



MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Untersuchungen an Nagern zur Modulation der
Insulinsekretion durch Peptidhormone“

Verfasserin

Lidia Alicja Surman, Bakk.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Clemens Fürnsinn, Frau Dr. Karin Stadlbauer, Frau Dr. Zsuzsanna Lehner und Frau Erika Nowotny für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung meiner Masterarbeit. Ganz gleich wie, ohne Sie hätte ich das niemals geschafft.

Besonders bedanken möchte ich mich aber bei meinen Eltern, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben. Besonders dankbar bin ich Paul Frankl, der sehr viel Zeit und Nerven in das Korrekturlesen investiert hat.

Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
TABELLENVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	10
2 LITERATURÜBERSICHT	12
2.1 DIABETES MELLITUS	12
2.1.1 <i>Diabetes Mellitus 1</i>	14
2.1.2 <i>Diabetes Mellitus 2</i>	15
2.2 INSULIN	17
2.3 GLUKAGON	19
2.4 GLP-1	21
2.5 B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE	23
2.6 BNP UND DIABETES MELLITUS	25
3 MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 VERSUCHSTIERE	27
3.2 INTRAPERITONEALER GLUKOSETOLERANZTEST BEI MÄUSEN	28
3.3 ORALER GLUKOSETOLERANZTEST BEI RATTEN	29
3.3.1 <i>Implantation eines venösen Permanentkatheters in die Jugularisvene</i>	29
3.3.1.1 Operationsvorbereitungen	29
3.3.1.2 Operation	32
3.3.1.3 Kontrolle nach der Operation	37
3.3.2 <i>Das Experiment</i>	37
3.3.2.1 Blutabnahme	39
3.3.2.2 Injektion von BNP	42
3.3.2.3 Peptidanalytik	43
3.4 STATISTIK	43

4	RESULTATE UND DISKUSSION	44
4.1	IPGTT VON MÄUSEN	44
4.1.1	<i>Glukosetoleranz nach Gabe von 360 oder 1000 pmol/kg BNP</i>	<i>44</i>
4.1.2	<i>Glukosetoleranz nach Gabe von 500 pmol/kg BNP</i>	<i>48</i>
4.2	OGTT BEI RATTEN	53
4.2.1	<i>Glukosetoleranz</i>	<i>53</i>
4.2.2	<i>Peptidhormone</i>	<i>55</i>
4.2.2.1	Insulin	55
4.2.2.2	Glukagon	57
4.2.2.3	GLP-1	59
4.3	DISKUSSION	60
5	SCHLUSSFOLGERUNG	66
6	ZUSAMMENFASSUNG	69
7	ABSTRACT	70
8	LITERATURVERZEICHNIS	71
	CURRICULUM VITAE	76

Abkürzungsverzeichnis

BNP	B-Type natriuretisches Protein
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
IPGTT	Intraperitonealer Glukosetoleranztest
GLP-1	Glukagon like peptid 1
PVP	Polyvinylpyrrolidonlösung
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
DPP IV	Dipeptidylpeptidase 4
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
NaCl	physiologische Kochsalzlösung
OP	Operation
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus Typ 1
DM2	Diabetes Mellitus Typ 2
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
GLUT-4	Glukosetransporter Typ 4
AUC-tot	Totale Fläche unter der Kurve
AUC-inc	Inkrementale Fläche unter der Kurve

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Insulinmolekül [4]	17
Abbildung 2 Insulinsignalweg. Das Insulinmolekül bindet an die α -Untereinheiten des Rezeptors und es kommt zu einer Autophosphorylierung der β -Untereinheiten. Der Rezeptor wird zu einer aktiven Tyrosinkinase und phosphoryliert die IRS (Insulin Rezeptor Substrate). Anschließend wird die PI3-Kaskade aktiviert, was letztendlich zu einer Translokation von GLUT4 an die Zelloberfläche führt [Thews et al., 1999]. Adaptiert nach [5]	19
Abbildung 3 Aminosäuresequenz von Glukagon [6]	20
Abbildung 4 BNP, Abgebildet nach [7]	24
Abbildung 5 Überblick möglicher Auswirkungen von BNP auf verschiedene Organe bzw. Gewebe [Welsh and McMurray, 2012].	26
Abbildung 6 Vorgefertigter Katheter mit Silikonring bei 43 mm	30
Abbildung 7 Für die Operation benötigte Utensilien: Kappen, Metallbögen und Schrauben	31
Abbildung 8 Ratte vor der Operation, Rasur an der Kehle, die vorgesehene Schnittstelle wurde mit einer roten Linie markiert.	33
Abbildung 9 Blick auf das frei gelegte Bregma. Die Schrauben sind um das Bregma, das auf diesem Foto durch weiße Striche angezeichnet ist, angeordnet.	34
Abbildung 10 Versuchsordnung: Auf den Metallbogen am Kopf der Ratte ist ein Schlauch gesetzt, der es ermöglicht von außerhalb des Käfigs Blutproben zu sammeln bzw. intravenöse Injektionen zu verabreichen, ohne dabei die freie Beweglichkeit des Tieres einzuschränken.....	40

Abbildung 11 Die Luftblase trennt das NaCl und das Blut. Das gewährleistet eine unverdünnte Blutprobe bei der Abnahme.....	41
Abbildung 12 Blutabnahme bzw. intravenöse Injektion von BNP-Lösung von außerhalb des Käfigs.....	41
Abbildung 13 Einfluss von 360 pmol/kg BNP auf die intraperitoneale Glukosetoleranz von Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 7$	45
Abbildung 14 Einfluss von 360 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot), (B) inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-inc) im intraperitonealen Glukosetoleranztest von Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 7$	46
Abbildung 15 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die intraperitoneale Glukosetoleranz von Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 7$	47
Abbildung 16 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot), (B) Inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-inc) im intraperitonealen Glukosetoleranztest von Mäusen. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n \geq 7$	48
Abbildung 17 Einfluss von 500 pmol/kg BNP auf die intraperitoneale Glukosetoleranz von Mäusen. *... $p < 0,05$ vs. Vehikel, Mittelwerte $\pm$ SEM, $n \geq 12$	49
Abbildung 18 Einfluss von 500 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot), (B) inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-inc) im intraperitonealen Glukosetoleranztest von Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 12$	50
Abbildung 19 Einfluss von 500 pmol/kg BNP auf die intraperitoneale Glukosetoleranz von Mäusen. *... $p < 0,05$ vs. Vehikel, Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 10$	51
Abbildung 20 Einfluss von 500 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot), (B) inkremenale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-inc) im intraperitonealen Glukosetoleranztest von Mäusen. *... $p < 0,05$ vs. Vehikel, Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 10$	52

Abbildung 21 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die orale Glukosetoleranz von Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM; n $\geq$ 5	54
Abbildung 22 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot) und (B) Inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-inc) im oralen Glukosetoleranztest von Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM, n $\geq$ 5.....	55
Abbildung 23 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf das Plasmainsulin während des oralen Glukosetoleranztests bei Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM, *... p<0,05 vs. Vehikel; n $\geq$ 5	56
Abbildung 24 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Insulinkurve (AUC-tot) und auf die (B) inkrementale Fläche unter der Insulinkurve (AUC-inc) im oralen Glukosetoleranztest von Ratten.*...p<0,05 vs. Vehikel. Mittelwerte $\pm$ SEM, n $\geq$ 5.....	57
Abbildung 25 Einfluss von 1000pg/ kg BNP auf die Plasmakonzentration von Glukagon von Ratten während eines oralen Glukosetoleranztests bei Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM; n $\geq$ 4.....	58
Abbildung 26 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukagonkurve und (B) inkrementale Fläche unter der Glukagonkurve während eines oralen Glukosetoleranztests bei Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM, n $\geq$ 4	59
Abbildung 27 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die GLP-1 Konzentration im Plasma während eines oralen Glukosetoleranztests bei Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM; n $\geq$ 5	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zeitpunkte der Blutabnahme und Mengen an Vollblut, die für die Analytik benötigt wurden.	38
--	----

1 Einleitung

Diabetes Mellitus (DM) gehört mittlerweile zu den bedeutendsten Volkserkrankungen unserer Zeit und es wird schon behauptet, dass diese Krankheit zu einer der größten Epidemiologien des 21. Jahrhunderts werden könnte. Mit konstant steigenden Zahlen wurde DM zu einer globalen Massenerkrankung. Im Gegensatz zu früher, wo vorwiegend ältere Menschen betroffen waren, ist die Prävalenz heutzutage bei den jungen Erwachsenen stark im Steigen. Die aktuellen Zahlen, die in einem späteren Kapitel dieser Arbeit beschrieben werden, bestätigen die Aussage, dass DM eine gefährliche und mit einer großen Mortalität verbundene Krankheit ist. Deswegen ist es wichtig, neue Medikamente und moderne Wege zur Heilung oder zumindest zur Milderung der Symptome zu finden.

Diese Arbeit beschäftigt sich nun mit der Auswirkung des Hormons B-Typ Natriuretic Peptid (BNP) auf die Glukosetoleranz von Nagetieren. Die Idee zur Durchführung dieser Experimente ist nach einer Auseinandersetzung mit einem Artikel von Heinisch et al. entstanden. In dieser Studie wurden die Auswirkungen vom BNP auf die Glukosetoleranz bei gesunden Menschen beschrieben. Hierbei haben zehn gesunde Männer an einem randomisierten, einfach verblindeten, Placebo-kontrollierten, Crossover-intravenösen Glukosetoleranztest (IVGTT) teilgenommen. Die Beteiligten, denen Vehikel (0.9% physiologische Kochsalzlösung, NaCl) oder BNP infundiert wurde, wurden 12 Stunden vor Beginn des Experimentes auf Diät gesetzt. BNP (3pmol/kg) oder das Vehikel wurde ihnen 4 Stunden lang infundiert und die Glukose bei Minute $t=0$ intravenös verabreicht. Während der Infusion wurde die Blutglukose von Minute 60 bis Minute 180 in verschiedenen Abständen gemessen. Nach Auswertung der Daten aus dem IVGTT hat sich herausgestellt, dass die Teilnehmer, denen BNP infundiert wurde, vorübergehend eine um 11-13% ($p<0,001$) niedrigere Glukosekonzentration im Blut zeigten als Kontrollpersonen unter Vehikel [Heinisch et al., 2012].

Laut der Aussage von Heinisch et al. hat das BNP keinen Einfluss auf die β -Zellfunktion und auch nicht auf die Insulinsensitivität. Es wurde aber festgestellt, dass die Empfänger des BNP eine signifikant höhere Pulsrate während der Infusion im Zeitraum von $t=60$ bis $t=180$ Minuten hatten.

Nachdem also festgestellt wurde, dass BNP einen wesentlichen Einfluss auf die Glukosetoleranz bei Menschen hat, bleibt noch eine Frage offen: welche Mechanismen verstecken sich hinter der Wirkung von BNP?

Zu diesem Zweck ist es hilfreich, ein Tiermodell zu identifizieren, an dem BNP vergleichbaren Effekt hat. Dazu wurde im ersten Teil meiner Arbeit erneut die Glukosetoleranz untersucht, allerdings in einem intraperitonealen Glukosetoleranztest (IPGTT) an Mäusen. Die Tiere mussten dabei in Kontroll- und BNP-Gruppe eingeteilt werden. Die Kontrollgruppe bekam auch NaCl verabreicht. Um die Wirkung von BNP optimal zu erfassen, verfolgte ich dabei verschiedene Protokolle. In diesen Protokollen wurden die Zeiten der Glukosemessung, sowie die Zeitpunkte der Verabreichung von Glukose und BNP bzw. NaCl (Kontrolle) variiert. Auch die Dosis des BNP wurde variiert. Dieses Experiment hatte das Ziel, die Ergebnisse der Studie von Heinisch et al. an Mäusen entweder zu überprüfen.

Im zweiten Teil meiner Masterarbeit wurde eine Methode verwendet, die ohne Stress einen oralen Glukosetoleranztest (OGTT) bei Ratten ermöglicht. Dazu wurde den Tieren operativ ein Dauerkatheter eingesetzt, welcher eine intravenöse Gabe vom BNP sowie stressfreie Blutabnahmen bei vollem Bewusstsein erlaubt. Die entnommenen Blutproben wurden dann zur Bestimmung von Hormonen, die bei der Glukosetoleranz eine wichtige Rolle spielen, genutzt. Dabei handelte es sich um Insulin, Glukagon und Glukagon like peptid-1 (GLP-1). So wie bereits oben angeführt wurden die Ratten in Kontroll- und BNP-Gruppe eingeteilt. Die Glukose- und Hormonmessung erfolgte zu bestimmten Zeitpunkten. Dieses Experiment sollte die Wirkung von BNP an einer weiteren Spezies und bei oraler Glukoseaufnahme darstellen.

2 Literaturübersicht

2.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), besser bekannt unter dem Begriff "Zuckerkrankheit", ist ein Sammelbegriff für chronische Stoffwechselerkrankungen, die durch erhöhte Blutglukose gekennzeichnet sind. Mechanismen, die zu einer Hyperglykämie führen, sind mit dem Hormon Insulin verbunden und durch Insulinmangel oder eine Unempfindlichkeit der Zellen auf Insulin gekennzeichnet. Das Hormon wird in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet [1].

Es gibt zwei Haupttypen von DM:

- Diabetes mellitus 1 (DM1): Ist durch die Zerstörung der Langerhans'schen Inseln durch eine Autoimmunreaktion in der Bauchspeicheldrüse gekennzeichnet und wird vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen diagnostiziert.
- Diabetes mellitus 2 (DM2): Wird durch einen relativen bzw. absoluten Insulinmangel hervorgerufen, der in Zusammenhang mit einer Insulinresistenz der Zielzelle auftritt. Dieser Typ der Hyperglykämie ist weltweit am meisten vertreten, ca. 90 % aller Diabetiker leiden an DM2 [1].

Epidemiologie

Im Jahr 2011 waren 366 Millionen Menschen (globale Prävalenz 8,3%) auf unserem Planeten an DM erkrankt. Groben Schätzungen zufolge wird sich diese Zahl bis 2030 fast verdoppeln. 80% der Erkrankten kommen aus ärmeren Ländern mit kleinen und mittleren Einkommen. Die am meisten gefährdete Zielgruppe ist die Population

zwischen dem 40. und 59. Lebensjahr. DM und dessen Folgeerkrankungen bewirkten im Jahr 2011 geschätzte 4,6 Millionen Todesfälle weltweit, womit diese Krankheit in der Statistik der am häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen an vierter oder fünfter Stelle rangiert [2].

Symptome

Zu den typischen Symptomen des unbehandelten DM gehören:

- Großer Durst (Polydipsie), anormale Trockenheit im Mund
- Abgeschlagenheit, Leistungsabfall
- Häufiges Wasserlassen (Polyurie)
- Schmerzen und Anschwellungen von Extremitäten [1]

Diagnose

Die Diagnose erfolgt im ersten Schritt an Hand einer Messung der Nüchtern glukose im Blut. Ab 100 mg/dl spricht man von einer „gestörten Fastenglukose“ oder DM2 im Anfangsstadium. Liegen die Glukosewerte an zwei verschiedenen Tagen über 126 mg/dl, spricht man von DM. Zur Bestätigung wird ein Glukosebelastungstest (oraler Glukosetoleranztest, OGTT) durchgeführt. Dabei wird Glukose erst im nüchternen Zustand gemessen. Im nüchternen Zustand (8-12 Stunden vor der Messung wird gefastet) liegen die normalen Werte von Glukose bei 70-100 mg/dl. Nach der Messung bekommt der Patient 75 g Glukose, aufgelöst in 250 bis 300 ml Wasser, zu trinken. Zwei Stunden später wird die Glukose erneut gemessen. Bei Werten zwischen 140-200 mg/dl spricht man von einer gestörten Glukosetoleranz, Werte über 200 mg/dl bedeuten die Diagnose eines DM [3].

Folgeerkrankungen

Bei einer Nicht- oder Falschbehandlung von DM kommt es oft zu Komplikationen, die man wie folgt in zwei Gruppen einteilen kann:

- Mikrovaskuläre Komplikationen: Schädigung von kleineren Gefäßen in den Nieren, Augen und Nervenbahnen. Typische Folgeerkrankungen sind diabetische Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie.
- Makrovaskuläre Komplikationen: vor allem eine Schädigung von Herzkranzgefäßen, mit potenziell fatalen Folgen wie Herzinfarkt und Schlaganfall. Patienten mit DM 2 haben ein 2-3-fach erhöhtes Herzinfarktrisiko [Ledochowski, 2010].

2.1.1 Diabetes Mellitus 1

Bei DM1 handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, für die eine genetische Prädisposition besteht und die vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen diagnostiziert wird. Dabei werden die pankreatischen β -Zellen im Zuge einer chronischen Entzündung durch das körpereigene Immunsystem zerstört [Schauder and Ollenschläger, 2006]. Der Auslöser dieser Autoimmunreaktion ist noch immer nicht geklärt, unter anderem werden Nahrungsmittel oder Viren und Toxine aus der Umwelt (Nitrosamine, Bafilomycine) diskutiert [Petrovsky et al., 2006]. Der Verlust der β -Zellen führt zu einem Insulinmangel (absoluter Insulinmangel). DM1 manifestiert sich aber erst bei einem Defizit von ca. 80-90% der Zellmasse. Beim absoluten Insulinmangel muss das Hormon in Form von Insulinpräparaten zugefügt werden. Diese Therapie muss lebenslang befolgt werden.

DM1 lässt sich in zwei Kategorien einteilen: Typ 1a und Typ 1b. Diabetes Mellitus 1a wird durch eine chronische, immunvermittelte Entzündung gekennzeichnet [Böhm et

al., 2011]. Die Zerstörung von den β -Zellen erfolgt vorwiegend durch T-Lymphozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten [Schauder and Ollenschläger, 2006]. Dabei kommt es zu einer Produktion von Antikörpern, die sich sehr gut als serologische Marker im Blut nachweisen lassen und sich zur Identifizierung von DM1 anbieten. Zu den Markern gehören: Inselzell-Antikörper (IAA), Glutamat-Decarboxylase-Antikörper (GAD) und Tyrosin-Phosphatase-Antikörper (IA2) [Böhm et al., 2011]. Bei mehr als 90% der Patienten mit DM1 kann eines von diesen Antigenen nachgewiesen werden [Petrovsky et al., 2006].

Beim Typ 1b handelt es sich um einen sogenannten idiopathischen Diabetes, bei dem keine bekannten Ursachen für die Zerstörung der β -Zellen vorliegen. Dieser Typ wird häufig vererbt [Böhm et al., 2011].

DM1 wird als eine multifaktorielle Erkrankung verstanden, die sowohl durch genetische als auch exogene Einflüsse hervorgerufen wird. 90 % aller Erkrankten haben keine familiäre Vorgeschichte. Bislang wurden ca. 20 Gene entdeckt, die mit DM1 in Zusammenhang stehen könnten [Nokoff, 2012]. Das humane leukozytenartige-System (HLA), das am kurzen Arm von Chromosom 6 platziert ist, ist hierbei von größter Bedeutung [Petrovsky et al., 2006].

2.1.2 Diabetes Mellitus 2

Bei DM2 handelt es sich um eine komplexe Erkrankung, bei der es zu Insulinresistenz und/oder zu einer gestörten Insulinsekretion kommt. In der Entwicklung der Krankheit kann die Insulinresistenz in den ersten Jahren durch eine erhöhte Produktion von diesem Hormon kompensiert werden. Erst ab dem Zeitpunkt, an dem auch diese Menge nicht mehr reicht, steigt die Blutglukose an [Thews et al., 1999]. Der Insulinmangel wird hier vor allem durch Bewegungsdefizite, stärkeres Übergewicht und durch eine genetische Prädisposition herbeigeführt. Zu einer

Insulinsekretionsstörung kommt es primär bei Patienten, die eine genetische Prädisposition aufweisen. Dabei kann die Umwandlung von Proinsulin zu Insulin oder die pulsatile Freisetzung aus der β -Zelle gestört sein [Ledochowski, 2010].

Als Insulinresistenz wird jener Zustand definiert, bei dem eine entsprechende Konzentration von Insulin im Blut die Blutglukose nicht angemessen senken kann. Zum Wirkungsverlust kommt es vorwiegend in der Leber-, den Muskel- und den Fettzellen [Thews et al., 1999].

Eine hepatische Insulinresistenz zeichnet sich durch eine Überproduktion von Glukose in den Leberzellen aus. Nach der Nahrungsaufnahme wird Glukose in die Leberzellen aufgenommen und in Glykogen umgewandelt. Durch eine gestörte Reaktion auf Insulin in der Leber wird die Glukoneogenese nicht gehemmt, was zu einer erhöhten Blutglukose führt [Chaves and Henry, 2006].

Die Insulinresistenz in der peripheren Muskulatur ist durch eine verminderte Zahl an Rezeptoren auf der Zelle oder durch eine gestörte Bindung von Insulin an den Rezeptor gekennzeichnet, insbesondere ist aber die intrazelluläre Signalvermittlung gestört. Dadurch kann Glukose nicht ausreichend genutzt werden [Chaves and Henry, 2006]. Die genaue Ursache für die Insulinresistenz ist noch nicht bekannt. Im Anfangsstadium der DM2-Erkrankung kann die periphere Insulinresistenz durch eine vermehrte Bildung von Insulin kompensiert werden, allerdings kommt es mit der Zeit zur Erschöpfung der β -Zellen.

Zu einer Insulinresistenz kommt es vor allem bei adipösen Patienten. Durch ein erhöhtes Gewicht werden mehrere Entzündungsmediatoren im Körper gebildet, wobei auch die freien Fettsäuren, die durch die Lipolyse vom Fett abgegeben werden, eine wichtige Rolle spielen. Diese Fettsäuren werden durch die Leber und die Muskelzellen aufgenommen und aktivieren dort Prozesse, die die Insulinresistenz steigern. Im Fettgewebe werden auch vermehrt Zytokine gebildet. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Interleukin 6, Interleukin 1 und Tumornekrosefaktor(TNF)- α , welche

für die β -Zellen toxisch sind und somit deren Apoptose beschleunigen [Schauder and Ollenschläger, 2006].

2.2 Insulin

Insulin besteht aus 51 Aminosäuren, die auf zwei Ketten verteilt sind und über Disulfidbrücken verbunden werden (Kette A mit 21 AS und Kette B mit 30 AS, Abbildung 1). Das Insulingen befindet sich am kurzen Arm von Chromosom 11 und besteht aus 300 Nucleotiden [Löfler, 2005].

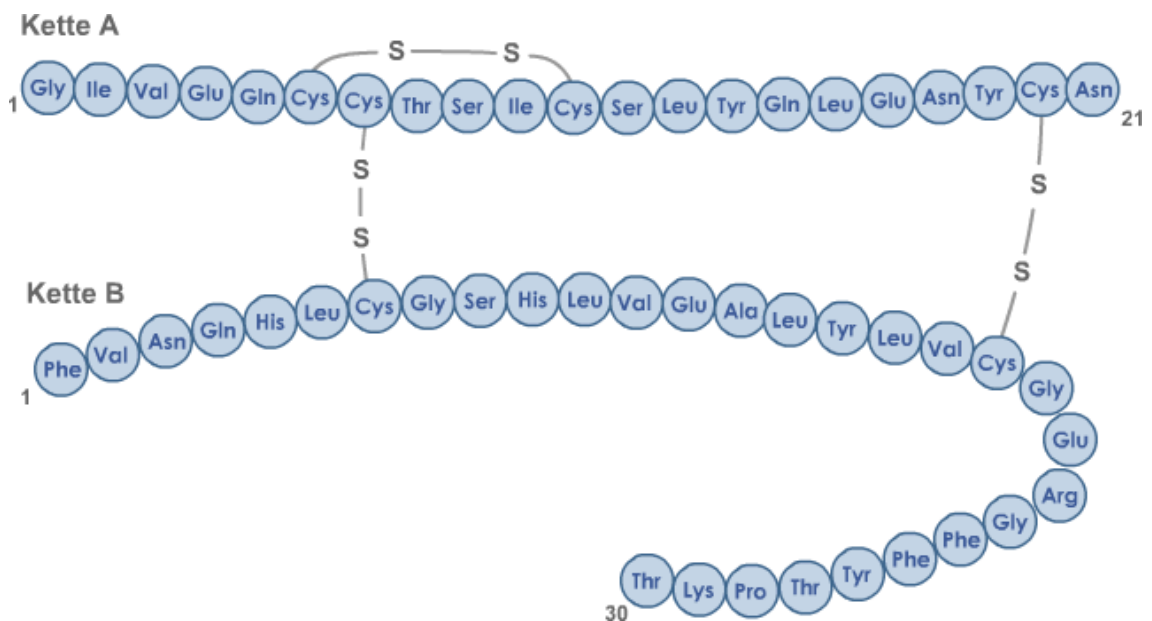


Abbildung 1 Insulinmolekül [4]

Insulin wird in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse produziert. Es ist das wichtigste anabole Hormon, das den Kohlenhydratstoffwechsel durch Stimulation des Glukosetransports in die Muskulatur und ins Fettgewebe

beeinflusst. Insulin hemmt auch die Glukoneogenese und fördert die Glykogensynthese. Insulin drosselt auch die Lipolyse im Fettgewebe und stimuliert die Triglyzeridbiosynthese [Silbernagl and Agamemnon, 2007]. Bekannt ist auch der anregende Effekt auf die Proteinbiosynthese, auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung.

Die Insulinausschüttung aus der β -Zelle wird stark durch die Glukosekonzentration im Blut reguliert und in erster Linie nach der Nahrungsaufnahme gefördert. Eine erhöhte Plasmakonzentration an verschiedenen Aminosäuren (Arginin, Lysin), freien Fettsäuren und gastrointestinalen Hormonen (GIP, GLP-1) kann ebenfalls eine Insulinausschüttung hervorrufen. Die Insulinfreisetzung wird auch durch das vegetative Nervensystem gesteuert. Wenn die Blutglukose unter etwa 60 mg/dl sinkt, wird die Insulinsekretion gehemmt. Hormone wie Glukagon, Somatostatin und Adrenalin inhibieren die Freisetzung und steigern die Glukoseproduktion der Leber.

Insulinrezeptoren werden in fast allen Organen exprimiert. Deren Anzahl ist unterschiedlich. Die roten Blutkörperchen verfügen über eine sehr kleine Zahl an Rezeptoren, Leber und Muskelzellen besitzen dagegen viele. Der Insulinrezeptor ist ein Heterotetramer, das aus 2 extrazellulären α - und 2 transmembranösen β -Untereinheiten besteht. Beide sind durch Disulfidbrücken kovalent verbunden. Der Insulinrezeptor gehört zur Familie der Tyrosinkinaserzeptoren und ist somit imstande Tyrosinreste zu phosphorylieren [Thews et al., 1999]. Insulin bindet an der α -Untereinheit des Rezeptors und die β -Untereinheit wird durch Autophosphorylierung aktiviert. In Folge dessen wird eine intrazelluläre Signalkette ausgelöst und es kommt zur GLUT4-Translokation an die Zelloberfläche (Abbildung 2). Dadurch kann vermehrt Glukose in die Zelle aufgenommen werden und im Glykogen gespeichert oder zur Energiegewinnung herangezogen werden [Löffler, 2005].

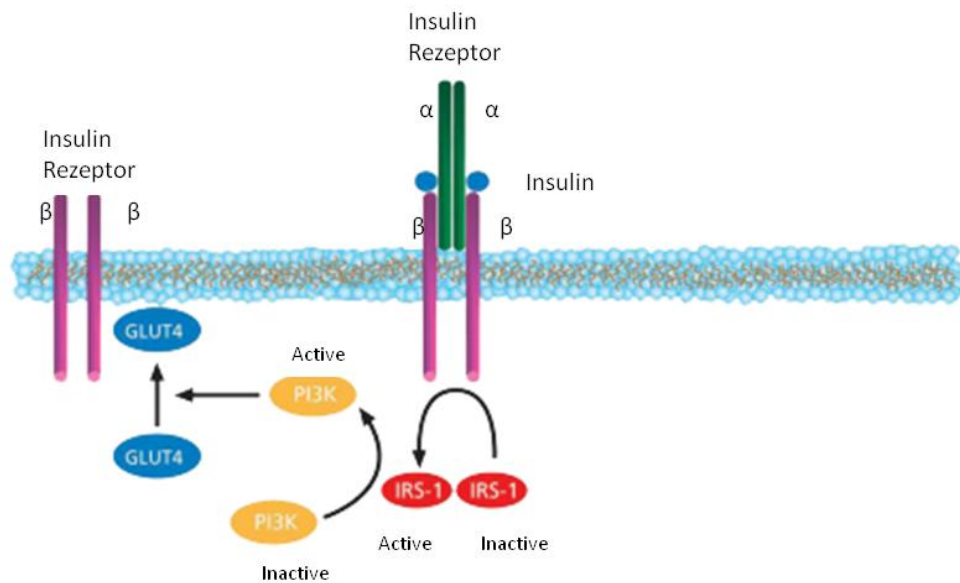


Abbildung 2 Insulinsignalweg. Das Insulinmolekül bindet an die α -Untereinheiten des Rezeptors und es kommt zu einer Autophosphorylierung der β -Untereinheiten. Der Rezeptor wird zu einer aktiven Tyrosinkinase und phosphoryliert die IRS (Insulin Rezeptor Substrate). Anschließend wird die PI3-Kaskade aktiviert, was letztendlich zu einer Translokation von GLUT4 an die Zelloberfläche führt [Thews et al., 1999]. Adaptiert nach [5]

2.3 Glukagon

Glukagon besteht aus 29 Aminosäuren (Abbildung 3) und wird vor allem in den α -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas und in der Magenmukosa gebildet. Glukagon ist ein Peptidhormon, das an der Glukosehomöostase maßgeblich beteiligt ist. Die Hauptaufgabe von Glukagon besteht darin, den Blutglukosespiegel bei einer Nahrungskarenz und bei einem hohen Energieverbrauch (Sport, Schwerarbeit, Stress) im normalen Bereich (70-110 mg/dl) zu halten [Silbernagl and Agamemnon, 2007].

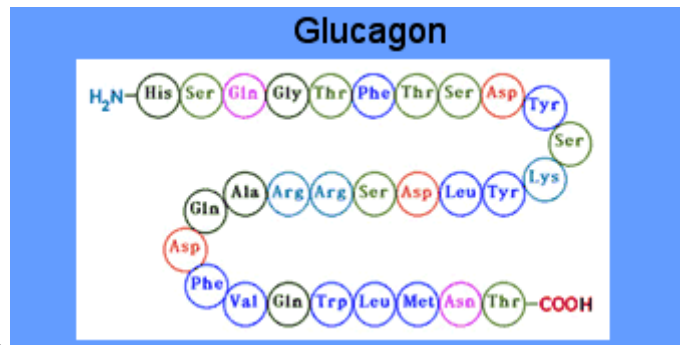


Abbildung 3 Aminosäuresequenz von Glukagon [6]

Glukagon fördert als Insulin-Antagonist den Glykogenabbau in der Leber. Durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels wird die Proteinkinase A aktiviert und es kommt zur vermehrten Bereitstellung von Glukose. Eine erhöhte Zufuhr von Aminosäuren mit der Nahrung führt zur Insulinausschüttung. Wird gleichzeitig keine Glukose mit der Nahrung aufgenommen, kann es zu einer Hypoglykämie kommen. Verhindert wird das durch die Wirkung von Glukagon, das die Glukoneogenese steigert. Aminosäuren werden in Glukose umwandelt und zur Verfügung gestellt. Für die Neubildung von Glukose können nicht nur Aminosäuren, sondern auch Laktat und Glycerin genutzt werden [Silbernagl and Agamemnon, 2007]. Die Glukoseutilisation in der Leber wird ebenfalls durch Glukagon beschränkt. Glukagon inaktiviert auch die Proteinsynthese und stimuliert die Proteolyse in der Leber.

Die stärkste Wirkung weist Glukagon zwar in der Leber auf, es verfügen aber auch andere Organe wie Nieren, Fett, Herz, Langerhans'schen Inseln, Milz und Thymus über Rezeptoren.

Die Sekretion von Glukagon kann durch Nahrungsbestandteile oder durch Hormone reguliert werden. Insulin, GLP-1 und Glukagon selbst hemmen die Sekretion. Die Freisetzung wird durch Somatotropin und durch Sympathikusaktivierung stimuliert [Horn, 2005]. Aber die wesentlichste Regulation erfolgt durch abfallenden Blutglukosespiegel und steigende Aminosäurenkonzentration im Blut. Andererseits

verhindert hohe Kohlenhydrat- und Fettkonzentration im Blut die Ausschüttung von Glukagon. Eine ausreichende Kapillarversorgung und Durchblutung der Langerhans'schen Inseln (α - und β -Zellen) ermöglicht eine perfekte Steuerung der Glukagon- und Insulinsekretion und gewährleistet somit die Glukosehomöostase [Hürter and Danne, 2005].

2.4 GLP-1

GLP-1 (Glucagon like peptide-1) ist ein aus 30 Aminosäuren gebautes Peptidhormon. Es ist ein Hormon, das wesentlich am Inkretineffekt beteiligt ist, und es gehört zu den wirksamsten Verstärkern der Insulinsekretion [Ban et al., 2008]. Unter Inkretineffekt versteht man, dass eine orale Gabe von Glukose die Insulinsekretion stärker stimuliert, als intravenös verabreichte Glukose [Häring et al., 2005]. GLP-1 wird im Darm von enteroendokrinen L-Zellen gebildet und kurz nach der Nahrungsaufnahme sezerniert [Vahl et al., 2003]. GLP-1 wird aus Präproglukagon protolysiert, sodass zwei aktive Isoformen entstehen: GLP-1(7-36)-Amid und GLP-1(7-37). Kurz nach der Sekretion aus den Darmzellen wird das Amid durch die Dipeptidyl-Peptidase-IV (DPP-IV) in das inaktive GLP-1(9-36) umgewandelt [Ban et al., 2008].

Die GLP-1-Rezeptoren sind vor allem in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln zu finden. Dieser transmembrane G-Protein-gekoppelte Rezeptor befindet sich auch in anderen Organen wie z.B. Niere, Lunge, Herz und Gehirn.

Die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors bewirkt die Bildung von cAMP und eine Phosphorylierung der Proteinkinase A, wodurch die β -Zellen stimuliert werden. Es kommt zu einer erhöhten Insulinsekretion sowie zur vermehrten Expression des Insulins. GLP-1 regt auch die Proliferation und Differenzierung an und reduziert die Apoptose der pankreatischen β -Zellen [Mossello et al., 2011].

Zu den charakteristischen Eigenschaften von GLP-1 gehört die Hemmung der Glukagonsekretion im nüchternen Zustand. Wie es allerdings dazu kommt, ist bislang noch nicht bekannt [Ganten et al., 2006].

GLP-1 inhibiert unter anderem die Motilität des Magens und verlangsamt dessen Entleerung, was wiederum Auswirkung auf das Hunger- und Sättigungsgefühl hat [Mossello et al., 2011]. Außerdem wird die Sekretion von Magen- und Pankreasenzymen gehemmt. Dies alles führt zu einer verlangsamen Glukoseresorption. Auch eine Regulation von Appetit und Nahrungsaufnahme ist bekannt. Dies kann mit den GLP-1 Rezeptoren, die sich im zentralen Nervensystem befinden, Zusammenhängen stehen.

Neben dem Glukoseabhängigen Insulinotropen Peptid (GIP) ist GLP-1 für etwa $\frac{3}{4}$ Inkretineffektes verantwortlich [Ganten et al., 2006].

Viltsboll et al. fanden in ihrer Studie unterschiedliche Sekretion von GLP-1 zwischen Gesunden und Patienten mit DM2. Sie untersuchten die GLP-1 Konzentration im Blut bis zu 180 Minuten nach Verabreichung eines Frühstücks (566 kcal). Die Ergebnisse zeigten, dass Patienten mit DM2 im Gegensatz zu Gesunden eine reduzierte GLP-1-Sekretion aufweisen. Die höchste Plasmakonzentration an GLP-1 wurde bei den Kranken bei Minute 45 gemessen und betrug 21 ± 1 pmol/l. Im Gegensatz dazu lag der höchste Wert bei den Kontrollen erst bei Minute 120 vor und betrug 26 ± 3 pmol/l. Diese Werte und auch die Tatsache, dass die GLP-1-Antwort in der späteren Phase (Minute 90-120) signifikant niedriger war, untermauern die Hypothese, dass der Inkretineffekt bei Patienten mit DM2 geschwächt ist. Dies wirkt sich wiederum auf die Insulinsekretion aus [Viltsboll et al., 2001].

Rask et al. untersuchten die GLP-1 Werte nach Verabreichung von oraler Glukose bei 13 Frauen mit beeinträchtigter Glukosetoleranz und 17 Frauen mit normaler Glukosetoleranz. Beiden Gruppen waren nicht krankhaft übergewichtig ($BMI = 26 \pm 4 \text{ kg/m}^2$). Der OGTT dauerte wie in der Studie von Viltsboll et al. 180 Minuten. Im

Gegensatz zur vorher erwähnten Studie ergaben die Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen [Rask et al., 2004].

2.5 B-Type Natriuretic Peptide

Die Erforschung der Familie der Natriuretic Peptides begann in den 50-er Jahren des 20. Jahrhunderts. Zu dieser Gruppe von Peptidhormonen zählen: Atrial Natriuretic Peptide (ANP), B-Type Natriuretic Peptide (BNP), C-Type Natriuretic Peptide und D-Type Natriuretic Peptide [Potter et al., 2009].

BNP wurde im Gehirn entdeckt und vorerst als Neurotransmitter eingestuft. Ursprünglich hieß es auch nicht B-Type Natriuretic Peptide, sondern Brain Natriuretic Peptide. Erst als sich bestätigte, dass im Herz eine ca. 10-mal höhere Konzentration an BNP zu finden ist, wurde der Name geändert [Pandit et al., 2011].

BNP ist ein aus 32 Aminosäuren gebautes Neurohormon (Abbildung 4) und wird aus den kardialen Myozyten des linken und rechten Ventrikels freigesetzt. Eine erhöhte Freisetzung des Hormons ist direkt abhängig vom Grad der Wandspannung und der Drucküberlastung des Herzens [Cardarelli and Lumicao, 2002]. So etwas passiert sowohl bei einer Überfüllung durch systolische und diastolische Unterfunktion, als auch bei einer Klappendysfunktion des Herzens. Eine höhere zirkulierende Konzentration von BNP wird auch mit extrakardialen Erkrankungen, die zu Hypervolämie führen, in Verbindung gebracht. Auch Patienten mit chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen haben deutlich erhöhte Blutwerte. Erklärbar wird das durch die Mehrbelastung der linken Herzhälfte [Pflister et al., 2003].

Da die Konzentration von BNP im Blut bei einem gesunden Menschen relativ niedrig ist, wird BNP als Marker für Früherkennung von chronischen koronaren

Herzerkrankungen, von Vorhofdysfunktionen sowie von Herzinsuffizienz angesehen [Sundell et al., 2011].

Bei Personen mit einem Herzfehler wird der erhöhten Menge an BNP im Blut eine protektive Eigenschaft zugeschrieben. Es wurde nämlich festgestellt, dass dieses Hormon vasodilatatorische Wirkung besitzt [Pandit et al., 2012]. Durch die Wirkung von BNP wird vermehrt cGMP gebildet, was zu einer erhöhten Ausscheidung von NaCl führt und dies wiederum bewirkt eine Entspannung der glatten Muskulatur der Gefäße. BNP ist ein Antagonist von Angiotensin II [Peacock, 2007]. Auch positive hämodynamische Effekte, also Dilatation von Venen und Arterien, wurden erforscht und untersucht [McCullough et al., 2006].

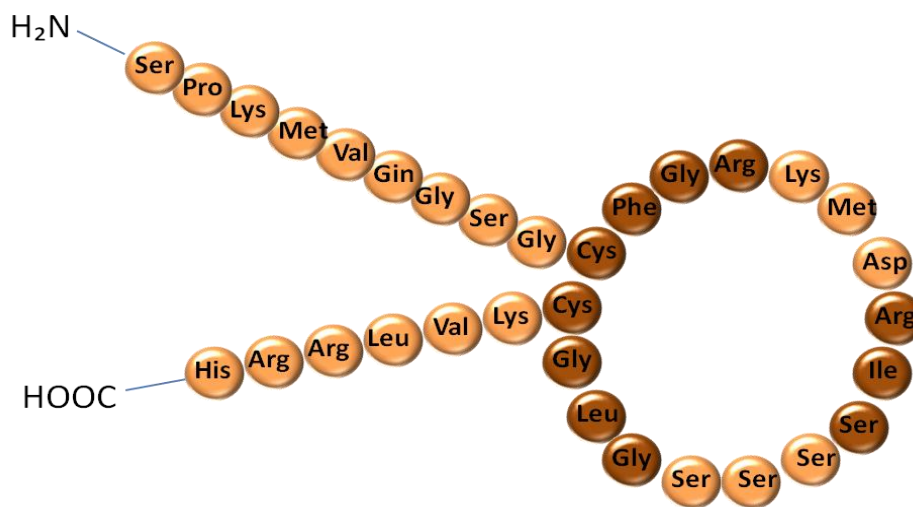


Abbildung 4 BNP, Abgebildet nach [7]

2.6 BNP und Diabetes Mellitus

Das Wissen über die Rolle von Natriuretic Peptides (NP) im Glukosemetabolismus ist bislang sehr begrenzt. Es ist bekannt, dass die α -Zellen der Langerhans'schen Inseln NP-Rezeptoren exprimieren und dass ANP und BNP die Sekretion von Glukagon in den menschlichen Langerhans'schen Inseln stimulieren [Burgess et al. 2009].

Eine vasodilatatorische Wirkung von BNP könnte bei der Glukoseaufnahme eine Rolle spielen. Durch die Erhöhung der kapillaren Permeabilität wird die Durchblutung der Muskeln erhöht, was wiederum eine schnellere Aufnahme von Glukose bewirkt [Welsh and McMurray, 2012].

Laut Addison et al. reduziert BNP die gastrische Motilität, verlangsamt also die Entleerung des Magens und verzögert die Absorption von Nahrungsmittelbestandteilen. Die Glukose wird dadurch langsamer ins Blut aufgenommen, was dazu führt, dass der Blutglukosespiegel nicht so schnell steigt [Addison et al., 2008].

Anhand einer Studie von Jensen et al. hat sich herausgestellt, dass eine Infusion von BNP die Urinausscheidung erhöht, wodurch es bei DM auch zu einer verstärkten Ausscheidung von Glukose kommen kann [Jensen et al., 1998].

Erwähnenswert ist auch der mögliche Zusammenhang von BNP mit Adiponektin. Adiponektin ist ein Peptidhormon, das in den Fettzellen produziert wird und an der Hungerregulation beteiligt ist. Es verstärkt einerseits die Wirkung von Insulin in den Fettzellen, andererseits wird diesem Hormon auch ein antiinflammatorischer Effekt zugeschrieben [Wang et al., 2006]. Ein geringerer Adiponektinspiegel wird mit einem erhöhten Risiko, Insulinresistenz zu entwickeln, verbunden. Weil niedrige Adiponektinwerte in erster Linie an beleibten und adipösen Menschen gemessen werden, ist Hypoadiponektinämie vor allem für übergewichtige Patienten mit DM2 von Bedeutung [Weyer et al., 2001]. Zum einen erhöht das BNP die Lipolyse [Sengenès et

al., 2000], zum anderen wird die Adiponektinkonzentration angehoben [Myashita et al., 2009]. Folglich haben beide Eigenschaften einen positiven Einfluss auf Patienten mit DM, wobei die antiinflammatorische und antidiabetische Wirkung von Adiponektin von noch größerer Bedeutung ist.

Die mögliche Wirkung von BNP auf die Glukosehomöostase ist in Abbildung 5 zusammen gefasst.

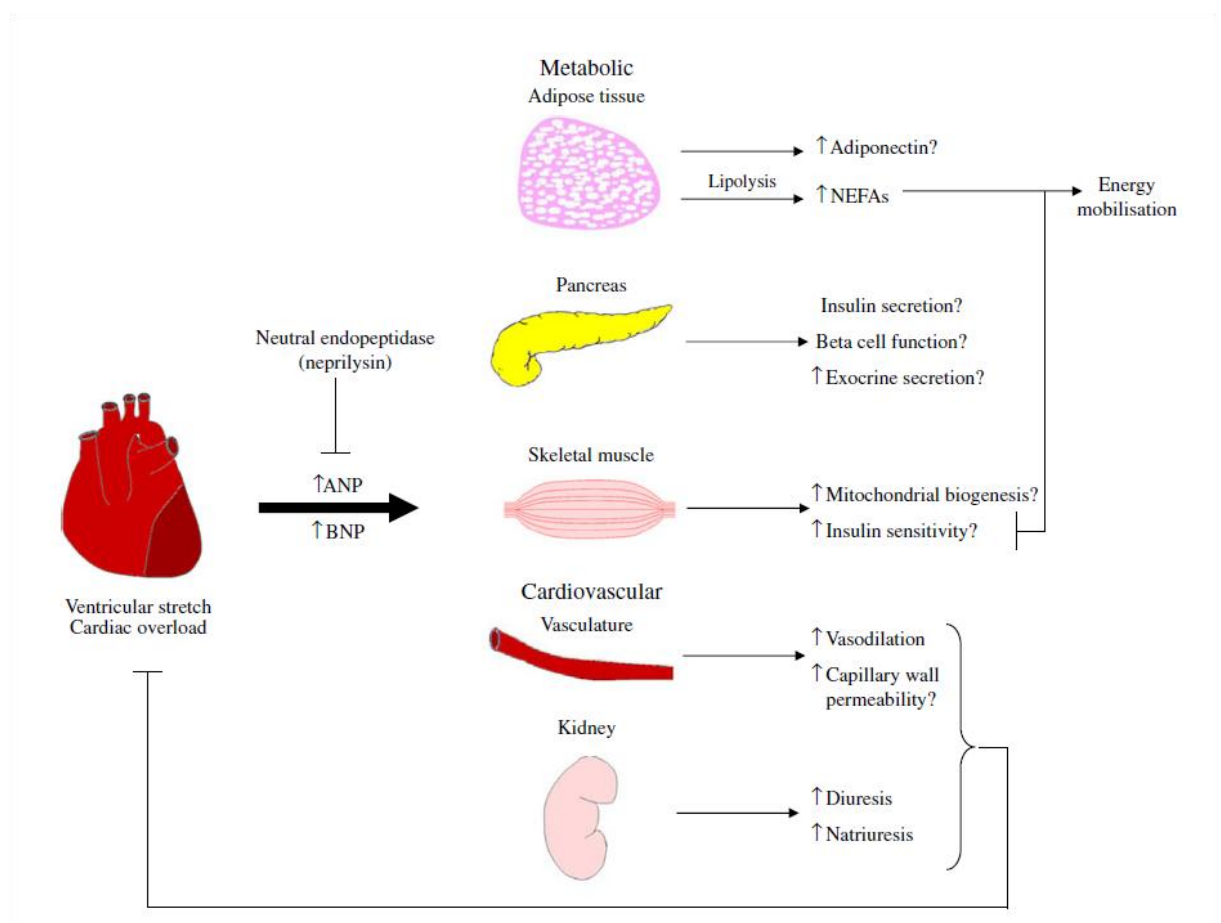


Abbildung 5 Überblick möglicher Auswirkungen von BNP auf verschiedene Organe bzw. Gewebe [Welsh and McMurray, 2012].

DM2 und BNP wurden schon früher in Verbindung gebracht. Auf Grund dessen wurde von Pfister et al. eine Studie durchgeführt. Dabei wurde die Assoziation zwischen der BNP-Konzentration im Blut und dem Risiko, an DM2 zu erkranken, untersucht. In der Zusammenschau der Ergebnisse von elf voneinander unabhängigen Studien wurde eine Assoziation zwischen DM 2 und BNP festgestellt. Je weniger BNP im Blut gemessen worden ist, desto größer war die Wahrscheinlichkeit, an DM2 zu erkranken [Pfister et al., 2011].

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für den OGTT wurden männliche Sprague-Dawley Ratten von der Abteilung für Labortierkunde und Labortiergenetik der Medizinischen Universität Wien (Himberg, Österreich) verwendet. Die Tiere wurden mindestens 2 Wochen vor Beginn jeglicher Manipulation geliefert, sodass Zeit zur Akklimatisation blieb. In einem Käfig befanden sich jeweils 4 Ratten. Die Tiere erhielten herkömmliche Standarddiät: Futter (Alleinfutter für Ratten und Mäuse sniff R/M-H, sniff Spezialdiäten GmbH; Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum – sofern nicht anders angeführt.

Der Intraperitoneale Glukosetoleranztest (IPGTT) wurde an männlichen C57BL/6J Mäusen von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Das Einsatzalter der Tiere betrug 27-30 Wochen. Die Mäuse waren auf einer Standarddiät (wie oben).

Alle Tiere befanden sich in einem Raum mit einer geregelten und konstanten Temperatur (21 Grad) und einem künstlichen 12/12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus.

3.2 Intraperitonealer Glukosetoleranztest bei Mäusen

Im Unterschied zum OGTT wurde den Mäusen beim IPGTT die Glukoselösung sowie BNP bzw. das Vehikel intraperitoneal gespritzt.

Vor der Injektion wurde bei den Tieren die Schwanzspitze mit einer 23 G Nadel angestochen, um daraus Blut für die Glukosemessung zu gewinnen. Die Blutglukose wurde mit Hilfe eines Glukosehandmessgerätes (One Touch Ultra Easy, Life Scan, Milpitas, USA) gemessen. Dabei wurden unterschiedliche Dosierungen von BNP getestet:

1. Im ersten Protokoll wurde als Vehikel NaCl verwendet. Die Dosis von BNP betrug 360 pmol/kg oder 1000 pmol/kg. Vehikel oder BNP wurden bei $t=-10$ min verabreicht, die Glukose bei $t=0$ min.
2. Im zweiten Protokoll diente die 33% Glukoselösung (Mayrhofer Pharmazeutika Linz, Österreich, 6 μ l/ g Maus) als Vehikel, dem BNP beigemischt wurde. Die Dosis von BNP betrug in diesem Versuch 500 pmol/kg. Die Injektion erfolgte bei $t=0$ min

Die Zeitpunkte der Glukosemessungen waren in den Experimenten unterschiedlich und sind genau im Ergebnissteil dargestellt.

3.3 Oraler Glukosetoleranztest bei Ratten

OGTTs an Ratten wurden durchgeführt, um zu erforschen, ob und wie BNP nach Verabreichung von Glukose die Glukose-, Insulin-, Glukagon- und GLP-1-Konzentration im Blut beeinflusst. Um eine stressreiche Zwangsfütterung per Schlundsonde zu vermeiden, bekamen die Ratten im nüchternen Zustand ein Gemisch aus Apfelmus (Spar, Natur*pur Bio-Apfelmus, Salzburg, Österreich) und Glukose. Die Tiere wurden eine Woche vor Beginn jeglichen Eingriffs mehrfach trainiert, das Apfelmus-Glukosegemisch innerhalb von 5 Minuten zu fressen.

Das Experiment beruht auf einer Methode, bei der der Ratte mindestens eine Woche zuvor operativ ein permanenter venöser Katheter implantiert wird, der während des Experiments eine intravenöse Injektion von BNP sowie wiederholte Blutabnahmen von der frei beweglichen Ratte unter stress- und schmerzfreien Bedingungen erlaubt.

3.3.1 Implantation eines venösen Permanentkatheters in die Jugularisvene

3.3.1.1 Operationsvorbereitungen

Für die Operation wurden folgende Gegenstände benötigt:

- **Katheter:** Der 11 cm lange Katheter war ein Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einem Außendurchmesser von 1,0 mm (Abbildung 6). Um später die Katheterspitze in die optimale Position zu bringen, wurde bei Millimeter 43 ein Silikonring angebracht. Weiters wurden am Ende des Schlauches (seitlich) zwei kleine Löcher mit einer stumpfen Nadel (0,9 mm

Durchmesser) gestochen. Wichtig war dabei, dass im Schlauch keine Überreste von Silikon zurückblieben und alle Ränder und Oberflächen glatt waren, weil Ungleichmäßigkeiten zu Irritationen geführt hätten. Im Anschluss daran wurde der Katheter autoklaviert.

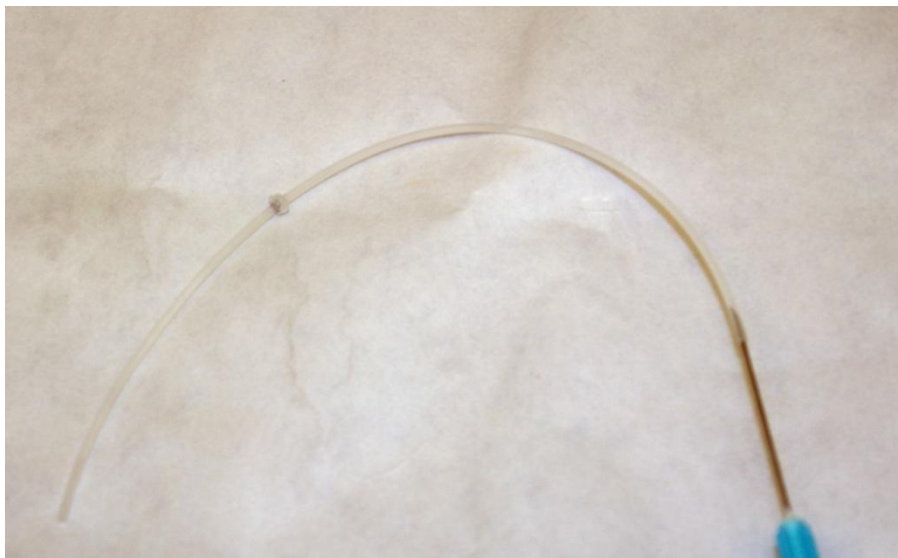


Abbildung 6 Vorgefertigter Katheter mit Silikonring bei 43 mm

- **Metallbogen:** Dieser wurde aus einer 20 G - Injektionskanüle angefertigt, die Länge der Arme betrug jeweils ca. 1 cm (Abbildung 7). Angesichts der Tatsache, dass später über diesen Bogen der Katheter geschoben werden sollte, wurden die Ränder gewissenhaft geglättet, da jede scharfe Stelle zu Rissen führen konnte.
- **Kappe:** Dies war ein Stück Polyethylenschlauch, der durch Erhitzen an einem Ende dicht verschlossen war (Abbildung 7).



Abbildung 7 Für die Operation benötigte Utensilien: Kappen, Metallbögen und Schrauben

- **Schlauch für die Blutabnahme:** Ein durchsichtiger Polyethylenschlauch mit einem Innendurchmesser von 0,75 mm und einem Außendurchmesser von 1,45 mm wurde mit einem Nagel dicht verschlossen.
- **Polyvinylpyrrolidonlösung (PVP)** (Merck, Darmstadt, Deutschland): Dabei handelt es sich um eine zähflüssige Lösung. Mit dieser Lösung wurde der Katheter befüllt, wenn gerade kein Experiment im Gange war. Das Eintreten kleiner Mengen davon in die Blutbahn ist unbedenklich. Die Lösung bestand aus 45 ml NaCl und 22,5 mg Polyvinylpyrrolidon und wurde autoklaviert. Nach einer Zugabe von 5 ml Heparin/45ml (5000 IE, Biochrom, Berlin, Deutschland) wurde das Gemisch portioniert und bis zur Verwendung bei -20 Grad gelagert.
- **Physiologische Kochsalzlösung 0,9% (NaCl)** 0,9 % NaCl Physiologicum Galenica sense Srl; Industria Farmaceutica Monteseroni d'Arbia; Italien
- **Heparin Lösung:** 5 ml Heparin (5000 IE) wurden mit 45 ml NaCl verdünnt. Die Lösung diente dem Verhindern einer Blutkoagulation.

- **Bohrer und Schrauben mit einem Durchmesser von ca. 0,4 mm bzw. ca. 0,5 mm** (Abbildung 7)
- **Dentalzement:** Pro Base Cold Working Kit, Ivoclar Vivadent; Schaan; Lichtenstein
- **Diverses OP-Besteck**

3.3.1.2 Operation

Ratten, die für die Operation verwendet wurden, hatten ein Mindestgewicht von 300 g und befanden sich jedenfalls schon 2 Wochen in der Tieranstalt. Schon Tage vor dem Eingriff wurde den Tieren das Apfelmus-Glukosegemisch verabreicht, um eine sofortige Aufnahme anzulernen. Zumal die Ratten nach der Operation mindestens eine Woche Zeit zur Erholung hatten, war es wichtig, gleich nach dieser Woche mit dem Experiment zu beginnen, da sonst die Wahrscheinlichkeit einer Verstopfung der Kanüle anstieg.

Vor der Betäubung wurde der OP-Tisch vorbereitet und auch 3 Schrauben und ein Metallbogen mit Kappe bereitgelegt. Der Katheter wurde mit Hilfe einer Spritze und einer Nadel (23 G) mit Heparinlösung gefüllt. Dabei hielt man den Arbeitsplatz möglichst sauber, vor allem der autoklavierte Katheter durfte nur mit alkoholgereinigtem OP-Besteck berührt werden. Jede Kontamination der Katheterter Spitze kann nämlich zu einem vorzeitigen Verschluss der Kanüle führen.

Das Nagetier wurde durch intraperitoneale Injektion einer Mischung von Rompun (Rompun® 20 mg/ml; Bayer Austria Ges.m.b.H; Wien; Österreich, 0,1 ml/Ratte) und Ketamin (Ketasol; aniMedica GmbH; Im Südfeld; Deutschland, 0,1 ml pro 100 g pro Körpergewicht) betäubt. Befand sich das Tier in tiefer Narkose, wurden zuerst die Haare an der rechten Seite des Brustkorbs gezupft (Abbildung 8) und danach die Kehle rasiert, um die anschließende Intubation zu erleichtern.

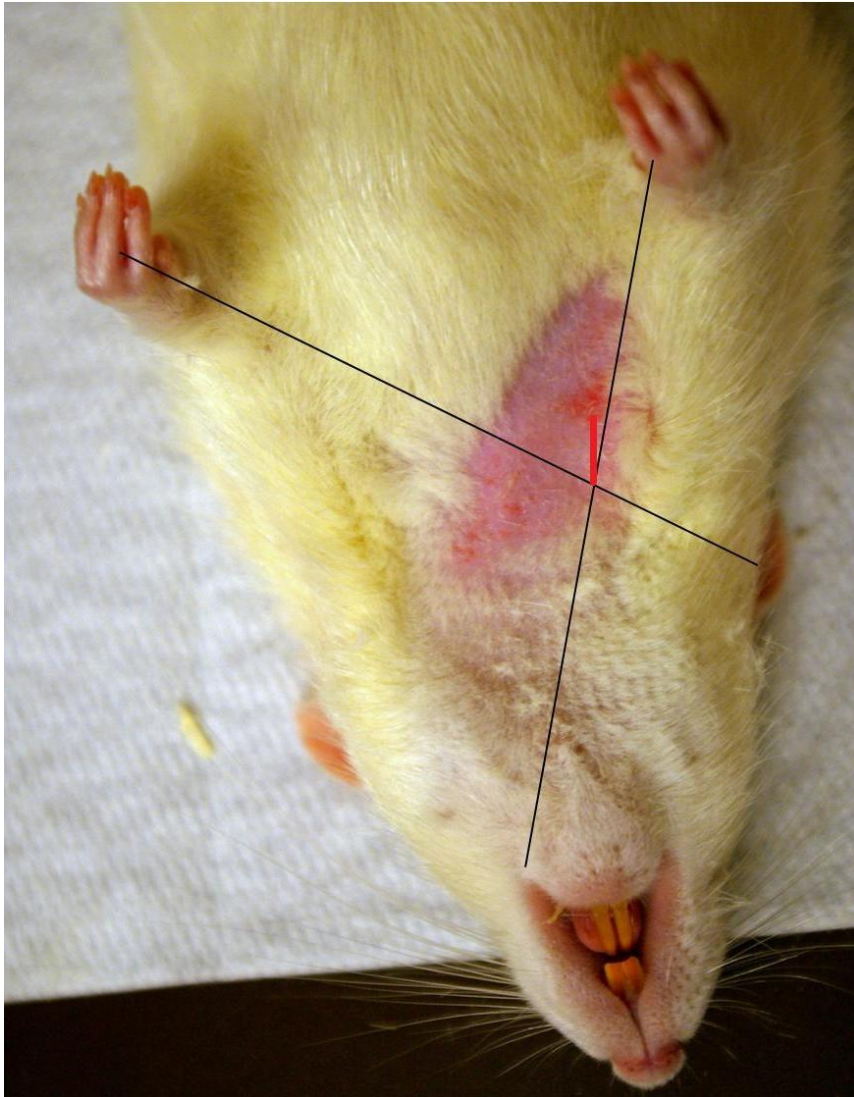


Abbildung 8 Ratte vor der Operation, Rasur an der Kehle, die vorgesehene Schnittstelle wurde mit einer roten Linie markiert.

Nach der Intubation wurde, abhängig von der Tiefe der Narkose, zusätzlich mit Sevofluran künstlich beatmet (Sevorane[®]; Abbot; Wien; Österreich). Das Tier wurde auf den Bauch gedreht, die Haare zwischen den Ohren und den Augen gezupft und anschließend die Haut mit Alkohol gereinigt. Der Hautschnitt am Kopf erfolgte so, dass nach dem Entfernen des Unterhautbindegewebes das Bregma (weisse Kreuzung)

sichtbar wurde (Abbildung 9). Um das Bregma wurden anschließend 3 Löcher gebohrt und die dazu vorgesehenen Schrauben eingedreht. Hierbei musste beachtet werden:

- die Löcher nicht direkt am Bregma zu bohren, weil sich darunter große Gefäße befinden, die dadurch verletzt werden könnten.
- die Löcher nicht tiefer als 1 mm zu bohren, um oberflächliche Verletzungen der Hirnhäute oder sogar des Gehirns zu vermeiden. Die einfachste Methode war, über den Bohrkopf ein entsprechend bemessenes Stück Silikonschlauch zu stecken.
- die Schrauben durften nicht näher als 1mm beieinander liegen, andernfalls passte später der Katheter nicht dazwischen.
- die Schrauben sollten nicht bis zum Anschlag in das Bohrloch gedreht werden, mussten jedoch so befestigt sein, dass am Ende die Verbindung zwischen Dentalzement und Schädel gewährleistet war.



Abbildung 9 Blick auf das frei gelegte Bregma. Die Schrauben sind um das Bregma, das auf diesem Foto durch weiße Striche angezeichnet ist, angeordnet.

Dann wurde der Nager auf den Rücken gelegt. Es war dabei von großer Wichtigkeit, dass die Position des Beatmungstubus und regelmäßige Atmung nach der Drehung überprüft wurden.

Die vorher gezupfte Stelle am Brustkorb wurde mit Alkohol gereinigt und ein 1 cm langer Schnitt gesetzt (Abbildung 8). Mit Hilfe von Pinzetten wurden an der Stelle ihres Zusammenflusses die folgenden 3 Venen stumpf präpariert: die Vena jugularis interna, die Vena jugularis externa und die Vena subclavia. Bei Ratten ist die Vena jugularis externa meistens markanter und größer und wurde daher bevorzugt für das Einführen des Dauerkatheters benutzt. Die Vene wurde ca. 1 cm oberhalb der Kreuzung abgeklemmt und musste vor dem Einführen des Katheters von dem darüber liegenden Gewebe gereinigt werden. Erwähnenswert wäre noch, dass sich die Vene zusammenzieht wenn sie zu lange und zu stark mit der Pinzette bearbeitet wird, was das Einführen des Katheters erschweren kann. Nach dem Abklemmen und der Reinigung wurde das Blutgefäß mit einer 20 G Nadel angestochen. Dabei war zu beachten, dass die Nadel in einem flachen Winkel angesetzt wird, um das Risiko einer Perforation zu minimieren.

Die Öffnung wurde mit einer speziellen sehr spitzen Pinzette erweitert, um die Einführung des Schlauchs zu erleichtern. Der Katheter wurde mit Hilfe eines Greifwerkzeuges in das Gefäß eingeführt und bis zum angebrachten Silikonring vorgeschoben. Wenn der Katheter irgendwo blockierte oder sogar zurückrutschte, musste er ein wenig zurückgezogen und dann wieder neu vorgeschoben werden, während zeitgleich mittels einer Klemme die Lage der Vene verändert wurde. Um zu überprüfen, ob der Katheter in der richtigen Position lag, wurde Blut mit Hilfe der Spritze angesogen. Wenn das Blut gut ansaugbar war, bedeutete das, dass sich der Katheter am richtigen Ort befand und der Vorgang erfolgreich war. Da sich die Ratte nach der Operation frei bewegen würde, wurde der Katheter mit Ligaturen an der Vene befestigt, um eine Verlagerung zu verhindern. Die erste Fixierung wurde unter dem Silikonring platziert, wodurch die Vene am Katheter befestigt wurde. Durch einen zweiten Knoten wurde das Gefäß distal abgebunden und letztendlich auch der

Silikonring durch eine Schlinge fixiert. Es war ratsam, die Knoten vorsichtig zu machen, um die Kanüle nicht zu schädigen beziehungsweise abzubinden.

Zwecks Befestigung des Katheters am Kopf wurde die Ratte auf eine Seite gedreht und das Katheterende subkutan, hinter dem linken Ohr, zum Schnitt am Kopf geführt. Dabei wurde mit einer stumpfen Klemme durch das Unterhautgewebe gestochen. Der Katheter, der durch die Klemme gehalten wurde, musste anschließend an die Kopfoberfläche gezogen werden. Dies geschah möglichst langsam und behutsam, die Lage des Katheters wurde sorgfältig überprüft. Anschließend wurde der Schnitt an der Brust vernäht.

Die Ratte kam wieder in Bauchlage, um die Arbeit am Kopf zu beenden. Zuerst wurde die Katheterlänge zugeschnitten und das Katheterende auf den Metallbogen geschoben. Um ein Abrutschen des Katheters vom Metallbogen zu verhindern, wurden zwei starke Ligaturen gemacht. Der Schlauch für die Blutabnahme wurde auf das andere Ende des Metallbogens gesetzt und das Blut ein wenig angesogen. Dann wurde der Katheter mit ca. 100 µl PVP gefüllt. Um einen Ausfluss oder eine Härtung des PVP zu verhindern, wurde der Metallbogen mit einer Kappe luftdicht verschlossen.

Der Metallbogen konnte jetzt mit Dentalzement an den Schädel befestigt werden. Da dieses Verfahren der Ratte keine Schmerzen mehr bereitete, konnte die Narkosedosis reduziert und somit die Aufwachphase eingeleitet werden. Nach der Operation wurde gewartet, bis die Ratte wieder selbstständig atmete. Zur Kontrolle wurde das Beatmungsgerät für ca. 40 Sekunden vom Beatmungstubus genommen. Auch wenn das Tier wieder selbstständig atmete, ließ man vor der Entfernung des Tubus ca. 5 Minuten verstreichen, um auf eventuelle Atmungsaussetzer reagieren zu können.

Am Ende wurde der Ratte subkutan eine Mischung aus NaCl und Dipidolor (Jassen Pharmaceutica; Beere; Belgien, im Verhältnis 2:3, 100 µl pro 100 g Körpergewicht) gespritzt. Genau das gleiche Schmerzmittel bekam das Tier auch die ersten 3 Tage nach der OP ins Trinkwasser gemischt.

3.3.1.3 Kontrolle nach der Operation

Einen Tag nach der OP musste der Katheter gespült werden bzw. dessen Durchgängigkeit überprüft werden. Gelegentlich kann die Kanüle durch ein Blutgerinnsel verstopft oder von Endothel zugewachsen werden. Dafür wurde der Schlauch für die Blutabnahme mit NaCl gefüllt und auf den Metallbogen am Kopf der Ratte angesetzt. Um ein Eindringen von Luft zu vermeiden, war der Schlauch am anderen Ende immer durch einen Nagel verschlossen oder mit einer Pinzette abgeklemmt, sofern nicht gerade eine Injektionsspritze zum Ansaugen oder Einspritzen aufgesteckt war. Um mögliche kleine Gerinnsel, die sich an der Öffnung des Kathethers gebildet haben mochten, zu entfernen, wurde der Katheter mit ca. 0,1 ml NaCl gespült und dann das Blut angesogen. Wenn kein Blut angesogen werden konnte, wurde „geklopft“ (d.h. ruckartiges Einspritzen von NaCl in den Katheter). Durch das sogenannte „Klopfen“ lösten sich meistens verstopfende Blutgerinnsel. War Blut ansaugbar, wurde es ein paar Mal auf und ab gesogen, um den Katheter zu spülen. Zum Abschluss wurde das Blut einen Zentimeter über dem Bogenende angehalten. Der Katheter wurde wieder mit ca. 100 µl PVP befüllt und der Metallbogen mittels Kappe luftdicht verschlossen.

3.3.2 Das Experiment

Frühestens eine Woche nach der Operation wurde ein Experiment durchgeführt. Wie beim Menschen wurde der orale Glukosetoleranztest auch bei Tieren im nüchternen Zustand durchgeführt. Deswegen wurden die Ratten 10-12 Stunden vor der Untersuchung nüchtern gesetzt, Wasser stand weiterhin ad libidum zu Verfügung.

Um die exakte Dosis von BNP und Apfelmus-Glukosegemisch zu bestimmen, wurde am Tag des Experiments das Gewicht des Tieres festgestellt. Das entsprechend abgewogene Apfelmus-Glukosegemisch wurde in einer kleinen Glasschüssel vorbereitet. Die Ratte bekam 2,75 Apfelmus-Glukosegemisch (1,5 g Apfelmus + 1,25 g Glukose) pro kg Körpergewicht. Des Apfelmus enthielt pro g: 4,5 mg Eiweiß; 180 mg Kohlenhydrate (davon 171 mg Zucker), 6 mg Fett (davon gesättigte Fettsäuren 3 mg), 25 mg Ballaststoffe und weniger als 0,15 mg Natrium.

Beim oralen Glukosetoleranztest wurde den Ratten zu 7 verschiedenen Zeiten Blut abgenommen (siehe Tabelle 1). Bei Minute 0 bekam die Ratte das Apfelmus-Glukosegemisch zu fressen.

Kurz nach der Abnahme wurde das Vollblut zentrifugiert, das Plasma vorsichtig in ein anderes Röhrchen transferiert und gefroren. Plasma für die Messung von GLP-1 und Glukagon wurde bei – 70 Grad gelagert, Plasma zur Bestimmung von Insulin hingegen bei – 20 Grad.

Probe (Zeitpunkt)	Insulin	GLP-1	Glukagon
1 (-15 min)	70 µl	-	-
2 (-1 min)	70 µl	500 µl	500 µl
3 (5 min)	70 µl	500 µl	-
4 (15 min)	70 µl	500 µl	-
5 (30 min)	70 µl	500 µl	500 µl
6 (45 min)	70 µl	-	-
7 (60 min)	70 µl	500 µl	500 µl

Tabelle 1 Zeitpunkte der Blutabnahme und Mengen an Vollblut, die für die Analytik benötigt wurden.

Je nach zu bestimmenden Peptidhormon wurden in die verschiedenen Röhrchen für das Vollblut unterschiedliche Substanzen vorgelegt:

1. Insulin: 3 μ l EDTA (Ethyldiamintetraacetat, 0,34 M): Verhindert die Gerinnung von Blut
1. GLP-1: 12 μ l EDTA + 5 μ l Dipeptidylpeptidase 4 (DPP IV) Inhibitor (Merck, Darmstadt, Deutschland): Verhindert den Abbau von GLP-1
2. Glukagon: 12 μ l EDTA + 25 μ l Aprotinin. Aprotinin ist ein Proteaseinhibitor, der den enzymatischen Abbau des Glukagons blockiert

Bei jedem der sieben unterschiedlichen Zeitpunkte wurde mit Hilfe eines Glukose-Handmessgerätes (One Touch Ultra Easy, Life Scan, Milpitas, USA) sofort Blutglukose gemessen.

3.3.2.1 Blutabnahme

Für die Blutabnahme wurde am Metalbogen am Kopf der Ratte ein langer Schlauch, gefüllt mit NaCl, angeschlossen. Die Ratte konnte sich während des ganzen Experiments im Käfig frei bewegen. Der Schlauch wurde durch den Käfigdeckel nach oben geführt, so dass die Ratte den Schlauch nicht beschädigen konnte (Abbildung 10).



Abbildung 10 Versuchsordnung: Auf den Metallbogen am Kopf der Ratte ist ein Schlauch gesetzt, der es ermöglicht von außerhalb des Käfigs Blutproben zu sammeln bzw. intravenöse Injektionen zu verabreichen, ohne dabei die freie Beweglichkeit des Tieres einzuschränken.

Um ein Eindringen von Luft zu vermeiden, wurde der Schlauch, so lange nicht Blut abgenommen oder Flüssigkeit injiziert wurde, mit einem Nagel verschlossen. Zur Abnahme einer Blutprobe wurde mit Hilfe einer Pinzette das Ende des Schlauchs abgeklemmt, der Nagel entfernt und eine Injektionspritze aufgesetzt. Dann wurde das NaCl aus dem Schlauch abgesaugt und verworfen. Die Blutprobe wurde gesammelt und sofort im Eiswasser gekühlt. Dann wurde der Schlauch erneut abgeklemmt, ein Tropfen Heparinlösung eingespritzt und anschließend durch kurzes Öffnen der Pinzette eine kleine Luftblase erzeugt. Die Blase diente der Trennung von NaCl und Blut. Nunmehr wurde NaCl injiziert, bis die Luftblase kurz vor dem Kopf stand und durch ein Abklemmen des Schlauches angehalten wurde (Abbildung 11). Um so viel Blut wie möglich in die Ratte zurück zu befördern, bildete man eine zweite Luftblase und injizierte weiteres NaCl, bis diese Luftblase ca. 4 cm gewandert war. Somit hatte man die Garantie, dass die erste Luftblase sich noch im Katheter befand. Dieses Verfahren

wendete man nach jeder Blutabnahme an und konnte durch die Trennung der Flüssigkeiten mittels Luftblase sicher sein, dass nur reines Blut abgenommen wurde.

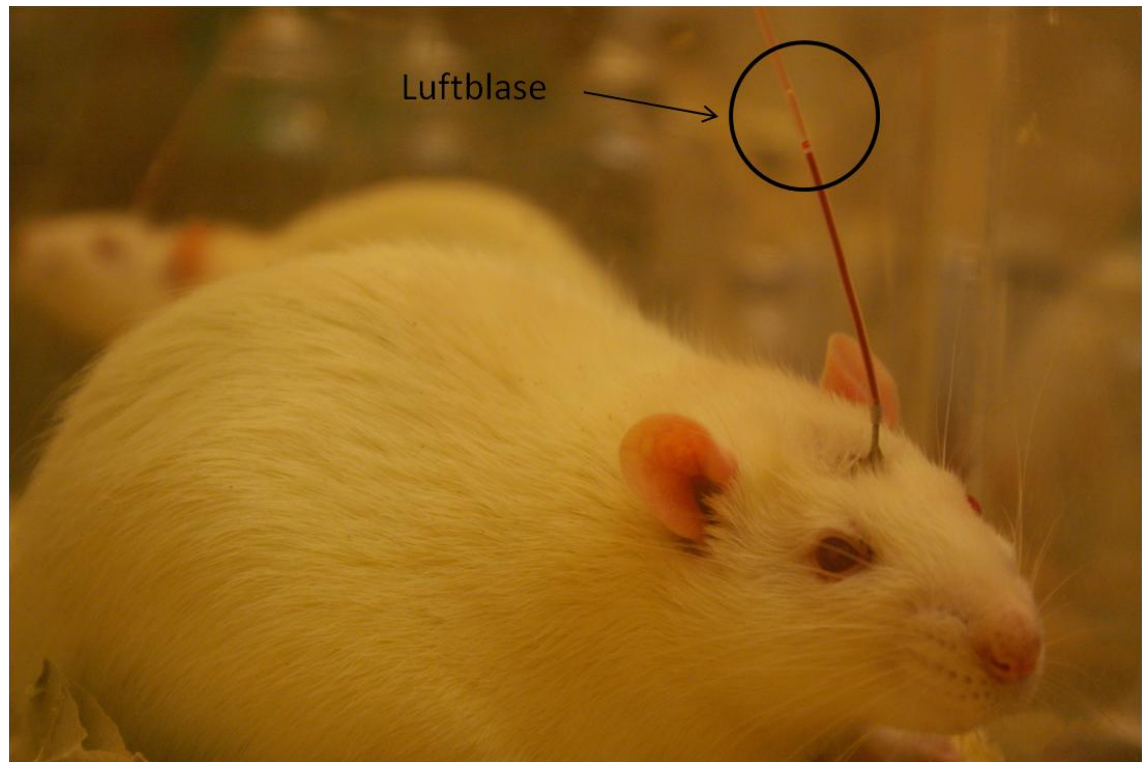


Abbildung 11 Die Luftblase trennt das NaCl und das Blut. Das gewährleistet eine unverdünnte Blutprobe bei der Abnahme.



Abbildung 12 Blutabnahme bzw. intravenöse Injektion von BNP-Lösung von außerhalb des Käfigs.

Nach der letzten Blutabnahme wurden die Katheter wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.3.1.3) mit PVP-Lösung befüllt und verschlossen.

3.3.2.2 Injektion von BNP

Der Ratte wurde BNP (American Peptide, Sunnyvale, CA, USA) oder das Vehikel (NaCl) zu 3 Zeitpunkten intravenös verabreicht. Wie bei einer Blutabnahme (Kapitel 3.3.2.1) wurde das Blut mit Hilfe einer Spritze bis ganz nach oben gesogen. Um den Rückfluss des Blutes zu verhindern, wurde der Schlauch fest mit der Pinzette gehalten und abgeklemmt. In jenes Ende des Schlauchs, das sich hinter der Pinzette befand, wurde ein wenig Heparin eingespritzt und anschließend die Spritze mit BNP gesetzt (Abbildung 12).

Die vorgegebene Menge an BNP wurde über den Schlauch langsam injiziert. Damit auch die im Schlauch verbliebene Menge an BNP in den Körper der Ratte gelangt, wurde im Anschluss daran NaCl injiziert. Um eine Vermischung von beiden Flüssigkeiten zu unterbinden, wurde zwischen BNP und NaCl eine Luftblase im Schlauch produziert. Da die Luftblase letztendlich in den Körper der Ratte gelangte, war es erforderlich, diese möglichst klein zu halten.

Nachdem das Tier die gesamte Dosis von BNP bekommen hatte, wurde das Blut mit Hilfe einer Spritze erneut angesogen, ein wenig Heparin eingespritzt und mit NaCl und zwei Luftblasen wieder abgeschlossen (siehe oben).

Die Dosis von BNP betrug 1000 pmol/kg der Ratte (1 ml/500g). Das Peptid wurde in 3 Portionen zu 3 verschiedenen Zeitpunkten verabreicht: bei Minute -15 erfolgten 50% der gesamten Menge, sowie jeweils 25% bei Minute 0 und in Minute 10.

3.3.2.3 Peptidanalytik

Die Auswertung von Plasmaproben erfolgte anhand von Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) mit Hilfe folgender kommerziell erhältlicher Kits:

1. GLP-1 : Glukagon-Like Peptid 1 (Active) Elisa kit; Milipore, Billerica, MA, USA
2. Insulin : Ultrasensitive Rat Insulin Elisa; Mercodia; Uppsala, Schweden
3. Glukagon: Rat Glukagon Elisa; Wako, Osaka, Japan

Die ELISAs wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

3.4 Statistik

Die Ergebnisse von IPGGT sowie von OGTT wurden mittels deskriptiver Statistik ausgewertet. Zur Ermittlung von Signifikanz wurden die Mittelwerte und deren Standardfehler mit Hilfe ungepaarten T-Test verglichen. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,005$.

4 Resultate und Diskussion

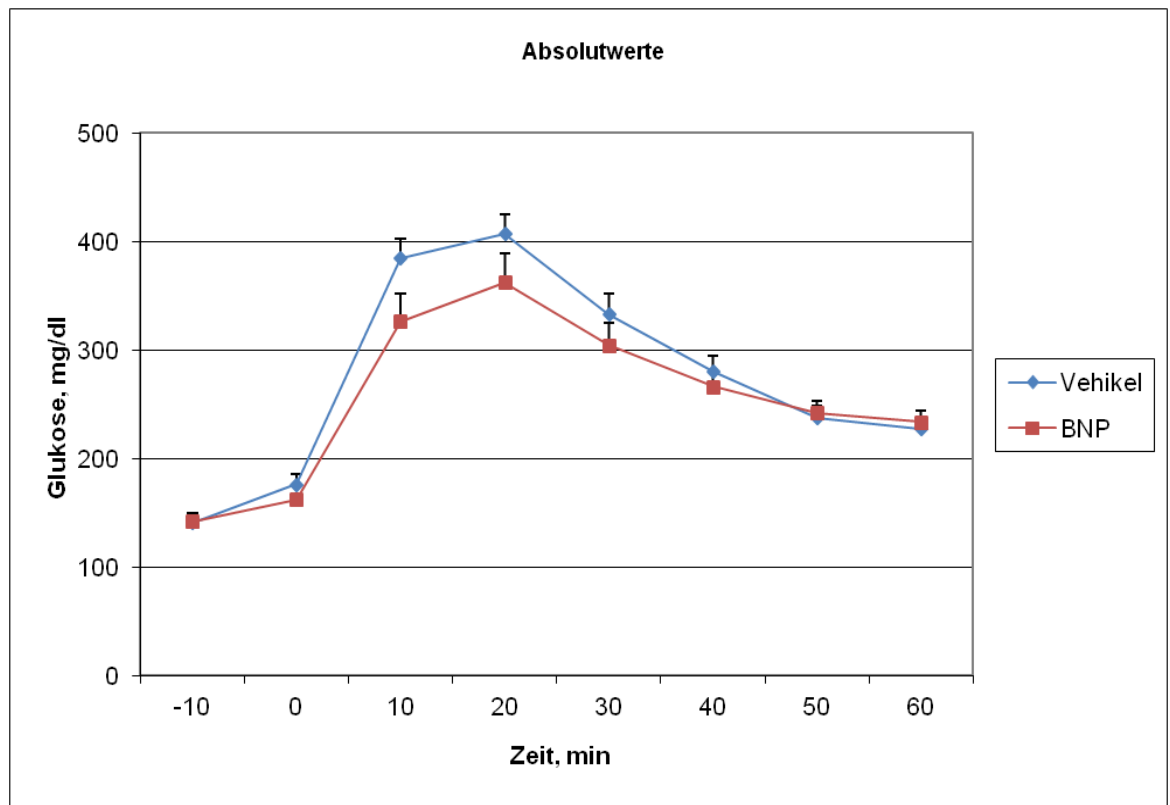
4.1 IPGTT von Mäusen

4.1.1 Glukosetoleranz nach Gabe von 360 oder 1000 pmol/kg BNP

Zur Untersuchung der Wirkung von BNP auf die Glukosetoleranz der Maus wurde ein IPGTT durchgeführt.

Das erste Experiment untersuchte den Einfluss von 360 pmol/kg BNP auf die Glukosekonzentration im Blut, und zwar im Zeitrahmen von -10 bis 60 min. Die Substanz oder das Vehikel (in diesem Fall NaCl) wurden bei Minute -10 verabreicht. Die Glukoseinjektion (2g/kg) erfolgte dann bei Minute 0.

Die Glukosekurve nach Verabreichung von 360 pmol/kg BNP war zwar niedriger als jene des Vehikels, es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen Vehikel und BNP festgestellt werden (siehe Abbildung 13). Der deutlichste Trend von BNP wurde in Minute 10 beobachtet (Vehikel $384,6 \pm 18,3$ mg/dl vs. BNP $325,9 \pm 25,6$ mg/dl). Der p-Wert war mit $p=0,0865$ aber über dem von uns gesetzten Signifikanzniveau von $p<0,05$.



	-10	0	10	20	30	40	50	60
Vehikel	140,9	176,4	384,6	407,5	332,8	280,1	237,8	227,2
BNP	141,9	162,0	325,9	362,2	304,5	266,3	241,7	233,5

Abbildung 13 Einfluss von 360 pmol/kg BNP auf die intraperitoneale Glukosetoleranz von Mäusen.
Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 7$

Bei der Auswertung der Flächen unter den Glukosekurven konnte auch kein Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 14).

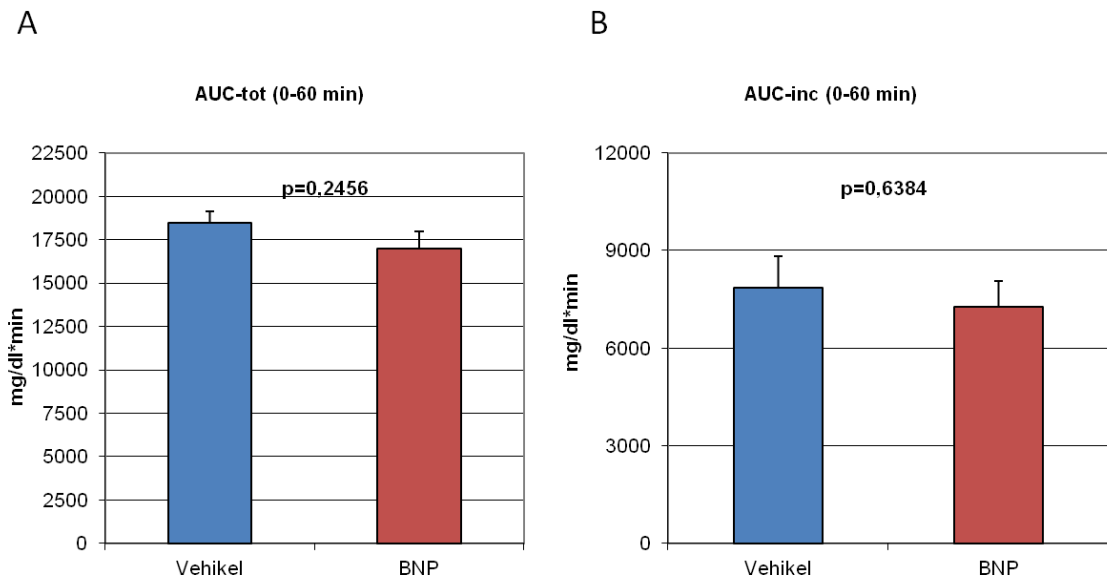
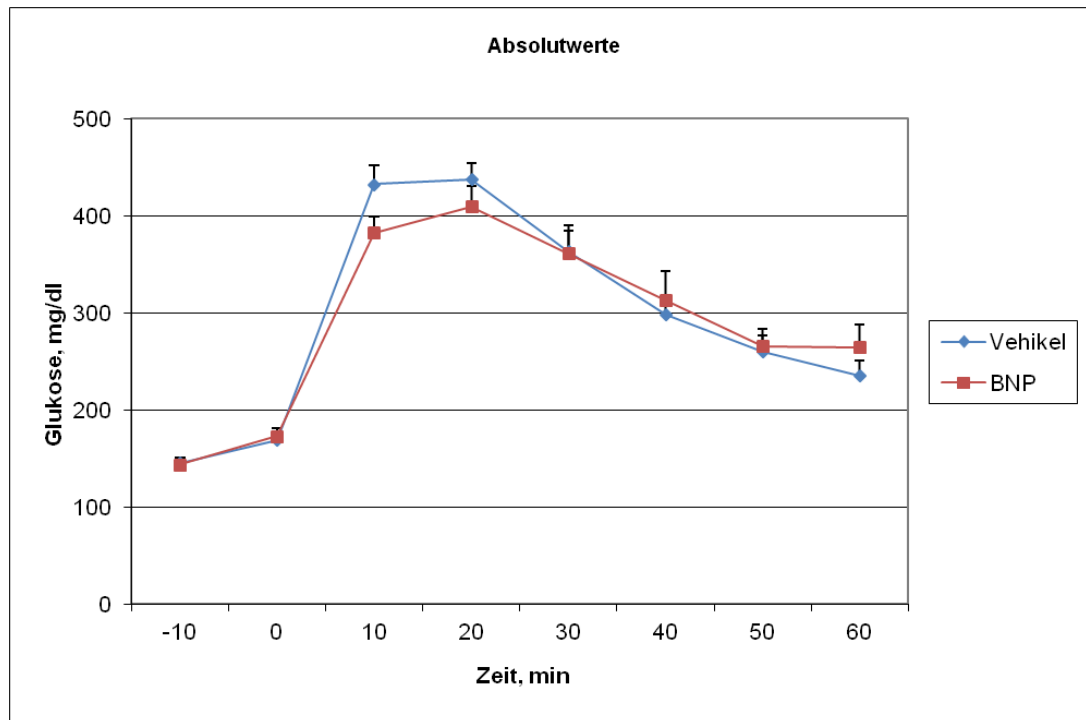


Abbildung 14 Einfluss von 360 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot), (B) inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-inc) im intraperitonealen Glukosetoleranztest von Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 7$

Nach Auswertung der Ergebnisse des Experiments, in dem 360 pmol/kg BNP verabreicht wurde, wurde eine höhere Dosis 1000 pmol/kg BNP im gleichen Protokoll untersucht. Die Zeiten der Verabreichung von BNP und Vehikel ($t = -10$ min) sowie Glukose ($t = 0$) blieben gleich. Die Blutglukose wurde auch in den gleichen Abständen gemessen.

Auch bei Erhöhung der BNP-Dosis auf 1000 pmol/kg konnte kein Unterschied zwischen BNP und Vehikel festgestellt werden. Kurz nach Injektionen der Glukose war jedoch wieder ein Trend zur Verbesserung der Glukosetoleranz durch BNP zu erkennen. Der deutliche Trend wurde wie im ersten Experiment in Minute 10 beobachtet (Vehikel $432,6 \pm 19,6$ mg/dl; BNP $382,6 \pm 16,3$ mg/dl, $p = 0,0715$). Der Vergleich zwischen Vehikel und BNP erbrachte jedoch zu diesem Zeitpunkt keine Signifikanz (Abbildung 15).



	-10	0	10	20	30	40	50	60
Vehikel	145,1	168,8	432,6	437,5	363,6	298,4	260,1	235,3
BNP	143,6	172,9	382,6	409,7	360,7	313,1	265,6	264,4

Abbildung 15 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die intraperitoneale Glukosetoleranz von Mäusen.
Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 7$

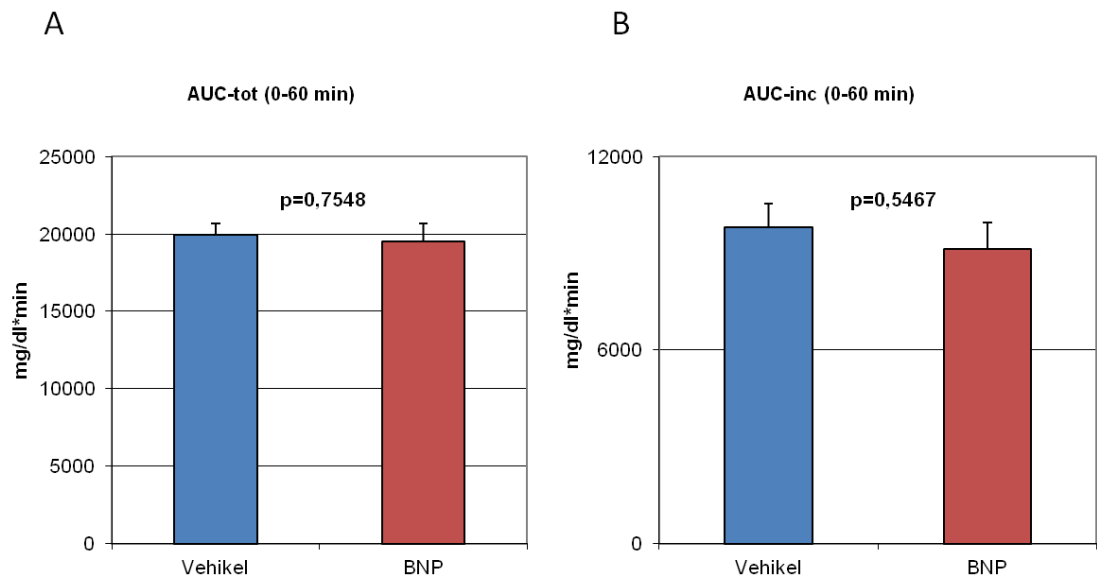


Abbildung 16 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot), (B) Inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-inc) im intraperitonealen Glukosetoleranztest von Mäusen. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n \geq 7$

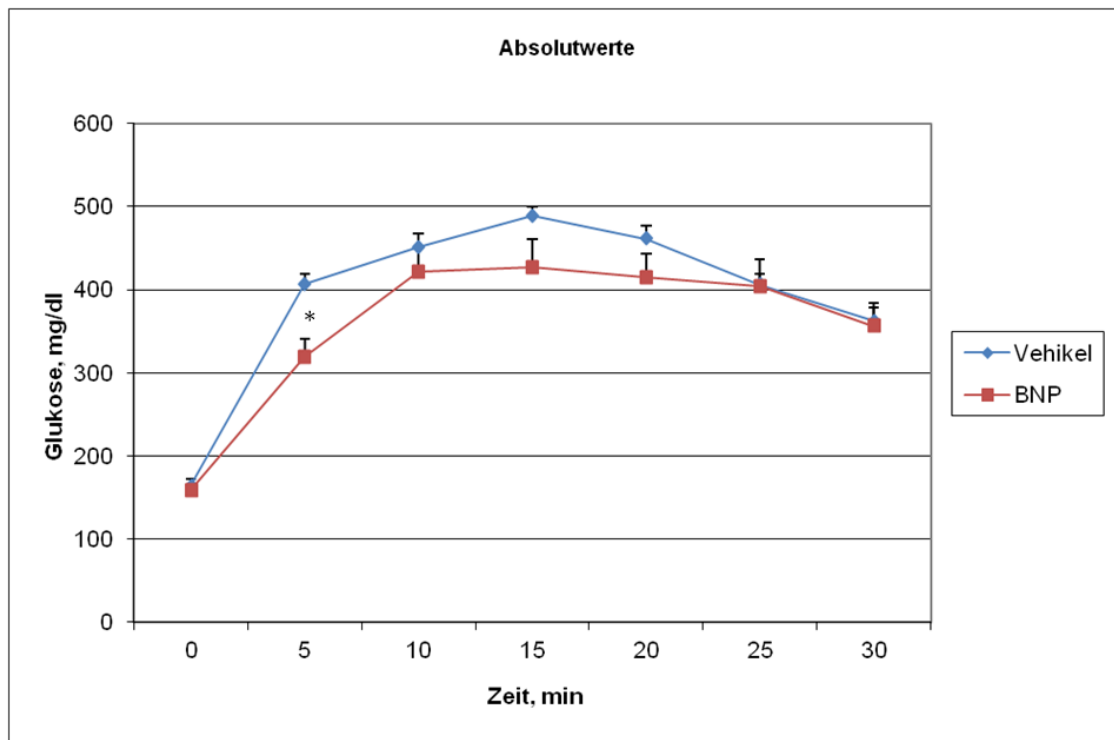
Der Vergleich zwischen den Flächen unter der Kurve ergab auch keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 16).

4.1.2 Glukosetoleranz nach Gabe von 500 pmol/kg BNP

Auf Grund der kurzen Halbwertszeit von BNP im Blut und weil in den vorangegangenen Experimenten in den ersten Minuten des IPGTT wiederholt auffällige Trends zu beobachtet worden waren, wurde das Protokoll erneut adaptiert. Dabei wurde die BNP-Dosis mit 500 pmol/kg festgelegt. Außerdem wurden BNP und eine 33% Glukoselösung gleichzeitig verabreicht ($t=0$ min) und die Abstände der Blutglukosemessung von 10 min auf 5 min verkürzt. Zumal in den vorangehenden Experimenten ab Minute 30 die gemessenen Blutglukosewerte bei Vehikel und BNP

fast gleich waren, wurde die Dauer des Experiments nach Glukosegabe auf 30 Minuten verkürzt.

Bei Auswertung dieser Ergebnisse wurde erstmalig eine signifikante Senkung der Blutglukosewerte durch BNP sichtbar. Diese wurde bereits in Minute 5 nach Injektion von BNP und Glukose festgestellt (Abbildung 19). Die Blutglukosewerte in der BNP-Gruppe lagen bei $319,1 \pm 22,2$ mg/dl, die Kontrollwerte bei $406,5 \pm 12,7$ mg/dl. Der Vergleich der Mittelwerte ergab einen p-Wert von $p=0,0032$.



	0	5	10	15	20	25	30
Vehikel	163,9	406,5	451,3	489,4	461,2	405,9	362,3
BNP	158,5	319,1	421,7	426,8	414,9	403,5	356,1

Abbildung 17 Einfluss von 500 pmol/kg BNP auf die intraperitoneale Glukosetoleranz von Mäusen.

*... $p<0,05$ vs. Vehikel, Mittelwerte $\pm$ SEM, $n\geq 12$

Die Unterschiede zwischen den Flächen unter der Kurve (totale sowie inkrementale) zeigten keine Signifikanz (Abbildung 20). Im Vergleich zu den ersten zwei Experimenten signalisierten die Werte allerdings einen glukosesenkenden Trend. AUC-tot: BNP $11216,1 \pm 734,1$ mg/dl*min vs. Vehikel $12386, \pm 341,6$ mg/dl*min, $p=0,1723$. AUC-inc: BNP $6361,1 \pm 720,5$ mg/dl*min vs. Vehikel $7470,3 \pm 242,5$ mg/dl*min, $p=0,2064$.

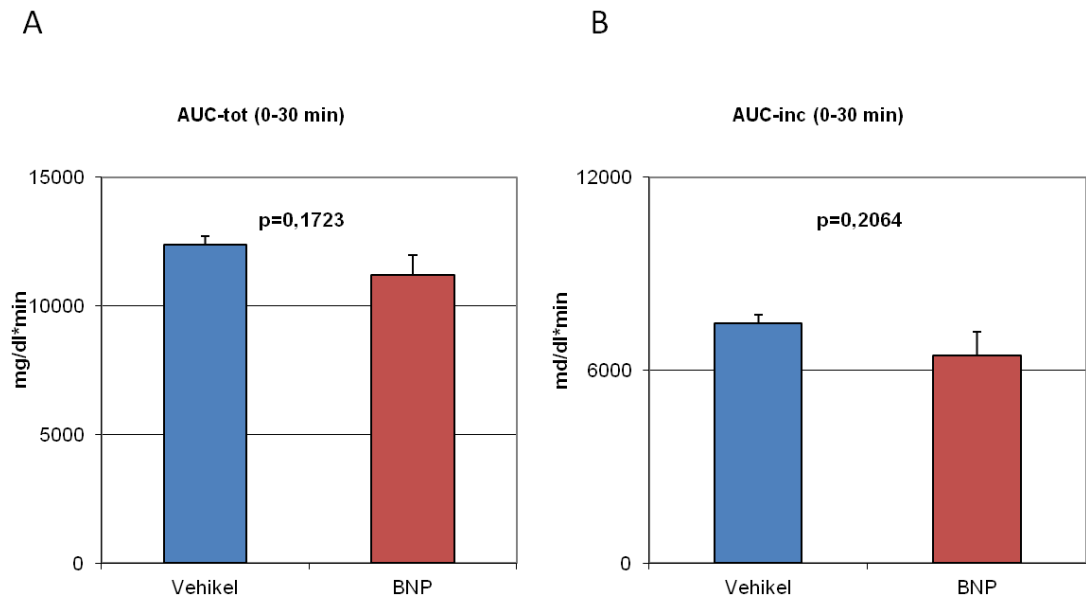
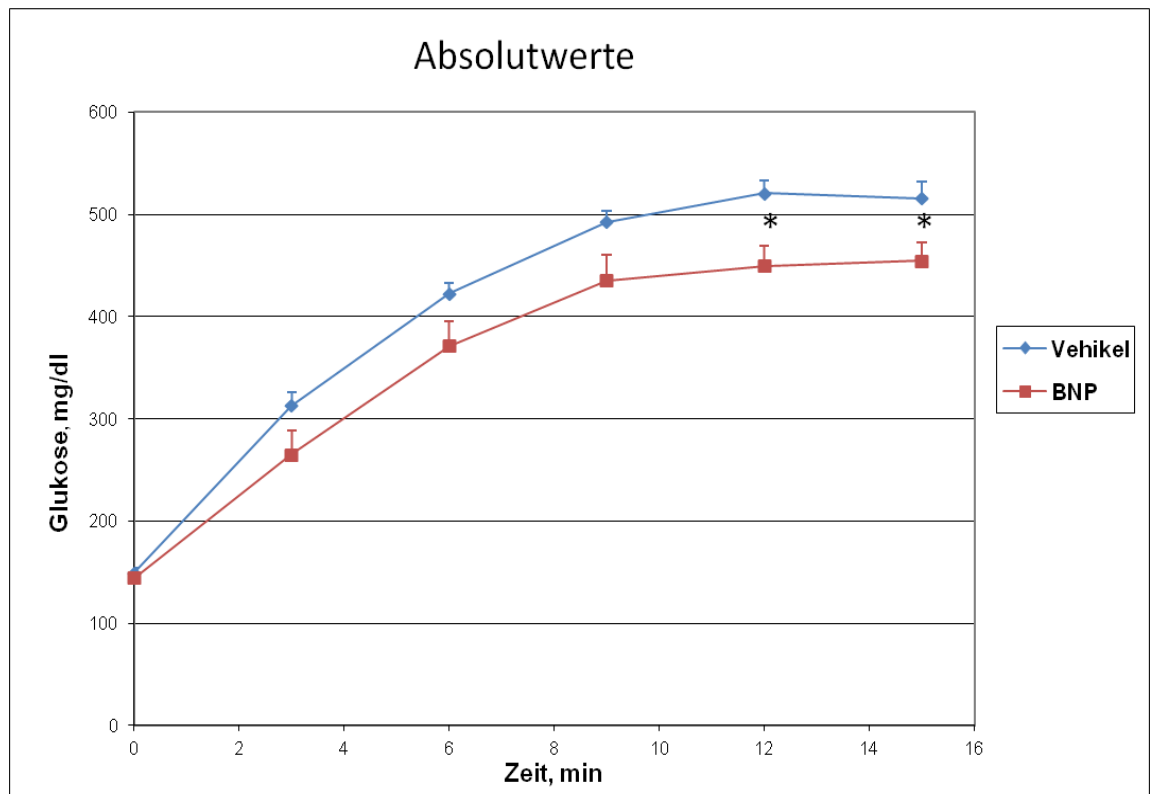


Abbildung 18 Einfluss von 500 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot), (B) inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-inc) im intraperitonealen Glukosetoleranztest von Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 12$

Um die Wirkung von BNP unmittelbar nach Verabreichung besser darstellen zu können, wurde das Protokoll abermals adaptiert. Dabei wurden die Abstände der Blutglukosemessung auf 3 Minuten verkürzt, sowie die Beobachtungsdauer auf 15 Minuten reduziert.

In Minute $t=12$ (Vehikel 521 ± 12 mg/dl vs. BNP $449 \pm 19,9$ mg/dl, $p= 0,0071$) und in Minute $t=15$ (Vehikel $516 \pm 16,5$ mg/dl vs. BNP $455 \pm 17,6$ mg/dl, $p=0,0200$) waren signifikante Unterschiede zwischen den Blutglukosewerten zu sehen (Abbildung 21).



	0	3	6	9	12	15
Vehikel	149	313	422	493	521	516
BNP	144	265	371	435	449	455

Abbildung 19 Einfluss von 500 pmol/kg BNP auf die intraperitoneale Glukosetoleranz von Mäusen.

*... $p < 0,05$ vs. Vehikel, Mittelwert $\pm$ SEM, $n \geq 10$.

Auch der Vergleich der Flächen unter den Glukosekurven zeigten zum ersten Mal signifikante Unterschiede zwischen BNP-behandelten Mäusen und Kontrollen (Abbildung 22).

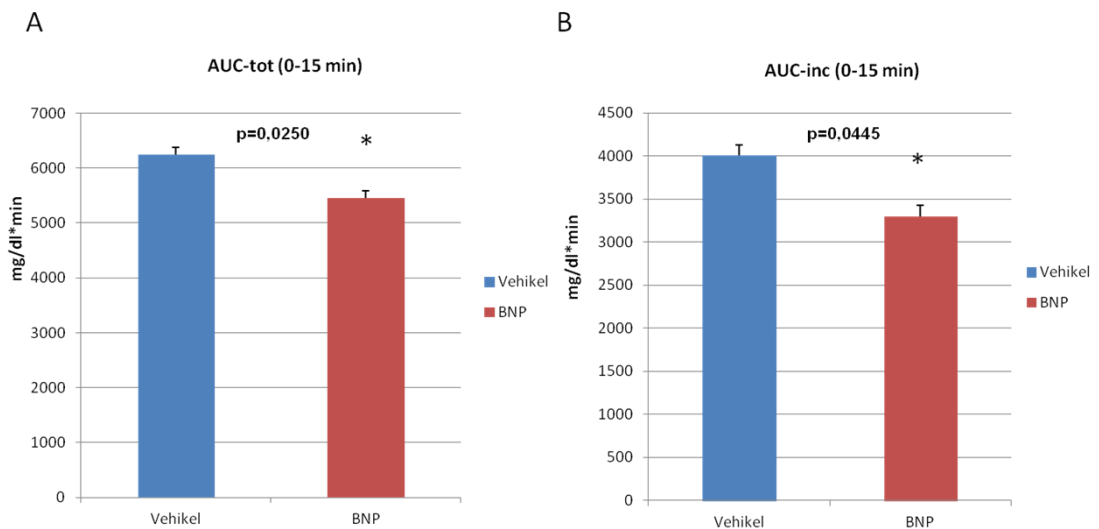


Abbildung 20 Einfluss von 500 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot), (B) inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-inc) im intraperitonealen Glukosetoleranztest von Mäusen. *...p<0,05 vs. Vehikel, Mittelwert ±SEM, n≥10

Die Betrachtung der totalen Fläche unter den Glukosekurven zeigt dabei eine signifikant höhere Glukoseexkursion bei Vehikel als bei BNP (Vehikel 6244 ± 128 mg/dl*min vs. BNP 5460 ± 287 mg/dl*min, p= 0,0250). Die inkrementale Fläche unter den Glukosekurven der BNP-behandelten Mäuse war ebenfalls signifikant kleiner als jene der Kontrollen (Vehikel 4006 ± 125 mg/dl*min vs. BNP 3298 ± 296 mg/dl*min, p= 0,0445).

4.2 OGTT bei Ratten

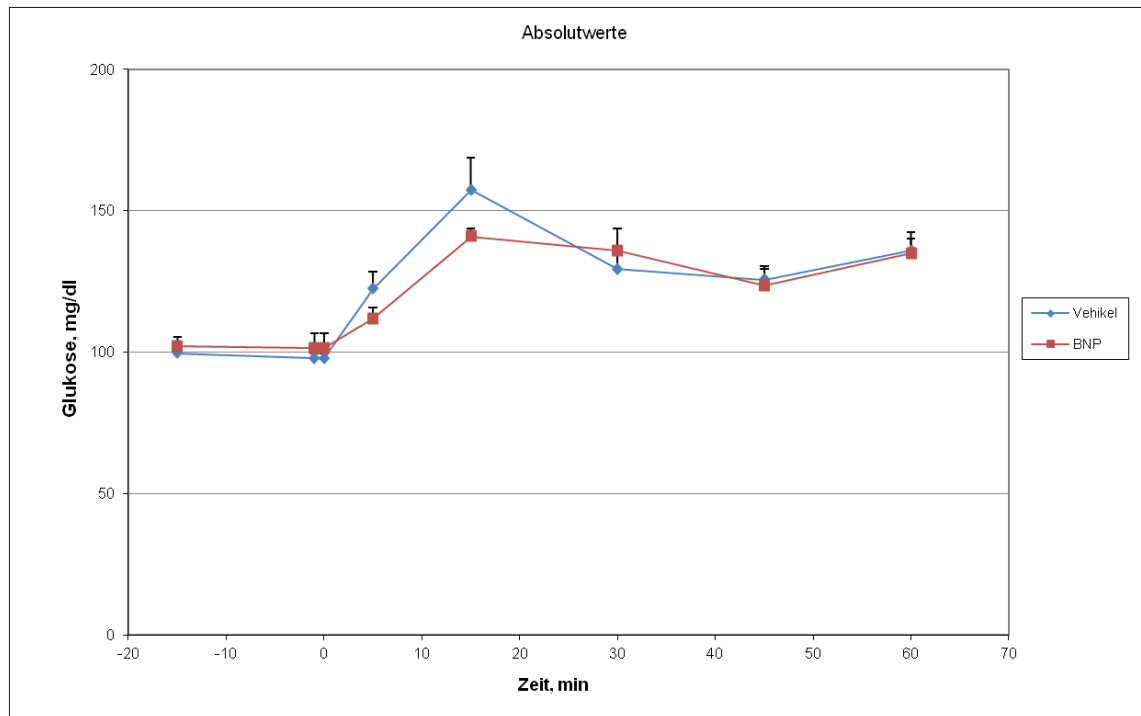
4.2.1 Glukosetoleranz

Um den Einfluss von BNP zu untersuchen, wurde neben den IPGTT bei Mäusen auch ein OGTT bei Ratten durchgeführt. Wie schon in Kapitel 3 beschrieben wurde dabei auch die Insulin-, Glukagon- und GLP-1-Konzentrationen in den gesammelten Plasmen gemessen.

Zugleich wurde der Einfluss von BNP auf die Glukosetoleranz untersucht. Die Glukose wurde in unterschiedlichen Abständen in der Zeit von $t = -15$ bis 60 gemessen.

Die Auswertung der Daten hat kein signifikantes Ergebnis ergeben.

Bei Betrachtung von Abbildung 23 kann man feststellen, dass ein leichter glukosesenkender Trend bei BNP in Minute 15 sichtbar ist, also kurz nach der letzten Verabreichung von BNP bei $t = 10$ min.



	-15	-1	0	5	15	30	45	60
Vehikel	99,5	97,8	97,8	122,4	157,3	129,3	125,5	135,8
BNP	102,0	101,3	101,3	111,8	140,8	135,8	123,5	134,9

Abbildung 21 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die orale Glukosetoleranz von Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM; $n \geq 5$

Der Vergleich zwischen den Flächen unter der Kurve ergab ebenfalls kein signifikantes Ergebnis (Abbildung 24). Nach Betrachtung der inkrementalen Flächen unter der Kurve war der glukosenkende Trend wieder leicht sichtbar (Vehikel $2103 \pm 211,3$ mg/dl*min vs. BNP $1675 \pm 216,6$ mg/dl*min, $p=0,2065$). Nichtsdestotrotz war das nicht signifikant.

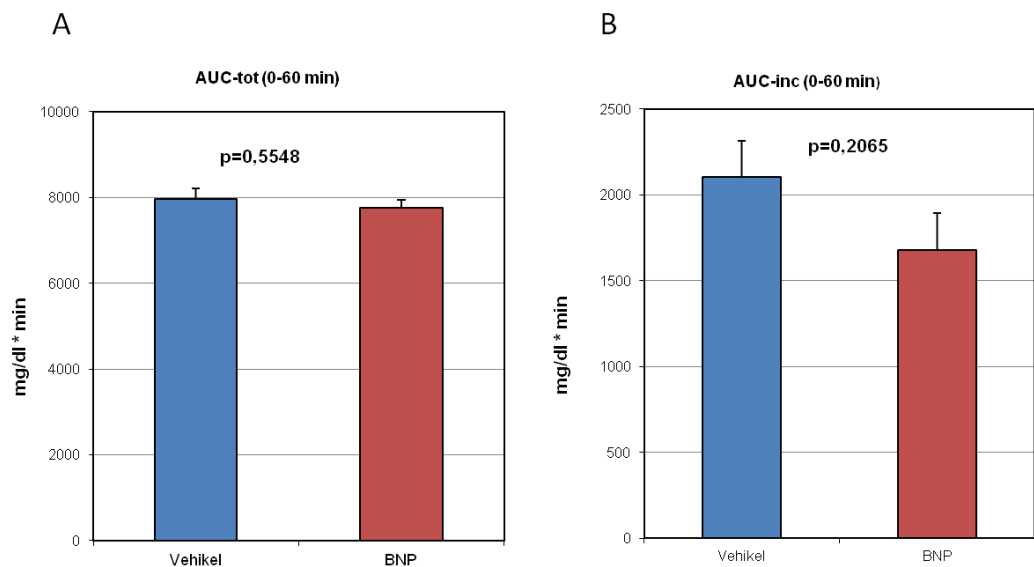


Abbildung 22 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot) und (B) Inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-inc) im oralen Glukosetoleranztest von Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n \geq 5$

4.2.2 Peptidhormone

4.2.2.1 Insulin

Zu den Zeitpunkten, an denen die Glukose gemessen wurde, wurde auch die Insulinkonzentration im Plasma ermittelt. Die Insulinkurven sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Ratten, denen BNP verabreicht wurde, zeigen im Vergleich zu den Kontrollratten einen Trend zu geringerem Plasmainsulin, jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse zeigen einzig in Minute $t=-1$ einen signifikant geringeren Wert in der Gruppe der BNP-behandelten Ratten (BNP $0,610 \pm 0,040 \mu\text{g/dl}$ vs. Vehikel $0,797 \pm 0,063 \mu\text{g/dl}$, $p=0,046$). Dabei ist zu beachten, dass dieser Wert kurz vor Verabreichung des Apfelmus-Glukosegemisches gemessen wurde. Der größte

Unterschied der Mittelwerte von Vehikel- und BNP-Ratten wurde zum Zeitpunkt t=15 min beobachtet (BNP $3,040 \pm 0,822 \mu\text{g/l}$ vs. Vehikel $5,547 \pm 1,126 \mu\text{g/l}$, $p=0,1285$).

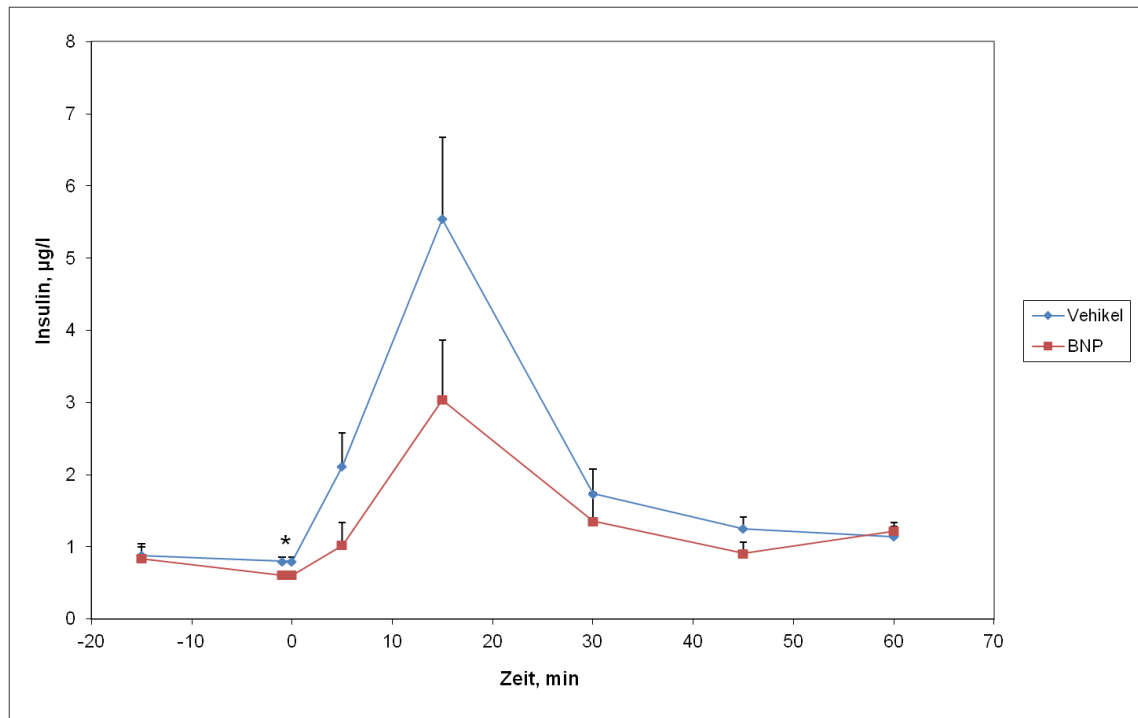


Abbildung 23 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf das Plasmainsulin während des oralen Glukosetoleranztests bei Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM, *... $p < 0,05$ vs. Vehikel; $n \geq 5$

In Abbildung 26 ist der Vergleich zwischen den Flächen unter den Insulinkurven dargestellt. Für die totalen Flächen zeigt BNP einen Insulin senkenden Trend (BNP $90,2 \pm 18,3 \mu\text{g/l} \cdot \text{min}$ vs. Vehikel $140,5 \pm 18,4 \mu\text{g/l} \cdot \text{min}$, $p=0,0903$).

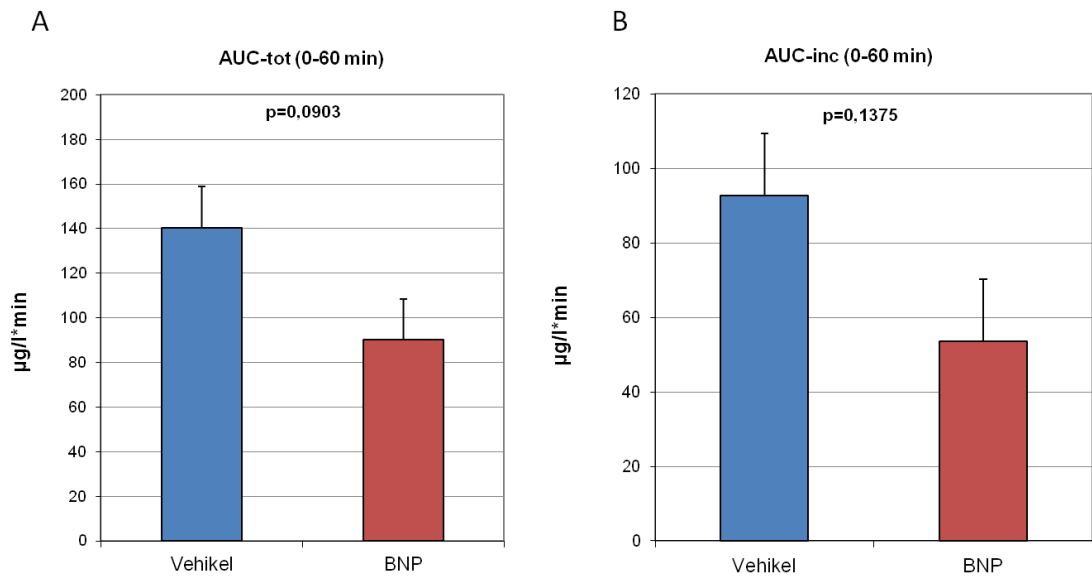


Abbildung 24 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Insulinkurve (AUC-tot) und auf die (B) inkrementale Fläche unter der Insulinkurve (AUC-inc) im oralen Glukosetoleranztest von Ratten.*... $p < 0,05$ vs. Vehikel. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n \geq 5$

4.2.2.2 Glukagon

Im nächsten Schritt wurden die Glukagonproben ausgewertet. Die Ratten, denen BNP verabreicht wurde, zeigen etwas höhere Glukagonwerte im Plasma als Ratten, denen Vehikel verabreicht wurde. Es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Siehe Abbildung 27 und 28). Auch die Flächen unter den Kurven wurden von BNP nicht beeinflusst: AUC-tot: BNP $7357,5 \pm 806,6$ pg/ml vs. Vehikel $6742,5 \pm 496,2$ pg/ml, $p=0,5099$; AUC-inc: BNP $-1087,5 \pm 58,9$ pg/ml vs. Vehikel $-1905,0 \pm 392,2$ pg/ml, $p=0,1818$.

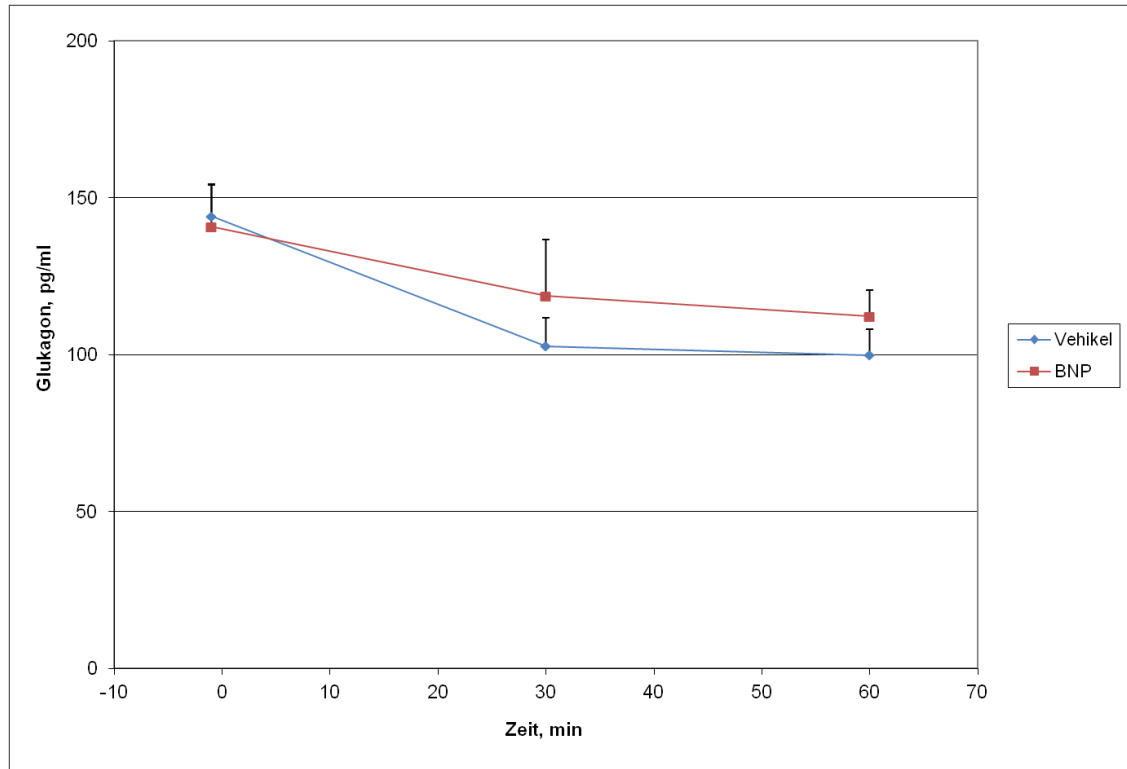


Abbildung 25 Einfluss von 1000pg/ kg BNP auf die Plasmakonzentration von Glukagon von Ratten während eines oralen Glukosetoleranztests bei Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM; $n \geq 4$

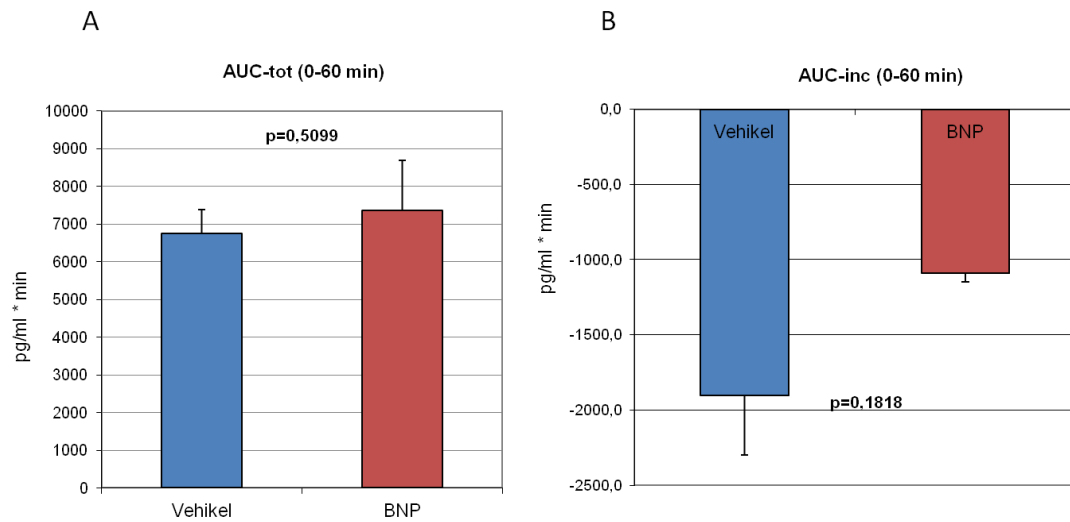


Abbildung 26 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die (A) totale Fläche unter der Glukagonkurve und (B) inkrementale Fläche unter der Glukagonkurve während eines oralen Glukosetoleranztests bei Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM, $n \geq 4$

4.2.2.3 GLP-1

Als letzter Parameter wurde die GLP-1 Konzentration im Plasma gemessen. Zu keinem der gemessenen Zeitpunkte konnte ein Unterschied der GLP-1 Konzentration zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Abbildung 29)

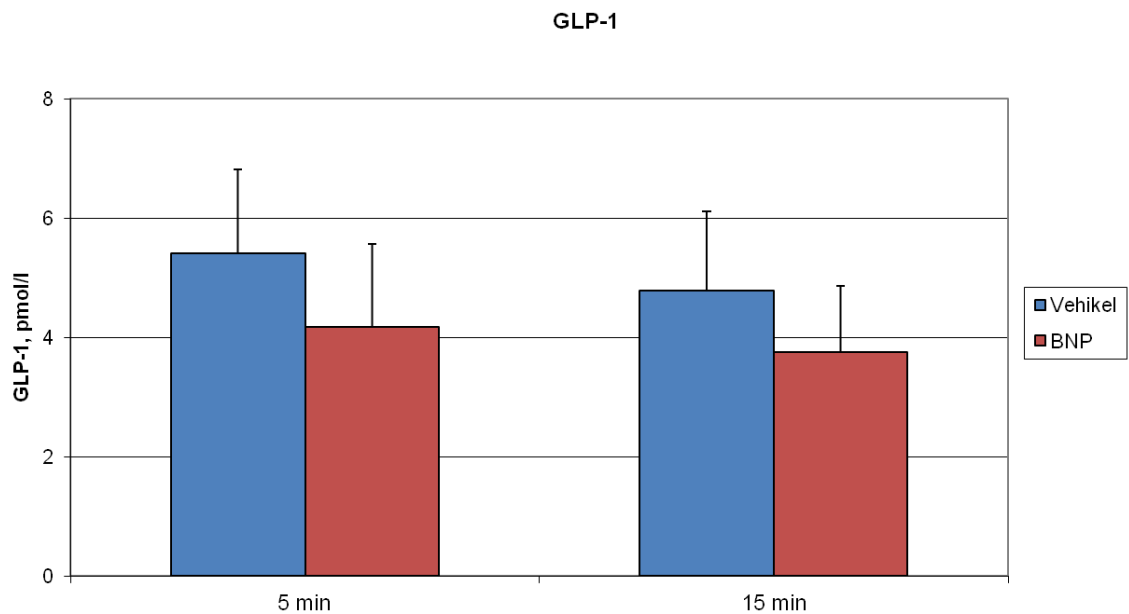


Abbildung 27 Einfluss von 1000 pmol/kg BNP auf die GLP-1 Konzentration im Plasma während eines oralen Glukosetoleranztests bei Ratten. Mittelwerte $\pm$ SEM; $n \geq 5$

4.3 Diskussion

Meine Masterarbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob und wie sich BNP auf die Glukosetoleranz bei Mäusen und Ratten auswirkt. Die Untersuchungen wurden nach dem Erscheinen einer Publikation von Heinisch et al. in die Wege geleitet. In der darin beschriebenen Studie wurde gezeigt, dass BNP bei gesunden Probanden während eines IVGTT die Blutglukose ohne jegliche Auswirkung auf das Plasmainsulin signifikant senken kann [Heinisch et al., 2012].

Um zu untersuchen, ob solche Wirkungen von BNP auch bei Nagern auftreten, habe ich Protokolle benutzt, bei denen Mäuse oder Ratten BNP injiziert wurde. Zuerst wurden an Mäusen IPGTTs durchgeführt, um zu überprüfen, ob BNP auch bei dieser Spezies die Blutglukosekonzentration signifikant senken kann. Weiters habe ich an

Ratten OGTTs durchgeführt, wobei nicht nur die Blutglukosekonzentration überprüft wurde, sondern auch Plasmaproben gesammelt wurden, um die Konzentrationen von Insulin, Glukagon und GLP-1 zu messen. Die Messung dieser Hormone sollte helfen, die Wirkungsmechanismen von BNP zu verstehen.

Glukosetoleranz

In einer Reihe von IPGTTs an Mäusen konnte ich zeigen, dass BNP offenbar eine zumindest geringe senkende Wirkung auf die Blutglukosekonzentration hat. Die Daten, die ich in den ersten Untersuchungen an Mäusen gewonnen hatte, zeigten lediglich einen glukosesenkenden Trend in den ersten Minuten des Glukosetoleranztests. Das Protokoll wurde nach der Analyse dieser ersten Experimente adaptiert und optimiert, um die möglichen Effekte in der frühen Phase des Glukosetoleranztests besser zu erfassen. Im letzten nachfolgenden IPGTT, in dem die Dosis von injiziertem BNP 500 pmol/kg betrug, wurden die Messintervalle auf 3 Minuten verkürzt und letztendlich nur die ersten 15 Minuten nach Injektion untersucht. Hier zeigten sich die deutlichsten Ergebnisse mit signifikanten Wirkungen von BNP auf die Blutglukose. Neben signifikanten Unterschieden zu einigen frühen Messzeitpunkten war auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Flächen unter den Glukosekurven der Kontroll- gegenüber der BNP-Gruppe nachweisbar, was deutlich auf ein Potenzial von BNP hinweist, die Glukosetoleranz zu steigern.

Ich glaube, dass die Ergebnisse von Mäusen insgesamt durchaus als Bestätigung einer Wirksamkeit von BNP in der frühen Phase eines Glukosetoleranztests interpretiert werden dürfen. Das wird auch deutlich, wenn man die Ergebnisse der einzelnen IPGTTs in einer Zusammenschau gepoolt analysiert. Zwar waren Zeitpunkte und Dosierungen bei der BNP-Verabreichung in den einzelnen Experimenten etwas unterschiedlich, nimmt man aber alle Werte zusammen, die zu den Zeitpunkten 5 min und 6 min nach Glukoseinjektion gemessen wurden, so ist der Blutglukosewert der Kontrollmäuse (n=24) mit 400 ± 12 mg/dl doch deutlich höher als jener der BNP-behandelten Tiere

(n=24) mit 345 ± 17 mg/dl ($p=0.01$). Ähnliches gilt für die gepoolten Werte der Zeitpunkte 9 min und 10 min (437 ± 11 gegen 399 ± 14 ; n jeweils 39, $p=0.04$), sowie für die gepoolten Werte des Zeitpunkts 20 min (440 ± 10 gegen 398 ± 16 ; n jeweils 27, $p=0.03$). Für die spätere Phase der Glukosetoleranztests (>20 min) wurde auch in der Zusammenschau kein Hinweis auf BNP-Wirkung gefunden.

Der Befund der Arbeitsgruppe Heinisch et al [Heinisch et al., 2012], dass akute Verabreichung von BNP die Glukosetoleranz gesunder Menschen verbessert, konnte also an Mäusen nachvollzogen und bestätigt werden. Während das BNP bei den Menschen kontinuierlich infundiert wurde, musste es den Mäusen als Bolus injiziert werden. Damit könnte in den Mäuseexperimenten die bekanntermaßen kurze Halbwertszeit von BNP im Blut dazu beigetragen haben, dass die festgestellten Wirkungen auf die ersten Minuten nach BNP-Injektion beschränkt waren. Es ist allerdings anzumerken, dass auch in den Glukosetoleranztests an Menschen - also unter kontinuierlicher BNP-Infusion – die Blutglukose durch BNP vor allem in den ersten Minuten unmittelbar nach Glukoseverabreichung gesenkt war.

Auch beim OGTT an Ratten zeigte sich ein ähnliches Bild im Sinne eines Trends zur Senkung der Glukosekonzentration in der Anfangsphase der Untersuchung. Jedoch konnten in den Experimenten an Ratten keinerlei signifikante Effekte von BNP auf die Blutglukose nachgewiesen werden. So wie bei den Mäusen war ein senkender Trend etwa zwischen Minute 5 und 20 nach Glukosefütterung sichtbar, doch selbst dieser Trend war ca. ab Minute 30 nicht mehr zu sehen, und die Glukosekonzentration im Blut der BNP-injizierten Ratten war sogar etwas höher als im Blut der Vehikelgruppe. Trotz des Mangels an signifikanter Wirkung dürfen die bei den Ratten festgestellten Trends unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Mäusen wahrscheinlich durchaus als weitere Evidenz im Sinne einer leichten glukosesenkenden Wirksamkeit von BNP interpretiert werden. Dies insbesondere, weil auch das Zeitfenster möglicher Wirksamkeit in den ersten Minuten mit den Hinweisen von Menschen und Mäusen übereinstimmte. Anzumerken ist auch, dass die Glukosewerte bei den Ratten stärkere Streuung aufwiesen als bei den Mäusen, was mit der oralen Glukoseverabreichung zu

tun haben mag (bei den Mäusen intraperitoneal). Obwohl überprüft wurde, dass die Ratte zumindest 85% der angebotenen Glukoselösung tatsächlich gefressen hatte, ergibt sich schon bei der oralen Aufnahme eine leichte Variation der aufgenommenen Dosis. Dazu kommt, dass interindividuelle Unterschiede in der genauen Fressgeschwindigkeit und Resorptionsgeschwindigkeit bei oraler Aufnahme zu vergleichsweise mehr Streuung führen können als bei intraperitonealer Injektion.

Peptidhormone und Wirkmechanismus

Neben der Blutglukose wurden im OGTT an den Ratten auch die Plasmakonzentrationen der glukoregulatorischen Peptidhormone Insulin, Glukagon und GLP-1 gemessen, um Hinweise auf eine mögliche Rolle dieser Hormone bei der Vermittlung von BNP-Wirkungen auf die Blutglukose zu erhalten.

Neben der hier angesprochenen Möglichkeit einer Wirkung über Hormone wurden in der Literatur schon andere Hypothesen diskutiert. Dazu zählt, dass BNP die Fähigkeit besitzt, die Permeabilität von Gefäßen zu erhöhen [Welsh and McMurray 2012], was in der Folge dazu führen könnte, dass die im Glukosetoleranztest verabreichte Glukose insbesondere in der Muskulatur schneller aufgenommen werden kann. So könnten bei gleicher Insulinsekretion niedrigere Blutglukosespiegel zu finden sein. In diesem Zusammenhang ist auch anzumerken, dass in BNP-infundierten Probanden Hinweise auf eine Steigerung des initialen Glukoseverteilungsvolumens im Glukosetoleranztest festgestellt wurden [Heinisch et al., 2012].

In einer Studie von Addison et al. wurde gezeigt, dass BNP durch die Verlangsamung der Magenmotilität die Magenentleerung verzögert. Durch eine verzögerte Magenentleerung werden die Nährstoffe verspätet in das Blut aufgenommen, was auch die Glukoseresorption verzögern könnte [Addison et al., 2008]. Dadurch steigt möglicher Weise im Glukosetoleranztest die Blutglukose nicht so rasant an. Eine Senkung der Glukoseresorptionsrate aus dem Darm ist ja auch der Wirkmechanismus

einer Gruppe von antidiabetischen Medikamenten (Alpha-Glukosidaseinhibitoren). Auch bei einem solchen Mechanismus wären reduzierte Glukosewerte ohne hormonelle Vermittlung erklärbar.

Zuletzt ist noch zu bemerken, dass BNP die Harnausscheidung steigern dürfte. Es wäre daher möglich, dass vermehrt Glukose mit dem Harn ausgeschieden wird und deswegen der Glukosespiegel im Blut niedriger ist [Jensen et al., 1998]. Da weder unser Team noch die Gruppe von Heinisch et al. diesen Parameter in die Untersuchungen einbezogen hat, wäre es empfehlenswert bei nachfolgenden Studien die Glukosekonzentration im Harn zu messen. Ein Einfluss von BNP auf die „Nierenschwelle“ für Glukose ist allerdings noch nicht beschrieben worden.

Neben all diesen Möglichkeiten ist freilich auch eine BNP-Wirkung über glukoregulatorische Hormone nicht auszuschließen. In der vorliegenden Studie zeigten Ratten, denen BNP injiziert worden war, im OGTT allerdings bestenfalls einen Trend zu niedrigerer Insulinkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen. Laut Heinisch et al. hat BNP im IVGTT beim Menschen keinerlei Einfluss auf die Funktion der β -Zellen des Pankreas [Heinisch et al., 2012]. Bemerkenswert ist aber, dass ich in den Versuchen an Ratten zum Zeitpunkt $t=-1$ min eine geringe, aber signifikante, Glukosesenkung gefunden habe. Dieser Wert wurde kurz nach BNP-Injektion, aber noch vor Verabreichung des Glukose-Apfelmusgemischs gemessen. Es handelt sich dabei also um einen Einfluss von BNP auf das basale Insulin, was bedeuten würde, dass BNP möglicherweise doch eine geringe Wirkung auf die Insulinfreisetzung der β -Zellen des Pankreas hat. Ob diese Wirkung direkt ist oder indirekt über niedrigere Konzentrationen von zirkulierenden Stimulatoren der Insulinsekretion vermittelt wird (z.B. Glukose), kann aus meinen Daten jedoch nicht unterschieden werden. Fest steht, dass meine Ergebnisse gegen erhöhtes Insulin als Vermittler einer BNP-induzierten Glukosesenkung sprechen.

Burgess et al. haben berichtet, dass BNP die Glukagonsekretion von menschlichen α -Zellen des Pankreas in vitro deutlich steigert [Burgess et al., 2009]. Die

Plasmakonzentration von Glukagon lag in meinen Ratten nach Verabreichung von BNP zwar im Mittel etwas höher als bei den Kontrolltieren, die Daten können auf Basis der vorliegenden statistischen Analyse allerdings keinesfalls als Wirkungsnachweis und wohl auch nicht als „Trend“ betrachtet werden: Selbst der niedrigste p-Wert, der für die inkrementalen Flächen unter der Glukagonkurve errechnet wurde, blieb über $p=0.18$. Auch hier muss betont werden, dass gesteigerte Glukagonfreisetzung bestenfalls höhere Glykämie, aber keinesfalls eine verbesserte Glukosetoleranz erklären könnte.

Ebenso konnte in den Ratten kein Effekt von BNP auf das zirkulierende GLP-1 festgestellt werden. Insgesamt finden sich in den Ergebnissen von Ratten somit keine Hinweise, dass BNP die zirkulierenden Konzentrationen der glukoseregulierenden Peptidhormone Insulin, Glukagon oder GLP-1 beeinflusst - insbesondere nicht in einer Weise, die eine verbesserte Glukosetoleranz erklären könnte. Nachdem in meinem Experiment an Ratten jedoch auch betreffend die Blutglukose nur ein nicht-signifikanter senkender Trend festgestellt werden konnte, kann auf Basis dieses Datensatzes nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass Peptidhormone für die glukosesenkenden Effekte von BNP, die in anderen Protokollen deutlicher erfasst werden konnten, eine Rolle spielen.

Zusammenschau

In Übereinstimmung mit den Daten von BNP-infundierten Menschen konnte also an Nagern eine BNP-induzierte Verringerung der Blutglukosekonzentration in den ersten Minuten eines Glukosetoleranztests gefunden werden. Zwar war nicht in jedem Experiment eine signifikante Verbesserung der Glukosetoleranz nachweisbar, doch waren immer zumindest deutliche Trends zur Glukosesenkung bemerkbar. Gegen Zufallsbefunde spricht insbesondere, dass die Reduktion der Glykämie bei Mensch und Tier immer im selben Zeitfenster auftrat (in den ersten Minuten nach Glukosegabe).

Hinweise auf eine Vermittlung der Effekte durch glukoregulatorische Peptidhormone wurden nicht gefunden.

5 Schlussfolgerung

Folgende wesentliche Schlussfolgerungen können somit aus den Ergebnissen der vorliegenden Diplomarbeit gezogen werden und könnten für nachfolgende Forschungen über die Wirkungen von BNP auf den Glukosestoffwechsel richtungsweisend sein:

1) Peripher verabreichtes BNP hat akute glukosesenkende Effekte.

Eine durch akute BNP-Infusion induzierte Reduktion der Glukoseexkursion im Glukosetoleranztest ist an einer kleinen Gruppe von Probanden schon zuvor beobachtet worden [Heinisch et al., 2012]. In meiner Diplomarbeit konnte ich diesen Effekt im Tierversuch bestätigen, was untermauert, dass das Ergebnis an Menschen wohl kein Zufallsbefund war, sondern dass BNP tatsächlich solche Effekte hat. Die Entdeckung dieser zuvor unbekannten Wirkung beschreibt BNP als ein Hormon, das nicht nur wesentlichen Einfluss auf die Regulation von Herz-Kreislauf-Funktionen hat, sondern zugleich den Glukosestoffwechsel moduliert. Bedenkt man, dass Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus häufig mit Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems einhergehen, ist es wichtig, die mechanistischen Ursachen dieser Zusammenhänge zu verstehen. Die Daten sind somit als Ausgangspunkt für eine Erforschung der Rolle von BNP in den Zusammenhängen zwischen

Glukosestoffwechsel und Herz-Kreislauf-System anzusehen; eine Forschung, die letztendlich zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien führen kann.

2) Die glukosesenkende Wirkung von BNP ist in Nagern nachweisbar.

Von Bedeutung ist auch der Nachweis, dass die glukosesenkende Wirkung von BNP nicht auf den Menschen beschränkt ist, sondern auch bei Spezies zu finden ist, die typischer Weise in der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt werden. Dieser Hinweis, dass BNP in Mensch, Maus und Ratte ähnlich wirkt und daher wohl ähnliche Regelkreise am Werk sind, lässt weiter führende Untersuchungen an den klassischen „Tiermodellen“ sinnvoll und gerechtfertigt erscheinen. Meine Ergebnisse öffnen somit die Türe für tierexperimentelle Untersuchungen zum besseren Verständnis der Rolle von BNP in der Physiologie und Pathophysiologie des Glukosestoffwechsels.

3) Die glukosesenkende Wirkung von BNP dürfte nicht durch glukoregulatorische Peptidhormone vermittelt werden.

Ziel dieser Arbeit war es auch, erste Hinweise für oder gegen eine Vermittlung der glukosesenkenden BNP-Wirkung durch die glukoregulatorischen Peptidhormone Insulin, Glukagon und GLP-1 zu liefern. Nachdem im betreffenden Experiment an Ratten nur ein glukosesenkender Trend von BNP gefunden wurde, sind keine endgültigen Schlüsse möglich. Es ist aber anzumerken, dass die zirkulierenden Konzentrationen von Insulin im Mittelwert unter BNP etwas niedriger waren als bei den Kontrollen, während die zirkulierenden Konzentrationen von Glukagon im Mittelwert etwas höher waren als bei den Kontrollen. Diese Daten gingen also

tendenziell in eine Richtung, die bestenfalls einen glukosesteigernden Effekt verursachen könnten, keinesfalls aber Ursache glukosesenkender Wirkung sein können. Dieser Hinweis gegen eine Vermittlung durch Peptidhormone könnte bei der weiteren Suche nach den Mechanismen der BNP-Wirkung auf den Glukosestoffwechsel hilfreich sein.

6 Zusammenfassung

Zielsetzung: Das vorrangige Ziel dieser Masterarbeit war zu überprüfen, ob das Peptidhormon B-Natriuretic Peptide (BNP) im Glukosetoleranztest eine akute, die Blutglukose senkende Wirkung an Mäusen und Ratten hat. Darüber hinaus sollte gegebenenfalls ein Beitrag zum Verständnis des zu Grunde liegenden Wirkungsmechanismus von BNP geleistet werden, letzteres anhand der Messung der Konzentrationen glukoregulatorischer Hormone im Plasma von BNP-injizierten Ratten.

Methoden: Mäusen wurde intraperitoneal BNP oder physiologische Kochsalzlösung (Kontrolle) sowie Glukose injiziert und im Anschluss die Exkursion der Blutglukosekonzentration dokumentiert (intraperitonealer Glukosetoleranztest). Bezüglich der BNP-Dosis sowie der Injektions- und Messzeitpunkte wurden mehrere unterschiedliche Protokolle umgesetzt. An Ratten wurde ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt, wobei eine Methode für stressfreie intravenöse Injektionen und Blutabnahmen zur Anwendung kam. Neben der Blutglukose wurden die Konzentrationen von Insulin, Glukagon und GLP-1 im Plasma gemessen.

Ergebnisse und Schlussfolgerung: Die in der Literatur für Menschen beschriebene akute blutglukosesenkende Wirkung von BNP wurde auch im intraperitonealen Glukosetoleranztest an Mäusen gefunden. In Ratten war zwar nur ein glukosesenkender Trend feststellbar, insgesamt liefern die Ergebnisse der Studie aber deutliche Evidenz, dass BNP auch in Nagern die Glukosetoleranz verbessern kann. Die Ergebnisse der Messung von glukoregulatorischen Peptidhormonen sprechen gegen eine Vermittlung der BNP-Wirkung über eine Änderung der Insulin-, Glukagon- oder GLP-1-Ausschüttung.

7 Abstract

Aim: The main aim of this master thesis was to investigate, whether the peptide hormone B-Natriuretic Peptide (BNP) has an acute effect on blood glucose in glucose tolerance tests of mice and rats. Moreover, it should help to understand the mechanisms underlying BNP effects by measuring the concentrations of glucoregulatory hormones in plasma of BNP-injected rats.

Methods: Mice were intraperitoneally injected with BNP or saline (control) and glucose, and the subsequent changes of circulating blood glucose concentrations were documented (intraperitoneal glucose tolerance test). Several protocols have been used with different doses of BNP and with different time points of injections and measurements. Furthermore, oral glucose tolerance tests were carried out in rats, whereby a method for stress-free intravenous injections and blood sampling was applied. In addition to blood glucose, plasma concentrations of insulin, glucagon and GLP-1 were measured in the rats.

Results and conclusion: An acute glucose lowering effect of BNP, as previously described for humans, was also found in intraperitoneal glucose tolerance tests in mice. In rats, only a glucose lowering trend was observed in oral glucose tolerance tests. Altogether, the results of the study provide evidence that BNP has a potential to improve glucose tolerance also in rodents. Measurements of peptide hormones in BNP-exposed rats did not suggest that the BNP-effects are mediated by changes of circulating insulin, glucagon or GLP-1.

8 Literaturverzeichnis

ADDISON A, GOWER R W, LANDON S C, DIETZ R J. B-Type natriuretic peptide decreases gastric emptying and absorption. *Exp Biol Med*. 2008; 233: 475-482

BAN K, NOYAN-ASHRAF H M, HOEFER J, BOLZ S-S, DRUCKER D J, HUSAIN M. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and –independent pathways. *circulation*. 2008; 117: 2340-2350

BÖHM B O, FRITSCHÉ A, FÜRCHTENBUSCH M, GÖLZ S, MARTIN S. Definition und Klassifikation des Typ-1-Diabetes. In: Therapie des Typ-1-Diabetes (MATTHAEI S, KELLERER M.) Hrsg.: Deutsche Diabetes Gesellschaft. 2011; 14-16

BURGESS M D, MOORE K D, CATER G M, ALLI C S, GRANDA C S, ICHII H, RICORDI C, GOWER WR. C-Type natriuretic peptide receptor expression in pancreatic alpha cells. *Histochem Cell Biol*. 2009; 132: 95-103

CARDARELLI R, LUMICAO G T. B-Type natriuretic peptide: a review of 1st diagnostic, prognostic, and therapeutic monitoring value in heart failure for primary care physicians. *JABFP*. 2003; 16: 327-331

CHAVES B E, HENRY R R. Type 2 diabetes: insulin resistance, beta cell dysfunction, and other metabolic and hormonal abnormalities. In: Clinical diabetes translating research into practice. Elsevier, Philadelphia, USA. 2006: 21-34

GANTEN D, RUCKPAUL K, KÖHRLE J. Gastrointestinale Hormonsysteme und ihre Regulation. In: Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen. Springer Berlin Heidelberg, Deutschland. 2006; 272-275

HÄRING H-U, GALLWITZ B, MÜLLER – WIELAND D, USADEL K-H, MEHNERT H. Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Typ 2 Diabetes. In: Diabetologie in Klinik und Praxis. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland. 83

HEINISCH B B, VILA G, RESL M, RIEDL M, DIEPLINGER B, MUELLER T, LUGER A, PACINI G, CLODI M. B-type natriuretic peptide (BNP) affects the initial response to intravenous glucose: a randomised placebo-controlled cross-over study in healthy men. Diabetologia. 2012; 55: 1400-1405

HORN F. Hormone, Energieversorgung. In: Biochemie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland. 2005; 348-377

HÜRTER P, DANNE T. Normale und pathologische Physiologie des Inselzellsystem. In: Diabetes bei Kindern und Jugendlichen: Grundlagen – Klinik – Therapie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, Deutschland. 2005; 106-109

JENSEN T K, CARSTENS J, PEDERSEN B E. Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in human. A m J Physiol. 1998; 274: R63-R72

LEDOCHOWSKI M, Metabolismus. In: Klinische Ernährungsmedizin. Springer, New York. 2010; 474-476

LÖFLER G, Insulin ist das wichtigste anabole Hormon. In: Basiswissen Biochemie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005; 510-515

MCCULLOUGH A P, OMLAND T, MAISEL S A. B-Type Natriuretic Peptides: A diagnostic breakthrough für clinicians. Rev Cardiovasc Med. 2003; 4: 72-80

MIYASHITA K, ITOH H, TSUJIMOTO H, TAMURA N, FUKUNAGA Y, SONE M, YAMAHARA K, TAURA D, INUZUKA M, SONOYAMA T, NAKAO K. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. Diabetes. 2009; 58: 2880-2892

NOKOFF N J. The interplay of autoimmunity and insulin resistance in type 1 diabetes. *Discovery Medicine*. 2012; 13: 115-122

PANDIT K, MUKHOPADHYAY P, GHOSH S, CHOWDHURY S. Natriuretic peptides: diagnostic and therapeutic use. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2011; 15: 345-353

PEACOCK F W. Heart failure in the emergency department; diagnosis with natriuretic peptides; critical pathways in cardiovascular medicine (Cannon C P, O’Gara T P) Lippincott Williams and Wilkins; 2007; 48-49

PETROVSKY N, WINTER W E, SCHATZ D A. Type 1 Diabetes: immunology and genetics. In: *Clinical Diabetes Translating Research into Practice*. Elsevier, Philadelphia, USA. 2006: 6-20

PFISTER R, ERDMANN E, SCHNEIDER C A. Die natriuretischen peptide BNP und NT-pro-BNP- die „neuen Troponine“ der Herzinsuffizienz? *Dtsch Med Wochenschr*. 2003; 128: 1007-1012

PFISTER R, SHARP S, LUBEN R, WELSH P, BARROSO P, SALOMAA V, MEIRHAEGHE A, KHAW K-W, SATTAR N, LANGENBERG C, WAREHAM N J. Mendelian randomization study of B-Type natriuretic peptide and type 2 diabetes: evidence of causal association from population Studies. *PLoS Med*. 2011; 8: 1-11

POTTER L R, YODER R A, FLORA R D, ANTOS K L, DICKEY M D. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic function and therapeutic application. cGMP: generators, effectors and therapeutic implications (Schmidt et al.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg 2009; 341-358

RASK E, OLSSON T, SÖDERBERG S, HOLST J J, TURA A, PACINI G, AHRÉN B. Insulin secretion and incretin hormones after oral glucose in non-obese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism*. 2004; 53: 624-631

SENGENÉS C, BERLAN M, DE GLISEZINSKI I, LAFONTAN M, GALITZKY J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *The FASEB Journal*. 2000; 14: 1345-1351

SCHAUDER P, OLLENSCHLÄGER G. Kapitel 9. In: *Ernährungsmedizin Prävention und Therapie*. Urban und Fischer, München, Deutschland. 2006; 831-834

SILBERNAGL S, AGAMEMNON D. Kohlenhydratstoffwechsel, Pankreashormone. In: *Taschenatlas Physiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007; 284-287

SUNDELL J, ENGBLOM E, KOISTINEN J, YLITALO A, LAINE H, KALLIOKOSKI R, AIRAKSINEN J K E, BOX J J, KNUUTI J. increased B-type natriuretic peptide concentration is associated with reduced coronary vasoreactivity in patients with dilated cardiomyopathy but not in healthy subjects. *ISRN Cardiology*. 2011;4: 1-5

THEWS G, MUTSCHLER E, VAUPEL P: Pankreas und Blutzuckerregulation. In: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart, Deutschland. 1999; 512-520

VAHL P T, PATY W B, FULLER B D, PRIGEON R L, D'ÁLESSIO D, Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 1772-1779

VILSBOLL T, KRARUP T, DEACON C F, MADSBAD S, HOLST J J. Reduced postprandial concentration of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *diabetes*. 2001; 50: 609-613

WANG Y, XU L Y, LAM K S, LU G, COOPER G J, XU A. Proteomic characterization of human serum proteins associated with the fat-derived hormone adiponectin. *Proteomics*. 2006; 6: 3862-3870

WELSH P, MCMURRAY J J. B-type natriuretic peptide and glycemia: an emerging cardiometabolic pathway? *Diabetologia*. 2012; 55: 1240-1243

WEYER C, FUNAHASHI T, TANAKA S, HOTTA K, MATSUZAWA Y, PRATLAY R E, TATARANNI A P. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. JCEM. 2001; 96: 1930-1935

Internetseiten:

- (1) http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/index.html
- (2) <http://www.idf.org/diabetesatlas/>
- (3) http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241594934_eng.pdf
- (4) <http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Insulin>
- (5) http://www.betacell.org/content/articlepanelview/article_id/1/panel_id/3
- (6) <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/614hormone.html>
- (7) <http://www.cyberounds.com/cmecontent/art373.html?pf=yes>

CURRICULUM VITAE

Angaben zur Person

Vor- und Nachname:	Lidia Alicja Surman
Geburtstag:	23.02.1988
Geburtsort:	Andrychów
Staatsangehörigkeit:	Polen

Ausbildung

2010 – 2013	Masterstudium Ernährungswissenschaften; Schwerpunkt : Molekulare Ernährung
2006 - 2010	Bakkalaureatstudium Ernährungswissenschaften
2000 - 2006	Maria Skłodowska-Curie Lyzeum in Andrychów, Schwerpunkt: Biologie, Chemie, Physik (<i>Abschluss: Matura in Deutsch ,vertiefend in Chemie und Biologie)</i> Klassensprecherin

Praktikumserfahrungen

1/11/2012 – 30/6/2013	Gelegentliche Mitarbeit an Experimenten eines Kooperationsprojekts zwischen MedUniWien und 55pharma
21/06/2010 – 30/09/2010	Henkel CEE Erdbergstraße 29 Qualitätssicherung, Verpackungslabor
10/08/2009 - 2/09/2009	Medizinische Universität Wien 1090 Wien, Währinger Gürtel 18-20 Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie Christian Doppler Labor für Molekulare Carzinom und Chemoprävention

Veröffentlichungen/Mitautorenschaften

R. Evstatiev; A. Bukaty; L. Surman; W. Schmid; HM. Kvasnicka; S. Kulnigg; C. Gasche.
Thrombocytosis in IBD: Iron Deficiency Driving Megakaryopoiesis and Platelet
Aggregation