



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

Eine Studie zur Wirkung von Insulinsensitisern und Naturheilstoffen in
genetisch adipösen Nagermodellen für Typ 2 Diabetes

angestrebter akademischer Grad

Doktor/in der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Mag. Zsuzsanna Szöcs
Matrikel-Nummer:	9900774
Dissertationsgebiet (lt. Studienblatt):	Zoologie
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Prof. Dr. Clemens Fürnsinn

Wien, am 27. August 2009

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, an Nagermodellen für Typ 2 Diabetes die Wirksamkeit von Extrakten von Arzneipflanzen zu untersuchen, die in weniger entwickelten Ländern zur Behandlung des Diabetes mellitus verwendet werden und deren Wirksamkeit auch in der wissenschaftlichen Literatur dokumentiert ist. Im Sinne einer Positivkontrolle wurde ein detailliertes Wirkprofil des etablierten Antidiabetikums Pioglitazon an der Zucker Diabetic Fatty (ZDF)-Ratte erarbeitet.

Die Profilierung des ZDF-Syndroms zeigte, dass solche Ratten im Alter zwischen 7 und 12,5 Wochen eine deutliche Hyperglykämie entwickeln, was mit Reduktionen von zirkulierendem Plasmainsulin und Plasmaadiponektin assoziiert ist. Eine präventive Behandlung mit Pioglitazon ab Woche 7 steigerte das Plasmaadiponektin sehr deutlich und verhinderte die Entwicklung der Hyperglykämie. Wurde die Behandlung erst im Alter von 10,5 Wochen begonnen, so senkte Pioglitazon die bestehende Hyperglykämie nur vorübergehend, nach 31 Behandlungstagen war kein Unterschied zur Hyperglykämie unbehandelter Kontrolltiere mehr feststellbar. Bei noch späterer Intervention im Alter von 15,5 Wochen blieb Pioglitazon ganz ohne glukosesenkende Wirkung. Unabhängig von der Wirkung auf die Blutglukose waren Plasmaadiponektin und Gewichtszunahme in allen Pioglitazon-behandelten ZDF-Ratten gesteigert. Diese umfangreiche Darstellung und Analyse der longitudinalen Veränderungen der Stoffwechsellage von ZDF-Ratten sowie der Effekte einer Intervention mit Pioglitazon macht Parallelen und Unterschiede zwischen dem ZDF-Syndrom und dem Typ 2 Diabetes des Menschen deutlich. Solche Informationen sind wichtig für eine angemessene Interpretation von Studien, die mit diesem Tiermodell durchgeführt werden.

Eine Behandlung von ZDF-Ratten mit Extrakten von *Suaeda fruticosa* und *Juniperus communis* blieb gänzlich ohne blutglukosesenkende Wirkung. Auch die Plasmakonzentrationen von Triglyzeriden und Cholesterin waren nicht geringer als in unbehandelten Kontrolltieren, sodass die behauptete antidiabetische Wirksamkeit dieser Pflanzenextrakte an der ZDF-Ratte nicht nachvollziehbar war. In adipösen db/db-Mäusen, in denen Pioglitazon eine deutliche Blutglukosesenkung bewirkte, wurden Extrakte von *Ceiba pentandra* und *Bridelia ndellensis* getestet. Hierbei bewirkte nur der Extrakt von *Bridelia ndellensis* ein Absinken der Blutglukose und eine Verbesserung der Glukosetoleranz. Dies war jedoch mit reduzierter Körpergewichtszunahme assoziiert, mutmaßlich als Folge verringerter Nahrungsaufnahme. Die glukosesenkende Wirkung des Extrakts von *Bridelia ndellensis* könnte somit Folge eines Appetitverlusts sein, der sehr unspezifische Ursachen, wie z.B. Übelkeit, haben kann.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass viele Berichte über eindrucksvolle antidiabetische Wirksamkeit von Pflanzenextrakten in einschlägigen Tiermodellen nicht bestätigt werden können. Dies könnte verursacht sein durch Unterschiede in Untersuchungsprotokollen, Herkunft oder Extraktionsverfahren, aber auch durch unzureichende Qualität und Verlässlichkeit der betreffenden Berichte.

Abstract

The present study was to assess and analyse the antidiabetic effects of plant extracts in rodent models of type 2 diabetes. The examined extracts are traditionally used in less developed countries as remedies for diabetes mellitus and their glucose-lowering activities are documented in the scientific literature.

In this context, the established anti-diabetic drug pioglitazone served as a positive control and its pharmacology was thoroughly profiled in Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats. Between 7 and 12.5 weeks of age, ZDF-rats developed severe hyperglycaemia, which was strongly associated with decreases in circulating insulin and adiponectin. When pioglitazone treatment was started at an age of 7 weeks, i.e. before the deterioration of blood glucose, pioglitazone markedly elevated plasma adiponectin and completely prevented the development of hyperglycaemia. Initiation of pioglitazone treatment at a later stage of disease development (at an age of 10.5 weeks) ameliorated the prevailing hyperglycaemia only modestly and transiently. After 31 days of daily treatment (15 weeks-old), the difference in blood glucose concentrations of treated versus untreated animals was lost. Intervention with pioglitazone at a further advanced age of 15.5 weeks did not have any glucose lowering effect at all, although plasma adiponectin and weight gain increased. This detailed portrayal of the longitudinal development of the ZDF-syndrome and of the consequences of intervention with pioglitazone pinpoints parallels and differences between this hyperglycaemic animal model and human type 2 diabetes. When animal models are used as tools to learn more about human disease, such detailed investigation and characterisation of their syndromes is an indispensable prerequisite for adequate interpretation.

Other groups of ZDF-rats were treated with plant extracts of *Suaeda fruticosa* and *Juniperus communis*, but these extracts lacked any glucose lowering effect. Comparison to vehicle-treated control animals revealed no effect on the plasma concentrations of cholesterol and triglycerides either. Glucose lowering activities of these plant extracts as described in the literature could therefore not be confirmed in ZDF-rats. Extracts of *Ceiba pentandra* and *Bridelia ndellensis* were tested in obese db/db-mice, which like ZDF rats were responsive to the glucose lowering action of pioglitazone. In this animal model, only the extract from *Bridelia ndellensis* ameliorated basal hyperglycaemia and improved glucose tolerance. However, the results did not allow to exclude that glucose lowering was secondary to reduced food intake and impaired weight gain. The antihyperglycaemic effect of the extract of *Bridelia ndellensis* remains without interest for diabetes treatment in humans, as long as loss of appetite due to unspecific actions like, e.g., induction of nausea are excluded as the underlying mechanism.

The present work suggests that impressive antidiabetic activities of medical plant extracts as reported in the scientific literature are often difficult to confirm. This could be due to variation in research protocols, animal models, origin of plant material, and/or the methods of extraction. But insufficient quality and reliability of available scientific reports can not be excluded either.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Glukosestoffwechsel	7
1.1.1	Glukosehomöostase	8
1.1.2	Insulin.....	8
1.1.3	Insulinsignalübertragung	9
1.2	Diabetes mellitus Typ 2	11
1.3	Insulinsensitiser	12
1.3.1	Metformin	12
1.3.2	Thiazolidindione	13
1.4	Tiermodelle für Typ 2 Diabetes	16
1.4.1	ZDF-Ratten	16
1.4.2	db/db-Mäuse	19
1.5	Naturheilstoffe	21
1.5.1	Ethnopharmakologie	21
1.5.2	Extrakte	23
1.5.2.1	Suaeda fruticosa (CHENOPODIACEAE).....	23
1.5.2.1.1	Pflanze	23
1.5.2.1.2	Traditionelle Anwendung.....	24
1.5.2.2	Juniperus communis (CUPRESSACEAE).....	25
1.5.2.2.1	Pflanze	25
1.5.2.2.2	Traditionelle Anwendung.....	26
1.5.2.3	Bridelia ndellensis (EUPHORBIACEAE).....	27
1.5.2.3.1	Pflanze	27
1.5.2.3.2	Traditionelle Anwendung.....	28
1.5.2.4	Ceiba pentandra (MALVACEAE).....	30
1.5.2.4.1	Pflanze	30
1.5.2.4.2	Traditionelle Anwendung.....	31
1.6	Zielsetzung	34
2	MATERIAL UND METHODEN	35
2.1	Untersuchungen an ZDF-Ratten	35
2.1.1	Versuchstiere	35
2.1.1	Behandlung.....	35
2.1.2	Extrakte und Substanzen	36
2.1.2	Wöchentliche Untersuchungen	36
2.1.3	Untersuchungen am Ende der Behandlung	37
2.1.3.1	Gewebe und Blutentnahme	37
2.1.3.2	Analytik der Plasmaparameter.....	37
2.1.3.3	Analyse der Proteinexpression und -phosphorylierung	38

2.1.3.3.1	Herstellung der Gewebehomogenate.....	38
2.1.3.3.2	Proteinbestimmung	39
2.1.3.3.3	Gelelektrophorese	40
2.1.3.3.4	Western Blotting.....	42
2.1.3.3.5	Immunodetektion.....	42
2.1.3.4	Präparation des Musculus soleus.....	44
2.1.3.4.1	Inkubationsmedium	45
2.1.3.4.2	Insulin.....	45
2.1.3.4.3	Radiomarkierte Substrate.....	45
2.1.3.4.4	Vorinkubation	46
2.1.3.4.5	Messphase.....	46
2.1.3.5	Herstellen der Gewebelysate.....	47
2.1.3.6	Analyse der Lysate des Musculus soleus	47
2.1.3.6.1	CO ₂ -Produktion aus Glukose oder Palmitat	47
2.1.3.6.2	Laktatproduktion.....	48
2.1.3.6.3	Glukosetransport.....	50
2.1.3.6.4	Glykogengehalt	51
2.1.3.6.5	Glykogensynthese.....	52
2.2	Untersuchungen an db/db-Mäusen	54
2.2.1	Versuchstiere	54
2.2.2	Behandlung.....	54
2.2.3	Extrakte und Substanzen	55
2.2.4	Wöchentliche Untersuchungen	56
2.2.5	Untersuchungen am Ende der Behandlung	56
2.2.5.1	Oraler Glukosetoleranztest.....	56
2.2.5.2	Gewebeentnahme	56
2.2.5.3	Analytik.....	57
2.3	Statistik.....	57
3	RESULTATE	58
3.1	ZDF-Ratten.....	58
3.1.1	Altersabhängige Entwicklung des ZDF-Syndroms	58
3.1.2	Korrelationen verschiedener Parameter bei ZDF-Ratten im Alter von 12.5 Wochen	68
3.1.3	Einfluss einer Intervention mit Pioglitazon.....	72
3.1.4	Einfluss einer Intervention mit Metformin	78
3.1.5	Western Blotting.....	80
3.1.6	Soleusinkubationen.....	83
3.1.7	Pflanzenextrakte	89
3.2	db/db Mäuse.....	93
3.2.1	Intervention mit Pioglitazon	93
3.2.2	Pflanzenextrakte	97

4	DISKUSSION.....	104
4.1	ZDF-Ratten.....	104
4.1.1	Altersabhängige Entwicklung des ZDF-Syndroms	104
4.1.2	Einfluss einer Intervention mit Pioglitazon.....	107
4.1.3	Wirkungsmechanismen von Pioglitazon.....	108
4.1.4	Einfluss einer Intervention mit Metformin	111
4.1.5	Einfluss einer Intervention mit Suaeda fruticosa	113
4.1.6	Einfluss einer Intervention mit Juniperus communis	115
4.2	db/db-Mäuse	116
4.2.1	Altersabhängige Entwicklung	116
4.2.2	Einfluss einer Intervention mit Bridelia ndellensis	117
4.2.3	Einfluss einer Intervention mit Ceiba pentandra.....	118
4.3	Konklusion.....	120
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	122
6	CURRICULUM VITAE	135

1 EINLEITUNG

1.1 Glukosestoffwechsel

Kohlenhydrate, zu denen die **Glukose** zählt, dienen als Energiespeicher und Brennstoff im Säugetierorganismus. Glukose selbst ist eine Aldohexose, ist gut wasserlöslich und liegt größtenteils als Ring (α -d (+)-Glukopyranose) vor. Sie ist in der Natur Baustein für Stärke und Zellulose, sowie in gebundener Form auch in Rohr- und Milchzucker enthalten [1]. Der Großteil der Glukose wird letztendlich in der Zellatmung katabolisiert und liefert so die nötige Energie für die Produktion von ATP und NADH und somit für alle endergonischen Prozesse der Biosynthese [2]. Für das Gehirn und die Erythrozyten ist Glukose der wichtigste Energielieferant, da sie kaum Brennstoffreserven besitzen und ihr ATP nicht durch Fettsäureoxidation produzieren können. In ihren stoffwechselaktiven Formen, dem Glukose-6-Phosphat und der Uridindiphosphat-Glukose steht sie dem Körper zur Verfügung. Vor allem in der Muskulatur und in der Leber kann sie als **Glykogen** gespeichert (Glykogensynthese) und bei Bedarf wieder mobilisiert werden (Glykogenolyse). Während die Leber Glukose produzieren kann, wird das im Muskel gespeicherte Glykogen nicht mehr zu Glukose aufgebaut, sondern bei Bedarf in der Muskelzelle selbst verbraucht. Synthese und Abbau des Glykogens sind bedeutende Prozesse, die die Blutglukosekonzentration regulieren und ein Glukosereservoir schaffen.

In der **Glykolyse** wird Glukose zu zwei Molekülen Pyruvat umgewandelt. Dabei entsteht ATP und NADH. Läuft dieser Prozess unter anaeroben Bedingungen ab, wird Pyruvat zu Laktat, welches von der Leber wieder zu Glukose aufgebaut werden kann (Glukoneogenese) [3, 4]. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat durch die äußere Mitochondrienmembran geschleust, um im Mitochondrium oxidativ decarboxyliert und an ein Coenzym-A (CoA) gebunden zu werden. Das so entstandene Acetyl-CoA treibt den **Citratcyklus** an, wobei NADH und $FADH_2$ entstehen. In der Atmungskette dienen diese Moleküle als Substrate für einen Prozess, bei dem Elektronen enzymatisch über mehrere Molekülkomplexe weitergegeben werden. Mit der dabei frei werdenden Energie wird an der inneren Mitochondrienmembran ein Protonengradient aufgebaut. Diese Protonenpumpe ist die treibende Kraft der ATP-Synthese, die als **oxidative Phosphorylierung**

bezeichnet wird. Durch diesen Prozess wird etwa 90% des ATP in der Zellatmung produziert [2, 4].

1.1.1 Glukosehomöostase

Die Blutglukosekonzentration ist wesentlich für den Energiestoffwechsel. Trotz einer nicht konstanten Nahrungszufuhr schwankt sie wenig und liegt bei Menschen in der Regel zwischen 80 und 120 mg/dl. Bei Säugetieren ist dafür ein hoch entwickeltes Glukosehomöostase-Regulationssystem entwickelt. Dieses funktioniert hauptsächlich über die Hormone **Insulin** und **Glukagon**, die in den Langerhansschen Inseln des Pankreas gebildet werden. Dabei wird Insulin bei einer durch die Resorption der Nahrungskohlenhydrate erhöhten Konzentration der Blutglukose ausgeschüttet und verstärkt so hauptsächlich in peripheren Geweben des Körpers die Glukoseaufnahme (insulinmedierte Glukoseaufnahme). Aber auch ohne Insulin wird Glukose in geringerem Ausmaß von Organen aufgenommen (basale Glukoseaufnahme). Ein Abfall der Blutglukosekonzentration aufgrund von Muskelarbeit oder Hunger bewirkt die Ausschüttung von Glukagon, welches antagonistisch zum Insulin wirkt. Es veranlasst die Ausschüttung von Glukose aus der Leber. Insulin bewirkt eine Hemmung der Glukagonwirkung und der Glukoneogenese in der Leber, sodass die Nettoglukoseproduktionsrate der Leber stark vom Konzentrationsverhältnis dieser beiden Hormone abhängt. Weiters steuern auch andere Hormone wie z.B. **Adrenalin** und **Cortisol** und das vegetative Nervensystem die Glukosehomöostase [1, 3].

1.1.2 Insulin

Das Peptidhormon Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas synthetisiert, wird dort gespeichert und bei Bedarf ins Blut freigegeben. Die Insulinsekretion wird von der Glukosekonzentration im Blut, aber auch von anderen Substraten, von Hormonen und vom vegetativen Nervensystem gesteuert [5]. Die durch erhöhte Blutglukosekonzentration in die β -Zellen strömende Glukose bewirkt über mehrere Schritte die Exozytose von Insulin. Über den Blutkreislauf gelangt es ans Zielgewebe und bindet an die Insulinrezeptoren (IR) der Zellen. Da die Insulinkonzentration im Blut sehr gering ist, haben diese Rezeptoren eine hohe Affinität zum Hormon. Die Dichte der IR ist in den verschiedenen Geweben unterschiedlich. Gewebe mit

besonders hoher Dichte sind Leber und Fett. Insulinbindung schaltet an den Rezeptoren eine Tyrosin-Kinase-Aktivität ein, was eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten bewirkt. Auch wenn sich das Insulin vom Rezeptor löst, bleibt die Kinaseaktivität auf Grund der Autophosphorylierung erhalten. Über die so angeregte Insulin-Signaltransduktionskaskade werden Stoffwechsellzyme in den Effektorzellen aktiviert oder gehemmt. In **Leberzellen** erhöht Insulin den Einbau von Glukose in die Speicherform Glykogen. Gleichzeitig wird die Metabolisierung der Glukose zu Pyruvat und Laktat gesteigert. Die Glukoneogenese, z.B. aus Aminosäuren und Laktat, wird blockiert, die Glykogenolyse und die β -Oxidation von freien Fettsäuren werden gehemmt. Da Glukagon als Antagonist des Insulins fungiert, ist in der Leber das Verhältnis von Insulin- und Glukagonwirkung entscheidend. In der Muskulatur steigert Insulin Glukoseaufnahme und Glykogensynthese. Der Großteil der von der **Muskulatur** aufgenommenen Glukose wird zu Glykogen umgewandelt und gespeichert. Der Rest wird sofort als Energieträger über die Atmungskette genutzt. Insulin fördert im Muskel auch die Aufnahme von Aminosäuren und die Proteinsynthese. In Fettzellen wird ebenfalls die Glukoseaufnahme stimuliert. Im Fett wird die Glukose in α -Glycerophosphat umgewandelt und die Synthese und Speicherung von Triglyzeriden vorangetrieben. Der Triglyzeridabbau wird durch Insulin gehemmt. Insgesamt ist Insulin ein anaboles Signal, das eine stimulierende Wirkung auf anabole und eine hemmende Wirkung auf katabole Prozesse hat [3, 4, 5].

1.1.3 Insulinsignalübertragung

Die Bindung von Insulin am transmembranen Insulinrezeptor (IR) bewirkt eine Kaskade von Phosphorylierungsreaktionen, die als Signalwege beschrieben werden. Diese multiplen, insulinabhängigen Proteinkinase-Kaskaden sind parallel verlaufend, interagieren jedoch bei der Durchführung der metabolischen Funktion von Insulin. Die zu Beginn stattfindende Autophosphorylierung des IR bewirkt unter anderem, dass das Insulinrezeptorsubstrat-1 (**IRS1**) phosphoryliert wird. Die nachfolgende, für die Glukoseaufnahme relevante Kaskade führt über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (**PI3K**) und **Akt**, was in Zellen, die mit GLUT4 (Glukosetransporter 4, z.B. Muskel, Fett) ausgestattet sind, letztendlich zur Translokation des GLUT4 in die Zellmembran und zu gesteigertem Glukosetransport in die Zelle führt [6]. Zusätzlich steuert Akt die Glykogensynthasekinase 3 (**GSK-3**), was die Synthese von Glykogen

bewirkt (siehe Abb. E1). Dieser Signalweg wird nicht nur von Insulin gesteuert. So werden z.B. durch den Einfluss von Aminosäuren die Signalproteine **mTOR** (mammalian Target of Rapamycin) und **p70S6K** (p70 ribosomal S6-Kinase) aktiviert [7]. Dies wirkt hemmend auf das IRS1, was die Hemmung des Glukosetransportes in die Zelle zur Folge hat. Ein Mangel an ATP aktiviert ein weiteres Enzym, die **AMPK** (AMP-aktiviert protein kinase), welches die Hemmung des mTOR, der p70S6K und unter anderem auf diesem Weg die Verstärkung des Glukosetransportes bewirkt [9]. Diese Zusammenhänge sind in Abb. E1 schematisch dargestellt.

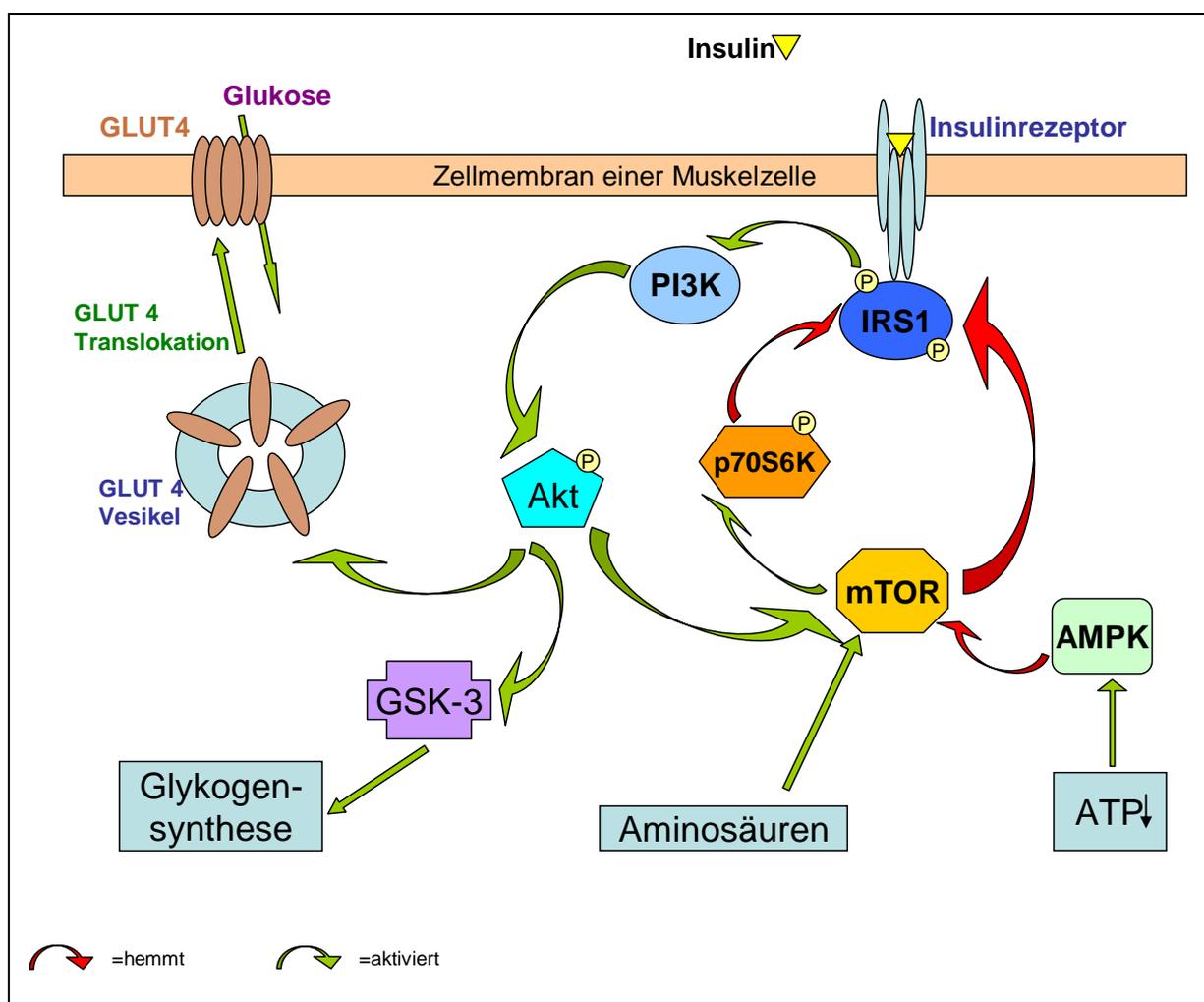


Abb E1: Insulinwirkung an der Muskelzelle: Über eine Signalkaskade, an deren Anfang das IRS1 steht, stimuliert Insulin Glukoseaufnahme und Glykogensynthese. Die Aktivität des IRS1 wird aber auch durch den mTOR /p70S6K-Weg moduliert, der wiederum von Aminosäuren und ATP gesteuert wird. [adaptiert nach 8.]

1.2 Diabetes mellitus Typ 2

Typ 2 Diabetes ist eine Stoffwechselstörung, die durch erhöhte Blutglukosewerte definiert ist. Im Gegensatz zu **Diabetes mellitus Typ 1**, bei dem ein absoluter Insulinmangel die Hyperglykämie verursacht, ist beim Typ 2 zu Beginn der Krankheitsentwicklung die Insulinsekretion nicht reduziert [10]. **Diabetes mellitus Typ 2** entsteht meist gemeinsam mit einer viszeralen Fettverteilung, Hypertonie und Hyper-/Dyslipidämie [11]. Eine wichtige Ursache des **Diabetes mellitus Typ 2** ist das unzureichende Ansprechen von Zielgeweben wie Muskel, Leber und Fett auf das Peptidhormon Insulin (**Insulinresistenz**) [12]. Die häufigste Ursache der Insulinresistenz, und damit des Typ 2 Diabetes, ist Adipositas, die Wohlstandsbedingt durch ein Überangebot an Kalorien und mangelnde körperliche Betätigung entsteht. Sprechen die Zellen nicht ausreichend auf das Insulin an, wird eine verminderte Glukoseaufnahme in die Gewebe bewirkt. Zu Beginn der Krankheitsentwicklung kann das Pankreas noch gegensteuern, indem es große Mengen Insulin freisetzt (**Hyperinsulinämie**). Mit der Zeit kann es den Bedarf an so hohen Insulinmengen zur Kontrolle der Blutglukose nicht mehr decken und es kommt zu einer fortschreitenden Erschöpfung der Insulinproduktion. Als relativen Insulinmangel bezeichnet man hohe oder normale Plasmainsulinkonzentration, die jedoch gemessen am hohen Bedarf trotzdem nicht ausreichend ist, um eine normale Glykämie zu bewirken [2, 12, 13]. So führt Adipositas über die Insulinresistenz schließlich zur Manifestation des Typ 2 Diabetes [10]. Substanzen, die der Insulinresistenz entgegenwirken, nennt man **Insulinsensitizer**.

1.3 Insulinsensitiser

1.3.1 Metformin

Zu den klinisch verwendeten Insulinsensitisern zählen Thiazolidindione und **Metformin**. Letzteres gehört zur Gruppe der Biguanide und zählt zu den am besten etablierten Arzneimitteln in der Diabetesbehandlung.

Metformin verbessert die Insulinsensitivität der Leber und der Muskulatur [13]. Die Substanz verzögert die Glukoseresorption aus dem Darm und glättet damit postprandiale Glukoseprofile [12, 14]. Sie hemmt die Glukoseproduktion in der Leber durch Glykogenolyse und Glukoneogenese und steigert die Glykogensynthese. Weiters steigert sie Glukoseaufnahme und –verbrauch in Muskel- und Fettzellen und erleichtert eine Gewichtsreduktion durch eine appetithemmende Wirkung [12]. Auch eine Reduktion der freien Fettsäuren im Plasma, der Lipidoxidationsrate und das Absenken der zirkulierenden Cholesterin- und Triglyzeridkonzentration sind belegt [15, 16], was die kardiovaskuläre Mortalität reduziert. Ein Vermindern der PAI-1-Konzentration (Plasminogen-activator inhibitor 1) sowie eine Hemmung der Fibrinolyse wurden ebenfalls beschrieben [17].

Obwohl Metformin bereits seit mehreren Jahrzehnten in der Diabetesbehandlung eingesetzt wird, ist sein antidiabetischer Wirkungsmechanismus noch nicht ganz geklärt [18]. Auf zellulärer Ebene wird die verbesserte Insulinwirkung im Muskel auf mehrere Abläufe zurückgeführt: verbesserte IR-Tyrosinkinaseaktivität [19], erhöhte Anzahl und Aktivität der GLUT4 [20], Aktivierung der AMPK [21] und gesteigerte Glykogensynthese [20, 22, 23]. Die Wirkung von Metformin ist jedoch an das Vorhandensein einer Mindestkonzentration von Insulin gebunden und kann somit weder im nüchternen Zustand noch nach dem Essen eine Hypoglykämie bewirken [24]. Es beseitigt lediglich das Auftreten einer Hyperglykämie. Untersuchungen deuten darauf hin, dass durch eine Hemmung des **Komplex 1** der Atmungskette die Zellatmung verringert wird, was die Ursache einer besseren Insulinsensitivität sein könnte [25, 26].

1.3.2 Thiazolidindione

Eine zweite Gruppe der Insulinsensitizer sind Thiazolidindione (Glitazone oder TZDs). TZDs weisen in ihrer Grundstruktur alle einen Thiazolidinring auf, der für die insulinsensitivierende und antihyperglykämische Wirkung eine entscheidende Rolle spielt. Die einzelnen TZDs unterscheiden sich anhand ihrer Reste, denen unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften zugeschrieben werden. Die bekanntesten Glitazone sind **Troglitazon**, **Rosiglitazon** und **Pioglitazon**. Die Struktur des in der vorliegenden Studie verwendeten Pioglitazon ist in Abb E2 dargestellt. Das 1997 als erstes eingeführte Troglitazon wurde als Monotherapie und in Kombination mit Sulfonylharnstoffen, Metformin und Insulin angewendet [27]. Nach mehreren Fällen von Hepatotoxizität wurde das Medikament jedoch wieder vom Markt genommen. Das seit 2000 verfügbare Pioglitazon weist wie auch Rosiglitazon keine negativen Nebenwirkungen an der Leber auf [14, 28].

In klinischen Studien an Typ 2 Diabetikern wurde, z.B. bei einer Monotherapie mit Pioglitazon, eine senkende Wirkung auf HbA1c-Werte deutlich dargestellt. Das Medikament zeigt eine gute Verträglichkeit bei Erwachsenen jeder Altersklasse [29]. In der Klinik sind Insulinsensitivierung und Glukosesenkung kombiniert mit einem Blutdruckabfall (systolisch und diastolisch), einer Verbesserung der Mikrozirkulation in der Haut und einer Besserung der endothelialen Funktion. Auch eine Verbesserung der Serumlipidkonzentrationen wurde in Studien nachgewiesen. Durch TZDs wird die Plasmatriglyzeridkonzentration um 30% und freie Fettsäuren werden um 10-20% gesenkt. [30]. Jedoch zählen Ödeme, erhöhtes Risiko von Frakturen bei Frauen [BfArM] und eine Körpergewichtszunahme zu den bekannten

Nebenwirkungen. Hypoglykämien wurden nur bei Kombination mit Sulphonylharnstoffen oder Insulin verzeichnet (2-15% der Patienten) [29, 31].

TZD wirken als Agonisten von **PPAR- γ** (peroxisome proliferator-activated receptor γ). PPAR- γ ist ein durch azylierte Fettsäuren und Fettsäurederivate aktivierbarer nuklearer Rezeptor. Dieser wird durch die Aktivierung in den Kern verlagert, wo er als Transkriptionsfaktor

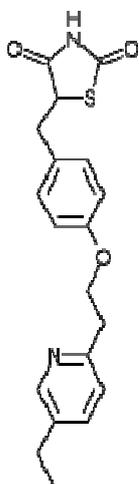


Abb. E2: Strukturformel von Pioglitazon; der obere Teil des Moleküls ist der Thiazolidinring, der allen TZD gemeinsam ist.

unterschiedlicher stoffwechselregulierender Proteine aktiv wird. Diese Proteine verstärken die post-Rezeptor-Aktivität von Insulin, wobei unklar ist, ob solche PPAR γ -vermittelte Wirkungen nur im Fettgewebe oder auch in der Leber und im Skelettmuskel wesentlich sind. PPAR γ wird nämlich vor allem im Fettgewebe exprimiert, wo er auch die Differenzierung von Adipozyten reguliert. Bei Stimulation des PPAR γ werden im Fettgewebe große Adipozyten durch kleinere, stoffwechselaktivere Adipozyten ersetzt [27]. Diese setzen weniger Fettsäuren frei und zeigen auch eine veränderte Freisetzung an Fettgewebshormonen, den Adipokinen. Das in diesem Zusammenhang wichtigste dieser Hormone ist **Adiponektin**, dessen Freisetzung durch TZD stark erhöht wird. Das vom Fettgewebe produzierte Peptidhormon steuert unter anderem mit Insulin und Leptin gemeinsam das Hungergefühl und somit die Nahrungsaufnahme [32]. Besonders wichtig ist aber, dass geringe Plasmaadiponektinkonzentrationen, wie sie für Übergewicht typisch sind, eine Insulinresistenz bewirken [33, 34]. Dabei gilt das Bauchfett als besonders gesundheitsschädlich, da es nur geringe Mengen an Adiponektin produziert und somit eine Insulinresistenz erhöht [35, 36].

Wie schon erwähnt ist unklar, ob über PPAR- γ direkt die Insulinempfindlichkeit der Zellen von Leber und Muskulatur erhöht werden kann. Als sicher kann jedoch angenommen werden, dass TZD über aus Fettzellen freigesetztes Adiponektin indirekt auf Leber und Muskel wirken. Über die Vermittlung der Adiponektinwirkung an dessen Zielzellen ist bekannt, dass Adiponektin an zwei Rezeptoren der Zellmembran, AdipoR1 und AdipoR2 bindet. Das zelluläre Eiweißmolekül, das als Adapterprotein fungiert, heißt APPL1 (Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1) und moduliert Fettsäureverbrennung und Glukoseaufnahme der Zelle. Durch Adiponektin wird die Interaktion des APPL1 mit der GTPase (Guanosintriphosphatase) Rab5 angeregt. Das bewirkt eine erhöhte Translokation des Glukosetransporters GLUT4 und die Glukoseaufnahme durch die Zelle. Adiponektin verstärkt so die Wirkung von Insulin und hat eine synergistische Wirkung bei der Aktivierung des Insulinzielmoleküls Akt [37]. Fettsäuren und Glukose werden dadurch vermehrt in die Zellen aufgenommen und umgesetzt. In der Leber verringert sich zusätzlich die Neubildung von Glukose [38]. So bewirken TZD eine verbesserte Kontrolle des Glukosehaushaltes, ohne Wirkung auf die Insulinsekretion zu haben.

Erhöhte Plasmaadiponektinkonzentration wird also mit erhöhter Insulinsensitivität assoziiert, was in weiterer Folge das Risiko einer Typ 2 Diabetes-Erkrankung verringert [32, 36]. Auch andere Adipokine und freie Fettsäuren werden als Mediatoren der PPAR- γ -vermittelten Insulinsensitivierung betrachtet. Thiazolidindione senken also über den PPAR- γ -Rezeptor im Fettgewebe indirekt die Insulinresistenz [33, 34].

Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus der TZDs, der an verschiedenen Organen relevant sein könnte, basiert auf einer Hemmung der Zellatmung, mutmaßlich durch Hemmung des des **Komplex 1** der Atmungskette. Die atmungshemmende Wirkung der TZD ist nicht PPAR- γ -vermittelt und nicht auf Modulation der Genexpression zurückzuführen. In vitro reduzieren TZD die Glukoseoxidation und steigern die Laktatfreisetzung durch direkte Wirkung auf Skelettmuskelpräparate [39]. Solche Effekte wurden auch schon an anderen Geweben beschrieben, die mit Glitazonen behandelt wurden. Die Untersuchung des Glitazons BLX-1002 bestärkt die Annahme einer PPAR- γ -unabhängigen Wirkkomponente, da dieses TZD eine insulinsensitivierende Wirkung hat, den PPAR- γ jedoch wahrscheinlich nicht anspricht [40].

Die atmungshemmende Wirkung der TZD reduziert naturgemäß den Energiestatus der Zelle und interessanter Weise hat Adiponektin den gleichen Effekt auf den Energiestatus seiner Zielzellen [37]. Der Energiestatus wiederum beeinflusst bekannterweise den mTOR/p70S6k-Signalweg (siehe Abb. E1). Kato et al haben an salzsensitiven Dahl-Ratten die hemmende Wirkung von Pioglitazon auf mTOR und p70S6K nachgewiesen [41]. Eine vergleichbare Arbeit mit ZDF-Ratten könnte Informationen über den Zusammenhang zwischen diesem Signalweg und dem antidiabetischen Wirkmechanismus der TZD bringen.

1.4 Tiermodelle für Typ 2 Diabetes

1.4.1 ZDF-Ratten

ZDF-Ratten und db/db-Mäuse, die in dieser Studie Verwendung fanden, zählen zu den meist verwendeten Diabetes-Tiermodellen.

Das gut erforschte Syndrom der ZDF-Ratte ist besonders gut geeignet für Modelluntersuchungen des humanen Diabetes mellitus Typ 2. Innerhalb weniger Wochen nach der mütterlichen Laktationsphase entwickeln diese Tiere ein prädiabetisches Stadium mit starker Hyperinsulinämie, das rasch in offenen Diabetes, d.h. ausgeprägte Hyperglykämie, mit relativem Insulinmangel übergeht.

Vorfahren der von uns verwendeten ZDF-Ratten sind die in den sechziger Jahren vom Ehepaar Zucker entdeckt worden und nach ihnen **Zucker-Ratten** genannt worden [42]. Diese Tiere entstanden spontan bei Kreuzungsversuchen des Merck-Stamms M mit einem Sherman-Rattenstamm am Laboratory of Comparative Pathology in Massachusetts. Nach erstmaliger Beschreibung 1961 wurde aus dem Hybridstamm ein Rattenstamm gezüchtet, der eine Mutation am fa-Gen trägt, das für den Leptinrezeptor kodiert. Das



Abb. E3: ZDF-Ratten weisen eine typische Schwarzweißfärbung auf.

von Adipozyten abgegebene Proteohormon **Leptin** spielt eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel, indem es das Auftreten von Hungergefühl hemmt [43]. Die autosomal rezessiv vererbte Mutation ist mit einem Defekt am Leptin-Rezeptor (fa) verbunden und führt bei homozygoten Tieren zu Hyperphagie, Hyperlipidämie, Adipositas und leichter Hyperglykämie [44, 45]. Da diese Tiere auch im fortgeschrittenen Alter die Zahl ihrer Fettzellen erhöhen können, findet man eine Fettgewebsvergrößerung, die sowohl durch Hypertrophie als auch Hyperplasie zustande kommt [46]. Aus diesem Stamm der Zucker-Ratten gingen die ZDF-Ratten hervor. Durch Paarung mit heterozygoten, normalgewichtigen Zucker-Ratten (Fa/fa), die ein hohes diabetisches Potential in sich trugen, konnte in der Folge ein konstanter Phänotyp mit starker Hyperglykämie (Diabetes) herausgezüchtet werden.

Auch bei diesem Stamm (Zucker-Diabetic-Fatty-Ratten, kurz **ZDF-Ratten**, siehe Abb. E3) ist die diabetische Erkrankung durch das fa-Gen monogenetisch determiniert und wird autosomal weitergegeben. Die weiblichen Tiere werden zwar fettleibig und insulinresistent, bilden jedoch, sofern sie nicht mit einer speziellen Diät gefüttert werden, keinen Diabetes aus. [47]

Bei Männchen ist das Auftreten des Diabetes bei Fütterung mit dem Standardfutter Purina 5008 gut vorhersagbar und hat einen reproduzierbaren altersabhängigen Verlauf (siehe Abb. E4).

Die für Zucker- und junge ZDF-Ratten typische Hyperinsulinämie resultiert aus einer Insulinresistenz, die sich bereits mit Ende der Säugezeit, etwa ab der 4. Lebenswoche, festlegt [48]. Im Gegensatz zu Zucker-Ratten, die hypertrophe Langerhans'sche Inseln besitzen und langfristig große Mengen an Insulin produzieren können, zeigen ZDF-Ratten etwa ab der 7. Lebenswoche einen dauerhaften Abfall der Plasma-Insulinkonzentration. Von Griffen et al. wurde gezeigt, dass bereits Föten von ZDF-Ratten einen genetischen Defekt der Insulintranskription der β -Zellen aufweisen. Dieser wird unabhängig von der Insulinresistenz und der Leptinrezeptor-Mutation weiter vererbt und ist vielleicht in Kombination mit der Insulinresistenz die Ursache der Diabetesentwicklung [49]. ZDF-Ratten leiden spätestens ab der 12. Woche an einem offenen Diabetes und bilden etwa ab der 21. Woche eine Proteinurie aus. Schließlich entwickeln die Tiere Neuro- und Nephropathien, woran sie dann im Alter von etwa 1 Jahr meist sterben.

Für wissenschaftliche Untersuchungen sind folgende besondere Symptome des ZDF-Syndroms wichtig [50]:

- Hyperglykämie
- Schlechte Wundheilung
- Neuropathie
- Nephropathie
- Insulinresistenz
- Hyperinsulinämie
- Leichte Hypertension
- Hypertriglyzeridämie
- Hypercholesterinämie

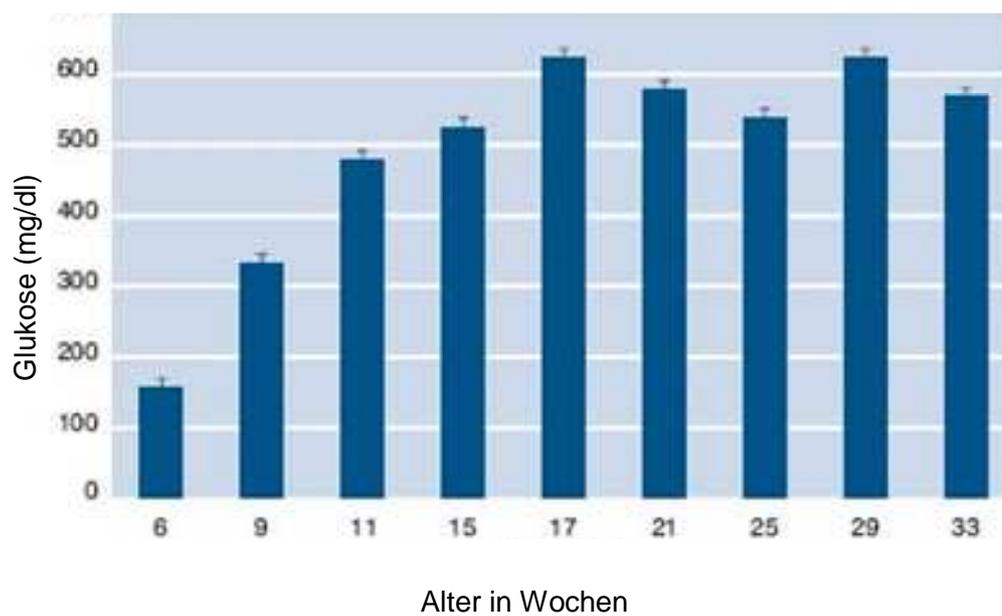
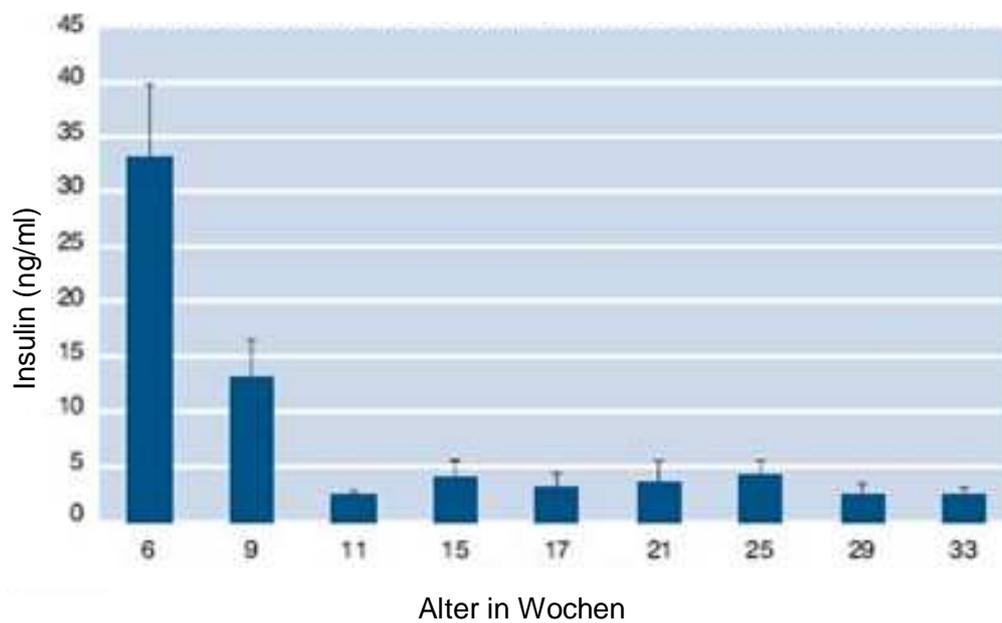


Abb. E4: Plasma-Insulin und Glukoseverlauf in der Altersentwicklung von männlichen ZDF-Ratten auf Purina 5008 Diät zwischen Woche 6 und 33. (Grafik nach Angaben des Züchters Charles River)

1.4.2 db/db-Mäuse

Auch bei db/db-Mäusen wird die Entwicklung zu einem adipösen Habitus durch eine gestörte Leptinwirkung hervorgerufen (siehe Abb. E5).

Wie auch bei ZDF-Ratten zirkuliert das Hormon in hohen Konzentrationen, wird aber vom Hypothalamus nicht wahrgenommen, da auf Grund einer Spontanmutation im entsprechenden Gen das notwendige Rezeptorprotein defekt ist. Es weist eine verkürzte zytoplasmatische Region auf und ermöglicht keine Signaltransduktion. Die hohe Leptin-Serumkonzentration ist als Kompensation für die Leptinresistenz als Folge des Leptinrezeptordefekts zu interpretieren [51]. Durch die fehlende Leptinwirkung kommt es zu Hyperphagie und



Abb. E5: Adipöser Habitus einer 10 Wochen alten, männlichen db/db-Maus.

Adipositas, eine Zufuhr von exogenem Leptin kann die Stoffwechselsituation nicht verbessern.

Die hohe Körpergewichtszunahme resultiert nicht nur von einer Hyperphagie, sondern auch von der verbesserten Effizienz in der Nahrungsverwertung und akutem Bewegungsmangel [52]. db/db-Mäuse werden ab der 3-4. Woche augenscheinlich adipös, ein Anstieg in der Plasmainsulinkonzentration ist schon zwischen dem 10. und 14. Tag zu erkennen [50]. Zwischen der 4. und 8. Woche entwickeln sie eine deutliche Hyperglykämie. Daraus resultieren fettleibige Tiere mit einem autosomal rezessiven Diabetes-ähnlichen Syndrom [53]. Die db/db-Maus weist auch eine intestinale Hypertrophie, Abnormitäten in der Nahrungsresorption und Veränderungen der regulierenden Neuropeptide im Darm auf [54]. Da sowohl in jungen als auch in alten Tieren in der Leber die Konzentrationen von Glukose-6-Phosphat, Fruktose-1,6-Diphosphatase, Pyruvatcarboxylase und Phosphoenol-Pyruvatcarboxykinase erhöht sind, ist auch eine verstärkte Glukoneogenese zu verzeichnen [55]. Weiters ist eine Hyperfunktion der pankreatischen,

glukagonproduzierenden α -Zellen erwiesen [52]. Die Tiere leiden an Polyphagie, Polydipsie und Polyurie und erliegen mit etwa 10 Monaten ihrer diabetischen Erkrankung. Die Symptome sind bei männlichen Tieren stärker ausgeprägt, was auf eine protektive Wirkung des weiblichen Steroids Östrogen auf die β -Zellen zurückzuführen sein könnte [56] und eine längere Lebenserwartung bei Weibchen bewirkt [57].

1.5 Naturheilstoffe

1.5.1 Ethnopharmakologie

Der Begriff der Ethnopharmakologie wurde ursprünglich 1967 in wissenschaftlicher Literatur über psychoaktive Drogen verwendet [58] und war stark von der Faszination der sechziger Jahre für bewusstseinsverändernde Drogen geprägt. Später wurde der Begriff neu definiert [59] und meint heute die Wissenschaft der traditionellen Pharmakologie von Naturvölkern. Sie wird als interdisziplinäre Forschung betrieben, die in einer Zusammenarbeit von Ethnographie, Ethnomedizin, Botanik und Pharmakologie versucht, traditionell verwendete Naturheilstoffe, meist Pflanzenwirkstoffe, aufzufinden, zu beschreiben und auf ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen [60].

Viele Schlüsselsubstanzen unserer modernen Pharmakologie sind ethnomedizinischen Ursprungs. Bereits die antike Heilkunde hat uns wertvolle Arzneidrogen, wie etwa *Colchicin*, *Aloe vera* oder *Opium* überliefert. Doch auch Berichte von Entdeckungsreisen der frühen Neuzeit haben Wissen über neue Gifte und Heilmittel nach Europa gebracht. Dies ist die Grundlage der gegenwärtigen Nutzung von Pflanzendrogen aus traditionellen Heilkunden. Ein berühmtes Beispiel ist Alexander von Humbolts Beobachtung der Verwendung von *Curare*, einem Pfeilgift, durch verschiedene Indianergruppen Südamerikas aus dem Jahre 1800 [61]. Die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit diesem Gift zeigt die Übertragung einer von Naturvölkern verwendeten Substanz in die moderne Medizin. Neuere ethnopharmakologische Untersuchungen führten zum Beispiel zur Entdeckung der Antitumorsubstanzen *Vinblastin* und *Vincristin* aus dem Madagaskar-Immergrün und der Antimalariadroge *Artemisin* aus der chinesischen Volksmedizin. Viele dieser Substanzen sind in modernen Therapien mittlerweile unersetzlich geworden [60].

Dabei ist jedoch von besonderer Relevanz, dass sich die Pharmakologie verschiedener Völker stark unterscheiden kann. Meist ist eine tief verinnerlichte, animistische Einstellung zur Pflanzenwelt ein typisches Merkmal traditioneller Heilkunst. Oftmals werden Pflanzen, wie im Beispiel unserer mittelalterlichen *Alraune*, personalisiert und eine kulturell und religiös verlaufende, reziproke

Beziehung hergestellt [62]. Deshalb ist es ein wichtiger Teil der Ethnopharmakologie, die spezifische Vorstellung über Wirkung und Nutzen im kulturellen und sozialen Kontext zu verstehen. Erst anschließend sind eine botanische Bestimmung und schließlich eine pharmakologische Untersuchung sinnvoll. Eine erfolgreiche Adaptation an unsere Bedürfnisse ist eine grundlegende Notwendigkeit für die Etablierung solcher Heilmittel.

Ein weiteres Hindernis in der Ethnopharmakologie ist die kontinuierliche und gemischte Anwendung bestimmter Pflanzen. Dabei werden diese sowohl als Arzneimittel als auch als Nahrungsmittel gebraucht, was eine genaue Bestimmung des Wirkungsursprungs zusätzlich erschwert.

Besondere Bedeutung in der Ethnopharmakologie hat heute die Diskussion über "**intellectual property rights**". Dies ist in diesem Falle das Recht der einheimischen Bevölkerung auf die Nutzung ihres Kulturerbes. Die Implementierung von Markenrechten auf einzelne Pflanzen, deren Bestandteile und Genetik stellt eine zunehmende Konfliktquelle dar [60]. Das amerikanische Patentrecht erkennt mündlich überlieferte, ausländische Kenntnisse über Nutzung nicht als Erfindung an. Ausschließlich auf Papier gebrachte Formen des Wissens werden für die Entscheidungen über Neuheitscharakter akzeptiert. Als Beispiel dafür wurde das aus dem indischen Niembaum gewonnene Insektenschutzmittel *Azadirachtin* von einer amerikanischen Firma patentiert, und schließt somit indische Firmen aus der Vermarktung dieses indischen Produkts aus. Die Entwicklung geht jedoch dahin, solche Patente nicht mehr anzuerkennen und eine derartige Ausbeutung tradierten Wissens zu unterbinden [61]. Die Forschung im ethnobotanischen und ethnopharmakologischen Bereich ist also mit großer Verantwortung verbunden. Die **Deklaration von Belem** 1988 ist eine Forderung zum Schutz der biologischen Artenvielfalt und der Naturvölker und weist auf die unentwerrbare Verknüpfung von kultureller und biologischer Diversität hin [63].

Bis heute wurde nicht mehr als 1% der etwa 250000 höheren Pflanzen auf ihre phytochemische und pharmakologische Zusammensetzung genauer untersucht. Daher ist eine genaue Untersuchung von Pflanzen, die eine lange Verwendungsgeschichte in der Behandlung von Diabetes aufweisen, ein vielversprechender Weg zur Identifikation und Erforschung von neuen Heilsstoffen und Medikamenten.

1.5.2 Extrakte

1.5.2.1 *Suaeda fruticosa* (CHENOPODIACEAE)

1.5.2.1.1 Pflanze



Diese einjährige Pflanze hat eine aufrechte, strauchige Form, worauf der Name *fruticosa* hinweist, und wird etwa 1m groß. *Suaeda fruticosa* ist weit verbreitet in Europa, Asien, Australien, Afrika und Nordamerika. Die meisten Arten der Gattung *Suaeda* sind Halophyte, das heißt sie besiedeln salzreiche Standorte

weitgehend breitenunabhängig. Sie leben in trockenen bis überfluteten Lebensräumen, häufig an Salzseen und Wattstränden des Meeres, wo angespülte Tier- und Pflanzenreste einen nährstoffreichen Boden sichern. Sie haben sukkulente Blätter und bevorzugen sandige bis lehmige, vor allem aber feuchte Böden. In Küstennähe kommen sie nie unter der Überschwemmungsgrenze vor und kommen mit basischem, salzreichen Untergrund gut zurecht. Sie wachsen ausschließlich an sonnigen Stellen [64].

Der Name *Suaeda* leitet sich vom arabischen »suda« für Kopfschmerzen und »soda oder sauda« = Galle, Melancholie, Trübsinn ab. Dagegen verwendete man die an Natriumcarbonat reichen Pflanzen. Da man die Pflanze *Suaeda maritima* früher durch Trocknen und Verbrennen zur Herstellung von Soda (Natron) verwendet hat, das zum Wäschewaschen und für die Glasherstellung gebraucht wurde, ist der deutsche Pflanzename Sode entstanden.

Durch den hohen Salzgehalt der bevorzugten Standorte ist auch in den Zellen der Pflanze eine starke Anreicherung von Mineralsalzen vorhanden, wobei Kochsalz und Natriumcarbonat überwiegen. Diese werden mit dem Wasser aufgenommen und können nicht wieder abgeben werden. Sie werden eingelagert und führen schließlich zur Vergiftung der Pflanze. Eine Akkumulation der Aminosäure Prolin wurde in Zusammenhang mit der Salzverträglichkeit dieser Pflanzen belegt [65]. In

Untersuchungen von Sandberg et al. [66] wurde, wie in vielen anderen *Suaeda*-Spezies, auch bei *Suaeda fruticosa* ein hoher Gehalt an Alkaloiden nachgewiesen.

1.5.2.1.2 Traditionelle Anwendung

Über den Gebrauch der Pflanze als Nahrung- oder Heilmittel ist leider nur wenig bekannt. Junge Blätter und Samen können roh oder gekocht gegessen werden, wobei die Blätter einen leicht salzigen Geschmack haben [67]. Beobachtungen an Schafen haben jedoch gezeigt, dass die Pflanze Durchfall verursacht, der in weiterer Folge zum Tod der Tiere führen kann [68]! In Indien wird eine Breipackung aus Blättern der Pflanze zur Linderung von Augenentzündungen und –schmerzen angewandt, mit Wasser aufgegossene Blätter als Brechmittel verwendet [68, 69].

Bezüglich einer Wirksamkeit bei Diabetes wurde in einer Arbeit von Bennani-Kabchi et al. ein hypoglykämischer und auch ein antihyperglykämischer Effekt bei Sandratten (*Psammomys obesus*) nachgewiesen [70]. Um Diabetes-ähnliche Stoffwechselstörungen zu induzieren, wurden die Tiere, die ausgesprochene Ernährungsspezialisten sind und sich vorwiegend von sukkulenten Salzpflanzen ernähren, einer stark cholesterinhaltigen Diät ausgesetzt, was zur Entwicklung von Fettleibigkeit und in der Folge zu Diabetes mellitus führt. Eine Gruppe von Sandratten wurde zusätzlich mit wässrigem Extrakt von *S. fruticosa* oral behandelt. Der sonst typischen Entwicklung von Hyperlipidämie, verschlechterter Glukosetoleranz und Insulinresistenz konnte mit dieser Behandlung vorgebeugt werden. Dabei konnte eine Verringerung vieler Blutfette und des Plasmainsulins verzeichnet werden. Der Rückgang der Insulinkonzentration wies darauf hin, dass die Effekte nicht auf eine Stimulation der Insulinsekretion zurückzuführen sind. Es wurde davon ausgegangen, dass die Glukosesenkung nicht insulinabhängig erfolgte und ein extrapankreatischer Wirkungsmechanismus ausschlaggebend war. Als Grund für die verbesserte Hyperlipidämie wurde eine verminderte Cholesterinaufnahme im Darm vermutet [71]. Die Arbeitsgruppe geht davon aus, dass die Pflanze zumindest zwei Verbindungen enthält, die unabhängig voneinander zu einer hypoglykämischen bzw. hypolipidämischen Aktivität führen [70].

Die Gruppe Benwahhoud et al. hat den wässrigen Extrakt an gesunden und Streptozotocin (STZ)-diabetische Ratten getestet, wobei den Tieren der Extrakt oder eine Kontrollösung intravenös verabreicht wurden. Bei den anschließenden Untersuchungen der Blutparameter wurde ein starker Abfall der

Blutglukosekonzentration und der Plasmacholesterinkonzentration bei den mit *Suaeda*-Extrakt behandelten Tieren festgestellt. Jedoch blieben die Insulinkonzentration und die Plasmatriglyzeride unverändert, was ebenfalls auf einen extra-pankreatischen Wirkungsweg hindeutet [72]. Genauere Analysen des wässrigen Extraktes von *Suaeda fruticosa* zeigten das reichliche Vorkommen von Flavonoiden, jedoch besagen andere Untersuchungen über den antidiabetischen Effekt bei Sandratten, dass Mineralsalze wie Chrom, Magnesium und Mangan vermutlich die wirkungsvollen Bestandteile der Pflanze sind [73]. Da auch toxikologische Untersuchungen eine gute Verträglichkeit der Pflanzenlösung bestätigten [72], sollten weitere Untersuchungen der Pflanzenextrakte in der Diabetesforschung vorgenommen werden.

1.5.2.2 *Juniperus communis* (CUPRESSACEAE)

1.5.2.2.1 Pflanze



Juniperus communis, für gewöhnlich gemeine Wacholder genannt, gehört zu den Zypressengewächsen. Er hat unter den Nadelbäumen die größte Verbreitung, die sich von Nordamerika und Südgrönland über Europa und Nordafrika bis nach Ostasien erstreckt. Der bis zu 12 Meter hohe Strauch kann 600 bis

800 Jahre alt werden, bevorzugt trockene, basenreiche und sonnige Plätze, kann aber auch Frost bis -40°C ertragen.

Der Name stammt aus dem althochdeutschen "weholter", was lebensfrisch, immergrün bedeutet. Nach altem Volksglauben vertreibt der Rauch der Wacholderpflanze böse Geister. Er veredelt außerdem Lebensmittel, die im Wacholderrauch geröstet werden. Wacholderbeeren finden Verwendung als Küchenwürze. Außerdem werden Schnäpse wie Steinhäger, Gin und Genever aus den Beeren zubereitet [74].

Die beerenförmigen Zapfen des Wacholders bestehen bis zu 33% aus Zucker und 10% aus Harz. Die ätherischen Öle der Zapfen, die über Alkoholextraktion gewonnen werden können, bestehen aus den Kohlenwasserstoffen alpha-Pinin, Sabinen und Myrcen sowie Terpeneol und Flavonoiden. Die Pflanze weist eine leichte Giftigkeit für den Menschen auf, die sich vor allem in den Blattspitzen und Beeren konzentriert. Der Geschmack ist zunächst süßlich, hinterlässt aber einen bitterherben Nachgeschmack. Bei übermäßiger Konsumation kommt es zu Diarrhöe [74, 75].

1.5.2.2 Traditionelle Anwendung

Bereits im Mittelalter galt die Pflanze als wichtiges Heilmittel. Man nahm sie bei Husten, dem Biss giftiger Tiere, Wassersucht, bei Ohnmacht, Zahnschmerzen, sogar gegen die Pest wurde sie eingesetzt [76]. Die heutigen Hauptanwendungsgebiete für den Wacholder sind Verdauungsbeschwerden wie Aufstoßen, Völlegefühl und Sodbrennen [77]. Innerlich angewendet wirkt *Juniperus* magenstärkend, blutreinigend und harntreibend, äußerlich bewirkt er eine verstärkte Durchblutung [75]. Die Nutzung der Wacholderbeeren als harntreibendes Mittel ist stark umstritten, da die Diurese vermutlich durch eine toxische Reizung der Nieren ausgelöst wird [77].

In der Homöopathie werden Wacholderbeeren als Ableitungsmittel angewendet, d. h. sie steigern durch äußerliche Anwendung die Durchblutung und finden zur Behandlung von Nieren, Hautkrankheiten, Gicht und Rheuma Verwendung [75].

Viele *Juniperus*öle und -teere werden in der Kosmetik verwendet, wobei neue Untersuchungen besagen, dass auch hier eine leichte Toxizität vorliegt [78]. Außerdem hat *Juniperus* Effekte auf die Fertilität und weist eine abtreibende Wirkung bei Albinoratten auf [79]. Zusätzlich wurde auf der Suche nach pflanzlichen Kontrazeptiva eine implantationshemmende Wirkung von *Juniperus* festgestellt, was durch diverse internationale Organisation (zB. WHO, ICMR) bestätigt wurde [80]. In anderen Studien wurde eine starke antioxidative Wirkung der Pflanze nachgewiesen. In diesem Zusammenhang wurde auch eine starke Konzentration von Tannin und Flavonoid in den Blättern und von Saponin in den Früchten der Pflanze dokumentiert [81]. Die antioxidative Wirkung wird auch durch die jahrhundertealte Einbindung der Pflanze in die ländliche Küche Mitteleuropas als Konservierungsmittel illustriert [82].

In einer Studie von Filipowicz wurden für Wacholderöl gute antibiotische Eigenschaften an isolierten, gegen gebräuchliche Antibiotika immunen Krankenhauskeimen nachgewiesen [83].

In der Diabetesforschung sind Extrakte der Gattung *Juniperus* in mehreren Studien als antihyperglykämisch beschrieben worden [84]. Bei *Juniperus communis* wurde von Swanston-Flatt et al. eine Hinauszögerung der Manifestation eines STZ-induzierten Diabetes bei Mäusen nachgewiesen, denen getrocknete *Juniperus*beeren verfüttert wurden [85]. Die glukosesenkende Wirkung von *Juniperus*beeren (Sud) wurde auch bei Ratten, sowohl bei normoglykämischen als auch bei STZ-diabetischen Tieren, beobachtet. Als Ursache für diese Wirkung bei gesunden Ratten werden entweder ein Anstieg der peripheren Glukoseaufnahme oder eine vermehrte Insulinausschüttung vermutet. Bei diabetischen Tieren ist nach einer 24-tägigen Behandlung ein Rückgang der Blutglukosekonzentration, sowie der Sterberate festgestellt worden. Weiters haben die Tiere den für das fortgeschrittene Stadium der Krankheit typischen Gewichtsverlust nicht gezeigt [86].

Bisherige Untersuchungen weisen somit auf eine antidiabetische Wirksamkeit von Extrakten dieser Pflanze hin. Weitere Informationen müssen aber gesammelt werden.

1.5.2.3 *Bridelia ndellensis* (EUPHORBIACEAE)

1.5.2.3.1 Pflanze



Der bis zu 30 Meter hohe Baum säumt meist Wälder, die an Savannengebiete grenzen, kommt aber auch im Unterholz von Trockenwäldern vor. Die Verbreitung beläuft sich von zentralen Teilen Afrikas (Ghana bis Uganda) bis nach Asien (Guinea, Bali) [87]. Die Blüten der Pflanze sind grün-gelb. *Bridelia ndellensis* hat Pfahlwurzeln, Stamm und

Äste sind mit Dornen versehen. Die Pflanze ist gegen jährlich wiederkehrende Flächenbrände resistent [87, 88].

Das Holz ist weiß, hart und grobfasrig und wird von der lokalen Bevölkerung als Baumaterial und zur Herstellung von Werkzeugen verwendet. Die Früchte werden gegessen. Die Rinde einiger *Bridelia*-Arten hat eine Funktion in Religion, Aberglauben und Magie. Phytochemisch gesehen enthält sie Glycoside, Saponine, Steroide und Tannine.

1.5.2.3.2 Traditionelle Anwendung

Rinde und Blätter von *Bridelia*-Arten werden in Afrika von der Bevölkerung vielseitig medizinisch genutzt. Sie werden angewendet gegen Diarrhöe [89, 90], Ruhr, Wassersucht und Ödeme, gegen Gicht, Rheumatismus und Nierenleiden und als Diuretika. Weiters sollen sie sowohl eine stimulierende Wirkung auf Laktation und Geschlechtsorgane haben, als auch abführend, fiebersenkend [90] und schwellungslindernd sein. Die Blätter der Pflanze werden oft zur Schmerzlinderung eingesetzt [87].

Mittlerweile gibt es auch wissenschaftliche Arbeiten, die die medizinische Wirkung von diversen *Bridelia*-Arten belegen, wobei sich die meiste Information jedoch nicht auf die in dieser Arbeit verwendete *Bridelia ndellensis* beziehen, sondern auf andere Arten derselben Gattung. So wurde in der Arbeit von Olomo et al. auf den hohen Eisengehalt (35,69mg/100g) in der Wurzelrinde von *Bridelia cathartica* hingewiesen, was bei der Anämiebehandlung in weiterer Folge eine wichtige Rolle spielt [91, 92]. In vitro wirkten Extrakte dieser Pflanze wachstumshemmend auf den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* [93].

Eine signifikante Aktivität ist für *Bridelia ferruginea* aus der Sichelzellenanämie-Forschung bekannt [94]. Auch eine antithrombotische Wirkung wird dieser Pflanze zugeschrieben [95]. Sie hemmt angeblich auch dosisabhängig sowohl den klassischen, als auch den alternativen Weg des Komplementsystems, wie in der Immunforschung gefunden wurde [96]. Onuruvwe et al. zeigten eine kontraktionssteuernde Aktivität auf die glatte Blasenmuskulatur bei Ratten, denen ein Ethanolextrakt der Blätter und der Stammrinde verabreicht wurde [97]. Einige Bestandteile der Stammrinde von *B. ferruginea* wurden für die rheumatische Schmerzbehandlung genauer untersucht [98]. Auch wurde die entzündungshemmende Wirkung der Stammrinde sowohl in vitro als auch an Ödemen bei Mäusen und arthritischen Rattenmodellen untersucht [99, 100]. An weiteren Ödemmodellen bei Mäusen und Ratten wurde *B. ferruginea* auch die

Unterdrückung von granulomatöser Gewebsbildung bei chronischen Entzündungen zugeschrieben, was die akute und chronische Entzündungshemmung bestätigt.

Ähnliche entzündungshemmende und antinozizeptive Wirkungen wurden bei *Bridelia scleroneura* beschrieben [101].

Sogar in mehreren Studien wurde auf die antimikrobielle Wirkung von Blättern, Früchten und Rinde von *B. ferruginea* eingegangen [102, 103, 104]. Eine antibakterielle Wirkung wurde auch bei *Bridelia crenulata* [105], bei *Bridelia scandens* [106] und *Bridelia micrantha* nachgewiesen, wobei in der Untersuchung der letzten Art die anti-diarrhöetische Wirkung im Vordergrund stand [107]. In den Untersuchungen von Abo et al. war die hemmende Aktivität auf pathogene Organismen vergleichbar mit jenen von Ampicilin und Gentamycin [108]. Eine genauere Untersuchung der antibakteriellen Wirkungsweise durch Gangoue-Piéboji et al. ergab eine die β -Lactamase hemmende Aktivität [109]. Eine antimykotische Wirkung konnte bei *Bridelia micrantha* nicht bestätigt werden [108].

Als Beispiel für eine antimykotische Anwendung der Gattung *Bridelia* dienen die Ergebnisse von Jayashinghe et al., die eine solche Wirkung bei *Bridelia retusa* nachweisen konnten [110].

Bridelia atroviridis wiederum wird in der kardiovaskulären Pharmakologie eine Senkung des Blutdruckes und der Herzfrequenz bei anästhesierten Ratten zugeschrieben. Jedoch kommt es bei wiederholter Anwendung zu einer raschen Toleranzentwicklung [111]. Wässriger Extrakt dieser Pflanze zeigt auch eine starke uterotonische Aktivität bei Ratten [112].

Die für die vorliegende Untersuchung relevante Art, *Bridelia ndellensis*, zeigt eine hemmende Wirkung gegen das Schlangengift Phosphodiesterase-I [113]. Ein antihyperglykämischer Effekt ist von Sokeng et al. beschrieben worden. Dabei wurden männliche Ratten mit STZ-induziertem Diabetes verwendet, die je nach Dosierung als Modell für Typ 1 und Typ 2 angesehen werden und denen Ethanolextrakt der Rinde von *B. ndellensis* verabreicht wurde. Akuteffekte wurden in prä- und postprandialem Zustand untersucht und zeigten kein Absinken der Blutglukose in den hypoglykämischen Bereich. Bei dem Typ 2 Diabetes Tiermodell wurde ein signifikanter antihyperglykämischer Effekt verzeichnet, wenn gleichzeitig mit der Substanz auch Glukose verabreicht wurde. Da dieser Effekt beim Typ 1-Modell ausblieb, liegt die Vermutung nahe, dass die Wirkung von *B. ndellensis* an

das Vorhandensein von funktionierenden β -Zellen gebunden ist. Eine Stimulierung der Insulinsekretion, vergleichbar mit der Wirkungsweise von Sulfonylharnstoffen, könnte die mögliche Wirkungsweise darstellen. In den antihyperglykämisch wirkenden Extrakten waren Ethylazetat- und Dichlormethananteile, genauso wie β -Sitosterol, Quercetin, Quercetin-3-Glycosidase und Epigallocatechin, welche auch in *B. ferruginea* als mutmaßlich hypoglykämische Wirkstoffe angesehen [90]. Da die zwei Pflanzen zur gleichen Gattung gehören, ist es nahe liegend, dass in *B. ndellensis* gleiche oder ähnliche Verbindungen für die blutglukosesenkende Wirkung verantwortlich sind.

Weitere Versuche zur genauen Analyse der antidiabetischen Wirkungsweise von *Bridelia ndellensis* sind notwendig, um das tatsächliche Potential dieser Pflanze abzuklären.

1.5.2.4 *Ceiba pentandra* (MALVACEAE)

1.5.2.4.1 Pflanze



Dieser tropische Baum gehört zur Familie der Malvaceae und wird für gewöhnlich Kapokbaum genannt. Ursprünglich kommt er in Mexiko, Zentralamerika, im nördlichen Südamerika und in der Karibik vor, wird aber mittlerweile auch in den primären Regenwäldern von Westafrika, Südostasien, Indonesien und auf der Malaiischen Halbinsel kultiviert

[114]. Er wird bis zu 70m hoch und der gerade Stamm kann einen Durchmesser von bis zu 3m haben. Die Rinde ist mit kurzen Stacheln gepanzert, um eine Schädigung des Stammes zu verhindern. Der majestätisch anmutende Baum wird von riesigen Brettwurzeln gestützt und hat fast waagrecht abgehende Äste, die oft hunderte von Kapokfrüchten tragen [115]. Diese sind wegen ihrer die Samen umhüllenden Kapokfasern begehrt, die für industrielle Zwecke genutzt werden. Die Fasern sind

wärmedämmend und wasserabweisend und wurden lange Zeit zum Befüllen von Schwimmwesten verwendet. Die grau-weißen Fasern sind glänzend und eignen sich hervorragend als Füllmaterial für Matratzen, Polstermöbel und als Dämmstoff, werden jedoch immer mehr von künstlichen Materialien ersetzt. Da die Fasern auch hoch entzündlich sind, werden sie in Südostasien auch als Heizmaterial verwendet. Das aus den Samen gewonnen Öl kann als Düngemittel verwendet werden [114, 115, 116].

C. pentandra wurden von den alten Mayas als heiliger Baum verehrt. Auch heutzutage hat er in einigen Ländern eine besondere Bedeutung für die Bevölkerung. So ist er der Nationalbaum von Costa Rica. Der über 200 Jahre alte „Cotton



Abb. E8: *Ceiba pentandra* auf 10.000 Leone Geldschein [117]

Tree“ in Freetown, Sierra Leone ziert als Symbol für Frieden und Reichtum das Stadtbild und ist auf dem 10.000 Leone Geldschein abgebildet (siehe Abb. E8)[115].

1.5.2.4.2 Traditionelle Anwendung

In weiten Teilen von Südamerika, Indien, Sri-Lanka und anderen südostasiatischen Staaten ist die Anwendung von *C. pentandra* in der Pflanzenheilkunde sehr verbreitet. An der Elfenbeinküste werden die Blätter als Gemüse verarbeitet [119]. Bei der Untersuchung der Inhaltsstoffe der Blätter von *C. pentandra* wurde ein hoher Eisen- und Kalziumanteil nachgewiesen, ebenso wie ein hoher Anteil an Schleimstoffen, die eine beruhigende Wirkung auf Schleimhäute haben [120].

Da der Samen besonders hohe Anteile an Rohprotein (32%) und Kohlenhydraten (13%) hat, kann er als Futtermittel verwendet werden. Kalzium, Phosphor, cyclopropenoide Aminosäuren und Tannine sind ebenfalls nachgewiesen [121].

Der Absud der Pflanze wird von der Bevölkerung als Diuretikum, Aphrodisiakum, Mittel gegen Kopfschmerzen und auch bei Typ 2 Diabetes verwendet [115]. Samen, Blätter, Rinde und Harz der Pflanze werden als Heilmittel gegen Durchfall, Fieber, Geschlechtskrankheiten, Asthma, Menstruationsbeschwerden und Nierenbeschwerden angewendet [122].

Die ersten Aufzeichnungen über eine medizinische Wirkung von *C. pentandra* erfolgten bereits im 18. Jhdt. von Georg Eberhard Rumpf, der in seinem Werk *Ambonese Herbal* (Volume I) der Pflanze (Kopf-)schmerzlindernde Eigenschaften zuschrieb [123]. Analgetische, antiinflammatorische und antipyretische Wirkungen wurden später von diversen Arbeiten bestärkt [124, 125]. In einer Arbeit von Lin et al. wurden Extrakten aus Rinde, Stamm und Wurzel der Pflanze antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, nachdem sie auf carrageninduzierte Pfotenödeme von Ratten eine positive Wirkung hatten [126].

In weiteren aktuellen Arbeiten wurde eine hemmende Wirkung auf den Erreger der Schlafkrankheit *Trypanosoma brucei* sowohl *in vitro*, als auch in Mäusen nachgewiesen [127]. Die Isolation von Naphthoquinonen [128], und Polyprenolen [129] aus dem Holz der Pflanze deutet auf antioxidative, antibakterielle und antikanzerogene Eigenschaften hin [128, 129]. Auch der mehrmalige Nachweis von unterschiedlichen Isoflavonen [130, 131, 132] bestätigte das antioxidative und antikanzerogene Potential der Pflanze. Aus der Wurzelrinde gewonnene Extrakte zeigen eine moderate antimikrobielle Aktivität, was auf die Präsenz von Sesquiterpenlaktonen zurückgeführt wurde [133].

Experimente an Ratten mit STZ-induziertem Diabetes und an gesunden Ratten zeigten, dass der Wurzelrindenextrakt eine glukosesenkende Wirkung auf beide Tiergruppen hat, wenn er in einer Dosis von 40 oder 75mg/kg verabreicht wurde. Die orale Behandlung mit höheren Dosen blieb wirkungslos. Bei mehrtägigen Versuchen wurde den Tieren 2xtäglich Extrakt gavagiert. Dabei wurde bei diabetischen Tieren neben der Blutglukosesenkung auch die Senkung der Glukosekonzentration im Urin verzeichnet. Die Pflanze scheint also hypoglykämische Eigenschaften zu besitzen und ist auch imstande die Hyperglykämie der diabetischen Tiere zu verbessern [134].

In einer ähnlichen Studie hat die Arbeitsgruppe von Dzeufiet die tägliche Verabreichung des Extraktes über 28 Tage untersucht. Anschließend wurden Blutparameter gemessen und ein OGTT (oraler Glukosetoleranztest) durchgeführt. Die Behandlung mit dem Pflanzenextrakt hatte in Ratten mit STZ-induziertem Diabetes eine senkende Wirkung auf die Konzentration der Blutglukose, der Blutfette, des Kreatin und des Harnstoffes. Es wurde jedoch auch ein Absinken der Futter- und Wasseraufnahme festgestellt, was Ursache der verbesserten Stoffwechsellage sein könnte [135]. Reduzierte Nahrungsaufnahme kann Folge

eines verminderten Wohlbefindens der Tiere sein. Eine Blutglukosesenkung über Unwohlsein mit Appetitlosigkeit ist vorstellbar, wäre jedoch gewiss keine attraktive Wirkungsweise für ein Antidiabetikum. Um genauere Erkenntnisse über die antidiabetische Wirkung und eventuelle Nebenwirkungen zu gewinnen, ist es notwendig, weitere Untersuchungen durchzuführen.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war, eine mutmaßliche glukosesenkende Wirksamkeit von Pflanzenextrakten an Tiermodellen für Typ 2 Diabetes zu überprüfen, an denen sich insbesondere insulinsensitivierende Wirkung gut darstellen lässt. Die Notwendigkeit, die Syndrome der betreffenden Tiermodelle genau zu verstehen, wird bei solchen Ansätzen oft vernachlässigt, was gelegentlich zu etwas unkritischer Extrapolation von Befunden aus dem Tiermodell zur humanklinischen Situation führt. Daher wurden den letztendlich angestrebten Tests der Pflanzenextrakte Untersuchungen mit einem etablierten Insulinsensitizer vorangestellt.

1) Zielsetzung des ersten Teils der Arbeit war also, die Krankheitsverläufe der Typ 2-ähnlichen Syndrome von ZDF-Ratte und db/db-Maus, sowie die Auswirkungen einer Intervention mit einem etablierten Insulinsensitizer detailliert darzustellen und zu analysieren. Dies sollte einerseits optimale Voraussetzungen bieten, um zur Untersuchung der Pflanzenextrakte geeignete Studiendesigns zu erstellen, und sollte andererseits helfen, Parallelen und Unterschiede gegenüber dem humanen Typ 2 Diabetes zu verstehen und auf dieser Basis die Ergebnisse angemessen zu interpretieren.

2) Zielsetzung des zweiten Teils der Arbeit war es, auf Basis dieser Grundlagen und entlang der entsprechenden Protokolle die antidiabetische Wirksamkeit traditionell gegen Typ 2 Diabetes verwendeter Naturheilstoffe unter Laborbedingungen zu überprüfen. Dabei wurde für die Untersuchung von Extrakten aus *Juniperus communis* und *Suaeda fruticosa* das Tiermodell der ZDF-Ratte gewählt. *Ceiba pentandra* und *Bridelia ndellensis* wurden an db/db Mäusen untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungen an ZDF-Ratten

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche ZDF-Ratten von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland, Zuchtstation in Belgien) eingesetzt. Die Tiere wurden im Alter zwischen 5 und 6 Wochen geliefert und bei konstanter Raumtemperatur (21°C) in einem 12+12stündigen künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Ratten hatten zu Versuchsbeginn ein Körpergewicht zwischen 200g und 250g und erhielten eine Hi-Calory-Diät (Purina LabDiet Formulab 5008, Richmond, USA), die ihnen bis 4 Stunden vor den jeweiligen Blut- und/oder Gewebeentnahmen angeboten wurde. Trinkwasser wurde immer ad libitum zur Verfügung gestellt. Alle Tiere wurden zumindest 1 Woche vor Versuchsbeginn angeliefert, um eine Akklimatisation zu ermöglichen.

Zu Versuchsbeginn wurden Körpergewicht und Blutglukosekonzentration gemessen. Aufgrund dieser Daten wurden Gruppen mit ähnlichen Mittelwerten gebildet, welche anschließend den unterschiedlichen Behandlungen unterzogen wurden.

Da bei ZDF-Ratten sowohl der grundlegende Krankheitsverlauf als auch die Intervention mit Pioglitazon in verschiedenen Stadien der Erkrankung untersucht werden sollten, wurden diese Tiere in 3 Gruppen geteilt, die ab dem Alter von 7, 10,5 und 15,5 Wochen mit Pioglitazon oder Vehikel behandelt wurden. Die Gruppen werden im Verlauf dieser Arbeit zur Vereinfachung kurz **ZDF-Jung** (Behandlungsalter Woche 7-12,5) **ZDF-Mittel** (Behandlungsalter Woche 12-15,5) und **ZDF-Alt** (Behandlungsalter Woche 15,5-18) genannt.

Eine Gruppe von gesunden, vehikelbehandelten Wurfgeschwistern (Fa/-) wurde zum Vergleich ab der 10,5 Lebenswoche ebenfalls untersucht. Diese Tiere werden in dieser Arbeit kurz **Gesund-Mittel** (Behandlungsalter Woche 12-15,5) bezeichnet.

2.1.1 Behandlung

Für Experimente an ZDF-Ratten wurden die zu untersuchenden Extraktionsprodukte bzw. Substanzen in 5% **Gummi arabicum** (2ml/kg, Gum arabic aus der Akazie,

Sigma-Aldrich, Deutschland) aufgenommen. Die Kontrollgruppen enthielten jeweils das gleiche Volumen an Vehikel.

Diese Flüssigkeiten wurden den Tieren einmal täglich über Schlundsonden (Animal Feeding Needle, Scanbur-BK, Schweden) zugeführt.

2.1.2 Extrakte und Substanzen

Für Versuchsreihen mit ZDF-Ratten wurden 2 Pflanzenextrakte und zusätzlich Pioglitazon (ActosTM, Takeda, Österreich) und Metformin (1,1 Dimethylbiguanid Hydrochlorid, Sigma, Deutschland) verwendet (siehe Tab. M1). Dabei wurden die Pioglitazontabletten in einem Mörser zerstoßen und in Vehikelflüssigkeit aufgenommen. Die Pflanzenextrakte wurden von den Firmen 55Pharma und Analyticon in Pulverform bereitgestellt. Aus den oberirdischen Pflanzenteilen der aus Marokko importieren *Suaeda f.* wurde ein wässriger Extrakt hergestellt. Beeren von *Juniperus c.* wurden aus Bosnien und Herzegovina importiert. Der Extrakt wurde mit 60%igem Ethanol gewonnen.

Tab. M1: Dosen der Substanzen und Extrakte, die ZDF-Ratten täglich verabreicht wurden.

Substanz bzw. Extrakt	Dosis	Vehikel
Pioglitazon	12 mg/kg/d	5 % Gummi arabicum
Metformin	300 mg/kg/d	5 % Gummi arabicum
Suaeda fruticosa	300 mg/kg/d	5 % Gummi arabicum
Juniperus communis	500 mg/kg/d	5 % Gummi arabicum

2.1.2 Wöchentliche Untersuchungen

Am Tag 1, 3, 7, 14, 21 und 28 wurden die Tiere 4 Stunden gefastet, anschließend gewogen und die Glukosekonzentration im Blut gemessen. Dabei wurde die Schwanzspitze mit einer Injektionskanüle angestochen und zweimal 10µl Blut in einer Glaskapillare aufgefangen. Diese wurden mit je 2ml Stabilisatorflüssigkeit vermischt und innerhalb von 5 Tagen an einem Glukoseanalyser (Falcor 350, Menerini, Italien) gemessen.

Der Futterverbrauch pro Woche und Käfig wurde bestimmt, um daraus den durchschnittlichen Futteraufnahme pro Tier zu berechnen. Somit konnte gegebenenfalls ein Gewichtsverlust mit Appetitlosigkeit der Tiere in Zusammenhang gebracht werden.

2.1.3 Untersuchungen am Ende der Behandlung

2.1.3.1 Gewebe und Blutentnahme

Am Ende der jeweiligen Behandlungsphase (5,5 Wochen bei den ZDF-Ratten Jung, 4,5 Wochen bei den ZDF-Ratten Mittel und 2,5 Wochen bei den ZDF-Ratten Alt) wurden die Tiere nach einer Nüchternphase von 3 Stunden mit einem Inhalationsnarkotikum (Sevorane[®], ABBOTT, Austria) betäubt und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Unverzüglich wurde der Brustkorb geöffnet und durch Herzpunktion etwa 5ml Blut entnommen, das mit EDTA (Szabo, Österreich, 0,3M, 25µl/ml Blut) versetzt wurde. Anschließend wurde das Blut zentrifugiert, das gewonnene Plasma in Eppendorfhütchen auf Eis gestellt und wenig später bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Dem toten Tier wurden danach diverse Gewebeproben entnommen und eine Gewebebank angelegt. Proben der folgenden Gewebe wurden herauspräpariert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert:

- Leber (mittlerer Lappen)
- Epididymales Fett (rechts)
- Musculus gastrocnemius (roter Teil)
- Extensor digitorum longus
- Musculus soleus

2.1.3.2 Analytik der Plasmaparameter

Die Messungen der Plasmatriglyzeride und des Plasmacholesterins wurden mittels eines kommerziell erhältlichen Analyse-Kits (Menarini, Italien) an einem Enzym-Analyser (Falcor 350, Menarini, Deutschland) nach Standardmethoden des Herstellers durchgeführt. Die freien Fettsäuren im Plasma wurden mit einem Kit von Wako (Neuss, Deutschland), Insulin und Adiponektin mit Radioimmunoassays von Linco (St. Charles, USA) gemessen. Zur Ermittlung der Alanin-Aminotransferase (ALAT), der Aspartat-Amino-Transferase (ASAT) und des Blut-Harnstoff-Stickstoffs

(BUN) wurden kinetische UV-Test zur quantitativen Bestimmung an einem Olympus Analysegerät durchgeführt. Am Selbigen wurden auch die kinetischen Farbstest (Jaffé-Methode) zur quantitativen Bestimmung des Kreatitingehaltes im Plasma ausgeführt.

2.1.3.3 Analyse der Proteinexpression und -phosphorylierung

2.1.3.3.1 Herstellung der Gewebehomogenate

Gewebeproben, die zur Proteinbestimmung mittels Western-Blot herangezogen wurden, mussten zuvor in eine **homogene Lösung** gebracht werden.

Dafür wurde gefrorene Muskelprobe mit einem Glasstab in Flüssigstickstoff zerstoßen. Auf Eis wurde anschließend 400µl Lysepuffer (siehe Tab. M2) zugeführt und nach einer Einwirkzeit von etwa 2 min das Ganze mit einem Homogenisator (Polytron PT 3100, Kinematica, Schweiz) so lange gemixt, bis keine Gewebestrukturen mehr zu erkennen waren.

Tab. M2: Zusammensetzung des Weinberglysepuffer und der Proteaseinhibitoren zur Herstellung von Gewebehomogenaten

Lösungen zu 10ml Weinberglysepuffer	Menge
Orthovanadat (1mmol/l)	100µl
β-Glycerophosphat (1mol/l)	500µl
Pantinol (100.000 KIE)	140µl
Benzamidin (0,1mol/l)	200µl
Leupeptin (10mg/ml)	10µl
Phenylmethylsulfonylfluorid (0,1mol/l)	100µl

Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (4°C vorgekühlt, 4000rpm, 10 min) und der Überstand in Eppendorfhütchen übergeführt. Die Proben wurden immer auf 4°C behandelt, um den Zustand von Proteinen und deren Phosphorylierung stabil zu halten. Erfolgt die nächsten Analyseschritte erst zu einem späteren Zeitpunkt, wurden die Proben bis dahin bei -80°C gelagert.

2.1.3.3.2 Proteinbestimmung

Zuerst musste die Proteinkonzentration der Muskelhomogenate ermittelt werden. Dazu wurden ein BCA-Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) und eine BSA-Standardkurve verwendet. In einem alkalischen Medium reagieren die Proteine mit Cu^{2+} , wobei ein violetter Reaktionspuffer entsteht. Mittels einer photometrischen Messung bei 562nm kann vom Absorptionsvermögen auf die Proteinkonzentration der Lösung geschlossen werden.

Je nach Anzahl der zu bestimmenden Proben wurde die entsprechende Menge an Working Reagens (Pierce, Rockford, USA) vorbereitet. Dabei wurden Reagens A, Reagens B und Reagens C in einem Verhältnis von 25 : 24 : 1 zusammengemischt. Auf ein Well mit 96 Plätzen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurden jeweils 2µl Probe, 100µl A. bidest und 100µl Working Reagens aufgetragen (zweifach für jede Probe). Ebenfalls wurde eine entsprechende Eichkurve angelegt, wobei die verwendete BSA-Lösung (Pierce, Rockford, USA) unterschiedlich verdünnt wurde (siehe Tab. M3).

Tab. M3: Zusammensetzung der Eichkurve im Well zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Position	µl A. bidest.	µl BSA-Lsg	µl Working Reagens	Konzentration in µg/ml
A1/B1	100	0	100	0
A2/B2	75	25	100	50
A3/B3	50	50	100	100
A4/B4	25	75	100	150
A5/B5	0	100	100	200

Das Working Reagens wurde in alle Positionen zum Schluss zugegeben, um einen möglichst gleichzeitigen Reaktionsbeginn aller Proben und der Eichkurve zu gewährleisten. Nach einer Inkubationszeit von 120 min bei 37°C konnte die photometrische Messung bei 562nm erfolgen. Durch Berechnen der Mittelwerte der Doppelmessung und Vergleich mit den Werten der Eichkurve wurde die Proteinkonzentration berechnet.

2.1.3.3 Gelelektrophorese

Da die Methode zur Proteinanalytik dient, wurde eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) durchgeführt. Dabei bewegen sich Proteine durch ein als Molekularsieb wirkendes Gel auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe und Ladung verschieden schnell und werden so aufgetrennt. SDS (sodium dodecyl sulfate) übertönt die Eigenladung der Proteine und erzeugt somit eine konstante Ladungsverteilung der Moleküle [136, 137, 138].

Das für diese Methode notwendige Trenn- und Sammelgel wurde selbst hergestellt (siehe Tab. M4) und am Tag der Verwendung zusammengemischt. Dabei wurde für die Bestimmung von p70S6K 8%iges, für die Bestimmung von IRS1 12%iges Trenngel verwendet. Da die Polymerisierung des Acrylamids durch die Reaktion von TEMED und APS statt findet, wurden diese Komponenten knapp vor dem Gießen der Gele zugeführt. Die mit Ethanol gründlich gereinigte Apparatur wurde nach Anleitung zusammengebaut. Nach dem Gießen des Trenngeles wurde dieses mit 70%igem Isopropanol beschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von etwa 30 min wurde das Isopropanol entfernt und nach Einlegen der Positionskämme das Sammelgel aufgetragen.

Tab. M4: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel zur Auftrennung der Proteine nach Ladung und Größe

	Trenngel 8%	Trenngel 12%	Sammelgel 5%
A. bidest	4,65ml	3,35ml	2,85ml
Tris-HCl 1,5M pH 8,8 (Tris (Merck; Darmstadt, Deutschland) 182g/l A. bidest, pH 8,8 mit HCl)	2,5ml	2,5ml	-
Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (Tris (Merck, Darmstadt, Deutschland) 60,6g/l A.bidest, pH 6,8 mit HCl)	-	-	1,25ml
Acrylamid-Bisacrylamid 37,5:1 (30% Acrylaide/Bis Solution; 37,5:1 (2,6%C) Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)	2,7ml	4ml	835µl
SDS 20% (Sodium dodecyl sulfate, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)	50µl	50µl	25µl
APS (Amonpersulfat, 10% in A.)	100µl	100µl	100µl

bidest. Bio-Rad, Richmond, USA)			
TEMED (Tetramethylethylen-diamin, Bio-Rad, Hercules, USA)	10µl	10µl	10µl

Während dieses auspolimerisierte, wurden die Proben vorbereitet. Zum Aufbrechen der Disulfidbrückenbindungen der Proteine wurde zum Samplepuffer (siehe Tab. M5) β -Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) im Verhältnis 5: 1 zugegeben.

Tab. M5: Zusammensetzung des Samplepuffers, der mit der Probe vermischt und in die Geltasche gefüllt wird

4 x Samplepuffer	Menge
SDS (Sigma, St. Louis, USA)	0,4g
Bromphonolblau (Sigma, St. Louis, USA)	10-15mg
Tris HCl 0,5M, pH 6,8	2ml
Glyzerin (Sigma, St. Louis, USA)	2ml

Da die Positionstaschen des Gels max. 20µl fassten, wurden die Volumina so berechnet, dass in ein Eppendorfhütchen zu 4µl 4x Samplepuffer ein Probe – A.bidest – Gemisch von insgesamt 12µl zugefügt wurde. Dabei wurde aus der zuvor gemessenen Proteindichte das Verhältnis von Probe zu A.bidest errechnet, sodass in jeder Positionstasche die gleiche Proteinkonzentration von 35µg vorlag. Als Marker diente 2µl Samplepuffer mit 4µl Rainbowmarker (Amersham, Buckinghamshire, UK). Alle Proben wurden für 5 min in kochendes Wasser gegeben und anschließend zentrifugiert (60sec., 13000rpm, 20°C). Nachdem die Kämme aus den Gelen entfernt und die Taschen mit 1%igem SDS gespült worden waren, wurde die Apparatur in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und mit Laufpuffer (siehe Tab. M6, Verdünnung 1:10) umspült. Die Proben wurden in die Geltaschen gefüllt und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Mini Protean II und Power Supply, Bio-Rad, USA, 150V; 1,5h bei p70S6K und 1h bei IRS1).

Tab. M6: Zusammensetzung des Laufpuffers für die Gelelektrophorese

10 x Laufpuffer	Menge
Tris (Merck, Darmstadt, Deutschland)	30,3g

Glycin (Merck, Darmstadt, Deutschland)	144g
A. bidest	Ad 1l
SDS 20% (Sigma, St. Louis, USA)	50ml

2.1.3.3.4 Western Blotting

Nach der Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden diese vom Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dies erfolgt durch Elektroblothing, senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angelegte Elektronenfelder, wodurch die Proteine auf eine Membran wandern [139, 140].

Dabei wurde das Gel aus der Apparatur entnommen, auf Filterpapier gelegt, mit Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) und einem zweiten Filterpapier überdeckt und zwischen Schwämmchen in die Blotting-Apparatur eingebaut. Die Apparatur wurde mit Transferpuffer (siehe Tab. M7, Verdünnung 1:10) befüllt und mit einem Magnetrührer und einem Eisbehälter kühl gehalten. Nach dem Blotten (100V, 1h) wurde die Membran mit einem Blocking Reagens (Roche, Mannheim, Deutschland; Verdünnung 1:5) auf einem Red Rocker (Hofer, San Francisco, CA, USA) eine Stunde lang geblockt.

Tab. M7: Zusammensetzung Transferpuffer für die Gelelektrophorese

10 x Transferpuffer pH 8,1-8,4	Menge
Tris (Merck, Darmstadt, Deutschland)	3,03g
Glycin (Merck, Darmstadt, Deutschland)	14,4g
Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	200ml
A. bidest	Ad 1l

2.1.3.3.5 Immunodetektion

Zur Detektion der jeweiligen Proteine wurde ein Antigen-Antikörper-Bindungsprinzip angewendet (siehe Abb. M1) [139, 141]. Dabei wurde, nachdem zuvor die unspezifischen Bindungsstellen der Membran geblockt worden waren, ein proteinspezifischer Antikörper (siehe Tab. M8) auf die Membran aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nachdem die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper mit TBS-T (siehe TBS (Tris Buffered Saline) in Tab. M9, Verdünnung 1:10, Zugabe 0,5ml Tween-20 pro 1000ml, Bio-Rad, Richmond, USA) abgespült worden

waren, wurde ein sekundärer Antikörper (ECL Anti-rabbit IgG, (HRP=) Horseradish

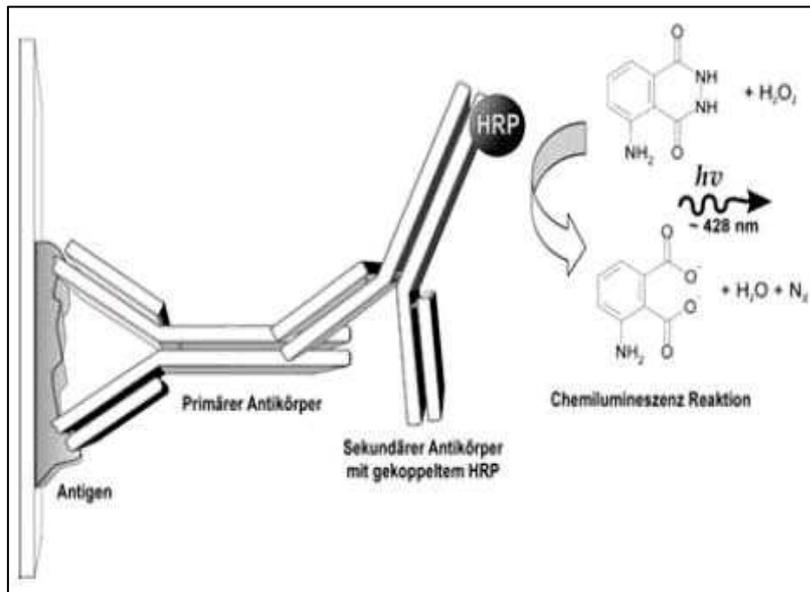


Abb. M1: Schema einer Immundetektion. Am Antigen bindet der primäre Antikörper, an diesen wiederum bindet der sekundäre Antikörper, der mit dem Enzym Horseradish peroxidase gekoppelt ist. Das Enzym oxidiert Luminol, dessen Chemilumineszenz detektiert werden kann [nach 142].

Peroxidase linked (from donkey), GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Großbritannien) für 1h aufgetragen. Dieser bindet am zuvor zugeführten primären Antikörper und markiert ihn für die anschließende Visualisierung. Hierfür wurde eine Entwicklungslösung (Super Signal System Kit, Pierce, Rockford, USA) verwendet.

Nachdem die Membran wieder mit TBS-T gespült worden war, wurde sie 5min mit der Entwicklungslösung inkubiert. Dabei oxidierte HRP das Luminol der Entwicklungslösung, wobei Lumineszenz entstand. Schließlich wurde die in Klarsichtfolie gewickelte Membran in eine Dunkelkammer gebracht. Ein Kodak X-Omat AR Film wurde je nach Lumineszenz einige Sekunden oder Minuten auf die Membran gelegt und anschließend entwickelt.

Tab. M8: Verwendete primäre Antikörper mit dazugehöriger Verdünnung in TBS-T

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Insulin Rezeptor 1 (IRS1) (Rabbit Immunoaffinity purified IgG)	Upstate, New York, USA	1µg/ml
Anti-IRS1 (Serin 307) (IRS1 ^{Ser307}) (Rabbit Antiserum)	Upstate, New York, USA	1:1000
Anti-p70S6-Kinase (p70S6K) (Rabbit Polyclonal Antibody C-18)	Santa Cruz Biotech., Heidelberg, Deutschland	1:200

Tab. M9: Zusammensetzung TBS (Tris Buffered Saline)

10 x TBS	Menge
Tris (Merck, Darmstadt, Deutschland)	24,2g
NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)	80g
A. bidest	auf 800ml
HCl (37%, Merck, Darmstadt, Deutschland)	auf pH 7,6
A. bidest	auf 1l

Die entstandenen Filme wurden fotografiert (Gel Dokumentationssystem, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) und die Banden semiquantitativ mit dem Gene Profiler 3.56/Windows ausgewertet.

2.1.3.4 Präparation des *Musculus soleus*

Der *Musculus soleus* der Ratte eignet sich wegen seiner leichten Präparierbarkeit und geringen Größe, die *in vitro* eine gute Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch Diffusion ermöglicht, besonders gut für *ex vivo*-Untersuchungen von Stoffwechselprozessen.

Bei der Präparation wurde das abgetrennte Hinterbein mit der Fußsohle nach oben an der Unterlage fixiert. Nachdem an der Achillessehne ein Bindfaden befestigt worden war, wurde die Sehne distal durchtrennt. Durch Hochheben der Sehne wurde der daran angewachsene *Musculus gastrocnemius* mit dem darunter liegenden *M. soleus* vom übrigen Bein gelöst und an der Unterlage befestigt. Der *M. soleus* wurde anschließend freigelegt, von Bindegewebsrückständen gesäubert und der Länge nach in 4 etwa gleich große Teile geteilt. Diese Präparate wurden an der distalen und proximalen Sehne an Bindfäden befestigt und vom Bein gelöst. Schließlich wurden die Präparate gewogen und an 3,5 cm lange Stahlklammern befestigt, um eine annähernd natürliche Ruhespannung zu simulieren. Man erhielt somit pro Tier 8 Präparate, was die Untersuchung von möglichst vielen unterschiedlichen Parametern ermöglichte [40].

2.1.3.4.1 Inkubationsmedium

Als Inkubationsmedium diente das Kulturmedium 199 (M199, Sigma, St. Louis, USA). Der isotone Puffer ist mit Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Salzen u.a. angereichert und versorgt den Muskel in vitro.

Nachdem am Versuchstag das Medium 199 auf Raumtemperatur erwärmt worden war, wurden folgende Substanzen zugesetzt: **BSA** (3g/l = 0.3% w/v; Bovines Serum-Albumin, Roche, Deutschland), **HEPES** (1,3g/l = 0.13% w/v; Sigma, St Louis, USA) und **PALMITAT** (25mg Palmitinsäure in 812,5µl Ethanol gelöst, von dieser Stammlösung 250µl/l dem Inkubationsmedium zugefügt, das sind 0,025% v/v Ethanol und 300µmol/l Palmitat). Der pH-Wert wurde mittels HCl und NaOH auf pH 7,35-7,40 korrigiert.

2.1.3.4.2 Insulin

Insulin (Actrapid, Novo Nordisk, Dänemark) wurde mit 0,9% NaCl + 0,26% HEPES auf 100µmol/l verdünnt, bei -20°C gelagert, am Versuchstag weiter auf 1µmol/l verdünnt und in einer Konzentration zum Medium gegeben (letztendliche Konzentration: 50nmol/l).

2.1.3.4.3 Radiomarkierte Substrate

Die radioaktiven Substanzen (siehe Tab. M10) wurden zur Bestimmung von Stoffwechselraten verwendet. Sie stammten alle von der Firma Amersham Life Science (Amersham, England). Die verwendeten Radionuklide sind β -Stahler. Das heißt, sie haben eine Strahlungsreichweite im Bereich von µm-mm. Um diese Strahlung trotz der geringen Reichweite detektieren zu können, wurde den Proben Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold LSC-Scintillator, Packard Instrument Company, Meriden, USA) zugegeben. Durch die Energie der Elektronenstrahlung wird diese zur Fluoreszenz angeregt. Am β -Counter (Liquid Scintillation Analyser 1900 TR, Packard Instruments Company, Meriden, USA) wurden dann die Zerfälle pro Minute (decays per minute = dpm) bzw. die Detektionen pro Minute (counts per minute = cpm) gemessen.

Tab. M10: Konzentration der mit Radionukleotiden markierten Substrate zur Bestimmung der Stoffwechselfparameter.

radiomarkierte Verbindung	Parameterbestimmung	Konzentration im Medium
^{14}C -Glukose	Nettoglykogensynthese,	0,2 µCi/ml

	CO ₂ -Produktion aus Glukose	
³ H-2-Deoxyglukose	Glukosetransport	0,4 µCi/ml
¹⁴ C-Sukrose	Glukosetransport	0,06 µCi/ml
¹⁴ C-Palmitat	CO ₂ -Produktion aus Palmitat	0,2 µCi/ml

2.1.3.4.4 Vorinkubation

Für die Versuche wurden 25ml-Erlenmeyerkolben verwendet. Diese wurden zuvor mit Gel-Slick Lösung (Blue Slick, Serva, Deutschland) beschichtet, um ein Anhaften von Substanzen an der Gefäßwand zu verhindern.

Vor der Messphase von 60 Minuten erfolgte eine 20minütige Vorinkubationsphase, welche der Equilibrierung diente. In der Vorinkubationsphase waren dem Inkubationsmedium weder Insulin noch radioaktive Substrate zugesetzt.

Jedes Präparat wurde in einen eigenen Kolben mit 3 ml Inkubationsmedium gegeben. Anschließend wurden die Kolben mit einem Gummistopfen verschlossen, durch die eine Injektionsnadeln für die Gasabfuhr geführt wurden. Die ausreichende Sauerstoffversorgung der Muskeln wurde durch Begasen mit einem O₂/CO₂-Gemisch gewährleistet. Dadurch waren die Präparate einer künstlichen Atmosphäre (O₂ : CO₂ = 95% : 5%) ausgesetzt. Für die Dauer der Versuche wurden die Erlenmeyerkolben in ein Schüttelwasserbad (1086, GFL, Deutschland) bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 130rpm gestellt. Als Leerwerte wurden 2 Kolben mit Inkubationsmedium ohne Muskelpräparate im Experiment mitgeführt.

2.1.3.4.5 Messphase

Für die 60minütige Messphase wurde das gleiche Inkubationsmedium vorbereitet, welches auch für die Vorbehandlungsphase verwendet wurde. Weiters wurden in der Messphase, wenn angegeben, Insulin und je nach zu messenden Parametern die entsprechenden radioaktiv markierten Substrate zugesetzt. Während der Messphase wurden die Erlenmeyerkolben unter den gleichen Bedingungen wie bei der Vorinkubationsphase im Wasserbad geschüttelt, die Sauerstoffzufuhr wurde regelmäßig überprüft.

Wenn die CO₂-Freisetzung gemessen werden sollte, wurde nach 15 Minuten der Gasdurchfluss unterbrochen. Durch den dichten Verschluss der Gummistoppeln blieb

für den Rest der Versuchsdauer dennoch eine für den Muskel ausreichende Sauerstoffatmosphäre gewährleistet.

Am Ende des Versuchs wurden die Muskeln rasch aus den Erlenmeyerkolben entfernt, mit Filterpapier abgetrocknet und in Flüssigstickstoff schock-gefroren. Erfolgte die Verarbeitung der Muskeln erst zu einem späteren Zeitpunkt, wurden diese in Zentrifugenröhrchen bei -80°C gelagert, um etwaige metabolische Prozesse zu unterbinden.

2.1.3.5 Herstellen der Gewebelysate

Für die Messung des Glykogengehaltes, der Glykogensynthese und des Gukosetransportes mussten die Muskeln **lysiert** werden.

Dafür wurden die tiefgefrorenen Muskel- und Leberproben jeweils in $500\mu\text{l}$ 1M KOH über ca. 20 min bei 70°C inkubiert. Nach kurzem Schütteln am Vortex (Momentschüttler L24, Labinco, Niederlande) erhielt man ca. $500\mu\text{l}$ homogene Lösungen der Muskeln, die für die weitere Analytik verwendet wurden.

2.1.3.6 Analyse der Lysate des *Musculus soleus*

2.1.3.6.1 CO_2 -Produktion aus Glukose oder Palmitat

Glukose und Fettsäuren werden bei der Zellatmung vollständig oxidiert, wobei CO_2 und H_2O als Endprodukte ins Inkubationsmedium abgegeben werden. CO_2 kann von einer starken Säure in die Gasphase getrieben werden, wo es von einer „Trapping“-Lösung gebunden wurde. Wird in das Medium ^{14}C -Glukose gegeben, sind auch die CO_2 -Moleküle radioaktiv markiert und können am β -Counter gemessen werden.

Für diese Methode wurden spezielle manipulierte Gummistoppeln vorbereitet. Auf der Innenseite dieser wurden abgeschnittenen Spitzen von Eppendorfhütchen befestigt, die ein 1cm^2 großes Filterpapier enthielten. Auf das Filterpapier wurde unmittelbar vor Gebrauch $200\mu\text{l}$ einer Trapping-Lösung aufgebracht, die 1:1 aus Methanol (Merck, Deutschland) und 2-Phenylethylamin (99%, Sigma-Aldrich, Deutschland) bestand. Nach entfernen der Muskeln, wurde die Kolben rasch wieder mit diese Spezial-Stoppel verschlossen. Anschließend wurde mit einer Injektionsnadel der Stoppel durchstoßen und $200\mu\text{l}$ 1M Perchlorsäure in das Medium gespritzt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die Hütchen mit dem Filterpapier entnommen und in Counterröhrchen mit 4ml Szintillationsflüssigkeit

gegeben. Mit den als Leerwerte fungierenden Kolben wurde gleichermaßen verfahren. Schließlich wurde nach ausgiebigem Schütteln der Röhrcchen am Vortex die ^{14}C -Konzentration am β -Counter gemessen. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glukose wurde je 4mal der ^{14}C -Gehalt von 100 μl des nicht inkubierten Inkubationsmediums gemessen.

Formel zur Berechnung der CO_2 -Produktion aus Glukose oder Palmitat:

$$(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Blank}}) * 1,3333 / (S_A / 1000 / 1000) / \text{ww} = \text{nmol Substrat zu CO}_2 * \text{g}^{-1} * \text{h}^{-1}$$

$$S_A = \text{CPM}_A * 10 / c$$

cpm..... detektierte counts per minute

1,3333..... Korrekturfaktor von 45 Minuten (Zeit ab Gasstopp) auf eine Stunde

S_A spezifische Aktivität

c..... Konzentration von kaltem (nicht radioaktivem) Substrat im Zellkulturmedium (5,5 mmol/l Glukose)

10..... Umrechnungsfaktor vom Puffervolumen im Counter (100 μl auf 1ml)

ww..... wet weight = Muskelgewicht in mg

CPM_A ^{14}C Gehalt (cpm) von 100 μl Inkubationsmedium (Mittelwert von 4 Messungen)

2.1.3.6.2 Laktatproduktion

Ist nicht genügend Sauerstoff im Muskel vorhanden, um eine ausreichende ATP-Produktion über die oxidative Phosphorylierung zu gewährleisten, wird die Milchsäuregärung aktiviert, um die vorhandene Glukose umzusetzen. Dabei entsteht Laktat, wird aus den Zellen abgegeben und sammelt sich im Inkubationsmedium.

Um den Laktatgehalt im Medium zu bestimmen, wird das Enzym Laktatdehydrogenase zugeführt. Dieses wandelt Laktat in Pyruvat durch Oxidation um, wobei das Koenzym NAD^+ zu NADH reduziert wird. Ein Mol Laktat entspricht dabei genau einem Mol gebildetem NADH . Die photometrische Messung der NADH -Konzentration erlaubt somit Rückschlüsse auf die im Medium vorhandene Laktatkonzentration.

Dafür wurde das bei Versuchsende durch die Perchlorsäure angesäuerte Inkubationsmedium zentrifugiert und 1ml des Überstandes in Röhrchen mit 100µl KOH-TEA (0,5M TEA + 2M KOH; TEA=Triethanolamine, Sigma) übergeföhrt. Anschließend wurden die Proben in 10µl Schritten mit KOH-TEA neutralisiert, aus jeder Probe 2x 200µl in Photometerküvetten pipettiert und mit 1ml Reaktionspuffer (siehe Tab. M11) für 30min inkubiert. Ebenso wurde mit den Leerwerten verfahren.

Tab. M11: Zusammensetzung des Reaktionspuffers zur Umsetzung von Laktat in Pyruvat

Substanzen pro 60ml Aqua dest.	Menge
EDTA (Triplex III, Merck, Deutschland)	230mg
NAD (Grad 1, 100%; Boehringer Mannheim, Deutschland)	90mg
Hydrazinhydrat (BDH Laboratory Supplies, England)	1,2ml
LDH (aus Kaninchenmuskel, Boehringer Mannheim, Deutschland)	0,36ml

Nach der Inkubationszeit, in der die oben beschriebene enzymatische Reaktion ablief, wurden die NADH-Konzentration der Proben und Leerwerte bei einer Wellenlänge von 340nm an einem Photometer (Beckmann DU62) gemessen.

Formel zur Berechnung der Laktatproduktionsrate aus der Extinktion:

$$\frac{dA * 1,2 * 3,2 * NV}{\epsilon * 0,2 * ww} = \frac{dA * 3,08 * NV}{ww} = \mu\text{mol Laktat} * \text{g Gewebe}^{-1} * \text{h}^{-1}$$

- dA..... (Extinktion Probe – Extinktion Blank) * 1000
- 1,2..... Gesamtvolumen Probe mit Reaktionspuffer (ml)
- 3,2..... Gesamtkubationspuffer im Flask (ml) und 200µl Perchlorsäure
- ε..... Extinktionskoeffizient von NADH bei 340nm
(6,22 * 10⁻³ *(µmol/l)⁻¹ * cm⁻¹)
- 0,2..... eingesetztes Inkubationspuffervolumen (ml)

NV..... Korrekturfaktor für zugesetztes Volumen an KOH/TEA

ww..... wet weight = Muskelgewicht in mg

2.1.3.6.3 Glukosetransport

Für die Bestimmung der Glukosetransportrate wurden die radioaktiven Verbindungen ^3H -2-Deoxyglukose und ^{14}C -Sukrose zu Hilfe genommen. Das 2-Deoxyglukosemolekül wird zwar von der Zelle aufgenommen und phosphoryliert, kann aber auf Grund seiner strukturellen Eigenschaften nicht weiter an der Glykolyse teilnehmen. Nachdem die Muskelzelle es auch nicht wieder abgeben kann, sammelt es sich im Zytoplasma. ^{14}C -Sukrose kann von der Zelle nicht aufgenommen werden und repräsentiert den Extrazellularraum. Beide Isotope können bei einer Messung nachgewiesen werden und ermöglichen die Berechnung des Glukosetransportes.

Das in KOH-hältige basische Muskellysat wurde nach Zugabe eines Universalindikators (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Essigsäure neutralisiert, bis ein Farbumschlag von Violett auf Gelb-Grün erfolgte. Das war notwendig, da eine basische Lösung im β -Counter eine zu hohe Lumineszenz verursacht hätte. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (20°C, 2000rpm, 10min) und aus dem Überstand 300 μl in 5ml Counterröhrchen übergeführt. Schließlich wurden die Röhrchen mit jeweils 4ml Szintillationslösung aufgefüllt, verschlossen, kurz geschüttelt und am β -Counter gemessen. Als Leerwerte wurde in 4 Röhrchen jeweils 100 μl Inkubationsmediums, mit 4ml Szintillationslösung aufgefüllt und mitgemessen. Dabei wurde die in den Lösungen vorhandene Menge der radioaktiv markierten Glukose und Sukrose in *counts per minute* gemessen.

Formel zur Berechnung der aufgenommenen ^3H -2-Deoxyglukose:

$$\frac{[^3\text{H Probe} - (^3\text{H Blank} / ^{14}\text{C Blank} * ^{14}\text{C Probe})] * \text{CF} * 50000}{\text{ww} * ^3\text{H Blank}}$$

$$= \text{cpm transportierte } ^3\text{H Deoxyglukose} * \text{mg}^{-1} * \text{h}^{-1}$$

cpm..... detektierte counts per minute

^3H Probe..... cpm ^3H -Deoxyglukose im Muskellysat

^3H Blank..... cpm ^3H -Deoxyglukose in 100 μl Inkubationsmedium

^{14}C Probe..... cpm ^{14}C -Sukrose im Muskellysat
 ^{14}C Blank..... cpm ^{14}C -Sukrose in 100 μl Inkubationsmedium
 ww..... wet weight = Muskelgewicht in mg
 CF..... Korrekturfaktor für das Probenvolumen: 535 (μl Muskellysat
 inkl. Indikator und Essigsäure) / 300 (μl gemessenes
 Probenvolumen)

2.1.3.6.4 Glykogengehalt

Für die Bestimmung des Glykogengehaltes wird zuerst mit Hilfe des Enzyms Amyloglukosidase Glykogen in Glukosemoleküle gespalten. mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Enzymlösung wird Glukose dann durch das Enzym Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Dabei wird NADH in einem Verhältnis von 1:1 zu Glukose reduziert und kann am Photometer gemessen werden.

Zu 100 μl der Muskellysate wurde zuerst 16 μl konzentrierte Essigsäure zur Neutralisation beigefügt. Anschließend wurden jeweils 500 μl Enzympuffer mit Amyloglukosidase (siehe Tab. M12) zugegeben, die Röhrchen gut verschlossen, geschüttelt und bei 37°C mind. 6 Stunden inkubiert. Dabei fand die enzymatische Aufspaltung des Glykogens in Glukosemoleküle statt.

Tab. M12: Zusammensetzung des Enzympuffers zur Spaltung des Glykogens im Muskellysat

zu 30ml Aqua bidest.	Menge
Konzentrierte Essigsäure	144 μl
Na-Acetat	293mg
Amyloglukosidase (Aspergillus niger, Lyophilisat, Boehringer Mannheim, Deutschland)	150mg

Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (4°C, 3000rpm, 10min) und jeweils 2mal 100 μl des Überstandes in Photometerküvetten pipettiert. 2ml Puffer mit Hexokinase (LiquidUV, HumanGmbH, Taunusstein, Deutschland) wurden in jede Küvette zugegeben und 30min inkubiert. Als Leerwerte wurden 2 Küvetten nur mit Hexokinasepuffer befüllt. 2 interne Standards mit 10 μl Standardglukoselösung (Konzentration von 5.55mmol/l) und 2ml Hexokinasepuffer wurden ebenfalls mitgeführt, um die Qualität der Bestimmung zu überprüfen. Schließlich wurden die Proben am Photometer bei 366nm gemessen.

Formel zur Berechnung des Glykogengehaltes:

$$\frac{dE \cdot 0,5 \cdot 2,1}{(\epsilon \cdot 0,016 \cdot ww)} = \frac{dE \cdot 19}{ww} = \mu\text{mol Glukosyleinheiten / g Gewebe}$$

dE..... (Extinktion Probe – Extinktion Blank) * 1000

0,5ml..... Volumen des Gesamtmuskellysats

2,1ml..... Summe der Proben- und Hexokinasepuffervolumen

0,016ml..... Anteil des Probenvolumens am Gesamtmuskellysats

ϵ Extinktionskoeffizient von NADH bei 366nm ($3,3 \cdot 10^{-3} \cdot (\mu\text{mol/l})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

ww..... wet weight = Muskelgewicht in mg

2.1.3.6.5 Glykogensynthese

Durch das Verwenden der radioaktiv markierten ^{14}C -Glukose kann in einem Experiment zugleich die zuvor erläuterte Glukoseoxidation und die Nettoeinbaurrate von Glukose in das Glykogen des Muskels ermittelt werden. Dabei wird durch die Glykogensynthese das radiomarkierte Glukosemolekül im Muskel zu Glykogen synthetisiert und gespeichert. Das Glykogen kann aus dem Muskellysats isoliert und der Gehalt an ^{14}C am β -Counter gemessen werden.

Nach der Entnahme von 100 μl Muskellysats für die Bestimmung des Glykogengehaltes wurden zu den verbleibenden 400 μl zuerst 80 μl gesättigte Na_2SO_4 -Lösung und dann 100 μl Glykogenlösung (25mg/ml A. bidest. Kaninchenleberglykogen von Boehringer Mannheim, Deutschland) zugefügt. Die Proben wurden gut geschüttelt und nach Zugabe von 1,2ml auf -20°C gekühltem Ethanol und nach neuerlichem Schütteln bei -20°C mindestens 1 Stunde inkubiert, was eine vollständige Glykogenfällung bewirkte. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (20°C , 3000rpm, 20min), wodurch das ausgefällte Glykogen in Pellets verklumpte. Nach dem Dekantieren des Ethanols wurden 500 μl A. bidest. zugesetzt und bei 70°C im Heizblock 15min inkubiert, wodurch sich das Glykogen wieder löste. Durch Schütteln am Vortex wurde die Pelletreste in Lösung gebracht und anschließend wieder 1,5ml gekühltes Ethanol zugesetzt. Eine weitere Wiederholung der Arbeitsschritte Inkubieren bei -20°C , Zentrifugieren und Dekantieren war

erforderlich, um das Glykogen zu reinigen. Schließlich wurden die Pellets in 300µl A.bidest. gelöst, in Counterröhrchen überführt und mit 4ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt. Da Glykogen auch in diesem Medium nach einiger Zeit ausfällt, wurden die Proben unmittelbar vor der Messung am β-Counter erneut geschüttelt. Die Messung der spezifischen Aktivität der Glukose im Inkubationsmedium war bereits im Rahmen der Bestimmung der CO₂-Produktionsrate erfolgt (siehe Kapitel 2.1.3.6.1).

Formel zur Berechnung der Nettoinkorporation von Glukose in Glykogen:

$$\frac{\text{cpm Probe} * 1000 * 1,25}{(\text{SA} / \text{ww})} = \mu\text{mol Glukose inkorporiert} * \text{g}^{-1} * \text{h}^{-1}$$

$$S_A = \text{CPM}_A * 10 / c$$

- cpm..... detektierte counts per minute
- 1,25..... Korrekturfaktor für das Volumen (abgezweigte 100µl für die Bestimmung des Glykogengehaltes)
- ww..... wet weight = Muskelgewicht in mg
- S_A Spezifische Aktivität
- CPM_A..... ¹⁴C Gehalt (cpm) von 100µl Inkubationsmedium (Mittelwert von 4 Messungen)
- 10..... Umrechnungsfaktor vom Puffervolumen im Counter (100µl auf 1ml)
- c..... Konzentration von kalter (nicht radioaktiver) Glukose im Zellkulturmedium (5,5 mmol/l)

2.2 Untersuchungen an db/db-Mäusen

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche db/db-Mäuse von der Firma Charles River Laboratories eingesetzt. Die Tiere wurden im Alter zwischen 5 und 7 Wochen geliefert und wurden dann bei konstanter Raumtemperatur (21°C) in einem 12+12-stündigen künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die db/db-Mäuse hatten bei Versuchsbeginn ein Körpergewicht zwischen 30g und 40g und wurden mit Standardfutter gehalten, welches ihnen 12 Stunden vor den jeweiligen Blut- und/oder Gewebeentnahmen entzogen wurde. Trinkwasser wurde immer ad libitum zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden zumindest 1 Woche vor Versuchsbeginn angeliefert, um eine Akklimatisation zu gewährleisten.

Zu Versuchsbeginn wurden das Körpergewicht der Tiere und die Blutglukosekonzentration gemessen. Aufgrund dieser Daten wurden vergleichbare Gruppen gebildet, welche anschließend den unterschiedlichen Behandlungen mit Extrakten, Substanzen oder Vehikel zugeordnet wurden.

2.2.2 Behandlung

Bei den Mäuseexperimenten wurde 0,5% **CMC** (Carboxymethylcellulose, SIGMA, Österreich) mit 1% **DMSO** (Dimethyl Sulfoxid, SIGMA, Frankreich) als Vehikel verwendet. Die Kontrollgruppen enthielten jeweils das gleiche Volumen an Vehikel.

Für den Zeitraum der Versuchsdauer wurden den Tieren täglich Vehikel oder die zu testende Substanzen/Extrakte oral, mittels Schlundsonde verabreicht (2ml/kg) (siehe Abb. M2).



Abb. M2: Verabreichung eines Extraktes mittels Schlundsonde an eine db/db Maus.

2.2.3 Extrakte und Substanzen

In den Experimenten mit db/db-Mäusen wurden 2 Pflanzenextrakte und Pioglitazon als Positivkontrolle untersucht (siehe Tab. M13). Die Extrakte wurden auch hier von den Firmen 55pharma und Analyticon bereitgestellt. Die Ethylacetatextrakte wurden aus der Stammrinde von *Bridelia n.* und aus der Wurzelrinde von *Ceiba p.* hergestellt. Die Lösung bzw. Dispersion der Extrakte in der Vehikellösung erfolgte einige Stunden vor Versuchsbeginn.

Tab. M13: Menge der Substanz und Extrakte, die db/db Mäusen während der Versuchsphase täglich verabreicht wurde.

Substanz/Extrakte	Dosis	Vehikel
Pioglitazon	30 mg/kg/d	CMC + DMSO
Ceiba pentandra	500 mg/kg/d	CMC + DMSO
Bridelia ndellensis	40 mg/kg/d	CMC + DMSO

2.2.4 Wöchentliche Untersuchungen

Die Blutglukosekonzentration der Tiere wurde an den Tagen 1, 3, 7, 14, 21 und 28 nach einer 12stündigen Fastenperiode, jedoch vor der Verabreichung der jeweiligen Tagesdosis festgestellt. Dies erfolgte durch Anstechen der Schwanzspitze und anschließender Messung mittels Handmessgerät (OneTouch, ACCU-CHECK, Lifescan, USA). Anschließend wurden die Tiere gewogen (WTB 2000, Radwag, Polen).

Auch der Futtermittelfverbrauch pro Woche und Käfig wurde bestimmt, um daraus die durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier zu berechnen. Somit konnte gegebenenfalls ein Gewichtsverlust mit Appetitlosigkeit der Tiere in Zusammenhang gebracht werden.

2.2.5 Untersuchungen am Ende der Behandlung

2.2.5.1 Orale Glukosetoleranztest

Nach einer Behandlungsdauer von 5 Wochen wurden die Tiere nach einer Nüchternphase von 12 Stunden einem oralen Glukosetoleranztest (OGTT) unterzogen. Dabei wurde ihnen nach der Messung der basalen Blutglukosekonzentration über eine Schlundsonde 3g/kg Glukose (in A.dest gelöst) verabreicht und anschließend bei Minute 30, 60 und 90 die Blutglukosekonzentration bestimmt.

2.2.5.2 Gewebeentnahme

Anschließend wurden die Tiere mit dem Inhalationsnarkotikum Sevofluran betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Unverzüglich wurde der Brustkorb geöffnet und durch Herzpunktion etwa 0,5-1ml Blut in eine Spritze mit EDTA (25µl/ml Blut, 0,3M, Ethylendiaminetetraacetic Acid, Szabo, Austria) entnommen. Anschließend wurde das Blut zentrifugiert und das gewonnene **Plasma** in Eppendorfhütchen auf Eis gestellt, dann bis zu den späteren Messungen bei -80°C gelagert.

Vom toten Tier wurden ein Stück des mittleren **Leberlappens** und ein Teil des **Muskulus gastrocnemius** entnommen und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die so angelegte Gewebebank wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.5.3 Analytik

Plasmatriglyzeride und **Plasmacholesterin** wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Analyse-Kits (Triglycerides, Cholesterol, High Control, Low Control, Menarini, Italien) an einem Enzym-Analyser (Falcor 350, Menarini, Deutschland) nach Standardmethoden des Herstellers gemessen. Bei der **Plasmainsulinmessung** wurden ein Elisa-Immuno-Assay verwendet (Mouse Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Schweden) und photometrisch gemessen (PowerWave X, Bio-Tek Instruments, USA).

Die tiefgefrorenen Leber- und Muskelproben wurden verwendet, um den jeweiligen **Glykogengehalt** mittels der bereits beschriebenen Methode (siehe Kapitel 2.1.3.6.5) zu messen.

2.3 Statistik

Die Auswertung der Ergebnisse wurde mittels deskriptiver Statistik durchgeführt.

Die Entwicklung von Körpergewicht und Blutglukose im Verlauf der Beobachtungsperiode wurde durch einen intraindividuellen, gepaarten Vergleich analysiert. Auch die Wirkung von Insulin am Soleusmuskel wurde durch einen gepaarten Test untersucht.

Die Ergebnisse sind in Form von Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Zum Vergleich der Mittelwerte von Messreihen wurde der zweiseitige, gepaarte oder ungepaarte Students-t Test herangezogen.

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

$$t = x/SE$$

$$FG = n - 1$$

SE..... Standardfehler des Mittelwertes

x..... Mittelwert

FG..... Freiheitsgrad

n..... Stichprobengröße

3 RESULTATE

3.1 ZDF-Ratten

3.1.1 Altersabhängige Entwicklung des ZDF-Syndroms

In diesem Kapitel soll die altersabhängige Entwicklung des ZDF-Syndroms unabhängig von einer therapeutischen Intervention dargestellt werden. Dementsprechend werden vorerst nur Resultate von Vehikel-behandelten Tieren beschrieben, also von den Gruppen ZDF-Jung-Veh, ZDF-Mittel-Veh, ZDF-Alt-Veh und Gesund-Mittel-Veh.

Blutglukose: Im Alter von 7 bis 12.5 Wochen stieg die Blutglukose der Tiere stark an (ZDF-Jung-Veh von 107.3 ± 7.3 mg/dl auf 146.6 ± 15.2 mg/dl bis zum Alter von 8.5 Wochen, $p < 0.05$; und auf 340.0 ± 27.5 mg/dl bis zum Alter von 12.5 Wochen, $p < 0.001$; Abb. R1 Seite 61). Nach dieser dynamischen Phase der Krankheitsentwicklung stabilisierten sich die Werte etwa in der 13. bis 15. Woche (ZDF-Mittel) bei etwa 450 mg/dl. Im Vergleich dazu blieb die Blutglukosekonzentration bei gesunden Wurfgeschwistern normal und war im Alter von 15 Wochen signifikant niedriger als jene der ZDF-Tiere (ZDF-Mittel-Veh: 458.1 ± 16.6 mg/dl, Gesund-Mittel-Veh: 103.9 ± 4.5 mg/dl, $p < 0.001$, Abb. R1 Seite 61). Messungen bei älteren ZDF-Tieren ergaben keine relevanten Veränderungen der Blutglukose nach dem Alter von 15 Wochen. Die erhöhte Blutglukosekonzentration der ZDF-Ratten blieb bis zur 18. Lebenswoche stabil und unverändert (ZDF-Alt-Veh, Woche 15.5: 425.7 ± 8.2 mg/dl Woche 18: 430.1 ± 14.0 mg/dl, nicht signifikant, Abb. R1 Seite 61). Bei einem Tier aus der Gruppe ZDF-Alt-Veh blieb im gesamten Verlauf der Beobachtung, also bis zum Alter von 18 Wochen, die Blutglukose im normoglykämischen Bereich (18 Wochen alt: 111.2 mg/dl). Nachdem es sich hier offenkundig um einen untypischen Einzelfall handelte, wurde dieses Individuum von der Analyse ausgeschlossen.

Körpergewichtszunahme, Adipositas und Futteraufnahme: Das Körpergewicht der ZDF-Ratten war im Alter von 7 Wochen bei 226.8 ± 2.4 g und stieg bis zur 18. Woche auf 375.0 ± 12.5 g. Gesunde Tiere hatten im Alter von 10.5 bis 15 Wochen eine signifikant höhere Körpergewichtszunahme als die gleichaltrigen ZDF-Tiere

(ZDF-Mittel-Veh: $+21.1 \pm 2.3$ g, Gesund-Mittel-Veh: $+63.0 \pm 4.3$ g, $p < 0.001$, Abb. R2-B Seite 62). Die hyperglykämischen ZDF-Ratten hatten allerdings wesentlich größere epididymale Fettpolster als die gesunden Wurfgeschwister, was auf einen höheren Körperfettanteil (Adipositas) hinweist (ZDF-Mittel-Veh: 4.0 ± 0.2 g; Gesund-Mittel-Veh: 2.3 ± 0.1 g, $p < 0.001$, siehe Abb. R3-F Seite 65). Die Berechnung der Futterraufnahme zeigt, dass ZDF-Ratten signifikant mehr Futter zu sich nahmen als gesunde Wurfgeschwister (ZDF-Mittel-Veh: 346.0 ± 4.1 g/Ratte/10 Tage; Gesund-Mittel-Veh: 214.4 ± 2.7 g/Ratte/10 Tage, $p < 0.001$, siehe Abb. R3-I Seite 67).

Adiponektin: Die Plasmaadiponektinkonzentration bei ZDF-Jung-Veh Tieren belief sich auf 4.6 ± 0.4 mg/l, fiel bei ZDF-Mittel-Veh etwas ab auf 3.6 ± 0.2 mg/l ($p < 0.05$) und stieg bei ZDF-Alt-Veh wieder auf 4.1 ± 0.2 mg/l an (nicht signifikant, siehe Abb. R3-A. Seite 63).

Insulin: ZDF-Jung-Veh hatten eine hohe Plasmainsulinkonzentration von 83.8 ± 18.2 mU/l. Diese nahm während der Krankheitsentwicklung erwartungsgemäß ab und war bei ZDF-Mittel-Veh und bei ZDF-Alt-Veh ähnlich wie bei 15.5 Wochen alten gesunden Wurfgeschwistern (Gesund-Mittel-Veh: 24.5 ± 2.4 mU/l, nicht signifikant; ZDF-Mittel: 21.7 ± 1.8 mU/l, ZDF-Alt: 22.8 ± 3.6 mU/l, $p < 0.01$, siehe Abb. R3-B Seite 63).

Triglyzeride, Cholesterin und FFA: Die Triglyzeridwerte waren bei ZDF-Jung-Veh bei 715 ± 94 mg/dl. Im Verlauf der Krankheit nahmen sie ab (ZDF-Mittel-Veh: 269 ± 26 , $p < 0.001$; ZDF-Alt-Veh: 349 ± 41 mg/dl, $p < 0.05$). Gesund-Mittel-Veh hatten deutlich geringere Werte von 83.8 ± 10 mg/dl ($p < 0.001$, siehe Abb. R3-C, Seite 64). Die Cholesterinwerte waren bei ZDF-Jung-Veh noch im normalen Bereich (108 ± 4 mg/dl [143], stiegen in einer für den hyperglykämischen Krankheitsverlauf typischen Weise bereits bei ZDF-Mittel-Veh stark an (172 ± 7 mg/dl, $p < 0.001$) und blieben bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes in diesem Bereich (ZDF-Alt-Veh: 184 ± 6 mg/dl, $p < 0.001$). Gesunde Vergleichstiere hatten mit 77 ± 2 mg/dl geringeres Plasmacholesterin (Gesund-Mittel-Veh: $p < 0.001$, siehe Abb. R3-D Seite 64). Die Konzentration der FFA nahm in ZDF-Ratten von anfänglich 845 ± 69 $\mu\text{mol/l}$ bis zur 18. Woche auf 620 ± 23 $\mu\text{mol/l}$ etwas ab ($p < 0.05$, siehe Abb. R3-E Seite 65).

Muskel- und Leberglykogen: Bei der Messung des Muskelglykogengehaltes konnten keine signifikanten Veränderungen im Krankheitsverlauf festgestellt werden (ZDF-Jung-Veh: 21.9 ± 2.2 $\mu\text{mol/g}$, ZDF-Mittel-Veh: 18.0 ± 0.9 $\mu\text{mol/g}$, ZDF-Alt-Veh: 21.0 ± 1.0 $\mu\text{mol/g}$, nicht signifikant gegen Jung). Die Werte der gesunden Tiere waren deutlich niedriger als die gleichaltrigen ZDF-Ratten (Gesund-Mittel-Veh: 10.5 ± 1.4 $\mu\text{mol/g}$, $p < 0.001$, siehe Abb. R3-G Seite 66). Die Leberglykogenwerte lagen bei ZDF-Jung-Veh bei 261.5 ± 19.6 $\mu\text{mol/g}$ und sanken dem gegenüber bei ZDF-Mittel-Veh und ZDF-Alt-Veh Tieren signifikant ab (ZDF-Mittel-Veh: 180.7 ± 6.4 $\mu\text{mol/g}$, $p < 0.05$, ZDF-Alt-Veh: 186.6 ± 17.9 $\mu\text{mol/g}$, $p < 0.05$). Die gesunden Vergleichstiere hatten einen wesentlich geringeren Leberglykogengehalt als gleichaltrige ZDF-Ratten von 109.4 ± 13.8 $\mu\text{mol/g}$ (Gesund-Mittel-Veh: $p < 0.001$, siehe Abb. R3-H Seite 66).

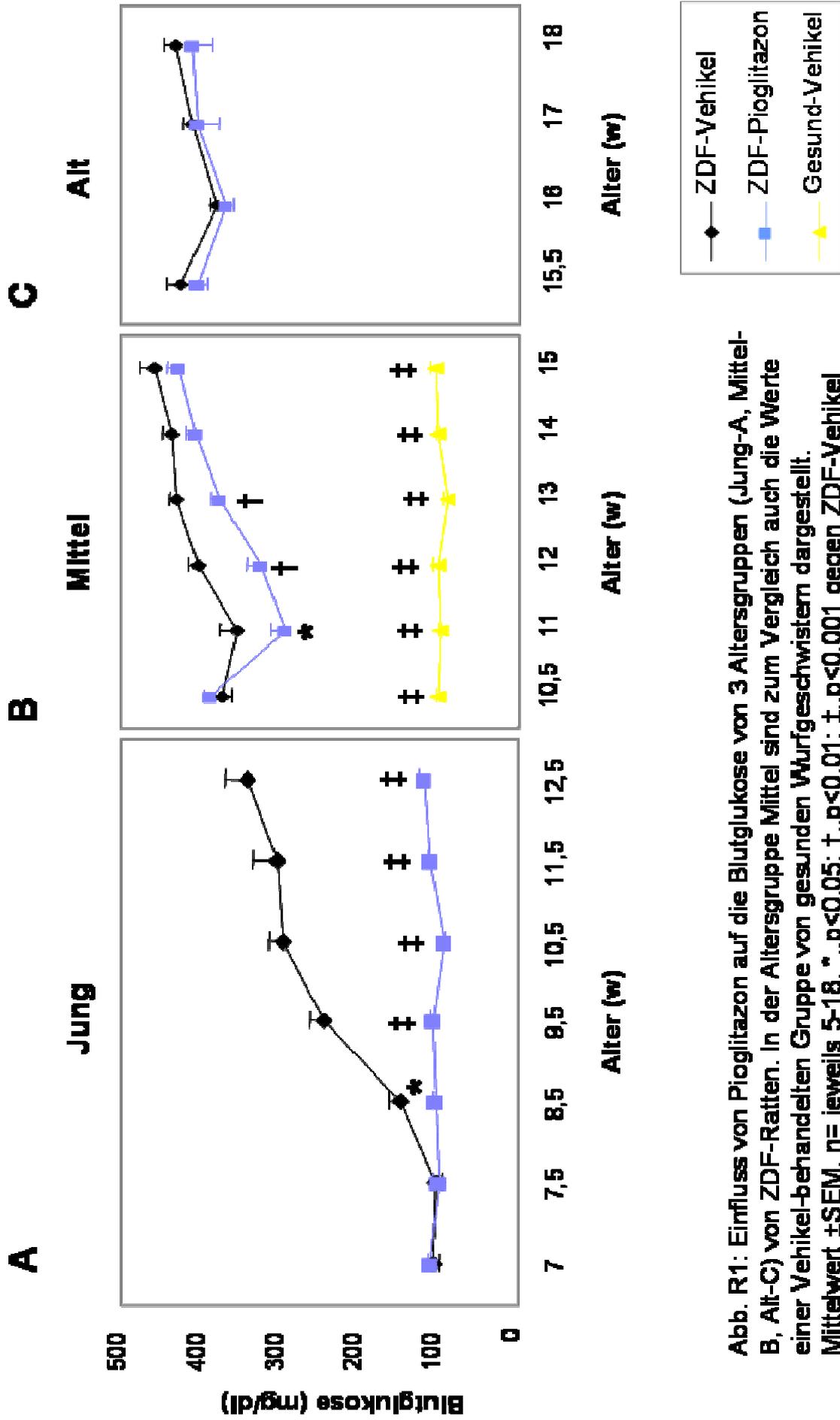


Abb. R1: Einfluss von Pioglitazon auf die Blutglukose von 3 Altersgruppen (Jung-A, Mittel-B, Alt-C) von ZDF-Ratten. In der Altersgruppe Mittel sind zum Vergleich auch die Werte einer Vehikel-behandelten Gruppe von gesunden Wurfgeschwistem dargestellt. Mittelwert \pm SEM, n= jeweils 5-18, * ..p<0.05; †..p<0.01; ‡..p<0.001 gegen ZDF-Vehikel

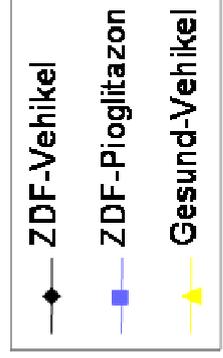
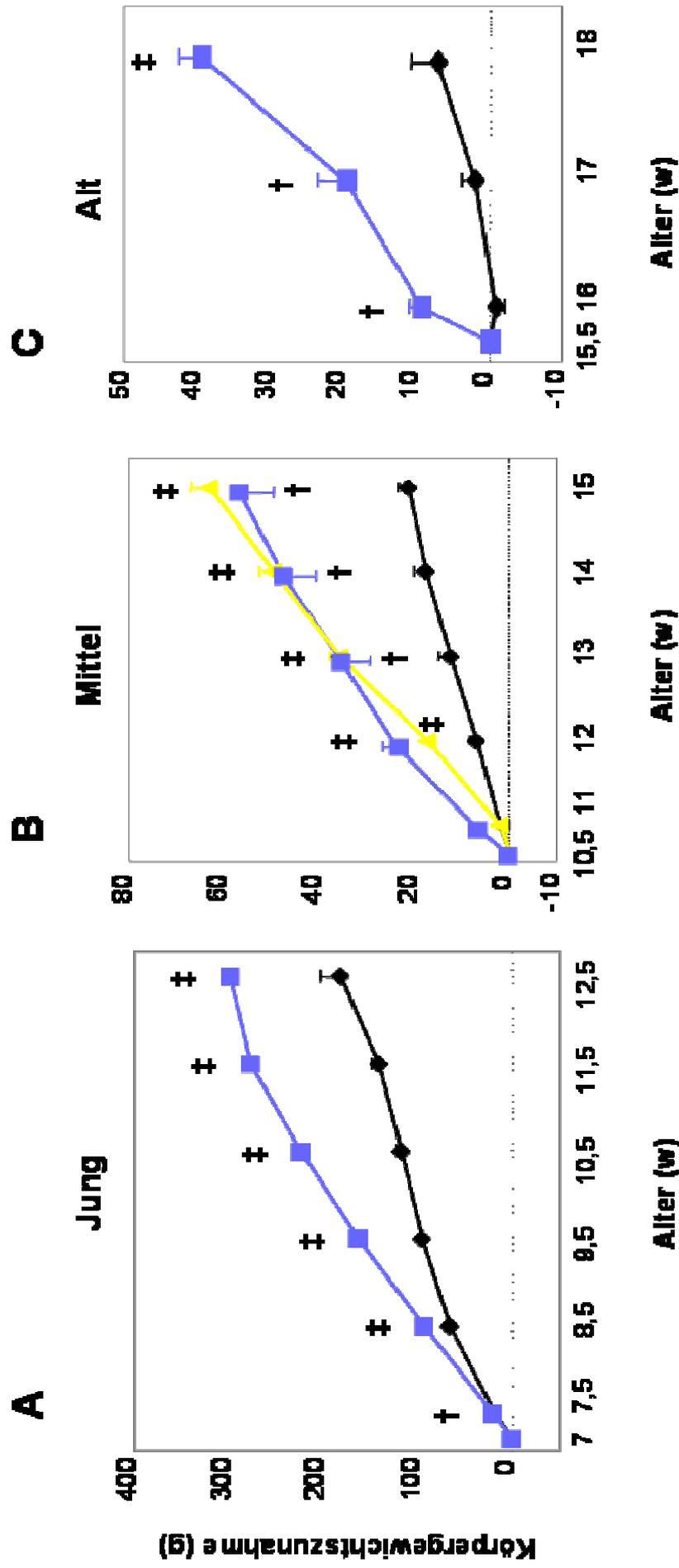


Abb. R2: Einfluss von Pioglitazon auf die Körpergewichtszunahme von 3 Altersgruppen (Jung-A, Mittel-B, Alt-C) von ZDF-Ratten. In der Altersgruppe Mittel sind zum Vergleich auch die Werte einer Vehikel-behandelten Gruppe von gesunden Wurfgeschwistern dargestellt.
 Mittelwert \pm SEM, n= jeweils 5-18, *, .p<0.05; †.p<0.01; ‡.p<0.001 gegen ZDF-Vehikel

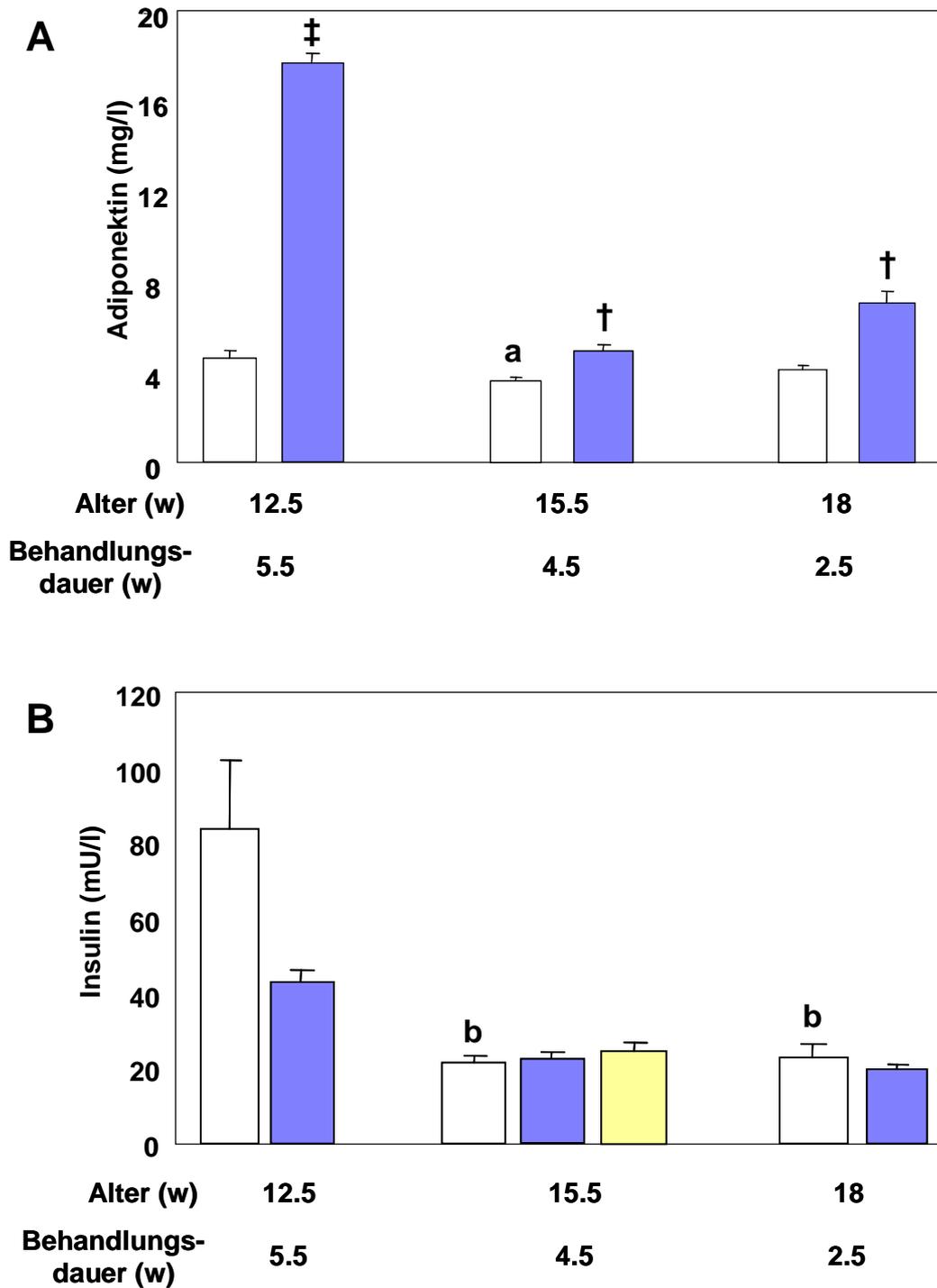


Abb. R3: Einfluss von Pioglitazon auf die Plasmaparameter Adiponektin (A), Insulin (B), Triglyzeride (C), Cholesterin (D) und freie Fettsäuren (E) sowie auf epididymales Fettlappengewicht (F), Muskel- (G) und Leberglykogen (H) und die Futtermittelaufnahme (I) von 3 Altersgruppen von ZDF-Ratten. In der 15.5 Wochen alten Gruppe sind zum Vergleich auch die Werte einer Vehikel-behandelten Gruppe von gesunden Wurfgeschwistern dargestellt.

Mittelwert \pm SEM, n= jeweils 5-18, *.p<0.05; †.p<0.01; ‡.p<0.001 gegen ZDF-Vehikel, a...p<0.05, b...p<0.005; c...p<0.001 gegen 12.5 Wochen alte, Vehikel-behandelte ZDF-Ratten

Abbildung auf nächster Seite fortgesetzt.



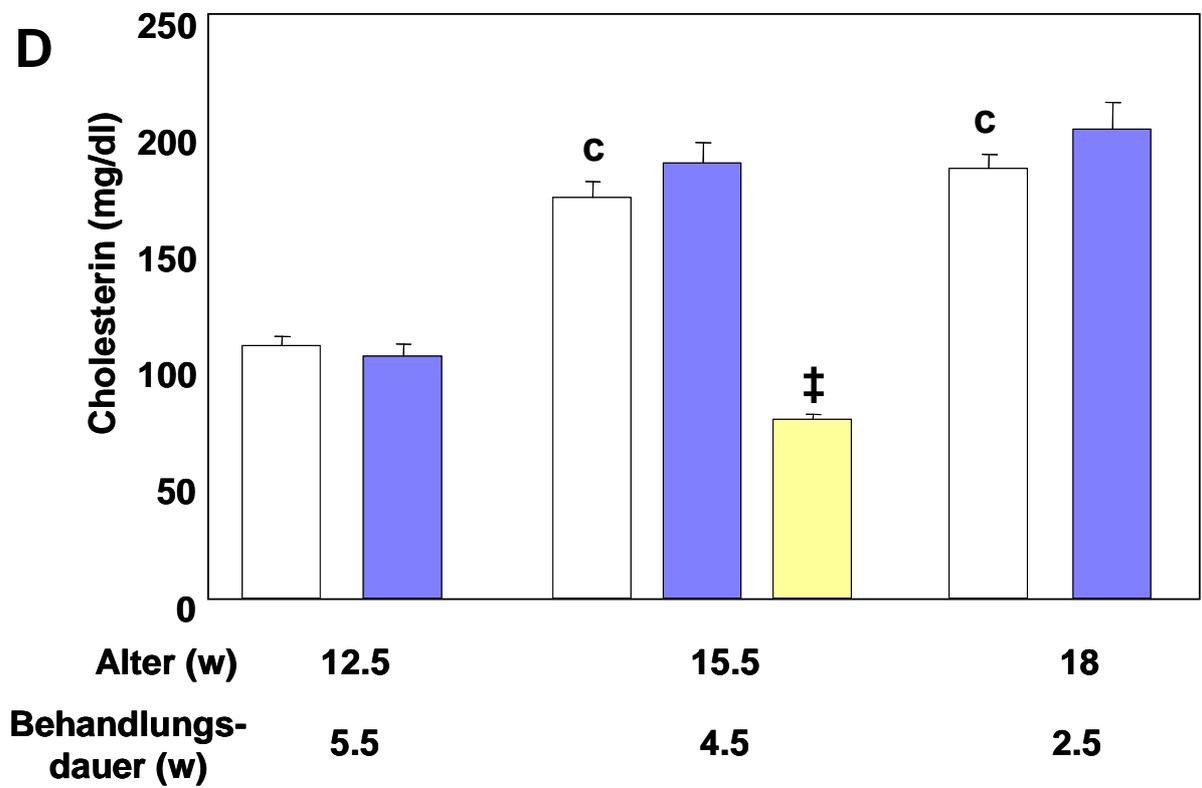
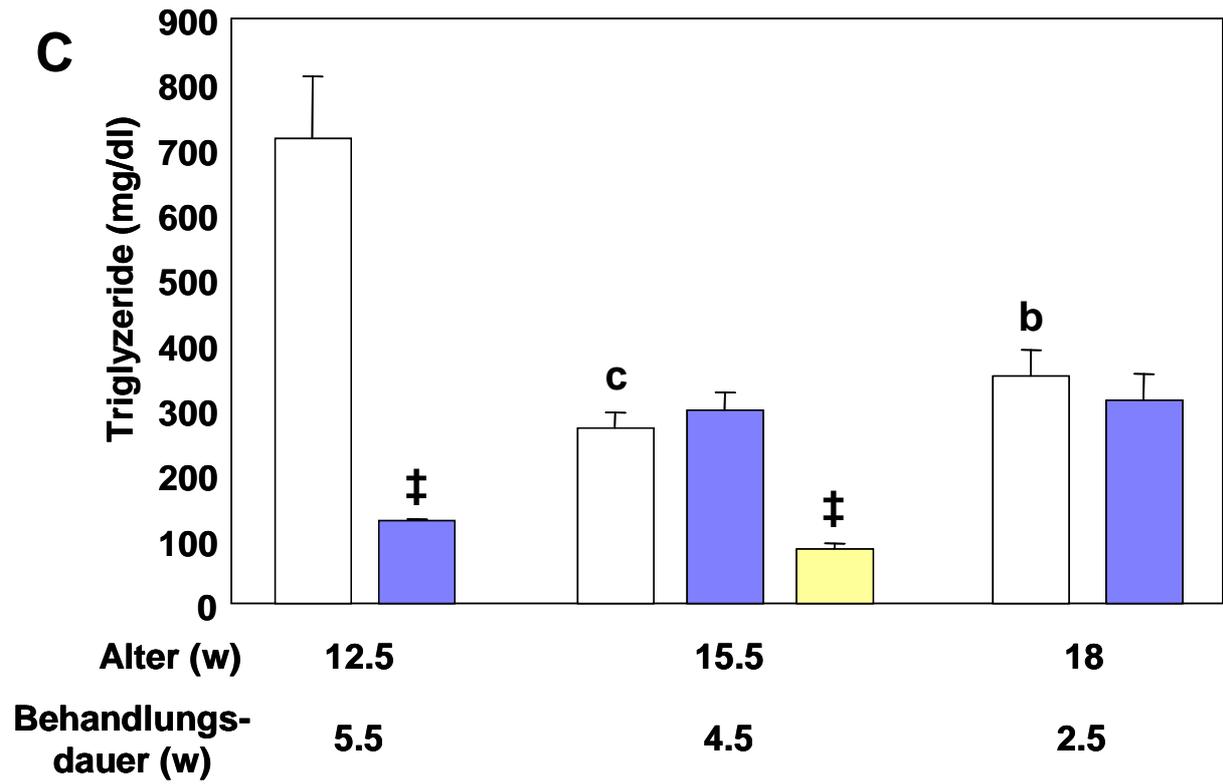


Abb. R3: Legende siehe vorangehende Seite

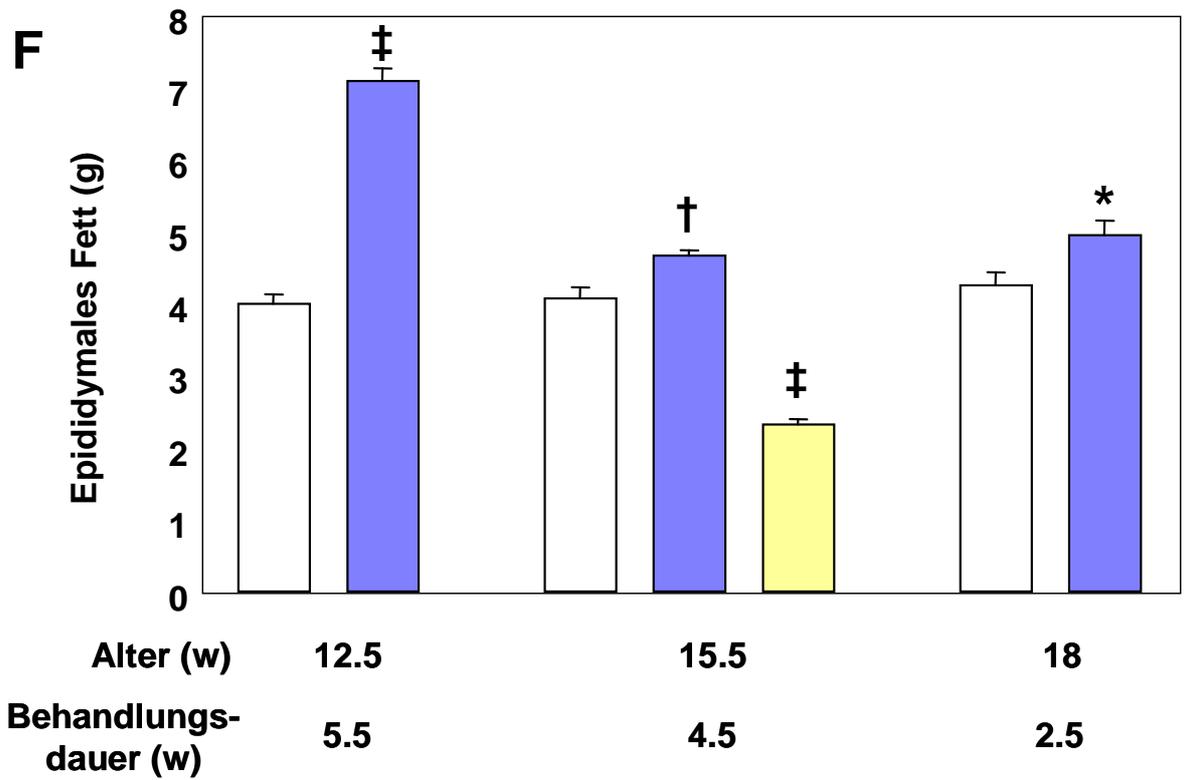
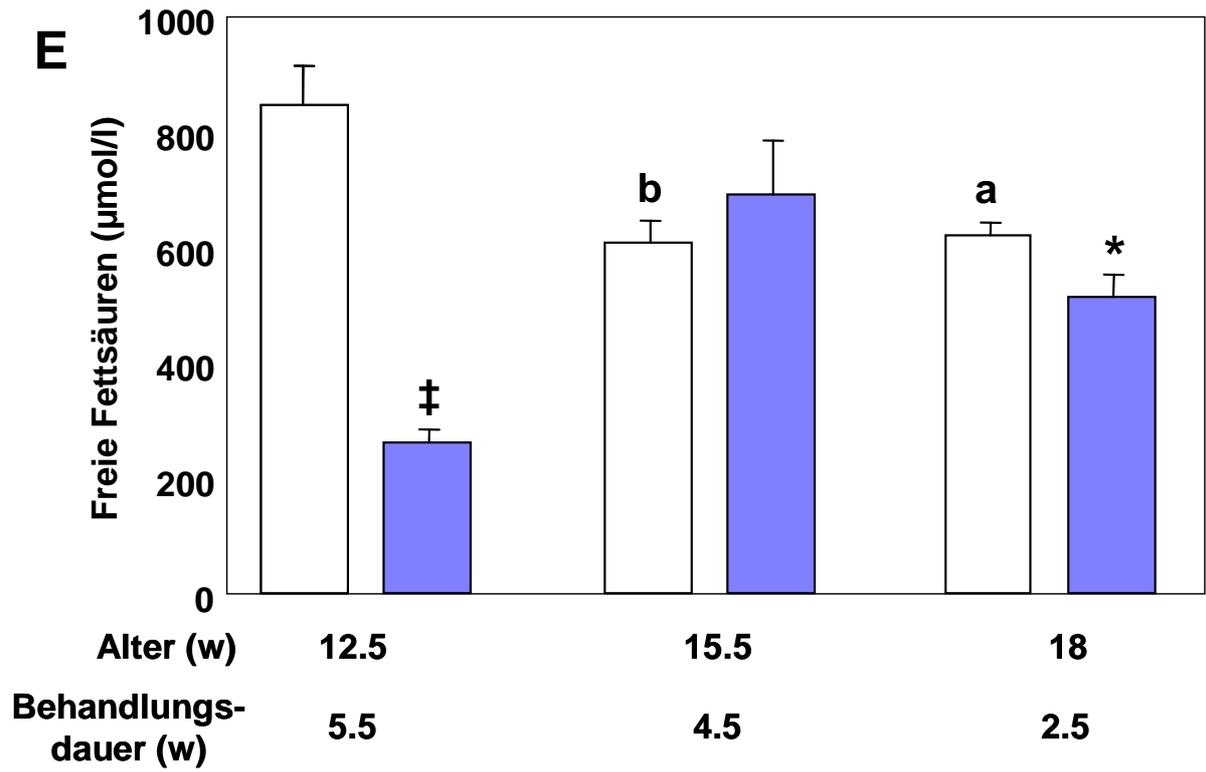


Abb. R3: Legende siehe Seite 63

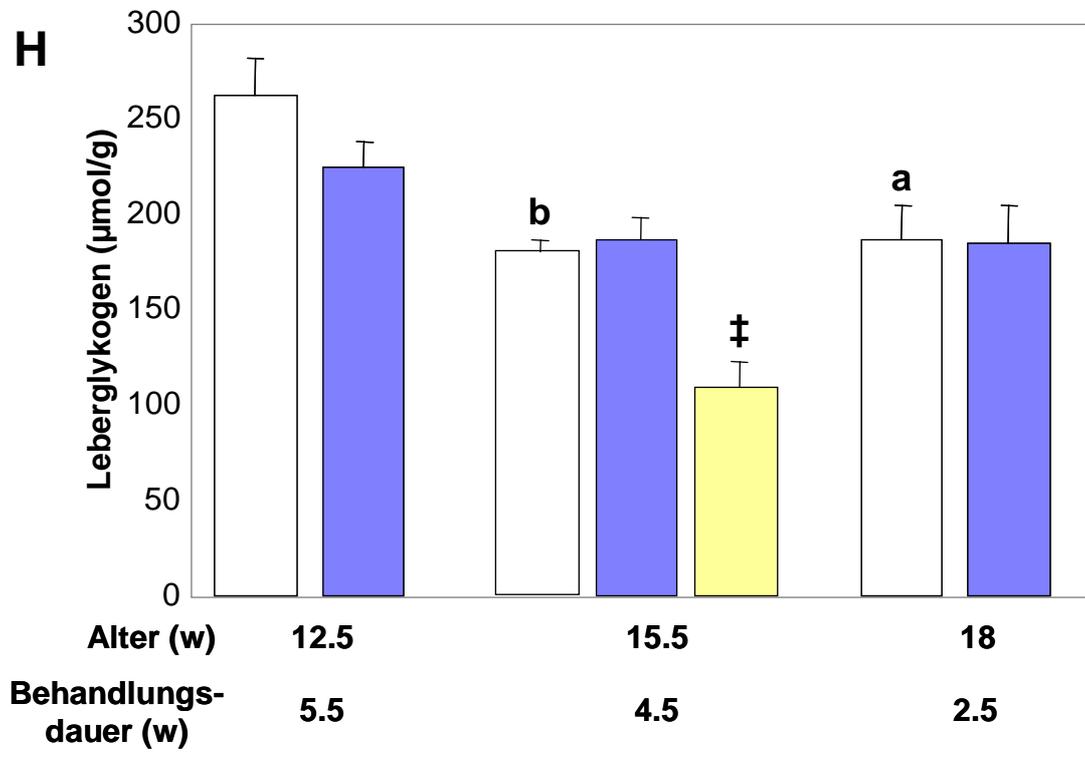
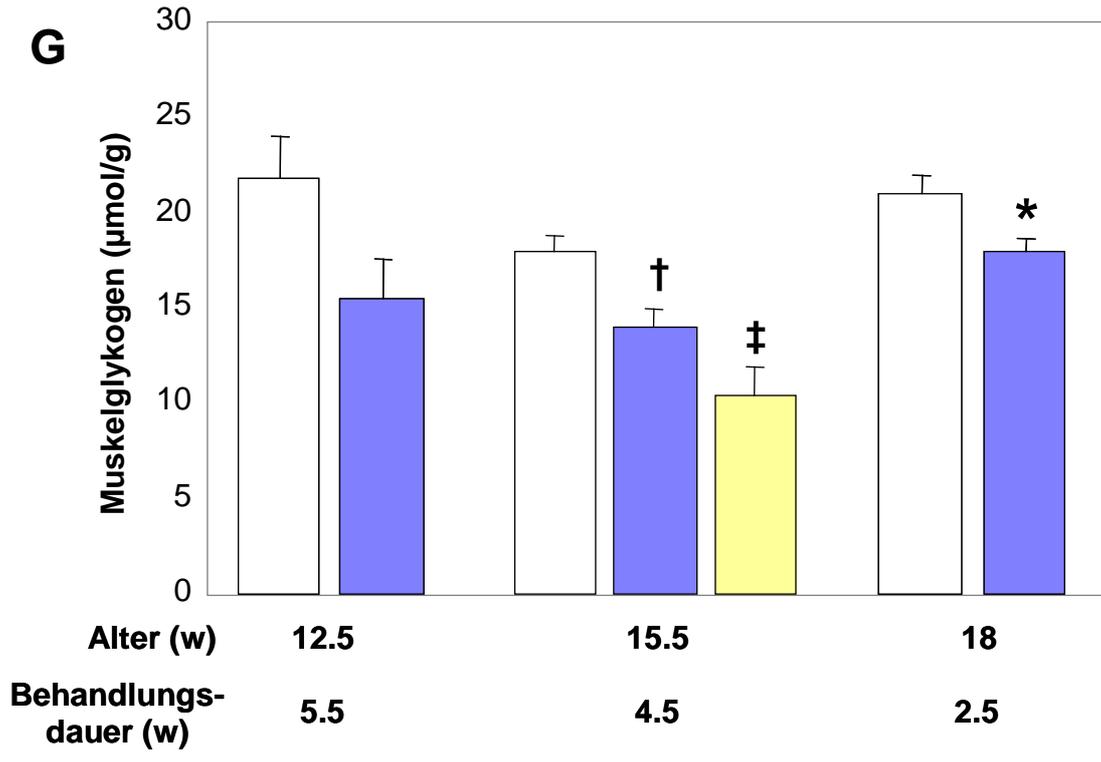


Abb. R3: Legende siehe Seite 63

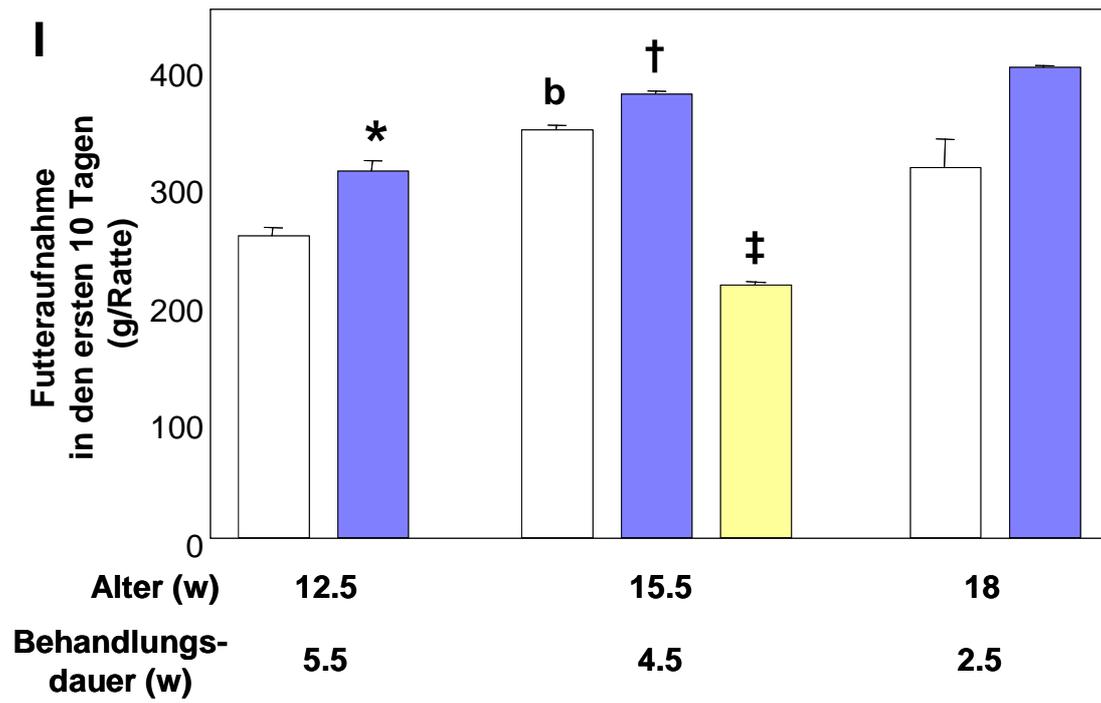


Abb. R3: Legende siehe Seite 63

3.1.2 Korrelationen verschiedener Parameter bei ZDF-Ratten im Alter von 12.5 Wochen

Das ZDF-Syndrom entwickelt sich in der Altersphase 7-10 Wochen besonders dynamisch. Daher widerspiegeln Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren in dieser Altersphase unterschiedliche Stadien der fortschreitenden Krankheitsentwicklung. Zum ausgewählten Zeitpunkt (12.5 Wochen) sind daher noch zwischen den Individuen Unterschiede zu sehen, was mit fortschreitendem Alter, wenn sich die Stoffwechselsituation auf einem anderen Niveau stabilisiert, zunehmend verschwindet.

Die Gegenüberstellung der Glukose mit dem **Körpergewicht** ergab eine signifikante, negative Korrelation bei ZDF-Ratten im Alter von 12.5 Wochen. (Abb. R4-A, $r=-0.88$, $p<0.001$). Ebenso war die Korrelation zwischen Glukose und **epididymalem Fett** signifikant (Abb. R4-B, $r=-0.90$, $p<0.001$). Auch eine negative Assoziation zwischen **Plasmaadiponektin** und Glukose war bei 12.5 Wochen alten ZDF-Ratten signifikant (Abb. R4-C, $r=-0.81$, $p<0.01$, siehe Seite 69). Weiters war das Plasmaadiponektin niedriger bei Individuen mit weniger Körpergewicht (Abb R4-G, $r=0.74$, $p<0.05$) und epididymalem Fett (R4-H, $r=0.69$, $p<0.05$, siehe Seite 71). Eine höhere individuelle Blutglukosekonzentration war allerdings mit niedrigeren **Triglyzeriden** (Abb. R1-D, $r=-0.86$, $p<0.01$), **freien Fettsäuren** (Abb. R4-E, $r=-0.69$, $p<0.05$) und **Insulin** im Plasma assoziiert (Abb. R4-F, $r=-0.98$, $p<0.001$, siehe Seite 70).

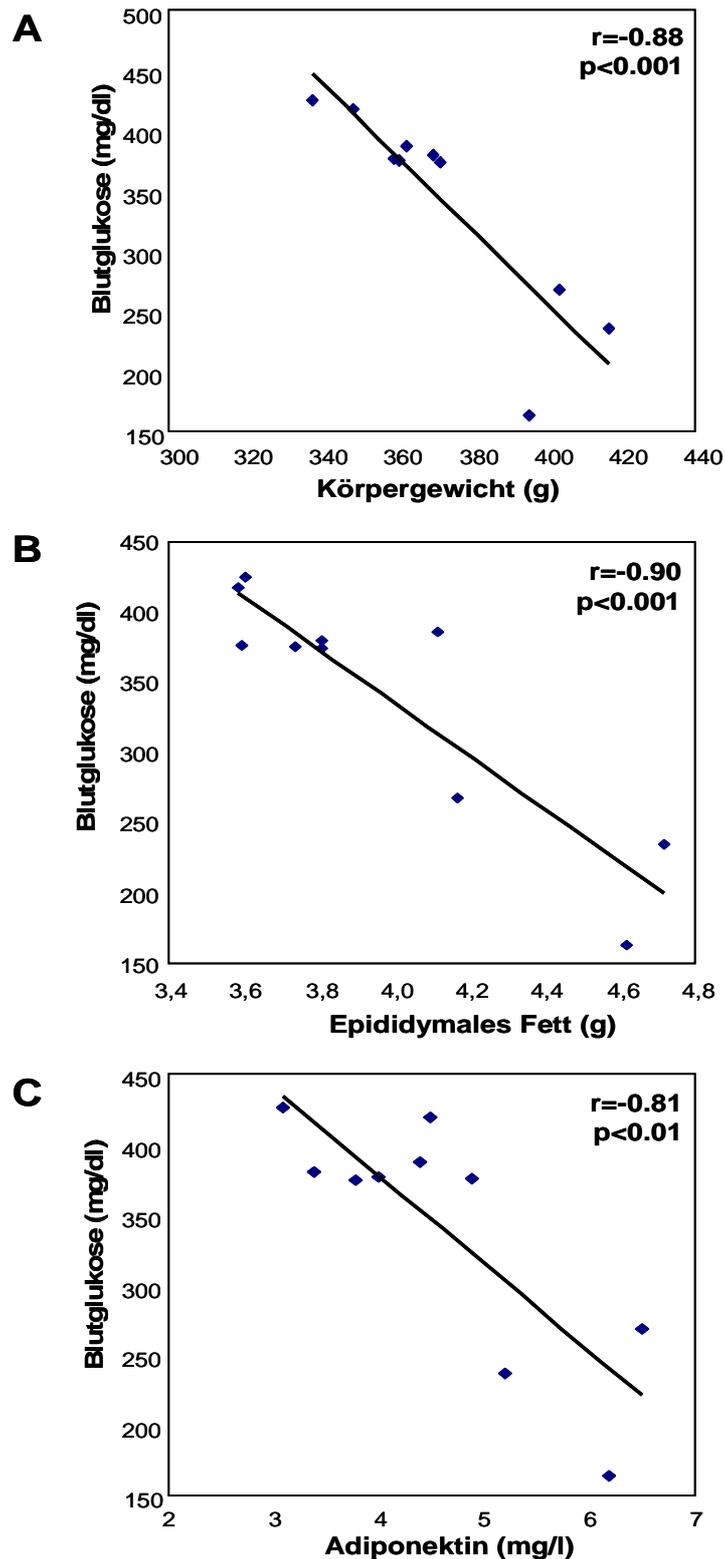


Abb. R4: Intraindividuelle Assoziationen der Blutglukosekonzentration mit Körpergewicht (A), Gewicht des epididymalen Fettablappens (B) und den Plasmakonzentrationen von Adiponektin (C), Triglyzeriden (D), freien Fettsäuren (E) und Insulin (F), sowie die des Plasmaadiponektins mit Körpergewicht (G) und Gewicht des epididymalen Fettablappens (H) bei Vehikel behandelten 12,5 Wochen alten ZDF-Ratten.

n=10

Abbildung auf nächster Seite fortgesetzt.

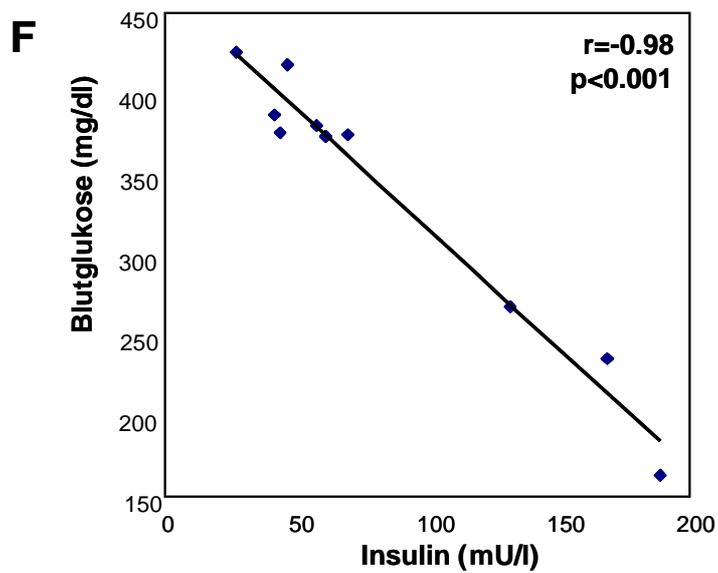
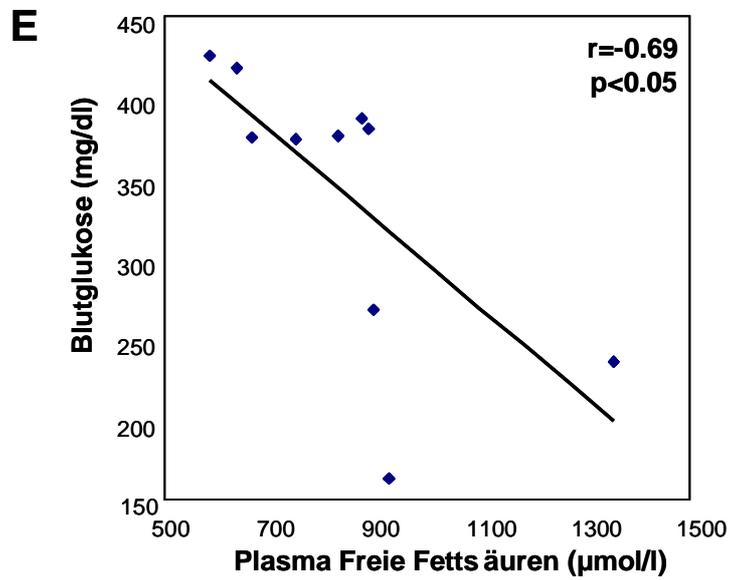
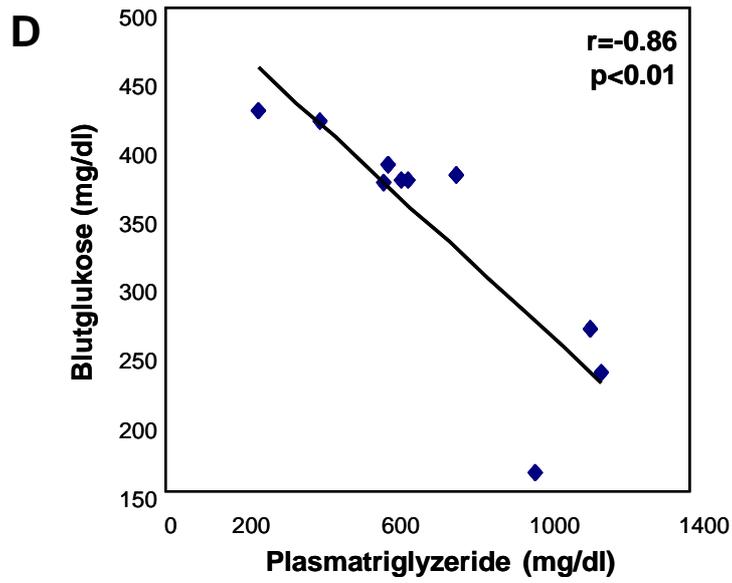


Abb. R4: Legende siehe vorangehende Seite

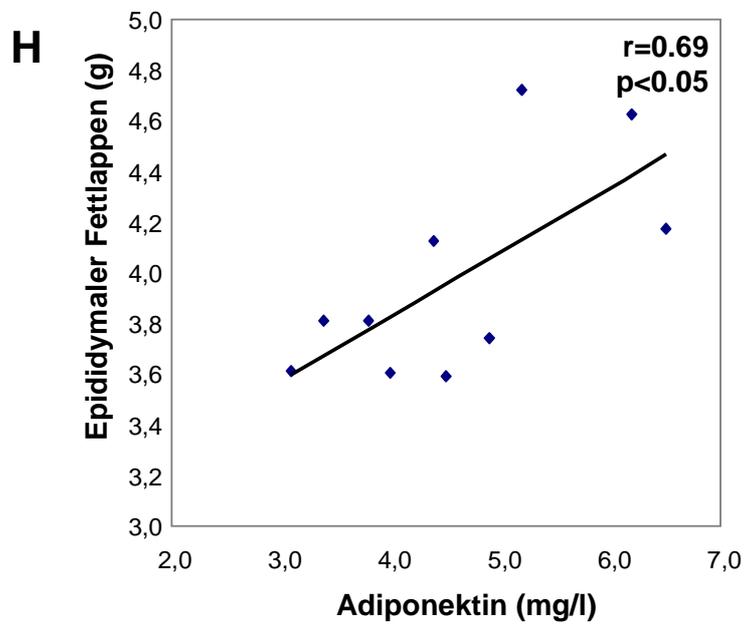
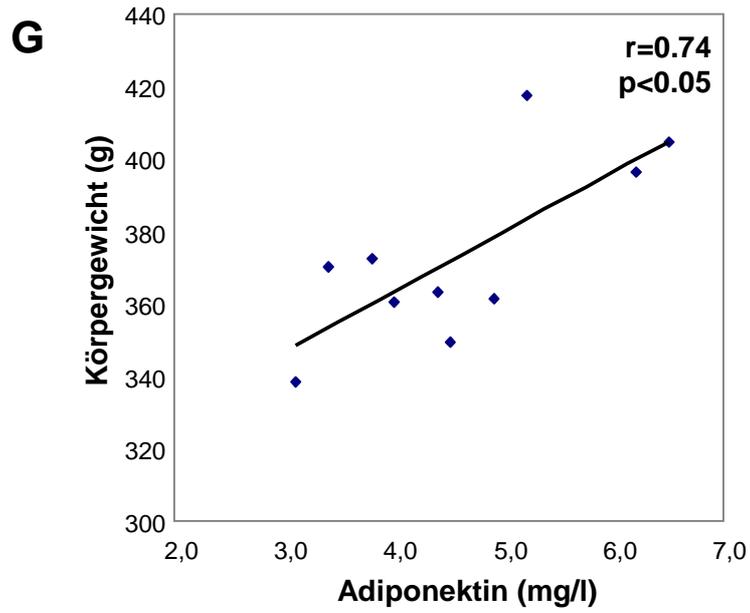


Abb. R4: Legende siehe Seite 69

3.1.3 Einfluss einer Intervention mit Pioglitazon

Blutglukose: Bei Pioglitazonbehandlung ab der 7. Lebenswoche war bereits ab dem 10. Behandlungstag eine signifikant niedrigere Blutglukose festzustellen (ZDF-Jung-Veh: 146.6 ± 15.2 mg/dl, ZDF-Jung-Pio: 102.9 ± 3.4 mg/dl, $p < 0.05$). Auch bis zum 31. Behandlungstag blieb die Blutglukose der Pioglitazon-behandelten Tiere praktisch unverändert, während sich bei den Vehikel-behandelten eine starke Hyperglykämie entwickelte (ZDF-Jung-Veh: 304.5 ± 28.6 mg/dl, ZDF-Jung-Pio: 110.7 ± 3.7 mg/dl, $p < 0.001$, siehe Abb. R1-A, Seite 61).

Wurde die Behandlung erst ab der 10.5. Woche begonnen, so war die antihyperglykämische Wirkung zwar bereits ab dem 3. Behandlungstag nachzuweisen (ZDF-Mittel-Pio: 292.9 ± 17.7 mg/dl, ZDF-Mittel-Veh: 355.0 ± 21.1 mg/dl, $p < 0.05$), verlor sich aber nach 24 Behandlungstagen wieder (ZDF-Mittel-Pio: 405.0 ± 14.2 mg/dl, ZDF-Mittel-Veh: 436.1 ± 12.7 mg/dl, nicht signifikant, siehe Abb. R1-B). Die Wirkung war somit nur vorübergehend.

Bei Tieren, die ab der 15.5. Woche behandelt wurden, zeigte Pioglitazon im Verlauf der Behandlung keine signifikante Wirkung auf die Blutglukosekonzentration (nach 18 Tagen Behandlung ZDF-Alt-Pio: 407.9 ± 22.6 mg/dl, ZDF-Alt-Veh: 430.1 ± 14.0 mg/dl, nicht signifikant, siehe Abb. R1-C)

Körpergewichtszunahme: Das Körpergewicht der jüngsten Gruppe stieg während der Pioglitazonbehandlung deutlich stärker als bei den Vehikel-behandelten Kontrolltieren an, sodass ab dem 3. Behandlungstag ein signifikanter Unterschied erkennbar war (ZDF-Jung-Pio: $+20.4 \pm 0.8$ g, ZDF-Jung-Veh: $+17.1 \pm 0.6$ g, $p < 0.01$). Am letzten Behandlungstag hatten die Pioglitazon-behandelten Tiere mit knapp 500 g im Durchschnitt über 100 g mehr Körpergewicht als die Vehikel-behandelten Kontrolltiere (Zunahme über 5.5 Wochen: ZDF-Jung-Pio: $+298.2 \pm 5.3$ g, ZDF-Jung-Veh: $+180.8 \pm 21.4$ g, $p < 0.001$, siehe Abb. R2-A, Seite 62).

Auch wenn die Behandlung mit Pioglitazon erst ab der 10.5. Woche begonnen wurde, war ein erhöhter Anstieg des Körpergewichtes zu verzeichnen, was am 10. Tag gegenüber Vehikel-behandelten Kontrolltieren signifikant war. Gesunde Vehikel-behandelte Tiere hatten nach 10 Behandlungstagen ebenfalls eine signifikant höhere Körpergewichtszunahme als ihre Vehikel-behandelten ZDF-Wurfgeschwister (Tag

10: ZDF-Mittel-Veh: $+6.8 \pm 1.5$ g, ZDF-Mittel-Pio: $+23.9 \pm 3.4$ g, $p < 0.05$, Gesund-Mittel-Veh: $+17.0 \pm 1.9$ g, $p < 0.001$, siehe Abb. R2-B). Jedoch waren die gesunden Tiere zu Beginn der Behandlung im Alter von 10.5. Wochen mit im Mittel 324 g deutlich leichter als die altersgleichen ZDF-Tiere mit 342 g Körpergewicht. Die signifikanten Unterschiede in der Körpergewichtszunahme blieben in beiden Gruppen bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes in der 15. Lebenswoche erhalten.

ZDF-Ratten mit 15.5 Wochen hatten im Schnitt über 350 g. Bereits nach 3 Tagen war die Körpergewichtszunahme der Pioglitazon-behandelten Tiere signifikant höher als der Vehikel-behandelten Kontrolltiere (Tag 3: ZDF-Alt-Pio: $+9.3 \pm 1.8$ g, ZDF-Alt-Veh: -0.8 ± 1.3 g, $p < 0.005$, siehe Abb. R2-C).

Adiponektin: Unter Pioglitazoneinfluss war die Adiponektinkonzentration im Plasma bei allen 3 Altersgruppen signifikant erhöht. Dieser Effekt war allerdings bei früher Intervention viel deutlicher als bei ZDF-Ratten, die erst in höherem Alter mit Pioglitazon behandelt wurden. Bei der Gruppe ZDF-Jung, wo auch die Pioglitazonwirkung auf die Blutglukose am stärksten war, war die Adiponektinkonzentration annähernd 4 mal höher als bei den gleichaltrigen Kontrolltieren (ZDF-Jung-Pio: 17.8 ± 0.4 mg/l, ZDF-Jung-Veh: 4.6 ± 0.4 mg/l, $p < 0.001$; ZDF-Mittel-Pio: 5.0 ± 0.3 mg/l, ZDF-Mittel-Veh: 3.6 ± 0.3 mg/l, $p < 0.01$; ZDF-Alt-Pio: 7.1 ± 0.6 mg/l, ZDF-Alt-Veh: 4.1 ± 0.2 mg/l, $p < 0.01$, siehe Abb. R3-A, Seite 63).

Insulin: Bei der Messung der Plasmainsulinwerte konnte kein Unterschied zwischen den Vehikel- und Pioglitazon-behandelten ZDF-Tieren festgestellt werden. Allerdings war in ZDF-Jung ein deutlicher Trend zu Pioglitazon-bedingtem Absinken der Insulinämie zu erkennen () (ZDF-Jung-Pio: 42.9 ± 3.4 mU/l, ZDF-Jung-Veh: 83.8 ± 18.2 mU/l, $p = 0.053$, nicht signifikant, siehe Abb. R3-B). Im Alter zwischen 12.5 und 15.5 Wochen fiel die Insulinämie von Vehikel-behandelten ZDF-Ratten allerdings stark ab (um etwa 75%) und war dann ähnlich jener von gleichaltrigen gesunden Tieren (ZDF-Mittel-Pio: 22.4 ± 1.8 mU/l, ZDF-Mittel-Veh: 21.7 ± 1.8 mU/l, Gesund-Mittel-Veh: 24.5 ± 1.6 mU/l, nicht signifikant, siehe Abb. R3-B, Seite 63).

Triglyzeride: Die Triglyzeride im Plasma waren bei ZDF-Jung unter Pioglitazoneinfluss signifikant niedriger als bei den entsprechenden Vehikel-behandelten Kontrolltieren (ZDF-Jung-Pio: 125.5 ± 5.1 mg/dl, ZDF-Jung-Veh:

715.0±94.4 mg/dl, $p < 0.001$). Bei den Gruppen ZDF-Mittel und ZDF-Alt waren keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Pioglitazon-behandelten Ratten und den entsprechenden Kontrolltieren (siehe Abb. R3-C, Seite 64).

Cholesterin: In keinen der 3 Altersgruppen konnte eine Wirkung von Pioglitazon auf die Cholesterinwerte nachgewiesen werden.

Freie Fettsäuren: Bei ZDF-Jung war die Konzentration der freien Fettsäuren unter Pioglitazoneinfluss niedriger (ZDF-Jung-Pio: 263±23 µmol/l, ZDF-Jung-Veh: 845±69 µmol/l, $p < 0.001$). Bei den 15.5 Wochen alten Tieren ging dieser Effekt verloren (ZDF-Mittel-Pio: 689±95 µmol/l, ZDF-Mittel-Veh: 605±41 µmol/l, nicht signifikant). In der 18. Lebenswoche war erneut eine Senkung bei den Pioglitazon-behandelten Tieren zu verzeichnen, der Effekt war aber um ein Vielfaches geringer als bei ZDF-Jung (ZDF-Alt-Pio: 514±37 µmol/l, ZDF-Alt-Veh: 620±23 µmol/l, $p < 0.05$, siehe Abb. R3-E, Seite 65).

Epididymales Fett: Unter Pioglitazoneinfluss stieg das Gewicht des epididymalen Fettpolsters. Dabei war der Unterschied zu den Vehikel-behandelten Kontrolltieren in allen Altersgruppen signifikant, das Ausmaß des Effektes nahm aber mit steigendem Alter ab (ZDF-Jung-Pio: 7.07±0.18 g, ZDF-Jung-Veh: 3.98±0.13 g, $p < 0.001$; ZDF-Mittel-Pio: 4.67±0.07 g, ZDF-Mittel-Veh: 4.06±0.16 g, $p < 0.01$; ZDF-Alt-Pio: 4.94±0.21 g, ZDF-Alt-Veh: 4.23±0.18 g, $p < 0.05$, siehe Abb. R3-F, Seite 65).

Muskelglykogen: Nach einer Behandlung mit Pioglitazon war bei der Gruppe ZDF-Jung ein Trend zu geringerer Muskelglykogenkonzentration vorhanden, der jedoch nicht signifikant war (ZDF-Jung-Pio: 15.6±2.1 µmol/g, ZDF-Jung-Veh: 21.9±2.2 µmol/g, $p = 0.054$, nicht signifikant). Bei den Altersgruppen Mittel und Alt war die Pioglitazon-induzierte Verringerung des Glykogengehalts im Muskel signifikant (ZDF-Mittel-Pio: 14.1±0.9 µmol/g, ZDF-Mittel-Veh: 18.0±0.9 µmol/g, $p < 0.01$; ZDF-Alt-Pio: 18.0±0.7 µmol/g, ZDF-Alt-Veh: 21.0±1.0 µmol/g, $p < 0.05$, siehe Abb. R3-G). Auffallend war allerdings, dass der Muskelglykogengehalt der hyperglykämischen ZDF-Tiere um etwa 70% höher war als jenes der gleichaltrigen, gesunden Ratten (ZDF-Mittel-Veh: 18.0±0.9 µmol/g, Gesund-Mittel-Vehikel: 10.5±1.4 µmol/g, $p < 0.001$, siehe Abb. R3-G, Seite 66).

Leberglykogen: Pioglitazon hatte bei keiner Altersgruppe Einfluss auf den Glykogengehalt in der Leber. Allerdings war zwischen gesunden und ZDF-Ratten ein ähnlicher etwa 65%iger Unterschied zu erkennen wie beim Muskelglykogen (ZDF-Mittel-Veh: 180.7 ± 6.4 $\mu\text{mol/g}$, Gesund-Mittel-Veh: 109.4 ± 13.8 $\mu\text{mol/g}$, $p < 0.001$, siehe Abb. R3-H, Seite 66).

Futteraufnahme: Die Beobachtung der Futteraufnahme in den ersten 10 Tagen der Behandlung ergab, dass Pioglitazon-behandelte Tiere in den Altersgruppen ZDF-Jung und ZDF-Mittel einen größeren Appetit hatten als gleichaltrige Kontrolltiere (ZDF-Jung-Pio: 311 ± 9 g/Ratte/10 Tage, ZDF-Jung-Veh: 256 ± 8 g/Ratte/10 Tage, $p < 0.05$, ZDF-Mittel-Pio: 376 ± 3 g/Ratte/10 Tage, ZDF-Mittel-Veh: 346 ± 4 g/Ratte/10 Tage, $p < 0.01$, siehe Abb. R3-I, Seite 67).

Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Amino-Transferase (ASAT): Für ALAT und ASAT waren bei den Gruppen Jung und Mittel zwischen den Pioglitazon-behandelten ZDF-Ratten und den Vehikel-behandelten ZDF-Ratten keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Jedoch waren die Mittelwerte der Gruppen bei ALAT zwischen 102 und 144 U/l immer über den für gesunde Ratten beschriebenen Normalwert, der zwischen 50 und 70 U/l liegen sollte [144]. ALAT- und ASAT-Werte der gesunden Tiere der Gruppe Mittel lagen signifikant unter den Werten von ZDF-Mittel (ALAT: ZDF-Mittel-Veh: 101.6 ± 9.3 U/l, Gesund-Mittel-Veh: 65.5 ± 3.3 U/l; $p < 0.01$, ASAT: ZDF-Mittel-Veh: 80.1 ± 11.2 U/l, Gesund-Mittel-Veh: 37.0 ± 1.4 U/l, $p < 0.01$; siehe Abb. R5-A, Abb. R5-B, Seite 76).

Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN): Pioglitazon-behandelte Ratten der Altersgruppe Mittel hatten einen höheren Blut-Harnstoff-Stickstoffgehalt im Plasma als die dazugehörigen Vehikel-behandelten Tiere (ZDF-Mittel-Veh: 17.9 ± 0.5 mg/dl, ZDF-Mittel-Pio: 20.5 ± 0.7 mg/dl, $p < 0.05$; siehe Abb. R5-C, Seite 77). Die BUN-Werte waren bei allen Tieren durchwegs im Normalbereich zwischen 15 und 21 mg/dl [144].

Kreatinin: Der Kreatiningehalt im Plasma zeigte keinen signifikanten Unterschied unter dem Einfluss von Pioglitazon. Sie bewegten sich alle im Normbereich unter 0,8 mg/dl (siehe Abb. R5-D, Seite 77) [144].

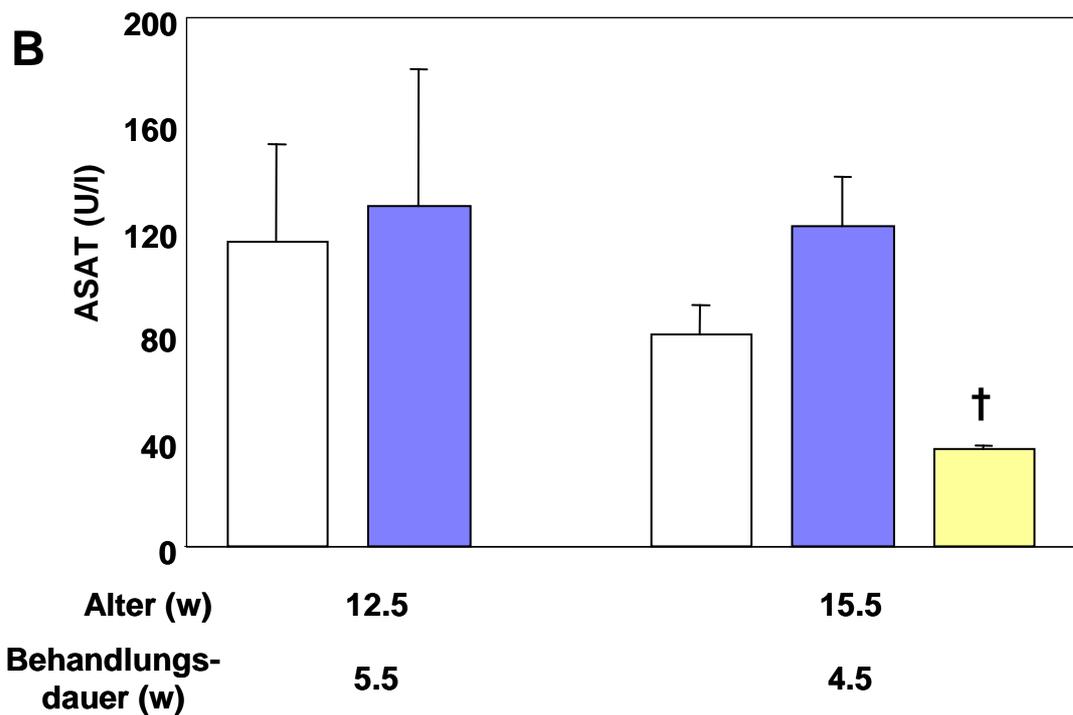
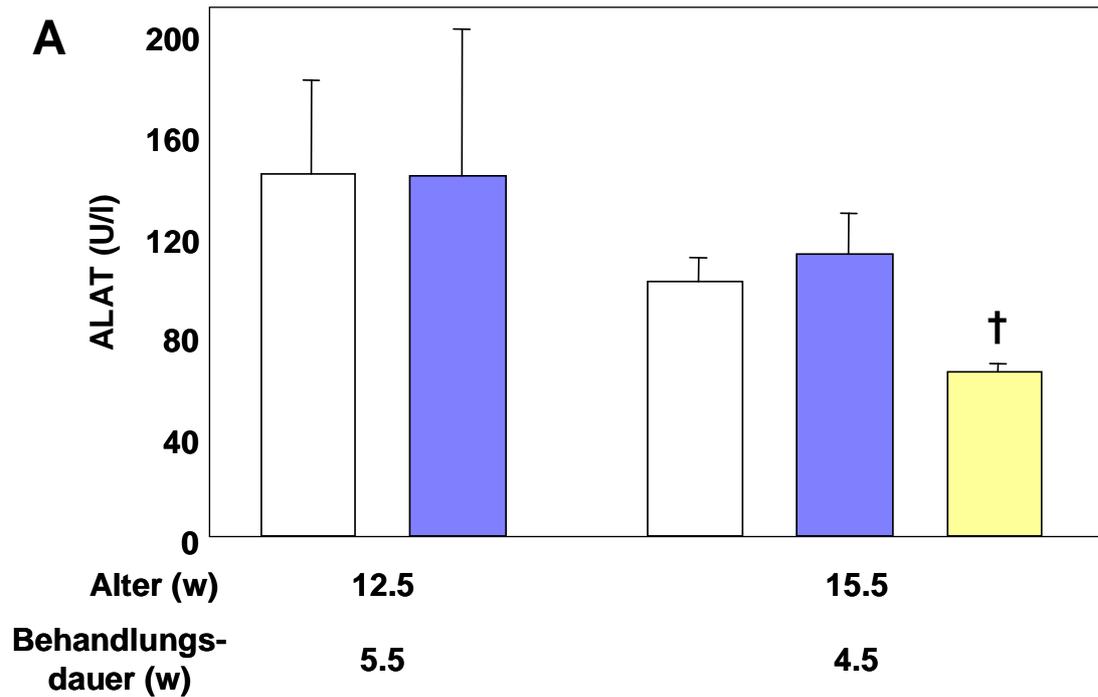


Abb. R5: Einfluss von Pioglitazon auf ALAT (A), ASAT (B), BUN (C) und Plasmakreatinin (D) bei 2 Altersgruppen von ZDF-Ratten. Mittelwert \pm SEM, n=5-8, *..p<0.05; †..p<0.01; ‡..p<0.001 gegen ZDF-Vehikel
Abbildung auf nächster Seite fortgesetzt.



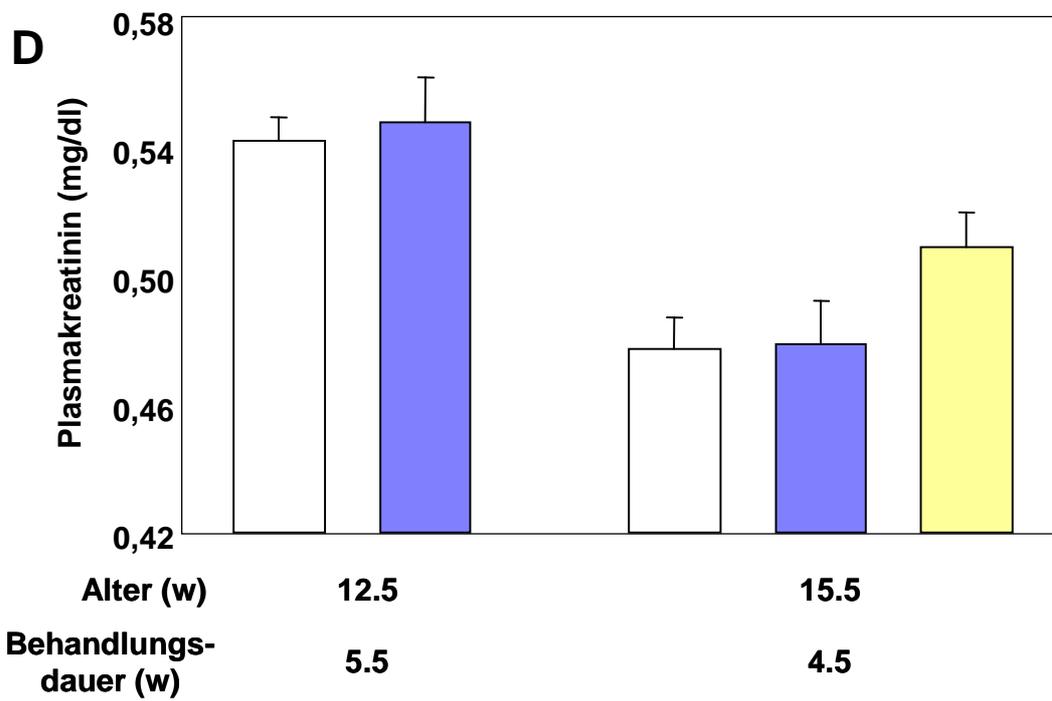
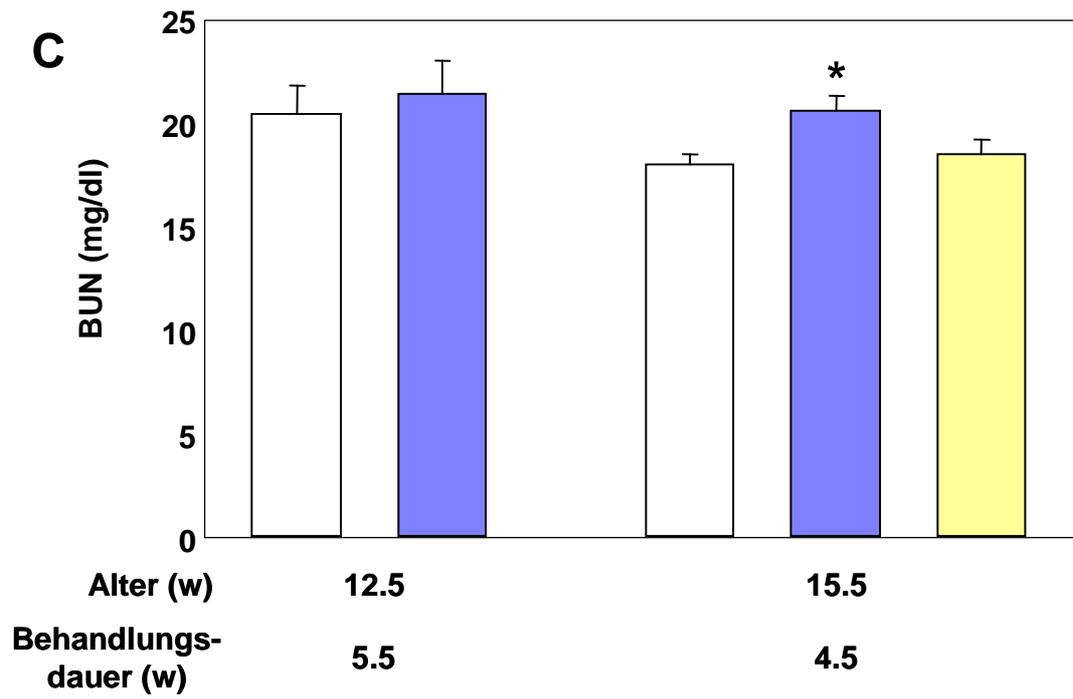


Abb. R5: Legende siehe vorangehende Seite

3.1.4 Der Einfluss einer Intervention mit Metformin

Eine Intervention mit Metformin wurde nur bei der mittleren Altersgruppe untersucht (Behandlungsbeginn im Alter von 10.5 Wochen).

Blutglukose: Auf die Hyperglykämie von ZDF-Ratten wirkte die Behandlung mit Metformin nicht verbessernd. Metformin-behandelte als auch Vehikel-behandelte ZDF-Tiere im Alter zwischen 10.5 und 15 Wochen hatten Blutglukosekonzentrationen im selben Bereich, die sich zum Ende des Behandlungszeitraumes etwas über 400 mg/dl stabilisierten (14. Woche: ZDF-Mittel-Met: 411.0 ± 3.6 mg/dl, ZDF-Mittel-Veh: 402.9 ± 15.1 mg/dl, nicht signifikant, siehe Abb. R6-A, Seite 79)

Körpergewichtszunahme: Auch bei der Beobachtung der Körpergewichtsentwicklung wurden keine signifikanten Unterschiede während einer Intervention mit Metformin festgestellt. Beide Gruppen hatten zu Beginn der Behandlung (10.5 Wochen) etwa 350 g und nahmen bis zur 14. Woche auf im Mittel 372 bzw. 377 g zu (ZDF-Mittel-Met: 27.3 ± 4.7 g, ZDF-Mittel-Veh: 22.0 ± 6.6 g, nicht signifikant, siehe Abb. R6-B, Seite 79).

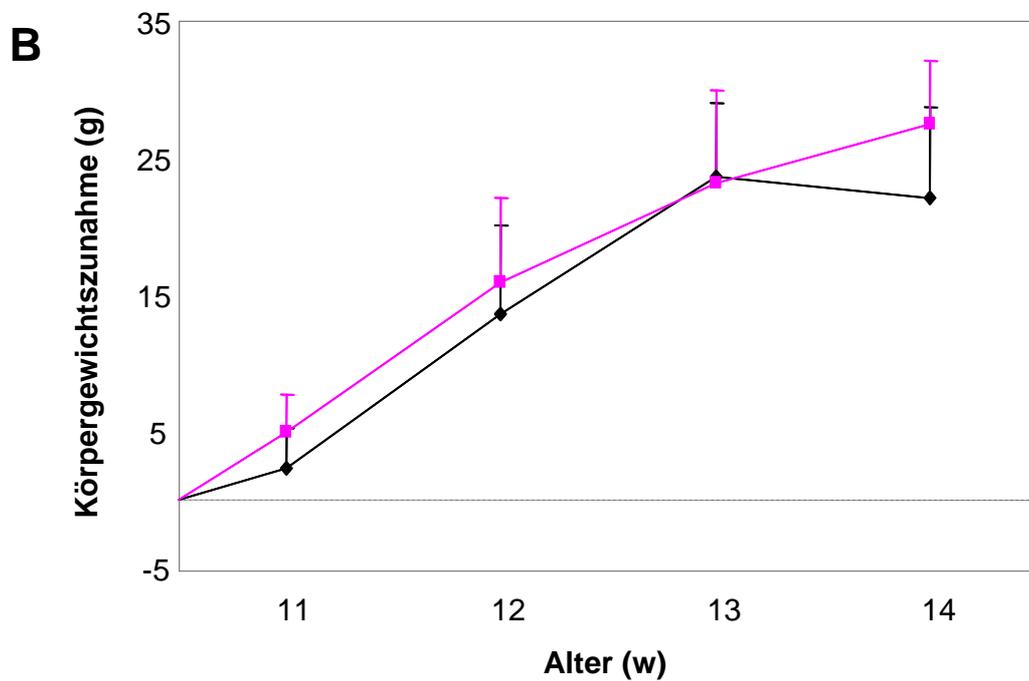
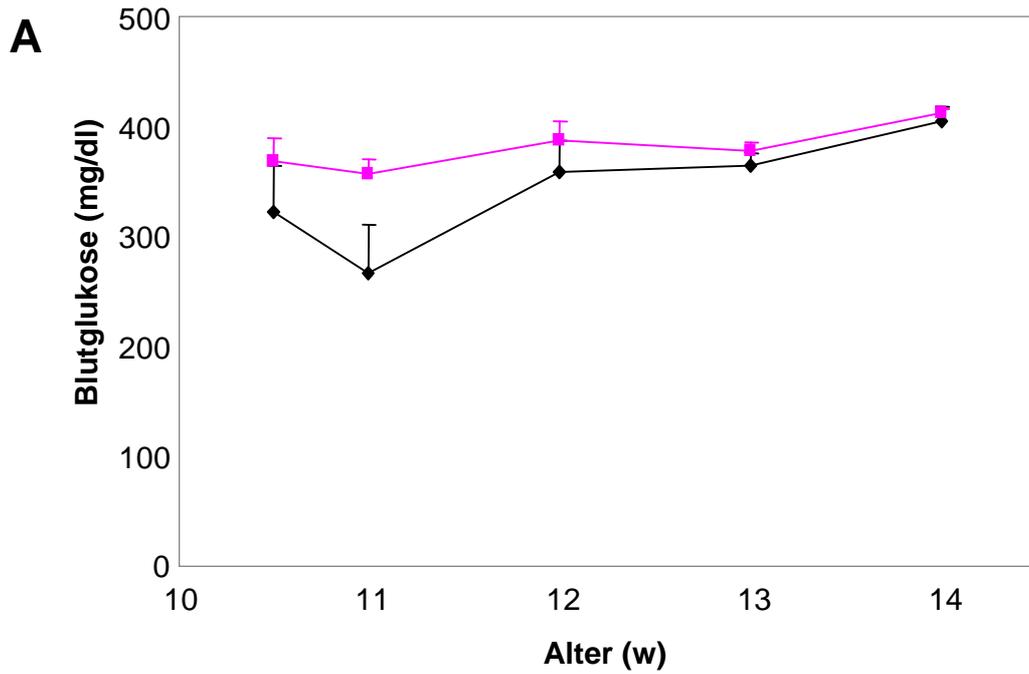


Abb. R6: Einfluss von Metformin auf die Blutglukosekonzentration (A) und die Körpergewichtszunahme (B) bei ZDF-Ratten im Alter zwischen 10.5 und 14 Wochen (ZDF-Mittel). Mittelwert \pm SEM, n= jeweils 4, keine signifikanten Unterschiede für Vehikel gegen Metformin



3.1.5 Western Blotting

Es wurde auch der Einfluss der verwendeten Medikamente auf Aktivität (=Phosphorylierung) der p70S6K und auf die Serinphosphorylierung des IRS-1 in Position 307 im Musculus extensor digitorum longus (EDL) bestimmt.

P70S6K: Eine deutliche Senkung der p70S6K-Aktivität unter Pioglitazoneinfluss konnte bei der jüngsten Altersgruppe nachgewiesen werden (ZDF-Jung-Veh: $31.7 \pm 2.7\%$, ZDF-Jung-Pio: $19.0 \pm 3.0\%$ phosphorylierter Anteil, $p < 0.05$, siehe Abb. R7-A, Seite 80). Bei den Altersgruppen Mittel und Alt, sowie bei den Metformin-behandelten Tieren konnte keine Veränderung der p70S6K-Aktivität nachgewiesen werden (ZDF-Mittel-Veh: $20.4 \pm 6.0\%$, ZDF-Mittel-Met: $27.1 \pm 2.9\%$, nicht signifikant, siehe Abb. R7-D, Seite 81).

P-IRS1^{ser307}: Bei den mit Pioglitazon behandelten Tieren war eine signifikante Erhöhung der Serinphosphorylierung 307 festzustellen (ZDF-Mittel-Veh: 100%, ZDF-Mittel-Pio: $167.1 \pm 22.4\%$, $p < 0.05$). Metformin zeigte keinen Einfluss (ZDF-Mittel-Veh: 100%, ZDF-Mittel-Met: $102.1 \pm 22.7\%$, nicht signifikant, siehe Abb. R7-E, Seite 82).

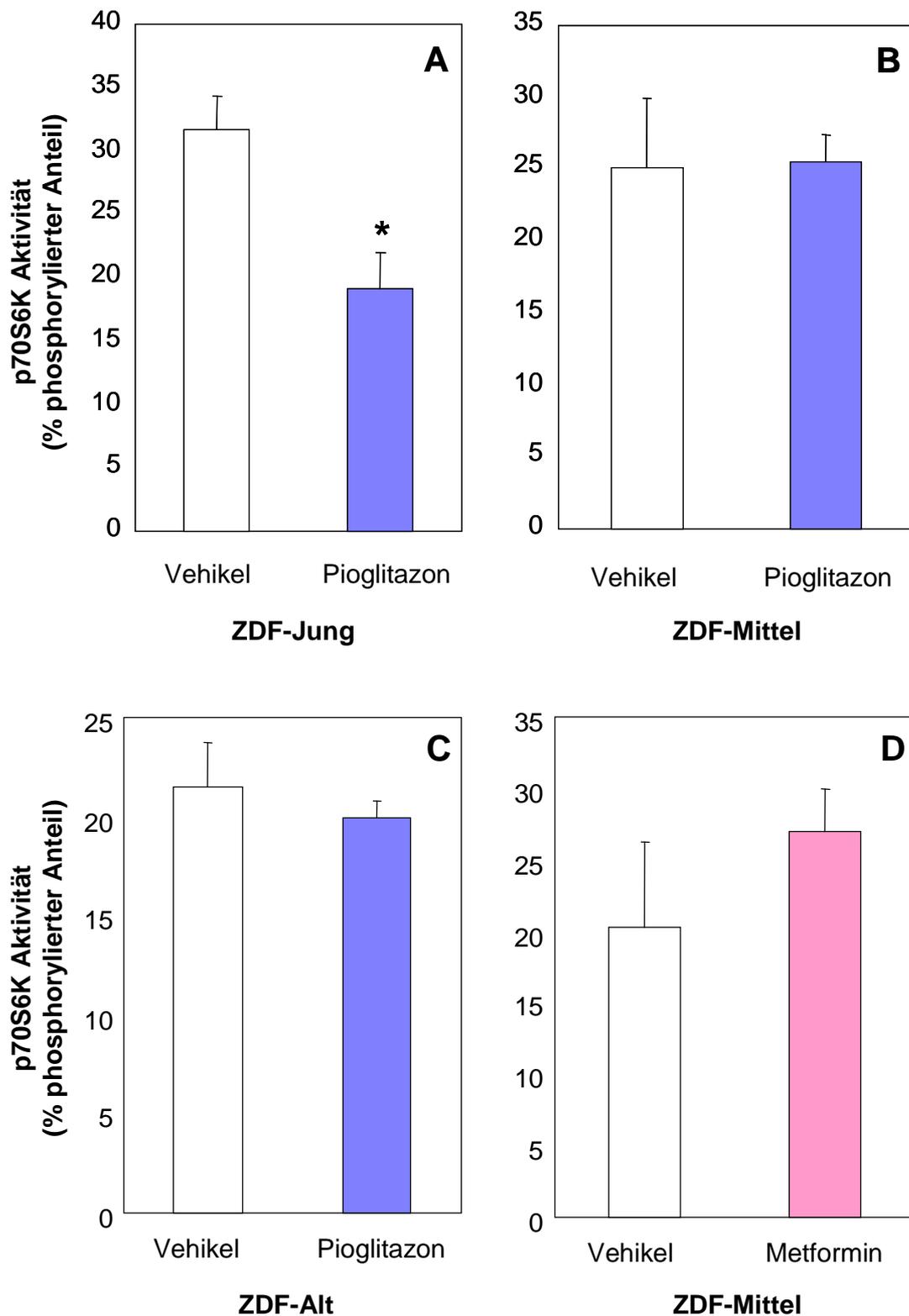


Abb. R7: Einfluss von Pioglitazon oder Metformin auf die Aktivität der p70S6K (A-D) und die Serinphosphorylierung (Ser307) von IRS1 (F) im Skelettmuskel von 3 Altersgruppen von ZDF-Ratten (Jung, Mittel, Alt). Abb. E zeigt repräsentativen Blots für p70S6K Mittelwert \pm SEM, n=4-8, *...p<0.05; gegen ZDF-Vehikel Abbildung auf nächster Seite fortgesetzt.



E

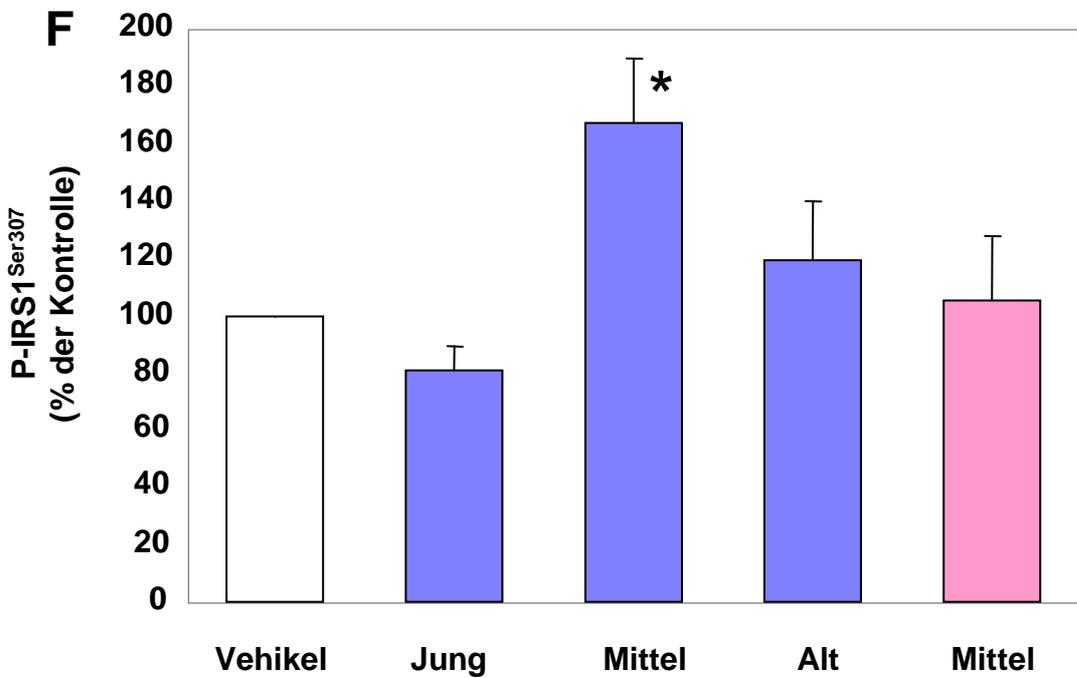
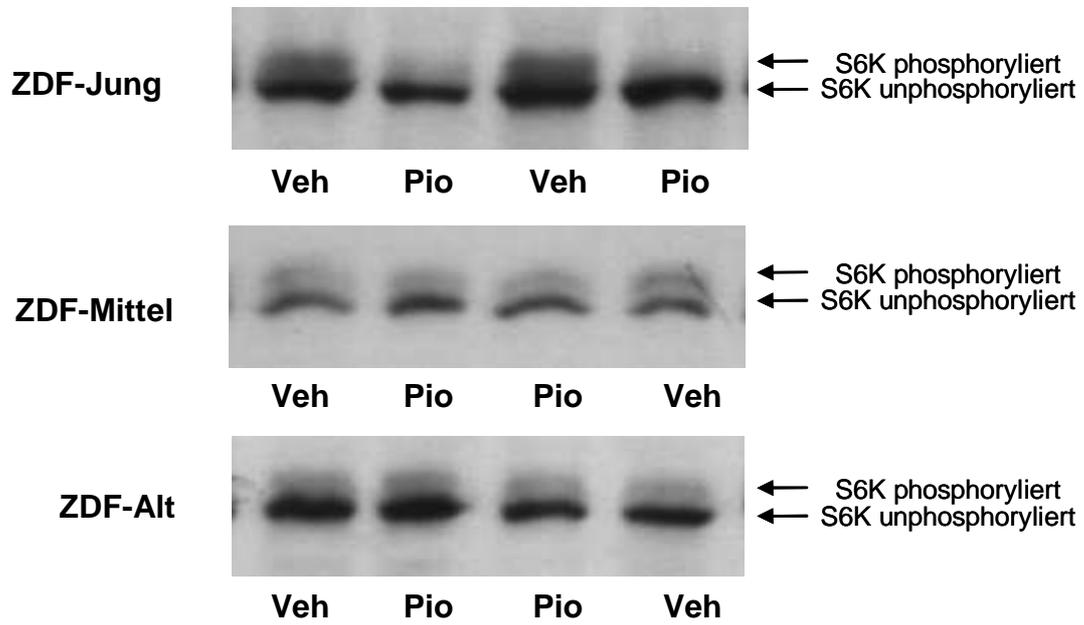


Abb. R7: Legende siehe vorangehende Seite.

3.1.6 Soleusinkubationen

Isolierte Präparate des M. soleus von gesunden Ratten und ZDF-Ratten, denen zuvor 28 Tage lang entweder Vehikel, Pioglitazon oder Metformin verabreicht wurde, wurden 80 min inkubiert, um in der letzten Stunde Stoffwechselformparameter unter basalen oder insulinstimulierten Bedingungen zu messen. Die Muskelpräparate stammten alle von Tieren der Altersgruppe „Mittel“, Muskel von Ratten der Altersgruppe „Jung“ oder „Alt“ wurden nicht untersucht.

Glukosetransport: Bei den basalen Glukosetransportwerten der verschiedenen Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede verzeichnet. Auch die insulinstimulierten Glukosetransportraten unterschieden sich nicht signifikant von einander. Sehr deutlich war jedoch der signifikante Anstieg des Glukosetransportes durch Insulinstimulation zu erkennen (ZDF-Mittel-Veh: $+342 \pm 54$ cpm/mg/h, Gesund-Mittel-Veh: $+443 \pm 49$ cpm/mg/h, ZDF-Mittel-Pio: $+347 \pm 36$ cpm/mg/h, ZDF-Mittel-Met: $+425 \pm 25$ cpm/mg/h, p jeweils <0.001 für den Effekt von Insulin, siehe Abb. R7-A, Seite 86).

Glykogensynthese: Muskelpräparate von gesunden Tieren wiesen unter basalen Bedingungen eine signifikant höhere Glykogensyntheserate auf als jene von vehikelbehandelten ZDF-Tieren. Eine Verringerung wurde bei Metformin-behandelten Tieren nachgewiesen (basal: ZDF-Mittel-Veh: 1.39 ± 0.09 $\mu\text{mol/g/h}$, Gesund-Mittel-Veh: 2.88 ± 0.25 $\mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.001$, ZDF-Mittel-Met: 0.91 ± 0.15 $\mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.05$). Unter Insulinstimulation war bei gesunden Ratten die Glykogensynthese signifikant höher als bei gleichbehandelten ZDF-Tiere (Insulin: ZDF-Mittel-Veh: 4.00 ± 0.24 $\mu\text{mol/g/h}$, Gesund-Mittel-Veh: 7.61 ± 0.64 $\mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.001$). Der insulininduzierte Anstieg war bei allen Gruppen signifikant (ZDF-Mittel-Veh: $+2.61 \pm 0.23$ $\mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.001$; Gesund-Mittel-Veh: $+4.73 \pm 0.58$ $\mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.001$; ZDF-Mittel-Pio: $+2.90 \pm 0.20$ $\mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.001$; ZDF-Mittel-Met: $+2.45 \pm 0.46$ $\mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.05$), bei gesunden Tieren war der Effekt auch innerhalb der Insulinwirkung zu sehen ($p < 0.01$, siehe Abb. R8-B, Seite 86)

Laktatfreisetzung: Die Laktatfreisetzung der gesunden Ratten war sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter Insulineinfluss signifikant niedriger als bei

Vehikel-behandelten ZDF-Ratten (basal: ZDF-Mittel-Veh: 17.7 ± 0.9 $\mu\text{mol/g/h}$, Gesund-Mittel-Veh: 10.5 ± 0.8 $\mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.001$, Insulin: ZDF-Mittel-Veh: 20.0 ± 1.2 $\mu\text{mol/g/h}$, Gesund-Mittel-Veh: 12.3 ± 0.7 $\mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.001$). Unter basalen Bedingungen war auch durch Pioglitazonbehandlung eine Senkung der Laktatfreisetzung zu verzeichnen (basal: ZDF-Mittel-Veh: 17.7 ± 0.9 $\mu\text{mol/g/h}$, ZDF-Mittel-Pio: 14.7 ± 0.8 $\mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.05$ gegen Vehikel, siehe Abb. R7-C, Seite 87). Metformin zeigte keine Wirkung auf die Laktatfreisetzung. Auch der insulinbedingte Anstieg auf die Laktatfreisetzung war bei keiner Gruppe signifikant.

CO₂ aus Glukose: Gesunde Tiere hatten unter beiden Bedingungen eine signifikant höhere, Metformin-behandelte ZDF-Tiere eine signifikant niedrigere Glukoseoxidation als ihre hyperglykämischen Wurfgeschwister (basal: ZDF-Mittel-Veh: 356 ± 26 nmol/g/h , Gesund-Mittel-Veh: 1022 ± 76 nmol/g/h ; $p < 0.001$; ZDF-Mittel-Met: 186 ± 17 nmol/g/h , $p < 0.001$ Insulin: ZDF-Mittel-Veh: 440 ± 31 nmol/g/h , Gesund-Mittel-Veh: 1488 ± 145 nmol/g/h , $p < 0.001$, ZDF-Mittel-Met: 286 ± 22 nmol/g/h , $p < 0.01$). Verglichen mit den entsprechenden Kontrolltieren zeigte Pioglitazon weder basal noch insulinstimuliert einen Effekt auf die Glukoseoxidation. Ein Vergleich von basalen und insulinexponierten Werten ergab in allen Gruppen einen signifikanten Anstieg (ZDF-Mittel-Veh: $+84 \pm 22$ nmol/g/h , $p < 0.01$; Gesund-Mittel-Veh: $+466 \pm 165$ nmol/g/h , $p < 0.05$; ZDF-Mittel-Pio: $+171 \pm 27$ nmol/g/h , $p < 0.001$; ZDF-Mittel-Met: $+100 \pm 8$ nmol/g/h , $p < 0.01$), wobei Pioglitazon einen signifikant höheren Anstieg aufweist ($p < 0.05$ gegen Anstieg Vehikel, siehe Abb. R7-D, Seite 87).

CO₂ aus Palmitat: Wie bei den anderen Parametern, war auch hier die basale Palmitatoxidation bei gesunden Tieren signifikant höher (basal: ZDF-Mittel-Veh: 76.8 ± 4.6 nmol/g/h , Gesund-Mittel-Veh: 131.0 ± 8.2 nmol/g/h , $p < 0.001$). Unter Insulineinfluss wurde ebenfalls ein signifikanter Effekt bei den gesunden und den Metformin-behandelten Tieren festgestellt (Insulin: ZDF-Mittel-Veh: 64.4 ± 3.6 nmol/g/h , Gesund-Mittel-Veh: 78.5 ± 4.1 nmol/g/h , $p < 0.05$; ZDF-Mitte-Met: 46.5 ± 5.0 nmol/g/h , $p < 0.05$). Pioglitazon zeigte weder basal noch unter Insulineinfluss eine Wirkung auf die Palmitatoxidation. Der durch Insulin entstehende Abfall in der Palmitatoxidation war nur bei den gesunden Tieren signifikant höher (Gesund-Mittel-Veh: -52.5 ± 7.0 nmol/g/h , $p < 0.001$ gegen Vehikel, siehe Abb. R7-E, Seite 88).

Glykogengehalt: Der Glykogengehalt war sowohl bei gesunden als auch bei Metformin-behandelten Tieren unter basalen Bedingungen signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren (ZDF-Mittel-Veh $13.6 \pm 1.0 \mu\text{mol/g}$, Gesund-Mittel-Veh: $8.2 \pm 1.3 \mu\text{mol/g}$, $p < 0.05$; ZDF-Mittel-Met: $11.3 \pm 0.3 \mu\text{mol/g}$, $p < 0.05$). Unter Insulineinfluss konnten keine Effekte nachgewiesen werden. Der Anstieg unter Insulin war bei gesunden Tieren und Tieren, denen Pioglitazon verabreicht wurde, signifikant (Gesund-Mittel-Veh: $+4.3 \pm 0.9 \mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.01$; ZDF-Mittel-Pio: $+2.9 \pm 0.5 \mu\text{mol/g/h}$, $p < 0.01$ jeweils für den Effekt von Insulin, siehe Abb. R7-F, Seite 88).

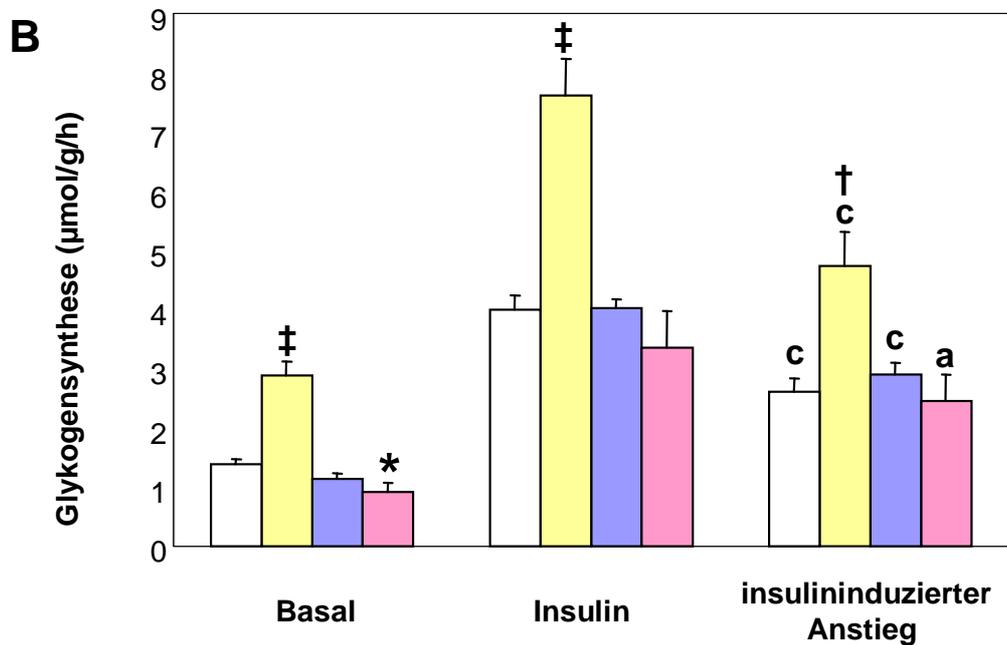
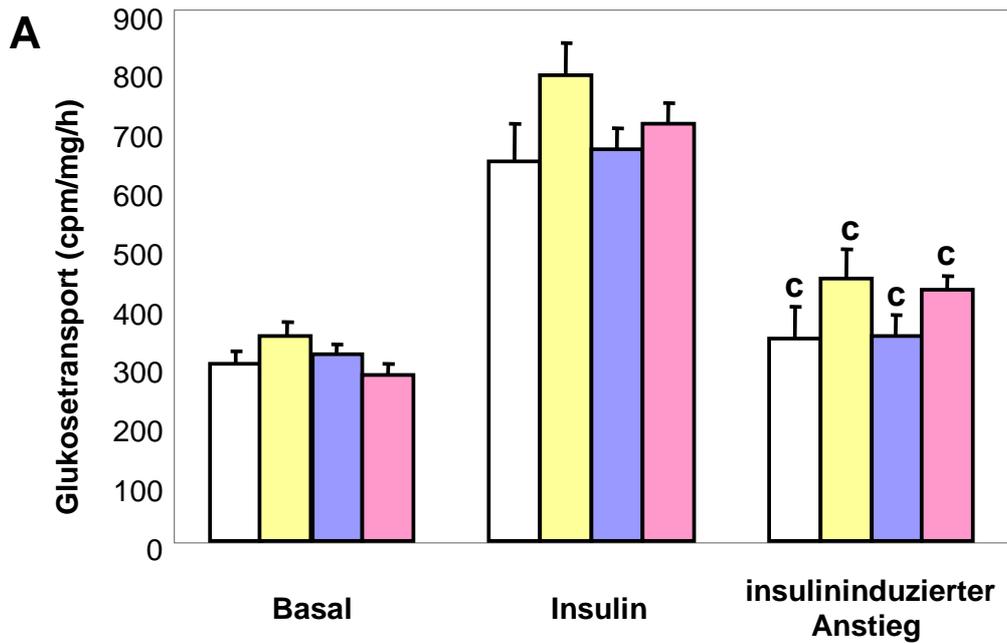


Abb. R8: Einfluss von Pioglitazon oder Metformin unter basalen und insulinstimulierten Bedingungen auf Stoffwechselfparameter des Musculus soleus in ZDF-Ratten oder ihren gesunden Wurfgeschwistern.

Mittelwert \pm SEM, n=4-13, *..p<0.05; †..p<0.01; ‡..p<0.001 gegen Vehikel

a...p<0.05, b...p<0.005; c...p<0.001 Basal gegen Insulin

Abbildung auf nächster Seite fortgesetzt.



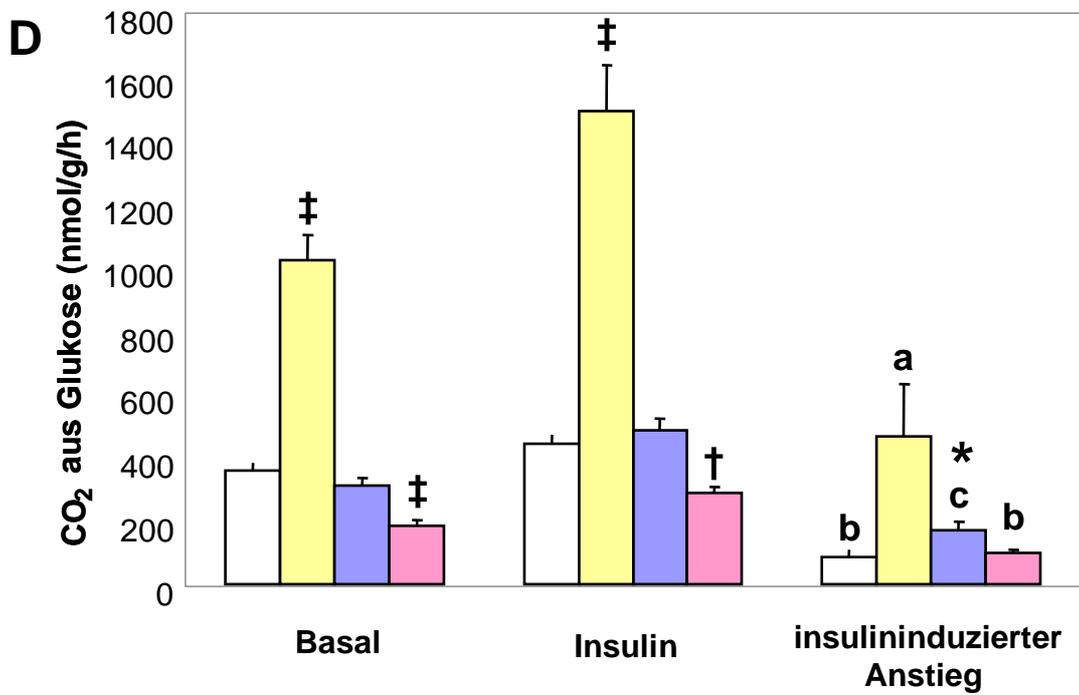
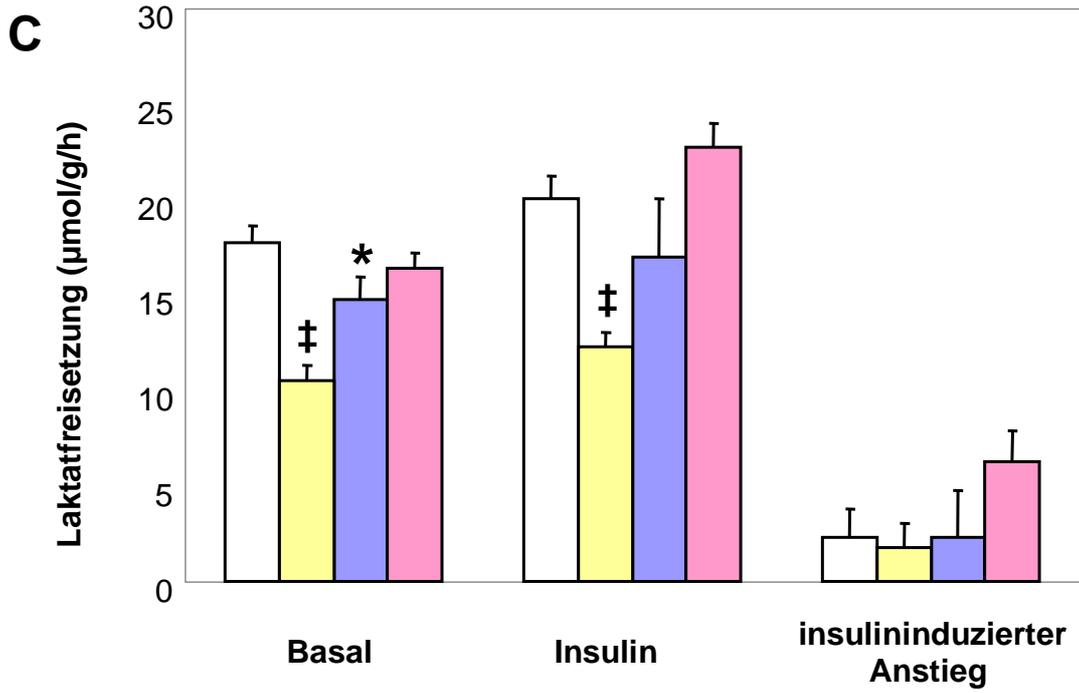


Abb. R8: Legende siehe vorangehende Seite

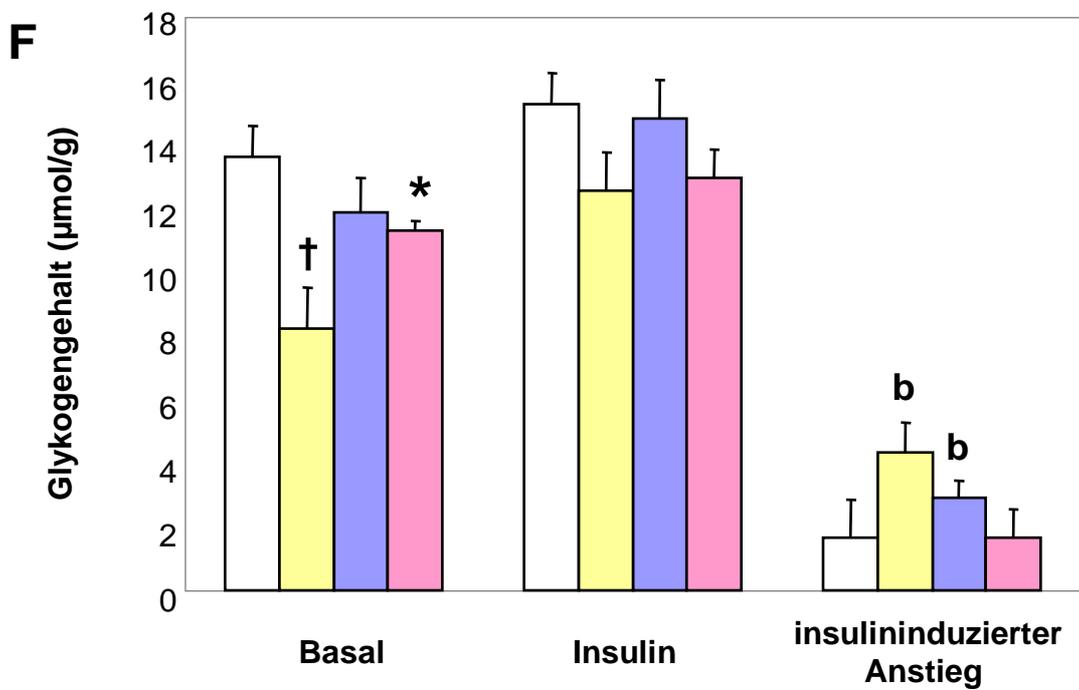
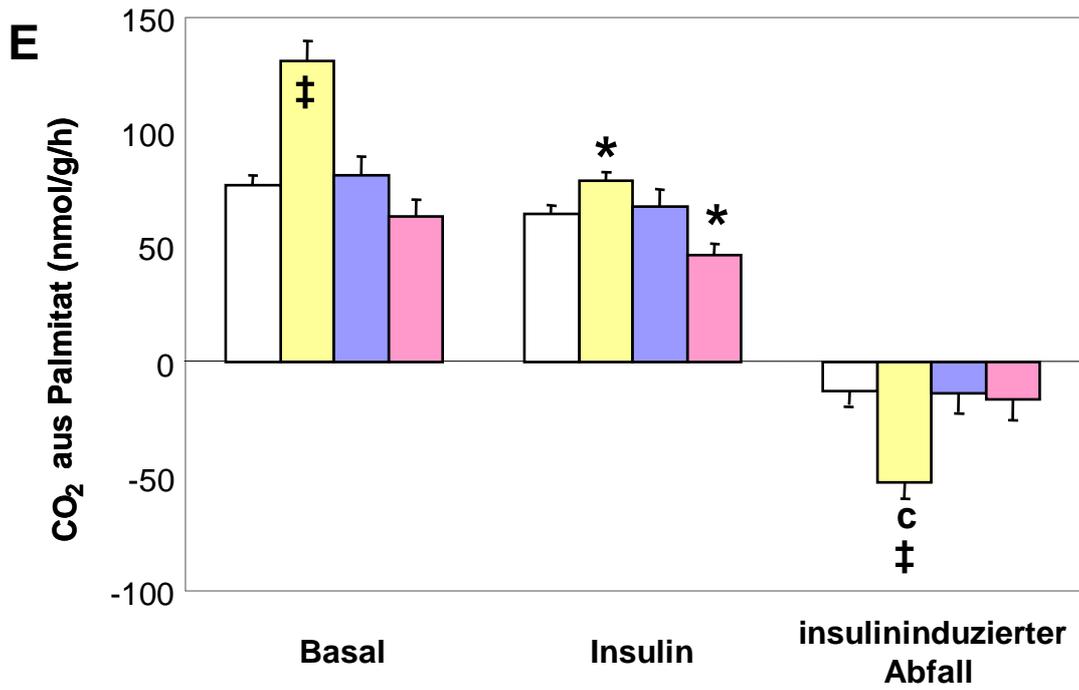


Abb. R8: Legende siehe Seite 86

3.1.7 Pflanzenextrakte

Während der 28-tägigen, oralen Behandlung von ZDF-Ratten der jüngsten Altersgruppe mit Pflanzenextrakten wurden wöchentlich Blutglukose, Körpergewicht und Futterraufnahme gemessen. Am Ende des Versuchs wurden aus dem Plasma Triglyzeride und Cholesterin bestimmt und der epididymale Fettlappen gewogen.

Blutglukose: *Juniperus c.* und *Suaeda f.* hatten keine glukosesenkende Wirkung bei ZDF-Ratten (siehe Abb. R9-A, Seite 90).

Körpergewicht: Die Behandlung hatte keinen Einfluss auf das Gewicht der Tiere (siehe Abb. R9-B, Seite 90).

Triglyzeride und Cholesterin: Bei der Messung der Blutfette konnte keine Wirkung der Pflanzenextrakte nachgewiesen werden (siehe Abb. R9-C und -D, Seite 91).

Epididymales Fett: Der epididymale Fettlappen war bei *Suaeda f.*-behandelten Tieren signifikant größer als bei den vehikelbehandelten Tieren. Die Behandlung mit *Juniperus c.* zeigte keine Veränderung des Gewichtes des epididymalen Fettgewebes (Vehikel: 3.39 ± 0.10 g, *Juniperus*: 3.67 ± 0.07 g, $p < 0.05$, *Suaeda*: 3.46 ± 0.06 g, nicht signifikant, siehe Abb. R9-E, Seite 92)

Futterraufnahme: Auch bei der Futterraufnahme konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *Juniperus*- oder *Suaeda*-behandelten Ratten und Vehikel-behandelten Ratten festgestellt werden (siehe Abb. R9-F, Seite 92).

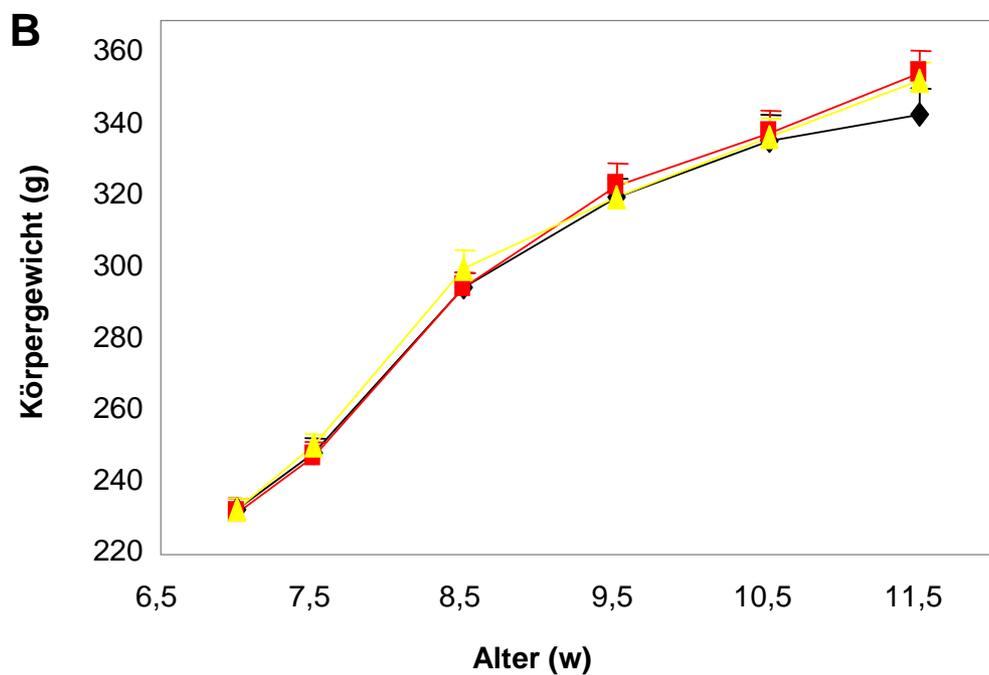
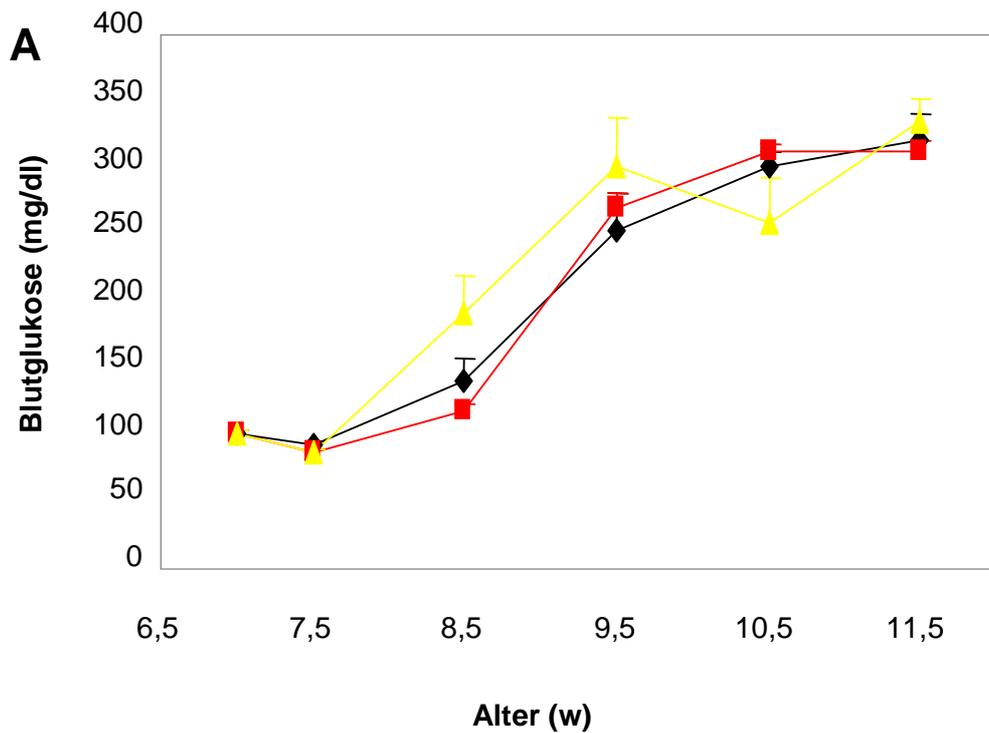
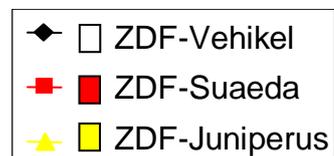


Abb. R9: Einfluss der Extrakte von Suaeda f. und Juniperus c. auf Blutglukosekonzentration (A), Körpergewicht (B), Blutfette (C,D), Gewicht des epididymalen Fettlappens (E) und Futteraufnahme (F) von ZDF-Ratten.

Mittelwert \pm SEM, n= jeweils 7, *..p<0.05; gegen Vehikel

Abbildung auf nächsten Seiten fortgesetzt.



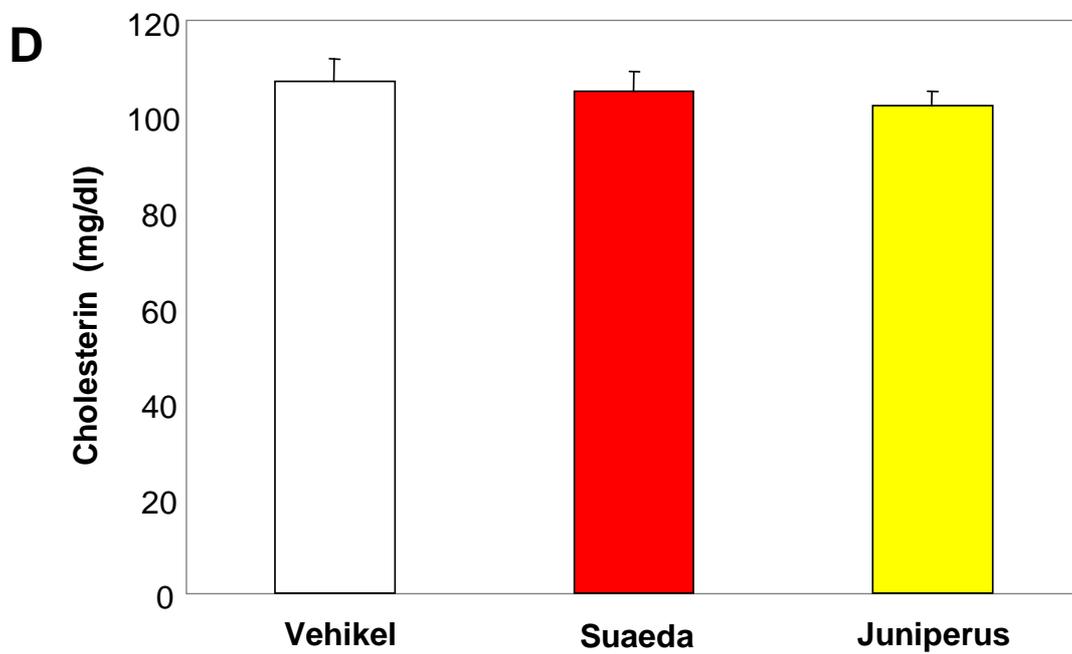
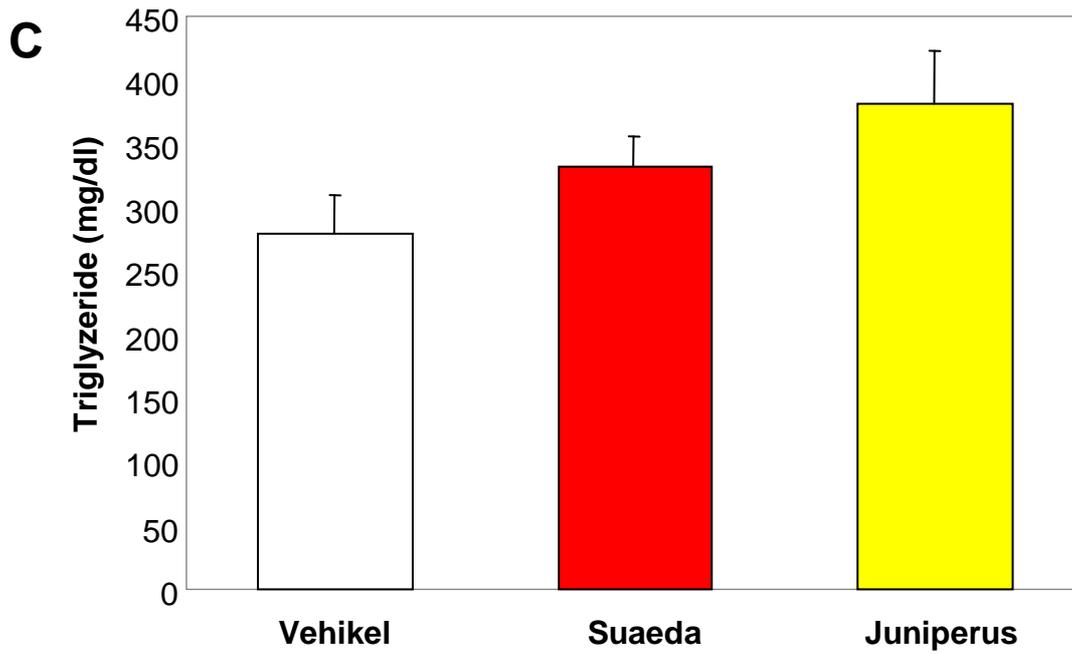


Abb. R9: Legende siehe vorangehende Seite

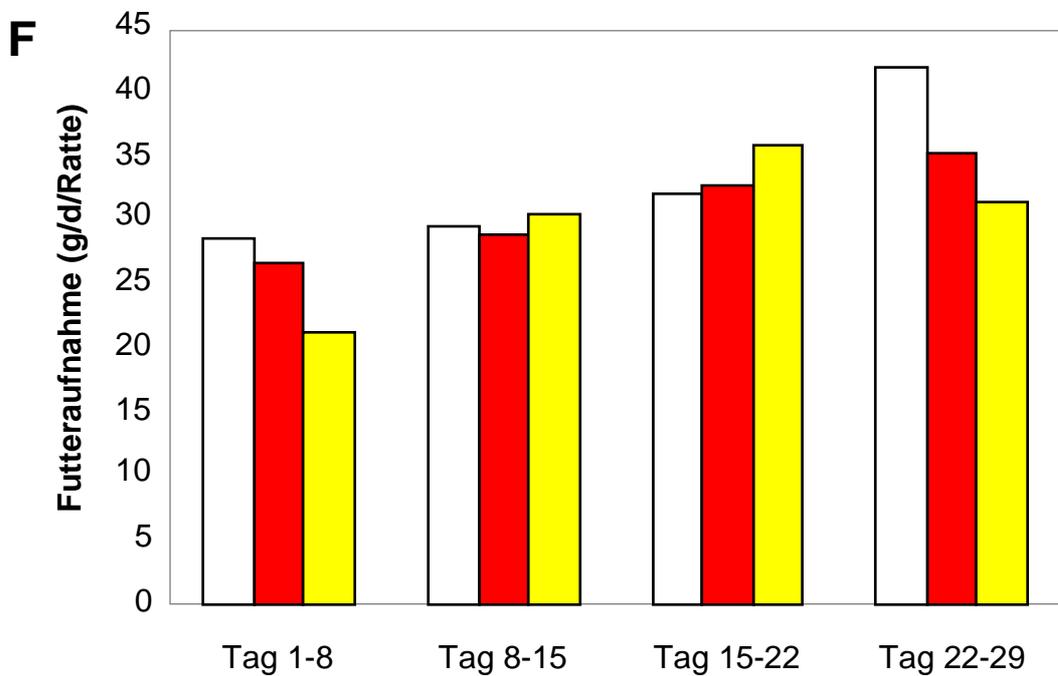
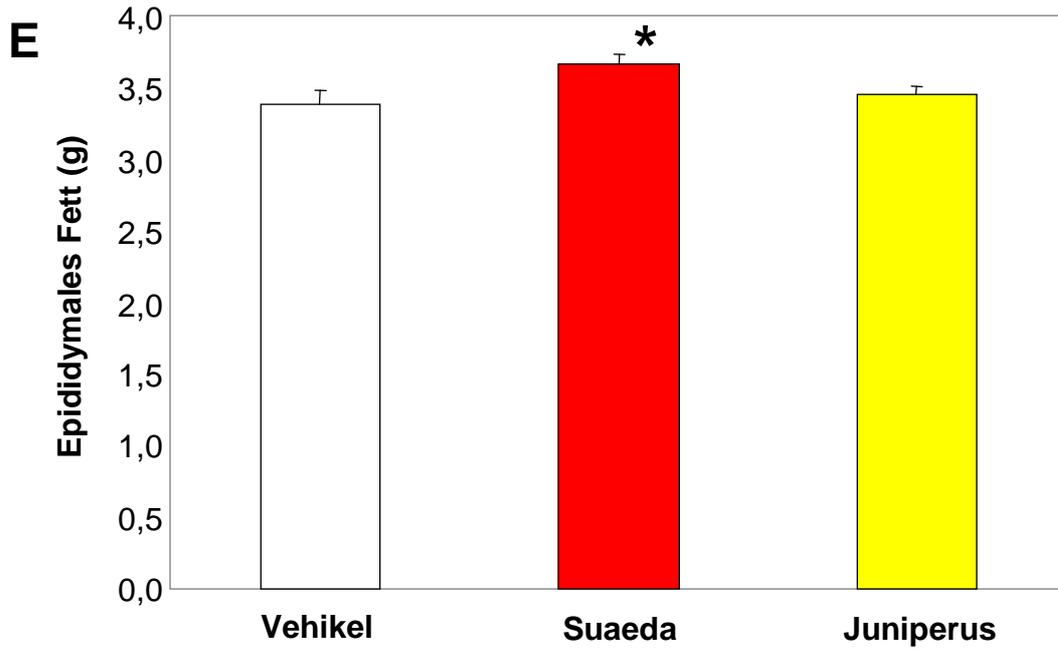


Abb. R9: Legende siehe Seite 90

3.2 db/db Mäuse

3.2.1 Intervention mit Pioglitazon

Blutglukose: Bereits nach 8 Tagen Behandlungszeit war ein signifikanter Unterschied in der Blutglukosekonzentration von Pioglitazon gegen Vehikel-behandelte Mäuse zu erkennen (Pioglitazon: 144 ± 12 mg/dl, Vehikel: 250 ± 32 mg/dl, $p < 0.01$). Dieser Unterschied wurde bis zum Versuchsende durch ein weiteres Ansteigen der Glykämie bei Vehikel-behandelten Tieren noch deutlicher (Pioglitazon: 143 ± 15 mg/dl, Vehikel: 350 ± 32 mg/dl, $p < 0.001$, siehe Abb. R10-A, Seite 94).

Körpergewichtszunahme, Adipositas und Futtermittelaufnahme: Die Gewichtszunahme der Mäuse, die Pioglitazon erhielten, war signifikant höher als die der Kontrolltiere (nach 1.5 Wochen Behandlung: Pioglitazon: $+3.4 \pm 0.4$ g, Vehikel: $+1.9 \pm 0.3$ g, $p < 0.01$, siehe Abb. R10-B, Seite 94). Somit nahmen die Pioglitazon-behandelten Tiere sichtbar stärker zu. Dies könnte auf vermehrte Futtermittelaufnahme zurückzuführen sein, hier zeigte sich aber nur ein Trend (Pioglitazon: 7.0 ± 0.9 g, Vehikel: 6.4 ± 0.4 g, nicht signifikant, siehe Abb. R10-F, Seite 96). Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits bei ZDF-Ratten beobachtet und durch das Abwägen des epididymalen Fettablattes untermauert (siehe Abb. R4).

Insulin: Bei der Messung der Plasmainsulinkonzentration konnte keine Veränderung durch Pioglitazon festgestellt werden.

Cholesterin und Triglyzeride: Pioglitazon hatte keine Wirkung auf das Cholesterin. Zwar waren Triglyzeride unter Pioglitazoneinfluss etwas niedriger, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Pioglitazon: 104.8 ± 9.0 mg/dl, Vehikel: 165.0 ± 35.8 mg/dl, nicht signifikant, siehe Abb. R10-D, Seite 95).

Leber- und Muskelglykogen: Weder in der Leber noch in der Muskulatur konnte eine signifikante Veränderung des Glykogengehaltes durch Pioglitazon nachgewiesen werden (siehe Abb. R10-E, Seite 95).

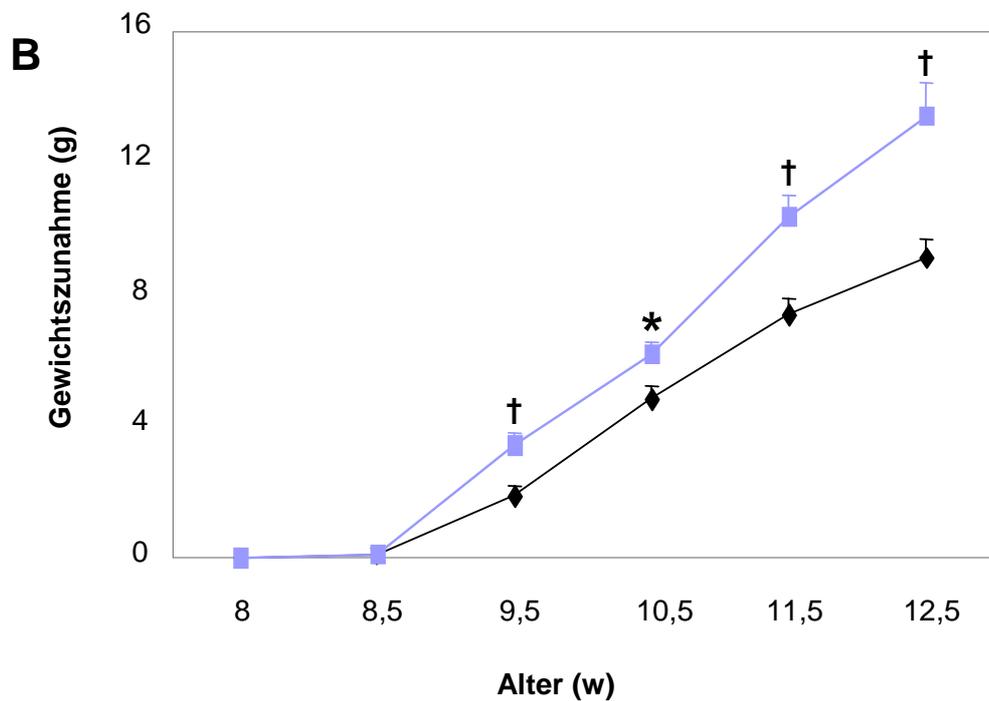
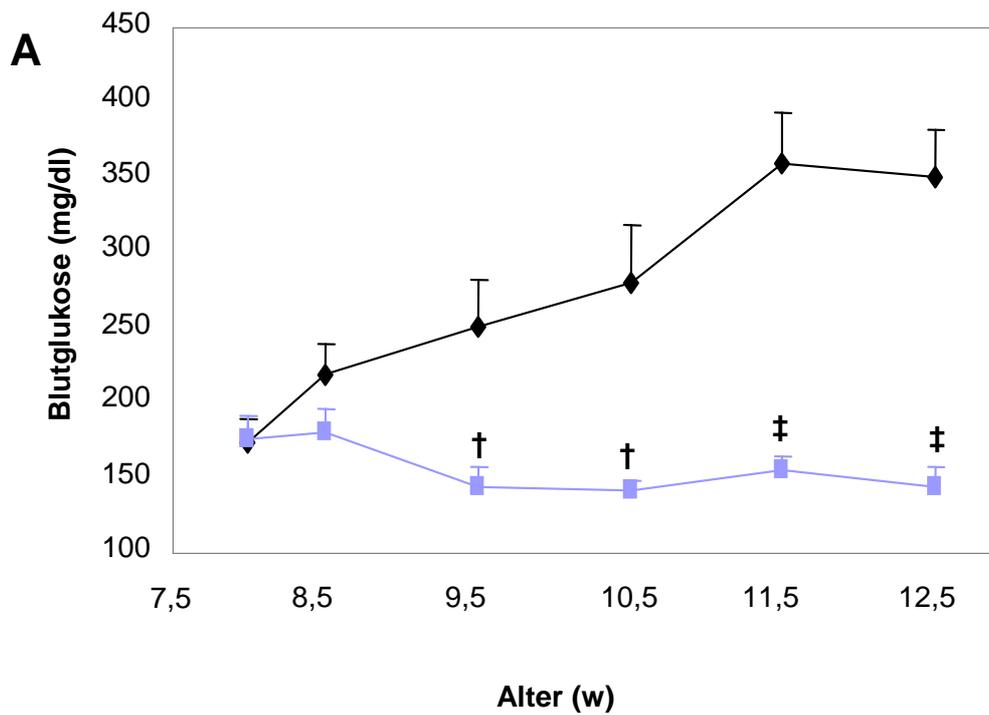


Abb. R10: Einfluss von Pioglitazon auf Blutglukosekonzentration (A), Körpergewicht (B), Insulin (C) Blutfette (D.), Muskel- und Leberglykogengehalt (E) und Futteraufnahme (F) von db/db-Mäusen.

Mittelwert \pm SEM, n= jeweils 6-10, *..p<0.05; †..p<0.01;

‡..p<0.001 gegen Vehikel

Abbildung auf nächsten Seiten fortgesetzt.



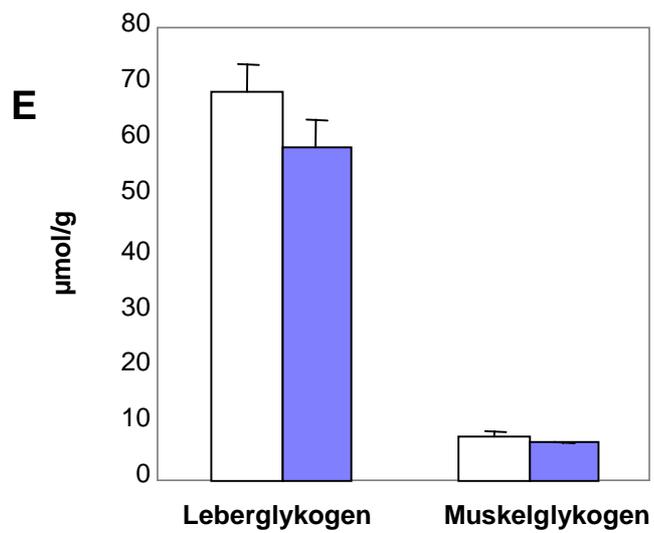
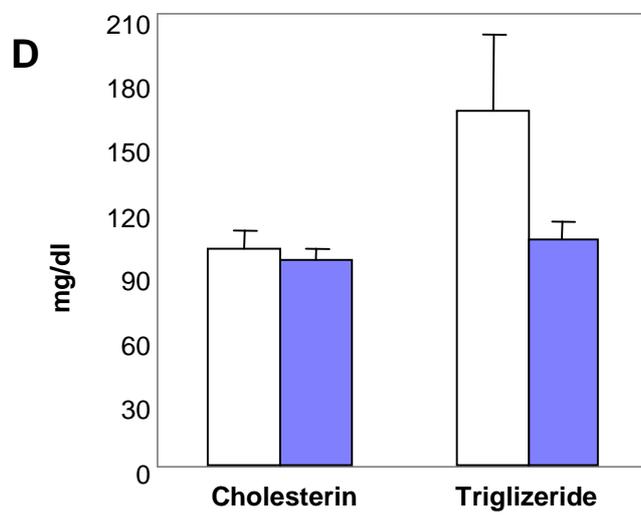
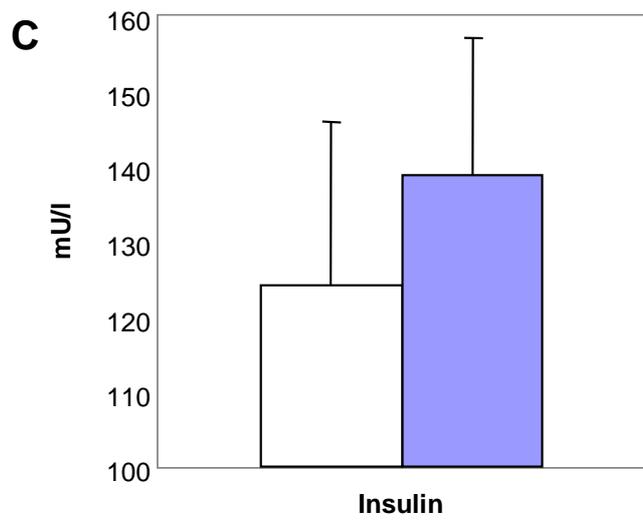


Abb. R10: Legende siehe vorangehende Seite

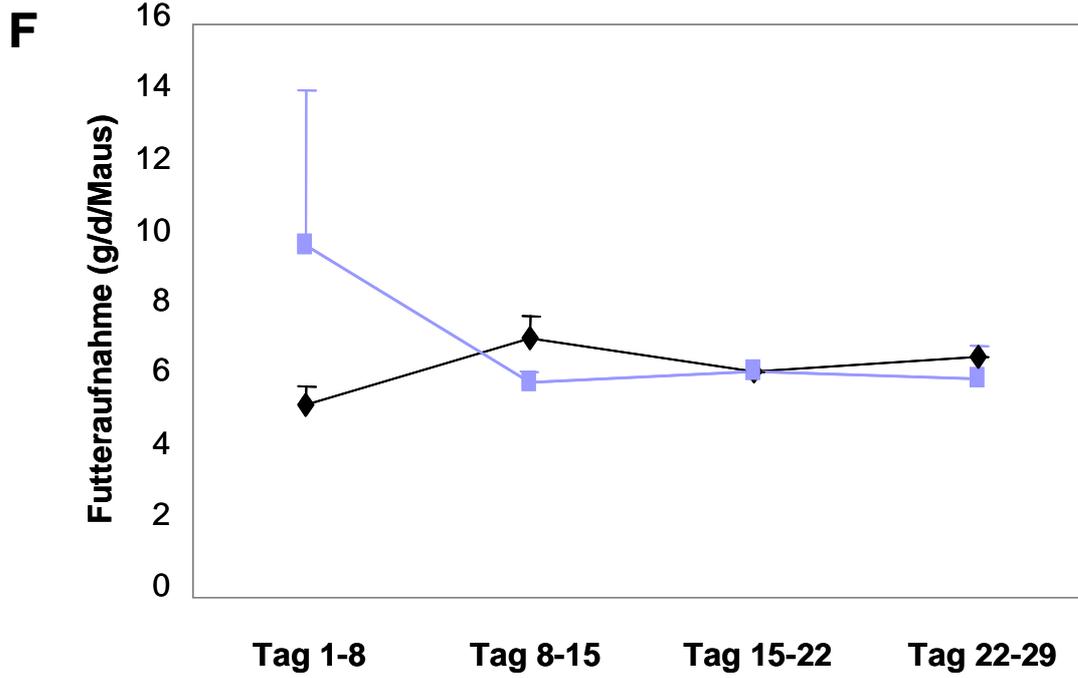


Abb. R10: Legende siehe Seite 94

3.2.2 Pflanzenextrakte

Während der 28-tägigen, oralen Behandlung mit Pflanzenextrakten von *Ceiba p.* und *Bridelia n.* wurden wöchentlich die Blutglukose, das Körpergewicht und die Futtermittelaufnahme gemessen.

Blutglukose: Während einer Behandlung mit *Ceiba p.* war die Nüchternblutglukose etwas niedriger als bei den Kontrolltieren, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bei den mit *Bridelia n.* behandelten Mäusen war die Blutglukose ab der 3. Behandlungswoche signifikant niedriger (nach 3 Wochen: *Bridelia*: 298.4±49.8 mg/dl, Vehikel: 440.5±21.0 mg/dl, $p < 0.05$; *Ceiba*: 372.0±43.8 mg/dl, nicht signifikant; nach 4 Wochen: *Bridelia*: 253.9±44.4 mg/dl, Vehikel: 431.3±29.0 mg/dl, $p < 0.01$; *Ceiba*: 372.2±32.6 mg/dl, nicht signifikant, siehe Abb. R11-A, Seite 99).

OGTT: Im oralen Glukosetoleranztest zeigten beide Pflanzen einen geringeren Glukoseanstieg als die mit Vehikel gefütterten Kontrolltiere. Bei *Bridelia n.* war dieser Unterschied ab der 30. Minute nach Glukoseverabreichung signifikant (Min. 30: *Bridelia*: 426±35 mg/dl Vehikel: 535±22 mg/dl, $p < 0.05$; Min. 90: *Bridelia*: 323±43 mg/dl, Vehikel: 485±35 mg/dl, $p < 0.05$, siehe Abb. R11-B, Seite 99).

Körpergewicht: Im Vergleich zu den Kontrolltieren und den Tieren, die mit *Ceiba p.* behandelt wurden, hatten die mit *Bridelia n.* behandelten Tiere nach der 1. Behandlungswoche ein geringeres Körpergewicht. Obwohl die Tiere anschließend konstante Zunahmeraten zeigten, blieb der Gewichtsunterschied in den nachfolgenden Wochen erhalten (nach 1. Woche: *Bridelia*: 37.5±0.9 g, Vehikel: 39.8±0.5 g, $p < 0.05$, siehe Abb. R11-C, Seite 100).

Cholesterin: Die Plasmacholesterinkonzentration stieg unter dem Einfluss von *Ceiba p.* signifikant an (*Ceiba*: 151±7 mg/dl, Vehikel: 129±7 mg/dl, $p < 0.05$, siehe Abb. R11-D, Seite 100). *Bridelia n.* hatte keinen Einfluss auf diesen Parameter.

Triglyzeride: Weder *Ceiba p.* noch *Bridelia n.* haben eine Veränderung der Triglyzeridwerte bewirkt (siehe Abb. R11-E, Seite 101).

Muskel- und Leberglykogen: Auch bei der Untersuchung der Muskel- und Leberglykogengehalts konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Pflanzenextrakten behandelten und den mit Vehikel behandelten Tieren nachgewiesen werden (siehe Abb. R11-F und –G, Seite 101 und 102).

Futteraufnahme und Gesamtfutteraufnahme: Die Daten zur Futteraufnahme stellen den Mittelwert von nur 2 Messungen pro Behandlungsgruppe dar (wurde nur pro Käfig festgestellt), sodass keine echte statistische Aussagekraft gegeben ist. Trotzdem fällt auf, dass die mittlere kumulative Nahrungsaufnahme unter Ceiba p. um etwa 8% und unter Bridelia n. etwa 25% geringer war als in den Vehikel-behandelten Kontrolltieren (siehe Abb. R11-H und –I, Seite 102 und 103).

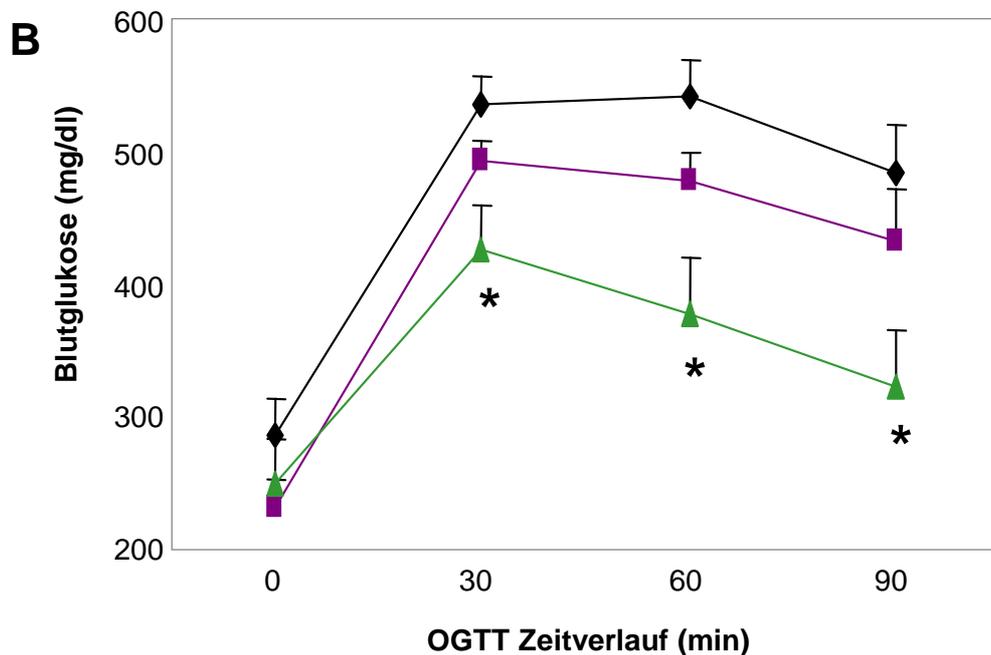
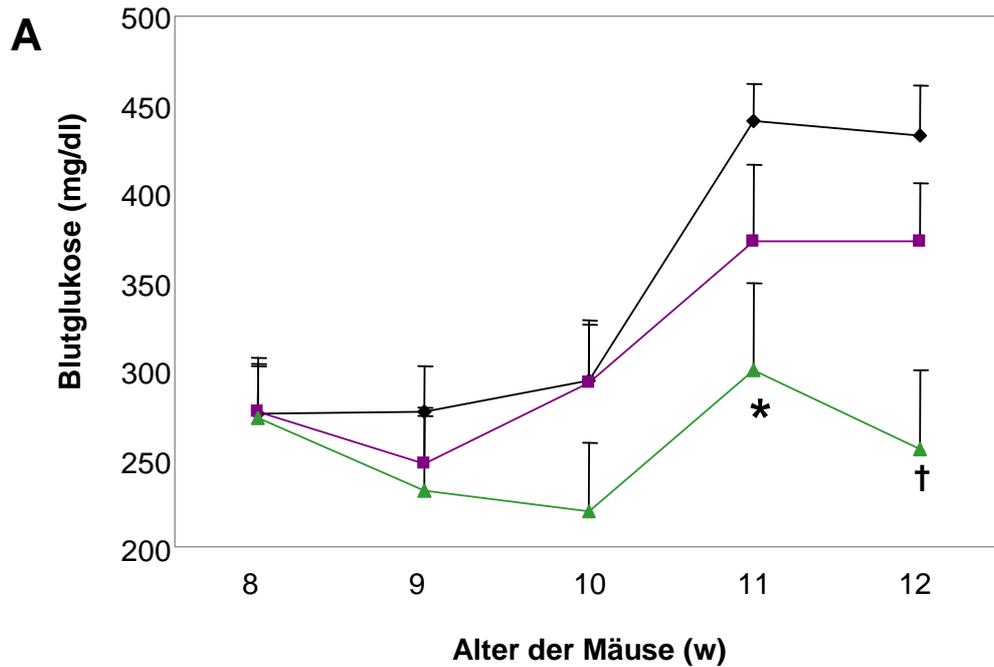
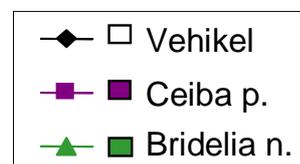


Abb. R11: Einfluss von Extrakten von *Ceiba p.* und *Bridelia n.* auf Blutglukose (A), orale Glukosetoleranz (B) Körpergewicht (C), Plasmacholesterin (D), Plasmalipid (E), Muskel- (F) und Leberglykogengehalt (G) und die kumulative Futteraufnahme (H) sowie die Futteraufnahme (I) von hyperglykämischen db/db Mäusen.

Mittelwert \pm SEM, n= jeweils 5-12, *.p<0.05; †.p<0.01 gegen Vehikel

Abbildung auf nächsten Seiten fortgesetzt.



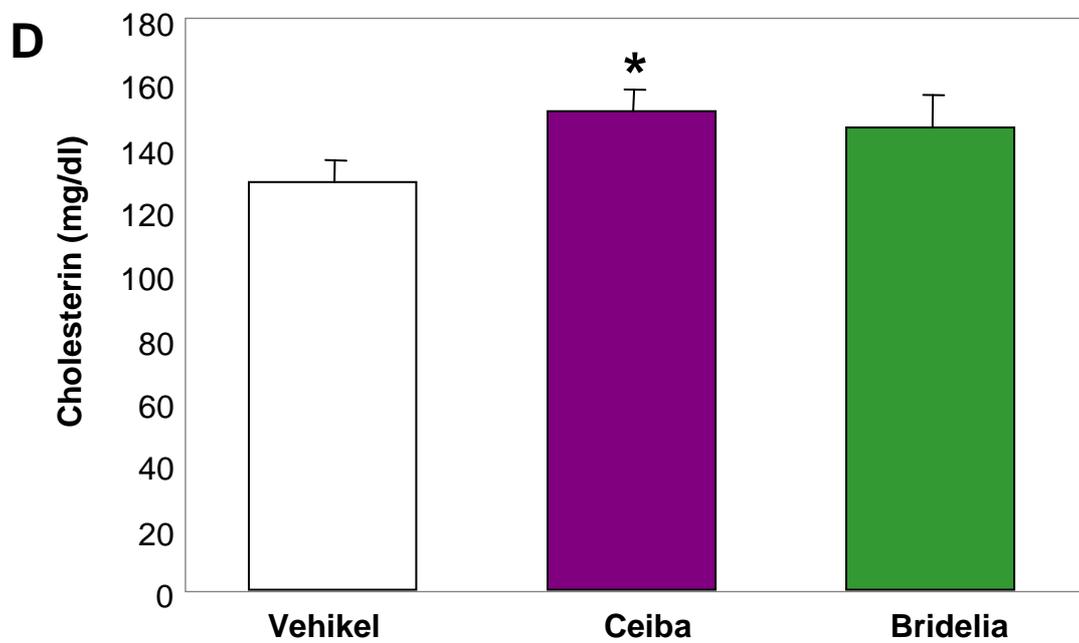
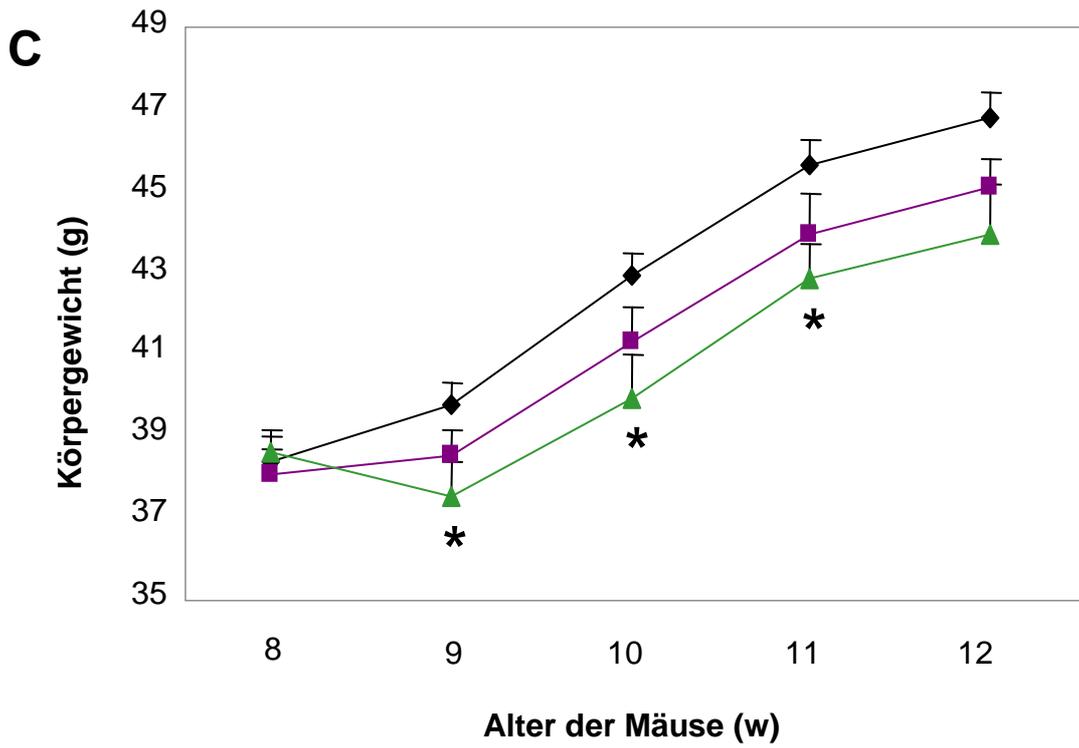


Abb. R11: Legende siehe vorangehende Seite

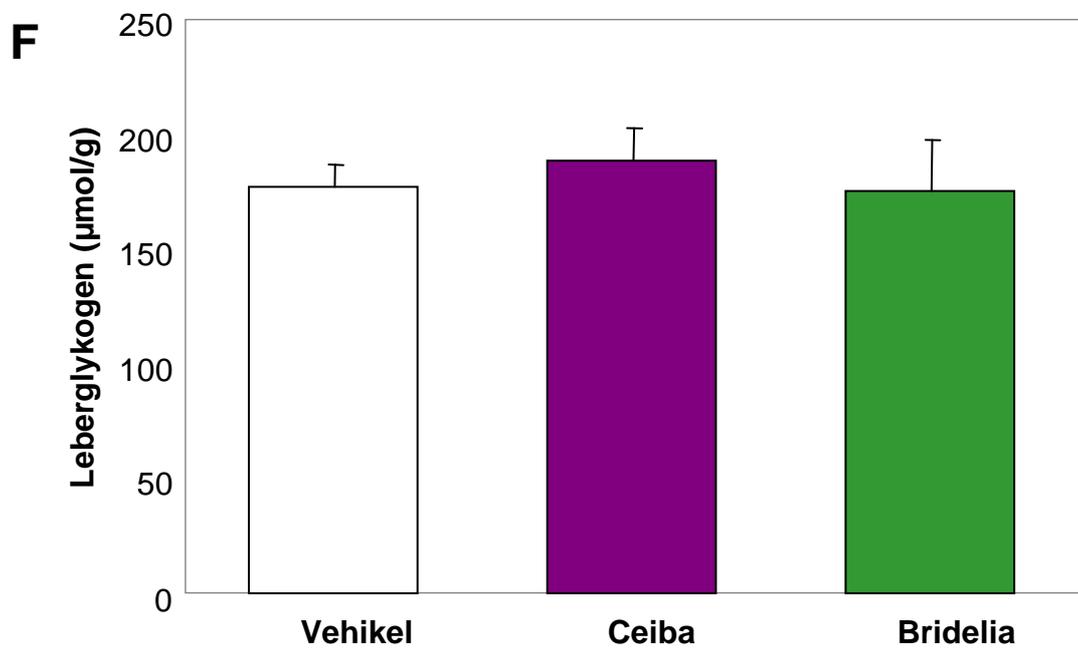
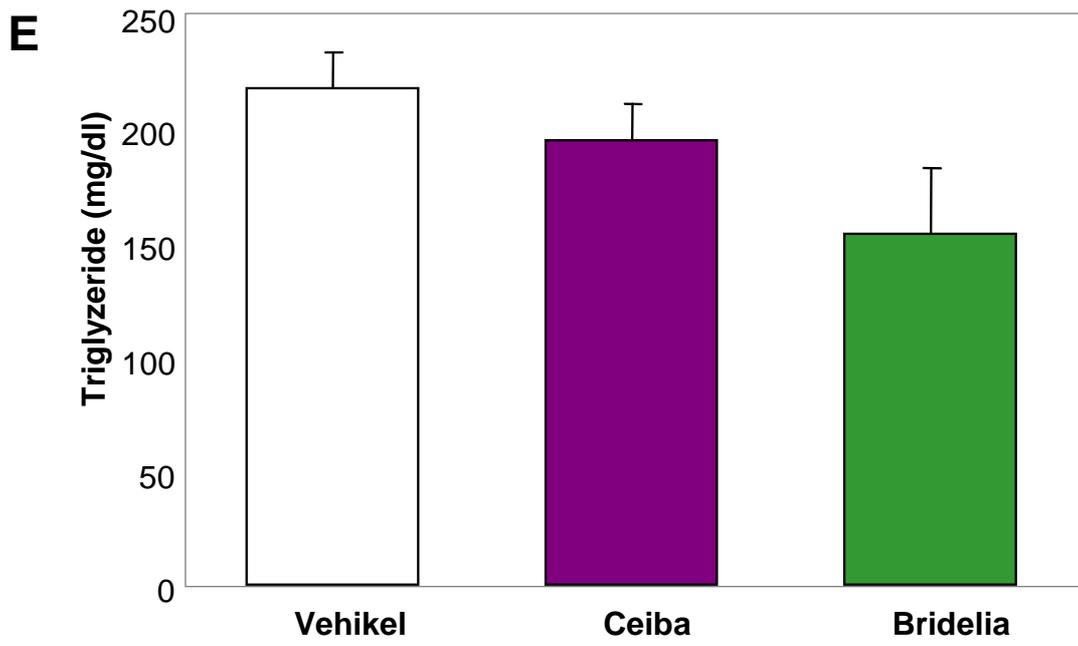


Abb. R11: Legende siehe Seite 99

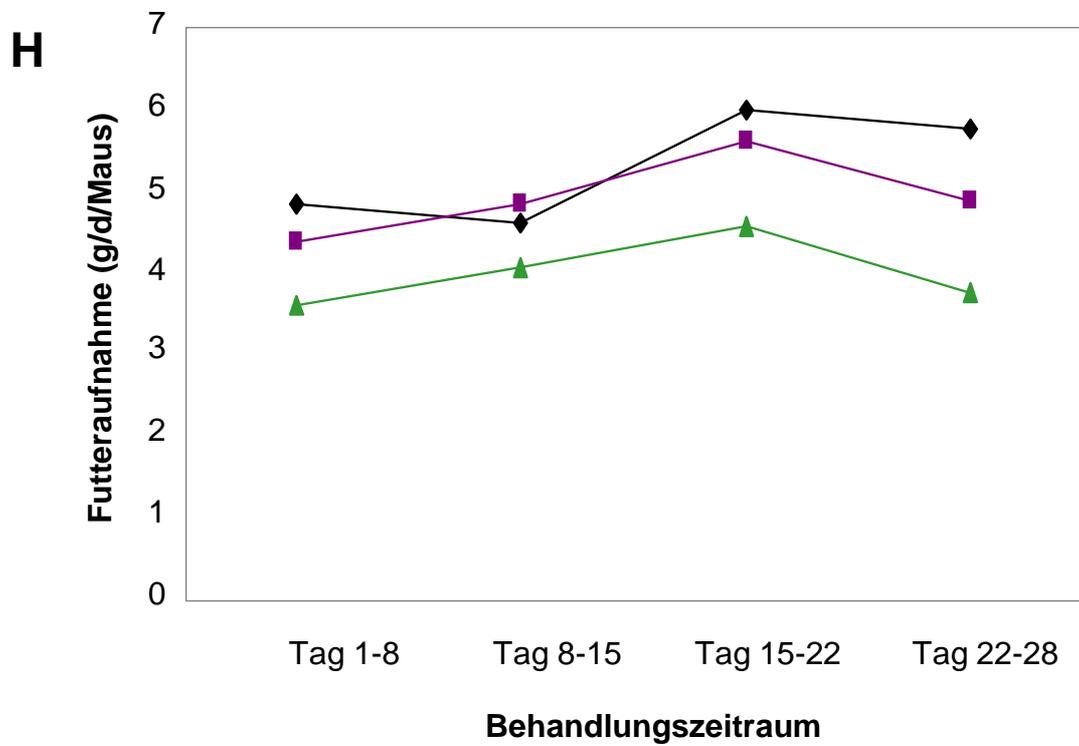
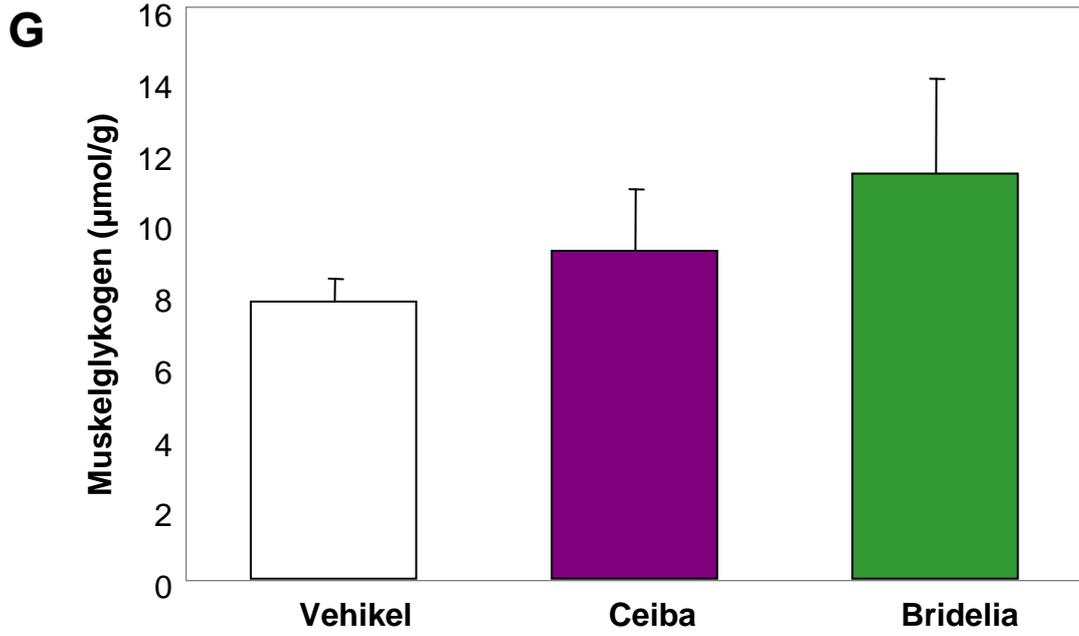


Abb. R11: Legende siehe Seite 99

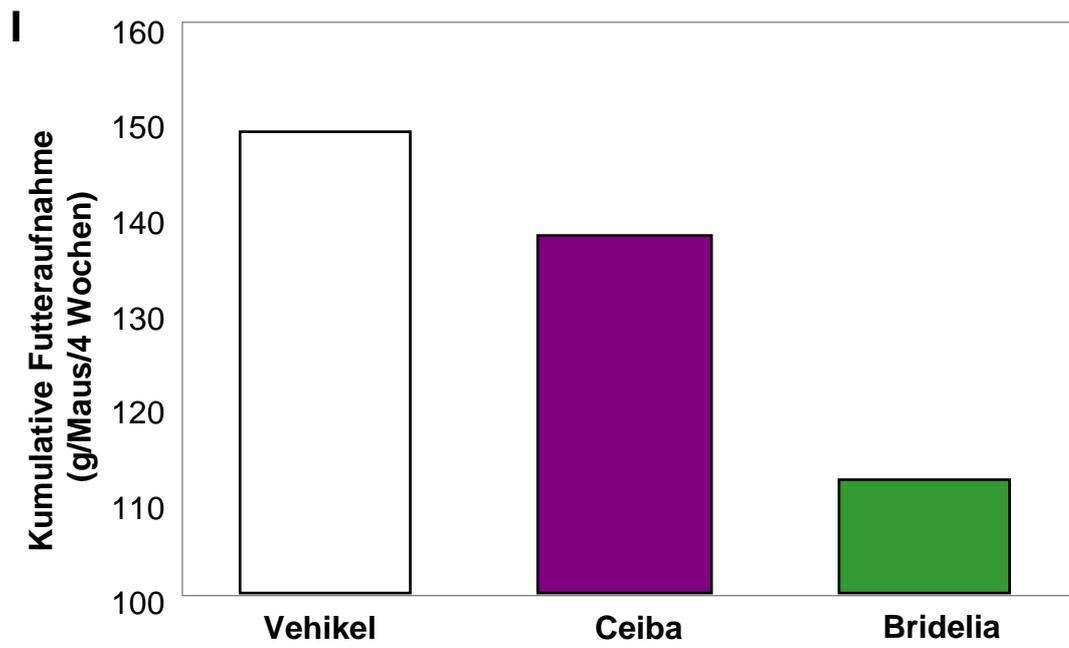


Abb. R11: Legende siehe Seite 99

4 DISKUSSION

4.1 ZDF-Ratten

4.1.1 Altersabhängige Entwicklung des ZDF-Syndroms

Um Befunde von Interventionsmaßnahmen bei männlichen, adipösen ZDF-Ratten angemessen beurteilen und interpretieren zu können, wurde in dieser Studie vorweg die altersabhängige Entwicklung des Syndroms, insbesondere der Blutglukose- und Plasmainsulinkonzentrationen, analysiert. Die Ergebnisse sind im Einklang mit früheren Berichten über die longitudinale Entwicklung dieses Syndroms [145, 146, 147, 148, 149]. Beispielsweise haben Finegood et al in adipösen ZDF-Ratten im Vergleich mit ihren gesunden Wurfgeschwistern ist bereits in der 6. Lebenswoche eine geringe, aber signifikante Erhöhung der Blutglukose verzeichnet (8.5 ± 0.3 vs. Gesunde 6.6 ± 0.1 mmol/l, $p < 0.0001$). Die Plasmainsulinkonzentration war bei den adipösen Tiere dieser Altersgruppe allerdings um das 12-fache erhöht, was auf die frühe Entwicklung einer massiven, Adipositas-assoziierten Insulinresistenz hinweist (2.468 ± 181 vs. Gesund 198 ± 12 pmol/l, $p < 0.0001$) [146]. Wie in der vorliegenden Studie kam es auch in der zitierten Studie bei den ZDF-Ratten im Alter von etwa 7 bis 10 Wochen zur massiven Entgleisung der Glykämie. Nach dieser dynamischen Phase der Krankheitsentwicklung stabilisierte sich allerdings die Glykämie und blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes weitgehend unverändert auf einem stark hyperglykämischen Niveau (in der vorliegenden Studie bei etwa 20-25 mmol/l, beobachtet bis zum Alter von 18 Wochen; bei Finegood et al bei etwa 30 mmol/l, beobachtet bis zum Alter von 12 Wochen) [146]. Auch von Smith et al wurde bei ZDF-Ratten im Alter zwischen 14 Wochen und einem halben Jahr eine stabile Hyperglykämie beschrieben, wobei diese Tiere mit einer etwas anderen Diät gefüttert wurden [145]. Erdely et al. berichteten sogar, dass die Hyperglykämie von ZDF-Ratten im Alter zwischen 4 und 11 Monaten ganz konstant bei etwa 30 mmol/l bleibt [149].

Die erhöhte Blutglukosekonzentration war in der vorliegenden Studie sowohl altersabhängig als auch intraindividuell mit einer niedrigeren Plasmainsulinkonzentration assoziiert (siehe Abb. R4-F), was in ähnlicher Weise von anderen beschrieben wurde [146]. Also kann die Verschlechterung der Glykämie

einem Verlust an Insulinproduktion zugeschrieben werden. Dieser relative Insulinmangel, also relativ geringes Plasmainsulin bei relativ hoher Glykämie, war intraindividuell mit einem niedrigeren Körpergewicht und einer geringeren Größe des epididymalen Fettpolsters assoziiert (siehe Abb. R4-A,B). Das widerspiegelt wohl die katabole Stoffwechsellage bei Insulinmangel, die ja auch beim unbehandelten, stark hyperglykämischen Diabetiker beobachtet werden kann.

Wenn man die Entwicklung des ZDF-Syndroms auf das humane Krankheitsbild des Typ 2 Diabetes umlegt, werden wichtige Unterschiede deutlich. Typ 2 Diabetes ist eine Krankheit, die sich durch Entgleisung der Glykämie und Erschöpfung der pankreatischen β -Zellen schleichend und fortschreitend entwickelt, bis es im späten Stadium sogar zu einem lebensbedrohlichen Insulinmangel kommen kann [150]. Im Gegensatz zu diesem fortschreitenden Ansteigen der Glykämie über einen langen Zeitraum bei Typ 2 Diabetes beschränkt sich das Ansteigen der Glykämie beim ZDF-Syndrom auf wenige Wochen. Diese kurze, dynamische Phase der Krankheitsentwicklung ist bereits im Alter von etwa 11 bis 15 Lebenswochen abgeschlossen. Dann stabilisiert sich der Zustand, sodass die Tiere fortan an einer schweren, aber gleich bleibenden Hyperglykämie leiden, die von Hyperlipidämie (siehe Abb. R3-C-E), relativem Insulinmangel, Proteinurie und verschlechterter Nierenfunktion begleitet ist. [145, 146, 149 und diese Arbeit].

Eine Hypothese, die diesen Speziesunterschied erklären könnte, ist, dass in ZDF-Ratten ein Masseneffekt der Glukose wirksam wird, sobald eine hyperglykämische Blutzuckerkonzentration erreicht wird. In anderen Worten, bei relativem Insulinmangel könnte hohe Glykämie bei den Nagern viel stärker die zelluläre Glukoseverwertung steigern als in einer vergleichbaren Situation beim Menschen. So würde beim relativen Insulinmangel der ZDF-Ratte der Masseneffekt der erhöhten Glukosekonzentration Glukosetransport und Glykogensynthese antreiben und so zu einem neuen Steady-State auf einem hohen Glukoseniveau führen. Dieser Effekt würde eine Homöostase der Blutglukose in einem sehr hohen Bereich erklären, wie sie bei ZDF-Ratten über viele Monate aufrecht erhalten wird. Beim Menschen mit relativem Insulinmangel hingegen wäre der Einfluss der Glykämie viel geringer, auch bei sehr hoher Blutglukose würde fast ausschließlich die Insulinstimulation die Raten der zellulären Glukoseaufnahme und Glykogenspeicherung steuern.

Hinweise, die diese Hypothese unterstützen, finden sich sowohl in der Literatur als auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. In der Phase konstanter Hyperglykämie wurde sowohl in Muskel- als auch in Leberproben der hier untersuchten ZDF-Ratten ein etwa 70% höherer Glykogengehalt festgestellt als in den Proben von gesunden Wurfgeschwistern (siehe Abb. R3-G,H). Das heißt, die hohe Glukosekonzentration steigert auch bei relativem Insulinmangel die Aufnahmeraten in die Zelle und die führt dort zu einer verstärkten Glykogenspeicherung. Dieses Ergebnis steht im klaren Unterschied zu verringerten Gewebeglykogenkonzentrationen beim Patienten mit Typ 2 Diabetes [151, 152, 153]. Carey et al. zeigten, dass Typ 2 Diabetes-Patienten nicht nur im Nüchternzustand eine niedrigere Muskelglykogenkonzentration aufweisen (57.1 ± 3.6 mmol/l gegen Gesunde 68.9 ± 4.1 mmol/l, $p < 0.05$), sondern auch nach einer Mahlzeit geringere Raten der Glykogeneinlagerung in die Muskulatur zeigen (Glykogengehalt 6 Stunden nach der Mahlzeit: Typ 2 Diabetes 70.8 ± 6.7 mmol/l, ns gegen Ausgangswert; Gesund, 108.0 ± 11.6 mmol/l, $p < 0.005$ gegen Ausgangswert) [151]. Ebenso ist im euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamp die hepatische Nettoglykogensyntheserate von Diabetes-Patienten 35% niedriger als bei vergleichbaren gesunden Probanden [153].

Weitere Hinweise im Sinne der beschriebenen Hypothese finden sich in Untersuchungen zum Thema der durch hohe Fettsäuren induzierten Insulinresistenz. So zeigte Randle an isolierten Rattenmuskeln, dass hohe freie Fettsäuren Insulinresistenz verursachen, indem sie durch intrazelluläre Konkurrenz die mitochondriale Oxidation von Glukose hemmen. In der Zelle entsteht sozusagen ein „Rückstau“ nicht oxidierten Glukosyleinheiten und das Glukose-6-phosphat steigt, was dann die Glykogenspeicherung stimuliert [154]. Für humane Skelettmuskeln zeigte Roden hingegen, dass hohe Fettsäurenkonzentrationen die Glukoseaufnahme in die Zelle hemmen, sodass keine Steigerungen, sondern Reduktionen des intrazellulären Glukose-6-phosphats und der Glykogenspeicherung die Folgen sind [155]. Auch hier also ein Hinweis, dass beim Menschen die Muskelzelle bei Hyperglykämie mit unzureichender Insulinstimulation die Glukose nicht aufnimmt, während beim hyperglykämischen Nager die Glukose aufgenommen und in der Glykogensynthese verwertet wird.

Bei Menschen werden hohe Plasmakonzentrationen an freien Fettsäuren als treibende Kraft in der Entwicklung der Insulinresistenz und der resultierenden Hyperglykämie, also des Typ 2 Diabetes, angesehen. Bei der ZDF-Ratte zeigt die vorliegende Studie aber in der späteren hyperglykämischen Erkrankungsphase sogar niedrigere Plasmakonzentration von freien Fettsäuren und Triglyzeriden als in der frühen Phase (siehe Abb. R4-D,E). Die zirkulierenden Lipide dürften also bei ZDF-Ratten viel weniger Ausdruck eines relativen Insulinmangels sein als Folge von Übergewicht und Adipositas. Übergewicht und Adipositas sind ja in der frühen Phase des Syndroms mit extremer Hyperinsulinämie viel ausgeprägter als in der späten Phase mit Hyperglykämie und kataboler Stoffwechselsituation.

4.1.2 Einfluss einer Intervention mit Pioglitazon

Übereinstimmend mit früheren Arbeiten verhinderte eine frühe Intervention mit Pioglitazon vollständig die Entgleisung der Blutglukose. Laut Pickavance steigerte das Medikament die Insulinsensitivität um 72% ($p < 0.01$) und es gab Trends zu einer verbesserten β -Zellfunktion und einem erhöhten pankreatischen Insulingehalt. [145, 146, 147, 148, 156].

Beim späteren Einsetzen der gleichen Behandlung senkte Pioglitazon die bestehende Hyperglykämie, jedoch nur vorübergehend. Pickavance et al konnte bei einer Behandlung ab der 10. Lebenswoche sogar noch einen verbesserten Insulin/Glukose-Quotienten (Kontrolle: 0.06 ± 0.02 , Pio: 0.21 ± 0.05 , $p < 0.05$) und eine gesteigerte β -Zellfunktion (HOMA- β : Kontrolle: $13.0 \pm 1.3\%$, Pio: $55.9 \pm 10.2\%$, $p < 0.01$) durch eine Pioglitazonbehandlung nachweisen [148].

Wurde die Intervention nach vollständiger Ausbildung einer Hyperglykämie angesetzt, blieb Pioglitazon jedoch ganz ohne Wirkung auf die Blutglukose (siehe Abb. R1-A-C). Die wahrscheinlichste Erklärung für das Abnehmen der Wirkung dieses Insulinsensitizers ist der Rückgang an zirkulierendem Insulin. Eine ausreichende Insulinkonzentration ist grundlegend für die Glukosesenkung mittels Insulinsensitivierung. Die besondere Wirksamkeit dieses TZDs im frühen Krankheitsstadium wurde auch an Menschen beobachtet (The Dream Trial Investigators, 2003), jedoch bleibt die klinische Anwendung dieses Potentials wegen der Nebenwirkung beschränkt. Thiazolidindionen wird grundsätzlich eine Herzinsuffizienz (CHF) fördernde Wirkung bei anfälligen Patienten nachgesagt [157].

Dormandy et al konnten auch eine positive Wirkung des Medikaments bei Hochrisikopatienten für Herzinfarkt, Schlaganfall und andere makrovaskuläre Todesursachen nachweisen. Diese kardioprotektiven Effekte sind jedoch unabhängig von einer glukosesenkenden Wirkung des Medikamentes [158]. Nach Goldberg et al scheint Pioglitazon auch eine bessere Wirkung auf Blutfette, speziell auf Triglyceride zu haben, als andere TZD [159]. Somit sind Nebenwirkungen im kardiovaskulären Bereich kein Klasseneffekt der Thiazolidindione. Dennoch sind Gewichtszunahmen und Ödeme eine wiederholt bestätigte Nebenwirkungen des Insulinsensitisers die die Möglichkeiten einer Diabetesprävention durch das Medikament einschränken [157, 160].

Der altersbedingte Verfall der Wirkung bei Thiazolidindionen wurde schon bei Typ 2 Diabetes dokumentiert. Kahn et al zeigten einen 15%igen Abfall der antihyperglykämischen Wirkung von Rosiglitazon im Verlauf von 5 Jahren [161]. Die vorliegende Arbeit ist die Erste, die diese Entwicklung auch bei ZDF-Ratten nachweist.

Zusammengefasst bestätigt unsere Arbeit gewisse Gemeinsamkeiten der Effekte von TZD auf den Glukosehaushalt in Typ 2 Patienten und ZDF-Ratten. Der oft genannte Wirkungsvorsprung von TZD bei Nagern scheint nach meinen Erkenntnissen nicht auf Speziesunterschiede zu beruhen. Sie lässt sich im Vergleich mit Menschen viel eher auf den unterschiedlichen Beginn der Behandlung im Krankheitsverlauf zurückführen.

4.1.3 Wirkungsmechanismen von Pioglitazon

Meist wird davon ausgegangen, dass die insulinsensitivierende Wirkung von TZDs über die Adipozytendifferenzierung und Fettgewebsneubildung geht. Das so gebildete Adiponektin bewirkt in weiterer Folge die Verbesserung der Insulinsensitivität von Muskulatur und Leber [162]. Sogar in alten ZDF-Ratten, wo TZD keine glukosesenkende Wirkung mehr zeigen, ist eine erhöhte Plasma-Adiponektinkonzentration zu verzeichnen. Auch die Fettgewebsbildung ist verstärkt, was durch vergrößerte epididymalen Fettablappen und eine beschleunigte Körpergewichtszunahme bestätigt wird. Dies untermauert bisherige Annahmen, dass diese Effekte unabhängig von einer glukosesenkenden Wirkung auftreten.

Auf den ersten Blick scheint es, dass dieser immense Anstieg der Plasma-Adiponektinkonzentration eine Voraussetzung für die glukosesenkende Wirkung darstellt. Meine Ergebnisse unterstützen eine andere Hypothese: Obwohl in allen Altersgruppen eine Erhöhung der Plasma-Adiponektinkonzentration gemessen wurde, war diese Erhöhung in der Gruppe ZDF-Jung-Pio am stärksten. Sie war in etwa um das 4-fache erhöht, was einen deutlichen Unterschied zu der 1,5-fachen Erhöhung der Gruppe ZDF-Alt-Pio darstellt (siehe Abb. R3-A). Da jedoch allen Altersgruppen die gleiche Dosis des Medikamentes verabreicht wurde, scheint die eigentliche Wirkung auf die Adiponektinkonzentration der bei allen 3 Gruppen gleichermaßen stattfindende Anstieg von mindestens 1 bis 3 mg/l zu sein. Der darüber hinausgehende Anstieg in der Gruppe ZDF-Jung-Pio könnte auf den augenscheinlichsten Faktor zurückzuführen sein, nämlich die Glykämie. Wie lässt sich dies erklären?

Individuen mit einer gesunden Glykämie haben eine Assoziation zwischen hohem Adiponektingehalt und niedrigem Körpergewicht [163]. ZDF-Jung-Veh Tiere, also unbehandelte Ratten im Alter von 12.5 Wochen mit mäßig fortgeschrittenem diabetischen Syndrom, haben eine starke Assoziation von hoher Glukose mit niedrigem Plasma-Adiponektin (siehe Abb. R4-C). Dies weist darauf hin, dass der Grad der Glukoseentgleisung den Adiponektingehalt beeinflusst, und zwar unabhängig von einer TZD-Behandlung. Bei diesen Tieren hat die Assoziation zwischen niedrigem Adiponektin und hoher Glykämie sogar die bisher etablierte Assoziation zwischen niedrigem Adiponektin mit hohem Körpergewicht übertroffen [163, 164]. Nach den vorliegenden Daten wird niedriges Adiponektin mit niedrigem Körpergewicht ($r=0.74$) und niedrigem epididymalen Fettlappengewicht ($r=0.69$) assoziiert (siehe Abb. R4-G,H). Nach diesen Erkenntnissen ist der Einfluss der Glukoseentgleisung auf die zirkulierende Adiponektinkonzentration ($r=-0.81$) dem Einfluss von Körpergewicht überlegen. Auch scheint der Glukoseanstieg einen stärkeren Einfluss auf den Adiponektingehalt zu haben als die Pioglitazonwirkung. Der bekannte Wirkungsweg von Pioglitazon über die PPAR γ induzierte Adiponektin-freisetzung und die damit einhergehende Insulinsensitivierung könnte somit durch eine bereits bestehende Hyperglykämie geblockt werden. Eine Glukoseentgleisung hemmt möglicherweise den für eine Insulinsensitivierung notwendigen Adiponektinanstieg und in Folge die Glukoseregulation (siehe Abb. D1).

Das weist darauf hin, dass der bislang verzeichnete Anstieg in der Plasma-Adiponektin-konzentration von ZDF-Ratten und Typ-2-Patienten [165, 156] eher eine Konsequenz als der Grund einer metabolischen Verbesserung ist.

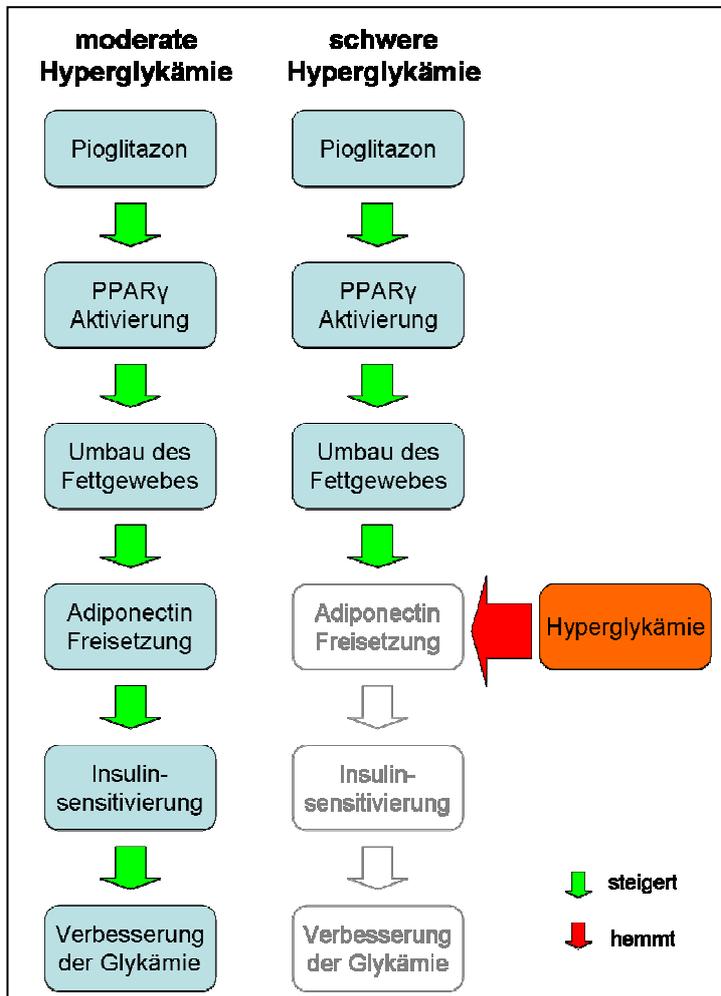


Abb. D1: Hypothese zur Erläuterung einer geringeren Adiponektinsteigerung bei schwerer Hyperglykämie.

Das durch Pioglitazon erhöhte Adiponektin wirkt auf Insulinzielgewebe wie Muskel und Leber, wo es bekanntlich den zellulären Energiestatus verringert [166]. Deshalb wird Energie aus Glykogen mobilisiert, da die aus Glykogen gewonnene Glukose der kompensatorischen ATP-Synthese dient. [167, 168, 169]. Dies würde erklären, warum Pioglitazon den Muskelglykogengehalt unabhängig von der umliegenden Glukose- und Insulinkonzentration reduziert. Reduziertes Glykogen steigert wiederum die insulinstimulierte Glukoseaufnahme [170] und kann somit zur positiven Wirkung dieses

Medikamentes bei ZDF-Ratten beitragen.

Zellulärer Energiemangel bewirkt neben einer Glykogenerschöpfung auch die Hemmung der p70S6-Kinase. Eine gestörte Aktivität der p70S6-Kinase wird mit einer Insulinsensitivierung mittels Dephosphorylierung am Serin-Rest der IRS1 assoziiert [171]. Jedoch wurden bislang entsprechende TZD-Effekte nur in Studien über mögliche Antitumoreffekte berichtet [172, 173, 174]. Diese Arbeit ist die Erste, die eine Reduktion der p70S6-Kinase Aktivität im Zusammenhang mit TZD-bedingter Glukosesenkung in der Skelettmuskulatur nachweist. Es ist aber zu beachten, dass die durch Pioglitazon hervorgerufene Hemmung der p70S6-Kinase nur gleichzeitig

mit einer Glukosehemmung beobachtet wurde, In der Gruppe ZDF-Alt-Pio konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Somit kann man nicht unterscheiden, ob die Hemmung des Enzyms in der Wirkungskette von TZDs den insulinsensitivierenden und glukosesenkenden Effekten vor- oder nachgeschaltet ist.

4.1.4 Einfluss einer Intervention mit Metformin

Es herrscht die grundsätzliche Meinung vor, dass eine antidiabetische Wirkung von subchronischer Behandlung mit Metformin in adipösen Nagermodellen kaum nachweisbar ist. Diese Meinung lässt sich durch die Ergebnisse unserer Arbeit nur bestätigen, denn bei Intervention in einem Alter, in dem Pioglitazon bei ZDF-Ratten noch deutliche Glukosesenkung bewirkte, blieb die Behandlung mit Metformin wirkungslos.

Im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen berichten Sreenan et al eine „gewichts- und glukosestabilisierende“ Wirkung von Metformin bei ZDF-Ratten, wenn die Behandlung ab der 6. Lebenswoche begonnen wird [175]. Sie haben hierfür ZDF-Ratten, gesunde Wurfgeschwister und fettleibige, jedoch nicht diabetische, Zuckerratten einer Behandlung mit Metformin oder Troglitazon unterzogen. Die Medikamente wurden in einer Konzentration von 16.6 mg/g in das Futter Purina 5008 gemischt. Die Ergebnisse zeigten eine präventive (=„glukosestabilisierende“) Wirkung von Metformin auf die Entwicklung der Hyperglykämie von ZDF-Ratten. Ähnliches wurde ja in der vorliegenden Studie bei früher Intervention mit Pioglitazon gefunden. Eine präventive Intervention mit Metformin wurde in der vorliegenden Arbeit zwar nicht untersucht, in der Studie von Sreenan et al fällt aber ins Auge, dass Metformin auch eine sehr ausgeprägte „gewichtsstabilisierende“ Wirkung hatte. In einer Altersphase, in der Ratten für gewöhnlich stark wachsen, fielen die Metformin-behandelten gesunden und adipösen Gruppen gegenüber den Kontrolltieren an Gewicht zurück und zwar in einem Ausmaß, dass weit über Gewichtsreduktionen hinaus geht, wie sie in der Klinik an Metformin-behandelten Patienten beobachtet werden.

Die mangelnde Gewichtszunahme in den Metformin-behandelten Gruppen dieser Studie [175] könnte aus einer geringeren Futteraufnahme resultieren, etwa wegen eines schlechten Geschmacks des ins Futter eingemischten Metformins. Die Futteraufnahme der unbehandelten Tier wurde nicht protokolliert, somit ist ein

Vergleich dieser nicht möglich. Jedoch ist ersichtlich, dass Troglitazon-behandelte, gesunde Tiere eine etwa 10% höhere Futteraufnahme zeigten als Metformin-behandelte (siehe Tab. D1). Das kann zumindest teilweise Folge einer den Appetit steigernden Wirkung der Thiazolidindione bei Nagern sein, wie sie auch in der vorliegenden Studie festgestellt wurde (Siehe Abb. R3-I). Die massiven, von Sreenan et al festgestellten Effekte auf das Körpergewicht kann eine solche Reduktion der Nahrungsaufnahme aber nicht erklären: gesunde, unbehandelte Tiere hatten am Ende der Behandlungszeit ein Körpergewicht von etwa 308 g. Dieses „gesunde“ Körpergewicht wurde selbst bei keiner der adipösen Metformin-behandelten Gruppen erreicht (siehe Tabelle D1), was die Frage aufwirft, wodurch eine so massive Beeinträchtigung dann hervorgerufen wird.

Tab. D1: Berechnung der in der Studie von Sreenan et al. [175] aufgenommenen Tagesdosen von Metformin oder Troglitazon.

	Gewicht (g)	Futteraufnahme (g/Ratte/Tag)	aufgenommene Tagesdosis (mg/kg/Tag)
Unbehandelt –gesund	308.0±4.7	keine Angaben	
Unbehandelt – Zuckerratte	421.6±5.2	keine Angaben	
Unbehandelt – ZDF-diabetisch	365.3±8.2	keine Angaben	
Metformin –gesund	198.8±8.9	21	1754
Metformin - Zuckerratte	224.0±0.6	19	1408
Metformin – ZDF-diabetisch	286.8±5.5	20	1158
Troglitazon - gesund	314.8±7.5	23	1213
Troglitazon - Zuckerratte	427.1±22.3	26	1011
Troglitazon – ZDF-diabetisch	420.8±32.1	29	1144

In Tabelle D1 ist auf Basis der von Sreenan et al angegebenen Daten die Tagesdosis an aufgenommenem Metformin errechnet. Es fällt auf, dass die Beimischung des Medikaments ins Futter in einer Konzentration von 16.6 mg/g zur Aufnahme von Tagesdosen von mehr als 1 g/kg oder gar mehr als 1.5 g/kg Metformin führten. Das entspricht einer 4- bis 6-fachen Dosierung im Vergleich mit den per Schlundsonde verabreichten Dosen in dieser Arbeit (300 mg/kg) und liegt

auch weit über den in anderen tierexperimentellen Studien verwendeten Metformindosen. Während ähnlich hohe Dosen von Troglitazon offenbar besser vertragen wurden, liegt für Metformin die Vermutung nahe, dass bei einer so hohen Dosierung eine toxische – oder zumindest „unspezifische“ - Wirkung des Medikaments vorlag. Dies kann das niedrige Körpergewicht der Tiere erklären. Somit ist der präventive Effekt von Metformin auf die Hyperglykämieentwicklung der ZDF-Ratten in der Studie von Sreenan et al [175] sehr wahrscheinlich Folge eines Gewichtsverlustes, der wiederum höchstwahrscheinlich auf eine massive Überdosierung des Medikamentes zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit fand die Intervention mit Metformin erst ab der Woche 10.5 statt. Obwohl zu diesem Zeitpunkt bei Pioglitazon noch glukosesenkende Wirkung vorhanden war (siehe Abb. R1), blieb die Behandlung der Tiere mit Metformin sowohl auf das Körpergewicht, als auch auf die Glykämie wirkungslos. Da sich bei ZDF-Ratten bis zu diesem Alter bereits ein Typ-2-Diabetes-ähnliches Syndrom manifestiert, ist eine präventive Wirkung von Metformin aus den hier erhobenen Daten nicht beurteilbar. Es steht aber fest, dass die negativen Befunde im Einklang mit vielen anderen Studien an Nagern sind, in denen – zumindest bei vernünftiger Dosierung - keine antidiabetischen Effekte von subchronischer Metforminbehandlung gefunden wurden.

4.1.5 Einfluss einer Intervention mit *Suaeda fruticosa*

In der vorliegenden Studie konnte durch die Behandlung mit *Suaeda f.* über 28 Tage die Glykämie beim diabetischen Tiermodell der ZDF-Ratte nicht beeinflusst werden. Lediglich das Gewicht des epididymalen Fettpolsters war unter dem Einfluss von *Suaeda f.* signifikant höher als bei den Vehikel-behandelten Kontrolltieren. Diese Resultate deuten auf eine erhöhte Einlagerung von Fett hin, wurden jedoch nicht von irgendwelchen Wirkungen auf Körpergewicht oder Blutfette begleitet. Es dürfte sich also um einen sehr moderaten Effekt, vielleicht sogar um einen Zufallsbefund handeln. Dieser Magel an Wirksamkeit von *Suaeda f.* in der vorliegenden Untersuchung steht im Gegensatz zu zwei anderen Studien, die – allerdings unter anderen Versuchsbedingungen – antidiabetische Wirkung bei Nagermodellen beschrieben haben [70, 72].

Eine dieser Studien verwendete Sandratten (*Psammomys obesus*), die in der marokkanischen Wüste gefangen worden waren. Diese Tiere, die sich in der Natur vornehmlich von kalorienarmen Wüstenpflanzen ernähren, wurden dann über 90 Tage relativ fettreich gefüttert, was zu beträchtlicher Gewichtszunahme, Glukoseintoleranz, Hyperinsulinämie und Hyperlipidämie führte. Während der letzten 45 Tage der hyperkalorischen Ernährung wurde einem Teil der Tiere täglich ein Extrakt von *Suaeda f.* verabreicht, wodurch am Ende der Untersuchung sowohl Nüchternglukose, als auch Plasmainsulin und Blutfette signifikant niedriger waren als bei der Kontrollgruppe [70]. Dass in der hier vorliegenden Studie bei ZDF-Ratten keine Veränderungen dieser Parameter festgestellt werden konnten, kann freilich auf Unterschiede zwischen den Tiermodellen der Sandratte und der ZDF-Ratte zurückzuführen sein. Die adulten Sandratten entwickelten die Entgleisung der Glukosetoleranz binnen 45 Tagen auf einer hochkalorischen Diät und auch nach weiteren 45 Tagen auf dieser Diät war die Hyperinsulinämie bei knapp verdoppelter Glykämie noch sehr ausgeprägt. Bei den genetisch adipösen ZDF-Ratten kommt es wesentlich früher, also schon im Jugendalter, zu einer Entgleisung der Glykämie bei gleichzeitigem Abfall des Plasmainsulins, sodass die Tiere bereits ab der 12. Woche an einer viel deutlicheren Hyperglykämie ohne Hyperinsulinämie leiden (Siehe Abb. R1 und R3-B). Trotzdem erklären diese Unterschiede das Ausbleiben antihyperglykämischer Wirkung bei ZDF-Ratten nicht ganz überzeugend, denn das Krankheitsstadium der beiden Tiermodelle war zum jeweiligen Zeitpunkt der Intervention mit dem Extrakt der *Suaeda f.* durchaus ähnlich (Adipositas, Hyperinsulinämie und Hyperlipidämie, aber noch keine relevante Hyperglykämie).

Eine andere Studie hat zwar auch Blutglukose-senkende Wirkung eines Extraktes von *Suaeda f.* beschrieben, das Protokoll war allerdings dem hier verwendeten nicht im Geringsten vergleichbar. Zum Einen wurden als Tiermodell des Diabetes STZ-diabetische Ratten verwendet, also ein Modell mit primärem Insulinmangel ohne Adipositas. Zum anderen kam ein für solche Fragestellungen höchst ungewöhnliches Protokoll zur Anwendung. Der Pflanzenextrakt wurde nämlich intravenös an Ratten verabreicht, die über 5h unter Narkose gehalten wurden. Die Glukose-senkende Wirkung von *Suaeda f.* trat dabei erst nach 2h und nur bei diabetischen, nicht aber bei gesunden Tieren auf [72]. Eine solche Wirkungsweise kann durch die vorliegende Arbeit freilich weder bestätigt noch widerlegt werden, da weder Kurzzeitversuche, noch intravenöse Infusionen durchgeführt wurden.

4.1.6 Einfluss einer Intervention mit *Juniperus communis*

Sánchez de Medina et al. beschrieben eine hypoglykämische Wirkung einer einzelnen Dosis des Extraktes von Juniperus-Beeren an normoglykämischen Ratten [86]. Die Akutwirkung einer Einzeldosis wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht und kann daher auch nicht kommentiert werden. In der gleichen Arbeit wurde aber auch beschrieben, dass der Beerenextrakt bei täglicher Verabreichung die Hyperglykämie von Ratten mit STZ-induziertem Diabetes reduziert und ganz Ähnliches wird von Swanston-Flatt et al. für STZ-diabetische Mäuse berichtet. Interessant ist auch, dass in beiden Arbeiten die glukosesenkende Wirkung von einer deutlichen Gewichtszunahme gegenüber dem diabetischen Kontrollkollektiv begleitet war [86, 87].

In der vorliegenden Arbeit konnte an ZDF-Tieren allerdings die antihyperglykämische Wirkung von *Juniperus communis* in keiner Weise bestätigt werden. Die Untersuchungen der Blutglukose über 28 Tage ergaben zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den *Juniperus c.*-behandelten und den Vehikel-behandelten diabetischen ZDF-Ratten. Bei der Untersuchung der Blutfette war bestenfalls ein Trend zu höheren Triglyzeriden bei *Juniperus c.*-behandelten Tieren zu erkennen. Dieser Trend war jedoch nicht signifikant und wurde nicht von veränderten Cholesterinwerten begleitet. Bei den oben erwähnten STZ-diabetischen Tiermodellen, die nicht adipös sind und deren Diabetes durch Insulinmangel bedingt ist, wurde ja unter *Juniperuseinfluss* eine Gewichtszunahme beobachtet. In den ZDF-Ratten blieben jedoch auch Körpergewicht und Gewicht des epidydimalen Fettlappens gegenüber der Vehikel-Gruppe unverändert. In den STZ-Modellen wäre es allerdings plausibel, dass die beobachtete Steigerung des Körpergewichts als sekundäre Folge der verbesserten Stoffwechsellage auftrat. Insofern wäre ein vergleichbarer Effekt auf die Gewichtsentwicklung von *Juniperus c.*-behandelten ZDF-Ratten, die ja keine Glukosesenkung zeigten, auch nicht zu erwarten.

Ob der Mangel an antidiabetischer Wirkung von Juniperus-Beeren bei ZDF-Ratten nun wirklich an den unterschiedlichen Charakteristika gegenüber dem STZ-Modell liegt, kann nicht festgestellt werden. Das Ergebnis zeigt aber wiederum, dass die Bestätigung beschriebener antidiabetischer Wirksamkeit von Pflanzenextrakten offenbar aus verschiedenen Gründen oft nicht gelingt.

4.2 db/db-Mäuse

4.2.1 Altersabhängige Entwicklung

Die Blutglukose von unbehandelten db/db-Mäusen stieg im beobachteten Altersabschnitt zwischen der Lebenswoche 8 und 12,5 kontinuierlich an. Am Ende dieses Zeitraums betrug die Hyperglykämie etwa 350 mg/dl. Die Behandlung mit Pioglitazon konnte, wie beim Tiermodell der ZDF-Ratte, dieser Entwicklung entgegenwirken. Der Anstieg der Glykämie wurde hintangehalten, die Glykämie bei etwa 150 mg/dl stabilisiert. Auch die Gewichtszunahme war bei Pioglitazon-behandelten db/db-Mäusen, wie bei ZDF-Ratten, deutlich stärker als bei den unbehandelten Kontrolltieren (siehe Abb. R10-B).

Diese Beobachtungen stimmen größtenteils mit den Ergebnissen einer anderen Studie überein [176]. In dieser Arbeit von Kawasaki et al. fällt auf, dass die dort verwendete höhere Dosierung von Pioglitazon (100 mg/kg/d) keine stärkere oder andere Wirkung auf Glykämie oder Körpergewichtszunahme hatte als die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten 30 mg/kg/d. Die von uns verwendete Tagesdosis dürfte somit maximal wirksam sein.

Yamanaka et al. untersuchten die Wirkung von 40 mg/kg/d Pioglitazon bei Behandlung ab der 10. Lebenswoche der db/db-Mäuse. Zu diesem Zeitpunkt war die Nüchternblutglukose der Tiere bereits in einem diabetischen Bereich bei etwa 360 mg/dl. Die Behandlung mit Pioglitazon zeigte bereits nach 3 Tagen eine signifikante Reduktion der Glykämie und bewirkte nach 21 Tagen ein Absinken auf etwa 180 mg/dl [177]. Dies unterstützt grundsätzlich unsere Ergebnisse, dass Pioglitazon bei db/db-Mäusen eine starke Wirkung hat. Während die vorliegende Arbeit sowie die von Kawasaki et al. allerdings eine präventive Wirkung des Medikamentes darstellen, belegen die Ergebnisse von Yamanaka et al. eine therapeutische Wirkung, wie sie bei db/db-Mäusen nicht in vergleichbarem Ausmaß gefunden werden konnte. Die Messung des Plasmainsulins durch Yamanaka et al. bestätigt unsere Ergebnisse, dass durch Pioglitazon dieser Wert nicht signifikant erhöht ist (siehe Abb. R10-C).

4.2.2 Einfluss einer Intervention mit *Bridelia ndellensis*

Durch die Behandlung mit einem Extrakt von *Bridelia n.* ab der achten Lebenswoche (Blutglukose ca. 280 mg/dl) konnte bei db/db-Mäusen ein weiterer Anstieg der Blutglukose verhindert werden. Die mittleren Glukosewerte der mit *Bridelia n.*-behandelten Mäuse lagen immer unter jenen der Kontrollmäuse, ab der 11. Lebenswoche war dieser Unterschied signifikant. Auch im oralen Glukosetoleranztest war eine deutlich geringere Exkursion der Blutglukose bei den mit *Bridelia n.*-behandelten Mäusen festzustellen und die glukosesenkende Wirkung des Pflanzenextrakts somit deutlich zu erkennen. Die behauptete antidiabetische Wirkung des Extraktes konnte also grundsätzlich bestätigt werden.

Untersuchungen zur Glukosetoleranz wurden auch von Sokeng et al. durchgeführt, jedoch an Ratten. mit STZ-induziertem Diabetes. Auch wurde in dieser Arbeit die Wirkung einer einzigen und wesentlich höheren Dosis des Pflanzenextrakts (1,25 g/kg) untersucht, die gleichzeitig mit der Glukose verabreicht wurde. 30 bzw. 75 Minuten später wurde eine starke Reduktion des Glukoseanstiegs (um 32% bzw. 35%) durch den Pflanzenextrakt gemessen [90]. Da in den Versuchen von Sokeng et al. eine antihyperglykämische Wirkung offenbar vom Vorhandensein ausreichend funktionsfähiger β -Zellen abhängig war, wurde spekuliert, dass der Ethanolextrakt von *Bridelia n.* ähnlich wie Sulfonylharnstoffe die Insulinsekretion aus den β -Zellen der Pankreas stimuliert. Dass sowohl bei Sokeng et al. als auch in den hier beschriebenen Versuchen niemals eine echte hypoglykämische Wirkung bei nüchternen Tieren gefunden wurde, spricht allerdings gegen eine glukoseunabhängige Stimulation der Insulinsekretion, wie sie für Sulfonylharnstoffe bekannt ist [178]. Sokeng et al. spekulieren weiters, dass die antihyperglykämische Wirkung zumindest teilweise auf eine Hemmung der intestinalen Glukoseresorption und Freisetzung des Glukagon-like Protein-1 (welches auch glukoseabhängig die Insulinproduktion stimuliert) zurückzuführen sein könnte [90].

Wenn auch in den vorliegenden Untersuchungen die glukosesenkende Wirkung des Extraktes von *Bridelia n.* bestätigt wurde, so weisen die Ergebnisse aus dem hier angewandten subchronischen Behandlungsregime bezüglich des Wirkmechanismus allerdings in eine andere Richtung als bei Sokeng et al, die Akuteffekte untersuchten. Zu berücksichtigen ist in der vorliegenden Studie nämlich die beträchtliche Reduktion des Körpergewichtes der mit *Bridelia n.*-behandelten Mäuse gegenüber den Vehikel-

behandelten Kontrolltieren. Ein signifikanter Unterschied war schon nach der ersten Behandlungswoche zu erkennen. Obwohl im weiteren Verlauf beide Gruppen konstant und in ähnlichem Ausmaß zunahmen, blieben die *Bridelia n.*-behandelten Mäuse bis zum Ende des Experiments signifikant leichter als die Kontrolltiere (siehe Abb. R11-C). Auch die Futtermittelaufnahme dieser Tiere war über die gesamte Versuchsdauer niedriger als jene der Kontrolltiere, obwohl hier aufgrund der geringen Käfigzahl keine aufschlussreiche statistische Analyse möglich ist (siehe Abb. R11-H und R11-I). Es scheint nicht nur möglich, sondern durchaus wahrscheinlich, dass die Reduktion von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht Ursache der verbesserten Glykämie dieser adipösen Mäuse war. Als Ursache für Appetitlosigkeit kommen allerdings verschiedenste unspezifische Nebenwirkungen wie Übelkeit und andere gesundheitliche Beeinträchtigungen in Frage – also „Mechanismen“, die für ein antidiabetisches Therapeutikum sicher nicht attraktiv sind. In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, dass 37,5% der *Bridelia n.*-behandelten Tiere im Verlauf des mehrwöchigen Experiments verendet sind. Untersuchungen zur Ermittlung der Todesursache wurden nicht durchgeführt. Eine Assoziation zwischen besonders starken Reduktionen von Körpergewicht oder Blutglukose mit dem Tod der Tiere konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Wenn die vorliegende Studie auch das Vorhandensein einer antihyperglykämischen Wirkung des Extraktes von *Bridelia n.* grundsätzlich bestätigt, so sind doch weitere Untersuchungen des Pflanzenextraktes notwendig, bevor dieser als geeignetes antidiabetisches Therapeutikum diskutiert werden kann. Reduktionen von Appetit und Körpergewicht, die durchaus eine Reduktion der Hyperglykämie nach sich ziehen mögen, können nämlich durch viele höchst unspezifische Formen des Unwohlseins und der gesundheitlichen Beeinträchtigung hervorgerufen werden.

4.2.3 Einfluss einer Intervention mit *Ceiba pentandra*

Die antihyperglykämische Wirkung von *Ceiba p.*, wie sie in verschiedenen Arbeiten an STZ-diabetischen Nagern beschrieben wurde [134, 135, 179], konnte mit unseren Untersuchungen nicht eindeutig bestätigt werden. Obwohl Trends in dieser Richtung zu beobachten waren, konnten signifikante Reduktionen von Blutglukose, Körpergewicht oder Nahrungsaufnahme zwischen den *Ceiba p.*-behandelten und den Kontrolltieren nicht nachgewiesen werden. Auch im oralen Glukosetoleranztest

waren die Glukosewerte der *Ceiba p.*-behandelten Tiere zwar im Trend etwas niedriger, jedoch von jenen der Vehikel-behandelten Tiere nicht signifikant unterschiedlich. Lediglich für das Plasmacholesterin wurde unter dem Einfluss von *Ceiba p.* ein höherer Wert gemessen. Nachdem die Triglyceride unauffällig waren, lässt sich der Abweichung dieses Parameters nicht allzu viel Gewicht beimessen.

Die antihyperglykämische Wirkung eines Extraktes von *Ceiba p.* wurde in Arbeiten von Dzeufiet sowohl an STZ-induzierten diabetischen, als auch an gesunden Wistar-Ratten beschrieben. Bei beiden Tiermodellen konnte durch die einmalige wie auch durch regelmäßige Gabe von *Ceiba p.* eine Senkung der Blutglukose erreicht werden. Die Autoren spekulieren über eine insulinähnliche Wirkung mit verbesserter Glukoseaufnahme und -verstoffwechslung in peripheren Geweben und/oder reduzierter hepatischer Glukoneogenese [135]. In einer Arbeit von Ladeji et al. werden ebenfalls positive Resultate bezüglich einer antihyperglykämischen Wirkung in STZ-induzierten diabetischen Ratten präsentiert. Dafür wurde jedoch ein Extrakt aus der Stammrinde von *Ceiba p.* hergestellt und nicht wie bei Dzeufiet et al. und in der vorliegenden Arbeit eine Extrakt aus Wurzelrinde. Durch 28-tägige orale Verabreichung des Pflanzenextraktes konnte Ladeji et al. die Glykämie der diabetischen Tiere signifikant reduzieren. Als mögliche Mechanismen werden sowohl eine Insulinsensitivierung als auch ein antioxidativer Schutz der verbliebenen β -Zellen durch den Karotenoide im Extrakt diskutiert [179].

All diese Befunde wurden durch die hier präsentierten Untersuchungen nicht bestätigt, in denen weder die Glukose oder Lipide gesenkt wurden, noch Veränderungen in der Muskel- und Leberglykogenkonzentration verzeichnet festgestellt.

4.3 Konklusion

Die vorliegende Arbeit untermauert die Eignung von ZDF-Ratten und db/db-Mäusen für präklinische pharmakologische Modellstudien über Typ 2 Diabetes, insbesondere für Untersuchungen zur Pharmakologie von Insulinsensitizern, wie am Beispiel eines Thiazolidindions dargestellt wurde. In einer genauen Analyse des ZDF-Syndroms wurden aber Unterschiede auch zum humanen Typ 2 Diabetes festgestellt, die bei der Interpretation von Befunden berücksichtigt werden müssen. Insbesondere wurde dargestellt, dass die Glukoseaufnahme in die Zelle und die Glykogenspeicherung bei Ratten offenbar in anderer, weniger insulinabhängiger Weise reguliert werden als beim Menschen, was zu einer unterschiedlichen longitudinalen Entwicklung der Adipositas-assoziierten Störungen des Glukosestoffwechsels führt. Darüber bringen die Ergebnisse Hinweise, in welcher Weise Veränderungen von Glykogengehalt, p70S6-Kinase-Aktivität und Plasmaadiponektinkonzentration zur insulin-sensitivierenden Wirkung von TZDs beitragen könnten.

Der Versuch, mit Hilfe solcher Nagermodelle eine antidiabetische Wirksamkeit von Pflanzenextrakten nachzuweisen, zeigte aber, dass in anderen Protokollen beschriebene Effekte kaum zu bestätigen waren. Ähnlich verlief auch eine Anzahl von weiteren, parallelen Untersuchungen von anderen Pflanzenheilmitteln, die allerdings nicht Teil dieser Dissertation waren [180, 181]. Die möglichen Ursachen hierfür sind vielfältig und schließen ein,

- dass die Wirksamkeit vieler Pflanzenextrakte auf spezifische Syndrome und Studiendesigns beschränkt sein könnten. Hier ist allerdings anzumerken, dass die eingesetzten Modelle durchaus auf ein breites Spektrum etablierter Antidiabetika gut ansprechen.
- dass der genaue Vorgang der Gewinnung wirksamen Pflanzenmaterials von großer Bedeutung ist und Faktoren wie Standort, Jahreszeit der Ernte und Lagerung für die Pflanzeninhaltsstoffe sehr bedeutsam sein könnte. Wenn dies allerdings tatsächlich der Fall ist, so wäre die wiederholte Herstellung eines wirksamen Extraktes in letzter Konsequenz kaum verlässlich zu bewerkstelligen, was die Brauchbarkeit solcher Naturheilmittel in Frage stellen würde.

- dass kleine Unterschiede in der Prozedur der Extraktgewinnung bedeutsam sein könnten. Die Möglichkeiten, Wirkstoffe aus Pflanze zu gewinnen, sind sehr vielfältig und tragen das Risiko mit sich, die entscheidenden Komponenten nicht in ausreichender Menge zu gewinnen oder sie in nachfolgenden Schritten wieder zu verlieren. Sokeng et al. haben nachgewiesen, dass bei der Ethanolextraktion von *Bridelia n.* Ethylacetat- und Dichlormethanbruchstücke eine glukosesenkende Wirkung aufweisen [90]. Im Gegensatz dazu hat das Buthanolextrakt der gleichen Pflanze keinerlei Wirkung, um nur ein Beispiel zu nennen. Auch ist fraglich, in wie fern Herstellungsmethoden von Heilern unter Laborbedingungen nachvollzogen werden können. Eine genaue Befragung und Beobachtung der traditionellen Heiler in der Anwendung ist freilich essentiell. Es ist aber anzumerken, dass bei den hier verwendeten Extrakten so detailliert wie möglich Verfahren nachvollzogen wurden, die auch an anderer Stelle unter Laborbedingungen durchgeführt wurden und zu Extrakten mit glukosesenkender Wirkung geführt haben sollen.

Die geringe Erfolgsrate beim Versuch, angeblich antihyperglykämische Effekte von Naturheilmitteln zu bestätigen, muss aber auch zu der Frage führen, ob viele der zahllosen Studien und Berichte über wirksame Pflanzenextrakte womöglich von unzureichender Qualität oder gar unseriös sind. Anekdotische Erfahrungen, die im Verlauf der Recherchen zur vorliegenden Arbeit gemacht wurden, weisen jedenfalls darauf hin, dass gerade bei Studien über Naturheilmittel haarsträubende Fehler im Studienablauf bis hin zu echtem Betrug durchaus als Ursache erstaunlicher Ergebnisse in Frage kommen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Campbell NA: Dt. Übers. Hrsg. Von Jürgen Markl: *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1997
- [2] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemie*. Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 2003
- [3] Eckert R: *Tierphysiologie*. Thieme Verlag, 2002
- [4] Klinker R, Pape H-C, Silbernagl S: *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005
- [5] Emmig C.T: *Chemie für Mediziner*. Thieme Verlag, Stuttgart, 2002
- [6] Avruch J: *Insulin signal transduction through proteinkinase cascades*. Molecular and Cellular Biochemistry 182: 31–48, 1998
- [7] Tremblay F, Marette A: *Amino Acid and Insulin Signaling via the mTOR/p70 S6 Kinase Pathway*, J Biol Chem. 276(41):38052-60, 2001
- [8] http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Insulin_Receptor.html, abgerufen am 22.1.2009
- [9] Cho DH, Choi YJ, Jo SA, Ryou J, Kim JY, Chung J, Jo I. *Troglitazone acutely inhibits protein synthesis in endothelial cells via a novel mechanism involving protein phosphatase 2A-dependent p70 S6 kinase inhibition*. Am J Physiol Cell Physiol. 291(2):C317-26, 2006
- [10] Waldhäusl W: *Diabetes in der Praxis*. Springer Verlag, Berlin, 2004
- [11] Ludvik B: *Therapie mit Glitazonen*. Ärztemagazin 1-2/2005: 12-14, 2005
- [12] Stryjek-Kaminska D: *Thiazolidindione mit Metformin*, Der Allgemeinarzt 8:632-4, 2003
- [13] DeFronzo RA: *The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM*. Diabetes 6: 667-687, 1988
- [14] De Fronzo RA: *Pharmacologic Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus*, Ann Intern Med. 1999 Aug 17;131(4):281-303, 1999
- [15] Jeppesen J, Zhou MY, Chen YD, Reaven GM.: *Effect of Metformin on postprandial lipemia in patients with fairly to poorly controlled NIDDM*. Diabetes Care. 17: 1093-9, 1994
- [16] Reaven GM, Johnston P, Hollenbeck CB, Skowronski R, Zhang JC, Goldfine ID, Chen YD.: *Combined Metformin-sulfonylurea treatment of patients with noninsulin-dependent diabetes in fair to poor glycemic control*. J Clin Endocrinol Metab. 74: 1020-6, 1992

- [17] UK Prospektive Diabetes Study (UKPDS) Group: *Effect of intensive blood-glucose control with Metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34)*. The Lancet. Vol 352: 854-65, 1998
- [18] Owen MR, Doran E, Halestrap AP: *Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain*. Biochem J. 348 Pt 3:607-14, 2000
- [19] Rossetti L, DeFronzo RA, Gherzi R, Stein P, Andraghetti G, Falzetti G, Shulman GI, Klein-Robbenhaar E, Cordera R: *Effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats: in vivo and in vitro correlations*. Metabolism. Apr;39(4):425-35, 1990
- [20] Klip A, Leiter LA. *Cellular mechanism of action of Metformin*. Diabetes Care. 13:696-704, 1990
- [21] Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE: *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action*. J Clin Invest. 2001 Oct;108(8):1167-74. 2001
- [22] DeFronzo RA, Barzilai N, Simonson DC: *Mechanism of metformin action in obese and lean noninsulin-dependent diabetic subjects*. J Clin Endocrinol Metab. 1991 Dec;73(6):1294-301, 1991
- [23] Johnson AB, Webster JM, Sum CF, Heseltine L, Argyraki M, Cooper BG, Taylor R: *The impact of metformin therapy on hepatic glucose production and skeletal muscle glycogen synthase activity in overweight type II diabetic patients*. Metabolism. 1993 Sep;42(9):1217-22, 1993
- [24] <http://www.ifap.de/bda-manuale/diabetes/medikamentoes/metformin.html>
abgerufen am 12.4.2008
- [25] Fürnsinn C, Waldhäusl W: *Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro*. Diabetologia. 2002 Sep;45(9):1211-23, 2002
- [26] Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhäusl W, Fürnsinn C: *Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?* Diabetes. 2004 Apr;53(4):1052-9, 2004
- [27] Schoonjans K, Auwerx J: *Thiazolidinediones: an update*. Lancet. 2000 Mar 18;355(9208):1008-10. 2000
- [28] Watkins PB, Withcomb RW: *Hepatic dysfunction associated with troglitazone*. N Engl J Med 338: 916-7, 1998
- [29] Gillies PS, Dunn CJ: *Pioglitazone*. Drugs. 2000 Aug;60(2):333-43, 2000
- [30] Krusche D: *The glitazones - proceed with caution*. West J Med. 2000 July; 173(1): 54-57, 2000

- [31] Day C: *Thiazolidindiones: a new class of antidiabetic drugs*. Diabet Med 1999, 16: 179-192, 1999
- [32] Berg AH, Scherer PE: *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. Circ Res. 2005 May 13;96(9):939-49, 2005
- [33] Ukkola O, Santaniemi M: *Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities?* J Mol Med. 2002 Nov;80(11):696-702, 2002
- [34] Díez JJ, Iglesias P: *The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease*. Eur J Endocrinol. 2003 Mar;148(3):293-300, 2003
- [35] Calabro P, Yeh ET: *Intra-abdominal adiposity, inflammation, and cardiovascular risk: new insight into global cardiometabolic risk*. Curr Hypertens Rep. 2008 Feb;10(1):32-8, 2008
- [36] <http://www.diabetes-und-insulinresistenz.de/news/2005-10.htm>, abgerufen am 20.10.2008
- [37] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T: *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. Nature. 2003 Jun 12;423(6941):762-9. 2003
- [38] <http://ch.oddb.org/de/gcc/resolve/pointer/!fachinfo,1428593>, abgerufen am 4.6.2008
- [39] Brunmair B, Gras F, Neschen S, Roden M, Wagner L, Waldhäusl W, Fürnsinn C: *Direct thiazolidinedione action on isolated rat skeletal muscle fuel handling is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated changes in gene expression*. Diabetes. 2001 Oct;50(10):2309-15, 2001
- [40] Szöcs Z: *Wirkungen des Antidiabetikums BLX-1002 auf Mitochondrienfunktion und Stoffwechsel des isolierten Rattenmuskels*. Diplomarbeit an der Formal- und Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien, 2006
- [41] Kato MF, Shibata R, Obata K, Miyachi M, Yazawa H, Tsuboi K, Yamada T, Nishizawa T, Noda A, Cheng XW, Murate T, Koike Y, Murohara T, Yokota M, Nagata K: *Pioglitazone attenuates cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension: role of activation of AMP-activated protein kinase and inhibition of Akt*. J Hypertens. 2008 Aug;26(8):1669-76, 2008
- [42] Zucker, LM: *Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipidemia*, NY Acad. Science 131, p447-458, 1965
- [43] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: *Positional Cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, Vol 372, 425-32, 1994
- [44] Godbole V, York DA: *Lipogenesis in situ in the genetically obese Zucker fatty rat (fa/fa): role of hyperphagia and hyperinsulinaemia*. Diabetologia. 1978 Mar;14(3):191-7, 1978

- [45] Ikeda H, Shino A, Matsuo T, Iwatsuka H, Suzuoki Z: *A new genetically obese-hyperglycemic rat (Wistar fatty)*. *Diabetes*. 1981 Dec;30(12):1045-50, 1981
- [46] Vincon M: *Hämodynamische Untersuchungen an Typ 2-diabetischen Ratten – Einfluss des ACE-Inhibitors Ramipril*. Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2004
- [47] Peterson RG, Shaw WN, Neel M-A, Little LA, Eichberg J. *Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *ILAR J* 1990; 32:16-9, 1990
- [48] Etgen GJ, Oldham BA: *Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state*. *Metabolism*, 49(5), 684-8, 2000
- [49] Griffen SC, Wang J, German MS: *A Genetic Defect in β -Cell Gene Expression Segregates Independently From the fa Locus in the ZDF Rat*. *Diabetes* Vol. 50, 63-69, 2001
- [50] http://www.criver.com/flex_content_area/documents/rm_rm_d_zdf_rat.pdf, abgerufen am 12.4.2008
- [51] Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS: *Adiponectin acts in the brain to decrease body weight*. *Nat Med*. 2004 May;10(5):524-9, 2004
- [52] Bray GA, York DA: *Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis*. *Physiol Rev*. 1979 Jul;59(3):719-809, 1979
- [53] Hummer KP, Dickie MM, Coleman DL: *Diabetes, a new mutation in the mouse*. *Science* 153, 1127-1128, 1966
- [54] Bailey CJ, Flatt PR, Deacon CF, Shaw C, Conlon JM: *Substance P, neurokinin A, vasoactive intestinal polypeptide and gastrin releasing peptide in the intestine and pancreas of spontaneously obese-diabetic mice*. *Regul Pept*. 1986 Dec 30;16(3-4):339-48, 1986
- [55] Herberg L, Coleman DL: *Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes*. *Metabolism*. 1977 Jan;26 (1):59-99,1977
- [56] Garris DR, Coleman DL: *Diabetes-associated changes in estradiol accumulation in the aging C57BL/KsJ mouse brain*. *Neurosci Lett*. 1984 Aug 31;49(3):285-90. 1984
- [57] Chen D, Wang MW: *Development and application of rodent models for type 2 diabetes*. *Diabetes Obes Metab*. 2005 Jul;7(4):307-17. 2005
- [58] Efron DH, Holmstedt B, Kline NS: *Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs*. Washington, D.C; Government Printing Office 1967, pp. 385-391. 1967
- [59] Bruhn JC, Holmstedt B: *Ethnopharmacology: objectives principles and perspectives* In: Beal JL, Reinhard E(eds.): *Natural Products as Medicinal Agents*. Stuttgart: Hippokrates 1981: 405-430, 1981

- [60] Prinz A: *Grundlagen für eine integrative Ganzheitsmedizin*. Facultas, Wien 1993
- [61] Heinrich M, Pieroni A: *Ethnopharmakologie heute: Ziele und Aufgaben*. Zeitschrift für Phytotherapie 236-240, 2001
- [62] Rättsch Ch: *Die Alraune heute*; in: Adolf Taylor Starck 1917, Nachdr. 87–103, 1997
- [63] Posey DA: *Indigenous knowledge and conservation: missing link and forgotten knowledge*. Topics in Primatology Vol. 2, 329-343, 1992
- [64] <http://de.wikipedia.org/wiki/Suaeda> abgerufen am 2.4.2009
- [65] Stewart GR, Lee JA: *The role of proline accumulation in halophytes*. *Planta*, Springer Verlag, Heidelberg, Volume 120, Number 3 / Januar 1974, p 279-89. 1974
- [66] Sandberg et al. aus Lellau TF: *Isolierung und charakterisierung von sekundären Naturheilstoffen aus Halophyten*, Dissertation an der Universität Oldenburg, 2001
- [67] Fern K: <http://www.pfaf.org/database/plants.php?Suaeda+fruticosa>, abgerufen am 25.3.2009
- [68] http://www.aluka.org/action/showMetadata?doi=10.5555%2FAL.AP.UPWTA.1_720, abgerufen am 25.3.2009
- [69] Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC: *Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement)*. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi. 1986
- [70] Bennani-Kabchi N, el Bouayadi F, Kehel L, Fdhil H, Marquié G: *Effect of Suaeda fruticosa aqueous extract in the hypercholesterolaemic and insulin-resistant sand rat*. Therapie. 1999 Nov-Dec; 54(6):725-30. 1999
- [71] Amin RM, Abdul G, Abdul-Salam S, Suleiman MS: *Effect of Fenugreek an Lupin seeds on the development of experimental diabetes rats*. *Planta Medica*; 54: 286-290, 1988
- [72] Benwahhoud M, Jouad H, Eddouks M, Lyoussi B: *Hypoglycemic effect of Suaeda fruticosa in streptozotocin-induced diabetic rats*. *J Ethnopharmacol*. 2001 Jun; 76(1):35-8. 2001
- [73] Aharonson Z, Shani J, Sulman FG: *Hypoglycaemic effect of the salt bush (Atriplex halimus): a feeding source of the sand rat (Psammomys obesus)*. *Diabetologia* 5, 379–383. 1969
- [74] <http://www.baumkunde.de/> abgerufen am 10.7.2008
- [75] <http://www.baumdesjahres.de/> abgerufen am 10.7.2008

- [76] Hahn G, Hahn M: *Zypressengewächse, Keineswegs nur Parkbäume und Holzlieferant, sondern auch Medizinalpflanzen*. Originalia, EHK 6/2003, 371-385, 2003
- [77] www.apotheker.or.at abgerufen am 10.7.2008
- [78] no authors listed: *Final report on the safety assessment of Juniperus communis Extract, Juniperus oxycedrus Extract, Juniperus oxycedrus Tar, Juniperus phoenicea extract, and Juniperus virginiana Extract*. *Int J Toxicol Suppl*. 2001. 2:41-56. 2001
- [79] Prakash AO, Saxena V, Shukla S, Tewari RK, Mathur S, Gupta A, Sharma S, Mathur R: *Anti-implantation activity of some indigenous plants in rats*. *Acta Eur Fertil*. 1985 Nov-Dec;16(6):441-8. 1985
- [80] Chaudhury RR: *The quest for a herbal contraceptive*. *Natl Med J India*. 1993 Sep-Oct;6(5):199-201. 1993
- [81] Emami SA, Asili J, Mohagheghi Z, Hassanzadeh MK: *Antioxidant activity of leaves and fruits of Iranian conifers*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007 Sep;4(3):313-9. 2007
- [82] Łuczaj Ł, Szymański WM: *Wild vascular plants gathered for consumption in the Polish countryside: a review*. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2007 Apr 15;3:17. 2007
- [83] Filipowicz N, Kamiński M, Kurlenda J, Asztemborska M, Ochocka JR: *Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components*. *Phytother Res*. 2003 Mar;17(3):227-31. 2003
- [84] Petlevski R, Hadzija M, Slijepcevic M, Juretic D: *Effect of 'antidiabetis' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice*. *J Ethnopharmacol*. 2001 May;75(2-3):181-4. 2001
- [85] Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR: *Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice*. *Diabetologia*. 1990 Aug;33(8):462-4. 1990
- [86] Sánchez de Medina F, Gámez MJ, Jiménez I, Jiménez J, Osuna JI, Zarzuelo A: *Hypoglycemic activity of juniper "berries"*. *Planta Med*. 1994 Jun;60(3):197-200. 1994
- [87] <http://www.aluka.org>, abgerufen am 14.10.2008
- [88] Burkill HM: *The useful plants of west tropical Africa, Vol 2*, Balogh Scientific Books, 1985.
- [89] Lockett CT, Grivetti LE: *Food-related behaviors during drought: a study of rural Fulani, northeastern Nigeria*. *Int J Food Sci Nutr*. 2000 Mar;51(2):91-107. 2000
- [90] Sokeng SD, Rokeya B, Mostafa M, Nahar N, Mosihuzzaman M, Ali L, Kamtchouing P: *Antihyperglycemic effect of Bridelia ndellensis ethanol extract and fractions in streptozotocin induced diabetic rats*. *Afr. J. Trad. CAM* 2 (2): 94-102, 2005

- [91] Omolo OJ, Chhabra SC, Nyagah G: *Iron content of some edible leafy vegetables and medicinal plants used traditionally for anaemia treatment in East Africa*. Afr J Health Sci. 2001 Jan-Jun;8(1-2):55-60. 2001
- [92] Omolo OJ, Chhabra SC, Nyagah G: *Determination of iron content in different parts of herbs used traditionally for anaemia treatment in East Africa*. J Ethnopharmacol. 1997 Oct;58(2):97-102. 1997
- [93] Jurg A, Tomás T, Pividal J: *Antimalarial activity of some plant remedies in use in Marracuene, southern Mozambique*. J Ethnopharmacol. 1991 May-Jun; 33 (1-2): 79-83. 1991
- [94] Mpiana PT, Tshibangu DS, Shetonde OM, Ngbolua KN: *In vitro antitrepanocytary activity (anti-sickle cell anemia) of some congolese plants*. Phytomedicine. 2007 Feb;14(2-3):192-5. 2007
- [95] Olajide OA: *Investigation of the effects of selected medicinal plants on experimental thrombosis*. Phytother Res. 1999 May;13(3):231-2. 1999
- [96] Cimanga K, De Bruyne T, Apers S, Pieters L, Totté J, Kambu K, Tona L, Bakana P, van Ufford LQ, Beukelman C, Labadie R, Vlietinck AJ: *Complement-Inhibiting Constituents of Bridelia ferruginea Stem Bark*. Planta Med. 1999 Apr;65(3):213-7. 1999
- [97] Onoruvwe O, Olayinka AO, Lot TY, Udoh FV: *Effects of stem bark and leaf extracts of Bridelia ferruginea on rat bladder smooth muscle*. Fitoterapia. 2001 Mar;72(3):230-5. 2001
- [98] Cimanga K, Ying L, De Bruyne T, Apers S, Cos P, Hermans N, Bakana P, Tona L, Kambu K, Kalenda DT, Pieters L, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ: *Radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity of phenolic compounds from Bridelia ferruginea stem bark*. J Pharm Pharmacol. 2001 May;53(5):757-61. 2001
- [99] Olajide OA, Okpako DT, Makinde JM: *Anti-inflammatory properties of Bridelia ferruginea stem bark. Inhibition of lipopolysaccharide-induced septic shock and vascular permeability*. J Ethnopharmacol. 2003 Oct;88(2-3):221-4. 2003
- [100] Olajide OA, Makinde JM, Okpako DT, Awe SO: *Studies on the anti-inflammatory and related pharmacological properties of the aqueous extract of Bridelia ferruginea stem bark*. J Ethnopharmacol. 2000 Jul;71(1-2):153-60. 2000
- [101] Théophile D, Laure NE, Benoît NT, Anatole AG, Emmanuel AA, Paul TV, Pierre K: *Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethyl acetate stem bark extract of Bridelia scleroneura (Euphorbiaceae)*. Inflammopharmacology. 2006 Mar;14(1-2):42-7. 2006
- [102] Talla E, Djamen D, Djouldé D, Tatsadjeu L, Tantoh D, Mbafor JT, Fomum ZT: *Antimicrobial activity of Bridelia ferruginea leaves extracts*. Fitoterapia. 2002 Jul;73(4):343-5. 2002
- [103] Akinpelu DA, Olorunmola FO: *Antimicrobial activity of Bridelia ferruginea fruit*. Fitoterapia. 2000 Feb;71(1):75-6. 2000

- [104] Irobi ON, Moo-Young M, Anderson WA, Daramola SO: *Antimicrobial activity of bark extracts of Bridelia ferruginea (Euphorbiaceae)*. J Ethnopharmacol. 1994 Jul 22;43(3):185-90. 1994
- [105] Ramesh N, Viswanathan MB, Saraswathy A, Brindha P, Balakrishna K, Lakshmanaperumalsamy P, Patra A: *Antibacterial activity of luteoforol from Bridelia crenulata*. Fitoterapia. 2001 May;72(4):409-11. 2001
- [106] Kotigadde S, Jose S, Zachariah A, Premanathan P, Bhat KG: *Antibacterial activity of Bridelia scandens*. J Commun Dis. 2005 Jun;37(2):135-7. 2005
- [107] Lin J, Puckree T, Mvelase TP: *Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers*. J Ethnopharmacol. 2002 Jan;79(1):53-6. 2002
- [108] Abo KA, Ashidi JS: *Antimicrobial screening of Bridelia micrantha, Alchornea cordifolia and Boerhavia diffusa*. Afr J Med Med Sci. 1999 Sep-Dec;28(3-4):167-9. 1999
- [109] Gangoué-Piéboji J, Baurin S, Frère JM, Ngassam P, Ngameni B, Azebaze A, Pegnyemb DE, Watchueng J, Goffin C, Galleni M: *Screening of some medicinal plants from cameroon for beta-lactamase inhibitory activity*. Phytother Res. 2007 Mar;21(3):284-7. 2007
- [110] Jayasinghe L, Kumarihamy BM, Jayarathna KH, Udishani NW, Bandara BM, Hara N, Fujimoto Y: *Antifungal constituents of the stem bark of Bridelia retusa*. Phytochemistry. 2003 Feb;62(4):637-41. 2003
- [111] Corallo A, Fougbe S, Davy M, Cohen Y: *Cardiovascular pharmacology of aqueous extract of the leaves of Bridelia atroviridis Muell. Arg. (Euphorbiaceae) in the rat*. J Ethnopharmacol. 1997 Aug;57(3):189-96. 1997
- [112] Corallo A, Savineau JP, Tricoche R, Fougbe S: *The uterotonic action of the aqueous extract of Bridelia atroviridis in the rat*. Fundam Clin Pharmacol. 1991;5(4):319-29. 1991
- [113] Mostafa M, Nahar N, Mosihuzzaman M, Sokeng SD, Fatima N, Atta-Ur-Rahman, Choudhary MI: *Phosphodiesterase-I inhibitor quinovic acid glycosides from Bridelia ndellensis*. Nat Prod Res. 2006 Jun;20(7):686-92. 2006
- [114] <http://www.blueplanetbiomes.org/kapok.htm>, abgerufen am 3.9.2008
- [115] http://en.wikipedia.org/wiki/Ceiba_pentandra, abgerufen am 4.2.2009
- [116] <http://www.ub.bildarchiv-dkg.uni-frankfurt.de/Bildprojekt/Lexikon/Standardframeseite.php?suche=Kapok>, abgerufen am 4.2.2009
- [117] Ceiba Banknote: <http://www.banknotes.com/sl29.htm>
- [118] http://de.wikipedia.org/wiki/Ceiba_pentandra abgerufen am 2.4.2009
- [119] Menant M: *Medicinal Plants of East and South East Asia*. MIT Press Cambridge, UK, 1980.

- [120] Herzog F, Farah Z, Amadò R: *Nutritive value of four wild leafy vegetables in Côte d'Ivoire*. Int J Vitam Nutr Res. 1993;63(3):234-8. 1993
- [121] Narahari D, Asha Rajini R: *Chemical composition and nutritive value of kapok seed meal for broiler chickens*. Br Poult Sci. 2003 Jul;44(3):505-9. 2003
- [122] <http://www.tropilab.com/ceiba-pen.html>, abgerufen am 21.10.2008
- [123] Buenz EJ, Johnson HE, Beekman EM, Motley TJ, Bauer TA: *Bioprospecting Rumphius's Ambonese Herbal: Volume I*, J Ethnopharmacol 96:57–70. 2005
- [124] Duke JA, Vasquez R: *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. CRC-Press, p.181. 1994
- [125] Grosvenor PW, Gothard PK, Mc William NC, Supriono A, Gray DO: *Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 1+2*. J Ethnopharmacol 45, 75–95 und 97-111, 1995
- [126] Lin CC, Chen SY, Lin JM, Chiu HF: *The pharmacological and pathological studies on Taiwan folk medicine (VIII): The anti-inflammatory and liver protective effects of "mu-mien"*. Am J Chin Med.;20(2):135-46. 1992
- [127] Bizimana N, Tietjen U, Zessin KH, Diallo D, Djibril C, Melzig MF, Clausen PH: *Evaluation of medicinal plants from Mali for their in vitro and in vivo trypanocidal activity*. J Ethnopharmacol. 2006 Feb 20;103(3):350-6. 2006
- [128] Kishore PH, Reddy MV, Gunasekar D, Caux C, Bodo B: *A new naphthoquinone from Ceiba pentandra*. J Asian Nat Prod Res. 2003 Sep;5(3):227-30. 2003
- [129] Marczewski A, Ciepichal E, Canh le X, Bach TT, Swiezewska E, Chojnacki T: *The search for polyprenols in dendroflora of Vietnam*. Acta Biochim Pol.;54(4):727-32. 2007
- [130] Ueda H, Kaneda N, Kawanishi K, Alves SM, Moriyasu M: *A new isoflavone glycoside from Ceiba pentandra (L.) Gaertner*. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2002 Mar;50(3):403-4. 2002
- [131] Ngounou FN, Meli AL, Lontsi D, Sondengam BL, Atta-Ur-Rahman, Choudhary MI, Malik S, Akhtar F: *New isoflavones from Ceiba pentandra*. Phytochemistry. 2000 May;54(1):107-10. 2000
- [132] Noreen Y, el-Seedi H, Perera P, Bohlin L: *Two new isoflavones from Ceiba pentandra and their effect on cyclooxygenase-catalyzed prostaglandin biosynthesis*. J Nat Prod. 1998 Jan;61(1):8-12. 1998
- [133] Rao KV, Sreeramulu K, Gunasekar D, Ramesh D: *Two new sesquiterpene lactones from Ceiba pentandra*. J Nat Prod. 1993 Dec;56(12):2041-5. 1993
- [134] Dzeufiet PDD, Ohandja DY, Tédong L, Asongalem EA, Dimo T, Sokeng SD, Kamtchouing P: *Antidiabetic effect of ceiba pentandra extract on streptozo-tocin-induced non-insulin-dependent diabetic (NIDDM) rats*. Afr. J. Trad. Comp. Alt. Med., Volume 4, Issue 1, 47-54. 2007

- [135] Dzeufiet PDD, Tétong L, Asongalem EA, Dimo T, Sokeng SD, Kamtchouing P: *Hyperglycaemic and antidiabetic effect of root extracts of Ceiba pentandra in normal and diabetic rats*. Afr. J. Trad. Comp. Alt. Med., Volume 3, Issue 1, 129-136. 2006
- [136] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press 3, 18.47-18.59. 1989
- [137] Laemmli UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature, 227, 680-685. 1970
- [138] Weber K, Osborn M: *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. J Biol Chem. 1969 Aug 25;244(16):4406-12. 1969
- [139] Burnette WN: *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem. 1981 Apr;112(2):195-203. 1981
- [140] Towbin H, Staehelin T, Gordon J: *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl. Acad Sci USA, 1979 Sep, 76(9), 4350-4. 1979
- [141] Renart J, Reiser J, Stark GR: *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Jul;76(7):3116-20. 1979
- [142] <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:ECL.jpg&filetimestamp=20050818094645>
- [143] <http://www.rattenzauber.de/blutzapf.htm>, abgerufen am 25.9.2008
- [144] <http://www.rattenliebe.de/blutabnahme.html> abgerufen am 26.9.2008
- [145] Smith SA: *Rosiglitazone prevents the onset of hyperglycaemia and proteinuria in the Zucker diabetic fatty rat*. Diabetes Obes Metab. 2000 Dec;2(6):363-72. 2000
- [146] Finegood DT: *Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death*. Diabetes. 2001 May;50(5):1021-9. 2001
- [147] Brand CL: *Dual PPARalpha /gamma activation provides enhanced improvement of insulin sensitivity and glycemic control in ZDF rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003 Apr;284(4):E841-54. 2003
- [148] Pickavance LC: *The dual PPARalpha/gamma agonist, ragaglitazar, improves insulin sensitivity and metabolic profile equally with pioglitazone in diabetic and dietary obese ZDF rats*. Br J Pharmacol. 2005 Feb;144(3):308-16. 2005
- [149] Erdely A: *Renal disease in rats with type 2 diabetes is associated with decreased renal nitric oxide production*. Diabetologia, 2004 Oct;47(10):1672-6, 2004

- [150] DeFronzo RA: *The triumvirate: β -cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM.* 1988, *Diabetes* 37: 667-687, 1988
- [151] Carey PE, Halliday J, Snaar JE, Morris PG, Taylor R: *Direct assessment of muscle glycogen storage after mixed meals in normal and type 2 diabetic subjects.* *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Apr;284(4):E688-94. 2003
- [152] He J and Kelley DE: *Muscle glycogen content in type 2 diabetes mellitus.* *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287: E1002-E1007. 2004
- [153] Krssak M: *Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes.* *Diabetes.* 2004 Dec;53(12):3048-56. 2004
- [154] Randle PJ: *Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years.* *Diabetes Metab Rev.* 1998 Dec;14(4):263-83. 1998
- [155] Roden M: *How Free Fatty Acids Inhibit Glucose Utilization in Human Skeletal Muscle.* *News Physiol Sci.* 2004 Jun;19:92-6. 2004
- [156] Yang B, Brown KK, Chen L, Carrick KM, Clifton LG, McNulty JA, Winegar DA, Strum JC, Stimpson SA, Pahel GL: *Serum adiponectin as a biomarker for in vivo PPAR γ activation and PPAR γ agonist-induced efficacy on insulin sensitization/lipid lowering in rats.* *BMC Pharmacol.* 2004 Oct 18;4:23. 2004
- [157] Nissen SE, Wolski K: *Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes.* *N Engl J Med.* 2007 Jun 14;356(24):2457-71. 2007
- [158] Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ: *Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial.* *Lancet*; 366:1279-1289. 2005
- [159] Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA: *A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia.* *Diabetes Care*; 28:1547-1554. 2005
- [160] Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton ES, Le Winter M, Porte D, Semenkovich CF, Smith S, Young LH, Kahn R: *Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association.* *Diabetes Care.* 2004 Aug;27(8):2096; 2004
- [161] Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, Kravitz BG, Lachin JM, O'Neill MC, Zinman B, Viberti G; ADOPT Study Group: *Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy.* *N Engl J Med.* 2006 Dec 7;355(23):2427-43. 2006
- [162] Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB: *Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome.* *Diabetes Obes Metab.* 2006 May;8(3):264-80. 2006

- [163] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 2;257(1):79-83. 1999
- [164] Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA: *Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Feb;89(2):463-78. 2004
- [165] Miyazaki Y, Mahankali A, Wajcberg E, Bajaj M, Mandarino LJ, DeFronzo RA: *Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Sep;89(9):4312-9. 2004
- [166] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1288-95. 2002
- [167] Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhäusl W, Fürsinn C: *Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?* *Diabetes*. 2004 Apr;53(4):1052-9. 2004
- [168] Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB: *Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Feb 6;314(2):580-5. 2004
- [169] LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E: *Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Jul;291(1):E175-81. 2006
- [170] Nielsen JN, Derave W, Kristiansen S, Ralston E, Ploug T, Richter EA: *Glycogen synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content*. *J Physiol*. 2001 Mar 15;531(Pt 3):757-69. 2001
- [171] Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G: *Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor*. *Science*. 2001 Nov 2; 294(5544):1102-5. 2001
- [172] Cho DH, Choi YJ, Jo SA, Ryou J, Kim JY, Chung J, Jo I: *Troglitazone acutely inhibits protein synthesis in endothelial cells via a novel mechanism involving protein phosphatase 2A-dependent p70 S6 kinase inhibition*. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Aug; 291(2):C317-26. 2006
- [173] Han S, Roman J: *Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways*. *Mol Cancer Ther*. 2006 Feb; 5(2):430-7. 2006

- [174] He G, Sung YM, Digiovanni J, Fischer SM. *Thiazolidinediones inhibit insulin-like growth factor-I-induced activation of p70S6 kinase and suppress insulin-like growth factor-I tumor-promoting activity.* Cancer Res. 2006 Feb 1;66(3):1873-8.
- [175] Sreenan S: *Prevention of hyperglycemia in the Zucker diabetic fatty rat by treatment with metformin or troglitazone.* Am J Physiol. 1996 Oct;271(4 Pt 1):E742-7. 1996
- [176] Kawasaki F, Matsuda M, Kanda Y, Inoue H, Kaku K: *Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in db/db mice.* Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005 Mar;288(3):E510-8. 2005
- [177] Yamanaka M, Itakura Y, Tsuchida A, Nakagawa T, Noguchi H, Taiji M: *Comparison of the antidiabetic effects of brain-derived neurotrophic factor and thiazolidinediones in obese diabetic mice.* Diabetes Obes Metab. 2007 Nov; 9(6):879-88. 2007
- [178] MacDonald PE, Wheeler MB: *Voltage-dependent k^+ channels in pancreatic beta cells: Role, regulation and potential as therapeutic targets.* Diabetologia 46: 1046-62. 2003
- [179] Ladeji O, Omekarah I, Solomon M: *Hypoglycemic properties of aqueous bark extract of Ceiba pentandra in streptozotocin-induced diabetic rats.* J Ethnopharmacol. 2003 Feb;84(2-3):139-42. 2003
- [180] Brunmair B, Szöcs Z, Stadlbauer K, Nowotny P, Luger A, Fürnsinn C: *Keine Wirkung von Pygenol® und Myrthenöl auf die Blutglukose hyperglykämischer Zucker Diabetic Fatty- (ZDF-) Ratten.* Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel 2008,1 (Sonderheft 1), 6. 2008
- [181] Szöcs Z, Brunmair B, Stadlbauer K, Nowotny P, Luger A, Fürnsinn C: *Keine Senkung der Blutglukose von Zucker Diabetic Fatty- (ZDF-) Ratten durch Pflanzenextrakte von Suaeda fruticosa, Adhatoda vasica oder Cichorium intybus.* Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel 2008,1 (Sonderheft 1), 15. 2008

Bildquellen:

Seite 16, ZDF-Ratte: www.criver.com

Seite 19, db/db-Maus: eigene Aufnahme im Tierstall des ZBF Wien

Seite 23, Suaeda fruticosa: www.callutheran.edu/wf/images/des/des-824.jpg

Seite 25, Juniperus communis: http://www.boga.ruhr-uni-bochum.de/html/Juniperus_communis_Foto2.html

Seite 27, Bridelia ndellensis:
[http://www.metafro.be/prelude/view_symptom?si=H\(095\)](http://www.metafro.be/prelude/view_symptom?si=H(095))

Seite 30, Ceiba pentandra: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Kapok_tree-pod.jpg

6 CURRICULUM VITAE

Name: Zsuzsanna Szöcs

Geburtsdatum: 14. Oktober 1979

Geburtsort: Gheorgheni, Siebenbürgen, Rumänien

Eltern: Mária Szöcs (14. April 1959) und János Szöcs (20. September 1955)

Ausbildung:

1986-1987: Volksschule Oradea, Rumänien

1987-1990: Volksschule Lackenbach und Unterfrauenhaid, Burgenland, Österreich

1990-1994: Hauptschule Lackenbach

1994-1999: Bundeshandelsakademie Oberpullendorf

1999: Matura

1999-2004: Biologiestudium an der Universität Wien, Schwerpunkt Zoologie

2004-2006: Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Clemens Fürnsinn an der Klinik für Innere Medizin III, Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechsel und der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien.

Titel: Wirkungen des Antidiabetikums BLX-1002 auf Mitochondrienfunktion und Stoffwechsel des isolierten Rattenmuskels.

2006: Sponsion zur Magistra der Naturwissenschaften

2006-2009: Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Clemens Fürnsinn und Priv. Doz. Dr. Barbara Brunmair an der Klinik für Innere Medizin III, Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechsel und der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien

Seit 2007: Mitglied der EASD (European Association for the Study of Diabetes)

Seit 2009: Mitglied der ÖGES (Österreichische Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel)

Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen:

XII. 2004: 32. Jahrestagung der Österreichischen Diabetes Gesellschaft (ÖDG), Baden, Österreich

IV. 2005: 10. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel (ÖGES), St. Wolfgang, Österreich

XII. 2005: 33. Jahrestagung der Österreichischen Diabetes Gesellschaft (ÖDG), Baden, Österreich

III. 2007: 51. Symposium der deutschen Gesellschaft für Endokrinologie und 12. Jahrestagung der österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel, Salzburg, Österreich

V. 2007: 42. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Diabetes, Hamburg, Deutschland

IX. 2007: 43. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), Amsterdam, Niederlande

IX. 2008: 44. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), Rom, Italien

XI. 2008: 36. Jahrestagung der Österreichischen Diabetes Gesellschaft (ÖDG), Baden, Österreich

V. 2009: 14. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel (ÖGES), St. Wolfgang, Österreich

Publikationen:

Internationale Journale

Szöcs Z, Brunmair B, Stadlbauer K, Nowotny P, Bauer L, Luger A, Fürnsinn C: Age-dependent development of metabolic derangement and effects of intervention with pioglitazone in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 326: 323-9, 2008

Gras F, Brunmair B, Quarre L, **Szöcs Z**, Waldhäusl W, Fürnsinn C: Progesterone impairs cell respiration and suppresses a compensatory increase in glucose transport in isolated rat skeletal muscle: a non-genomic mechanism contributing to metabolic adaptation in late pregnancy? *Diabetologia* 50, 2544-52, 2007.

Brunmair B, Staniek K, Dörig J, **Szöcs Z**, Stadlbauer K, Marian V, Gras F, Anderwald C, Nohl H, Waldhäusl W, Fürnsinn C: Activation of PPAR- δ in rat skeletal muscle switches fuel preference from glucose to fatty acids. *Diabetologia*, 49(11):2713-22, 2006

Nationale und Internationalen Präsentationen (Poster und Vorträge)

Szöcs Z, Brunmair B, Dey D, Waldhäusl W, Fürnsinn C: Die Wirkung des neuen Antidiabetikums BLX-1002 auf den Skelettmuskel gleicht jener von Metformin, Rosiglitazon und Pioglitazon. 10. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel (ÖGES), St. Wolfgang, Österreich, 2005; Wr.Klin.Wochenschr.117 (Suppl.), A 21, 2005

Szöcs Z, Brunmair B, Stadlbauer K, Nowotny P, Bauer L, Luger A, Fürnsinn C: Wirkung von Pioglitazon in ZDF (Zucker diabetic fatty)-Ratten: Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Intervention. 51. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) und 12. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel (ÖGES), Salzburg, Österreich, 2007; Exp.Clin.Endocrinol.Diab.115 (Suppl.1), S66, 2007

Szöcs Z, Brunmair B, Stadlbauer K, Nowotny P, Bauer L, Luger A, Fürnsinn C: Wirkung von Pioglitazon in ZDF (Zucker diabetic fatty)-Ratten: Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Intervention. 42. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG), Hamburg, Deutschland; Diab.Stoffw.2 (Suppl.), S61, 2007

Szöcs Z, Brunmair B, Stadlbauer K, Nowotny P, Bauer L, Luger A, Fürnsinn C: Effects of pioglitazone on fuel homeostasis, plasma adiponectin, and p70S6 kinase activity at different stages of the diabetes-like syndrome of the Zucker diabetic fatty (ZDF) rat. 43. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), Amsterdam, Niederlande, 2007; Diabetologia 50 (Suppl.1), S264, 2007

Szöcs Z, Brunmair B, Stadlbauer K, Nowotny P, Bauer L, Luger A, Fürnsinn C: Abhängigkeit der Pioglitazonwirkung vom Zeitpunkt der Intervention in Zucker diabetic fatty (ZDF)-Ratten. 36. Jahrestagung der Österreichischen Diabetes

Gesellschaft (ÖDG), Baden, Österreich, 2008; Wr.Klin.Wochenschr.117 (Suppl.5), 2-3, 2008

Szöcs Z, Brunmair B, Stadlbauer K, Nowotny P, Luger A, Fürnsinn C: Keine Senkung der Blutglukose von Zucker Diabetic Fatty- (ZDF-) Ratten durch Pflanzenextrakte von Suaeda fruticosa, Adhatoda vasica oder Cichorium intybus. 13. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel (ÖGES), St. Wolfgang, Österreich, 2008; J.f.Klin.Endo.u.Stoffw.1 (Suppl.1), 4-18, 2008

Szöcs Z, Brunmair B, Dey D, Bolten C, Fürnsinn C: Lipophilie ist mit hemmender Wirkung von Thiazolidindionen auf die Zellatmung assoziiert. 14. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel (ÖGES), St. Wolfgang, Österreich, 2009; J.f.Klin.Endo.u.Stoffw.2 (Suppl.1), 031, 2009

Brunmair B, **Szöcs Z**, Stadlbauer K, Dey D, Waldhäusl W, Fürnsinn C: Wirkung von BLX-1002, einem Thiazolidindion ohne PPAR-agonistische Aktivität, auf Mitochondrienfunktion und zellulären Energiegehalt. 33. Jahrestagung der Österreichischen Diabetes Gesellschaft (ÖDG), Baden, Österreich, 2005; Wr.Klin.Wochenschr.117 (Suppl.5), 2-3, 2005

Brunmair B, **Szöcs Z**, Marian V, Dörig J, Gras F, Waldhäusl W, Fürnsinn C: Direct effects of PPAR δ activation on glucose oxidation and the PI3K/Akt pathway in isolated rat skeletal muscle. 65th Annual Meeting of the American Diabetes Association (ADA), Orlando, USA, 2005; Diabetes 54 (Suppl.19), A380, 2005

Brunmair B, **Szöcs Z**, Stadlbauer K, Nowotny P, Luger A, Fürnsinn C: Keine Wirkung von Pygenol® und Myrtenöl auf die Blutglukose hyperglykämischer Zucker Diabetic Fatty (ZDF-) Ratten. 13. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel (ÖGES), St. Wolfgang, Österreich, 2008; J.f.Klin.Endo.u.Stoffw.1 (Suppl.1), 4-18, 2008

Brunmair B, Staniek K, **Szöcs Z**, Nohl H, Waldhäusl W, Fürnsinn C: GW501516 beeinflusst den Muskelstoffwechsel nicht nur über PPAR- δ , sondern auch durch direkte Wirkung auf das Mitochondrium. 10. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel (ÖGES), St. Wolfgang, Österreich, 2005; Wr.Klin.Wochenschr.117 (Suppl.), A 16, 2005

Brunmair B, Staniek K, **Szöcs Z**, Dörig J, Waldhäusl W, Nohl H, Fürnsinn C: GW501516, a specific agonist of PPAR δ , has acute PPAR-independent effects on mitochondrial function. 41. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), Athen, Griechenland, 2005; Diabetologia 48 (Suppl.1), A43-A44, 2005

Stadlbauer K, Brunmair B, **Szöcs Z**, Krebs M, Anderwald C, Waldhäusl W, Fürnsinn C: Wirkung von Aminosäuren auf die Substratoxidation und die Phosphorylierung der p70S6-Kinase im isolierten Rattenmuskel. 33. Jahrestagung der Österreichischen Diabetes Gesellschaft (ÖDG), Baden, Österreich, 2005; Wr.Klin.Wochenschr.117 (Suppl.5), 22, 2005

Staniek K, Brunmair B, **Szöcs Z**, Dörig J, Waldhäusl W, Nohl H, Fürnsinn C: Effects of the PPAR- δ agonist GW501516 on mitochondrial respiration. 47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, Deutschland, 2006; Arch.Pharmacol.372 (Suppl.1), 29, 2006

Stadlbauer K, Brunmair B, **Szöcs Z**, Krebs M, Waldhäusl W, Fürnsinn C: Effekte von Aminosäure unter Rapamycin und AICAR auf die Glukoseoxidation und die Phosphorylierung der p70S6-Kinase. 11. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel (ÖGES), Linz, Österreich, 2006; Wr.Klin.Wochenschr.118, A 23, 2006

Stadlbauer K, Brunmair B, **Szöcs Z**, Krebs M, Waldhäusl W, Fürnsinn C: Amino acids inhibit glucose oxidation independently of the mTOR/p70S6-kinase pathway in isolated rat skeletal muscle. 42. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), Kopenhagen, Dänemark, 2006; Diabetologia 49 (Suppl.1), 24, 2006

Stadlbauer K, Brunmair B, **Szöcs Z**, Krebs M, Luger A, Fürnsinn C: Amino-acid-induced impairment of glucose oxidation by isolated rat muscle. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) und 12. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Endokrinologie und Stoffwechsel (ÖGES), Salzburg, Österreich 2007; Exp.Clin.Endocrinol.Diab.115 (Suppl.1), S9, 2007.

Stadlbauer K, Brunmair B, **Szöcs Z**, Nowotny P, Luger A, Fürnsinn C: Keine Verbesserung der Blutglukose in Zucker diabetic fatty (ZDF)-Ratten durch Pflanzenextrakte von Juniperus communis, Adhatoda vasica und Cichorium intybus. 36. Jahrestagung der Österreichischen Diabetes Gesellschaft (ÖDG), Baden, Österreich, 2008; Wr.Klin.Wochenschr.117 (Suppl.5), 22, 2008

Fürnsinn C, Brunmair B, Gras F, **Szöcs Z**, Waldhäusl W: Modulation of mitochondrial function: the second arm of thiazolidinedione action? 3rd International Symposium on PPARs: Efficacy and Safety, Monte Carlo, Monaco, 2005

Fürnsinn C, Brunmair B, Dey D, **Szöcs Z**, Marian V, Waldhäusl W: BLX-1002, a new antidiabetic agent, inhibits cell respiration in isolated rat skeletal muscle: parallels with metformin, rosiglitazone, and pioglitazone. 41. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD), Athen, Griechenland, 2005; Diabetologia 48 (Suppl.1), A276, 2005

Brunmair B, Gras F, Quarré L, **Szöcs Z**, Waldhäusl W, Fürnsinn C: Direct non-genomic actions of progesterone on isolated rat skeletal muscle: inhibition of cell respiration and induction of insulin resistance. 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD), Amsterdam, the Netherlands, 2007; Diabetologia 50 (Suppl.1), S280, 2007