



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

Wirkung von Erythropoietin auf den Glukosestoffwechsel männlicher und weiblicher Mäuse

verfasst von / submitted by

Pörtl Lisa

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2020 / Vienna, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Dr. Clemens Fürnsinn

Zusammenfassung

Hintergrund und Zielsetzung: Diabetes mellitus vom Typ 2 ist durch erhöhte Blutglukose definiert und wird durch Übergewicht sowie Bewegungsarmut gefördert. Weltweit sind viele Millionen Patienten von dieser Krankheit betroffen, was eine der großen medizinischen Herausforderungen der Gegenwart darstellt. Die vorliegende Arbeit basiert auf Befunden in adipösen Mäusen, die bei Haltung unter Hypoxie eine gewichtsunabhängige Verbesserung von Blutglukose und Insulinsensitivität gezeigt haben. Ein möglicher Vermittler dieser Effekte könnte das unter Hypoxie vermehrt produzierte und freigesetzte Peptid Erythropoietin (EPO) sein. Das primäre Ziel dieser Studie war daher zu erforschen, ob regelmäßige EPO-Injektionen zu einer gewichtsunabhängigen Verbesserung der Insulinsensitivität und zum Absinken der Blutglukose führen.

Material und Methode: C57BL/6J-Mäuse, die durch Fettdiät (HFD) adipös waren, erhielten für zwei Monate wöchentlich drei intraperitoneale Injektionen von EPO (300 U/kg). Blutglukose, Glukosetoleranz, Plasmainsulin und andere Stoffwechselfparameter wurden dokumentiert. Um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede zu erfassen, wurden weibliche und männliche Mäuse untersucht.

Ergebnisse: Zuzufolge der EPO-Behandlung war der Hämatokrit in beiden Geschlechtern deutlich erhöht (Kontrolle vs. EPO, %: ♀ 43 ± 1 vs. 63 ± 2 , $p < 0,0001$; ♂ 44 ± 1 vs. 69 ± 1 , $p < 0,0001$). Verfütterung von HFD bewirkte bei weiblichen Mäusen deutlich geringere Adipositas als bei männlichen. Im Gegensatz zu vorangehenden Berichten hatte EPO allerdings keinerlei Wirkung auf das Körpergewicht der Mäuse (Kontrolle vs. EPO, Gewichtszunahme über zwei Monate, g: ♀ $+8,4 \pm 0,5$ vs. $+7,3 \pm 0,8$, n.s.; ♂ $+4,9 \pm 0,7$ vs. $+5,1 \pm 0,5$, n.s.). Die Injektionen führten dennoch in beiden Geschlechtern zu einer starken Verbesserung der Nüchternblutglukose (Kontrolle vs. EPO, mg/dl: ♀ 139 ± 5 vs. 112 ± 9 , $p = 0,005$; ♂ 173 ± 7 vs. 108 ± 9 , $p < 0,0001$) und Glukosetoleranz (Kontrolle vs. EPO, AUC, min*g/dl: ♀ 34 ± 1 vs. 24 ± 1 , $p < 0,0001$; ♂ 45 ± 1 vs. 28 ± 2 , $p < 0,0001$). Auch die Hyperinsulinämie der adipösen Mäuse wurde unter EPO-Injektionen vermindert (Kontrolle vs. EPO, pmol/l: ♀ 85 ± 16 vs. 35 ± 9 , $p = 0,03$; ♂ 712 ± 152 vs. 185 ± 32 , $p = 0,009$), was auf verbesserte Insulinsensitivität hinweist.

Schlussfolgerung:

In adipösen Mäusen hat regelmäßige Behandlung mit EPO sehr starke blutglukosesenkende Wirkung, wobei in der vorliegenden Studie erstmals nachgewiesen wurde, dass dies ein direkter Effekt ist, also nicht bloß die indirekte Wirkung eines etwaigen Gewichtsverlusts. EPO ist daher als möglicher Vermittler einer Hypoxie-bedingten Verbesserung der Glukosehomöostase anzusehen. Weibliche Mäuse entwickeln unter HFD deutlich weniger ausgeprägte Adipositas als männliche, die Effekte von EPO auf die Blutglukosehomöostase sind aber in beiden Geschlechtern gleichermaßen festzustellen.

Abstract

Background and objective: Diabetes mellitus type 2 is defined by elevated blood glucose and can result from overweight and sedentary lifestyle. World widely many millions of patients are afflicted by this life threatening disease, which is regarded as one of the major current medical challenges in developed countries. The present study is based on findings that life under hypoxia improves blood glucose and insulin sensitivity in obese mice. A potential mediator of such actions is the peptide erythropoietin (EPO), the production and release of which increases in response to hypoxia. This study therefore primarily aimed to unravel potential weight-independent effects of regular EPO injections on the homeostasis of blood glucose.

Material and methods: C57BL/6J mice, which were obese due to a high fat diet (HFD), received three intraperitoneal injections of EPO (300 U/kg) per week for two months. Blood glucose, glucose tolerance, plasma insulin and further metabolic parameters were documented. To pinpoint possible sex-specific differences, both male and female mice were examined.

Results: As a result of the EPO treatment, hematocrit increased distinctly in both sexes (control vs. EPO, %: ♀ 43 ± 1 vs. 63 ± 2 , $p < 0,0001$; ♂ 44 ± 1 vs. 69 ± 1 , $p < 0,0001$). Feeding HFD caused less severe obesity in female than male mice. In contrast to preceding reports from other laboratories, EPO lacked effects on body weight of both, female and male mice (control vs. EPO, weight gain after two months, g: ♀ $+8,4 \pm 0,5$ vs. $+7,3 \pm 0,8$, n.s.; ♂ $+4,9 \pm 0,7$ vs. $+5,1 \pm 0,5$, n.s.). Nevertheless, EPO caused marked improvement in fasting blood glucose (control vs. EPO, mg/dl: ♀ 139 ± 5 vs. 112 ± 9 , $p = 0,005$; ♂ 173 ± 7 vs. 108 ± 9 , $p < 0,0001$) and glucose tolerance (control vs. EPO, AUC, min*g/dl: ♀ 34 ± 1 vs. 24 ± 1 , $p < 0,0001$; ♂ 45 ± 1 vs. 28 ± 2 , $p < 0,0001$). EPO also ameliorated hyperinsulinemia in the obese mice (control vs. EPO, pmol/l: ♀ 85 ± 16 vs. 35 ± 9 , $p = 0,03$; ♂ 712 ± 152 vs. 185 ± 32 , $p = 0,009$), which indicated improvement of insulin sensitivity.

Conclusions: In obese mice, regular treatment with EPO has a distinct blood glucose lowering effect. The present study is the first to show that this decrease in blood glucose is a direct effect, i.e. more than the indirect consequence of weight loss. Hence, EPO is to be regarded as a potential mediator of hypoxia-induced improvement of blood

glucose homeostasis. While female mice fed HFD develop less distinct obesity than males, the effects of EPO on blood glucose occur in both sexes.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Regulation der Blutglukose	1
1.2. Insulin	2
1.2.1. Biosynthese	2
1.2.2. Blutglukosesenkende Wirkung von Insulin	2
1.3. Definition Diabetes	4
1.3.1. Typ-1-Diabetes	4
1.3.2. Typ-2-Diabetes	5
1.3.3. Gestationsdiabetes	6
1.3.4. LADA (latent autoimmune diabetes with adult onset)	6
1.3.5. MODY (maturity onset diabetes of the young).....	7
1.4. Diagnose.....	7
1.4.1. Nüchternblutglukose und Gelegenheitsplasmaglukose.....	8
1.4.2. Oraler Glukosetoleranztest	9
1.4.3. HbA1c	9
1.5. Diabetische Akut- und Spätkomplikationen	10
1.6. Möglichkeiten der Behandlung.....	11
1.6.1. Typ-1-Diabetes	11
1.6.2. Typ-2-Diabetes	11
1.7. Erythropoietin	12
1.7.1. Definition	12
1.7.2. Wirkmechanismen.....	13
1.7.3. Nebenwirkungen	16
1.7.4. Doping.....	16
2. Zielsetzung	18
3. Materialien und Methoden.....	19
3.1. Versuchstiere und Haltung.....	19
3.2. Versuchsablauf und Protokoll	20
3.2.1. Interventionen und Versuchsgruppen	20
3.2.2. Messungen	21
3.3. Messmethoden und Analytik	21
3.3.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme	21

3.3.2. Körperzusammensetzung.....	22
3.3.3. Nüchternblutglukose	22
3.3.4. Plasmainsulin und HOMA-Index.....	23
3.3.5. Glukosetoleranztest.....	23
3.3.6. Hämatokrit.....	24
3.3.7. Terminales Sammeln von Plasma- und Gewebeproben	24
4. Ergebnisse	26
4.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme.....	26
4.2. Körperzusammensetzung	28
4.3. Hämatokrit	30
4.4. Basalglykämie	31
4.5. Intraperitonealer Glukosetoleranztest	33
4.6. Plasmainsulin und HOMA-Index	38
5. Diskussion.....	41
6. Schlussfolgerung	45
7. Danksagung	46
8. Literaturverzeichnis.....	47
9. Abbildungsverzeichnis.....	51

1. Einleitung

1.1. Regulation der Blutglukose

Kohlenhydrate werden über die Nahrung dem Körper zugeführt und im Darm durch Amylasen und Disaccharidasen zu Monosacchariden abgebaut. Daraufhin gelangen sie durch aktiven Transport über die Darmwand in den Blutkreislauf, über den sie letztlich zu den Körperzellen transportiert werden. Glukose ist ein wichtiger Energielieferant, unter anderem zur Bewerkstelligung der Stoffwechselvorgänge von Muskel-, Fett-, Nerven- und Leberzellen. An dieser Stelle wird das Hormon Insulin benötigt. Als Antwort auf die steigende Blutglukose wird verstärkt Insulin ans Blut abgegeben. Insulin als blutglukosesenkendes Hormon bewirkt eine Erhöhung der Glukoseaufnahme im Fettgewebe und im Muskel, wobei die Leberzelle Glukose insulinunabhängig aufnehmen kann. Glukose wird über entsprechende insulinabhängige oder insulinunabhängige Transporter in die Zellen aufgenommen. Nach Aufnahme in die Zelle bewirkt Insulin die Speicherung von Glukoseeinheiten in Form von Glykogen (vgl. Bopp, 2001).

Aufgrund einer längeren Fastenperiode sinkt die Blutglukose und in der Folge das Plasmainsulin ab, was ein Signal an die Leber ist, vermehrte Glykogenolyse zu betreiben und damit Glukose aus den Speichern ins Blut abzugeben und anderen Organen zur Verfügung zu stellen. Auch die Gluconeogenese (Bildung von Glukose aus anderen Vorläufermolekülen, z.B. Aminosäuren, Laktat) wird durch Absinken der Insulinkonzentration und vermehrte Ausschüttung von Glukagon (Gegenspieler von Insulin) stimuliert. Glukagon fördert die Glykogenolyse und somit die Bereitstellung von Glukose bei hypoglykämischen Zuständen.

Aufgrund dieser Regulationsmechanismen wird im gesunden Organismus die Blutglukosekonzentration in einem engen Zielbereich gehalten, was man als Blutglukosehomöostase bezeichnet (vgl. Robbers et al., 1981).

1.2. Insulin

1.2.1. Biosynthese

Der Synthese- und Speicherort von Insulin sind die β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas. Durch Transkription entsteht die mRNA, die das Präproinsulin codiert, bestehend aus A- und B-Kette, C-Peptid und Signalsequenz. Letztere wird beim Einschleusen ins Endoplasmatische Retikulum abgespalten. Bei Verpackung in Vesikel und Transport im Golgi-Apparat wird das C-Peptid abgespalten und es resultiert das fertige Insulin. Insulin besteht aus einer A- und B-Kette und drei Disulfidbrücken (vgl. Müller-Esterl et al., 2011).

1.2.2. Blutglukosesenkende Wirkung von Insulin

Ein Stimulator der Insulinfreisetzung ist die erhöhte Blutglukose. Glukose wird von den β -Zellen des Pankreas durch erleichterte Diffusion über GLUT-2-Transporter aufgenommen. Durch das Enzym Glukokinase entsteht aus Glukose Glukose-6-phosphat. Im weiteren Verlauf der Glykolyse und Glukoseoxidation entsteht intrazellulär der Energieträger ATP. Dies bewirkt eine Schließung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle der Zellmembran. Es folgt eine Depolarisation der Zellmembran, da weniger Kalium aus der Zelle fließen kann. Das ist das Signal für die Öffnung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle, Kalzium kann vermehrt in die Zelle fließen und steigt somit intrazellulär an. Am Endoplasmatischen Retikulum sitzen zusätzlich Kalzium-abhängige Kanäle, welche somit öffnen und weiteres Kalzium in das Zytoplasma abgeben. Dieses Signal löst die Freisetzung von Insulin aus der β -Zelle ins Blut aus (Exozytose). „Das Signal ‚erhöhte Glukosekonzentration‘ wird also in einem Mehrstufenprozess in das Signal ‚vermehrte Insulinausschüttung‘ gewandelt.“ (Abbildung 1; Müller-Esterl, 2011)

Über den Blutkreislauf gelangt Insulin zu seinen Zielzellen wie den Hepatozyten der Leber, welche einen Insulinrezeptor besitzen. Die Bindung von Insulin an seinen dimeren Rezeptor löst eine Signaltransduktionskaskade über den MAP-Kinaseweg aus, was die Expression insulinsensitiver Gene fördert.

Über MAP-Kinase unabhängige Wege wird vermehrter Einbau von Glukose in den Speicher Glykogen angeregt und die Glykogenolyse gehemmt. Insulin fördert auch den Abbau von Glukose über die Glykolyse, hemmt ihre Neubildung durch Glukoneogenese in der Leber und senkt somit effektiv die Blutglukosekonzentration.

Insulin beeinflusst auch den Fettstoffwechsel der Hepatozyten über Steigerung der Lipogenese. Im Zuge dessen werden vermehrt freie Fettsäuren synthetisiert und in Triglyzeride eingebaut. Gleichzeitig senkt Insulin die Lipolyse und es resultiert Fettspeicherung.

In den Adipozyten und Muskelzellen bewirkt Insulin die Translokation von Glukosetransportern (GLUT4-Transporter) an die Zellmembran. Steigt die Blutglukose, so kann über GLUT4-Transporter vermehrt Glukose aufgenommen werden. Auch hier wird vor allem die Glykogensynthese angeregt, es steigt auch die Lipidspeicherung und Glukoseoxidationsrate.

Grundsätzlich ist Insulin somit ein anaboles Hormon (vgl. Müller-Esterl et al., 2011).

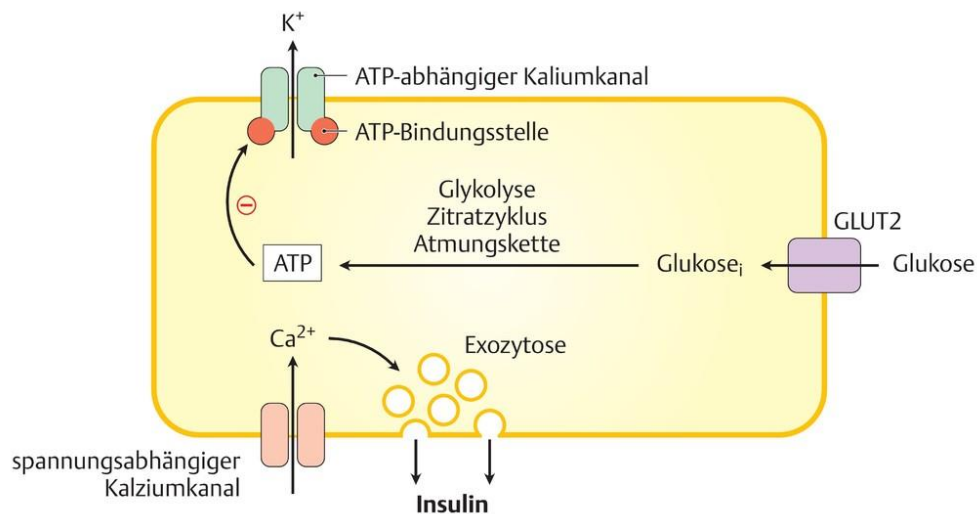


Abbildung 1: Mechanismus der Glukose-abhängigen Insulinsekretion (Behrends et al., 2012)

1.3. Definition Diabetes

Der Name der Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus (deutsch „Zuckerharnruhr“) leitet sich von einem Defekt im Kohlenhydratstoffwechsel ab, der zu einer hohen Glukosekonzentration im Blut und im Harn führt. Dabei können jedoch auch andere wichtige Stoffwechselwege gestört sein, wie zum Beispiel der Fett- und Proteinstoffwechsel (vgl. Robber et al., 1981).

Die Diabetes mellitus ist definiert durch eine Hyperglykämie, die langfristig zu schweren Spätschäden an Organen und Geweben führen kann. Deshalb ist es sehr wichtig, die Blutglukose durch eine entsprechende Therapie genau einzustellen.

Diabetes mellitus lässt sich in die zwei häufigsten Formen, nämlich Typ-1- und Typ-2-Diabetes, und einige Sonderformen (z.B. MODY, LADA und Gestationsdiabetes) gliedern (vgl. Bopp, 2001).

1.3.1. Typ-1-Diabetes

Die Entwicklung von Typ-1-Diabetes ist Folge einer Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen mit folgendem Insulinmangel. Weiters unterteilt man diese Form des Diabetes in zwei Untergruppen, Typ 1a und Typ 1b:

Bei Typ-1a-Diabetes entwickelt der Körper Antikörper, die gegen die insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln oder gegen Insulin gerichtet sind (Autoimmunerkrankung). Eine Entzündungsreaktion in der Bauchspeicheldrüse führt in weiterer Folge zu einer Zerstörung dieser β -Zellen. Erst ab einem Verlust von 80-90% der β -Zell-Masse entsteht ein klinisch relevanter Insulinmangel. Kennzeichnend für diesen Typ sind Insulitis (Entzündung der Inselzellen) und Autoantikörper (Inselzellantikörper = ICA, Glutamatdecarboxylase-Antikörper = GAD-AK, Zinktransporter-ZnT8-Antikörper, Insulinautoantikörper = IA-AK und Tyrosin-Phosphatase-2-Antikörper = IA-2-AK).

Ursache von Typ-1a-Diabetes ist eine genetische Veranlagung, aber auch Umweltfaktoren und Virusinfektionen dürften begünstigende Faktoren sein. Risikofaktoren, die den Verlust der β -Zellen beschleunigen können, sind wiederum Virusinfektionen, Immunstimulatoren, Stilldauer unter 3 Monate und

Ernährungsfaktoren wie zum Beispiel Kuhmilch und Vitamin-D-Mangel (vgl. Bopp, 2001; vgl. Hien et al., 2013; vgl. Schatz et al., 2014).

Der Typ-1b-Diabetes kommt weniger häufig vor und wird als idiopathischer Typ-1-Diabetes bezeichnet (unbekannte Ursache). Wie auch beim Typ-1a steht die Zerstörung der β -Zellen und nachfolgender Insulinmangel im Vordergrund (vgl. Hien et al., 2013).

1.3.2. Typ-2-Diabetes

Typ-2-Diabetes lässt sich in zwei weitere Untergruppen teilen, nämlich Typ-2a (ohne Adipositas) und Typ-2b (mit Adipositas). Gestörte Insulinsekretion und Insulinresistenz zeichnen den Typ-2-Diabetes aus. Risikofaktoren zur Entstehung dieser Erkrankung sind vor allem Lebensstilfaktoren wie mangelnde Bewegung, fettreiche Kost und damit verbunden Übergewicht und Adipositas, jedoch auch familiäre Vorbelastung, also genetische Veranlagung, kann Auslöser für Typ-2-Diabetes sein.

Ein wesentliches Problem stellt die Insulinresistenz von Muskel- und Leberzellen dar. Da die peripheren Zielzellen (z.B. Muskel-, Leber- und Fettgewebszellen) Insulin schlecht wahrnehmen können, steigt die Blutglukose etwas an, was dem Körper signalisiert, dass vermehrt Insulin benötigt wird. In Folge der Insulinresistenz kommt es daher zu einer gesteigerten Insulinsekretion (= kompensatorischer Hyperinsulinismus). Dadurch laufen die β -Zellen auf Hochtouren und können die Insulinresistenz anfangs kompensatorisch durch gesteigerte Insulinfreisetzung ausgleichen. Beim Fortschreiten der Erkrankung und Fortführen eines schlechten Lebensstils führt dies zur Downregulation der Insulinrezeptoren und relativem Insulinmangel, die Insulinresistenz kann nicht mehr kompensiert werden. Folgen sind ansteigende Blutglukose und pathologische Glukosetoleranz. Aufgrund gesunder Ernährung und erhöhter Bewegung kann dieser Trend bei 75% der Patienten umgekehrt werden. Werden jedoch keine Gegenmaßnahmen gesetzt, so folgt eine zunehmende Zerstörung der β -Zellen des Pankreas, im Extremfall mit absolutem Insulinmangel (vgl. Hien et al., 2013).

1.3.3. Gestationsdiabetes

Erfolgt die Diagnose einer gestörten Glukosetoleranz zum ersten Mal in der Schwangerschaft, so spricht man von Gestationsdiabetes. Der Krankheitsverlauf ist dem von Typ-2-Diabetes ähnlich und ist durch zunehmende Insulinresistenz mit abfallender β -Zell-Kompensation gekennzeichnet.

Bleibt ein Gestationsdiabetes unentdeckt, so bestehen für Mutter und Kind gravierende Risiken. Zum einen besteht bei der Mutter unter anderem ein erhöhtes Risiko einer Frühgeburt, Präeklampsie, Kaiserschnitt und höhergradige Dammrisse. Als Langzeitfolge bestehen erhöhtes Diabetesrisiko und Wiederholungsrisiko eines Gestationsdiabetes.

Gestationsdiabetes wirkt sich auch auf das Kind problematisch aus. Die Hyperglykämie der Mutter bedingt im Fetus erhöhte Insulinausschüttung. Es kommt zu Makrosomie und Zunahme des Bauchumfangs durch Einlagerung von Fett und Glykogen. Direkt nach der Geburt bestehen akute Probleme wie Hypoglykämie, Hypokalziämie, Hypomagnesiämie, Polyglobulie, Hyperbilirubinämie oder Atemstörungen. Auch Spätfolgen wie Fettleibigkeit und gestörte Glukosetoleranz können das Kind beeinträchtigen.

Als Basistherapie des Gestationsdiabetes dient die Erhöhung der körperlichen Aktivität verbunden mit gesunder Ernährung. Eine regelmäßige Blutglukosemessung ist erforderlich, um die Notwendigkeit einer Pharmakotherapie festzustellen. Ist es durch Lebensstilverbesserung nicht möglich, das vorgegebene Ziel zu erreichen, so wird eine Insulintherapie empfohlen. Die Plazentaschranke wird von Insulin nicht passiert, somit dient es als Mittel der ersten Wahl zur Therapie eines Gestationsdiabetes (vgl. Kleinwechter et al., 2017).

1.3.4. LADA (latent autoimmune diabetes with adult onset)

Die Symptome von LADA entsprechen denen von Typ-1-Diabetes, treten jedoch erst im Erwachsenenalter auf. Das langsame Fortschreiten der Schädigung der Pankreas- β -Zellen bei LADA wird zunächst fast immer als Typ-2-Diabetes mellitus diagnostiziert. Deshalb sprechen LADA-Patienten in den ersten 6 Monaten auf orale Antidiabetika an, allerdings wird ab einem gewissen Zeitpunkt eine tägliche Insulingabe notwendig. Wie auch bei Typ-1-Diabetes besteht bei LADA letztendlich absoluter Insulinmangel.

Nachweisbar sind wiederum Autoantikörper gegen Inselzellbestandteile im Serum. Kennzeichnend für diese Sonderform sind niedrige C-Peptid-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu zeigen Patienten mit Insulinresistenz und klassischem Typ-2-Diabetes meist hohe zirkulierende Konzentrationen des C-Peptids.

Es wird geschätzt, dass 50% des Typ-2-Diabetes ohne Adipositas LADA-Patienten sind, wobei LADA nicht immer mit Untergewicht verbunden ist, auch Übergewicht kann unter LADA auftreten (vgl. Rahmadi et al., 2019).

1.3.5. MODY (maturity onset diabetes of the young)

MODY kennzeichnet eine Gruppe monogenetischer Störungen mit β -Zell-Dysfunktion und wird autosomal dominant vererbt. MODY auslösende Mutationen wurden bisher in 14 verschiedenen Genen festgestellt. Eine diagnostische Unterscheidung zu Typ-1- und Typ-2-Diabetes ist oft sehr schwierig, jedoch notwendig, um eine bestmögliche Therapie zu gewährleisten. Mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung lassen sich Genmutationen aufdecken, was eine Diagnose möglich macht. Da eine MODY-Diagnose sehr teuer ist, gibt es festgelegte Kriterien, wann eine Diagnose durchgeführt werden soll: Beim Vorliegen einer β -Zell-Dysfunktion ohne Autoantikörper, beim Auftreten von MODY unter 25 Jahren bei mindestens einem Familienmitglied und beim Auftreten eines autosomal dominanten Diabetes in mindestens zwei Generationen der Familiengeschichte. Als Pharmakotherapie sind Sulfonylharnstoffe (orale Antidiabetika) die erste Wahl (vgl. Jang, 2020; vgl. Hien et al., 2013).

1.4. Diagnose

Eine gezielte Untersuchung auf Diabetes mellitus sollte dann durchgeführt werden, wenn ein erhöhtes Diabetesrisiko durch Familienvorbelastung oder Komorbiditäten bestehen, wenn die Gelegenheitsblutglukose erhöht ist oder wenn man typische Symptome eines Diabetes aufweist (Gewichtsverlust, Polyurie, Polydipsie) (vgl. Abholz et al., 2013).

Die Diagnose von Diabetes mellitus beruht auf der Bestimmung der Nüchternblutglukose, des Hämoglobin A1c und der Durchführung eines oralen Glukosetoleranztests (oGTT) (vgl. Wascher, 2016).

1.4.1. Nüchternblutglukose und Gelegenheitsplasmaglukose

Beim Gesunden beträgt die Plasmaglukose im Nüchternzustand < 100mg/dl. Ab einer Nüchternglukose von $\geq 126\text{mg/dl}$ (venöses Plasma) an zwei Tagen spricht man von manifestem Diabetes mellitus (siehe Tabelle 1; vgl. Harreiter et al., 2019; vgl. Abholz et al., 2014).

Tabelle 1: Standarddiagnostik des Diabetes mellitus und des erhöhten Diabetesrisikos (Harreiter et al., 2019)

	Manifester Diabetes mellitus	Erhöhtes Diabetesrisiko (Prädiabetes) ^a
Nicht-Nüchtern („Random-Glucose“, venös oder kapillär)	$\geq 200\text{ mg/dl}$ ($11,1\text{ mmol/l}$) an 2 Tagen ^b ODER $\geq 200\text{mg/dl}$ + klassische Symptome ^c	-
Nüchternglukose (venöses Plasma)	$\geq 126\text{mg/dl}$ ($7,0\text{mmol/l}$) an 2 Tagen ^b	$\geq 100\text{mg/dl}$ ($5,6\text{mmol/l}$), aber $\leq 125\text{ mg/dl}$ ($6,9\text{ mmol/l}$) (abnorme Nüchternglukose, „impaired fasting glucose“ [IFG])
2-h-Glukose nach 75 g OGTT (venöses Plasma)	$\geq 200\text{ mg/dl}$ ($11,1\text{ mmol/l}$) an 2 Tagen ^b	Glukose $\geq 140\text{mg/dl}$ ($7,8\text{mmol/l}$), aber $\leq 199\text{mg/dl}$ ($11,0\text{mmol/l}$) (gestörte Glukosetoleranz, „impaired glucose tolerance“ [IGT])
HbA1c	$\geq 6,5\%$ (48mmol/mol) an 2 Tagen ^b	$\geq 5,7\%$ (39mmol/mol), aber $\leq 6,4\%$ (46mmol/mol) ^d

a ... Ein erhöhtes Diabetesrisiko kann auch ohne Nachweis von Störungen der Glykämie bestehen und lässt sich mittels definierter Risikotests erheben.

b ... Sind 2 unterschiedliche Tests positiv, ist die Diagnose Diabetes gegeben, sodass auf die Testwiederholung verzichtet werden kann. Ergeben unterschiedliche Tests unterschiedliche Ergebnisse, dann ist der Test mit erhöhtem Ergebnis zu wiederholen.

c ... Bei Vorliegen von Hyperglykämie und klassischen Symptomen ist die Diagnose ohne Testwiederholung gegeben, da z. B. bei Erstmanifestation des Typ-1- Diabetes das HbA1c normal sein kann.

d ... Weiterführende Diagnostik mittels Nüchternglukose oder OGTT ist erforderlich.

(Harreiter et al., 2019)

1.4.2. Oraler Glukosetoleranztest

Bei Nüchternblutglukose im Normbereich wird der orale Glukosetoleranztest ergänzend durchgeführt, um das Vorhandensein einer gestörten Glukosetoleranz oder eines Diabetes mellitus auszuschließen (vgl. Hien et al., 2013).

Zur Durchführung eines oralen Glukosetoleranztests wird nach 10-16 Stunden Nahrungskarenz eine Glukoselösung getrunken und zu den Zeitpunkten 0 und 120 Minuten die Blutglukose gemessen (vgl. Hien et al., 2013).

Dann folgt die Interpretation der Ergebnisse des oralen Glukosetoleranztests: Prädiabetes liegt vor, wenn die Nüchternblutglukose zwischen 110 und 124mg/dl und die Blutglukose nach 2 Stunden zwischen 141 und 198mg/dl liegt. Prädiabetes ist ein Zustand, bei dem die Blutglukose zu hoch ist, jedoch noch kein Diabetes vorliegt (Ernährung und Bewegung können sich positiv auswirken). In diesem Zustand besteht ein erhöhtes makrovaskuläres, aber noch kein erhöhtes mikrovaskuläres Risiko. Ab 126mg/dl (Nüchternblutglukose) und 200mg/dl (2 Stunden Blutglukose) spricht man von Diabetes und es besteht sowohl makro- als auch mikrovaskuläres Risiko (vgl. Phillips, 2012).

1.4.3. HbA1c

Befindet sich die Blutglukose in einem unphysiologisch hohen Bereich, so führt dies zu einer spontanen Glykosylierung von Hämoglobin. Durch Bildung einer Schiff'schen Base und eine Amadori-Umlagerung entsteht eine irreversible Bindung von Glukose an das Protein Hämoglobin und Hämoglobin A1c (HbA1c) entsteht. Mit einer Halbwertszeit von 120 Tagen bildet das HbA1c die Glukosekonzentrationen der letzten vier Monate ab (vgl. Müller-Esterl et al., 2011).

In den meisten Fällen wird unter Therapie ein HbA1c-Wert von $\leq 7\%$ angestrebt. Unter diesen Bedingungen sinkt das Risiko der mikrovaskulären Spätkomplikationen (vgl. Wascher, 2016).

Die größte Diabetesstudie UKPDS (**United Kingdom Prospective Diabetes Study**) zeigt die Bedeutung der Senkung des HbA1c: „Zwischen 1977 und 1991 wurden 4209 Personen mit Diabetes mellitus Typ II rekrutiert und randomisiert in eine intensiv behandelte (mit dem Ziel einer Nüchtern-Glukose unter 6,0mmol/l [= 108mg/dl]) und

eine konventionell behandelte (Nüchtern-Glukose unter 15,0mmol/l [= 270mg/dl]) Gruppe. Dabei konnte das Risiko für mikrovaskuläre Komplikationen durch eine intensivierte Therapie signifikant gesenkt werden. Eine Senkung des HbA1c um 1% brachte eine Reduktion des Retinopathie- Risikos um 21% und des Risikos einer Albuminurie um 34%!“ (Diem, 2020)

1.5. Diabetische Akut- und Spätkomplikationen

Notfälle bei Diabetespatienten entstehen meistens durch Insulinmangel oder Insulinüberdosierung. Zu akuten Stoffwechselkomplikationen bei Diabetikern zählen bei Überdosierung Hypoglykämie und bei Unterdosierung diabetische Ketoazidose, hyperosmolares Koma und seltener Laktatazidose und alkoholische Ketoazidose.

Hypoglykämie als eine der gefährlichsten Komplikationen ist Folge einer Überdosierung von Insulin (Typ-1-Diabetes oder Typ-2-Diabetes) oder von bestimmten oralen Antidiabetika (Typ-2-Diabetes) und kann unbehandelt zu Krämpfen, Koma und Tod führen. Für die Behandlung einer leichten Hypoglykämie (Patient ist wach und kooperativ) genügt die Gabe von Kohlenhydraten wie zum Beispiel Traubenzucker. Bei schwerer Hypoglykämie (Bewusstlosigkeit) muss eine 40%ige Glukoselösung i.v. oder 1mg Glukagon i.m. verabreicht werden. Glukagon ist der Gegenspieler von Insulin und bewirkt die Freisetzung von Glukose aus den Glykogenspeichern. Für die Wirksamkeit von Glukagon müssen daher ausreichende Glykogenreserven im Körper vorhanden sein (vgl. Pieper et al., 2018).

Unter den Spätkomplikationen unterscheidet man makrovaskuläre von mikrovaskulären. Dabei zählen koronare Herzkrankheit, zerebrovaskuläre Erkrankung und periphere arterielle Verschlusskrankheit zur Gruppe der makrovaskulären Komplikationen und Nephropathie, Neuropathie, diabetisches Fußsyndrom und diabetische Augenerkrankung zu den mikrovaskulären. Ist die Blutglukose gut eingestellt, so sinkt das Risiko von mikrovaskulären Spätfolgen, wobei der Nutzen für makrovaskuläre Erkrankungen weniger gut belegt ist (vgl. Diem, 2020).

1.6. Möglichkeiten der Behandlung

1.6.1. Typ-1-Diabetes

Um dem Insulinmangel bei Typ-1-Diabetes entgegenzuwirken, ist Insulin s.c. als Hormonersatztherapie unumgänglich. Als Ergebnis vieler Jahre Forschung sind heute verschiedene Insuline am Markt vertreten: kurz- und langwirksames Insulin, Insulinanaloge und Mischinsuline. Standardmäßig wird heute eine funktionelle Insulintherapie empfohlen. Im Zuge dieser wird ein- bis zweimal täglich ein langwirksames Basalinsulin verabreicht und ein kurzwirksames Insulin prandial bzw. als Korrekturinsulin dazugegeben. Zur Gewährleistung einer erfolgreichen Therapie ist das stetige Kontrollieren von Blutglukose bzw. Führen von Glukosetagebüchern ein essentieller Bestandteil.

Die ursprüngliche konventionelle Form der Insulintherapie wird heute nur noch in Ausnahmefällen gebraucht. Hierbei wird zwei- bis dreimal pro Tag zu festgelegten Zeiten eine definierte Menge an Mischinsulin gespritzt. Somit sind die Mahlzeiten an den Spritzrhythmus gebunden und die Lebensqualität sinkt (vgl. Lechleitner et al., 2019).

1.6.2. Typ-2-Diabetes

Am Beginn der Standardtherapie von Typ-2-Diabetes stehen orale Antidiabetika. Kann durch diese Arzneimittel und aufgrund diätetischer Maßnahmen im weiteren Verlauf das entsprechende Therapieziel nicht erreicht werden oder bestehen Kontraindikationen, so kommt auch hier eine Insulintherapie in Frage. In den meisten Fällen von Typ-2-Diabetes reichen allerdings orale Antidiabetika zur Therapie aus (vgl. Lechleitner et al., 2019).

Unter den oralen Antidiabetika gibt es solche, die die Insulinsekretion fördern (z.B. Sulfonylharnstoffe, GLP-1-Analoga) und solche, die Glukoseausscheidung im Harn bewirken (Gliflozine). Andere wiederum wirken auf die Zielgewebe von Insulin (Metformin, Thiazolidindione). Der Wirkmechanismus einiger Antidiabetika ist bis heute nicht vollständig bekannt, jedoch weiß man, dass einige die Zellatmung in den

Mitochondrien hemmen, wie zum Beispiel das häufig verwendete Biguanid Metformin oder die Thiazolidindione (vgl. Brunmair et al., 2004).

Die Hemmung der Zellatmung als möglicher antidiabetischer Wirkmechanismus war Ausgangspunkt einer präklinischen Studie über die Wirkung von Hypoxieexposition auf die Blutglukose. Nachdem tatsächlich blutglukosesenkende Wirkung festgestellt wurde (Abu Eid et al (2018): „Obesity caused by free access to HFD caused marked deteriorations of basal blood glucose and glucose tolerance. Reduced consumption of HFD ameliorated hyperglycemia and, with some delay, maintenance in a hypoxic environment even normalized basal blood glucose to concentrations as circulating in chow fed lean mice“), beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Möglichkeit, dass Erythropoietin Vermittler dieses Effekts sein könnte.

1.7. Erythropoietin

1.7.1. Definition

Vor mehr als einem halben Jahrhundert definierte Remmele Erythropoietin wie folgt: „Das Erythropoietin ist ein über die Körpersäfte wirkender, bei Zuständen erhöhten Erythrozytenbedarfs vermehrt gebildeter Stoff, der spezifisch und direkt auf das Knochenmark einwirkt und in ihm die Erythropoiese stimuliert.“ (Remmele, 1963)

Als saures Glykoprotein besteht Erythropoietin aus 165 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 30kDA und ist an vier Stellen glykosyliert. Eine minimale Änderung der Glykosylierung hat einen Einfluss auf sein physikalisch-chemisches Verhalten.

Der wesentlichste Syntheseort bei Erwachsenen ist die Niere, jedoch auch andere Organe wie Leber (bei Neugeborenen) und Lunge können Erythropoietin produzieren. Eine Beziehung zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffverbrauch beeinflusst die Syntheserate. Situationen des erhöhten Erythrozytenbedarfs wie Anämie und Sauerstoffmangel bewirken eine gesteigerte Produktion von Erythropoietin.

In der Klinik wird Erythropoietin mittlerweile vielfach eingesetzt. Eine häufige Indikation für Erythropoietin ist renale Anämie, die durch chronische Niereninsuffizienz zustande kommt. Die Niere ist nicht mehr in der Lage, ausreichend Erythropoietin zu produzieren

und somit sinkt die Erythropoiese. Auch andere Anämien stellen Anwendungsgebiete für Erythropoietin dar, wie zum Beispiel Tumoranämie, Frühgeborenenanämie und Anämie bei HIV-Erkrankungen, jedoch auch als Anregung der Erythropoiese bei Eigenblutspende kommt Erythropoietin in Verwendung (vgl. Remmele, 1963).

1.7.2. Wirkmechanismen

Hauptwirkung von Erythropoietin ist die Stimulation der Erythropoiese im Knochenmark, die zu einer erhöhten Erythrozytenmasse führt. Dabei bindet Erythropoietin an den Erythropoietin-Rezeptor (Mitglied der Zytokinrezeptor-Superfamilie 1) der Erythroblasten (= differenzierte Zellart der hämatopoetischen Stammzelllinie), was eine 3-5malige Zellteilung und Synthese von bis zu 64 Erythroblasten in einer Woche bewirkt. Nach der Bindung kommt es zur Dimerisierung des Erythropoietin-Rezeptors und daraufhin wird der JAK-STAT-Signalweg aktiviert (Abbildung 2). JAK (= **J**anus**k**inase) bindet an intrazelluläre Domänen am Erythropoietin-Rezeptor und wird über Phosphorylierung aktiviert. Folglich kommt es zur Rekrutierung von STAT (= **S**ignal **T**ransducers and **A**ctivators of **T**ranscription) an den Rezeptor. JAK bewirkt wiederum die Phosphorylierung von STAT und führt damit zu dessen Dimerisierung. Nach Translokation in den Zellkern bindet das STAT-Dimer an bestimmte DNA-Sequenzen und reguliert die Expression der Zielgene, was maßgeblich für das Geschehen in den hämatopoetischen Zellen ist (vgl. Singbartl et al., 2016).

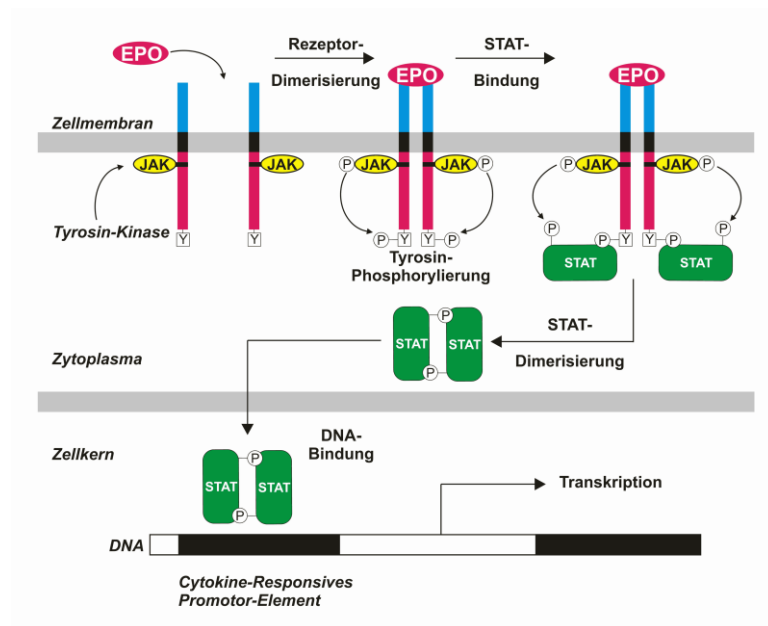


Abbildung 2: JAK-STAT-Signalweg von Erythropoietin
(<https://de.wikipedia.org/wiki/JAK-STAT-Signalweg>)

Erythropoietin wird bei Zuständen der Hypoxie vermehrt produziert. In den Bergen herrscht ein geringerer Sauerstoffpartialdruck als in niedrigeren Gebieten. Neuerlich wurde bewiesen, dass Nüchternblutglukose und Insulinresistenz bei in den Bergen lebenden Menschen geringer sind als bei jenen in niedrigeren Regionen. Es sinkt auch die Prävalenz von Übergewicht und Diabetes, denn Bergsteigen und Hypoxie beeinträchtigen den Appetit. Aufgrund dessen könnte Erythropoietin abgesehen von der Erythropoiese auch für Diabetes-relevante Stoffwechselwirkungen verantwortlich sein, was in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wird (vgl. Woolcott et al., 2015). Daher wird Erythropoietin als pleiotropes Zytokin mit hämatopoetischen wie auch mit zahlreichen nicht-hämatopoetischen Wirkungen bezeichnet. Die Erythropoietin-Rezeptor-Expression wurde auch in nicht erythroiden Zellen gezeigt, deshalb führt Erythropoietinbehandlung zu einigen nicht hämatopoetischen Effekten in Endothelzellen, Nervenzellen, Gehirn, Myoblasten, Skelettmuskel, Knochen, Herz und Fettgewebe (Abbildung 3; vgl. Foskett et al., 2011). Als Reaktion auf Hypoxie stimuliert Erythropoietin zum Beispiel eNOS (= endothelial nitric oxide synthase), welche eine Produktion von Stickstoffmonoxid (= NO) in den Endothelzellen bewirkt. NO ist ein Regulator des Gefäßtonus und verbessert somit den Sauerstofftransport (vgl. Suresh et al., 2020).

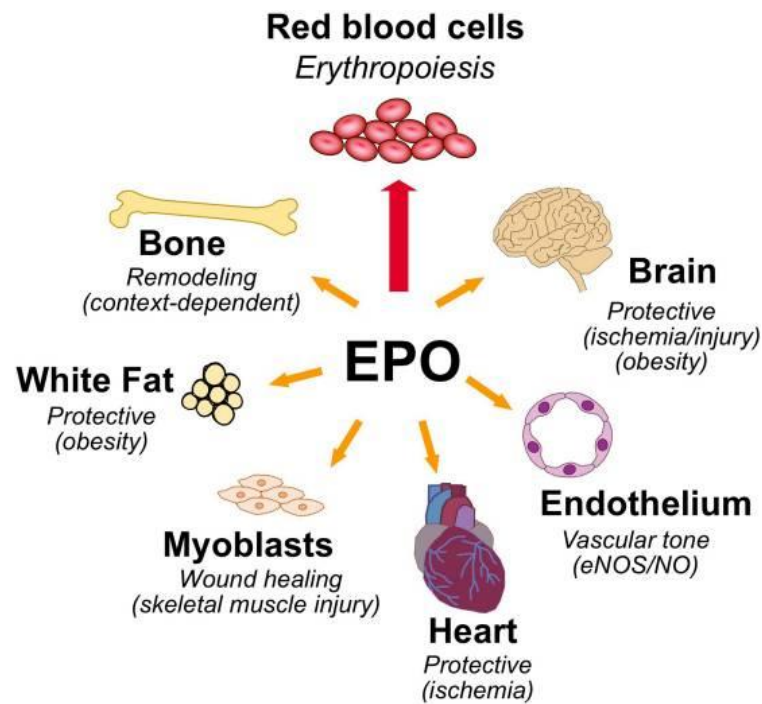


Abbildung 3: Pleiotrope Wirkung von Erythropoietin (Suresh et al., 2020)

Erythropoietin hat auch schützende Wirkungen bei Herz- und Gehirnverletzungen. Kardioprotektive Effekte werden ebenfalls über Induktion einer koronaren Produktion von NO durch Endothelzellen bewerkstelligt (vgl. Suresh et al., 2020).

Zu den weiteren Eigenschaften von Erythropoietin zählen die direkte oder indirekte Beeinflussung von Entzündungsprozessen durch das Reduzieren der Immunantwort oder die Hemmung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Als Folgen der Erythropoietinwirkung sind auch Verbesserung der β -Zell-Aktivität des Pankreas, die Änderung der Proopiomelanocortin-Produktion des Hypothalamus und die Reduktion der Entzündungsreaktion beschrieben (vgl. Zhang et al., 2017).

Aktuelle Studien zeigen eine Beteiligung von Erythropoietin in der Regulation von Körpergewicht, Fettmasse und Glukosemetabolismus. Überexpression von Erythropoietin im Skelettmuskel von Mäusen resultierte zum Beispiel in einem reduzierten Körpergewicht und reduzierter Fettmasse. Auch eine Normalisierung von Plasmainsulinkonzentration und Glukosetoleranz in mit fettreicher Diät gefütterten Mäusen wurden gezeigt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass sich die nicht-hämatopoetischen Wirkungen von Erythropoietin womöglich auf die Regulierung des Fett- und Glukosestoffwechsels erstrecken (vgl. Foskett et al., 2011).

Eine Studie von Zhang et al. (2017) resultierte ebenfalls in einer geringeren Gewichtszunahme und Fettmasse durch fettreiche Diät in männlichen Erythropoietin-behandelten Mäusen. Dies konnte bei den Weibchen nicht beobachtet werden, was mit einem möglichen Einfluss des Sexualhormons Östrogen und als mögliche Folge der geschlechtsunterschiedlichen Expression des Erythropoietin-Rezeptors begründet wurde. Nach einer Ovariectomie wurde auch bei den weiblichen Mäusen ein Effekt von Erythropoietin auf die Gewichtszunahme unter Fettdiät beobachtet (vgl. Zhang et al., 2017).

1.7.3. Nebenwirkungen

Die unerwünschten Wirkungen bei klinischer Anwendung von Erythropoietin-Substitution werden in zwei Gruppen aufgeteilt:

Eine Reihe gefährlicher Nebenwirkungen kann sich als Folge der Erhöhung der Erythrozytenzahl mit erhöhter Blutviskosität ergeben, wie zum Beispiel Thrombose, Hypertonie und Herz-Kreislauffeffekte.

Andere unspezifische Nebenwirkungen begründen sich in der Applikation eines biotechnologischen oder synthetischen Erythropoietins. Das können unter anderem grippeähnliche oder atemwegsassoziierte Symptome bei Epoetin alpha und beta oder Fieber, Ödeme, Übelkeit und Durchfall bei Darbepoetin alpha sein (vgl. Singbartl et al., 2016).

1.7.4. Doping

Eine Erhöhung der Erythrozytenmasse durch Erythropoietin bewirkt reflektorisch eine steigende Sauerstoffspeicherung und -transportkapazität. Damit verbunden ist die Erhöhung der Ausdauerleistung und somit ist Erythropoietin häufig von Leistungssportlern als Dopingmittel in Gebrauch.

Als es noch nicht möglich war, eindeutig nachzuweisen, ob exogen Erythropoietin zugeführt wurde, wurden Grenzwerte für Hämatokrit und Hämoglobin festgelegt und vor einem Wettkampf die Blutwerte der Sportler bestimmt (vgl. Büch, 2000).

Als Hämatokrit bezeichnet man den Anteil der roten Blutkörperchen im Gesamtblut. Er ist für die Dickflüssigkeit des Bluts verantwortlich. Das Hormon Erythropoietin fördert

im Knochenmark die Bildung der Erythrozyten und demnach resultiert aus Erythropoietininjektion ein höherer Hämatokrit (vgl. Fandrey et al., 2015). Erythropoietin bewirkt durch den Anstieg der Erythrozyten reflektorisch einen Anstieg von Hämoglobin im Blut. Hämoglobin ist als Farbstoff der roten Blutkörperchen für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich. Es ist ein tetrameres Protein und kann demnach maximal vier Sauerstoff-Moleküle binden (vgl. Müller-Esterl et al., 2011).

Beim Nachweis von Erythropoietindoping unterscheidet man heute direkte von indirekten Nachweismöglichkeiten. So können Referenzbereiche für Erythropoietin im Blut festgelegt werden, die nach Erythropoietingabe überschritten werden. In anderen direkten Bestimmungsverfahren versucht man minimale Unterschiede zwischen humanem und gentechnisch hergestelltem Erythropoietin festzustellen (z.B. Ladungsunterschiede durch Kapillarelektrophorese). Da für dieses grundsätzlich mögliche Verfahren große Urinmengen nötig sind, werden indirekte Bestimmungsverfahren bevorzugt, bei denen weniger Probenmaterial notwendig ist.

Die Konzentration einiger biochemischer Faktoren ist von der Erythropoietinkonzentration abhängig. Der lösliche Transferrinrezeptor ist zum Beispiel nach Erythropoietingabe im Plasma in erhöhter Konzentration zu finden. So kann durch Messen solcher Faktoren Doping festgestellt werden.

Weiters können als Nachweis Fibrin- und Fibrinogen-Abbauprodukte im Urin nach Erythropoietinzufuhr festgestellt werden (vgl. Büch, 2000).

2. Zielsetzung

Ziel dieser Experimente war es, eine mögliche blutglukosesenkende Wirkung durch das Hormon Erythropoietin an adipösen männlichen und weiblichen Mäusen zu prüfen. Weiters galt es zu erforschen, ob dabei geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen. Es wurden bereits einige Studien mit ähnlichen Zielen durchgeführt, jedoch wurde bis jetzt nicht gezeigt, inwiefern ein blutglukosesenkender Effekt von Erythropoietin alleine die Folge von Appetitverlust und Gewichtsreduktion ist. Genau dies versuchte meine Arbeit zu unterscheiden und hatte damit das Ziel, das Vorhandensein einer körporgewichtsunabhängigen Wirkung von Erythropoietin auf die Blutglukose zu hinterfragen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Versuchstiere und Haltung

Für dieses Experiment wurden 34 weibliche und 36 männliche Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden am 09.07.2019 geliefert und waren zu diesem Zeitpunkt ca. 8 Wochen alt. Es handelte sich um Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J aus der Tierzucht der Medizinischen Universität Wien in Himberg, Österreich. Die Versuchstiere wurden in Kleingruppen in 12 Kunststoffkäfigen mit Gitterdach untergebracht. Sie wurden in einem Raum mit konstanter Raumtemperatur und einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus (12h dunkel / 12h hell Zyklus) gehalten. Drei Tage nach der Lieferung wurden die Mäuse auf „High-Fat-Diet“ gesetzt, die zu 60% aus Fett besteht (HFD; Research Diets, New Brunswick, USA). Sofern unten nicht anders beschrieben, stand den Mäusen Trinkwasser und HFD ad libitum zur Verfügung. Für die vorliegenden Untersuchungen waren C57BL/6J-Mäuse besonders geeignet, da aus früheren Studien bekannt ist, dass dieser Stamm unter fettreicher Diät stark an Gewicht zunimmt und für Übergewicht typische Stoffwechselstörungen entwickelt.

Montgomery et al. (2013) führten eine Studie durch, bei der die Auswirkungen von High-Fat-Diet im Vergleich zu Low-Fat-Diet auf den Metabolismus von fünf Mäusestämmen (C57BL/6J, 129X1/SvJ, BALB/c, DBA/2 und FVB/N) untersucht wurden: „On an HFD, all strains of mice gained a significant amount of body fat. All strains, except BALB/c, also exhibited a significant but variable deterioration in glucose tolerance.“

Gollisch et al. (2009) kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass Nager unter High-Fat-Diet zur Entwicklung der für Übergewicht typischen Stoffwechselstörungen tendieren: „High-fat feeding led to dramatic increases in the total amount of adipose tissue and was associated with decreased oral glucose tolerance.“

Die Entwicklung dieser Stoffwechselstörung war im vorliegenden Experiment essentiell, weil in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit einer Verbesserung einer gestörten Stoffwechsellaage durch Erythropoietin untersucht werden sollte.

3.2. Versuchsablauf und Protokoll

3.2.1. Interventionen und Versuchsgruppen

Etwa zwei Monate nach Anlieferung der Mäuse und Beginn der HFD-Fütterung begann das eigentliche Experiment. Am Beginn wurden Ausgangswerte für Körpergewicht, Nüchternblutglukose und Körperzusammensetzung ermittelt. Um in weiterer Folge die Individuen in den jeweiligen Käfigen unterscheiden zu können, wurde jede Maus mit einer farblichen Markierung am Schwanz versehen.

Auf Basis der Ausgangswerte wurden die männlichen und weiblichen Mäuse mittels „Matching“ auf jeweils drei etwa gleich große Gruppen verteilt. Ziel des Matching war, in Bezug auf Gewicht, Blutglukose und relative Fettmasse Mäusegruppen mit möglichst ähnlichen Mittelwerten zusammenzustellen und so die Untersuchungen mit bestmöglich vergleichbaren Gruppen zu beginnen. Alle Mäuse wurden weiterhin mit HFD gefüttert.

Jeweils eine männliche und eine weibliche Gruppe bildete die Erythropoietin-Gruppe. Diese Tiere erhielten über etwa zwei Monate an drei Tagen pro Woche eine Injektion von 300 U/kg Erythropoietin theta (Eporatio®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland). Die Stammlösung von 4000 IE Erythropoietin theta pro 0,5ml wurde 80-fach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und davon jeder Maus ein Volumen von 3µl/g Körpergewicht intraperitoneal (= in die Peritonealhöhle) injiziert. Dazu gab es pro Geschlecht zwei Kontrollgruppen, denen jeweils das gleiche Volumen an Vehikel (physiologische Kochsalzlösung) verabreicht wurde, um bezüglich etwaiger Stresswirkung durch die Injektionen für alle Tiere gleiche Bedingungen zu schaffen. Eine dieser Kontrollgruppen hatte jeweils wie die Erythropoietin-Mäuse freien Zugang zu Futter („Ad lib“). Die jeweils andere Kontrollgruppe wurde geführt, weil in früheren Studien beschrieben worden war, dass Erythropoietinbehandlung die Gewichtszunahme von Mäusen reduziert, sodass direkte Wirkung von Erythropoietin nicht von indirekten Folgen des Gewichtsverlusts unterschieden werden konnte. Das fassen Foscett et al. (2011) in folgender Aussage zusammen: „In summary, we report that high (1000 U/kg), medium (600 and 300 U/kg), and low (150 U/kg) doses of Epo are effective in reducing body weight and fat mass in mice on high fat diet.“

In dieser weiteren Kontrollgruppe („Restricted“) sollten die Mäuse nur eingeschränkt (= „restricted“) Futter erhalten, sodass die Gewichtskurve der Restricted-Gruppe jener der Erythropoietin-Gruppe möglichst genau gleicht.

3.2.2. Messungen

Das Körpergewicht und die Menge der Futteraufnahme wurden mindestens einmal pro Woche ermittelt. Zur Bestimmung der Menge der Futteraufnahme wurde den Mäusen eine genau dokumentierte Menge an Futter zur Verfügung gestellt und nach einer Woche das Gewicht des verbliebenen Futters bestimmt. Die Differenz daraus entsprach der Futteraufnahme im betreffenden Käfig.

An den Tagen 8, 35 und 60 nach Beginn der Injektionen wurde die Nüchternblutglukose gemessen. Am Tag 60 wurde auch Plasma zur Bestimmung der Insulinkonzentration und zur Berechnung des HOMA-Index gesammelt. Am Tag 44 wurden Hämoglobingehalt, Sauerstoffsättigung und Hämatokrit bestimmt. Ein Glukosetoleranztest folgte am Tag 51 (Männchen) beziehungsweise 53 (Weibchen). Am Tag 56 wurde nochmals die Körperzusammensetzung dokumentiert, am Tag 63 (Weibchen, 18.11.2019) bzw. Tag 65 (Männchen, 20.11.2019) wurden die Mäuse getötet und terminal Proben von Plasma und diversen Geweben gesammelt.

3.3. Messmethoden und Analytik

3.3.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme

Zur Bestimmung des Körpergewichtes und der gefressenen Menge an HFD wurde eine Präzisionswaage verwendet (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA). Da die Mäuse ständig in Bewegung sind, musste zum Wägen der Tiere die Waagen-Einstellung „dynamisches Wiegen“ gewählt werden, bei der aus den schwankenden Gewichtswerten über wenige Sekunden ein Mittelwert berechnet wird. Die aufgenommene Nahrungsmenge konnte nicht pro Individuum, sondern nur als Mittelwert pro Käfig dokumentiert werden.

3.3.2. Körperzusammensetzung

Zur Bestimmung des Körperfettanteils der Mäuse kam der Body Composition Analyzer EMR-188 zum Einsatz (EchoMRI, Houston, TX, USA). Bei der Messung wurde jeweils eine Maus, die nicht gefastet war, in den röhrenförmigen Container gesetzt und in das Gerät geschoben. Das Gerät bestimmte innerhalb einer Minute die Körperfettmasse (Fat Mass) und die fettfreie Körpermasse (Lean Mass) in Gramm.

3.3.3. Nüchternblutglukose

Die Messung der basalen Blutglukose fand jeweils 48 Stunden nach der letzten Injektion von Erythropoietin bzw. Vehikel statt (siehe unten) und wurde an zuvor 4 Stunden gefasteten Mäusen durchgeführt. Zur Messung der Blutglukose wurde das Handmessgerät „StatStrip Xpress“ verwendet (Nova Biomedical, Waltham, MA, USA), das nur 1,2 µl Blut zur Messung benötigt und von der Firma DSI (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) speziell für Messungen an Labornagern adaptiert worden ist. Für die vorliegende Studie war bedeutend, dass dieses Gerät eine besonders geringe Hämatokritsensitivität aufweist, während viele andere, insbesondere ältere Modelle, bei hohem Hämatokrit die Blutglukosekonzentration wesentlich zu gering anzeigen.

Vanavan et al. (2010) erstellten eine Studie und stellten drei Glukosemessgeräte in Vergleich: „The StatStrip assay showed excellent linearity and recovery. The coefficient of variations for imprecision were < 5%. This meter correlated well with the comparison method. Of the three meters tested, only the StatStrip showed interference < 10% for all spiked levels of acetaminophen, ascorbic acid, maltose and hematocrit at three levels of glucose tested.“

Lyon et al. (2009) verglichen ebenfalls verschiedene Glukometer: „All evaluated glucose meter systems demonstrated varying degrees of interference by hematocrit, ascorbate, and maltose mixtures. [...] However, the modified glucose oxidase-based amperometric method (Nova StatStrip) was less affected in comparison with the glucose oxidase-based photometric method (LifeScan SureStep Flexx).“

Zur Glukosemessung wurde den Mäusen mit einer Nadel in die Schwanzspitze gestochen und Kapillarblut aus der Schwanzspitze verwendet. Dazu wurde ein

Glukoseteststreifen ins Messgerät gesteckt und nach zartem Ausdrücken des Schwanzes ein Blutstropfen aufgenommen.

3.3.4. Plasmainsulin und HOMA-Index

Sollte zum gleichen Termin auch das basale Plasmainsulin gemessen werden, so wurden unmittelbar nach Bestimmung der Basalglykämie weitere 50 µl Kapillarblut in ein mit EDTA beschichtetes Hütchen aufgenommen (Microvette CB 300 K2E, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Nach Zentrifugation wurde das Plasma gesammelt und vorerst bei -80°C gelagert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde mittels ELISA-Test die Insulinkonzentration im Plasma bestimmt (Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Schweden). Mithilfe von Blutglukose und Plasmainsulin konnte nach der Formel $\text{Glukose (mg/dl)} * \text{Insulin (}\mu\text{U/ml)} / 405$ der HOMA-Index berechnet werden (= **H**omeostasis **M**odel **A**ssessment). Sofern kein Insulinmangel vorliegt, gilt der HOMA-Index als Maß zur Schätzung der vorliegenden Insulinsensitivität.

3.3.5. Glukosetoleranztest

Der Glukosetoleranztest (GTT) dient dazu, einen gestörten Glukosestoffwechsel nachzuweisen. Dafür wurden die Mäuse 48 Stunden nach der letzten Erythropoietininjektion für 8h gefastet. Zuerst wurde eine Blutglukosemessung zur Bestimmung des basalen Nüchternblutglukosewerts durchgeführt (siehe oben, Kapitel 3.3.3.). Anschließend wurde den Mäusen intraperitoneal Glukoselösung injiziert (33% w/v; 1,5g/kg Glukose entsprechend 4,5ml/kg Körpergewicht; Sonderanfertigung gespag, Bad Ischl Apotheke, Österreich). Es folgten weitere Messungen der Blutglukose 20, 40, 60, 90 und 120 Minuten nach Glukoseinjektion. Bei diesen nachfolgenden Messungen musste die Schwanzspitze nicht erneut angestochen werden, sondern es war ausreichend, durch leichten Druck aus der bestehenden Wunde einen weiteren Blutstropfen zu gewinnen.

3.3.6. Hämatokrit

Nach der gleichen Vorgangsweise wie die Bestimmung der Basalglykämie (siehe oben, Kapitel 3.3.3.) fand diese Messung 48 Stunden nach der letzten Injektion von Erythropoietin bzw. Vehikel statt (siehe unten), jedoch ohne die Mäuse zuvor zu fasten. 50µl Blut wurden in eine Heparin-beschichtete Glaskapillare gesammelt (minicaps, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland). Mit Hilfe eines Blutgasanalysators (ABL 800 FLEX, Drott Medizintechnik GmbH, Wiener Neudorf, Österreich) wurden unter anderem Hämoglobingehalt und Sauerstoffsättigung gemessen und daraus der Hämatokritwert berechnet. Als Hämatokrit bezeichnet man den Anteil der roten Blutkörperchen im Gesamtblut, was auch die Dickflüssigkeit des Bluts beeinflusst. Da Erythropoietin im Knochenmark die Bildung der Erythrozyten fördert, war bei Erythropoietin-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollgruppen ein deutlich erhöhter Hämatokritwert zu erwarten (vgl. Fandrey et al., 2015). Um unnötige Belastung durch die Abnahme dieser für Mäuse relativ großen Blutmenge zu minimieren, wurden diese Messungen nur bei einigen willkürlich ausgewählten Individuen jeder Gruppe durchgeführt bzw. das Blut von zwei Mäusen wurde in einer Probe zusammengeführt.

3.3.7. Terminales Sammeln von Plasma- und Gewebeproben

48 Stunden nach der letzten Injektion von Erythropoietin wurden die für 4h gefasteten Mäuse am Tag der Tötung in einer Box mit dem Narkotikum Isofluran betäubt. Unter tiefer Narkose wurden sie, weiterhin bei Inhalation des Narkotikums, zum Sektionstisch übergeführt und mit einer kleinen Schere Bauch- und Brustraum eröffnet. Mit einer EDTA-enthaltenden Spritze wurde eine Herzpunktion durchgeführt und eine möglichst große Menge an Blut aus dem Herzen entnommen (500-900µl), die vorerst auf Eis gekühlt wurde. Spätestens im Verlauf dieser Entblutung unter hoher Isofluran-Exposition trat der Tod der Maus ein. Binnen 30 Minuten wurde durch Zentrifugation das Plasma gesammelt, wobei der erhöhte Hämatokrit der Mäuse der Erythropoietin-Gruppen augenfällig war.

Unmittelbar im Anschluss an die Punktion des Herzens wurden Proben mehrerer, für die Regulation des Glukosestoffwechsels wichtiger Organe gesammelt. Alle entnommenen

Organe wurden sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, um bei Bedarf für spätere Untersuchungen verfügbar zu sein:

Leber: Proben von Lebergewebe wurden zerkleinert in einem Gefäß gesammelt. Die Leber kann viel Glukose aufnehmen und als Glykogen speichern, ist aber vor allem das wichtigste Organ für die Glukoseproduktion.

Skelettmuskel: Proben des Musculus gastrocnemius (Wadenmuskel) wurden präpariert, wobei insbesondere geachtet wurde, dass der Muskel frei von Fettgewebe gesammelt wurde. Der Skelettmuskel nimmt unter Insulin-stimulierten Bedingungen bei Weitem die größten Glukosemengen auf und speichert sie als Glykogen.

Hypothalamus: Weiters wurde noch der Schädelknochen aufgebrochen und der Hypothalamus der Mäuse gesammelt, der an der Unterseite des Gehirns zu finden ist. Der Hypothalamus ist ein wichtiges vegetatives Steuerzentrum für den Kraftstoffwechsel und das Körpergewicht.

Bauchspeicheldrüse (nur von männlichen Mäusen gesammelt): Die in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse gelegenen β -Zellen sind für die Produktion von Insulin verantwortlich, dem für die Senkung der Blutglukose wichtigsten Hormon (vgl. Müller-Esterl et al., 2011).

Braunes Fettgewebe (nur von männlichen Mäusen gesammelt): Das braune Fett befindet sich bei den Mäusen subkutan zwischen den Schulterblättern und dient vor allem der Produktion von Wärme. Es ist reich an Mitochondrien und durch die darin vorkommenden Cytochromen braun gefärbt. Dieses Organ ist bei kleinen Säugetieren, die schnell abkühlen können, meist gut entwickelt und ermöglicht bei Kälte, die Körpertemperatur konstant zu halten (vgl. Müller-Esterl et al., 2011).

Früher dachte man, dass das braune Fettgewebe beim Menschen nur im Säuglingsalter eine Rolle spielt. Nun hat sich allerdings in mehreren Studien gezeigt, dass es auch noch im Erwachsenenalter in geringen Mengen vorhanden und somit wirksam ist. Nicht nur die Wärmeregulation, sondern auch die Insulinsensitivität und der Fettstoffwechsel werden vom braunen Fettgewebe beeinflusst. (vgl. Tews et al., 2016)

4. Ergebnisse

4.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme

Das Durchschnittsgewicht aller Männchen betrug beim Start der Experimente rund 40g. Jede der drei zu vergleichenden Gruppen (Ad lib, Restricted und Erythropoietin) nahm im Laufe der 65 Versuchstage stetig und kontinuierlich an Gewicht zu, sodass zu keiner Zeit ein statistisch signifikanter Unterschied bestand.

Die Mäuse der Restricted-Gruppe starteten mit einem Gewicht von $40,8 \pm 1,0\text{g}$ je Maus und dieses stieg im Laufe der 65 Tage auf ein Endgewicht von $46,0 \pm 0,5\text{g}$. Vergleichbare Daten lieferte die Erythropoietin-Gruppe mit einem Anstieg von $40,0 \pm 0,8\text{g}$ auf $45,6 \pm 0,8\text{g}$. Auch die Ad lib-Gruppe verhielt sich ähnlich mit $39,1 \pm 1,3\text{g}$ auf $45,4 \pm 0,5\text{g}$ (Abbildung 4).

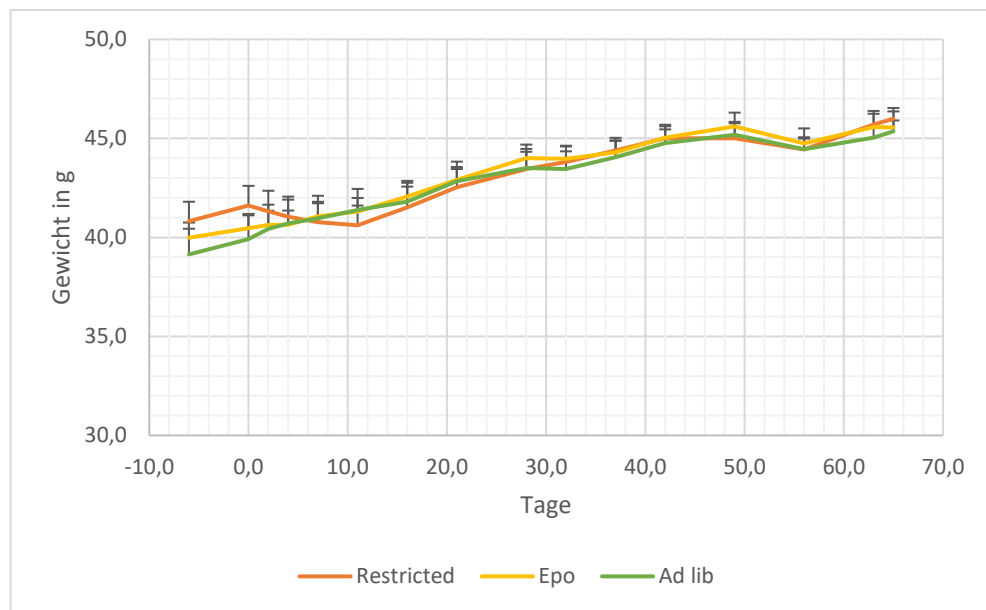


Abbildung 4: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf das Körpergewicht adipöser männlicher Mäuse über einen Zeitraum von $t = 65$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Weibchen starteten mit einem mittleren Gewicht von 24,7g. Auch die Weibchen nahmen kontinuierlich an Gewicht zu, wobei die weibliche Restricted-Gruppe von $24,6 \pm 0,8\text{g}$ auf $34,5 \pm 1,4\text{g}$ zunahm, die Erythropoietin-Gruppe ihr Gewicht von $24,7 \pm 0,9\text{g}$ auf $33,3 \pm 1,5\text{g}$ erhöhte und die Ad lib-Gruppe einen Anstieg von $24,7 \pm 0,9\text{g}$ auf $33,8 \pm$

1,6g am Tag 63 zeigte. Wieder bestand auch hier zu keiner Zeit ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 5).

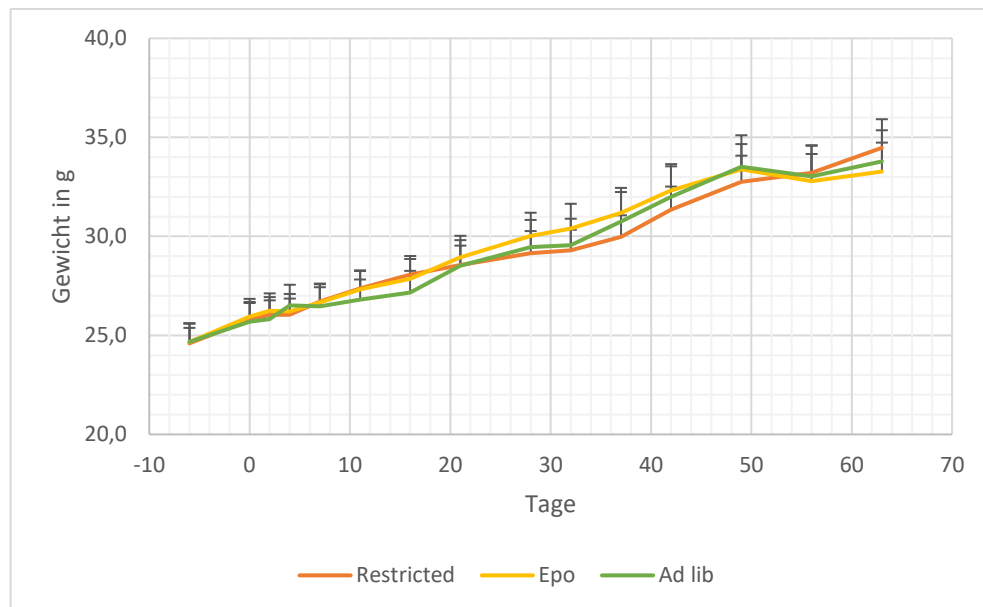


Abbildung 5: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf das Körpergewicht adipöser weiblicher Mäuse über einen Zeitraum von $t = 63$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Futteraufnahme wurde pro Maus pro Tag errechnet. Zwischen Tag 0 und Tag 9 nahm eine männliche Restricted-Maus im Durchschnitt 1,86g, eine Erythropoietin-Maus 2,02g und eine Ad lib-Maus 2,19g pro Tag zu sich. Die totale Futteraufnahme betrug 134,2g (Restricted), 134,4g (Erythropoietin) und 141,1g (Ad lib) pro Maus über den gesamten Versuchszeitraum. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, was sich auch während und zu Ende der Versuchsreihe nicht änderte.

In den ersten neun Tagen nahm eine weibliche Restricted-Maus im Durchschnitt 1,94g, eine Erythropoietin-Maus 1,89g und eine Ad lib-Maus 1,84g HFD pro Tag zu sich. Es ergab sich eine totale Futteraufnahme von 121,7g (Restricted), 123,7g (Erythropoietin) und 119,5g (Ad lib) pro Maus über die Versuchstage. Die Futteraufnahme blieb während der 63 Tage einigermaßen konstant und änderte sich nur geringfügig. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen.

4.2. Körperzusammensetzung

Nach Auswertung der Ergebnisse des Echo MRI Gerätes ließ sich in Bezug auf die Körperzusammensetzung ein Unterschied zwischen Männchen und Weibchen erkennen. Weibliche Mäuse hatten einen geringeren Fettanteil als männliche. Dies begründete sich wohl zumindest größtenteils daraus, dass die Weibchen nicht gleichermaßen mit Fettakkumulation auf ihre Fettdiät ansprachen, wie die Männchen. Sie blieben dünner und, wie noch weiter unten an der Blutglukose gezeigt wird, auch stoffwechselgesünder.

Fünf Tage vor dem Beginn der Injektionen wurden die Ausgangswerte für die Körperzusammensetzung der unbehandelten Mäuse ermittelt. Daraus ergab sich bei einem Restricted-Männchen ein prozentueller Fettanteil von $41,40 \pm 1,78\%$, bei Erythropoietin-Mäusen $41,32 \pm 0,85\%$ und bei Ad lib- Mäusen $38,35 \pm 1,71\%$. Diese Werte waren infolge des Matching sehr ähnlich.

Ein zweites Mal wurde die Körperzusammensetzung als Vergleich am Tag 56 ermittelt. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen Gruppen erkennen (Abbildung 6). Wohl aufgrund der HFD stieg das relative Körperfett minimal an, jedoch verhielten sich alle drei Gruppen gleich. Der mittlere prozentuelle Fettanteil der Restricted-Gruppe betrug am Ende der Studie $43,56 \pm 0,84\%$, der Erythropoietin-Gruppe $44,62 \pm 0,73\%$ und der Ad lib-Gruppe $43,18 \pm 0,79\%$.

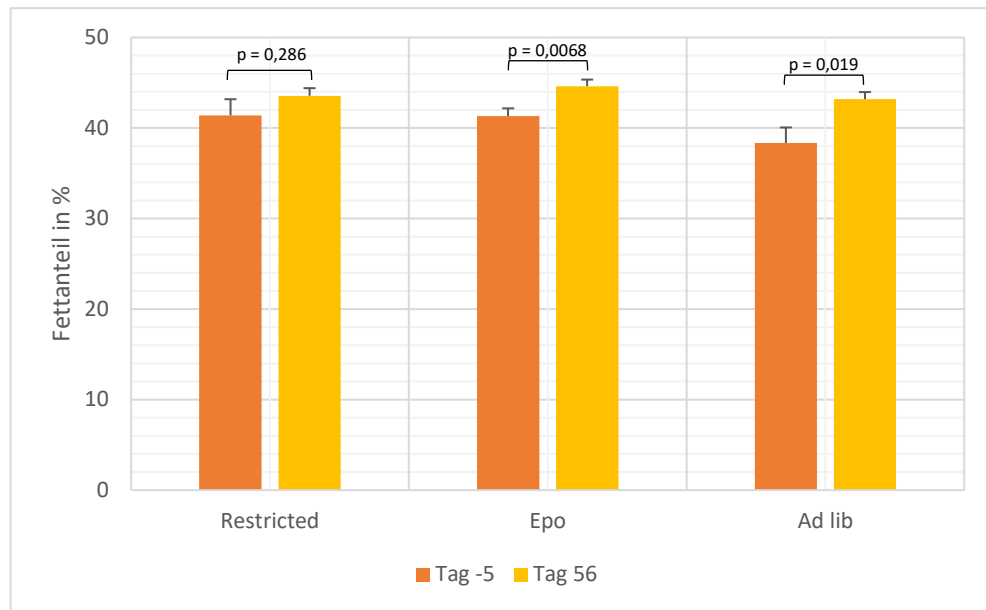


Abbildung 6: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die relative Fettmasse von adipösen männlichen Mäusen zu den Zeitpunkten $t = -5$ Tage und $t = 56$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Mit dem Echo MRI Gerät wurde auch bei den Weibchen fünf Tage vor Beginn der Injektionen die Körperzusammensetzung erhoben. Restricted-Weibchen zeigten einen mittleren prozentuellen Fettanteil von $26,11 \pm 2,01\%$, Erythropoietin-Weibchen $26,13 \pm 2,40\%$ und Ad lib-Weibchen $27,76 \pm 2,20\%$. Zwischen den Gruppen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied.

Auch am Tag 56 waren die Werte der drei Gruppen vergleichbar. Eine Restricted-Maus hatte im Mittel einen Fettanteil von $40,21 \pm 2,14\%$, eine Erythropoietin-Maus $39,68 \pm 2,32\%$ und eine Ad lib-Maus $41,80 \pm 2,94\%$. Es bestand zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 7).

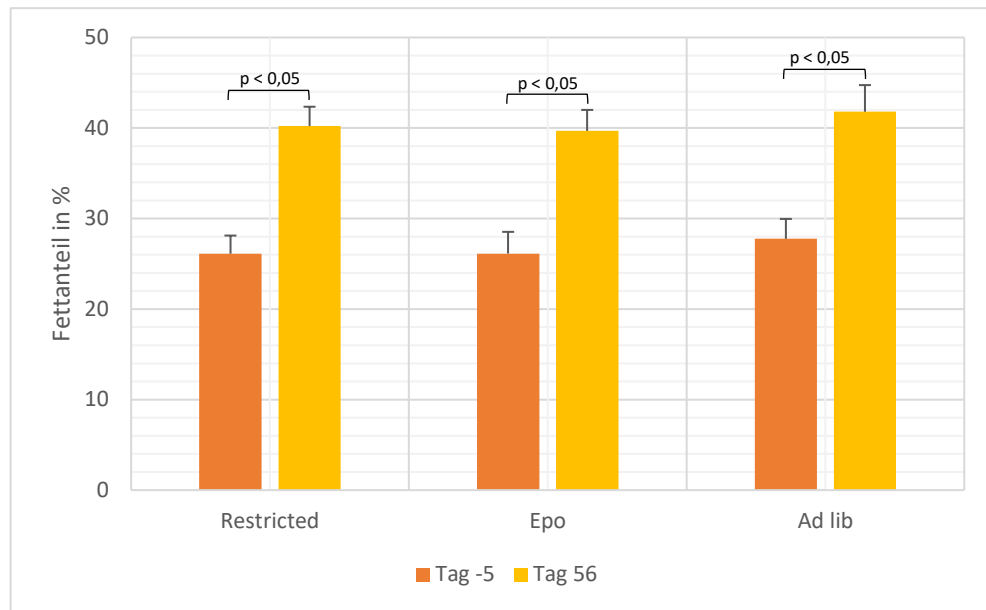


Abbildung 7: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die relative Fettmasse von adipösen weiblichen Mäusen zu den Zeitpunkten $t = -5$ Tage und $t = 56$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

4.3. Hämatokrit

Aufgrund der relativ großen benötigten Blutmenge und zur Schonung der Tiere wurde nicht von jeder Maus der Hämatokrit bestimmt, sondern meist Blut zweier Mäuse gepoolt.

An Tag 44 betrug der Hämatokrit der männlichen Vehikel-Mäuse (Restricted) $44,4 \pm 0,9\%$ und der männlichen Erythropoietin-Mäuse $68,7 \pm 1,2\%$. Dieses Ergebnis zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

Wie die Männchen verhielten sich auch die Weibchen. Weibliche Kontrollmäuse (Restricted) zeigten am Tag 44 einen Hämatokrit von $43,3 \pm 0,9\%$ vs. Erythropoietin-Mäuse $63,2 \pm 1,9\%$. Auch bei den Weibchen bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ($p < 0,05$; Abbildung 8).

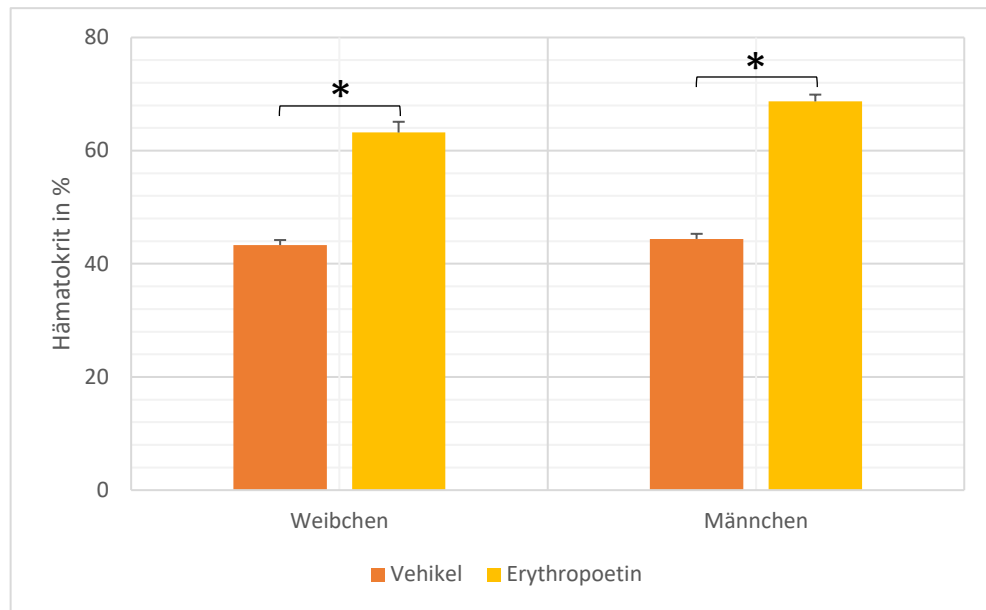


Abbildung 8: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf den Hämatokrit adipöser weiblicher und männlicher Mäuse zum Zeitpunkt $t = 44$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; * $p < 0,05$.

4.4. Basalglykämie

Die Nüchternblutglukose wurde an drei verschiedenen Tagen gemessen. Die erste Messung fand vier Tage vor der Erythropoietin- bzw. Vehikel-Injektion statt. Auf Basis dieser Werte wurden die Gruppen gematcht.

Bereits am Tag 8 war ein blutglukosesenkender Effekt von Erythropoietin bei den Männchen zu sehen. Die Mäuse der Erythropoietin-Gruppe zeigten einen Glukosewert von $146,6 \pm 4,6$ mg/dl. Die zwei Kontrollgruppen zeigten Nüchternglykämiewerte von $160,2 \pm 3,4$ mg/dl (Restricted) und $172,5 \pm 7,4$ mg/dl (Ad lib). Es bestanden statistisch signifikante Unterschiede zwischen Erythropoietin und jeder Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Erwartungsgemäß bekräftigten die Ergebnisse von Tag 35 und Tag 60 die Messung von Tag 8 (Abbildung 9). Die Blutglukose der Erythropoietin-Gruppe war weiter gesunken auf $112,9 \pm 6,1$ mg/dl (Tag 35) bzw. $108,4 \pm 9,2$ mg/dl (Tag 60). Restricted und Ad lib hatten hier ähnliche, deutlich höhere Blutglukose. Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Erythropoietin-Gruppe und jeder Vehikel-Gruppe.

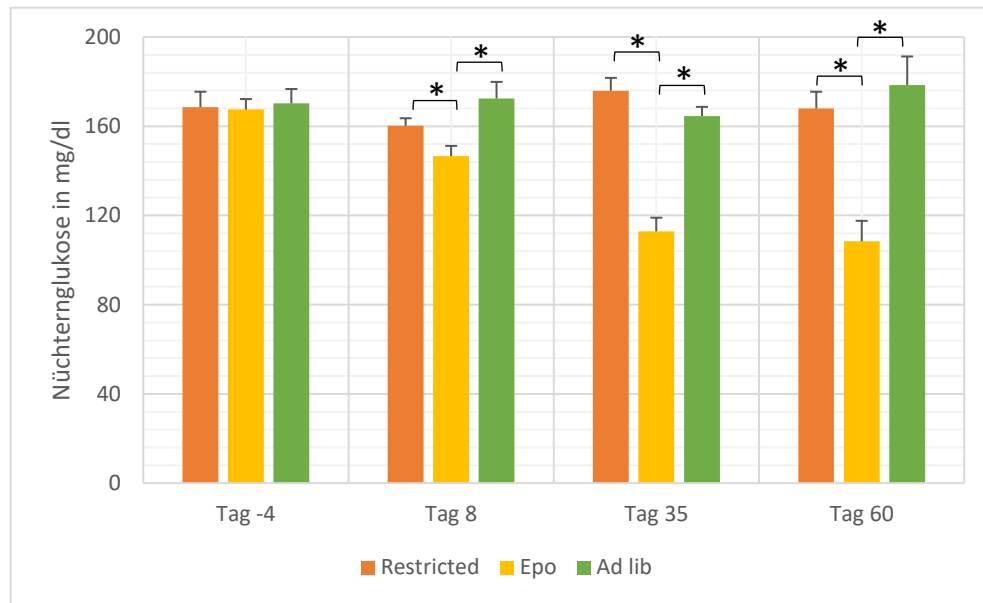


Abbildung 9: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Basalglykämie adipöser männlicher Mäuse zu den Zeitpunkten $t = -4$ Tage, $t = 8$ Tage, $t = 35$ Tage und $t = 60$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; * $P < 0,05$.

Wie an der relativen Fettmasse zu erkennen (Abbildung 6 vs. Abbildung 7), hatten die Weibchen unter HFD weniger ausgeprägte Adipositas entwickelt als die Männchen. Dementsprechend zeigten sie zu Beginn des Experiments auch deutlich geringere Blutglukose. Trotzdem senkte Erythropoietin auch die Blutglukose der Weibchen deutlich.

Ein signifikantes Absinken der Blutglukose zeigte sich bei den Weibchen noch nicht am achten Tag, sondern erst später bei der nächsten Messung am Tag 35 und Tag 60. Die Erythropoietin-Gruppe hatte eine Blutglukose von $102,0 \pm 4,2$ mg/dl (Tag 35) bzw. $112,0 \pm 8,7$ mg/dl (Tag 60). Die Werte der beiden Vehikel-Gruppen lagen statistisch signifikant höher ($p < 0,05$; Abbildung 10).

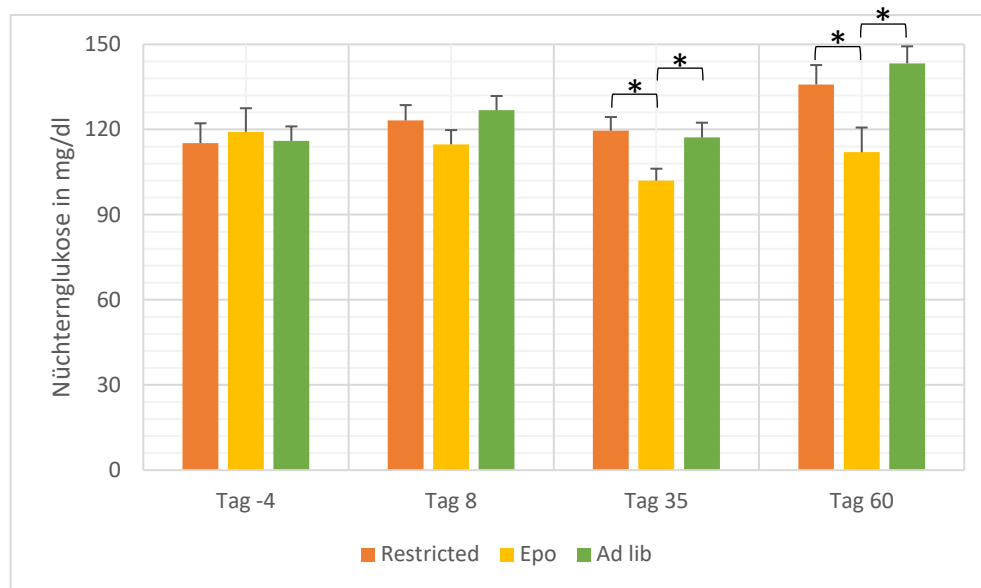


Abbildung 10: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Basalglykämie adipöser weiblicher Mäuse zu den Zeitpunkten $t = -4$ Tage, $t = 8$ Tage, $t = 35$ Tage und $t = 60$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; * $p < 0,05$.

4.5. Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Ein Glukosetoleranztest wurde am Tag 51 bzw. Tag 53 (Männchen bzw. Weibchen) durchgeführt. Zuerst wurde die Basalglykämie bestimmt und anschließend, nach Injektion einer Glukoselösung ins Peritoneum, nach 20, 40, 60, 90 und 120 Minuten erneut die Blutglukosekonzentration ermittelt.

Die Nüchternglykämie der männlichen Erythropoietin-Gruppe fiel vor Beginn des Tests statistisch signifikant niedriger aus als die der beiden anderen Gruppen, wie das auch an anderen Tagen der Fall war (siehe Kapitel 4.4.). Nach 20 Minuten sah man bei allen drei Gruppen einen steilen Anstieg der Blutglukose. Allerdings blieben die Erythropoietin-Mäuse auch weiterhin unter den Werten der beiden Vehikel-Gruppen. Im weiteren Verlauf des Glukosetoleranztests fiel die Blutglukosekonzentration der Erythropoietin-behandelten Mäuse steiler ab als jene der Kontrollgruppen (Abbildung 11). Erythropoietin bewirkte somit nicht nur geringere absolute Glykämie, sondern auch eine beschleunigte Glukoseclearance. Nach 120 Minuten wurde in der Erythropoietin-Gruppe annähernd der Ausgangswert erreicht. Die Glykämie lag nur mehr $+38,4 \pm 10,0$ mg/dl über dem basalen Anfangsglukosewert. Im Vergleich dazu war die Blutglukose der Restricted-Gruppe noch um $+111,6 \pm 16,6$ mg/dl und die der Ad lib-

Gruppe um $+115,1 \pm 8,0\text{mg/dl}$ höher als zu Beginn des Tests. Dies war ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Erythropoietin und den Kontrollgruppen (jeweils $p < 0,05$).



Abbildung 11: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Glukosetoleranz von adipösen männlichen Mäusen zum Zeitpunkt $t = 51$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM.

Dementsprechend zeigte der Vergleich der Gesamtflächen unter den Glukosekurven (AUC-tot) einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den männlichen Erythropoietin- und den Vehikel-Gruppen (Abbildung 12). Auch die inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-ink) fiel in der Erythropoietin-Gruppe signifikant niedriger aus als in den Kontrollgruppen (Abbildung 13).

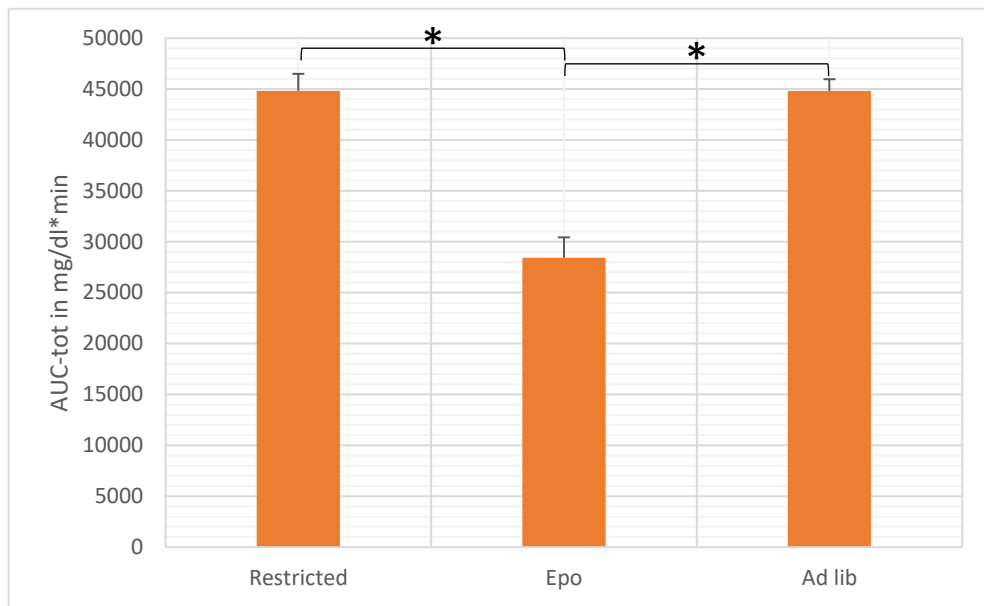


Abbildung 12: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot) über einen Zeitraum von $t = 120\text{min}$ im intraperitonealen Glukosetoleranztest adipöser männlicher Mäuse. Mittelwert $\pm$ SEM. $*p < 0,05$.

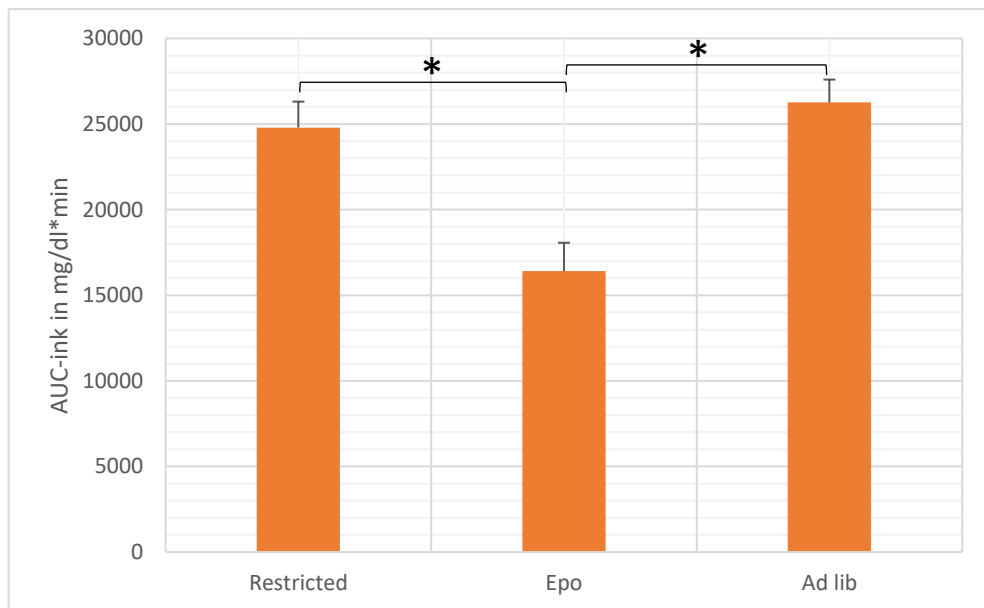


Abbildung 13: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-ink) über einen Zeitraum von $t = 120\text{min}$ im intraperitonealen Glukosetoleranztest adipöser männlicher Mäuse. Mittelwert $\pm$ SEM. $*p < 0,05$.

Am Tag 53 wurde bei den weiblichen Versuchstieren ein Glukosetoleranztest durchgeführt. Auch bei den Weibchen war die Basalglykämie der Erythropoietin-Mäuse schon vor Beginn des Tests statistisch niedriger als die der Kontrollgruppen (wie auch an anderen Tagen; siehe Kapitel 4.4.). Nach 20 Minuten erreichte auch die Blutglukose der

Weibchen ihr Maximum. Auch bei den Weibchen war die Blutglukose der Erythropoietin-behandelten Mäuse zu jedem Zeitpunkt geringer als die der Kontrollgruppen (Abbildung 14). In der Erythropoietin-Gruppe der Weibchen war die Blutglukose bei 120 Minuten nur noch $+16,1 \pm 4,6\text{mg/dl}$ über der Basalglykämie, wie sie am Beginn des Tests vorlag. Das war signifikant näher am Ausgangswert als für die Restricted-Kontrollgruppe ($+35,5 \pm 6,6\text{mg/dl}$; $p < 0,05$). Gegenüber der Ad lib-Kontrollgruppe war der Unterschied allerdings nicht signifikant ($+24,0 \pm 5,8\text{mg/dl}$, n. s.).

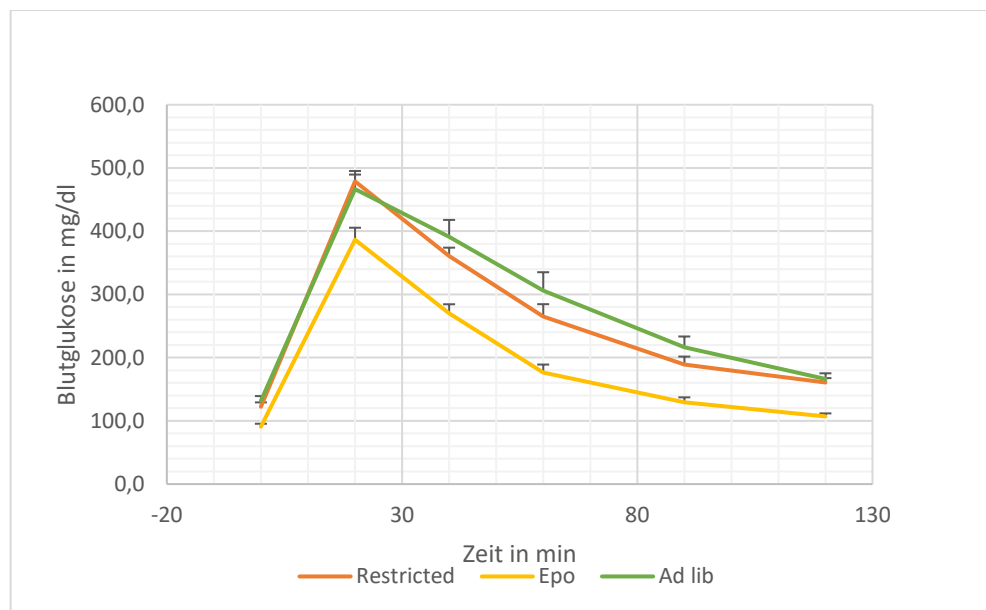


Abbildung 14: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Glukosetoleranz von adipösen weiblichen Mäusen zum Zeitpunkt $t = 53$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM.

Die Gesamtflächen unter den Glukosekurven (AUC-tot) zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den weiblichen Erythropoietin- und den Vehikel-Gruppen (Abbildung 15). Dementsprechend resultierte die inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-ink) in der Erythropoietin-Gruppe auch signifikant niedriger als in den Kontrollgruppen (Abbildung 16).

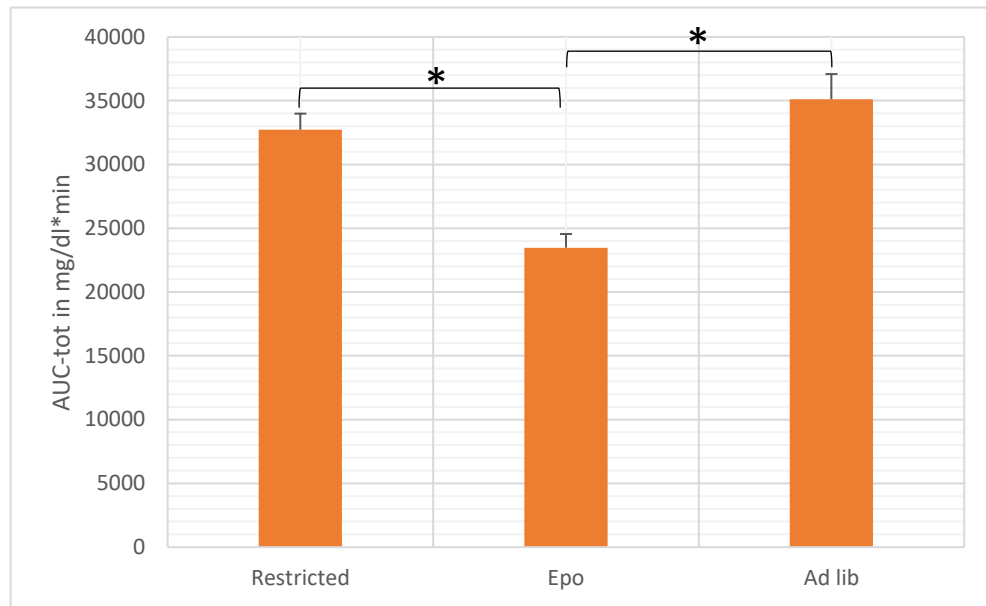


Abbildung 15: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot) über einen Zeitraum von $t = 120\text{min}$ im intraperitonealen Glukosetoleranztest adipöser weiblicher Mäuse. Mittelwert $\pm$ SEM. $*p < 0,05$.

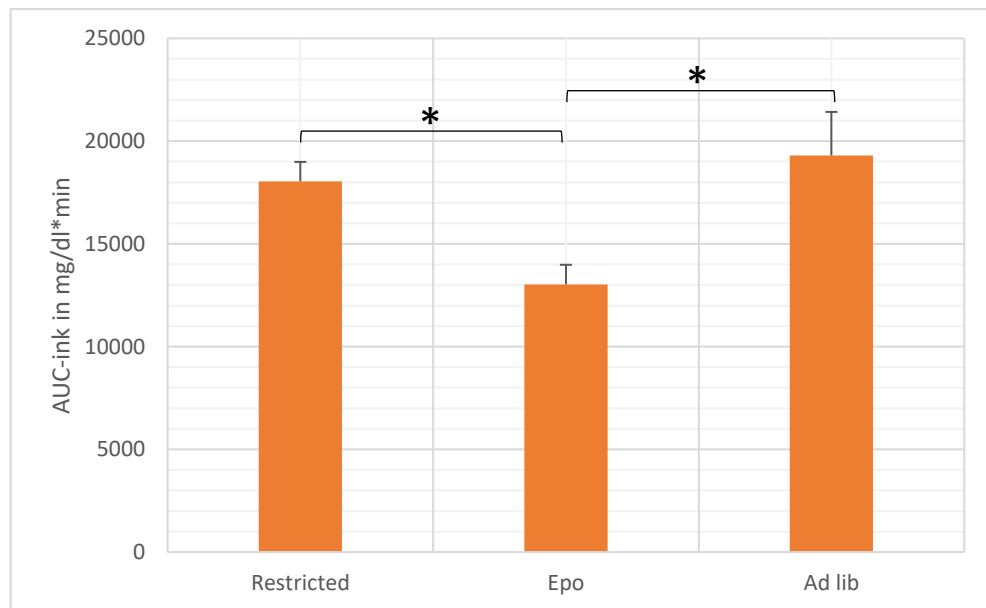


Abbildung 16: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-ink) über einen Zeitraum von $t = 120\text{min}$ im intraperitonealen Glukosetoleranztest adipöser weiblicher Mäuse. Mittelwert $\pm$ SEM. $*p < 0,05$.

4.6. Plasmainsulin und HOMA-Index

Unmittelbar nach Bestimmung der Basalglykämie am Tag 60 (siehe Abbildung 9 und 10) wurde Plasma gesammelt und später mittels ELISA das Plasmainsulin bestimmt. Die ermittelten Plasmainsulinwerte resultierten bei den männlichen Erythropoietin-Mäusen signifikant geringer als die der beiden Kontrollgruppen (Abbildung 17).

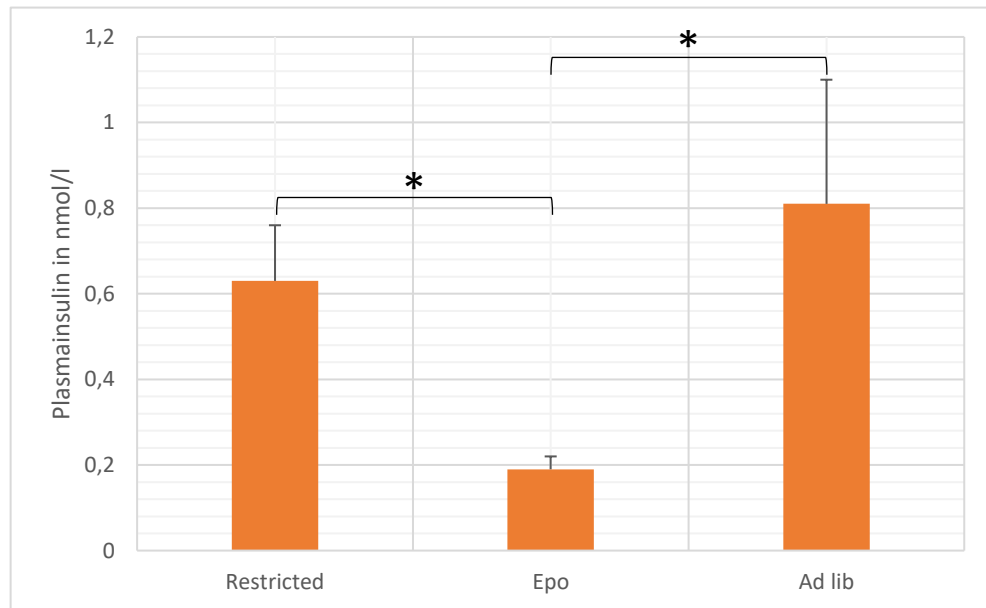


Abbildung 17: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf das Plasmainsulin adipöser männlicher Mäuse zum Zeitpunkt $t = 60$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; * $p < 0,05$.

Der HOMA-Index ist ein Maß für die Insulinsensitivität. Für seine Berechnung benötigt man die Basalglykämie und die Insulinkonzentration im Plasma.

Der HOMA-Index der männlichen Erythropoietin-Gruppe war signifikant niedriger als jener der Kontrollgruppen (Abbildung 18). Er betrug bei männlichen Erythropoietin-Mäusen $0,30 \pm 0,06$, bei Restricted-Mäusen $1,44 \pm 0,28$ und bei Ad lib-Mäusen $2,26 \pm 0,87$. Der signifikant geringere HOMA-Index nach Erythropoietinbehandlung bedeutet eine deutlich verbesserte Insulinsensitivität.

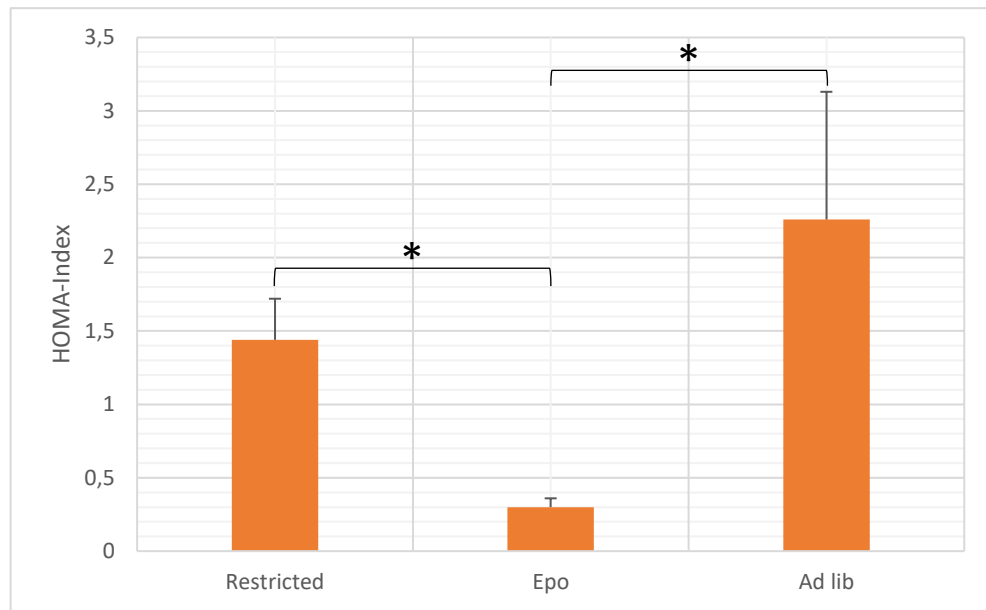


Abbildung 18: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Insulinsensitivität von adipösen männlichen Mäusen zum Zeitpunkt $t = 60$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; $*p < 0,05$.

Im Unterschied zu den Männchen zeigte das Plasmainsulin keinen signifikanten Unterschied zwischen den weiblichen Versuchstiergruppen (Abbildung 19). Die Plasmainsulinkonzentration aller Gruppen war jedoch bei den Weibchen deutlich niedriger als bei den jeweiligen Gruppen der Männchen.

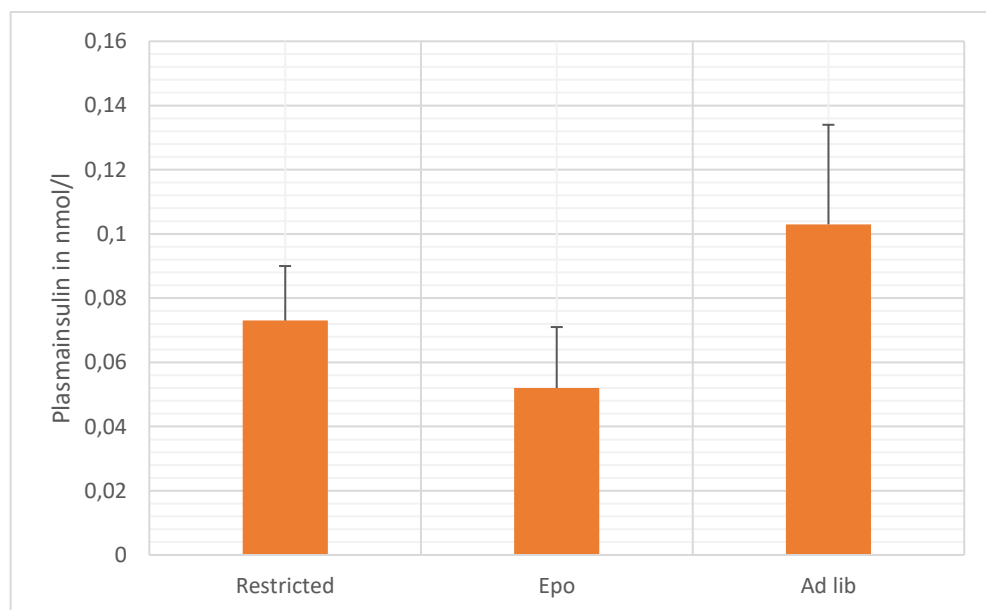


Abbildung 19: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf das Plasmainsulin adipöser weiblicher Mäuse zum Zeitpunkt $t = 60$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede.

Ebenso ließ sich beim HOMA-Index der Weibchen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erkennen (Abbildung 20). Ein Trend zu besserer Insulinsensitivität war bei Erythropoietin-behandelten Weibchen jedoch zu erkennen. Der HOMA-Index der weiblichen Erythropoietin-Mäuse betrug $0,09 \pm 0,03$, vs. Restricted-Mäuse $0,15 \pm 0,04$ und vs. Ad lib-Mäuse $0,22 \pm 0,07$.

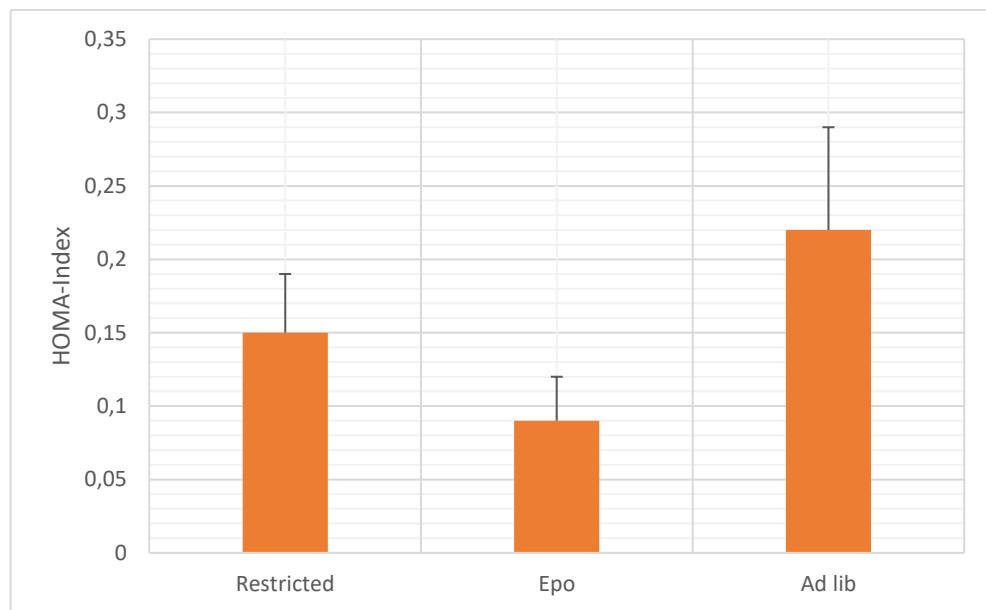


Abbildung 20: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Insulinsensitivität von adipösen weiblichen Mäusen zum Zeitpunkt $t = 60$ Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es festzustellen, ob Erythropoietinbehandlung in Mäusen blutglukosesenkende Wirkung hat und ob diesbezüglich geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen. Obwohl ähnliche Untersuchungen schon mehrfach publiziert wurden, konnten in der vorliegenden Studie offene Fragen beantwortet werden.

In einer der vorangehenden Studien von Zhang et al. (2017) wurden wie in der vorliegenden Arbeit Mäuse mit HFD mit 60% Fettgehalt gefüttert und mit Erythropoietin beziehungsweise Vehikel behandelt. Erythropoietin hatte dabei einen deutlichen reduzierenden Effekt auf die Gewichtszunahme und Fettmasse in männlichen Mäusen, allerdings im Vergleich zu meiner Arbeit bei einer 10-fach höheren Dosis (3000 U/kg Körpergewicht dreimal pro Woche).

Ebenso verwendeten Foscett et al. (2011) 60%ige HFD und erarbeiteten eine breite Dosis-Wirkungskurve mit intraperitonealen Injektionen von 1000, 600, 300, 150 und 75 U/kg Körpergewicht an jedem zweiten Tag. Auch hier wurde im Vergleich zur Vehikelgruppe unter Erythropoietin ein deutlicher und dosisabhängiger Verlust an Körpergewicht festgestellt. Mit Ausnahme der niedrigsten Dosis (75 U/kg) resultierten alle Dosen in einem signifikant niedrigeren Körpergewicht und einer geringeren Fettmasse. Mit ähnlicher Dosisabhängigkeit wie für das Körpergewicht beobachtet wurde in beiden Studien auch ein klarer blutglukosesenkender Effekt von Erythropoietin beobachtet. In ihrer Dosis-Wirkungskurve fanden Foscett et al. signifikante Blutglukosesenkung durch Erythropoietin bei allen Dosierungen über 75 U/kg, also auch bei einer Dosierung, wie sie in der vorliegenden Studie eingesetzt wurde. Ebenfalls ließ sich in beiden Studien eine deutlich verbesserte Glukosetoleranz bei allen Erythropoietin-Mäusen feststellen.

Auch weitere Studien bestätigten im Wesentlichen die Befunde der oben diskutierten. Meng et al. (2013) fütterten Mäuse mit 60%iger HFD und behandelten sie mit einer Dosis von 1000 U/kg Erythropoietin bei Injektionen an jedem zweiten Tag. Ein Unterschied in der Futteraufnahme konnte nicht nachgewiesen werden, die Gewichtszunahme unter HFD war jedoch auch hier signifikant niedriger als unter Vehikel, was von signifikant geringerer Blutglukose und verbesserter Glukosetoleranz begleitet war.

Kodo et al. (2017) zeigten bei vergleichsweise niedrigerer Erythropoietin-Dosis von 200 U/kg (drei Injektionen pro Woche) und HFD von etwas anderer Zusammensetzung (56,7% Fett) signifikant niedrigeres Körpergewicht in Erythropoietin-behandelten Mäusen als in deren Kontrollen. Unterschiede in der Futteraufnahme oder Aktivität konnten dabei nicht nachgewiesen werden. Bezüglich niedriger Blutglukose und verbesserter Glukosetoleranz durch Erythropoietin wurden nur Trends beobachtet, was allerdings im Lichte der vergleichsweise geringen Dosierung zu beurteilen ist.

Deutlich höher dosiertes Erythropoietin verwendeten Teng et al. (2011) mit 3000 U/kg (drei Injektionen pro Woche), die, wie auch in den anderen Studien beschrieben, einen geringeren Anstieg des Körpergewichts und der Fettmasse unter Erythropoietin im Vergleich zu den Kontrollen feststellten. In dieser Untersuchung wurden auch transgene Mäuse verwendet, die in nicht-hämatopoetischen Geweben keinen Erythropoietin-Rezeptor exprimieren. Obwohl bei diesen Tieren der Erythropoietin-Rezeptor in hämatopoetischen Geweben vorhanden ist, wurde unter Erythropoietin-Behandlung kein Unterschied in Bezug auf das Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet. Auch war bei transgenen Mäusen die Blutglukose höher und sie waren glukoseintoleranter als die Wild-Typ-Kontrolltiere. Somit ließ sich schließen, dass die Wirkung von Erythropoietin auf Körpergewicht und Blutglukose von der Expression seines Rezeptors in nicht-hämatopoetischen Geweben abhängig sein dürfte.

Es ist allen oben zitierten und diskutierten Arbeiten gemeinsam, dass Erythropoietin einen relativen Verlust an Körpergewicht und Fettmasse bewirkte. Wie weit dies Folge eines Appetitverlusts und reduzierter Nahrungsaufnahme ist, kann noch nicht endgültig beantwortet werden. Fest steht aber, dass ein Absinken der Blutglukose in diesen Berichten immer nur in Zusammenhang mit Gewichtsverlust beschrieben wurde, sodass völlig unklar bleibt, ob die Reduktion der Glykämie bloß triviale Folge reduzierter Adipositas war oder ob Erythropoietin auch einen direkten, also gewichtsunabhängigen, Effekt auf die Blutglukose hat. Diese Frage sollte in meiner Studie beantwortet werden, indem bei einer Gruppe von Kontrollmäusen durch reduzierte Fütterung das Körpergewicht immer auf dem möglichst gleichen Wert gehalten werden sollte, wie bei den Erythropoietin-behandelten Vergleichstieren. Etwas überraschend erwies sich reduzierte Fütterung nicht als notwendig, denn der vielfach beschriebene Gewichtsverlust blieb in meinen Erythropoietin-behandelten Mäusen aus. In der

vorliegenden Studie wurde unter Erythropoietin keine Wirkung auf Körpergewicht oder Fettmasse, weder in männlichen noch in weiblichen Mäusen, gefunden. Eine sehr deutliche Reduktion der Blutglukose war dennoch festzustellen, womit ein ganz wesentliches Ergebnis meiner Arbeit im ersten konklusiven Nachweis besteht, dass Erythropoietin einen direkten Effekt auf Glykämie von Mäusen hat, der über die indirekte Wirkung eines etwaigen Gewichtsverlusts hinausgeht. Hervorzuheben ist dabei, dass dieser Effekt sehr deutlich ausfiel, da die basale Blutglukose der hyperglykämischen, adipösen Tiere sogar auf Konzentrationen abfiel, wie sie für völlig gesunde, schlanke Mäusen typisch sind.

Es stellt sich nun freilich die Frage, weshalb der von anderen mehrfach reproduzierte Effekt der Erythropoietin-Behandlung auf Körpergewicht und Fettmasse adipöser Mäuse in meiner Studie nicht zu finden war. Eine mögliche Ursache ist, dass die kommerziell erhältlichen und in den Studien verwendeten Erythropoietin-Produkte nicht ganz gleich sind. Die synthetischen Erythropoietine, die alle die Aminosäuresequenz des humanen Erythropoietins haben, werden durch „Epoetin“ und einen griechischen Buchstaben benannt, wobei der griechische Buchstabe Unterschiede im Glykosylierungsmuster anzeigt, die durchaus auch Unterschiede in den Eigenschaften bedingen können. Zu den synthetischen Peptiden zählen Darbepoetin alfa, Epoetin alfa, Epoetin, beta, Epoetin gamma, Epoetin delta, Epoetin epsilon, Epoetin zeta, Epoetin theta, Epoetin kappa und Epoetin omega. In den vorangegangenen Mäusestudien wurde zur Injektion meist Epoetin alfa verwendet, in meiner Studie hingegen Epoetin theta. Es könnte also sein, dass der Mechanismus, über den das Körpergewicht beeinflusst wird, nur über bestimmte Epoetine und nicht aber über Epoetin theta angesprochen wird. Experimentell bleibt das aber nachzuweisen.

Man könnte weiters spekulieren, dass hier die Durchgängigkeit der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle spielen könnte, sodass bezüglich des Körpergewichts nur Epoetine wirksam sein könnten, die die Appetitzentren des Zentralnervensystems erreichen. Der hier geführte grundsätzliche Nachweis, dass die Wirkung auf die Glykämie von jener auf das Körpergewicht entkoppelt werden kann, suggeriert jedenfalls, dass diesen Effekten unterschiedliche Mechanismen und/oder Effekte auf unterschiedliche Zielorgane zu Grunde liegen müssen.

Eine weitere Frage, die in der vorliegenden Arbeit gestellt wurde, ist jene nach möglichen Unterschieden der Erythropoietinwirkung in männlichen gegenüber weiblichen Mäusen. Zhang et al. (2017) hatten nämlich solche Geschlechterunterschiede beschrieben und eine kausale Rolle des weiblichen Hormons Östrogen hypothetisiert. So fanden Zhang et al., dass eine Erythropoietin-induzierte relative Reduktion des Körpergewichts in männlichen Mäusen sowie in ovariectomierten Weibchen zu finden war, nicht jedoch in normalen Weibchen. Auch in nicht ovariectomierten Weibchen war die Hyperglykämie allerdings moderater als in männlichen Mäusen.

Geschlechtsspezifische Effekte auf das Körpergewicht konnten in meiner Studie freilich nicht bestätigt werden, da ja überhaupt keine Wirkung des Erythropoietin auf die Gewichtskurven gefunden wurde (allerdings 10-fach geringere Dosierung als bei Zhang et al.). Auch in der vorliegenden Studie sah allerdings die blutglukosesenkende Wirkung von Erythropoietin in weiblichen Mäusen auf den ersten Blick geringer aus als bei den Männchen.

Es muss berücksichtigt werden, dass die Weibchen der Kontrollgruppe in beiden Studien, also der vorliegenden und jener von Zhang et al., unter HFD deutlich weniger an Gewicht zunahmen und dementsprechend auch eine geringere Hyperglykämie entwickelten. Die geringeren Vergleichswerte der weiblichen gegenüber den männlichen Kontrolltieren waren daher womöglich für den Anschein geringerer Erythropoietinwirkung verantwortlich. In der Schlussfolgerung kann somit ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Auswirkung fettreicher Ernährung, jedoch keine grundsätzlich unterschiedliche Wirkung des Erythropoietin bei männlichen und weiblichen Mäusen behauptet werden.

6. Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie somit erstmals, dass regelmäßige Erythropoietinbehandlung bei adipösen Mäusen eine sehr starke anti-hyperglykämische Wirkung ausübt, die völlig unabhängig von Effekten auf das Körpergewicht ist. Diese Blutglukose-senkende Wirkung von Erythropoietin ist bei männlichen wie auch bei weiblichen Mäusen nachweisbar, ein geschlechtsspezifischer Unterschied kann nicht behauptet werden.

7. Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Betreuer Professor Clemens Fürnsinn danken. Er ist ein außerordentlich freundlicher und geduldiger Mensch. Auch in schwierigen Situationen nahm er sich Zeit und stand mir mit Rat und Tat zur Seite, was ich ihm sehr hoch anrechne.

Während der Arbeiten erklärte und zeigte er mir alles in vollster Ruhe und motivierte mich mit seinen positiven Worten. Ohne seinem außerordentlichen Wissen und seiner Anleitung wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Auch beim Korrekturlesen meiner Vorlagen war er sehr unterstützend und half mir die richtigen Formulierungen zu finden. Dank seiner Unterstützung war es für mich eine schöne Zeit, in der ich viele wertvolle Erfahrungen sammeln konnte.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinem Freund danken. Sie standen während meines Studiums immer hinter mir und motivierten mich, niemals aufzugeben. Ich möchte ihnen danken, dass sie mir meine Ausbildung ermöglichten und mich immer sowohl finanziell als auch emotional unterstützten.

8. Literaturverzeichnis

- Abholz, H., Egidi, G., Gries, A., Haller, N., Landgraf, R., Loskill, H., Matthaei, S., Müller, U., Spranger, J., Suchowenskyj, A. & Toeller, M. (2013). Nationale Versorgungsleitlinie: Therapie des Typ-2-Diabetes (1. Auflage). Berlin: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.
- Abu Eid, S., Hackl, M., Kaplanian, M., Winter, M., Kaltenecker, D., Moriggl, R., Luger, A., Scherer T. & Fürnsinn, C. (2018). Life Under Hypoxia Lowers Blood Glucose Independently of Effects on Appetite and Body Weight in Mice. *Front Endocrinol*, 9:490.
- Behrends, J., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, M., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C. & Wischmeyer, E. (2012). Physiologie (2. Auflage). Stuttgart: Thieme.
- Bopp, A. (2001). Leben mit Diabetes. Berlin: Stiftung Warentest.
- Brunmair, B., Staniek, K., Gras, F., Scharf, N., Althaym, A., Clara, R., Roden, M., Gnaiger, E., Nohl, H., Waldhäusl W. & Fürnsinn, C. (2004). Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes*, 53 (4), 1052-9.
- Büch, M. (2000). Aktuelle wissenschaftliche Beiträge zum „EPO-Doping“. Köln: Bundesinstitut für Sportwissenschaft.
- Diem, P. (2020). UKPDS: die grossen Diabetesstudien: Beschränkter Nutzen einer intensiven Diabetestherapie. Wil: Infomed-Verlag-AG.
- Fandrey, J. & Hallek, M. (2015). Erythropoese: Physiologie, Pathophysiologie und Algorithmus zur Abklärung von Anämien. *Der Internist*, 56, 970-977.
- Foskett, A., Alnaeeli, M., Wang, L., Teng, R. & Noguchi, C. (2011). The Effects of Erythropoietin Dose Titration during High-Fat Diet-Induced Obesity. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 373781.
- Gollisch, K., Brandauer, J., Jessen, N., Toyoda, T., Nayer, A., Hirshman, M. & Goodyear, L. (2009). Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 297 (2), E495-E504.

- Harreiter, J. & Roden, M. (2019). Diabetes mellitus: Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention. *The Central European Journal of Medicine*, 131 (1), 6-15.
- Hien, P., Böhm, B., Claudi-Böhm, S., Krämer, C. & Kohlhaus, K. (2013). Diabetes Handbuch (7. Auflage). Berlin & Heidelberg: Springer-Verlag.
- International Diabetes Federation: URL: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html> (abgerufen am 13.3.2020)
- Jang, K. (2020). Maturity-onset diabetes of the young: update and perspectives on diagnosis and treatment. *Yeungnam University Journal of Medicine*, 37 (1), 13-21.
- Kleinwechter, H., Schäfer-Graf, U., Bühner, C., Kainer, F., Kantzky-Willer, A., Pawlowski, B., Schunck, K., Somville, T. & Sorger, M. (2017). Gestationsdiabetes mellitus (GDM) – Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG.
- Kodo, K., Sugimoto, S., Nakajima, H., Mori, J., Itoh, I., Fukuhara, S., Shigehara, K., Nishikawa, T., Kosaka, K. & Hosoi, H. (2017). Erythropoietin (EPO) ameliorates obesity and glucose homeostasis by promoting thermogenesis and endocrine function of classical brown adipose tissue (BAT) in diet-induced obese mice. *PLoS One*, 12(3).
- Lechleitner, M., Clodi, M., Abrahamian, H., Brath, H., Brix, J., Drexel, H., Fasching, P., Föger, B., Francesconi, C., Fröhlich-Reiterer, E., Harreiter, J., Hofer, S., Hoppichler, F., Huber, J., Kaser, S., Kautzky-Willer, A., Ludvik, B., Luger, A., Mader, J., Paulweber, B., Pieber, T., Prager, R., Rami-Merhar, B., Resl, M., Riedl, M., Roden, M., Saely, C., Schelkshorn, C., Schernthaner, G., Sourij, H., Stechemesser, L., Stingl, H., Toplak, H., Wascher, T., Weitgasser, R., Winhofer-Stöckl, Y. & Zlamal-Fortunat, S. (2019). Insulintherapie bei Typ 2 Diabetes mellitus. *The Central European Journal of Medicine*, 131 (1), 39-46.
- Lechleitner, M., Kaser, S., Hoppichler, F., Roden, M., Weitgasser, R., Ludvik, B., Fasching, P., Winhofer-Stöckl, Y., Kautzky-Willer, A., Schernthaner, G., Prager, R., Wascher, T. & Clodi, M. (2019). Diagnostik und Therapie des Typ 1 Diabetes mellitus. *The Central European Journal of Medicine*, 131 (1), 77-84.

- Lyon, M., Baskin, L., Braakman, S., Presti, S., Dubois, J. & Shirey, T. (2009). Interference Studies with Two Hospital-Grade and Two Home-Grade Glucose Meters. *Diabetes Technology and Therapeutics*, 11 (10), 641-647.
- Pieber, T., Prager, R., Rami-Merhar, B., Resl, M., Riedl, M., Roden, M., Saely, C., Schelkshorn, C., Schernthaner, G., Sourij, H., Stechemesser, L., Stingl, H., Toplak, H., Wascher, T., Weitgasser, R., Winhofer-Stöckl, Y. & Zlamal-Fortunat, S. (2019). Insulintherapie bei Typ 2 Diabetes mellitus. *The Central European Journal of Medicine*, 131 (1), 39-46.
- Meng, R., Zhu, D., Bi, Y., Yang, D. & Wang, Y. (2013). Erythropoietin Inhibits Gluconeogenesis and Inflammation in the Liver and Improves Glucose Intolerance in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLoS One*, 8(1).
- Montgomery, M. K., Hallahan, N. L., Brown, S. H., Liu, M., Mitchell, T. W., Cooney, G. J. & Turner, N. (2013). Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*, 56, 1129–1139.
- Müller-Esterl, W., Anderka, O., Brandt, U. & Kerscher, S. (2011). *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler* (2. Auflage). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Phillips, P. (2012). Oral glucose tolerance testing. *Australian Family Physician*, 41 (6), 391-393.
- Pieper, D., Bühn, S., Nothacker, M., Kopp, B., Haring, A., Kulzer, B., Ludwig, B. & Schenker, P. (2018). *S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes* (2. Auflage). Deutsche Diabetes Gesellschaft.
- Rahmadi, A., Decroli, E. & Kam, A. (2019). Sepsis in Latent Autoimmune Diabetes in Adults with Diabetic Ketoacidosis: A Case Report. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7 (20), 3501-3504.
- Remmele, W. (1963). *Die humorale Steuerung der Erythropoiese*. Berlin, Göttingen & Heidelberg: Springer-Verlag.
- Robber, H., Sauer, H. & Willms, B. (1981). *Praktische Diabetologie* (2. Auflage). München-Gräfelfing: Werk-Verlag Dr. Edmund Banaschewski.
- Schatz, H. & Pfeiffer, A. (2014). *Diabetologie kompakt: Grundlagen und Praxis* (5. Auflage). Berlin & Heidelberg: Springer-Verlag.

- Singbartl, G. & Singbartl, K. (2016). Transfusionsassoziierte Pharmakotherapie (1. Auflage). Berlin & Heidelberg: Springer-Verlag.
- Suresh, S., Rajvanshi, P. & Noguchi, C. (2020). The Many Facets of Erythropoietin Physiologic and Metabolic Response. *Frontiers in Physiology*.
- Teng, R., Gavrilova, O., Suzuki, N., Chanturiya, T., Schimel, D., Hugendubler, L., Mammen, S., Yver, D., Cushman, S., Mueller, E., Yamamoto, M., Hsu, L. & Noguchi, C. (2011). Disrupted erythropoietin signalling promotes obesity and alters hypothalamus proopiomelanocortin production, *Nat Commun*, 2:520.
- Tews, D., Fischer-Posovszky, P., Debatin, K., Beer, A. & Wabitsch, M. (2016). Physiologische Relevanz des braunen Fettgewebes beim Menschen. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 165, 502-509.
- Vanavanan, S., Santanirand, P., Chaichanajareernkul, U., Chittamma, A., Dubois, J., Shirey, T. & Heinz, M. (2010). Performance of a new interference-resistant glucose meter. *Clinical Biochemistry*, 43 (1-2), 186-192.
- Wascher, T. (2016). Diabetes mellitus Typ 2: Einsatz in Therapie und Prophylaxe. *Arznei und Vernunft*.
- Wikipedia: JAK-STAT-Signalweg. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/JAK-STAT-Signalweg> (abgerufen am: 12.3.2020).
- Woolcott, O., Ader, M. & Bergman, R. (2015). Glucose homeostasis during short-term and prolonged exposure to high altitudes. *Endocr Rev.*, 36 (2), 149-173.
- Zhang, Y., Rogers, H., Zhang, X. & Noguchi, C. (2017). Sex difference in mouse metabolic response to erythropoietin. *The Federation of American Societies For Experimental Biology Journal*, 31 (6), 2661-2673.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der Glukose-abhängigen Insulinsekretion (Behrends et al., 2012).....	3
Abbildung 2: JAK-STAT-Signalweg von Erythropoietin	14
Abbildung 3: Pleiotrope Wirkung von Erythropoietin (Suresh et al., 2020).....	15
Abbildung 4: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf das Körpergewicht adipöser männlicher Mäuse über einen Zeitraum von t = 65 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.....	26
Abbildung 5: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf das Körpergewicht adipöser weiblicher Mäuse über einen Zeitraum von t = 63 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.....	27
Abbildung 6: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die relative Fettmasse von adipösen männlichen Mäusen zu den Zeitpunkten t = -5 Tage und t = 56 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.	29
Abbildung 7: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die relative Fettmasse von adipösen weiblichen Mäusen zu den Zeitpunkten t = -5 Tage und t = 56 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.	30
Abbildung 8: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf den Hämatokrit adipöser weiblicher und männlicher Mäuse zum Zeitpunkt t = 44 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; *p < 0,05.	31
Abbildung 9: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Basalglykämie adipöser männlicher Mäuse zu den Zeitpunkten t = -4 Tage, t = 8 Tage, t = 35 Tage und t = 60 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; *P < 0,05.	32
Abbildung 10: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Basalglykämie adipöser weiblicher Mäuse zu den Zeitpunkten t = -4 Tage, t = 8 Tage, t = 35 Tage und t = 60 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; *p < 0,05.	33
Abbildung 11: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Glukosetoleranz von adipösen männlichen Mäusen zum Zeitpunkt t = 51 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM.	34
Abbildung 12: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot) über einen Zeitraum von t = 120min im intraperitonealen Glukosetoleranztest adipöser männlicher Mäuse. Mittelwert $\pm$ SEM. *p < 0,05.	35
Abbildung 13: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-ink) über einen Zeitraum von t = 120min im intraperitonealen Glukosetoleranztest adipöser männlicher Mäuse. Mittelwert $\pm$ SEM. *p < 0,05.....	35
Abbildung 14: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Glukosetoleranz von adipösen weiblichen Mäusen zum Zeitpunkt t = 53 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM.	36
Abbildung 15: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die totale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-tot) über einen Zeitraum von t	

= 120min im intraperitonealen Glukosetoleranztest adipöser weiblicher Mäuse. Mittelwert $\pm$ SEM. *p < 0,05.....	37
Abbildung 16: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC-ink) über einen Zeitraum von t = 120min im intraperitonealen Glukosetoleranztest adipöser weiblicher Mäuse. Mittelwert $\pm$ SEM. *p < 0,05.....	37
Abbildung 17: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf das Plasmainsulin adipöser männlicher Mäuse zum Zeitpunkt t = 60 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; *p < 0,05.....	38
Abbildung 18: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Insulinsensitivität von adipösen männlichen Mäusen zum Zeitpunkt t = 60 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; *p < 0,05.	39
Abbildung 19: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf das Plasmainsulin adipöser weiblicher Mäuse zum Zeitpunkt t = 60 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede.	39
Abbildung 20: Einfluss regelmäßiger intraperitonealer Erythropoietin-Injektionen auf die Insulinsensitivität von adipösen weiblichen Mäusen zum Zeitpunkt t = 60 Tage. Mittelwert $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede.....	40