

**Einfluß einer 5 Tage anhaltenden hyperkalorischen
Glukosezufuhr auf Blutzucker, Insulinsekretion,
Freßverhalten und Körpergewicht der Ratte**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von
Nguyen van Hoc

Tag der mündlichen Prüfung:

28. Juli 2003

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter

Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter

Prof. Dr. G. Drews

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im September 1995 unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon am Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaftler der Eberhard-Karls-Universität Tübingen begonnen und im März 1999 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas. Viel mehr danke ich ihm allerdings für seine menschliche Wärme und für sein persönliches Engagement, nicht nur die Arbeit sondern auch mich selbst voranzubringen.

Frau Professor Dr. G. Drews danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und für das Korrigieren meiner Arbeit.

Herrn Dr. N. Lemberg danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Methoden zur ATP- und Glykogenbestimmung.

Mein Dank gilt auch Herrn H. Bröckel für die Versorgung der Versuchstiere.

Herrn Dr. O. Rau, dem Tierarzt der Tierklinik Tübingen, danke ich für die Anleitung zur schonenden und effektiven Operationstechnik.

Frau Hagenloh danke ich für die Einführungsarbeit zur Insulinbestimmung und für die Beschaffung von Materialien.

Frau Dr. M. Düfer möchte ich für ihre Hilfe beim Erstellen meiner Dissertation und für ihre aufmunternden Worte danken.

Herrn M. Bäcker danke ich für die Unterstützung bei Softwareproblemstellungen und für die Freundschaft.

Frau I. Breuning danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Professor Ammon, Frau Professor Drews und Herrn Professor Ruth möchte ich mich für das sehr angenehme Arbeitsklima und die vielen aufmunternden Worte bedanken.

Meine akademischen Lehrer neben Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren an der Universität Würzburg:

F.-C. Czygan	Pharmazeutische Biologie
S. Ebel	Pharmazeutische Chemie
D. Hentschler	Pharmakologie und Toxikologie
C. Herdeis	Pharmazeutische Chemie
H. Karch	Medizinische Mikrobiologie
H.-G. Neumann	Pharmakologie und Toxikologie
P. Proksch	Pharmazeutische Biologie
J. Riehl	Pharmazeutische Technologie
H. Rüdiger	Biochemie
P. Surmann	Anorganische Chemie

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Van Hoc Nguyen
Geburtsdatum 02.09.1967
Geburtsort Baria/Vietnam
Staatsangehörigkeit deutsch seit 11/1996

Schule

1973 - 1978 Besuch einer Grundschule in Vietnam
01/1980 Einreise nach Deutschland als Flüchtling
1980 – 1988 Besuch des Ricarda-Huch-Gymnasiums in Krefeld
06/1988 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Studium und beruflicher Werdegang

11/1988 – 04/1993 Pharmaziestudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
05/1993 – 10/1993 Pharmaziepraktikum in der Seiden-Apotheke in Krefeld
11/1993 – 04/1994 Pharmaziepraktikum in der Krankenhausapotheke in Jülich
09/1994 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/1994 – 08/1995 Vertretungstätigkeit in der Elch-Apotheke in Duisburg
09/1995 Beginn der Promotion bei Prof. Dr. H.P.T. Ammon, Lehrstuhl für Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Universität Tübingen, mit dem Thema:
Einfluß einer 5 Tage anhaltenden hyperkalorischen Glukosezufuhr auf Blutzucker, Insulinsekretion, Freßverhalten und Körpergewicht der Ratte“
02/1996 Beginn der Experimente nach Erhalt der Genehmigung für die Tierversuche
03/1999 Abschluß der experimentellen Arbeiten
01/1996 – 06/1998 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaftler bei Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden zum Teil bereits veröffentlicht:

Houdali B., Nguyen V., Ammon H.P.T., Haap M., Schechinger W., Machicao F., Rett K., Häring H.-U. (2002)

Prolonged glucose infusion into conscious rats inhibits early steps in insulin signalling and induces translocation of GLUT4 and protein kinase C in skeletal muscle.

Diabetologia 45, 356-368

Houdali B., Wahl H.G., Kresi M., Nguyen V., Haap M., Machicao F., Ammon H.P.T., Renn W., Schleicher E.D., Häring H.-U. (2003)

Glucose oversupply increases $\Delta 9$ -desaturase expression and its metabolites in rat skeletal muscle. Diabetologia 46, 203-212

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Typ I Diabetes mellitus – IDDM	1
1.1.2 Typ II Diabetes mellitus – NIDDM.....	2
1.2 Die Langerhans Inseln und ihre Beeinflussung durch neuronale, humorale und parakrine Wege.....	3
1.3 Mechanismus der Insulinsekretion.....	5
1.3.1 Initiatoren der Insulinsekretion.....	5
1.3.2 Modulatoren der Insulinsekretion.....	6
1.4 Insulinwirkungen.....	7
1.5 Insulinrezeptor.....	8
1.5.1 Signaltransduktion	9
1.5.2 Insulinresistenz	10
2 FRAGESTELLUNG.....	11
3 MATERIAL	12
3.1 Versuchstiere	12
3.2 Geräte	12
3.3 Hilfsmittel für die Dauerinfusion	13
3.4 Chemikalien.....	13
3.5 Arzneistoffe	14
3.6 Elektrolytlösungen und Medien	14
3.6.1 Krebs-Ringer-HEPES-Lösung (KRH-Puffer).....	14
3.6.2 Puffer für den Linco Radioimmunoassay	16
3.6.3 Meerschweinchen-Antikörper gegen Ratteninsulin (Linco)	16
3.6.4 Puffer für die Ratteninsulinstandardlösung	16
3.6.5 ¹²⁵ J-Insulin.....	16
3.6.6 Meerschweinchen IgG Carrier (Linco).....	17
3.6.7 Ziegenantikörper gegen Meerschweinchen IgG (Linco).....	17
3.6.8 Medium für die Präparation der Inseln und die Bestimmung der Insulinsekretion.....	17
4 METHODEN.....	18
4.1 Dauerinfusion der Ratten.....	18
4.1.1 Narkose	18

4.1.2	Katheterimplantation	18
4.1.3	Katheteraufbau.....	22
4.1.4	Herstellung des Katheters	23
4.1.5	Infusion	25
4.1.6	free-moving-system: ein Modell zur Dauerinfusion von Ratten bei fast voller Bewegungsfreiheit.....	25
4.2	Isolierung der Langerhans Inseln	29
4.2.1	Modifizierte Vorschrift nach Gotoh et al. (1985) und Sutton et al. (1986)	29
4.2.2	Glukosekonzentrationen der Medien	29
4.3	Bestimmung der Blutzuckerkonzentration.....	30
4.3.1	Gewinnung der Blutproben.....	30
4.3.2	Blutzuckermessung.....	30
4.4	Bestimmung der Insulinsekretion.....	31
4.4.1	Inkubation von Langerhans Inseln.....	31
4.4.2	Insulinbestimmung über Radioimmunoassay.....	31
4.4.3	Bestimmung des Gesamtinsulingehalts	32
4.4.4	Bestimmung des Serum-Insulingehalts	32
4.5	Bestimmung des ATP/ADP-Quotienten der Inseln	32
4.5.1	Prinzip der biometrischen Bestimmung.....	32
4.5.2	Versuchsdurchführung.....	33
4.6	Bestimmung des Proteingehalts der Inseln	34
4.6.1	Meßprinzip der Bestimmung des Proteingehalts.....	34
4.6.2	Durchführung der Proteinbestimmung	35
4.7	Bestimmung des DNA-Gehalts der Inseln.....	35
4.7.1	Meßprinzip der Bestimmung des DNA-Gehalts	35
4.7.2	Durchführung der DNA-Bestimmung	35
5	ERGEBNISSE.....	37
5.1	In vivo-Untersuchungen	37
5.1.1	Einfluß einer ein- bis siebentägigen Glukosedauerinfusion auf den Blutzuckerspiegel der Ratte	37
5.1.2	Einfluß einer ein- bis siebentägigen Dauerinfusion mit Glukose oder NaCl auf den Plasmainsulinspiegel der Ratte.....	40
5.1.3	Einfluß einer ein- bis siebentägigen Dauerinfusion mit Glukose bzw. NaCl auf den insulinogenen Index	43
5.2	In vitro-Untersuchungen.....	46
5.2.1	Glukosestimulierte Insulinsekretion	46
5.2.2	Einfluß einer Inkubation mit Glukose auf die ATP/ADP-Quotienten	53
5.2.3	Einfluß einer Dauerinfusion mit Glukose auf den DNA-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte	59

5.2.4	Einfluß einer Dauerinfusion mit Glukose auf den Protein-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte	62
5.2.5	Einfluß einer Dauerinfusion mit Glukose auf den Insulin-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte	65
5.2.6	Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukose- oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Insulingehalt, bezogen auf den DNA-Gehalt der Langerhans Inseln.....	68
5.2.7	Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Insulingehalt, bezogen auf den Proteingehalt der Langerhans Inseln. .	71
5.2.8	Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/ einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Proteingehalt, bezogen auf den DNA-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.	74
5.2.9	Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Glykogengehalt von Langerhans Inseln der Ratte.	77
5.3	Zusatzversuche	80
5.3.1	Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Futterverbrauch der Ratte	80
5.3.2	Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf das Körpergewicht der Ratte	83
5.3.3	Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf die Zunahme des Körpergewichts von Ratten.....	86
5.3.4	Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf die Ausscheidung von Glukose im Urin der Ratte	89

6	DISKUSSION	90
6.1	Typ-II-Diabetes mellitus (NIDDM = Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus).....	90
6.2	Der Blutzuckerspiegel unter Dauerinfusion.....	91
6.3	Die Insulinsekretion unter Dauerinfusion	93
6.4	Inselgröße, Glykogen- und Insulingehalt unter Dauerinfusion.....	95
7	ZUSAMMENFASSUNG	99
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	102

Abkürzungsverzeichnis

μ-Ci	mikro Curie
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	bovine serum albumine
cAMP	cyclisches Adenosin-3'-5'-monophosphat
CCK	Cholecystokinin
DAG	Diacylglycerol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
GLUT2	glucose transporter isoform 2
GLUT4	glucose transporter isoform 4
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
GRP	Gastrin-releasing peptide
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-ethansulfonsäure
HLA	human leucocyte antigen
IDDM	insulin-dependent diabetes mellitus
I.E.	Internationale Einheit
IGT	impaired glucose tolerance
IP ₃	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
IRS1	insulin receptor substrate 1
KRH-Puffer	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer
MODY	maturity onset diabetes of the young
NADP	nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NADPH	nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, reduzierte Form
NIDDM	non-insulin-dependent diabetes mellitus
RIA	radioimmunoassay
SEM	standard error of the mean

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist der Überbegriff für eine Reihe von klinischen Befunden von Patienten, die unter verschiedensten Symptomen leiden, die alle von erhöhten Blutglukosespiegeln ausgehen. Sekundär kann das Syndrom Diabetes durch Pankreatektomie, Hämochromatose oder Cortisonüberproduktion bei Morbus Cushing hervorgerufen werden. Primär jedoch wird meistens zwischen 2 Hauptgruppen unterschieden: Typ I Diabetes mellitus (insulin-dependent diabetes mellitus oder IDDM) und Typ II Diabetes mellitus (non-insulin-dependent diabetes mellitus oder NIDDM).

1.1.1 Typ I Diabetes mellitus – IDDM

Charakteristisch für den Typ I Diabetes ist der absolute Insulinmangel. Der Erkrankung liegt eine Zerstörung der Langerhans Inseln zugrunde. Manifest wird der Diabetes erst, wenn ca. 90% der B-Zell-Masse zerstört ist. Verantwortlich für das Auftreten der Erkrankung sind genetische, autoimmune und exogene Faktoren.

1.1.1.1 Ursachen des Typ I Diabetes mellitus

Genetisch bedingte Faktoren gehen mit der Ausbildung der MHC (major histocompatibility complex) – codierten Moleküle der Klasse I und II einher. Die Moleküle der Klasse I werden auf jeder Zelle gebildet, während die der Klasse II auf Zellen des Immunsystems (Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten) vorkommen und mit fremden Antigenen Komplexe formen, die spezifischen T-Zellen die Erkennung von körperfremden Antigenen ermöglichen. Der MHC ist ein hoch polymorpher Genort auf dem Chromosom 6, der die Gene für die Klasse I- (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und Klasse II- (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) Moleküle enthält. Das genetisch bedingte Risiko für Typ I Diabetes wird z.B. für die weiße Bevölkerung mit dem Genort HLA-DR assoziiert, wobei die Diabetesprävalenz für Personen mit HLA-DR4 und HLA-DR3 höher ist gegenüber Personen mit HLA-DR2. Personen mit dem heterozygoten Typ HLA-DR3/4 haben ein 20 bis 40 fach höheres Risiko als die Durchschnittsbevölkerung (Gorsuch, 1987).

Die Anwesenheit von antientzündlichen Zellen (Gepts, 1965) in den Langerhans Inseln und die häufige Anwesenheit von Antikörpern gegen Inselzellen lassen auf

eine Beteiligung der zellulären und humoralen Abwehr (Bottazzo et al., 1974) im Sinne einer Autoimmunreaktion schließen.

Virusinfektionen mit Mumps-, Röteln-, Masern- und Coxsackie-Viren sind bei genetisch vorbelasteten Menschen möglicherweise der Auslöser für die Entwicklung eines Typ I Diabetes.

1.1.2 Typ II Diabetes mellitus – NIDDM

NIDDM ist durch einen relativen Insulinmangel gekennzeichnet. Hier wird zwischen Typ IIa (nicht adipös) und Typ IIb (adipös) unterschieden. Beim Typ IIa ist vor allem eine gestörte Insulinsekretion, beim Typ IIb die Insulinresistenz, eine verminderte Wirkung des Insulins an seinen Zielzellen, die Ursache. MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) ist eine Form des Diabetes, die vor allem bei jungen Menschen auftritt.

1.1.2.1 Ursachen des Typ II Diabetes

Beim Typ II Diabetes geht man auch von einer genetischen Veranlagung aus, wobei die beteiligten Gene noch nicht genau zugeordnet werden konnten. Hinweise dafür gibt die unterschiedliche Diabetes-Prävalenz für verschiedene ethnische Gruppen. Auch haben jungen Patienten (25-40 Jahre), die Typ II Diabetes entwickeln, oft Eltern, die beide Diabetes oder Glukoseintoleranz zeigen (O'Rahilly et al., 1987).

Da Diabetes erst nach einer jahrelangen Phase des Prädiabetes, die meistens unbemerkt bleibt, zum Ausbruch kommt, ist es schwierig, den Verlauf der Krankheit in dieser Zeit zu charakterisieren. Doch das Auftreten einer IGT (impaired glucose tolerance) scheint eng mit dem späteren Ausbruch des Diabetes verknüpft zu sein (Sartor et al., 1980, Ohlson et al., 1988). Ein gängiges Modell der Krankheitsentwicklung geht, neben der genetischen Veranlagung, von folgendem typischen Verlauf beim übergewichtigen Diabetiker aus:

Durch übermäßige Nahrungsaufnahme entwickelt sich Übergewicht. Das Übergewicht als solches scheint verantwortlich für das Entstehen einer Insulinresistenz der insulin-abhängigen Gewebe zu sein. Als Folge kommt es zu einer Hyperglykämie, die oft über Jahre noch durch eine Hyperinsulinämie ausgeglichen werden kann. Erst nach jahrelanger B-Zell-Überstimulation, wenn die Langerhans Inseln die benötigte Insulinmenge nicht mehr liefern können oder die periphere Insulinresistenz weiter zugenommen hat, kommt es zum endgültigen Entgleisen des Blutzuckerspiegels:

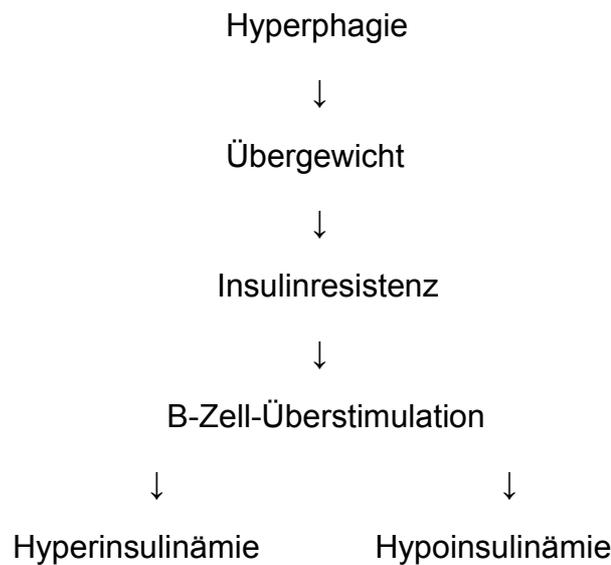


Abb. 1.1.2.1: Möglicher Mechanismus der Entwicklung eines Typ-IIb-Diabetes

1.2 Die Langerhans Inseln und ihre Beeinflussung durch neuronale, humorale und parakrine Wege

Die Bauchspeicheldrüse sezerniert als exokrine Drüse Verdauungsenzyme und alkalische Flüssigkeit für die Nahrungsverdauung und gibt sie über den Ductus pancreatus in das Duodenum ab. Nur etwa 1% der Bauchspeicheldrüse besteht aus Langerhans Inseln, die den endokrinen Teil des Pankreas bilden. Ungefähr 1 Million Inseln mit einem Durchmesser von 20-800 µm liegen als komplexer eigenständiger Zellverband (Volk und Wellmann, 1985) verstreut im exokrinen Pankreasgewebe. Dieser Zellverband besteht aus vier unterschiedlichen endokrinen Zelltypen. Den Hauptteil von 60-90% machen die insulinproduzierenden B-Zellen aus, die vor allem den Kern der Langerhans Insel bilden. Vorwiegend in der Peripherie der Insel befinden sich die glukagonproduzierenden A-Zellen (15-20%), die somatostatinbildenden D-Zellen (5-15%) und zu etwa 1% die PP-Zellen, die das pankreatische Polypeptid produzieren (Ashcroft und Rorsman, 1989; Pipeleers et al., 1985). Diese beeinflussen sich gegenseitig über ihre sezernierten Hormone und werden auch über das vegetative Nervensystem beeinflusst.

Hier steigern gastrointestinale Peptidhormone, die während des Verdauungsvorgangs gebildet werden, die Insulinsekretion.

1.3 Mechanismus der Insulinsekretion

Maßgeblicher Auslöser für die Insulinsekretion ist die im Blut zirkulierende Glukose, die insulinunabhängig in die B-Zelle mit Hilfe des GLUT-2-Glukosetransporters (Thorens et al., 1988) aufgenommen wird und intrazellulär hauptsächlich über den Glykolyseweg metabolisiert wird. Der daraus resultierende Anstieg des ATP/ADP-Quotienten schließt den ATP-abhängigen Kaliumkanal (Ashcroft und Rorsman, 1989; Rorsman und Trube, 1985), wodurch eine Depolarisation der Zelle eingeleitet wird. Die Depolarisation führt zum Öffnen spannungsabhängiger Calciumkanäle und damit zum Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration. Die intrazelluläre Calciumerhöhung aktiviert Ca-abhängige Prozesse wie z. B. Ca-Calmodulin-abhängige Proteinphosphorylierungen, die für die Verschmelzung der Insulingranula mit der Zellmembran und somit für die Exocytose verantwortlich sind (Arkhammer et al., 1987; Ashcroft et al., 1994).

1.3.1 Initiatoren der Insulinsekretion

Substanzen, die eine Insulinsekretion auslösen können, werden als Initiatoren der Insulinfreisetzung bezeichnet. Dazu zählen Nahrungsbestandteile, wie z.B. metabolisierbare Kohlenhydrate (Glukose, Mannose, Fruktose), bestimmte Aminosäuren (Arginin, Leucin) und kurzkettige Fettsäuren (Buttersäure, Oktansäure), aber auch antidiabetische Pharmaka (Sulfonylharnstoffe).

Als der wichtigste Initiator der Insulinsekretion ist die Glukose zu nennen, die aufgrund ihrer Metabolisierung zu einer Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten und zum Schließen des ATP-abhängigen Kaliumkanals führt. Auf gleichem Weg sorgen auch andere Substanzen, wie z.B. Glycerinaldehyd, Leucin (McDonald, 1990) und Mannose, für eine Insulinfreisetzung.

Die beiden Aminosäuren Lysin und Arginin werden in die B-Zellen aufgenommen und bewirken aufgrund ihrer positiven Ladung eine Ladungsverschiebung, die in einer Depolarisation der Zelle resultiert (Yada, 1994). Dadurch werden die spannungsabhängigen Calciumkanäle geöffnet und eine Insulinsekretion ausgelöst.

Die zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II (NIDDM) eingesetzten Sulfonylharnstoffderivate (z.B. Tolbutamid, Glibenclamid) schließen durch einen direkten Angriff den ATP-abhängigen Kaliumkanal. Dieser Kaliumkanal besitzt

zusätzlich zu einer porenbildenden Einheit (Kir6.2) eine Sulfonylharnstoffbindungsstelle (SUR) (Inagaki et al., 1995), an die die Pharmaka binden und den Kanal schließen. Dies führt glukoseunabhängig zur Depolarisation der Zelle und nachfolgenden Insulinsekretion.

1.3.2 Modulatoren der Insulinsekretion

Unter Modulatoren der Insulinsekretion versteht man Substanzen unterschiedlicher Herkunft, die eine bereits ausgelöste Insulinsekretion entweder verstärken oder abschwächen können. Hierzu zählen verschiedene gastrointestinale Hormone (CCK, GIP, GLP-1), die Inselhormone (Glukagon, Somatostatin, Insulin), Neuropeptide (VIP, GRP, Galanin) und Neurotransmitter (Acetylcholin, Noradrenalin) (Ammon und Wahl, 1989; Berggren et al., 1992).

Die Modulation erfolgt hauptsächlich über Phosphorylierungsvorgänge, bei denen die Proteinkinase A, die Proteinkinase C und verschiedene Phosphatasen beteiligt sind. Die Aktivierung der membranständigen Adenylatcyclase durch Peptidhormone führt zu einem Anstieg des zellulären cAMP-Gehaltes. Dies führt zu verstärkten Proteinphosphorylierungen durch die Proteinkinase A, wodurch z.B. der Calciumeinstrom über den L-Typ-Calciumkanal gesteigert wird. Zusätzlich wird jedoch auch ein direkter Angriff des cAMP bei der Exocytose der Sekretionsgranula postuliert (Ämmälä et al., 1993). Die durch ein G-Protein aktivierte Phospholipase C spaltet das aus der Membran stammende Substrat in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) (Best, 1983). IP3 erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration der B-Zellen, indem es aus intrazellulären Speichern (z.B. aus dem endoplasmatischen Retikulum) Calcium freisetzt, und verstärkt somit die durch andere Substanzen ausgelöste Insulinsekretion. DAG ist der physiologische Aktivator der Proteinkinase C (Berridge, 1983), durch die offensichtlich die Acetylcholinmodulation der Insulinsekretion vermittelt wird (Persaud et al., 1991).

Auch eine Veränderung des Redoxstatus im Bereich des NADPH/NADP-Quotienten kann die Insulinsekretion modulieren (Ammon und Wahl, 1994).

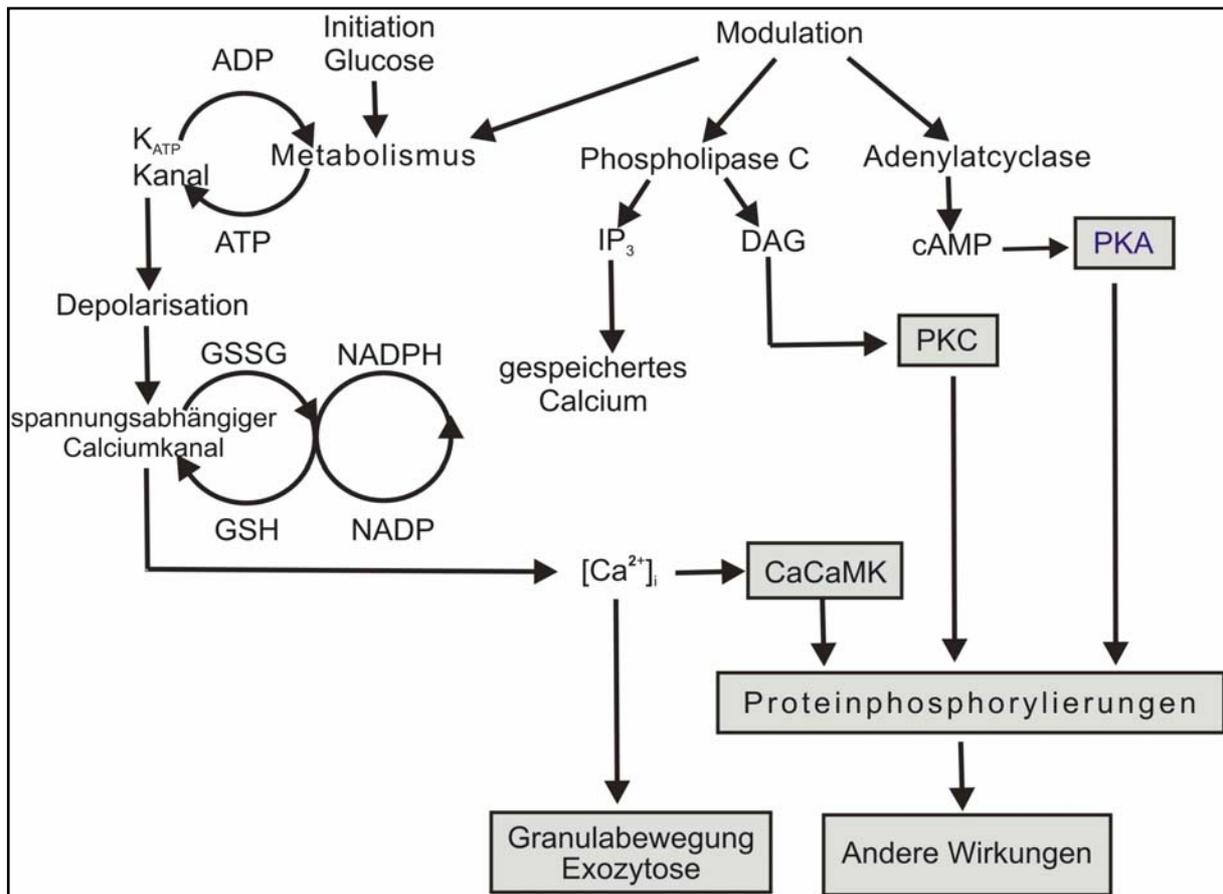


Abb. 1.3.2: Modell zum Mechanismus der Insulinsekretion (Ammon, 1995)

1.4 Insulinwirkungen

Durch die Bindung des Insulins an einen spezifischen Rezeptor in der Plasmamembran wird eine Kette an Vorgängen in Gang gesetzt, an deren Ende sich folgende Effekte an den Zielzellen Muskel, Fett und Leber zeigen:

1. Aktivierung von Membrantransportprozessen (Ionen, Glukose, Aminosäuren)
2. Stimulierung anaboler Effekte wie Glykogensynthese, Lipogenese und Proteinsynthese
3. Hemmung kataboler Effekte wie Lipolyse, Proteolyse und Glykogenolyse
4. Stimulierung von RNA- und DNA-Synthese und somit Zellwachstum bestimmter Zelltypen

1.5 Insulinrezeptor

Das Vorhandensein eines spezifischen Insulinrezeptors wurde zu Anfang der 70er Jahre von einigen Arbeitsgruppen postuliert (Cuatrecasas, 1971; Freychet, 1971; Kono und Barham, 1971). Inzwischen liegen zahlreiche Studien über dessen Struktur und Funktion vor.

Der Insulinrezeptor ist ein transmembranäres Glykoprotein von ca. 400kDa, welches sich aus zwei α -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 135kDa (Goldfine, 1987) und zwei β -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 95kDa zusammensetzt (Jakob und Cuatrecasas, 1981).

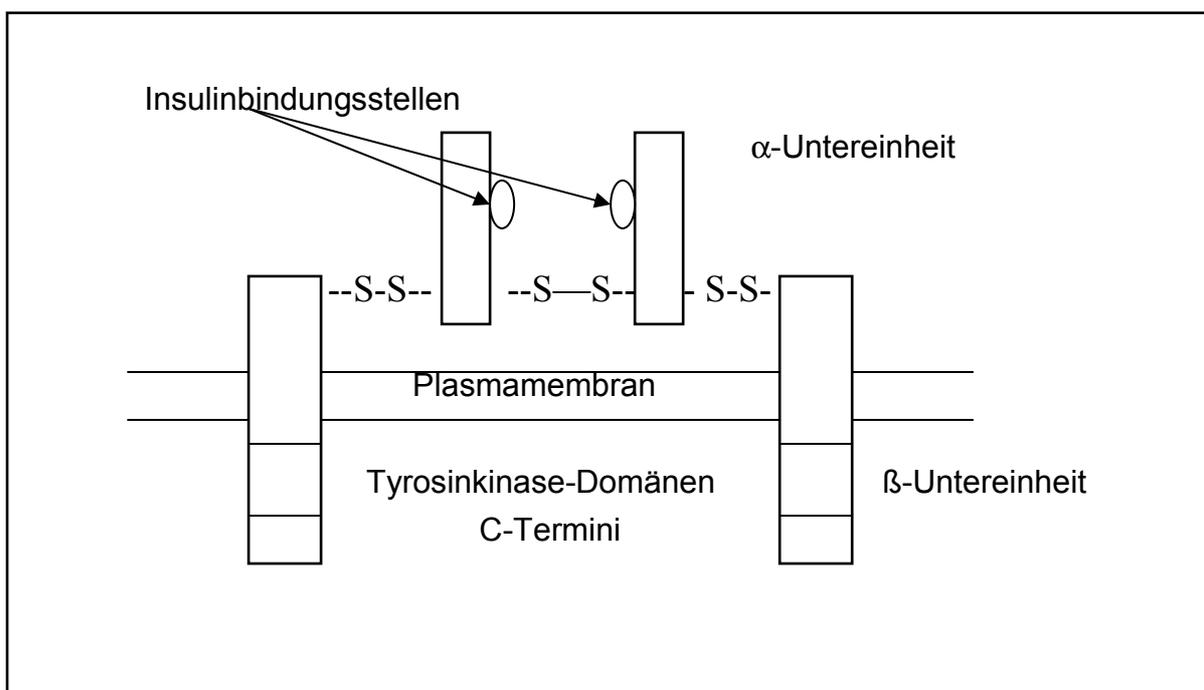


Abb. 1.4.1: Schematischer Aufbau des Insulinrezeptors

Während sich die α -Untereinheiten ausschließlich an der Außenseite der Plasmamembran befinden, bestehen die beiden β -Untereinheiten des Insulinrezeptors aus einem extrazellulären, einem transmembranären sowie einem intrazellulären Anteil. Die Insulinbindungsstelle liegt in der α -Untereinheit (De Meyts et al. 1988, 1989). Im intrazellulären Bereich der β -Untereinheit befinden sich verschiedene für die Insulinsignalübertragung wichtige Domänen v.a. Tyrosinkinase.

1.5.1 Signaltransduktion

Durch die Insulinbindung an die α -Untereinheit kommt es zu einer Dimerisation und zu einer Konformationsänderung der α -Untereinheiten (Debant et al., 1989).

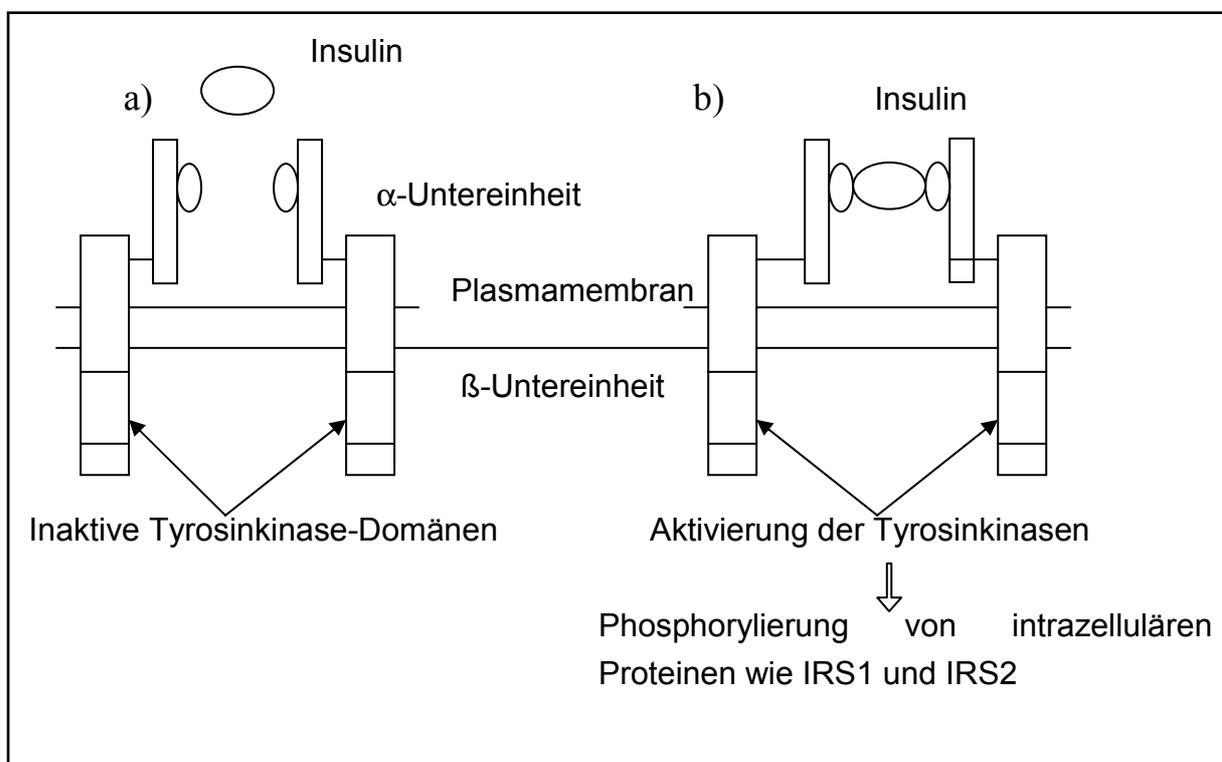


Abb. 1.4.2: Insulinrezeptor-Signalübertragung

Anschließend wird die Autophosphorylierung der Insulinrezeptor- β -Untereinheit stimuliert. Dabei werden mehrere Tyrosinreste phosphoryliert. Nach Shulman et al. spielt sich am Insulinrezeptor folgendes ab:

Die Tyrosinkinase des Insulinrezeptors ist an sich aktiv; sie wird jedoch durch die α -Untereinheit sterisch gehemmt. Nach Insulinbindung ändert die α -Untereinheit ihre Konformation und hebt dadurch ihre sterische Inhibition der Tyrosinkinase in der β -Untereinheit auf (Shulman, 1990).

Nach der Autophosphorylierung d.h. nach der Aktivierung des Insulinrezeptors kommt es zur Phosphorylierung von Substraten u.a. Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS1) und Insulinrezeptorsubstrat 2 (IRS2). Diese können Proteine wie die Phosphatidylinositol-3-Kinase, die Phosphatase PTD1D (SHP2), das Growth-Factor-Receptor-Binding-Protein-2 (Grb2) und -7 (Grb7) sowie die Phospholipase $C\gamma$ (PLC γ) binden. Die Anlagerung solcher Proteine an IRS1 und IRS2 initiiert verschiedene Signalwege mit den Resultaten wie dem Glukosetransport in die Zelle, der Glykogensynthese, der DNA-Synthese, der Proteinsynthese und anderem mehr.

1.5.2 Insulinresistenz

Glukose stellt eine der wichtigsten Energiequellen des Organismus dar. Störungen in diesem Glukosetransportsystem und somit auch in der Insulinsignalübertragung können die Entstehung von Krankheiten wie z. B. Diabetes mellitus hervorrufen (Friedmann et al., 1991; Vogt et al., 1992). Neben einem genetischen Defekt, der für den Typ-II-Diabetes bislang noch nicht identifiziert werden konnte, spielt die sekundäre Verminderung der Insulinsensitivität beziehungsweise das Vorhandensein und die Zunahme der Insulinresistenz durch theoretisch reversible Faktoren wie Bewegungsmangel, Adipositas und Hyperglykämie ebenso eine bedeutsame Rolle. Unter Insulinresistenz versteht man eine verringerte biologische zelluläre Antwort auf endogenes und/oder exogenes Insulin. Wann sich der Diabetes mellitus manifestiert, hängt es auch wesentlich von der Existenz solcher oben genannter Insulinresistenz-Faktoren ab. Einen wichtigen Insulinresistenz-Faktor stellt die Hyperglykämie dar (DelPrato et al., 1994). So führte im Zellmodell eine kurzzeitige Inkubation (30 Minuten) mit 10mM Glukose, entsprechend einem Blutzuckerwert von ca. 200 mg/dl zu einer verminderten Aktivierung des Insulinrezeptors und zu einer verminderten Substratphosphorylierung IRS1 (Berti et al., 1994). Obwohl es durchaus Hinweise für kompensatorische Signalwege bei der Inhibition von Insulinsignalübertragungsproteinen auf Postrezeptorebene gibt (Araki et al., 1994): die IRS1-Knockout-Maus zeigt keinen Diabetes mellitus, da IRS2 zumindest teilweise kompensatorisch die Funktion von IRS1 übernehmen kann, kann die zelluläre Insulinübertragung offensichtlich später nicht mehr kompensiert werden, da die Hyperglykämie auch eine Hemmung des Glukosetransportes (unabhängig von der Glukosetransporter-Downregulation) und der mitogenen Effekte des Insulins verursacht (Berti et al., 1994; Müller et al., 1991). Inwieweit sich eine chronische Hyperglykämie z.B. über mehrere Tage im Tiermodell im gesamten Organismus auf die Insulinresistenz auswirkt, muß noch untersucht werden. Im Rahmen unseres Projektes hat Herr B. Houdali diesen Teil der Experimente übernommen.

2 Fragestellung

Der Typ II Diabetes ist im Frühstadium gekennzeichnet durch eine Hyperinsulinämie, eine beginnende Insulinresistenz und eine geringe Hyperglykämie. Sie sind u.a. Folge einer permanent hyperkalorischen Ernährung, von Bewegungsmangel und als Folge von Übergewicht. Für die Deponierung der Nahrungsbestandteile Glukose, Fettsäuren und Aminosäuren ist die ausreichende Verfügbarkeit von Insulin sowie dessen ausreichende Wirkung auf die Zielgewebe Muskulatur, Leber und Fettgewebe Voraussetzung. Eine permanente hyperkalorische Ernährung muß daher Auswirkungen auf Bereitstellung und Wirkungen des Insulins haben.

Im Rahmen einer größer angelegten Versuchsreihe sollte daher untersucht werden, wie sich eine 5-tägige hyperkalorische Glukosezufuhr (Dauerinfusion) bei der Ratte auf Blutzucker und Verfügbarkeit von Insulin (diese Dissertation) sowie Insulinwirkungen auf Muskelgewebe (Dissertation B. Houdali, 2000) auswirken.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher folgende Fragen untersucht werden:

- Wie verhalten sich Blutzuckerspiegel, Blutinsulinspiegel und Insulinogener Index nach einer hyperkalorischen Dauerinfusion von Glukose über 2 bis 5 Tage?
- Findet sich auch zu dieser Zeit eine stärkere oder schwächere Sensibilisierung der Insulinsekretion wie von Bacher und Brändle (Dissertationen M. Bacher, 1995 und W. Brändle, 1995) nachgewiesen?
- Ist eine mögliche gesteigerte Insulinsekretion auf eine Hyperplasie bzw. Hypertrophie Langerhanscher Inseln zurückzuführen?
- Wie verhält sich der Insulingehalt der Langerhans'schen Inseln nach 5 Tagen Dauerinfusion?
- Wie verhalten sich Futteraufnahme und Körpergewicht?

Ergebnisse dieser Arbeit und der Dissertation von B. Houdali sind inzwischen in der Zeitschrift Diabetologia [45:356-368 (2002) und 46:203-212 (2003)] publiziert.

3 Material

3.1 Versuchstiere

Für sämtliche Versuche wurden weibliche Wistar Ratten (Charles River, Deutschland) mit einem Gewicht von 250-300 g verwendet. Das Alter der Ratten lag zwischen zwei und vier Monaten. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen bei einer konstanten Temperatur von 24°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55-60% und einem Tag- / Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Sie erhielten Standardtrockenfutter (Altromin, Lage/Lippe) und Trinkwasser ad libitum.

3.2 Geräte

Gamma-Counter:	Clinigamma 1272, LKB Wallac, Turku, Finnland
LSC-Zählgläser:	Minivials 2000, Zinsser, Frankfurt a.M.
Magnetrührer:	IKA-Kombimag RCT, Janke & Künkel, Staufen i. Breisgau
Membranfilter:	Minisart NML 0,2µm Porendurchmesser, Sartorius, Göttingen
Infusionspumpen:	Perfusor EDL 2 Spritzenpumpe mit 2 Kunststoffeinmalspritzen 0,1-29,9ml/h, Braun, Melsungen
Mikroskop:	Stereolupe SM6, Nikon, Japan
Mixer:	Whirlmix, Vortex-Genie, Milten, Niederlande
pH-Meter:	Digital-pH-Meter 646, Knick
Reagenzgefäße:	Polystyrolröhrchen, Vetter, Ammerbuch
Thermostat:	Eppendorf Gerätebau, Meckenheim
Wasserbad:	Schüttelwasserbad, Köttermann, Hänigsen
Zentrifugen:	Beckmann Microfuge B, Kühlzentrifuge Cryofuge 203, Heraeus

Die hier nicht ausdrücklich aufgeführten Geräte entsprechen der üblichen Ausstattung in wissenschaftlichen Labors.

3.3 Hilfsmittel für die Dauerinfusion

Blutentnahmekapillaren:	Capilette 10µl, Selzer, Waghäusl
free-moving-system:	Käfig Eigenbau, vgl. Kapitel 4
Kabelbinder:	Polyamid, 20 cm lang, 2,5 mm breit, Conrad Electronic, München
Katheter:	Eigenbau, vgl. Kapitel 4, bestehend aus:
Silikonschlauch:	Silastic, 0,5mm I.D., 1,00 mm A.D., Dow Corning Corporation, Medical Products, Midland, MI, USA
Silikongewebe:	Silastic, Dicke: 0,178 mm, USA
Polyethylenschlauch:	0,5 mm I.D., 1,00 mm A.D., Vetter, Ammerbuch
Miniature swivel:	drehbarer Einkanal Infusionskopf, ZAK-Medizintechnik, München

3.4 Chemikalien

Adenosin-5'-Diphosphat:	Boehringer Mannheim
Adenosin-5'-Triphosphat:	Boehringer Mannheim
Alpha-D-Glucose:	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg
Collagenase:	Worthington Biochemicals, USA
Cystein:	Boehringer Mannheim
EDTA-Na:	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Insulin Radioimmunoassay Kit:	Linco Research, St. Louis, USA
	- Guinea Pig IgG Carrier
	- Guinea Pig Anti Rat Insulin Serum
HEPES:	2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Roth, Karlsruhe
¹²⁵ Jod-Insulin:	A-14 Schweineinsulin, 360 mCi/mg
Ratteninsulinstandard:	Novo Research Institute, Bagsvaerd, Dänemark
Rinderserumalbumin:	Sigma Chemicals, St. Louis, USA

Alle anderen, nicht aufgeführten Substanzen wurden in pro analysi Qualität von Merck, Darmstadt bezogen.

3.5 Arzneistoffe

Atropinsulfatlösung: 1 mg/ml, Universitätsapotheke, Tübingen

Glukose-Lösung 50%: Glucosteril[®] 50%, Fresenius, Bad Homburg

Heparin 5000 I.E. /ml: Liquemin[®], Roche, Grenzach

Ketamin 50 mg/ml: Ketanest[®], Parke-Davis, Freiburg

NaCl-Lösung 0,9%, steril: Universitätsapotheke, Tübingen

NaCl-Lösung 0,45%: Braun, Melsungen

PS-Puder: Pitman-Moore, Burgwedel

PVP-Jod-Lösung: Betaisodona[®], Mundipharma, Limburg

Xylasin: Rompun[®], Bayer, Leverkusen

3.6 Elektrolytlösungen und Medien

3.6.1 Krebs-Ringer-HEPES-Lösung (KRH-Puffer)

Der verwendete KRH-Puffer weist die folgende Zusammensetzung auf:

NaCl	122,0 mM
KCL	4,8 mM
CaCl ₂	2,5 mM
MgCl ₂	1,1 mM
HEPES	10,0 mM

Es erwies sich als zweckmäßig, drei getrennte konzentrierte Stammlösungen des Puffers herzustellen.

Stammlösung A:

NaCl	71,30 g
KCl	3,69 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2,24 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 g

Stammlösung B:

CaCl ₂ · 2H ₂ O	3,67 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 g

Stammlösung C:

HEPES	23,83 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 g

Diese Stammlösungen wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und kurz vor Versuchsbeginn folgendermaßen gemischt und verdünnt:

Stammlösung A:	1 Teil
Stammlösung B:	1 Teil
Stammlösung C:	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teile

Dieser Puffer wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Der KRH-Puffer zeichnet sich durch eine hohe pH-Stabilität aus.

3.6.2 Puffer für den Linco Radioimmunoassay

NaCl	9,00 g
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	12,35 g
KH ₂ PO ₄	0,65 g
EDTA	9,30 g
EMTSA	0,10 g
Aqua bidest.	ad 900,0 g

Dieser Puffer wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und anschließend mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 1000,0 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde bei 4°C maximal einen Monat gelagert.

3.6.3 Meerschweinchen-Antikörper gegen Ratteninsulin (Linco)

Der in gefrorener Form gelieferte Antikörper wurde mit 20 ml Linco Assay Puffer unter Zusatz von 1% BSA verdünnt und anschließend in Aliquots zu je 0,4 ml bei -20°C bis zur weiteren Verwendung vorrätig gehalten.

3.6.4 Puffer für die Ratteninsulinstandardlösung

Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	5,77 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,05 g
Thiomersal	0,24 g
NaCl	6,00 g
Aqua bidest.	ad 1000,00 g

Das Insulin wurde auf eine Konzentration von 1000 IU / l verdünnt, und davon wurden jeweils 20 µl (20 mU pro Gefäß) bei -20°C gelagert.

3.6.5 ¹²⁵J-Insulin

¹²⁵J-Insulin mit einer Aktivität von etwa 21 µCi (ca. 740 kBq), was einer spezifischen Aktivität von 175 mCi / mg Insulin entspricht, wurde in 2,0 ml 1%iger Na-Azid-Lösung

(mit einem Zusatz von 1% BSA) aufgenommen und anschließend in Portionen zu 100 µl bei -20°C eingefroren.

3.6.6 Meerschweinchen IgG Carrier (Linco)

Das in gefrorener Form gelieferte Immunglobulin wurde mit 100 ml Linco assay Puffer (unter Zusatz von 3% PEG 8000) verdünnt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung vorrätig gehalten.

3.6.7 Ziegenantikörper gegen Meerschweinchen IgG (Linco)

Das in gefrorener Form gelieferte Immunglobulin wurde mit 100 ml Linco assay Puffer (unter Zusatz von 3% PEG 8000) verdünnt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung vorrätig gehalten.

3.6.8 Medium für die Präparation der Inseln und die Bestimmung der Insulinsekretion

Für die Präparation der Inseln wurde der unter 3.4.1 beschriebene KRH-Puffer verwendet, der einen BSA-Zusatz von 0,5% und Glukose in einer Konzentration von 2,8 mM bis 28 mM (vgl. Tabelle Tab. 4.6) enthielt. Der pH-Wert wurde auf 7,35 eingestellt und mehrmals während der Inselisolierung überprüft.

4 Methoden

4.1 Dauerinfusion der Ratten

4.1.1 Narkose

Für eine rasche und zuverlässig, aber nicht zu lange andauernd, wirksame Narkose wurde die folgende Kombination gewählt:

Ketanest[®] (Ketamin 50 mg/ml) und Rompun[®] im Verhältnis 3:1 und 2 Tropfen Atropinlösung pro 1 ml Mischung. Hiervon wurden 0,6 ml für eine Ratte i.p. (durch die Bauchdecke senkrecht in den Bauchraum, ohne den Gastrointestinaltrakt zu verletzen) injiziert.

Die Wirkung setzte nach ca. 5 min ein und hielt etwa 1 Stunde an. Falls die Wirkung nachließ, was durch zunehmende Reflexe des Tieres während der Operation frühzeitig zu erkennen war, konnten 0,1 bis 0,2 ml der Narkosemischung i.p. nachinjiziert werden.

Während der Operation wurden fortwährend die Narkosetiefe, die Reflexe und die Atmung überprüft.

4.1.2 Katheterimplantation

Die Ratte wurde im Brust- und Nackenbereich rasiert und die Haut mit Jodlösung (Betaisodona[®]) desinfiziert.

Anschließend wurde dem auf dem Rücken liegenden Tier mit einem halbrunden Skalpell die Haut knapp unterhalb des Schlüsselbeins durch einen Längsschnitt auf einer Länge von etwa 1,5 bis 2 cm durchtrennt.

Durch vorsichtiges Präparieren mit einer Präparierschere konnte die vena jugularis auf einer Länge von etwa 1 cm freigelegt werden.

Beim Entfernen von direkt an der Vene anliegendem Gewebe mußte darauf geachtet werden, daß das Gefäß nicht durch zu starke Belastung kollabierte, wodurch Komplikationen beim Öffnen der Vene und dem Einführen des Katheters hätten verursacht werden können.

Zur Weitung des OP-Feldes wurden durch Anlegen von je einer kleinen Klemme rechts und links die Wundränder fixiert.

Die letzten dünnen Schichten von aufliegender Gewebe wurden mit zwei spitzen geraden, mikrochirurgischen Pinzetten beiseite gezogen.

Die freiliegende Jugularisvene wurde an der kopfwärts liegenden Seite mit einer Schlinge aus Seidenfaden einmal unterfahren, umschlungen und nochmals unterfahren. Die 10 cm langen Fadenenden wurden zusammengefaßt. Die Klemme wurde angespannt und abgelegt. Dadurch wurde die Blutzirkulation unterbrochen, damit beim Öffnen der Vene keine stärkeren Blutungen auftraten. Die Vene war noch mit etwas Blut gefüllt und daher gut sichtbar.

Auf der brustwärts liegenden Seite wurde die Vene mit einem weiteren Faden einmal unterfahren. Der Faden wurde zunächst abgelegt. Die Vene konnte jetzt in dem Bereich zwischen den beiden Fäden mit einer spitzen Schere angeschnitten werden. Dann wurde der inzwischen mit einer Lösung von 50 I.E. Heparin in steriler physiologischer Kochsalzlösung gespülte und luftfrei gefüllte Katheter in die Vene eingeführt und mit dem auf der Brustseite liegenden Faden fixiert. Anschließend wurden die auf der Kopfseite liegenden Fadenenden verknotet und der Katheter an dieser Stelle durch eine Schlinge festgenäht.

Die Lage und Funktion des Katheters wurden durch vorsichtiges Injizieren von ca. 0,1 bis 0,3 ml der Heparinlösung und anschließendem Aspirieren von etwas Blut geprüft. Das Blut wurde wieder zurückinjiziert, der Katheter mit etwa 0,2 ml der dahinterliegenden Heparin-Kochsalzlösung nachgespült und direkt hinter dem Silikonvlies mit einer kleinen Bulldogg-Klemme abgedrückt. Jetzt konnte die Heparinspritze abgezogen werden, ohne daß Luft in den Katheter gelangen konnte.

Nun wurde das Tier vorsichtig auf den Bauch gedreht und die Nackenhaut hinter den Ohren durch einen 1-2 mm langen Schnitt mit der Schere durchtrennt. Durch diesen Schnitt wurde von der Nackenseite kommend eine ca. 8 cm lange Braunüle (1,2 mm Durchmesser) unter der Haut, seitlich am Hals vorbei bis zum auf der Brustseite herausschauenden Katheterende geführt. Das Katheterende wurde durch die Braunüle geschoben und diese danach abgezogen, so daß der Katheter nun direkt aus der Vene am Hals vorbei (unter der Haut) bis zum Nacken des Tieres führte. Von dort wurde er von unten in die Metallspirale des schwenkbaren Infusionskopfrägers eingeführt und auf den unteren, kanülenartigen Ansatz des vorher von der Infusionspumpe aus luftfrei mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gefluteten Infusionsdrehkopfes aufgesteckt.

Die Bulldogg-Klemme konnte jetzt entfernt werden, und die Infusion wurde mit 0,5 ml/h physiologischer Kochsalzlösung begonnen.

Die Schnittwunde auf der Brustseite wurde mit etwas steriler physiologischer Kochsalzlösung ausgespült, trocken getupft, mit Penicillin-Sulfonamid-Wundpuder bestreut und mit etwa 5-6 Stichen genäht. Nun wurde das Tier auf den Bauch gedreht, damit der kleine Schnitt am Nacken mit einem Stich verschlossen werden konnte. Anschließend wurde der Faden zweimal direkt durch die mittlere Bohrung der Teflonplatte am unteren Ende der Metallspirale geführt und diese mit demselben Faden direkt am Nacken des Tieres festgenäht. Als zusätzliche Sicherung und zur Kraftübertragung als stufenlos verstellbares Halsband wurde zum Schluß ein Kunststoffkabelbinder durch die Teflonplatte und um den Hals des Tieres gelegt, nicht zu fest angezogen (rundum ca. 3mm Luft), und das überstehende Ende abgezwickelt.

Das Tier konnte jetzt in den Käfig gelegt und in den Tierstall zurückgebracht werden, wo es kurze Zeit später aufwachte.

Während der Erholungszeit von 2-3 Tagen wurde die Infusionsrate bei 0,5 ml/h physiologischer Kochsalzlösung gehalten, um ein Verstopfen des Katheters mit koaguliertem Blut zu verhindern.

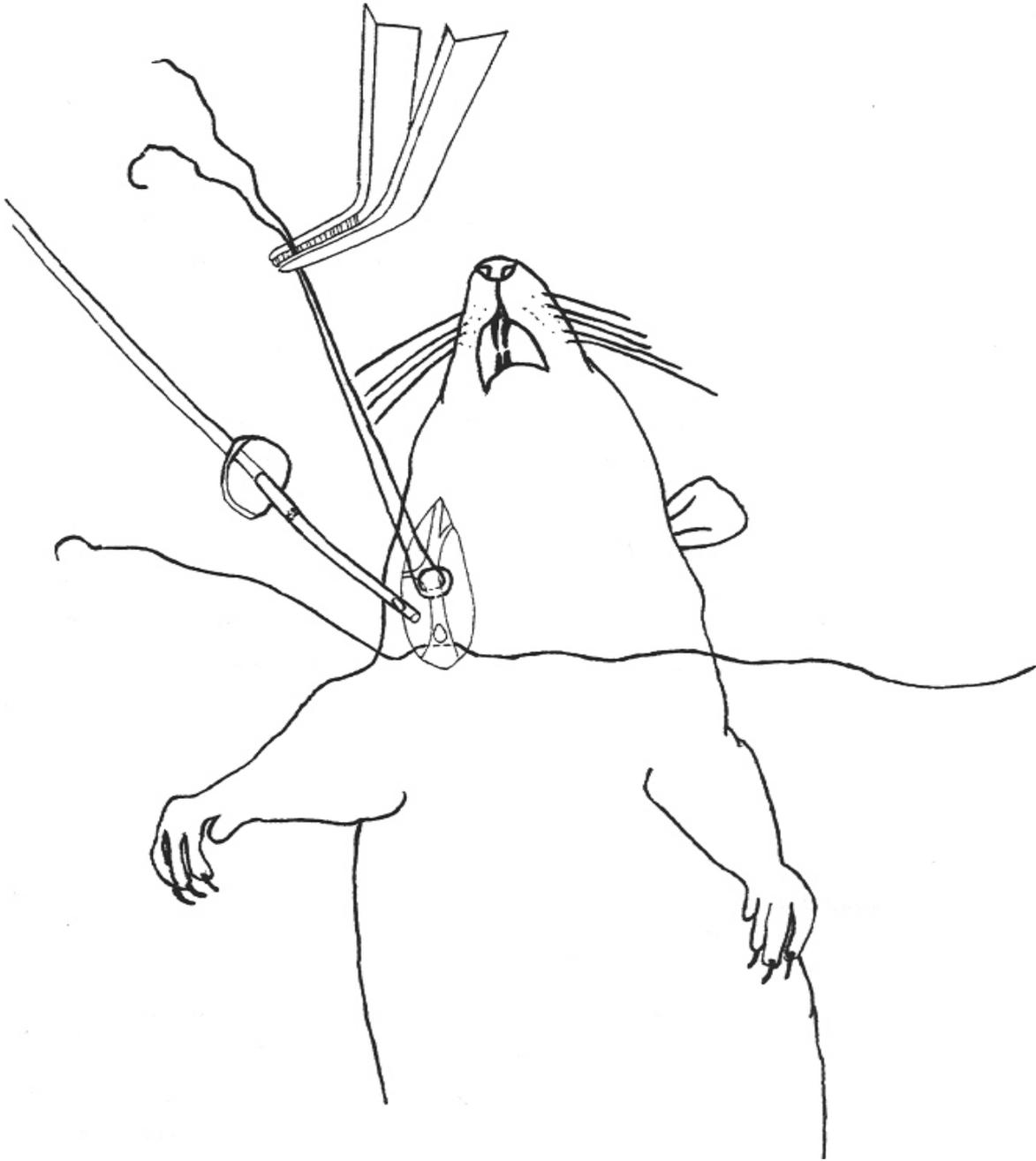


Abb. 4.1.2: Einführen des Herzkatheters in die Jugularisvene

4.1.3 Katheteraufbau

Die Implantation des Katheters in die Jugularisvene bis zum rechten Herzvorhof wurde ausgewählt, weil damit eine schnelle Durchmischung des jeweiligen Infusionsmediums gewährleistet wird. Wegen der Hypertonie der 50%igen Glukose-Lösung zur Infusion mit der Gefahr von Gefäßläsionen konnte kein peripherer Applikationsort für die i.v. Dauerinfusion gewählt werden.

Eine für diese experimentellen Anforderungen benötigte Katheterform war kommerziell nicht erhältlich. Deshalb mußte ein aus mehreren Komponenten bestehender Katheter entwickelt und selbst hergestellt werden, s. a. Brändle, (Dissert. 1995). Danach führten sämtliche Versuche mit anderen als den hier verwendeten Materialien nach mehr oder weniger kurzer Zeit wegen Inkompatibilität zum Abbruch der Infusion.

Für den im Tier verlaufenden Teil des Katheters war ein Schlauch aus Silikonmaterial aufgrund der folgenden Eigenschaften notwendig und besonders gut geeignet:

- Biokompatibilität des Silikonpolymers
- geringere Verletzungsgefahr der Gefäßintima beim Einführen und Verweilen aufgrund der hohen Flexibilität des Katheters
- weniger Fremdkörpergefühl und Behinderung des Tieres wegen der guten Biugsamkeit
- Zugspannungen werden durch die hohe Elastizität ebenfalls abgefangen, so daß die Gefahr einer Verlagerung und insbesondere des Herausrutschen des Katheters geringer ist
- im Vergleich zu starrem Kathetermaterial ermöglicht die Nachgiebigkeit der Oberfläche eine Fixierung mit einer festen Schlinge aus Seidennahtmaterial für eine dauerhafte Abdichtung an der Eintrittsstelle des Katheters ins Gefäß
- das Silikonvlies kann nur auf Silikonmaterial (mit einem speziellen Silikonklebstoff) dauerhaft haltbar verbunden werden.
- seitliche Öffnungen lassen sich leicht an der Seite des Katheters einstanzen
- längere Funktionsdauer des Katheters durch geringere Fibrinablagerungen auf der Außenseite und um Lumen des Katheters.

Aufgrund größerer mechanischer Stabilität insbesondere im Bereich des Ansatzes am Infusionskopf wurde für den außerhalb des Tieres verkaufenden Teil Polyethylenmaterial verwendet. Durch zu große Beanspruchung, z.B. wenn sich das Tier mehrmals gedreht oder geschüttelt hätte, wäre ein Schlauch aus Silikon im Bereich des Überganges zum unteren Teil des Infusionskopfes häufig eingerissen. Die einfache Fixierung des Katheters durch Nähte war nicht ausreichend, um ein Herausrutschen des Katheters aus der Vene im Verlauf der insgesamt 7-8 tägigen Infusion zuverlässig zu verhindern. Aus diesem Grund diente ein auf dem Katheter fest verklebtes Silikonvlies in ca. 0,5 cm Abstand zur Eintrittsstelle in die Vene als zusätzliche Verankerung, indem der Katheter hinter dem Vlies mit einer Schlinge an der Vene und dem Gewebe fixiert wurde.

Um eine gleichmäßigere Verteilung und die Entnahme von Blutproben durch den Katheter zu ermöglichen, mußte an der Spitze des Katheters eine zusätzliche seitliche Öffnung angebracht werden. Bei nur einer zentralen Öffnung bestand die Gefahr, daß durch den Unterdruck beim Ansaugen von Blut die Gefäßwand durch einen Ventileffekt an die Öffnung angesaugt wurde und diese blockierte.

4.1.4 Herstellung des Katheters

Zunächst wurden vom Silikonschlauch 12 cm lange Stücke und vom PE-Schlauch 32 cm lange Stücke gerade geschnitten. Vom Silikonvliesgewebe wurden 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke abgeschnitten und in der Mitte mit einer gerade abgesägten und scharf geschliffenen Kanüle (0,9 mm Durchmesser) gelocht. Der mit einem Skalpell schräg angespitzte PE-Schlauch wurde mindestens etwa 5 mm tief in den Silikonschlauch geschoben und an dieser Überlappungsstelle mit einem Baumwollfaden durch mehrere Schlingen und Knoten gesichert. Ebenfalls mit der geschärften 0,9 mm Kanüle wurde ca. 2 mm von der gerade abgeschnittenen Spitze des Katheters entfernt ein einzelnes Loch in die Katheterwand gestanzt. Das Silikonvlies wurde in 4 cm Abstand zur Spitze mit Silikonklebstoff befestigt. Nach einer Trocknungszeit von 24 h wurden mit einer kleinen Schere die Ecken des Vlies so abgeschnitten, daß eine ovale Katheterform entstand.

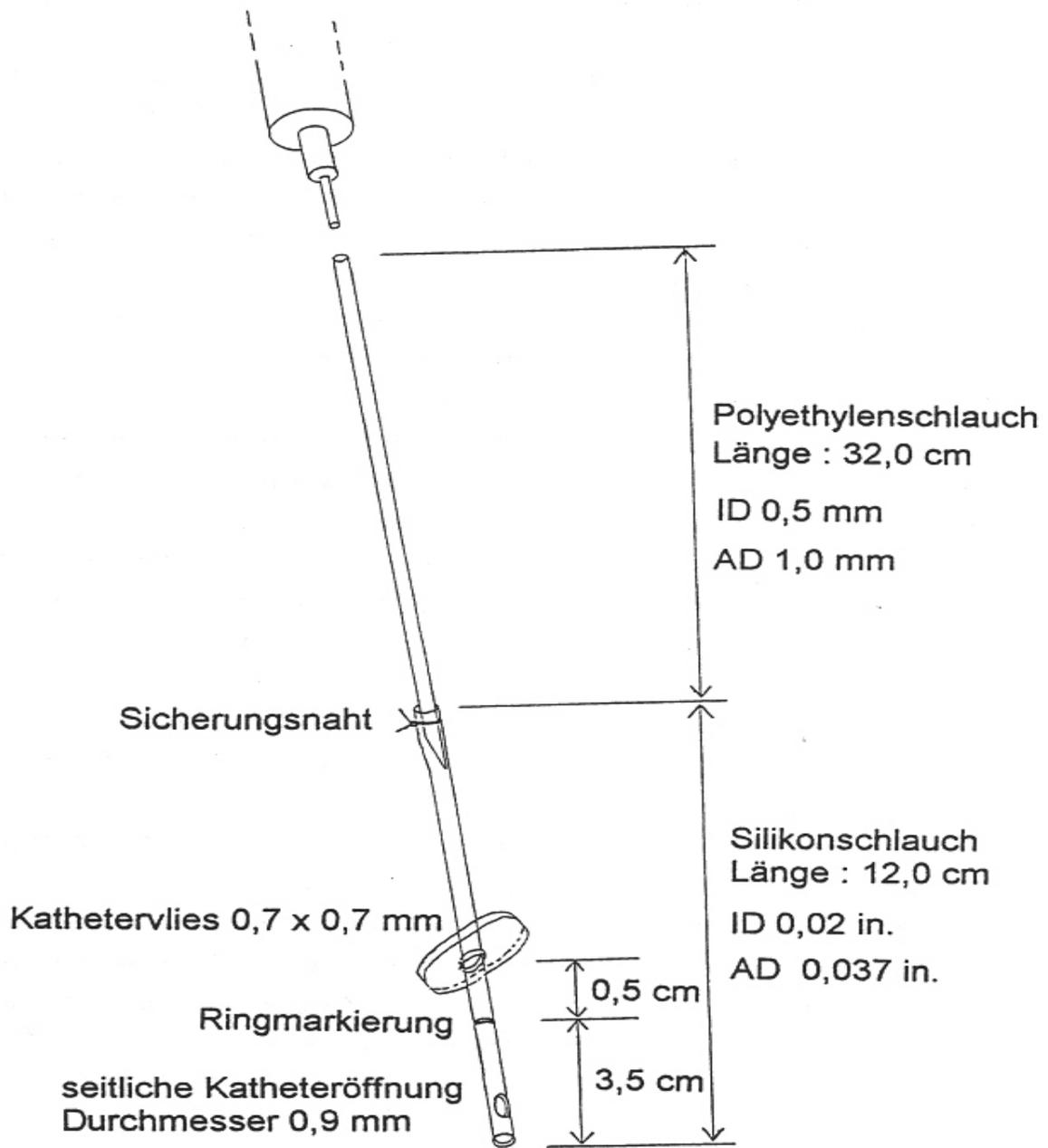


Abb.4.1.4: Aufbau des Herzkatheters (Eigenbau)

4.1.5 Infusion

Nach der 2-3 tägigen Erholungszeit erhielten die Tiere eine entweder 2 oder 5 Tage anhaltende Dauerinfusion mit einer Infusionsrate von 2 ml/h. Die Kontrollgruppe erhielt eine 0,45% Kochsalzlösung infundiert. Eine 0,9% Kochsalzlösung hätte eine Überlastung des Organismus mit NaCl nach sich ziehen können. Die Glukosegruppe erhielt eine 50% Glukoselösung mit einem Zusatz von 0,45% Kochsalz. Während der gesamten Infusionsdauer hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser. Nach der Infusion wurden die Tiere, genau wie bei der Isolierung der Inseln beschrieben, mit Diethylether narkotisiert, Katheter und Infusionssystem direkt am Tier abgetrennt und die Langerhans Inseln wie üblich isoliert. Die Infusionsdauer wurde auf 5 Tage festgesetzt, da in den ersten Versuchen eine siebentägige Infusionsdauer qualitativ keine anderen Ergebnisse bei der glukosestimulierten Insulinsekretion als eine fünftägige Infusion zeigte. Zudem lagen die Ausfallquoten bei der 7 Tage anhaltenden Infusionsdauer weit über 50 Prozent.

4.1.6 free-moving-system: ein Modell zur Dauerinfusion von Ratten bei fast voller Bewegungsfreiheit

Ein oben und unten offener Plexiglas, Durchmesser 30 cm, Länge 35 cm, wurde auf ein verchromtes Gitter aufgesetzt, das auf einem 33 cm x 33 cm Aluminiumrahmen als Basis verschraubt war. Zur Erleichterung des Einstreuwechsels wurde eine PVC-Wanne wie eine Schublade im Aluminiumrahmen unterhalb des Gitters eingeschraubt.

Seitlich am Plexiglas waren zur Befestigung eines Drahtkorbes für Trockenfutter rechteckige Öffnungen angebracht und Löcher für die Befestigung eines Metallhalters für eine Standardwasserflasche. Beides war für die Tiere in der gewohnten Höhe erreichbar. Am oberen Rand des Plexiglaszylinders wurde der schwenkbare Tragarm mit dem luft- und wasserdichten Infusionsdrehkopf am inneren und dem verschiebbaren Gegengewicht am äußeren Ende festgeschraubt.

Auf der Unterseite des Infusionsdrehkopfes an der unteren Anschlußkanüle für den Infusionsschlauch diente eine 30 cm lange lückenlos aus rostfreiem Federstahl gewickelte, stabile Spirale mit 4 mm Durchmesser als Führungsschiene für den Katheter. Dadurch wurde diese vor Beschädigungen (wie z.B. Kratzen und Beißen der Ratte) geschützt und konnte sich auch nicht verdrillen, wenn das Tier sich mehrmals umdrehte, da die Metallspirale die Drehbewegungen bis 360° drehbaren Infusionskopf weiterleitete.

Am anderen Ende des Infusionsdrehkopfes verlief die Infusion von der oberen Anschlußkanüle durch einen elastischen PVC-Schlauch mit 2 mm Außendurchmesser bis zur Infusionspumpe. Diese war mit zwei 50-ml-Kunststoffspritzen bestückt, bei denen Kanülen aufgesteckt waren, über die der PVC-Zuleitungsschlauch gezogen wurde. Die Spritzen wurden nach jedem Gebrauch heiß ausgewaschen, mit destilliertem Wasser gespült und wiederverwendet. Am unteren Ende der Metallspirale war eine 1 cm x 1 cm große, 4 mm hohe, abgerundete Teflonplatte mit vertikalen Bohrungen (zum Festnähen der Platte am Nacken des Tieres) und einer horizontal verlaufenden Durchführung für einen Polyamidkabelbinder mit 20 cm Länge und 3 mm Breite als Halsband angebracht.

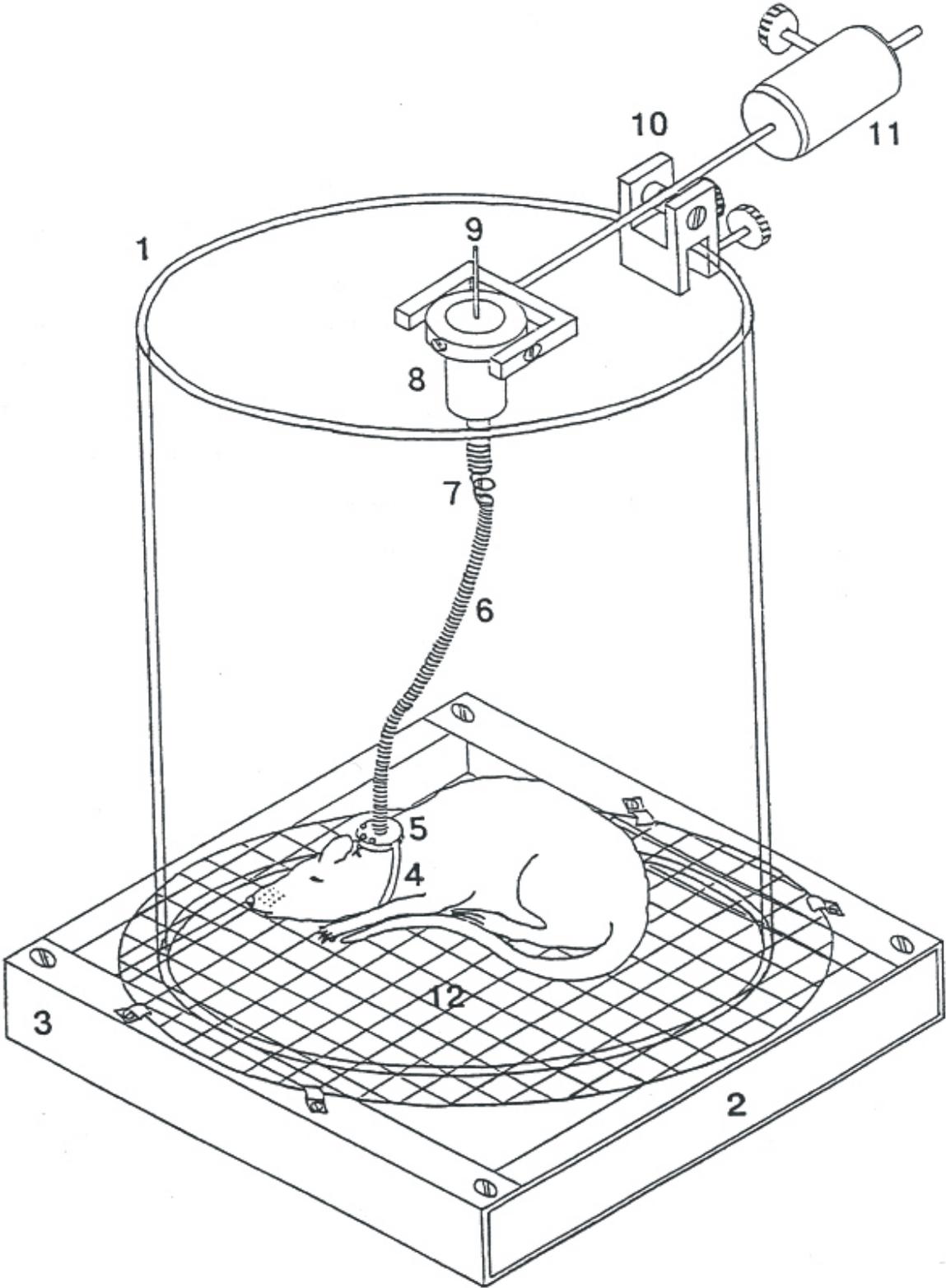


Abb. 4.1.6: Modell zur Dauerinfusion von Ratten bei voller Bewegungsfreiheit

Legende:

- 1 Plexiglaszylinder
- 2 Einstreuschubblade (PVC, verschweisst)
- 3 Käfigunterbau (Aluminium)
- 4 Halsband
- 5 Teflonplatte
- 6 Katheterschutzspirale (Inox-Federstahldraht, gewickelt)
- 7 unteres Anschlußstück am Infusionsdrehknopf
- 8 Infusionsdrehkopf (Teflon)
- 9 oberes Abschlußstück am Infusionsdrehknopf
- 10 Schwingarm
- 11 verstellbares Gegengewicht
- 12 Gitterboden

4.2 Isolierung der Langerhans Inseln

4.2.1 Modifizierte Vorschrift nach Gotoh et al. (1985) und Sutton et al. (1986)

Die Ratte wurde getötet, das Abdomen geöffnet und der Ductus pancreaticus an der Leber abgeklemmt. Ein dünner Schlauch wurde in den Ductus pancreaticus vom Darm aus eingeführt und das Pankreas mit 10 ml Kollagenaselösung (10 ml HEPES-Puffer mit 12,5 mg Kollagenase Serva) aufgebläht. Das nun gut sichtbare Gesamtorgan wurde von Duodenum, Magen und Milz abgetrennt, herausgeschnitten und 15 min bei 37° im Schüttelwasserbad inkubiert. Das Bindegewebe und der exokrine Teil des Pankreas wurden dabei aufgelöst und die kompakten Langerhans Inseln blieben erhalten. Die Verdauungsreaktion wurde durch Zugabe von kalter Pufferlösung gestoppt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand abkantiert. Dieser Waschvorgang wurde noch 2-3 wiederholt. Anschließend wurde der Inhalt des Zentrifugenglases in ein 50 ml Becherglases überführt und mit Puffer resuspendiert. Es folgte das Auslesen der einzelnen Inseln in einer schwarzen Schale unter der Stereolupe. Die Ausbeute betrug ca. 400 Inseln.

4.2.2 Glukosekonzentrationen der Medien

Um die durch die Glukosedauerinfusion erreichten Effekte zu erhalten, wurden die Inseln nach Beendigung der Infusion bis zu Beginn der verschiedenen Versuche bei der Glukosekonzentration gehalten wie sie nach zwei bzw. fünf Tage Infusion im Blut gefunden wurde:

- 18,8 mM Glukose für die Inseln der zwei Tage glukoseinfundierten Ratten und
- 7,2 mM Glukose für die Inseln von 5 Tage mit Glukose infundierten Ratten sowie für die Inseln aller Kontrolltiere

Nach der Auslese wurden die Inseln bei entsprechender Glukosekonzentration 60 min bei 37°C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Dies diente dazu, den Inseln einen Regenerationszeitraum vom Isolierungsprozeß zu verschaffen. Es ist möglich, daß durch die Collagenase Oberflächenstrukturen der Inseln und eventuell auch Rezeptoren verändert/verdaut werden. Durch den normalen Rezeptor turn-over

könnte es hier zur Regeneration kommen. Unterschiede zwischen Inseln, die durch Mikrodissektion bzw. durch enzymatische Methoden isoliert wurden, konnten von J.H. Nielsen und A. Lernmark (1983) sowie J.C. Henquin und H.P. Meissner (1984) nachgewiesen werden.

4.3 Bestimmung der Blutzuckerkonzentration

4.3.1 Gewinnung der Blutproben

Die Blutprobenentnahme wurde vor, während und nach der eigentlichen Infusion jeweils zur gleichen Uhrzeit vormittags durchgeführt.

Die Tiere erhielten über den Katheter 0,1 ml der Narkosemischung, die auch bei der Operation verwendet wurde. Anschließend wurde der Schwanz kurz angeschnitten. Mit einer Einmalkapillare mit Ringmarke wurden 10 µl Blut entnommen, mit 990 µl isotonomischer Kochsalzlösung verdünnt und bei 5000 x g die Erythrozyten abzentrifugiert.

4.3.2 Blutzuckermessung

Aus dem Überstand der Zentrifugation wurde die Glukosekonzentration mit einer modifizierten Methode der Gluco-quant[®]-Test –Kombination Hexokinase-G-6-P-Dehydrogenase-Methode bestimmt.

Glukose und zugesetztes ATP reagieren mit Hexokinase zu G-6-P und ADP. Das G-6-P reagiert mit NADP⁺ und G-6-P-DH zu Gluconat-6-P, H⁺ und NADPH. Letzteres konnte durch Bestimmung der Extinktion bei 365 nm detektiert werden. Die Extinktion wurde gegen das reine Reaktionsgemisch gemessen. Standards mit Glukosekonzentrationen zwischen 50 und 500 mg/ml wurden in derselben Weise wie die Proben behandelt. Die aus den Standards errechnete Eichkurve wurde dazu benutzt, um die Glukosekonzentration der Proben zu ermitteln. Jede Probe und jeder Standard wurde dreimal bestimmt und der Mittelwert gebildet.

4.4 Bestimmung der Insulinsekretion

4.4.1 Inkubation von Langerhans Inseln

Je 5 gleich große Inseln wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß einpipettiert, trocken gesaugt und mit 1 ml KRH-Puffer mit der jeweiligen Glukosekonzentration (0-28 mM) versetzt. Die Proben wurden 60 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Alle 15 min und nach Inkubationsende wurden die Röhrchen von Hand kurz stärker geschüttelt, um sezerniertes Insulin im Inkubationsmedium besser zu verteilen. Dies ist notwendig, um eine anhaltende Insulinsekretion zu erreichen. Andernfalls würde Insulin, welches sich in höherer Konzentration in der Nähe der Inseln befindet, über einen negativen short-loop feedback Mechanismus die weitere Insulinfreisetzung beeinträchtigen (Ammon, Reiber und Verspohl, 1991). Die Inkubation wurde im Eisbad gestoppt. Aliquote zu je 100 µl wurden abpipettiert und bei -20°C bis zur Insulinbestimmung tiefgefroren.

4.4.2 Insulinbestimmung über Radioimmunoassay

Es wurde ein Antikörper gegen Ratteninsulin verwendet. Die Trennung des gebundenen Insulins vom ungebundenen Insulin wurde mit der von Soeldner und Sloane (1965) beschriebenen radioimmunologischen Doppelantikörpermethode durchgeführt. Die Proben mit je 100 µl Eluat werden mit 100 µl Assay-Puffer (1% BSA) verdünnt. Anschließend wurden jeweils 100 µl des im Verhältnis 1:80 mit Assay-Puffer (mit BSA) verdünnten 125J-Insulin und 100 µl des 1:40 mit Assay-Puffer verdünnten Ratteninsulinantikörpers dazupipettiert. Die Proben werden gevortext. Dann wurden sie im Kühlschrank bei 4°C über Nacht gelagert, um die Insulin-Antikörper-Kopplung vollständig ablaufen zu lassen. Sodann wurde der Insulin-Antikörper-Komplex durch Zugabe von 100 µl Meerschweinchen-Serum als Carrier und von 100 µl Ziegen-Antikörper gegen Meerschweinchen-Serum gefällt. Hierzu waren 2 Stunden Zeit erforderlich. Nicht gebundenes radioaktives Insulin wurde ausgewaschen, indem 1 ml Assay-Puffer ohne BSA zugesetzt und gevortext wurde. Durch Zentrifugation bei 2500 g bildete sich ein Pellet, der Überstand konnte vorsichtig vollständig abgesaugt werden. Die Proben wurden mit Kunststoffstopfen verschlossen, in spezielle Racks umgesetzt und im Gamma-Counter ausgemessen. Ein an den Counter angeschlossener Computer wertete die Proben aus, indem mit Hilfe der Standardwerte durch ein Regressionsverfahren die Insulinkonzentration ermittelt wurde.

4.4.3 Bestimmung des Gesamtinsulingehalts

4 Inseln von jeweils gleicher Größe wurden mit 100 µl ethanolischer HCL-Lösung versetzt, 30 min bei 37°C inkubiert, gemixt und bei -20 °C eingefroren. Am Versuchstag erfolgte Zugabe von 160 µl 0,1 N NaOH und 740 µl KRH-Puffer. 10µl davon wurden mit 90 µl KRH-Puffer versetzt und im RIA eingesetzt.

4.4.4 Bestimmung des Serum-Insulingehalts

Die Blutproben wurden analog zur Bluglukose-Bestimmung (s. 3.3.1) gewonnen und 100 µl im RIA zur Insulinbestimmung eingesetzt.

4.5 Bestimmung des ATP/ADP-Quotienten der Inseln

4.5.1 Prinzip der biometrischen Bestimmung

Biolumineszenz ist charakterisiert als eine exergone, enzymkatalysierte Reaktion, deren Energie in Form von Licht abgegeben wird. Grundlegende Komponenten sind die katalysierenden Enzyme (Luciferasen) und ihre oxidierbaren Substrate (Luciferine). Bei der ATP-Bestimmung wird die Firefly-Luciferase, ein gereinigtes Präparataus dem Leuchtkäferorgan von *Photinus pyralis*, und das D-(-)-Luciferin verwendet.

Reaktionsmechanismus: D-(-)-Luciferin und ATP werden in Anwesenheit von Mg^{2+} durch Luciferase enzymatisch unter Abspaltung von Pyrophosphat in das gemischte Anhydrid Adenyl-Luciferin-Luciferase umgewandelt. Das Adenyl-Luciferin dieses Komplexes wird durch molekularen Sauerstoff oxidiert, wobei CO_2 , AMP und Oxyluciferin, das sich im elektronisch angeregten Singulettzustand befindet, gebildet werden. Beim Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand wird Licht zwischen 500 und 600 nm mit einem Maximum bei 562 nm emittiert. Bei Luciferase im Überschuß wird das ATP vollständig umgesetzt. Für ATP-Konzentrationen von 10^{-6} mol/l bis zum Detektionslimit von 10^{-14} mol/l ist die Intensität des emittierten Lichts direkt proportional zur ATP-Konzentration (Wulff und Döggen, 1985)

4.5.2.3 Durchführung der Messung

Am Versuchstag wurden die Proben aufgetaut und auf Eis gelagert. Eine Probe zu 10 µl wurde für die Bestimmung des ADP-Gehalts mit 20 µl des ADP-Reaktionsgemisches versetzt, nach 10 Minuten mit dem Vortex gemischt und durch 100 µl einer HCl-Lösung (3 mmol/l) neutralisiert. Die Probe wurde nochmals gemischt und bis zur Messung auf Eis aufbewahrt. Eine zweite Probe mit 10 µl wurde zur Bestimmung des ATP-Gehalts mit 20 µl des ATP-Reaktionsgemisches mit NaHCO_3 versetzt und mit 100 µl HCl-Lösung (3 mmol/l) neutralisiert. 50 µl der neutralisierten Probe wurden mit 200 µl Trispuffer und 50 µl Monitoring-Reagenz gemischt. Die Proben wurden in das BioOrbit-Lumineszenz-Meßgerät gestellt. Die Messung wurde sofort gestartet und die Meßzeit betrug 20 Sekunden. Die ADP-Standards wurden wie die Proben zur ADP-Bestimmung behandelt. Die ATP-Standards wurden entsprechend den Proben zur Bestimmung des ATP-Gehalts eingesetzt.

4.5.2.4 Auswertung der Meßergebnisse

Die Meßwerte der Verdünnungen der Standards zeigten eine lineare Abhängigkeit. Durch lineare Regressionsanalyse wurde je eine Eichkurve für ATP und ADP erstellt. Sowohl der ATP- als auch der ADP-Gehalt konnte direkt aus der Eichkurve entnommen werden. Der ATP/ADP-Quotient wurde aus dem Verhältnis der ATP- und ADP-Mittelwerte einer Doppelbestimmung berechnet.

4.6 Bestimmung des Proteingehalts der Inseln

4.6.1 Meßprinzip der Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt wurde mit einer modifizierten Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Es wurde ein kommerzieller Kit von BioRad eingesetzt. Das Meßprinzip beruht auf einer Komplexbildung von Coomassie Brilliant Blue G-250 mit Proteinen, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nach 595 nm verschiebt. Die entstandene Blaufärbung wurde photometrisch bestimmt. Eine Eichkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen ermöglichte die Auswertung. Der entstehende Farbstoff-Protein-Komplex war bis zu einer Stunde stabil.

4.6.2 Durchführung der Proteinbestimmung

Es wurden 20 µl Probelösung eingesetzt. Aus Rinderalbumin (Serva) wurde eine Verdünnungsreihe mit Cystein/NaOH-Lösung erstellt:

Konzentration BSA (µg/20µl): 20 15 10 7,5 5,0 2,5 1,25

10 ml des BioRad-Protein-Assay wurden mit 40 ml Aqua dest. verdünnt. Jeweils 20 µl Probelösung wurden mit 1 ml BioRad-Lösung versetzt, durchmischt und nach etwa 20 Minuten in Halbmikroküvetten im Photometer bei 595 nm gegen eine vorbereitete Reaktionslösung vermessen.

Die Auswertung erfolgte durch das Ablesen des Proteingehalts an der Eichkurve.

4.7 Bestimmung des DNA-Gehalts der Inseln

4.7.1 Meßprinzip der Bestimmung des DNA-Gehalts

Die Bestimmung des DNA-Gehalts beruht auf der Methode nach Beckmann (1981). Die von Kissane und Robins (1958) für DNA-Bestimmung in Nervengewebe entwickelte Methode wurde von Beckmann für die Bestimmung des DNA-Gehalts in Langerhans Inseln validiert. Die Methode basiert auf der Reaktion von DABA (3,5-Diaminobenzoessäuredihydrochlorid) mit der Desoxyribose-Komponente der DNA und nachfolgender fluorimetrischer Bestimmung bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm. DABA reagierte jedoch auch mit einigen anderen Aldehyden, die von Gewebelipiden stammen können. Kissane und Robins führten daher wiederholt Ethanolextraktionsschritte durch, um das Gewebe von Lipiden zu reinigen. Beckmann konnte zeigen, daß die Langerhans Inseln deutlich weniger dieser störenden Lipide enthalten als Nervenzellgewebe und verzichtete auf die Ethanolextraktion, die ebenfalls durch im Ethanol enthaltenen Acetaldehyd stören kann.

4.7.2 Durchführung der DNA-Bestimmung

Es wurden DNA-Standards mit folgenden Konzentrationen hergestellt:

DNA-Gehalt (µg/12,5µl): 1,25 0,625 0,312 0,156 0,07

12,5 µl Probelösung oder die DNA-Standards wurden mit 31,2 µl DABA-Lösung versetzt und bei 60°C für 40 Minuten unter regelmäßigem Umschütteln inkubiert. Die

auf Zimmertemperatur abgekühlten Proben wurden nach Zugabe von 625 μ l 1N HCl im Fluorimeter vermessen. Die Anregungswellenlänge war 405 nm, das Fluoreszenzlicht wurde bei 520nm detektiert. Aus den Standards wurde eine Eichgerade erstellt und daraus die DNA-Konzentrationen der Proben errechnet.

5 Ergebnisse

5.1 In vivo-Untersuchungen

5.1.1 Einfluß einer ein- bis siebentägigen Glukosedauerinfusion auf den Blutzuckerspiegel der Ratte

In Abb. 5.1.1 ist die Blutzuckerkonzentration von Ratten während der Dauerinfusion dargestellt.

Die Ratten erhielten nach der Operation eine zweitägige Erholungszeit mit einer Infusion von 0,5 ml /h einer 0,9%igen NaCl-Lösung. Dann wurden die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt. Während die erste Gruppe (**G**) bis zu sieben Tage mit 2 ml/h einer 50%igen Glukoselösung in einer 0,45%igen NaCl-Lösung infundiert wurde, erhielt die zweite Gruppe bestehend aus Kontrolltieren (**K**) für dieselbe Infusionsdauer nur eine 0,45%ige NaCl-Lösung.

Diese Kontrolltiere zeigten über den gesamten Verlauf des Versuchs einen konstanten Plasmaglukosespiegel von etwa 130mg/dl. Bei den mit Glukose infundierten Tieren sah man nach den ersten 24 h einen steilen Anstieg der Glukosekonzentration im Blut von 130mg/dl auf 470mg/dl. Danach sank der Glukosespiegel deutlich ab und erreichte ab dem fünften Tag den Wert der Kontrolltiere von ca. 130mg/dl.

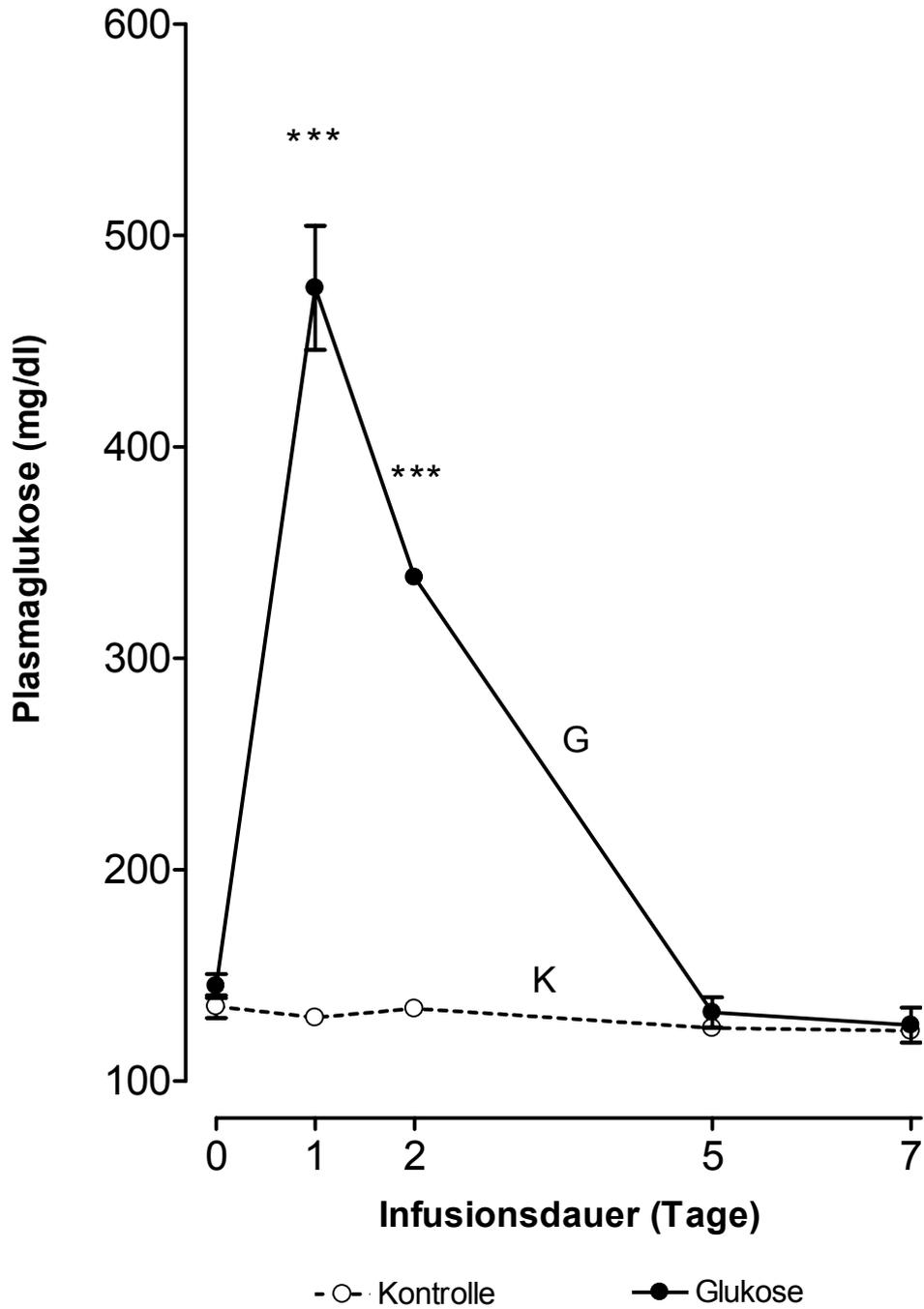


Abb. 5.1.1: Einfluß einer ein- bis siebentägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-lösung (K) auf den Blutzuckerspiegel der Ratte.

*****: $p < 0,001$**

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.1.1)

Tab. 5.1.1: Einfluß einer ein- bis siebentägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-lösung (K) auf den Blutzuckerspiegel der Ratte.

Blutzuckerkonzentration (mg/dl)					
Zeit (Tage)	0	1	2	5	7
G Glukoseinfusion	145 ± 5	475 ± 29	338 ± 3	132 ± 7	126 ± 8
K Kochsalzinfusion	135 ± 5	130 ± 2	134 ± 2	125 ± 1	123 ± 3
Statistische Auswertung: p					
G vs. K	n.s.	< 0,001	< 0,001	n.s.	n.s.
G (Zeit = 0Tag) vs. 1Tag, 2Tage, 5Tage, und 7Tage		< 0,001	< 0,001	n.s.	n.s.
K (Zeit = 0Tag) vs. 1Tag, 2Tage, 5Tage und 7Tage		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

Der Mittelwert aus 2 Doppelbestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): n = 5-6.

5.1.2 Einfluß einer ein- bis siebentägigen Dauerinfusion mit Glukose oder NaCl auf den Plasmainsulinspiegel der Ratte

Abb. 5.1.2 zeigt die Plasmainsulinkonzentration von Ratten bei permanenter Glukose- bzw. NaCl-Infusion über sieben Tage.

Während bei den Kontrolltieren über die gesamte Infusionsdauer die Plasmainsulinkonzentration bei ca. 45 $\mu\text{U/ml}$ lag, erreichte diese bei den glukoseinfundierten Ratten ein Maximum (900 $\mu\text{U/ml}$) nach den ersten 24h. Im weiteren Verlauf der Infusion sank der Plasmainsulinspiegel ab und zwar auf 155 $\mu\text{U/ml}$ nach sieben Tagen, womit er aber immer noch dreimal höher als bei den Kontrolltieren war.

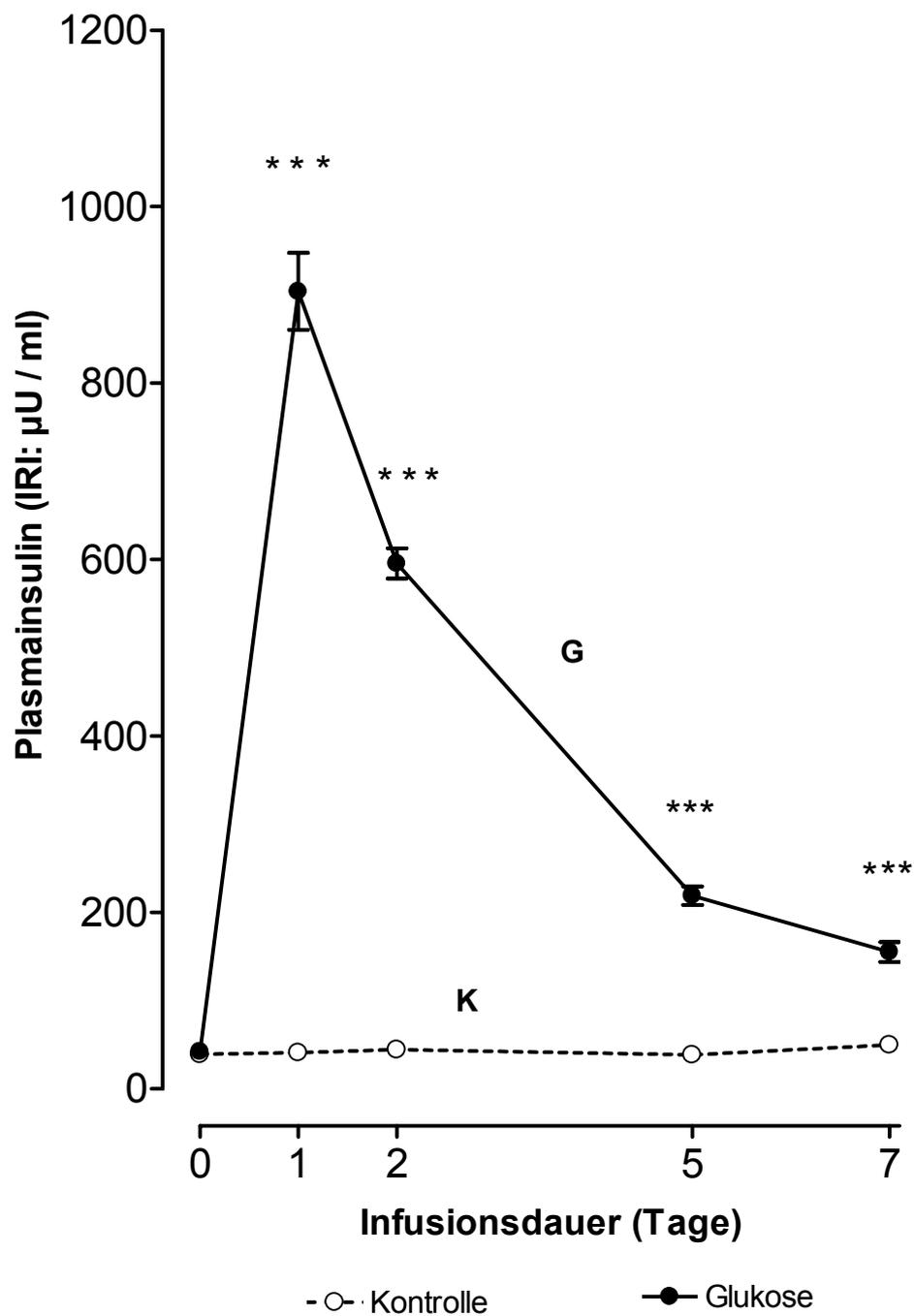


Abb. 5.1.2: Einfluß einer ein- bis siebentägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-lösung (K) auf den Plasmainsulinspiegel der Ratte.

*****: $p < 0,001$**

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.1.2)

Tab. 5.1.2: Einfluß einer ein- bis siebentägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-lösung (K) auf den Plasmainsulinspiegel der Ratte.

Plasmainsulinkonzentration ($\mu\text{U/ml}$)					
Zeit (Tage)	0	1	2	5	7
G Glukoseinfusion	42 \pm 2	903 \pm 43	595 \pm 17	219 \pm 10	155 \pm 11
K Kochsalzinfusion	39 \pm 1	41 \pm 1	44 \pm 2	38 \pm 1	49 \pm 4
Statistische Auswertung: p					
G vs. K	n.s.	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
G (Zeit = 0Tag) vs. 1Tag, 2Tage, 5Tage, und 7Tage		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
K (Zeit = 0Tag) vs. 1Tag, 2Tage, 5Tage und 7Tage		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM.

Jede Plasmainsulinmessung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

Der Mittelwert aus 3 Bestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): n = 5-6

5.1.3 Einfluß einer ein- bis siebentägigen Dauerinfusion mit Glukose bzw. NaCl auf den insulinogenen Index

Die Abb. 5.1.3 zeigt den Insulinogenen Index (das Verhältnis von Plasmainsulinkonzentration zu Blutzuckerkonzentration) bei infundierten Ratten.

Bei den Kontrolltieren liegt der insulinogene Index über die gesamte Infusionsdauer nahezu konstant bei 0,3. Dagegen steigt dieser Index bei den glukoseinfundierten Ratten nach 24h auf 1,9. Danach sinkt er langsam ab und beträgt nach sieben Tagen Infusion 1,2 und ist damit immer noch viermal größer als bei den Kontrolltieren.

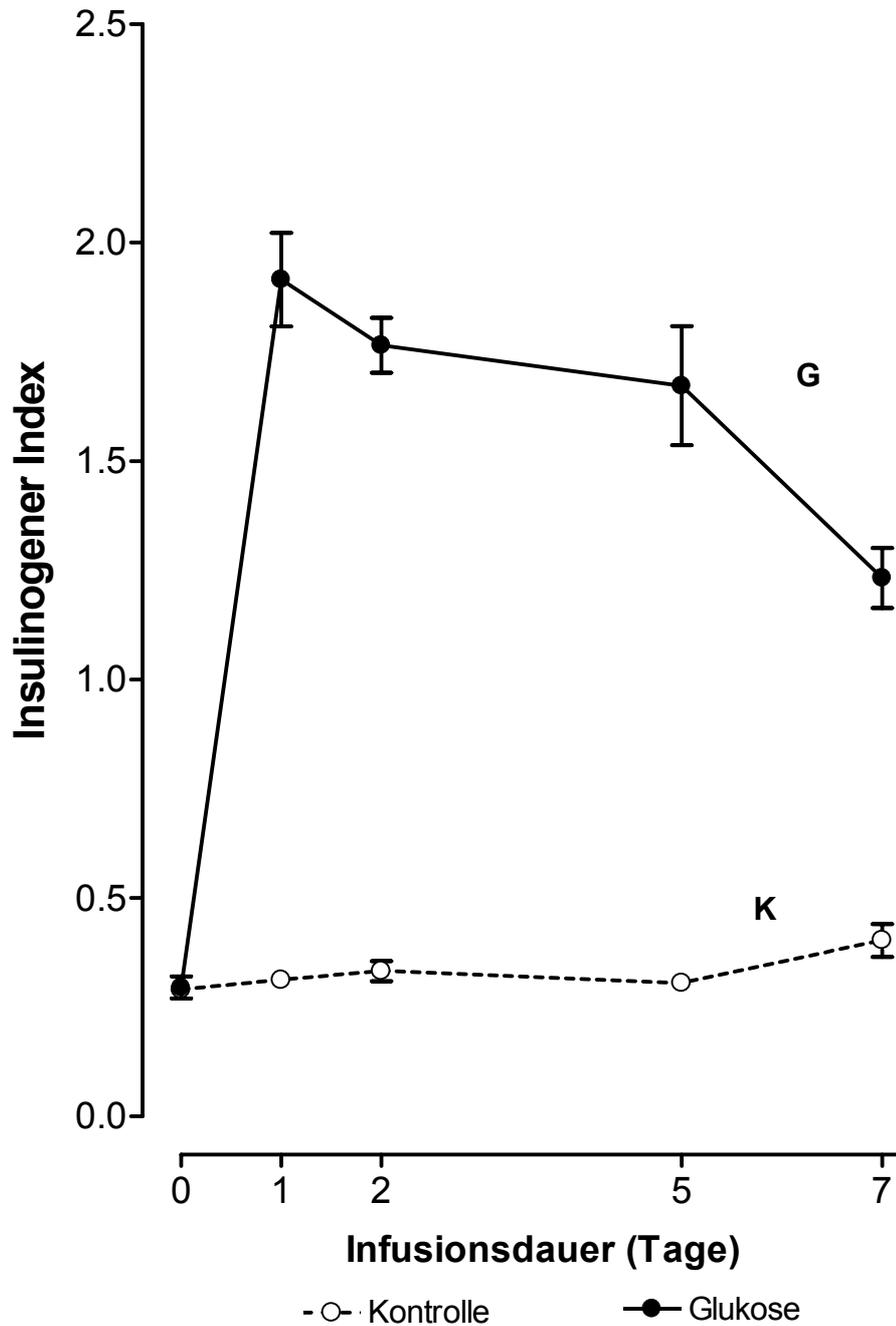


Abb. 5.1.3: Einfluß einer ein- bis siebentägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-lösung (K) auf den Insulinogenen Index der Ratte.

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.1.3)

Tab. 5.1.3: Einfluß einer ein- bis siebentägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-lösung (K) auf den Insulinogenen Index der Ratte, berechnet aus den Ergebnissen der Tabellen 5.1.1 und 5.1.2

Insulinogener Index					
Zeit (Tage)	0	1	2	5	7
G Glukoseinfusion	0,30 ± 0,03	1,92 ± 0,11	1,77 ± 0,06	1,67 ± 0,14	1,23 ± 0,07
K Kochsalzinfusion	0,29 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,40 ± 0,03

5.2 In vitro-Untersuchungen

5.2.1 Glukosestimulierte Insulinsekretion

Für die in-vitro Untersuchungen wurden Inseln von nur zwei und fünf Tage infundierten Ratten verwendet. Auf die siebentägige Infusion wurde nun verzichtet, da bei dieser Infusionsdauer die Ausfallquote sehr hoch war. Darüber hinaus wurden in Vorversuchen bei der statischen Inkubation keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Sekretion von Insulin zwischen fünf und sieben Tage glukoseinfundierten Ratten festgestellt.

Um die durch die Glukosedauerinfusion erreichten Effekte zu erhalten, wurden die Inseln nach Beendigung der Infusion bis zum Beginn der eigentlichen statischen Inkubation weiterhin bei derselben Glukosekonzentration gehalten, wie sie nach zwei bzw. fünf Tage Infusion im Blut gefunden wurde, d.h.

- 18,8 mM Glukose für die Inseln der zwei Tage glukoseinfundierten Ratten und
- 7,2 mM Glukose für die Inseln von 5 Tage mit Glukose infundierten Ratten sowie für die Inseln aller NaCl-infundierten Kontrolltiere

5.2.1.1 Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Insulinsekretion von Langerhans Inseln von Ratten nach einer zweitägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder NaCl (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2 ml/h

Die Abb. 5.2.1.1 zeigt den Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Insulinsekretion von Langerhans Inseln der Ratte nach einer zweitägigen Dauerinfusion.

Bei den Inseln der mit Kochsalz infundierten Ratten (K) tritt der typische sigmoide konzentrationsabhängige Anstieg der Insulinsekretion auf. Hierbei fällt auf, daß selbst im Inkubationsmedium ohne Glukose eine Insulinsekretion zu verzeichnen ist, welche ihr Maximum erst oberhalb von 16,8mM erreicht.

Die Inseln der glukoseinfundierten Ratten (G) zeigen im Inkubationsmedium ohne Glukose eine um ca. 9-fach höhere Insulinsekretion als bei der Kontrolle und haben schon bei 5,6mM Glukose einen Spitzenwert, welcher sich bei weiterer Erhöhung der Glukosekonzentration nicht mehr signifikant ändert.

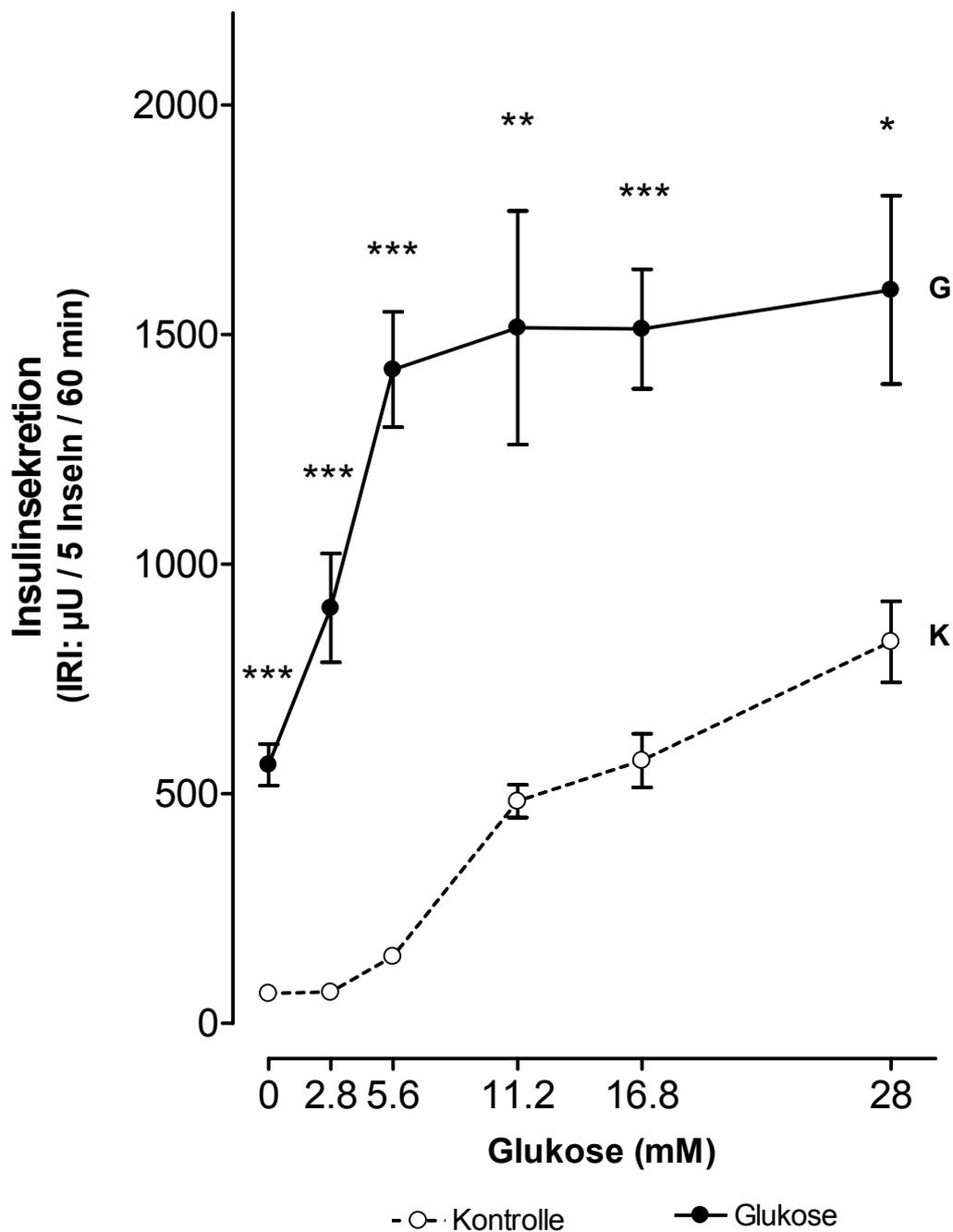


Abb. 5.2.1.1: Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Insulinsekretion von Langerhans Inseln von Ratten nach einer zweitägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder NaCl (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2 ml/h.

***: $p < 0,001$;

** : $p < 0,01$;

* : $p < 0,05$

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.1.1)

Tab. 5.2.1.1: Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Insulinsekretion von Langerhans Inseln von Ratten nach einer zweitägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder NaCl (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2 ml/h.

Insulinsekretion (μU / 5 Inseln / 60 min)						
Glukose (mM)	0	2,8	5,6	11,2	16,8	28
G Glukoseinfusion Präparation bei 18.7 mM Glukose	562 \pm 45	904 \pm 118	1423 \pm 125	1515 \pm 254	1511 \pm 130	1597 \pm 205
K Kochsalzinfusion Präparation bei 7,4 mM Glukose	64,6 \pm 8	66 \pm 8	144 \pm 17	482 \pm 35	571 \pm 58	830 \pm 88
Statistische Auswertung: p						
G vs. K	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,01	< 0,001	< 0,05
G: (0 mM Glukose) vs. 2,8mM, 5,6mM, 11,2mM, 16,8 mM und 28 mM		< 0,05	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,01
K: (0 mM Glukose) vs. 2,8mM, 5,6mM, 11,2mM, 16,8 mM und 28 mM		n.s.	< 0,01	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM.

Der Mittelwert aus 2-3 Doppelbestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): n = 5-6.

5.2.1.2 Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Insulinsekretion von Langerhans Inseln von Ratten nach einer fünftägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder NaCl (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2ml/h

Aus Abb. 5.2.1.2 geht hervor, daß nach der fünftägigen Dauerinfusion die Langerhans Inseln von kochsalzinfundierten Ratten (**K**) bereits bei der Inkubation ohne Glukose eine Insulinsekretion aufweisen und daß diese bei weiterer Erhöhung der Glukosekonzentration sigmoid ansteigt.

Auch bei den glukoseinfundierten Ratten (**G**) ist eine Insulinsekretion im glukosefreien Inkubationsmedium zu beobachten. Sie übertrifft die der Kontrolle um das 4-fache und ist nur halb so ausgeprägt wie die der zwei Tage glukoseinfundierten Ratten (**G**). Im weiteren Verlauf findet eine von der Glukosekonzentration abhängige, deutliche Zunahme der Insulinsekretion, mit einem Maximum bei 11,2mM Glukose, statt.

Wird die Gkuloosekonzentration weiter auf 28mM gesteigert, so ist keine weitere signifikante Änderung der Sekretionsleistung festzustellen.

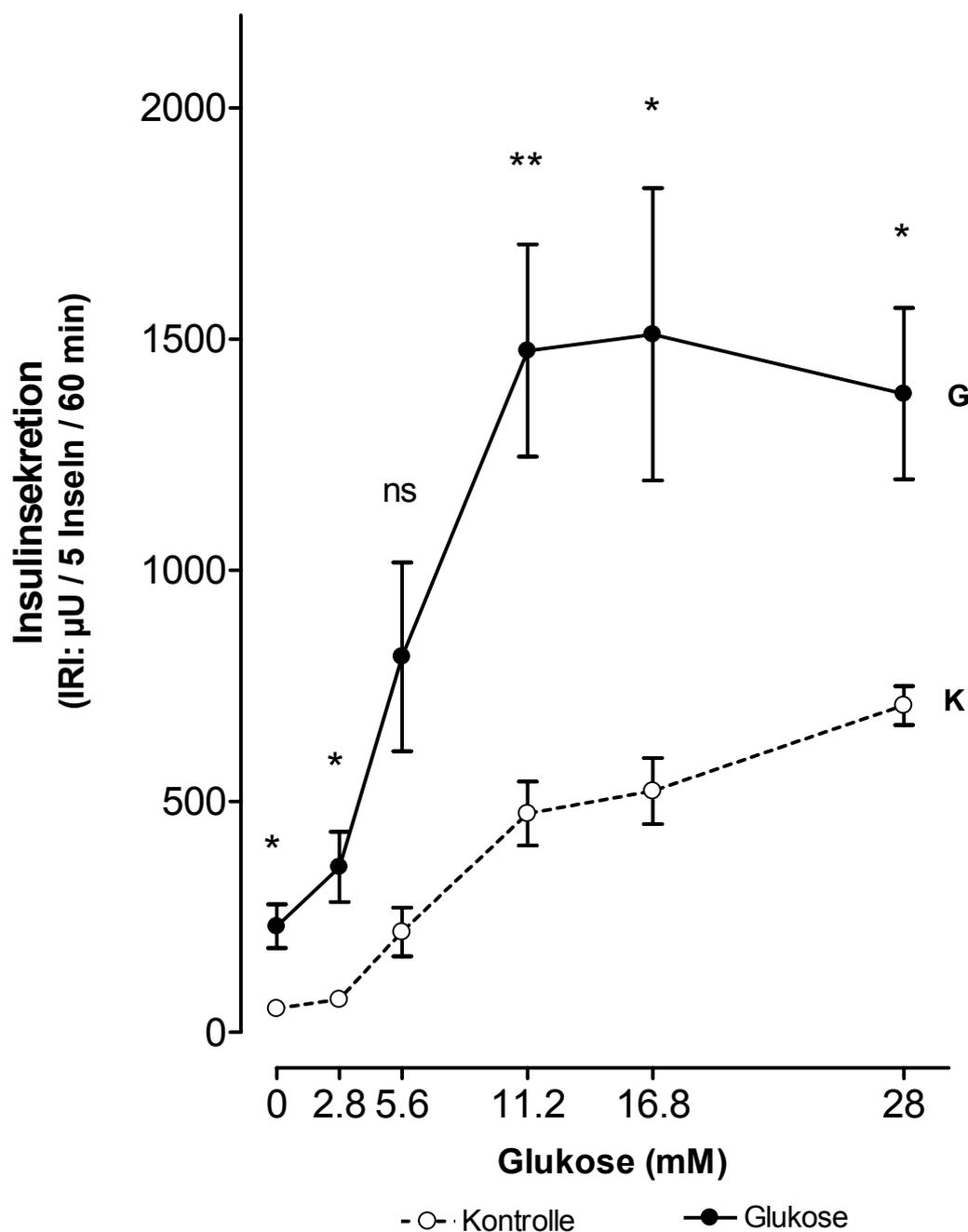


Abb. 5.2.1.2: Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Insulinsekretion von Langerhans Inseln von Ratten nach einer fünftägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder NaCl (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2 ml/h.

** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; ns: statistisch nicht signifikant

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.1.2)

Tab. 5.2.1.2: Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Insulinsekretion von Langerhans Inseln von Ratten nach einer fünftägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder NaCl (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2 ml/h.

Insulinsekretion (μ U / 5 Inseln / 60 min)						
Glukose (mM)	0	2,8	5,6	11,2	16,8	28
G Glukoseinfusion Präparation bei 7,4 mM Glukose	229 \pm 47	357 \pm 76	812 \pm 203	1475 \pm 229	1510 \pm 316	1381 \pm 185
K Kochsalzinfusion Präparation bei 7,4 mM Glukose	51 \pm 8	80 \pm 4	217 \pm 52	473 \pm 69	522 \pm 71	707 \pm 42
Statistische Auswertung: p						
G vs. K	< 0,05	< 0,05	n.s.	< 0,01	< 0,05	< 0,05
G: (0 mM Glukose) vs. 2,8mM, 5,6mM, 11,2mM, 16,8 mM und 28 mM		n.s.	< 0,05	< 0,001	< 0,01	< 0,001
K: (0 mM Glukose) vs. 2,8mM, 5,6mM, 11,2mM, 16,8 mM und 28 mM		n.s.	< 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM.

Der Mittelwert aus 2-3 Doppelbestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): n = 5-6.

5.2.2 Einfluß einer Inkubation mit Glukose auf die ATP/ADP-Quotienten

5.2.2.1 Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die ATP/ADP-Quotienten von Langerhans Inseln von Ratten nach einer zweitägigen Dauerinfusion mit Glukose (**G**: 50%) oder Kochsalz (**K**: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2ml/h

Die Abb. 5.2.2.1 zeigt den Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die ATP/ADP-Quotienten von Langerhans Inseln von Ratten, deren Inseln nach einer zweitägigen Dauerinfusion mit Glukose (**G**) bzw. Kochsalz (**K**) bei der Präparation bei der Glukosekonzentration gehalten wurden wie sie am Ende der Infusion im Blut vorlag, d.h.

- 18,8mM Glukose für die Inseln glukoseinfundierter Ratten (**G**) und
- 7,2mM Glukose für die Inseln kochsalzinfundierter Ratten (**K**) (s.a. Abb.5.1.1).

Aus der Abb. 5.2.2.1 geht hervor, daß bei kochsalzinfundierten Ratten der ATP/ADP-Quotient bei 0mM Glukose ca. 3,8 beträgt. Dieser Quotient nimmt bei steigenden Glukosekonzentrationen zu und erreicht bei 11,2mM sein Maximum.

Bei höheren Glukosekonzentrationen 16,8mM und 28mM ist nur eine leichte und somit statistisch nicht signifikante Abnahme des ATP/ADP-Quotienten zu verzeichnen.

Bei glukoseinfundierten Ratten hat der ATP/ADP-Quotient einen Wert von 5 bei 0mM Glukose und unterscheidet sich somit statistisch signifikant von dem Quotienten 3,8 kochsalzinfundierter Ratten.

Eine weitere Erhöhung der Glukosekonzentration bis auf 28mM führt nicht zu einer statistisch signifikanten Änderung des APT/ADP-Quotienten.

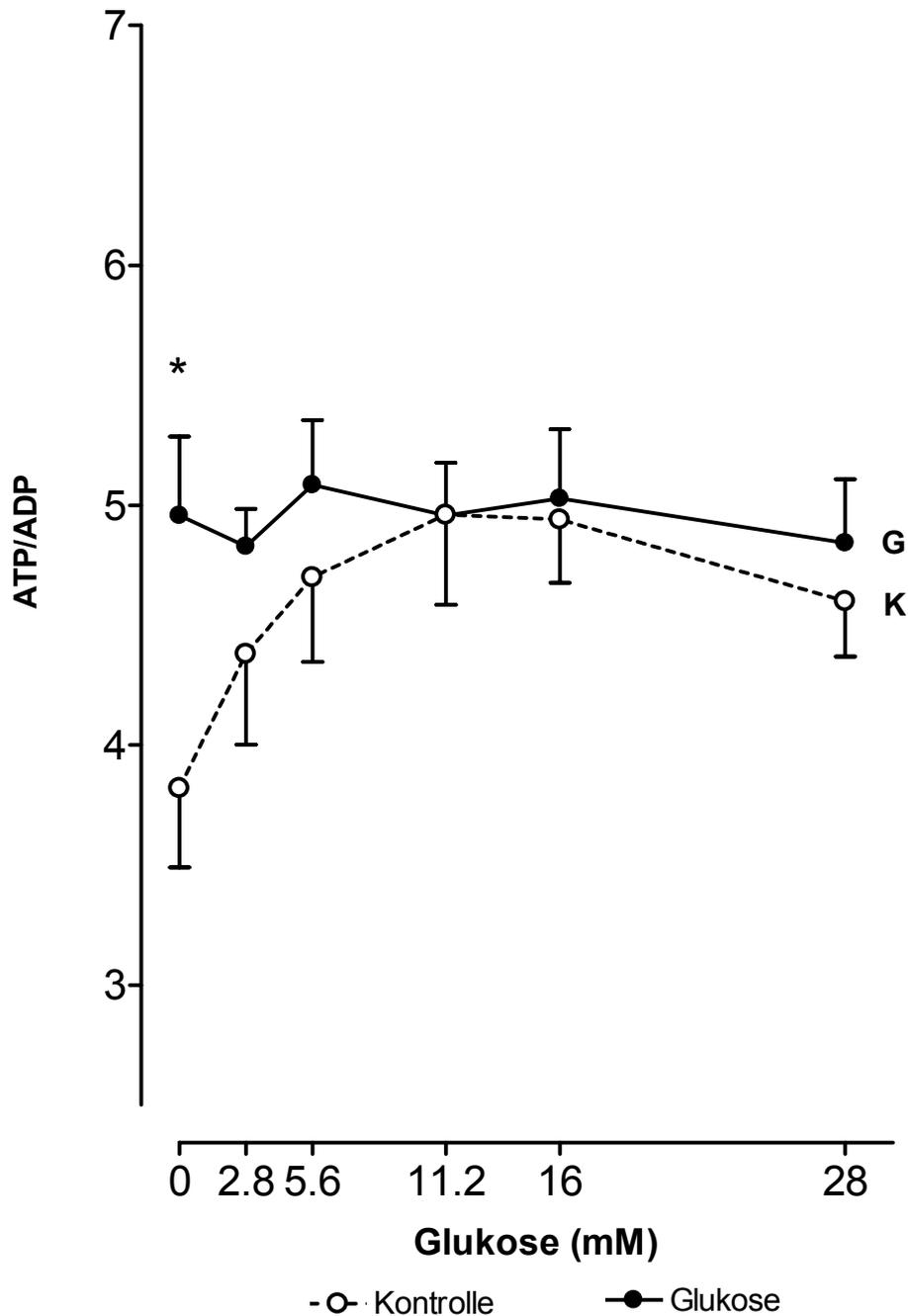


Abb. 5.2.2.1: Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die ATP/ADP-Quotienten von Langerhans Inseln von Ratten nach einer zweitägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder Kochsalz (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2 ml/h.

*: $p < 0,05$

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.2.1)

Tab. 5.2.2.1: Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die ATP/ADP-Quotienten von Langerhans Inseln von Ratten nach einer zweitägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder Kochsalz (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2 ml/h.

ATP/ADP (5 Inseln / 5 min)						
Glukose (mM)	0	2,8	5,6	11,2	16,8	28
G Glukoseinfusion Präparation bei 18,7 mM Glukose	4,96 ± 0,33	4,83 ± 0,16	5,09 ± 0,27	4,96 ± 0,22	5,03 ± 0,29	4,84 ± 0,27
K Kochsalzinfusion Präparation bei 7,4 mM Glukose	3,8 ± 0,33	4,38 ± 0,38	4,70 ± 0,35	4,96 ± 0,38	4,94 ± 0,26	4,60 ± 0,23
Statistische Auswertung: p						
G vs. K	< 0,05	ns.	ns.	ns.	ns.	ns.
G: (0 mM Glukose) vs. 2,8mM, 5,6mM, 11,2mM, 16,8 mM und 28 mM		n.s.	ns.	ns.	ns.	ns.
K: (0 mM Glukose) vs. 2,8mM, 5,6mM, 11,2mM, 16,8 mM und 28 mM		n.s.	ns.	ns.	< 0,05	ns.

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

Der Mittelwert aus 2 Bestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): n = 5-6.

5.2.2.2 Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die ATP/ADP-Quotienten von Langerhans Inseln von Ratten nach einer fünftägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder Kochsalz (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2ml/h

Ähnlich wie bei der zweitägigen Dauerinfusion wurden die Inseln nach der Infusion bis zum Inkubationsbeginn bei der Glukosekonzentration gehalten wie sie nach 5 Tage Dauerinfusion im Blut gefunden wurde, d.h.

- 7,2mM Glukose für die Inseln glukoseinfundierter Ratten (**G**)
- 7,2mM Glukose für die Inseln kochsalzinfundierter Ratten (**K**) (s.a. Abb. 4.1.1).

In Abb. 5.2.2.2 sieht man bei den Inseln kochsalzinfundierter Ratten (**K**) eine konzentrationsabhängige Zunahme des ATP/ADP-Quotienten, wobei dieser bei 0mM Glukose einen Wert von ca. 3 hat.

Dagegen beträgt der ATP/ADP-Quotient bei den Inseln glukoseinfundierter Ratten (**G**) ca. 5. bei 0mM Glukose und bleibt in etwa gleich bei weiterer Erhöhung der Glukosekonzentration auf 28mM.

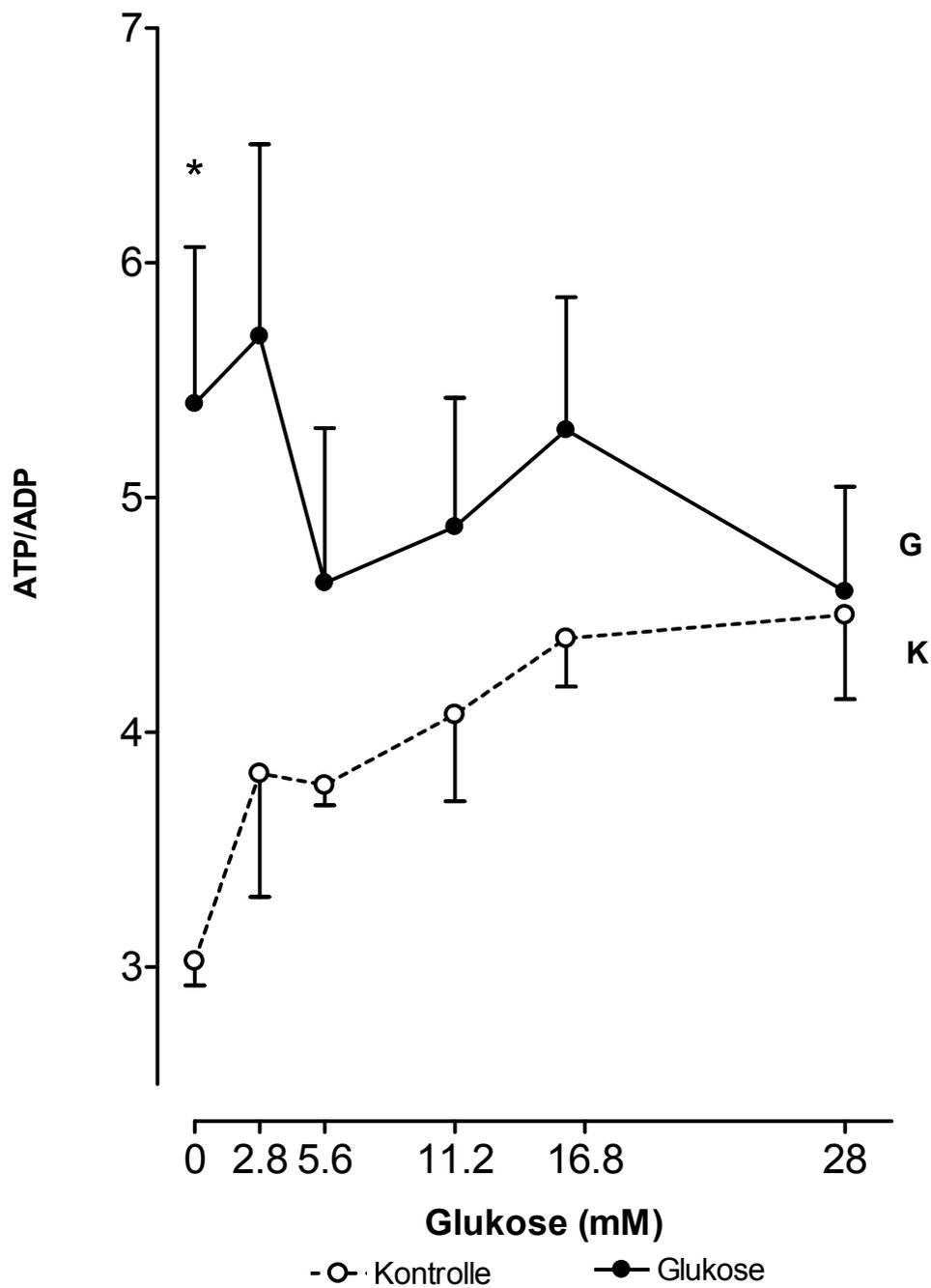


Abb. 5.2.2.2: Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die ATP/ADPQuotienten von Langerhans Inseln von Ratten nach einer fünftägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder Kochsalz (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2 ml/h.

*: $p < 0,05$

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.2.2)

Tab. 5.2.2.2: Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen auf die ATP/ADP-Quotienten von Langerhans Inseln von Ratten nach einer fünftägigen Dauerinfusion mit Glukose (G: 50%) oder Kochsalz (K: 0,45%), jeweils mit einer Infusionsrate von 2 ml/h.

ATP/ADP (5 Inseln / 5 min)						
Glukose (mM)	0	2,8	5,6	11,2	16,8	28
G Glukoseinfusion Präparation bei 18,7 mM Glukose	5,40 ± 0,67	5,70 ± 0,82	4,64 ± 0,66	4,88 ± 0,55	5,29 ± 0,57	4,60 ± 0,45
K Kochsalzinfusion Präparation bei 7,4 mM Glukose	3,03 ± 0,10	3,83 ± 0,53	3,78 ± 0,09	4,08 ± 0,37	4,40 ± 0,20	4,50 ± 0,36
Statistische Auswertung: p						
G vs. K	< 0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G: (0 mM Glukose) vs. 2,8mM, 5,6mM, 11,2mM, 16,8 mM und 28 mM		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
K: (0 mM Glukose) vs. 2,8mM, 5,6mM, 11,2mM, 16,8 mM und 28 mM		n.s.	< 0,01	< 0,05	< 0,001	< 0,01

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

Der Mittelwert aus 2 Bestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): n = 5.

5.2.3 Einfluß einer Dauerinfusion mit Glukose auf den DNA-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte

5.2.3.1 Einfluß einer zwei- bzw. fünftägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-Lösung (K) auf den DNA-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

Aus der Abb. 5.2.3.1 geht hervor, daß bei einer Dauerinfusion der DNA-Gehalt von Inseln glukoseinfundierter und kochsalzinfundierter Ratten ca. $5,8\mu\text{g}/10$ Inseln beträgt und somit in etwa gleich ist.

Auch die Infusionsdauer nimmt keinen Einfluß auf den DNA-Gehalt, denn zwischen Inseln von 2 und 5 Tage glukoseinfundierten Tieren ist kein Unterschied bezüglich des DNA-Gehalts festzustellen.

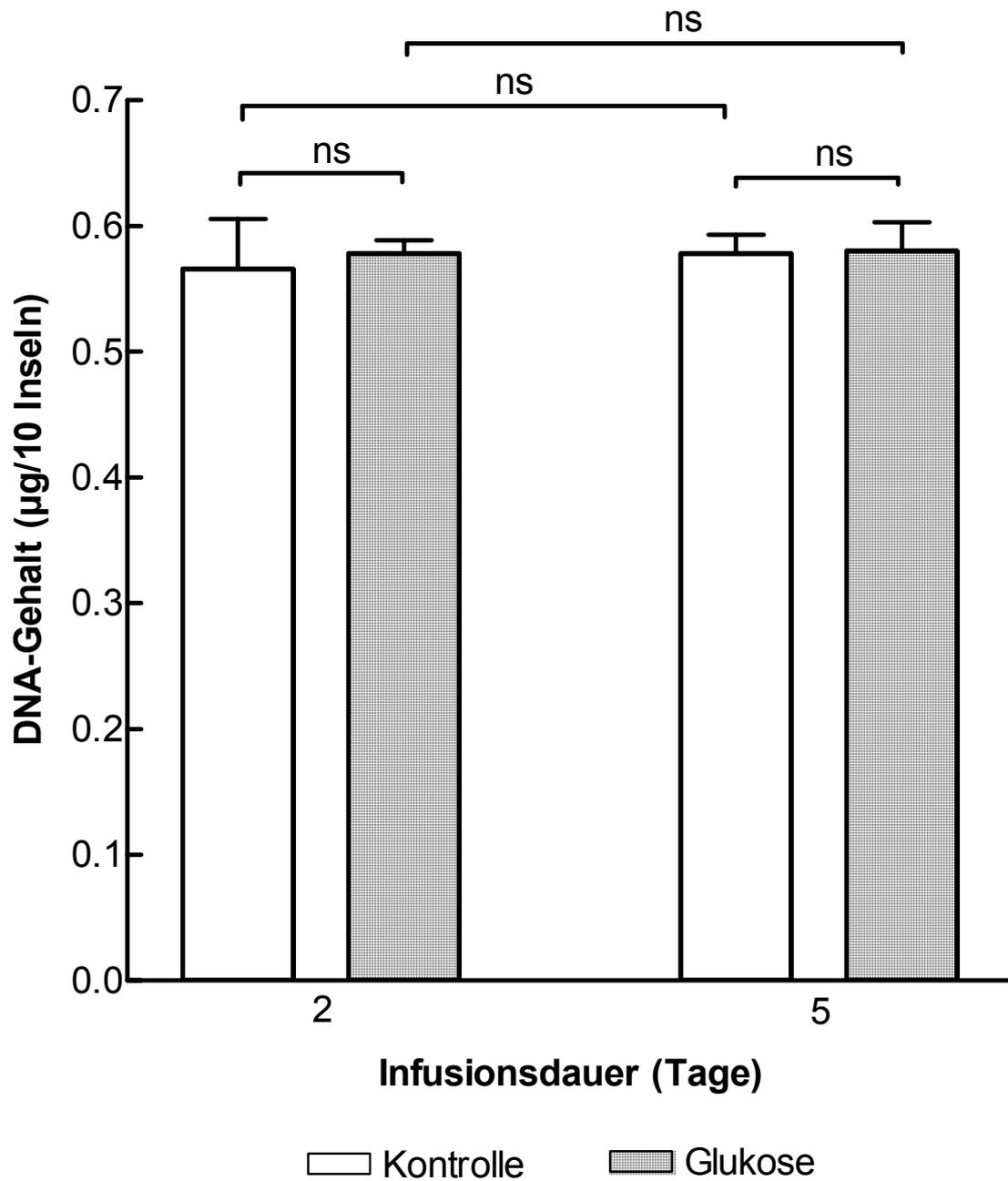


Abb. 5.2.3.1: Einfluß einer zwei- bzw. fünftägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-lösung (K) auf den DNA-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

ns: statistisch nicht signifikant

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.3.1)

Tab. 5.2.3.1: Einfluß einer zwei- bzw. fünftägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-Lösung (K) auf den DNA-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

DNA-Gehalt (µg / 10 Inseln)		
Infusionsdauer (Tage)	2	5
G Glukoseinfusion	0,578 ± 0,01	0,58 ± 0,02
K Kochsalzinfusion	0,566 ± 0,04	0,578 ± 0,03
Statistische Auswertung: p		
G vs. K	n.s.	n.s.

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

Der Mittelwert aus 3 Bestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): n = 5-6.

5.2.4 Einfluß einer Dauerinfusion mit Glukose auf den Protein-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte

5.2.4.1 Einfluß einer zwei- bzw. fünftägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-Lösung (K) auf den Protein-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

In Abb. 5.2.4.1 sieht man, daß der Protein-Gehalt bei der 2-tägigen Kontrolle ca. 5,5 µg/10 Inseln beträgt. Dagegen liegt dieser bei Inseln glukoseinfundierter Ratten bei ca. 9 µg/10 Inseln und somit fast zweimal so hoch wie bei der Kontrolle.

Eine Ausdehnung der Dauerinfusion auf 5 Tage führt sowohl bei der Kontrolle als auch bei mit Glukose infundierten Tieren zu keiner nennswerten Änderungen der Werte.

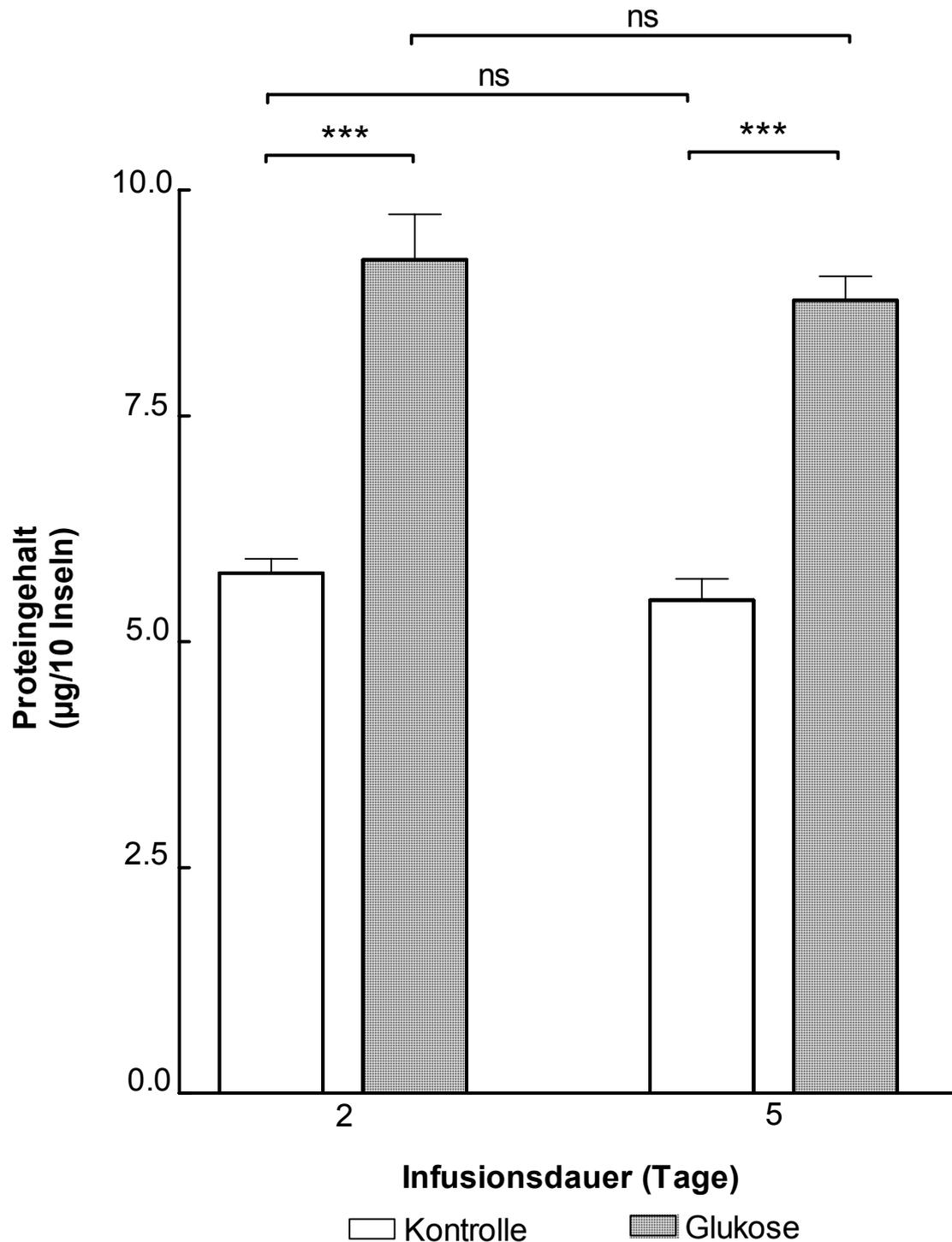


Abb. 5.2.4.1: Einfluß einer zwei- bzw. fünftägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-lösung (K) auf den Protein-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

*****: $p < 0,001$; ns: statistisch nicht signifikant**

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.4.1)

Tab. 5.2.4.1: Einfluß einer zwei- bzw. fünftägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-Lösung (K) auf den Protein-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

Protein-Gehalt (µg / 10 Inseln)		
Infusionsdauer (Tage)	2	5
G Glukoseinfusion	9,23 ± 0,50	8,78 ± 0,27
K Kochsalzinfusion	5,76 ± 0,16	5,46 ± 0,24
Statistische Auswertung: p		
G vs. K	n.s.	n.s.

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

Der Mittelwert aus 3 Bestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): n = 5-6.

5.2.5 Einfluß einer Dauerinfusion mit Glukose auf den Insulin-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte

5.2.5.1 Einfluß einer zwei- bzw. fünftägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-Lösung (K) auf den Insulin-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

Die Abb. 5.2.5.1 zeigt die Wirkung einer 2- bzw. 5-tägigen Dauerinfusion mit Glukose auf den Insulin-Gehalt Langerhans Inseln der Ratte.

Während bei der 2 Tage Kontrolle der Insulin-Gehalt ca. 1600ng/10 Inseln beträgt, so fällt dieser bei der 2 Tage Glukose-Gruppe auf ca. 550 ng/10 Inseln.

Eine Erweiterung der Infusion auf 5 Tage führt bei der Glukose-Gruppe zu einer stärkeren- statistisch aber nicht signifikanten- Abnahme des Insulin-Gehalts.

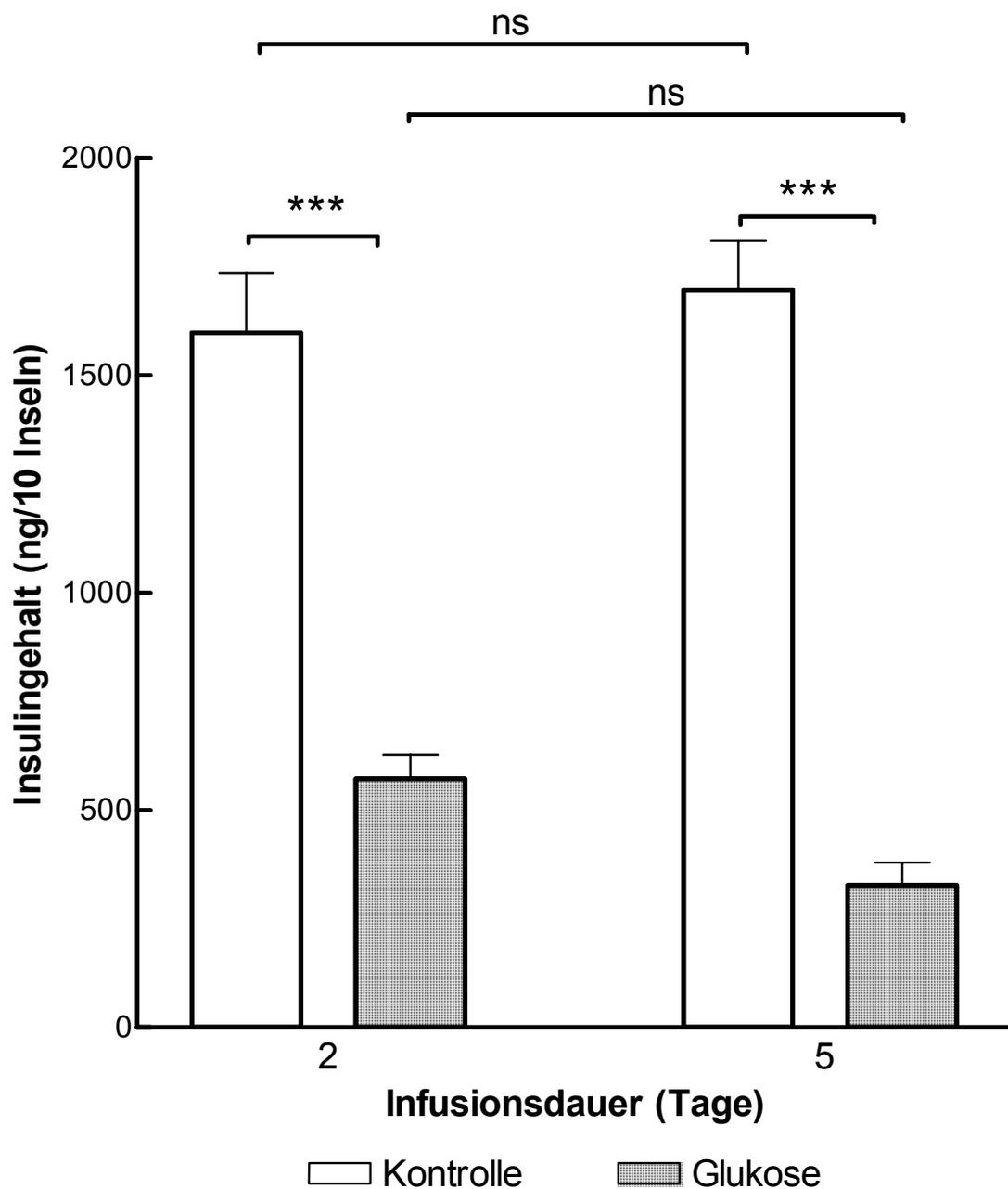


Abb. 5.2.5.1: Einfluß einer zwei- bzw. fünftägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-lösung (K) auf den Insulin-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

*****: $p < 0,001$; ns: statistisch nicht signifikant**

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.5.1)

Tab. 5.2.5.1: Einfluß einer zwei- bzw. fünftägigen Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%-igen Glukoselösung (G) oder einer 0,45%-igen NaCl-Lösung (K) auf den Insulin-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

Insulingehalt (ng / 10 Inseln)		
Infusionsdauer (Tage)	2	5
Glukoseinfusion	571 ± 55	326 ± 52
Kochsalzinfusion	1597 ± 138	1695 ± 113

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

Der Mittelwert aus 3 Bestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): n = 5.

5.2.6 Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukose- oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Insulingehalt, bezogen auf den DNA-Gehalt der Langerhans Inseln.

Bestimmt man bei den infundierten Tieren den Insulin- sowie DNA-Gehalt der Langerhans Inseln und setzt man diese beiden Parameter in Verhältnis (Insulin:DNA), so sieht man in Abb. 5.2.6 bei den zwei Tage glukoseinfundierten Ratten eine Reduzierung des Quotienten auf ca. 40% des Wertes der Kontrolle. Bei Erweiterung der Dauerinfusion auf fünf Tage fällt der Quotient noch deutlicher kleiner aus und beträgt nur etwa 20% des Wertes der Kontrolltiere.

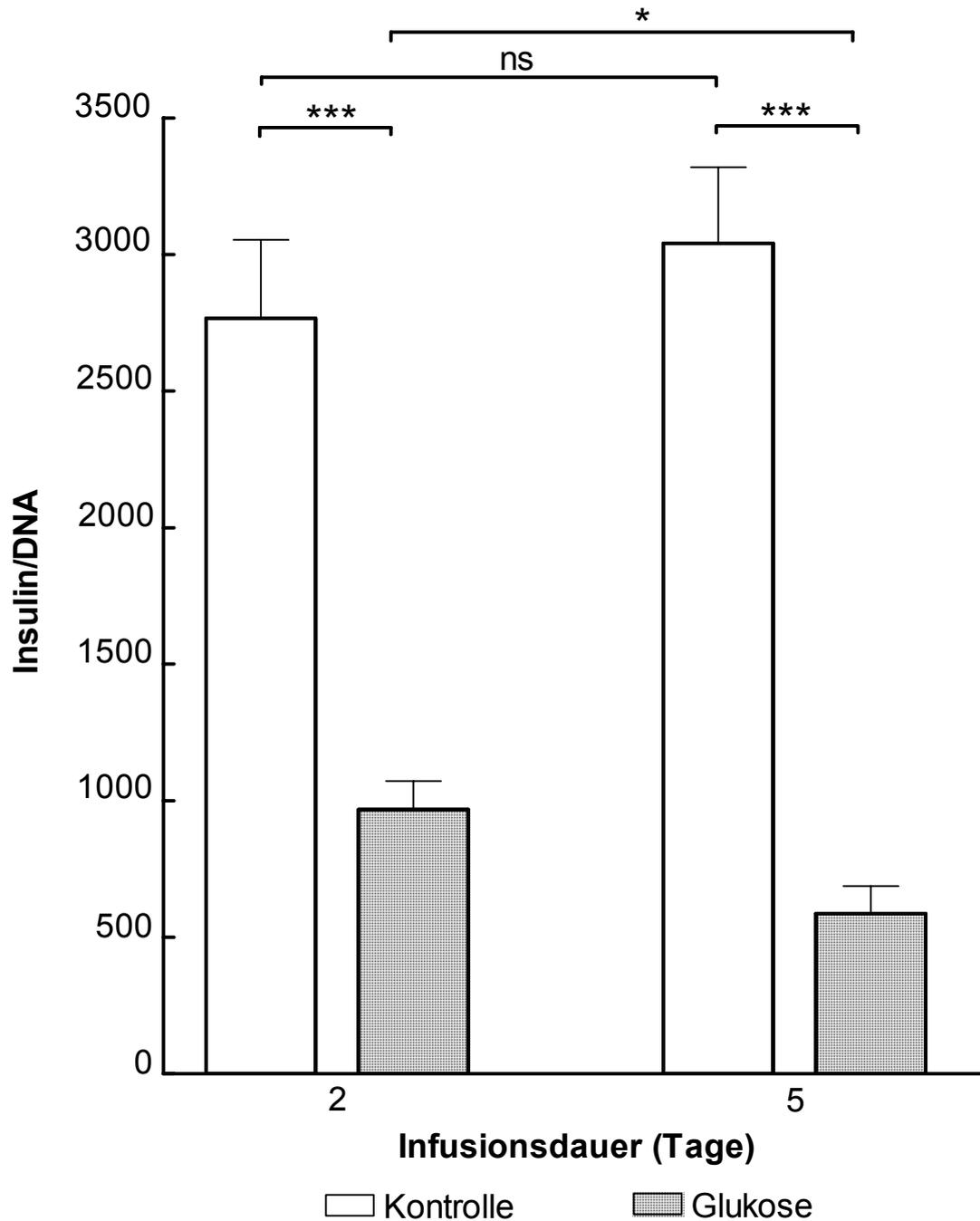


Abb. 5.2.6: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukose- oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Insulingehalt, bezogen auf den DNA-Gehalt der Langerhans Inseln.

*****: $p < 0,001$;**

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.6)

Tab. 5.2.6: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukose- oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Insulingehalt, bezogen auf den DNA-Gehalt der Langerhans Inseln.

Insulin/DNA		
Infusionsdauer (Tage)	2	5
Glukoseinfusion	968 ± 103	586 ± 101
Kochsalzinfusion	2765 ± 288	3041 ± 278

5.2.7 Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Insulingehalt, bezogen auf den Proteingehalt der Langerhans Inseln.

Betrachtet man nun in Abb. 5.2.7 die Änderung des Insulingehalts als Protein im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der Langerhans Inseln, so fällt auf, daß bei den 2 Tage glukoseinfundierten Ratten der Quotient nur etwa einfünttel des Wertes der Kontrolle ausmacht. Bei den 5 Tage infundierten Tieren wird der Quotient kleiner und beträgt nur noch ein Achtel des Verhältnisses bei der Kontrolle.

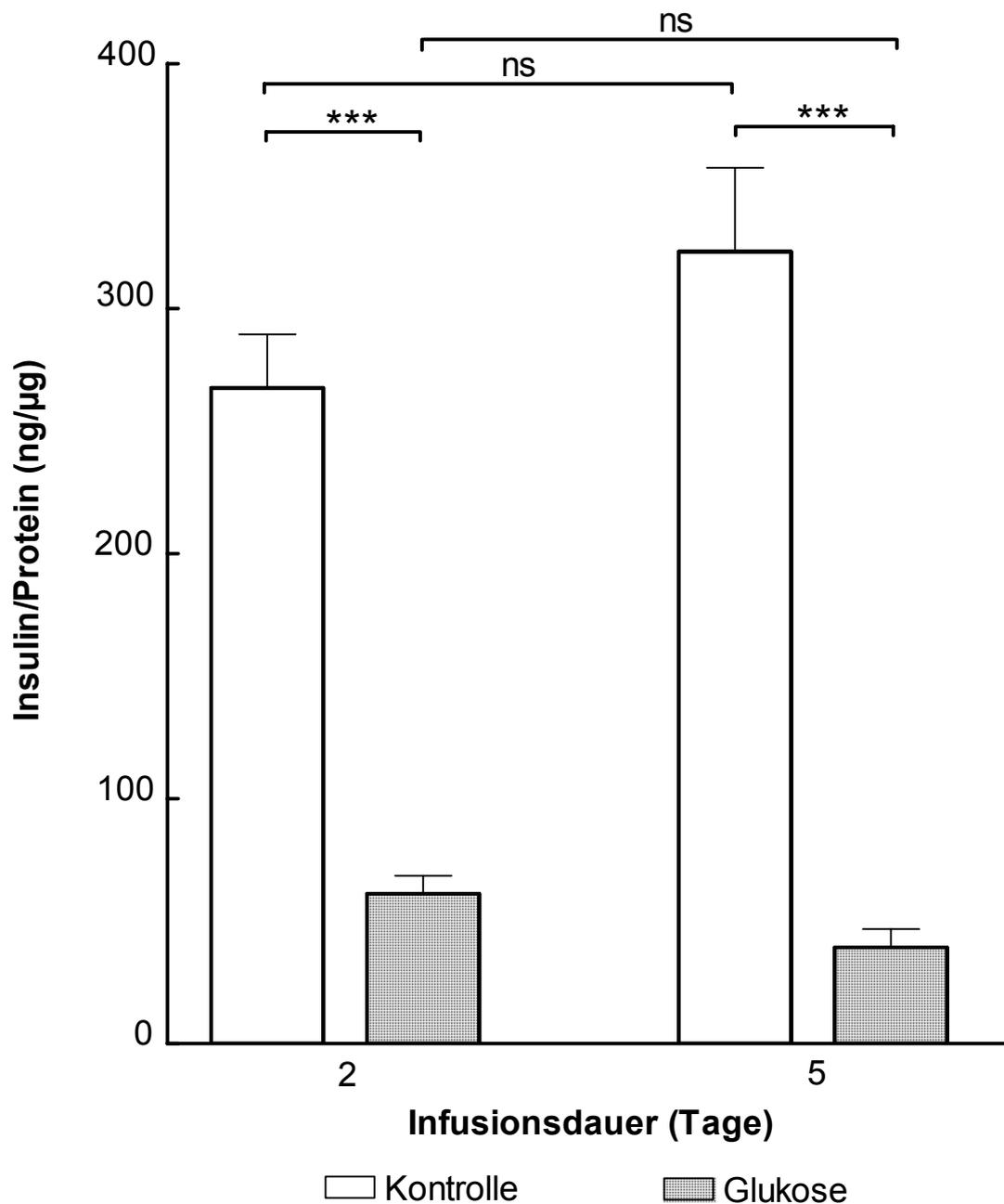


Abb. 5.2.7: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Insulingehalt, bezogen auf den Proteingehalt der Langerhans Inseln.

***: $p < 0,001$;

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.7)

Tab. 5.2.7: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Insulingehalt, bezogen auf den Proteingehalt der Langerhans Inseln.

Insulin/Protein		
Infusionsdauer (Tage)	2	5
Glukoseinfusion	61 ± 7	39 ± 7
Kochsalzinfusion	267 ± 22	323 ± 34

5.2.8 Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/ einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Proteingehalt, bezogen auf den DNA-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

Bildet man den Quotienten aus Protein- und DNA-Gehalt von Langerhans Inseln, so stellt man in Abb. 5.2.8 bei glukoseinfundierten Ratten eine eineinhalb fache Zunahme des Quotienten im Vergleich mit der Kontrolle. Die Werte zwischen 2 und 5 Tage Dauerinfusionen unterscheiden sich jeweils nicht signifikant.

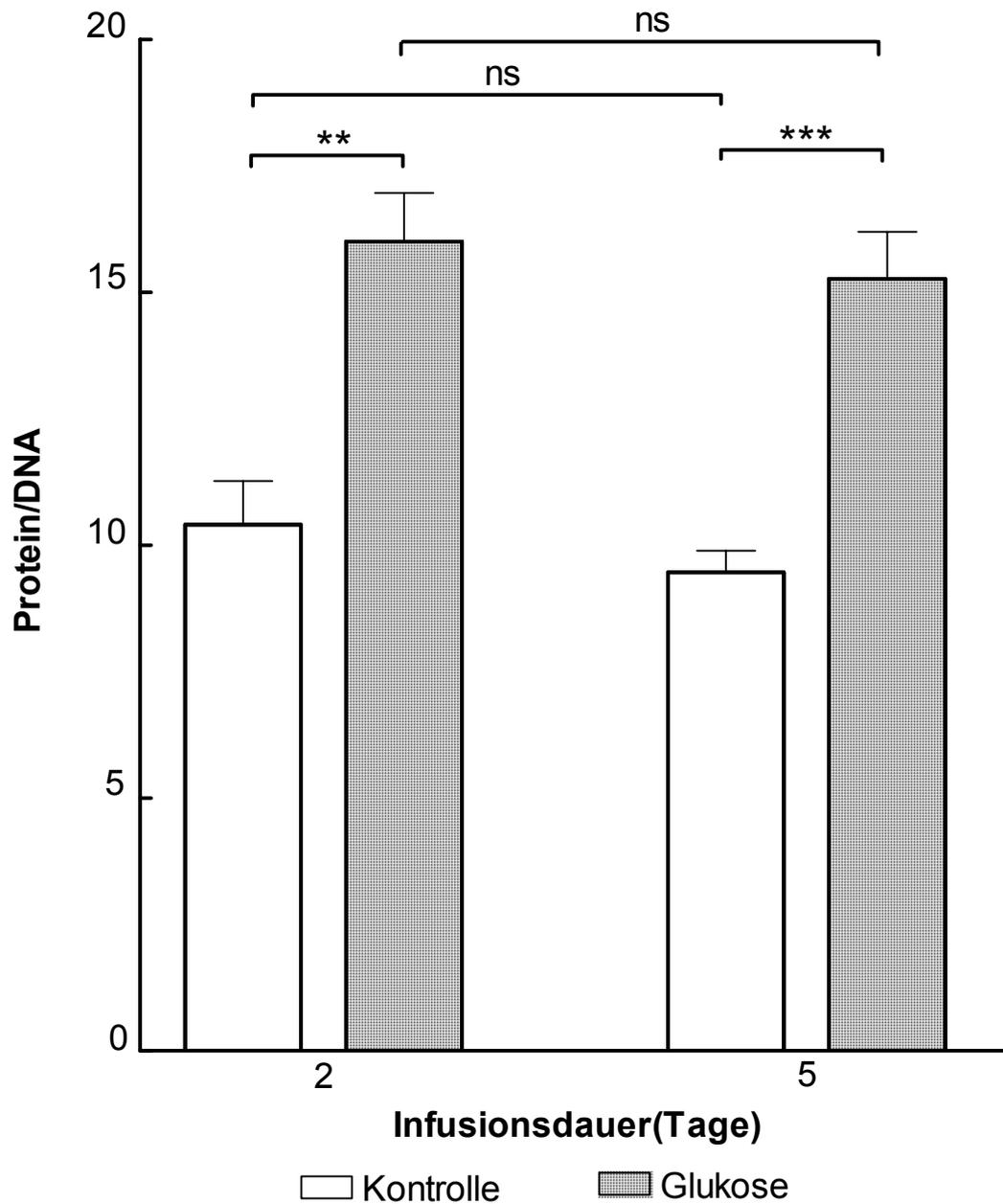


Abb. 5.2.8: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Proteingehalt, bezogen auf den DNA-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

*****: $p < 0,001$;**

**** : $p < 0,01$;**

ns: statistisch nicht signifikant

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.8)

Tab. 5.2.8: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Proteingehalt, bezogen auf den DNA-Gehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

Protein/DNA		
Infusionsdauer (Tage)	2	5
Glukoseinfusion	16 ± 0,86	15,27 ± 0,93
Kochsalzinfusion	10,41 ± 0,95	9,42 ± 0,45

5.2.9 Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Glykogengehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

Bestimmt man den Glykogengehalt Langerhansscher Inseln von zwei und fünf Tag infundierten Ratten, so fällt auf, daß bei zwei Tage glukoseinfundierten Tieren der Glykogengehalt den der Kontrolltiere ca. um das vierfache übertrifft. Dagegen ist nach fünftägiger Infusion kein signifikanter Unterschied bezüglich des Glykogengehalts zwischen glukose- und kochsalzinfundierten Tieren festzustellen.

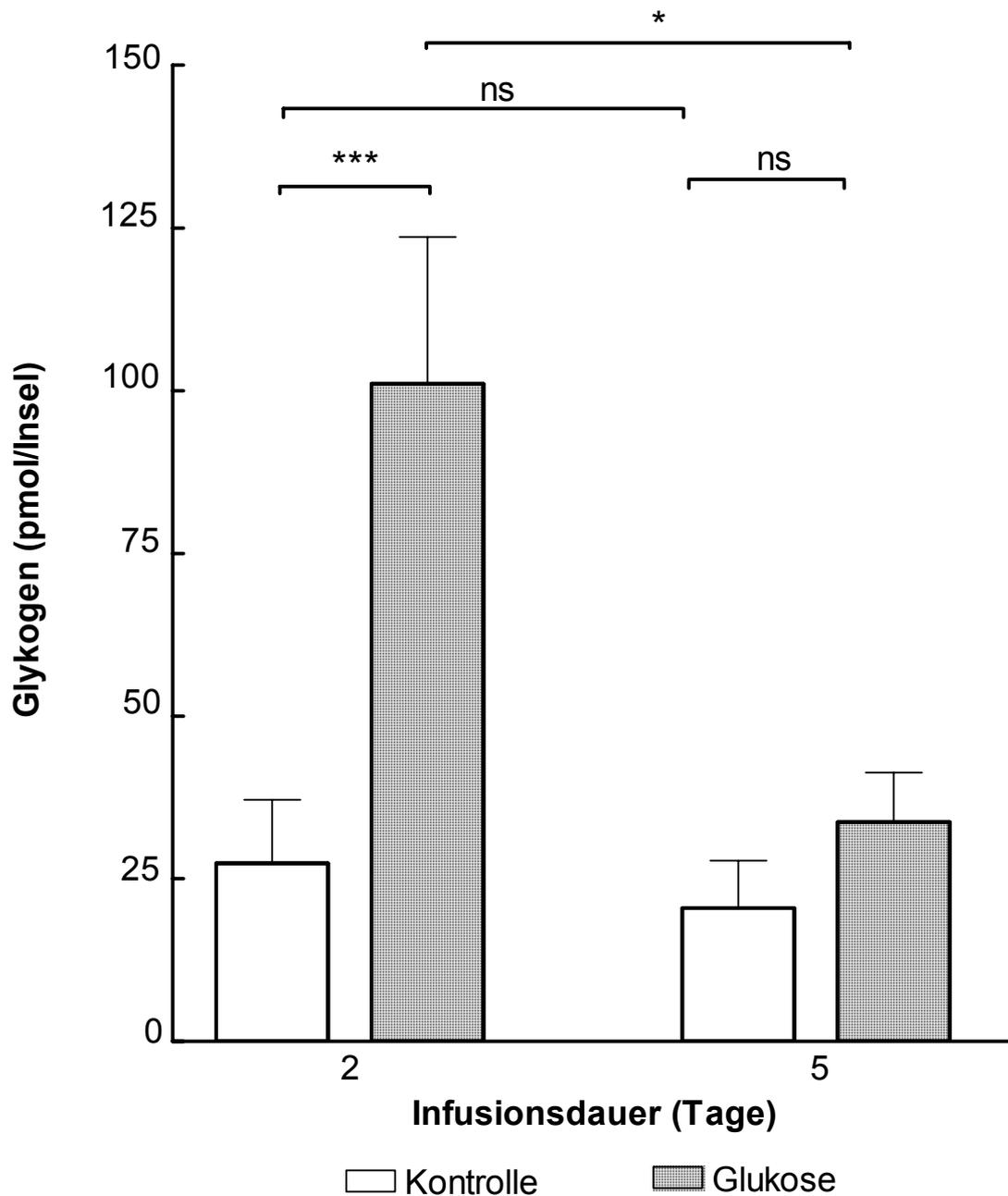


Abb. 5.2.9: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Glykogengehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

***: $p < 0,001$;

*: $p < 0,05$;

ns: statistisch nicht signifikant

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.2.9)

Tab. 5.2.9: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2 ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Glykogengehalt von Langerhans Inseln der Ratte.

Glykogengehalt (pmol / Insel)		
Infusionsdauer (Tage)	2	5
Glukoseinfusion	101 ± 22	33,7 ± 7,6
Kochsalzinfusion	27,4 ± 9,7	20,5 ± 7,3

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

Der Mittelwert aus 2-3 Doppelbestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): 5-6.

5.3 Zusatzversuche

5.3.1 Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Futterverbrauch der Ratte

In Abb. 5.3.1 sieht man, daß während der Infusion die glukoseinfundierten Ratten wesentlich weniger fressen als die Kontrolltiere. Betrachtet man nur die glukoseinfundierten Ratten, so ist festzustellen, daß der Futterverbrauch bei der fünf Tage anhaltenden Infusion signifikant weniger ist als bei der zweitägigen Dauerinfusion.

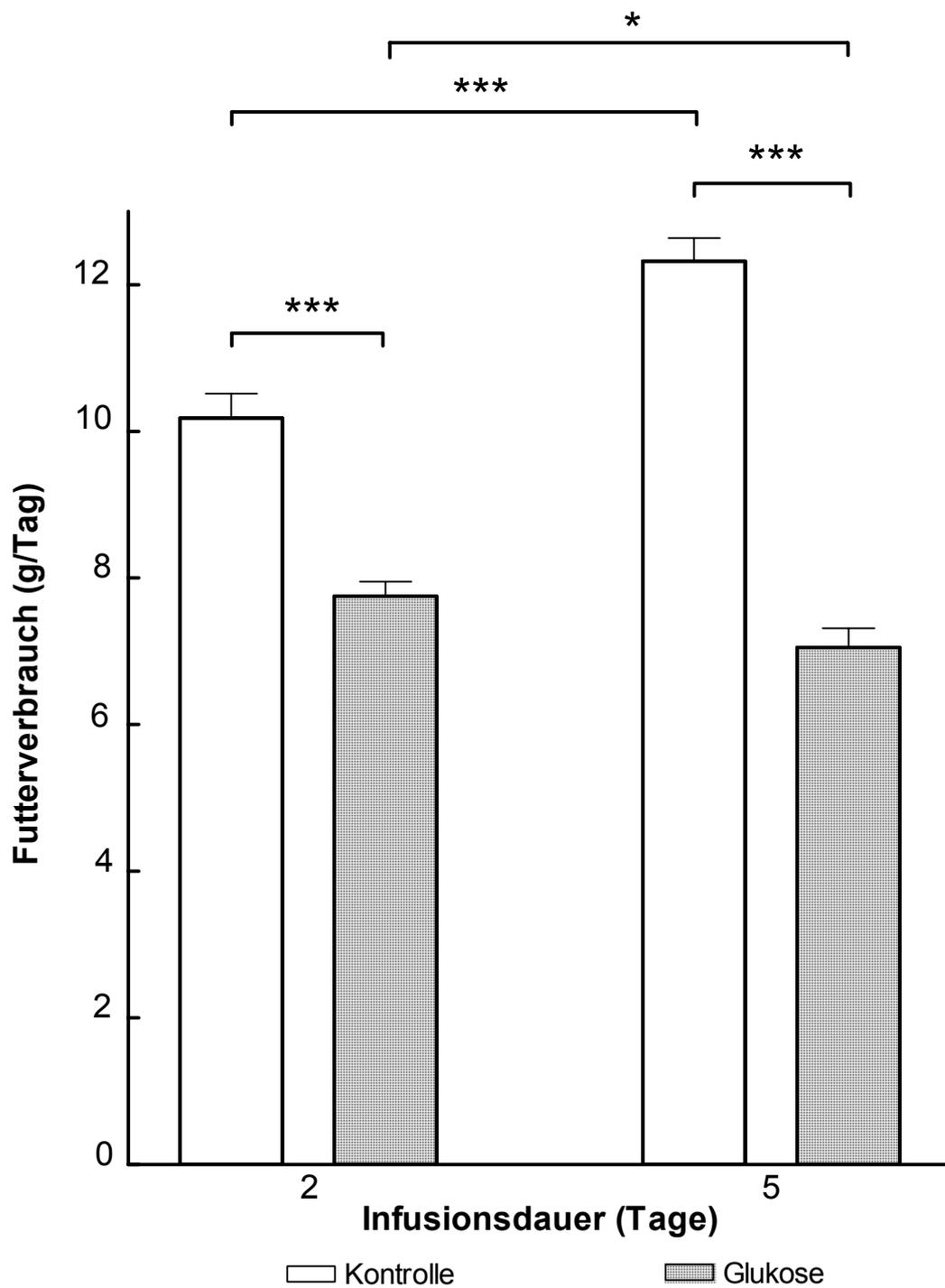


Abb. 5.3.1: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Futterverbrauch der Ratte

***: $p < 0,001$;

*: $p < 0,05$;

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.3.1)

Tab. 5.3.1: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf den Futterverbrauch der Ratte

Futterverbrauch (g/Tag)		
Infusionsdauer (Tage)	2	5
Glukoseinfusion	7,8 ± 0,2	7,05 ± 0,26
Kochsalzinfusion	10,1 ± 0,3	12,3 ± 0,32

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

Der Mittelwert aus 2-3 Doppelbestimmungen ging als n = 1 in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): 5-6.

5.3.2 Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf das Körpergewicht der Ratte

In Abb. 5.3.2 sieht man, daß sich das Körpergewicht sowohl bei Kontroll- als auch bei den glukoseinfundierten Ratten nicht signifikant unterscheiden.

Betrachtet man jedoch nur die Netto-Gewichtszunahme während der Infusion, so sind doch gewisse Unterschiede bezüglich des Körpergewichtes festzustellen, siehe Abb. 5.3.2.

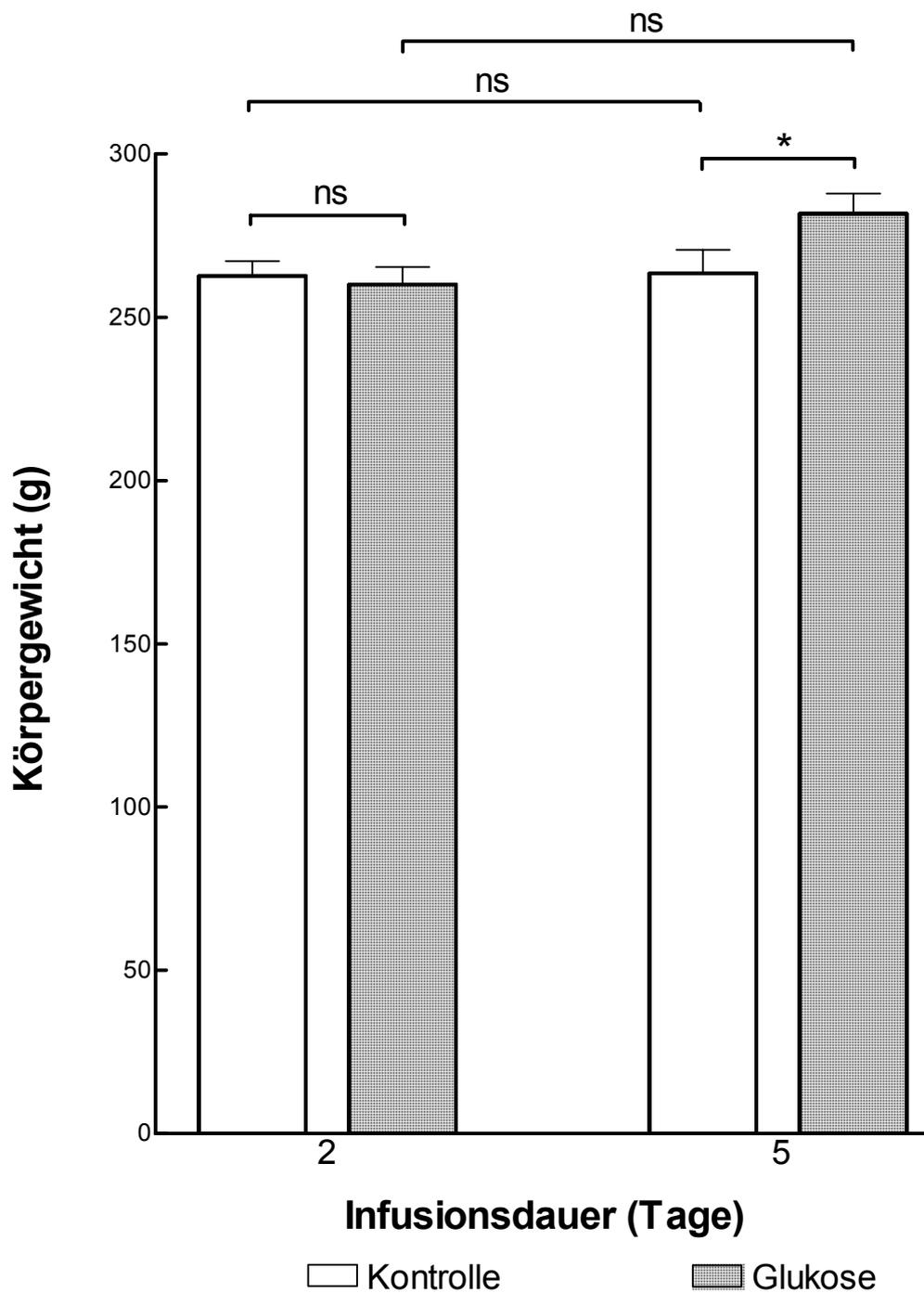


Abb. 5.3.2: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/l einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf das Körpergewicht der Ratten

***: $p < 0,05$; ns: statistisch nicht signifikant**

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.3.2)

Tab. 5.3.2 Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf das Körpergewicht der Ratte

Körpergewicht (g)		
Infusionsdauer (Tage)	2	5
G Glukoseinfusion	260 ± 5	285 ± 5
K Kochsalzinfusion	262 ± 4	263 ± 7
Statistische Auswertung: p		
G vs. K	n.s.	< 0,05
G: 2 Tage vs. 5 Tage		< 0,05
K: 2 Tage vs. 5 Tage		n.s.

Angegeben sind Mittelwerte ± SEM.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): 8-9.

5.3.3 Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf die Zunahme des Körpergewichts von Ratten.

In Abb. 5.3.3 sieht man, daß die Nettogewichtszunahme bei glukoseinfundierten Ratten ca. 3g pro Tag beträgt und somit fast doppelt soviel wie bei den Kontrolltieren ist. Betrachtet man nur die Glukosegruppe, so ist festzustellen, daß die Gewichtszunahme bei der fünftägigen Infusion etwas größer ausfällt als bei der zweitägigen Dauerinfusion. Zwischen den Kontrolltieren beider Gruppen ist die Zunahme des Körpergewichts während der Dauerinfusion in etwa gleich, nämlich ca. 1,7g pro Tag.

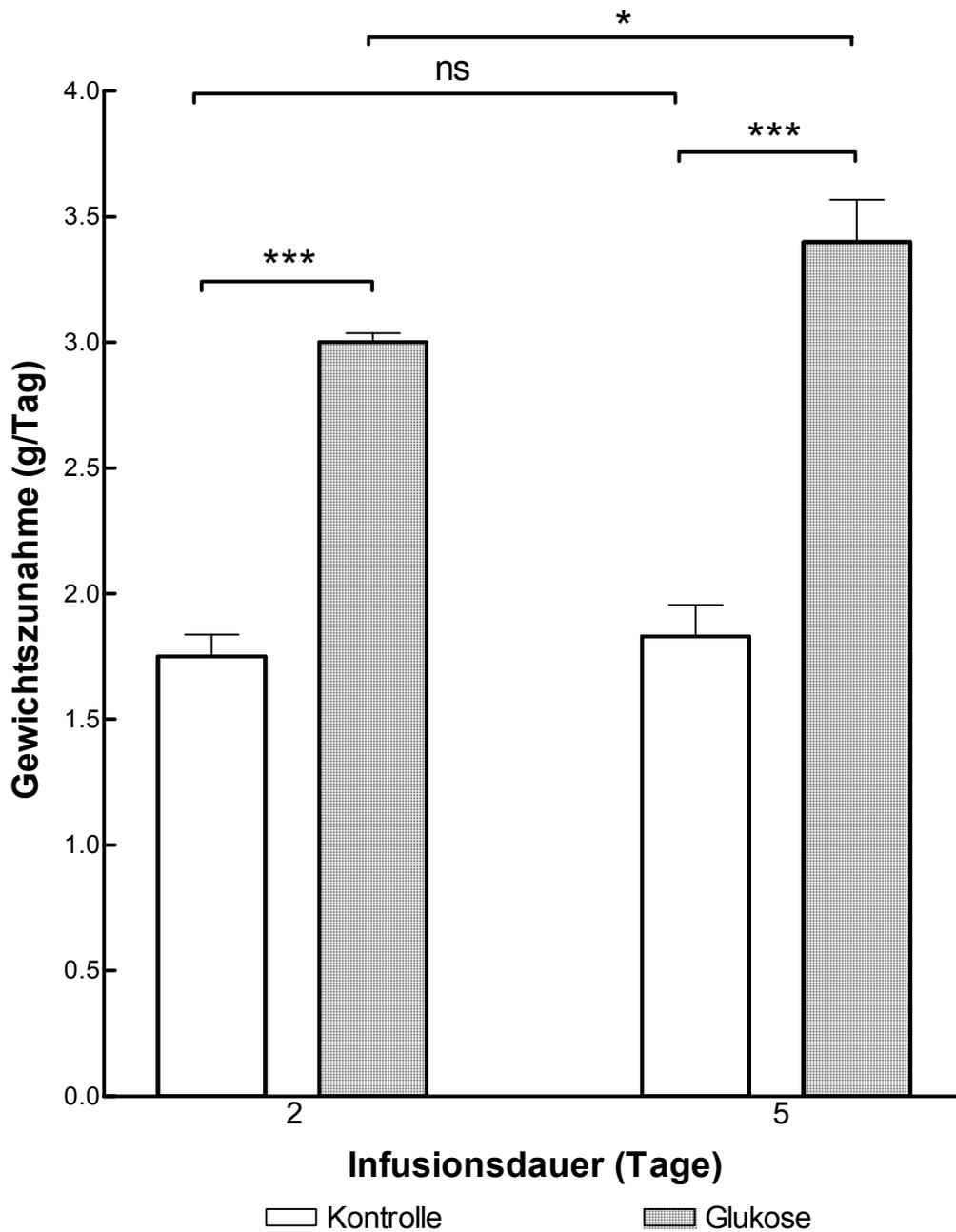


Abb. 5.3.3: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2m/l einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf die Zunahme des Körpergewichtes von Ratten

***: $p < 0,001$;

*: $p < 0,05$;

ns: statistisch nicht signifikant

(Zahlenwerte und statistische Auswertung siehe Tab. 5.3.3)

Tab. 5.3.3: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2m/l einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf die Zunahme des Körpergewichtes von Ratten

Gewichtszunahme (g/Tag)		
Infusionsdauer (Tage)	2	5
Glukoseinfusion	$3 \pm 0,04$	$3,4 \pm 0,17$
Kochsalzinfusion	$1,75 \pm 0,09$	$1,83 \pm 0,12$

Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM.

Der Mittelwert aus 2-3 Doppelbestimmungen ging als $n = 1$ in die statistische Auswertung ein.

Anzahl der unabhängigen Experimente (Infusionen): 5-6.

5.3.4 Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf die Ausscheidung von Glukose im Urin der Ratte

Entnimmt man direkt nach jeder Infusion den Urin und untersucht man auf das Vorhandensein von Glukose im Urin mit Hilfe eines Zuckerteststäbchens, so stellt man fest, wie in Abb. 5.3.4 dargestellt, daß nur bei den 2 Tage glukoseinfundierten Ratten ein positiver Befund vorliegt. Bei den 5 Tage mit Glukose infundierten Ratten fällt der Test auf Glukose im Urin negativ aus.

Tab.5.3.4: Einfluß einer zwei und fünf Tage anhaltenden Dauerinfusion mit 2ml/h einer 50%igen Glukoselösung oder einer 0,45%igen Kochsalzlösung auf die Ausscheidung von Glukose im Urin der Ratten

Infusionsdauer (Tage)	2		5	
	K	GL	K	GL
Glukosezufuhr p. Infusion (g/Tag)	0	24	0	24
Glukose im Urin	neg.	pos.	neg.	neg.

6 Diskussion

6.1 Typ-II-Diabetes mellitus (NIDDM = Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus)

Diabetes mellitus vom Typ II ist eine Erkrankung, die sich über Jahre oder Jahrzehnte unbemerkt entwickeln kann, bevor sie durch das endgültige Entgleisen der Blutglukosekonzentration entdeckt wird. Ursachen des adipösen Typ-II-Diabetes sind neben einer genetischen Komponente vor allem Überernährung und Bewegungsmangel. Charakteristisch für diese Stoffwechselerkrankung ist die sehr früh beginnende Insulinresistenz, ein relativer Insulinmangel sowie wohl wegen beider eine vermehrte Glukoseproduktion in der Leber.

Längerdauernde Exposition von Geweben mit hohen Glukosekonzentrationen wird in der Literatur unter der Bezeichnung "Glukosetoxizität" diskutiert. Im Grunde genommen handelt es sich bei den Versuchen zur "Glukosetoxizität" um Überernährung von Geweben, die damit fertig werden müssen, obwohl sie hohes bzw. andauernd hohes Substratangebot gar nicht benötigen. Permanentes Überangebot an Substrat führt beim Menschen zu Übergewicht und in vielen Fällen zum Typ-II-Diabetes (Altersdiabetes) mit Hyperglykämie, Hypercholesterinämie (Hyperlipidämie) und Hypertonie. Folgen sind Mikro- und Makroangiopathie. Das Gewebe wird immer unempfindlicher gegenüber Insulin, vermutlich um sich gegen übermäßige Glukoseeinlagerung zur Wehr zu setzen. Die zunächst einsetzende Hyperinsulinämie bei nur leicht erhöhtem Blutzuckerspiegel scheint der Insulinresistenz entgegenwirken zu wollen, bis der Zeitpunkt eintritt, zu dem der Inselpräparat überfordert ist und es bei ansteigendem Blutzuckerspiegel zum Insulinmangel kommt. Eine über längere Zeit dauernde hyperkalorische Glukoseinfusion kommt einer Überernährung insbesondere durch Kohlenhydrate gleich. Der tägliche Kalorienbedarf einer jungen (300g) noch wachsenden Ratte beträgt ca. 45 kcal pro Tag. Mit der von uns verwendeten Glukoseinfusion führten wir den Tieren pro Tag 98,4 kcal zu. Nach 5 Tagen sank gegenüber den Kontrollen von ca. 10g der Futterverbrauch auf 7g pro Tag. Das ist etwa ein Drittel. Diese verminderte Futteraufnahme zusammen mit der infundierten Glukosemenge ergibt dennoch eine Kalorienzufuhr, die weit über dem Tagesbedarf liegt. Daraus erklärt sich schließlich die stärkere Gewichtszunahme bei den glukoseinfundierten Tieren. Möglicherweise liegt hier eine Situation vor, wie wir sie beim Menschen sehen, die dann letztlich zum Typ II Diabetes mit allen seinen Konsequenzen führt. In dieser Situation ist vor allem der Blutzuckerspiegel vom Interesse und zwar unter folgenden Gesichtspunkten:

1. Die Höhe des Blutzuckers ist das Ergebnis aus Zufuhr und von Glukoseaufnahme durch die Gewebe (Deponierung und Verstoffwechsellung zur Gewinnung von Energie)
2. Ausscheidung über die Nieren bei Überschreitung der Nierenschwelle
3. Einfluß auf die Sekretion von Insulin bzw. Einfluß der freigesetzten Insulinmenge auf den Blutzucker und schließlich
4. sein langfristiger Effekt in Bezug auf Folgeerkrankungen der Zuckerkrankheit, nämlich zunächst Insulinresistenz und langfristig Mikro- und Makroangiopathie. Die beiden letzteren dürften allerdings in unseren Experimenten wegen der kurzen Versuchsdauer von lediglich 5 Tagen noch keine Rolle spielen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bis zu 5 Tage anhaltende Dauerinfusionen mit einer 50%igen hyperkalorische Glukoselösung durchgeführt. Zu Anfang wurde bis zu 7 Tagen infundiert. Da sich in Vorversuchen die Blutglukosespiegel und das Insulinsekretionsverhalten zwischen 5 und 7 Tage Dauerinfusionen kaum unterschieden und die Ausfallquote der Versuchstiere bei 7 Tage Dauerinfusionen über 60% betrug, wurde die Infusionsdauer in den nun folgenden Versuchen auf 5 Tage festgelegt, wodurch die Ausfallquote auf ca. 30% reduziert werden konnte.

6.2 Der Blutzuckerspiegel unter Dauerinfusion

In Übereinstimmung mit den Befunden von Bedoya (1991), Sako (1992), Ammon et al. (1998) und Laybutt, Thompson et al. (1997), bei denen während einer Glukosedauerinfusion die Blutzuckerspiegel etwa auf das Zwei- bis Dreifache der Kontrollwerte erhöht waren, sind auch bei den Infusionsversuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit in etwa vergleichbare Ergebnisse gefunden worden.

24h nach Beginn der Dauerinfusion ist der Blutzuckerspiegel auf fast das Vierfache (475 mg/100ml) der Werte von Kontrolltieren (130 mg/100ml) angestiegen. Überraschend fällt er dann langsam und kontinuierlich wieder ab und erreicht nach 5 Tagen das normoglykämische Niveau (135 mg/100ml gegenüber 125 mg/100ml der Kontrolle) bei gleichbleibender Glukoseinfusion. Wir haben es also mit 2 verschiedenen Situationen zu tun, bei denen der Körper jeweils anders mit der ihm zugeführten Glukosemenge umgeht. Unter normaler Nahrungsaufnahme werden ca. 25% der zugeführten Glukosemenge zum Zweck der Energiegewinnung in verschiedenen Geweben metabolisiert, ca. 25% werden in der Leber gespeichert, ca.

50% in der Skelettmuskulatur und 1-3% gelangen in das Fettgewebe. Vermittelt werden die Aufnahme und Speicherung der Glukose durch Insulin. Nach 2 Tagen Infusion scheinen diese Mechanismen zu funktionieren. Wegen Überschreitung der Nierenschwelle taucht zunächst Glukose im Urin auf. Der Glykogengehalt der Muskulatur steigt von 3,3 auf 49 mg/g Skelettmuskel, der Triglyceridgehalt der Muskulatur von 245 auf 417 pmol/kg Skelettmuskel (Houdali et al., 2002). Dies ist wohl auf die Wirkung der stark angestiegenen Insulinkonzentration im Blut zurückzuführen: Insulin erhöht nicht nur die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe sondern auch die Synthese von Glykogen in Leber und Muskulatur bei gleichzeitiger Hemmung der Glykogenolyse und Gluconeogenese. Darüber hinaus stimuliert es die Triglyceridsynthese in der Leber, die Aufnahme von Fettsäuren in das Fettgewebe, die Triglyceridsynthese und hemmt dort die Lipolyse.

Nach 5 und 7 Tagen ist der Blutzuckerspiegel trotz Dauerinfusion nahezu normal. Überraschend ist dabei jedoch der noch deutlich erhöhte Plasmainsulinspiegel. Überraschend deswegen weil dies bei Normoglykämie (siehe Kontrolle) nicht der Fall sein sollte. Es muß also während der Hyperglykämiephase oder durch die dauernde Glukosezufuhr eine Sensibilisierung des Sekretionsmechanismus stattgefunden haben. Die Frage ist nun, wohin mit der permanenten übermäßigen Glukosezufuhr und wie geht der Körper damit um? Über die Niere verliert der Körper keine Glukose mehr. Dieser Weg ist also als Ursache für die Normalisierung des Blutzuckers ohne Bedeutung. Sieht man sich den Glykogengehalt der Muskulatur nach 5 Tagen an, so ist dieser sogar deutlich niedriger als nach 2 Tagen Infusion (Houdali et al., 2002). Und auch der Triglyceridgehalt der Muskulatur hat nicht weiter zugenommen trotz erhöhter Insulinspiegel. Dies spricht dafür, dass das Muskelgewebe nicht mehr als Speicher für übermäßig zugeführtes Substrat in Frage kommt. Es muß sich also gegen die abspeichernde Wirkung des Insulins zur Wehr gesetzt haben. Es ist insulinresistent geworden. In der Tat konnten Houdali et al. (2002) unter denselben Versuchsbedingungen wie in dieser Arbeit nachweisen, dass es zu einer Reduktion von Signaltransduktionsmetaboliten der Insulinwirkung im Muskelgewebe kam, die eine verminderte Wirkung von Insulin und damit die Insulinresistenz erklären könnten. Die Muskulatur schützt sich also vor weiterer Überladung mit Substraten (Glykogen und Triglyceriden). Dies ist insofern sinnvoll als die Muskulatur kein Speicherorgan sondern ein Arbeits-(Kontraktions)organ darstellt.

Wie geht der Körper dann mit dem Überangebot an Glukose um? Zunächst reduziert er die Nahrungsaufnahme um 22%. Berücksichtigt man dies, hätte er mit der Glukosezufuhr immer noch einen erheblichen Überschuß an oxidierbarem Substrat.

Da die glukoseinfundierten Tiere gegenüber den Kontrollen keine gesteigerte körperliche Aktivität aufweisen, trägt auch ein erhöhter oxidativer Stoffwechsel nicht zu zusätzlichem Energieverbrauch bei. Bleibt die Ablagerung in Form von Triglyceriden im Fettgewebe eine Möglichkeit. In der Tat nehmen die glukoseinfundierten Tiere von 2. zum 5. Tag der Infusion etwas über 4 g an Körpergewicht mehr zu als die Kontrollen. Wenn die vermehrte Einlagerung von Triglyceriden in das Fettgewebe unter unseren Versuchsbedingungen noch nachzuweisen wäre, würde das Ganze Sinn machen: denn Überernährung führt beim Menschen zu Übergewicht, wofür in erster Linie das Fettgewebe verantwortlich ist.

6.3 Die Insulinsekretion unter Dauerinfusion

Aus den Versuchen zur Dauerinfusion geht hervor, dass die starke Hyperglykämie nach 2 Tagen zu einer erheblichen Zunahme der Plasmainsulinkonzentration führt, die letztlich dafür sorgt, dass vermehrt Glukose ins Gewebe aufgenommen wird, wie zum Beispiel der starke Anstieg des Muskelglykogens zeigt (Houdali et al., 2002). Überraschend ist allerdings, dass nach 5 Tagen Infusion immer noch ein deutlich erhöhter Insulinspiegel vorliegt, obwohl sich die Blutzuckerkonzentration weitgehend normalisiert hat, und von dieser her eigentlich eine Stimulation der Sekretion in dem oben genannten Ausmaß nicht mehr erfolgen sollte. Dies spricht dafür, dass sich die Ansprechbarkeit der B-Zellen auf das Signal geändert haben muß und zwar in der Weise, dass diese bereits auf sonst nicht stimulierende Glukosekonzentrationen jetzt mit einer Sekretionssteigerung ansprechen. Dies zeigen frühere (Leahy, 1996) und die jetzt vorliegenden in vitro Untersuchungen.

In Arbeiten von Ammon et al 1998 wurden die Inseln zwei Tage infundierter Ratten in vitro mit verschiedenen Glukosekonzentrationen - von 2,8 bis 28 mM Glukose - stimuliert. Dabei zeigte sich, daß bereits bei 11,1 mM Glukose die maximale Insulinsekretion lag. Bei höheren Glukosekonzentrationen nahm sie leicht ab und unterschied sich nicht signifikant von den Werten der Kontrolle. Glukosekonzentrationen bis 11,1 mM verursachten also bei Inseln von glukoseinfundierten Tieren eine viel höhere Insulinsekretion als bei den Kontrollen, woraus eine Sensibilisierung der Langerhans Inseln durch die Dauerinfusion mit Glukose gefolgert wurde.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es, die Infusion auf 5 Tage auszudehnen und zu untersuchen, wie sich die verlängerte Infusionsdauer auf die Sekretionsfähigkeit von Langerhans Inseln auswirken würde. Im Gegensatz zu den

Versuchen (Ammon et al., 1998) wurden bei den Experimenten dieser Arbeit die Inseln *in vitro* auch ohne Glukosestimulation untersucht. Es stellte sich heraus, daß selbst bei 0 mM Glukose die Inseln sowohl bei zwei als auch bei fünf Tage glukoseinfundierten Ratten deutlich mehr Insulin als bei der Kontrolle sezernierten, was die Sensibilisierung der Inseln unterstreicht. Die Insulinsekretion stieg mit zunehmenden Glukosekonzentrationen und erreichte bei zwei Tage infundierten Tieren das Maximum bereits bei 5,6 mM Glukose, während das Sekretionsmaximum von 5 Tage glukoseinfundierten Tieren erst bei 11,1 mM erreicht wurde. Die Linksverschiebung der Konzentrationswirkungskurve für Glukose *in vitro* sowie die erhöhte Basalsekretion bei 0 mM Glukose zeigen deutlich, dass die Hyperglykämie während der ersten 2 Tage der Infusion die Ansprechbarkeit des Sekretionsmechanismus gegenüber Glukose deutlich erhöht, d.h. sensibilisiert hat, wohl um mit der stark erhöhten Glukosezufuhr fertig zu werden.

Wie in der Einleitung dargelegt, hängt die Sekretion eng mit der Glukosekonzentration und diese wiederum mit dem Glukosemetabolismus in der B-Zelle zusammen.

Die in diesem Zusammenhang auftretende Erhöhung der ATP/ADP-Quotienten sowie eine Erhöhung des Redoxstatus von NADPH/NADP und GSH/GSSG scheinen dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Eine Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten führt über die Hemmung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle zu einer Depolarisation der B-Zelle, wodurch über die Öffnung des spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanals und dem darauf folgenden Calciumeinstrom die Insulinsekretion ausgelöst wird (Ashcroft et al., 1984).

Sowohl bei 2 Tage als auch bei 5 Tage glukoseinfundierten Ratten ist selbst nach der Inkubation ohne Glukose ein erhöhter ATP/ADP-Quotient von ca. 5 festzustellen, der sich gegenüber 3 signifikant vom Quotienten der Kontrolle unterscheidet. Bei steigenden Glukosekonzentrationen bis 28 mM bleibt der ATP/ADP-Quotient von glukoseinfundierten Tieren in etwa gleich, nämlich bei 5 und ist nicht mehr signifikant unterschiedlich vom Quotienten der Kontrolltiere. Aber genau dieser fast gleichbleibende Quotient über den gesamten Konzentrationsbereich kann nicht allein die Sekretionsmaxima bei 5,6 mM nach zweitägiger und bei 11,1 mM nach fünftägiger Dauerinfusion erklären. Von Ammon und Wahl (Review, 1994) wurde postuliert, dass die Zunahme des ATP/ADP-Quotienten offensichtlich den Einschaltmechanismus für die Sekretion darstellt, dass andererseits der weitere Metabolismus der Glukose modulierend auf die Sekretion einwirkt. Favorisiert werden von Ammon und Wahl dabei der glukoseabhängige Anstieg reduzierter Pyridinnucleotide sowie des GSH/GSSG-Quotienten. Diesen Zusammenhang

untermauern die Daten von Ammon et al (1998), die nach zweitägiger Glukoseinfusion einen erhöhten NADPH/NADP-Quotienten gefunden haben, welcher parallel zur gesteigerten Insulinsekretion verlief.

Darüber hinaus können Phosphorylierungsreaktionen, die über die Phospholipase C und über die Adenylatcyclase laufen, zur erhöhten Sekretion von Insulin beitragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen klar, daß auch nach fünf Tagen noch eine Sensibilisierung der Insulinsekretion durch Glukose vorliegt. Sie fällt allerdings etwas geringer aus als nach zwei Tagen. Diese verringerte Sensibilisierung dürfte jedoch darauf zurückzuführen sein, daß jetzt nach fünf Tage Dauerinfusion der Blutzuckerspiegel nahezu normal ist und von ihm keine derart starke Signalwirkung ausgehen kann, wie wir sie nach einer zwei Tage langen Infusion finden.

6.4 Inselgröße, Glykogen- und Insulingehalt unter Dauerinfusion

Inselgröße

Die stark erhöhten Plasmainsulinkonzentrationen unter Dauerinfusion werfen nicht nur die Frage auf, wie sich diese auf Sekretion und Sekretionsmechanismus sondern auch auf Inselgröße und Insulingehalt auswirken. Bekanntlich steigert Glukose nicht nur Insulinsekretion sondern auch Insulinbiosynthese (Svensson et al., 1991).

Hier zeigt sich, dass es durch die Glukoseinfusion im untersuchten Zeitraum nicht zur Zellvermehrung gekommen ist, da sich die DNA-Gehalte der Inseln nicht verändert haben. Dagegen nahm der Proteingehalt der Inseln nach 2 Tagen Infusion um ca. 80% zu. Keine weitere Zunahme erfolgte nach 5 Tagen. Diese Ergebnisse lassen auf eine Hypertrophie schließen, die nach 2 Tagen Infusion bereits abgeschlossen ist. Dies stimmt mit den Daten in der Literatur überein (Bedoya & Jeanrenaud, 1991). Aus den o. g. Daten geht also hervor, dass durch die Glukosedauerinfusion keine Hyperplasie sondern nur eine Hypertrophie der Langerhans Inseln stattgefunden hat. Ähnliche Befunde finden sich auch in der Literatur (Bonner-Weir, 1989). Der Inselpräparat versucht also der Dauerbeanspruchung durch die permanente Glukoseinfusion kompensatorisch mit einer Vergrößerung seiner B-Zellen entgegenzuwirken.

Glykogengehalt

Dauerinfusion bewirkt nach 2 Tagen nicht nur eine Hypertrophie des Inselgewebes. Ähnlich wie in der Muskulatur (Vaag, Damsbo et al., 1992) findet sich auch eine Zunahme des Glykogengehaltes und zwar auf das 4-fache. Daß es sich dabei um eine echte Zunahme und nicht nur um eine Parallelität zur Hypertrophie handelt, ergibt sich aus der Tatsache, dass sich der Proteingehalt lediglich um 80% erhöht hat. Interessant und in Übereinstimmung mit der Literatur (Malaisse et al., 1993) ist die Beobachtung, dass der Glykogengehalt der Insel nach 5 Tagen wieder deutlich geringer ist. Während der Rückgang des Glykogengehaltes in der Muskulatur (Houdali et al., 2002; Sugden, Holness et al., 1997) möglicherweise auf Insulinresistenz zurückzuführen sein könnte, trifft solches für die B-Zelle nicht zu, da dort die Glukoseaufnahme nicht insulinabhängig ist sondern über den insulin-unabhängigen GLUT 2 verläuft. Die Glukoseaufnahme in die B-Zelle ist direkt abhängig von der Glukosekonzentration im Blut, und diese ist nach 5 Tagen wieder normal. Allerdings ist nicht bekannt, ob die Glukosesynthese der B-Zelle insulinabhängig ist. Immerhin verfügen auch Langerhans'sche Inseln über Insulinrezeptoren (Verspohl et al., 1980).

Insulingehalt

Bereits nach 2 Tagen Dauerinfusion kommt es zu einer drastischen Abnahme des Insulingehaltes Langerhanscher Inseln (Abb 5.2.5.1) und zwar sowohl berechnet auf die Inselzahl als auch den DNA-Gehalt. Er ist noch deutlicher auf Proteinbasis, die die Hypertrophie mitberücksichtigt. Hier beträgt er gegenüber den Kontrollen nur noch 23%. Es hält also die Biosynthese nicht mit der Sekretion Schritt. Offenbar wird durch die Hyperglykämie nur die Sekretion aber nicht in gleichem Umfang die Biosynthese sensibilisiert. Und insbesondere nach 5 Tagen Infusion dürfte von der Normoglykämie keine Stimulation der Biosynthese mehr ausgehen. Es wäre an dieser Stelle interessant zu wissen, ob dies auch für den adipösen Typ-II-Diabetes gilt, wenn es nach der Phase der Hyperinsulinämie zum relativen Insulinmangel kommt.

In Arbeiten von Bedoya (1991) und Ammon et al. (1998) wurde bei 2 Tage glukoseinfundierten Ratten im Vergleich mit der Kontrolle ein um ca. 80% reduzierter Insulingehalt der Langerhans Inseln gefunden.

Die Messung desselben Parameters in der vorliegenden Arbeit sollte vor allem Aufschluß darüber geben, wie sich der Insulingehalt verhält, wenn die Glukosedauerinfusion von 2 auf 5 Tage ausgedehnt wird. Bei 2 Tage

glukoseinfundierten Tieren reduziert sich der Insulingehalt auf ca. 35% im Vergleich mit der Kontrolle. Bei 5-tägiger Dauerinfusion mit Glukose beträgt der Insulingehalt nur noch 20% des Wertes der Kontrolltiere. Allerdings sind die Werte von 2 und 5 Tage glukoseinfundierten Ratten nicht signifikant unterschiedlich.

Der stark reduzierte Insulingehalt, besonders bei 5-tägiger Glukoseinfusion, weist zum einen unter Berücksichtigung der Plasmainsulinkonzentrationen auf eine noch intakte Sekretion von Insulin hin. Zum andern zeigt diese starke Abnahme des Insulinwertes beim Vergleich mit der Kontrolle, dass die Langerhans Inseln einen großen Teil an Insulin ausschütten, um möglichst viel Glukose aus der Blutbahn zu entfernen (s. Abb. 5.1.1).

Schlussfolgerungen

Allgemein lässt sich für die fünftägige hyperkalorische Dauerinfusion mit Glukose sagen, dass in vivo bei den glukoseinfundierten Ratten verschiedene Adaptationsmechanismen in Gang gesetzt werden, um den kurz nach Beginn der Infusion stark erhöhten Blutglukosespiegel nach 5 Tagen auf das normoglykämische Niveau zurückzuführen.

- Sensibilisierung der B-Zellen

Die Insulinsekretion ist nach 5 Tage Dauerinfusion noch intakt. Sie ist nicht nur noch intakt, sondern die B-Zellen sind durch die Glukosedauerinfusion sogar sensibilisiert. Dies wird insbesondere dadurch sichtbar, dass die Inseln bei der in vitro Inkubation selbst bei 0 mM Glukose, d.h. in Abwesenheit von zugesetzter Glukose als Stimulator, mehr Insulin sezernieren als bei den Kontrollen.

- Hypertrophie der B-Zellen

Um die hohe Sekretionsleistung zu ermöglichen, findet beim Inselapparat kompensatorisch eine Vergrößerung der B-Zellen statt. Es kommt jedoch nicht zu einer Hyperplasie derselben Zellen, da es keinen Unterschied zwischen DNA-Gehalten von glukose- und kochsalzinfundierten Ratten nach 5 Tagen Dauerinfusion gibt.

- Erhöhte Gewichtszunahme trotz verringerten Futtermittelsverbrauches

Der Hyperglykämie entgegenwirkend trägt auch dazu bei, dass die glukoseinfundierten Tiere weniger als die Kontrolltiere gefressen haben und dass bei ihnen die Gewichtszunahme aber trotzdem ausgeprägter als bei den kochsalzinfundierten Ratten ausfällt. Möglicherweise wird ein Teil der hyperkalorischen Glukosezufuhr in Fettsäuren umgewandelt und in Form von Fett im

Fettgewebe gespeichert. Die Skelettmuskulatur kommt als Speicherorgan überschüssiger Glukose nicht in Frage, da der Glykogengehalt der Skelettmuskulatur nach 5 Tagen Infusion nur noch ein Drittel dessen aufwies, welcher nach 2 Tagen Dauerinfusion festgestellt worden war.

- Insulinresistenz

Um sich vor unphysiologischer Glukoseeinlagerung in die Muskulatur in Form von Glykogen zu schützen, scheint das Muskelgewebe eine Resistenz gegenüber Insulin zu entwickeln, über deren möglichen Mechanismus kürzlich von Houdali et al. (2002) berichtet wurde.

7 Zusammenfassung

Fragestellung

Charakteristisch für den Typ-II-Diabetes ist die Hyperglykämie, eine Insulinresistenz und ein relativer Insulinmangel. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich eine permanent (5 Tage) stark erhöhte, hyperkalorische Glukosezufuhr auf die Funktion der B-Zelle auswirkt. Zu diesem Zweck wurde die Methode der Glukosedauerinfusion (fünftägige Dauerinfusion mit einer 50%tigen Glukoselösung und mit einer Infusionsrate von 2ml/Stunde) angewandt.

Mit den gewonnenen Blutproben und den isolierten Langerhans Inseln sollten folgende Fragen untersucht werden:

- Wie verhalten sich Blutglukosespiegel, Blutinsulinspiegel und Insulinogener Index (Insulinwirksamkeit) nach einer Dauerinfusion von 5 Tagen?
- Findet sich zu dieser Zeit eine schwächere oder stärkere Sensibilisierung der Insulinsekretion als bei zweitägiger Dauerinfusion nachgewiesen?
- Ist eine mögliche gesteigerte Insulinsekretion auf eine Hyperplasie bzw. Hypertrophie der Langerhans Inseln zurückzuführen?
- Wie verhält sich der Insulingehalt der Langerhans Inseln nach 5 Tagen Dauerinfusion?
- Wie verhalten sich Freßverhalten und Körpergewicht?
- In einer weiteren Dissertation (Houdali) sollte der Frage nach einer möglicherweise entstehenden Insulinresistenz der Muskulatur unter den gleichen Versuchsbedingungen nachgegangen werden.

Ergebnisse

In vivo Befunde

Durch die Dauerinfusion mit Glukose steigen die Blutzuckerwerte zunächst stark an. Nach 24 Stunden erreichen sie das Maximum von 475 mg/dl. Sie sinken dann ab und liegen nach 5 Tagen mit 130 mg/dl auf gleichem Niveau wie die der Kontrolltiere.

Der Plasmainsulinspiegel ist bei den glukoseinfundierten Ratten während der gesamten Infusionsdauer erhöht. Er erreicht nach 24 Stunden den Spitzenwert von 900 μ U/ml. Nach 5 Tagen ist der Plasmainsulinspiegel mit 200 μ U/ml immer noch fünfmal höher als bei den Kontrolltieren.

Der Insulinogene Index bei glukoseinfundierten Ratten ist mit 1,8 am ersten Tag sechsmal und mit 1,2 nach fünf Tagen viermal höher als bei der Kontrollgruppe.

In vitro Befunde

Die Insulinsekretion bei glukoseinfundierten Ratten ist in vitro stark erhöht. Schon im Inkubationsmedium, welches keine Glukose enthält, ist die Sekretion mit 500 μ U Insulin /5Inseln /60min nach 2 Tagen zehnfach und mit 230 μ U Insulin /5Inseln /60min nach 5 Tagen noch fast fünfmal stärker erhöht als bei den Kontrolltieren. Dieser Anstieg hält bei einer Stimulation mit Glukosekonzentrationen von 2,8 mM bis 11,1 mM an. Bei weiterer Erhöhung der Glukosekonzentrationen auf bis 28 mM ist die Insulinsekretion nicht mehr steigerbar.

Für das ATP/ADP-System ist ein starker Anstieg des ATP-Gehalts schon bei der Inkubation ohne Glukose zu verzeichnen. Der daraus gebildete ATP/ADP-Quotient von 5 unterscheidet sich signifikant von dem Quotienten (3,8) der Kontrolltiere. Bei Stimulation mit Glukosekonzentrationen von 2,8 mM bis 28 mM sind die gefundenen ATP/ADP-Quotienten glukose- und kochsalzinfundierter Ratten nicht mehr voneinander signifikant verschieden.

Was die DNA-Gehalte Langerhans'scher Inseln anbetrifft, so ist sowohl bei glukose- als auch kochsalzinfundierten Ratten keine Zunahme zu verzeichnen.

Bezüglich der Proteingehalte findet sich im Vergleich zu den Kontrollen bei den glukoseinfundierten Tieren eine 80%ige Zunahme.

Umgekehrt verhält es sich bei Insulingehalten: Nach 5 Tagen Glukoseinfusion ist der Insulingehalt um 80% vermindert.

Bei den glukoseinfundierten Ratten ist während der fünftägigen Dauerinfusion der Futterverbrauch um ein Drittel gesunken. Dagegen fand sich bei denselben Tieren eine Zunahme des Körpergewichtes um 4 g. Eine Glukoseausscheidung im Urin konnte bei den mit Glukose infundierten Ratten nach 5 Tagen Infusion nicht beobachtet werden.

Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich der Schluß, dass der Gesamtorganismus auf die permanent erhöhte Kalorienzufuhr durch Glukose sein Insulinsekretionspotential gesteigert hat und zwar durch Hypertrophie und Sensibilisierung der B-Zellen gegenüber Glukose. Ursache der Sensibilisierung dürfte ein hoher ATP/ADP-Quotient bei normalerweise nicht stimulatorischer

Glukosekonzentration sein. Die Sensibilisierung der B-Zelle hat das Ziel, das vermehrte Substratangebot aus dem Blut wegzuschaffen, was dann letztlich zu erhöhter Gewichtszunahme führte. Zum anderen hat er die Nahrungsaufnahme gedrosselt.

Was eine mögliche Glukosetoxizität betrifft, kann man sagen, dass die fünftägige Dauerinfusion mit einer 50%tigen Glukoselösung eine solche noch nicht erkennen läßt. Darüber hinaus dürfte sich jedoch der Organismus bereits jetzt gegen die permanent gesteigerte Insulinaktivität zur Wehr setzen, indem er eine Insulinresistenz (z.B. Muskulatur) ausbildet.

8 Literaturverzeichnis

Ämmälä C., Ashcroft F. M., Rorsman P. (1993)

Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single β - cells. *Nature* 363, 356-358

Ahren B., Taborsky G.J., Porte D., jr. (1986)

Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. *Diabetologia* 29, 827-836

Ammon H.P.T., Verspohl E. J. (1976)

Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin. *Endocrinology* 99, 1469-1476

Ammon H.P.T., Wahl M.A. (1989)

The impact of thiols for insulin secretion. *Exp. Clin. Endocrinol.* 93, 136-142

Ammon H.P.T., Reiber C., Verspohl E. J. (1991)

Indirect evidence of short-loop negative feedback of insulin secretion in the rat. *Endocrinology* 128, 27-34

Ammon H.P.T., Wahl M.A. (1994)

Islet redox ratios: their role in insulin release. In: Flatt P.R., Lenzen S. (eds.) *Frontiers of insulin secretion and pancreatic B-cell research.* Smith-Gordon London, 113-122

Ammon H.P.T., Bacher M., Brändle W.F., Waheed A., Roenfeldt M., el-Sayed M.E., Ahmed A.A., Wahl M.A. (1998)

Effect of forty-eight-hour glucose infusion into rats on islet ion fluxes, ATP/ADP ratio and redox ratios of pyridine nucleotides. *J. Endocrinol.* 156, 583-590

Araki E., Lipes M.A., Patti M.E., Bruning J.C., Haag B., Johnson R.S., Kahn C.R. (1994)

Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372, 186-190

Arkhammer P, Juntti-Berggren L., Larsson O., Welsh M., Nanberg E., Sjöholm A., Köhler M., Berggren P.O. (1994)

Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the β -cell voltage-activated calcium channels. *J. Biol. Chem.* 269, 2743-2749

Ashcroft F.M., Rorsman P. (1989)

Electrophysiology of the pancreatic B-cell. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 54, 87-143

Ashcroft F.M., Proks P., Smith P.A., Ämmälä C., Bokvist K., Rorsman P. (1994)

Stimulus-secretion coupling in pancreatic β cells. *J. Cell. Biochem.* 55S, 54-65

Beckmann J., Holze S., Lenzen S., Panten U. (1981)

Quantification of cells in islets of Langerhans using DNA determination. *Acta Diabetol. Lat.* 18(1), 51-57

Bedoya F.J., Jeanrenaud B. (1991)

Evolution in insulin secretory response to glucose by perfused islets from lean (FA/FA) rats chronically infused with glucose. *Diabetes* 40, 7-14

Berggren P.O., Rorsman P., Efendic S., Östenson C.-G., Flatt P.R., Nilsson T., Arkhammer P., Junti-Berggren L. (1992)

Mechanism of action of entero-insular hormones, islet peptides and neural input on the insulin secretory process. In: Flatt P.R. (ed.) *Nutrient regulation of insulin secretion*. Portland Press London, 289-318

Berridge M.J. (1983)

Rapid accumulation of inositol triphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides of phosphatidylinositol. *Biochem. J.* 212, 849-858

Berti L., Mosthaf L., Kroder G., Kellerer M., Tippmer S., Mushack J., Seffer E., Seedorf K., Häring H.U. (1994)

Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 3381-3386

Best L., Dunlop M., Malaisse W.J. (1984)

Phospholipid metabolism in pancreatic islets. *Experientia* 40, 1085-1090

Bonner-Weir S., Deery D., Leahy J.L., Weir G.C. (1989)

Compensatory growth of pancreatic β -cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38, 49-53

Bottazzo G.F., Florin-Christensen A., Doniach D. (1974)

Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* ii, 1279-1282

Bradford M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254

Brändle W.F. (1995)

Einfluß einer 48-stündigen Glukoseinfusion auf Pyridinnukleotide von Langerhans Inseln der Ratte. Dissertation Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

Creutzfeldt W. (1979)

The incretin concept today. *Diabetologia* 19, 75-85

Cuatrecasas P. (1971)

Insulin receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1264-1268

Debant A., Ponzio G., Clauser E., Contreres J.O., Rossi B. (1989)

Receptor cross-linking restores an insulin metabolic effect altered by mutation on tyrosine 1162 and tyrosine 1163. *Biochemistry* 28, 14-17

Del Prato S., Leonetti F., Simonson D.C., Sheehan P., Matsuda M., DeFronzo R.A. (1994)

Effect of sustained physiologic hyperinsulinaemia and hyperglycemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man. *Diabetologia* 37, 1026-35

DeMeyts P., Gu J.L., Shymko R.M., Bell G., Whittaker J. (1988)

Identification of an insulin receptor binding domain complementary to the cooperative site of insulin. *Diabetologia* 31, 484A

Demeyts P., Gu J.L., Katuria S., Shymko R.M., Kaplan B., Smal J. (1989)

Insulinomimetic properties of a synthetic insulin receptor α -subunit domain. *Diabetes* 38, A3

Freychet P., Kahn C.R., Jarret D.B., Roth J. (1971)

Insulin receptors in the liver: specific binding of (¹²⁵I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1833-1837

Friedmann J.E., Dudek R.W., Whitehead D.S., Downes D.L., Frisell W.R., Caro J.F., Dohm G.L. (1991)

Immunolocalization of glucose transporter GLUT4 within human skeletal muscle. *Diabetes* 40, 150-154

Gepts W. (1965)

Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 14, 619-633

Gorsuch A.N. (1987)

The Immunogenetics of diabetes. *Diabetic. Med.* 4, 510-516

Gotoh M., Maki T., Kiyozumi T., Satomi S., Monaco P. (1985)

An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 40, 437-438

Henquin J.C., Meissner H.P. (1984)

Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia* 40, 1043-1052

Houdali B., Nguyen V., Ammon H.P.T., Haap M., Schechinger W., Machicao F., Rett K., Häring H.U. Schleicher E.D. (2002)

Prolonged glucose infusion into conscious rats inhibits early steps in insulin signaling and induces translocation of GLUT4 and protein kinase C in skeletal muscle. *Diabetologia* 45, 356-368

- Inagaki N., Gono T., Clement IV J.P., Namba N., Inazawa J., Gonzales G., Aguilar-Bryan L., Seino S., Bryan J. (1995)
Reconstitution of I_{KATP} : An inward rectifier subunit plus the sulphonylurea receptor. *Science* 270, 1166-1170
- Jacobs S., Cuatrecasas P. (1981)
Insulin receptor: structure and function. *Endocrinol. Rev.* 2, 251-263
- Kissane J.M., Robins E. (1985)
The fluorometric measurement of desoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 233, 184
- Kono T., Barham F.W. (1971)
The relationship between the insulin-binding capacity of fat cells and the cellular response to insulin. Studies with intact and trypsin-treated fat cells. *J. Biol. Chem.* 246, 6210-6216
- Laybutt D.R., Thompson A.L., Cooney G.J., Kraegen E.W. (1997)
Selective chronic regulation of GLUT1 and GLUT4 content by insulin, glucose and lipid in rat cardiac muscle in vivo. *Am. J. Physio.* 273, H1309-H1316
- Leahy J.L., Hosokawa Y.A., Hosokawa H., Chen C. (1996)
Mechanism of impaired glucose-potentiated insulin secretion in diabetic 90% pancreatectomy rats. Study using glucagons-like peptide. *J. Clin. Invest.* 1, 180-186
- Malaisse W.J., Maggetto C., Leclercq-Meyer V., Sener A. (1993)
Interference of glycogenolysis with glycolysis in pancreatic islets from glucose-infused rats. *J. Clin. Invest.* 432-436
- McDonald M.J. (1990)
Elusive proximal signals for β -cells for insulin secretion. *Diabetes* 39, 1461-1466
- Müller H.K., Kellerer M., Ermel B., Muhlhofer A., Obermaier K.B., Vogt B., Häring H.U. (1991)
Prevention by protein kinase C inhibitors of glucose-induced insulin receptor tyrosine kinase resistance in rat fat cells. *Diabetes* 40, 1440-1448

Nielsen J.H., Lernmark A. (1983)

Cell separation: methods and selected applications.

Academic Press, New York, p. 99

Ohlson L.O., Larsson B., Björntop P., Eriksson H., Svardsudd K., Wellin L., Tibblin G., Wilhelmsen L. (1988)

Risk factors for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Thirteen and one-half years of follow-up of the participants in a study of Swedish men born in 1913. *Diabetologia* 31, 798-805

O' Rahilly S., Spivey R.S., Holman R.R., Nugent Z., Clark A., Turner A.C. (1987)

Type II diabetes of early onset: a distinct clinical and genetic syndrome? *Br. Med. J.* 294, 923-928

Persaud S.J., Jones P.M., Howell S.L. (1991)

Activation of protein kinase C is essential for sustained insulin secretion in response to cholinergic stimulation. *Biochem. Biophys. Acta* 1091, 120-122

Rorsman P., Trube G. (1985)

Glucose dependent K^+ channels in pancreatic B-cells are regulated by intracellular ATP. *Pflügers Arch.* 405, 305-309

Sako Y., Eizirik D., Grill V. (1992)

Impact of uncoupling glucose stimulus from secretion on B-cell release and biosynthesis. *Endocrinol. Metab.* 25, E 150-154

Sartor G., Schersten B., Carlström S., Melander A., Norden A., Persson G. (1980)

Ten-year follow-up of subjects with impaired glucose tolerance: prevention of diabetes by tolbutamide and diet regulation. *Diabetes* 29, 41-49

Schuit F.C., Pipeleers D.G. (1986)

Differences in adrenergic recognition by pancreatic A and B cells. *Science* 232, 875-877

Shulman G.I., Rothman D.L., Jue T., Stein P., DeFronzo R.A., Shulman R.G. (1990)

Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N. Engl. J. Med.* 322, 223-228

Soeldner J.S., Sloane D. (1965)

Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique. *Diabetes* 14, 771-779

Sugden M.C., Holness M.J., Fryer L.G. (1997)

Differential regulation of glycogen synthase by insulin and glucose in vivo in skeletal muscles of the rat. *Am. J. Physiol.* 273, E479-E847

Sutton R., Peters M., McShane P., Gray D.W.R., Morris P.J. (1986)

Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase.

Transplantation 42, 689-691

Svensson C., Hellerström C. (1991)

Longterm effects of a high glucose concentration in vitro on the oxidative metabolism and insulin production of isolated rat pancreatic islets. *Metabolism* 40, 513-518

Thorens B., Sarkar H.K., Kaback H.R., Lodish H.F. (1988)

Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55, 281-190

Vaag A., Damsbo P., Hother N.O., Beck N.H. (1992)

Hyperglycemia compensates for the defects in insulin-mediated glucose metabolism and in the activation of glycogen synthase in the skeletal muscle of patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35, 80-88

Verspohl E.J., Ammon H.P.T. (1980)

Evidence for presence of insulin receptors in rat islets of Langerhans. *J. Clin. Invest.* 65, 1230-1237

Vogt B., Muhlbacher C., CarrascosaObermaier K.B., Seffer E., Mushack J., Pongratz D., Häring H.U. (1992)

Subcellular distribution of GLUT4 in the skeletal muscle of lean type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients in the basal state. *Diabetologia* 35, 456-463