



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchungen zum Mechanismus der
antihyperglykämischen Wirkung von Efaroxan

Verfasserin

Denise Gruber

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Gewidmet meinen Eltern

Karin und Wolfgang Gruber

Vielen Dank für eure Unterstützung!

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1.	ERNÄHRUNGSSITUATION IN ÖSTERREICH	3
2.2.	DIABETES MELLITUS	5
2.3.	GLUKOSESTOFFWECHSEL	7
2.4.	INSULIN	11
2.5.	K_{ATP} -KANÄLE	15
2.6.	DIAZOXID	16
2.7.	α_2 -ADRENERGE REZEPTOREN	17
2.8.	UK 14,304	19
2.9.	EFAROXAN	20
3.	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1.	VERSUCHSTIERE	25
3.2.	PERIFUSION	25
3.2.1.	VERSUCHSPRINZIP DER PERIFUSION ISOLIERTER INSELN.....	25
3.2.2.	REAGENZIEN	26
3.2.3.	PERIFUSIONSMEDIEN	28
3.2.4.	PANKREASPRÄPARATION.....	31
3.2.5.	ISOLATION DER LANGERHANS' SCHEN INSELN.....	33
3.2.6.	„PICKEN“ DER INSELN.....	34
3.2.7.	BELADEN DER PERIFUSIONSZYLINDER.....	35
3.2.8.	TESTPHASE	37
3.2.9.	INSULINMESSUNG.....	39
3.3.	ORALER GLUKOSETOLERANZTEST (OGTT)	40

3.4.	PHARMAKOLOGISCH INDUZIERTE HYPERGLYKÄMIE.....	42
3.5.	STATISTIK.....	44
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	45
4.1.	WIRKUNG VON EFAROXAN IN VITRO.....	45
4.1.1.	WIRKUNG EFAROXAN UNTER STANDARDBEDINGUNGEN	45
4.1.2.	WIRKUNG VON (+) -UND (-)-EFAROXAN UNTER DIAZOXID.....	48
4.1.3.	WIRKUNG VON (+) -UND (-)-EFAROXAN UNTER UK.....	50
4.2.	DISKUSSION IN VITRO.....	52
4.3.	WIRKUNG VON EFAROXAN IN VIVO	56
4.3.1.	ORALE GLUKOSETOLERANZTESTS.....	56
4.3.2.	PHARMAKOLOGISCH INDUZIERTE HYPERGLYKÄMIEN	60
4.4.	DISKUSSION IN VIVO	69
5.	SCHLUSSBETRACHTUNG	74
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	78
7.	ABSTRACT	80
8.	LITERATURVERZEICHNIS	81
9.	CURRICULUM VITAE	84
10.	DANKSAGUNG.....	86

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Insulin ist ein äußerst wichtiges Hormon. Es wird aus den β -Zellen der sogenannten Langerhans'schen Inseln des Pankreas freigesetzt und reguliert unter anderem den Glukosestoffwechsel. Ein relativer oder absoluter Mangel an Insulin ist Ursache einer weit verbreiteten Krankheit, des Diabetes mellitus Typ 2. Im Fokus dieser Arbeit stand die Erforschung der Wirkungsweise verschiedener Substanzen, die die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas steigern und die Blutglukose senken können.

Ziel dieser Arbeit war die Erforschung des Wirkmechanismus von Efaroxan, einer Substanz aus der Klasse der Imidazoline, von der man weiß, dass sie die Insulinfreisetzung steigern und die Blutglukose senken kann. Laut Literatur kommen zwei unterschiedliche Wirkmechanismen direkt an der β -Zelle als Ursache für diese Effekte in Frage: Antagonismus an α_{2A} -Adrenozeptoren und Schließen der K_{ATP} -Kanäle. Efaroxan ist ein Razemat, wobei die Verfügbarkeit hochgereinigter Efaroxanenantiomere Grundlage der hier beschriebenen Untersuchungen war. Meine Arbeit kann in zwei wichtige Abschnitte unterteilt werden:

Der erste Teil der Arbeit diente der vergleichenden Darstellung der direkten Wirkungen von Efaroxanrazemat, (+)-Efaroxan und (-)-Efaroxan auf die Insulinfreisetzung perifundierter Mäuseinseln *in vitro*. Die Effekte der unterschiedlichen Präparationen von Efaroxan auf die basale und glukosestimulierte Insulinsekretion wurden zu diesem Zweck sowohl unter Standardbedingungen, als auch in Anwesenheit der Insulinsekretionshemmer Diazoxid (K_{ATP} -Kanal-Öffner) oder UK 14,304 (α_{2A} -Agonist) getestet. Ziel dieser Experimente war zu differenzieren, welches der Efaroxanenantiomere welchen der beiden Wirkmechanismen (α_{2A} -Antagonismus und Schließen der K_{ATP} -Kanäle) anspricht.

Im zweiten Teil wurde die Blutglukose-senkende Wirkung von Efaroxanrazemat mit jener von (+)-Efaroxan und (-)-Efaroxan in Mäusen *in vivo* verglichen. Dabei wurden sowohl orale Glukosetoleranztests, als auch Experimente mit pharmakologisch verursachten Hyperglykämien durchgeführt, wobei diese Hyperglykämien wiederum

durch Diazoxid und UK 14,304 induziert wurden. Das Ziel all dieser Experimente war, die beiden bekannten Wirkmechanismen von Efaroxan klar zu differenzieren und insbesondere festzustellen, welcher der Mechanismen, Antagonismus am α_{2A} -Adrenozeptor bzw. Schließen der K_{ATP} -Kanäle, wie weit für die Senkung der Blutglukose in vivo verantwortlich ist. Diese Frage blieb trotz umfangreicher Studien zum Wirkmechanismus von Efaroxan und verwandter Substanzen bis zur vorliegenden Diplomarbeit unbeantwortet.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. ERNÄHRUNGSSITUATION IN ÖSTERREICH

Laut der am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien durchgeführten ÖSES.07-Studien (ÖSES = Österreichische Studie zum Ernährungsstatus) liegt in allen untersuchten Altersgruppen eine starke Tendenz zu Übergewicht (Body Mass Index zwischen 25 und 29,9 kg/m²) vor. In der Kategorie der 6- bis 15-jährigen Schulkinder sind 19 % übergewichtig, bei den 18- bis 65-jährigen Erwachsenen sogar 42 % und in der Gruppe der 65- bis >84-Jährigen leiden 40 % an Übergewicht. Außerdem neigen Buben bzw. Männer eher zu Übergewicht als Mädchen bzw. Frauen. Ebenso kann ganz allgemein gesagt werden, dass mit zunehmendem Alter das Gewicht steigt, wobei es ab etwa 65 Jahren wieder sinkt. Sehr interessant ist außerdem, dass es ein starkes Ost-West-Gefälle gibt. Im Osten von Österreich sind in allen Altersgruppen mehr übergewichtige bzw. adipöse Menschen zu finden als im Westen. Generell zeigt sich in beiden Geschlechtern in den letzten Jahren eine starke Zunahme von Übergewicht bzw. Adipositas [1].

Der Grund für die allgemeinen Ursachen für Übergewicht liegt in einer Reihe zusammenhängender Faktoren wie zum Beispiel Rauchen, Alkohol, sitzender Lebensweise, finanzieller Belastung, mangelnder Bewegung, Erkrankungen und vor allem an einseitiger Ernährung [1].

Die durchschnittliche Energiezufuhr der Frauen liegt mit 7,5 MJ/d nicht im optimalen Bereich von 8,5-10 MJ, das heißt, es entspricht nicht dem Referenzwert (= ein Oberbegriff für die Empfehlung der Nährstoffzufuhr, die in Zahlen angegeben wird). Bei den Männern liegt die durchschnittliche Energiezufuhr bei 9 MJ, die damit ebenso niedriger liegt, als es der D-A-CH-Referenzwert mit 10,5-12,5 MJ vorgibt. Diese niedrige Energiezufuhr lässt auf eine geringe körperliche Aktivität schließen, welche sich im Allgemeinen schlecht auf den Körper auswirkt [1].

Eiweiß wird im Allgemeinen zuviel aufgenommen. Im Durchschnitt nimmt ein Erwachsener 1,2 g Eiweiß pro kg Körpergewicht und Tag auf, was in etwa 50 % über der empfohlenen Zufuhr liegt. Da der Proteinanteil bezogen auf die Gesamtenergiezufuhr bei rund 15 % liegt, befindet er sich noch im Referenzbereich (= der Toleranzbereich zwischen den vorgegebenen Soll –und Grenzwerten). Allgemein kann gesagt werden, dass Männer etwas mehr Eiweiß zu sich nehmen als Frauen [1].

Die Fettzufuhr liegt bei österreichischen Erwachsenen zwischen 36 und 38 Energie% (E%), was deutlich über dem empfohlenen Wert von maximal 30 E% liegt. Nicht nur die Fettmenge, sondern auch die Fettzusammensetzung spielt eine große Rolle. Mit 14-15 E% liegt die Zufuhr an gesättigten Fettsäuren deutlich über der empfohlenen Zufuhr von maximal 10 E%. Bei Männern wurde außerdem mit 352 mg/d eine zu hohe Cholesterinzufuhr festgestellt (maximal 300 mg/d), was auf einen hohen Verzehr von tierischen Produkten zurückzuführen ist. Die Aufnahme an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die zwischen 10 und 13 E% liegen sollte, war im Durchschnitt mit 13 E% im optimalen Bereich [1].

Der hohe Anteil an Eiweiß und Fett wird in der Ernährung der Erwachsenen im Vergleich mit dem dazu relativ geringen Kohlenhydratanteil deutlich. Frauen nehmen durchschnittlich 46 E% und Männer 43 E% auf, was deutlich unter dem Referenzwert von 50 E% liegt. Die Saccharosezufuhr (Haushaltszucker) liegt mit rund 10 E% im akzeptablen Bereich während die Ballaststoffzufuhr mit 20 g pro Tag weit unter der empfohlenen Zufuhr von 30 g pro Tag liegt. Der durchschnittliche Alkoholkonsum liegt im gesundheitlich verträglichen Bereich. Bei Männern gelten 20 g/d als gesundheitlich unbedenklich und bei Frauen 10 g pro Tag, wobei Frauen im Durchschnitt weniger Alkohol konsumieren als Männer. Hinsichtlich der Vitaminszufuhr wurde ein unzureichender Versorgungszustand bei Vitamin B₆ und Folsäure festgestellt. Auch bei Vitamin D wurde ein erniedrigter Status ermittelt. Bei den Mineralstoffen wurden erniedrigte Statuswerte von Eisen und Zink festgestellt [1].

In der ÖSES.07 Studie wurden zusätzlich 12 mögliche Faktoren untersucht, die das Ernährungsverhalten der Österreicher beeinflussen könnten.

Einen geringen bzw. kaum Einfluss haben: der Familienstand, das Einkommen und der Einfluss des extern bestimmten Ernährungsverhaltens wie, zum Beispiel, die Mahlzeiten, die man in der Arbeit zu sich nimmt oder wenn man in Restaurants essen geht. Signifikante Einflüsse auf das Ernährungsverhalten zeigten die Häufigkeit der im Leben durchgeführten Diäten. Einen Zusammenhang mit dem Ernährungsverhalten haben: das Rauchen, die Anzahl der Mahlzeiten pro Tag, der Body-Mass-Index (BMI), die Zufriedenheit mit dem Körpergewicht (eher bei Männern), die Einstellung zu einer gesunden Ernährung, der „bewusste Genuss“, „sich Zeit für das Essen nehmen“ und die Reaktion auf Emotionen (eher bei Frauen) [1].

Außerdem können auch ernährungsbedingte Erkrankungen wie, zum Beispiel, Herz-Kreislauferkrankungen, Krebs, Adipositas oder Diabetes mellitus durch eine einseitige Ernährung, Rauchen, Alkohol, Übergewicht, Bluthochdruck und viele andere Risikofaktoren vermehrt auftreten. [1].

Die vorliegende Arbeit beinhaltet pharmakologische Untersuchungen zu einer dieser Folgeerkrankungen, dem Diabetes mellitus.

2.2. DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus wird auch Zuckerkrankheit genannt und gehört zu den erblich chronischen Stoffwechselerkrankungen. Diese Krankheit beruht entweder auf einem absoluten oder auf einem relativen Mangel an Insulin. Die Diagnose erfolgt durch die Feststellung einer erhöhten Blutglukosekonzentration. Wichtige Erkennungszeichen dieser Krankheit sind neben Hyperglykämie auch Glukosurie, Polyurie und Polydipsie. Je nach Schweregrad dieser Krankheit ist entweder eine Behandlung durch Diät alleine oder zusätzlich mit oralen Antidiabetika oder durch Insulininjektionen notwendig.

Neben weiteren Sonderformen werden 2 Arten von Diabetes mellitus unterschieden, nämlich Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 [2, 3].

Diabetes mellitus Typ 1 tritt überwiegend in jüngeren Jahren auf und wird auch als insulinabhängiger Diabetes bezeichnet [3]. Beim Typ 1 Diabetes kommt es zur Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas, wodurch ein absolutes Insulindefizit eintritt [4]. Durch den absoluten Insulinmangel kommt es zu einer dem Hungerstoffwechsel ähnlichen Stoffwechsellage, was zusammen mit einer Dehydrierung den typischen Gewichtsverlust bedingt. Wenn man den Typ-1-Diabetes nicht behandelt, kommt es quasi zu einem „Verhungern der Zellen“, da von vielen Zelltypen keine Glukose aufgenommen werden kann. Dadurch kommt es zu einer Ketose, die im schlimmsten Fall tödlich enden kann [2]. Allerdings ist der Typ 1 Diabetes, an dem nur 5-10 % der Diabetiker leiden, wesentlich seltener, als der Typ 2 [4].

Diabetes mellitus Typ 2 tritt hauptsächlich bei älteren Menschen auf und wird deshalb auch als Altersdiabetes bezeichnet. Man spricht auch vom insulinunabhängigen Diabetes. Es kommt zu einem multikausalen relativen Insulinmangel, der meist auch erblich veranlagt ist. Übergewicht, falsche Ernährung und eine geringe körperliche Betätigung sind wesentliche Faktoren, die zu einem Diabetes Typ-2 führen können. Die meisten Typ 2 Diabetiker sind übergewichtig oder adipös, wodurch sich die Glukosetoleranz verschlechtert. In der frühen Phase der Erkrankung entwickelt sich eine zunehmende Insulinresistenz, die auch bei Übergewicht ohne Diabetes schon deutlich ist. Dadurch wird eine vermehrte Insulinausschüttung der β -Zellen induziert (kompensatorische Hyperinsulinämie), was bei länger anhaltendem Zustand zu einer Beeinträchtigung der β -Zellfunktion führt und eine Insuffizienz entstehen lässt [2]. In der späten Phase der Erkrankung kann es, ähnlich dem Typ 1 Diabetes, zu einem totalen Insulinmangel kommen. Der Typ 2 Diabetes ist für 90-95 % der Diabetesfälle verantwortlich [4]. Die Unterschiede in den Pathogenesen zwischen Typ 1 und Typ 2 Diabetes sind in Abbildung L1 dargestellt.

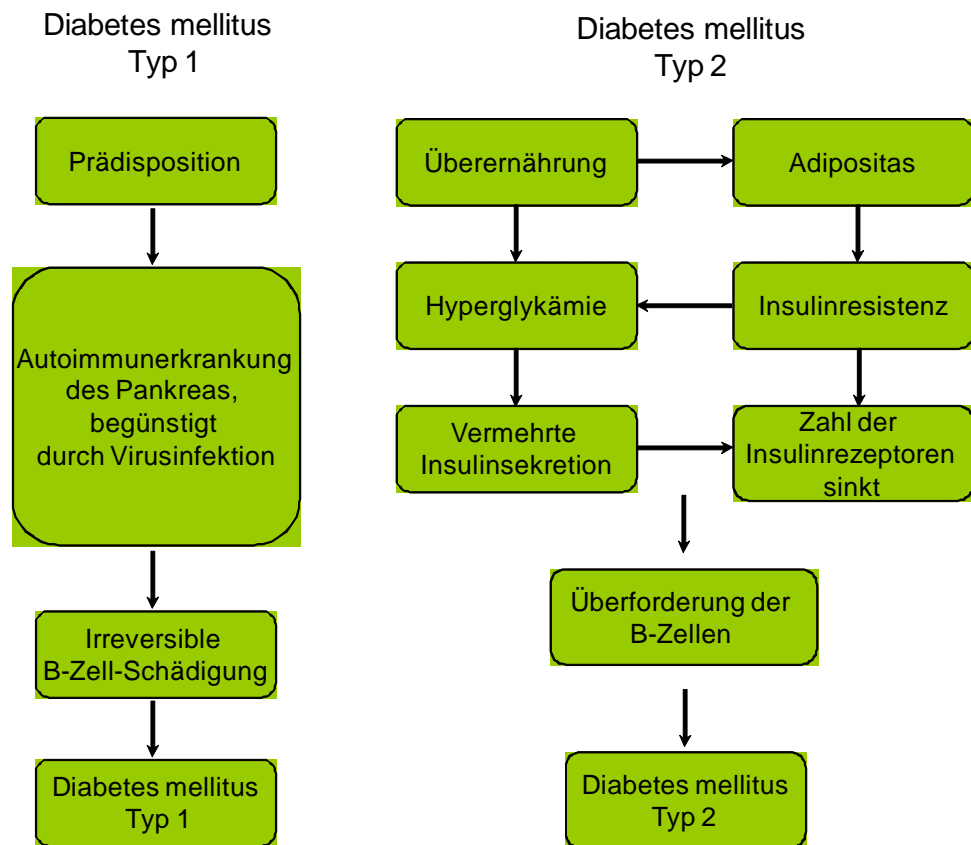
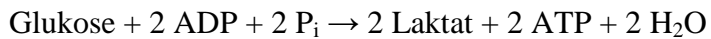


Abbildung L1: Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 1 und 2, adaptiert nach [2]

2.3. GLUKOSESTOFFWECHSEL

Diabetes mellitus ist also durch Hyperglykämie, also einen gestörten Glukosestoffwechsel definiert. Die Leber stellt das zentrale Organ der anabolen und katabolen Prozesse des Kohlenhydratstoffwechsels dar. Im gesamten Kohlenhydratstoffwechsel des Menschen ist die D-Glukose von großer Bedeutung. Um zu einer Reaktion zu gelangen, muss Glukose mit Hilfe von ATP in Glukose-6-phosphat umgewandelt werden. In fast allen Zellen findet sich das Enzym Hexokinase, welches diese Reaktionen katalysiert. Ausnahmen sind die Leber und die β -Zellen des Pankreas, wo sich eine besondere Isoform, nämlich die Glukokinase, befindet.

Der Phosphorylierung folgen die weiteren Schritte der Glykolyse, also des Abbaus von Glukose zum Pyruvat. Unter anaeroben Bedingungen wird das Pyruvat dann zum Laktat umgesetzt. Die folgende Gleichung beschreibt die Gesamtreaktion, der anaeroben Glukoseverstoffwechslung:



[5]

Wenn Glukose unter aeroben Bedingungen abgebaut wird, werden die gebildeten Pyruvat-Moleküle in die mitochondriale Matrix transportiert, wo sie in Acetyl-CoA umgewandelt werden. Anschließend wird das Acetyl-CoA in den Zitronensäurezyklus eingeschleust. In diesen Kreislauf von Reaktionen wird pro Umlauf ein Acetyl-CoA eingeschleust, wobei 2 Moleküle CO_2 , und jeweils ein Molekül GTP und FADH_2 , sowie 3 Moleküle NADH entstehen. Die beiden letztgenannten Coenzyme spielen eine wichtige Rolle bei der oxidativen Phosphorylierung, in der ATP aus ADP phosphoryliert wird (siehe Abbildung L2) [6].

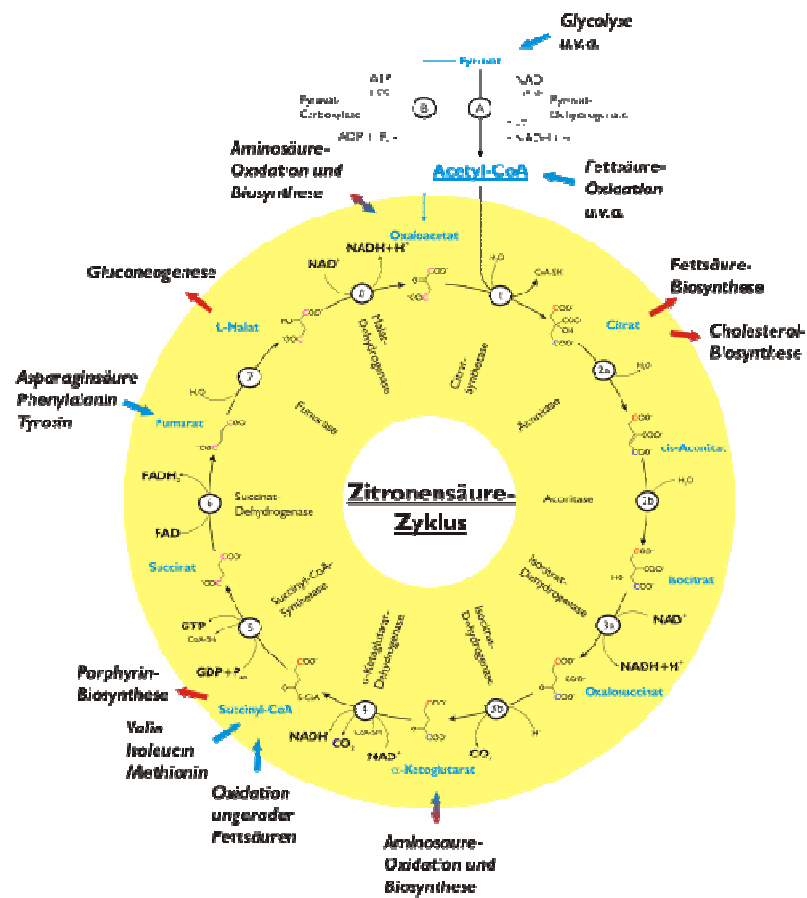


Abbildung L2: Die Reaktionsschritte des Zitronensäurezyklus [7]

Glukose-6-Phosphat muss aber nicht direkt in die Glykolyse eingehen. Der erste Schritt der **Glykogensynthese** ist die Umwandlung von Glukose-6-phosphat in Glukose-1-phosphat durch die Phosphoglukomutase (Abbildung L3). Durch die Glukose-1-phosphat-UTP-Transferase entsteht aus Glukose-1-phosphat und UTP die UDP-Glukose. Dabei kommt es zu einer Phosphorsäureanhydridbindung zwischen den Phosphatresten von Glukose-1-phosphat und UTP und in weiterer Folge zur Abspaltung des Phosphats von UTP durch die Pyrophosphatasen (Abbildung L4). Dadurch kommt es zu einer Gleichgewichtsverschiebung der Reaktion in Richtung Glykogensynthese. Anschließend kommt es zur Übertragung der aktivierten UDP-Glukose auf ein Startermolekül. Das Schlüsselenzym der Glykogensynthese stellt die Glykogen-Synthase dar. Die Glykogen-Synthase überträgt Glykosylreste von der UDP-Glukose auf vorhandene Ketten, wodurch es zu einer Kettenverlängerung des Glykogenmoleküls

kommt. Durch die Entstehung von Verzweigungsstellen ab einer bestimmten Anzahl von Glukoseeinheiten und durch die Knüpfung von 1,6 glykosidischen Bindungen an benachbarten Ketten, kommt es zu einer typischen baumartigen Verzweigung der Glykogenkette. Beim Abbau des Moleküls handelt es sich um eine phosphorylytische Spaltung durch Phosphorsäure, wodurch wieder Glukose-1-phosphat entsteht. Die Glykogenphosphorylase katalysiert diese Reaktion und stellt das Schlüsselenzym der Glykogenolyse dar [8].



Abbildung L3: Umwandlung von Glukose-6-phosphat in Glukose-1-phosphat durch die Phosphoglucokinase, adaptiert nach [9]

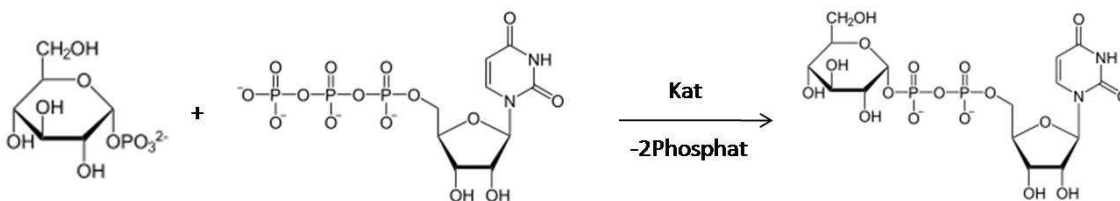


Abbildung L4: Entstehung der UDP-Glukose durch die Verknüpfung von Phosphatresten von Glukose-1-phosphat und UTP, adaptiert nach [9]

Die Glukose und die Glukosyleinheiten aus dem Glykogen werden also über die Glykolyse zur Versorgung der Zellen mit Energie (ATP) verwendet. Die Leber kann aber auch große Mengen an Glukose freisetzen, die aus den Glykogenvorräten stammt (Glukogenese) oder sozusagen in Umkehrung der Glykolyse z.B. aus Laktat oder Aminosäuren gebildet wird (Glukoneogenese). Durch entsprechend regulierte Raten von Glukoseresorption aus dem Darm, Glukoseproduktion der Leber und Glukoseaufnahme in die Gewebe wird die Blutglukosekonzentration eines gesunden nüchternen Menschen zwischen 70 und 120 mg/dl konstant gehalten. Dies wird als **Glukosehomöostase** bezeichnet, für die die Wirkungen der Hormone Insulin und Glukagon wichtig sind. Insulin und Glukagon zirkulieren im Blut eines gesunden Menschen in wechselnden Konzentrationen, wobei Insulinwirkung ein Absinken und Glukagonwirkung ein Ansteigen der Blutglukosekonzentration bewirkt. Zur kurzfristigen Regulation der Blutglukosekonzentration sind insbesondere Auf- und Abbau von Leberglykogen sowie die Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur wichtig. Durch den ständigen Glykogenauf- und -abbau werden in etwa 60 % der mit der Nahrung aufgenommenen Glukose zuerst in der Leber gespeichert und später zur Verfügung gestellt, sofern man sich gesund ernährt. Zur längerfristigen Regulation werden verschiedene Adaptionenmechanismen benötigt, sodass unter anderem auch bei kohlenhydratfreier Ernährung eine Mindestmenge an Glukose zur Verfügung steht. Hierbei kommt es zur Einschränkung des Glukoseverbrauchs durch Leber, Muskulatur und Fettgewebe. Zur gleichen Zeit einsetzende Glukoneogenese der Leber kann die Glukoseversorgung aufrecht erhalten, was insbesondere für das Gehirn wichtig ist [10].

2.4. INSULIN

Das lebenswichtige, die Blutglukose senkende Hormon und somit im Mittelpunkt aller Beobachtungen über Diabetes mellitus ist Insulin.

Insulin ist ein Polypeptid und besteht aus insgesamt 51 Aminosäuren. Es setzt sich aus einer kürzeren A-Kette, die 21 Aminosäuren enthält, und aus einer längeren B-Kette,

die aus 30 Aminosäuren besteht, zusammen. Diese beiden Ketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Zur weiteren Stabilisierung sind zwei Cysteinreste innerhalb der A-Kette noch zusätzlich durch eine dritte Disulfidbrücke verbunden (Abbildung L5). Threonin, Serin und Isoleucin in der A-Kette, sowie Threonin in der B-Kette sind bei Mensch, Rind und Schwein unterschiedlich positioniert. Die molare Masse des Humaninsulins beträgt 5786 Dalton. Zur Synthese des Insulins kommt es in speziellen Zellen, den β -Zellen der sogenannten Langerhans'schen Inseln, die sich im Pankreasgewebe verstreut befinden. Man findet etwa ein bis zwei Millionen Langerhans'sche Inseln im Pankreas eines Menschen [3, 5].

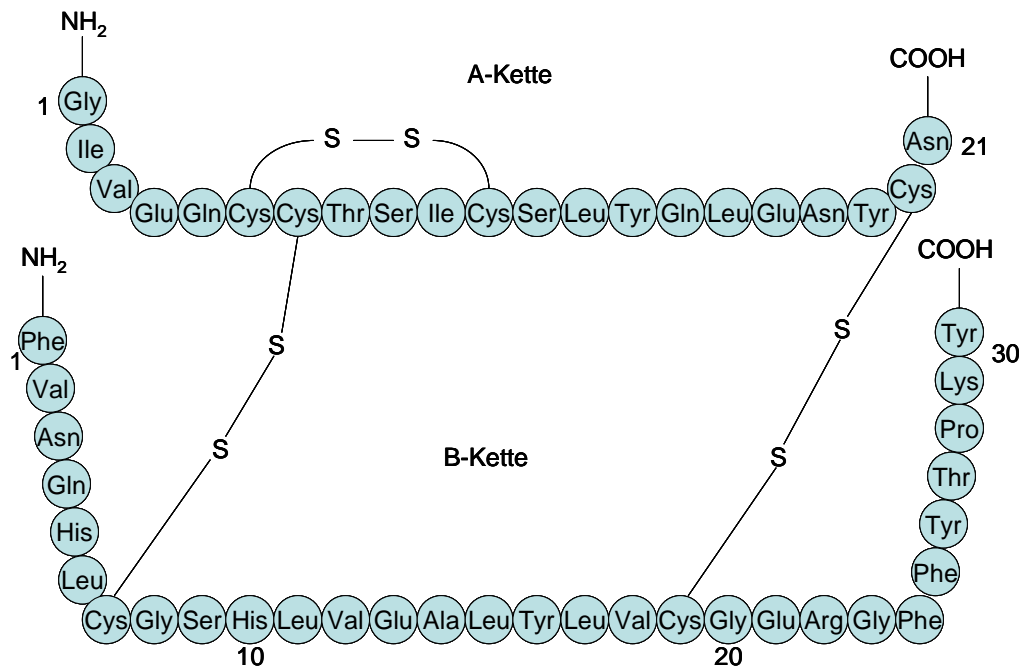


Abbildung L5: Struktur des Humaninsulins adaptiert nach [5]

Bei der **Insulinsekretion** wird das Insulin durch Exozytose an das Blut abgegeben. Der Anstieg der Blutglukosekonzentration stellt den wichtigsten physiologischen Reiz für die Auslösung der Insulinsekretion dar. Durch den Anstieg der Blutglukose wird diese vermehrt in die β -Zelle aufgenommen und führt zu einer Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration. Daraufhin werden ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) geschlossen, wodurch es zu einer Depolarisation der Membran kommt. Dadurch wiederum werden Kalziumkanäle aktiviert und Kalzium strömt in die Zelle ein. Durch die Erhöhung der Kalziumkonzentration kommt es zur Auslösung der Exozytose. Dabei verschmelzen die insulinhaltigen Granula mit der Plasmamembran, wodurch das Insulin in den extrazellulären Raum abgegeben wird (Abbildung L6) [5].

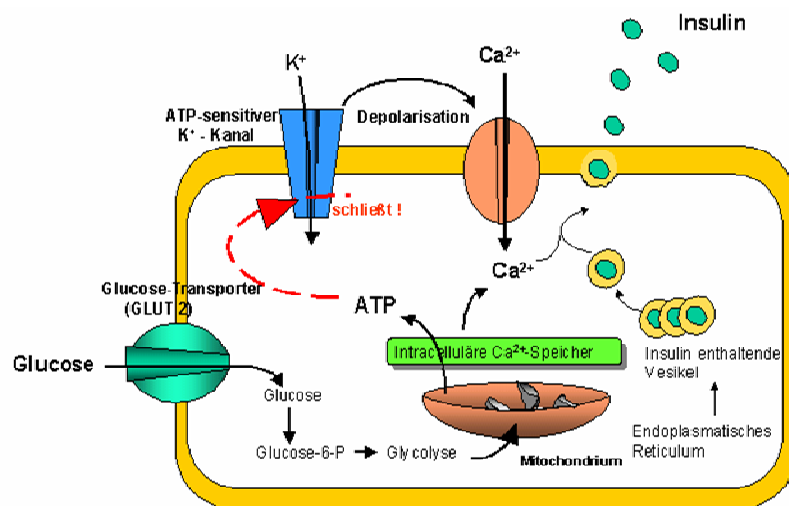


Abbildung L6: Reaktionsmechanismus der glukoseinduzierten Insulinfreisetzung [11]

Die **Wirkungen von Insulin** sind vielfältig. In Zusammenhang mit Diabetes mellitus ist die Bedeutung des Hormons vor allem für die Glukosehomöostase, aber auch für Fett – und Proteinstoffwechsel, entscheidend. Die Wirkung von Insulin wird in etlichen Organen beobachtet, wobei es auf Leber, Muskulatur und Fettgewebe die bedeutendsten Effekte aufweist. Die Wirkung des Insulins lässt sich am besten als anabol und antikatabol beschreiben. Durch gezielte Steuerung von Schlüsselenzymen werden anabole Vorgänge, wie die Synthese von Fett, Protein und Glykogen beschleunigt.

Ebenso werden katabole Prozesse, wie Proteolyse, Glykogenolyse und Lipolyse, gehemmt (Tabelle L1).

Bei der Vermittlung der Insulinwirkung an der Zelle wird zuerst das Hormon an einen Rezeptor in der Plasmazellmembran gebunden. Dann wird das Hormonsignal in die Zelle übertragen, und letztendlich Schlüsselenzyme gesteuert. Dadurch werden verschiedenste intrazelluläre Stoffwechselprozesse reguliert [3].

Tabelle L1: Die Wirkungen des Insulins auf diverse Stoffwechselprozesse adaptiert nach [3]

Prozess	Organ
1. Stimulation des Membrantransportes von:	
Zuckern	Fettgewebe, Muskel
Aminosäuren	Fettgewebe, Muskel
Ionen	Leber, Fettgewebe, Muskel
2. Anabole Wirkung durch:	
Stimulation der Proteinsynthese	Fettgewebe, Muskel
Stimulation der Glykogensynthese	Fettgewebe, Muskel, Leber
Stimulation der Triglycerid- und Fettsäuresynthese	Fettgewebe, Leber
3. Antikatabole Wirkung durch:	
Hemmung der Lipolyse	Fettgewebe (Leber)
Hemmung der Proteolyse	Muskel, Leber
Hemmung der Glukoneogenese	Leber

Bei der so genannten **Insulinresistenz**, die Übergewicht und Adipositas begleitet, kommt es in den verschiedensten Zielorganen von Insulin zu einer verminderten Antwort auf das Hormonsignal, vor allem im Skelettmuskel, im Fettgewebe und in der Leber. Folgen sind vermehrte Glukoseproduktion und erniedrigte Glukoseaufnahme aus dem Blut. Um ein Entgleisen der Blutglukosekonzentration zu vermeiden, produzieren die β -Zellen des Pankreas bei der Insulinresistenz vermehrt Insulin. Das ist der mutmaßliche Grund, warum sich das Pankreas nach einer bestimmten Zeit erschöpft und es nicht mehr genug Insulin produzieren kann [12]. Daher kommt es zuerst zu einer kompensatorischen Hyperinsulinämie und im weiteren Verlauf oft zu einer Hyperglykämie, also zum Diabetes mellitus [13].

2.5. K_{ATP} -KANÄLE

K_{ATP} -Kanäle gehören zu einer großen Klasse von Kaliumkanälen, die dazu beitragen das Ruhepotenzial bei negativen Membranpotenzialen aufrecht zu erhalten. K_{ATP} -Kanäle befinden sich unter anderem in Muskelzellen, in den β -Zellen des Pankreas und im Gehirn.

Der K_{ATP} -Kanal besteht aus zwei Typen von Proteinen. Einerseits die sogenannten Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR = sulfonylurea receptor), der die Bindungsstelle für die kanalblockierenden Sulfonylharnstoffe darstellt. Andererseits die porenbildenden Einheiten (Kir6.x; Kir = K inward rectifier), die um eine zentrale Pore angeordnet sind. Ein Kanal wird aus acht Proteinen gebildet, jeweils vier Einheiten SUR und vier Einheiten Kir6.x. Man kennt sowohl unterschiedliche Isoformen der porenbildenden Einheit, nämlich Kir6.1 und Kir6.2, als auch des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR1, SUR2A, SUR2B). Die unterschiedlichen Subtypen sind in verschiedenen Zelltypen zu finden. So ist z.B. Kir6.2 der dominante Subtyp für die meisten Gewebe.

Die bereits erwähnten Sulfonylharnstoffe blockieren den Kanal und führen so zur Depolarisation der Zelle. Diazoxid, aber auch Minoxidil, Nicorandil und Pinacidil

zählen zu den Kaliumkanalöffnern. Kaliumkanalöffner reduzieren die Hemmwirkung von ATP und führen dazu, dass sich der Kanal in Gegenwart physiologischer, zellulärer ATP-Konzentration öffnet. Kaliumkanalöffner führen außerdem dazu, dass das Ruhepotenzial in Richtung des Kaliumgleichgewichtspotenzials verschoben wird, woraus eine Hyperpolarisation der Zelle resultiert.

Nicht zuletzt aufgrund der unterschiedlichen K_{ATP} - und SUR-Subtypen unterscheiden sich Organe in ihrer Empfindlichkeit für bestimmte Kaliumkanalöffner und Sulfonylharnstoffe. So reagieren Gefäß- und Bronchialmuskulatur am empfindlichsten auf die klassischen Kanalöffner. Danach folgen die Herzmuskulatur, Skelettmuskulatur, Neuronen und letztendlich die β -Zellen des Pankreas. Bei der Empfindlichkeit der Sulfonylharnstoffe hingegen ist es anders, hier sind die β -Zellen deutlich empfindlicher als die Muskulatur und das Herz.

Die für die vorliegende Studie relevanten Wirkungen liegen in einer Hemmung der Insulinsekretion (Kanalöffner; Hyperpolarisation) gegenüber einer Stimulation der Insulinsekretion (Kanalblocker; Depolarisation). Eine weitere Eigenschaft der Kaliumkanalöffner ist die Senkung des Gefäßwiderstands, die in weiterer Folge zu einer Abnahme des arteriellen Blutdrucks führt. Dadurch kommt es zu Katecholaminausschüttung, Tachykardie, Natrium- und Wasserretention und einer Steigerung der Plasmareninaktivität [14].

2.6. DIAZOXID

Diazoxid ist ein Benzothiadiazin-Derivat (Abbildung L7) und wirkt als oraler Kaliumkanalöffner [15]. Diazoxid führt zur Hemmung der Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas und in weiterer Folge zu einer Erhöhung der Blutglukosekonzentration. Außerdem führt es zu einem Abfall des Blutdrucks und des peripheren Gefäßwiderstands, was wiederum zu einer erhöhten Herzfrequenz und einem erhöhtem Herzzeitvolumen führt.

Diazoxid kommt zu 90 % an Plasmaproteine gebunden vor, wodurch es zu einer längeren Plasmahalbwertszeit kommt, die 20-30 Stunden beträgt. Die Wirkungsdauer hingegen liegt nur bei 4-12 Stunden [14].

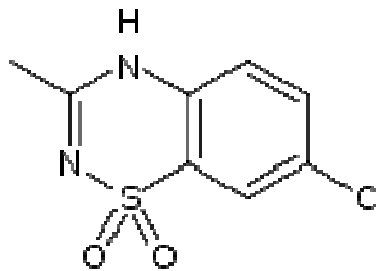


Abbildung L7: Strukturformel von Diazoxid [15]

2.7. α_2 -ADRENERGE REZEPTOREN

α_2 -adrenerge Rezeptoren oder auch α_2 -Adrenozeptoren, spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Blutglukosehomöostase und werden in 3 verschiedene Subtypen aufgeteilt, nämlich α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} -Adrenozeptoren. Alle 3 Subtypen sind Mitglieder der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). α_{2A} -Adrenozeptoren wurden im Gehirn und in den Neuronen gefunden und sind der vorherrschende Subtyp der Hemmung der Insulinsekretion [16]. Auch α_{2C} -Adrenozeptoren führen zu einer Hemmung der Insulinsekretion. Sie sind im Nebennierenmark der wichtigste Subtyp. Alle 3 Subtypen führen gleichermaßen zu einer Hemmung der Noradrenalinausschüttung aus den Nervenenden des sympathischen Nervensystems [17]. Adrenalin und Noradrenalin werden auch aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks sezerniert und erhöhen die Blutglukosekonzentration, durch die Hemmung der Insulinsekretion und durch die Erhöhung der Glukagonsekretion aus dem endokrinen Pankreas, sowie durch die Erhöhung der Glukoneogenese und der Glykogenolyse in der Leber. Die Effekte von Adrenalin und Noradrenalin werden unter anderem durch die α -Adrenozeptoren vermittelt [16].

Rosengren et al. beschäftigten sich mit einem Zusammenhang zwischen Adrenozeptoren des α_{2A} -Subtyps und Diabetes mellitus Typ 2. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der α_{2A} -Adrenozeptor eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Pathophysiologie des Typ 2 Diabetes spielen könnte. Ausgangspunkt dieser Schlussfolgerung waren in vitro- und in vivo- Studien an der Goto-Kakizaki (GK) Ratte, welche ein weit verbreitetes Modell für Typ 2 Diabetes darstellt. Zuerst wurden kongene Stämme der GK-Ratte gefunden, die eine gestörte Insulinsensitivität, eine gestörte Insulinsekretion, sowie verschiedene mit Typ 2 Diabetes assoziierte Spätkomplikationen aufwiesen. In der Folge wurde im Genom der GK-Ratten ein 1,4 Mb-Segment nachgewiesen, dass in Verbindung mit der verminderten Freisetzung von Insulin steht. Dieses Segment enthielt fünf bekannte Protein-codierende Gene. In Ratten, in deren isolierten Langerhans'schen Inseln die Insulinsekretion vermindert war, war die Expression von vier dieser Gene unverändert, während beim fünften Gen *Adra2a*, welches für den α_{2A} -Adrenozeptor codiert, sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene vermehrte Expression in den Inseln gefunden wurde [18].

In weiteren Untersuchungen wurde in den Ratten mit höherer Expression des α_{2A} -Adrenozeptors auch in vivo eine ausgeprägte Reduktion der Glukose-stimulierten Insulinsekretion verbunden mit einer gestörten Glukosetoleranz festgestellt [18].

In weiteren in vitro Experimenten konnte der α_2 -Adrenozeptorantagonist Yohimbin das Defizit in der glukose-stimulierten Insulinfreisetzung aus Inseln solcher Ratten aufheben. Zusammengefasst unterstützen diese Beobachtungen das Konzept, dass die gestörte Insulinsekretion dieser Tiere durch eine Überexpression des α_{2A} -Adrenozeptor-Subtyps verursacht wird [18].

Auf der Basis dieser Feststellungen an Versuchstieren wurden SNP-Analysen (SNP = Single Nucleotide Polymorphism) des menschlichen Gens *Adra2a* durchgeführt. In Analogie zu den Befunden an den GK-Ratten fanden sich hier SNPs, die zu vermehrter Expression des α_{2A} -Adrenozeptors führten und auch hier war diese erhöhte Expression mit verringerter Insulinsekretion und verminderten Insulingranula in den B-Zellen dieser Menschen verbunden. Es konnte sogar eine Assoziation mit dem Typ 2 Diabetes nachgewiesen werden [18]. Diese Ergebnisse suggerieren, dass zumindest bei einem

Teil der vom Typ 2 Diabetes betroffenen Patienten eine erhöhte Expression des α_{2A} -Adrenozeptors, die offenbar zu einer übermäßigen Hemmung der Insulinsekretion führt, eine kausale Rolle spielt.

2.8. UK 14,304

UK 14,304 (UK) ist ein synthetischer α_2 -Adrenozeptoragonist und ist nach systemischer Verabreichung *in vivo* auch zentral aktiv. UK 14,304 ist 5-Bromo-6-(2-Imidazolin-2-yl-Amino)-Quinoxalin (Abbildung L8) und führt, ebenso wie Diazoxid, zu einer Hemmung der Insulinsekretion aus dem Pankreas was offenkundig direkt über α_2 -Adrenorezeptoren, die von den insulinproduzierenden β -Zellen exprimiert werden, vermittelt wird [19, 20].

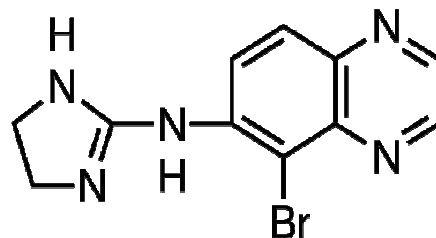


Abbildung L8: Strukturformel von UK 14,304 [21]

2.9. EFAROXAN

Efaroxan gehört zu den Imidazolinen und ist ein hochwirksamer α_2 -Adrenozeptorantagonist (Abbildung L9). Außerdem führt Efaroxan zu einer gesteigerten Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas.

Neben der α_2 -antagonistischen Wirkung verursacht Efaroxan ein Schließen der ATP-sensitiven K^+ -Kanäle der β -Zellen des Pankreas, wodurch eine Depolarisation der β -Zelle resultiert [22, 23, 24, 25, 26, 27].

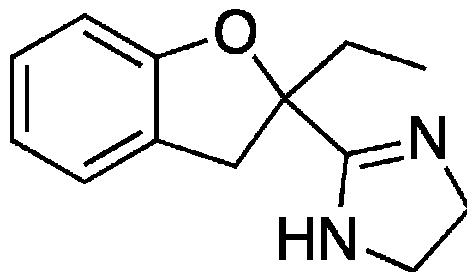


Abbildung L9: Strukturformel von Efaroxan [28]

Aus mehreren Studien wurde geschlossen, dass die Wirkung von α_2 -antagonistischen Imidazolinen wie Efaroxan auf die Insulinsekretion nicht aus der Interaktion mit α_2 -Adrenozeptoren resultiert, da nur bestimmte α_2 -Adrenozeptorantagonisten diesen Effekt hervorzurufen schienen [22, 23, 24, 26, 27]. Bei dem α_2 -Adrenozeptorantagonist Idazoxan beispielsweise konnte dieser Effekt nicht festgestellt werden [23, 29].

In einer Studie von Chan et al. wurde das racemische Efaroxangemisch in das (+) und (-)-Enantiomer aufgetrennt und gründlich untersucht. Sie untersuchten die Wirkung der beiden Enantiomere, sowie die Wirkungen von UK und Diazoxid auf inkubierte Rattenpankreasinseln und kamen zu folgenden Ergebnissen [19]:

Als die Inseln mit den gereinigten Enantiomeren in Anwesenheit von 6mM Glukose inkubiert wurden, war das (-)-Enantiomer deutlich potenter als das (+)-Enantiomer. Bereits bei einer Konzentration von 1 μ M des (-)-Enantiomers kam es zu einem

deutlichen Anstieg der Insulinsekretion, die bei einer Konzentration von 100 μM des (-)-Enantiomers immer noch stieg. Das (+)-Enantiomer führte selbst bei einer Konzentration von 100 μM zu keinem Anstieg [19].

Beim zweiten Versuch wurden die Inseln mit 20 mM Glukose und 1 μM UK inkubiert. UK ist ein α_2 -Agonist und führt zur Hemmung der Insulinsekretion. Das (+)-Enantiomer hob den hemmenden Effekt von UK bereits bei nanomolaren Konzentrationen komplett auf, während das (-)-Enantiomer nicht einmal bei 10 μM eine Wirkung zeigte [19].

Beim dritten Versuch wurden die Inseln mit 20 mM Glukose und 250 μM Diazoxid inkubiert [19]. In diesem Fall war das (-)-Enantiomer deutlich wirksamer als das (+)-Enantiomer. Während das (-)-Enantiomer bei einer Konzentration von 75 μM der Hemmung der Insulinsekretion deutlich entgegenwirkte, war das (+)-Enantiomer bei dieser Konzentration nahezu wirkungslos [19].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ohne einen pharmakologischen Hemmer der Insulinsekretion das (-)-Enantiomer wirksamer war als das (+)-Enantiomer.

In Anwesenheit von UK war das (+)-Enantiomer effektiver und beim Einsatz von Diazoxid zeigte das (-)-Enantiomer eine stärkere Wirkung [19].

Chan et al. zeigten außerdem, dass die Wirkung von Efaroxan offenbar auf zwei verschiedene Bindungsstellen zurückzuführen ist. Die eine Bindungsstelle ist für das (+)-Enantiomer relevant und stellt den α_2 -Adrenozeptor dar, während die andere Bindungsstelle das (-)-Enantiomer stärker bindet [19].

Auf Basis dieser Ergebnisse zogen die Autoren den Schluss, dass das (-)-Enantiomer von Efaroxan ein potentes und für eine Medikamententwicklung interessantes insulinotropes Molekül ist, das sowohl unter Standardbedingungen als auch unter Diazoxidexposition deutlich stärker wirkt als das (+)-Enantiomer. Eine Überlegenheit des (+)-Enantiomers wurde lediglich unter α_2 -adrenerger Stimulation beschrieben.

In einer weiteren Studie, von Mourtada et al., wurde ebenfalls die Wirkung der Efaroxan-Enantiomere auf die Insulinfreisetzung isolierter Langerhans'scher Inseln

untersucht. Hier konnte ein ähnliches Ergebnis wie in der Studie von Chan et al. festgestellt werden. Wie schon erwartet, kam man bei beiden Enantiomeren zu unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf die Stimulation der Insulinsekretion. Auch hier war das (-)-Enantiomer in einem Konzentrationsbereich von 10-50 μM deutlich effektiver als das (+)-Enantiomer [30].

2006 führten Taylor et al. ebenfalls eine Studie über die Wirkung von Efaroxan und seinen Enantiomeren durch. Sie untersuchten das monomere G-Protein Rhes (Ras Homologue Expressed in Striatum) das in den β -Zellen des Pankreas vorkommt und eventuell einen Einfluss auf die Insulinfreisetzung hat. Zuerst behandelten sie RINm5F-Zellen mit Efaroxanazemat. Bei einer Konzentration von 100 μM Efaroxan erreichte der Rhes mRNA-Gehalt seinen Maximalwert. Weiters wurden die Zellen auch mit den gereinigten Efaroxanenantiomeren behandelt. Es wurde festgestellt, dass die Behandlung mit 100 μM (-)-Efaroxan zu einem viel stärkeren Anstieg des Rhes mRNA-Gehalts führte, als mit 100 μM (+)-Efaroxan. Es wurden auch Ratteninseln mit 100 μM (-)-Efaroxan behandelt, wobei auch ein Anstieg des Rhes mRNA-Gehalts festgestellt werden konnte. Außerdem stellten die Autoren fest, dass die Induktion der Rhes-Expression von Calcium gesteuert wird und nicht direkt mit der Insulinfreisetzung assoziiert ist. Diese Ergebnisse bestätigten frühere Berichte, dass Rhes in den β -Zellen exprimiert und von Imidazolinen reguliert wird [31].

Hatlapatka et al. führten im Jahr 2009 Perifusionsversuche mit Mäuseinseln durch. Sie untersuchten die Wirkung von Nährstoffen und Nichtnährstoffen auf die Insulinsekretion in Kombination mit Efaroxan. Es kam heraus, dass Efaroxan die Stimulation der Insulinsekretion durch den Nährstoff Ketoisocapronsäure (KIC) verstärkt, jedoch die Insulinsekretion des Nicht-Nährstoffes KCl, der durch Depolarisation wirkt, nicht beeinflusste. Außerdem kam man zu dem Ergebnis, dass Efaroxan und RX871024, ein anderer α_2 -Antagonist, keine Wirkung auf die Insulinsekretion von Sulfonylharnstoff-Rezeptor (= SUR1) Knockout-Mäusen hatten. Hatlapatka et al. kamen also zu dem Ergebnis, dass die Wirkung von Efaroxan auf die

Insulinsekretion wohl durch die Effekte des K_{ATP} -Kanals zustande kommt, da SUR1 ein Bestandteil des K_{ATP} -Kanals ist [32].

In einer Studie von Berdeu et al. wurde die Wirkung von Imidazolinderivaten auf die Insulinsekretion anhand von Perfusionen isolierter Rattenpankreatata untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das Imidazolin Efaroxan und ein weiterer α_2 -Adrenozeptorantagonist eine stimulierende Wirkung auf die Insulinsekretion hatten. Idazoxan und Yohimbin, welche α_2 -Antagonisten sind, hatten keinen Einfluss auf die Insulinsekretion. Außerdem konnte festgestellt werden, dass alle getesteten Imidazoline eine Vasokonstriktion in den Blutgefäßen des Pankreas auslösten, im Gegensatz zu Yohimbin. Die Efaroxan-induzierte Insulinsekretion wurde durch eine Blockade der α_2 -Adrenozeptoren nicht beeinflusst, weshalb die Effekte von Efaroxan nicht auf eine Interaktion mit α -Adrenozeptoren zurückgeführt wurden [33].

Letztendlich wurde aus all den obigen Befunden der Schluss gezogen, dass Efaroxan-induzierte Insulinsekretion wohl nicht durch eine Blockade der α_2 - oder α_1 -Adrenozeptoren erklärt werden kann, sondern zumindest hauptsächlich durch einen anderen Mechanismus verursacht wird. Diesen anderen Mechanismus glaubte man in der Interaktion mit dem K_{ATP} -Kanal gefunden zu haben.

Fagerholm et al. führten im Jahr 2008 allerdings eine weitere in vivo-Studie durch, um herauszufinden, ob die Wirkung von Efaroxan auf einem Antagonismus des α_2 -Adrenozeptors der β -Zellen beruht, oder doch durch unabhängige Mechanismen, wie zum Beispiel über den K_{ATP} -Kanal, auftritt. Sie untersuchten die Wirkung von Efaroxan und eines nicht-Imidazolin α_2 -Adrenozeptorantagonisten auf die Blutglukose und die Plasmainsulinkonzentration. Dazu verwendeten sie α_2 -Adrenozeptor-Knockout-Mäuse (α_{2A} -KO), die mit Kontrollmäusen (wild type) verglichen wurden. Die Substanzen wurden ihnen sowohl im gefasteten, als auch im gefütterten Zustand verabreicht. Das Blut wurde anhand von Schwanzpunktion abgenommen. Fagerholm et al. kamen zu dem Ergebnis, dass Efaroxan ohne α_{2A} -Adrenozeptor keine Wirkung auf die

Insulinsekretion und Glukosesenkung in α_{2A} -KO-Mäusen zeigte. Dies widersprach der bis dahin bevorzugten Hypothese, dass Efaroxan unabhängig von α_2 -Adrenozeptor zu einer Erhöhung der Insulinsekretion und einer Senkung der Blutglukose führt [34].

In mehreren unterschiedlichen Studien kam man also zu der Feststellung, dass Efaroxan sowohl ein ausgezeichneter α_2 -Adrenozeptorantagonist ist, als auch fähig ist die insulinotrope Wirkung der Glukose durch die Blockade der ATP-sensitiven K^+ -Kanäle der β -Zellen des Pankreas zu verstärken. Wenn es auch Studien gibt, die in eine andere Richtung weisen [34], so wurde doch die längste Zeit hindurch angenommen, dass die antihyperglykämische und insulinotrope Wirkung von Efaroxan und anderen Imidazolinen nicht auf dem α_2 -Antagonismus beruht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. VERSUCHSTIERE

Für Experimente an isolierten Langerhans'schen Inseln wurden C57BL/6J-Mäuse der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) sowie der Abteilung für Labortierkunde und Labortiergenetik der Medizinischen Universität Wien (Himberg, Österreich) verwendet. Es wurden jeweils 4 Mäuse pro Käfig bei künstlichem 12/12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus und 22° C Raumtemperatur gehalten. Futter und Wasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung, da der Gallengang für die Gewebsentnahme gefüllt sein sollte, was bei gefasteten Tieren nicht der Fall ist.

Für orale Glukosetoleranztests und für Untersuchungen mit pharmakologisch induzierter Hyperglykämie wurden C57BL/6J-Mäuse der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) verwendet, die jeweils für 2 Wochen vor dem Versuch akklimatisiert wurden. 10 Stunden vor Versuchsbeginn wurden sie gewogen, mit verschiedenfarbigen Markern individuell gekennzeichnet, gematcht und nüchtern gesetzt, wobei ihnen Wasser weiterhin ad libitum zur Verfügung stand.

3.2. PERIFUSION

3.2.1. VERSUCHSPRINZIP DER PERIFUSION ISOLIERTER INSELN

Im Prinzip handelt es sich bei der Perifusion um die Umspülung isolierter Langerhans'scher Inseln von Mäusen mit Krebs-Ringer-Puffer und verschiedenen Substanzen in einem Perifusionszylinder. Die Langerhans'schen Inseln werden aus dem Pankreas isoliert, indem das Pankreas mit Collagenase angedaut wird. Das Perifusionsmedium wird nach der Umspülung der Inseln zu festgelegten Zeitpunkten gesammelt und das darin enthaltene Insulin mittels eines Radioimmunoassays gemessen.

3.2.2. REAGENZIEN

3.2.2.1. Krebs-Ringer-Puffer:

Als Medium für die Perifusion wurde ein Krebs-Ringer-Puffer verwendet, der sich aus 6 Stammlösungen zusammensetzt (Tabelle MM1).

Tabelle MM1: Herstellung von Krebs-Ringer-Puffer aus 6 Stammlösungen

Volumen, gesamt:	768 ml
<u>Lösung 1:</u> (154mM NaCl, pH=5,3): 18,0g NaCl (Merck 6404), A. bidest ad 2,0 l.	600 ml
<u>Lösung 2:</u> (154mM KCl, pH=5,8): 5,75g KCl (Merck 4936), A. bidest ad 500 ml.	24 ml
<u>Lösung 3:</u> (110mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, pH=5,7): 8,10g CaCl ₂ x 2H ₂ O (Merck 2382), A. bidest ad 500 ml.	18 ml
<u>Lösung 4:</u> (154mM KH ₂ PO ₄ , pH=4,6): 5,275g KH ₂ PO ₄ (Merck 4873), A. bidest ad 250 ml.	6 ml
<u>Lösung 5:</u> (154mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O, pH=6,0): 9,55g MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck 5886), A. bidest ad 250 ml.	6 ml
<u>Lösung 6:</u> (154mM NaHCO ₃): 13,0g NaHCO ₃ (Merck 6329), A. bidest ad 1,0 l.	102 ml
A. bidest	12 ml

Der Krebs-Ringer-Puffer wurde zuerst 20 Minuten mit 95 % CO₂ : 5 % O₂ begast. Dem begasten Krebs-Ringer-Puffer wurden eine Hepes NaOH-Lösung (siehe unten; 12 ml/768 ml Krebs-Ringer-Puffer) und Bovines Serum Albumin (0,2 % w/v, Fraktion V, Roche, Mannheim, Deutschland) zugesetzt. Diese Lösung wird in der Folge als „KRB“ bezeichnet.

3.2.2.2. Hepes NaOH-Lösung:

Es wurden 38,7 g HEPES (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in 125 ml A. bidest gelöst und anschließend 77 ml 1N NaOH zu der HEPES-Lösung hinzugegeben. Abschließend wurde die Lösung in Röhrchen zu je 12 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.2.2.3. Collagenaselösung:

Zum Andauen des Pankreas wurde Collagenaselösung verwendet. Die vorportionierte Collagenase (NB 8 Broad Range, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde aus dem Kühlschrank genommen, in KRB (1mg/ml) gelöst, verschlossen und bis zur Weiterverwendung bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2.4. 5 mM oder 7 mM Glukoselösung („Pickmedium“):

Um die isolierten Inseln händisch zu sammeln („picken“), wurde eine Glukoselösung benötigt, die in ihrer Zusammensetzung jenem Medium entsprach, das am Beginn des jeweiligen Experiments zur Perifusion verwendet wurde. Dazu wurden 43,2 mg (5 mM) bzw. 60,5 mg (7 mM) Glukose (D(+)-Glukose, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 48 ml KRB gelöst.

3.2.2.5. Substanzen:

- **Efaroxan (Efa):** Efa (Efaroxanhydrochlorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland bzw. gereinigte Enantiomere des Efa ((+)-Efa und (-)-Efa), bereitgestellt vom Chemielabor der Firma 55pharma Drug Discovery Development AG, Wien/Tulln), wurden in KRB gelöst. Das Razemat wurde in den Konzentrationen 25, 80, und 250 μM verwendet. (+)-Efa kam in den Konzentrationen 0,25, 2,5, 25, 100 und 250 μM und (-)-Efa kam in den Konzentrationen 25 und 250 μM zur Verwendung. Außerdem war bei Experimenten mit Efa und dessen Enantiomeren Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) dem Medium in einer Konzentration von 0,1 % (v/v) zugesetzt.
- **Diazoxid (Diaz):** Diaz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde in DMSO gelöst und kam in einer Konzentration von 250 μM zur Verwendung. Die DMSO-Konzentration im Perifusionsmedium war in Experimenten mit Diaz letztendlich 0,25 % (v/v).
- **UK 14,304 (UK):** UK (5-Bromo-6-(2-imidazolin-2-ylamino) quinoxaline, Tocris, Bristol, UK) wurde ebenfalls in DMSO gelöst, sodass bei den Experimenten eine DMSO-Konzentration von 0,1 % vorhanden war. Es wurde in einer Konzentration von 1 μM verwendet.

3.2.3. PERIFUSIONSMEDIEN

3.2.3.1. Equilibrationsmedium:

Das Medium für die Equilibrationsphase in Experimenten, in denen Efa als Razemat untersucht wurde, war KRB mit 5 mM Glukose (siehe 3.2.2.4.). Bei Experimenten, in denen Diaz oder UK zum Einsatz kam, wurde dem KRB 7 mM Glukose hinzugefügt (siehe 3.2.2.4.), sowie 250 μM Diaz oder 1 μM UK (Tabelle MM2).

3.2.3.2. Testmedium 1:

Testmedium 1 entsprach dem jeweiligen Medium der Equilibrationsphase (siehe 3.2.3.1.), wobei allerdings die jeweils angegebenen Konzentrationen von Efa zugesetzt waren (Tabelle MM2).

3.2.3.3. Testmedium 2:

Testmedium 2 entsprach dem Medium der Testphase 1 (siehe 3.2.3.2.), wobei allerdings eine höhere Glukosekonzentration von 10 mM (statt 5 mM) bzw. 20 mM (statt 7 mM) Glukose zugesetzt war (Tabelle MM2).

3.2.3.4. Testmedium 3:

Im Testmedium 3, das nur in einigen Experimenten zum Einsatz kam, befanden sich 10 mM Glukose, sonst entsprach es dem Testmedium 2.

Tabelle MM2: Zusammensetzung der Perifusionsmedien

	<u>Equ.</u> (0-60 min.)	<u>Test.1</u> (60-90 min.)	<u>Test.2</u> (90-120 min.)	<u>Test.3</u> (120-130 min.)
Protokoll 1: Efaroxan	5 mM Glukose	5 mM Glukose ± 25, 80 oder 250 µM Efa Razemat	10 mM Glukose ± 25, 80 oder 250 µM Efa Razemat	10 mM Glukose
Protokoll 2: Diazoxid	7 mM Glukose ± 250 µM Diaz	7 mM Glukose ± 250 µM Diaz ± 100 oder 250 µM (+)-Efa ± 100 oder 250 µM (-)-Efa	20 mM Glukose ± 250 µM Diaz ± 100 oder 250 µM (+)-Efa ± 100 oder 250 µM (-)-Efa	---
Protokoll 3: UK	7 mM Glukose ± 1 µM UK	7 mM Glukose ± 1 µM UK ± 0,25, 2,5 oder 25 µM (+)-Efa ± 25 oder 250 µM (-)-Efa	20 mM Glukose ± 1 µM UK ± 0,25, 2,5 oder 25 µM (+)-Efa ± 25 oder 250 µM (-)-Efa	---

Efa Razemat...razemisches Efaroxan

(+)/(-)-Efa...gereinigte Enantiomere von Efaroxan

Diaz...Diazoxid

UK...UK 14,304

Equ. ...Equilibrationsmedium

Test.1/2/3...Testmedium 1/2/3

3.2.4. PANKREASPRÄPARATION

Zuerst wurde die Maus mittels Inhalationsnarkotikum (Sevorane Abbott Wien, Österreich) in einem Glas betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurde die Maus auf eine Korkplatte fixiert, das Fell mit Ethanol beträufelt und abgewischt. Anschließend wurde das Fell der Maus am unteren Drittel des Abdomens eingeschnitten und mit beiden Händen geöffnet. Danach wurde die Maus so gedreht, dass der Schwanz in Richtung des Präparators zeigte. Die darunter liegende Haut wurde mit einem T-Schnitt geöffnet und die linke obere Seite des Rippenbogens eingeschnitten. Danach wurde die Maus so gedreht, dass der Kopf in Richtung des Präparators zeigte. Die Leber wurde in Richtung des Mauskopfes geklappt und der Darm nach links verschoben (Abbildung MM1).

Unter dem Mikroskop wurde die Einmündung des Gallengangs in den Darm (Papilla Vateri) abgeklemmt, damit die Collagenaselösung bei der Injektion nicht in den Darm, sondern in das Pankreas fließen konnte. Danach fuhr man mit einer spitzen Pinzette unter den Gallengang und schnitt am Darm-distalen Ende mit Hilfe einer Minischere ein kleines Loch in das Bindegewebe, sodass anschließend ein Faden durchgezogen werden konnte. Der Gallengang wurde mithilfe des Fadens gespannt und von überschüssigem Bindegewebe befreit. Anschließend fuhr man mit dem vorderen Ende einer abgerundeten Pinzette unter den Gallengang, sodass eine Art Unterlage geschaffen wurde. Schließlich wurden etwa 2 ml der Collagenaselösung über den Gallengang in das Pankreas gespritzt, sodass das Pankreas mit Flüssigkeit aufgeblasen wurde (Abbildung MM2).

Abschließend wurde das Pankreas aus der Maus herauspräpariert (Abbildung MM3) und bis zur weiteren Verarbeitung in Röhrchen auf Eis gegeben.

Für eine Perifusion wurden Inseln von mindestens 2 Mäuse verwendet.

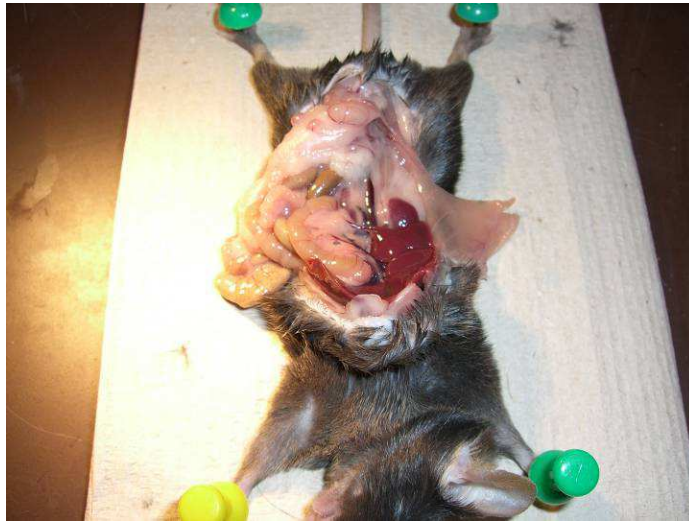


Abbildung MM1: Vorbereitung der toten Maus für die Pankreaspräparation



Abbildung MM2: Einspritzen der Collagenaselösung in den Gallengang

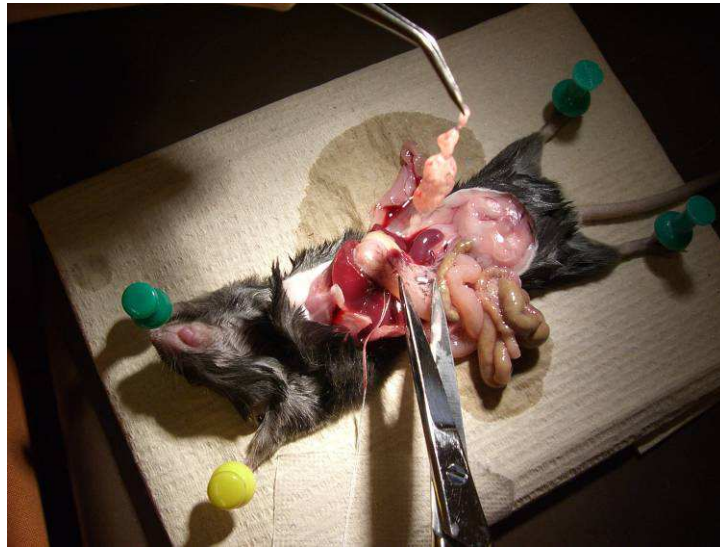


Abbildung MM3: Herauspräparieren des Pankreas

3.2.5. ISOLATION DER LANGERHANS`SCHEN INSELN

Zur Verdauung wurden die Röhren mit dem Pankreas für 13 Minuten in ein Wasserbad (37°C) gestellt, wodurch die injizierte Collagenase das exokrine Pankreasgewebe zersetzen konnte, und anschließend für 30 Sekunden gut geschüttelt, wodurch ein weiterer mechanische Gewebeerfall bewirkt wurde. Danach wurden die Röhren mit eiskaltem KRB aufgefüllt und auf Eis gestellt, um die Verdauung zu stoppen. Die Röhren wurden gut geschüttelt, um eine gute Durchmischung des Gewebes mit KRB zu bewirken und anschließend zentrifugiert (1150 rpm, 4°C, 15 Sekunden). Der Überstand wurde dekantiert und der Prozess wurde erneut durchgeführt, um die Collagenase aus dem Gewebe zu waschen. Der Überstand wurde wieder dekantiert und die Röhren wurden mit dem glukoseversetzten „Pickmedium“ aufgefüllt. Danach wurden die Röhren wieder gut geschüttelt und auf Eis gestellt.

3.2.6. „PICKEN“ DER INSELN

Das angedaute Pankreasgewebe wurde in eine geschwärzte Petrischale geleert. Unter dem Mikroskop wurden die Inseln (Abbildung MM4) mit einer 100 µl-Pipette herausgepickt (= gesammelt) und in einer weiteren Petrischale mit dem Pickmedium auf Eis gesammelt. Das Picken sollte möglichst sauber ablaufen, und es sollten keine anderen Gewebeteile mit gesammelt werden. Es wurden jeweils 50 Inseln pro Perifusionszylinder gesammelt.

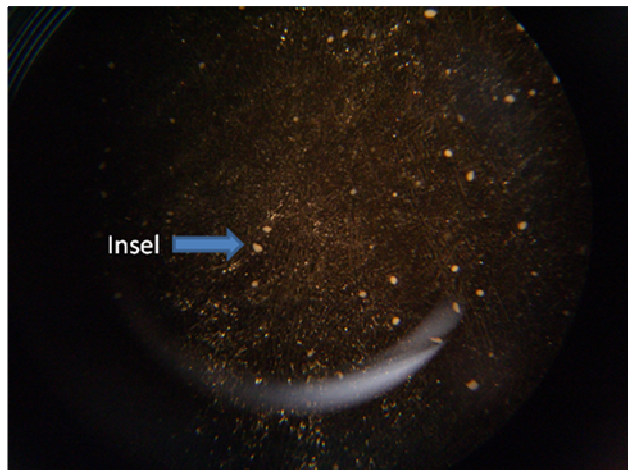


Abbildung MM4: In einer schwarzen Petrischale sieht man zwischen lysiertem exokrinen Pankreasgewebe intakte Langerhans'sche Inseln

3.2.7. BELADEN DER PERIFUSIONSZYLINDER

Meist wurden 4 Perifusionsexperimente parallel durchgeführt. Das Equilibrationsmedium wurde in 4 Spritzen aufgezogen und in den jeweiligen unteren Teil des Perifusionszylinders gefüllt. Anschließend wurde der obere Teil des Zylinders, der mit 2 Dichtungsringen und einem dazwischenliegenden Filterpapier bestückt war, mit dem unteren Teil verschlossen (Abbildung MM5) und luftblasenfrei mit Equilibrationsmedium aufgefüllt. Die Perifusionszylinder wurden mit jeweils 50 Inseln befüllt, indem man die Pipettenspitze mit den Inseln an den Zylinder steckte, die Pipette abnahm und die Inseln in den Perifusionszylinder sinken ließ, wo sie sich auf dem Filterpapier absetzten (Abbildung MM6). Danach wurden die Pipettenspitzen herausgenommen und unter dem Mikroskop überprüft, ob alle Inseln aus der Spitze in den Zylinder gerieselert waren. Anschließend wurde die Pumpe gestartet (1ml/min) und die Perifusionszylinder an den abführenden Schlauch angeschlossen. Die Perifusionszylinder wurden an die Innenwand eines Plastikbehälters im Wasserbad befestigt (Abbildung MM7). Der Plastikbehälter wurde abgedeckt, um ein 37°C warmes Klima zu gewährleisten. Anschließend konnte die Perifusion gestartet werden.

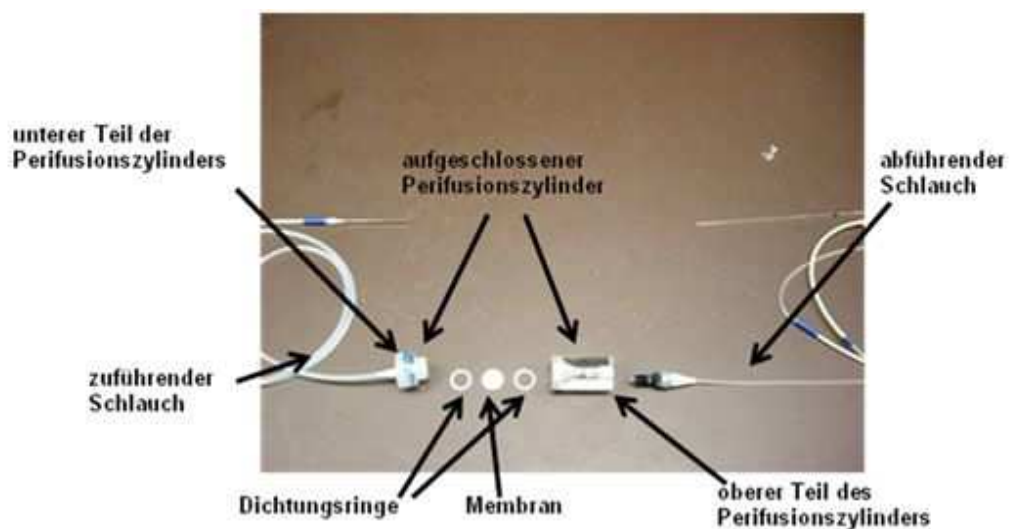


Abbildung MM5: Aufbau des Perifusionszylinders



Abbildung MM6: Beladen des Perifusionszylinders mit den Inseln

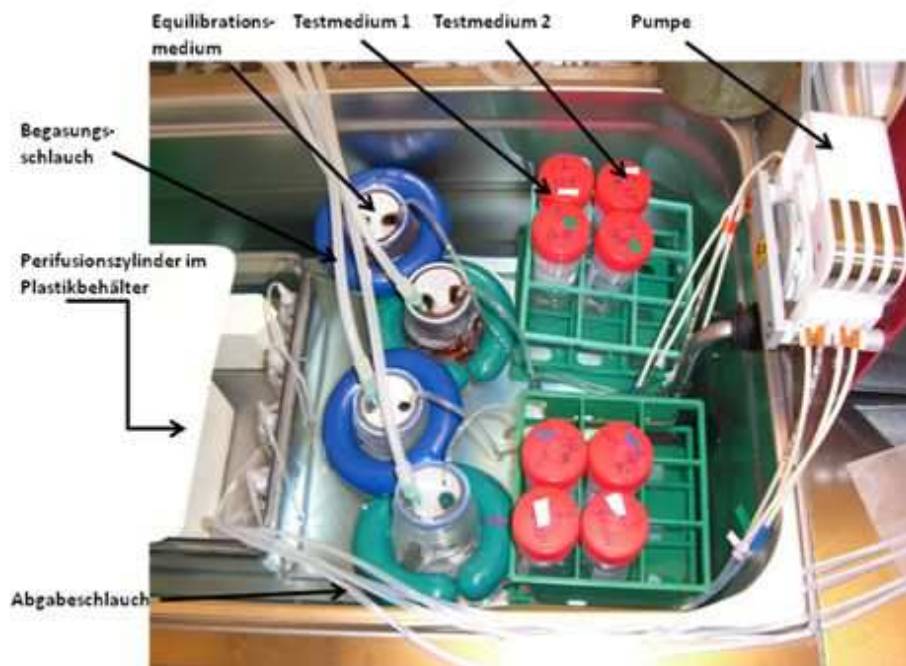


Abbildung MM7: Versuchsaufbau der Perifusion

3.2.8. TESTPHASE

Die ersten 60 Minuten wurden die Inseln vom Equilibrationsmedium umspült. Jeweils 17 Minuten vor dem Wechsel zu einem anderen Perifusionsmedium bei Minute 60, 90 und 120 wurde die Atmosphäre über den jeweiligen Medien in den Röhrchen nochmals mit 95 % CO₂ : 5 % O₂ begast. Gemessen wurde die Insulinkonzentration des Effluents, das über die Pumpe durch die Perifusionszylinder lief und in Eppendorf-Hütchen gesammelt wurde. Die Protokolle beinhalteten Messungen zu 17 bzw. 19 Zeitpunkten. Die Probenabnahme erfolgte nach einem bestimmten Zeitschema (Tabelle MM3). Die meisten Experimente endeten nach 120 Minuten Perifusion. Bei Experimenten mit racemischem Efaroxan gab es noch 2 weitere Messungen bei Minute 125 und 130. Die Proben wurden bis zur Insulinmessung in einem Tiefkühler bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle MM3: Zeitschema für das Sammeln von Effluent-Proben während der Perifusion

Probe	Minute	
1	40	Begasen von Testmedium 1
2	50	
3	57	Umstecken auf Testmedium 1
4	62,5	
5	65	
6	67,5	
7	70	Begasen von Testmedium 2
8	75	
9	80	
10	87	Umstecken auf Testmedium 2
11	92,5	
12	95	
13	97,5	
14	100	Begasen von Testmedium 3*
15	105	
16	110	
17	117	Umstecken auf Testmedium 3*
18*	125	
19*	130	

* nur bei Perifusionsexperimenten mit racemischem Efaroxan

3.2.9. INSULINMESSUNG

Die Messung des Insulins erfolgte mittels eines Radioimmunoassays (RIA; Sensitive Rat Insulin RIA Kit, Millipore Corporation, Billerica, U.S.A.). Beim RIA, der nach Angabe des Herstellers durchgeführt wurde, wird eine festgelegte Konzentration an radioaktiv markiertem Antigen an einen Antikörper gebunden. Dazu wurden jeweils 100 µl der Probe gegeben. Diese Probe enthielt eine unbekannte Konzentration an Insulin (= unmarkiertes Antigen). Sowohl das radioaktiv markierte Antigen, als auch das unmarkierte Antigen binden an den Antikörper, wodurch eine Konkurrenz um die Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen entsteht. Je mehr unmarkiertes Antigen vorhanden ist, desto weniger radioaktiv markiertes Antigen kann an den Antikörper binden. Durch einen zweiten Antikörper und eine abschließende Zentrifugation wurde das antikörpergebundene Antigen vom freien Antigen getrennt. Zuletzt wurde die Intensität der Strahlung der Antigen-Antikörperkomplexe in einem Gamma-Counter gemessen und in ng/ml Insulin in der Probe umgerechnet. Die Insulinsekretionsrate wird in pg/min/Insel angegeben und wie folgt berechnet:

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

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

Umrechnungsfaktor von ng auf pg = 1000

Inseln/Zylinder = 50

3.3. ORALER GLUKOSETOLERANZTEST (OGTT)

Am Versuchstag wurde zum Zeitpunkt $T_{-45 \text{ min}}$ die Schwanzspitze der Maus leicht angestochen und mit Hilfe des austretenden Bluttröpfchens anschließend mit einem Blutglukosemessgerät (One Touch Ultra Easy Lifescan Milpitas, USA) die Blutglukosekonzentration gemessen. Unmittelbar danach wurde Efaroxan oder Vehikel (0,5% CMC = Carboxymethylcellulose; 5 $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht Maus) oral per Schlundsonde (=Gavage) verabreicht.

Efaroxan sowie dessen gereinigte Enantiomere wurden im Vehikel gelöst. Efaroxan-Razemat kam in einer Dosis von 0,3 mg/kg zur Verwendung. (+)-Efaroxan und (-)-Efaroxan kamen beide jeweils in den Dosen 0,3 und 1 mg/kg zum Einsatz. (-)-Efaroxan wurde weiters in einer Dosis von 3 mg/kg verwendet (Tabelle MM4).

Zum Zeitpunkt $T_0 \text{ min}$ wurde abermals die Blutglukose gemessen, wobei hier kein Anstechen der Schwanzspitze mehr nötig war. Außerdem wurde eine Glukoselösung (3 g/kg; 6 $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht Maus) gavagiert.

Zu den Zeitpunkten $T_{30 \text{ min}}$, $T_{60 \text{ min}}$, $T_{90 \text{ min}}$, $T_{120 \text{ min}}$, $T_{150 \text{ min}}$ wurde die Blutglukose bestimmt, wobei bei allen Zeitpunkten von $T_{-45 \text{ min}}$ bis $T_{150 \text{ min}}$ eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, sodass zur Auswertung ein Mittelwert gebildet werden konnte.

Tabelle MM4: Im oralen Glukosetoleranztest verabreichte Dosen von Efaroxan

Versuch 1			
<u>Vehikel</u>	<u>Efa, Razemat</u>	<u>(+)-Efa</u>	<u>(-)-Efa</u>
CMC 0,5 %	0,3 mg/kg	0,3 mg/kg	0,3 mg/kg
Versuch 2			
<u>Vehikel</u>	<u>(-)-Efa</u>	<u>(-)-Efa</u>	<u>(+)-Efa</u>
CMC 0,5 %	3 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg

Efa...Efaroxan

(+)-Efa...das (+)-Enantiomer von Efaroxan

(-)-Efa...das (-)-Enantiomer von Efaroxan

Efa, Razemat...razemisches Efaroxan

3.4. PHARMAKOLOGISCH INDUZIERTE HYPERGLYKÄMIE

Neben den Glukosetoleranztests wurden auch Experimente durchgeführt, in denen eine Hyperglykämie nicht durch Fütterung von Glukoselösung, sondern durch Verabreichung von pharmakologischen Hemmern der Insulinsekretion induziert wurde.

Am Versuchstag wurde zum Zeitpunkt $T_{0 \text{ min}}$ die Schwanzspitze der Maus leicht angestochen und mit Hilfe des austretenden Bluttröpfchens anschließend mit einem Blutglukosemessgerät die Blutglukosekonzentration gemessen. Dann wurde die entsprechende Kombination eines Hemmers der Insulinsekretion mit einem gereinigten Efaroxanenantiomer verabreicht. Bei allen Versuchen wurden Efa und Diaz bzw. das Vehikel (0,5 % CMC; 5 $\mu\text{l/g}$) oral per Schlundsonde verabreicht. UK bzw. das entsprechende Vehikel (physiologische Kochsalzlösung mit 7 % DMSO; NaCl; 5 $\mu\text{l/g}$) wurden hingegen zum gleichen Zeitpunkt intraperitoneal verabreicht (Tabelle MM5).

Die Enantiomere von Efaroxan wurden in 0,5 % CMC gelöst und kamen als (+)-Efaroxan sowie als (-)-Efaroxan in den Dosierungen von 1 mg/kg zum Einsatz. (+)-Efaroxan wurde zusätzlich in einer Dosis von 0,01 mg/kg verwendet.

Diazoxid wurde in CMC gelöst und kam in der Dosis von 250 mg/kg zur Verwendung.

Die UK-Stammlösung (in DMSO) wurde in einer physiologischen Kochsalzlösung (NaCl) verdünnt und kam in den Dosierungen von 25 und 100 $\mu\text{g/kg}$ zum Einsatz. Die i.p. induzierte Lösung enthielt letztendlich eine DMSO-Konzentration von 7 %.

Zu den Zeitpunkten $T_{30 \text{ min}}$, $T_{60 \text{ min}}$, $T_{90 \text{ min}}$, $T_{120 \text{ min}}$, $T_{150 \text{ min}}$, $T_{180 \text{ min}}$ wurde die Blutglukose bestimmt, wobei bei allen Zeitpunkten von $T_{0 \text{ min}}$ bis $T_{180 \text{ min}}$ eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, sodass zur Auswertung ein Mittelwert gebildet werden konnte.

Tabelle MM5: Verabreichung und Dosierung von Substanzen in den Experimenten zur pharmakologisch induzierten Hyperglykämie

Versuch 1			
<u>Vehikel</u> CMC 0,5 % + NaCl	CMC 0,5 % + <u>UK</u> 25 µg/kg	<u>(+)-Efa</u> 1 mg/kg + <u>UK</u> 25 µg/kg	<u>(-)-Efa</u> 1 mg/kg) + <u>UK</u> 25 µg/kg
Versuch 2			
<u>Vehikel</u> CMC 0,5 %	<u>Diaz</u> 250 mg/kg	<u>Diaz</u> 250 mg/kg + <u>(+)-Efa</u> 1 mg/kg	<u>Diaz</u> 250 mg/kg + <u>(-)-Efa</u> 1 mg/kg
Versuch 3			
<u>Vehikel</u> CMC 0,5 % + NaCl	CMC 0,5 % + <u>UK</u> 100 µg/kg	<u>(+)-Efa</u> 1 mg/kg + <u>UK</u> 100 µg/kg	<u>(-)-Efa</u> 1 mg/kg + <u>UK</u> 100 µg/kg
Versuch 4			
<u>UK</u> 100 µg/kg + CMC 0,5 %	<u>UK</u> 100 µg/kg + <u>(+)-Efa</u> 0,01 mg/kg	<u>Diaz</u> 250 mg/kg	<u>Diaz</u> 250 mg/kg + <u>(+)-Efa</u> 0,01 mg/kg

NaCl...physiologische Kochsalzlösung mit 7 % DMSO

(+)(-)-Efa...gereinigte Enantiomere des Efaroxan

UK...UK 14,304

Diaz...Diazoxid

3.5. STATISTIK

Die Ergebnisse wurden mittels deskriptiver Statistik ausgewertet. Zum statistischen Vergleich der Mittelwerte wurde ein Students-t Test verwendet, der für heteroskedastische Datensätze adaptiert ist (Microsoft Excel). Die Ergebnisse werden in Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

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

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. WIRKUNG VON EFAROXAN IN VITRO

Im ersten Teil meiner Arbeit wurde sowohl die Wirkung von racemischem Efaroxan, als auch die Wirkung von gereinigten Efaroxanenantiomeren auf die Insulinsekretion perifundierter Mäuseinseln untersucht. Unter Standardbedingungen wie auch in Anwesenheit der Insulinsekretionshemmer Diazoxid oder UK wurden Effekte auf die basale Sekretion und auf die Antwort auf einen Glukosestimulus dargestellt.

4.1.1. WIRKUNG EFAROXAN UNTER STANDARDBEDINGUNGEN

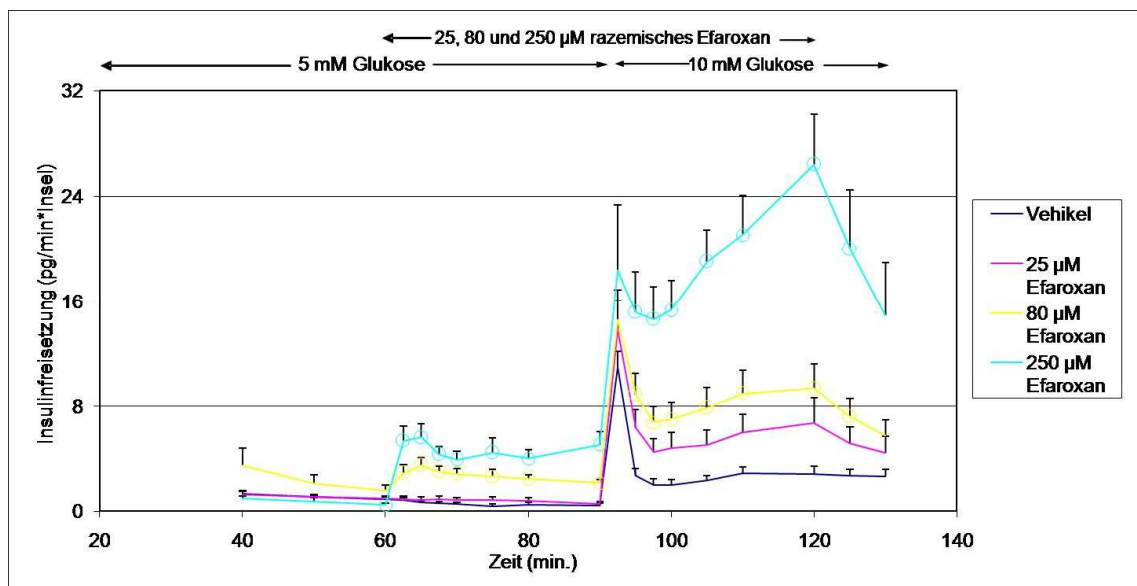


Abbildung ED1: Einfluss von 25, 80 und 250 µM Efaroxan auf die Insulinfreisetzung perifundierter Langerhans'scher Inseln von Mäusen

Mittelwert \pm SEM, n jeweils ≥ 4 , $^{\circ}$ p < 0,05 gegen Vehikel

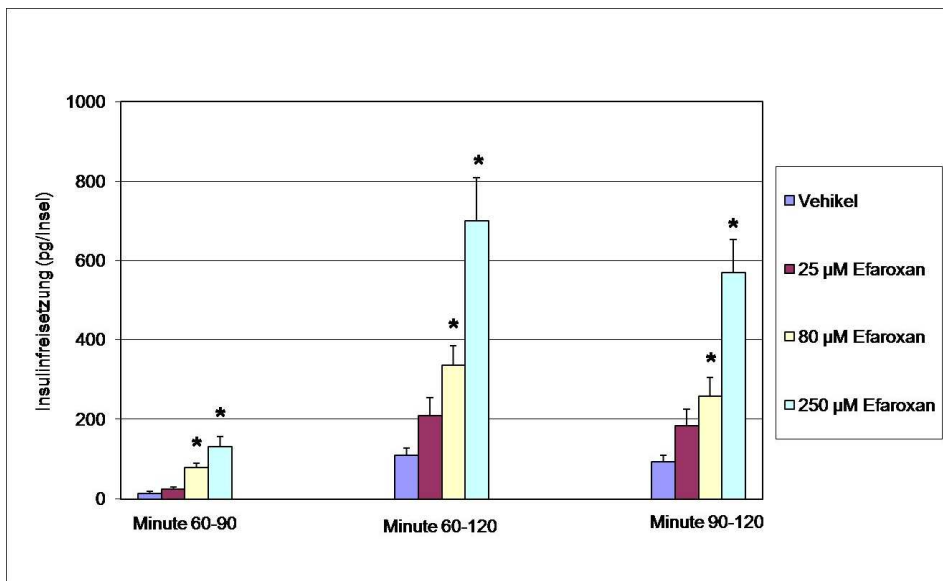


Abbildung ED2: Einfluss von 25, 80 und 250 µM Efaroxan auf die Insulinsekretion perifundierter Langerhans'scher Inseln von Mäusen

Mittelwert ± SEM, n jeweils ≥ 4, * p < 0,05 gegen Vehikel

In den ersten 60 Minuten, also während der Equilibrationsphase, lag eine Glukosekonzentration von 5 mM vor. Ab der 60. Minute wurde dem Perifusionsmedium, bei gleich bleibender Glukosekonzentration, 25, 80 oder 250 µM Efaroxan zugesetzt. Ab Minute 62,5 bewirkten 80 und 250 µM Efaroxanrazemat im Vergleich zum Vehikel einen signifikanten Anstieg der Insulinfreisetzungsrates (Abbildung ED1). In den nächsten 30 Minuten blieb die Sekretionsrate jeweils etwa auf dem bei 62,5 Minuten gemessenen Niveau. Erst nach Minute 90 und einem Anheben der Glukosekonzentration von 5 auf 10 mM kam es zu einem deutlichen weiteren Anstieg der Insulinsekretionsrate. Die Sekretionsantwort auf den Glukosestimulus wurde von Efaroxan dosisabhängig verstärkt, wobei die erste Sekretionsspitze (92,5 Minuten; wird auch als „erste Phase der Sekretionsantwort“ bezeichnet) noch keine signifikanten Unterschiede zeigte. In der nachfolgenden zweiten Phase der Sekretionsantwort war wiederum ein sehr deutlicher, dosisabhängiger Effekt von Efaroxan zu erkennen. Ab der 95. Minute bis hin zu Minute 130 blieb die Freisetzungsrates unter dem Vehikel auf einem sehr stabilen Plateau. Bei 25 und 80 µM Efaroxan kam es von der 95. bis zur 120. Minute zu einem leichten Anstieg der

Insulinfreisetzungsrates, bei 250 μM Efaroxan fiel dieser Anstieg sehr deutlich aus. Ab Minute 120 wurde kein Efaroxan mehr zugesetzt, wodurch die Insulinsekretionsrate rasch abfiel. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass racemisches Efaroxan in jedem Fall die Insulinsekretion fördert. Je höher die Konzentrationen, desto höher liegt die Insulinfreisetzungsrates.

In Abbildung ED2 sind diese Ergebnisse nochmals als Flächen unter der Kurve zusammengefasst. Diese zeigen freilich, dass es in Minute 90 bis 120, also unter erhöhter Glukose, zu einer vielfach höheren Insulinsekretion kam als in Minute 60 bis 90. Außerdem zeigen sie sehr klar, dass Efaroxan die Insulinfreisetzung dosisabhängig erhöht und dass dies sowohl bei niedriger als auch bei stark stimulierender Glukosekonzentration der Fall ist.

4.1.2. WIRKUNG VON (+) -UND (-)-EFAROXAN UNTER DIAZOXID

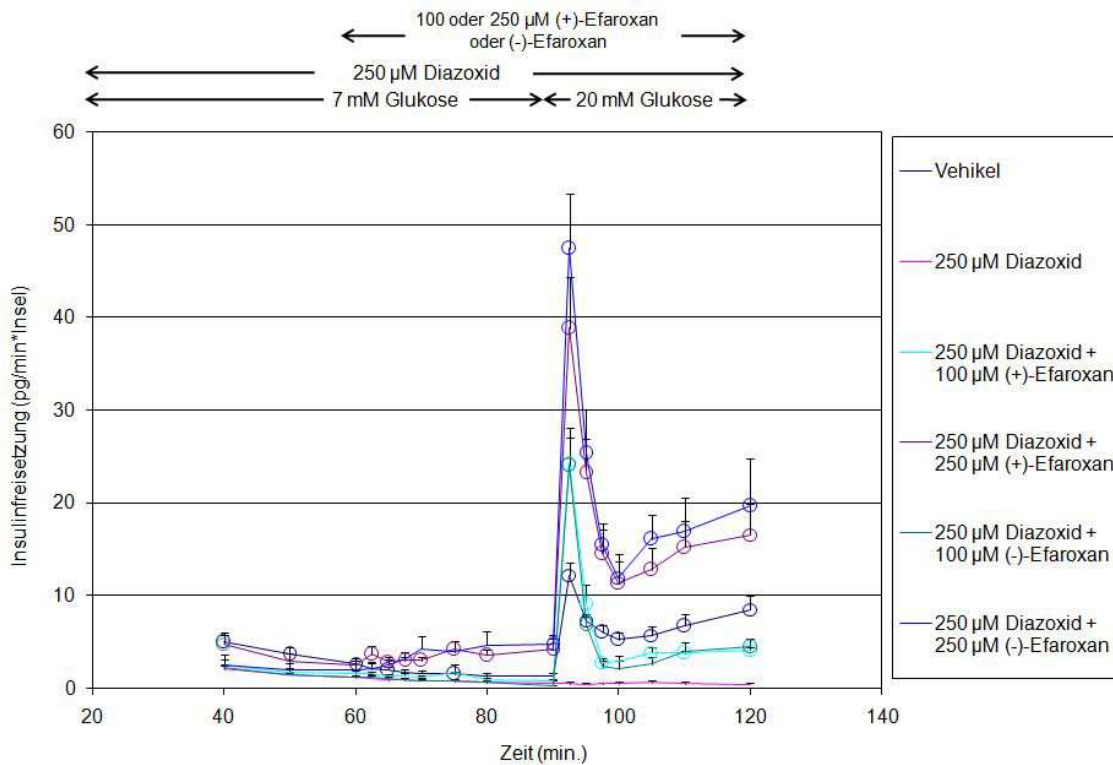


Abbildung ED3: Einfluss von 100 und 250 µM (+)-Efaroxan und (-)-Efaroxan auf die Insulinsekretion perifundierter Diazoxid-exponierter (250 µM) Langerhans'scher Inseln von Mäusen

Mittelwert ± SEM, n jeweils ≥ 3, ° p < 0,05 gegen Diazoxid

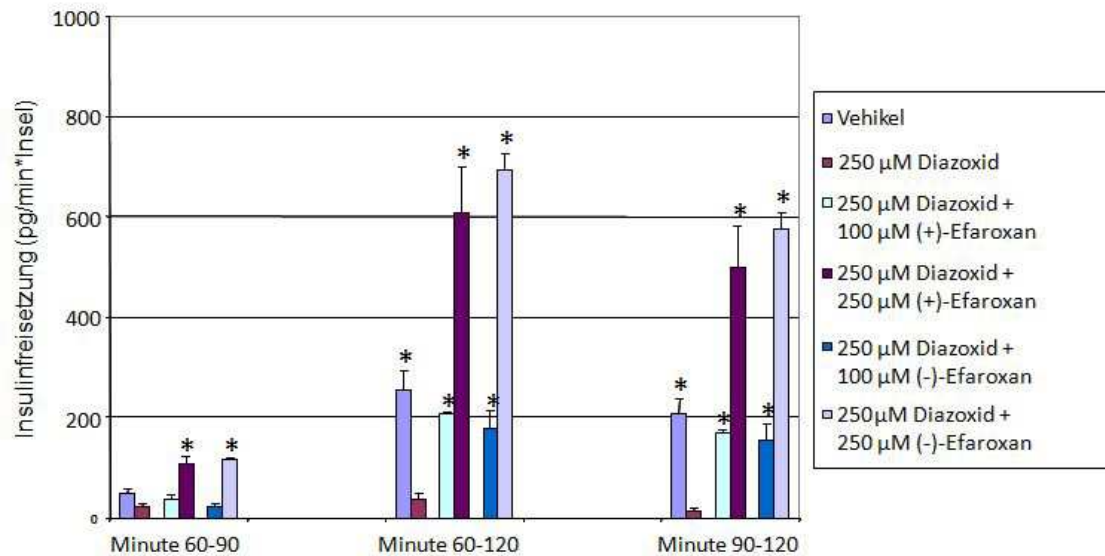


Abbildung ED4: Einfluss von 100 und 250 µM (+)-Efaroxan und (-)-Efaroxan auf die Insulinsekretion perifundierter Diazoxid-exponierter (250 µM) Langerhans'scher Inseln von Mäusen

Mittelwert ± SEM, n jeweils ≥ 3, * p < 0,05 gegen Diazoxid

Während der ersten 60 Minuten wurden die Inseln mit einer Glukosekonzentration von 7 mM und mit 250 µM Diazoxid umspült. Danach wurde dem Perifusionsmedium 100 µM oder 250 µM (+)-Efaroxan oder (-)-Efaroxan zugesetzt, wobei an der Glukosekonzentration und an der Diazoxidkonzentration nichts verändert wurde. Selbst als bei Minute 90 die Glukosekonzentration von 7 mM auf 20 mM angehoben wurde, kam es unter Diazoxid, einem Hemmer der Insulinsekretion, zu keinem Anstieg der Insulinfreisetzungsrates (Abbildung ED3). Alle getesteten Konzentrationen von Efaroxanenantiomeren wirkten dieser Hemmung aber sehr stark entgegen. Die unter 100 µM (+)-Efaroxan erhobenen Kurven waren jenen unter Kontrollbedingungen (d.h. ohne Diazoxid und ohne Efaroxan) sehr ähnlich. Die Freisetzungsrates unter 250 µM der Enantiomere waren noch deutlicher und gingen somit über die Aufhebung der Diazoxid-induzierten Hemmung hinaus. Die Kurvenform mit schnellem hohem Peak und einer nachfolgenden Plateauphase entsprach unter allen Bedingungen dem

typischen Muster. Für die vorliegende Studie besonders wichtig ist die Feststellung, dass die Wirkungen der beiden Enantiomere in keiner Weise unterschiedlich waren.

Dieses wichtige Ergebnis wird auch bei der Betrachtung der kumulativ freigesetzten Insulinmengen deutlich (Abbildung ED4).

4.1.3. WIRKUNG VON (+)-UND (-)-EFAROXAN UNTER UK

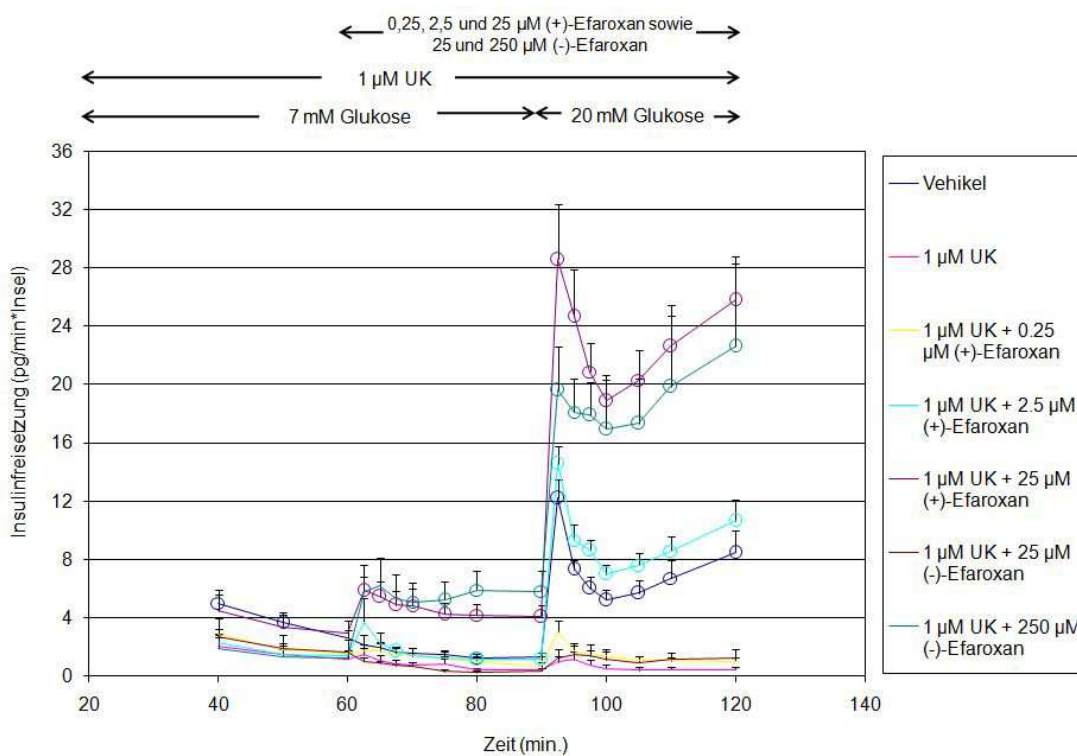


Abbildung ED5: Einfluss von 0,25, 2,5 und 25 μ M (+)-Efaroxan und 25 und 250 μ M (-) Efaroxan auf die Insulinsekretion perifundierter UK-exponierter (1 μ M) Langerhans'scher Inseln von Mäusen

Mittelwert \pm SEM, n jeweils \geq 3, $^{\circ}$ p < 0,05 gegen UK

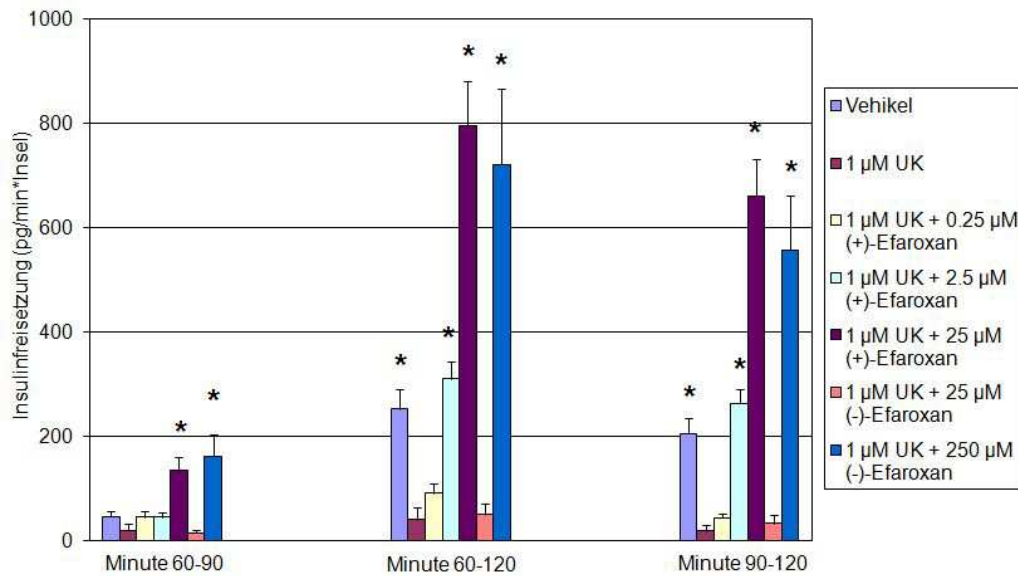


Abbildung ED6: Einfluss von 0,25, 2,5 und 25 µM (+)-Efaroxan und 25 und 250 µM (-) Efaroxan auf die Insulinsekretion perifundierter UK-exponierter (1 µM) Langerhans'scher Inseln von Mäusen

Mittelwert ± SEM, n jeweils ≥ 3, * p < 0,05 gegen UK

Ab der 60. Minute wurde dem Perifusionsmedium, das 7 mM Glukose und 1 µM UK enthielt, 0,25, 2,5 und 25 µM (+)-Efaroxan oder 25 und 250 µM (-)-Efaroxan zugesetzt. Während es unter allen anderen Bedingungen zu keiner Veränderung kam, stieg die Insulinfreisetzungsrates unter 25 µM (+)-Efaroxan und 250 µM (-)-Efaroxan an und blieb von Minute 62,5 bis zu Minute 90 auf einem annähernd konstanten Plateau (Abbildung ED5). Als bei der 90. Minute die Glukosekonzentration auf 20 mM erhöht wurde, blieb die Insulinsekretion durch 1 µM UK fast unverändert unterdrückt. 0,25 µM (+)-Efaroxan und 25 µM (-)-Efaroxan konnten dieser Hemmung kaum entgegenwirken. 2,5 µM (+)-Efaroxan hob die hemmende Wirkung von 1 µM UK in etwa auf, die Kurve war der Sekretionsdynamik unter Basalbedingungen (Vehikel) sehr ähnlich. 250 µM (-)-Efaroxan hatte eine ähnliche Wirkung wie unter Basalbedingungen und unter Diazoxid, die Insulinsekretionsrate war sehr stark erhöht. Die größte Wirkung zeigte unter Hemmung mit 1 µM UK allerdings (+)-Efaroxan, das bei 2,5 µM sogar eine noch

höhere Sekretionsrate bewirkte als 25 μM (-)-Efaroxan, obwohl ein 10-facher Unterschied in den Konzentrationen bestand.

Zusammenfassend konnte hier also gezeigt werden, dass UK wie Diazoxid als starker Hemmer der Insulinfreisetzung wirkt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass (+)-Efaroxan schon in kleinen Konzentrationen der UK-induzierten Hemmung der Insulinfreisetzung entgegenwirkte. (-)-Efaroxan hatte eine vergleichbare Wirkung nur bei mehr als 10-fach höheren Konzentrationen.

Die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse als Flächen unter der Kurve (Abbildung ED6) verdeutlicht eindrucksvoll, dass die Potenz von (+)-Efaroxan der UK-induzierten Hemmung entgegenzuwirken, um ein vielfaches größer ist als jene des (-)-Efaroxan. Dieses Muster steht im deutlichen Gegensatz zu den sehr ähnlichen Wirkungen der beiden Enantiomere unter Diazoxid-induzierter Hemmung (Abbildung ED4).

4.2. DISKUSSION IN VITRO

Chan et al. veröffentlichten 1990 eine Studie, in der sie vergleichende Versuche mit Idazoxan an isolierten Rattenpankreasinseln durchführten, um festzustellen, ob die insulinotrope Wirkung von Efaroxan auf einem α_2 -Adrenozeptor-Antagonismus beruht. Wenn dies der Fall wäre, so folgerten die Autoren, müsste Idazoxan, das ebenfalls ein wirkungstarker α_2 -Adrenozeptor-Antagonist ist, dieselbe Wirkung wie Efaroxan zeigen. Da Idazoxan jedoch keine Wirkung zeigte, schlossen die Autoren, dass Efaroxan über einen Adrenozeptor-unabhängigen Mechanismus wirken muss. Sie fanden heraus, dass die Wirkung von Efaroxan in diesen Experimenten offenbar einer Interaktion mit den K_{ATP} -Kanälen der β -Zellen des Pankreas zuzuschreiben ist [22].

In einer weiteren Studie von 1993 untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe vergleichend die Wirkung von (+)- und (-)-Efaroxan auf die Insulinsekretion von inkubierten

Rattenpankreasinseln [19], die in einigen Experimenten zugleich mit UK oder Diazoxid behandelt wurden. Es handelte sich also um Protokolle, die jenen der Experimente dieser Diplomarbeit sehr ähnlich waren. Unterschiede und Ähnlichkeiten der Ergebnisse sollen daher nun genau diskutiert werden.

Im ersten Versuch untersuchten Chan et al. die Wirkungen der beiden gereinigten Efaroxanenantiomere auf isolierte Inseln, die in einem herkömmlichen Inkubationspuffer mit einer Glukosekonzentration von 6 mM inkubiert wurden. Beide Enantiomere zeigten grundsätzlich eine dosisabhängige insulinotrope Wirkung. Bezüglich der Potenz wurde aber eine deutliche Überlegenheit des (-)-Efaroxans beschrieben, das bereits bei einer Konzentration von 1 μM zu einer Steigerung der Insulinsekretion führte. Bis zu einer Konzentration von 100 μM (-)-Efaroxan stieg die Insulinsekretion immer deutlicher an, wohingegen (+)-Efaroxan bis 10 μM völlig ohne Wirkung blieb und bei 100 μM nur einen sehr moderaten Anstieg der Insulinsekretion induzierte [19].

Dies widerspricht den Ergebnissen einer anderen Diplomarbeit, dessen Verfasser zu dem Ergebnis kam, dass beide Efaroxanenantiomere in vitro ähnlich stark wirkten [35].

Im zweiten Versuch inkubierten Chan et al. die Inseln mit 20 mM Glukose und 1 μM des α_2 -Agonisten UK. Hier wirkte (+)-Efaroxan dem hemmenden Effekt von UK deutlich entgegen. Schon bei einer Konzentration von nur 1 μM (+)-Efaroxan war eine Wirkung zu erkennen und der Effekt nahm mit steigender Konzentration deutlich zu. (-)-Efaroxan, hingegen zeigte selbst bei 10 μM nur vergleichsweise marginale Wirkung [19].

Diese Feststellung wird durch die Ergebnisse vergleichbarer Experimente der vorliegenden Diplomarbeit bestätigt, da auch hier (+)-Efaroxan, nicht aber (-)-Efaroxan, schon in kleinen Konzentrationen der Hemmung der Insulinfreisetzung durch UK

entgegen wirkte. Diese besondere Fähigkeit, die Wirkung eines α_2 -Rezeptoragonisten aufzuheben, lässt vermuten, dass der zugrunde liegende Mechanismus ein vorwiegend vom (+)-Enantiomer getragener α_{2A} -Antagonismus ist. Die Schlussfolgerung der oben erwähnten Vergleichsstudie zwischen Efaroxan und Idazoxan von Chan et al. [22], dass Efaroxan über einen Adrenozeptor-unabhängigen Mechanismus wirkt, würde damit nur unter bestimmten Versuchsbedingungen, nicht aber für UK-exponierte Inseln gelten.

Im dritten Versuch inkubierten Chan et al. die Inseln mit 20 mM Glukose und 250 μ M Diazoxid, einem Öffner der K_{ATP} -Kanäle. Wie schon im oben zitierten Experiment ohne Hemmer der Insulinsekretion zeigte (-)-Efaroxan auch unter Diazoxid in den Experimenten dieser Forschergruppe eine deutlich stärkere Wirkung als (+)-Efaroxan. (-)-Efaroxan hob bei einer Konzentration von 75 μ M komplett die Hemmung der Insulinsekretion durch Diazoxid auf, wohingegen (+)-Efaroxan in dieser Konzentration einen vergleichsweise marginalen Effekt hatte [19].

Insgesamt stellten Chan et al. also fest, dass sowohl in Abwesenheit eines pharmakologischen Hemmers als auch unter Diazoxidexposition (-)-Efaroxan als Stimulator der Insulinsekretion aus isolierten Langerhans'schen Inseln viel wirksamer war als (+)-Efaroxan. Bei Inkubation in Anwesenheit von UK war allerdings (+)-Efaroxan viel potenter [19]. Chan et al. schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die Wirkung von Efaroxan wohl auf zwei verschiedene Bindungsstellen bzw. Mechanismen zurückzuführen ist. Ein Mechanismus wäre demgemäß ein Antagonismus am α_{2A} -Adrenozeptor, der vor allem von (+)-Efaroxan angesprochen wird, über den zweiten Mechanismus wäre (-)-Efaroxan viel wirkungsstärker [19]. Vieles sprach und spricht dafür, dass diesem zweiten Mechanismus ein Schließen der K_{ATP} -Kanäle zugrunde liegt.

Während die Ergebnisse der vorliegenden Diplomarbeit die Überlegenheit des (+)-Enantiomers unter UK bestätigen, ergab sich bei einer vergleichbaren Versuchsanordnung unter Diazoxidexposition ein ganz anderer Befund als in der Studie

von Chan et al. [19]. In den Experimenten dieser Diplomarbeit konnte unter Diazoxid nämlich kein Unterschied zwischen den Wirkungen von (+)- und (-)-Efaroxan festgestellt werden. Gleich wie die Gruppe Chan et al. trat in meinen Untersuchungen allerdings auch für das (-)-Enantiomer die Wirkung unter Diazoxid nur bei mikromolaren Konzentrationen auf, während die Effekte von (+)-Efaroxan an UK-behandelten Inseln im nanomolaren Konzentrationsbereich festgestellt wurden. Das von mir beschriebene Wirkmuster an isolierten Nagerinseln - enantio-unspezifische Wirkung unter Diazoxid und überlegene Potenz des (+)-Enantiomers unter einem α_2 -Agonisten – wurde bemerkenswerter Weise auch für eine andere Imidazolinverbindung beschrieben [36].

Obwohl wir ein etwas anderes Wirkmuster fanden als die Gruppe Chan et al., konnten wir also grundsätzlich bestätigen, dass Efaroxan in vitro offenbar über zwei unterschiedliche Mechanismen die Insulinsekretion steigern kann (mutmaßlich α_2 -Antagonismus und Schließen der K_{ATP} -Kanäle). Daraus ergibt sich die wesentliche Frage, welcher dieser beiden Mechanismen wie weit für die bekannte insulintropen und blutglukosesenkenden Wirkung von Efaroxan in vivo verantwortlich ist. Nach unseren in vitro-Experimenten folgten daher die für uns noch interessanteren in vivo-Versuche.

4.3. WIRKUNG VON EFAROXAN IN VIVO

Im zweiten Teil meiner Arbeit wurde die Wirkung sowohl von racemischem Efaroxan als auch seiner gereinigten Enantiomere in vivo getestet. Um die Pharmakologie in vivo in Bezug zu den in vitro erhobenen Daten zu stellen, wurden die Wirkungen nicht nur in Glukosetoleranztests untersucht, sondern auch bei Hyperglykämien, die durch Injektion von Diazoxid oder UK verursacht wurden.

4.3.1. ORALE GLUKOSETOLERANZTESTS

4.3.1.1. RAZEMAT VS. GEREINIGTE ENANTIOMERE

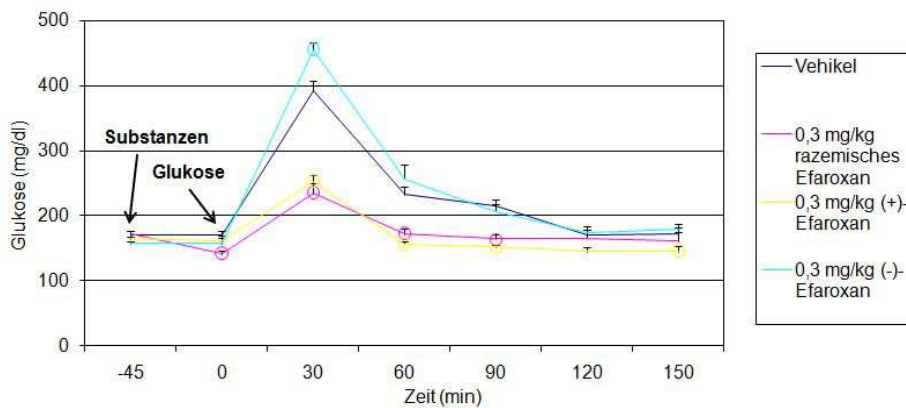


Abbildung ED7: Einfluss von 0,3 mg/kg racemischem Efaroxan, (+) –und (-)-Efaroxan auf die orale Glukosetoleranz (3g/kg) von Mäusen

Mittelwert \pm SEM, n = jeweils 8, ° p < 0,05 gegen Vehikel

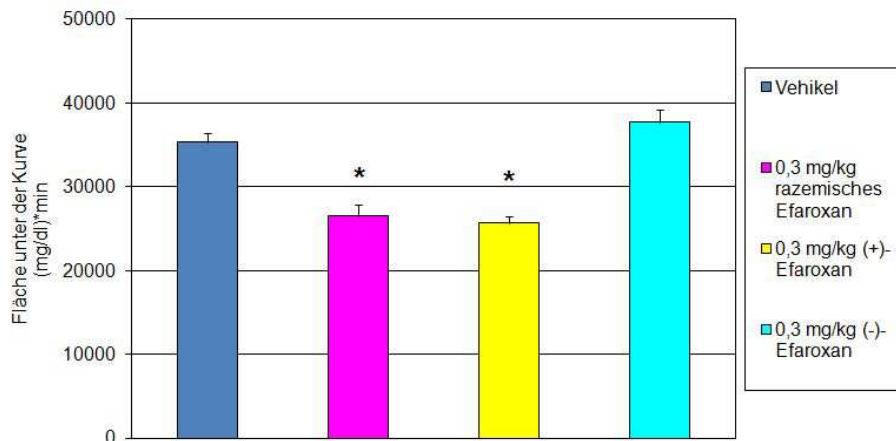


Abbildung ED8: Einfluss von 0,3 mg/kg racemischem Efaroxan, (+) –und (-)-Efaroxan auf die totale Fläche unter der Glukosekurve im oralen Glukosetoleranztest von Mäusen

Mittelwert \pm SEM, n = jeweils 8, * p < 0,05 gegen Vehikel

Zum Zeitpunkt $T_{-45 \text{ min}}$ wurden 0,3 mg/kg racemisches Efaroxan, (+) –oder (-)-Efaroxan verabreicht, bei $T_{0 \text{ min}}$ folgte die Verabreichung von Glukoselösung. Bei $T_{30 \text{ min}}$ erreichte die Blutglukose ihren Maximalwert, wobei racemisches Efaroxan und (+)-Efaroxan im Gegensatz zum Vehikel zu einem deutlich niedrigeren Anstieg der Blutglukosekonzentration führten (Abbildung ED7). Die Blutglukose des racemischen sowie des (+)-Efaroxans fiel nach dem Spitzenwert bei $T_{30 \text{ min}}$ bis zu $T_{60 \text{ min}}$ ab und war am Ende des Experiments ähnlich wie der Anfangswert. (-)-Efaroxan zeigte keinen Einfluss auf die Glukosekonzentration im Blut. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass racemisches Efaroxan und (+)-Efaroxan eine deutlich bessere Wirkung auf die Glukosekonzentration im Blut hatten, als (-)-Efaroxan.

Auch die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse als Flächen unter der Glukosekurve (Abbildung ED8) verdeutlicht, dass racemisches Efaroxan sowie (+)-Efaroxan besser wirkten als (-)-Efaroxan. Die Fläche unter der Glukosekurve des racemischen Efaroxans und des (+)-Efaroxans war im Vergleich zum Vehikel signifikant kleiner, wobei (+)-Efaroxan sogar noch etwas stärker wirkte als das

Razemat. (-)-Efaroxan zeigte im Vergleich zum Vehikel keinen signifikanten Unterschied bei den Flächen unter der Glukosekurve.

4.3.1.2. (+)-EFAROXAN VS. (-)-EFAROXAN

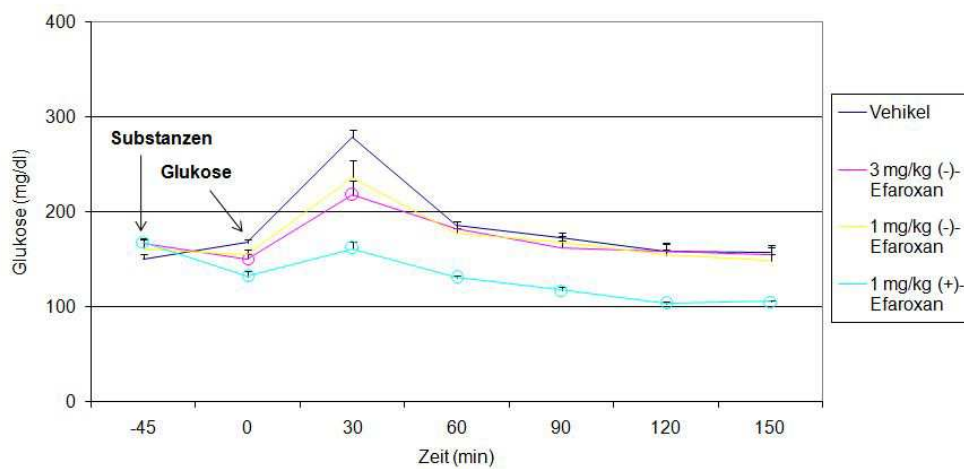


Abbildung ED9: Einfluss von 3 und 1 mg/kg (-)-Efaroxan, sowie 1 mg/kg (+)-Efaroxan auf die orale Glukosetoleranz (3g/kg) von Mäusen

Mittelwert \pm SEM, n jeweils ≥ 8 , $^{\circ}$ $p < 0,05$ gegen Vehikel

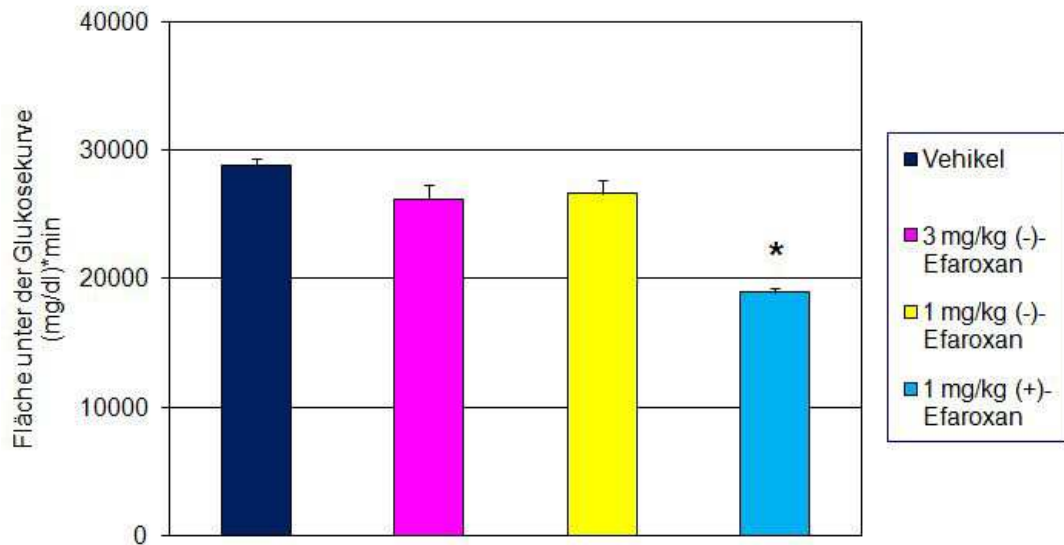


Abbildung ED10: Einfluss von 3 und 1 mg/kg (-)-Efaroxan, sowie 1 mg/kg (+)-Efaroxan auf die Fläche unter der Glukosekurve im oralen Glukosetoleranztest von Mäusen

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

Nachdem zum Zeitpunkt $T_{-45 \text{ min}}$ die Substanzen verabreicht wurden, kam es zum Zeitpunkt $T_{0 \text{ min}}$ sowohl bei 3 mg/kg (-)-Efaroxan als auch bei 1 mg/kg (+)-Efaroxan zu einem Abfall der Glukosekonzentration im Blut. Beim höchsten Wert der Blutglukose, nämlich bei $T_{30 \text{ min}}$, kam es zu einem signifikant kleineren Anstieg der Blutglukosekonzentration bei 3 mg/kg (-)-Efaroxan und 1 mg/kg (+)-Efaroxan im Gegensatz zum Vehikel. Nach Minute 30 fiel die Blutglukosekurve unter beiden Substanzen ab, wobei 3 mg/kg (-)-Efaroxan bis zum Ende des Experiments keine Wirkung mehr zeigte. Im Gegensatz dazu zeigte 1 mg/kg (+)-Efaroxan bis zum Schluss eine signifikante Wirkung (Abbildung ED9). Während des gesamten Experiments bewirkte 1 mg/kg (-)-Efaroxan zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zum Vehikel. Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass (+)-Efaroxan stärker wirkt, als (-)-Efaroxan, welches sogar in dreifach höherer Dosis eingesetzt wurde. Im vorigen Experiment (Abbildung ED7) zeigte 0,3 mg/kg (+)-Efaroxan auch eine signifikante Wirkung im Gegensatz zum Vehikel, wodurch also noch einmal verdeutlicht werden kann, dass sogar eine 10-fach höhere Dosis von (-)-Efaroxan immer noch weniger Wirkung hatte, als (+)-Efaroxan.

In Abbildung ED10 sind diese Ergebnisse nochmals als Flächen unter der Glukosekurve zusammengefasst. Hier sieht man deutlich, dass in diesem Experiment nur (+)-Efaroxan eine signifikante Wirkung aufweist. (-)-Efaroxan zeigte in beiden eingesetzten Dosen keine signifikante Wirkung auf die Fläche unter der Kurve.

Zusammenfassend konnte also in zwei oralen Glukosetoleranztests gezeigt werden, dass (+)-Efaroxan mit wesentlich höherer Potenz die Glukosetoleranz verbessert als (-)-Efaroxan.

4.3.2. PHARMAKOLOGISCH INDUZIERTER HYPERGLYKÄMIEN

4.3.2.1. DIAZOXID-INDUZIERTER HYPERGLYKÄMIEN

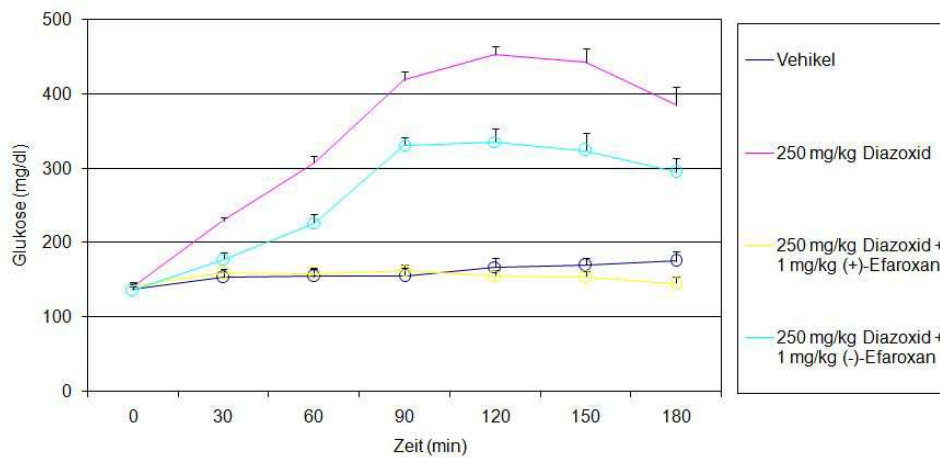


Abbildung ED11: Einfluss von 1 mg/kg (+) -oder (-)-Efaroxan auf eine Diazoxid-induzierte (250 mg/kg) Hyperglykämie bei Mäusen

Mittelwert \pm SEM, n = jeweils 8, ° p < 0,05 gegen Diazoxid alleine

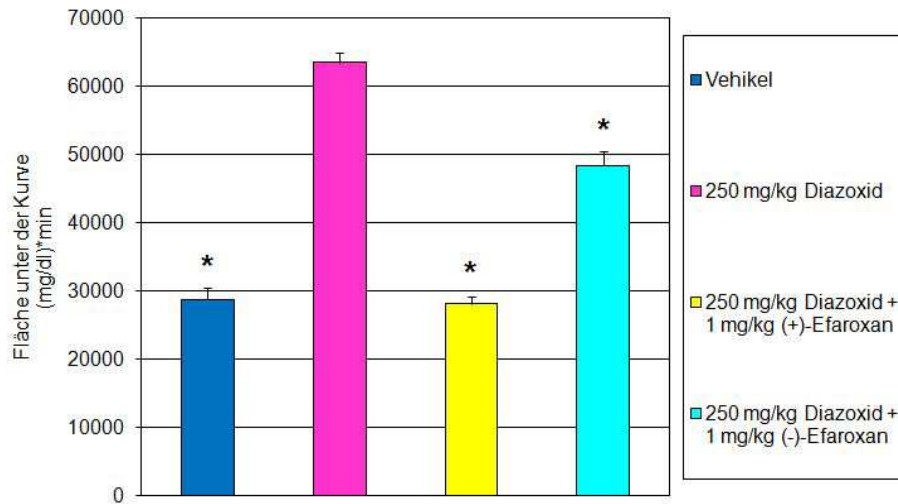


Abbildung ED12: Einfluss von 1 mg/kg (+) –oder (-)-Efaroxan auf die Fläche unter der Kurve bei Diazoxid-induzierter (250 mg/kg) Hyperglykämie von Mäusen

Mittelwert \pm SEM, n = jeweils 8, * p < 0,05 gegen Diazoxid alleine

Nach dem Verabreichen von 250 mg/kg Diazoxid zum Zeitpunkt 0 kam es verglichen mit dem Vehikel zu einem starken Anstieg der Blutglukosekonzentration. Hier erreichte die Blutglukose bei Minute 120 ihr Maximum und fiel anschließend bis zum Ende des Experiments wieder leicht ab. Bei einer gleichzeitigen Verabreichung von 1 mg/kg (-)-Efaroxan fiel der Anstieg geringer aus, als bei der alleinigen Verabreichung von Diazoxid. (-)-Efaroxan wirkte dem Diazoxid-induzierten Anstieg der Blutglukosekonzentration also entgegen. Einen noch stärkeren Effekt als 1 mg/kg (-)-Efaroxan wies allerdings 1 mg/kg (+)-Efaroxan auf, wodurch der Glukoseanstieg völlig ausblieb. Die Glukosekurve verlief in etwa wie die des Vehikels (Abbildung ED11).

Auch die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse als Flächen unter der Kurve verdeutlicht diesen Befund. Sowohl (-)-Efaroxan, als auch (+)-Efaroxan zeigten eine signifikante Wirkung auf den Diazoxid-induzierten Glukoseanstieg, wobei (+)-Efaroxan deutlich stärker wirkte (Abbildung ED12).

Zusammenfassend konnten bei einer Dosis von 1 mg/kg beide Efaroxanenantiomere einer Diazoxid-induzierten Hyperglykämie entgegenwirken, wobei das (+)-Efaroxan wesentlich stärker wirkte als (-)-Efaroxan.

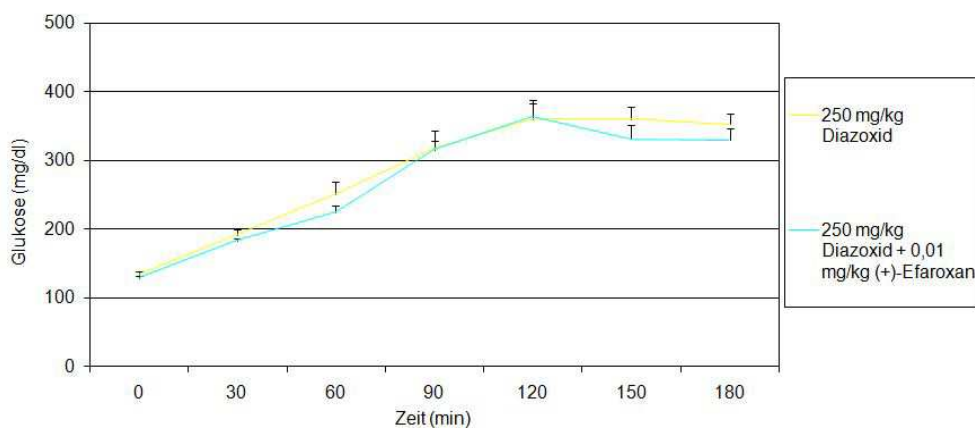


Abbildung ED13: Einfluss von 0,01 mg/kg (+)-Efaroxan auf eine Diazoxid-induzierte (250 mg/kg) Hyperglykämie bei Mäusen

Mittelwert \pm SEM, n = jeweils 8, ° p < 0,05 gegen Diazoxid alleine

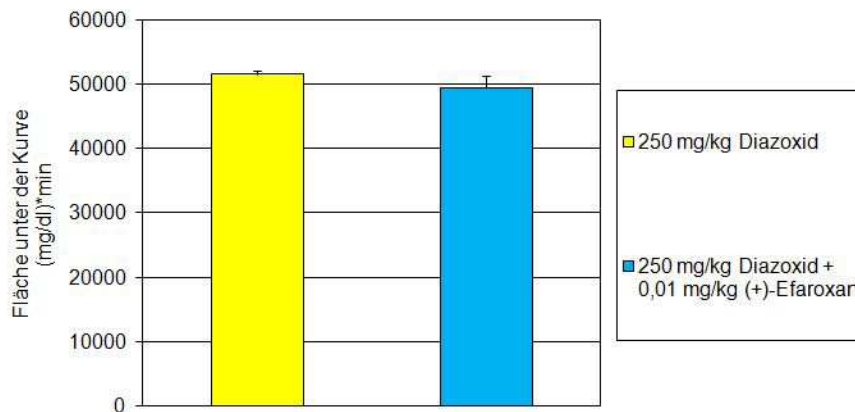


Abbildung ED14: Einfluss von 0,01 mg/kg (+)-Efaroxan auf die Fläche unter der Kurve bei Diazoxid-induzierter (250 mg/kg) Hyperglykämie bei Mäusen

Mittelwert \pm SEM, n = jeweils 8, * p < 0,05 gegen Diazoxid alleine

In diesem Experiment wurde die Wirkung von 0,01 mg/kg (+)-Efaroxan unter Diazoxid getestet, um festzustellen, ob das (+)-Enantiomer, welches bei höheren Dosierungen Wirkung zeigte, auch in kleineren Dosen wirkt. Nach der Gabe von Diazoxid zum Zeitpunkt T_0 min kam es in den ersten beiden Stunden zu einem Anstieg der Blutglukosekonzentration, welche bei T_{120} min ihren Höchstwert erreichte und anschließend auf einem annähernd gleichbleibenden Niveau blieb. Bei zusätzlicher Verabreichung von (+)-Efaroxan war das Ergebnis annähernd dasselbe, 0,01 mg/kg (+)-Efaroxan zeigte somit keine Wirkung (Abbildung ED13). Es konnte also festgestellt werden, dass (+)-Efaroxan in dieser Dosis keine Wirkung hatte.

In Abbildung ED14 sieht man die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse als Flächen unter der Kurve, die auch hier ergeben, dass (+)-Efaroxan wirkungslos war.

4.3.2.2. UK-INDUZIERTE HYPERGLYKÄMIE

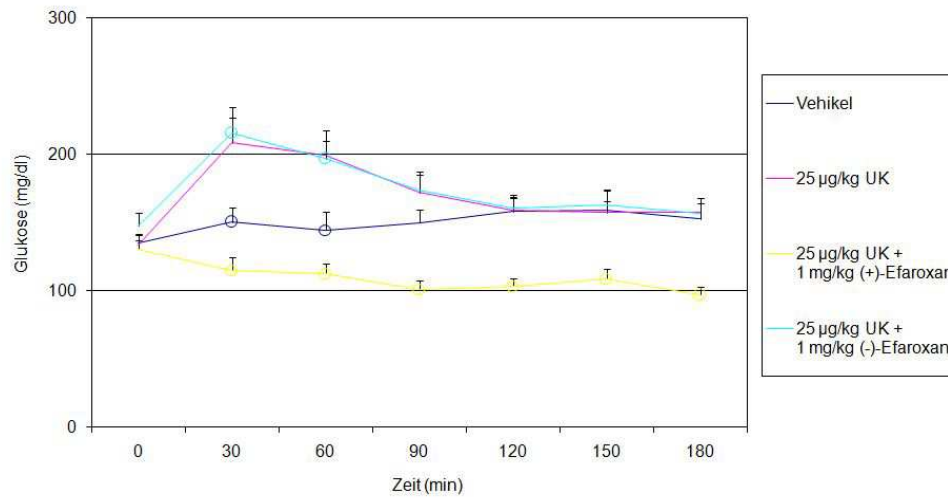


Abbildung ED15: Einfluss von 1 mg/kg (+) –oder (-)-Efaroxan auf eine UK-induzierte (25 µg/kg) Hyperglykämie bei Mäusen

Mittelwert ± SEM, n jeweils ≥ 7, ° p < 0,05 gegen UK alleine

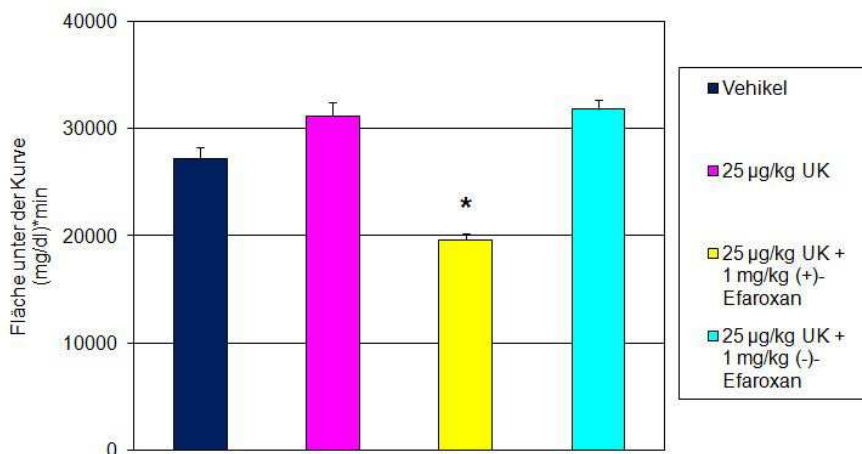


Abbildung ED16: Einfluss von 1 mg/kg (+) –oder (-)-Efaroxan auf die Fläche unter der Kurve bei UK-induzierter (25 µg/kg) Hyperglykämie bei Mäusen

Mittelwert ± SEM, n jeweils ≥ 7, * p < 0,05 gegen UK alleine

Nachdem zum Zeitpunkt $T_{0 \text{ min}}$ 25 $\mu\text{g/kg}$ UK verabreicht wurde, kam es zu einem starken Anstieg der Blutglukosekonzentration im Vergleich zum Vehikel. Bei Minute 30 erreichte die Blutglukose ihren Höchstwert und fiel anschließend bis zum Ende des Experiments wieder ab. Gleichzeitige Verabreichung von (-)-Efaroxan hatte keinen Einfluss auf den Glukoseanstieg. Die Blutglukosekurve verlief ähnlich wie unter Verabreichung von UK alleine. Gleichzeitige Verabreichung von (+)-Efaroxan hatte allerdings eine deutliche Wirkung. Hier kam es zum keinem Anstieg der Blutglukosekonzentration. Es kam sogar zu einem Absinken der Glukosekonzentration im Blut unter jene Werte die unter Vehikelbehandlung gemessen wurden (Abbildung ED15).

In Abbildung ED16 wird durch die Auswertung der Ergebnisse als Flächen unter der Kurve deutlich sichtbar, dass nur (+)-Efaroxan der UK-induzierten Hyperglykämie stark entgegenwirkte. (-)-Efaroxan hatte keine Wirkung.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass 1 mg/kg (+)-Efaroxan einer UK-induzierten Hyperglykämie entgegenwirkte, während (-)-Efaroxan unter diesen Bedingungen wirkungslos war.

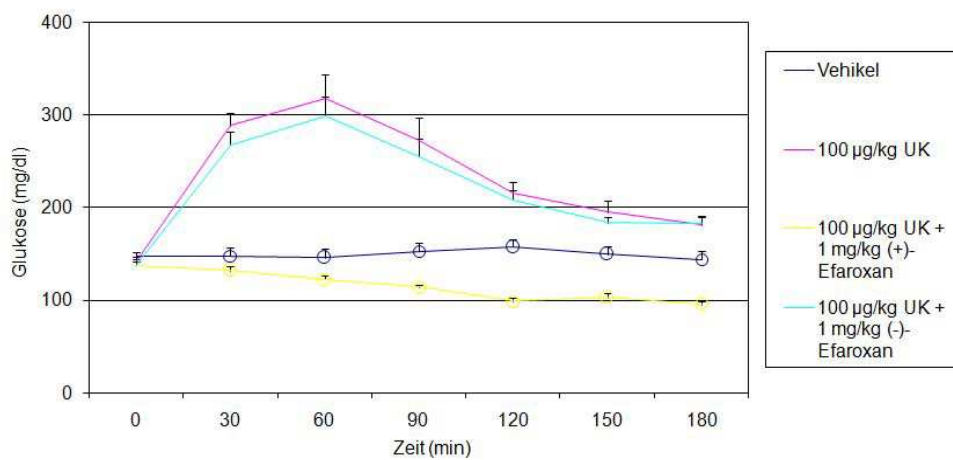


Abbildung ED17: Einfluss von 1 mg/kg (+) –oder (-)-Efaroxan auf eine UK-induzierte (100 µg/kg) Hyperglykämie bei Mäusen

Mittelwert ± SEM, n = jeweils 8, ° p < 0,05 gegen UK alleine

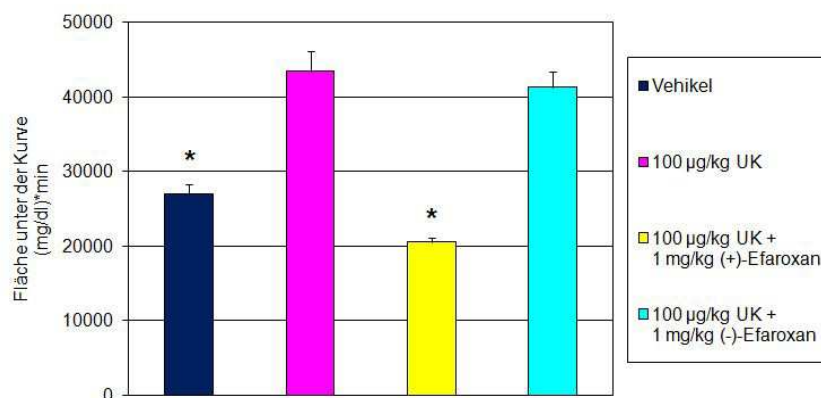


Abbildung ED18: Einfluss von 1 mg/kg (+) –oder (-)-Efaroxan auf die Fläche unter der Kurve bei UK-induzierter (100 µg/kg) Hyperglykämie bei Mäusen

Mittelwert ± SEM, n = jeweils 8, * p < 0,05 gegen UK alleine

In diesem Experiment (Abbildung ED17) wurden gegenüber dem zuvor dargestellten Experiment höhere Konzentrationen von UK verwendet. Das Ergebnis blieb allerdings dasselbe.

Nach der Verabreichung von 100 µg/kg UK zum Zeitpunkt 0 kam es zu einem deutlichen Anstieg der Blutglukosekonzentration verglichen mit dem Vehikel. Bei T_{60 min} erreichte die Blutglukose ihren Maximalwert und fiel bis zum Ende des Experiments wieder ab. Bei gleichzeitiger Gabe von (-)-Efaroxan kam es zu einem in etwa selben Ergebnis wie unter UK alleine. (-)-Efaroxan zeigte keine Wirkung. (+)-Efaroxan konnte jedoch bei gleichzeitiger Gabe dem UK-induzierten Anstieg entgegen wirken. Hier verlief die Glukosekurve wie auch im zuvor beschriebenen Experiment sogar unter der des Vehikels.

Diese Ergebnisse sind in Abbildung ED18 auch als Flächen unter der Glukosekurve dargestellt. UK führte zu einem signifikanten Anstieg der Blutglukosekonzentration im Gegensatz zum Vehikel. Bei gleichzeitiger Gabe von Efaroxan konnte nur das (+)-Enantiomer eine signifikante glukosesenkende Wirkung aufweisen. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass UK in beiden verabreichten Dosen (25 und 100 µg/kg) zu einem Anstieg der Blutglukose führte. Dieser Anstieg der Blutglukosekonzentration konnte jedoch nur von (+)-Efaroxan, nicht aber von (-)-Efaroxan, erzielt werden.

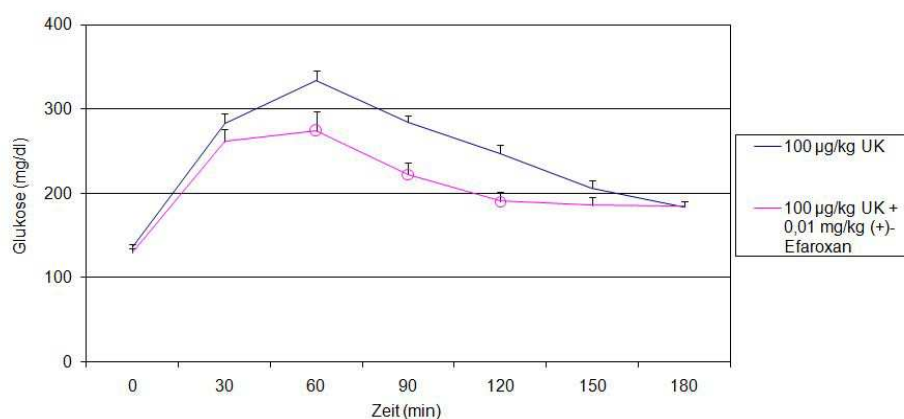


Abbildung ED19: Einfluss von 0,01 mg/kg (+)-Efaroxan auf eine UK-induzierte (100 µg/kg) Hyperglykämie bei Mäusen

Mittelwert ± SEM, n = jeweils 8, ° p < 0,05 gegen UK alleine

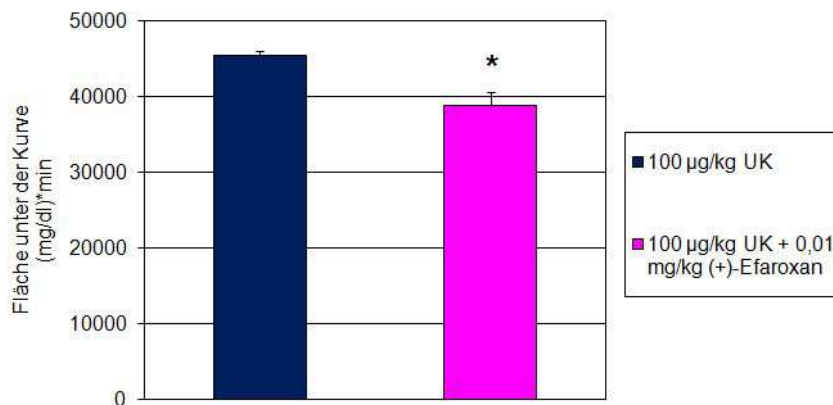


Abbildung ED20: Einfluss von 0,01 mg/kg (+)-Efaroxan auf die Fläche unter der Kurve bei UK-induzierter (100 µg/kg) Hyperglykämie bei Mäusen

Mittelwert \pm SEM, n = jeweils 8, * p < 0,05 gegen UK alleine

In diesem Experiment wurde abermals die Wirkung von 0,01 mg/kg Efaroxan getestet, wie schon zuvor in Abbildung ED13, allerdings unter UK. Nach dem Verabreichen von UK zum Zeitpunkt 0 kam es abermals zu einem deutlichen Anstieg der Blutglukosekonzentration. Der Spitzenwert wurde bei T_{60 min} erreicht, die Kurve fiel anschließend stetig ab. Bei zusätzlicher Gabe von (+)-Efaroxan war ein signifikant kleinerer Höchstwert bei T_{60 min} zu sehen. Anschließend fiel die Kurve bis zum Ende des Experiments wieder ab. (+)-Efaroxan konnte also selbst bei einer Dosis von 0,01 mg/kg entgegen wirken. Es konnte also festgestellt werden, dass eine niedrigere Dosis von (+)-Efaroxan eine Wirkung hatte.

Auch die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse als Flächen unter der Kurve verdeutlicht die potente Wirkung von 0,01 mg/kg (+)-Efaroxan auf 100 µg/kg UK. Es konnte eine signifikante Wirkung festgestellt werden (Abbildung ED20).

4.4. DISKUSSION IN VIVO

Die in vivo-Versuche umfassten orale Glukosetoleranztests und Versuche mit pharmakologisch induzierter Hyperglykämie. Bei den oralen Glukosetoleranztests kam ich zu dem Ergebnis, dass (+)-Efaroxan viel stärker wirkt als (-)-Efaroxan, wobei selbst eine 10-fach höhere Dosis von (-)-Efaroxan immer noch weniger Wirkung hatte als (+)-Efaroxan.

In einem Versuch zur Diazoxid-induzierten Hyperglykämie konnte ich feststellen, dass beide Efaroxanenantiomere bei einer Dosis von 1 mg/kg die Glykämie senken konnten, wobei (+)-Efaroxan allerdings wesentlich stärker wirkte als (-)-Efaroxan. (+)-Efaroxan wurde unter Diazoxid in einem zweiten Experiment noch mit einer geringeren Dosis (0,01 mg/kg) getestet, wobei hier keine Wirkung stattgefunden hat. Bei UK-induzierter Hyperglykämie stellte ich bei beiden verabreichten Dosen (25 und 100 µg UK) einen Anstieg der Blutglukosekonzentration fest. Diesem Anstieg der Blutglukosekonzentration wirkte jedoch nur 1 mg/kg (+)-Efaroxan entgegen. Die gleiche Dosis von (-)-Efaroxan blieb hier wirkungslos. Unter UK zeigte (+)-Efaroxan selbst eine glukosesenkende Wirkung in der sehr niedrigen Dosis von 0,01 mg/kg. Aus diesen Experimenten kann man Folgendes schließen:

- 1) Die glukosesenkende Potenz von racemischem Efaroxan ist fast ausschließlich dem (+)-Enantiomer zuzurechnen.
- 2) Die besonders potente Wirksamkeit von (+)-Efaroxan unter UK weist im Einklang mit Berichten aus der Literatur darauf hin, dass das (+)-Enantiomer für den α_2 -Antagonismus von Efaroxan verantwortlich ist. Die glukosesenkende Potenz von racemischem Efaroxan lässt sich somit weitestgehend auf α_2 -Antagonismus zurückführen.

3) Die glukosesenkende Wirkung hoher Dosen von (-)-Efaroxan beruht auf einem anderen Mechanismus als jene hoher Dosen von (+)-Efaroxan. Dies lässt sich schließen, da (-)-Efaroxan, ganz im Gegensatz zum (+)-Enantiomer, der Diazoxid-induzierten Hyperglykämie stärker entgegenwirkt als der UK-induzierten Hyperglykämie.

Fagerholm et al. führten im Jahr 2008 ebenfalls eine *in vivo*-Studie durch. Sie untersuchten die Wirkung von Efaroxan und eines α_2 -Adrenozeptorantagonisten, der nicht zur Klasse der Imidazoline gehört, auf die Blutglukose und die Plasmainsulinkonzentration, um festzustellen ob die Wirkung von Efaroxan auf einem Antagonismus am α_2 -Adrenozeptor der β -Zellen beruht. Die verabreichten Substanzen wurden sowohl in gefasteten, als auch in gefütterten Mäusen untersucht, wobei dafür α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout-Mäuse (α_{2A} -KO) mit Kontrollmäusen (wild type) verglichen wurden. Die Blutabnahme erfolgte anhand einer Schwanzpunktion. Fagerholm et al. kamen zu dem Ergebnis, dass Efaroxan ohne α_{2A} -Adrenozeptor keine Wirkung auf die Insulinsekretion und Glukosesenkung in α_{2A} -KO-Mäusen zeigte [34], was meine Schlussfolgerung bestärkt, dass die Wirkung von Efaroxan *in vivo* vor allem auf dem α_2 -Antagonismus beruht.

In der Literatur findet man nur wenige Untersuchungen zur Wirkung gereinigter Efaroxanenantiomere *in vivo*. Die einzige Studie, in der der Einfluss der Efaroxanenantiomere *in vivo* in Glukosetoleranztests untersucht wurde, stammt von Mourtada et al. [30]. Sie stammt also von jener Arbeitsgruppe, die, wie oben erwähnt, unter den mehreren Versuchsbedingungen *in vitro* eine stärkere insulinotrope Potenz des (-)-Enantiomers gegenüber dem (+)-Enantiomer gefunden hatte [19]. Dieser Befund an isolierten Inseln, der ja im Gegensatz zu meinen Ergebnissen steht, wurde in der Arbeit von Mourtada et al. nochmals bestätigt [30]. Von Experimenten, bei denen Ratten *in vivo* mit gereinigten Efaroxanenantiomeren behandelt wurden, berichten die Autoren leider keine Blutglukosewerte, sondern nur das Plasmainsulin. Bei relativ hoher Dosierung von 3,5 mg/kg fanden die Forscher für beide Enantiomere, (+)-Efaroxan und (-)-Efaroxan, ähnliche, eher moderate Anstiege des Plasmainsulins. Nur wenn zugleich Glibenklamid verabreicht wurde, kam es zu stärkeren Anstiegen, wobei (+)-Efaroxan dann deutlich wirksamer war als (-)-Efaroxan. Obwohl der Mangel an

Glukosdaten die Interpretation erschwert, lassen sich diese Befunde doch weitgehend mit den meinen vergleichen, denn auch in meiner Studie hatte das gereinigte (-)-Enantiomer bei sehr hoher Dosierung Wirkung. Weiters war das (+)-Efaroxan in vivo auch in der Studie von Mourtada et al. in vivo - zumindest unter Glibenklamid - das wirkungsstärkere Enantiomer, wenn dies auch deutlich weniger ins Auge stach als in den Resultaten der vorliegenden Untersuchung.

Taylor et al. untersuchten 2006 ebenfalls die Wirkung von Efaroxan und seiner Enantiomere in vivo. In dieser Studie wurde allerdings keine metabolische Wirkung, sondern das monomere G-Protein Rhes (Ras Homologue Expressed in Striatum), das in den β -Zellen des Pankreas vorkommt, untersucht. Im ersten Versuch behandelten sie RINm5F-Zellen mit Efaroxanrazemat. Der Rhes mRNA-Gehalt stieg und erreichte bei einer Konzentration von 100 μ M Efaroxan seinen Maximalwert. Im zweiten Versuch wurden die Zellen auch mit gereinigten Efaroxanenantiomeren behandelt. Hier führte die Behandlung mit 100 μ M (-)-Efaroxan zu einem viel stärkeren Anstieg des Rhes mRNA-Gehalts, als jene mit 100 μ M (+)-Efaroxan. In einem weiteren Versuch wurden auch Ratteninseln mit 100 μ M (-)-Efaroxan behandelt. Auch hier wurde ein Anstieg des Rhes mRNA-Gehalts festgestellt. Weiters kamen Taylor et al. zu dem Ergebnis, dass die Induktion der Rhes-Expression von Kalzium gesteuert wird und nicht direkt mit der Insulinfreisetzung assoziiert ist. Die Autoren kamen letztendlich zu dem Ergebnis, dass Rhes in den β -Zellen exprimiert und von Imidazolinen reguliert wird [31]. Stimmen meine oben genannten Schlussfolgerungen, so würde die Überlegenheit des (-)-Enantiomers dafür sprechen, dass die Zunahme der Rhes-Expression im Gegensatz zur Glukosesenkung nicht durch α_2 -Antagonismus bedingt sein kann.

Obwohl es also schon Hinweise in dieser Richtung gab, steht die Kernaussage dieser Diplomarbeit - dass die Wirkung von Efaroxan in vivo weitestgehend auf α_2 -Antagonismus beruht – im Gegensatz zur lange bevorzugten Ansicht, dass die Ursache der insulinotropen und glukosesenkenden Wirkung der Imidazoline eben nicht der α_2 -Antagonismus sei. Ich vermute, dass diese Anschauung sich durchsetzte, da viele

Untersuchungen *in vitro* in Abwesenheit von α_2 -Agonisten gemacht worden sind. Wie in der Diskussion der *in vitro*-Daten erläutert, dürfte unter solchen Versuchsbedingungen der *in vivo* so wichtige α_2 -Antagonismus schlichtweg nicht zur Wirkung kommen und „übersehen“ worden sein.

Hier zwei Beispiele von Studien, die auf Basis von *in vitro*-Experimenten solche Schlüsse zogen:

Im Jahr 2009 führten Hatlapatka et al. Perfusionsversuche mit Mäuseinseln durch, wobei sie die Wirkung von Nährstoffen und Nichtnährstoffen auf die Insulinsekretion in Kombination mit Efaroxan untersuchten [32]. Sie stellten fest, dass Efaroxan die Stimulation der Insulinsekretion durch einen getesteten Nährstoff verstärkt und die Insulinsekretion des getesteten Nichtnährstoffes nicht beeinflusste. Außerdem stellten sie fest, dass Efaroxan und ein anderer getesteter α_2 -Antagonist keine Wirkung auf die Insulinsekretion von Sulfonylharnstoff-Rezeptor (= SUR1) Knockout-Mäusen hatten. Die Autoren kamen zu dem finalen Ergebnis, dass die Wirkung von Efaroxan auf die Insulinsekretion durch Effekte auf den K_{ATP} -Kanal zustande kommt, da SUR1 ein Bestandteil des K_{ATP} -Kanals ist [32].

Berdeu et al. [33] führten in einer Studie Perfusionsversuche isolierter Rattenpankreatata durch und untersuchten die Wirkung von Imidazolinderivaten auf die Insulinsekretion. Sie fanden heraus, dass Efaroxan, welches ein Imidazolin ist, eine stimulierende Wirkung auf die Insulinsekretion hatte. Andere α_2 -Antagonisten, nämlich Idazoxan (auch ein Imidazolin) und Yohimbin (kein Imidazolin) zeigten aber keine Wirkung auf die Insulinsekretion, woraus man schloss, dass die Effekte von Imidazolinen nicht auf eine Interaktion mit α_2 -Adrenozeptoren zurückzuführen sind [33].

Diese Autoren und viele andere, die ähnliche Experimente gemacht haben, waren also der Meinung, dass die Efaroxan-induzierte Insulinsekretion nicht durch eine Blockade der α_2 -Adrenozeptoren zustande kommt, sondern durch einen zweiten Mechanismus, dem eine Interaktion mit dem K_{ATP} -Kanal zu Grunde liegt. Dies mag unter den

gewählten Versuchsbedingungen *in vitro* zwar richtig sein, kann aber nicht auf die Situation *in vivo* extrapoliert werden. *In vivo* sind Agonisten wie Adrenalin und Noradrenalin immer vorhanden, was *in vitro* der experimentellen Situation unter UK-Exposition vergleichbar ist. Und unter diesen Umständen wird die potente Wirkung der Imidazoline auch *in vitro* sichtbar.

Zusammenfassend kann man also feststellen, dass Efaroxan *in vivo* über zwei Mechanismen insulinotrop und glukosesenkend wirken kann (α_{2A} -Antagonismus und vermutlich Interaktion mit dem K_{ATP} -Kanal). Jedoch stellte sich in meiner Diplomarbeit der α_{2A} -Antagonismus als der viel potentere und wichtigere Mechanismus *in vivo* heraus.

5. SCHLUSSBETRACHTUNG

Mechanismen der Efaroxanwirkung in vitro

Ausgangspunkt dieser Studie war, dass für die insulinotrope und glukosesenkende Wirkung von Imidazolinen wie dem Efaroxan in der Literatur zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert werden (einerseits Antagonismus am α_{2A} -Adrenozeptor und andererseits Schließen des K_{ATP} -Kanals). Dabei wurden den beiden gereinigten Efaroxanenantiomeren unterschiedlich starke Wirkungen über die beiden Mechanismen zugeschrieben: α_{2A} -Adrenozeptor: (+)-Efaroxan > (-)-Efaroxan; K_{ATP} -Kanal: (-)-Efaroxan > (+)-Efaroxan.

Ich führte zuerst Experimente mit Hilfe einer Methode zur Perifusion isolierter Langerhans'scher Inseln durch, um diese beiden Mechanismen in vitro zu differenzieren. Ähnliche Experimente waren schon im Jahr 1993 durch Chan et al. an Diazoxid- und UK-exponierten Inseln durchgeführt worden [19]. Meine Inselperifusionen bestätigten eine deutliche Überlegenheit des (+)-Enantiomers unter UK. Unter Diazoxidexposition erhielt ich allerdings ein anderes Ergebnis als Chan et al., bei deren Versuchen (-)-Efaroxan deutlich potenter dem Diazoxid entgegenwirkte als (+)-Efaroxan [19]. Ich hingegen konnte unter diesen Versuchsbedingungen keinen Unterschied zwischen den beiden Efaroxanenantiomeren feststellen. (-)-Efaroxan, wie auch (+)-Efaroxan, wirkte in meinen Untersuchungen unter Diazoxid nur in mikromolaren Konzentrationen insulinotrop, wohingegen eine Wirkung von (+)-Efaroxan unter UK schon in nanomolaren Konzentrationen nachweisbar war. In Bezug auf die wirksamen Konzentrationsbereiche kamen Chan et al. ebenfalls zu diesem Ergebnis [19]. Obwohl meine Befunde also die Ergebnisse von Chan et al. nicht in allen Aspekten bestätigten, wurde auch in meinen Experimenten deutlich, dass Efaroxan in vitro über zwei unterschiedliche Mechanismen die Insulinsekretion steigern kann. Dabei dürften beide Enantiomere ähnlich starke Wirkung auf den K_{ATP} -Kanal haben, was in Abwesenheit von adrenergen Agonisten gut darstellbar ist. Sobald allerdings ein α_2 -Agonist anwesend ist, wird die α_2 -antagonistische Wirkung sichtbar, die offenkundig nur das (+)-Enantiomer ausübt.

Diese in vitro dargestellte klare Differenzierung der relativen Wirkstärken der Efaroxanenantiomere über den jeweiligen Mechanismus sollte genutzt werden, um herauszufinden, welcher Mechanismus für die Blutglukose-senkende Wirkung von Efaroxan in vivo verantwortlich ist.

Mechanismen der Efaroxanwirkung in vivo

Um herauszufinden, welcher der beiden bekannten Mechanismen in vivo der relevante ist, führten ich an Mäusen zuerst orale Glukosetoleranztests durch. In diesen Experimenten wurden die Wirkungen von Efaroxan und seinen Enantiomeren auf die Blutglukosekonzentration ohne Einsatz von Sekretionshemmern getestet. Hier konnte dem Efaroxanrazemat und dem (+)-Efaroxan eine deutlich potentere Wirkung auf die Glukosekonzentration im Blut zugeschrieben werden als dem (-)-Efaroxan. Diese Feststellung wird verdeutlicht, indem sogar eine 10-fach höhere Dosis von (-)-Efaroxan immer noch weniger Wirkung zeigte als (+)-Efaroxan. In diesen Experimenten konnte ich also eine deutlich stärkere Wirkung jenes Enantiomers feststellen, das für den Antagonismus am α_{2A} -Adrenozeptor verantwortlich ist. Die Ergebnisse aus den Glukosetoleranztests wiesen somit deutlich darauf hin, dass in vivo α_{2A} -Adrenozeptor-Antagonismus der für die Verbesserung der Glukosetoleranz hauptverantwortliche Mechanismus ist.

Um diese überlegende Bedeutung des α_{2A} -Antagonismus zu untermauern, wurden in vivo zusätzlich Experimente mit pharmakologisch induzierten Hyperglykämien durchgeführt. Diese Hyperglykämien wurden durch die Injektion von einem der beiden Insulinsekretionshemmer Diazoxid und UK ausgelöst. Grundsätzlich war auch hier (+)-Efaroxan unter allen Bedingungen das weitaus potentere Enantiomer. (+)-Efaroxan wirkte allerdings bei gleicher Dosierung dem UK viel stärker entgegen als dem Diazoxid. Es zeigte unter UK, nicht aber unter Diazoxid, selbst bei der sehr niedrigen Dosis von 0,01 mg/kg eine glukosesenkende Wirkung. Diese besonders hohe Fähigkeit, die Wirkung eines α_2 -Agonisten aufzuheben, bestätigte abermals, dass die Effekte des (+)-Efaroxan wohl einem α_2 -Antagonismus zuzuordnen sind. Anders als das (+)-Efaroxan wirkte (-)-Efaroxan in einer Dosis von 1 mg/kg der Diazoxid-induzierten

Hyperglykämie deutlich entgegen, nicht aber der UK-induzierten Hyperglykämie. Dieses unterschiedliche Interaktionsmuster mit den Insulinsekretionshemmern beweist, dass die Wirkung des (-)-Efaroxan in vivo tatsächlich über einen anderen Mechanismus zustande kommt als jene des (+)-Efaroxan. Zusammenfassend konnte ich also auch in Experimenten mit pharmakologisch induzierten Hyperglykämien bestätigen, dass (+)-Efaroxan dem (-)-Efaroxan in vivo weit überlegen ist und das dies offenkundig damit zu tun hat, dass nur das (+)-Enantiomer α_2 -antagonistische Wirkung hat, während (-)-Efaroxan nur in weit höheren Dosen und über einen anderen Mechanismus wirkt.

Schlussfolgerungen

In Anbetracht der Ergebnisse kann man also zweifelsfrei schließen, dass die insulinotrope und glukosesenkende Wirkung von Efaroxan in Mäusen in vivo weitgehend auf dem α_2 -Antagonismus beruht. Der zweite Mechanismus, dem offenbar eine Interaktion mit dem K_{ATP} -Kanal zugrunde liegt, ist in seiner Bedeutung eventuell oft überschätzt worden. Dies mag damit zu tun haben, dass viele Versuche in vorangehenden Studien in vitro und in völliger Abwesenheit adrenerger Agonisten durchgeführt wurden, also unter Bedingungen, unter denen α_2 -Antagonismus nicht sichtbar wird. Für solche Standardbedingungen in vitro ist der Schluss, dass Imidazoline über den K_{ATP} -Kanal und nicht über Adrenozeptoren wirken, also wahrscheinlich richtig. Mehrere Studien, die unter solchen Versuchsbedingungen zu dem Ergebnis kamen, dass die Efaroxan-induzierte Insulinsekretion nicht durch eine Blockade der α_{2A} -Adrenozeptoren zustande kommt, sondern durch das Schließen der K_{ATP} -Kanäle, sind daher zu bestätigen. Dieser Schluss kann aber nicht auf die viel bedeutsamere in vivo-Situation übertragen werden. In vivo zirkulieren nämlich immer Agonisten wie Adrenalin und Noradrenalin im Blut, sodass der α_2 -Adrenozeptor-Antagonismus von Efaroxan zur Wirkung kommt und zum weitaus potenteren glukosesenkenden Mechanismus wird. Letztendlich kam ich zu dem Ergebnis, dass Efaroxan zwar sehr wohl auch in vivo über zwei verschiedene Mechanismen wirken kann, dass die Wirkkomponente über den K_{ATP} -Kanal aber von vernachlässigbarer Bedeutung ist. Dies

ist für eine mögliche weitere Entwicklung von solchen Substanzen als Medikamente eine wichtige Information.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zielsetzung: Ziel dieser Arbeit war ein besseres Verständnis jener Mechanismen, über die das Imidazolin Efaroxan in Mäusen die Insulinsekretion verstärkt und die Blutglukose senkt. Grundsätzlich wurden schon zuvor zwei Mechanismen mit diesen Wirkungen von Efaroxan in Zusammenhang gebracht: ein Schließen der K_{ATP} -Kanäle und ein Antagonismus an den α_{2A} -Adrenozeptoren der insulinproduzierenden β -Zellen. Insbesondere sollte in der vorliegenden Arbeit die bislang offene Frage beantwortet werden, welcher dieser Mechanismen wie weit für die antihyperglykämische Wirkung von Efaroxan in vivo verantwortlich ist.

Methoden: Ausgangspunkt der Experimente war die Verfügbarkeit hochreiner Enantiomere von Efaroxan, die vergleichend untersucht wurden. Dabei wurden insbesondere Unterschiede in deren Potenz ermittelt, die Wirkungen eines α_2 -Agonisten bzw. eines K_{ATP} -Öffners aufzuheben. Nach diesem Prinzip wurde einerseits die insulinotrope Wirkung an isolierten perifudierten Langerhans'schen Inseln in vitro und andererseits die Blutglukose-senkende Wirkung an Mäusen in vivo vergleichend untersucht.

Ergebnisse und Schlussfolgerung: Es konnte zunächst bestätigt werden, dass Efaroxanrazemat in vitro die Insulinsekretion fördert. Während unter dem Sekretionshemmer Diazoxid kein Unterschied in der Wirkung der beiden Efaroxanenantiomere auf die Insulinfreisetzung festgestellt werden konnte, wirkte (+)-Efaroxan schon in kleinen Konzentrationen der UK-induzierten Hemmung der Insulinfreisetzung entgegen. Dies weist darauf hin, dass beide Enantiomere gleichermaßen ein Schließen der K_{ATP} -Kanäle bewirken, der α_2 -Antagonismus jedoch praktisch ausschließlich vom (+)-Efaroxan getragen wird. In vivo erwies sich sowohl in oralen Glukosetoleranztests als auch bei Diazoxid- oder UK-induzierten

Hyperglykämien (+)-Efaroxan als wesentlich potenter als (-)-Efaroxan. In vivo stellte sich also der α_{2A} -Antagonismus als der für die Senkung der Blutglukose weitaus wichtigere Mechanismus heraus.

7. ABSTRACT

Aim: A better understanding of the mechanisms, which increase the insulin secretion and reduce the blood glucose in mice by imidazoline efaroxan, were the aim of this study. In this context, two mechanisms have been associated with these effects of efaroxan previously: closing of K_{ATP} -channels and an antagonism to the α_2 -adrenoceptors of the insulin producing β -cells. Answering the question how much each of these two mechanisms is responsible for the antihyperglycemic effect of efaroxan, was the main aim of the present study.

Methods: The starting point of these experiments was the availability of highly pure enantiomers of efaroxan, which were comparatively investigated. In particular differences have been identified in their potency to reverse the effect of a α_2 -agonist or a K_{ATP} -opener. Under this principle on the one hand the insulinotropic effect on isolated perfused Langerhans' islets in vitro and on the other hand the blood glucose lowering effect in mice in vivo was studied comparatively.

Results and conclusion: It could first be confirmed that racemic efaroxan promotes the insulin secretion in vitro. While no difference in the effect of the two enantiomers of efaroxan on the insulin release under the insulin secretions inhibitor diazoxide was found, (+)-efaroxan even worked in small concentrations against the UK-induced inhibition of insulin release. This indicates that both enantiomers equally cause the closure of K_{ATP} -channels. Though the α_2 -antagonism mechanism is exclusively supported by (+)-efaroxan. In vivo it turned out, that in the oral glucose tolerance tests and in diazoxide- or UK-induced hyperglycemias (+)-efaroxan was much more effective than (-)-efaroxan. Hence, in vivo the α_{2A} -antagonism turned out to be the much more important mechanism for lowering the blood glucose.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- [1]Elmadfa I., Freisling H.: Österreichischer Ernährungsbericht 2008, Wien, 2009; 1-28
- [2]Elmadfa I., Leitzmann C.: Ernährung des Menschen, Ulmer Verlag, Hohenheim, 2004; 544-549
- [3]Mehnert H.: Stoffwechselkrankheiten Grundlagen – Diagnostik – Therapie, Thieme Verlag, 1990; 113-132
- [4]Schwandt P, Richter, Parhofer: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie der Dyslipoproteinämien Prävention der Atherosklerose, Schattauer Verlag, 2001; 240-244
- [5]Rehner G., Daniel H.: Biochemie der Ernährung, Spektrum Akademischer Verlag, 2002; 122-129; 374-379
- [6]Silverthorn D. U.: Physiologie, Pearson Studium, 2009; 151-162
- [7]<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Citratcyclus.svg&filetimestamp=20070421124421>; abgerufen am 14.10.2011
- [8]Rehner G., Daniel H.: Biochemie der Ernährung, Spektrum Akademischer Verlag, 2010; 431-437
- [9]<http://de.wikipedia.org/wiki/Glykogensynthese>; abgerufen am 7.3.2012
- [10]Biesalski H. K., Grimm P.: Taschenatlas Ernährung, Thieme Verlag, 2007; 54-61
- [11]http://www.uni-giessen.de/cms/fbz/fb10/institute_klinikum/institute/vphysbio/lehre/bch-veranstaltungen/uebung-biochem/Folien/kapitel-7-praktikum/kapitel7.5; abgerufen am 12.10.2011
- [12]De Fronzo RA, The triumvirate: beta-cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM, Diabetes 37, 1988 Jun; 37(6):667-87
- [13]Siegenthaler W.: Klinische Pathophysiologie, Thieme Verlag, 2006; 83-90
- [14]Estler C.J., Schmidt H.: Pharmakologie und Toxikologie: für Studium und Praxis, Schattauer, 2007; 403-404
- [15]<http://de.wikipedia.org/wiki/Diazoxid>; abgerufen am 8.10.2011

- [16] Brede M., Philipp M., Knaus A., Muthig V., Hein L.: Alpha2-adrenergic receptor subtypes – novel functions uncovered in genotargeted mouse models, *Biol Cell*, 2004 Jun; 96(5): 343-8
- [17] Moura E., Afonso J., Hein L., Vieira-Coelho MA.: Alpha2-adrenoceptor subtypes involved in the regulation of catecholamine release from the adrenal medulla of mice, *Br J Pharmacol*, 2006 Dec; 149(8): 1049-58
- [18] Rosengren A.H., Jokubka R., Tojjar D., Granhall C., Hansson O., Li D.-Q., Nagaraj V., Reinbothe T.M., Tuncel J., Eliasson L., Groop L., Rorsman P., Salehi A., Lyssenko V., Luthman H., Renström E.: Overexpression of Alpha2A-Adrenergic Receptors Contributes to Type 2 Diabetes, *Science*, 2010 Jan 8; 327(5962): 217-20
- [19] Chan S., Colin A., Brown C.A., Morgan N.: Stimulation of insulin secretion by the imidazoline α_2 -adrenoceptor antagonist efaroxan is mediated by a novel, stereoselective, binding site, *Eur. J. Pharmacol*, 1993 Jan 19; 230(3): 375-8
- [20] <http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=1958>; abgerufen am 15.03.2012
- [21] http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CO_NCAT_PNO%7CBRAND_KEY&N4=U104%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC; abgerufen am 8.10.2011
- [22] Chan S., Morgan N.: Stimulation of insulin secretion by efaroxan may involve interaction with K⁺ channels, *Eur. J. Pharmacol*, 1990 Jan 25; 176(1): 97-101
- [23] Jonas J.C., Plant T.D., Henquin J.C.: Imidazoline antagonists of α_2 -adrenoceptors increase insulin release in vitro by inhibiting ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic β -cells, *Br. J. Pharmacol*, 1992 Sep 107(1): 8-14
- [24] Plant T.D., Henquin J.C.: Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive K⁺ channels in mouse pancreatic β -cells, *Br. J. Pharmacol*, 1990 Sep; 101(1): 115-20
- [25] Schulz A., Hasselblatt A.: Phentolamine, a deceptive tool to investigate sympathetic nervous control of insulin release, *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol*, 1988 Jun; 337(6): 637-43
- [26] Chan S., Dunne M.J., Stillings M.R., Morgan N.: The α_2 -antagonist efaroxan modulates K⁺_{ATP} channels in insulin secreting cells, *Eur. J. Pharmacol*, 1991 Oct 29; 204(1): 41-8
- [27] Dunne M.J.: Block of ATP-regulated K⁺ channels by phentolamine and other α -adrenoceptor antagonists, *Br. J. Pharmacol*, 1991 Aug; 103(4): 1847-50

- [28]<http://de.wikipedia.org/wiki/Efaroxan>; abgerufen am 8.10.2011
- [29]Brown C.A., Loweth A.C., Smith S.A., Morgan N.G.: Evidence that the stimulatory effects of imidazoline compounds on insulin secretion are not mediated by interaction with non-adrenergic idazoxan binding sites, *Br. J. Pharmacol*, 1993 Feb; 108(2): 312-7
- [30]Mourtada M., Brown C.A., Smith S.A., Piercy V., Chan S., Morgan N.: Interactions between imidazoline compounds and sulphonylureas in the regulation of insulin secretion, *Br. J. Pharmacol*, 1997 Jun; 121(4): 799-805
- [31]Taylor JP., Jackson DA., Morgan NG., Chan SL.: Rhes expression in pancreatic β -cells is regulated by efaroxan in a calcium-dependent process, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006 Oct 20; 349(2): 809-15
- [32]Hatlapatka K., Wienbergen A., Kühne C., Jörns A., Willenborg M., Rustenbeck I.: Selective Enhancement of Nutrient-Induced Insulin Secretion by ATP-Sensitive K⁺ Channel-Blocking Imidazolines, *J Pharmacol Exp Ther*, 2009 Dec; 331(3): 1033-41
- [33]Berdeu D., Gross R., Ribes G., Loubatieres-Mariani MM., Bertrand G.: Effects of imidazolines and derivates on insulin secretion and vascular resistance in perfused rat pancreas, *Eur J Pharmacol*, 1994 Mar 11; 254(1-2): 119-25
- [34]Fagerholm V., Scheinin M., Haaparanta M.: α_{2A} -Adrenoceptor antagonism increases insulin secretion and synergistically augments the insulinotropic effect of glibenclamide in mice, *Br J Pharmacol*, 2008 Jul; 154(6): 1287-96
- [35]De Cillia V.: Untersuchungen zur Wirkung von Progesteron und Efaroxan auf die Insulinsekretion von Mäusen, Diplomarbeit 2011
- [36]Jonas JC., Garcia-Barrado MJ., Angel I., Henquin JC.: The imidazoline SL 84.0418 shows stereoselectivity in blocking α_2 -adrenoceptors but not ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic B-cells, *Eur J Pharmacol*, 1994 Oct 13; 264(1): 81-4

9. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Denise Gruber
Geburtsdatum: 23.04.1986
Geburtsort: Gmünd, Niederösterreich, Österreich

Ausbildung

1992-1996: Peter-Rosegger Volksschule Gmünd, Niederösterreich
1996-2005: Bundesrealgymnasium Gmünd, Niederösterreich
16.06.2005: Matura-Abschluss
2005-2012: Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien, Österreich
August 2011: Verfassung der Diplomarbeit unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Jürgen König und Ao. Univ.-Prof. Dr. Clemens Fürnsinn am Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien, Klinik für Innere Medizin III, Abteilung Endokrinologie und Stoffwechsel

Praktikumserfahrung

01.09.2008-25.09.2008: Praktikantin im Karl Landsteiner Institut für Stoffwechselerkrankungen und Nephrologie, Wien

03.07.2009-31.07.2009: Praktikantin bei der Arbeitsgemeinschaft für klinische Ernährung (AKE), Wien

06.09.2010-01.10.2010: Praktikantin im Qualitätslabor Niederösterreich, Niederösterreich

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Jürgen König bedanken, der mich bei den letzten Schritten meines Studiums begleitet hat und meine Diplomarbeit betreut hat.

Ein besonderer Dank gilt meinem externen Betreuer Herrn Prof. Clemens Fürnsinn, der mich mit sehr viel Engagement, guten Ideen und unermüdlichem Einsatz bei der Erstellung dieser Arbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Karin Stadlbauer und Frau Dr. Zsuzsanna Lehner, die mir stets den Rücken gestärkt haben. Außerdem möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung, für die vielen hilfreichen Anregungen und für ihre Engelsgeduld bedanken.

Ich möchte mich außerdem bei meinem Freund Christoph Gabler bedanken, der mich während des gesamten Studiums, vor allem aber während der Diplomarbeitsphase tatkräftig unterstützt hat und alle meine Launen ertragen hat. Auch möchte ich mich bei ihm dafür bedanken, dass er immer zu mir gehalten hat und mit mir durch Höhen und Tiefen gegangen ist.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Schwester und meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben, die stets ein offenes Ohr für mich hatten, mir immer wieder aus einer Motivationskrise geholfen haben und mich bestärkt haben, wenn ich an mir gezweifelt habe. Ich danke euch für die jahrelange Unterstützung!