

# **Wirkungen von GLP-1 und Exendin-4 auf die myokardiale Glucoseverwertung und Kontraktilität**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor medicinae (Dr. med.)*

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät**

**der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Tien Dung Nguyen

geboren am 18.11.1981 in Ho-Chi-Minh-Stadt, Vietnam

## **Gutachter**

1. Prof. Dr. med. Torsten Doenst

Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Jena

2. Prof. Dr. med. Regine Heller

Institut für molekulare Zellbiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

3. Prof. Dr. med. Michael Stumvoll

Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie, Universitätsklinikum Leipzig

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.07.2014**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                     |  |
|---------------------|--|
| ACC                 | Acetyl-CoA-Carboxylase                                   |
| ADH                 | Antidiuretisches Hormon                                  |
| ANP                 | Atriales natriuretisches Peptid                          |
| ATP                 | Adenosintriphosphat                                      |
| cAMP                | Zyklisches Adenosinmonophosphat                          |
| CAT                 | Carnitin-Acetyltransferase                               |
| CPT                 | Carnitin-Palmitoyltransferase                            |
| CT                  | Carnitintransferase                                      |
| DPP-4               | Dipeptidylpeptidase-4                                    |
| FABP                | Fettsäurebindeprotein                                    |
| FADH                | Reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid                    |
| FAT                 | Fettsäuretranslokase                                     |
| G-6-P               | Glucose-6-Phosphat                                       |
| GIP                 | Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide             |
| GLP-1               | Glucagon-Like Peptide-1                                  |
| GLUT                | Glucosetransporter                                       |
| GRPP                | Glicentin-related pancreatic polypeptide                 |
| GTP                 | Guanosintriphosphat                                      |
| IP                  | Intervening peptide                                      |
| LDH                 | Lactatdehydrogenase                                      |
| MCD                 | Malonyl-CoA-Decarboxylase                                |
| MPC                 | Mitochondrialer Pyruvat-Carrier                          |
| NADH/H <sup>+</sup> | Reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid               |
| NADPH               | Reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NO                  | Stickstoffmonoxid  |
| PDH                 | Pyruvatdehydrogenase                                     |
| PDH                 | Pyruvatdehydrogenase-Komplex                             |
| PDK                 | Pyruvatdehydrogenase-Kinase                              |
| PFK                 | Phosphofruktokinase                                      |
| PKA                 | Proteinkinase A  |
| TCC                 | Tricarboxylat-Carrier                                    |

# INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2 EINLEITUNG .....</b>   | <b>8</b>  |
| 2.1 DAS INKRETINSYSTEM UND GLP-1 .....  | 9         |
| 2.1.1 Allgemeines .....   | 9         |
| 2.1.2 GLP-1 und der systemische Glucosestoffwechsel .....   | 10        |
| 2.1.3 GLP-1-Mimetika .....  | 12        |
| 2.2 KARDIOVASKULÄRE WIRKUNGEN VON GLP-1 .....   | 13        |
| 2.3 GRUNDLAGE DES MYOKARDIALEN STOFFWECHSELS .....  | 16        |
| 2.3.1 Fettsäureverwertung .....   | 17        |
| 2.3.2 Glucoseverwertung .....   | 17        |
| 2.3.3 Oxidative Phosphorylierung .....  | 18        |
| 2.3.4 Alternative Stoffwechselwege von Glucose .....  | 19        |
| 2.3.5 Der Randle-Zyklus .....   | 19        |
| <b>3 ZIELE DER ARBEIT .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>4 PUBLIZIERTE ORIGINALARBEIT .....</b>   | <b>22</b> |
| <p><b>Glucagon-like peptide-1 reduces contractile function and fails to boost glucose utilization in normal hearts in the presence of fatty acids.</b> Nguyen TD, Shingu Y, Amorim PA, Schwarzer M, Doenst T. <i>Int J Cardiol</i>, 168(4): 4085–4092, 2013</p> |           |
| <b>5 DISKUSSION .....</b>   | <b>23</b> |
| <b>6 SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>   | <b>32</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>7 LITERATUR UND QUELLENVERZEICHNIS</b> ..... | <b>33</b> |
| <b>8 ANHANG</b> .....                           | <b>33</b> |
| 8.1 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....              | 40        |
| 8.2 DANKSAGUNG .....                            | 41        |
| 8.3 LEBENSLAUF .....                            | 42        |
| 8.4 WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN.....        | 44        |

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

## **Hintergrund und Ziele der Studie:**

Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) ist ein Inkretinhormon mit Wirkungen auf verschiedene Organsysteme. Exendin-4 ist ein potenter Agonist des GLP-1-Rezeptors. Da eine systemische Aktivierung des GLP-1-Rezeptors gestörte Glucosetoleranz lindern kann, findet GLP-1-basierte Therapie verbreitete Anwendung in der Behandlung von Typ-2-Diabetes mellitus. Neuerdings werden GLP-1-Rezeptoragonisten aufgrund ihrer gewichtsreduzierenden Wirkung als potentielle Antiadiposita diskutiert.

Aufgrund der Expression des GLP-1-Rezeptors im Herzen hat GLP-1 direkte kardiale Wirkungen. Studien zufolge steigert GLP-1 die kardiale Glukoseaufnahme. Es wurde außerdem gezeigt, dass GLP-1 durch Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) die Kontraktilität von Kardiomyozyten herabsetzt. Allerdings wurden diese Untersuchungen unter unphysiologischen Bedingungen durchgeführt, nämlich mit Glucose als alleinigem Substrat, obwohl das Herz überwiegend Fettsäuren zur ATP-Herstellung verstoffwechselt. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Effekte von GLP-1 und Exendin-4 auf die kardiale Glucoseverwertung und Pumpfunktion unter Berücksichtigung des Fettsäurestoffwechsels zu charakterisieren. Des Weiteren sollten die Wirkungen einer systemischen Langzeitbehandlung mit GLP-1 auf die kardiale Glucoseoxidation und die Herzleistung untersucht werden.

## **Methodik und Ergebnisse:**

Herzen von Sprague-Dawley-Ratten wurden im arbeitenden Modus für eine Gesamtdauer von 60 Min mit entweder Glucose (5 mM) oder Glucose (5 mM) und Oleat (0,4 mM) als Substrate perfundiert. Nach 30 Min wurde GLP-1 oder Exendin-4 (jeweils 0,5 nM oder 5 nM) zugegeben. Die Raten der kardialen Glucoseaufnahme und Glucoseoxidation wurden mittels  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-Glucose}$  und  $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-Glucose}$  bestimmt. Leistungsparameter des isolierten Herzens wurden durchgängig registriert.

Mit Glucose als alleinigem Substrat steigerte GLP-1 (5 nM) sowohl die Glucoseaufnahme als auch die Glucoseoxidation, während Exendin-4 (5 nM) nur die Glucoseoxidation stimulierte. Weder GLP-1 noch Exendin-4 beeinflusste die Herzleistung.

Mit der gemischten Substrat-Konstellation wurden hingegen die kardialen Wirkungen beider Peptide stark verändert. GLP-1 konnte weder die Glucoseaufnahme noch die

Glucoseoxidation aktivieren. Zudem senkte GLP-1 (5 nM) die Herzleistung signifikant. Exendin-4 zeigte weiterhin keinen Effekt auf die Herzleistung. Allerdings senkte Exendin-4 die Glucoseaufnahme in beiden Konzentrationen und konnte die Glucoseoxidation nicht mehr stimulieren. Während die oleat-abhängige, negativ inotrope Wirkung von GLP-1 durch Zugabe des GLP-1-Rezeptorblockers Exendin (9-39) vollständig aufgehoben wurde, blieb der oleat-abhängige Effekt von Exendin-4 auf die kardiale Glucoseaufnahme durch diese Blockade unbeeinflusst.

Zur Überprüfung ob die oleat-abhängige, negativ inotrope Wirkung von GLP-1 durch Aktivierung der PKA vermittelt wird, wurde GLP-1 in Anwesenheit des PKA-Inhibitors H-89 zugegeben. Allerdings konnte H-89 die Senkung der Herzleistung durch GLP-1 nicht hemmen.

Zur Untersuchung chronischer, kardialer Effekte von GLP-1 wurden bei Ratten osmotische Pumpen implantiert, die eine kontinuierliche, intravenöse Applikation von GLP-1 ermöglichen. Nach einer vierwöchigen Dauerbehandlung untersuchten wir die Herzfunktion in vivo mittels Echokardiographie und ex vivo mittels isolierter Rattenherzperfusion. Während wir keine Veränderung der Herzfunktion in vivo feststellten, waren sowohl die Herzleistung als auch die kardiale Glucoseoxidation in der mit GLP-1 behandelten Gruppe signifikant reduziert. Im Unterschied zu der berichteten insulinotropen Wirkung von GLP-1 waren diese Behandlungseffekte nicht mit einer Steigerung des Plasma-Insulinspiegels assoziiert.

### **Schlussfolgerungen:**

In Anwesenheit von Oleat in physiologischer Konzentration ist GLP-1 nicht in der Lage, die kardiale Glucoseverwertung zu steigern. Außerdem kann sowohl eine akute als auch eine chronische Behandlung mit GLP-1 die Herzleistung senken. Der GLP-1-Rezeptor-Agonist Exendin-4 kann, unabhängig vom GLP-1-Rezeptor, unterschiedliche Wirkungen auf die kardiale Glucoseaufnahme und Pumpfunktion im Vergleich zu GLP-1 selbst haben. Die Ergebnisse heben die Notwendigkeit vertiefender Untersuchungen über kardiale Effekte beider Peptide hervor und legen nahe, dass diese Untersuchungen in Anwesenheit von Fettsäuren erfolgen sollten.

## 2 EINLEITUNG

Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) ist ein Inkretinhormon, das von den L-Zellen des distalen Ileums und des Kolons gebildet und sezerniert wird. Die Freisetzung von GLP-1 wird durch die intestinale Nahrungspassage stimuliert. Eine Besonderheit von GLP-1 ist dessen rapider Abbau im Plasma durch das Enzym Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4), was unter normalen Bedingungen einen sehr geringen Plasmaspiegel und deshalb eingeschränkte biologische Wirkungen des Peptids zur Folge hat. Zur Aktivierung des GLP-1-Rezeptors in vivo wurden deshalb Agonisten entwickelt, die gegenüber der Degradation durch DPP-4 resistent sind. Exendin-4 ist ein wichtiger Vertreter dieser Substanzgruppe (Drucker 2006, Holst 2007).

Aufgrund der Expression des GLP-1-Rezeptors in vielen Geweben besitzt GLP-1 bzw. dessen Mimetika ein breites Wirkungsspektrum. Sie fördern die Insulinsekretion, verzögern die Magenentleerung und reduzieren die Nahrungsaufnahme, was insgesamt zur Verbesserung der Glucosetoleranz bei Insulinresistenz führt. Infolgedessen findet GLP-1-basierte Therapie verbreitete Anwendung in der Behandlung von Typ-2-Diabetes mellitus (Lovshin und Drucker 2009). Aufgrund der gewichtsreduzierenden Wirkung von GLP-1-Rezeptoragonisten werden diese außerdem als potente Therapieansätze für Adipositas diskutiert (Raun et al. 2007, Buse et al. 2009, Vilsboll et al. 2012).

GLP-1 und Exendin-4 können die Glucoseaufnahme im Skelettmuskel und Fettgewebe steigern (Holst 2007). Im Herzen wurde gezeigt, dass GLP-1 die kardiale Glucoseaufnahme direkt und im gleichen Maße wie Insulin stimuliert (Zhao et al. 2006, Ban et al. 2008), was häufig mit seinen kardioprotektiven Effekten in Verbindung gebracht wird. Allerdings fanden Studien zur Wirkung von GLP-1 auf die kardiale Glucoseaufnahme unter unphysiologischen Stoffwechsel-Bedingungen statt, nämlich mit Glucose als alleinigem Substrat, während das Herz überwiegend Fettsäuren zur ATP-Herstellung verwendet.

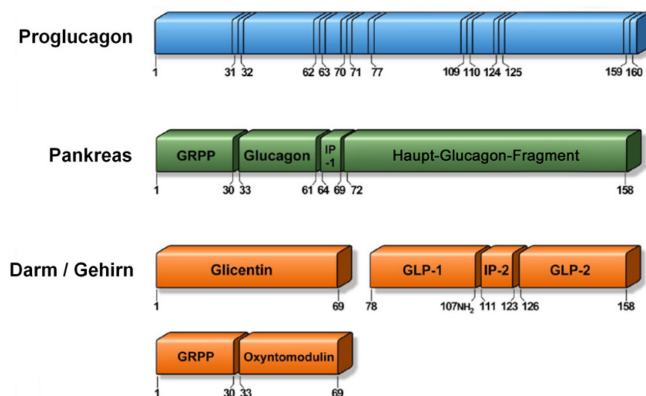
Wir untersuchten als Erste die direkten Effekte von GLP-1 oder dessen Agonist Exendin-4 auf die kardiale Glucoseverwertung und Pumpfunktion unter Berücksichtigung des Fettsäurestoffwechsels. Wir konnten u.a. zeigen, dass die kardialen Wirkungen beider Peptide von Oleat signifikant beeinflusst werden und sich von den bisherigen Annahmen unterscheiden. Zum Verständnis der Ergebnisse und deren Interpretation sind einige Grundlagen und relevante Aspekte über das Inkretinsystem sowie den myokardialen Stoffwechsel notwendig.



## 2.1 Das Inkretinsystem und GLP-1

### 2.1.1 Allgemeines

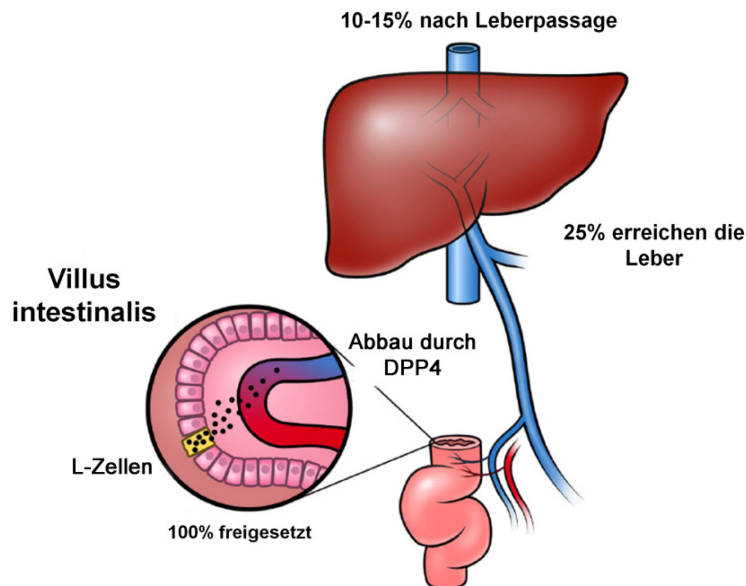
Die Entdeckung des Inkretinsystems begann mit der Beobachtung, dass enterale Glucosegabe bei gleichem Plasmagluconespiegel in eine vielfach stärkere Insulinausschüttung als parenteraler Applikationsweg resultierte. Dieses Phänomen wird unter dem Begriff Inkretineffekt gefasst. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Gabe von intestinalem Zellextrakt die Insulinsekretion bei Hunden steigerte (Drucker 2006). Es wurde deshalb die Existenz bestimmter neurohumoralen Faktoren des Verdauungstraktes, also der Inkretine vermutet, die an der postprandialen Insulinfreisetzung maßgeblich beteiligt sind. Als erstes Inkretinhormon wurde das Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) in den 1970er entdeckt. Mehr als eine Dekade später wurde erstmals das zweite Inkretinhormon, das Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1), bei der Klonierung von Proglucagon-cDNA als Produkt einer Gensequenz innerhalb des Proglucagongens identifiziert.



**Abbildung 1:** Unterschiedliche posttranslationale Prozessierung von Proglucagon im Pankreas und im Darm /Gehirn. Die Nummern kennzeichnen die Positionen der Aminosäuren in der aus 160 Aminosäuren bestehenden Proglucagon-Sequenz. Die vertikalen Linien markieren die typischen Spaltungsstellen. GRPP, glicentin-related pancreatic polypeptide; IP, intervening peptide. *Aus (Holst 2007) mit freundlicher Genehmigung des Verlags American Physiological Society.*

GLP-1 wird von enteroendokrinen L-Zellen gebildet und sezerniert, die vor allem im distalen Ileum und Kolon vorkommen. Außerdem wird GLP-1 auch im zentralen Nervensystem synthetisiert. In L-Zellen wird Proglucagon zu Glicentin, Oxyntomodulin, GLP-1 und GLP-2 prozessiert (Abb. 1). Das bioaktive GLP-1 wird aus GLP-1 (1-37) generiert und kommt entweder als GLP-1 (7-37 amid) oder GLP-1 (7-36 amid) vor, wobei das GLP-1 (7-36 amid) den Hauptanteil des aktiven Peptids im humanen Plasma ausmacht (Orskov et al. 1994). Beide Formen des aktiven GLP-1 werden nach der Sekretion von dem Enzym DPP-4 zu deren inaktiven Fragmenten GLP-1 (9-37) oder GLP-1 (9-36) abgebaut. Aufgrund des rapiden DPP-4-abhängigen Abbaus im Darm und in der Leber gelangen nur etwa 10-15% der sezernierten

GLP-1-Menge in den Körperkreislauf, wo es weiterhin zügig über die Niere ausgeschieden wird (Abb. 2). Infolgedessen besitzt das aktive GLP-1 nur eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit von 1-2 Min (Holst 2007).



**Abbildung 2:** Die Sekretion und der anschließender Abbau von GLP-1 im Darm und in der Leber. Aus (Holst 2007) mit freundlicher Genehmigung des Verlags American Physiological Society.

Der humane GLP-1-Rezeptor ist ein heptahelikaler G-Protein-gekoppelte Rezeptor, der im Pankreas, Niere, Lunge, Herzen und Teilen des Nervensystems exprimiert wird. Bisher wurde nur ein einziger GLP-1-Rezeptor identifiziert, obwohl einige Studien auf mögliche Existenz weiterer GLP-1-Rezeptoren hindeuten (Ussher und Drucker 2012). Mehrere Kaskaden beteiligen sich an der intrazellulären Signaltransduktion des GLP-1-Rezeptors. Bindung am GLP-1-Rezeptor führt zur Formation von zyklischen AMP (cAMP) mit anschließender Aktivierung von Proteinkinase A (PKA) (Holz 2004). Darüber hinaus ist GLP-1 in der Lage, komplexe zelluläre Effekte durch Beeinflussung wichtiger Regulatoren wie Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2, Proteinkinase C, Phosphatidylinositol 3-kinase, Proteinkinase B, und AMP-aktivierte Proteinkinase auszulösen (Ussher und Drucker 2012).

### 2.1.2 GLP-1 und der systemische Glucosestoffwechsel

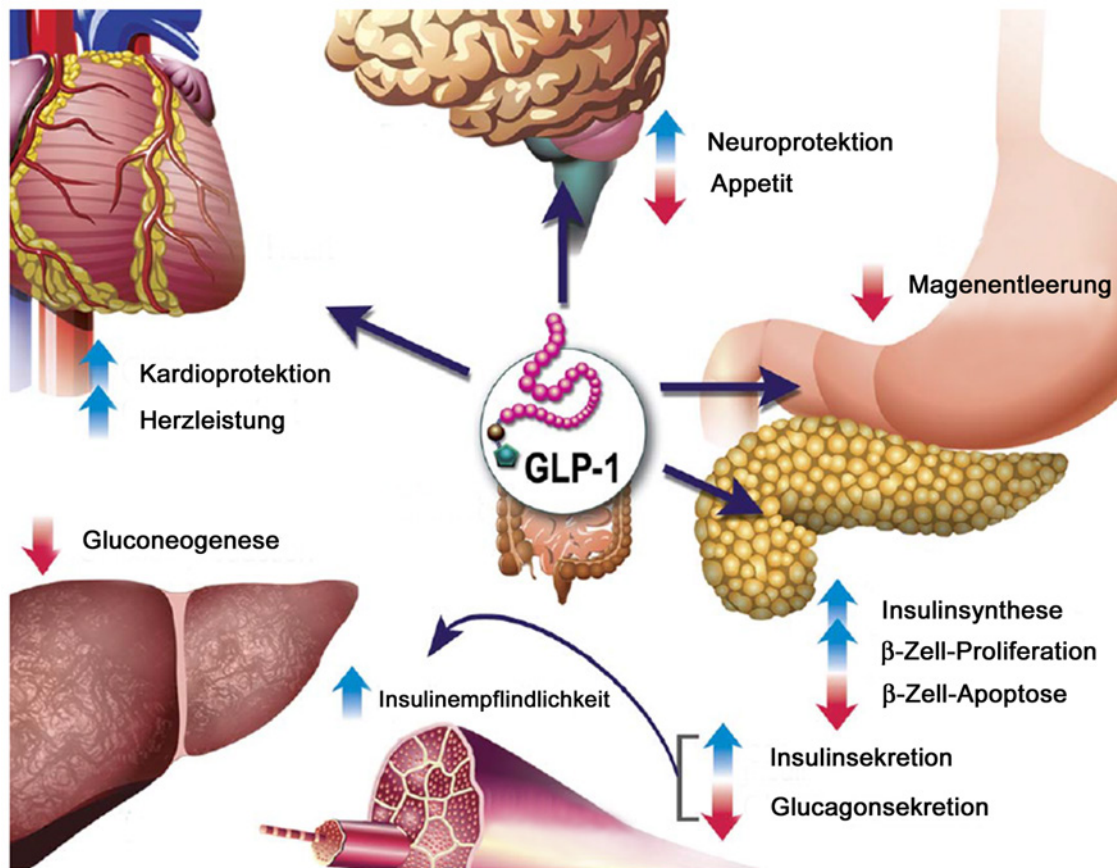
Aufgrund der Expression des GLP-1-Rezeptors in vielen Geweben, der seinerseits verschiedene Signalkaskaden beeinflusst, besitzt GLP-1 ein sehr vielfältiges Wirkungsspektrum. Allerdings wird die Entfaltung der GLP-1-Wirkungen unter normalen

Bedingungen durch seine kurze Plasmahalbwertszeit eingeschränkt. Zur Ermittlung der GLP-1-Effekte *in vivo* ist deshalb eine kontinuierliche Infusion von rekombinantem GLP-1 notwendig. Alternativ kann entweder die Plasmahalbwertszeit des natürlichen Peptids durch Inhibition von DPP-4 verlängert werden, oder der GLP-1-Rezeptor durch DPP-4-resistente Agonisten direkt stimuliert werden. Diese Maßnahmen ermöglichten die Entdeckung einer Reihe von systemischen und organspezifischen GLP-1-Wirkungen.

An erster Stelle ist der insulinotrope Effekt von GLP-1 zu nennen. Im Gegensatz zu Sulfonylharnstoffen beruht dieser Effekt nicht auf einer forcierten Insulinfreisetzung, welche auf Dauer zur Erschöpfung der  $\beta$ -Zellen führen könnte. Stattdessen erhöht GLP-1 die zelluläre Insulin-Reserve durch Stimulation der Genexpression von Proinsulin und steigert dadurch die glucose-abhängige Insulinfreisetzung (Drucker et al. 1987). Es wurde zudem gezeigt, dass GLP-1 sowohl in normalen als auch in diabetischen Tiermodellen die Proliferation der  $\beta$ -Zellen aktiviert und deren Apoptose entgegenwirkt, wodurch eine nachhaltige Förderung der Insulinproduktion gewährleistet wird (Edvell und Lindstrom 1999, Xu et al. 1999, Wang und Brubaker 2002, Li et al. 2003). Darüber hinaus verstärkt GLP-1 die periphere Insulinwirkung durch Hemmung der Glucagon-Freisetzung der  $\alpha$ -Zellen (Orskov et al. 1988, Drucker 2006).

Unabhängig von seiner insulin-abhängigen Wirkung beeinflusst GLP-1 den systemischen Glucosestoffwechsel durch Effekte auf andere Organe. Im Magen hemmt GLP-1 die Peristaltik und die Säureproduktion, was zur Verlangsamung der Magenentleerung führt. Obwohl der GLP-1-Rezeptor im Magen exprimiert wird, scheinen diese Effekte durch komplexe Interaktionen mit dem Zentralnervensystem indirekt vermittelt zu werden (Vrang et al. 2003, Imeryuz et al. 1997, Wettergren et al. 1997). GLP-1 ist zudem in der Lage, das Essverhalten im Sinne einer Reduktion der Nahrungsaufnahme zu verändern; ein Effekt, der wahrscheinlich auf eine Veränderung des Sättigungsgefühls und eine Induktion von Geschmacksaversion zurückzuführen ist (Thiele et al. 1997).

Abbildung 3 illustriert die wichtigsten Effekte von GLP-1 im Hinblick auf die Regulation des systemischen Glucosestoffwechsels. Die kardiovaskulären Wirkungen des Peptids werden aufgrund ihrer direkten Relevanz für die Fragestellung der Arbeit in einem gesonderten Kapitel besprochen.



**Abbildung 3:** GLP-1-Effekte auf verschiedene Gewebe und Organsysteme mit Fokus auf die Beeinflussung des systemischen Glucosestoffwechsels. GLP-1 wirkt direkt auf das endokrine Pankreas, den Magen, das Gehirn und das Herz. Die Effekte auf die Leber und die Skelettmuskulatur sind indirekt. Aus (Drucker 2006) mit freundlicher Genehmigung des Verlags Elsevier.

### 2.1.3 GLP-1-Mimetika

Während die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors experimentell durch eine kontinuierliche Infusion des Peptids erreicht werden kann, ist in klinischen Kontexten der Einsatz von GLP-1-Mimetika wie DPP-4-Inhibitoren (indirekte Mimetika) oder GLP-1-Rezeptoragonisten für diesen Zweck erforderlich. Beispiele für zugelassene DPP-4-Inhibitoren sind Sitagliptin, Vitagliptin, Linagliptin. Allerdings haben DPP-4-Inhibitoren GLP-1-unabhängige Effekte, nicht zuletzt weil das Enzym DPP-4 außer GLP-1 noch viele weitere Peptide spalten kann. Im Vergleich zu DPP-4-Inhibitoren sind GLP-1-Rezeptoragonisten in Bezug auf die Spezifität die bessere Wahl zur Verstärkung der GLP-1-Effekte. Bisher zugelassene Vertreter dieser Gruppe sind Exenatid und Liraglutid.

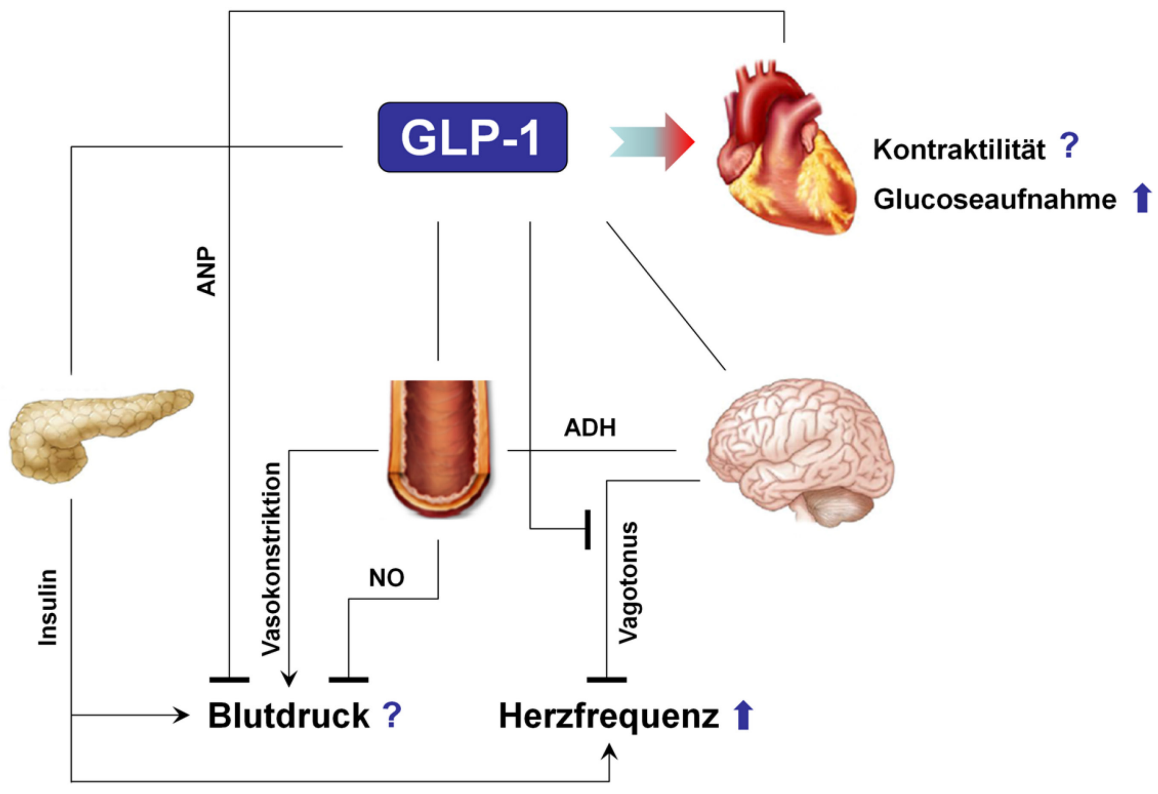
Exenatid ist ein synthetisches Exendin-4, das ursprünglich aus dem Speichel der Gila-Krustenechse isoliert wurde. Exendin-4 hat eine Kettenlänge von 39 Aminosäuren und weist 53% Homologie zum humanen GLP-1 auf. Es wird im Allgemeinen als ein hoch potenter GLP-1-Rezeptoragonist akzeptiert. Dank seiner Resistenz gegen DPP-4 hat Exendin-4 eine wesentlich längere Plasmahalbwertszeit (~ 30 Min) im Vergleich zu GLP-1. Während Exendin-4 den GLP-1-Rezeptor stimuliert, ist dessen Fragment Exendin (9-39) ein kompetitiver Antagonist des Rezeptors (Goke et al. 1993). Im Unterschied zu Exendin-4 weist Liraglutid (NN2211) 97% Homologie zu GLP-1 auf und ist deshalb ein GLP-1-Analogen. Liraglutid besitzt ein verlängertes pharmakokinetisches Profil, das sowohl auf die Resistenz gegen DPP-4 als auch auf die Formation von nicht-kovalenter Bindung mit Albumin zurückzuführen ist (Juhl et al. 2002, Drucker 2006).

GLP-1-basierte Therapie hat sich in der Behandlung von Typ-2-Diabetes als effektiv erwiesen (Lovshin und Drucker 2009). Das therapeutische Nutzen wird dabei u.a. durch verbessertes Blutzucker-Profil, Pankreas-Protektion, erhöhte Insulin-Produktionskapazität und gesteigerte Insulinempfindlichkeit charakterisiert. Darüber hinaus bewirken GLP-1-Rezeptoragonisten, insbesondere Liraglutid, ausgeprägte Gewichtsreduktion sowohl in diabetischen als auch in nicht-diabetischen Individuen (Buse et al. 2009, Garber et al. 2009, Astrup et al. 2009). Das hat zur Folge, dass GLP-1-Rezeptoragonisten neuerdings auch als potentielle Antiadiposita diskutiert werden (Vilsboll et al. 2012).

## **2.2 Kardiovaskuläre Wirkungen von GLP-1**

GLP-1 beeinflusst das kardiovaskuläre System durch komplexe Effekte auf das Zentralnervensystem und das Herz. Untersuchungen in Nagetieren zeigten, dass GLP-1- oder Exendin-4-Infusion den systemischen Blutdruck und die Herzfrequenz akut erhöhte (Barragan et al. 1994, Barragan et al. 1996). Diese Effekte scheinen vom antidiuretischen Hormon (ADH) und der vagalen Versorgung des Herzens abhängig zu sein (Isbil-Buyukcoskun und Gulec 2004, Barragan et al. 1999). Aufgrund der insulinotropen Wirkung von GLP-1 könnten diese Effekte auch zum Teil auf die Insulinwirkung auf den Blutdruck und die Herzfrequenz zurückgeführt werden (Edwards et al. 1998, Ussher und Drucker 2012). Allerdings bestehen hinsichtlich dieser Effekte sowie deren Wirkmechanismen noch beträchtliche Diskrepanzen aus Studien in Tiermodellen (Osaka et al. 2005). Auch Humanstudien lieferten

widersprüchliche Ergebnisse, wobei die Mehrheit der Studien einen antihypertensiven Effekt von GLP-1 berichtete (Edwards et al. 1998, Bharucha et al. 2008, Ussher und Drucker 2012). Dies beruht möglicherweise auf einer direkten Stimulation der Freisetzung des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und/oder des endothelialen Stickstoffmonoxids (NO) (Kim et al. 2013, Erdogdu et al. 2010).



**Abbildung 4:** Übersicht der bekannten und potentiellen kardiovaskulären Effekte von GLP-1. ADH: antidiuretisches Hormon, ANP: atriales natriuretisches Peptid, NO: Stickstoffmonoxid. Die Fragezeichen weisen auf unklare Effekte bzw. widersprüchliche Studienergebnisse hin. Der rote Pfeil signalisiert direkte kardiale GLP-1-Wirkungen. *Bildelemente aus (Baggio und Drucker 2007) mit freundlicher Genehmigung des Verlags Elsevier.*

Die Expression des GLP-1-Rezeptors im ventrikulären Myokard wurde bei Nagetieren und Menschen nachgewiesen (Bullock et al. 1996, Ban et al. 2008, Wei und Mojssov 1996). Untersuchungen in adulten Rattenkardiomyozyten haben gezeigt, dass GLP-1 die intrazelluläre cAMP-Konzentration und dadurch die Aktivität von PKA steigerte (Vila Petroff et al. 2001). Somit scheint die Aktivierung der cAMP/PKA-Achse ein charakteristisches Merkmal der Signaltransduktion von GLP-1 zu sein. Bemerkenswerterweise wurde in der

Studie von Petroff et al. gezeigt, dass diese Aktivierung die Kontraktilität von Kardiomyozyten herabsetzte. In isoliert perfundierten Rattenherzen wurde ebenfalls eine negativ inotrope Wirkung von GLP-1 festgestellt (Zhao et al. 2006). Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen berichteten Ban et al. jedoch, dass GLP-1 die Pumpfunktion isoliert perfundierter Mäuseherzen sogar um 20% erhöhte (Ban et al. 2008). Eine überzeugende Erklärung für diese Diskrepanzen ist nicht bekannt.

Direkte Wirkung von GLP-1 auf die kardiale Glucoseaufnahme wurde bisher in zwei Studien untersucht. Beide Studien zeigten, dass GLP-1 die myokardiale Glucoseaufnahme im ähnlichen Maße wie Insulin stimulierte (Zhao et al. 2006, Ban et al. 2008). Obwohl Exendin-4 inzwischen in der Therapie von Typ-2-Diabetes verbreitet eingesetzt wird, gibt es nach unseren Erkenntnissen noch keine Studien über dessen direkte kardiale Wirkungen. Dies beruht möglicherweise auf der verbreiteten Annahme, dass Exendin-4 identische Wirkungen wie GLP-1 aufweist. Abbildung 4 fasst die bisher bekannten kardiovaskulären Effekte von GLP-1 zusammen.

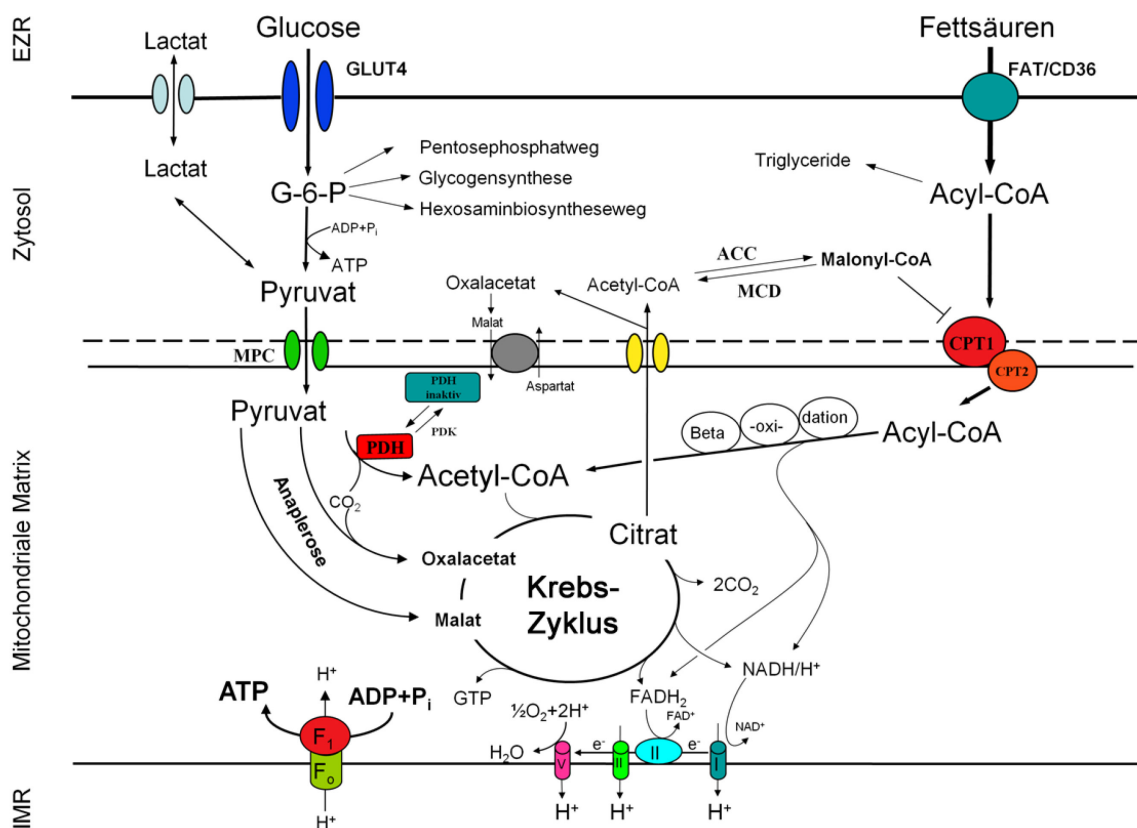
Während der Wissensstand über die Effekte von GLP-1 bzw. dessen Mimetika auf gesunde Herzen noch denkbar limitiert ist, so wurde deren Nutzen in verschiedenen Modellen von Herzerkrankungen wie Ischämie-Reperfusion, dilatative Kardiomyopathie oder Myokardinfarkt bereits intensiv untersucht. Die Mehrheit der Studien konnte günstige Effekte von GLP-1-basierter Therapie im Sinne von verbesserter Pumpfunktion, reduzierter Infarktgröße und Apoptose feststellen (Ravassa et al. 2012). Basierend auf der berichteten stimulierenden Wirkung von GLP-1 auf die Glucoseaufnahme im gesunden Herzen werden diese Therapieeffekte oft mit einer Verbesserung des kardialen Glucosestoffwechsels in Zusammenhang gebracht (Ussher und Drucker 2012, Ravassa et al. 2012).

An dieser Stelle ist es jedoch wichtig zu vermerken, dass bisherige Studien über die direkten kardialen Effekte von GLP-1 unter unphysiologischen Stoffwechselbedingungen durchgeführt wurden, nämlich mit Glucose als alleinigem Substrat. Zum besseren Verständnis dieser Limitierung werden Grundlagen des myokardialen Stoffwechsels im nachfolgenden Kapitel näher besprochen.

## 2.3 Grundlage des myokardialen Stoffwechsels

Unter normoxischen Bedingungen stammen etwa 95% des im Herzen produzierten Adenosintriphosphats (ATP) aus oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien. Die restlichen 5% werden in der Glykolyse und im Krebs-Zyklus generiert. Das Herz verwendet 60-70% der gebildeten ATP für seine Kontraktionsarbeit und die restlichen 30-40% für verschiedene Ionenpumpen, insbesondere die  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums. Etwa 70-90% des kardialen ATP-Bedarfs werden durch Oxidation von Fettsäuren gedeckt. Die Verwertung von Glucose, Lactat, Ketonkörpern und einigen Aminosäuren trägt etwa 10-30% zur ATP-Herstellung bei (Opie 2004, Stanley et al. 2005).

Abbildung 5 stellt wesentliche Prozesse des kardialen Substratstoffwechsels mit Fokus auf die ATP-Herstellung aus Fettsäuren und Glucose dar.



**Abbildung 5:** Der myokardiale Energiestoffwechsel von Fettsäuren und Glucose. ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase, CPT: Carnitin-Palmitoyltransferase, EZR: Extrazellulärraum, FAT: fatty acid translocase, G-6-P: Glucose-6-Phosphat, IMR: Intermembranraum, MCD: Malonyl-CoA-Decarboxylase, MPC: Mitochondrialer Pyruvat-Carrier, PDH: Pyruvatdehydrogenase-Komplex, PDK: Pyruvatdehydrogenase-Kinase.



### 2.3.1 Fettsäureverwertung

Die Fettsäureverwertung kann in 3 Schritte unterteilt werden: Aufnahme ins Zytosol, Transport durch die Mitochondrienmembran und  $\beta$ -Oxidation. Die Fettsäureaufnahme ins Zytoplasma wird durch Transportproteine wie die Fettsäuretranslokase (FAT/CD36) und das Fettsäurebindeprotein (FABP) erleichtert. Im Zytosol erfolgt zunächst die Veresterung der Fettsäuren zu Acyl-CoA, welches dann entweder in Form von Triglyceriden gespeichert oder durch das Enzym Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) auf der äußeren Mitochondrienmembran zu Acylcarnitin verestert wird, wobei das Letztere für den Transport von Acyl-CoA durch die innere Mitochondrienmembran notwendig ist. In der mitochondrialen Matrix wird Acylcarnitin durch das Enzym Carnitin-Palmitoyltransferase 2 zurück in Acyl-CoA umgewandelt, welches in die  $\beta$ -Oxidation eintritt und zu Acetyl-CoA, reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH/H<sup>+</sup>) und reduziertem Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH<sub>2</sub>) abgebaut wird (Löffler et al. 2007, Opie 2004). Die von CPT1 katalysierte Reaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fettsäureoxidation dar. CPT1 wird maßgeblich von Malonyl-CoA inhibiert; ein Mechanismus, der in der Selbstregulation des metabolischen Gleichgewichts eine große Rolle spielt (Lopaschuk et al. 2010).

Die Rate der kardialen Fettsäureaufnahme wird primär von der Plasmakonzentration der freien Fettsäuren bestimmt, die je nach Tageszeit zwischen 0,2 – 0,8 mM variieren kann. Unter besonderen Umständen wie Fasten oder Diabetes, kann diese bis zu > 1 mM ansteigen (Stanley et al. 2005). Zu den im Plasma am meisten vorkommenden Fettsäuren gehören sowohl bei Menschen als auch bei Nagetieren die Ölsäure (18:1), die Palmitinsäure (16:0) und die Linolsäure (18:2) (Wisneski et al. 1987, Koves et al. 2008).

### 2.3.2 Glucoseverwertung

Trotz seines geringeren Beitrags zur ATP-Produktion ist der Glucosestoffwechsel für die Aufrechterhaltung der Herzfunktion essentiell. Die vom Herzen verwertete Glucose wird aus dem Extrazellularraum aufgenommen oder aus dem intrazellulären Glycogenspeicher mobilisiert. Der Glucosetransport ins Zytosol wird durch die Glucosetransporter GLUT1 und GLUT4 gewährleistet, wobei GLUT4 die vorherrschende Isoform im adulten Herzen darstellt (Abel 2004, Stanley et al. 2005).

Unmittelbar nach der zellulären Aufnahme wird Glucose zu Glucose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert, welches anschließend in verschiedene Stoffwechselwege eingeschleust wird. Die Glykolyse und die nachfolgende Glucoseoxidation bilden den Hauptanteil des Glucosestoffwechsels. Aus der Glykolyse entstehen Pyruvat, NADH und eine geringere Menge ATP. Die Phosphofruktokinase 1 (PFK1) mit ihren komplexen Regulationsmechanismen stellt das wichtigste Schlüsselenzym der Glykolyse dar. Das glykolytische ATP wird vermutlich für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum und deshalb für die diastolische Relaxation des Myokards genutzt (Stanley et al. 2005). Im Zytosol kann Pyruvat zu Lactat reduziert werden. Nach der Aufnahme in die mitochondriale Matrix durch die mitochondrialen Pyruvat-Transporter (Herzig et al. 2012) wird Pyruvat entweder zu Acetyl-CoA oxidiert oder zu Oxalacetat oder Malat carboxyliert. Die Oxidation von Pyruvat, also die Glucoseoxidation, wird durch den Multienzymkomplex Pyruvatdehydrogenase (PDH) katalysiert. Die Aktivität dieses Enzyms wird durch die Produkte der Glucoseoxidation (Acetyl-CoA, NADH) und durch Phosphorylierung an der Untereinheit E1 des Enzymkomplexes streng reguliert (Opie 2004, Löffler et al. 2007).

### **2.3.3 Oxidative Phosphorylierung**

Acetyl-CoA, das gemeinsame Endprodukt der Glucose- und Fettsäureoxidation, tritt in den Citratzyklus (Krebs-Zyklus) ein. Der Krebs-Zyklus beinhaltet hintereinander geschaltete Reaktionen, die Citrat zu Oxalacetat umwandeln, wobei NADH/ $\text{H}^+$ ,  $\text{FADH}_2$ , Guanosintriphosphat (GTP) und  $\text{CO}_2$  generiert werden. Die Reduktionsäquivalente NADH/ $\text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$ , die der Oxidation von Fettsäure und Glucose sowie dem Krebs-Zyklus entstammen, werden in die mitochondriale Atmungskette eingeschleust. Aufgrund des unterschiedlichen Redoxpotentials von Sauerstoff und den Reduktionsäquivalenten kommt es zum Elektronentransport durch die Atmungskette. Die dabei entstehende Energie wird für den Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran genutzt. Die Protonen fließen schließlich durch die  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPase entlang ihres Gradienten zurück in die mitochondriale Matrix, wobei die freigesetzte Energie zur ATP-Synthese aus ADP und anorganischem Phosphat verwendet wird (Opie 2004, Löffler et al. 2007).

### 2.3.4 Alternative Stoffwechselwege von Glucose

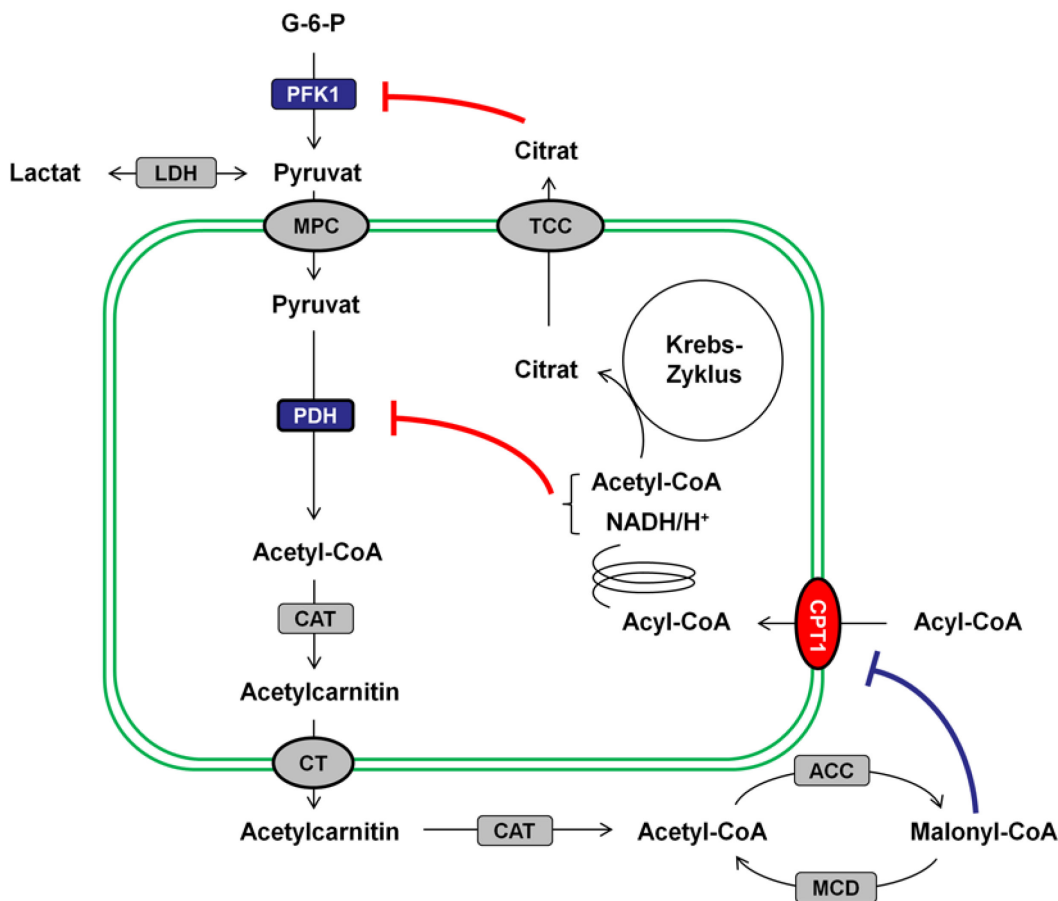
Die hohe Bedeutung des kardialen Glucosestoffwechsels für die Herzfunktion begründet sich nicht nur durch seine Beteiligung an der ATP-Herstellung. In den Mitochondrien kann Pyruvat, wie bereits erwähnt, zu Malat oder Oxalacetat carboxyliert werden. Die Carboxylierung von Pyruvat ist eine wichtige Reaktion der Anaplerose; ein Vorgang, der für die Aufrechterhaltung des Krebs-Zyklus und der Herzfunktion essentiell ist (Russell und Taegtmeyer 1991, Pound et al. 2009, Des Rosiers et al. 2011). Im Zytosol kann G-6-P in akzessorische Wege des Glucosestoffwechsels, nämlich den Pentosephosphatweg und den Hexosaminbiosyntheseweg, geleitet werden. Der Pentosephosphatweg ist ein anabolischer Prozess, bei dem reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und Ribose-5-Phosphat entstehen. NADPH spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Redox-Homöostase, der Lipidsynthese und der Anaplerose (Ussher et al. 2012, Pound et al. 2009). Ribose-5-Phosphat wird zur Synthese von Nukleinsäuren verwendet. Bei dem Hexosaminbiosyntheseweg wird Uridin Diphosphat-N-Acetylglucosamin gebildet, das für die posttranslationale O-GlcNAc-Modifizierung einer Vielzahl von Proteinen benötigt wird (Ngoh et al. 2010).

### 2.3.5 Der Randle-Zyklus

Der myokardiale Substratstoffwechsel wird streng reguliert, wobei die reziproke Hemmung zwischen der Fettsäure- und Glucoseverwertung von zentraler Bedeutung ist. Das Prinzip einer solchen Interaktion wurde erstmals 1963 von Randle et al. beschrieben und wird deshalb Randle-Zyklus genannt (Randle 1998). Der Randle-Zyklus spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des metabolischen Gleichgewichts und wurde bisher in verschiedenen Organen einschließlich des Herzens nachgewiesen (Hue und Taegtmeyer 2009). Die Fettsäureoxidation kann die Glucoseverwertung an mehreren Stellen inhibieren. In den Mitochondrien wird das Enzym PDH und dadurch die Glucoseoxidation von der bei der Fettsäureoxidation entstehenden hohen Menge an Acetyl-CoA und NADH inhibiert. Bei Überschuss an Acetyl-CoA kann darüber hinaus Citrat ins Zytosol transportiert werden, wo es zusätzlich die Glykolyse-Rate durch Hemmung von PFK1 vermindern kann. Umgekehrt kann eine erhöhte Glucoseverwertung, z.B. unter Insulin-Einfluss, die Fettsäureoxidation inhibieren. Dabei

scheint die Hemmung von CPT-1 durch Malonyl-CoA ausschlaggebend zu sein (Hue und Taegtmeier 2009, Lopaschuk et al. 2010).

Abbildung 6 illustriert die bisher bekannten Mechanismen des Randle-Zyklus



**Abbildung 6:** Interaktionen zwischen der Fettsäure- und Glucoseverwertung – Der Randle-Zyklus. Rote Linien: Mechanismen der Inhibition der Glucoseverwertung durch die Fettsäureoxidation. Blaue Linie: Mechanismus der Inhibition der Fettsäureverwertung durch die Glucoseoxidation. ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase, CAT: Carnitin-Acetyltransferase, CPT: Carnitin-Palmitoyltransferase, CT: Carnitintransferase, G-6-P: Glucose-6-Phosphat, LDH: Lactatdehydrogenase, MCD: Malonyl-CoA-Decarboxylase, MPC: Mitochondrialer Pyruvat-Carrier, PDH: Pyruvatdehydrogenase, PFK: Phosphofruktokinase, TCC: Tricarboxylat-Carrier. *In Anlehnung an (Lopaschuk et al. 2010)*

### **3 ZIELE DER ARBEIT**

Während eine Vielzahl an Studien über die therapeutische Wirkung GLP-1-basierter Therapie in Herzerkrankungen existiert, ist über die direkten Wirkungen von GLP-1 bzw. seinen Mimetika auf gesunde Herzen wenig bekannt. Angesichts des verbreiteten Einsatzes dieser Substanzen in der Therapie von Diabetes und möglicherweise zukünftig auch in Adipositas-Patienten, wo der kardiale Stoffwechsel und die Herzfunktion intakt sein können, ist dieser Aspekt von besonderer Bedeutung.

Wie bereits geschildert lieferten die wenigen Studien über die direkten Wirkungen von GLP-1 auf den kardialen Glucosestoffwechsel und die Herzleistung widersprüchliche Ergebnisse. Aufgrund der Tatsache, dass Glucose dabei als alleiniges Substrat verwendet wurde, besteht zusätzliches Bedenken hinsichtlich der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf In-vivo-Situationen, wo die kardiale Fettsäureverwertung dominiert und den Glucosestoffwechsel stark beeinflusst.

Es war das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit, die direkten Wirkungen von GLP-1 und Exendin-4 auf die kardiale Glucoseverwertung und kontraktile Funktion in einem isoliert arbeitenden Rattenherzmodell zu ermitteln. Im Gegensatz zu bisherigen Studien wurde der kardiale Fettsäurestoffwechsel berücksichtigt. Des Weiteren sollten Langzeiteffekte einer chronischen GLP-1-Behandlung auf die kardiale Glucoseoxidation und Herzleistung in der Ratte untersucht werden.

#### **4 PUBLIZIERTE ORIGINALARBEIT**

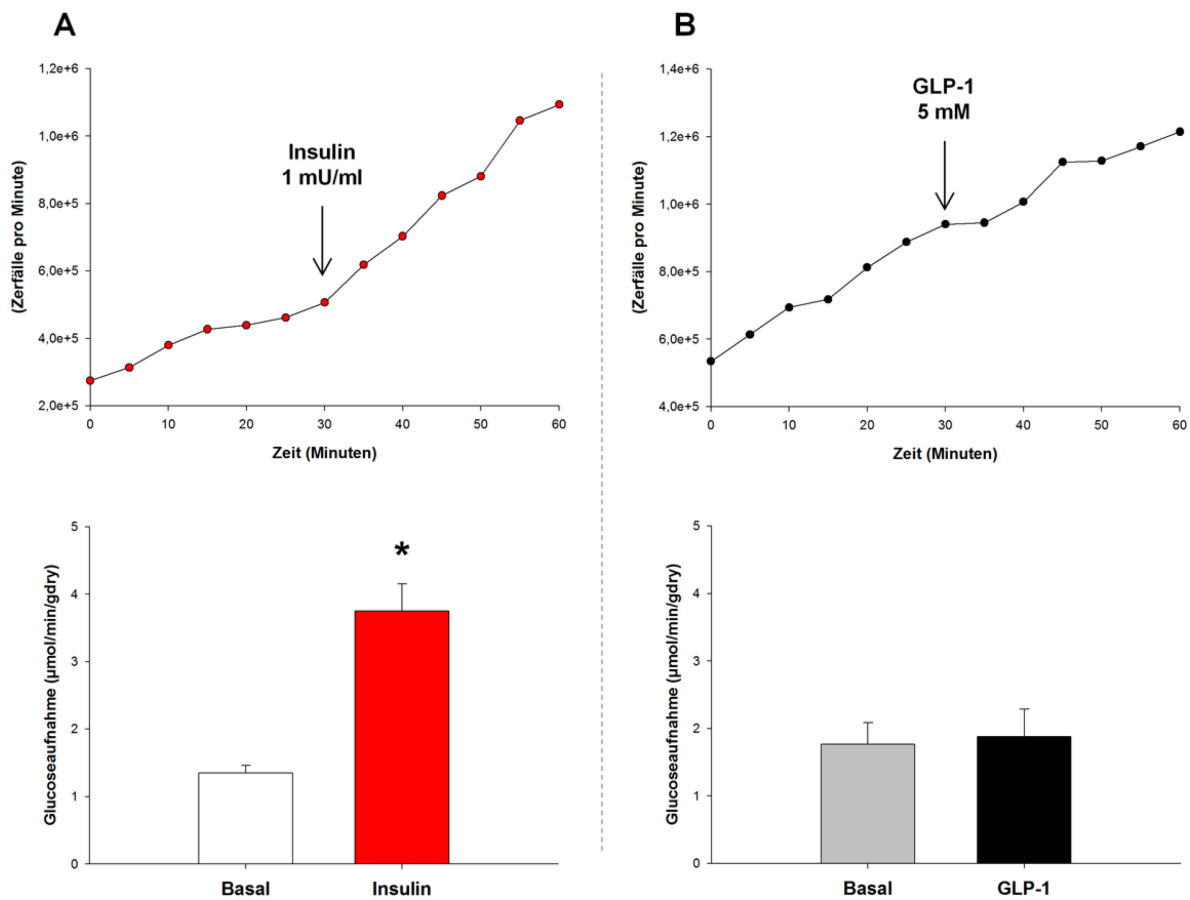
**Glucagon-like peptide-1 reduces contractile function and fails to boost glucose utilization in normal hearts in the presence of fatty acids.** Nguyen TD, Shingu Y, Amorim PA, Schwarzer M, Doenst T. *Int J Cardiol*, 168(4): 4085–4092, 2013

## 5 DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie demonstrieren die direkten Wirkungen von GLP-1 und Exendin-4 auf die kardiale Glucoseverwertung und Kontraktilität. Wir konnten Evidenz dafür liefern, dass diese Wirkungen von Oleat, einer der vom Herzen meist verwendeten Fettsäuren, maßgeblich beeinflusst werden.

Der direkte Effekt von GLP-1 auf die kardiale Glucoseaufnahme wurde bisher nur in zwei Studien untersucht. Zhao et al. zeigten in isoliert perfundierten Rattenherzen im Langendorff-Modus, dass GLP-1 die kardiale Glucoseaufnahme im vergleichbaren Maße wie Insulin steigerte (Zhao et al. 2006). Die Untersuchung von Ban et al. in Mäuseherzen mit der gleichen Methode ergab einen ähnlichen Befund (Ban et al. 2008). Unter Verwendung von Glucose als alleinigem Substrat konnten wir diesen Effekt von GLP-1 ebenfalls feststellen (Figure 1A\*). Allerdings fanden wir in Anwesenheit von Oleat in physiologischer Konzentration keine Veränderung der kardialen Glucoseaufnahme durch GLP-1 (Figure 1B). Nach unseren Erkenntnissen untersuchten wir als Erste den Einfluss von GLP-1 auf die Glucoseoxidation in normalen Herzen. In Analogie zur Glucoseaufnahme fanden wir, dass die Aktivierung der kardialen Glucoseoxidation durch GLP-1 in Anwesenheit von Oleat aufgehoben wurde (Figure 2A, 2B). Zum Vergleich ist Insulin in dieser gemischten Substratkonstellation und unter identischen experimentellen Bedingungen imstande, sowohl die Glucoseaufnahme als auch die Glucoseoxidation des Rattenherzens auf das 3-Fache zu erhöhen (Abbildungen 7 und 8). Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass GLP-1 unter In-vivo-Bedingungen, im Unterschied zu Insulin, weder die kardiale Glucoseaufnahme noch Glucoseoxidation stimulieren kann. Dies würde die bisherige Annahme widerlegen, dass GLP-1 hinsichtlich der Modulation der kardialen Glucoseverwertung einen insulinähnlichen Effekt hat.

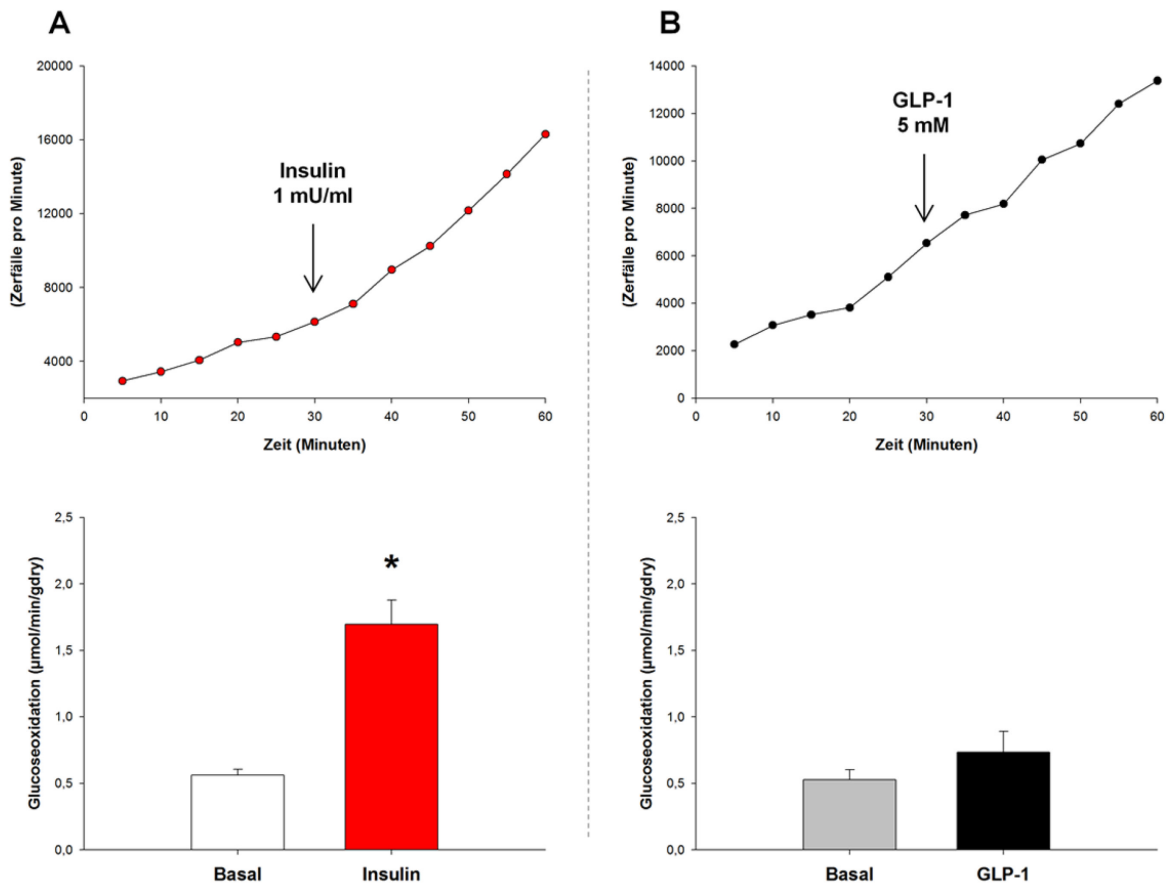
\* Der englische Begriff „Figure“ wird zum Verweis zu den Abbildungen in der beiliegenden Publikation verwendet.



**Abbildung 7:** Direkter Vergleich der Beeinflussung der kardialen Glucoseaufnahme zwischen 1 mU/ml Insulin (A) und 5 nM GLP-1 (B). Substratkonstellation: 5 mM Glucose, 0,4 mM Oleat. Die oberen Diagramme präsentieren Beispiele für die Veränderungen des freigesetzten  $^3\text{H}_2\text{O}$  aus der aufgenommenen  $[2\text{-}^3\text{H}]\text{-Glucose}$ . Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt.  $n = 12$  in A,  $n = 7$  in B. Statistischer Test: gepaarter t-Test. \* :  $p < 0,001$  vs. Basalwerte.

Bezüglich der für das Fehlen der Stimulation der Glucoseverwertung durch GLP-1 in Anwesenheit von Oleat verantwortlichen Mechanismen kann Folgendes vermutet werden. Die deutlich niedrigeren Basalwerte der Glucoseaufnahme und Glucoseoxidation in den Perfusionsexperimenten mit beiden Substraten deutet auf eine Hemmung der Glucoseverwertung durch die Oxidation von Oleat hin (Randle-Zyklus) (Figure 1, 2). Im Gegensatz zu Insulin scheint GLP-1 nicht in der Lage zu sein, die durch Oleat bedingte Hemmung der Glucoseverwertung zu überwinden.



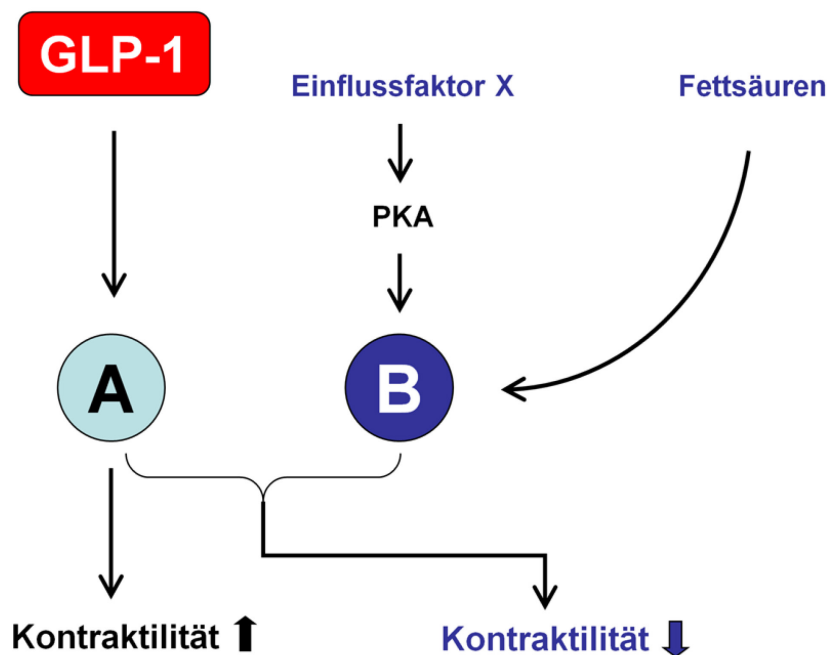


**Abbildung 8:** Direkter Vergleich der Beeinflussung der kardialen Glucoseoxidation zwischen 1 mU/ml Insulin (A) und 5 nM GLP-1 (B). Substratkonstellation: 5 mM Glucose, 0,4 mM Oleat. Die oberen Diagramme präsentieren Beispiele für die Veränderungen des freigesetzten  $^{14}\text{CO}_2$  aus der aufgenommenen  $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -Glucose. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt.  $n = 7$  in A,  $n = 7$  in B. Statistischer Test: gepaarter t-Test. \* :  $p < 0,001$  vs. Basalwerte.

Es wurde gezeigt, dass GLP-1 die kardiale Kontraktilität akut zu beeinflussen vermag. Zhao et al. zeigten eine negativ inotrope Wirkung (Zhao et al. 2006), was mit den Ergebnissen in adulten Rattenkardiomyozyten übereinstimmt (Vila Petroff et al. 2001). Im Gegensatz dazu zeigten Ban et al. in Mäuseherzen eine Steigerung der Kontraktilität um 20% nach GLP-1-Stimulation. Wenn Glucose, wie in diesen 3 Studien, als alleiniges Energiesubstrat verwendet wurde, beobachteten wir eine tendenzielle Erhöhung der kontraktilen Funktion durch GLP-1 (Tabelle 1), was mit den Ergebnissen von Ban et al. übereinstimmen würde. Allerdings konnten wir demonstrieren, dass GLP-1 sowohl in 0,5 nM als auch in 5 nM unter dem Einfluss von Oleat die entgegengesetzte Wirkung von sich selbst hervorrief (Tabelle 1). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die oleat-abhängige Wirkung von GLP-1 durch den

GLP-1-Rezeptor vermittelt wird, da dessen Blockade mittels Exendin (9-39) diese Wirkung vollständig aufhob (Figure 4B, Tabelle 2).

Die Beeinflussung der kardialen Kontraktilität durch Oleat lässt vermuten, dass die bisherigen Diskrepanzen hinsichtlich der Beeinflussung der kardialen Kontraktilität durch GLP-1 durch bestimmte Unterschiede in den experimentellen Bedingungen bedingt sein könnten. Wir schlagen folgendes Model zur Erklärung der erwähnten Diskrepanzen vor. GLP-1 könnte abhängig vom Vorhandensein bestimmter zellulären Ereignisse die kardiale Kontraktilität sowohl stimulieren als auch supprimieren. Diese noch unbekanntem zellulären Ereignisse könnten durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Möglicherweise lagen solche Einflussfaktoren unter den in den Studien von Zhao et al. und Petroff et al. herrschenden Bedingungen vor, so dass GLP-1 die kontraktile Funktion verminderte. Dahingegen waren diese in den Untersuchungen von Ban et al. und in unseren Perfusionsexperimenten mit Glucose als alleinigem Substrat vermutlich nicht vorhanden, so dass GLP-1 die Kontraktilität stimulierte. Aufgrund der Senkung der kontraktilen Funktion durch GLP-1 in Anwesenheit von Oleat könnte angenommen werden, dass die Verstoffwechslung von Oleat die für den negativ inotropen Effekt von GLP-1 notwendigen zellulären Ereignisse hervorrief. Hinsichtlich der Signaltransduktion des negativ inotropen Effekts von GLP-1 schlugen Petroff et al. die Aktivierung von PKA vor. Wir konnten allerdings zeigen, dass PKA in den oleat-abhängigen negativ inotropen Effekt von GLP-1 nicht involviert ist (Figure 4D, Tabelle 2). Zusammenfassend lassen unsere Ergebnisse auf ein Erklärungsmodel schließen, das bisherige Ergebnisse hinsichtlich der Beeinflussung der Herzfunktion durch GLP-1 vereinigen könnte. Siehe auch Abbildung 9 für eine schematische Darstellung dieses Konzepts.



**Abbildung 9:** Hypothetisches Modell zur Erklärung der uneinheitlich berichteten Modulation der kardialen Kontraktilität durch GLP-1. GLP-1 kann die Kontraktilität steigern oder senken in Abhängigkeit von dem intrazellulären Ereignis B. In Abwesenheit von B steigert GLP-1 die Kontraktilität wie in der Studie von Ban et al. und in unseren Perfusionsexperimenten mit Glucose als alleinigem Substrat. B kann durch unbekannte Einflussfaktoren ausgelöst werden, so dass GLP-1 die Kontraktilität durch Aktivierung von PKA senkt wie in den Studien von Petroff et al. und Zhao et al. B kann ebenfalls durch die kardiale Verwertung von Fettsäuren unabhängig von PKA ausgelöst werden.

Die Pumpleistung des Herzens steht mit dem myokardialen Stoffwechsel im engen Zusammenhang (Taegtmeyer 2004). Die Integration der Veränderungen der myokardialen Glucoseverwertung mit denen der Herzleistung lässt eine weitere Interpretationsmöglichkeit hinsichtlich des Mechanismus der negativ inotropen Wirkung von GLP-1 in Betracht kommen. Wenn Glucose als alleiniges Substrat verwendet wurde, stimulierte GLP-1 die kardiale Glucoseverwertung, was mit einer tendenziellen Steigerung der Kontraktilität einherging (Figure 1A, 2A, Tabelle 1). Unter dem Einfluss von Oleat konnte GLP-1 die Glucoseverwertung nicht erhöhen, was mit einer Senkung der Herzleistung assoziierte (Figure 1B, 2B, Tabelle 1). Diese Betrachtungsweise lässt vermuten, dass GLP-1 die Abhängigkeit der kontraktilen Funktion von der Glucoseverwertung förderte und dass eine Steigerung der Glucoseverwertung für die Erhaltung der Herzleistung notwendig war. In Anwesenheit von

Oleat wurde die Glucoseverwertung jedoch über den Randle-Zyklus gehemmt. Aufgrund des dadurch ausgebliebenen Anstiegs der Glucoseverwertung verminderte sich die Herzleistung.

Die vorliegende Arbeit untersuchte auch zum ersten Mal die Effekte einer chronischen GLP-1-Behandlung auf die Glucoseoxidation und Pumpleistung gesunder Herzen. Obwohl keine Veränderung der Herzfunktion mittels Echokardiographie festzustellen war (Tabelle 4), fanden wir eine signifikante Verminderung der Glucoseoxidation und der Herzleistung in isoliert arbeitenden Herzen (Figure 5). Aus der Tabelle 3 geht hervor, dass die erniedrigte Gesamt-Herzleistung (Figure 5B) sich durch die verminderte kardiale Kontraktilität ( $dp/dt_{max}$ ) und den daraus folgenden geringeren Aortenfluss erklären lässt. Die Diskrepanz zwischen den Echokardiographie- und Herzperfusions-Ergebnissen könnte möglicherweise auf neurohumorale kompensatorische Mechanismen *in vivo* zurückgeführt werden. Diese Annahme wird von der Beobachtung unterstützt, dass echokardiographische Veränderungen üblicherweise erst in fortgeschrittenen Stadien von Herzerkrankungen sichtbar sind (Franken et al. 1997, Doenst et al. 2010). Außerdem können Einflüsse der für die Echokardiographie-Untersuchung notwendigen Narkose nicht ausgeschlossen werden (Stein et al. 2007). Unsere mit GLP-1 behandelten Ratten zeigten ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich der Gewichtszunahme und des Serum-Insulinspiegels. Die unveränderte Gewichtszunahme könnte mit dem relativ jungen Alter der Ratten zusammenhängen. Außerdem ist es unklar, ob GLP-1 auch eine Gewichtsreduktion in gesunden Objekten induziert. Schließlich liegt bisher nur Evidenz für eine gewichtssenkende Wirkung von GLP-1 in Adipositas-Objekten vor. Der unveränderte Insulinspiegel begründet sich vermutlich dadurch, dass GLP-1 zwar die intrazelluläre Insulinsynthese steigert aber nicht zur forcierten Insulinfreisetzung führt (Drucker et al. 1987). Dieses Ergebnis stimmt mit den Studien überein, in denen der Insulinspiegel nach chronischen Behandlungen mit dem GLP-1-Analogen Liraglutid unverändert (Raun et al. 2007) oder sogar erniedrigt (Cummings et al. 2010) war.

Mehrere Mechanismen könnten den beobachteten Behandlungseffekten zugrunde liegen. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums von GLP-1 kommen bei einer systemischen Behandlung sowohl systemische als auch direkte kardiale Wirkungen in Betracht. Angesichts der festgestellten Beeinflussung der kardialen GLP-1-Effekte durch Oleat kann vermutet werden, dass der kardiale Stoffwechsel von Fettsäuren *in vivo* eine Rolle spielen könnte. So ist es möglich, dass GLP-1 unter dem Einfluss des Fettsäurestoffwechsels eine vermehrte Einschleusung von Glucose in andere Stoffwechselwege des Glucosestoffwechsels bewirkt, was schließlich zur Reduktion der Glucoseoxidation führen könnte. Zumindest in der Leber

und der Niere konnte bereits eine Aktivierung des Pentosephosphatwegs durch GLP-1 beobachtet werden (Gu et al. 2011).

Auf den ersten Blick scheint die festgestellte Reduktion der kardialen Glucoseoxidation und Kontraktilität mehreren Studien zu widersprechen, in denen GLP-1-basierte Therapien die Pumpleistung erkrankter Herzen verbesserten (Ravassa et al. 2012). Wir konnten selbst in einem Rattenmodell der Herzinsuffizienz feststellen, dass die identische Behandlungsform (vierwöchige GLP-1-Infusion) zu einer signifikanten Verbesserung der Herzfunktion und der Überlebensrate führte (Nguyen et al. 2011). Es ist deshalb an dieser Stelle wichtig zu unterstreichen, dass die Ergebnisse dieser Studie nicht mit denen aus therapeutischen Studien vergleichbar sind, wo der Stoffwechsel erkrankter Herzen meist gravierend verändert ist (Doenst et al. 2013).

Während das therapeutische Potenzial von GLP-1 oder Exendin-4 in verschiedenen Herzerkrankungen intensiv untersucht wurde, wird über deren Effekte auf normale Herzen wenig verstanden, obwohl dieser Aspekt von großer Bedeutung ist. GLP-1-basierte Therapien werden verbreitet in der Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt. Aufgrund der gewichtsreduzierenden Wirkung von GLP-1-Agonisten werden diese neuerdings auch als zukünftige Antiadiposita diskutiert (Torekov et al. 2011). Da der kardiale Stoffwechsel in solchen Situationen weitgehend intakt sein kann, könnten unsere Ergebnisse von klinischer Bedeutung sein. So könnte eine Dauerbehandlung mit GLP-1 in Patienten mit Prädiabetes oder Adipositas wider Erwarten zur Reduktion der kardialen Glucoseoxidation und Kontraktilität führen. Andererseits ist es wichtig zu erwähnen, dass eine Verminderung der kardialen Glukoseoxidation und Kontraktilität nicht zwangsläufig als schädlich interpretiert werden sollte. Weitere Untersuchungen sind deshalb nötig zur Klärung der Dignität dieser Veränderungen.

Unsere Studie untersuchte zum ersten Mal die direkten Wirkungen von Exendin-4 auf die kardiale Glucoseverwertung und Kontraktilität. Wir konnten zeigen, dass Exendin-4 sowohl ähnliche als auch unterschiedliche kardiale Effekte im Vergleich zu GLP-1 aufweist. Darüber hinaus lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass die kardialen Wirkungen von Exendin-4 ebenfalls durch den kardialen Fettsäurestoffwechsel moduliert werden können. Figure 2 macht deutlich, dass die Veränderungen der kardialen Glucoseoxidation durch Exendin-4 mit denen durch GLP-1 vergleichbar sind. Allerdings veränderte Exendin-4 beispielsweise die kardiale Glucoseaufnahme in den Perfusionsexperimenten mit Glucose als alleinigem

Substrat nicht, während GLP-1 diese steigerte (Figure 1A, 1C). Außerdem zeigte Exendin-4 keinen Einfluss auf die kardiale Pumpfunktion in Anwesenheit von Oleat, während GLP-1 diese reduzierte (Figure 3B, 3D). Obwohl diese Diskrepanzen auf eine geringere Potenz von Exendin-4 im Vergleich zu GLP-1 zurückgeführt werden könnten, liegen weitere Hinweise auf für Exendin-4 spezifische kardiale Wirkungen vor. So senkte Exendin-4 in Anwesenheit von Oleat sowohl in 0,5 nM als auch in 5 nM die kardiale Glucoseaufnahme signifikant (Figure 1D). Im Gegensatz dazu blieb diese unter den gleichen Bedingungen unverändert nach GLP-1-Stimulation (Figure 1B). Letztlich konnten wir demonstrieren, dass der senkende Effekt von Exendin-4 auf die kardiale Glucoseaufnahme vom kardialen GLP-1-Rezeptor unabhängig ist. Die Blockade des Rezeptors durch Exendin (9-39) konnte nämlich den genannten Effekt nicht hemmen (Figure 4A), während sie in der Lage war, die negativ inotrope Wirkung von GLP-1 vollständig aufzuheben (Figure 4B). Der Mechanismus, wie Exendin-4 in Anwesenheit von Oleat die kardiale Glucoseaufnahme senkte, ist unklar und bedarf weiterführender Untersuchungen.

Obwohl Exendin-4 im Allgemeinen als ein potenter GLP-1-Rezeptoragonist akzeptiert wird, ist bezüglich seiner Spezifität noch wenig bekannt. Es bestehen in der Literatur jedoch einige wenige Hinweise auf unspezifische Wirkungen von Exendin-4. Ban et al. konnte beispielsweise kardioprotektive Effekte von Exendin-4 in GLP-1-Rezeptor-defizienten Mäusen nachweisen (Ban et al. 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass Exendin-4, im Gegensatz zu GLP-1, die Insulinsensitivität in Adipozyten erhöhen kann (Idris et al. 2002). Zusammen mit diesen Beobachtungen unterstützen unsere Ergebnisse die neuartige Annahme, dass Exendin-4 unterschiedliche Wirkungen als GLP-1 aufweisen kann. Demzufolge sollte die häufige Zuschreibung der Effekte von Exendin-4 zu denen von GLP-1 mit Vorsicht betrachtet werden.

In unserer Studie konnten deutliche Veränderungen der kardialen Effekte von GLP-1 und Exendin-4 durch die Zugabe von Oleat ins Perfusionsmedium nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse unterstreichen somit die Bedeutung von Substratbedingungen für die Untersuchung der Wirkungen beider Peptide. Studien über die Effekte von GLP-1 oder Exendin-4 *in vitro* und *in vivo* weisen häufig Diskrepanzen auf (Holst 2007). So konnte beispielsweise eine Stimulation der Glucoseaufnahme durch GLP-1 in Myozyten (Yang et al. 1998, Gonzalez et al. 2005) aber nicht in Muskelgewebe (Furnsinn et al. 1995) beobachtet werden. Obwohl die Ursachen dieser Diskrepanzen ungeklärt bleiben, unterstützen unsere

Ergebnisse die Vermutung, dass die Verwendung von Glucose als alleinigem Substrat in Zellkultur-Modellen eine Rolle spielen könnte.

Die vorliegende Arbeit weist einige Limitierungen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten. Als Erstes sei genannt, dass nur Oleat zur Untersuchung des Einflusses von Fettsäuren verwendet wurde. Obwohl Oleat den größten Anteil der bei Menschen und Säugetieren vorkommenden Fettsäuren darstellt, besteht weiterhin die Möglichkeit, dass andere Fettsäuren die Wirkungen von GLP-1 oder Exendin-4 auf andere Weise beeinflussen können. Demnach ist eine Übertragung unserer Ergebnisse auf In-vivo-Situationen, wo viel komplexere Bedingungen herrschen, nur bedingt möglich. Eine weitere Einschränkung der Studie ist die Verwendung gesunder Ratten zur Untersuchung der chronischen GLP-1-Effekte. Angesichts des Einsatzes GLP-1-basierter Therapie im diabetischen Formenkreis könnte eine Validierung der Ergebnisse in Adipositas- bzw. Prädiabetes-Modellen hilfreich sein.

## 6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

In Anwesenheit von Oleat in physiologischer Konzentration ist GLP-1 nicht in der Lage, die Glucoseverwertung im normalen Herzen zu stimulieren. Dies stellt die bisherige Annahme einer insulinähnlichen Wirkung von GLP-1 hinsichtlich der Regulation des kardialen Glucosestoffwechsels in Frage. Währenddessen kann GLP-1 in Abhängigkeit von Oleat die Herzleistung ex vivo senken. Diese negativ inotrope Wirkung von GLP-1 ist abhängig vom kardialen GLP-1-Rezeptor, während PKA in diese Wirkung nicht involviert ist. Außerdem kann eine Dauerbehandlung mit GLP-1 zur Verminderung der kardialen Glucoseoxidation und Kontraktilität führen.

Im Vergleich zu GLP-1 kann der GLP-1-Rezeptor-Agonist Exendin-4 unterschiedliche Wirkungen auf die kardiale Glucoseaufnahme und Kontraktilität aufweisen. Exendin-4 kann die kardiale Glucoseaufnahme senken. Dieser Effekt ist abhängig von Oleat und wird unabhängig vom GLP-1-Rezeptor vermittelt. Im Gegensatz zu GLP-1 scheint Exendin-4 die Herzleistung nicht akut beeinflussen zu können.

Die Ergebnisse verdeutlichen die Rolle des Fettsäurestoffwechsels in der Modulation der kardialen Wirkungen von GLP-1 oder Exendin-4. Angesichts des verbreiteten Einsatzes GLP-1-basierter Therapien unterstreichen die überraschenden kardialen Effekte von GLP-1 und Exendin-4 die Notwendigkeit weiterführender Untersuchungen über kardiovaskuläre Wirkungen dieser Peptide.



## 7 LITERATUR UND QUELLENVERZEICHNIS

Abel ED. 2004. Glucose transport in the heart. *Front Biosci*, 9:201-215.

Astrup A, Rossner S, Van Gaal L, Rissanen A, Niskanen L, Al Hakim M, Madsen J, Rasmussen MF, Lean ME. 2009. Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet*, 374 (9701):1606-1616.

Baggio LL, Drucker DJ. 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132 (6):2131-2157.

Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hofer J, Bolz SS, Drucker DJ, Husain M. 2008. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*, 117 (18):2340-2350.

Barragan JM, Rodriguez RE, Blazquez E. 1994. Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in rats. *Am J Physiol*, 266 (3 Pt 1):E459-466.

Barragan JM, Rodriguez RE, Eng J, Blazquez E. 1996. Interactions of exendin-(9-39) with the effects of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide and of exendin-4 on arterial blood pressure and heart rate in rats. *Regul Pept*, 67 (1):63-68.

Barragan JM, Eng J, Rodriguez R, Blazquez E. 1999. Neural contribution to the effect of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on arterial blood pressure in rats. *Am J Physiol*, 277 (5 Pt 1):E784-791.

Bharucha AE, Charkoudian N, Andrews CN, Camilleri M, Sletten D, Zinsmeister AR, Low PA. 2008. Effects of glucagon-like peptide-1, yohimbine, and nitrenergic modulation on sympathetic and parasympathetic activity in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295 (3):R874-880.

Bullock BP, Heller RS, Habener JF. 1996. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology*, 137 (7):2968-2978.

Buse JB, Rosenstock J, Sesti G, Schmidt WE, Montanya E, Brett JH, Zychma M, Blonde L. 2009. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week

randomised, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet*, 374 (9683):39-47.

Cummings BP, Stanhope KL, Graham JL, Baskin DG, Griffen SC, Nilsson C, Sams A, Knudsen LB, Raun K, Havel PJ. 2010. Chronic administration of the glucagon-like peptide-1 analog, liraglutide, delays the onset of diabetes and lowers triglycerides in UCD-T2DM rats. *Diabetes*, 59 (10):2653-2661.

Des Rosiers C, Labarthe F, Lloyd SG, Chatham JC. 2011. Cardiac anaplerosis in health and disease: food for thought. *Cardiovasc Res*, 90 (2):210-219.

Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. 2013. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res*, 113 (6):709-724.

Doenst T, Pytel G, Schreppe A, Amorim P, Farber G, Shingu Y, Mohr FW, Schwarzer M. 2010. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc Res*, 86 (3):461-470.

Drucker DJ. 2006. The biology of incretin hormones. *Cell Metab*, 3 (3):153-165.

Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. 1987. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (10):3434-3438.

Edvell A, Lindstrom P. 1999. Initiation of increased pancreatic islet growth in young normoglycemic mice (Umea +/-). *Endocrinology*, 140 (2):778-783.

Edwards CM, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR. 1998. Subcutaneous glucagon-like peptide-1 (7-36) amide is insulinotropic and can cause hypoglycaemia in fasted healthy subjects. *Clin Sci (Lond)*, 95 (6):719-724.

Erdogdu O, Nathanson D, Sjolholm A, Nystrom T, Zhang Q. 2010. Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 325 (1-2):26-35.

Franken NA, Camps JA, van Ravels FJ, van der Laarse A, Pauwels EK, Wondergem J. 1997. Comparison of in vivo cardiac function with ex vivo cardiac performance of the rat heart after thoracic irradiation. *Br J Radiol*, 70 (838):1004-1009.

Furnsinn C, Ebner K, Waldhausl W. 1995. Failure of GLP-1(7-36)amide to affect glycogenesis in rat skeletal muscle. *Diabetologia*, 38 (7):864-867.

Garber A, Henry R, Ratner R, Garcia-Hernandez PA, Rodriguez-Pattzi H, Olvera-Alvarez I, Hale PM, Zdravkovic M, Bode B. 2009. Liraglutide versus glimepiride monotherapy for type 2 diabetes (LEAD-3 Mono): a randomised, 52-week, phase III, double-blind, parallel-treatment trial. *Lancet*, 373 (9662):473-481.

Goke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, Goke B. 1993. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem*, 268 (26):19650-19655.

Gonzalez N, Acitores A, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Penacarrillo ML. 2005. Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signalling in human myocytes. *Regul Pept*, 126 (3):203-211.

Gu W, Lloyd DJ, Chinookswong N, Komorowski R, Sivits G, Jr., Graham M, Winters KA, Yan H, Boros LG, Lindberg RA, Veniant MM. 2011. Pharmacological targeting of glucagon and glucagon-like peptide 1 receptors has different effects on energy state and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 338 (1):70-81.

Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey JL, Zamboni N, Westermann B, Kunji ER, Martinou JC. 2012. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science*, 337 (6090):93-96.

Holst JJ. 2007. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*, 87 (4):1409-1439.

Holz GG. 2004. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes*, 53 (1):5-13.

Hue L, Taegtmeyer H. 2009. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297 (3):E578-591.

Idris I, Patiag D, Gray S, Donnelly R. 2002. Exendin-4 increases insulin sensitivity via a PI-3-kinase-dependent mechanism: contrasting effects of GLP-1. *Biochem Pharmacol*, 63 (5):993-996.

- Imeryuz N, Yegen BC, Bozkurt A, Coskun T, Villanueva-Penacarrillo ML, Ulusoy NB. 1997. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am J Physiol*, 273 (4 Pt 1):G920-927.
- Isbil-Buyukcoskun N, Gulec G. 2004. Effects of intracerebroventricularly injected glucagon-like peptide-1 on cardiovascular parameters; role of central cholinergic system and vasopressin. *Regul Pept*, 118 (1-2):33-38.
- Juhl CB, Hollingdal M, Sturis J, Jakobsen G, Agerso H, Veldhuis J, Porksen N, Schmitz O. 2002. Bedtime administration of NN2211, a long-acting GLP-1 derivative, substantially reduces fasting and postprandial glycemia in type 2 diabetes. *Diabetes*, 51 (2):424-429.
- Kim M, Platt MJ, Shibasaki T, Quaggin SE, Backx PH, Seino S, Simpson JA, Drucker DJ. 2013. GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nat Med*, 19 (5):567-575.
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM. 2008. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab*, 7 (1):45-56.
- Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ. 2003. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem*, 278 (1):471-478.
- Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer London, Limited.
- Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*, 90 (1):207-258.
- Lovshin JA, Drucker DJ. 2009. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 5 (5):262-269.
- Ngoh GA, Facundo HT, Zafir A, Jones SP. 2010. O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system. *Circ Res*, 107 (2):171-185.
- Nguyen TD, Shingu Y, Amorim PA, Schwarzer M, Doenst T. 2011. Chronic GLP-1 treatment preserves diastolic function and improves survival in rats with pressure overload. *European Heart Journal*, 32:783,P4391.

- Opie LH. 2004. Heart physiology: from cell to circulation. Lippincott Williams & Wilkins.
- Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV. 1988. Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology*, 123 (4):2009-2013.
- Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. 1994. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes*, 43 (4):535-539.
- Osaka T, Endo M, Yamakawa M, Inoue S. 2005. Energy expenditure by intravenous administration of glucagon-like peptide-1 mediated by the lower brainstem and sympathoadrenal system. *Peptides*, 26 (9):1623-1631.
- Pound KM, Sorokina N, Ballal K, Berkich DA, Fasano M, Lanoue KF, Taegtmeyer H, O'Donnell JM, Lewandowski ED. 2009. Substrate-enzyme competition attenuates upregulated anaplerotic flux through malic enzyme in hypertrophied rat heart and restores triacylglyceride content: attenuating upregulated anaplerosis in hypertrophy. *Circ Res*, 104 (6):805-812.
- Randle PJ. 1998. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev*, 14 (4):263-283.
- Raun K, von Voss P, Gotfredsen CF, Golozoubova V, Rolin B, Knudsen LB. 2007. Liraglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 analog, reduces body weight and food intake in obese candy-fed rats, whereas a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, vildagliptin, does not. *Diabetes*, 56 (1):8-15.
- Ravassa S, Zudaire A, Diez J. 2012. GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside. *Cardiovasc Res*, 94 (2):316-323.
- Russell RR, 3rd, Taegtmeyer H. 1991. Changes in citric acid cycle flux and anaplerosis antedate the functional decline in isolated rat hearts utilizing acetoacetate. *J Clin Invest*, 87 (2):384-390.
- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 85 (3):1093-1129.

- Stein AB, Tiwari S, Thomas P, Hunt G, Levent C, Stoddard MF, Tang XL, Bolli R, Dawn B. 2007. Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats. *Basic Res Cardiol*, 102 (1):28-41.
- Taegtmeyer H. 2004. Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure. *Circulation*, 110 (8):894-896.
- Thiele TE, Van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Woods SC, Bernstein IL, Seeley RJ. 1997. Central infusion of GLP-1, but not leptin, produces conditioned taste aversions in rats. *Am J Physiol*, 272 (2 Pt 2):R726-730.
- Torekov SS, Madsbad S, Holst JJ. 2011. Obesity - an indication for GLP-1 treatment? Obesity pathophysiology and GLP-1 treatment potential. *Obes Rev*, 12 (8):593-601.
- Ussher JR, Drucker DJ. 2012. Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocr Rev*, 33 (2):187-215.
- Ussher JR, Jaswal JS, Lopaschuk GD. 2012. Pyridine nucleotide regulation of cardiac intermediary metabolism. *Circ Res*, 111 (5):628-641.
- Vila Petroff MG, Egan JM, Wang X, Sollott SJ. 2001. Glucagon-like peptide-1 increases cAMP but fails to augment contraction in adult rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 89 (5):445-452.
- Vilsboll T, Christensen M, Junker AE, Knop FK, Gluud LL. 2012. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on weight loss: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ*, 344:d7771.
- Vrang N, Phifer CB, Corkern MM, Berthoud HR. 2003. Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285 (2):R470-478.
- Wang Q, Brubaker PL. 2002. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia*, 45 (9):1263-1273.
- Wei Y, Mojsov S. 1996. Distribution of GLP-1 and PACAP receptors in human tissues. *Acta Physiol Scand*, 157 (3):355-357.

Wettergren A, Wojdemann M, Meisner S, Stadil F, Holst JJ. 1997. The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation. *Gut*, 40 (5):597-601.

Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Mayr M. 1987. Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with <sup>14</sup>C-labeled substrates in humans. *J Clin Invest*, 79 (2):359-366.

Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. 1999. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*, 48 (12):2270-2276.

Yang H, Egan JM, Wang Y, Moyes CD, Roth J, Montrose MH, Montrose-Rafizadeh C. 1998. GLP-1 action in L6 myotubes is via a receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *Am J Physiol*, 275 (3 Pt 1):C675-683.

Zhao T, Parikh P, Bhashyam S, Bolukoglu H, Poornima I, Shen YT, Shannon RP. 2006. Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther*, 317 (3):1106-1113.

## **8 ANHANG**

### **8.1 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Torsten Doenst

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers



## 8.2 Danksagung

Meinen Eltern **Lan** und **Reinhard Hanhues**, meiner Frau **Ngoc Thuy Vy Nguyen**. Ohne ihre Unterstützungen wären mein Studium und meine Promotionsarbeit nicht möglich gewesen.

**Torsten Doenst** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe in Leipzig und die hervorragende Betreuung und maximale Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotionsarbeit. Seine Begeisterung für die Forschung und sein wissenschaftliches Denken haben mir meine beruflichen Ziele vor Augen geführt. Darüber hinaus hat sein reicher sozialer Erfahrungsschatz meine persönliche Entwicklung sehr geprägt.

Der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere **Yasushige Shingu**, **Daniel Blum**, **Paulo Amorim**, **Moritz Osterholt**, die mit ihrem Wissen, ihren Ratschlägen und tatkräftigen Hilfen einen wesentlichen Beitrag zu meinem Fortschritt geleistet haben.

## 8.3 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

|                     |  |
|---------------------|--|
| Name                | Nguyen, Tien Dung  |
| Geburtsdatum        | 18. November 1981  |
| Geburtsort          | Ho-Chi-Minh-Stadt, Vietnam   |
| Familienstand       | verheiratet  |
| Staatsangehörigkeit | deutsch  |
| E-Mail              | <a href="mailto:Tien.Nguyen@med.uni-jena.de">Tien.Nguyen@med.uni-jena.de</a> |

### Schulbildung und Studium

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| 1987 – 1999       | Grundschule und Gymnasium in Ho-Chi-Minh-Stadt                               |
| 09/1999 – 02/2002 | Medizinstudium an der Pham-Ngoc-Thach-Medizinhochschule in Ho-Chi-Minh-Stadt |
| 09/2002 – 07/2003 | Studienkolleg Sachsen  |
| 10/2003 – 07/2009 | Medizinstudium an der Universität Leipzig                                    |
| Frühjahr 2005     | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung                                      |
| 08/2009 – 07/2010 | Praktisches Jahr in Leipzig (Innere, Chirurgie und Psychosomatik)            |
| Herbst 2010       | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung                                     |

### Wissenschaftlicher Werdegang

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| 10/2007 – 07/2010 | Forschungstätigkeit in der Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Leipzig<br>Betreuer: Prof. Dr. med. Torsten Doenst              |
| Seit 02/2011      | Tätigkeit als Arzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Jena |

### Wissenschaftliche Projekte

1. Substratstoffwechsel und Insulinempfindlichkeit des Herzens nach Myokardinfarkt.
2. Wirkung von GLP-1 und exendin-4 auf die Herzfunktion und den kardialen Glucosestoffwechsel.
3. Wertigkeit der transthorakalen Echokardiographie in der Diagnose des durch Drucküberlastung induzierten Lunge-Remodelings.
4. Die Rolle von GLP-1 in der Therapie der Herzinsuffizienz in drucküberlasteten Rattenherzen.
5. Kardiale Insulinempfindlichkeit in der Pathogenese der durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz.
6. Anaplerotische Therapie der Herzinsuffizienz mit Triheptanoin in drucküberlasteten Rattenherzen.
7. Veränderungen der mitochondrialen Biogenese und deren Mechanismen bei pathologischer Hypertrophie.

### **Sonstige Tätigkeiten**

---

|             |  |
|-------------|--|
| 2003 – 2006 | Musikalische Ausbildung (Gesang, Klavier) in Leipzig                         |
| 2005 – 2006 | Begabtenförderung im Fach Pop/Jazz-Gesang vom Verband deutscher Musikschulen |

## 8.4 Wissenschaftliche Publikationen

### Originalarbeiten:

1. Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, Amorim PA, Schoepe M, **Nguyen TD**, Mohr FW, Khalimonchuk O, Weimer BC, Doenst T. 2010. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res*, 85(2):376-84
2. **Nguyen TD\***, Amorim PA\*, Shingu Y, Schwarzer M, Mohr FW, Schrepper A, Doenst T. 2010. Myocardial infarction in rats causes partial impairment in insulin response associated with reduced fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 140(5):1160-7 (\*: *geteilte Erstautorenschaft*)
3. Shingu Y, Amorim P, **Nguyen TD**, Mohr FW, Schwarzer M, Doenst T. 2010. Myocardial performance (Tei) index is normal in diastolic and systolic heart failure induced by pressure overload in rats. *Eur J Echocardiogr*, 11(10):829-33
4. Shingu Y, Amorim PA, **Nguyen TD**, Osterholt M, Schwarzer M, Doenst T. 2013. Echocardiography alone allows the determination of heart failure stages in rats with pressure overload. *Thorac Cardiovasc Surg*, (Online-Publikation, im Druck)
5. **Nguyen TD**, Shingu Y, Amorim PA, Schwarzer M, Doenst T. 2013. Glucagon-like peptide-1 reduces contractile function and fails to boost myocardial glucose utilization in normal hearts in the presence of fatty acids. *Int J Cardiol*, 168(4):4085-92
6. **Nguyen TD**, Shingu Y, Schwarzer M, Schrepper A, Doenst T. 2013. The E-Wave deceleration rate E/DT outperforms the tissue Doppler-derived index E/e' in characterizing lung remodeling in heart failure with preserved ejection fraction. *PLOS One* (im Druck)
7. **Nguyen TD\***, Schwarzer M\*, Schrepper A, Muehle A, Amorim PA, Hain C, Blum D, Doenst T. A role for PTP1B in cardiac insulin resistance and mitochondrial dysfunction induced by pressure overload. (\*: *geteilte Erstautorenschaft*). In Vorbereitung

8. **Nguyen TD**, Shingu Y, Amorim PA, Schwarzer M, Doenst T. GLP-1 preserves diastolic function and cardiac glucose oxidation and improves survival in rats with pressure overload. In Vorbereitung
9. **Nguyen TD**, Shingu Y, Amorim PA, Schwarzer M, Doenst T. Triheptanoin-enriched diet attenuates hypertrophy and preserves diastolic function and cardiac glucose oxidation in rats with pressure overload. In Vorbereitung

#### **Übersichtsartikel:**

1. Doenst T, **Nguyen TD**, Abel ED. 2013. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. *Circ Res*, 113(6):709-24
2. Osterholt M, **Nguyen TD**, Schwarzer M, Doenst T. 2013. Alterations in mitochondrial function in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart Fail Rev*, 18(5):645-56
3. **Nguyen TD** and Doenst T. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. Buchkapitel in "Modern clinical use of cardioplegic solutions". Eingereicht
4. **Nguyen TD** and Doenst T. Switching substrate use in light of a failing Randle cycle: metabolic therapy for heart failure revisited. In Vorbereitung

#### **Korrespondenzen:**

1. **Nguyen TD**, Doenst T. 2009. Letter by Nguyen and Doenst regarding article "Chronic glucagon-like peptide-1 infusion sustains left ventricular systolic function and prolongs survival in the spontaneously hypertensive, heart-failure prone rat". *Circ Heart Fail*, 2(3):e1

**Abstracts (als Poster oder Vortrag präsentiert):**

1. **Nguyen TD**, Schwarzer M, Pytel G, Schrepper A, Mohr FW, Doenst T. 2008. Pressure overload-induced heart failure in rats is associated with impaired insulin response and mitochondrial dysfunction. Jahrestagung von Society for Heart and Vascular Metabolism
2. **Nguyen TD**, Schwarzer M, Amorim P, Schrepper A, Mohr FW, Doenst T. 2009. Mitochondrial function in pressure-overload and exercise-induced hypertrophy: Time makes the difference. Thorac cardiovasc Surg, 56: P67
3. Amorim P, **Nguyen TD**, Schrepper A, Mohr FW, Doenst T. 2009. Postinfarct remodeling causes insulin resistance and defects in substrate oxidation. Thorac cardiovasc Surg, 56: P76
4. Schrepper A, Schwarzer M, Amorim P, Schoepe M, **Nguyen TD**, Mohr FW, Doenst T. 2009. Moderate exercise training in rats is associated with myocardial hypertrophy but normal metabolic geno- and phenotype. Thorac cardiovasc Surg, 56: P66
5. **Nguyen TD**, Amorim PA, Schwarzer M, Mohr FM, Doenst T. 2009. Opposite effects of GLP-1 and its analogue exendin-4 on myocardial glucose metabolism. Jahrestagung von Society for Heart and Vascular Metabolism
6. Shingu Y, **Nguyen TD**, Amorim PA, Köppen A, Schwarzer M, Mohr FW, Doenst T. 2010. Oleate controls the effects of GLP-1 and exendin-4 on myocardial glucose utilization and contractile function. Thorac cardiovasc Surg, 58: V31
7. Amorim PA, **Nguyen TD**, Schrepper A, Köppen A, Shingu Y, Mohr FW, Doenst T. 2010. Cardiac insulin resistance as a common feature of pressure overload- and myocardial infarction-induced heart failure. Thorac cardiovasc Surg, 58: MP50
8. **Nguyen TD**, Shingu Y, Amorim P, Koeppen A, Schwarzer M, Mohr FW, Doenst T. 2010. Oleate controls the effects of GLP-1 and exendin-4 on myocardial glucose utilization and contractile function. Eur Heart J, 31:937
9. Shingu Y, Amorim P, **Nguyen TD**, Mohr FW, Schwarzer M, Doenst T. 2010. Myocardial performance (Tei) index is normal in diastolic and systolic heart failure induced by pressure overload in rats. Eur Heart J, 31:816

10. Schwarzer M, **Nguyen TD**, Hain C, Amorim PA, Blum D, Schrepper A, Doenst T. 2010. Pressure overload causes PTP1B activation - a possible mechanism for heart failure associated insulin resistance. *Circulation*, 122:A15431
11. **Nguyen TD**, Shingu Y, Amorim P, Koeppen A, Schwarzer M, Doenst T. 2011. Chronic GLP-1 treatment preserves diastolic function and improves survival in rats with pressure overload. *Eur Heart J*, 32:783
12. **Nguyen TD**, Shingu Y, Schwarzer M, Schrepper A, Doenst T. 2012. The E-wave deceleration rate E/DT but not the tissue-Doppler derived index E/Ea reliably characterizes pressure-overload induced diastolic dysfunction. *Eur Heart J*, 33:655-939, P4234
13. **Nguyen TD**, Shingu Y, Amorim PA, Schwarzer M, Doenst T. 2013. Triheptanoin diet alleviates hypertrophy and diastolic dysfunction and preserves cardiac glucose oxidation in rats with pressure overload. *Clin Res Cardiol*, 102, Suppl 1, V577
14. **Nguyen TD**, Domrös D, Heller R, Schwarzer M, Doenst T. 2013. Crosstalk between cardiac hypertrophy and mitochondrial biogenesis in heart failure; a role for Akt. Jahrestagung von Society for Heart and Vascular Metabolism

**Invited talk:** Research seminar – Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, University of Utah, Salt Lake City, USA. 2010. The role of cardiac insulin sensitivity in heart failure and the use of GLP-1 as a therapy for heart failure