



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchungen zur Wirkung von Progesteron
und Efaroxan auf die Insulinsekretion von Mäusen.

Verfasserin

Valentina Andreina Maria de Cillia

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

***Sehr herzlich möchte ich mich bei
Herrn Professor Clemens Fürnsinn, Frau Dr. Karin Stadlbauer
und Frau Dr. Zsuzsanna Lehner bedanken, die das Verfassen der
vorliegenden Diplomarbeit erst möglich gemacht haben und
mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.***

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Glukosestoffwechsel	3
2.2. Glukosehomöostase	4
2.3. Insulin	4
2.4. Insulinausschüttung.....	4
2.5. Insulinwirkung	7
2.6. Diabetes Mellitus.....	8
2.7. Typ-2-Diabetes	9
2.8. Schwangerschaftsdiabetes	10
2.9. Progesteron	11
2.10. Efaroxan.....	12
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1. Versuchstiere.....	17
3.2. Prinzip der Methode zur Perifusion der Langerhans'schen Inseln	18
3.3. Reagenzien	18
3.3.1. Krebs-Ringer Lösung.....	18
3.3.2. Hepes-NaOH-Stammlösung	20
3.3.3. Collagenase	20
3.3.4. 5mM Glukoselösung („Pickmedium“).....	20
3.3.5. Testsubstanzen	20
3.4. Versuchsvorbereitung	22
3.5. Gewebeentnahme	23
3.6. Inselgewinnung.....	26

3.7. „Picken“ der Inseln	27
3.8. Laden der Perifusionszylinder	27
3.9. Equilibrationsphase	27
3.10. Stimulationsphase	28
3.11. Analytik.....	28
3.12. Oraler Glukosetoleranztest	29
3.13. Sauerstoffmessung.....	30
3.14. Statistik.....	30
4. Ergebnisse und Diskussion	32
4.1. Evaluierung des Perifusionssystems	32
4.1.1. Glukose Dosis-Wirkungs-Kurve	32
4.1.2. KCl	34
4.1.3. KIC	36
4.1.4. Tolbutamid, Efaroxan.....	38
4.2. Wirkung von Progesteron auf die Insulinsekretion.....	41
4.3. Wirkungen gereinigter Efaroxanenantiomere	44
4.3.1. Wirkung auf die Insulinsekretion in vitro.....	44
4.3.2. Wirkung auf die Glukosetoleranz.....	49
4.3.3. Wirkung auf die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins	52
5. SCHLUSSBETRACHTUNG.....	55
6. ZUSAMMENFASSUNG	59
7. ABSTRACT	60
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	61
CURRICULUM VITAE	67

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Insulin ist ein Hormon aus den pankreatischen Langerhans'schen Inseln, das den Glukosestoffwechsel reguliert. Der Glukosestoffwechsel ist bei verschiedenen Krankheitsbildern, wie etwa dem Gestationsdiabetes oder dem adipositasassoziierten Typ-2-Diabetes gestört oder zumindest beeinträchtigt.

Aus diesen Gründen ist es wichtig zu erforschen, wie die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen durch Hormone reguliert wird und wie sie durch diverse Pharmaka moduliert werden kann.

Ziel dieser experimentellen Studie war es, eine Methode zur Perifusion isolierter Langerhans'scher Inseln von Mäusen zu etablieren und damit orientierende Experimente zu den Effekten des Hormons Progesteron und der synthetischen Substanz Efaroxan auf die Insulinsekretion durchzuführen und schließlich den Wirkmechanismus der Substanzen zu hinterfragen. Etwas ausführlicher lassen sich drei Zielsetzungen der Arbeit wie folgt zusammenfassen:

1) Im ersten Teil der Arbeit muss die experimentelle Methode etabliert, evaluiert und standardisiert werden. Die Methode der Perifusion isolierter Langerhans'scher Inseln ist durchaus nicht trivial, aber für Untersuchungen über die Modulation der Insulinsekretion *in vitro* sehr geeignet. Ziel ist also, die Qualität der Versuchsaufstellung durch Vergleich mit publizierten Daten über Stimulatoren der Insulinfreisetzung zu überprüfen. Dies ist Grundlage der nachfolgenden Bearbeitung von Fragestellungen der noch nicht hinlänglich beschriebenen Wirkungen von Progesteron und Efaroxan.

2) Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit einer möglichen akuten und direkten Wirkung des Hormons Progesteron auf die Insulinfreisetzung, was bei der Entstehung des Gestationsdiabetes relevant sein könnte. Zu diesem Zweck soll im Inselperifusionssystem die Wirkung von Progesteron auf die glukosestimulierte

Insulinsekretion untersucht werden. Ausgangspunkt ist dabei die Behauptung einer anderen Arbeitsgruppe, Progesteron hätte unter solchen Bedingungen hemmende Effekte.

3) Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung von Efaroxan auf die Insulinfreisetzung. Dabei ist das Ziel, die Wirkungen von racemischem Efaroxan und von hochgereinigten Efaroxanenantiomeren vergleichend darzustellen. Neben der Versuchsanordnung der Inselfusion werden hier auch Experimente an lebenden Mäusen durchgeführt. Dies umfasst orale Glukosetoleranztests und Messungen der Sauerstoffsättigung des Blutes. Letzteres ist ein mutmaßlicher Surrogatparameter vasodilatatorischer Wirkung. Diese Versuche sollen zum Verständnis des Wirkmechanismus von Efaroxan beitragen. Ausgangspunkt sind hier Hinweise aus der Literatur, wonach die insulinotrope Wirkung von Efaroxan über zwei unterschiedliche Mechanismen vermittelt wird, die von den jeweiligen Enantiomeren unterschiedlich stark angesprochen werden (Effekte über den α_2 -Adrenozeptor bzw. über den K_{ATP} -Kanal).

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1. Glukosestoffwechsel

Das Monosaccharid Glukose zählt zu den Kohlenhydraten. Kohlenhydrate sind aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff zusammengesetzt und gelten als wichtiger Energielieferant für den Organismus. Sie stellen bei herkömmlich ernährten Menschen mehr als 50% der benötigten Energie bereit [1, 2].

Besonders die Aldohexose Glukose nimmt im Intermediärstoffwechsel eine wichtige Rolle als zentraler Energieträger ein. Die Energieversorgung von Gehirn, Nierenmark und Erythrozyten wird beispielsweise alleine durch die Glukose gewährleistet [2, 3]. Sie wird in einer Reaktionskaskade, der Glykolyse, unter Freisetzung von je zwei Molekülen ATP und NADH, zu 2 Molekülen Pyruvat abgebaut. Wird Glukose anaerob abgebaut, entsteht aus dem Pyruvat das Endprodukt Laktat [4].

Bei der aeroben Verstoffwechslung wird das in der Glykolyse gebildete Pyruvat in weiterer Folge in den Mitochondrien durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Enzymkomplex decarboxyliert. Aus diesem Vorgang resultieren die Produkte CO_2 , NADH und Acetyl-CoA. Das Acetyl-CoA wird in den Zitronensäurezyklus eingeschleust, wo in mehreren Reaktionsschritten je Durchlauf zwei Moleküle CO_2 , drei Moleküle NADH, ein Molekül GTP und ein Molekül FADH_2 entstehen. NADH und FADH_2 spielen eine zentrale Rolle als Überträger energiereicher Elektronen an die Elektronentransportkette in der Mitochondrienmembran. Durch diesen Elektronentransport entsteht ein H^+ -Ionengradient, der die Bildung von ATP aus ADP durch Phosphorylierung betreibt. Diese Form der Energiegewinnung durch Synthese von ATP aus ADP wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet [4].

2.2. Glukosehomöostase

Die hormonell und nervös gesteuerte Glukosehomöostase reguliert die Blutglukosewerte und hält diese beim Menschen zwischen 60 und 180mg/dl. Entscheidend daran beteiligt sind die in den Langerhans'schen Inseln gebildeten Hormone Insulin und Glukagon. Insulin und Glukagon sind Antagonisten bei der Regulation der Glukosehomöostase und verhindern im Zusammenspiel sowohl Hyper- als auch Hypoglykämien [5]. Insulin wird von den β -Zellen des endokrinen Pankreas sezerniert und steuert die Aufnahme von Glukose in Muskulatur und Fettgewebe, die Speicherung von Glukose als Glykogen in Muskulatur, Fett und Leber, sowie die Verbrennung von Glukose in diesen Organen (anaboles Stoffwechselprinzip). Glukagon stammt aus den α -Zellen des endokrinen Pankreas und sorgt für einen ausreichend hohen Blutglukosespiegel durch eine Steigerung der Glukoneogenese aus Laktat, Aminosäuren und Glycerin sowie durch die verstärkte Aktivierung der Glykogenolyse in der Leber (kataboles Stoffwechselprinzip) [3, 5].

2.3. Insulin

Insulin zählt zu den anabolen Hormonen und setzt sich aus 51 Aminosäuren zusammen, die auf zwei Peptidketten (A und B) aufgeteilt und durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die A-Peptidkette erfährt zusätzliche Stabilisation durch eine weitere Disulfidbrücke. Synthetisiert wird dieses Peptidhormon in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas [6, 7]. Mit einer Halbwertszeit von 5-8 Minuten wird Insulin in Leber und Niere abgebaut [3].

2.4. Insulinausschüttung

Die Glukose stellt den primären Reiz für die Insulinausschüttung durch Exozytose dar. Erreicht die im Blutplasma zirkulierende Glukosekonzentration einen erhöhten Wert, erfolgt die Signaltransduktion zur Insulinsekretion. Durch den Anstieg der Plasmaglukose wird diese vermehrt über den Glut-2-Transporter in die β -Zelle

transportiert und beschleunigt dort die ATP-Produktion [7]. Die steigende ATP-Produktion in der β -Zelle hat die Schließung der ATP-gesteuerten Kaliumkanäle zur Folge, was eine Depolarisation der β -Zelle nach sich zieht. Durch die Depolarisation wird die Öffnung von Kalzium-Kanälen bewirkt. Kalzium strömt in die β -Zelle ein und verursacht die Exozytose von Insulin bei gleichzeitiger Öffnung der Kaliumkanäle. Insulin gelangt zu den Zielzellen, bindet dort an den Insulinrezeptor und löst eine Signaltransduktion aus [5, 7]. Die Wiederöffnung der Kaliumkanäle bewirkt eine Abschaltung der Insulinsekretion (= Rückkoppelung). Diese Reaktionskaskade ist in der Abbildung E1 schematisch dargestellt.

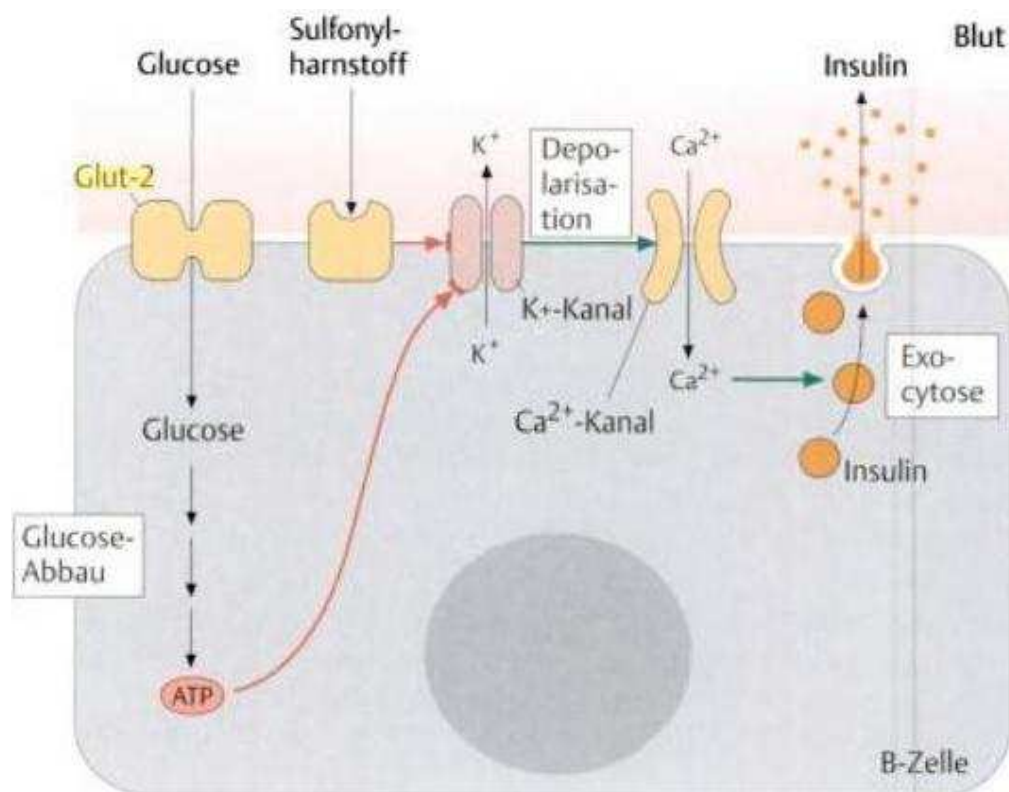


Abb. E1: Reaktionskaskade der Insulinausschüttung. Glukose gelangt in die β -Zelle, steigert die ATP-Produktion und verursacht die Schließung der Kaliumkanäle. Dadurch wird die Depolarisation der β -Zelle ausgelöst, die Öffnung der Kalzium-Kanäle bewirkt und somit die Exozytose von Insulin verursacht; aus [7].

Im Rahmen einer 2003 durchgeführten gemeinschaftlichen Arbeit mehrerer Arbeitsgruppen kam man zum Schluss, dass dieser sogenannte „K_{ATP}-Kanal abhängige Weg“ durch andere Mechanismen, den sogenannten „K_{ATP}-Kanal unabhängigen Weg“ ergänzt wird [8].

Der K_{ATP}-Kanal abhängige Weg hebt also den Kalziumspiegel im Cytosol an und induziert in weiterer Folge die Exocytose von Insulin. Der K_{ATP}-Kanal unabhängige Weg verstärkt hingegen den Einfluss auf den cytosolischen Kalziumspiegel nicht, steigert aber die Insulinsekretion als Folge des Kalziumsignals. Henquin et al. untersuchten mittels Perfusion von humanen Inseln, ob bei einer Glukosestimulation die Insulinsekretion über den K_{ATP}-Kanal unabhängigen Weg erhöht werden kann:

- Bei einer zwischen 1 und 15mmol/l wechselnden Glukosestimulation wurden je 100µmol/l Diazoxid und Tolbutamid auf ihren Effekt auf die Insulinsekretion untersucht. Diazoxid ist ein wirksamer K_{ATP}-Kanal-Öffner und hemmte dementsprechend die Insulinsekretion bei einer Glukosestimulation von 15mmol/l stark. Dieser Effekt konnte jedoch durch Zugabe von 100µmol/l Tolbutamid umgekehrt werden, d.h. Tolbutamid war in der Lage, die K_{ATP}-Kanäle wieder zu schließen und somit die Insulinsekretion erneut zu stimulieren. Tolbutamid gehört nämlich zu den Sulfonylharnstoffen und wirkt direkt auf den K_{ATP}-Kanal [9].
- Weiters wurde der Effekt von 500µmol/l Tolbutamid auf die Insulinsekretion analysiert. In Gegenwart von nur 1mmol/l Glukose kam es zu einem starken Anstieg der Insulinsekretion, die durch Erhöhung der Glukosekonzentration auf 15mmol/l weiter gesteigert werden konnte [9]. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Tolbutamid eine Blockade der K_{ATP}-Kanäle auslöst [10, 11].
- Bei einer Glukosekonzentration von 1mmol/l und konstanter Anwesenheit von Diazoxid war eine Konzentration von 30mmol/l KCl in der Lage, die β-Zelle zu depolarisieren und die Insulinsekretion zu erhöhen. KCl hebt somit die Wirkung des K_{ATP}-Kanal-Öffners Diazoxid auf. Dieser Effekt wurde in Gegenwart einer Glukosestimulation von 15mmol/l weiter gesteigert. Demnach ist KCl in der

Lage, die Insulinsekretion durch Depolarisation zu beeinflussen und daher unabhängig vom Öffnungszustand der K_{ATP} -Kanäle zu wirken. Ebenso kann die Glukose unabhängig vom K_{ATP} -Kanal wirken. Daraus lässt sich schließen, dass der K_{ATP} -Kanal unabhängige Weg funktional ist [9].

2.5. Insulinwirkung

Der Wirkung von Insulin liegen komplexe Effekte auf den Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel zu Grunde. Die anabole Wirkung von Insulin bedingt die Synthese von Speicherstoffen wie Glykogen, Triglyzeriden und Proteinen [7].

Insulin fördert desweiteren die zelluläre Aufnahme von Glukose und Aminosäuren [7]. Die Blutglukose-senkende Wirkung durch zelluläre Glukoseaufnahme ist auf den Glukosecarrier GLUT-4 in der Membran von Fett- und Skelettmuskelzellen zurückzuführen, der durch Insulin in die Zellmembran transloziert und dort aktiviert wird [3, 12]. Darüber hinaus bewirkt Insulin den Abbau von Triglyceriden in Chylomikronen. Dabei werden Fettsäuren frei, die insulinvermittelt gemeinsam mit Glycerin ins Fettgewebe transportiert und wiederum als Triglyceride gespeichert werden [12]. Die Wirkungen von Insulin auf den Stoffwechsel sind in der Abbildung E2 schematisch gelistet.

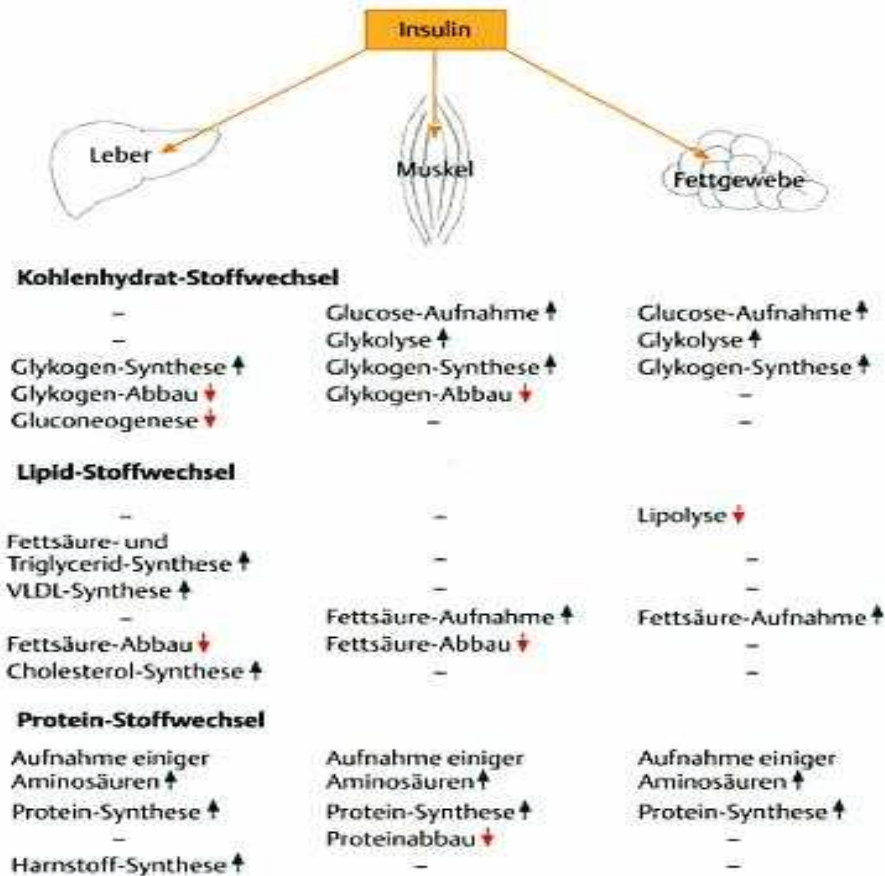


Abb. E2: Insulinwirkung auf den Kohlenhydrat-, Lipid- und Protein-Stoffwechsel; aus [7].

2.6. Diabetes Mellitus

Der Begriff Diabetes mellitus bezeichnet Stoffwechselanomalien, die durch erhöhte Blutglukose gekennzeichnet sind und denen unterschiedliche Ursachen zu Grunde liegen. Eine Vorstufe stellt die gestörte Glukosetoleranz, d.h. eine vorübergehend erhöhte Blutglukose durch eine unzureichende Verwertung von Glukose dar. Zurückzuführen sind diese Stoffwechselstörungen auf einen absoluten oder relativen Insulinmangel. Für eine Manifestation des Diabetes mellitus sind neben genetischer Prädisposition auch Umwelteinflüsse (Adipositas, Rauchen, Schwangerschaft, diabetogene Medikamente etc.) ausschlaggebend [13].

2.7. Typ-2-Diabetes

Typ-1-Diabetes ist durch den totalen Verlust der insulinproduzierenden β -Zellen gekennzeichnet. Mehr als 90% aller Diabetiker sind allerdings Typ-2-Diabetiker. Die Pathogenese von Diabetes mellitus Typ-2 ist komplex und umfasst verschiedene Ausprägungen wie etwa Formen mit starker peripherer Insulinresistenz und relativem Insulinmangel und Formen mit stark ausgeprägtem Insulinsekretionsdefekt in Assoziation mit milder Insulinresistenz. Charakteristisch für Typ-2-Diabetes ist demnach unter anderem eine periphere Insulinresistenz, also eine unzureichende Wirkung von Insulin auf Zielgewebe wie Muskel, Leber und Fett [13, 14].

Darüber hinaus trägt auch das Vorliegen einer Adipositas, insbesondere einer abdominellen Adipositas, maßgeblich zur Entwicklung einer Insulinresistenz bei. Intraabdominelles Fettgewebe ist verglichen mit peripherem Fettgewebe stoffwechselaktiver und weist einen höheren Gehalt an freien Fettsäuren auf. Dies wirkt sich nicht nur negativ auf den Glukosestoffwechsel aus, sondern kann auch u.a. zu einer Dyslipoproteinämie, Hypertonie und einer Hyperurikämie führen [13].

Die Adipositas hat komplexe Wirkungen auf den Glukosestoffwechsel. Durch manifeste Adipositas entwickelt sich eine erniedrigte Glukosetoleranz bei gleichzeitig erhöhtem Insulinspiegel, also Insulinresistenz und relativer Insulinmangel. Verbunden ist dies mit einer Abnahme membrangebundener Insulinrezeptoren, was trotz des erhöhten Insulinangebots zu einer verminderten Insulinbindung führt. Auch die Transduktion des Insulinsignals in der Zielzelle ist beeinträchtigt [15].

Die β -Zellen des Pankreas reagieren auf diesen Zustand mit erhöhter Insulinsekretion, was zumindest anfangs den Verlust an Insulinwirksamkeit ausgleicht (kompensatorische Hyperinsulinämie). Durch die permanent hohe Insulinausschüttung wird allerdings die normale β -Zellfunktion zunehmend gestört, woraus sich schließlich die Insuffizienz entwickelt [15]. Sulfonylharnstoffe (z.B. Tolbutamid) und Imidazoline (z.B. Efaroxan) sind Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden und die Insulinsekretion steigern, können in solchen Situationen die gestörte β -Zellfunktion ausgleichen. Während Sulfonylharnstoffe direkt an K_{ATP} -Kanäle binden und

diese schließen, ist der Wirkmechanismus der Imidazoline noch nicht vollständig geklärt (siehe unten).

2.8. Schwangerschaftsdiabetes

Schwangerschaftsdiabetes, auch Gestationsdiabetes genannt, ist definiert als eine Glukosetoleranzstörung, die erstmals in der Schwangerschaft auftritt [13]. Während der letzten Schwangerschaftsphase ist auch bei Gesunden die Insulin-abhängige Glukoseaufnahme ins mütterliche Gewebe reduziert. Interpretiert wurde dieses Phänomen als eine Verlagerung der Brennstoffversorgung von mütterlichen Geweben zum Fötus [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. Bei unzureichender Stoffwechselkontrolle bzw. Stoffwechseleinstellung durch geeignete Therapiemaßnahmen kann Gestationsdiabetes zu Komplikationen, wie etwa Embryopathie und diabetischer Fetopathie, führen. Zu den präventiven Maßnahmen zählt vor allem die Durchführung eines oralen Glukosetoleranztests in der 24.-28. Schwangerschaftswoche. Als Risikopatientinnen gelten Frauen mit familiärer Prädisposition, Übergewicht und fortgeschrittenem Alter [13].

Diese metabolische Adaption könnte hauptsächlich durch hohe Progesteronkonzentrationen, die ebenfalls im letzten Drittel der Schwangerschaft auftreten, ausgelöst werden [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. Als kompensatorische Anpassungen an diese schwangerschaftsassozierte Insulinresistenz gelten morphologische und funktionelle Adaptionen von Pankreasinseln, beispielsweise Hypertrophie, Hyperplasie und eine erhöhte Glukosesensitivität der Insulinsekretion von β -Zellen [25, 26, 27]. Prolaktin und das plazentare Laktogen wurden als Auslöser für die genannten Inseladaptionen identifiziert, während Progesteron gegenteilige Effekte haben dürfte [23, 26, 27, 28, 29, 30].

Dass sich Progesteron sowohl auf die Insulinsensitivität, als auch auf den kompensatorischen Anstieg der Insulinfreisetzung negativ auswirkt, hatte

Spekulationen zur Folge, dass dieses Steroidhormon die Entwicklung von Gestationsdiabetes fördern könnte [23].

2.9. Progesteron

Das Steroidhormon Progesteron zählt zu den Gestagenen und entsteht als Produkt aus Cholesterin. Cholesterin wird durch oxidative Verkürzung der Seitenkette C17 zu Pregnenolon. Selbiges wird durch anschließende Oxidation am C3-Atom und Verschiebung der Doppelbindung in den Ring A in Progesteron überführt [31]. Progesteron wird nach dem Eisprung im

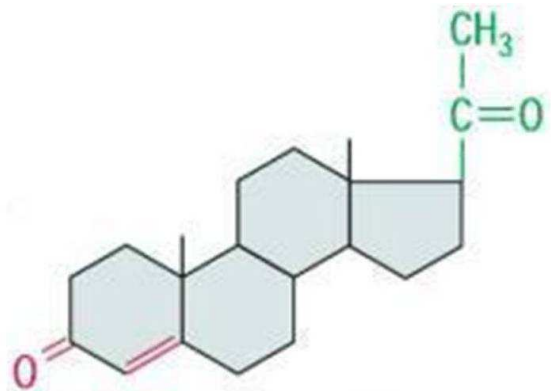


Abb. E3: Strukturformel von Progesteron; adaptiert nach [1].

Corpus luteum produziert und entsteht in der 8.-10. Schwangerschaftswoche vermehrt in der Plazenta [32, 33]. Das Hormon soll eine konzentrationsabhängige Verminderung der glukosestimulierten Insulinsekretion bewirken. Dieser Zusammenhang wurde an perfundierten Rattenpankreasinseln beschrieben [34]. Ursache dieser Hemmung der Insulinsekretion könnte sein, dass Progesteron die Zellatmung und Glukoseoxidation, und daher die ATP-Verfügbarkeit reduziert, was für isolierte Rattenmuskeln beschrieben wurde [29]. Sollte die Hypothese richtig sein, wonach Progesteron die mitochondriale Funktion beeinflusst und die ATP-Verfügbarkeit in der β -Zelle senkt, so könnte das erklären, weshalb eine Progesteronexposition unverzüglich die Insulinsekretion von β -Zellen inhibiert [34]. Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit hinterfragt.

2.10. Efaroxan

Neben dem Progesteron wurde in dieser Arbeit auch die Wirkung des schon weiter oben erwähnten Efaroxan untersucht.

Efaroxan zählt zur Gruppe der Imidazoline und wurde in zahlreichen

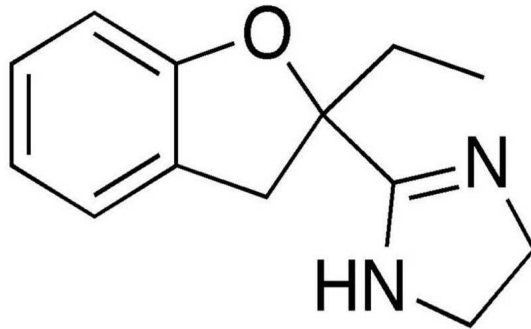


Abb. E4: Strukturformel von Efaroxan [60].

Studien als starker α_2 -adrenerger

Rezeptorantagonist identifiziert. Nachdem der α_2 -Adrenozeptorantagonismus gesteigerte Insulinsekretion bewirken kann, wurde dieser Wirkstoff als mögliches neues antidiabetisches Medikament untersucht [35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42].

Neben der weithin anerkannten Wirkung auf α_2 -Adrenozeptoren existiert die Hypothese, wonach Efaroxan unabhängig vom α_2 -Adrenozeptorantagonismus in der Lage sei, die insulinotrope Wirkung der Glukose zu verstärken, d.h. die K_{ATP} -Kanäle von insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zu blockieren, somit β -Zelle zu depolarisieren und in weiterer Folge durch den damit verursachten Kalziumeinstrom die Exocytose von Insulingranula auszulösen [40, 42, 43, 44, 45, 46, 47]. Zimanyi et al. kamen in den 1980er Jahren im Rahmen ihrer Arbeit über den Mäusesamenleiter zum Schluss, dass durch α_2 -Agonisten und die daraus resultierende Stimulation der α_2 -Adrenozeptoren die Permeabilität für Kalium an den Kaliumkanälen forciert wird. Daraus schloss man, dass es womöglich auch in anderen Geweben einen Zusammenhang zwischen α_2 -Adrenozeptoren und der Permeabilität von Kaliumkanälen gibt [48].

Eine Studie von Chan et al. an isolierten Rattenpankreasinseln spricht davon, dass der Effekt auf die Insulinsekretion von α_2 -Adrenozeptor-antagonistischen Wirkstoffen wie Efaroxan nicht alleine auf die Interaktion mit dem α_2 -Adrenozeptor zurückzuführen ist, da der α_2 -Adrenozeptorantagonist Idazoxan keine mit Efaroxan vergleichbare Wirkung

zeigte. Das Ausbleiben der Idazoxanwirkung wurde somit als Hinweis auf einen zweiten, Adrenozeptor-unabhängigen Wirkmechanismus von Efaroxan gedeutet [49]. Weiters wurden durch Auftrennung des racemischen Efaroxangemisches die reinen Enantiomere gewonnen und einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Dabei konnte die inhibierende Wirkung auf den α_2 -adrenergen Rezeptor auf Grund der Stereospezifität ausschließlich dem (+) Enantiomer zugeschrieben werden. Weitere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen der Kaliumkanalblockade und dem (-) Enantiomer, also dem am Adrenozeptor unwirksamen Enantiomer, belegen [50]. Statische Inkubationen von isolierten Ratteninseln wurden zu diesem Zweck durchgeführt und haben folgende Ergebnisse gebracht:

- Bei 60 minütiger Inkubation von Inseln mit 20mM Glukose führte 1 μ M des α_2 -Agonisten UK14,304 zu einer deutlichen Inhibition der Insulinsekretion. Bei Zugabe der reinen Efaroxanenantiomere konnten nanomolare Konzentrationen des (+) Enantiomers die Insulinsekretion deutlich stimulieren, während das (-) Enantiomer selbst bei 100 μ M nur marginale Wirkung zeigte. Daraus leitete man ab, dass die α_2 -Adrenozeptor-antagonistische Wirkung alleine beim (+) Enantiomer liegt [51].
- Unter Inkubation mit 20mM Glukose und 250 μ M des Kaliumkanal öffnenden Wirkstoffs Diazoxid hingegen zeigte sich, dass die inhibierende Wirkung von Diazoxid auf die Insulinsekretion wesentlich stärker durch das (-) Enantiomer aufgehoben wurde. Die unterschiedliche Wirkung der Enantiomeren war unter diesen Bedingungen etwa ab 25-50 μ M deutlich sichtbar. Fazit: Efaroxan wirkt nur in Form seines (-) Enantiomers auf den Kaliumkanal [51].
- Auch unter basalen Bedingungen (6mM Glukose, keine pharmakologischen Hemmer der Insulinsekretion) war das (-) Enantiomer deutlich wirksamer. Schon 1 μ M des (-) Efaroxans steigerte die Insulinsekretion der isolierten Inseln stark, während selbst 100 μ M (+) Efaroxan fast völlig wirkungslos waren [51].

Brown et al., ebenso Chan et al. kamen zum Schluss, dass die Stimulation der Insulinsekretion nicht alleine durch das Andocken von Efaroxan an Insel- α_2 -Adrenozeptoren ausgelöst wird [38, 49, 52]. Die 1993 publizierte Studie von Chan et al. wies in Anbetracht der bereits gesammelten Daten darauf hin, dass der Effekt von Efaroxan auf dessen Interaktion mit zwei verschiedenen Bindungsstellen zurückzuführen ist. Die Autoren folgerten eine Bindungsstelle sei ein α_2 -Adrenozeptor mit Selektivität für das (+) Enantiomer, die andere sei selektiv für das (-) Enantiomer, jedoch mit geringerer Affinität und sei für die Stimulation der Insulinsekretion zumindest zu einem wesentlichen Teil verantwortlich [51]. Diese Schlussfolgerungen wurden von der gleichen Arbeitsgruppe auch durch Experimente an lebenden Ratten untermauert, für die eine ähnliche Steigerung des Plasmainsulins durch 3,5mg/kg (+) und (-) Enantiomer berichtet wurden [47].

Taylor et al. beschäftigten sich ebenso mit der Wirkungsweise des Efaroxanracemats und seiner Enantiomere. In ihrer Studie wurde das monomere G-Protein Rhes (Ras Homologue Expressed in Striatum) untersucht, das in β -Zellen exprimiert wird, möglicherweise durch Efaroxan reguliert wird und einen Einfluss auf die Insulinsekretion haben dürfte [53, 54, 55]. 2004 kamen Taylor et al. bereits zum Schluss, dass Imidazoline, wie beispielsweise Efaroxan, die Expression von Rhes erhöhen. Anhand der 2004 gewonnenen Ergebnisse wurde darauf hingewiesen, dass dieser Vorgang von Kalzium gesteuert und unabhängig von der Insulinexozytose kontrolliert wird [56]. Im Rahmen der Studie von Taylor et al. aus 2006 wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

- RINm5F-Zellen (Ratteninsulinom-Zelllinie) wurden mit Efaroxanracemat in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Der Rhes-mRNA-Gehalt stieg dosisabhängig an und erreichte seinen Maximalwert bei einer Konzentration von 1 μ M Efaroxan [53].
- Die Wirkungen der reinen Efaroxanenantiomere wurden ebenfalls analysiert. Je 1 μ M des (-) Enantiomers und (+) Enantiomers ließ man auf RINm5F einwirken mit dem Ergebnis, dass das (-) Enantiomer einen starken Anstieg des Rhes-

mRNA-Gehalts bewirken konnte. Die verzeichnete Wirkung des (-) Efaroxans erreichte nach 4stündiger Inkubation ihren Höhepunkt, danach sank der Rhes-mRNA-Gehalt wieder ab. Das (+) Enantiomer hatte nur sehr geringe Wirkung [53]

- Um den Beweis zu erbringen, dass das (-) Enantiomer nicht nur auf die klonierte Zelllinie RINm5F wirkt, wurden Ratteninseln mit 1 μ M Efaroxan (-) Enantiomer behandelt. Auch hier konnte ein Anstieg des Rhes-mRNA-Gehalts beobachtet werden [53]. In diesem experimentellen Setting gelang also ein weiterer Nachweis, dass das (-) Efaroxan starke Wirkungen auf β -Zellen hat, obwohl dieses Enantiomer den α_2 -Adrenozeptor nicht anspricht.

Berdeu et al. untersuchten im Rahmen von Perfusionen von Rattenpankrea den Effekt von Imidazolinen auf die Insulinsekretion in vitro. Dabei konnte eine die Insulinsekretion stimulierende Wirkung von Efaroxan nachgewiesen werden, wohingegen Idazoxan, ebenfalls ein α_2 -adrenerger Rezeptorantagonist, keinen Einfluss auf die Insulinsekretion hatte. Erstaunlicherweise konnten alle Imidazoline in Blutgefäßen des Pankreas eine Vasokonstriktion auslösen. Die Befunde wurden letztendlich dahingehend interpretiert, dass die Efaroxan-induzierte Insulinfreisetzung nicht durch eine Blockade der α_2 - oder α_1 - Adrenozeptoren alleine erklärt werden kann [57].

2009 wurde von Hatlapatka et al. eine weitere Perifusionsstudie durchgeführt, die u.a. die Erforschung der Effekte von anderen Nährstoffen, die wie Glukose zur ATP-Produktion genutzt werden, sowie Nichtnährstoffstimuli auf die Insulinsekretion in Kombination mit Efaroxan zum Ziel hatte. Dabei zeigte sich, dass Efaroxan die Wirkung des Nährstoffes Ketoisocapronsäure (KIC), wie jene von Glukose, verstärkte, während die depolarisierende Wirkung von KCl nicht beeinflusst wurde. Weiters wurde nachgewiesen, dass Efaroxan, wie auch andere α_2 -Antagonisten, in dieser Versuchsanordnung unter keinerlei Bedingungen Wirkung auf Inseln von SUR1-Knockout-Mäusen hat. Nachdem SUR1 Bestandteil des K_{ATP} -Kanals ist, untermauerten diese Ergebnisse die Ansicht, dass die Wirkung von Efaroxan auf die Insulinsekretion weitgehend auf Effekte am K_{ATP} -Kanal zu erklären ist [58].

2008 wurden erneut Forschungen angestrengt, um an lebenden Mäusen die Frage der Efaroxanwirkung gänzlich zu klären. Fagerholm et al. gingen der Frage nach, ob die Wirkung von Efaroxan tatsächlich auf einen Antagonismus des α_2 -Adrenozeptors der β -Zellen beruht oder doch unabhängig vom α_2 -Adrenozeptor, beispielsweise über die Inhibition der K_{ATP} -Kanäle, eintritt. Zu diesem Zweck wurden die Effekte von Efaroxan und eines nicht-Imidazolin α_2 -Adrenozeptor-Antagonisten auf den Blutglukose- sowie den Insulinspiegel in vivo von α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout-Mäusen untersucht, denen C57BL/6J Kontrollmäuse (wild type) gegenübergestellt wurden. Das Studiendesign war so angelegt, dass den jeweiligen Mäusen die zu untersuchenden Substanzen einmal im gefasteten und dann im gefütterten Zustand verabreicht wurden. Die Blutproben zur Bestimmung von Glukose und Insulin wurden den Mäusen durch Punktion des Schwanzes abgenommen. Unter allen Bedingungen war Efaroxan in Mäusen ohne α_{2A} -Adrenozeptoren wirkungslos. Diese Resultate widersprachen der Hypothese, wonach das Imidazolin Efaroxan unabhängig vom α_2 -Adrenozeptor eine Erhöhung der Insulinsekretion und Senkung der Blutglukose bewirken kann. Weiters wurde spekuliert, dass Efaroxan die K_{ATP} -Kanäle wahrscheinlich lediglich in vitro und in hohen Konzentrationen inhibiert. Stichhaltige Beweise, wonach Efaroxan die Insulinsekretion auch in vivo durch eine K_{ATP} -Kanal-Blockade fördert, konnten nicht gewonnen werden [59].

Es gibt also Evidenz für die Hypothese, dass die insulintrope Wirkung von Efaroxan sowohl vom α_2 -Adrenozeptor, als auch vom K_{ATP} -Kanal getragen wird.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1. Versuchstiere

Zur Präparation von Langerhans'schen Inseln für die Perifusion wurden C57BL/6J-Mäuse von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) oder der Abteilung für Labortierkunde und Labortiergenetik der Medizinischen Universität Wien (Himberg, Österreich) verwendet. Vor ihrer Verwendung wurden die Mäuse nicht gefastet, da der Gallengang für die Gewebsentnahme gefüllt sein sollte.

Der orale Glukosetoleranztest wurde an C57BL/6J-Mäusen von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden im Alter von 11 Wochen für den Versuch eingesetzt. Die Akklimatisierungszeit zwischen Lieferung und Versuchsbeginn betrug mindestens 14 Tage. 10 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere gewogen und nüchtern gesetzt. Wasser bekamen sie weiterhin ad libitum.

Die Sauerstoffmessung wurde an C57 BL/6J-Mäusen von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden im Alter von 12 Wochen für den Versuch eingesetzt. Die Akklimatisierungszeit vor Versuchsbeginn betrug mindestens 14 Tage. 10 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere gewogen und nüchtern gesetzt. Wasser bekamen sie weiterhin ad libitum.

3.2. Prinzip der Methode zur Perifusion der Langerhans'schen Inseln

Das Prinzip der Methode beruht auf der Umspülung von sich im Perifusionszylinder befindlichen isolierten Langerhans'schen Inseln mit unterschiedlichen Substanzkonzentrationen. Die Langerhans'schen Inseln werden isoliert, indem ein Nagerpankreas mit Collagenase angedaut wird. Bricht man diesen Prozess zum richtigen Zeitpunkt ab, so ist das exokrine Gewebe zerfallen, während die endokrinen Inseln erhalten bleiben. Letztendlich wird im Perifusionsmedium Insulin gemessen und so Insulinfreisetzungsraten bestimmt.

3.3. Reagenzien

3.3.1. Krebs-Ringer Lösung

Für die Perifusion wurde aus Stammlösungen Krebs-Ringer-Puffer (KRB) in unterschiedlichen Volumina zubereitet und anschließend im Tiefkühler bis zum Gebrauch eingefroren (Tab. M1).

Tab. M1: Herstellung von Krebs-Ringer-Puffer aus diversen Stammlösungen

<u>Volumen: 192ml</u>	
Lösung 1 (154mM NaCl): 18,0g NaCl in 2 Liter Aqua bidest gelöst	150ml
Lösung 2 (154mM KCl): 5,75g KCl in 500ml Aqua bidest gelöst	6ml
Lösung 3 (110mM CaCl ₂ ·2 H ₂ O): 8,10g CaCl ₂ ·2 H ₂ O in 500ml Aqua bidest gelöst	4,5ml
Lösung 4 (154mM KH ₂ PO ₄): 5,275g KH ₂ PO ₄ in 250ml Aqua bidest gelöst.	1,5ml
Lösung 5 (154mM MgSO ₄ ·7 H ₂ O): 9,55g MgSO ₄ ·7 H ₂ O in 250ml Aqua bidest gelöst	1,5ml
Lösung 6 (154mM NaHCO ₃): 13,0g NaHCO ₃ in 1 Liter Aqua bidest gelöst	25,5ml
Aqua bidest	3ml

Dem KRB wurde desweiteren eine Hepes-NaOH-Lösung zugesetzt (3ml/192ml KRB; Herstellung siehe unten). Nach der Zugabe von Hepes-NaOH wurde diese Lösung mit 95%O₂:5%CO₂ begast. Nach 20 Minuten Begasungszeit wurden 0,2% oder 0,25% Bovines Serum Albumin (390mg/192ml bzw. 487,5mg/192ml KRB; BSA, Fraction V, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zugefügt. Anschließend wurde das Gemisch am Magnetrührer so lange gerührt, bis das BSA in Lösung gegangen ist. Danach wurde der pH-Wert der Lösung gemessen und gegebenenfalls mit HCl bzw. NaOH korrigiert. Dies war nötig, um einen physiologischen pH-Wert zwischen 7,35 und 7,40 zu gewährleisten.

3.3.2. Hepes-NaOH-Stammlösung

Um die Hepes-NaOH-Stammlösung herzustellen, wurden 38,7g Hepes (Hepes, Sigma, St. Louis, MO, USA) in 125ml Aqua bidest gelöst, anschließend 77ml einer 1 N NaOH zugesetzt und die Lösung aliquotiert.

3.3.3. Collagenase

Die benötigte Menge an Collagenase (Collagenase NB 8 Broad Range, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) für eine Maus betrug 3mg. Die Collagenase wurde in Eppendorfgefäßen eingewogen, verschlossen und trocken im Kühlschrank bis zum Gebrauch gelagert. Vor dem Gebrauch wurde die Collagenase in KRB+Hepes-NaOH+BSA gelöst (1mg/ml) und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

3.3.4. 5mM Glukoselösung („Pickmedium“)

Zum händischen Sammeln der Inseln (= „Picken“) wurde eine 5mM Glukoselösung benötigt. Dazu wurden 43,2mg Glukose in 48ml KRB+Hepes-NaOH+BSA (pH zwischen 7,35 und 7,40) gelöst und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

3.3.5. Testsubstanzen

Die jeweiligen Testsubstanzen wurden je nach Versuchsprotokoll in DMSO oder KRB+Hepes-NaOH+BSA gelöst, um deren Wirkung auf die Insulinfreisetzung zu analysieren.

- **Glukose** (D(+)-Glukose, MERCK, Darmstadt, Deutschland); in KRB+Hepes-NaOH+BSA gelöst
- **KCl** (Kaliumchlorid, MERCK, Darmstadt, Deutschland); in KRB+Hepes-NaOH+BSA gelöst

- **KIC** (4-Methyl-2-oxopentanoic acid, sodium salt, 98%, SAFCTM, St. Louis, USA); in KRB+Hepes-NaOH+BSA gelöst
- **L-Glutamin** ((S)-2,5-Diamino-5-oxopentanoic acid, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland); in KRB+Hepes-NaOH+BSA gelöst
- **Tolbutamid** (Tolbutamide, SIGMA, Aldrich Co., St. Louis, USA); in KRB+Hepes-NaOH+BSA gelöst
- **Progesteron** (Progesterone, SIGMA, Aldrich Co., St. Louis, USA); in DMSO gelöst
- **Efaroxan** (Efaroxanhydrochloride, SIGMA, Aldrich Co., St. Louis, USA; bzw. gereinigte Enantiomere in Form der freien Säure; Enantiomeren gereinigt und bereitgestellt vom Chemielabor der Firma 55pharma Drug Discovery & Development AG, Wien/Tulln); in KRB+Hepes-NaOH+BSA gelöst

3.4. Versuchsvorbereitung



Abb. M1: Anordnung der Perifusionsmedien im Wasserbad.

Das Wasserbad für die Perifusion wurde auf 37°C geheizt. Die Medien für die Perifusion wurden dem gegebenen Versuchsprotokoll entsprechend in Flaschen aufgeteilt und ins 37°C warme Wasserbad gestellt. Die Atmosphäre über den Medien wurde erneut mit 95%O₂:5%CO₂ begast (Abb. M1).

Die eigens aus Plexiglas angefertigten Perifusionszylinder, also jene Kammern, in denen die Langerhans'schen Inseln platziert wurden, wurden mit Dichtungsringen (Swinnex-Gasket, Millipore, Irland) ausgelegt, dazwischen ein Membran-Rundfilterfilter (Millipore, MFTM-Membran-Filter, Filter-Typ: 0,5µm SMWP, Irland) mit einer Pinzette eingelegt und schließlich vorsichtig verschlossen. Die Perifusionszylinder wurden mit Hilfe von Muffe und Klemme an Stativen hinter dem Wasserbad befestigt. Das Medium für die Equilibrationsphase, also die erste Phase der Perifusion, wurde mit 5ml Spritzen luftblasenfrei aufgezogen und in die Schläuche gespritzt, die zu den Perifusionszylindern führten. Die Perifusionszylinder wurden so mit Equilibrationsmedium aufgefüllt und kurz geschüttelt, um mögliche Luftblasen aus den Zylindern zu entlassen. Die 5ml Spritzen mit den Schläuchen wurden über den Kammern befestigt.

3.5. Gewebeentnahme



Abb. M2: Vorbereitung der benötigten Utensilien für die Gewebeentnahme.

Zunächst wurden die benötigten Instrumente gereinigt und eine Korkplatte (etwa 15x15cm) mit Zellstoff bespannt. Die bespannte Korkplatte wurde vor das Mikroskop (Mikroskop, SCHNEIDER OPTISCHE GERÄTE, Frauenhofen, Österreich) mit Kaltlichtlampe (Kaltlichtlampe, OLYMPUS, TL2, Japan) gelegt (Abb. M2).



Für zwei Perifusionszylinder wurden die Inseln von einer Maus verwendet. Die Versuchstiere wurden einzeln mit einer Überdosis Sevofluran Narkoselösung (Inhalationsnarkotikum, Sevofluran, Sevorane®, ABBOTT, Wien) in tiefe Narkose versetzt (Abb. M3).

Abb. M3: Narkotisierung des Versuchstiers.



Abb. M4: Tötung des Versuchstiers mittels zervikaler Dislokation.

Nach dem Aussetzen der Atmung wurden die Versuchstiere auf Zellstoff gelegt und eine zervikale Dislokation durchgeführt (Abb. M4). In der Zwischenzeit wurde eine Injektionsspritze (Einmalspritzen 2ml, Injekt®, BI Braun, Bad Arolsen, Deutschland) luftblasenfrei mit Collagenase-Lösung aufgezogen und auf Eis gelegt.

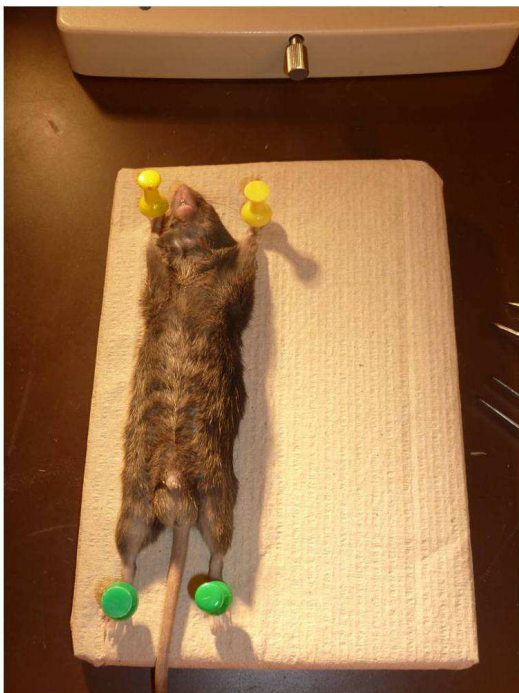


Abb. M5: Fixieren des Versuchstiers auf der mit Zellstoff bespannten Korkplatte.

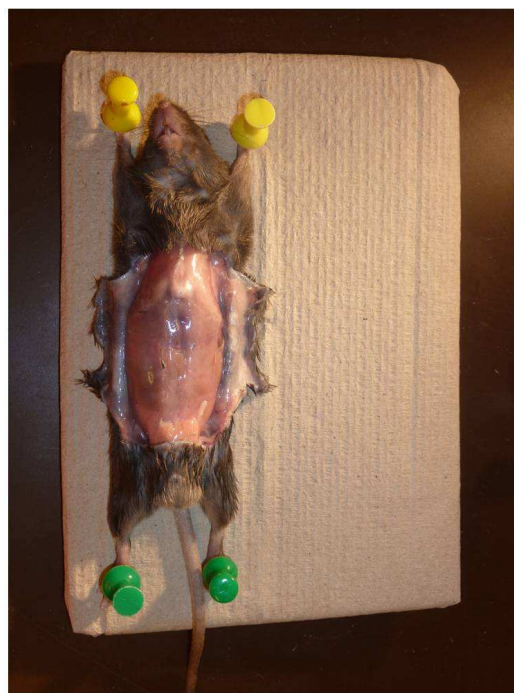


Abb. M6: Häutung des Versuchstiers mittels Doppel-T-Schnitt.



Abb. M7: Öffnung des Abdomen mittels Doppel-T-Schnitt.

Die toten Mäuse wurden auf der bespannten Korkplatte zur besseren Dehnung des Gallengangs festgepinnt und das Fell mit Ethanol besprüht (Abb. M5). Das Abdomen wurde mit einem Doppel-T-Schnitt geöffnet (Abb. M6 und M7). Das Versuchstier wurde unter dem Mikroskop mit dem Kopf zum Präparator gedreht, die Därme mit der stumpfen Pinzette nach links auf die Korkplatte geschoben und die Leberlappen kranial weggeklappt.

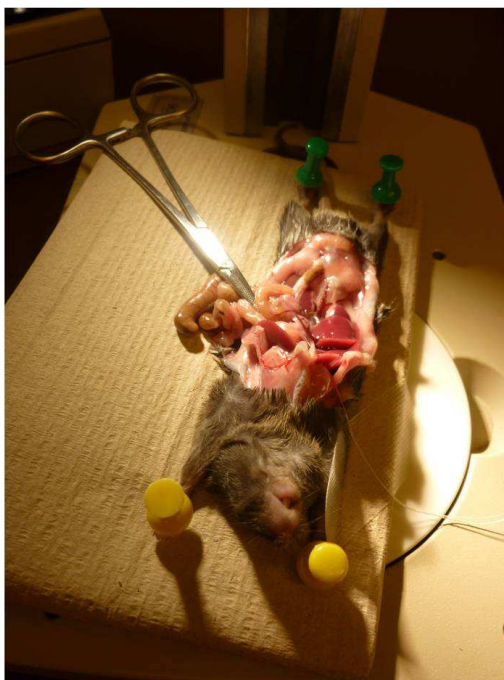


Abb. M8: Abklemmen der Papilla Vateri, um das Einfließen der Collagenasolösung in den Dünndarm zu verhindern.

Anschließend wurde die Papilla Vateri (Einmündung des Gallengangs in den Darm) mit einer feinen Klemme abgeklammt, damit die Collagenasolösung bei der Injektion nicht in den Darm fließen konnte (Abb. M8). Darauf folgte die Freilegung des Gallenganges. Dazu wurde mit Hilfe einer stumpfen Pinzette der Gallengang angehoben und mit einem Zwirn unterlegt, um den Gallengang darmseitig mit einem Knoten abzubinden. Anschließend wurde der Gallengang mit einer spitzen Pinzette von anhaftendem Bindegewebe befreit. Der Zwirn wurde schließlich auf der Korkplatte mit einem Klebestreifen straff befestigt (Abb. M8).

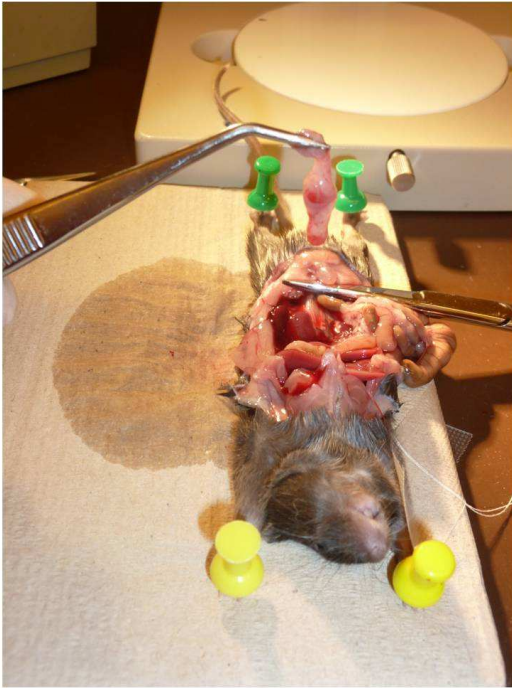


Abb. M9: Entnahme der mit Collagenase aufgeblähten Pankreas.

Der Gallengang wurde mit dem Schenkel einer stumpfen Pinzette unterlegt, dann die Collagenase-Spritze angesetzt und vorsichtig in der Nähe der Leber in den Gallengang eingestochen (Kanülen: 0,3mmx13mm, BD Microlance™ 3, Drogheda, Irland) und die Collagenaselösung langsam eingespritzt. Durch das große Volumen wurde das Pankreasgewebe distendiert und aufgebläht. Anschließend wurde das aufgeblähte Pankreas mit Hilfe einer scharfen Schere herauspräpariert (Abb. M9), mit der Pinzette in ein 10ml Röhrchen transferiert und auf Eis gestellt.

3.6. Inselgewinnung

Das im Röhrchen enthaltene Pankreas wurde zur Verdauung für 13 Minuten in einen Eprovettenständer in das auf 37°C erhitzte Wasserbad gestellt. Nach 13 Minuten wurde das Röhrchen aus dem Wasserbad geholt und noch 30 Sekunden zur mechanischen Aufspaltung kräftig geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt der Verdauung war das exokrine Gewebe lysiert, die Suspension enthielt jedoch zahlreiche, von exokrinem Gewebe befreite Inseln.

Nach dem Schütteln wurde das Röhrchen mit dem auf 4°C vorgekühlten KRB+Hepes-NaOH+BSA zur Gänze aufgefüllt um die lysierende Wirkung der Collagenase zu stoppen und zentrifugiert (15sec, 4°C, 1150rpm) (Zentrifuge, Beckman Coulter, Allegra X-12R Centrifuge, Fullerton, Kalifornien). Der Überstand wurde dekantiert, das Röhrchen erneut zur Gänze mit KRB+Hepes-NaOH+BSA aufgefüllt, aufgeschüttelt und zentrifugiert (15sec, 4°C, 1150rpm). Auf diese Weise wurde die Collagenase aus dem Gewebe gewaschen. Der Überstand wurde wiederum dekantiert, diesmal jedoch mit KRB+Hepes-NaOH+BSA, der 5mM Glukose enthielt, aufgefüllt und aufgeschüttelt, um

erneut die verdauten Gewebereste in Suspension zu bringen. Dabei wurden die Röhrchen zur Beibehaltung der Temperatur von 4°C auf Eis gestellt.

3.7. „Picken“ der Inseln

Die verdauten Pankreata in den Röhrchen wurden in zwei geschwärzte Petrischalen (schwarzer Hintergrund zur besseren Erkennung der weißen Inseln) aufgeteilt und nach Bedarf mit glukoseversetztem KRB+Hepes-NaOH+BSA aufgefüllt. Eine Petrischale wurde unter das Mikroskop gestellt, die zweite Petrischale wurde in der Zwischenzeit auf Eis gestellt. Die Inseln wurden mit Hilfe einer 100µl Kolbenhubpipette vorsichtig aufgesaugt (= „Picken“) und in einer dritten Petrischale mit glukoseversetztem KRB+Hepes-NaOH+BSA auf Eis gestellt. Bei diesem Vorgang wurden möglichst intakte Inseln ohne andere anhaftende Gewebereste ausgewählt.

3.8. Laden der Perifusionszylinder

Zum Laden der Perifusionszylinder wurden jeweils 50 Inseln mit der 100µl Kolbenhubpipette gesammelt und langsam in die Perifusionszylinder eingebracht, wo sie sich am Filter absetzen konnten. Dieser Vorgang sollte so schnell als möglich abgeschlossen werden.

Nachdem alle Perifusionszylinder mit jeweils 50 Inseln befüllt waren, wurden sie an das Perifusionssystem angeschlossen und die Pumpe gestartet (1ml/min, peristaltische Pumpe, Model ISM 852, ISMATEC SA, Glattbrugg, Schweiz).

3.9. Equilibrationsphase

Am Beginn der Perifusion stand in jedem der Versuchsprotokolle eine 60minütige Equilibrationsphase. In dieser Phase wurden die Inseln mit Equilibrationsmedium (KRB + Hepes-NaOH + BSA + 5mM Glukose) bei einer Durchflussrate von 1ml/min umspült. Bei Minute 40, 50 und 60 wurden laut Protokoll die ersten Proben genommen, d.h. es

wurde über jeweils eine Minute eine Probe des Effluens zur späteren Insulinmessung gesammelt.

3.10. Stimulationsphase

Die an die Equilibrationsphase anschließende Stimulationsphase startete ab Minute 60 und gliederte sich in mehrere Phasen, in denen unterschiedliche Stimuli bzw. Kombinationen von Stimuli für die Insulinfreisetzung gesetzt wurden. Die Zeitphasen der Stimulationen und die Zeitpunkte der Probenentnahmen waren in verschiedenen Protokollen unterschiedlich und sind im Kapitel „Ergebnisse und Diskussion“ dieser Arbeit dargestellt.

3.11. Analytik

Die gesammelten Proben wurden bis zur Insulinmessung verschlossen und im Tierkühler bei -20°C gelagert. Für die Probenauswertung wurde ein Radioimmunassay für Ratteninsulin verwendet (Sensitive Rat Insulin RIA Kit, MILIPORE CORPORATION, Billerica, USA), der auf Grund seiner 100% Kreuzreaktion auch für Mäuseinsulin geeignet ist. Bei dieser Methode, die nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt wurde, wird eine festgelegte Konzentration an radioaktiv markiertem Antigen (^{125}I -markiertes Insulin) mit einer konstanten Verdünnung von Antikörpern (Ratteninsulin-Antikörper) inkubiert. Zu diesem Gemisch wurden 100µl der jeweiligen Probe, die eine unbekannte Konzentration an unmarkiertem Antigen (= Insulin) enthielt, hinzugefügt. Dadurch binden sowohl das radioaktiv markierte Antigen, als auch das unmarkierte Antigen der Probe kompetitiv an den Antikörperbindungsstellen, d.h. es bildet sich ein Antigen-Antikörperkomplex.

Das Verhältnis von radioaktiv markiertem antikörpergebundenem Antigen ist indirekt proportional der Insulinkonzentration in der Probe, d.h. die Menge an radioaktiv markiertem antikörpergebundenem Antigen sinkt durch Anstieg der Konzentration an unmarkiertem antikörpergebundenem Antigen. Mit Hilfe eines zweiten Antikörpers

(=Fällungsreagens) und einer Zentrifugation wurde schließlich antikörpergebundenes Antigen von freiem Antigen getrennt. Anschließend wurde in einem Gamma-Counter die Strahlungsintensität der Antigen-Antikörperkomplexe in ng/ml gemessen. Zur Berechnung der Insulinsekretionsrate wurde das Ergebnis von ng/ml in pg/min/Insel umgerechnet.

$$\text{ng/ml} \times 1000 = \text{pg/min}$$

$$\text{pg/min} : 50 = \text{pg/min/Insel}$$

1000..... Umrechnung in pg

50..... 50 Inseln/Perifusionszylinder

3.12. Oraler Glukosetoleranztest

Die Versuchstiere wurden nach dem Körpergewicht vergleichbaren Gruppen zugeteilt (= „gematcht“). Zur Unterscheidung der Versuchstiere in einem Käfig wurden die Schwänze mit Markern unterschiedlicher Farbe markiert.

Zunächst wurde die Blutglukose bestimmt. Dazu wurde den Versuchstieren mit einer Injektionskanüle die Schwanzspitze punktiert und ein Blutstropfen abgepresst. Der Blutstropfen wurde mit einem Teststreifen (Ultra Teststreifen, ONETOUGH®, LifeScan, Milpitas, CA USA) des Blutglukosemessgeräts (Blutglukose-Messgerät, Ultra Easy™, ONETOUGH®, LifeScan, Milpitas, CA USA) aufgenommen und die Blutglukose bestimmt. Alle Blutglukosewerte wurden in Duplikaten bestimmt und deren Mittelwert gebildet.

Anschließend wurden 0,1mg/kg Racemat, (+) Enantiomer, oder (-) Enantiomer von Efaroxan, oder eine reine Vehikellösung (0,5% Carboxymethylcellulose (CMC), SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland) in einem Volumen von 5µl/g Körpergewicht den Versuchstieren mit Hilfe einer Schlundsonde oral verabreicht (= Zeitpunkt -45 Minuten).

Nach 45 Minuten, also zum Zeitpunkt 0 Minuten, wurde ein weiteres Mal die Blutglukose bestimmt. Im Anschluss daran wurde den Versuchstieren 3g/kg Körpergewicht Glukose als wässrige Lösung im Volumen von 6µl/g Körpergewicht gavagiert.

Von diesem Zeitpunkt an wurde die Blutglukose in 30-Minuten-Abständen gemessen, also zu den Zeitpunkten 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten.

3.13. Sauerstoffmessung

Wie beim oralen Glukosetoleranztest wurden die Versuchstiere nach dem Körpergewicht vergleichbaren Gruppen zugeteilt (= „gematcht“). Zur Unterscheidung der Versuchstiere in einem Käfig wurden die Schwänze mit Markern unterschiedlicher Farbe markiert.

Zum Zeitpunkt 0 wurde den Versuchstieren in einem Volumen von 5µl/g Körpergewicht, 3mg/kg Racemat, (+) Enantiomer, oder (-) Enantiomer von Efaroxan, oder eine reine Vehikellösung (0,5% CMC), gavagiert. Nach 75 Minuten wurden 30µl Blut in einer Heparin-beschichteten Glaskapillare (Clinitubes, D957G-70-35, 35µl, Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dänemark) gesammelt, wobei das Blut von zwei Tieren gepoolt wurde. Anschließend wurde mit Hilfe eines Blutgasmessgerätes (OSM3 Hemoximeter, Radiometer Copenhagen, Dänemark) die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins (HbO₂SAT) der Blutprobe gemessen.

3.14. Statistik

Die Ergebnisse wurden mittels explorativer Datenanalyse und deskriptiver Statistik ausgewertet.

Der Einfluss der jeweiligen getesteten Substanzen auf die Insulinfreisetzungsrate wurde ungepaart analysiert, ebenso die Wirkung der Substanzen auf Blutglukosekonzentration oder Sauerstoffsättigung.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes. Um die Mittelwerte einzelner Messreihen zu vergleichen, wurde der zweiseitige ungepaarte Student's t-Test eingesetzt.

Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Evaluierung des Perifusionssystems

4.1.1. Glukose Dosis-Wirkungs-Kurve

Im ersten Experiment wurde die Sekretionsantwort der isolierten Mäusepankreasinseln auf einen Glukosestimulus untersucht. Glukose wird als der „klassische“ Stimulus für die Insulinsekretion betrachtet und bewirkt die Sekretionsantwort über eine Steigerung des intrazellulären ATP, Schluss von K_{ATP} -Kanälen, Depolarisation der β -Zelle und Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} (siehe „Literaturübersicht“, Unterkapitel „Insulinausschüttung“). Das experimentelle Protokoll ist in Tab. ED1 schematisch dargestellt.

Tab. ED1: Protokoll der Perifusion zum Vergleich der Wirkung verschiedener Glukosestimuli (0,25% BSA, 0,1% DMSO).

	Kammer 1 Glukose	Kammer 2 Glukose	Kammer 3 Glukose
Equilibrationsphase (0-60min)	5mM	5mM	5mM
Stimulationsphase (60-130min)	10mM	17,5mM	30mM

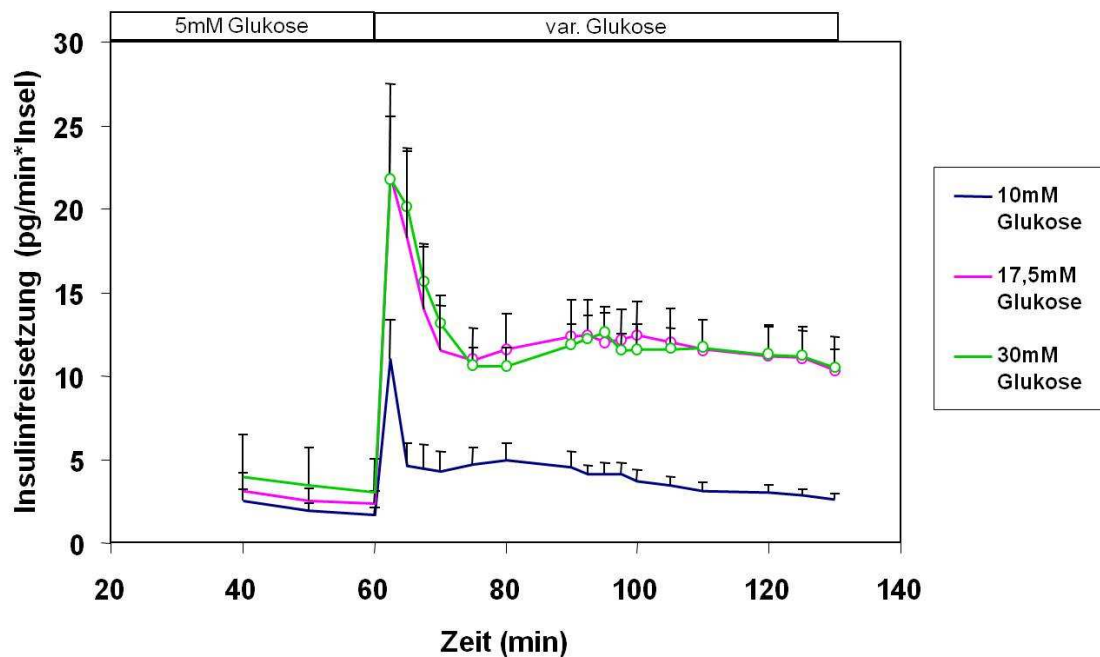


Abb. ED1: Einfluss von Stimulation mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (10mM, 17,5mM, 30mM) auf die Insulinfreisetzung isolierter perifundierter Mäusepankreasinseln. Mittelwert $\pm$ SEM, $n=5$, $\circ p<0,05$ gegen 10mM Glukose

Nach 60 Minuten Perifusion mit einer nicht-stimulierenden Glukosekonzentration von 5mM führte ein Anheben der Glukosekonzentration binnen 2,5 Minuten zu einem starken Anstieg der Insulinfreisetzungsrates. Diese fiel dann rasch wieder ab und stabilisierte sich auf einem „Plateau“, das – in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration – mehr oder weniger weit über der basalen Sekretionsrate lag. Dies entspricht der vielfach beschriebenen Kurvenform mit einer ersten Phase (schneller, hoher Peak) und einer zweiten Phase, für die bei Mäuseinseln eine relativ konstante Sekretionsrate („Plateau“) typisch ist [61]. Die Kurvenform (auch „Sekretionskinetik“) entsprach somit den Beschreibungen ähnlicher Versuchsanordnungen.

Der dosisabhängige Einfluss unterschiedlicher Glukosekonzentrationen auf die Insulinfreisetzung wurde auch untersucht, um das Perifusionssystem zu evaluieren und die Glukosekonzentration ausfindig zu machen, die unter diesen experimentellen

Bedingungen einen maximalen Stimulationseffekt der Insulinsekretion bewirkt. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen (5mM Glukose in der Equilibrationsphase; variable Glukosekonzentrationen in der Stimulationsphase) erzielten 30mM Glukose ab Minute 60 eine signifikant stärkere Steigerung der Insulinfreisetzungsrates als 10mM Glukose. Einem Peakwert bei Minute 62,5 (T 62,5: 30mM Glukose $21,85 \pm 3,7$ pg Insulin/min*Insel vs. 10mM Glukose $11,03 \pm 2,31$ pg Insulin/min*Insel, $p < 0,05$) folgte ein Absinken der Insulinfreisetzungsrates, wobei diese im Vergleich zu 10mM Glukose weiterhin auf einem signifikant höheren Niveau lag. 17,5mM Glukose erzielten erst ab Minute 75 signifikante Werte gegenüber 10mM Glukose, der Kurvenverlauf war jedoch ähnlich wie unter Stimulation mit 30mM Glukose. Die Insulinsekretion war im weiteren Verlauf bis zum Ende der Perfusion auch unter 17,5mM Glukose signifikant höher als unter 10mM Glukose (Abb. ED1).

4.1.2. KCl

Der Versuch mit Kaliumchlorid (KCl) diente dazu, die experimentelle Methode auch mit Hilfe eines nicht-nutritiven Stimulus zu etablieren und zu evaluieren. Nach der Beschreibung des Effekts des klassischen nutritiven Stimulus Glukose wurde die Sekretionsantwort auf eine hohe Konzentration von KCl untersucht. Das experimentelle Protokoll ist in Tab. ED2 schematisch dargestellt.

Tab. ED2: Protokoll der Perfusion zur Wirkung von KCl (0,2% BSA, 0,1% DMSO).

	Glukose	KCl
Equilibrationsphase (0-90min)	5mM	---
Stimulationsphase (90-130min)	5mM	40mM

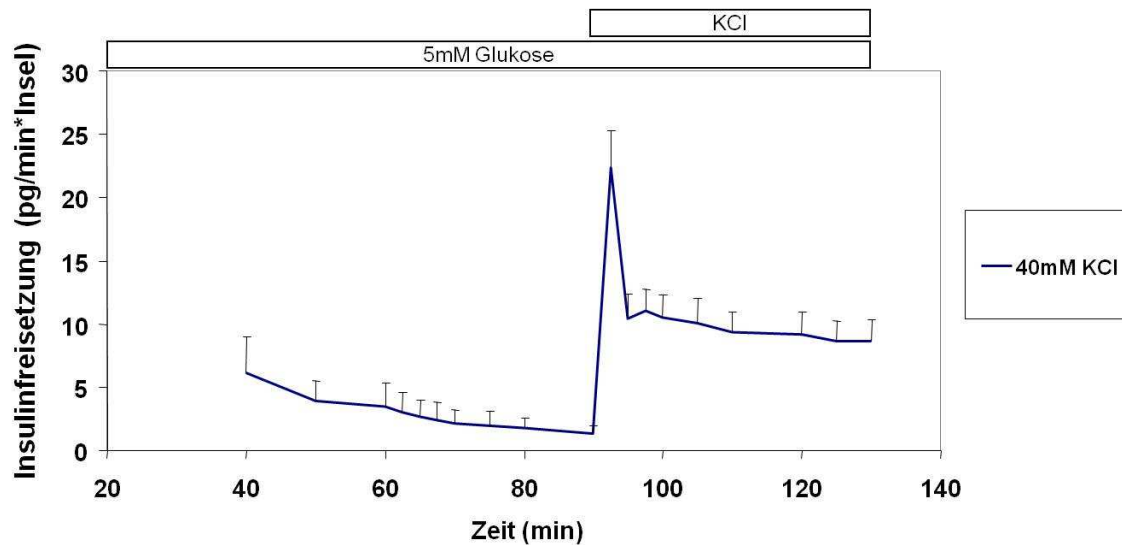


Abb. ED2: Einfluss von 40mM KCl auf die Insulinfreisetzung isolierter perfundierter Mäusepankreasinseln bei nicht stimulierender Glukosekonzentration (5mM).

Mittelwert $\pm$ SEM, n=4

Laut einer im Jahr 2006 von Henquin et al publizierten Studie ist KCl in der Lage, die Insulinsekretion von humanen Inseln durch Depolarisation zu beeinflussen und unabhängig vom Öffnungszustand der K_{ATP} -Kanäle zu wirken. Zu diesem Zweck wurden 30mM KCl in Kombination mit 100 μ mol/l des starken K_{ATP} -Kanal Öffners Diazoxid untersucht. Das Ergebnis war eindeutig: KCl konnte die Diazoxid-Wirkung aufheben und die Insulinsekretion steigern [9]. In Anbetracht dessen war es naheliegend, diese Erkenntnisse zur Überprüfung der Funktion unseres Perifusionssystems zu nutzen.

In unserem Versuchssetting wurde der Effekt von 40mM KCl bei einer konstanten Glukosekonzentration von 5mM beleuchtet. Ähnlich der Kurve von Henquin et al konnte auch bei uns eine Steigerung der Insulinsekretion bei Zugabe von 40mM KCl unter einer Glukosekonzentration von 5mM beobachtet werden. Einem Peakwert von $22,34 \pm 2,92$ pg Insulin/min*Insel bei Minute 92,5, also 2,5 Minuten nach Steigerung der KCl-Konzentration, folgte ein Absinken der Insulinfreisetzungsrates, wobei diese im weiteren Verlauf der Stimulation im Vergleich zur Abwesenheit von KCl auf einem konstanten, höheren Niveau blieb (Abb. ED2). Auch hier entsprach das Ergebnis also den von anderen beschriebenen Sekretionsmustern, das heißt dem typischen Muster

der Sekretionsantwort auf einen Stimulus mit schnellem ersten Peak und zweiter Phase [58].

4.1.3. KIC

Die Perfusion mit der Substanz Ketoisocapronsäure (KIC) hatte ebenso zum Ziel, die Methode zu etablieren und zu evaluieren. Das experimentelle Protokoll ist in Tab. ED3 schematisch dargestellt.

Tab. ED3: Protokoll der Perfusion zur Wirkung von Glutamin und KIC (0,2% BSA, 0,1% DMSO).

	Glutamin	KIC
Equilibrationsphase (0-90min)	1mM	1mM
Stimulationsphase (90-130min)	1mM	3mM

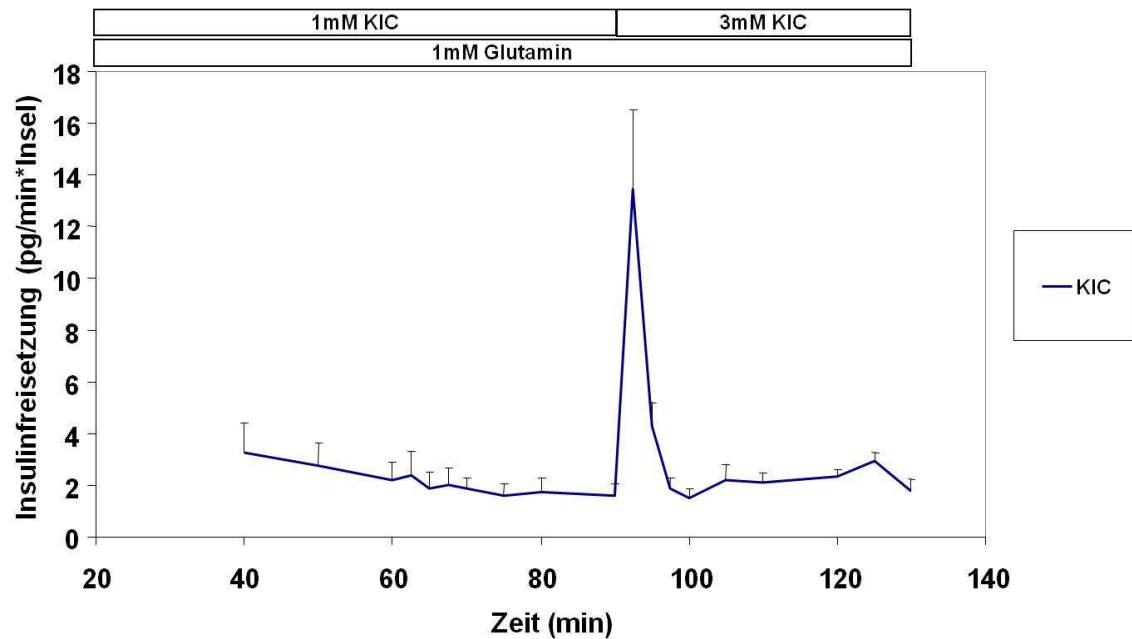


Abb. ED3: Einfluss von 1mM/3mM KIC auf die Insulinfreisetzung isolierter perfundierter Mäusepankreasinseln bei konstanter Glutaminkonzentration (1mM).

Mittelwert $\pm$ SEM, n=4

Vergleichsdaten für die Versuchsreihe stammen aus einer 2009 von Hatlapatka et al durchgeführten Studie, die eine Stimulation der Insulinsekretion durch KIC beschrieben hat. KIC ist wie Glukose ein nutritiver Stimulus, d.h. es wird von der Zelle metabolisiert [58].

In unserem Versuchsetting wurden die Inseln zunächst mit 1mM KIC und einer konstanten Glutaminkonzentration von 1mM perfundiert. Nach 90 Minuten wurde die KIC-Konzentration auf 3mM angehoben, was zu einem Anstieg der Insulinsekretionsrate führte. Einem Peakwert von $13,45 \pm 3,09$ pg Insulin/min*Insel bei Minute 92,5 folgte ein ebenso schnelles Absinken der Insulinfreisetzungsrates, die ab Minute 97,5 kaum höher lag als vor dem Anheben der KIC-Konzentration auf 3mM (Abb. ED3). Bei diesem Stimulus war also nur der erste schnelle Peak, aber nicht die zweite Phase der Sekretionsantwort, zu erkennen. Die gewonnenen Ergebnisse entsprachen somit weitgehend den Befunden von Hatlapatka et al [58]. Damit ist die Qualität meiner Perifusionsversuche für zwei nutritive (Glukose/KIC) und einen depolarisierenden Stimulus (KCl) durch Vergleich mit der Literatur belegt.

4.1.4. Tolbutamid, Efaroxan

Der vierte Versuch, der zur Methodenetablierung und –evaluierung durchgeführt wurde, beleuchtet den Einfluss von etablierten pharmakologischen Stimuli. Dabei wurden die Wirkungen von 50µM Tolbutamid und 250µM Efaroxan auf die Insulinsekretion getestet, da für solche Protokolle Vergleichsdaten aus der Literatur vorliegen. Der insulinsekretionsfördernde Effekt des Sulfonylharnstoffs Tolbutamid wurde bereits von Henquin et al belegt. Tolbutamid stimuliert die Insulinsekretion über den Schluss der K_{ATP} -Kanäle. Werden die K_{ATP} -Kanäle geschlossen, so wird eine Depolarisation der β -Zelle ausgelöst und in weiterer Folge die Exozytose von Insulin bewirkt [5, 7, 9]. Der Wirkmechanismus von Efaroxan ist hingegen noch nicht ganz geklärt (siehe Literaturüberblick „Insulinausschüttung“ und „Efaroxan“). Das experimentelle Protokoll ist in Tab. ED4 schematisch dargestellt.

Tab. ED4: Protokoll der Perifusion zur Wirkung von Tolbutamid und Efaroxan auf die Insulinsekretion (0,2% BSA, 0,1% DMSO).

	Glukose	Tolbutamid	Efaroxan
Equilibrationsphase (0-60min)	5mM	---	---
Stimulationsphase (60-90min)	5mM	50µM	250µM
Stimulationsphase (90-120min)	10mM	50µM	250µM
Stimulationsphase (120-130min)	10mM	---	---

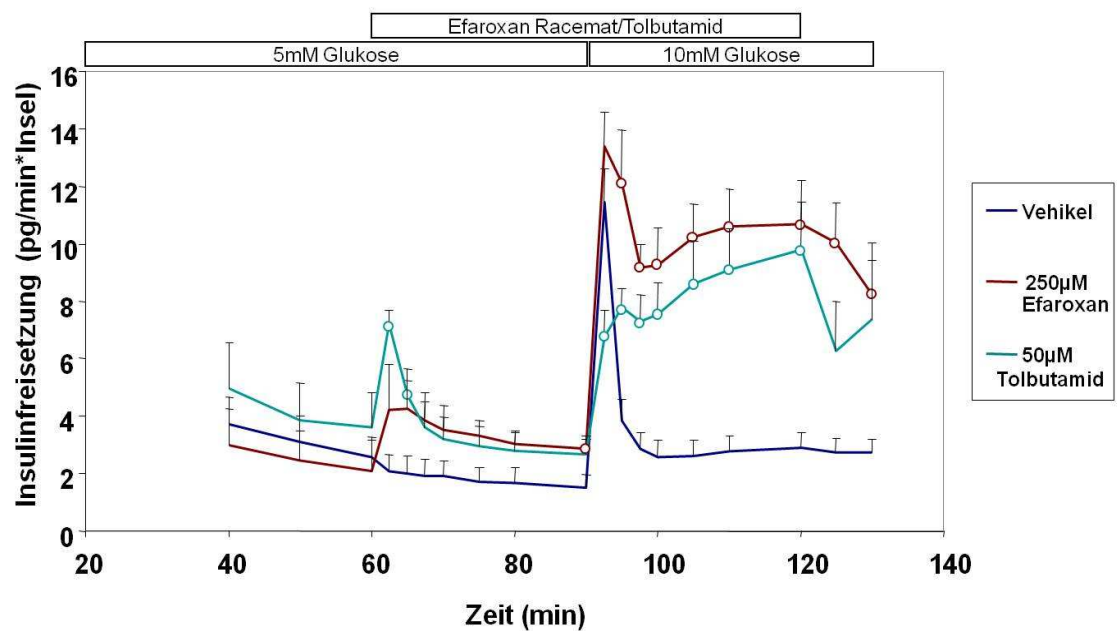


Abb. ED4: Einfluss von 50µM Tolbutamid und 250µM Efaroxan auf die Insulinfreisetzung isolierter perifundierter Mäusepankreasinseln. Tolbutamid und Efaroxan wurden bei basaler Glukosekonzentration (5mM) zugefügt und dann ein Glukosestimulus gesetzt. Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 5$, $p < 0,05$ gegen Vehikel

In unserem Versuchssetting wurde zuerst bei einer nicht-stimulierenden Glukosekonzentration von 5mM der Wirkstoff hinzugefügt, was bei beiden Substanzen sofort zu einer Sekretionsantwort führte. Tolbutamid bewirkte bei Minute 62,5 eine Peak der Insulinsekretionsrate (T 62,5: Tolbutamid $7,19 \pm 0,5$ pg Insulin/min*Insel vs. Vehikel $2,07 \pm 0,57$ pg Insulin/min*Insel, $p < 0,05$). Danach sank die Insulinsekretionsrate bei Minute 67,5 auf einen dem Wert bei Minute 60 ähnlichen Wert ab und blieb bis Minute 90 auf diesem Niveau. Dieser schnelle Peak wurde in einem ähnlichen Protokoll auch von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben [62]. 2,5 Minuten nach Steigerung der Glukosekonzentration auf 10mM war bei Minute 92,5 der Tolbutamid-induzierte Anstieg der Insulinsekretionsrate gegenüber der Vehikel-induzierten Insulinsekretionsrate geringer. Nach diesem schwachen ersten Peak war die zweite Phase der Sekretionsantwort auf den Glukosestimulus durch Tolbutamid allerdings deutlich erhöht, die Sekretionsrate erreichte den höchsten Wert bei Minute 120 (T 120: Tolbutamid $9,79 \pm 1,68$ pg Insulin/min*Insel vs. Vehikel $2,92 \pm 0,51$ pg Insulin/min*Insel, $p < 0,05$) (Abb. ED4).

Das Imidazolin Efaroxan steigerte in unserem Versuchsetting bei einer Konzentration von 250µM die Insulinfreisetzung noch deutlicher als Tolbutamid. Bei Minute 62,5 war im Vergleich zu Tolbutamid eine geringere schnelle Antwort der Insulinsekretion zu beobachten, jedoch stieg die Insulinsekretionsrate bei Minute 62,5 und 65 deutlich über den Wert von Minute 60 (T 62,5: Efaroxan $4,22 \pm 1,58$ pg Insulin/min*Insel, $p=0,005$; T 65: Efaroxan $4,26 \pm 0,10$ pg Insulin/min*Insel, $<0,05$). Danach stabilisierte sich die Sekretionsrate bis Minute 90 im Unterschied zu Tolbutamid auf einem erhöhten „Plateau“. Nach Anheben der Glukosekonzentration bei Minute 90 bewirkte Efaroxan einen schnellen Peak bei Minute 92,5, der ähnlich hoch ausfiel wie beim Vehikel. Dieser erste Peak war jedoch breiter als unter dem Vehikel, mit einem Wert von $12,11 \pm 1,84$ pg Insulin/min*Insel bei Minute 95. Dieser im Vergleich zum Vehikel signifikant erhöhte Wert sank bis Minute 97,5 auf $9,18 \pm 0,80$ pg Insulin/min*Insel ab. Es konnte sich im weiteren Verlauf unter dem Einfluss von 250µM Efaroxan jedoch eine besonders hohe zweite Phase etablieren, wie das im Versuchsetting von Rustenbeck et al ebenso beschrieben wurde [62] (Abb. ED4). Somit konnten unsere Ergebnisse zahlreiche Studienergebnisse bestätigen, die die insulinsekretionsfördernde Wirkung von Efaroxan bereits nachgewiesen haben.

Insgesamt wurde die Versuchsanordnung der Inselperifusion also neben dem „klassischen“ Stimulus Glukose mit Hilfe von einem nicht-nutritiven, einem nutritiven und zwei pharmakologischen Stimulatoren der Insulinsekretion evaluiert. Auf alle diese Reize zeigte sich eine Sekretionskinetik mit einem Muster, wie in der Literatur beschrieben. Das Setting durfte somit als erfolgreich etabliert und evaluiert angesehen werden.

4.2. Wirkung von Progesteron auf die Insulinsekretion

Im Rahmen des zweiten Teils meiner Arbeit habe ich mich mit einer möglichen akuten und direkten Wirkung des Hormons Progesteron auf die Insulinfreisetzung in vitro beschäftigt. Das experimentelle Protokoll zur Untersuchung der Wirkung von Progesteron ist in Tab. ED5 schematisch dargestellt.

Tab. ED5: Protokoll der Perfusion zur Untersuchung der Wirkung von Progesteron (0,25% BSA, 0,1% DMSO).

	Glukose	Progesteron
Equilibrationsphase (0-60min)	5mM	---
Stimulationsphase (60-130min)	30mM	30µM

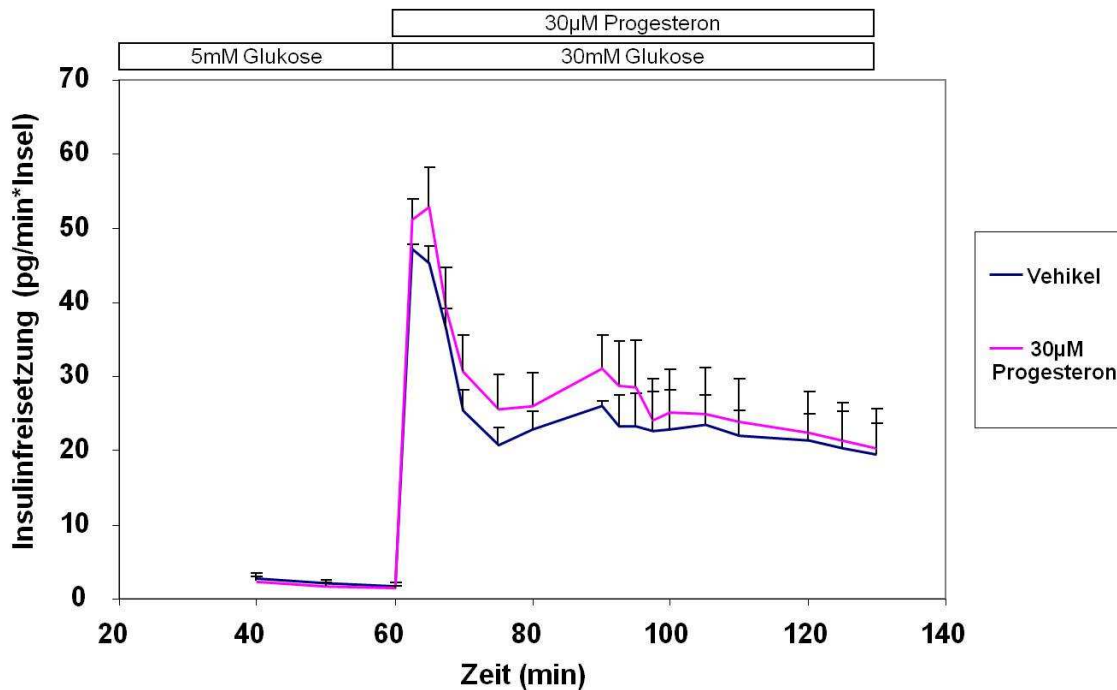


Abb. ED5: Einfluss von 30µM Progesteron auf die Insulinfreisetzung isolierter perfundierter Mäusepankreasinseln bei einem Glukosestimulus von 30mM.

Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 2$

Der Literatur zufolge soll Progesteron in einem vergleichbaren Experiment einen hemmenden Effekt auf die glukosestimulierte Insulinsekretion haben [34], was vor allem im Zusammenhang mit Gestationsdiabetes relevant sein könnte [23]. Die betreffende Arbeitsgruppe führte Perfusionen an Rattenpankreasinseln durch und kam zum Schluss, dass das Steroidhormon Progesteron eine konzentrationsabhängige und sehr ausgeprägte Verminderung der glukosestimulierten Insulinsekretion bewirkt [34].

In unserer Versuchsreihe wurden die Mäusepankreasinseln nach einer 60 minütigen Equilibrationsphase (5mM Glukose) in Ab- oder Anwesenheit von 30µM Progesteron mit einer Glukosekonzentration von 30mM stimuliert. Nach Minute 60 stieg die Insulinsekretionsrate im Vehikelversuch glukoseinduziert an und erreichte den höchsten Wert mit $52,77 \pm 5,35$ pg Insulin/min*Insel bei Minute 65. Die Insulinsekretionsrate sank ab Minute 65 bis Minute 75 auf einen Wert von $25,60 \pm 4,64$ pg Insulin/min*Insel ab. Wurde zugleich mit dem Glukosestimulus eine Progesteronkonzentration von 30µM zugesetzt, so hatte dies keinen Einfluss auf den

glukoseinduzierten Anstieg der Insulinsekretionsrate, die Kurve sah nicht anders aus, als im Kontrollversuch mit dem Vehikel. Auch in der späten Phase der Perifusion wurde die Insulinsekretion durch 30 μ M Progesteron nicht gehemmt (Abb. ED5).

Unsere Ergebnisse stehen somit im krassen Gegensatz zu jenen von Straub et al, die bereits bei einer wesentlich geringeren Progesteronkonzentration in einem sehr ähnlichen Versuchsprotokoll eine sehr ausgeprägte und signifikante Hemmung der Insulinfreisetzung beobachten konnten [34]. Eine potenzielle Ursache für diesen Mangel an Reproduzierbarkeit wäre möglicherweise die Verwendung von Inseln unterschiedlicher Spezies (Maus vs. Ratte). In unserem Labor durchgeführte Pilotversuche an Rattenpankreasinseln, die nicht Teil der vorliegenden Diplomarbeit sind, zeigten allerdings ebenso keinerlei hemmende Wirkung von Progesteron auf die Insulinsekretion. Die widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich kaum erklären, sofern man nicht von einem technischen Fehler an einem der beiden Laboratorien ausgeht.

4.3. Wirkungen gereinigter Efaroxanenantiomere

4.3.1. Wirkung auf die Insulinsekretion in vitro

Im dritten Teil meiner Arbeit habe ich die Wirkungen gereinigter Efaroxanenantiomere auf den Insulinspiegel untersucht. Das experimentelle Protokoll der Perfusionen zur Feststellung der Insulinsekretionsrate bzw. des Insulinsekretionsmusters in vitro ist in Tab. ED6 schematisch dargestellt.

Tab. ED6: Protokoll der vergleichenden Perifusionsuntersuchungen an (+) Efaroxan und (-) Efaroxan (0,2% BSA, 0,1% DMSO).

	Glukose	(+) Efaroxan /(-) Efaroxan
Equilibrationsphase (0-60min)	5mM	---
Stimulationsphase (60-90min)	5mM	250µM
Stiumlationsphase (90-120)	10mM	250µM
Stimulationsphase (120-130)	10mM	---

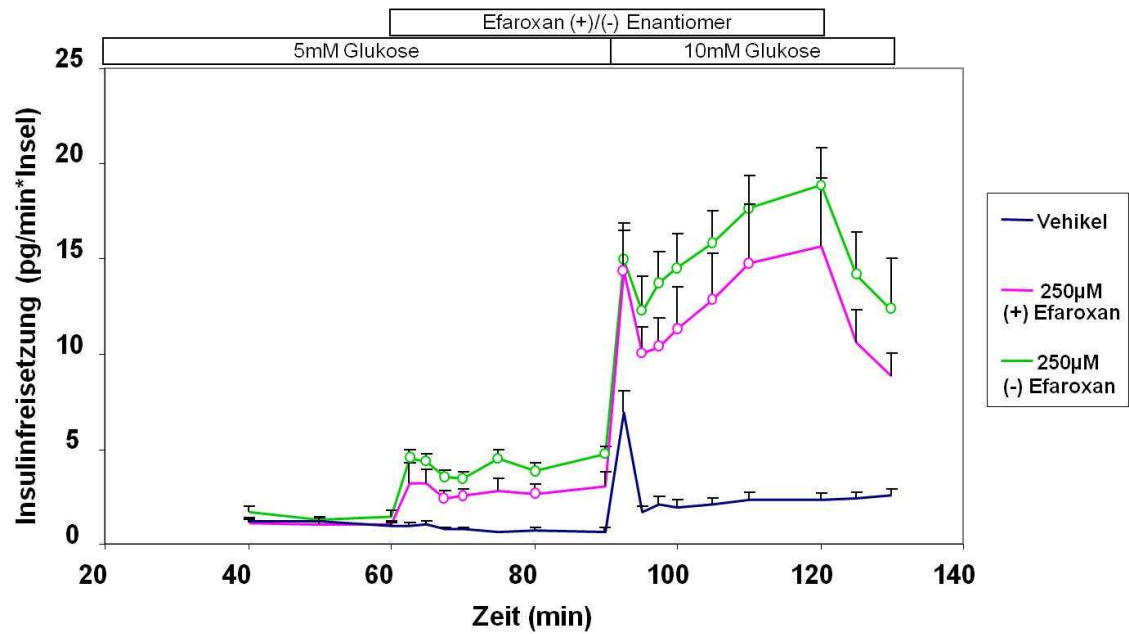


Abb. ED6: Einfluss von 250µM des (+) Enantiomers und (-) Enantiomers von Efaroxan auf die Insulinfreisetzung isolierter perifundierter Mäusepankreasinseln bei nicht-stimulierender (5mM) und stimulierender Glukosekonzentration (10mM)
Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 3$, $p < 0,05$ gegen Vehikel

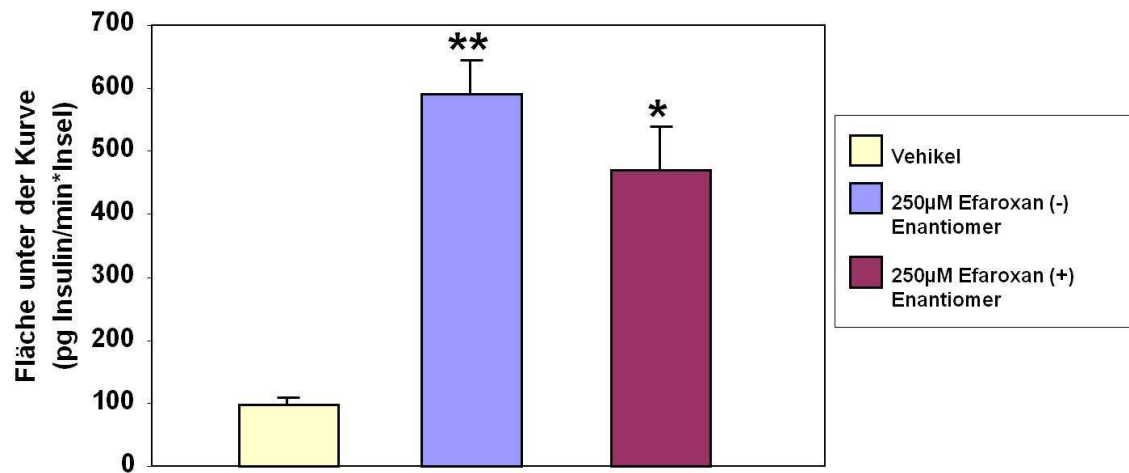


Abb. ED7: Einfluss von 250µM des (+) Enantiomers und (-) Enantiomers von Efaroxan auf die Fläche unter der Insulinfreisetzungskurve isolierter perifundierter Mäusepankreasinseln (Minute 60-120)
Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 3$, * $p < 0,05$ gegen Vehikel, ** $p < 0,01$ gegen Vehikel
Kein signifikanter Unterschied zwischen den Enantiomeren.

In unserem Versuchssetting wurden dem Perifusionsmedium nach einer 60minütigen Equilibrationsphase 250µM des (+) Enantiomers oder des (-) Enantiomers von Efaroxan zugesetzt, ohne dass die Glukosekonzentration gegenüber der Equilibrationsphase angehoben wurde (5mM). Ab Minute 62,5 bewirkten 250µM des (-) Enantiomers im Vergleich zum Vehikel einen signifikanten Anstieg der Insulinfreisetzungsrates (T 62,5: (-) Efaroxan $4,46 \pm 0,50$ pg Insulin/min*Insel vs. Vehikel $0,98 \pm 0,15$ pg Insulin/min*Insel; $p < 0,05$). Die erhöhte Insulinfreisetzungsrates blieb bis zum Ende der ersten Stimulationsphase bei Minute 90 relativ konstant. 250µM des (+) Enantiomers erzielte in dieser Phase im Vergleich zum Vehikel ebenfalls eine signifikante Stimulation der Insulinfreisetzungsrates, die zu den meisten Zeitpunkten gegenüber der Vehikelkurve signifikant war (T 80: (+) Efaroxan $2,63 \pm 0,47$ pg Insulin/min*Insel vs. Vehikel $0,74 \pm 0,12$ pg Insulin/min*Insel; $p < 0,05$). Zwischen den Kurven der beiden Enantiomeren war jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied feststellbar. Bei Minute 90 wurde die Glukosekonzentration auf 10mM erhöht, die Konzentration der Efaroxanenantiomere wurde nicht verändert. Wie auch für racemisches Efaroxan (Abb. ED4) fiel die Sekretionsantwort auf den Glukosestimulus in den mit den Enantiomeren behandelten Inseln unvergleichlich deutlicher aus, als unter dem Vehikel. Im Zuge dessen konnte die Insulinsekretionsrate im Vergleich zur ersten Stimulationsphase weiter gesteigert werden. Bei Minute 92,5 erzielte das (-) Enantiomer einen Peakwert von $14,98 \pm 1,88$ pg Insulin/min*Insel und das (+) Enantiomer einen Peakwert von $14,41 \pm 2,06$ pg Insulin/min*Insel, was signifikant höher war als unter dem Vehikel ($6,93 \pm 1,08$ pg Insulin/min*Insel; p gegen Enantiomere jeweils $p < 0,05$). Bei Minute 95 sank die durch die Efaroxanenantiomere induzierte Insulinfreisetzungsrates ab, blieb jedoch weiterhin auf einem signifikant höheren Niveau im Vergleich zum Vehikel (T 95: (-) Efaroxan $12,21 \pm 1,87$ pg Insulin/min*Insel, $p < 0,05$; (+) Efaroxan $10,03 \pm 1,36$ pg Insulin/min*Insel, $p < 0,05$; Vehikel $1,72 \pm 0,27$ pg Insulin/min*Insel). Ab Minute 95 stieg die Insulinfreisetzungsrates unter dem Einfluss der Efaroxanenantiomere bis Minute 120 wieder an. Die erreichten Insulinfreisetzungsrates lagen bei Minute 120 höher als beim ersten Peak, die Enantiomere des Efaroxans hatten also einen besonders starken Effekt auf die zweite Phase der Sekretionsantwort. Ab Minute 120 wurden dem

Medium die Wirkstoffe wieder entzogen und die Sekretionsrate fiel prompt ab. Die Wirkung der Efaroxanenantiomere war also rasch reversibel. Anhand der statistischen Auswertung konnten wir feststellen, dass beide Efaroxanenantiomere in vitro ähnlich stark wirken (Abb. ED6).

Dies wurde auch durch die Flächen unter den Kurven, die für die Periode der Efaroxanexposition (Minute 60-120) berechnet wurden, bestätigt: Beide Enantiomeren vervielfachten die freigesetzte Insulinmenge gegenüber dem Vehikel. Ein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit der Enantiomere bestand jedoch nicht (Abb. ED7).

Dieses Ergebnis widerspricht somit den Ergebnissen von Chan et al aus dem Jahr 1990, die an isolierten Inseln unter ähnlichen Versuchsbedingungen eine deutliche Überlegenheit des (-) Enantiomers beschrieben haben. Diese Arbeitsgruppe hatte zunächst den Wirkmechanismus von Efaroxan auf den α_2 -Adrenozeptor hinterfragt und zu diesem Zweck mit dem α_2 -Adrenozeptorantagonisten Idazoxan eine Versuchsreihe an isolierten Rattenpankreasinseln gestartet. Würde der Effekt von Efaroxan auf die Insulinsekretion auf einem α_2 -Adrenozeptor-Antagonismus beruhen, so hätte auch der α_2 -Adrenozeptor-Antagonist Idazoxan eine mit Efaroxan vergleichbare Wirkung zeigen müssen. Da die Idazoxanwirkung jedoch ausblieb, schloss man, dass Efaroxan auch einen Adrenozeptor-unabhängigen Wirkmechanismus haben dürfte [49]. In weiteren Studien wurde das Efaroxanracemat in seine reinen Enantiomere aufgetrennt und festgestellt, dass die inhibierende Wirkung auf den α_2 -adrenergen Rezeptor ausschließlich dem (+) Enantiomer zugeschrieben werden kann [50]. Diese weithin akzeptierte Auffassung weist die auch in der vorliegenden Arbeit festgestellten Wirkungen des (-) Enantiomers jedenfalls einem anderen Mechanismus zu.

Hinweisen aus der Literatur folgend, wonach es einen Zusammenhang zwischen der Kaliumkanalblockade und dem (-) Enantiomer gibt, führten Chan et al im Jahr 1993 statische Inkubationen von isolierten Rattenpankreasinseln durch [50, 51].

Zunächst wurden die isolierten Rattenpankreasinseln mit 20mM Glukose und 1 μ M des α_2 -Agonisten UK14,304 inkubiert. Nach Zugabe nanomolarer Konzentrationen der

reinen Efaroxanenantiomeren konnte das (+) Enantiomer die Insulinsekretion deutlich stimulieren, wohingegen selbst eine hohe Konzentration (100µM) des (-) Enantiomers kaum Wirkung zeigte. Fazit: die α_2 -Adrenozeptor-antagonistische Wirkung liegt beim (+) Enantiomer. Um diese Hypothese zu untermauern, wurde eine weitere Versuchsreihe gestartet. Diesmal wurden 20mM Glukose mit 250µM des Kaliumkanal-öffnenden Wirkstoffs Diazoxid inkubiert. Unter normalen Umständen dürfte es bei geöffneten Kaliumkanälen zu keiner Depolarisation und in weiterer Folge zu keiner Insulinsekretion kommen. Nach Zugabe der Efaroxanenantiomere konnte festgestellt werden, dass durch das (-) Enantiomer die Insulinsekretion stimuliert wurde, also die Wirkung des Kaliumkanalöffners Diazoxid aufgehoben wurde. Das (+) Enantiomer zeigte keine vergleichbare, sondern nur geringfügige Wirkung. Daraus schloss man, dass Efaroxan in Form seines (-) Enantiomers auf den Kaliumkanal wirkt und dadurch die Exozytose von Insulin auslösen kann.

Ein weiterer Versuch wurde durchgeführt, um den Wirkmechanismus der Efaroxanenantiomeren aufzuklären. In diesem Versuchssetting konnte 1µM des (-) Enantiomers die Insulinsekretion unter Standardbedingungen (keine pharmakologischen Hemmer der Insulinsekretion) stimulieren. Das (+) Enantiomer zeigte hingegen selbst bei einer Konzentration von 100µM kaum Wirkung auf die Insulinsekretion der isolierten Rattenpankreasinseln. Chan et al folgerten aus den von ihnen in verschiedenen Versuchsreihen gesammelten Informationen, dass der Effekt von Efaroxan auf dessen Interaktion mit zwei verschiedenen Bindungsstellen zurückzuführen ist. Eine Bindungsstelle, der α_2 -Adrenozeptor, sei für das (+) Enantiomer, die andere für das (-) Enantiomer selektiv, jedoch weniger stark [51].

Wie schon weiter oben erwähnt, widerspricht das hier präsentierte Ergebnis diesen Befunden, da die Perifusion unter Standardbedingungen gleich starke Effekte der beiden Enantiomeren zeigte. Dies wurde auch für ein anderes, dem Efaroxan strukturell verwandtes Imidazolin beschrieben [40], sodass meine Daten den Schluss zulassen, dass die Wirkung von Imidazolin auf den K_{ATP} -Kanal generell Enantiomeren-unspezifisch ist. Die von anderen behauptete Spezifität des Effektes

vom (-) Enantiomer, die sogar zu einer Patentanmeldung geführt hatte [50], hielt der kritischen Prüfung nicht stand.

4.3.2. Wirkung auf die Glukosetoleranz

Zur Untersuchung der Wirkung des Efaroxanracemats und seiner Enantiomeren auf die orale Glukosetoleranz wurde ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt.

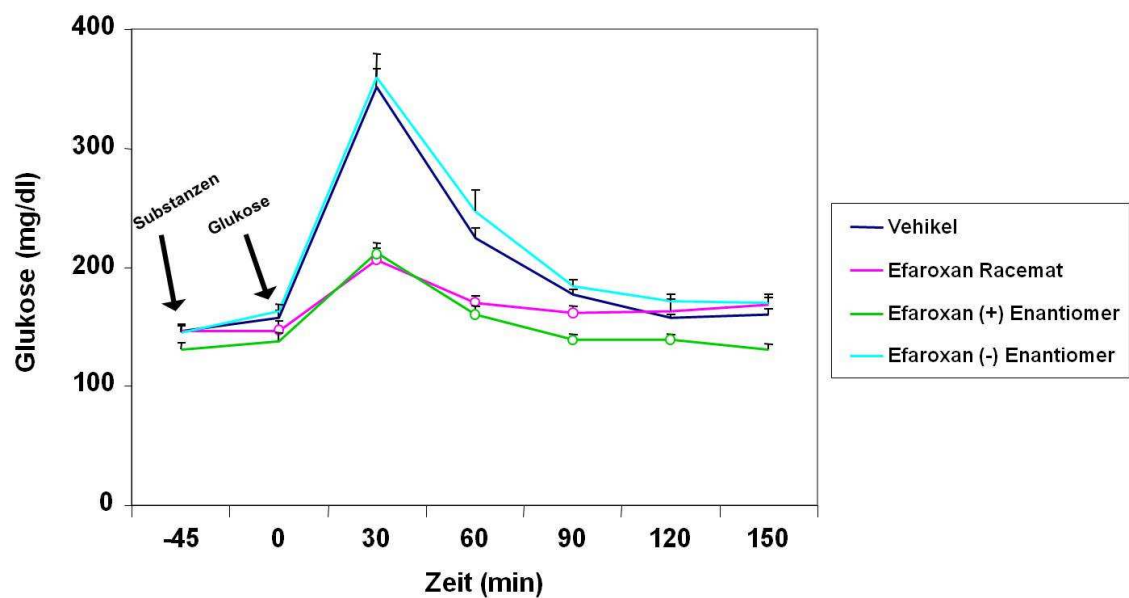


Abb. ED8: Einfluss von 0,1mg/kg Efaroxanracemat, sowie von reinem (+) Enantiomer und (-) Enantiomer von Efaroxan auf die orale Glukosetoleranz (3g/kg) von C57BL/6J-Mäusen.

Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 8$, $\circ$ $p < 0,05$ gegen Vehikel

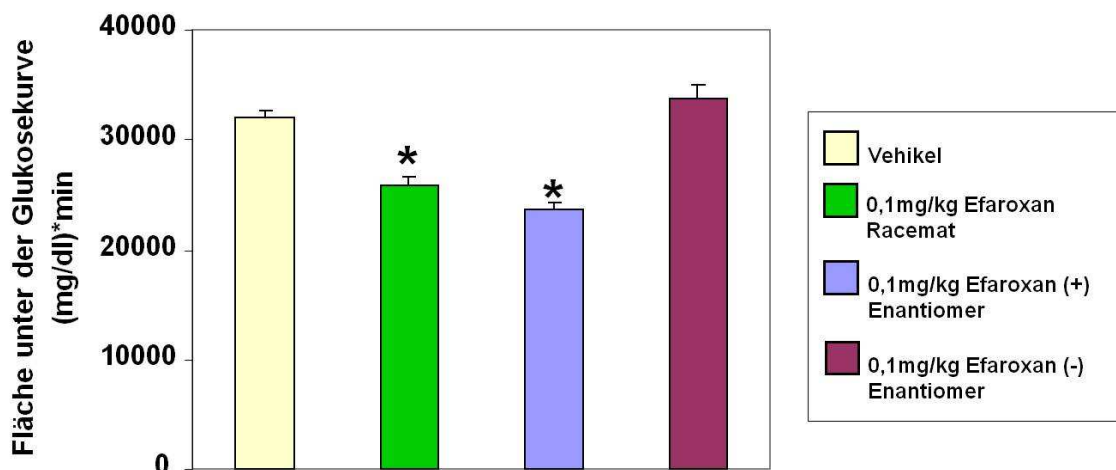


Abb. ED9: Einfluss von 0,1mg/kg Efaroxanracemat, (+) Enantiomer und (-) Enantiomer von Efaroxan auf die Fläche unter der Glukosekurve im oralen Glukosetoleranztest von C57BL/6J-Mäusen.

Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 8$, * $p < 0,001$ gegen Vehikel

Nach Verabreichung von jeweils 0,1mg/kg Efaroxanracemat, (+) Enantiomer oder (-) Enantiomer von Efaroxan zeigten ausschließlich das Efaroxanracemat und das (+) Enantiomer im Vergleich zum Vehikel eine signifikante Wirkung auf die Glukosetoleranz. Beim Spitzenwert der Blutglukose bei Minute 30 induzierten sowohl das Efaroxanracemat, als auch das (+) Enantiomer im Vergleich zum Vehikel eine statistisch signifikante Senkung der Glukosekonzentration im Blut (T 30: Efaroxanracemat 206 ± 9 mg/dl; (+) Efaroxan 212 ± 8 mg/dl; Vehikel 351 ± 14 mg/dl; jeweils $p < 0,0001$ gegen Vehikel). Alleine dieser starke Effekt auf den Maximalwert lässt schon Schlüsse auf die Wirkung der getesteten Substanzen zu (Abb. ED8). Das (-) Enantiomer konnte die Blutglukosekonzentration im gesamten Verlauf des Glukosetoleranztests im Vergleich zum Vehikel nicht signifikant senken. Durch Auswertung der gewonnenen Ergebnisse als Fläche unter der Kurve konnte die unterschiedliche Wirkung der Enantiomere und des Racemats im Vergleich zum Vehikel zusätzlich untermauert werden. Unter dem Einfluss von 0,1mg/kg Efaroxanracemat betrug die Fläche unter der Blutglukosekurve vom Zeitpunkt der Glukoseverabreichung (Minute 0) bis zur letzten Blutglukosemessung bei Minute 150 25761 ± 820 mg/dl*min und war damit im Vergleich zum Vehikel mit 32076 ± 649 mg/dl*min signifikant kleiner ($p < 0,001$). 0,1mg/kg (+) Enantiomer konnten die Blutglukosekonzentration im Vergleich zum

Vehikel ebenso signifikant senken, es war im Trend sogar etwas stärker wirksam als das Racemat ((+) Efaroxan $23604 \pm 695 \text{ mg/dl} \cdot \text{min}$ vs. Vehikel $32076 \pm 649 \text{ mg/dl} \cdot \text{min}$, $p < 0,001$). Ausschließlich $0,1 \text{ mg/kg}$ (-) Enantiomer konnte im Vergleich zum Vehikel keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Fläche unter der Blutglukosekurve erzielen ((-) Efaroxan $33821 \pm 1256 \text{ mg/dl} \cdot \text{min}$ vs. Vehikel $32076 \pm 649 \text{ mg/dl} \cdot \text{min}$; ns) [Abb. ED9]. Fazit: in vivo wirkt bei moderater Dosierung nur das (+) Enantiomer, dessen Wirkung über den α_2 -Adrenozeptor vermittelt wird.

Im Gegensatz zu unserer Versuchsreihe fanden Mourtada et al für beide Efaroxanenantiomere einen Effekt in vivo [47]. Anzumerken wäre jedoch, dass in diesem Versuchsetting nicht die Glukose gemessen wurde, sondern ausschließlich das Plasmainsulin von Ratten. Darüber hinaus wurde eine sehr hohe Dosis ($3,5 \text{ mg/kg}$) verwendet, für die ein vom α -Adrenozeptor unabhängiger Wirkmechanismus durch meine Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann, sodass auch das (-) Enantiomer eine Wirkung auf die Glukosetoleranz haben mag. Weiters muss bei der Gabe von hohen Dosen der Efaroxanenantiomere die Möglichkeit von Verunreinigungen mit dem anderen Enantiomer bedacht werden. In einer anderen Studie hat die betreffende Autorengruppe Verunreinigungen von bis zu 5% nicht ausgeschlossen [50, 51]. Selbst wenn beim Auftrennen des racemischen Efaroxangemisches weitgehend reine Enantiomeren gewonnen werden, gibt es dennoch ein Restrisiko, weil eine Umwandlung („Re-Racemisierung“) der Enantiomeren durch die Leber in vivo nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann. Erhöht man also die Dosis der Enantiomeren, so steigt naturgemäß auch die Dosis der Verunreinigung. Bedenkt man, dass in meinem Experiment schon eine Dosis von $0,1 \text{ mg/kg}$ des Racemats hochwirksam war, während Mourtada et al $3,5 \text{ mg/kg}$ verwendeten (35-fach höhere Dosis), so ist es formal unmöglich auszuschließen, dass der von Mourtada dem (-) Enantiomer zugeschriebene in vivo-Effekt tatsächlich durch Spuren des (+) Enantiomers bewirkt wurde.

In Anbetracht der durchgeführten Experimente und deren Ergebnisse kann man darauf schließen, dass die in vitro durchgeführten Experimente die in vivo Situation nicht

abbilden. Während in vivo das α -antagonistische (+) Enantiomer alleine wirksam oder zumindest weit überlegen ist, ist der Effekt auf die Insulinsekretionsrate in vitro enantiomerunspezifisch. Dies könnte bedeuten, dass dem insulinsekretionsfördernden Effekt des Efaroxan im von mir verwendeten Protokoll in vitro ein ganz anderer Mechanismus zu Grunde liegt (K_{ATP} -Schluss?) als dem Effekt in vivo, der offenkundig durch α -Antagonismus erklärbar ist. Dass die α -antagonistische Wirkkomponente in oft verwendeten in vitro-Protokollen nicht erfassbar ist, könnte dazu beigetragen haben, dass deren Bedeutung für die Wirkung der Imidazoline von einigen Autoren unterschätzt wurde.

4.3.3. Wirkung auf die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins

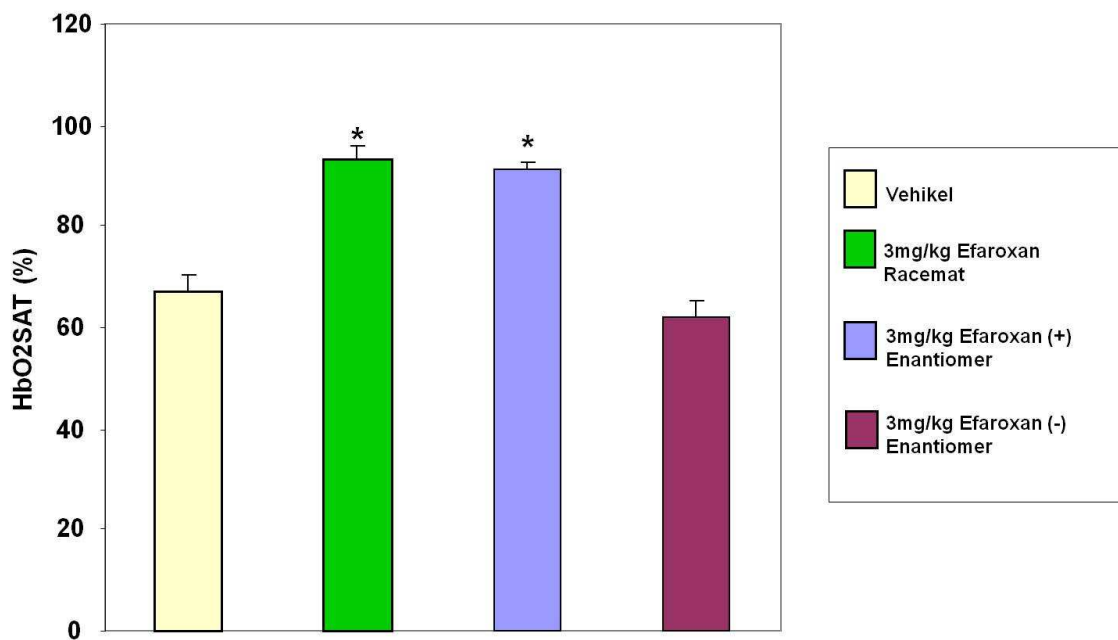


Abb. ED10: Einfluss von 3mg/kg Efaroxanracemat, Efaroxan (+) Enantiomer und Efaroxan (-) Enantiomer auf die Sauerstoffsättigung des Hämoglobin (HbO2SAT) im Schwanzkapillarblut von C57BL/6J-Mäusen.

Mittelwert $\pm$ SEM, n = 6, * p<0,001 gegen Vehikel

Zum Zeitpunkt 0 wurde den Versuchstieren in einem Volumen von 5µl/g Körpergewicht 3mg/kg Efaroxanracemat, (+) Enantiomer, (-) Enantiomer vn Efaroxan oder eine Vehikellösung (0,5% CMC) gavagiert. Nach 75 Minuten wurde von 30µl Blut mittels Blutgasmessgerätes die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins gemessen. Auffallend ist, dass unter dem Einfluss von 3mg/kg Efaroxanracemat oder (+) Enantiomer die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins gegenüber dem Vehikel signifikant anstieg (in % Sättigung: Vehikel $67,0 \pm 3,3$; Efaroxanracemat $93,6 \pm 2,3$; Efaroxan (+) $91,6 \pm 1,2$; p vs. Vehikel jeweils $<0,001$). Das (-) Enantiomer zeigte im Vergleich zum Vehikel hingegen keinen signifikanten Effekt auf die Sauerstoffsättigung (in % Sättigung: Vehikel $67,0 \pm 3,3$ vs. Efaroxan (-) $62 \pm 3,2$; ns). Die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins im Kapillarblut des Mäuseschwanzes darf in diesem Zusammenhang als Surrogatparameter für vasodilatatorische Wirkung betrachtet werden [63]. Die Ergebnisse stellen also einen Hinweis dar, dass auch die Steigerung der Sauerstoffsättigung (= mutmaßliche Vasodilatation) durch Efaroxan von α_2 -Adrenozeptoren mediert wird, weil sie nur durch das α -antagonistische (+) Enantiomer bewirkt wird.

Flavahan ging im Rahmen einer 2005 publizierten Studie der Frage nach, ob Phenylpropanolamin als vermeintlicher α_1 -adrenerger Agonist auch kontraktionsfördernde α_2 -Adrenozeptoren des Gefäßsystems aktivieren kann. Zu diesem Zweck wurden Arterien des Mäuseschwanzes und mesenterische kleine Arterien von C57BL6-Mäusen sowie humane Hautvenen isoliert und nach Behandlung mit den verschiedenen Substanzen mittels Perifusionsmyographie analysiert. Flavahan kam zum Schluss, dass sich unter dem Einfluss von Phenylephrine (α_1 -adrenerger Agonist) Schwanzarterien, mesenterische Arterien und humane Venen kontrahieren. Der α_2 -adrenerge Agonist UK14,304 hatte lediglich einen Effekt auf die Kontraktion von Schwanzarterien und humane Venen der Haut, also auf Gefäße mit thermoregulatorischer Funktion. Die kontraktionsfördernde Wirkung von Phenylpropanolamin wurde in diesen thermoregulatorischen Gefäßen, jedoch nicht in mesenterischen Gefäßen, von dem α_2 -adrenergen Antagonisten Rauwolscin inhibiert, während der α_1 -adrenerge Antagonist Prazosin keinen inhibierenden Effekt hatte. Mit

Hilfe dieser Ergebnisse zeigte Flavahan, dass Phenylpropanolamin ein potenter α_2 -adrenerger Agonist ist, der thermoregulatorische Blutgefäße kontrahiert, die funktionelle α_2 -Adrenozeptoren exprimieren [64].

Aus meinen Ergebnissen kann man also schließen, dass α_2 -adrenerge Antagonisten wie das Efaroxanracemat und das (+) Enantiomer die Sauerstoffsättigung im Schwanzblut steigern. Die Studie von Flavahan untermauert die Interpretation, dass dies durch eine über α_2 -Antagonismus vermittelte Dilatation der Gefäße im Mäuseschwanz verursacht wird.

Fraglich ist nun, inwieweit diese Erkenntnisse die Diabetesforschung beeinflussen werden, zählen ja Bluthochdruck, endotheliale Dysfunktion und periphere Durchblutungsstörungen zu den Begleiterscheinungen von Diabetes. Die endotheliale Dysfunktion führt neben einer gesteigerten Adhäsion von Blutplättchen und Leukozyten, Migration und Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen, sowie Deposition von Lipidpartikeln in der Gefäßwand, auch zu Vasokonstriktion von Gefäßen [65]. Hier könnten sich vasodilatatorisch wirkende Substanzen wie das Efaroxanracemat und das (+) Enantiomer zumindest auf einen Funktionsbereich des Endothels positiv auswirken, der Vasokonstriktion entgegenwirken und die Durchblutung verbessern [66].

5. SCHLUSSBETRACHTUNG

Etablierung und Evaluierung einer Methode zur Perfusion isolierter Mäuseinseln.

Im ersten Teil meiner experimentellen Arbeit habe ich mich mit einem methodischen Aspekt der Erforschung der Modulation der Insulinsekretion beschäftigt. Es galt nämlich, eine Methode zur Perfusion isolierter Langerhans'scher Inseln von Mäusen zu etablieren und mit ausgewählten Stimulatoren der Insulinsekretion zu evaluieren.

Im Rahmen der Methodenetablierung wurde zunächst die Sekretionsantwort der isolierten Mäusepankreasinseln auf einen Glukosestimulus, der als der klassische Stimulus der Insulinsekretion gilt, untersucht. Die beobachtete Kurvenform nach Anheben der Glukosekonzentration, mit einem starken ersten Peak und einer zweiten Phase, in der sich die Insulinsekretionsrate auf einem erhöhten Plateau stabilisierte, entsprach den Beschreibungen aus ähnlichen Versuchsanordnungen [61].

Als nächstes wurde die Sekretionsantwort auf eine hohe Konzentration von KCl untersucht, um die experimentelle Methode auch mit Hilfe eines depolarisierenden nicht-nutritiven Stimulus zu etablieren und zu evaluieren. Die Substanz KIC, sowie der Vergleich der pharmakologischen Wirkstoffe Tolbutamid und Efaroxan wurden ebenso verwendet, um die Qualität der Versuchsaufstellung durch Vergleich mit publizierten Daten zu überprüfen. Die gewonnenen Ergebnisse zur Sekretionskinetik, d.h. die Kurvenformen der Sekretionsantworten auf die diversen Stimuli, entsprachen weitgehend den Befunden aus der Literatur und so konnte die Qualität meiner Versuchsanordnung belegt werden [58, 62].

Auf Basis dieser Grundlagen wurden Fragen zu den noch nicht hinlänglich bekannten Wirkungen des Steroidhormons Progesteron und des Imidazolins Efaroxan gestellt.

Hat das Steroidhormon Progesteron eine akute und direkte Wirkung auf die Insulinsekretion in vitro?

Ausgangspunkt unserer Versuchsreihe war die Arbeit von Straub et al, die einen hemmenden Effekt von Progesteron auf die glukosestimulierte Insulinsekretion gefunden haben. Die Arbeitsgruppe führte Perfusionen an Rattenpankreasinseln durch und kam zum Schluss, dass das Steroidhormon Progesteron eine konzentrationsabhängige und sehr ausgeprägte Verminderung der glukosestimulierten Insulinsekretion bewirkt [43]. Dieser Zusammenhang könnte vor allem für die Erforschung von Gestationsdiabetes wichtig sein, da vor allem im letzten Drittel der Schwangerschaft im Blut hohe Progesteronkonzentrationen auftreten.

In unserer Versuchsreihe wurde ein dem Protokoll von Straub et al sehr ähnliches Versuchsprotokoll eingesetzt. Die erwartete Hemmung der Insulinsekretion durch Progesteron konnte nicht erzielt werden. Auch in der späteren Phase der Perfusion wurde die Insulinsekretion durch 30µM Progesteron nicht gehemmt. Die aus unserer Versuchsreihe gewonnenen Ergebnisse sind somit komplett konträr den Ergebnissen von Straub et al [34]. Ein möglicher Erklärungsansatz für diesen Mangel an Reproduzierbarkeit wäre die Verwendung von Inseln unterschiedlicher Spezies (Maus vs. Ratte). Doch zuvor durchgeführte Pilotversuche an Rattenpankreasinseln konnten ebenso keinerlei hemmende Wirkung von Progesteron auf die Insulinsekretion abbilden.

Nahe liegender wäre es anzunehmen, diesen widersprüchlichen Ergebnissen würde ein technischer Fehler an einem der beiden Laboratorien zu Grunde liegen. Die oben beschriebene ausführliche Evaluierung meiner Experimente spricht dabei gegen größere Fehler in meinen Untersuchungen. Die Frage, ob Progesteron nun solche Wirkungen hat oder nicht, ist nicht endgültig beantwortet, wobei meine Versuche die Existenz solcher Effekte in Zweifel ziehen.

Wie wirken racemisches Efaroxan und hochgereinigte Efaroxanenantiomeren auf Insulinsekretion, Glukosetoleranz und Sauerstoffsättigung des Schwanzblutes?

Ausschlaggebend für die Versuchsreihe über das Efaroxanracemat und seiner hochgereinigten Enantiomeren waren Hinweise aus der Literatur, wonach die insulinotrope Wirkung von Efaroxan über zwei unterschiedliche Mechanismen, den α_2 -Adrenozeptor abhängigen Mechanismus und den K_{ATP} -Kanal abhängigen Mechanismus mediiert wird. Darüber hinaus würden die der Efaroxan-induzierten Insulinsekretion zu Grunde liegenden Mechanismen von den jeweiligen Enantiomeren unterschiedlich stark angesprochen. Um diese unterschiedlichen Mechanismen zu erforschen, wurden neben der Inselperifusion auch der orale Glukosetoleranztest und die Messung der Sauerstoffsättigung des Blutes durchgeführt. Auf diese Weise erhielt ich Ergebnisse, die sowohl die in vitro-, als auch die in vivo-Situation abbilden und somit eine Schlussfolgerung darüber zuließen, wie weit der Versuchsaufbau der in vitro-Experimente der physiologischen Situation im intakten Organismus vergleichbar ist. Die Inselperfusionen belegten in unserem Versuchssetting eine ähnlich starke Wirkung beider Efaroxanenantiomere auf die Insulinfreisetzungsrates in vitro. Nachdem die α -antagonistische Wirkung von Efaroxan bekanntermaßen alleine vom (+) Enantiomer getragen wird, musste hierfür ein anderer Mechanismus verantwortlich sein. Insofern unterstützen meine Ergebnisse Berichte, wonach Efaroxan auch über einen K_{ATP} -Schluss wirkt.

Ebenso bestätigt das Ergebnis Berichte, dass die α -antagonistische Wirksamkeit von Imidazolin in vitro in Abwesenheit von α -Agonisten nicht darstellbar ist [40]. Auch hier stehen die Befunde allerdings im Widerspruch zu vorangehenden Berichten [51], die im Gegensatz zu uns eine viel stärkere Wirkung des (-) Enantiomers als des (+) Enantiomers am K_{ATP} -Kanal beschrieben haben.

Die Situation in vivo wurde mit einem oralen Glukosetoleranztest abgebildet. In diesem Versuchssetting konnten ausschließlich das Efaroxanracemat und das (+) Enantiomer eine statistisch signifikante Senkung der Glukosekonzentration im Blut bewirken, während das (-) Enantiomer die Blutglukosekonzentration im gesamten Verlauf des Glukosetoleranztests im Vergleich zum Vehikel nicht signifikant senken

konnte. Darüber hinaus konnte man einen Trend erkennen, wonach das (+) Enantiomer sogar etwas stärker wirksam war als das Efaroxanracemat. In vivo wirkt bei moderater Dosierung also nur das (+) Enantiomer, dessen Wirkung über den α_2 -Adrenozeptor mediiert wird.

In Anbetracht der Ergebnisse kann man schließen, dass viele in vitro Experimente die in vivo-Situation nicht abbilden. In vivo ist das α -antagonistische (+) Enantiomer alleine wirksam bzw. weit überlegen, während der Effekt auf die Insulinsekretionsrate in vitro enantiomerunspezifisch und daher mutmaßlich durch K_{ATP} -Kanalschluss bedingt ist. Das Ergebnis spricht somit dafür, dass im ganzen Organismus die Insulin-freisetzende und Glukose-senkende Wirkung von Efaroxan weitgehend auf dem α -Antagonismus beruht. Weitere Wirkmechanismen wie der K_{ATP} -Schluss sind womöglich oft in ihrer Bedeutung überschätzt worden, da die α -antagonistische Komponente unter den üblicherweise in vitro verwendeten Standardbedingungen nicht wirksam werden kann. Die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins im Kapillarblut des Mäuseschwanzes nach oraler Verabreichung von Efaroxanracemat, (+) Enantiomer oder (-) Enantiomer wurde gemessen, um eine mögliche vasodilatatorische Wirkung in Gefäßen zu beleuchten. Auffallend ist, dass das Efaroxanracemat, sowie das (+) Enantiomer einen signifikanten Anstieg der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins bewirkten. Unter dem Einfluss des (-) Enantiomers kam es zu keinem Anstieg der Sauerstoffsättigung. Nachdem Flavahan in einer Versuchsreihe über α_2 -adrenerge Agonisten und Antagonisten gezeigt hat, dass diese kontrahierend bzw. dilatierend auf die Schwanzarterie wirken, kann ich auch diese festgestellte Wirkung von Efaroxan mit einiger Sicherheit einem α_2 -Antagonismus zuordnen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zielsetzung: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Methode zur Perfusion isolierter Langerhans'scher Inseln von Mäusen zu etablieren und damit orientierende Experimente zu den Effekten des Steroidhormons Progesteron und des Imidazolins Efaroxan auf die Insulinsekretion in vitro durchzuführen. Letzteres sollte dann auch in vivo getestet werden, um den Wirkmechanismus zu klären. Nach einer ausführlichen Qualitätsanalyse mit Hilfe von nutritiven, nicht-nutritiven und pharmakologischen Stimuli der Insulinsekretion konnte die Versuchsanordnung der Inselperfusion als erfolgreich angesehen werden.

Methode: Die Methode der Inselperfusion beruht auf der Umspülung von isolierten Langerhans'schen Inseln mit unterschiedlichen Substanzkonzentrationen, sodass deren Einfluss auf die Insulinsekretionskinetik dargestellt werden kann. In vivo wurden an Mäusen orale Glukosetoleranztests und Messungen der Sauerstoffsättigung des Schwanzblutes als Surrogatparameter vasodilatatorischer Wirkung durchgeführt.

Ergebnisse und Schlussfolgerung: Eine in der Literatur postulierte Hemmung der Insulinsekretion durch Progesteron in diesem experimentellen Setting konnte nicht bestätigt werden. Bei einem Vergleich der Efaroxan-Enantiomeren unter Standardperifusionsbedingungen zeigten das (+) Enantiomer und das (-) Enantiomer gleich starke, signifikante Effekte. Im Gegensatz dazu war in vivo sowohl im Glukosetoleranztest als auch bezüglich einer mutmaßlich durch Vasodilatation bedingten Steigung der Sauerstoffsättigung des Schwanzblutes nur das (+) Enantiomer, Träger einer α_2 -antagonistischen Wirkung, effektiv. Die Wirkungen von Efaroxan in vivo sind somit zumindest überwiegend durch α -Antagonismus erklärbar, ein Mechanismus, der sich offenkundig durch Inselperfusionsen unter Standardbedingungen nicht abbilden lässt.

7. ABSTRACT

Aim: The aim of this diploma thesis was to establish a method for the perfusion of isolated islets of Langerhans from mice, and to exploit this technique for pilot studies dealing with the direct effects of the progesterone and of the imidazoline compound efaroxan on insulin secretion in vitro. Efaroxan was also examined in vivo in order to elucidate its mechanism of action.

Method: Freshly isolated islets from mice were perfused with different concentrations of substances in order to portray their influence on the kinetics of insulin secretion. In vivo experiments in mice included oral glucose tolerance tests. Furthermore, oxygen saturation in blood samples from the tip of the tail was measured as a putative surrogate parameter of vasodilation.

Results and conclusion: The experimental setting was regarded as successfully established after comparison the respective responses to nutritive, non-nutritive, and pharmacological stimuli of insulin secretion to what had been described previously by others. Experiments examining the actions of progesterone failed to confirm an inhibitory effect on insulin secretion from isolated islets, which had been ascribed to this steroid hormone by others. Comparison of purified enantiomers of efaroxan under standard perfusion conditions revealed very similar stimulatory effects of the (+) enantiomer and the (-) enantiomer. In contrast, only the (+) enantiomer, an established α_2 -adrenergic antagonist, markedly improved oral glucose tolerance and increased oxygen saturation of tail blood suggestive of vasodilatory action. Hence, the effects of efaroxan in vivo can at least mainly be attributed to the α -antagonistic activity of the (+) enantiomer. Islet perfusion experiments under standard conditions fail to portray this enantiomer-specific mode of action.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] LÖFFLER G. Kohlenhydrate. In: Basiswissen Biochemie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005; 86-148
- [2] ELMADFA I, LEITZMANN C. Kohlenhydrate und Ballaststoffe. In: Ernährung des Menschen, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart (Hohenheim), 2004; 146-169
- [3] SILBERNAGL S, AGAMEMNON D. Kohlenhydratstoffwechsel, Pankreashormone. In: Taschenatlas Physiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007; 284-287
- [4] ALBERTS B, BRAY D, HOPKIN K, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Wie Zellen Energie aus Nahrung gewinnen. In: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie (Nover L, Koskull-Döring P, Hrsg), WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2005; 453-480
- [5] HÜRTER P, KORDONOURI O, LANGE K, DANE T K, DANNE T. Hormonelle Steuerung der Glukosehomöostase. In: Kompendium pädiatrische Diabetologie. Springer Verlag, Berlin, 2006; 82-84
- [6] LÖFFLER G. Insulin ist das wichtigste anabole Hormon. In: Basiswissen Biochemie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005; 510-515
- [7] KARLSON P, DOENECKE D, KOOLMAN K, FUCHS G, GEROK W. Hormone der Bauchspeicheldrüse. In: Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. Thieme Verlag, Stuttgart, 2005; 535-539
- [8] HENQUIN JC, RAVIER MA, NENQUIN M, JONAS JC, GILON P. Hierarchy of the β -cell signals controlling insulin secretion, Eur J Clin Invest 2003; 33(9): 742-750
- [9] HENQUIN J-C, DUFRANE D, NENQUIN M. Nutrient Control of Insulin-Secretion in Isolated Normal Human Islets, Diabetes 2006; 55(12): 3470-3477
- [10] MISLER S, GEE WM, GILLIS KD, SCHARP DW, FALKE LC. Metabolite-regulated ATP-sensitive K^+ channel in human pancreatic islet cells, Diabetes 1989; 38(4): 422-427
- [11] ASHCROFT FM, KAKEI M, GIBSON JS, GRAY DW, SUTTON R. The ATP- and tolbutamide-sensitivity of the ATP-sensitive K-channel from human pancreatic β -cells, Diabetologia 1989; 32(8): 591-598

- [12] JÄNIG W. Wirkung von Insulin. In: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie (Schmidt RF, Lang F, Gerhard Thews, Hrsg). Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005; 479
- [13] PARHOFER K, LANDGRAF R, GÖKE B. Stoffwechsel/ Diabetes Mellitus. In: Innere Medizin. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2004; 1531-1560
- [14] STRYJEK-KAMINSKA D. Thiazolidindione mit Metformin. Der Allgemeinarzt
- [15] ELMADFA I, LEITZMANN C. Diabetes Mellitus. In: Ernährung des Menschen, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart (Hohenheim), 2004; 544-550
- [16] SUTTER-DUB MT, DAZEY B, VERGAUD MT, MADEC AM. Progesterone and insulin-resistance in the pregnant rat. I. In vivo and in vitro studies. Diabete & Metabolisme 1981; 7: 97-104
- [17] PEPE GJ, ROTHCHILD I. A comparative study of serum progesterone levels in pregnancy and in various types of pseudopregnancy in the rat. Endocrinology 1974; 95: 275-279
- [18] ALBRECHT ED, PEPE GJ. Placental steroidogenesis in primate pregnancy. In: Encyclopedia of Reproduction 1998; Vol.3: 889-898; Eds: Knobil E and Neill D, Academic Press Ltd., London
- [19] BUTTE NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. Am J Clin Nutr 2000; 71 (Suppl.): 1256S-1261S
- [20] BEN-HAROUSH A, YOGEV Y, HOD M. Epidemiology of gestational diabetes and its association with Type 2 diabetes. Diabet Med 2004; 21: 103-113
- [21] KÜHL C. Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. Diabetes Care 1998; 21 (Suppl.2):B19-B26
- [22] SUTTER-DUB M-T. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. Steroids 2002; 67: 77-93
- [23] BRANISTEANU DD, MATHIEU C. Progesterone in gestational diabetes mellitus: guilty or not guilty? Trends Endocrinol Metab 2003; 14: 54-56
- [24] CATALANO PM, TYZBIR ED, WOLFE RR, ROMAN NM, AMINI SB, SIMS EA. Longitudinal changes in basal hepatic glucose production and suppression during insulin infusion in normal pregnant women. Am J Obstet Gynecol 1992; 167: 913-919

- [25] GREEN I, TAYLOR KW. Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans. *J Endocrinol* 1972; 54: 317-325
- [26] SORENSON RL, BRELJE TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 1997; 29(6): 301-307
- [27] KAWAI M, KISHI K. Adaptation of pancreatic islet B-cells during the last third of pregnancy: regulation of B-cell function and proliferation by lactogenic hormones in rats. *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 419-425
- [28] SORENSON RL, BRELJE TC, ROTH C. Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology* 1993; 133: 2227-2234
- [29] GRAS F, BRUNMAIR B, QUARRÉ L, SZÖCS Z, WALDHÄUSL W, FÜRNSINN C. Progesterone impairs cell respiration and suppresses a compensatory increase in glucose transport in isolated rat skeletal muscle: a non-genomic mechanism contributing to metabolic adaptation to late pregnancy? *Diabetologia* 2007; 50: 2544-2552
- [30] PICARD F, WATANABE M, SCHOONJANS K, LYDON J, O'MALLEY BW, AUWERX J. Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(24): 15644-15648
- [31] LÖFFLER G. Androgene sind für die Ausbildung männlicher Geschlechtsmerkmale verantwortlich. In: *Basiswissen Biochemie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005; 495-498
- [32] LÖFFLER G. Estrogene sind für die Entwicklung weiblicher Geschlechtsmerkmale verantwortlich und regulieren zusammen mit Gestagenen den Menstruationszyklus. In: *Basiswissen Biochemie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005; 498-501
- [33] WUTTKE W. Regulation von Schwangerschaft, Laktation und sexueller Differenzierung. In: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* (Schmidt RF, Lang F, Gerhard Thews, Hrsg). Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005; 501-503
- [34] STRAUB SG, SHARP GWG, MEGLOSSON MD, DE SOUZA CJ. Progesterone inhibits insulin secretion by a membrane delimited, non-genomic action. *Biosci Rep* 2001; 21: 653-666
- [35] ROBERTSON RP, PORTE D Jr. Adrenergic modulation of basal insulin secretion in man. *Diabetes* 1973; 22(1): 1-8

- [36] EFENDIC` S, CERASI E, LUFT R. Effect of blockade of the alpha-adrenergic receptors on insulin response to glucose infusion in prediabetic subjects. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1973; 74(3): 542-547
- [37] LINDE J, DECKERT T. Increase of insulin concentration in maturity-onset diabetics by phentolamine (Regitine) infusion. *Horm Metab Res* 1973; 5(6): 391-395
- [38] CHAN SLF, DUNNE MJ, STILLINGS MR, MORGAN NG. The α_2 -antagonist efaroxan modulates K^+_{ATP} channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol* 1991; 204(1): 41-48
- [39] HENQUIN JC, CHARLES S, NENQUIN M, MATHIT F, TAMAGAWA T. Diazoxide and D600 inhibition of insulin release: distinct mechanisms explain the specificity for different stimuli. *Diabetes* 1982; 31(9): 776-83
- [40] JONAS J-C, PLANT TD, HENQUIN JC. Imidazoline antagonists of α_2 -adrenoceptors increase insulin release in vitro by inhibiting ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic β -cells, *Br J Pharmacol* 1992; 107(1): 8-14
- [41] PLANT TD, HENQUIN JC. Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive K^+ channels in mouse pancreatic β -cells, *Br J Pharmacol* 1990; 101(1): 115-120
- [42] SCHULZ A, HASSELBLATT A. A insulin-releasing property of imidazoline derivatives is not limited to compounds that block α -adrenoceptor. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1989; 340(3): 321-327
- [43] SEHLIN J, DOXEY J C, LINDSTRÖM P. Effect of α_2 -adrenoceptor blockage by RX 821037A on β -cell function, *Diabetologia* 1987; 30, 7, 580A No 503
- [44] SCHULZ A, HASSELBLATT A. Phentolamine, a deceptive tool to investigate sympathetic nervous control of insulin release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988; 337(6): 637-643
- [45] SMITH M, FURMAN BL. Augmentation of glucose induced insulin secretion by pertussis vaccine, phentolamine and benextramine: involvement of mechanisms additional to prevention of the inhibitory actions of catecholamines in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 118(1): 89-95
- [46] HIROSE H, SETO Y, MARUYAMA H, DAN K, NAKAMURA K, SARUTA T. Effects of alpha 2-adrenergic agonism, imidazolines, and G-protein on insulin secretion in beta cells. *Metabolism* 1997; 46(10): 1146-1149
- [47] MOURTADA M, BROWN CA, SMITH SA, PIERCY V, CHAN SL, MORGAN NG. Interactions between imidazoline compounds and sulphonylureas in the regulation of insulin secretion. *Br J Pharmacol* 1997; 121(4): 799-805

- [48] ZIMANYI I, FOLLY G, VIZI ES. Inhibition of K⁺ permeability diminishes alpha 2-adrenoceptor mediated effects on norepinephrine release. *J Neurosci Res* 1988; 20(1): 102-108
- [49] CHAN SL, MORGAN NG. Stimulation of insulin secretion by efaroxan may involve interaction with potassium channels. *Eur J Pharmacol* 1990; 176(1): 97-101
- [50] RECKITT K Colman Products Limited, WO 92/05171, Imidazoline Derivates, International Patent 1992
- [51] CHAN SL, COLIN A, BROWN CA, MORGAN NG. Stimulation of insulin secretion by the imidazoline α_2 -adrenoceptor antagonist efaroxan is mediated by a novel, stereoselective, binding site. *Eur J Pharmacol* 1993; 230(3): 375-378
- [52] BROWN CA, LOWETH AC, SMITH SA, MORGAN NG. Evidence that the stimulatory effects of imidazoline compounds on insulin secretion are not mediated by interaction with non-adrenergic idazoxan binding sites. *Br J Pharmacol* 1993; 108(2): 312-317
- [53] TAYLOR JP, JACKSON DA, MORGAN NG, CHAN SLF. Rhes expression in pancreatic β -cells is regulated by efaroxan in a calcium-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349(2): 809-815
- [54] FALK JD, VARGIU P, FOYE PE, USUI H, PEREZ J, DANIELSON PE, LERNER DL, BERNAL J, SUTCLIFFE JG. Rhes: a striatal-specific Ras homolog related to Dexas1. *J. Neurosci Res* 1999; 57(6): 782-788
- [55] CHAN SL, MONKS LK, GAO H, DEAVILLE P, MORGAN NG. Identification of the monomeric G-protein, Rhes, as an efaroxan-regulated protein in the pancreatic beta-cell. *Br J Pharmacol* 2002; 136(1): 31-36
- [56] TAYLOR JP, JACKSON DA, CHAN SLF. The protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide can block increased gene expression of the novel Ras GTPase Rhes induced by insulin secretagogues. *Diabetologia* 2004; 47(Suppl. 1): A163-A444
- [57] BERDEU D, GROSS R, RIBES G, LOUBATIERES-MARIANI MM, BERTRAND G. Effects of imidazolines and derivates on insulin secretion and vascular resistance in perfused rat pancreas. *Eur J Pharmacol* 1994; 254(1-2): 119-125

- [58] HATLAPATKA K, WIENBERGEN A, KÜHNE C, JÖRNS A, WILLENBORG M, RUSTENBECK I. Selective Enhancement of Nutrient-Induced Insulin Secretion by ATP-Sensitive K⁺ Channel-Blocking Imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 331(3): 1033-1041
- [59] FAGERHOLM V, SCHEININ M, HAARPARANTA M. α_{2A} -Adrenoceptor antagonism increases insulin secretion and synergistically augments the insulintropic effect of glibenclamide in mice. *Br J Pharmacol* 2008; 154(6): 1287-1296
- [60] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Efaroxan.png>; abgerufen am 25.01.2011
- [61] ZAWALICH WS, YAMAZAKI H, ZAWALICH KC. Biphasic insulin secretion from freshly isolated or cultured, perfused rodent islets: comparative studies with rats and mice. *Metabolism* 2008; 57(1): 30-39
- [62] RUSTENBECK I, WINKLER M, JÖRNS A. Desensitization of insulin secretory response to imidazolines, tolbutamide, and quinine; I. Secretory and morphological studies. *Biochem Pharmacol* 2001; 62(12): 1685-1694
- [63] STADLBAUER K, BRUNMAIR B, LEHNER Z, ADJORAN I, SIENGALOWICZ P, FROBEL K, BAUER L, FÜRNSINN C. Erhöhte Sauerstoffsättigung im Kapillarblut des Mäuseschwanzes als Surrogatparameter für vasodilatatorische Wirkung? *J Klin Endokrinol Stoffw* 2010; 3 (Sonderheft 1): 13
- [64] FLAVAHAN NA. Phenylpropanolamine Constricts Mouse and Human Blood Vessels by Preferentially Activating α_2 -Adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313(1): 432-439
- [65] TRIPOLT N, SOURIJ H. Diabetes mellitus und endotheliale Dysfunktion. *J Klin Endokrinol Stoffw* 2010; 3 (2): 20-24
- [66] NICKENIG G, BÖHM M. Atherosklerose. In: *Innere Medizin*. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2004; 221-227

CURRICULUM VITAE

- Name: Valentina Andreina Maria de Cillia
- Geburtsdatum und -ort: 14.10.1986, Klagenfurt, Kärnten
- Schulen

1993-1997: Volksschule 4, Villach, Kärnten

1997-2005: BG u. BRG Villach-Perau (Italienisch als 2. lebende Fremdsprache ab der 3. Klasse); 2002 zertifizierter Englischkurs (Stafford House School of English) am BG/BRG Villach-Perau; 2005 Teilnahme am 10. Englisch-Fremdsprachenwettbewerb der Stadt Villach; im Rahmen der Matura Verfassung einer Fachbereichsarbeit in Geografie und Wirtschaftskunde; 16. Juni 2005: Matura-Abschluss mit ausgezeichnetem Erfolg

- Studium

Ernährungswissenschaften an der Universität Wien seit Oktober 2005, 1. Studien-Abschnitt am 2. Juli 2008 abgeschlossen, März 2010-April 2011 Verfassung der Diplomarbeit unter Betreuung von Univ.-Prof. Dr. Jürgen König und Ao.Univ.-Prof. Dr. Clemens Fürnsinn an der Klinik für Innere Medizin III, Abteilung Endokrinologie und Stoffwechsel, Medizinische Universität Wien.

07.08-08.08.2010: Teilnahme an der 15. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel.

- Praktikumserfahrungen

19.07 – 18.08.2006: Praktikantin im Thermenresort Warmbad/Villach,

Abteilung Diätologie

16.07 – 3.08.2007 und 20. – 24.08.2007: Praktikantin im orthopädischen Spital Speising/Wien, Bereich Ernährungsmedizin

01.09– 25.09.2008: Praktikantin im Karl Landsteiner Institut für Stoffwechselerkrankungen und Nephrologie, Wien