



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Wirkung von Hypoxie auf die Blutglukose von Mäusen

verfasst von / submitted by

Chami Rime, BSc

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

Wien, 2022 / Vienna, 2022

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

UA 066 605

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

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Dr. Clemens Fürnsinn

Zusammenfassung

Hintergrund und Zielsetzung:

Erythropoietin (Epo) ist ein Hormon, das wesentlich für die Produktion von Erythrozyten ist und unter Hypoxie vermehrt produziert wird. Das Ziel dieser Studie war herauszufinden, ob Hypoxie bei gesunden Mäusen die Blutglukose senkt, ob regelmäßige Behandlung mit Epo zu Gewichtsverlust und einem Absinken der Blutglukose führt und ob ein solcher Effekt bei genetisch veränderten Mäusen, die Epo-Rezeptoren nur in Knochenmark und Milz exprimieren (EpoRKO/Tg-Mäuse), erhalten bleibt.

Material und Methoden:

Im ersten Experiment wurden männliche C57BL/6J-Mäuse und EpoRKO/Tg-Mäuse, die durch fettreiches Futter adipös waren, 3-mal wöchentlich mit intraperitonealen Injektionen von 1000 U/kg Epoetin alpha behandelt und mit Vehikel-behandelten Kontrollen verglichen. Körpergewicht, Nahrungsaufnahme, Hämatokrit, sowie basale Glykämie und Glukosetoleranztest und wurden gemessen. Im zweiten Experiment wurden normalgewichtige Mäuse unter Hypoxie gehalten (10% O₂ in der Atemluft). Die Kontrollgruppe unter Raumluft wurde eingeschränkt gefüttert, sodass kein Gewichtsunterschied zwischen den Gruppen bestand. Zusätzlich zu den oben gelisteten Parametern wurden hier Körperzusammensetzung, Plasmainsulin und HOMA-Index (Maß der Insulinsensitivität) dokumentiert.

Ergebnisse

In adipösen C57BL/6J-Mäusen bewirkten Epo-Injektionen gegenüber den Kontrollen einen signifikanten Gewichtsverlust. Dieser Effekt war in adipösen EpoRKO/Tg-Mäusen nicht zu finden. Die Glykämie widerspiegelte die Unterschiede im Körpergewicht. Haltung von gesunden Mäusen unter Hypoxie bewirkte einen Anstieg des Hämatokrit und ein Absinken der Glykämie. Letzteres war nach kurzfristigem Fasten (4 h) wenig ausgeprägt, nach prologiertem Fasten (18 h) und im Glukosetoleranztest jedoch statistisch

deutlich zu erfassen. Die Wirkung der Hypoxie auf die Blutglukose war bei gleichem Körpergewicht mit reduzierter relativer Fettmasse verbunden, Effekte auf Plasmainsulin und HOMA-Index waren nicht nachweisbar.

Schlussfolgerung

Die gewichtsreduzierende Wirkung von Epo ist von der Expression von Epo-Rezeptoren in nicht-hämatopoetischen Geweben abhängig, wird also offenkundig durch direkte Wirkung von Epo auf diese Gewebe vermittelt. Bei schlanken, gesunden Mäusen bewirkt Haltung unter Hypoxie, die Epo-Freisetzung und Hämatokrit steigert, eine Blutglukosesenkung. Dies kann nach längerem Fasten sogar zu ausgeprägten Hypoglykämien führen.

Abstract

Background and objective

Erythropoietin (Epo) is an essential hormone to produce erythrocytes and is increased in hypoxia. The aim of this study was to determine whether hypoxia decreased blood glucose in healthy mice, whether regular treatment with Epo leads to weight loss and a fall in blood glucose, and whether such an effect occurs in genetically modified mice expressing Epo receptors only in the bone marrow and spleen (EpoRKO/Tg mice).

Material and methods

In the first experiment, male mice of the C57BL/6J line and the EpoRKO/Tg line, which were obese from high-fat diet, were treated 3 times weekly with intraperitoneal injections of 1000 U/Kg epoetin alpha and compared to vehicle-treated controls. Body weight, food intake, hematocrit, basal glycemia and glucose tolerance test were measured. In the second experiment, normal-weight mice were kept under hypoxia (10% O₂ in the breathing atmosphere). The control group was under room air and was fed restrictedly so that there was no difference in weight between the groups. In addition to the parameters listed above, body composition, plasma insulin and HOMA index (measure of insulin sensitivity) were documented.

Results

In obese C57BL/6J mice, Epo injections caused a significant weight loss compared to controls. This effect was not found in obese EpoRKO/Tg mice. Glycemia reflected differences in body weight. Maintaining healthy mice under hypoxia caused an increase in hematocrit and a decrease in glycemia. The latter was less distinct after short-term fasting (4h), but statistically significant after prolonged fasting (18h) and in the glucose tolerance test. The effect of hypoxia on blood glucose was associated with reduced relative fat mass at the same body weight; effects on plasma insulin and HOMA index were not detectable.

Conclusio

The weight-loss effect of Epo is dependent on the expression of Epo receptors in non-hematopoietic tissues and is thus apparently mediated by the direct action of Epo on these tissues. In lean, healthy mice, maintenance under hypoxia, which increases Epo release and hematocrit, causes blood glucose lowering. This can even lead to distinct hypoglycemia after prolonged fasting.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Diabetes - Definition, Formen, Symptome und Folgen	1
1.1.1. Typ-1-Diabetes	1
1.1.2. Typ-2-Diabetes	2
1.1.3. Gestationsdiabetes	2
1.1.4. Latent Autoimmune Diabetes with Adult Onset (LADA).....	3
1.1.5. Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)	3
1.1.6. Diabetische Spätkomplikationen	4
1.2. Antidiabetische Medikamente	4
1.2.1. Orale Antidiabetika	4
1.2.2. Insulintherapie	6
1.3. Insulin	8
1.4. Hypoxie	9
1.5. Erythropoetin	11
1.5.1. Transgene Epo-R Knock Out Mäuse	12
2. Zielsetzung	14
2.1. Experiment 1	14
2.2. Experiment 2	14
3. Materialien und Methoden	15
3.1. Versuchstiere und Haltung	15
3.1.1. Exp. 1/Epo.....	15
3.1.2. Exp. 2/Hypoxie	16
3.2. Versuchsablauf	16
3.2.1. Interventionen und Versuchsgruppen - Exp.1/Epo	16
3.2.2. Interventionen und Versuchsgruppen - Exp. 2/ Hypoxie.....	17
3.3. Messungen	18
3.3.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme	18
3.3.2. Körperzusammensetzung	19
3.3.3. Nüchternblutglukose	19
3.3.4. Plasmainsulin und HOMA-Index.....	20
3.3.5. Glukosetoleranztest	20
3.3.6. Hämatokrit	21
3.3.7. Terminales Sammeln von Blut und Gewebeproben	21
3.4. Statistik.....	22
4. Ergebnisse	23
4.1. Exp.1/ Epo	23
4.1.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme	23
4.1.2. Hämatokrit und Sauerstoffsättigung	24
4.1.3. Glukosetoleranztest	25
4.2. Exp.2/ Hypoxie.....	27
4.2.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme	27
4.1.2. Körperzusammensetzung	28
4.2.3. Hämatokrit und Sauerstoffsättigung	29
4.2.4. Nüchternblutglukose	30
4.2.5. Glukosetoleranztest	32
4.2.6. Plasmainsulin und HOMA-Index.....	34

5. Diskussion	36
5.1. Exp. 1/Epo	36
5.2. Exp.2 /Hypoxie	38
6. Schlusserfolgerung	42
7. Danksagung.....	43
8. Literaturverzeichnis	44
9. Abbildungsverzeichnis	48

1. Einleitung

1.1. Diabetes - Definition, Formen, Symptome und Folgen

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselstörung, die durch einen relativen oder totalen Insulinmangel mit einer chronischen erhöhten Blutglukose ausgedeutet ist. Diabetes mellitus kann Spätschäden an Organen verursachen. Daher ist eine Diabetestherapie notwendig, mit deren Hilfe die Blutglukose so nahe wie möglich der physiologischen Blutglukosewerte von Gesunden eingestellt wird (Herdegen et al., 2019; Mutschler et al., 2020). Es wird zwischen mehreren Typen von Diabetes mellitus unterschieden: Typ-1-Diabetes, Typ-2-Diabetes, Gestationsdiabetes, LADA (Latent Autoimmune Diabetes of the Adults), MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young), medikamentös induzierter Diabetes und andere seltene Formen (Herdegen et al., 2019).

Die Symptome, die bei unbehandeltem Diabetes mellitus auftreten, sind Polyurie und dadurch Durst (aufgrund des hohen Wasserverlusts), Gewichtsverlust, Muskelschwäche, Leistungsverminderung, schlechte Wundheilung, Juckreiz und vermehrte Infektionsanfälligkeit (Herdegen, 2019). Die weltweit schnell zunehmende Prävalenz dieser Krankheit ist ein großes Gesundheitsproblem der Gegenwart. Deswegen ist es wichtig, neue Therapiekonzepte zu entwickeln (Siddiqui et al., 2015).

1.1.1. Typ-1-Diabetes

Typ-1-Diabetes tritt meist im jugendlichen Alter auf, weswegen man früher auch von „juvenilem Diabetes“ sprach. Es kann aber auch im späteren Lebensalter zur Manifestation eines Typ-1-Diabetes kommen. HLA-Antigene (DR3-DR4) wurden als Hinweis auf genetische Prädisposition beobachtet. Typ-1-Diabetes ist im Vergleich zu Typ-2-Diabetes weniger stark genetisch bedingt. Es kommt beim Typ-1-Diabetes zur autoimmunologischen Zerstörung der Insulin produzierenden B-Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas, was zum totalen Insulinmangel führt. Man nimmt an, dass exogene Faktoren wie virale Infektionen (z.B. Mumpsviren) oder Umweltschadstoffe diese Autoimmunerkrankung auslösen können. Wenn die Krankheit unbehandelt

bleibt, könnte es aufgrund des totalen Insulinmangels zu Ketoazidose und zum Koma diabetikum kommen, daher muss Insulin unbedingt lebenslang injiziert werden (Mutschler et al., 2020; Aktories et al., 2009).

1.1.2. Typ-2-Diabetes

Im Unterschied zum Typ-1-Diabetes ist der Typ-2-Diabetes (früher auch Altersdiabetes genannt) mit einem relativen Insulinmangel verbunden, wobei es im Spätstadium der Erkrankung auch zu einem absoluten Insulinmangel kommen kann (Mutschler et al., 2020). Die Veranlagung zum Typ-2-Diabetes ist sehr stark genetisch determiniert, allerdings ist der Erbgang noch nicht ganz geklärt, da eine Vielzahl von Genen Einfluss haben dürfte. Über 80% der Typ-2-Diabetiker sind übergewichtig und entwickeln daher eine Insulinresistenz, was zumindest teilweise Folge gesteigerter Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe sein dürfte. In einer frühen Phase wird die Insulinresistenz meist durch erhöhte Produktion und Plasmakonzentration von Insulin kompensiert. Der Typ-2-Diabetes, also die Hyperglykämie, entsteht allerdings erst, wenn der durch Insulinresistenz erhöhte Insulinbedarf von den B-Zellen nicht mehr vollständig gedeckt werden kann. Durch Ernährungsumstellung, Sport und orale Antidiabetika kann diese Krankheit oft jahrelang behandelt werden. Aufgrund des progredienten Prozesses der Krankheit muss der Patient in späteren Phasen des Krankheitsverlaufs aber meist mit oralen Antidiabetika und letztendlich sogar oft mit Insulin behandelt werden (Aktories et al., 2009).

1.1.3. Gestationsdiabetes

Wird eine Hyperglykämie während der Schwangerschaft zum ersten Mal diagnostiziert, spricht man von einem Gestationsdiabetes. Die Entstehung und Entwicklung des Gestationsdiabetes ist ähnlich dem Typ-2-Diabetes: Durch eine in der Schwangerschaft zunehmende Insulinresistenz mit unvollständiger Kompensation durch die B-Zellen kommt es zur Hyperglykämie. Das Wiederholungsrisiko bei nachfolgenden Schwangerschaften, sowie das Risiko, innerhalb von 10 Jahren nach einem Gestationsdiabetes an Typ-2-Diabetes zu erkranken, ist hoch. Bleibt die Krankheit ohne Behandlung, steigt das Risiko

von Frühgeburten sowie von erhöhtem Geburtsgewicht. Das Kind kann in der Folge auch an akuten Problemen (diabetische Fetopathie, Hypoglykämie, Atemstörungen) und an Langzeitfolgen (Adipositas und Glukosetoleranzstörung) leiden. Deswegen sind Ernährungsumstellung und Bewegung in der Behandlung des Gestationsdiabetes besonders wichtig. Sollte bei regelmäßigen Blutglukosemessungen bemerkt werden, dass die Blutglukosewerte trotzdem immer noch hoch sind, ist mit einer Insulintherapie zu beginnen (Schäfer-Graf et al., 2021).

1.1.4. Latent Autoimmune Diabetes with Adult Onset (LADA)

LADA ist eine besondere Form von Typ-1-Diabetes, die bei Erwachsenen vorkommt und langsam fortschreitet. Die Diagnose wird im Erwachsenenalter bei Beginn der Krankheit gestellt, und zwar bei Vorhandensein von Markern der B-Zellen Autoimmunität (zirkulierenden Insel-Autoantikörpern), die LADA von Typ-2-Diabetes unterscheiden, und durch keine Notwendigkeit an Insulin über 6 Monate nach Diagnose der Krankheit. Die HLA (DR3, DR4) sind auch in der Entstehung von LADA beteiligt. Die Krankheit kann anfänglich mit oralen Antidiabetika behandelt werden, allerdings wird eine Insulinzufuhr ab einem gewissen Zeitpunkt notwendig (Furlanos et al., 2005).

1.1.5. Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)

MODY ist eine Form von monogenem Diabetes, der autosomal dominant vererbt wird, und wurde früher als ein Typ-2-Diabetes von jungen Erwachsenen betrachtet. Die Krankheit wird durch heterozygote monogene Mutationen in verschiedenen Genen verursacht. MODY tritt normalerweise bei Kindern, Jugendlichen oder im frühen Erwachsenenalter mit milder Symptomatik auf. Erst in höherem Lebensalter (typischerweise >50) kommt es zur vollen Entwicklung der Krankheit. Es wurde kein Hinweis auf eine B-Zell Autoimmunität beobachtet. MODY kann sehr oft durch orale Antidiabetika ohne Bedarf an Insulin behandelt werden. Die benötigte Behandlung variiert jedoch in Abhängigkeit der Mutation, die zugrunde liegt (Siddiqui et al., 2015).

1.1.6. Diabetische Spätkomplikationen

Diabetes mellitus ist nicht nur aufgrund der akuten Wirkung der erhöhten Blutglukose bedrohlich, sondern auch, weil es – insbesondere bei schlechter Einstellung der Blutglukose - über die Jahre zu chronischen Komplikationen wie Makroangiopathie (koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit) und Mikroangiopathie (Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie und diabetisches Fußsyndrom) kommen kann (Herdegen et al., 2019).

1.2. Antidiabetische Medikamente

1.2.1. Orale Antidiabetika

Orale Antidiabetika werden hauptsächlich zur Behandlung von Typ-2-Diabetes eingesetzt. Eine Ausnahme ist Dapagliflozin, das vor kurzem zur Behandlung von Typ-1-Diabetes im Sinne einer Add-on-Therapie neben der unerlässlichen Insulintherapie eine Zulassung bekommen hat. Metformin wird gelegentlich Off-Label bei Typ-1-Diabetikern eingesetzt. (Herdegen et al., 2019; Mutschler et al., 2020).

Orale Antidiabetika können nach ihrer Wirkungsweise eingeteilt werden. Sulfonylharnstoffe und Glinide (auch insulinotrope Antidiabetika genannt) steigern die Insulinsekretion aus den B-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas. Sie greifen an den ATP-sensitiven Kalium-Kanälen an (siehe auch Kapitel 1.3). Sie sind allerdings nur wirksam, solange der Körper endogenes Insulin produzieren kann. Sulfonylharnstoffe sind mit einem erhöhten Risiko von Hypoglykämien und Gewichtszunahme verbunden, deswegen sollten sie übergewichtigen Typ-2-Diabetikern nicht verschrieben werden. Glinide werden insbesondere eingesetzt, um postprandiale Hyperglykämien zu behandeln. Sie verursachen seltener Hypoglykämien als Sulfonylharnstoffe, da sie eine vergleichsweise kürzere Wirkungsdauer haben. (Herdegen et al., 2019; Mutschler et al., 2020).

Auch Gliptine (Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitoren; DPP4-Inhibitoren) erhöhen die Insulinausschüttung, im Unterschied zu Sulfonylharnstoffen und Gliniden jedoch in glukoseabhängiger Weise, was die gefährlichen Hypoglykämien praktisch gänzlich ausschließt. Durch Hemmung des Enzyms DPP4 verzögern

die Gliptine den Abbau von GLP1 (Glukagon-like peptid-1). GLP1 ist ein Peptid, das die Insulinsekretion fördert. Ähnlich wirken Inkretinmimetika (GLP-Rezeptor-Agonisten), die direkt den GLP1-Rezeptor stimulieren und daher wie endogenes GLP1 wirken, was zu vermehrter der glukoseabhängiger Insulinausschüttung und zur Hemmung der Glukagonsekretion führt. Als Nebenwirkungen sind gastrointestinale Beschwerden und Pankreatitis zu beobachten. Inkretine werden meist mit Metformin oder Sulfonylharnstoffen kombiniert, da ihre Blutglukose-senkende Wirksamkeit vergleichsweise moderat ist. Aufgrund der Glukose-abhängigen Wirkweise werden durch Inkretine vor allem die postprandialen Blutglukosewerte gesenkt. (Herdegen et al., 2019; Mutschler et al., 2020).

Metformin ist das einzige Biguanid-Derivat, das in Verwendung geblieben ist, nachdem es im Vergleich zu anderen Biguaniden ein geringeres Risiko von Laktazidose hat. Metformin ist heutzutage das erste Mittel der Wahl zur Behandlung des Typ-2-Diabetes. Indem es die hepatische Glukoneogenese hemmt, vermindert Metformin die Glukoseproduktion und senkt so die Blutglukosekonzentration. Es bewirkt auch eine Verbesserung der Glukoseverwertung. Die Insulinsensitivität wird durch Metformin verbessert, auch die mikro- und makrovaskulären Spätschäden werden reduziert. Da es keine Stimulation der Insulinsekretion aus den B-Zellen hervorruft, ist das Risiko von Hypoglykämien sehr gering. (Herdegen et al., 2019; Mutschler et al., 2020).

Glitazone aktivieren den Transkriptionsfaktor peroxisomal proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), der Gene aktiviert, die am Glukose- und Lipidstoffwechsel beteiligt sind. Die Insulinresistenz und die hepatische Glukosefreisetzung werden dadurch vermindert. Als Nebenwirkungen werden Gewichtszunahme, Ödeme und ein erhöhtes Frakturrisiko beobachtet. (Herdegen et al., 2019; Mutschler et al., 2020).

α -Glucosidasehemmer hemmen die Spaltung von Disacchariden in Monosaccharide durch das Enzym α -Glucosidase im Darm. Dadurch wird die Glukoseresorption im Intestinum verzögert. Sie vermindern vor allem den postprandialen Blutglukoseanstieg und sind in der Anfangsphase des Diabetes besonders effizient. Gastrointestinale Störungen wurden allerdings als Folge

der Einnahme des Medikaments berichtet (Herdegen et al., 2019; Mutschler et al., 2020).

Die jüngste Klasse der oralen Antidiabetika sind die SGLT-2-Inhibitoren (Sodium dependent glucose transporter 2-Inhibitoren). Sie hemmen die SGLT-2 im proximalen Tubulus der Niere. So wird die Glukose vermehrt renal, also mit dem Urin, ausgeschieden. Es gibt Hinweise, dass karzinogene Effekte als Langzeitriskien leicht erhöht sein könnten (Mutschler et al., 2020).

1.2.2. Insulintherapie

Nachdem Insulin ein Proteinhoromon ist, wird es mit Ausnahme von Normalinsulin, das unter bestimmten Bedingungen auch intravenös appliziert werden kann, nur subkutan injiziert. Wenn eine kurzwirksame Wirkung gewünscht ist, wird die Injektion aufgrund der schnelleren Resorption in die Haut am Bauch empfohlen. Wenn aber eine langwirksame Wirkung gewünscht ist, erfolgt die Injektion am besten in den Oberschenkel. Die Injektionsstelle sollte immer innerhalb der gewählten Bereiche gewechselt werden, da es sonst zu lokalen Lipodystrophien kommen könnte (Herdegen et al., 2019).

Heutzutage sind verschiedene Insuline am Markt: kurzwirksame Insuline (Normalinsulin, Insulinanaloge), Verzögerungsinsulin (Intermediärinsuline, Langzeitinsuline) und Mischinsuline. Es wird zwischen mehreren Insulinbehandlungsformen unterschieden: konventionelle Therapie, intensivierte konventionelle Therapie, supplementäre Insulintherapie, basal unterstützte orale Therapie, sowie Insulinpumpen.

Bei der konventionellen Therapie erfolgt eine feste Insulindosierung (Mischinsulin) morgens und abends. Ein fester Ernährungsplan sowie Zwischenmahlzeiten sind bei dieser Therapie erforderlich, um Hypoglykämien zu vermeiden. Diese Therapie wird bei Typ-2-Diabetikern angewandt, die z.B. aufgrund hohen Alters eingeschränkt schulbar sind, in Ausnahmefällen aber auch bei Typ-1-Diabetikern. Bei der intensivierten konventionellen Therapie wird ein langwirksames Basalinsulin zwei oder selten dreimal täglich injiziert und mit Injektionen von kurzwirksamen Insulinen zu jeder Mahlzeit kombiniert.

Voraussetzung sind hier mehrmals täglich Blutglukosemessungen, die vom Patienten selbst durchgeführt werden. Die Patienten müssen eine intensive

Schulung bekommen, damit sie mit den sogenannten Pens (Injektionshilfen) umgehen können und gefährliche Hypoglykämien vermieden werden. Die Therapie kann bei Typ-1-Diabetikern und gut schulbaren Typ-2-Diabetikern durchgeführt werden (Aktories et al., 2009; Mutschler et al., 2020; Herdegen et al., 2019). Bei der supplementären Insulintherapie werden kurzwirksame Insuline zu den Mahlzeiten in Kombination mit einem oralen Antidiabetikum gespritzt. Patienten, die an postprandialen Hyperglykämien leiden, aber normale Nüchternblutglukose haben, profitieren von dieser Therapie. Bei der basalunterstützten oralen Therapie wird neben der oralen Therapie langwirksames Insulin vor dem Schlafen injiziert. Dies ist hilfreich, wenn es trotz oraler Antidiabetika zu erhöhter Nüchternblutglukose in den Morgenstunden kommt (Mutschler et al., 2020). Tragbare programmierbare Pumpen werden bei der Insulinpumpentherapie verwendet, wobei kontinuierlich, aber auch diskontinuierlich (d.h. zusätzlich bei jeder Mahlzeit), Insulin subkutan infundiert wird. Diese Therapie wird bei starken morgendlichen Hyperglykämien, bei wiederholten Hypoglykämien, sowie bei grundsätzlich sehr schwer einstellbaren Patienten angewandt (Herdegen et al., 2019; Mutschler et al., 2020). Hypoglykämien können durch Überdosierung bei Insulininjektionen auftreten, wobei Typ-1-Diabetiker unter intensivierter konventioneller Therapie am stärksten gefährdet sind. Bei Hypoglykämien wird zwischen vegetativen Symptomen (Blässe, Heißhunger, Schwitzen, Angst) und neuroglykopenischen Symptomen (Bewusstseinsstörungen, kognitive Störungen, Krämpfe) unterschieden. Es ist wichtig, die vegetativen Symptome rechtzeitig zu erkennen und durch Aufnahme schnell resorbierbarer Kohlenhydrate (z.B. Traubenzucker) zu intervenieren. Andernfalls kann es zu schweren, sogar lebensbedrohlichen Hypoglykämien kommen, die möglichst rasch durch Injektionen von Glukagon und/oder Glukoselösung bekämpft werden müssen. Gewichtszunahme und lokale Lipodystrophie, oft in Form von Lipohypertrophie, des Unterhaut-Fettgewebes an der Injektionsstelle sind auch unerwünschte Nebenwirkungen der Insulinbehandlung (Mutschler et al., 2020; Herdegen et al., 2019).

1.3. Insulin

Insulin ist entscheidend für die Regulation der Blutglukose und spielt daher eine sehr wichtige Rolle bei der Ätiologie und Therapie des Diabetes mellitus.

Der Synthese- und Speicherort von Insulin sind die B-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Insulin besteht aus zwei Peptidketten, der A-Kette und der B-Kette, die durch zwei Disulfidbrücken zusammen verbunden sind. Im Translationsprozess entsteht zuerst Präproinsulin an den Ribosomen der B-Zellen. Da Insulin ein zu sekretierendes Hormon ist, hat es eine Basensequenz, wie sie typischer Weise für ein Signalpeptid kodiert. Nach dem Abspalten des Signalpeptids entsteht aus dem Präproinsulin im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums das Proinsulin. Bei Spaltung im Golgi-Apparat wird das C-Peptid von A- und B-Kette getrennt und es entsteht das reife Insulin (Aktories et al., 2009, Königshoff; Brandenburger, 2004; Mutschler et al., 2020).

Neben anderen Signalen stimuliert vor allen erhöhte Blutglukose die Insulinfreisetzung. Glukose wird über Glukosetransporter-2 (Glut-2) in die B-Zellen des endokrinen Pankreas aufgenommen und über die Glykolyse, den Zitratzyklus und die Atmungskette abgebaut, sodass ATP produziert wird. Durch den Anstieg des ATP schließen sich die ATP-abhängigen Kaliumkanäle, was zu einer Depolarisation der Zelle führt, da Kalium nicht mehr aus der Zelle diffundieren kann. In der Folge öffnen sich die Kalziumkanäle und Kalzium kann in die Zelle einströmen, was letztendlich zur Exozytose, also zur Insulinfreisetzung in das Blut, führt (Königshoff, Brandenburger, 2004; Abbildung 1).

Insulin ist in seiner Wirkung ein anaboles Hormon. Das heißt, es stimuliert die Synthese und Speicherung großer Moleküle, die nicht zuletzt als Energiereserven des Körpers dienen. Insulin ist daher ein Stimulator der Triglyzeridsynthese und Fettspeicherung (vor allem Fettgewebe), der Glykogensynthese und Kohlenhydratspeicherung (vor allem Skelettmuskel und Leber) und der Proteinsynthese. In wesentlichen Organen regt Insulin daher auch die Aufnahme der für diese Prozesse benötigten Substrate an (z.B. Glukosetransport in den Muskel, Fettsäureaufnahme ins Fettgewebe). Die gegenläufigen katabolen Prozesse wie Lipolyse, Glykogenabbau oder

Proteolyse werden durch Insulin gehemmt. Dazu kommt es unter Insulinstimulation auch zu einer Hemmung der hepatischen Glukoseproduktion und zu einer Steigerung der oxidativen Glukoseverwertung (Mutschler et al., 2020).

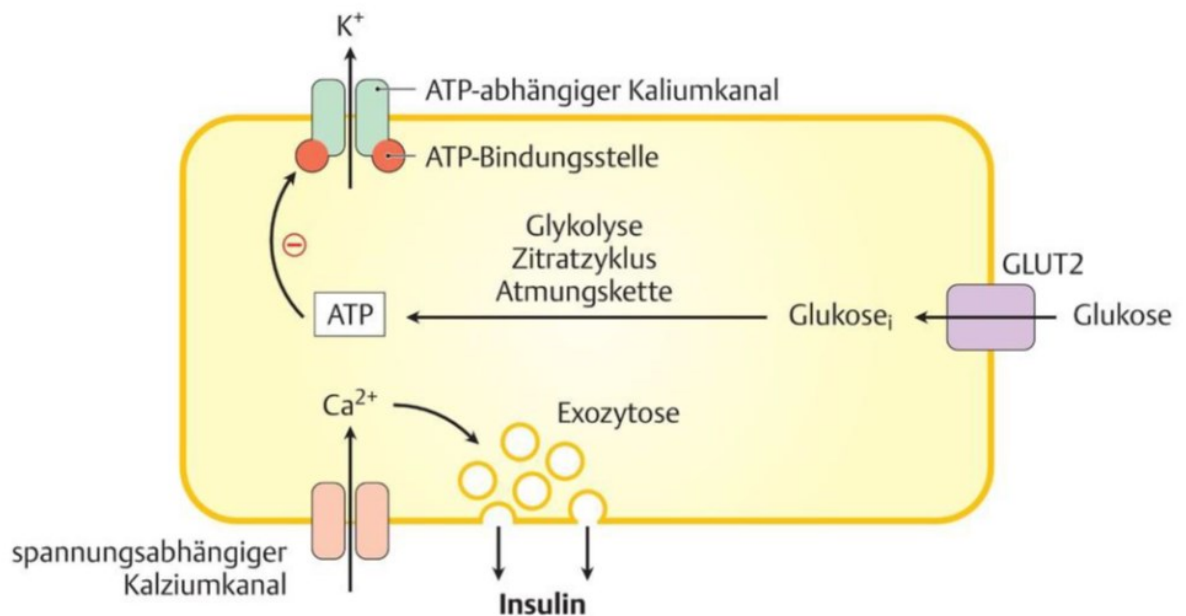


Abbildung 1: Mechanismus der Insulinsekretion aus den B-Zellen des Pankreas ins Blut (Behrends et al., 2012)

1.4. Hypoxie

Hypoxie ist definiert als reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit unter dem Normalwert, sodass die normale physiologische Funktion der Zellen nicht mehr aufrechterhalten werden kann (Sharp et al, 2004). Es gibt Hinweise, dass Hypoxie – möglicherweise über gesteigerte Freisetzung und Plasmakonzentration von Erythropoetin (Epo) - die Insulinwirkung moduliert, was Ursache eines Absinkens der Blutglukose sein könnte. Bei Personen, die auf hoher Seehöhe leben, wo ein niedriger Sauerstoffpartialdruck herrscht, sind basale Blutglukose und Insulinresistenz, sowie die Prävalenz von Diabetes niedriger als bei Bewohnern von Gebieten niedriger Seehöhe (Woolcott et al., 2014). Der Sauerstoffmangel in den Bergen könnte neben vielen anderen Faktoren der Grund für metabolische Unterschiede sein.

Deswegen wurden viele Experimente mit unterschiedlichen Protokollen durchgeführt, um die metabolischen Folgen von Hypoxie experimentell zu untersuchen (Unterschiede in Verlauf und Dauer des Sauerstoffmangels, Ernährungszustand, usw.). Auch Nagerexperimente mit kurzfristig alternierender Hypoxie und Normoxie wurden durchgeführt, um den wiederholten kurzzeitigen Sauerstoffmangel, der bei der obstruktiven Schlafapnoe auftritt, nachzuahmen. In vielen von letzteren Experimenten wurde ein nachteiliger Effekt auf die Glukosetoleranz und die Insulinsensitivität beobachtet (Drager et al., 2011, Polak et al., 2013). Abweichende Befunde von Hypoglykämie als Reaktion auf kurz- und langfristige Hypoxie wurden aber auch berichtet. Ein kurzfristiger Aufenthalt in den Bergen bzw. kurzfristige, aber kontinuierliche experimentelle Hypoxie von weniger als einer Woche zeigten oft eine Verschlechterung der Glukosehomöostase, was auf eine Stressreaktion zurückzuführen sein könnte (Höhenkrankheit) (Sawhney et al., 1991, Woolcott et al., 2015). Eine normale bzw. verbesserte Glukosehomöostase wurde allerdings in einigen Studien bei langfristigem, kontinuierlichem Sauerstoffmangel beobachtet (Chen et al., 2010, Gamboa et al., 2011). Aufgrund der gelegentlichen Anwendung von hämatokritsensitiven Glukosemessgeräten, die bei hohem Hämatokritwert zu niedrige Blutglukosekonzentration zeigen, sowie aufgrund indirekter Wirkungen auf die Blutglukose bei Änderungen in Kalorienkonsum und Körpergewicht kann eine direkte anti-hyperglykämische Wirkung langfristiger Hypoxie jedoch gegenwärtig noch nicht als nachgewiesen gelten. Obwohl eine anorektische Wirkung bei Aufenthalt in den Bergen und in Hypoxieexperimenten bestätigt wurde (Chen et al., 2007; Westerterp-Plantenga et al., 1999), wurde noch keine aussagekräftige Studie über Rolle der Appetitlosigkeit in der Blutglukosesenkung durch Hypoxie durchgeführt. Deswegen wurde in einem der vorliegenden Studie vorangehenden Experiment die direkte Wirkung von appetitvermittelten Effekten getrennt. Dies war möglich, indem Mäuse unter langfristiger und kontinuierlicher Hypoxie gehalten wurden und gleichzeitig die Mäuse der Kontrollgruppe eingeschränkt gefüttert wurden, sodass deren Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe vergleichbar war. Dabei wurde deutlich, dass Hypoxie auch eine beträchtliche

vom Körpergewicht unabhängige blutglukosesenkende Wirkung hat (Abu Eid et al, 2018).

Die vorliegende Studie beinhaltet Experimente, die dazu beitragen sollen besser zu verstehen, auf welche Weise Hypoxie die Blutglukose und die Insulinsensitivität beeinflusst. Vorangehende Experimente an unserem Labor hatten auf Epo als Vermittler der Hypoxiewirkung auf diese metabolischen Parameter hingewiesen.

1.5. Erythropoetin

Das Hormon Erythropoetin (Epo) ist wesentlich für die Produktion von Erythrozyten. Viault beschrieb zum ersten Mal die Beziehung zwischen der Erythropoese und dem Sauerstoff, als er im Hochland Morococha (Peru) war. Dort stellte er eine Zunahme seiner roten Blutzellen fest. Später wurde auch gefunden, dass Sauerstoffmangel im Gewebe zu einer vermehrten Produktion von Epo führt (Jelkmann, 2011).

Bei Säugetieren wird Epo vorwiegend in den Nieren produziert (Suresh et al, 2020). Die Epo-Synthese wird auf Transkriptionsebene reguliert. Epo-mRNA ist auch in Gehirn, Milz, Leber und Lunge nachweisbar, bei chronischer Nierenerkrankung können diese Organe allerdings nicht das renale Epo ersetzen. Epo ist ein saures Glykoprotein, das aus 165 Aminosäuren besteht, sein Molekulargewicht ist etwa 30kDa und es ist an vier Stellen glykosyliert. Transkriptionsfaktoren wie GATA2 kontrollieren die Epo-Synthese. GATA2 inhibiert den Epo-Promotor unter normalen Bedingungen. Allerdings wird GATA2 unter Hypoxie zurückgefahren, was zu einer Aufhebung der Blockade des Epo-Promotors führt. Ein weiterer wichtiger Regulator der Epo-Expression ist der EPO-Enhancer. Die Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIFs) sind für seine Aktivierung verantwortlich. HIFs sind Proteine, die in allen Geweben vorhanden sind (Jelkmann, 2013). Es wird ein Heterodimer aus HIF- α (HIF-1 α , HIF- 2 α oder HIF- 3 α) und HIF-1 β gebildet. Für die Epo-Regulierung ist HIF-2 α besonders wichtig. Bei ausreichendem Sauerstoff wird HIF- α durch Prolinhydroxylase hydroxyliert und durch das Proteosom abgebaut. Bei Sauerstoffmangel wird die Epo-Expression durch HIF-2 α hochreguliert (Suresh et al., 2020).

Der Epo-Rezeptor (Epo-R) ist ebenfalls ein Glykoprotein, mit 484 Aminosäuren und etwa 60 kDA. Der Epo-R gehört zur Zytokin-Klasse-I-Rezeptor-Familie (Jelkmann, 2011). Nach der Bindung von Epo an den Epo-R erfolgt eine Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten und so wird der JAK-STAT Signalweg aktiviert (JAK: Janus- Kinasen, STAT: Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription). Dieser Signalweg ist wichtig für die Reifung von Erythrozyten aus den Stammzellen des Knochenmarks (Müller-Esterl, 2018). Epo wird in der Medizin bei Anämien, die durch Niereninsuffizienz bzw. Tumoren verursacht werden, eingesetzt. Aufgrund seiner zytoprotektiven, proangiogenen und antiinflammatorischen Effekte kann es auch zur Regeneration der Haut und zur Beschleunigung der Wundheilung eingesetzt werden. Allerdings ist es wichtig zu erwähnen, dass Epo die Metastasierung von Krebszellen beschleunigen kann. Deswegen ist die Anwendung von Epo, wenn eine maligne Erkrankung bekannt ist, zu vermeiden (Sorg et al., 2010). Viele neue Studien haben gezeigt, dass das Körpergewicht, die Fettmasse und der Glukosestoffwechsel durch Epo reguliert werden können. Bei adipösen Mäusen, in denen Epo überexprimiert wurde, wurden Körpergewichtsabnahme, Abnahme der Fettmasse und Normalisierung der Plasmainsulinkonzentration beschrieben. Genauso wurden in Epo überexprimierenden Mäusen Verbesserungen von Glukosetoleranz und Insulinsensitivität beobachtet. Das zeigt uns, dass neben der hämatopoetischen Wirkung von Epo auch Fett- und Glukosestoffwechsel von Epo reguliert werden (Foskett et al., 2011).

1.5.1. Transgene Epo-R Knock Out Mäuse

Im Rahmen der Erforschung der Wirkungen von Epo, insbesondere auch der Wirkungen auf den Glukose- und Fettstoffwechsel, wurden Mausmodelle entwickelt, die zum besseren Verständnis der Epo-Wirkungen beitragen sollten. Die transgene Epo-R Knock-Out Maus wurde erstmals in einer Publikation von Suzuki et al. (2002) beschrieben. Da der Epo-EpoR Signalweg eine essentielle Rolle für die Erythropoese spielt, sind Mäuse ganz ohne Epo-R nicht lebensfähig. Daher wurden zwei Linien von Transgenen EpoR-Null Mäusen –

die den EPO-R nur in hämatopoetischen Geweben exprimieren (Knochenmark und Milz) – gentechnisch hergestellt. So wurden die EpoR-Null Mutanten vor embryonaler Letalität geschützt, konnten Erythrozyten bilden und entwickelten sich weitgehend normal, obwohl ihnen der EpoR in den nicht-hämatopoetischen Geweben fehlte. (Suzuki et al., 2002). Dieses Mausmodell wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

2. Zielsetzung

Die vorliegende Studie ist ein Beitrag zur Verbesserung des Verständnisses der Wirkungen von Hypoxie und Epo auf den Energiestoffwechsel. Nachdem an unserem Labor schon einige Untersuchungen zu diesem Thema abgeschlossen wurden, sollten nun in zwei Experimenten an Mäusen weitere Fragen beantwortet werden.

2.1. Experiment 1

In vorangehenden Studien wurde festgestellt, dass Behandlung von Mäusen mit hochdosiertem Epo das Körpergewicht reduziert. Das Ziel dieses Experiments war festzustellen, ob diese Wirkung durch Epo-R an hämatopoetischen oder an nicht-hämatopoetischen Geweben vermittelt wird. Zu diesem Zweck wurden EpoRKO/Tg-Mäuse verwendet, die den Epo-R nur in Knochenmark und Milz exprimieren.

2.2. Experiment 2

Mehrere Studien, auch an unserem Labor, haben sich bisher mit der Wirkung von Hypoxie auf die Blutglukose adipöser Mäuse beschäftigt. Nachdem an unserem Labor gefunden wurde, dass Haltung von adipösen Mäusen unter Hypoxie deren Hyperglykämie reduziert, hatte das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Experiment zum Ziel festzustellen, ob Hypoxie auch einen Effekt auf die Normoglykämie von gesunden Mäusen hat. Dabei sollte ein indirekter Hypoxieeffekt über Gewichtsverlust ausgeschlossen werden, indem die Kontrollgruppe eingeschränkt gefüttert wurde, sodass sie eine Körpergewichtskurve ähnliche jener der Hypoxie-Gruppe hatte.

3. Materialien und Methoden

3.1. Versuchstiere und Haltung

3.1.1. Exp. 1/Epo

In diesem Experiment fanden 28 männliche Mäuse Verwendung. Davon waren 11 Wildtyp-Mäuse vom Stamm C57BL/6J vom Zuchtinstitut der Medizinischen Universität Wien in Himberg, Österreich. Sie waren bei der Lieferung ca. 7 Wochen alt. Die weiteren 17 Tiere waren ebenfalls männlich, jedoch EpoRKO/Tg-Mäuse. Sie wurden in den Tierlabors gezüchtet, in denen die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt wurden, also an der Abteilung für Biomedizinische Forschung der Medizinischen Universität Wien, Österreich. EpoRKO/Tg-Mäuse haben einen genetischen C57BL/6J-Hintergrund und die verwendeten Tiere stammten von Embryonen ab, die vom Riken BioResource Research Center in Tsukuba, Japan, zur Verfügung gestellt worden waren. Der C57BL/6J-Stamm war für die vorliegende Studie geeignet, da Mäuse dieses Stamms unter Konsum von „High-Fat-Diet“, die zu 60% aus Fett besteht (HFD, von der Firma Research Diets, New Brunswick, USA), im Vergleich zu anderen Stämmen am anfälligsten für die Entwicklung von ernährungsbedingter Fettleibigkeit und Insulinresistenz sind. Dies wurde in einer Studie von Montgomery et al. (2013) gezeigt, die die Auswirkungen von HFD gegenüber Low-Fat-Diet in fünf verschiedenen Mäusestämmen untersucht hat. Die Mäuse wurden in Käfigen aus Kunststoff mit einem Gitterdeckel gehalten. In dem Raum, wo das Experiment stattgefunden hat, herrschte eine konstante Temperatur von ca. 23°C und ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden. Alle Mäuse wurden im Alter von etwa 10 Wochen auf HFD gesetzt und hatten unbeschränkten Zugang zu Trinkwasser.

3.1.2. Exp. 2/Hypoxie

Für dieses Experiment fanden 22 männliche Mäuse vom Stamm C57BL/6J vom Zuchtinstitut der Medizinischen Universität Wien in Himberg, Österreich, Verwendung. Die Mäuse waren bei der Lieferung ca. 8 Wochen alt. Sie bekamen ein kohlenhydratreiches Futter (Rod16-A, Alleinfutter für Zucht und Haltung von Maus & Ratte, LASvendi GmbH, Soest, Deutschland). Nachdem dieses Futter nur eine kleine Menge an Fett enthielt, waren die Mäuse gesund und entwickelten keine Adipositas. Die weiteren Haltungsbedingungen (Käfige, künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus, Trinkwasser) waren wie bei den Mäusen in Exp.1/Epo (Kapitel 3.1.1). Allerdings wurde ein Teil der Mäuse in einer Hypoxiekammer gehalten, was weiter unten noch genau beschrieben wird (Kapitel 3.2.2.). Die anderen Mäuse (Kontrollgruppe) wurde an normaler Raumluft unter Bedingungen wie oben beschrieben gehalten (Kapitel 3.1.1).

3.2. Versuchsablauf

3.2.1. Interventionen und Versuchsgruppen - Exp.1/Epo

Das Experiment begann, als die Mäuse etwa 9 Monate alt waren. Das Körpergewicht, die Körperzusammensetzung und die Nüchternblutglukose wurden bestimmt, um mittels „Matching“ die Mäuse in vergleichbare Gruppen aufzuteilen. Vergleichbare Gruppeneigenschaften am Beginn eines Experiments sind Voraussetzung, um bestmögliche und zuverlässige Ergebnisse zu erhalten.

Dadurch entstanden diese 4 Gruppen:

9 EpoR/Tg-Mäuse wurde 3 mal pro Woche mit 1000 U/kg Epoietin alpha (Erypo® Janssen-Cilag GmbH, Leiden, Niederlande) intraperitoneal injiziert (Gruppe „KO-Epo“). Die Stammlösung von 40.000 U/ml wurde 120-fach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Jeder Maus bekam davon 3 µl/g Körpergewicht pro Injektion. Eine Maus aus dieser Gruppe wurde nach schwerem Gewichtsverlust und schlechtem Zustand am Tag 49 tot aufgefunden. Alle Daten dieser Maus wurden von der Analyse ausgeschlossen. 8 Mäuse gehörten zur EpoR/Tg-Kontrollgruppe („KO-Con“). Diese bekamen statt Epoietin alpha-Lösung ebenfalls 3-mal pro Woche eine intraperitoneale

Injektion gleichen Volumens von physiologischer Kochsalzlösung (Vehikel). Der Grund, warum auch diese Gruppe mit der weitgehend wirkungslosen Kochsalzlösung injiziert wurde, war alle Mäuse einem vergleichbaren Stress der Injektionen auszusetzen. Eine Maus aus dieser Gruppe wurde am Tag 7 tot aufgefunden. Alle Daten dieser Maus wurden von der Analyse ausgeschlossen. 6 WT-Mäuse gehörten zu der Gruppe „WT-Epo“ und wurden nach gleichem Schema wie die KO-Epo-Gruppe mit Injektionen von Epoietin alpha-Lösung behandelt. Eine Maus dieser Gruppe wurde nach Gewichtsverlust mit schwerer Cutitis euthanasiert. Alle Daten dieser Maus wurden von der Analyse ausgeschlossen.

5 Mäuse gehörten zu der „WT-Con“, die gleich wie die KO-Con-Gruppe mit physiologischer Kochsalzlösung 3-mal wöchentlich intraperitoneal injiziert wurden.

Alle Mäuse hatten einen unbeschränkten Zugang zu HFD. Um Mäuse im selben Käfig unterscheiden zu können, wurde ihr Schwanz mit farbigen Markierungen bemalt.

3.2.2. Interventionen und Versuchsgruppen - Exp. 2/ Hypoxie

Etwa 3 Monate nach der Lieferung begann das Experiment. Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Nüchternblutglukose wurden bestimmt, um durch Matching vergleichbare Gruppen zusammenzustellen.

So entstanden zwei Gruppen:

Eine Gruppe von 11 Mäusen wurde unter Hypoxie in einer Kammer von etwa einem halben Kubikmeter gehalten (Biospherix-Kammer mit BioSpherix ProOx P110-Sauerstoffregler und E702 Sauerstoffsensor; Biospherix Ltd., Lacona, USA). Der Zielsauerstoffgehalt wird in diesem System durch das Verdünnen der Kammerluft mittels variabler Zufuhr einer geeigneten Menge Stickstoff erreicht und erhalten. Damit sich die Mäuse schrittweise an den Sauerstoffmangel gewöhnen konnten, war die Sauerstoffkonzentration am ersten Tag 15%, am zweiten Tag 12%, am dritten Tag 11% und erst dann für den weiteren Verlauf des Experiments 10%. Täglich wurde diese Kammer kurz belüftet, um eine Ansammlung von Feuchtigkeit und verdunstetem Urin in der Kammerluft zu vermeiden bzw. um die Mäuse zu versorgen und alle zwei bis

drei Tagen die Käfige zu wechseln. Die Mäuse dieser Gruppe hatten freien Zugang zum kohlenhydratreichen Futter und zu Trinkwasser. Die verbleibenden 11 Mäuse bildeten die Kontrollgruppe. Diese wurden unter normalen Raumbedingungen gehalten, hatten freien Zugang zu Trinkwasser, erhielten aber täglich nur eine Portion kohlenhydratreiches Futter, sodass ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe entsprach. Eine Maus dieser Gruppe wurde aus der Studie exkludiert. Sie zeigte mit Fortgang des Experiments gegenüber ihrer Gruppe immer stärker abweichende Blutglukosewerte (Hypoglykämie). Beim Sammeln von Gewebeproben am Ende des Experiments war ein deutlicher Leberdefekt, offenbar eine Fibrose und/oder Zirrhose zu erkennen (Abbildung 2). Alle Daten dieser Maus wurden von der Analyse ausgeschlossen.

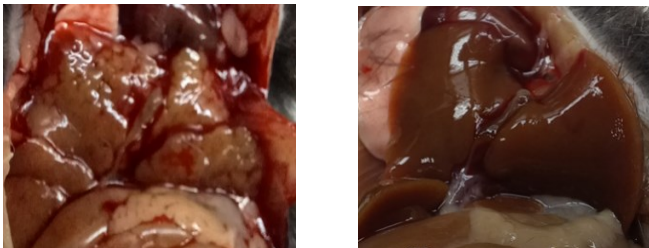


Abbildung 2: Links die auffällig krankhaft knotige Leber einer Maus der Kontrollgruppe von Exp.2/Hypoxie (Fibrose?, Zirrhose?). Rechts zum Vergleich das Erscheinungsbild einer normalen, gesunden Leber einer anderen Maus dieser Kontrollgruppe.

3.3. Messungen

3.3.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme

Mittels einer Präzisionswaage (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) wurde das Körpergewicht mindestens einmal wöchentlich bestimmt. Nachdem sich die Mäuse auf der Waage bewegten, musste die Einstellung „dynamisches Wiegen“ auf der Waage gewählt werden, bei dem nach einigen Sekunden mit bewegungsbedingten Schwankungen ein Mittelwert für das Körpergewicht berechnet wird. Die aufgenommene Futtermenge wurde ebenfalls mindestens einmal pro Woche bestimmt. Die Futteraufnahme von Gruppen mit freiem Zugang zu Futter wurde über die Differenz von bereitgestellter zu verbliebener Nahrung berechnet. In Exp.2/ Hypoxie wurde das verbliebene Futter vor dem Wägen für ein paar Tage an der Luft getrocknet, da es aufgrund der etwas

erhöhten Luftfeuchtigkeit in der Hypoxiekammer Feuchtigkeit aufgenommen hatte. Mithilfe der wöchentlichen Daten zu Futterverbrauch und Gewicht wurden die Portionsgrößen geschätzt, die bei der eingeschränkt gefütterten Gruppe die gewünschte Gewichtskurve erzeugen würden.

3.3.2. Körperzusammensetzung

Um die Körperzusammensetzung zu bestimmen, wurde jede Maus in die Kammer eines Body Composition Analyzer EMR-188 (Echo MRI, Houston, TX, USA) gesetzt. Dieses Gerät bestimmt innerhalb etwa einer Minute die Fettmasse und die Magermasse der Maus in Gramm. Diese Messung wurde in Exp.2/Hypoxie 4 Tage vor Beginn zum Zweck des Matching, sowie am Ende des Experiments durchgeführt.

3.3.3. Nüchternblutglukose

Die Nüchternblutglukose wurde in Exp.2/Hypoxie in den Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten unter zwei unterschiedlichen Bedingungen bestimmt: nach kurz- und langfristigem Fasten. Im ersteren Fall wurde der Hypoxiegruppe das Futter am Morgen vier Stunden vor der Blutglukosemessung weggenommen und die Hypoxiekammer wurde geöffnet. Für die Kontrollgruppe wurde die Messung 20 Stunden nach Gabe der letzten Futterportion durchgeführt. Etwaige Futterreste wurden 4 Stunden vor der Messung entfernt, wobei im Normalfall die Futterportion des Vortages zu diesem Zeitpunkt schon verzehrt war. Zur Messung nach langfristigem Fasten wurde beiden Gruppen das Futter am Nachmittag vor dem Messtag entzogen (ca. 8 Stunden nach Gabe der letzten Futterportion an die Kontrollen). Am nächsten Morgen, also 4 Stunden vor der Blutglukosemessung, wurde die Hypoxiekammer geöffnet.

Bei der Messung wurde die Schwanzspitze der Mäuse mittels einer Nadel angestochen. Ein Blutropfen wurde nach sanftem Ausdrücken der Schwanzspitze in einen Glukoseteststreifen des Glukosemessgeräts „StatStrip Xpress“ aufgenommen (Nova Biomedical, Waltham, MA, USA). Die Firma Data Sciences International (St.Paul, MN, USA) hat die Software dieses

Handmessgeräts speziell für die Glukosemessung bei Labornagetieren adaptiert. Es handelt sich dabei um ein Messgerät ohne Hämatokritsensitivität, was im vorliegenden Experiment von großer Bedeutung war, da ein Einfluss des Protokolls auf den Hämatokrit zu erwarten war. Eine Studie von Musholt et al. (2011) hat den Einfluss verschiedener Hämatokritwerte auf diverse Handmessgeräte untersucht und gezeigt, dass das StatStrip-Gerät im Vergleich zu anderen keine Hämatokritsensitivität aufweist.

3.3.4. Plasmainsulin und HOMA-Index

Eine einfache Methode zur Abschätzung der Insulinresistenz ist das Homeostasis Model Assessment (HOMA). Dies ist ein Modell der Beziehung zwischen Glukose und Insulin (Gutch et al. 2015). Mit der Formel $\text{Glukose (mg/dl)} \times \text{Insulin (}\mu\text{U/ml)} / 405$ wurde der HOMA-Index berechnet. Um das Plasmainsulin zu bestimmen, wurde nach 4 Stunden des Fastens etwa 50 μl Blut aus der Schwanzspitze der Mäuse in ein EDTA-beschichtetes Hütchen gesammelt (Microvette CB 300 K2E, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Die Hütchen waren mit EDTA beschichtet, um die Gerinnung des Blutes zu verhindern. Die Hütchen wurden zentrifugiert und das Plasma (der obere Teil) gewonnen und mittels des ELISA-Test (Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Schweden) die Insulinkonzentration bestimmt.

3.3.5. Glukosetoleranztest

Vor Beginn des Glukosetoleranztests (GTT) wurden die Mäuse für 8 Stunden gefastet. In Exp.1/ Epo fand der GTT 48 Stunden nach der letzten Erythropoietininjektion statt, in Exp.2/ Hypoxie 4 Stunden nach Öffnung der Hypoxiekammer. Zuerst erfolgte eine Blutglukosemessung (Kapitel 3.3.3.), dann bekamen die Mäuse eine intraperitoneale Injektion von Glukoselösung (33% w/v; 1,5 g/kg, 4,5 $\mu\text{l/g}$; Sonderanfertigung gespag, Bad Ischl Apotheke, Österreich). Weitere Blutglukosemessungen erfolgten 20, 40, 60, 90, 120 Minuten nach Injektion der Glukoselösung. Ein wiederholtes Stechen der Schwanzspitze war nicht erforderlich. Da die Wunde vom Stich am Beginn des

GTT noch offen war, reichte nur ein sanftes Ausdrücken der Schwanzspitze, um die benötigte Menge an Blut zu gewinnen.

3.3.6. Hämatokrit

Eine Heparin-beschichtete Glaskapillare (minicaps, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland) wurde verwendet, um 50 µl Blut zu sammeln (um die Mäuse nicht zu sehr zu belasten, wurde eine gepoolte Probe von zwei nicht gefasteten Mäusen gesammelt). Mittels Blutgasanalysator (ABL 800 FLEX, Drott Medizintechnik GmbH, Wiener Neudorf, Österreich) wurde der Hämoglobingehalt und die Sauerstoffsättigung bestimmt. Das Gerät schätzte auf Basis des Hämoglobingehalts auch einen Wert für den Hämatokrit.

3.3.7. Terminales Sammeln von Blut und Gewebeproben

Wenige Tage nach dem GTT wurden in Exp.1/ Epo die Mäuse getötet und Proben von Blut und Gewebe gesammelt. In Exp.2/ Hypoxie erfolgte diese Prozedur 4 Stunden, nachdem die Mäuse gefastet wurden und die Hypoxiekammer geöffnet wurde. Eine Maus nach der anderen wurde in einer Box mit dem Narkotikum Isofluran in tiefe Narkose gelegt. Nachdem die Maus aus der Box entnommen wurde, inhalierte sie weiter das Narkotikum, indem ein Röhrchen mit einem Isofluran-getränkten Papier über ihre Nase gestülpt wurde. Auf dem Sektionstisch wurden Bauch- und Brustraum der Maus mit einer Schere geöffnet. Ca. 500 µl Blut wurde durch Punktion des Herzens in eine 1 ml-Spritze, die einen Tropfen EDTA-Lösung enthielt, gesammelt. Das Blut wurde gekühlt und für 10 Minuten zentrifugiert, das Blutplasma wurde entnommen und bei -20°C für spätere Messungen gelagert. Proben der Leber und des Skelettmuskels der Hinterbeine (Musculus gastrocnemius) wurden entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, um sie später analysieren zu können.

3.4. Statistik

Die Ergebnisse sind in dieser Arbeit als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angeführt. Die p-Werte wurden mit einem ungepaarten zweiseitigen Student's-t-Test berechnet. Ein $p < 0,05$ zeigt wurde als signifikanter Unterschied zwischen die Gruppen betrachtet (Signifikanzniveau).

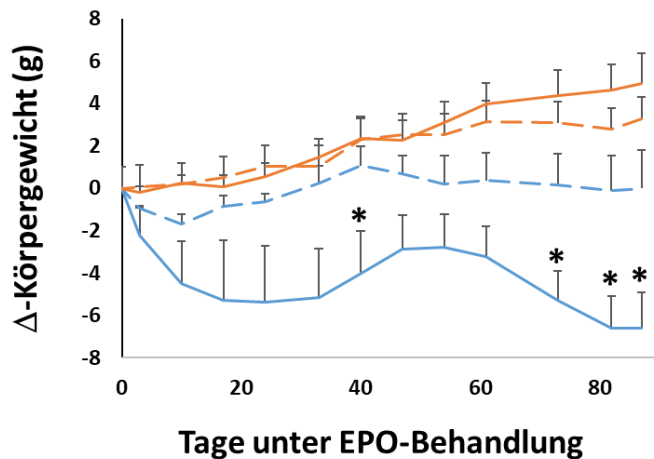
4. Ergebnisse

4.1. Exp.1/ Epo

4.1.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme

Zu dem Beginn des Experiments hatten die WT-Mäuse mit $52,1 \pm 1,6$ g (Kontrollgruppe) und $53,9 \pm 2,0$ g (EPO-Gruppe) ähnliches Körpergewicht wie die KO-Mäuse mit $52,3 \pm 1,5$ g (Kontrollgruppe) und $54,2 \pm 1,6$ g (EPO-Gruppe). Nun wurden die Gewichtsveränderungen mit gegen ohne Epo-Behandlung beobachtet, wobei sich am Tag 40, 73, 82 und 87 in den WT-Mäusen ein statistisch signifikanter Effekt der Epo-Injektionen feststellen ließ: Am Ende der Behandlungsphase, also am Tag 87, zeigten die WT-Epo Mäuse gegenüber dem Ausgangswert einen Gewichtsverlust von $-6,60 \pm 1,70$ g, während das Körpergewicht der dazugehörigen Kontrollen mit $-0,01 \pm 1,83$ g unverändert war. In beiden KO-Gruppen wurde hingegen am Tag 87 eine ähnliche, geringe Gewichtszunahme beobachtet ($4,94 \pm 1,42$ g in der KO-Epo Gruppe vs. $3,29 \pm 0,60$ g in der KO-Con Gruppe; $p=0,24$; Abbildung 3a.). Ein Vergleich der Gewichtsveränderungen zeigte sehr deutlich die unterschiedliche Wirkung von Epo in WT-Mäusen gegenüber KO-Mäusen ($p < 0,001$; Abbildung 3b.).

3a.



3b.

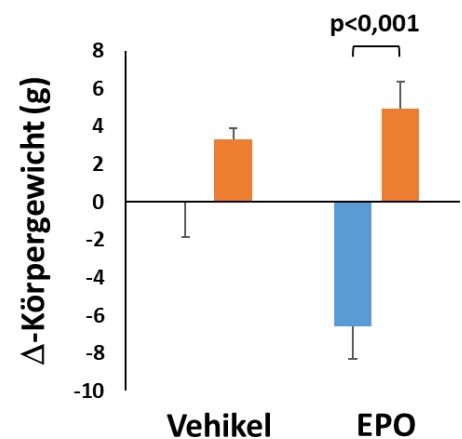


Abbildung 3: Δ -Körpergewicht im Verlauf (a.) und am Ende (b.) einer 3-monatigen Behandlung mit Vehikel gegen Erythropoetin (EPO; 1000 U/kg i.p., 3 Injektionen/Woche) bei männlichen adipösen Mäusen des Wildtyps (WT), sowie bei genmanipulierten Mäusen, die außer in Milz und Knochenmark keine Erythropoetinrezeptoren exprimierten (KO). WT-Mäuse: blau; KO-Mäuse: orange; gestrichelte Linie: Vehikel; durchgehende Linie: EPO; $n=5-8$ pro Gruppe. Mittelwert $\pm$ SEM.

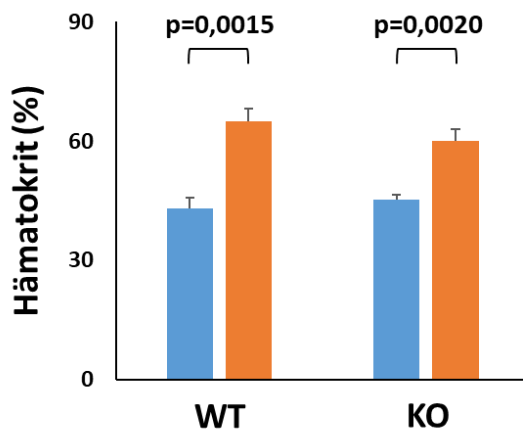
Im Verlauf des Experiments wurden durchschnittlich 203,5g HFD pro Maus der KO-Epo Gruppe (2,58 g pro Maus pro Tag) gefressen und 198,5 g pro Maus der KO-Con Gruppe (2,51 g pro Maus pro Tag). Die Mäuse der WT-Epo Gruppe nahmen 190,0 g (2,4 g pro Maus pro Tag) zu sich und die WT-Con hatten 209,8 g pro Maus (2,7 g pro Maus pro Tag) gefressen.

4.1.2. Hämatokrit und Sauerstoffsättigung

In beiden Genotypen, also in WT-Mäusen und in KO-Mäusen, hatten die EPO-Injektionen eine signifikante Wirkung auf den Hämatokrit. In der vehikelbehandelten WT-Con-Gruppe betrug der Hämatokrit $43,0 \pm 2,9\%$, in der WT-Epo Gruppe waren es $64,9 \pm 3,3\%$ ($p=0,0015$). Bei den KO-Tieren waren es $45,4 \pm 1,0\%$ und $60,0 \pm 3,1\%$ ($p=0,0020$; Abbildung 4a.).

Die Sauerstoffsättigung im Blut wurde in WT-Mäusen wie auch in KO-Mäusen durch EPO nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 4b.)

4a.



4b.

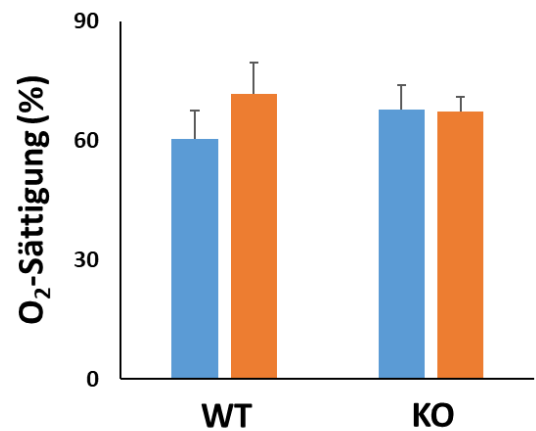


Abbildung 4: Hämatokrit (a.) und Sauerstoffsättigung (b.) von männlichen adipösen Mäusen, die über 3 Monate mit 3 Injektionen/Woche von Vehikel (blau) oder 1000 U/kg i.p. Erythropoetin (orange) behandelt wurden. Wildtyp-Mäuse (WT) und genmanipulierte Mäuse, die außer in Milz und Knochenmark keine Erythropoetinrezeptoren exprimierten (KO), wurden vergleichend untersucht. n=4-5 pro Gruppe; Mittelwert $\pm$ SEM.

4.1.3. Glukosetoleranztest

Der Glukosetoleranztest wurde am Tag 89 durchgeführt (Kapitel 3.3.5). Die Blutglukosekurve im Verlauf des Tests zeigte in der WT-Epo-Gruppe den geringsten Anstieg. Der Blutglukosewert bei der Bestimmung der Nüchternblutglukose (Minute 0) und 20 bzw. 40 Minuten nach Injektion der Glukoselösung war in der WT-Epo Gruppe signifikant niedriger als in der WT-Con Gruppe ($p=0,023$ bei Minute 0; $p=0,004$ bei Minute 20; $p=0,016$ bei Minute 40). 40 Minuten nach Injektion der Glukoselösung hatte die WT-Epo Gruppe ein signifikant niedriger Wert als die WT-Con Gruppe ($p=0,016$) und als die KO-Epo Gruppe ($p=0,007$). Auch bei den KO-Mäusen, die generell etwas höhere Glukosekurven zeigten als die WT Mäuse, war die Glukosekurve durch EPO etwas niedriger als in der Vehikelkontrolle. Ein signifikanter Unterschied war für die KO-Mäuse aber nur bei Minute 20 feststellbar ($p=0,036$; Abbildung 5)

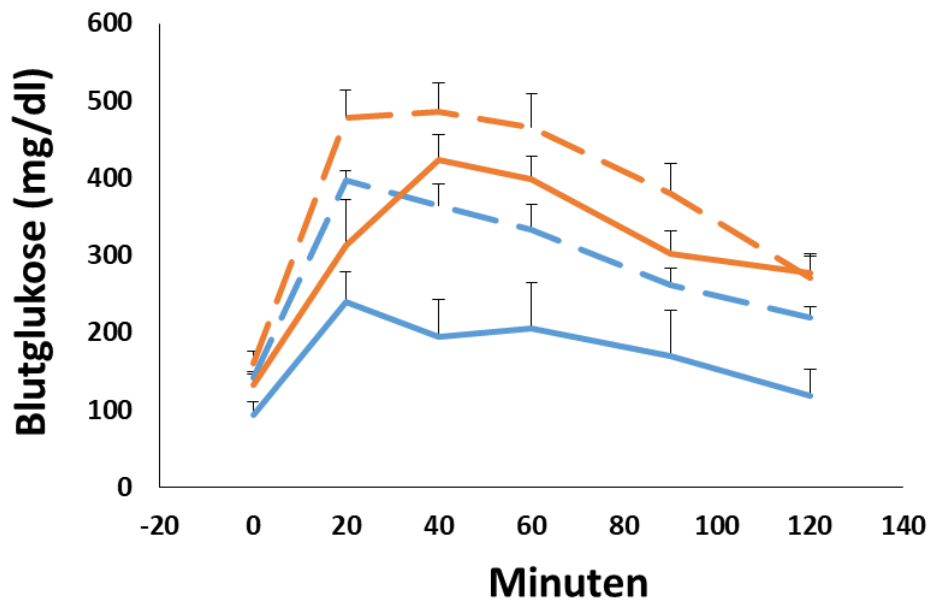
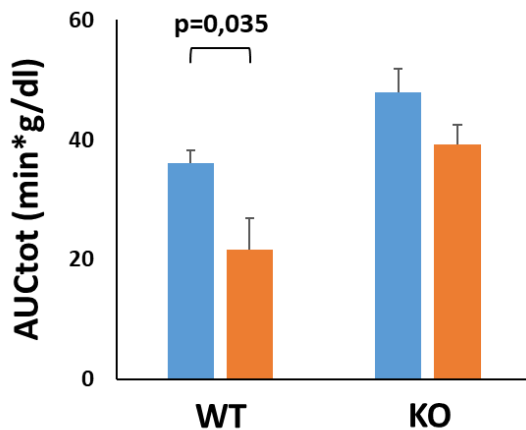


Abbildung 5: Glukosetoleranztest nach 3-monatiger Behandlung mit Vehikel gegen Erythropoetin (EPO; 1000 U/kg i.p., 3 Injektionen/Woche) bei männlichen adipösen Mäusen des Wildtyps (blau), sowie bei genmanipulierten Mäusen, die außer in Milz und Knochenmark keine Erythropoetinrezeptoren exprimierten (orange). gestrichelte Linie: Vehikel; durchgehende Linie: EPO; n=5-8 pro Gruppe. Mittelwert $\pm$ SEM.

Die Gesamtflächen und die inkrementalen Flächen unter den Kurven des Glukosetoleranztests (AUC_{tot}, AUC_{ink}) sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Mittelwerte der EPO-behandelten Gruppen waren in allen Vergleichen niedriger als jene der dazugehörigen Kontrollgruppen. Signifikant war der Unterschied jedoch nur für die Gesamtflächen der WT-Mäuse ($p=0,035$).

6a.



6b.

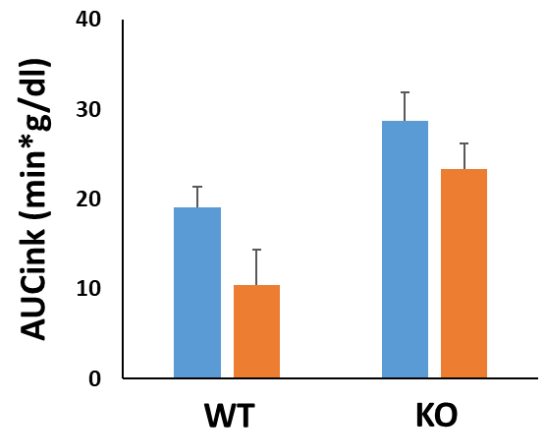


Abbildung 6: Gesamte Fläche unter der Kurve (AUCtot; a.) und inkrementale Fläche unter der Kurve (AUCink; b.) von männlichen adipösen Mäusen, die über 3 Monate mit 3 Injektionen/Woche von Vehikel (blau) oder 1000 U/kg i.p. Erythropoetin (orange) behandelt wurden. Wildtyp-Mäuse (WT) und genmanipulierte Mäuse, die außer in Milz und Knochenmark keine Erythropoetinrezeptoren exprimierten (KO), wurden vergleichend untersucht. n=5-8 pro Gruppe; Mittelwert $\pm$ SEM.

4.2. Exp.2/ Hypoxie

4.2.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme

Mittels des „Matching“, das vor Beginn des Experiments stattgefunden hatte, fing die Hypoxie-Gruppe mit einem Gewicht von $27,2 \pm 0,4$ g und die Kontrollgruppe mit einem ähnlichen Gewicht von $26,8 \pm 0,4$ g an. Im Laufe des Experiments bekam die Kontrollgruppe jeden Tag nur eine beschränkte Portion Futter, sodass ihr Körpergewicht so nah wie möglich dem der Hypoxie-Gruppe blieb. So war am Ende des Experiments (Tag 97) das Gewicht der Hypoxie-Gruppe mit $27,4 \pm 0,4$ g noch immer ähnlich dem der Kontrollgruppe ($28,3 \pm 0,4$ g; Abbildung 7).

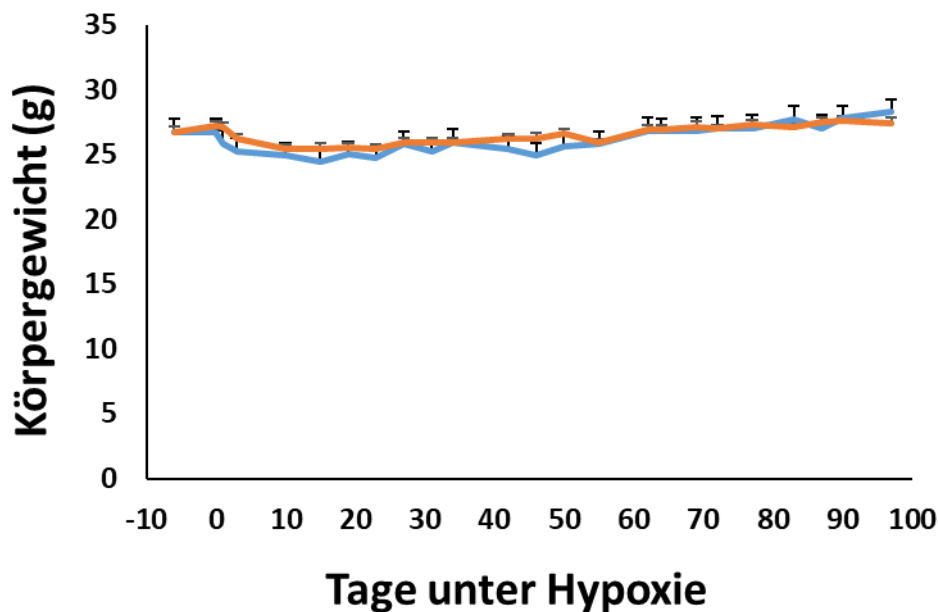


Abbildung 7: Körpergewicht einer Gruppe männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; $n=11$, orange) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; $n=10$, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM.

Im Verlauf des gesamten Experiments wurden durchschnittlich 263,8 g HFD pro Maus ($=2,90$ g pro Maus pro Tag) von der Hypoxie-Gruppe gefressen. 240,9 g pro Maus ($=2,65$ g pro Maus pro Tag) wurden der Kontrollgruppe gefüttert, um die Gewichtskurven gleich zu halten.

4.1.2. Körperzusammensetzung

4 Tage vor Beginn des Experiments wurde die Körperzusammensetzung (Fettmasse, Magermasse) mittels Echo MRI (Kapitel 3.3.2.) bestimmt. Am Beginn des Experiments waren die Gruppen auch für ihre Fettmasse und ihre Magermasse gut gematcht. Trotz ähnlichen Körpergewichts (Abbildung 7) war am Tag 87 die Fettmasse der Kontrollgruppe mit $4,23 \pm 0,14$ g höher als jene der Hypoxie-Gruppe ($3,34 \pm 0,11$ g), was ein statistisch signifikanter Unterschied war ($p=0,000073$; Abbildung 8a).

Die Magermasse betrug am Tag 87 $23,26 \pm 0,25$ g in der Hypoxie-Gruppe und

22,93 ± 0,30 g in der Kontrollgruppe, was statistisch kein signifikanter Unterschied war (p=0,40; Abbildung 8b).

Der relative Fettanteil in Prozent war vor dem Experiment am Tag -4 in der Hypoxie-Gruppe 13,60 ± 1,02% und in der Kontrollgruppe 12,71 ± 0,65%, also gematcht (p= 0,48). Entsprechend der höheren absoluten Fettmasse am Tag 87 war auch die relative Fettmasse zu diesem Zeitpunkt in der Kontrollgruppe signifikant höher verglichen mit der Hypoxie-Gruppe (15,56 ± 0,47% gegen 12,53 ± 0,34%; p=0,00004; Abbildung 8c).

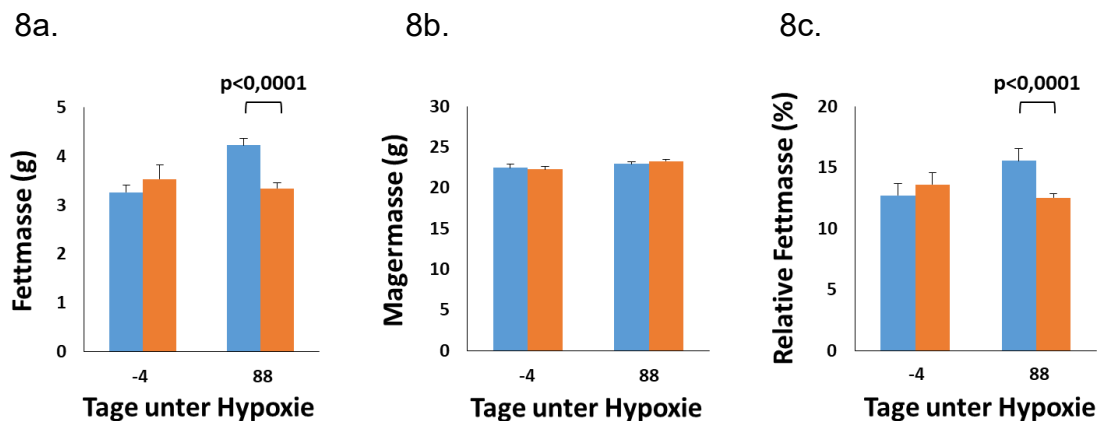


Abbildung 8: Fettmasse (a.), Magermasse (b.) und relative Fettmasse (c.) von männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurden (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange), im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert ± SEM.

4.2.3. Hämatokrit und Sauerstoffsättigung

Um die Mäuse nicht mit einer großen Menge an benötigtem Blut zu sehr zu belasten, wurden gepoolte Proben von jeweils zwei Mäuse gesammelt (Kapitel 3.3.6.). Der Hämatokrit wurde einmalig am Tag 77, 78 bzw. 79 bestimmt und betrug in der Hypoxie-Gruppe 57,0 ± 1,0% und in der Kontrollgruppe 45,8 ± 1,3%. Das Ergebnis war statistisch signifikant (p=0,00012, Abbildung 9a.). Die Sauerstoffsättigung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beide Gruppen (p=0,12; Abbildung 9b).

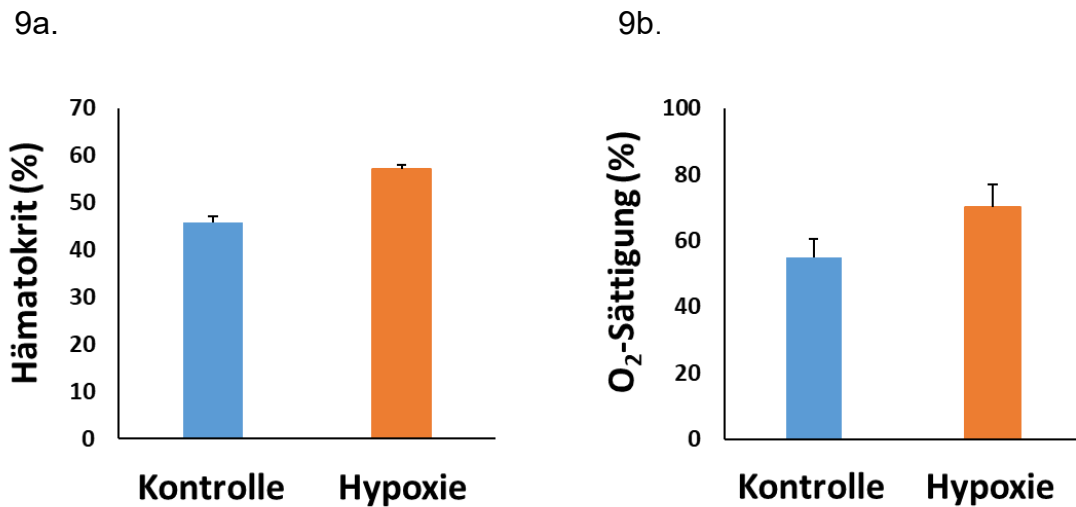


Abbildung 9: Hämatokrit (a.) und Sauerstoffsättigung (b.) männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurden (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange), im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM.

4.2.4. Nüchternblutglukose

Die Nüchternblutglukose wurde zu verschiedenen Zeitpunkten unter zwei unterschiedlichen Bedingungen bestimmt (Kapitel 3.3.3.). Die Blutglukose wurde nach kurzfristigem Fasten (4 h) am Tag -4, 7, 35, 58 und 91 bestimmt. Auf Basis des „Matching“ fingen die beiden Gruppen mit ähnlichen Werten an. Die Blutglukose in der Kontrollgruppe war am Tag 7 signifikant niedriger als jene der Hypoxie-Gruppe ($82,8 \pm 5,4$ mg/dl gegen $97,5 \pm 2,2$ mg/dl; $p=0,018$). Am Tag 35 waren die Werte beider Gruppen sehr ähnlich, es war kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Ein signifikanter Unterschied konnte am Tag 58 beobachtet werden ($p=0,000092$) mit Werten von $88,9 \pm 2,7$ mg/dl in der Hypoxie-Gruppe und $119,1 \pm 5,7$ mg/dl in der Kontrollgruppe. Am Tag 91 wurde ein gleichlaufender Trend, aber kein signifikanter Unterschied mehr beobachtet ($p=0,081$). Die Blutglukose betrug $90,7 \pm 3,6$ mg/dl in der Hypoxie-Gruppe und $98,8 \pm 2,4$ mg/dl in der Kontrollgruppe (Abbildung 10).

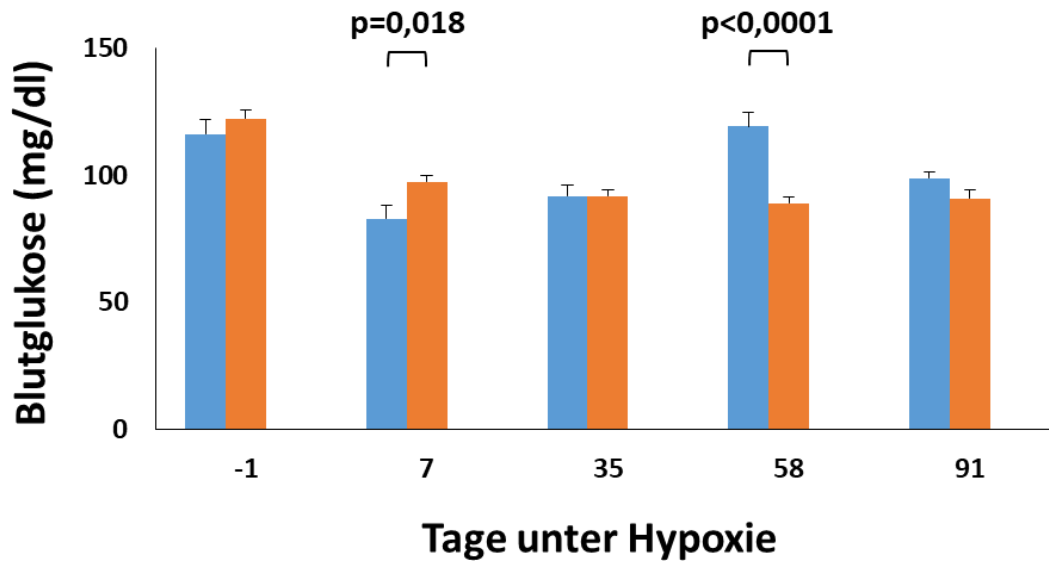


Abbildung 10: Blutglukose einer Gruppe männlicher, für 4 h gefasteter Mäuse vor dem Beginn des Experiments und nachdem sie für 7, 35, 58 und 91 Tage unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange). Im Vergleich dazu eine Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau), die täglich eine eingeschränkte Menge Futter bekam, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM.

Die Blutglukose wurde auch wiederholt nach langfristigem Fasten (18 h) am Tag 39, 71 und 85 bestimmt. Ein deutlicher signifikanter Unterschied wurde am Tag 39 beobachtet ($p < 0,0001$), wobei die Glykämie in der Hypoxie-Gruppe $50,4 \pm 1,7$ mg/dl und in der Kontrollgruppe $93,0 \pm 3,6$ mg/dl betrug. Ein signifikanter Unterschied wurde ebenfalls am Tag 71 und am Tag 85 gefunden, die Amplitude des Effekts wurde jedoch über die Zeit geringer. Die Werte lagen für die Hypoxie-Gruppe bei $63,0 \pm 1,8$ mg/dl (Tag 71) bzw. $79,1 \pm 3,7$ mg/dl (Tag 85) und für die Kontrollgruppe bei $94,7 \pm 4,0$ mg/dl (Tag 71) bzw. $92,4 \pm 4,0$ mg/dl (Tag 85) (Abbildung 11).

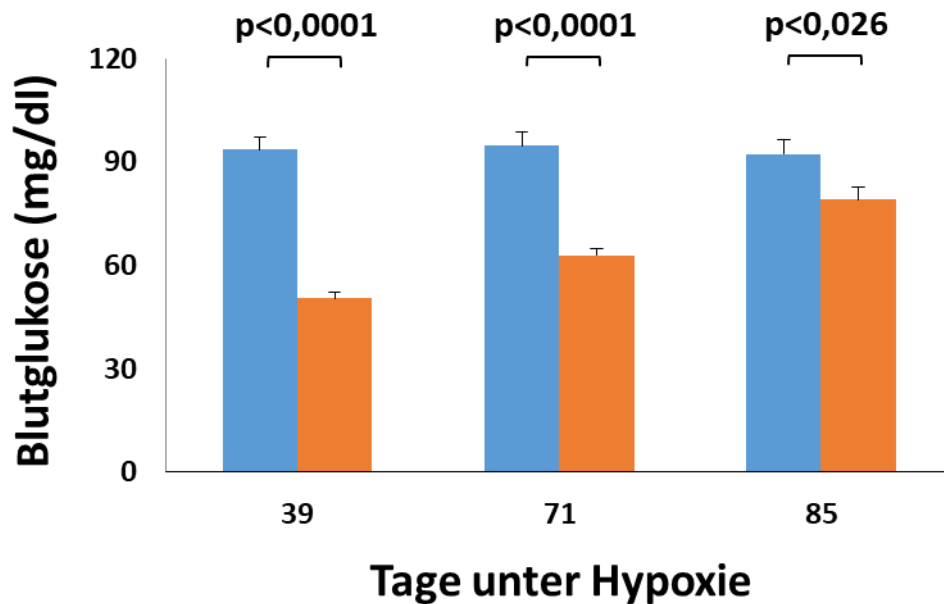


Abbildung 11: Blutglukose einer Gruppe männlicher, für 18 h gefasteter Mäuse, nachdem sie für 39, 71 und 85 Tage unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; $n=11$, orange). Im Vergleich dazu eine Kontrollgruppe (normale Raumluft; $n=10$, blau), die täglich eine eingeschränkte Menge Futter bekam, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM

4.2.5. Glukosetoleranztest

Der Glukosetoleranztest wurde am Tag 100 durchgeführt. Zuerst wurde die Nüchternblutglukose bestimmt. 20, 40, 60, 90 und 120 Minuten nach Injektion einer Glukoselösung (intraperitoneal) wurde die Blutglukose wieder gemessen (Kapitel 3.3.5.). Die Nüchternblutglukose war in der Hypoxie-Gruppe statistisch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p=0,013$). Über die ersten 20 Minuten nach Injektion der Glukoselösung wurde ein steiler Anstieg der Blutglukose beobachtet, wobei der Peak der Blutglukose in der Hypoxie-Gruppe $254,7 \pm 16,9$ mg/dl betrug und in der Kontrollgruppe $316,4 \pm 18,4$ mg/dl, was ebenfalls statistisch signifikant war ($p=0,023$). Im weiteren Verlauf des Glukosetoleranztests wurden auch 40, 60 und 90 Minuten nach der Glukoseinjektion signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden. Nach 120 Minuten waren die Werte der Gruppen ähnlich, es wurde kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt. Die Glukosekurven weisen auf eine verbesserte Glukoseclearance in Hypoxie-behandelten Mäusen hin (Abbildung 12).

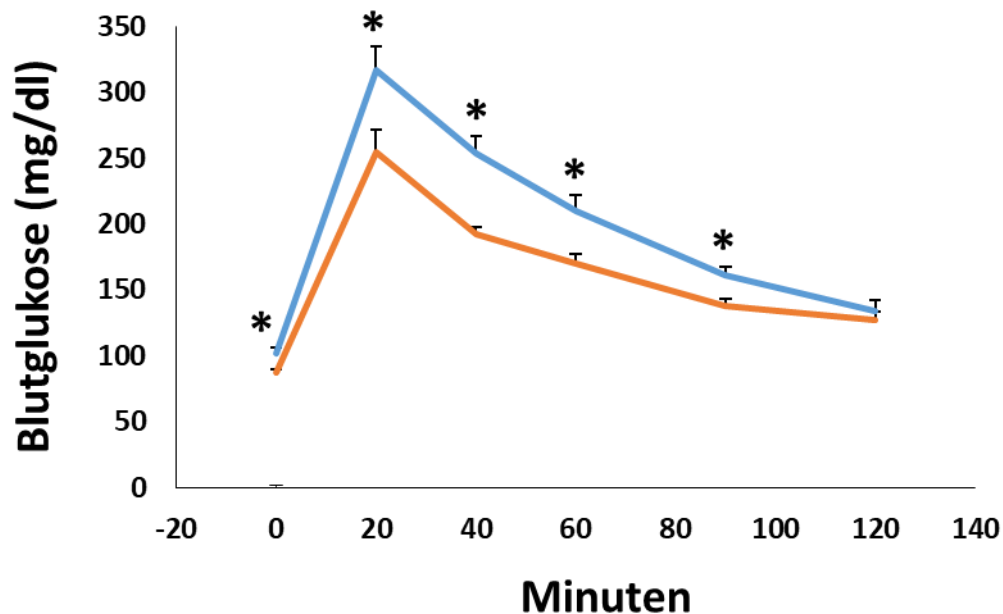
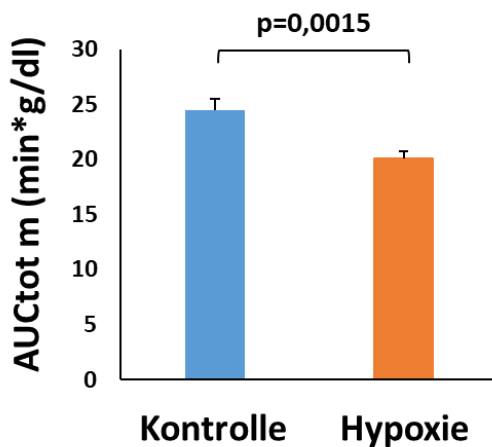


Abbildung 12: Glukosetoleranztest (1,5 g/kg i.p.) bei einer Gruppe männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM

Die Gesamtfläche unter der Kurve (AUC-tot) des Glukosetoleranztests fiel in der Hypoxie-Gruppe signifikant niedriger aus als in der Kontrollgruppe ($p=0,0015$; Abbildung 13a.). Dementsprechend zeigte die inkrementale Fläche unter der Kurve ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,047$; Abbildung 13b.).

13a.



13b.

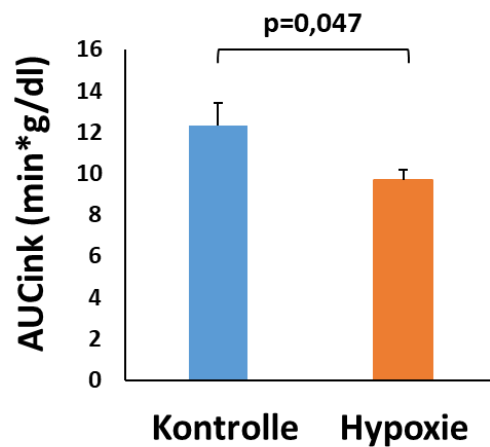


Abbildung 13: Gesamte Fläche unter der Glukosekurve (AUCtot; a.) und inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUCink; b.) im Glukosetoleranztest (1,5 g/kg i.p.) einer Gruppe männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange), im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM.

4.2.6. Plasmainsulin und HOMA-Index

Um den HOMA-Index zu berechnen, wurde am Tag 95 die Nüchternblutglukose und das Plasmainsulin bestimmt (Kapitel 3.3.4.). Die Nüchternblutglukose lag in der Hypoxie-Gruppe bei $112,6 \pm 7,9$ mg/dl und in der Kontrollgruppe bei $120,4 \pm 7,4$ mg/dl. Das Ergebnis war statistisch nicht signifikant ($p=0,486$; Abbildung 14a). Das Plasmainsulin betrug $0,138 \pm 0,021$ nmol/l in der Hypoxie-Gruppe und $0,121 \pm 0,011$ nmol/l in der Kontrollgruppe, was ebenfalls statistisch nicht signifikant war ($p=0,517$; Abbildung 14b.). Dementsprechend wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied für den HOMA-Index beobachtet ($p=0,81$). Dieses Ergebnis bedeutet, dass es durch die Hypoxie zu keiner nachweisbaren Verbesserung der Insulinsensitivität kam (Abbildung 14c.).

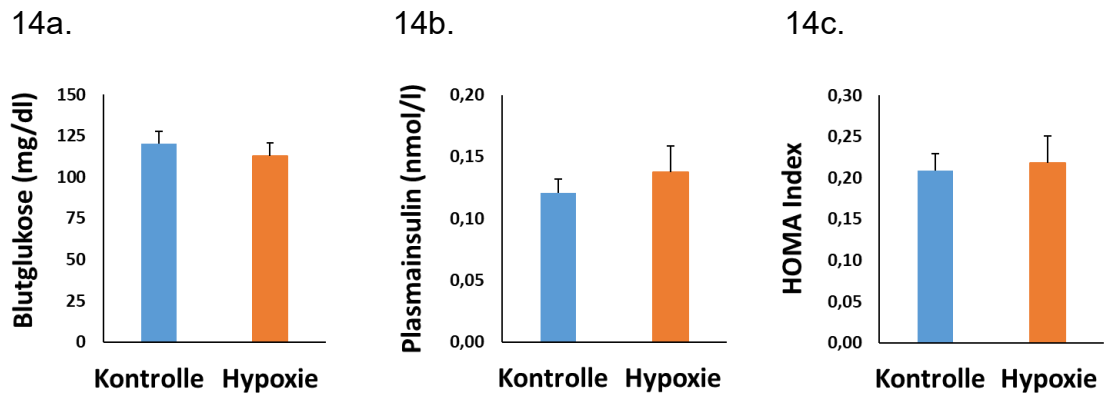


Abbildung 14: Blutglukose (a.), Plasmainsulin (b.) und HOMA-Index (c.) einer Gruppe männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange), im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM.

5. Diskussion

5.1. Exp. 1/Epo

In diesem Experiment wurden die Mäuse mit HFD gefüttert, sodass sie Adipositas entwickelten und somit hohe Blutglukose hatten. Sie wurden mit Epo behandelt, wobei die Dosierung mit 1000 U/kg dreimal pro Woche vergleichsweise hoch war. Ein Teil der Mäuse in dieser Studie war genetisch verändert, sodass sie Epo-R nur in Knochenmark und Milz exprimierten. So konnten diese EpoRKO/Tg-Mäuse unter Epo-Stimulation die Erythrozytenproduktion beschleunigen, verloren aber alle Epo-Effekte, die durch Epo-R an anderen Geweben vermittelt werden. Die Frage, die beantwortet werden sollte, war, ob die Behandlung mit Epo bei Mäusen eine Wirkung auf Blutglukose und Körpergewicht haben würde und ob diese Effekte bei EpoRKO/Tg-Mäusen verschwinden würden. Letzteres wäre ein Hinweis auf Vermittlung des jeweiligen Effekts durch Epo-Rauf nicht-hämopoetischen Geweben.

Teng et al., (2011) verwendeten ebenfalls das transgene EpoRKO/Tg-Mausmodell, das Epo-Rezeptoren nur in den hämatopoetischen Geweben (Milz und Knochenmark) hat, und verglichen diese Tiere mit WT-Mäusen. In Unterschied zu meiner Studie wurde Epo in einer noch höheren Dosierung (3000 U/kg) 3-mal wöchentlich intraperitoneal injiziert. Bei Epo-behandelten WT- und EpoRKO/Tg-Mäusen wurde gleichermaßen ein großer Anstieg des Hämatokrit beobachtet, wie das auch in meinen Experimenten der Fall war. Dies ist plausibel, da auf den blutbildenden Zellen ja wie im normalen Zustand Epo-R vorhanden war. (Bei einzelnen Individuen meiner Studie fiel der Hämatokritanstieg allerdings auffallend schwach aus, was womöglich mit dem hohen Alter der hier verwendeten Mäuse in Zusammenhang steht.)

Die Fettmasse hatte in der Studie von Teng et al. (2011) in Epo-behandelten WT-Mäusen viel weniger zugenommen als bei Vehikel-behandelten WT-Mäusen, was bedeutet, dass die Epo-Behandlung in WT-Mäusen die Fettmasse reduziert hatte. Eine Abnahme von 15% des Körpergewichts wurde bei den WT-Mäuse beobachtet im Vergleich zu einer Zunahme von 4% bei der Behandlung mit Kochsalzlösung. Dagegen wurde keinen signifikanten

Unterschied im Körpergewicht zwischen Epo- und Vehikelbehandlung bei der EpoRKO/Tg-Mäuse beobachtet. Die Befunde von Teng et al. (2011) konnten von mir bestätigt werden: Epo-behandelte EpoRKO/Tg-Mäuse nahmen unter Epo genauso zu wie unter Vehikel. Bei den WT-Mäusen hingegen bewirkte Epo einen signifikanten Gewichtsverlust gegenüber den WT-Kontrollen. Das bedeutet, dass der Epo-induzierte Gewichtsverlust nicht vermittelt werden kann, wenn den Mäusen der Epo-R in nicht-hämatopoetischen Geweben fehlt. Der Epo-induzierte Gewichtsverlust dürfte also durch direkte Wirkung auf ein nicht-hämatopoetisches Gewebe vermittelt sein, was nunmehr in zwei unabhängigen Studien mit Mäusen unterschiedlichen Alters und mit unterschiedlichen Epo-Dosierungen gezeigt werden konnte (Teng et al., (2011); und die vorliegende Studie). Ein möglicher Weise zugrundeliegender Mechanismus könnte sein, dass Epo, das die Blut-Hirn-Schranke passiert oder im Gehirn gebildet wird, im Gehirn mit den Signalen von Leptin, einem Appetithemmenden Hormon, interagiert. Solche Effekte wurden von anderen beschrieben (Dey et al., 2016). Nachdem die EpoRKO/Tg-Mäuse keinen Epo-R im Gehirn haben, wäre es zu keiner Appetitreduktion gekommen. Die AUC-tot des Glukosetoleranztests war in meinem Experiment sowohl in WT-Mäusen als auch in EpoRKO/Tg-Mäusen unter Epo-Injektionen niedriger als der jeweiligen Vehikel-behandelten Kontrollgruppe. (Dieser Unterschied war zwar in den WT-Mäusen nicht signifikant, es ist aber die relative geringe Gruppengröße zu beachten.) Die Wirkung von Epo auf die Blutglukose adipöser WT-Mäuse wurde zuvor in einer Studie von Foskett et al. (2011) mit unterschiedlichen Epo-Dosierungen genau untersucht (1000, 600, 300, 150, 75 U/kg an jeden zweiten Tag intraperitoneal injiziert). Es gab erwartungsgemäß einen direkten Zusammenhang zwischen Hämatokritwerten und den Epo-Dosierungen, allerdings wurde kein Unterschied zwischen den Hämatokritwerten und der niedrigsten Epo-Dosis (75 U/kg) und den Kontrollen beobachtet. Bei den Epo-Dosierungen, die einen Einfluss auf den Hämatokrit hatten (1000, 600, 300 und 150 U/kg), wurde im Vergleich zur Kontrolle auch ein signifikanter Unterschied in der Regulation des Körpergewichts und der Fettmasse beobachtet. Bei den höheren Epo-Dosierungen (1000, 600, 300 U/kg) wurde auch eine signifikant verbesserte Glukosetoleranz beobachtet. Das bedeutet, dass Epo auch bei geringeren Dosen, als sie in der vorliegenden

Studie verwendet wurden, den Glukosestoffwechsel regulieren kann. Wesentlich ist jedoch mein Befund, dass diese Blutglukose-senkende Wirkung in den EpoRKO/Tg-Mäusen uneingeschränkt erhalten blieb. Daraus lässt sich schließen, dass bei der Wirkung von Epo auf die Blutglukose - ganz anders als bei der Wirkung auf das Körpergewicht – der Epo-R an nicht-hämatopoetischen Organen nicht im Spiel sein kann. Es wird noch in weiteren Experimenten zu klären sein, wieweit die Glukosesenkung eine direkte Folge des Hämatokritanstiegs ist.

Zusammenfassend konnte ich mit diesem Vergleich der Epo-Wirkung in EpoRKO/Tg-Mäusen gegenüber WT-Mäusen zeigen, dass die Wirkung von Epo auf das Körpergewicht, nicht aber dessen blutglukosesenkende Wirkung, Epo-R an nicht-hämatopoetischen Geweben benötigt.

5.2. Exp.2 /Hypoxie

Das Ziel dieses Experiments war festzustellen, ob Hypoxie einen Effekt auf die Blutglukose gesunder Mäuse hat. Im Unterschied zu vielen vorangehenden Studien, in denen die Mäuse mit HFD gefüttert wurden, wurde den Mäusen in der vorliegenden Studie ein kohlenhydratreiches Futter, das nur eine kleine Menge an Fett enthält, gefüttert. Daher entwickelten sie keine Adipositas. Die Kontrollgruppe wurde eingeschränkt gefüttert, um deren Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. So konnte abgesichert werden, dass eine etwaige Reduktion der Blutglukose durch Hypoxie Folge eines direkten Effekts ist und nicht bloß indirekt durch Gewichtsabnahme zufolge eines Appetitmangels verursacht wird.

Am Tag 7 der Hypoxieexposition war die Blutglukose der Hypoxie-Gruppe signifikant höher als jene der Kontrollgruppe, was im Gegensatz zu vorangehenden Experimenten stand, in denen Hypoxie oder Epo-Behandlung bei HFD-gefütterten, adipösen Mäusen ein Absinken der Glykämie verursacht hatte (Abu Eid et al.,2018 ; Pörtl, 2020). Das könnte jedoch eine Folge der angewandten Methode der eingeschränkten Fütterung der Kontrollgruppe sein: Das Körpergewicht der Hypoxie-exponierten Mäuse fiel insbesondere in der ersten Woche stark ab. Um protokollgemäß das Körpergewicht der Kontrolltiere genauso deutlich abzusenken, erhielten diese nur eine sehr kleine Futterportion

pro Tag, die vormittags bis mittags gegeben wurde. Diese kleine Portion wurde von den hungrigen Tieren sehr schnell verzehrt. Als den Hypoxie-behandelten Mäusen gemäß Protokoll am Morgen 4 Stunden vor der Glukosemessung das Futter entzogen wurde, hatten die Kontrollmäuse daher mutmaßlich schon seit Stunden gefastet. Man muss also annehmen, dass hier 4 Stunden gefastete Mäuse der Hypoxie-Gruppe mit Kontrolltieren verglichen wurden, die wohl schon zwölf bis achtzehn Stunden kein Futter mehr aufgenommen hatten. Ein Versuchsablauf, der dieses Problem völlig ausschließt, ist bei der angewandten Technik der eingeschränkten Fütterung mit einer Portion pro Tag nicht machbar.

Bis zum Ende des ersten Monats hatten sich die Mäuse jedoch weitgehend der Hypoxie angepasst, fraßen mehr und zeigten wieder Körpergewichtszunahme, sodass das oben diskutierte methodische Problem keine große Rolle mehr gespielt haben sollte. Auch wurden nach einem, zwei und drei Monaten jeweils zwei Bestimmungen der Glykämie durchgeführt: nach 4-stündigem und nach 18-stündigem Fasten. Bei den meisten Messungen war nun eine Verringerung der Blutglukose durch Hypoxie nachweisbar. Auch die Glukosetoleranz war nach drei Monaten Hypoxie deutlich besser, was im Einklang mit Befunden aus den von anderen durchgeführten Experimenten an HFD-gefütterten Mäusen steht (Abu Eid et al., 2018 ; Pörtl, 2020). Besonders eindrucksvoll war der Effekt nach einem Monat Hypoxie und 18-stündigem Fasten. Unter diesen Bedingungen war die mittlere Blutglukosekonzentration der Hypoxiegruppe nur halb so hoch wie jene der gewichtsgleichen Kontrollen. Die Kontrollmäuse sind hier als der gesunde, durch die eingeschränkte Fütterung sogar leicht untergewichtige Status anzusehen, was bedeutet, dass die Hypoxie zu einer schweren Hypoglykämie geführt hatte. Diese Ergebnisse zeigen klar, dass Hypoxie nicht nur die Verbesserung einer Adipositas-bedingt pathologischen Hyperglykämie bewirken kann, sondern bei schlanken Mäusen auch eine ausgeprägte Hypoglykämie induziert.

Im Gegensatz zu einer Studie von Abu Eid et al. (2018) an adipösen Mäusen war die prozentuelle Fettmasse der Hypoxie-exponierten Mäuse am Ende des Experiments geringer als jene der Kontrollen. Um diese Verschiebung der relativen Fettmasse als mögliche Ursache einer geringeren Blutglukose zu hinterfragen, wurde die Korrelation zwischen relativer Fettmasse in Prozent und

den Blutglukosewerten näher betrachtet. Es wurde dabei keinerlei Zusammenhang zwischen den beiden gefunden (R^2 in beiden Gruppen $< 0,15$; Abbildung 15). Das bedeutet, dass die Hypoxie einen direkten Effekt auf die Blutglukosesenkung haben muss, der weder indirekt über ein verringertes Körpergewicht noch indirekt über eine verringerte relative Fettmasse erklärt werden kann.

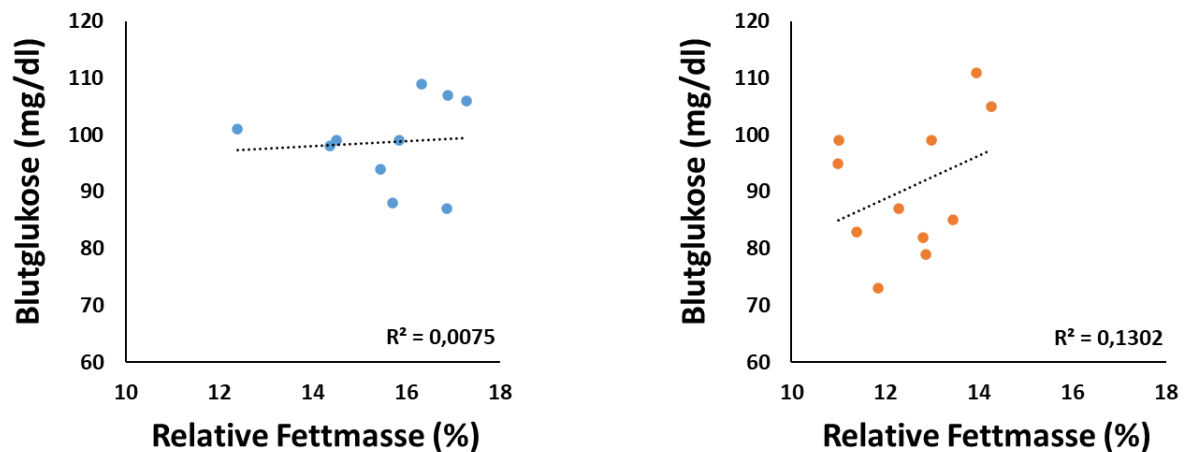


Abbildung 15: Korrelation zwischen relativer Fettmasse und basaler Blutglukose einer Gruppe männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; $n=11$, orange), sowie einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; $n=10$, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen.

In der Studie von Abu Eid et al. (2018) wurden an mit HFD gefütterten, adipösen Mäusen im Insulintoleranztest Hinweise auf eine Verschlechterung der Insulinsensitivität durch Hypoxie gefunden: Obwohl die Hypoxie-behandelten Tiere mit einer niedrigeren Blutglukose als die Kontrollen den Insulintoleranztest begonnen hatten, hatten sie am Ende dieses Tests eine signifikant höhere Glykämie im Vergleich zur Kontrollgruppe. In nachfolgenden Experimenten mit ähnlichem Protokoll wurde die Insulinsensitivität mit HOMA-Index oder mit euglykämisch-hyperinsulinämischem Clamp, dem Goldstandard zur Bestimmung der Insulinsensitivität, geprüft. Hier war das Ergebnis ein entgegengesetztes, also Verbesserung durch Hypoxie. Diese unterschiedlichen Befunde müssen wahrscheinlich als Beispiel der beschränkten Eignung des Insulintoleranztests zur Messung der Insulinsensitivität interpretiert werden. In der vorliegenden Studie wurde bei den schlanken Mäusen auf Basis des

HOMA-Index keine signifikante Veränderung der Insulinsensitivität durch Hypoxie beobachtet. Es muss an dieser Stelle jedoch festgestellt werden, dass die basale Insulinämie gesunder Mäuse grundsätzlich sehr niedrig ist, sodass ein weiteres Absinken, das einen Hinweis auf bessere Insulinsensitivität im HOMA-Index erbringen könnte, auch analytisch schwer zu erfassen wäre. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das vorliegende Experiment sehr deutliche Evidenz erbracht hat, dass das Leben unter Hypoxie in gesunden, schlanken Mäusen einen deutlichen blutglukosesenkenden Effekt hat und sogar ausgeprägte Hypoglykämie verursachen kann.

6. Schlusserfolgerung

Zu den beschriebenen Wirkungen, die regelmäßige Injektionen von Epo neben der Stimulation der Hämatopoese bei Mäusen ausüben, zählt ein Gewichtsverlust im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrolltieren. Bei den nicht-hämatopoetischen Effekten stellt sich jeweils die Frage, ob diese Folge der Hämatopoese sind oder durch direkte Wirkung von Epo auf nicht-hämatopoetische Gewebe zustande kommen. In meiner Studie habe ich gezeigt, dass hochdosierte Injektionen von Epo nur dann einen signifikanten Gewichtsverlust in Mäusen bewirken, wenn der Epo-R in nicht-hämatopoetischen Geweben exprimiert wird. Fehlt Epo-R in diesen Geweben, so ist keine Wirkung auf das Körpergewicht zu sehen. Dies bedeutet, dass die Wirkung von Epo auf das Körpergewicht keine Folge der Hämatokritsteigerung ist, sondern einem direkten Effekt des Hormons auf nicht-hämatopoetische Gewebe zuzuschreiben ist.

Weiters weisen meine Resultate nach, dass Haltung unter Hypoxie die Blutglukose von gesunden, also normoglykämischen, Mäusen senkt und deren Glukosetoleranz verbessert. Insbesondere nach prolongiertem Fasten kann es sogar zu ausgeprägten Hypoglykämien kommen. Ein Gewichtsverlust im Vergleich zu Kontrollen tritt auch bei Mäusen unter Hypoxie auf und könnte freilich Ursache von reduzierten Blutglukosekonzentrationen sein. Durch Verwendung einer Kontrollgruppe, die durch eingeschränkte Fütterung vergleichbares Gewicht hatte, konnte ich jedoch zeigen, dass Hypoxie die Blutglukosesenkung gewichtsunabhängig verursacht. Eine Verschiebung in der Körperzusammensetzung in Sinne einer geringeren relativen Fettmasse bei Hypoxie-exponierten Mäusen könnte jedoch in geringem Maße zur Blutglukosesenkung beitragen.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Herr Professor Clemens Fürnsinn bedanken. Er war sehr geduldig und hilfsbereit, hat mir vieles ruhig erklärt und hat mich während des Schreibens meine Masterarbeit sehr unterstützt, um die richtigen Formulierungen ausdrücken zu können. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Ich möchte mich auch bei meinen Eltern und Schwestern bedanken, sie haben immer mit offenem Ohr meine Sorgen angehört und mich sehr unterstützt.

Abschließend möchte ich mich auch bei meinen Freunden, Arbeits- und Studienkollegen bedanken, die mir während meines ganzen Studiums und vor allem während meiner Masterarbeit zur Seite standen und mich unterstützt haben.

8. Literaturverzeichnis

- Abu Eid, S., Hackl, M.T., 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.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. & Starke, K. (2009). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel. (10. Auflage). München: Elsevier, Urban & Fischer.*
- Chen, X.Q., Dong, J., Niu, C.Y., Fan, J.M & Du, J.Z. (2007). Effects of hypoxia on glucose, insulin, glucagon, and modulation by corticotropin-releasing factor receptor type 1 in the rat. *Endocrinology*, 148 (7), 3271-3278.
- Chen, C.Y., Tsai, Y.L., Kao, C.L., Lee, S.D., Wu, M.C., Mallikarjuna, K., et al. (2010). Effect of mild intermittent hypoxia on glucose tolerance, muscle morphology and AMPK-PGC-1alpha signaling. *Chinese Journal of Physiology*, 53, 62-71.
- Dey, S., Li, X., Teng, R., Alnaeeli, M., Chen, Z.Y., Rogers, H. & Noguchi, C.T. (2016). Erythropoietin regulates POMC expression via STAT3 and potentiates leptin response. *J Mol Endocrinol*, 56 (2): 55-67.
- Drager, L.F., Li, J., Reinke, C., Bevans-Fonti, S., Jun, J.C. & Polotsky, V.Y. (2011). Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. *Obesity* 19, 2167-2174.
- Foskett, A., Alnaeeli, M., Wang, L., Teng, R. & Noguchi, C.T. (2011). The Effects of erythropoietin dose titration during high-fat diet-induced obesity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology: Article ID 373781.*
- Fournalous, S., Dotta, F., Greenbaum, C.J., Palmer, J.P., Rolandsson, O., Colman, P. G. & Harrison, L.C. (2005). Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. *Diabetologia*, 48, 2206-2212.
- Gamboa, J.L., Garcia-Cazarin, M.L. & Andrade, F.H. (2011). Chronic hypoxia increases insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300, 85-91.

- Gutch, M., Kumar, S., Razi, S.M, Gupta, K.K. & Gupta, A. (2015). Assessment of insulin sensitivity/resistance. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 19 (1),160-164.
- Herdegen, T., Böhm, R., Culman, J., Gohlke, P., Luippold, G. & Wätzig, V. (2019). *Antidiabetika. Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie* (4. Auflage). Stuttgart: Thieme, 243-266.
- Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of Physiology*, 589.6, 1251-1258.
- Jelkmann, W. (2013). Körper eigene Produktion von Erythropoietin (EPO). *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 64, 11.
- Königshoff, M. & Brandenburger, T., (2007). *Kurzlehrbuch Biochemie*. (2. Auflage). Stuttgart, New York: Thieme.
- 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., Brandt, U., Anderka, O., Kerscher, S., Kieß, S., Ridinger, K., Voelcker, G. & Greiner, I., (2018). *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler* (3.Auflage). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg: Imprint: Springer Spektrum.
- Musholt, P.B., Schipper, C., Thomé, N., Ramljak, S., Schmidt, M., Forst, T. & Pfützner, A. (2011). Dynamic electrochemistry corrects for hematocrit interference on blood glucose determinations with patient self-measurement devices. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 5 (5), 1167-1175.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Menzel, S., Gudermann, T., Hinz, B. & Ruth, P. (2020). *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie- Klinische Pharmakologie- Toxikologie*. (11. Auflage) wvg-Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Pörtl, L. (2020). Diplomarbeit: Wirkung von Erythropoietin auf den Glukosestoffwechsel männlicher und weiblicher Mäuse.
- Polak, J., Shimoda, L.A., Drager, L.F., Undem, C., McHugh, H., Polotsky, V.Y. & Punjabi, N.M. (2013). Intermittent Hypoxia Impairs Glucose Homeostasis in C57BL6/J Mice: Partial Improvement with Cessation of the Exposure. *Sleep*, 36 (10), 1483-1490.

- Sawhney, R.C., Malhotra, A.S. & Singh, T. (1991). Glucoregulatory hormones in man at high altitude. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 62, 286-291.
- Schäfer-Graf, U., Laubner, K., Hummel, S., Gembruch, U., Groten, T., Kainer, F., Grieshop, M., Bancher-Todesca, D., Cervar-Zivakovic, M., Hösli I., Kaltheuner, M., Gellner, R., Kautzky-Willer, A., Bühner, C., Patchev, V. & Nothacker, M. (2021). Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge. *Diabetologe*, 17, 538-548.
- Siddiqui, K., Musambil, M. & Nazir, N. (2015). Maturity onset diabetes of the young (MODY) - History, first case reports and recent advances. *Gene*, 555, 66-71.
- Sharp, F.R., Ran, R., Lu, A., Tang, Y., Strauss, K.I., Glass, T., Ardizzone, T., Bernaudin, M. (2004). Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRX: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1, 26-35.
- Sorg, H., Kuhbier, J.W., Menger, B., Reimers, K., Harder, Y. & Vogt, P.M. (2010). Die Rolle von Erythropoetin bei der Verbesserung der Wundheilung. *Chirurg*, 81 (11), 993-998.
- Suresh, S., Rajvanshi, P. & Noguchi, C. (2020). The many facets of erythropoietin physiologic and metabolic response. *Frontiers in Physiology*, 10, 1534.
- Suzuki, N., Ohneda, O., Takahashi, S., Higuchi, M., Mukai, H.Y., Tatsutoshi, N., Imagawa, S. & Yamamoto, M. (2002). Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood, The Journal of Hematology*, 100 (7): 2279-2288.
- Teng, R., Gavrilova, O., Suzuki, N., Chanturiya, T., Schimel, D., Hugendubler, L., Mammen, S., Yver, D.R., Cushman, S.W., Mueller, E., Yamamoto, M., Hsu, L.L. & Noguchi, C.T. (2011). Disrupted erythropoietin signalling promotes obesity and alters hypothalamus proopiomelanocortin production. *Nature Communications*, 2, 520.
- Westerterp-Plantenga, M.S., Westerterp, K.R., Rubbens, M., Verwegen, C.R.T., Richelet, J.P. & Gardette, B. (1999). Appetite at "high altitude"

[Operation Everest III (Comex-'97)]: a simulated ascent of Mount Everest. *Journal of Applied Physiology*, 87 (1), 391-399.

-Woolcott, O.O., Castillo, O.A., Gutierrez, C., Elashoff, R.M., Stefanovski, D. & Bergman, R.N. (2014). Inverse association between diabetes and altitude: A cross-sectional study in the adult population of the United States. *Obesity*, 22, 2080-2090.

-Woolcott, O.O., Ader, M. & Bergman, R.N. (2015). Glucose homeostasis during short-term and prolonged exposure to high altitudes. *Endocrine Reviews*, 36, 149-173.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der Insulinsekretion aus den B-Zellen des Pankreas ins Blut (Behrends et al., 2012).....	9
Abbildung 2: Links die auffällig krankhaft knotige Leber einer Maus der Kontrollgruppe von Exp.2/Hypoxie (Fibrose?, Zirrhose?). Rechts zum Vergleich das Erscheinungsbild einer normalen, gesunden Leber einer anderen Maus dieser Kontrollgruppe.....	18
Abbildung 3: Δ -Körpergewicht im Verlauf (a.) und am Ende (b.) einer 3-monatigen Behandlung mit Vehikel gegen Erythropoetin (EPO; 1000 U/kg i.p., 3 Injektionen/Woche) bei männlichen adipösen Mäusen des Wildtyps (WT), sowie bei genmanipulierten Mäusen, die außer in Milz und Knochenmark keine Erythropoetinrezeptoren exprimierten (KO). WT-Mäuse: blau; KO-Mäuse: orange; gestrichelte Linie: Vehikel; durchgehende Linie: EPO; n=5-8 pro Gruppe. Mittelwert $\pm$ SEM.	24
Abbildung 4: Hämatokrit (a.) und Sauerstoffsättigung (b.) von männlichen adipösen Mäusen, die über 3 Monate mit 3 Injektionen/Woche von Vehikel (blau) oder 1000 U/kg i.p. Erythropoetin (orange) behandelt wurden. Wildtyp-Mäuse (WT) und genmanipulierte Mäuse, die außer in Milz und Knochenmark keine Erythropoetinrezeptoren exprimierten (KO), wurden vergleichend untersucht. n=4-5 pro Gruppe; Mittelwert $\pm$ SEM.	25
Abbildung 5: Glukosetoleranztest nach 3-monatiger Behandlung mit Vehikel gegen Erythropoetin (EPO; 1000 U/kg i.p., 3 Injektionen/Woche) bei männlichen adipösen Mäusen des Wildtyps (blau), sowie bei genmanipulierten Mäusen, die außer in Milz und Knochenmark keine Erythropoetinrezeptoren exprimierten (orange). gestrichelte Linie: Vehikel; durchgehende Linie: EPO; n=5-8 pro Gruppe. Mittelwert $\pm$ SEM.	26
Abbildung 6: Gesamte Fläche unter der Kurve (AUC _{tot} ; a.) und inkrementale Fläche unter der Kurve (AUC _{ink} ; b.) von männlichen adipösen Mäusen, die über 3 Monate mit 3 Injektionen/Woche von Vehikel (blau) oder 1000 U/kg i.p. Erythropoetin (orange) behandelt wurden. Wildtyp-Mäuse (WT) und genmanipulierte Mäuse, die außer in Milz und Knochenmark keine Erythropoetinrezeptoren exprimierten (KO), wurden vergleichend untersucht. n=5-8 pro Gruppe; Mittelwert $\pm$ SEM.	27
Abbildung 7: Körpergewicht einer Gruppe männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM..	28
Abbildung 8: Fettmasse (a.), Magermasse (b.) und relative Fettmasse (c.) von männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurden (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange), im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM.	29
Abbildung 9: Hämatokrit (a.) und Sauerstoffsättigung (b.) männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurden (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange), im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM..	30
Abbildung 10: Blutglukose einer Gruppe männlicher, für 4 h gefasteter Mäuse vor dem Beginn des Experiments und nachdem sie für 7, 35, 58 und 91 Tage unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange). Im Vergleich dazu eine Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau), die täglich eine eingeschränkte Menge Futter bekam, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM.	31
Abbildung 11: Blutglukose einer Gruppe männlicher, für 18 h gefasteter Mäuse, nachdem sie für 39, 71 und 85 Tage unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange). Im Vergleich dazu eine Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau), die täglich eine eingeschränkte Menge Futter bekam, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM.	32
Abbildung 12: Glukosetoleranztest (1,5 g/kg i.p.) bei einer Gruppe männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluft; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert $\pm$ SEM.	33

Abbildung 13: Gesamte Fläche unter der Glukosekurve (AUC _{tot} ; a.) und inkrementale Fläche unter der Glukosekurve (AUC _{ink} ; b.) im Glukosetoleranztest (1,5 g/kg i.p.) einer Gruppe männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange), im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluf; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert ± SEM.	34
Abbildung 14: Blutglukose (a.), Plasmainsulin (b.) und HOMA-Index (c.) einer Gruppe männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange), im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (normale Raumluf; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen. Mittelwert ± SEM.	35
Abbildung 15: Korrelation zwischen relativer Fettmasse und basaler Blutglukose einer Gruppe männlicher Mäuse, die unter Hypoxie gehalten wurde (10% Sauerstoff in der Atemluft; n=11, orange), sowie einer Kontrollgruppe (normale Raumluf; n=10, blau). Die Kontrollgruppe bekam täglich eine eingeschränkte Menge Futter, um ihre Körpergewichtskurve so gut wie möglich jener der Hypoxie-Gruppe anzugleichen.	40