglicht wurde. Vielen Dank für das mir entgegen gebrachte Vertrauen, die Durchsicht der Arbeit und die Einreichung an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Weiter bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. K. Parhofer für die interessante Themenstellung und die freundliche Projektbetreuung.

Mein größter Dank gilt meiner Betreuerin Katja Piotrowski. Sie begleitete mich in jeder Phase dieser Arbeit, war stets für all meine Fragen offen und unterstützte mich intensiv und professionell. Dabei konnte ich mich zu jeder Zeit voll und ganz auf sie verlassen.

Ich bedanke mich bei der ganzen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. K. Parhofer. Hier besonders bei Julia Zugwurst, die mir geduldig bei allen labortechnischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie eine große Hilfe bei der Betreuung der Mäuse darstellte. Vielen Dank an Katja Piotrowski, Julia Zugwurst, Inge Biller-Friedmann, Kerstin Henze, Dr. med. Elisa Waldmann für die wundervolle, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die exzellente Betreuung und fachkundige Hilfestellung, sowie für die unermüdliche Unterstützung und konsequente Motivation.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe PD Dr. Frank Tacke in Aachen, insbesondere Dr. Christer Bäck, die für mich die Histologie und die Hydroxyprolinbestimmung durchführten.

Ich möchte mich bei all meinen Freunden bedanken, die mir immer eine Hilfe waren und mich immer wieder aufbauten. Danke an Janina Driedger für das Korrekturlesen.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie bedanken. Nur durch die Unterstützung meiner Eltern waren das Studium und die Promotion möglich. Meine Eltern und meine Schwester standen mir immer zur Seite und schafften es selbst in den schwierigsten Situationen mir Mut zuzusprechen. Es ist viel wert eine Familie zu haben auf die man sich immer verlassen kann.