

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der  
Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. P. von Wichert  
Klinische Forschergruppe für gastrointestinale Endokrinologie  
(Leiter: Prof. Dr. B. Göke)

---

**Etablierung eines Modells des isolierten, in vitro perfundierten  
Rattenileums zur Untersuchung der luminalen und vaskulären  
Regulation der Glukagon-like peptide-1 (GLP-1)-Sekretion**

INAUGURALDISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Alexandra Vöge**  
aus Marburg

Marburg 1997

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am  
9. Oktober 1997  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Schäfer  
Referrent: Prof. Dr. B. Göke  
Correferrent: Prof. Dr. D. Schachtschabel

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>II</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1</b>	<b>Glukagon-like peptide-1 (GLP-1) und die entero-insuläre Achse</b>	<b>9</b>
1.1	Vorkommen und Synthese von GLP-1	9
1.2	Entdeckung von GLP-1	11
1.3	Untersuchungen zur Freisetzung von GLP-1	14
<b>2</b>	<b>Grundlagen und Geschichte des isolierten, vaskulär perfundierten Darmsegmentes</b>	<b>17</b>
2.1	Aufbau und Funktion des Dünndarms	17
2.2	Entwicklung des isolierten, vaskulär perfundierten Darmmodells	19
2.3	Arbeiten zur Hormonausschüttung an isolierten, vaskulär perfundierten Darmmodellen	21
2.4	Untersuchungen zur Vitalitätssicherung des isolierten, vaskulär perfundierten Darmpräparates	23
<b>III</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>25</b>
<b>IV</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
<b>1</b>	<b>Materialien und Herstellung der vaskulären Perfusionslösung</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Herstellung der luminalen und vaskulären Testlösungen</b>	<b>28</b>
2.1	Materialien und Herstellung der luminalen Testlösungen	28
2.2	Materialien und Herstellung der vaskulären Testlösungen	29
<b>3</b>	<b>Tiere</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Geräte</b>	<b>30</b>

<b>V</b>	<b>Versuchsaufbau und Versuchsablauf</b>	<b>31</b>
<b>1</b>	<b>Versuchsaufbau</b>	<b>31</b>
1.1	Die vaskuläre Perfusionsapparatur	31
1.2	Schematische Darstellung des Darmpräparates	32
1.3	Die Infusionsapparatur für die luminalen Testlösungen	32
<b>2</b>	<b>Versuchsablauf</b>	<b>33</b>
<b>VI</b>	<b>Operationstechnik</b>	<b>34</b>
<b>VII</b>	<b>Analytische Methoden</b>	<b>36</b>
<b>1</b>	<b>Aufbereitung des venösen Effluates</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>Bestimmung des GLP-1-Gehaltes der Proben</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>Bestimmung der Vitalitätskriterien</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>37</b>
<b>VIII</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
<b>1</b>	<b>Ergebnisse der Vitalitätsprüfung</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>Basale GLP-1-Freisetzung und GLP-1-Freisetzung nach luminaler Infusion einer gemischten Diät</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>Freisetzung von GLP-1 nach luminaler Applikation von Glukose in Aqua dest. bzw. in verschiedenen Konzentrationen von NaCl-Lösungen</b>	<b>43</b>
3.1	GLP-1 Freisetzung nach luminaler Infusion von 2,5 % Glukose in 0,9 % NaCl	43
3.2	GLP-1 Freisetzung nach luminaler Infusion von 5 % Glukose in 0,9 % NaCl	43
3.3	GLP-1 Freisetzung nach luminaler Infusion von 5 % Glukose in Aqua destillata	44
3.4	GLP-1 Freisetzung nach luminaler Infusion von 5 % Glukose in 1,8 % NaCl	45

<b>4</b>	<b>Ergebnisse der Freisetzung von GLP-1 nach luminaler Infusion von Fett- bzw. Gallensäurelösungen in das Ileum</b>	<b>47</b>
4.1	GLP-1 Freisetzung nach luminaler Infusion einer Fettemulsion: Lipofundin MCT 20 %	47
4.2	GLP-1 Freisetzung nach luminaler Infusion einer Gallensäurelösung	47
4.3	GLP-1 Freisetzung nach luminaler Infusion einer mit Gallensäuren versetzten Fettemulsion	48
<b>5</b>	<b>Freisetzung von GLP-1 aus dem Ileum nach luminaler Infusion eines Aminosäuregemisches</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>GLP-1-Freisetzung durch Stimulation mit Neurotransmittern</b>	<b>50</b>
6.1	GLP-1-Freisetzung durch vaskulärer Infusion einer $10^{-5}$ molaren Carbachollösung	50
6.2	GLP-1-Freisetzung durch vaskulärer Infusion einer $10^{-5}$ molaren Methacholinlösung	52
6.3	Interaktion zwischen luminaler und vaskulärer Stimulation der L-Zellen	54
<b>IX</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>1</b>	<b>Diskussion des Modells des isolierten, in vitro perfundierten Rattendünndarms</b>	<b>56</b>
<b>2</b>	<b>Diskussion der Vitalitätsparameter</b>	<b>59</b>
<b>3</b>	<b>Bewertung der experimentellen Daten</b>	<b>63</b>
3.1	Kann an dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell durch luminaler Infusion eines Nahrungsmittelgemisches die GLP-1-Freisetzung im portalen Effluat gemessen werden?	63
3.2	Welche Nahrungsmittelbestandteile beeinflussen nach luminaler Infusion die GLP-1-Ausschüttung?	64
3.3	GLP-1-Freisetzung durch Neurotransmitter	73

<b>X</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>
	<b>Anhang</b>	<b>91</b>
	Dank	91
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	92
	Ehrenwörtliche Erklärung	93
	Tabellarischer Lebenslauf	94

# I Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Regulation der Glukagon-like peptide-1 (GLP-1)-Freisetzung aus dem Ileum der Ratte untersucht. GLP-1 ist ein Peptidhormon, das die glukoseabhängige Insulinausschüttung aus dem Pankreas erhöht und möglicherweise auch die insulinunabhängige Glukoseverstoffwechslung fördert. Damit wäre GLP-1 in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II eine bedeutende Erweiterung der bisherigen Therapiemöglichkeiten.

GLP-1 wird in den L-Zellen der Darmmukosa gebildet; die höchste Dichte dieser Zellen findet sich im terminalen Ileum und Colon. Über die Mechanismen der GLP-1-Freisetzung aus den L-Zellen ist bisher wenig bekannt. Um diese zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein aus dem Ganztier isoliertes Ileumpräparat der Ratte mit einer artifizialen Blutersatzperfusion über die A. mesenterica superior benutzt. Anhand von Viabilitätsparametern konnte gezeigt werden, daß dieses Versuchsmodell über einen Zeitraum von 70 Minuten vital bleibt, und daß die GLP-1-Freisetzung im portalen Effluat unter Basalbedingungen (ohne intraluminale Stimulation) konstant ist.

Nach intraluminaler Infusion einer gemischten Diät in das isolierte Darmpräparat kam es zu einem starken Anstieg der GLP-1-Freisetzung, die nach Beendigung der luminalen Stimulation rückläufig war.

Die Versuche nach luminaler Glukoseinfusionen zeigten eine Abhängigkeit der GLP-1-Freisetzung von der angebotenen Glukosekonzentration und von der NaCl-Konzentration der infundierten Glukoselösung. Diese Ergebnisse lassen auf eine von der Glukoseresorption-abhängige GLP-1-Freisetzung schließen.

Die verwendeten Fett- bzw. Fett- und Gallensäurelösungen konnten keine wesentliche GLP-1-Freisetzung aus dem Ileum der Ratte auslösen. Die reine Gallensäurelösung zeigte einen geringen Effekt auf die GLP-1-Freisetzung.

Die luminaler Infusion einer Aminosäurelösung zeigte keinen signifikanten Anstieg der GLP-1-Ausschüttung.

Zusätzlich zur intraluminalen Stimulation sollte in dieser Arbeit die Beeinflussbarkeit der L-Zellen durch Neurotransmitter untersucht werden. Hierzu wurde die GLP-1-

Ausschüttung nach rein vaskulärer Stimulation mit einem muscarinergen bzw. muscarinergen und nicotinergen Agonisten, als Äquivalent für eine parasympathische Innervation, untersucht. Es kam durch beide Substanzen zu einer prompten und signifikanten GLP-1-Freisetzung nach Infusionsbeginn. Dies legt einen Einfluß des N. vagus auf die GLP-1-Freisetzung nahe.

Die basale GLP-1-Ausschüttung war durch einen muscarinergen Antagonisten (Atropin) nicht zu hemmen, es kam jedoch bei gleichzeitiger luminaler Glukose- und vaskulärer Atropinapplikation zu einer deutlich geringeren GLP-1-Freisetzung als nach alleiniger luminaler Glukoseinfusion. Die GLP-1-Freisetzung aus den L-Zellen nach einer luminalen Glukoseapplikation könnte also über eine Acetylcholinfreisetzung mitbedingt sein.

Es zeigte sich, daß die GLP-1-Freisetzung mit diesem Modell eines isolierten, vaskulär perfundierten Rattenileumpräparates untersucht werden kann.

Die Regulation der GLP-1-Freisetzung erfolgt dabei sowohl durch luminale, als auch durch vaskuläre Stimulation der L-Zellen, wobei die Na<sup>+</sup>-abhängige Glukoseresorption ein entscheidender Freisetzungsreiz zu sein scheint.

## II Einleitung

Glukagon-like peptide-1 (GLP-1) ist ein gastrointestinales Peptidhormon, das in den L-Zellen des Dün- und Dickdarms gebildet wird (Eissele et al., 1992). Nach Nahrungsaufnahme wird GLP-1 in die Blutbahn ausgeschüttet und verstärkt die glukoseabhängige Insulinausschüttung aus dem Pankreas (Göke et al., 1991).

Als wichtige Regulationshormone des Kohlenhydratstoffwechsels sind Insulin, Glukagon und Somatostatin bekannt. Die Insulinausschüttung aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas ist vor allem vom Blutglukosespiegel abhängig. Schon früh wurde entdeckt, daß die ausgeschüttete Insulinmenge nach intraluminaler intestinaler Glukoseapplikation wesentlich größer ist, als nach intravenöser Glukosegabe, bei gleicher applizierter Glukosemenge (Elrick et al., 1964). Als Signalvermittler dieses nahrungsabhängig insulinverstärkenden Effektes wurden sowohl humorale, als auch nervale Verbindungen zwischen Darm und Pankreas erwartet; diese Verbindungen wurden als "entero-insuläre Achse" bezeichnet (Unger und Eisentraut, 1969; Woods und Porte, 1974).

Humorale Faktoren, die nach Nahrungsaufnahme aus dem Darm freigesetzt werden und die glukoseinduzierte Insulinfreisetzung aus dem Pankreas erhöhen, werden auch als Inkretine bezeichnet. GLP-1 ist ein Peptidhormon, daß die Forderungen eines Inkretins erfüllt (Kreymann et al., 1987; Mojsov et al., 1987).

Durch eine GLP-1-Applikation in vivo kann bei Diabetes mellitus Typ II eine glukoseabhängige Erhöhung der Insulinausschüttung ohne Hypoglykämieentwicklung sowie eine insulinunabhängige Verbesserung der Glukosehomöostase erreicht werden. Beides Effekte, die GLP-1 für eine Therapie des Diabetes mellitus Typ II vorteilhaft erscheinen lassen. (Nauck et al., 1993, Byrne und Göke, 1996).

Um die Regulation der Freisetzung von GLP-1 aus den L-Zellen des Darms zu untersuchen sind bisher verschiedene Versuchsmodelle benutzt worden. Neben Versuchen am Menschen (Kreymann et al., 1987) wurden Versuche mit Zellkulturen (Brubaker 1991) und Untersuchungen am vom Ganztier teil- (Roberge und Brubaker 1991), bzw. vollständig isolierten Darmpräparaten (Sasaki et al., 1993) verwendet. Da neben direkten luminalen auch nervale und humorale Faktoren der GLP-1-

Freisetzung diskutiert werden (Roberge und Brubaker 1993; Schirra et al., 1996), sollte in dieser Arbeit ein Modell etabliert werden, an dem die verschiedenen die L-Zellen beeinflussenden Faktoren unter kontrollierten Bedingungen untersucht werden können. Dieses ist nur möglich an einem sowohl luminal, als auch vaskulär isolierten, in vitro perfundierten Darmmodell. Bei diesem können an einem intakten Organ luminale und/oder vaskuläre Stimuli unter annähernd physiologischen Bedingungen auf die GLP-1-Ausschüttung untersucht werden. Störende Einflüsse z. B. hormonell von vorgeschalteten Darmabschnitten (bei nur luminal isolierten Darmpräparaten) oder durch anderen Organen, z. B. nerval bei Versuchen am Menschen, können so vermieden werden.

# 1 Glukagon-like peptide-1 und die entero- insuläre Achse

## 1.1 Vorkommen und Synthese von GLP-1

GLP-1 ist ein von speziellen Zellen der Darmmukosa in die Blutbahn freigesetztes Peptidhormon. Diese Zellen werden aufgrund ihres Anfärbeverhaltens als enterochromaffine Zellen oder nach elektronenmikroskopischen Gesichtspunkten als L-Zellen bezeichnet (Eissele et al., 1992).

Die größte Dichte der L-Zellen findet sich beim Menschen (und ebenso bei der Ratte, jedoch in einer etwas abweichenden Verteilung) im distalen Jejunum, im Ileum und im Colon. Mittels GLP-1-Antikörpern konnte in den L-Zellen GLP-1-Immunoreaktivität (GLP-1IR) nachgewiesen werden, in den meisten Zellen gleichzeitig auch Glicentin-IR (s. u.) und teilweise Peptide YY-IR (Eissele et al., 1992). Peptide YY ist ein in den endokrinen Zellen des Ileums und Colons nachweisbares Peptidhormon, das auf Magenentleerung und Darmpassage Einfluß nimmt (Spiller et al., 1988).

GLP-1 wird als Hauptspaltprodukt des in den L-Zellen gebildeten Proglukagons ausgeschüttet.

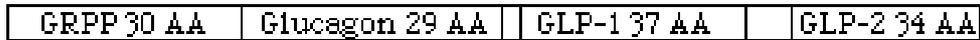
Proglukagon ist ein Prohormon, welches in identischer Form in den L-Zellen des Darms und den A-Zellen des Pankreas gebildet wird (Eissele et al., 1992). Durch posttranslationale Prozessierung entsteht in den intestinalen Zellen aus Proglukagon GLP-1(1-37), GLP-2, Oxyntomodulin und GRPP (Glicentin-related pancreatic peptide). Von dem ersten Spaltprodukt, GLP-1(1-37), werden nochmals sechs Aminosäuren am N-terminalen Ende abgespalten und es entsteht das biologisch aktive Hormon GLP-1(7-37) bzw. GLP-1(7-36)amid (s.u.) (Mojsov et al., 1986).

Dabei scheint das N-terminale Ende des Hormons die biologische Aktivität zu vermitteln (Suzuki et al., 1989).

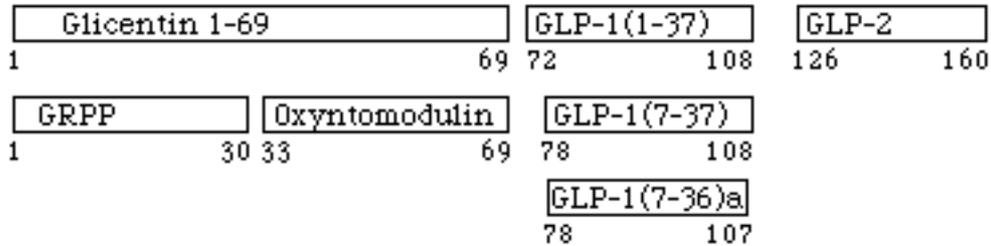
Teilweise wird noch die C-terminale Aminosäure abgespalten und das C-terminale Ende des Peptids alpha-amidiert, so daß GLP-1(7-36)amid entsteht (Mojsov et al., 1990). Bei anderen Peptiden konnte durch diesen Vorgang eine größere Stabilität des Peptids nachgewiesen werden; ob dies auch für GLP-1 zutrifft ist nicht geklärt (Bradbury und Smyth, 1991).

Aufspaltung von Proglukagon im Darm und im Pankreas

**Proglukagon:**



**Aufspaltung im Darm:**



**Aufspaltung im Pankreas:**

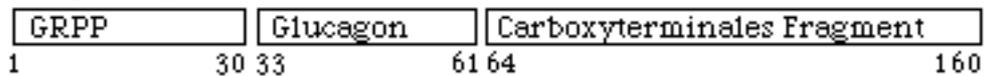


Abb. Nr.1: modifiziert aus Göke et al., 1991. AA = Aminosäuren. Die Zahlen unter den Kästchen geben die entsprechende Aminosäure im Proglucagon an. GLP-1(7-36)a = GLP-1(7-36) amid

In den A-Zellen des Pankreas entsteht aus Proglukagon Glukagon, GRPP und ein großes Carboxyterminales Fragment, welches nicht weiter aufgespalten wird (Prazelt und Schlitz, 1986). Mit Antikörpern gegen GLP-1(1-36)/(1-37) konnte in den A-Zellen des Pankreas GLP-1-ähnliche Immunreaktivität zusammen mit Glukagon-ähnlicher Immunreaktivität nachgewiesen werden, da der Antikörper die GLP-1-Sequenz im Carboxyterminalen Fragment erkennt. Nach Argininstimulation werden beide aus den A-Zellen ausgeschüttet (Hirota et al., 1987; Shima et al., 1987).

## 1.2 Entdeckung von GLP-1

Schon 1906 wurde von Extrakten aus der Darmmukosa eine blutzuckersenkende Wirkung bei Diabetes mellitus beschrieben (Moore et al., 1906). Der für diese Wirkung verantwortliche Stoff wurde zuerst **Sekretin** genannt (La Barre und Still, 1930). Später erhielt er den Namen **Inkretin**, in Anlehnung an die Bezeichnung "Exkretin", welches auf die exkretorische Funktion des Pankreas Einfluß nimmt (Zunz und La Barre, 1929). Unter einem Inkretin versteht man einen nach Nahrungsaufnahme vom Darm freigesetzten humoralen Faktor, der die glukoseinduzierte Insulinfreisetzung aus dem Pankreas verstärkt (Creutzfeldt, 1979).

Nachdem der Insulinspiegel durch die Entwicklung eines Radioimmunoassays messbar wurde, konnte die Wirkung dieses "Faktors" genauer ermittelt werden. Eine bis zu 50 % vermehrte Insulinausschüttung nach oraler Glukoseapplikation konnte im Vergleich zu einer in gleicher Menge intravenös verabreichten Glukosegabe gemessen werden (Mc Intyre et al., 1964; Elrick et al., 1964). Daraus folgerte man eine funktionelle Verbindung zwischen Darm und Pankreas. Diese wurde später auch mit dem Terminus der "**entero-insulären Achse**" belegt (Unger und Eisentraut, 1969). Dieser Begriff beinhaltet sämtliche Stimuli des Darmes auf die Inselzellen des Pankreas, neben endokrinen Transmittern auch neurokrine und substratvermittelte Einflüsse.

Auf der Suche nach einem hormonalen Botenstoff wurden verschiedenste bekannte Darmhormone auf ihre Insulinsekretion-stimulierende Wirkung untersucht. Es zeigte sich, daß GIP (Gastric inhibitory polypeptide), zunächst als Enterogastron angesehen, ein Inkretinkanidat war (Brown et al., 1975). Als Enterogastron wird ein postprandial aus dem Darm freigesetzter Faktor bezeichnet, der auf die Magensaftsekretion hemmend wirkt (Kosaka und Lim, 1930).

GIP ist ein Polypeptidhormon, daß in den neuroendokrinen K-Zellen des Duodenum und des Jejunum gefunden wird (O`Dorisio et al., 1976). Es wird nach oraler Glukose- und Fettapplikation in das Blutssystem sezerniert und stimuliert Glukose-abhängig die Insulinsekretion und wurde dann mit dem Synonym „glucose dependend insulinotropic polypeptide“ bezeichnet (Buffa et al., 1975, Roberge et al., 1993).

Allerdings konnte mittels Antikörpergabe gegen GIP gezeigt werden, daß GIP nicht für die gesamte Insulinausschüttung nach oraler Glucosegabe verantwortlich sein kann (Creutzfeld, 1985; Ebert und Creutzfeld, 1982).

Eine gesteigerte Insulinfreisetzung aus dem Pankreas bei erhöhten Blutglukosespiegeln wurde als Stoffwechselwirkung erhöhter GLP-1-Spiegel erstmals 1987 beschrieben (Mojsov et al., 1987). Somit war ein neuer insulinotroper Faktor gefunden.

Nach Entdeckung von GLP-1 konnte zudem gezeigt werden, daß beim Menschen in postprandialen Konzentrationen infundiertes GLP-1(7-36) eine höhere Insulinausschüttung bewirkt als eine GIP-Infusion, die ebenfalls postprandiale Spiegel erzeugt (Kreymann et al., 1987). In neueren Arbeiten konnte eine additive Wirkung von GIP und GLP-1 auf die Insulinfreisetzung aus dem Pankreas gezeigt werden (Fehmann et al., 1989; Fehmann et al., 1995). Im Tiermodell konnte darüber hinaus GIP eine GLP-1-Freisetzung bedingen (Roberge und Brubaker, 1993)

Auch durch Hemmung der Wirkung von GLP-1 kann dessen Stoffwechselaktivität belegt werden. Wenn die GLP-1-Wirkung nach enteraler Glukoseinfusion bzw. einer standardisierten Mahlzeit durch Exendin (9-39) gehemmt wird, reduziert sich die Insulinfreisetzung um ca. 60 %, bei ansteigenden Blutglukosespiegeln (Kolligs et al., 1995; Wang et al., 1995). Exendin (9-39) ist ein GLP-1-Antagonist der durch N-terminale Spaltung von Exendin-4, welches aus dem Gift einer Eidechse stammt, gewonnen wird (Göke et al., 1993b).

In neueren Untersuchungen wurde GLP-1(7-36)amid bei Patienten mit schlecht eingestelltem, nicht insulinabhängigem Diabetes mellitus (NIDDM) infundiert und die Auswirkungen auf den Zuckerstoffwechsel beobachtet. Nach der GLP-1-Infusion senkte sich der erhöhte Nüchternglukosespiegel auf normale Werte und es wurde eine vermehrte Ausschüttung von Insulin und C-Peptid gemessen. Nach Normalisierung der Blutglukosespiegel kam es zu einer Abnahme des Insulinspiegels - trotz weiterer GLP-1-Infusion -, so daß sich keine Hypoglykämie einstellte (Nauck et al. 1993). Diese Ergebnisse werden gestützt durch die Feststellung, daß eine intrazelluläre Calciumfreisetzung nach GLP-1-Bindung an den  $\beta$ -Zellen des Pankreas nur bei erhöhter Glukosekonzentration ausgelöst wird (Yada et al. 1993).

Neben dem die Insulinausschüttung verstärkenden Effekt konnte auch eine von der Insulinausschüttung unabhängige Verbesserung der Glukoseverwertung nachgewiesen werden. So wurden während einer GLP-1-Infusion am Menschen unter Isoglykämiebedingungen sowohl bei NIDDM, als auch IDDM (Insulin abhängigem Diabetes mellitus) eine Verminderung des exogenen Insulinverbrauchs gemessen. Für diesen Effekt wird zum einen die verminderte Glukagonfreisetzung, zum anderen eine verbesserte Insulinsensitivität angenommen (Gutniak et al., 1992). Auch eine direkte, insulinunabhängige, Verbesserung der Glukoseverwertung in Muskelzellen und in Hepatozyten konnte gezeigt werden (Villanueva-Penacarrillo et al., 1994, Valverde et al., 1994)

Somit wäre eine vor Hypoglykämie schützende, den Kohlenhydratstoffwechsel positiv beeinflussende Medikation bei Diabetes mellitus Typ II mit GLP-1 denkbar. Unter einer solchen Therapie könnte bei Diabetes mellitus die Spirale des erhöhten Insulinangebotes bei reduzierter peripherer Insulinrezeptorzahl durch *insulinunabhängig* verbesserten Glukosestoffwechsel unterbrochen werden und zudem die Gefahr einer therapeutisch induzierten Hypoglykämie eingeschränkt werden.

### 1.3. Untersuchungen zur Freisetzung von GLP-1

Bis heute wurde die GLP-1-Freisetzung aus dem Darm anhand von unterschiedlichen Versuchsmodellen untersucht. Die folgende Tabelle zeigt die Bandbreite der benutzten Versuchsmodelle.

<u>Autor /Jahr</u>	<u>Versuchsmodell</u>	<u>Nachweis von/ Bestimmung aus:</u>	<u>Spezies</u>	<u>Stimulation mit:</u>
Brubaker /1991	Zellkulturen	Glicentin und Oxyntomodulin/ Zellüberstand	Ratte	GIP, GRP, Bombesin, FS und Bethanechol
Namba et al./ 1990	luminal isoliertes Ileum	GLP-1(1-37)/ GLP-1(7-36)-amid/ Vena mesenterica.	Hund	Glukose, HCl und Gallensäure
Roberge und Brubaker/ 1991	luminal isoliertes Ileum	GLI/ Vena jugularis	Ratte	Fette, Glukose und NaCl
Roberge und Brubaker/ 1993	luminal isol. Ileum bzw. Duodenum	GLI/ Vena jugularis.	Ratte	Fett und Glukoseinfusion
Sasaki et al./ 1993	luminal und vaskulär isoliertes Ileum	GLP-1(1-37) und (7-36)-amid/ Blutersatz	Hund	Glukose
Kreymann et al./1987	orale Applikation	GLP-1(7-36)/ Plasma	Mensch	Glukose und gem. Frühstück
Orskov et al./ 1991	orale Applikation	GLP-1(7-36)/ Plasma	Mensch	Arginin und Glukose
D'Allesio et al./ 1993	orale Applikation	GLP-1(1-36) und (7-36)-amid/ Plasma	Mensch	KH-, Fett- und Protein-Mahlzeiten
Herrmann et al./ 1995	orale oder intra-duodenale Gabe	GLP-1(7-36)-amid/ Plasma	Mensch	Glukose, Galaktose, AS und Fette
Schirra et al./1996	duodenale Infusion	GLP-1(7-36)-amid/ Plasma	Mensch	Glukose

Tab. Nr. 1: Versuchsmodelle zum Studium der GLP-1-Freisetzung. Abk.: GLI Glukagon-ähnliche Immunoreaktivität, GRP Gastrin related peptide, FS Fettsäuren, AS Aminosäuren, KH Kohlenhydrate.

Von einzelnen Arbeitsgruppen wurde dabei nicht GLP-1 gemessen, sondern Glukagon-ähnliche Immunoreaktivität (GLI), welche nach Messung aller glukagonsequenz-

enthaltenden Peptide, abzüglich des pankreatischen Glukagons, ermittelt wurde. GLI entspricht vornehmlich Glicentin und Oxyntomodulin und ist somit ein indirektes Maß für die GLP-1-Freisetzung (Brubaker, 1991). Es ist jedoch unklar, ob der Metabolismus von Glicentin dem von GLP-1 entspricht, so daß sich die Plasmakonzentrationen der beiden Hormone unterschiedlich verhalten könnten (Holst, 1994).

So wurde an fetalen intestinalen Zellkulturen die Glicentin- und Oxyntomodulin-Ausschüttung nach Inkubation der Zellkulturen mit verschiedenen Peptiden, Nahrungsstoffen und Neurotransmittern untersucht. (Brubaker et al. 1991). Ebenso konnte an diesem Modell gezeigt werden, daß die Sekretion dieser Peptide durch den Proteinkinase C Weg bedingt ist (Brubaker et al., 1988). Da es bei Zellkulturversuchen zu einer Aufhebung der Zellordnung kommt, ist eine physiologische Einwirkung der Stimulantien jedoch nicht gegeben.

Bei Arbeiten mit nur luminal isolierten Darmschlingen, daß heißt, diese Darmpräparationen wurden weder vaskulär, noch nerval vom Ganztier getrennt und einer GLI-Messung im Plasma, zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse nach Glukoseinfusion. In einer Arbeit konnte ein Anstieg sowohl nach ilealer Glukose- als auch Fettinfusion gemessen werden (Roberge und Brubaker 1993), in einer anderen Arbeit wurde keine glukoseinduzierte, aber eine fettinduzierte, GLI-Steigerung gemessen (Roberge und Brubaker, 1991). Zudem wurde in der Arbeit von 1993 nach duodенaler Glukoseinfusion eine Erhöhung der GLI nachgewiesen; da L-Zellen aber praktisch nicht im Duodenum vorkommen, muß bei diesem Modell von komplexen Interaktionen zwischen Duodenum und Ileum ausgegangen werden.

Die GLP-1-Freisetzung wurde auch an Testpersonen nach oraler oder intraluminaler Applikation (über Sonde) von verschiedenen Nahrungsmittelbestandteilen untersucht. Auch hier zeigte sich eine GLP-1-Ausschüttung nach duodенaler Applikation von Glukose (Herrmann et al., 1995), so daß damit ebenfalls kein Modell für eine Untersuchung der L-Zellen ohne beeinflussende Mechanismen von höher gelegenen Darmabschnitten zur Verfügung steht.

In einer Arbeit mit duodенaler Glukoseinfusion am Menschen konnte eine Abhängigkeit der GLP-1-Freisetzung von der kalorischen Konzentration der Glukoselösung nachgewiesen werden. So wurde bei 2,2 kcal/Min. eine verstärkte

GLP-1-Freisetzung nachgewiesen, nicht jedoch bei 1,1 kcal/Min. und zwar unabhängig von erhöhten GIP-Spiegeln bei beiden Konzentrationen (Schirra et al., 1996).

An einem isolierten Hundedarmpräparat mit vaskulärer Dissektion vom Gesamttier und vaskulärer Perfusion des isolierten Darmabschnittes mit einer Blutersatzlösung konnte eine Erhöhung der GLP-1-Spiegel nach Glukoseinfusion nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte bei diesen Versuchen die Wirkung arteriell verabreichter Hemmstoffe (Quabain, Phlorizin) auf die glukoseinduzierte GLP-1-Freisetzung untersucht werden (Sasaki et al., 1993).

Die genannten Unterschiede der verwendeten Modelle veranschaulichen die Möglichkeiten, aber auch Einschränkungen, die den einzelnen Modellen eigen sind. Da neben einer direkten luminalen Stimulation der L-Zellen humorale und nervale Stimuli die GLP-1-Sekretion beeinflussen können, sollte für die Untersuchung der Freisetzungsmechanismen von GLP-1 aus den L-Zellen ein Modell gewählt werden, welches die Trennung des Darms vom Ganztier, sowohl luminal, als auch vaskulär vorsieht. Damit können die oben aufgezeigten Interaktionen vermieden und vielfache experimentelle Einflußmöglichkeiten erschlossen werden.

## **2 Grundlagen und Geschichte des isolierten, vaskulär perfundierten Darmsegmentes**

### **2.1 Aufbau und Funktion des Dünndarms**

Der Dünndarm ist ein beim Menschen 3-5 Meter langes, schlauchförmiges Organ, das der Verdauung, dem Weitertransport und der Resorption der verdauten Nahrung dient. Er gliedert sich in drei Teile Duodenum, Jejunum und Ileum mit teilweise unterschiedlichen Funktionen. Hier soll vor allem auf das Ileum eingegangen werden. Im Ileum werden die Resorptionsprozesse von Kohlenhydraten, Eiweißen, Fetten, Mineralien und Vitaminen, die im Duodenum und Jejunum zu einem großen Prozentsatz erfolgen, abgeschlossen. Im Ileum werden selektiv Gallensäuren und der Intrinsic Faktor resorbiert (Rauber und Kopsch, 1987).

Die Darmwand läßt sich in verschiedene Schichten gliedern: Außen von einer Peritonealschicht umkleidet, folgt nach innen eine Längs- und Ringmuskelschicht. Darauf folgen die Tela submucosa und die Mucosa. Die Mucosa ist wiederum in drei Schichten unterteilt: Die Lamina muscularis mucosae, die Lamina propria mucosae und die Lamina epithelialis mucosae (Hammersen, 1985). Die Mukosa und Submukosa sind zur Oberflächenvergrößerung ringförmig aufgeworfen, das Epithel bildet zusätzlich Zotten. Dieses Epithel besteht aus resorbierenden Epithelzellen, schleimbildenden Zellen sowie endokrinen und Paneth'schen Zellen. Die beiden letztgenannten sitzen vor allem, jedoch nicht ausschließlich, in den Zottenvertiefungen, den sogenannten Glandulae intestinales oder Lieberkühnschen Krypten.

Die endokrinen Zellen bestehen aus einer unterschiedlichen Population hormonproduzierender Zellen. Diese Zellen haben basale Sekretgranula und werden in Zellen vom "offenen" Typ, die mit ihrer Zellspitze das Darmlumen erreichen, und vom "geschlossenen" Typ, die das Darmlumen nicht erreichen, unterteilt (Rauber und Kopsch, 1987). Man geht bei den Zellen vom "offenen" Typ davon aus, daß sie mit ihrem apikalen mit Microvilli besetzten Zellausläufer Reize aus dem Darmlumen aufnehmen und basal Wirkstoffe in das Blut abgeben können. Man nimmt jedoch an, daß neben endokrinen Wirkungen auch parakrine Interaktionen zwischen den Zellen stattfinden (Sundler et al., 1989).

GLP-1 wird in Zellen vom "offenen" Typ gefunden, diese werden wegen elektronenmikroskopisch großer („large“) Granula auch L-Zellen genannt (Eissele et al., 1992).

Neben GLP-1 werden in den endokrinen Zellen des Darmes zahlreiche andere Peptidhormone gebildet u. a.: Serotonin, Somatostatin, VIP (vasoaktives intestinales polypeptide), GIP, Bombesin, auch GRP (gastrin releasing peptide) genannt, Motilin, Substanz P und Neurotensin.

Sympathische und parasympathische Nervenfasern versorgen die Muskulatur (Plexus myentericus) und die Mukosa (Plexus submucosus). Aufgrund der räumlichen Nähe der Axone wird eine Innervation "á distance" der endokrinen Zellen angenommen, auch wenn bislang noch keine Synapsen an endokrinen Zellen nachgewiesen werden konnten.

Der Darm ist sehr gut mit Blutgefäßen durchsetzt, die der Versorgung des Darmes mit Sauerstoff, dem Austausch humoraler Botenstoffe und dem Abtransport von resorbierten Nahrungsbestandteilen und Stoffwechselprodukten dienen (Rauber und Kopsch, 1987).

Aufgrund des gerichteten Aufbaus der Darmwand ist es für Hormonfreisetzungstudien wichtig, sowohl von der luminalen Seite der Darmmukosa, als auch vaskulär (Neurotransmitter und -peptide), mit verschiedenen Stoffen gezielt intervenieren zu können. Nur so können diese Stimuli annähernd physiologisch untersucht werden.

Bei erhaltenem physiologischem Organaufbau sollte das Darmsegment bei Studien zu Freisetzungsmechanismen von Hormonen jedoch vom Gesamtkörper getrennt untersucht werden, da nur dann unbeeinflussbare neural und humorale Signale während des Versuches von und zum Darm ausgeschlossen werden können. Eine nervale Separation des Darmes ist möglich, da das enterische Nervensystem als eines der drei Komponente des autonomen Nervensystems relativ unabhängig von externen Stimuli arbeiten kann. So konnte nach Kappung der den Darm versorgenden Nerven eine nur unwesentlich veränderte digestive Funktion dokumentiert werden (Furness und Costa, 1980).

## **2.2 Entwicklung des isolierten, vaskulär perfundierten Darmmodells**

Mit verschiedenen Untersuchungsanordnungen wurden bisher Experimente am isolierten Darm durchgeführt. Bei in vitro Experimenten am Darm ist die ausreichende Versorgung der Mukosa mit Sauerstoff und somit die Frage des Blutersatzes von besonderer Bedeutung, da dies für die Vitalität des Präparates ein entscheidendes Kriterium ist.

Einer der frühesten Versuche ein isoliertes Darmsegment mittels Organperfusion vital zu erhalten stellt die Arbeit von Salvioli dar. Salvioli perfundierte ein Hundedarmsegment über die zuführende Arterie mit einer Blutersatzlösung aus nicht oxygeniertem, defibriniertem und mit Kochsalz verdünntem Blut. Er bemerkte jedoch eine Rötung und Schwellung des Darmes, eine Zunahme an Flüssigkeit im Darmlumen sowie eine Abstoßung des Epithels (Salvioli, 1880).

Eine möglichst atraumatische Operationstechnik, die adäquate Zirkulation des Blutes und eine ausreichende Sauerstoffsättigung des Blutersatzes stellten lange Zeit die limitierenden Faktoren der Darmperfusion dar. So wurde versucht, die Sauerstoffversorgung durch defibriniertes, sauerstoffgesättigtes Blut zu verbessern (Roese, 1930) oder mit ungewaschenen Rindererythrozyten als Sauerstoffträger zu arbeiten (Ohnell, 1939). Es wurden jedoch auch hier irreguläre Kontraktionen der Muskulatur des Darms beobachtet (Ohnell, 1939).

Um die Probleme der arteriellen Blutersatzperfusion zu umgehen, versuchte man eine ausreichende Oxygenierung der Darmmukosa durch sauerstoffangereicherte luminale Perfusate zu gewährleisten (Fischer und Parson, 1949). Da die mukosale Oberfläche aufgrund der Gefäßversorgung am empfindlichsten auf Sauerstoffmangel reagiert, wurde der "everted sac" entwickelt. Bei dieser Technik wird das Darmlumen nach außen gestülpt und somit direkt von der oxygenierten Badeflüssigkeit umgeben. Probleme zeigten sich hier vor allem in Verletzungen der Mukosa, die zu Leckagen führten (Wilson und Wiseman, 1954). Da bei diesem Modell zudem keine adäquate vaskuläre Zirkulation besteht, schließt es sich für Untersuchungen zur Hormonfreisetzung aus.

Erst mit der Einführung verbesserter Operationstechniken und verschiedenster Modifikationen der vaskulären Perfusate konnte ein vitales Modell des isolierten, vaskulär perfundierten Dünndarms etabliert werden, welches als Grundlage der heutigen Darmperfusionen dient.

Hierbei wurde ein Teil des oberen Jejunums mit den zu- und abführenden Gefäßen isoliert. Die "arterielle" Zufuhr des Blutersatzes wurde über einen in die Aorta thoracica eingeführten Katheter gewährleistet. Um den venösen Abfluß sicherzustellen, wurde ein Katheter in die Vena cava eingeführt. Als Blutersatz benutzte man eine Elektrolytmischung, die mit Rindererythrozyten, Albumin, Glukose, Dextran und einem

Surfactant, zur Verminderung der Oberflächenspannung und Reduzierung der durch die Pumpen bedingten Zellschäden, versetzt war. Die Sauerstoffsättigung des Blutersatzes wurde durch eine spezielle Versuchsanordnung mittels einer rotierenden Scheibe zur Oberflächenvergrößerung des Blutersatzes, welcher durch diese Versuchsanordnung kontinuierlich mit Carbogen begast werden konnte, gesichert.

Mit diesem Modell konnte die Absorption von 3-O-Methyl-Glucose aus dem Darmlumen untersucht werden, und so ein aktiver Transport von Glukose aus dem Darmlumen nachgewiesen werden (Dubois et al., 1968).

Zusätzlich wurden Kriterien für die Vitalität eines Darmmodells aufgestellt. Die Überprüfung der Vitalität ist bei komplexen in vitro Modellen zur Qualitätssicherung ausgesprochen wichtig, um verwertbare Ergebnisse zu erzielen. Als Vitalitätskriterien wurde die Motilität des Darmes, die arterio-venöse Sauerstoffdifferenz, der vaskuläre Druck, die Glukose- und Sauerstoffaufnahme, ein aktiver Transport gegen einen Konzentrationsgradienten und eine nach Perfusionsende durchgeführte Histologie untersucht (Dubois et al., 1968; Hohenleitner und Senior, 1969).

Die Motilität des Darms stellte sich als schlechtes Kriterium zur Vitalitätsbeurteilung heraus, da diese von Präparat zu Präparat stark variiert und sowohl eine erhöhte, als auch verminderte Motilität für eine relative Hypoxie sprechen (Dubois et al., 1968; Kavin et al., 1967).

Weitere Arbeiten an isoliert perfundierten Darmmodellen untersuchten die Muskelarbeit (Holzer und Lembeck, 1979), pharmakologische Fragestellungen (Ochsenfahrt, 1979; Sakai et al., 1980; Hartmann et al., 1984) und Transportvorgänge (Lee, 1961; Jacobs et al., 1966; Windmueller et al., 1970; Hanson und Parson, 1976). Arbeiten zur Hormonausschüttung sollen im Folgenden näher dargestellt werden.

### **2.3 Arbeiten zur Hormonausschüttung an isolierten, vaskulär perfundierten Darmmodellen**

Bisher haben relativ wenige Untersucher das Modell des isolierten und vaskulär perfundierten Darmes für Hormonausschüttungsstudien benutzt. Dies mag an den oben genannten Problemen der Präparation und Vitalitätssicherung gelegen haben.

Untersuchungen zur Hormonausschüttung an isolierten, vaskulär perfundierten Darmsegmenten

<b>Untersuchtes Hormon</b>	<b>Untersuchtes Darmsegment</b>	<b>Spezies</b>	<b>Autor</b>
Sekretin	Duodenum	Schwein	Holst et al., 1981
Somatostatin	oberer Dünndarm	Schwein	Baldissera et al., 1985
Cholezystokinin	Duodenum	Ratte	Nakano et al., 1988
Neurotensin	Ileum	Ratte	Herrmann et al., 1991a/b
GLP-1	Ileum	Hund	Sasaki et al., 1993

Die Freisetzung von Sekretin aus dem Duodenum wurde nach luminaler Infusion mit verschiedensten Nahrungsstoffen untersucht. Ebenso wurde die Glukoseaufnahme aus dem Darm sowie deren Hemmbarkeit durch Quabain und Phloridizin betrachtet (Holst et al., 1981), Auch die Beeinflussung der Somatostatin-14 und -28-Sekretion aus dem Magen, dem Pankreas und dem oberen Dünndarm des Schweines wurde untersucht (Baldissera et al., 1985).

Eine Präparation des Duodenums inklusive des Pankreas wurde zur Untersuchung der CCK-Freisetzung durch GRP, Carbachol bzw. Atropin benutzt. Dieses Modell wurde mit einem oxygenierten Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer perfundiert (Nakano et al., 1988).

Die Neurotensin-Freisetzung durch Stimulation mit Neurotransmittern und Neuropeptiden wurden anhand einer isolierten, perfundierten Ileumpräparation untersucht. Hierbei wurde ein mit Erythrozyten angereicherter, oxygenierter Krebs-Henseleit-Puffer benutzt (Herrmann et al., 1991a/b).

Eine Arbeitsgruppe untersuchte die GLP-1-Freisetzung aus dem Hundeileum mit verschiedenen absorbierbaren und nicht absorbierbaren Zuckern durch luminale Stimulation und Messung der GLP-1-Freisetzung aus einer drainierenden Vene. Als

Blutersatzlösung wurde reine Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung benutzt (Sasaki et al., 1993).

## **2.4 Untersuchungen zur Vitalitätssicherung des isolierten, vaskulär perfundierten Darmpräparates**

Schon unter den ersten Anwendern von isolierten Darmpräparationen wurde die Notwendigkeit der Überprüfung und Sicherung der Qualität der Präparation und Perfusion gefordert, denn nur unter optimalen Bedingungen ist ein vitales Präparat zu gewährleisten (Hohenleitner und Senior, 1969; Dubois et al., 1968). So wurden Erscheinungen wie die Entwicklung von Ödemen und der Verlust von Perfusionsvolumen bereits früh als Kriterien für eine verminderte Güte der Präparation erkannt (Salvioli, 1880). Eine einfache Möglichkeit den Verlust von Perfusionsvolumen zu erkennen ist die Konstanz des Perfusionsvolumens über den Untersuchungszeitraum, also einen Vergleich des "arteriellen" Influx zum "venösen" Efflux durchzuführen. Hier sollte eine hohe Übereinstimmung nachweisbar sein (Porteous et al., 1984).

Als weiteres Kriterium, um Aussagen zur Vitalität der Präparation zu machen, sollte der arterielle Perfusionsdruck gemessen werden. Dieser sollte während der Perfusion konstant bleiben (Kavin et al., 1967; Hohenleitner und Senior, 1968; Sakai et al., 1980; Hartmann et al., 1984).

Parameter für den aktiven Zellstoffwechsel des Präparates sind die Sauerstoff- und Glukoseaufnahme durch das Präparat. Es wurden verschiedenste Perfusionslösungen getestet, um eine optimale Sauerstoffversorgung des Präparates zu gewährleisten. So z. B. eine Elektrolytlösung allein, mit Schafserythrozyten oder mit Hämoglobin versetzt (Hohenleitner und Senior, 1969), eine Elektrolytlösung mit Rindererythrozyten, (Dubois et al., 1968; Cuber et al., 1990) oder Elektrolytlösungen mit künstlichen Sauerstoffträgern (Hartmann et al., 1984). Es wurden ebenfalls Perfusionen mit Vollblut durchgeführt (Ochsenfahrt, 1979).

Es zeigt sich bei den Präparationen mit reinen Elektrolytlösungen eine um 50 % schlechtere Sauerstoffaufnahme als bei Perfusionen mit Erythrozyten. Bei den Versuchen mit Hämoglobinlösungen wurde zudem ein sehr hoher Gefäßwiderstand gemessen (Hohenleitner und Senior, 1969).

Untersuchungen zu Glukoseaufnahme bzw -verbrauch wurden von obengenannten Autoren und ebenfalls mit reiner Elektrolytlösung als Blutersatz (Levin et al., 1979; Sasaki et al., 1993) durchgeführt. Sowohl bei der Sauerstoffaufnahme, als auch bei der

Glukoseaufnahme durch die Präparate zeigt sich eine erhebliche Differenz zwischen einzelnen Versuchen und stärker noch zwischen unterschiedlichen Versuchsanordnungen. Hier ist eine Konstanz der Sauerstoff- bzw. Glukoseaufnahme innerhalb des einzelnen Versuchs als entscheidendes Vitalitätskriterium zu fordern (Kavin et al., 1967)

Die Umwandlung von Glukose in Lactat zur Überprüfung des anaeroben Stoffwechsels ist ein weiteres Kriterium eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Präparates nachzuweisen (Wilson, 1956; Hohenleitner and Senior, 1969; Nicholls et al., 1983).

Als ebenfalls sehr wichtiger Parameter gilt die histologische Aufarbeitung nach erfolgter Perfusion. Hierbei können bei inadäquater Präparation bzw. Perfusion Ödeme des Gewebes oder der Lymphbahnen, Nekrosen und Zellabschilferungen nachgewiesen werden (Dubois et al., 1968; Levin et al., 1979).

### III Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Freisetzung von GLP-1 aus dem Dünndarm zu untersuchen. Hierzu sollte ein Modell des isolierten, in vitro perfundierten Rattendünndarms etabliert werden. Als Blutersatz wurde eine mit Erythrozyten angereicherte Elektrolytlösung verwendet, um eine optimale Sauerstoffversorgung des Gewebes zu ermöglichen.

Die Arbeit gliederte sich in folgende Teile:

1. Anhand verschiedener Vitalitätskriterien sollte die Güte der Präparation dokumentiert werden. Dann sollte nachgewiesen werden, ob mit einem Modell des isolierten, vaskulär perfundierten Dünndarms eine GLP-1-Freisetzung aus dem Ileum gemessen werden kann.

2. Im 2. Versuchsabschnitt sollte die GLP-1-Freisetzung nach luminaler Stimulation der L-Zellen durch verschiedene Nahrungsbestandteile untersucht werden.

Da sich die höchsten Konzentrationen GLP-1-sezernierender Zellen im distalen Dünndarm und im Colon befinden, ist es eher unwahrscheinlich, daß Nahrungsmittelbestandteile unter physiologischen Bedingungen durch direkten mukosalen Kontakt eine Freisetzung von GLP-1 aus dem Ileum auslösen.

So könnten in vivo auch nervale Stimuli (z.B. reflektorisch von höheren Darmabschnitten ausgelöst) eine Rolle bei der Freisetzung von GLP-1 spielen, zumal aufgrund der engen morphologischen Nachbarschaft von L-Zellen und Nervenendigungen eine nervale Beeinflussung der L-Zellen wahrscheinlich ist.

3. In einem weiteren Versuchsabschnitt der Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Neurotransmitter eine GLP-1(7-36)amid-Freisetzung induzieren können.

Hierfür wurde die GLP-1(7-36)amid-Ausschüttung durch Stimulation mit dem Neurotransmitter Methacholin, einem muskarinergen Agonisten, bzw. Carbachol, einem muskarinergen und nikotinergen Agonisten, untersucht.

4. Im letzten Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob eine Modifikation der GLP-1-Antwort auf luminale Stimuli durch Neurotransmitter möglich ist. Hierzu wurde die GLP-1-Freisetzung unter gleichzeitiger vaskulärer Stimulation mit Atropin und luminaler Stimulation mit Glukose 5 % in 0,9 % NaCl gemessen.

## **IV Material und Methoden**

### **1 Materialien und Herstellung der vaskulären Perfusionslösung**

Zu Beginn jedes Versuchstages wurde ein Krebs-Henseleit Puffer (pH 7,4) aus NaCl bzw. KCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland), CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, NaHPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O und NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Dieser wurde kontinuierlich mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>/ 5 % CO<sub>2</sub>) durchperlt.

Frisches Rinderblut, mit Heparin (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) versetzt, wurde durch Zentrifugieren, Absaugen des Überstandes und Auffüllen mit Pufferlösung gewaschen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Der letzte Überstand wurde ebenfalls verworfen und die Erythrozyten mit 3 % Rinderalbumin (Sigma, St. Louis, USA), 1 % Azunitril 25, 8 mmol Glucose/l (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 0,02 % Heparin in Krebs-Henseleit-Puffer aufgenommen. Azunitril 25 ist ein Aminosäuregemisch aus: 3,4 % Isoleucin, 9,3 % Leucin, 8,5 % Lysin, 6,3 % Methionin, 8,3 % Phenylalanin, 3,4 % Threonin, 1,7 % Tryptophan, 8,4 % Valin, 2,7 % Aspartinsäure, 3,4 % Glutaminsäure, 6,4 % Alanin, 16,8 % Arginin, 15 % Cystein, 6 % Glycin, 3,4 % Histidin, 5,4 % Prolin, 0,9 % Serin, 0,2 % Tyrosin, 2 % Citrullin und 1,5 % Ornithin. Gesamt AS-Gehalt 14,8 g/100 ml (Laboratoire Roger Bellon; Neuilly-sur-Seine, Frankreich).

Der Hämatokrit dieser Lösung wurde auf 25 % eingestellt.

Der so vor jedem Versuchstag frisch hergestellte Blutersatz wurde kontinuierlich mit Carbogen durchperlt und die Temperatur im Wasserbad auf 37°C eingestellt. Der pH-Wert des Blutersatzes lag bei 7,25-7,45.

## 2 Materialien und Herstellung der luminalen und vaskulären Testlösungen

### 2.1 Materialien und Herstellung der luminalen Testlösungen

**Gemischte Sondenkost:** Biosorb (Pfrimmer, Erlangen, Deutschland)

100 ml enthalten: 4 g Protein (16 %), 4 g Fett (36 %), 11,8 g Kohlenhydrate (48 %).

100 ml entsprechen 100 kcal, Osmolarität 270 mosm/l.

**Glukoselösungen:** (Glucose, Roth, Karlsruhe, Deutschland; Aqua ad injectabile und 0,9 %ige NaCl-Lsg., Braun, Melsungen, Deutschland) Je nach Versuchsreihe wurde eine 5 %ige Glukoselösung in Aqua dest., 0,9 % bzw. 1,8 % NaCl oder eine 2,5 %ige Glukoselösung in 0,9 % NaCl angesetzt.

**Aminosäurelösung:** Aminoplasmal PO-10 % (Braun, Melsungen, Deutschland)  
1000 ml: enthalten Isoleucin 4,8 g, Leucin 8,4 g, Lysinmonoacetat 10,43 g, Methionin 2 g, Phenylalanin 4,2 g, Threonin 4,8 g, Tryptophan 2 g, Valin 6,4 g, Arginin 8,6 g, Histidin 5,4 g, Glycin 7 g, Alanin 12,4 g, Prolin 7 g, L-Aspartinsäure 0,9 g, L-Asparagin 1 H<sub>2</sub>O 1,02 g, N-Acetyl-L-tyrosin 2,46 g, L-(+)Glutaminsäure 9 g, Ornithin-1 HCl 2,3 g, Serin 3,2 g, Acetylcystein 0,8 g, Kaliumacetat 2,45 g, Magnesiumacetat-4 H<sub>2</sub>O 0,56 g, Natrium-hydrogenphosphat-2 H<sub>2</sub>O 1,4 g, L-Äpfelsäure 1,01 g, Natriumhydroxid 1,1 g in Wasser für Injektionszwecke. Theoretische Osmolarität: 990 mosm/l. Die Lösung wurde vor Infusion mit Aqua dest. auf 33 % verdünnt.

**Gallensäurelösung:** Na<sup>+</sup>-Taurocholsäure (Sigma, St. Louis, USA)

Vor Infusionsbeginn wurde eine 20 mM Taurocholsäurelösung in 0,9 % NaCl hergestellt.

**Fettemulsionen:** Lipofundin MCT 20 % (Braun, Melsungen, Deutschland) enthält in 1000 ml: Sojabohnenöl 100 g, mittelkettige Triglyceride 100 g, Phospholipide aus Ei

12 g, Glycerol 25 g in Wasser für Injektionszwecke. Osmolarität 380 mosm/l oder Lipofundin MCT 20 % plus 20 mM Taurocholat.

Alle Perfusate wurden vor jedem Versuch frisch angesetzt und auf 37°C im Wasserbad angewärmt. Nach Bolusgabe von 6 ml wurden die Perfusate kontinuierlich mit 0,25 ml/min in das Darmlumen infundiert.

## **2.2 Materialien und Herstellung der vaskulären Testlösungen**

**Carbachol:** Carbachol (Sigma, St. Louis, USA) als  $10^{-5}$  molare Lösung in 0,9 % NaCl mit 3 % Rinderalbumin.

**Methacholin:** Methacholin (Sigma, St. Louis, USA) als  $10^{-5}$  molare Lösung in 0,9 % NaCl mit 3 % Rinderalbumin.

**Atropin:** Atropin (Sigma, St. Louis, USA) als  $10^{-5}$  molare Lösung in 0,9 % NaCl mit 3 % Rinderalbumin.

Alle vaskulären Testlösungen wurden frühestens 5 Minuten vor Beginn der jeweiligen Stimulationsphase angesetzt.

### **3 Tiere**

Es wurde mit Wistar Ratten von 200-300 g Körpergewicht (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) gearbeitet. Die Tiere erhielten eine Standarddiät. Zusammensetzung: 19 % Protein, 50 % Kohlenhydrate, 4 % Fette (Altromin GmbH, Lage, Deutschland). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung.

### **4 Geräte**

- Schlauchpumpe für die vaskuläre Perfusion:

    Miniplus 2 Gilson Typ 3042 (Abimed, England)

- Schlauchpumpe für die luminale Perfusion:

    Microperpex Peristaltikpumpe Nr. 2132002 (Brommen KB, England)

- Probensammler:

    Redi Frac NR. AN 01580 (Pharmacia LKB, England)

- Wasserbäder:

    (Köttermann Labortechnik, Uetze-Hünigen, Deutschland)

- Evaporator :

    Typ 2363 (Liebich, Bielefeld, Deutschland)

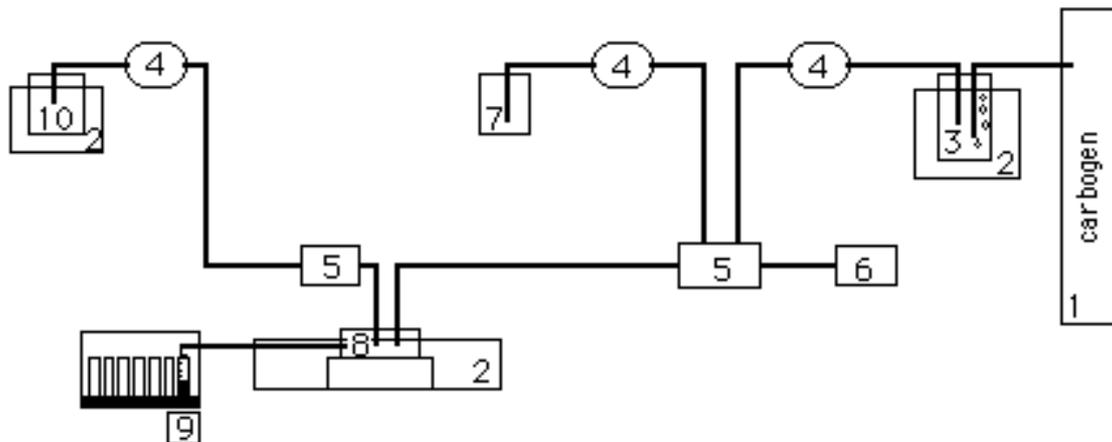
## V Versuchsaufbau und Versuchsablauf

### 1 Versuchsaufbau

#### 1.1 Die vaskuläre Perfusionsapparatur

Die mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % Co<sub>2</sub>) (1) durchperlte und im Wasserbad (2) vorgewärmte vaskuläre Perfusionslösung (Blutersatz) (3) wurde mittels einer Perfusionspumpe (4) transportiert. Ein vorgeschalteter Filter diente dem Zurückhalten von kleinsten Blutgerinnseln. Die vaskuläre Perfusionsgeschwindigkeit betrug 3,5 ml/min. Das Blutersatzperfusat passierte ein Mischpult (5), von dem im Nebenschluß der aktuelle Perfusionsdruck gemessen wurde. (HgCl-Rohr (6)).

#### Schematischer Versuchsaufbau



#### Legende:

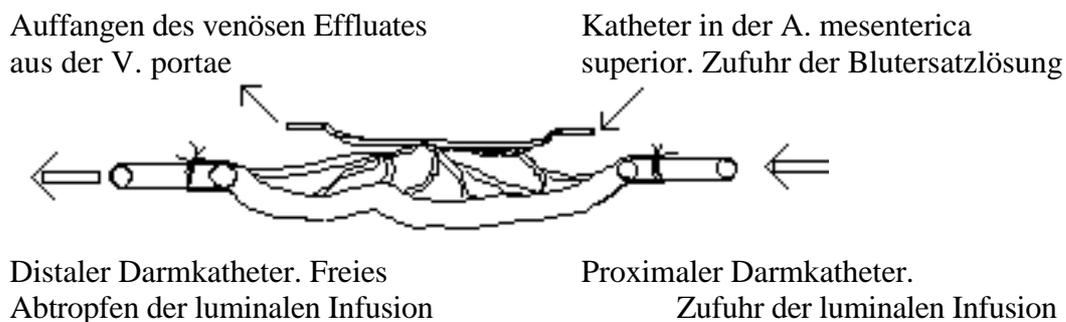
- |                    |                                 |
|--------------------|---------------------------------|
| 1 Carbogenflasche  | 6 HgCl-Rohr                     |
| 2 Wasserbäder      | 7 vaskuläre Testlösung          |
| 3 Blutersatzlösung | 8 Perfusionskammer für Präparat |
| 4 Pumpen           | 9 Probensammler                 |
| 5 Mischpulte       | 10 luminale Testlösung          |

Zusätzlich befand sich hier ein weiterer Zugang für vaskuläre Testlösungen (7), die über einen Infusomaten (4) eingespeist werden konnten. Dieser arbeitete mit 0,25 ml/min so daß sich die vaskuläre Testlösung sogleich mit dem Blutersatzperfusat vermischte.

Bevor das Perfusionsmedium nun den Darm erreichte, wurde es nochmals in einem kleinen abgeschlossenen Reservoir aufgefangen. Durch eine spezielle Anordnung („Blasenfalle“) des abfließenden Katheters wurde sichergestellt, daß ggf. vorhandene Luftblasen nicht weitertransportiert wurden, um Luftembolien in den Endarterien des Darms zu vermeiden.

Über einen Katheter in der Arteria mesenterica superior durchströmte das vaskuläre Perfusat das Präparat, welches sich in einer thermostabilen (37°C) Perfusionskammer (8) befand. Das Perfusat wurde durch freies Abtropfen aus einem Katheter in der Vena portae in einem Fraktionensammler (9) aufgefangen.

### 1.2 Schematische Darstellung des Darmpräparates



### 1.3 Die Infusionsapparatur für die luminalen Testlösungen

Die luminalen Testlösungen wurden vor Versuchsbeginn frisch angesetzt und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Von diesem aus wurden sie mittels einer Perfusionspumpe mit 0,25 ml/min in den proximalen Darmkatheter infundiert. Nach Durchströmen des Darmpräparates konnte die Infusionslösung frei aus dem distalen Katheter abtropfen.

## 2 Versuchsablauf

Nach operativer Freilegung des terminalen Ileums, Insertion der luminalen und vaskulären Katheter und dem Starten der vaskulären Perfusion, wie unten näher beschrieben, wurde das Präparat in die auf 37°C vorgewärmte, 0,9 % NaCl enthaltende Perfusionskammer gelegt.

Das Präparat wurde während der gesamten Versuchsdauer über die Arteria mesenterica superior von oxygeniertem Blutersatz vaskulär durchströmt. Zu Beginn eines jeden Versuchs wurde eine 20-minütige, sogenannte Basalphase mit luminaler Infusion einer 0,9 % NaCl Lösung gestartet. Nach Durchspülen des Darmlumens mit einem 6 ml Bolus der jeweiligen, als Stimulans angewandten Testlösung wurde eine 30-minütige Stimulationsphase angeschlossen.

Durch den Bolus wurde das Darmlumen von der vorherigen Lösung freigespült. Dadurch war gewährleistet, daß die Testlösung von Beginn an in vorgegebener Konzentration und gleichmäßiger Verteilung im Darm vorlag.

Während der gesamten Stimulationsphase wurde die luminale Testlösung dann mit 0,25 ml/min infundiert.

Nach Beendigung der 30-minütigen Stimulationsphase wurde das Lumen mit einem 6 ml Bolus 0,9 % NaCl durchspült und wiederum eine 10-minütige Phase unter Basalbedingungen, daß heißt mit weiterer luminaler Infusion von 0,9 % NaCl, angeschlossen.

## VI Operationstechnik

Zur Präparation des distalen Dünndarms wurde das Tier mit einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital ( Nembutal<sup>R</sup>, 50 mg/kg KG) narkotisiert. Der Bauchraum wurde durch einen Medianschnitt von der Symphyse bis zum Processus xyphoideus eröffnet. Nach Aufsuchen des Sigmoids wurde der Dünndarm auf einem mit Kochsalz getränkten Lappchen auf die linke Seite des Operationsfeldes gelagert.

Dann wurde mit der Präparation der Mesenterialgefäße begonnen. Das Mesenterium wurde unter sorgfältiger Schonung und Freipräparation der Mesenterialgefäße vom Sigmoid bis zum Caecum durchtrennt und die A. colica sinistra, -media und -dextra, ebenso die A. ileocolica präpariert. Nach Abbinden der Gefäße nahe am Mesenterialansatz und einer Unterbindung des Sigmoids wurde das distale Ileum katheterisiert. Hierfür wurde nach Durchtrennung der Mesoappendix das Darmlumen distal der letzten, das Ileum versorgenden Arterie zirkulär eröffnet. Danach wurde ein ebensolcher Schnitt drei Arterienarkaden weiter proximal angelegt (ca. 15-20 cm weiter oral) und ein Silastikkatheter von 4 mm Durchmesser eingeführt und mit einem Faden gesichert. Nun wurde durch diesen proximalen Katheter das Lumen des Ileum mit 10 ml vorgewärmter Kochsalzlösung langsam durchspült. Dadurch wurden Chymusreste aus dem Darm entfernt, die bei der späteren Perfusion als Abflußhindernis eine Druckerhöhung bewirken könnten.

Danach wurde ein 6 mm Durchmesser Silastikkatheter in die distale Öffnung des Ileums eingeführt und wie oben gesichert.

Nun wurden die anfangs ligierten Arterien des Dickdarms durchtrennt und dieser entfernt.

Nach Durchtrennung des Ileums proximal des oberen und distal des unteren Katheters war das Ileumpräparat luminal separiert.

Zur weiteren Präparation des Mesenterialstiels bis zum Abgang der A. mesenterica superior und der V. portae wurden die, dem Präparat nach proximal folgenden Arterien des Ileum und Jejunum der Reihe nach abgebunden und ligiert. An der Flexura duodenojejunalis wurde das bis dorthin vom Mesenterialstiel abpräparierte Darmstück entfernt. Das Duodenum wurde mobilisiert und unter dem Mesenterialstiel nach links gezogen. Jetzt wurden durch zwei weitere Unterbindungen die A. pancreaticoduodenalis

inferior und die Aa. gastroduodenales superior posterior et anterior durchtrennt. Nun waren nur noch die das Ileum versorgenden Gefäße des Mesenterialstiels intakt.

Als nächstes wurde die Vena portae dargestellt und unterminiert. Ebenso wurde mit der Arteria mesenterica superior verfahren. Das gefäßreiche Bindegewebe, welches zwischen Arterie und Vene liegt, wurde mit einem Faden umschlungen, abgebunden und durchtrennt.

Die Arteria mesenterica wurde sodann bis auf die äußere Wand von Bindegewebe befreit und mit einem Faden locker angeschlungen. Genauso wurde mit der Vena portae verfahren. Nach zirkulärer Eröffnung des Arterienlumens wurde ein Metallkatheter (0,75 mm  $\varnothing$ ) eingeführt und mit dem Faden gesichert. Dieser Vorgang dauerte nicht länger als 20 sec.

Schon kurz vor dem Einsetzen des Katheters wurde die Pumpe für den Blutersatz gestartet, so daß beim Einsetzen des Katheters in die Arterie keine Luftbläschen eingeschwemmt werden konnten und die arterielle Zirkulation nur für wenige Sekunden unterbrochen war.

Das Lumen der Vena portae wurde ebenfalls eröffnet, ein Silastikkatheter (1mm  $\varnothing$ ) eingesetzt und gesichert.

Nach dem Durchtrennen der beiden Gefäße auf Seiten des Tieres war das Präparat vollständig mobilisiert und wurde in die auf 37°C vorgewärmte, 0,9 %ige Kochsalzlösung enthaltende Perfusionskammer gelegt.

## **VII Analytische Methoden**

### **1 Aufbereitung des venösen Effluats**

Das in Zwei-Minuten-Abständen auf Eis gesammelte venöse Effluat aus der Vena portae wurde auf 250 µl 200 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgefangen. Die Menge wurde bestimmt und die Proben sofort bei 2000 U/min für 10 min abzentrifugiert und der Plasmaüberstand abgenommen. Für die Bestimmung der GLP-1-Konzentration wurden die Proteine mit Ethanol (2:1) gefällt und die Proben erneut bei 2000 U/min für 10 min zentrifugiert, um die ausgefallenen Proteine zu separieren. Der Überstand wurde abdekantiert, evaporiert und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

### **2 Bestimmung des GLP-1 Gehalts der Proben**

Es wurde ein kompetitiver Radioimmunoassay (Affiniti, Nottingham, England) zum GLP-1(7-36)amid-Nachweis benutzt. Der Antikörper (GA 1178) wird nach Bindung von GLP-1 (7-36)amid an Rinderalbumin als polyklonaler Kaninchen-Antikörper gewonnen.

Die Iodination erfolgte mit Jod-125 nach einer modifizierten iodogen Methode (Göke und Conlon; 1988)

Der Antikörper zeigt eine 100 % Reaktivität mit GLP-1(1-37)/(1-36)amid und GLP-1(7-36)amid. Die Sensitivität beträgt 2 fmol/Bestimmung.

Kreuzreaktionen wurden weder mit GIP, Glukagon, Glicentin, Oxyntomodulin noch mit GLP-2 gesehen.

Der Inter- und Intra-Essay Variationskoeffizient beträgt 10,2 % bzw. 3,4 %. Nach Ethanolextraktion beträgt die Wiederfindungsrate von GLP-1(7-36)amid  $84 \pm 6$  % (Herrmann et al., 1995)

### **3 Bestimmung der Vitalitätskriterien**

1. Der Glukosegehalt des Blutersatzes aus dem zu- bzw. abführenden Katheter ("arteriell" bzw. "venös") wurde mittels der Hexokinase-Methode bestimmt.

Der Glukoseverbrauch wurde aus der arteriovenösen Glukosedifferenz, bezogen auf die Zeit und das Trockengewicht des Präparates bestimmt.

2. Der Sauerstoffpartialdruck und die -sättigung wurde mit einem Radiometer (Kopenhagen, ABL System) bestimmt. Der Sauerstoffgehalt wurde dann nach folgender Formel errechnet:  $O_2 = 0,003 * PO_2 + Hb * Sa O \% * 0,01$ . Der Sauerstoffverbrauch wurde aus der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz, bezogen auf die Zeit und das Trockengewicht des Präparates berechnet. Die Kalkulation des Glukose- und Sauerstoffverbrauches erfolgte in Anlehnung an eine früher veröffentlichte Methode (Sakai et al., 1980).

3. Die Lactatausschüttung wurde mittels einer enzymatischen Routinemethode bestimmt. Die Konversionsrate von Glukose in Lactat wurde nach der Formel:  $(Lactat * 0,5) : Glukoseverbrauch$  in Prozent berechnet.

#### **4 Statistische Auswertung**

Die Daten werden in den Abbildungen als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung in fmol/Einheit dargestellt. Die integrierte GLP-1-Ausschüttung über 30 min stellt die in diesem Zeitraum ausgeschüttete GLP-1-Menge, abzüglich der für diesen Zeitraum zu veranschlagenden basalen Ausschüttung von GLP-1 dar. Diese wurde aus der vorhergehenden Basalperiode des Versuches ermittelt.

Die statistische Auswertung der Daten zum Vergleich der basalen Freisetzungsrates mit der Freisetzung von GLP-1 während der Stimulationsperioden, bzw. der Vergleich der GLP-1-Freisetzung durch unterschiedliche Stimuli, erfolgte mit dem Student T-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Werte. Die statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  festgelegt.

## **VIII Ergebnisse**

### **1 Ergebnisse der Vitalitätsprüfung**

#### **1.1 Volumetrie**

Die Volumenbestimmung des venösen Effluates aus der V. portae erfolgte in 2-minütigen Abständen. Da die vaskuläre Blutersatzperfusion („arterieller“ Zufluß) mit konstanter Geschwindigkeit von 3,5 ml pro Minute durchgeführt wurde, konnte schon während der Versuche eine Bilanz zwischen „arteriellem“ Zufluß und „venösem“ Abfluß erfolgen.

Die erlaubte Abweichung wurde auf 5 % festgesetzt.

#### **1.2 Vaskuläres Druckverhalten**

Bei allen Präparaten lag der Perfusionsdruck zwischen 70 und 90 mm Hg mit einer maximalen Abweichung innerhalb eines Versuches von  $\pm 10$  mmHg.

#### **1.3 Sauerstoffsättigung**

Die „venöse“ Sauerstoffsättigung wurde ebenfalls nach 10 und 60 Minuten bestimmt. Sie lag nach 10 Minuten bei  $65,1 \pm 5$  %, nach 60 Minuten bei  $68,4 \pm 5,1$  % (kein signifikanter Unterschied) (N= 6).

#### **1.4. Sauerstoffverbrauch des Präparates**

Schon während der Perfusionszeit konnte man durch makroskopischen Farbvergleich des „arteriellen“ zum „venösen“ Blut den Verbrauch von Sauerstoff im Präparat verfolgen. Es zeigte sich eine deutlich blau-rote Farbe des „venösen“ Effluates im Vergleich zu einer hellroten Farbe des „arteriellen“ Zuflusses.

Zur Sicherung dieser visuellen Ergebnisse wurde nach 10 Minuten und nach 60 Minuten Perfusionszeit der Sauerstoffverbrauch ermittelt. Nach 10 Minuten wurden vom Präparat  $0,165 \pm 0,024$  ml O<sub>2</sub>/min/g Trockengewicht verbraucht, nach 60 Minuten  $0,148 \pm 0,027$  ml O<sub>2</sub>/min/g Trockengewicht (kein signifikanter Unterschied) (N= 6).

### **1.5. Glukoseverbrauch**

Der Glukoseverbrauch, ein Parameter für aktive Stoffwechselforgänge in den Enterozyten, lag nach 10 Minuten bei  $0,19 \pm 0,01$  mg/min/g Trockengewicht, nach 60 Minuten bei  $0,21 \pm 0,02$  mg/min/g Trockengewicht (kein signifikanter Unterschied) (N= 6).

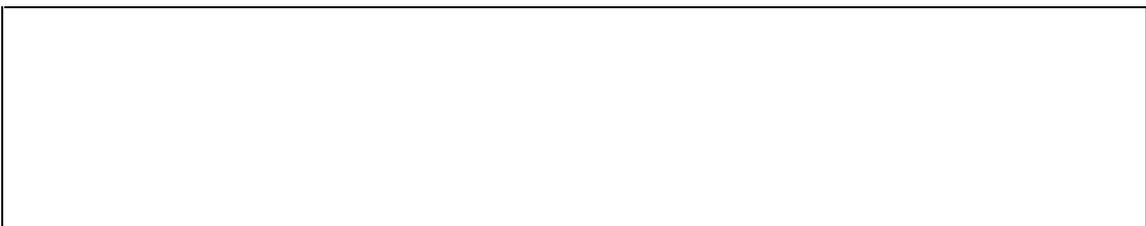
### **1.6. Lactatproduktion**

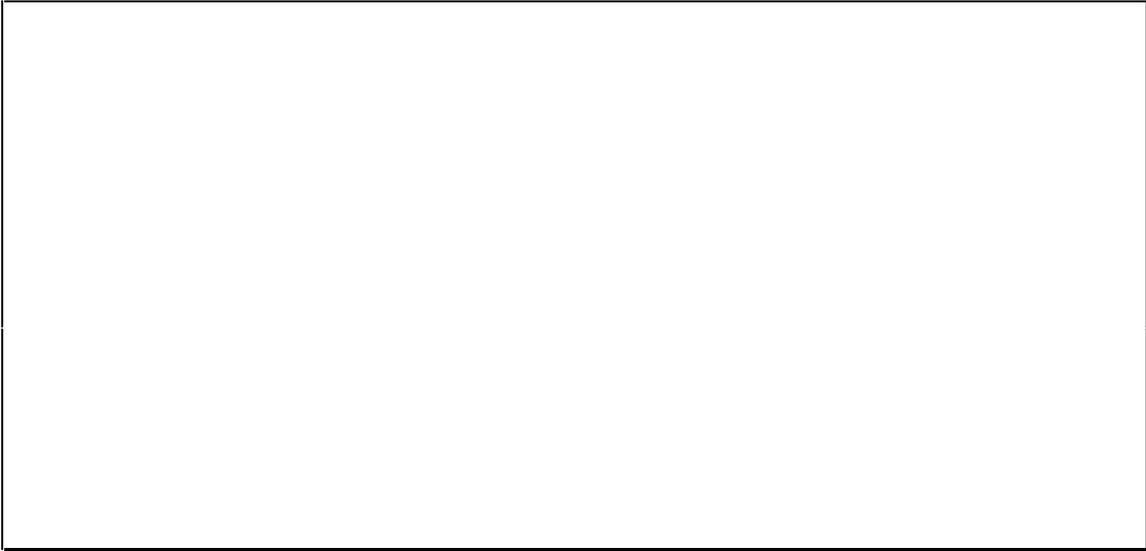
Die Lactatproduktion wurde im Verhältnis zum Glukoseverbrauch berechnet. Hier zeigte sich eine geringe Abnahme der Glukose/Lactat Konversion von  $37,4 \pm 3,2$  % in der 10. Minute auf  $26,9 \pm 3,6$  % in der 60. Minute ( N= 6).

### **1.7. Histologische Auswertung**

Die histologische Auswertung erfolgte bei einer mittleren Präparationsdauer von 22 Minuten und nach einer Perfusionszeit von ca. 70 Minuten. Die Präparate wurde zur Fixation sofort in eine 4 %ige Formalinlösung gelegt. Die Färbung erfolgte mit Hämalaun-Eosin.

Es wurde kein Ödem in der Lamina propria oder in der Mukosa gesehen. Es fanden sich keine Lymphangiectasien und auch keine histologischen Hinweise auf Zellzerstörung. Das Epithel auf und in den Krypten zeigte sich intakt.





Histologischer Schnitt, Rattenileum nach 70 Minuten „arterieller“ Perfusion mit einer Bluteratzlösung, Färbung HE, Vergrößerung 400-fach.

## **2 Basale GLP-1-Freisetzung und GLP-1-Freisetzung nach luminaler Infusion einer gemischten Diät.**

Um die GLP-1(7-36)amid (GLP-1) -Freisetzung aus dem Ileum zu untersuchen, wurde bei jedem Versuch vor der Stimulationsphase eine 20-minütige Basalphase mit luminaler Infusion einer 0,9 %igen NaCl-Lösung (0,25 ml/min) durchgeführt. Die über alle durchgeführten Versuche gemittelte basale GLP-1-Freisetzung betrug  $12,2 \pm 5,5$  fmol/2 Minuten.

Nach einer konstanten Basalperiode kommt es in den Versuchen mit erhöhter GLP-1-Freisetzung durch das Stimulans zu einem prompten Ansteigen der GLP-1-Ausschüttung nach Stimulationsbeginn und nach Stimulationsende zu einem Abfallen der GLP-1-Freisetzung.

In der Stimulationsphase wurde das jeweilige Stimulans, hier eine gemischte Diät aus Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen, nach einer Bolusgabe dieser Mischung von 6 ml, kontinuierlich mit 0,25 ml/min in das Lumen des Darms infundiert. Diese Stimulationsphase dauerte 30 Minuten. Daran schloß sich nach einer Bolusgabe von 6 ml 0,9 % NaCl erneut eine 10-minütige Phase mit luminaler Infusion von 0,9 % NaCl (0,25 ml/min) an.

In der Basalphase zeigte sich eine konstante Ausschüttung von GLP-1. Nach Infusionsbeginn der gemischten Diät kam es rasch zu einem starken Anstieg der GLP-1-Ausschüttung. Nach diesem initialen Anstieg kam es, nach kurzzeitigem leichtem Abfall, zu einem über die gesamte Stimulationsphase weiteren langsamen Anstieg der GLP-1-Freisetzung. Ein Höchstwert wurde gegen Ende der Stimulationsphase mit  $31,7 \pm 11,3$  fmol/2 Min. erreicht (N = 4). Nach Beendigung der Stimulationsphase kam es zu einem raschen Abfall der GLP-1-Freisetzung, der nach 10 Minuten etwa das Doppelte des Mittelwertes der 1. Basalperiode erreichte (Abb. 1).

Der Mittelwert der Basalphase lag bei  $10,0 \pm 1,5$  fmol/2 Min., in der Stimulationsphase bei  $24,2 \pm 5,6$  fmol/2 Min. Dies entsprach einer Steigerung der Freisetzung von GLP-1 um ca. 140 % während der Stimulationsphase gegenüber der basalen Ausschüttung.

Insgesamt konnte über die 30-minütige Stimulationsphase durch die luminale Infusion der gemischten Diät eine Steigerung der GLP-1-Ausschüttung von  $212,8 \pm 66,1$  fmol über basal gemessen werden (Abb. Nr. 4).

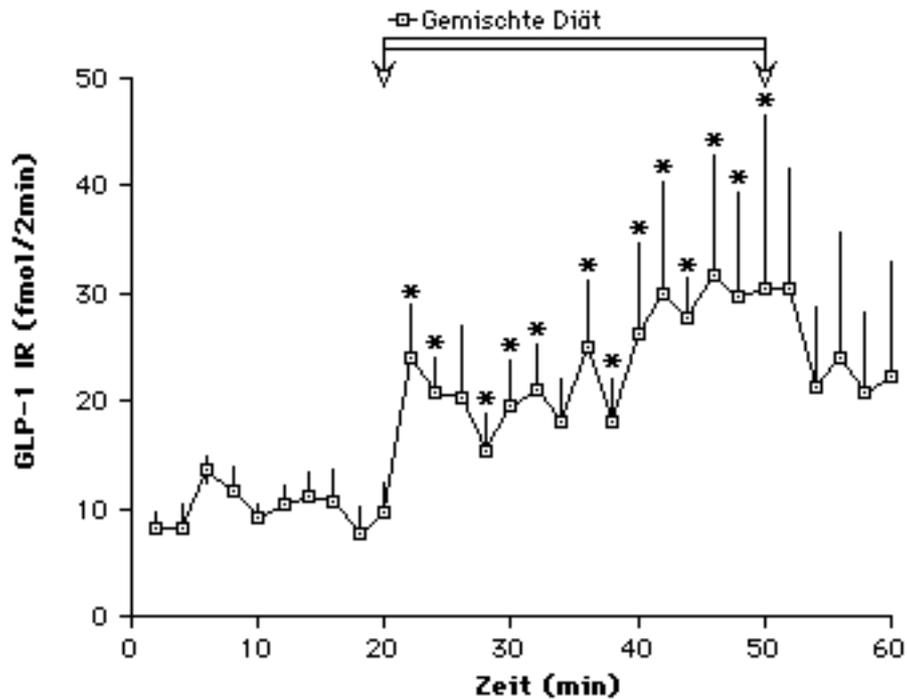


Abb. 1: GLP-1 Freisetzung in der Basalphase und nach luminaler Infusion einer gemischten Diät. (Der Infusionszeitraum der gemischten Diät ist durch den horizontalen Balken mit Pfeilen markiert). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M in fmol/2 Min. (N= 4). \* =  $p < 0.05$  gegenüber basal. GLP-1IR = GLP-1-Immunoreaktivität.

### **3 Freisetzung von GLP-1 nach luminaler Applikation von Glukose in Aqua destillata bzw. in verschiedenen Konzentrationen von NaCl-Lösungen**

#### **3.1 GLP-1-Freisetzung nach luminaler Infusion von 2,5 % Glukose in 0,9 % NaCl**

Bei diesen Versuchen erfolgte nach der Basalphase eine 30-minütige Stimulationsphase mit luminaler Infusion von 2,5 % Glukose in 0,9 % NaCl. Hierbei zeigte sich keine signifikante Steigerung der GLP-1-Freisetzung in der Stimulationsphase (Mittelwert  $11,8 \pm 5,8$  fmol/2 Min.) im Vergleich mit der Basalphase (Mittelwert  $7,9 \pm 4,3$  fmol/2 Min.), (N = 4).

#### **3.2 GLP-1-Freisetzung nach luminaler Infusion von 5 % Glukose in 0,9 % NaCl**

Wie in den vorangegangenen Versuchen wurde auch hier eine 30-minütige luminale Stimulationsphase an eine 20-minütige Basalphase angeschlossen.

Die Mittelwerte der GLP-1-Freisetzung in der Basalphase lagen bei  $16,3 \pm 2,9$  fmol/2 Min. Nach Stimulationsbeginn zeigte sich ein starker Anstieg der GLP-1-Ausschüttung (von  $16,5 \pm 4,7$  auf  $40,4 \pm 13,5$  fmol/2 Min.).

In der weiteren Stimulationsphase blieben die GLP-1-Werte kontinuierlich erhöht und erreichten ein Maximum von  $42,1 \pm 15,6$  fmol GLP-1/2 Min. (Abb. 2). Nach Beendigung der Stimulationsphase fiel die GLP-1-Freisetzung während der erneuten luminalen NaCl-Infusion wieder ab (N = 4).

Die Ausschüttung von GLP-1 in der 30-minütigen luminalen Stimulationsphase betrug  $228,1 \pm 102,8$  fmol nach Abzug der basalen Ausschüttungsrate (Abb. 7). Es kam somit während der luminalen Stimulation zu einer um 90 % stärkeren GLP-1-Freisetzung im Vergleich mit der basalen Ausschüttung.

### 3.3 GLP-1-Freisetzung nach luminaler Infusion von 5 % Glukose in Aqua destillata

Bei diesen Versuchen erfolgte nach der Basalphase eine 30-minütige Stimulationsphase mit luminaler Infusion von 5 % Glukose in Aqua destillata.

Nach luminaler Infusion der 5 %igen Glukoselösung war ein geringer (18 %), aber signifikanter Anstieg der GLP-1-Freisetzung zu erkennen. Der mittlere Wert der GLP-1-Ausschüttung in der Stimulationsphase lag bei  $9,8 \pm 1,4$  fmol/2 Min. (N =4), (Abb. 2). In der 30-minütigen luminalen Stimulationsphase konnte hier eine vermehrte Ausschüttung von  $22,5 \pm 3,5$  fmol GLP-1 über basal nachgewiesen werden (Abb. 4).

Darstellung der GLP-1-Freisetzung nach luminaler 5 %iger Glukoseinfusion in Aqua dest. bzw. 0,9 % NaCl

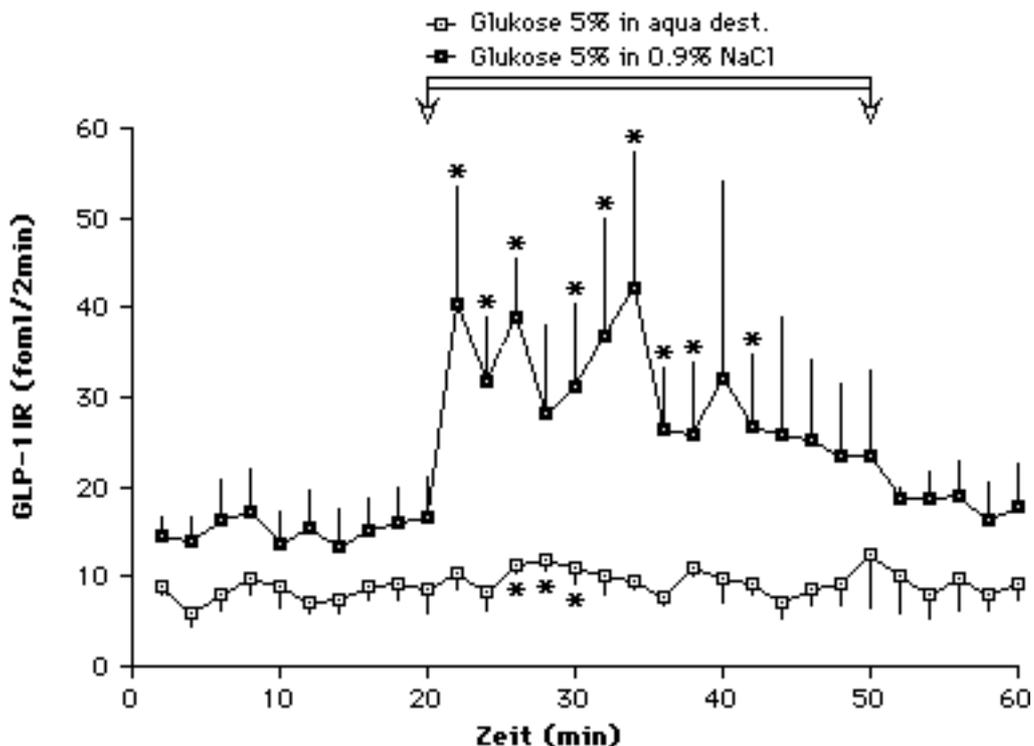


Abb. 2: Vergleich der GLP-1 Freisetzung nach luminaler Infusion von 5 % Glukose in 0,9 % NaCl (N=5) bzw. in Aqua dest. (N=4). Der Stimulationszeitraum wird durch den horizontalen Balken mit Pfeilen markiert. Dargestellt werden die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M in fmol/2 Min. \* =  $p < 0.05$  gegenüber basal. GLP-1IR = GLP-1 Immunoreaktivität

### 3.4 GLP-1-Freisetzung nach luminaler Infusion von 5 % Glukose in 1,8 % NaCl

An die 20 minütige Basalphase wurde eine 30 Minuten währende Stimulationsphase mit luminaler Infusion von 5 % Glucose in 1,8 % NaCl angeschlossen.

In der Basalphase lag die mittlere Ausschüttung von GLP-1 bei  $12,2 \pm 3,1$  fmol/2 Min. Nach Stimulationsbeginn stieg die Freisetzung von GLP-1 direkt um ca. 50 %, von  $14,7 \pm 3,7$  auf  $25,3 \pm 4,8$  fmol/2 Min., an. (N = 4), (Abb. 3).

Insgesamt konnte während der 30-minütigen luminalen Stimulation mit 5 % Glucose in 1,8 % NaCl eine vermehrte Ausschüttung von 98,8 fmol GLP-1 über basal gemessen werden (Abb. 4).

Darstellung der GLP-1-Freisetzung nach luminaler 5 %iger Glukoseinfusion in Aqua dest. bzw. 0,9 % NaCl

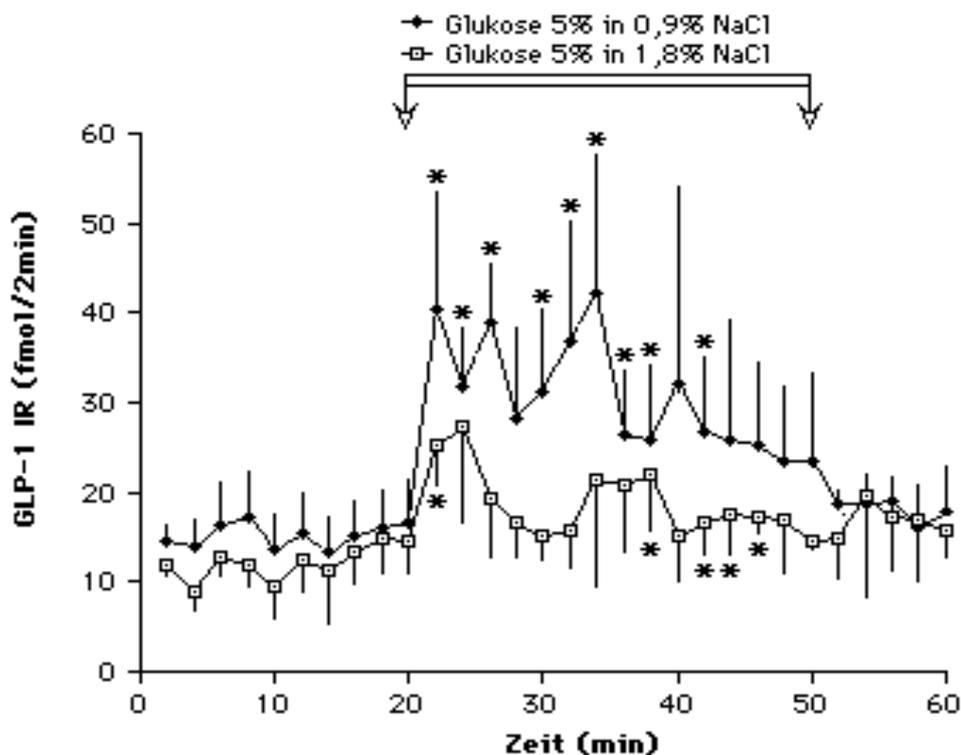


Abb. 3: Freisetzung von GLP-1 durch luminaler Infusion mit 5 % Glukose in 0,9 % NaCl (N=5) bzw. 1,8 % NaCl (N=4). Die Dauer der Stimulationsphasen wird durch den horizontalen Balken mit Pfeilen markiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M in fmol/2 Min. \* =  $p < 0,05$  gegenüber basal. GLP-1 IR = GLP-1 Immunoreaktivität.

Es ergab sich eine verdoppelte integrierte GLP-1-Freisetzung nach luminaler Glukoseinfusion in 0,9 % NaCl im Vergleich zu 1,8 % NaCl ( $228,1 \pm 102,8$  bzw.  $98,8 \pm 47,9$  fmol) (Abb. 4).

Integrierte Freisetzung von GLP-1 nach luminaler Infusion des Ileums mit 5 % Glukose in Aqua dest. bzw. in zwei unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl-Lösungen

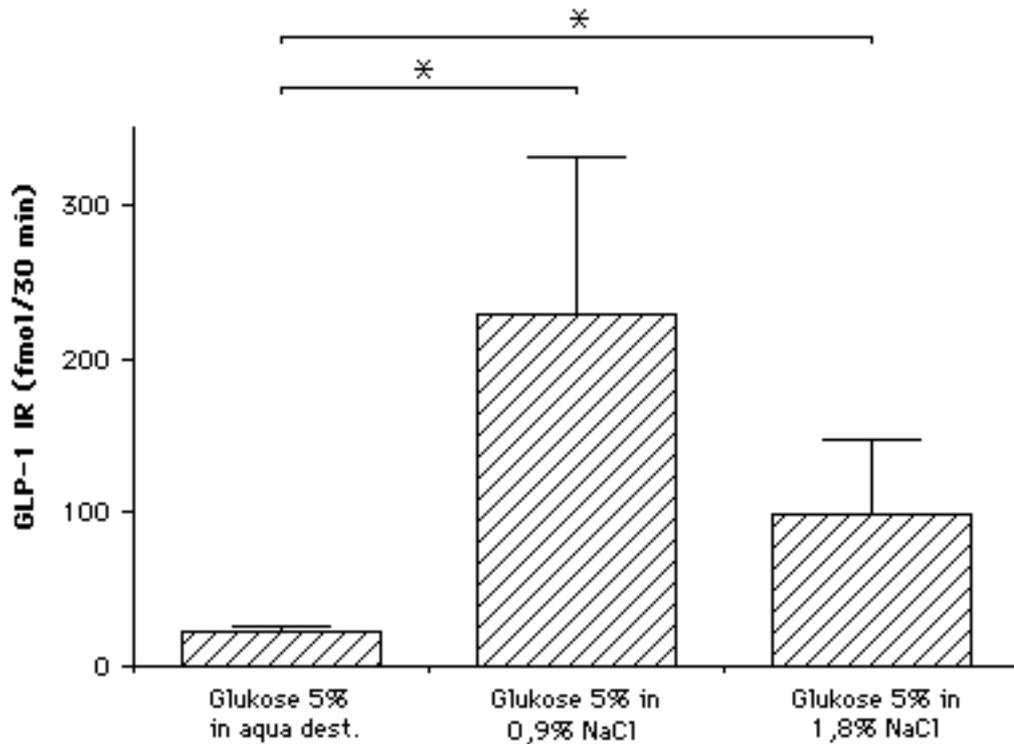


Abb. 4: Integrierte GLP-1 Freisetzung in fmol/30 Minuten (mit Standardabweichung) durch luminale Infusion von 5 % Glukose in Aqua destillata, 5 % Glukose in 0,9 % NaCl bzw. 5 % Glukose in 1,8 % NaCl. Die Markierungen über den Säulen geben den signifikanten Unterschiede der GLP-1-Freisetzung zwischen den jeweils an den Endpunkten liegenden Versuchen an. \* =  $p < 0.05$  gegenüber Glukose 5 % in aqua dest. GLP-1 IR = GLP-1-Immunoreaktivität.

## **4 Ergebnisse der GLP-1-Freisetzung nach luminaler Infusion von Fett- bzw. Gallensäurelösungen in das Ileum**

### **4.1 GLP-1-Ausschüttung nach luminaler Infusion einer Fettemulsion: Lipofundin MCT 20 %**

Es folgte nach der Basalphase eine Stimulationsphase mit luminaler Infusion von Lipofundin MCT 20 %.

In der Basalphase ergab sich eine mittlere GLP-1-Freisetzung von  $8,0 \pm 1,0$  fmol/2 Min. Der Mittelwert der Stimulationsphase lag bei  $8,4 \pm 1,4$  fmol GLP-1/2 Min (N = 4), (Abb. 5)

Während der 30-minütigen luminalen Stimulation mit Lipofundin ließ sich keine signifikante Steigerung der GLP-1-Freisetzung feststellen.

### **4.2 GLP-1-Ausschüttung nach luminaler Infusion mit Gallensäuren**

Auf eine 20-minütigen Basalphase folgte eine 30-minütige luminale Infusion in das Ileum mit einer 20 mM Taurocholat-Lösung. Daran anschließend erfolgte wieder eine 10-minütige luminale Infusion mit 0,9 % NaCl.

Der Mittelwert der Basalphase lag bei  $12,2 \pm 3,4$  fmol GLP-1/2 Min. Der Mittelwert der Stimulationsphase erreichte  $15,1 \pm 4,5$  fmol GLP-1/2 Min ( $p < 0,05$ ). Die integrierte GLP-1-Ausschüttung in den 30 Minuten der Stimulationsphase lag bei  $43,3 \pm 17,1$  fmol GLP-1 über basal (N = 6) (Abb.5), dies entspricht einer Steigerung von 28 %.

### 4.3 GLP-1-Freisetzung nach luminaler Infusion einer mit Gallensäuren versetzten Fettemulsion

Auch bei diesen Versuchen wurde nach der Basalphase eine 30-minütige Stimulationsphase angeschlossen. In dieser wurde ein Gemisch aus der Fettemulsion mit 20 mM Gallensäure infundiert.

Der Mittelwert der Basalphase betrug  $16,4 \pm 1,2$  fmol GLP-1/2 Min., der der Stimulationsphase  $18,6 \pm 2,2$  fmol GLP-1/2 Min. (N = 4). Die Steigerung gegenüber den gemittelten Basalwerten lag bei 13 % ( $p < 0,05$ ). Der integrierte Mittelwert der GLP-1-Ausschüttung über 30 Minuten lag bei  $33,4 \pm 12,7$  fmol über basal (Abb. 5).

Vergleichende Darstellung der integrierten GLP-1-Freisetzung über 30 Minuten nach Stimulation mit Glukose 5 % in 0,9 % NaCl, einer Fettemulsion, einer Gallensäurelösung bzw. einem Gemisch aus Fettemulsion und Gallensäuren

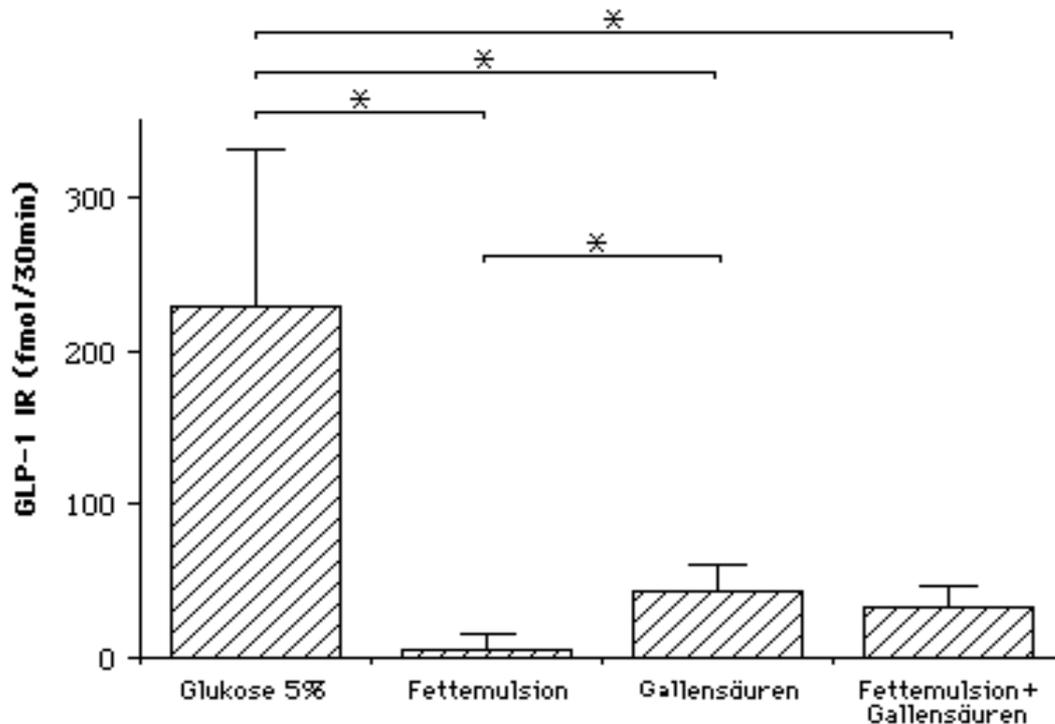


Abb. 5: Integrierte GLP-1-Freisetzung innerhalb von 30 Minuten in fmol über basal (mit Standardabweichung) nach luminaler Infusion des Ileums mit Glukose 5 % in 0,9 % NaCl, einer Fettemulsion, einer Gallensäurelösung 20 mM, bzw. einer Fettemulsion mit Gallensäuren 20 mM versetzt. \* =  $p < 0,05$  gegenüber Glukose 5 % in 0,9 % NaCl, bzw. der Fettemulsion. GLP-1 IR = GLP-1 Immunoreaktivität.

## 5 Freisetzung von GLP-1 aus dem Ileum nach luminaler Infusion eines Aminosäurengemisches

Es wurde zuerst eine 20-minütige Basalphase durchgeführt. Daran anschließend erfolgte eine 30-minütige Stimulationsphase mit luminaler Infusion des Aminosäurengemisches.

In der Basalphase wurden im Mittel  $13,2 \pm 4,7$  fmol GLP-1/2 Min. ausgeschüttet, in der Stimulationsphase  $15,0 \pm 7,2$  fmol/2 Min. Dies entsprach einem Anstieg von 14 % über basal, welcher nicht signifikant war (N = 4).

Darstellung der integrierten GLP-1-Freisetzung innerhalb von 30 Minuten durch Stimulation mit einer gemischten Diät bzw. den einzelnen untersuchten Nahrungsbestandteilen

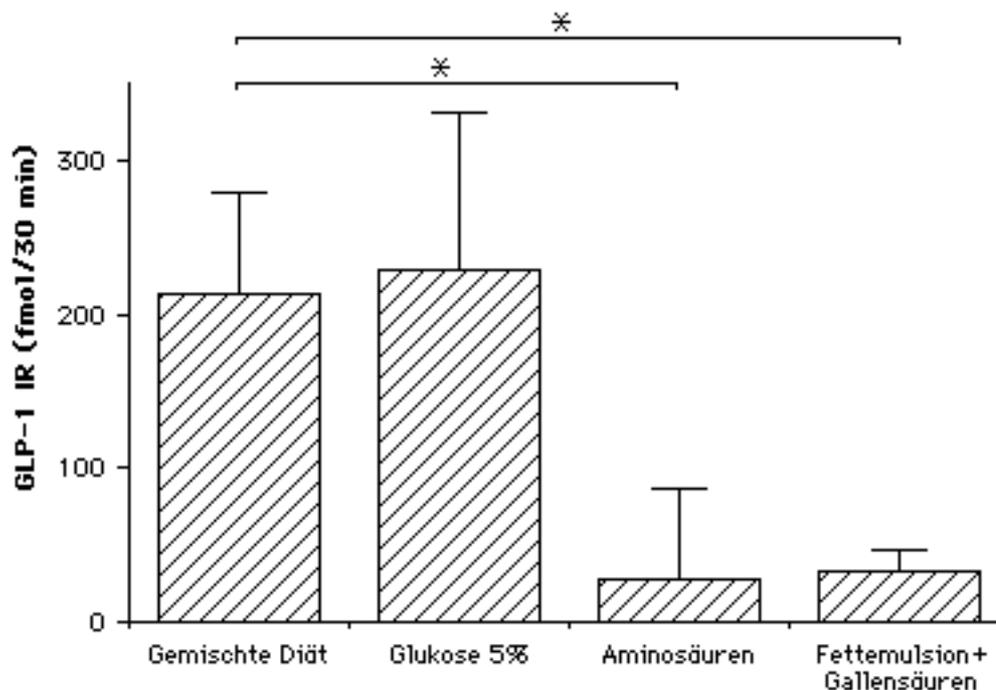


Abb.6: GLP-1-Freisetzung über 30 Minuten in fmol über basal (mit Standardabweichung) nach luminaler Infusion des Ileums mit einer gemischten Diät, Glukose 5 % in 0,9 % NaCl, einer Aminosäurenmischung bzw. einer Fettemulsion mit 20 mM Gallensäure. GLP-1IR = GLP-1 Immunoreaktivität. \* =  $p < 0,05$  gegenüber der Stimulation mit einer gemischten Diät.

## 6 GLP-1-Freisetzung durch Stimulation mit Neurotransmittern

### 6.1 GLP-1-Freisetzung durch vaskulärer Infusion einer $10^{-5}$ molaren Carbachollösung

Über die gesamte Versuchsdauer wurde das Darmlumen mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung durchspült (0,25 ml/Min.). Nach einer 20-minütigen Basalphase, ohne weitere vaskuläre Infusion, wurde eine 30-minütige Stimulationsphase angeschlossen. Während dieser erfolgte die vaskuläre Infusion einer  $10^{-5}$  molaren Carbachollösung (muscarinischer und nicotiner Agonist). Nach der Stimulationsphase folgte erneut eine 20-minütige Phase ohne weitere vaskuläre Stimulation.

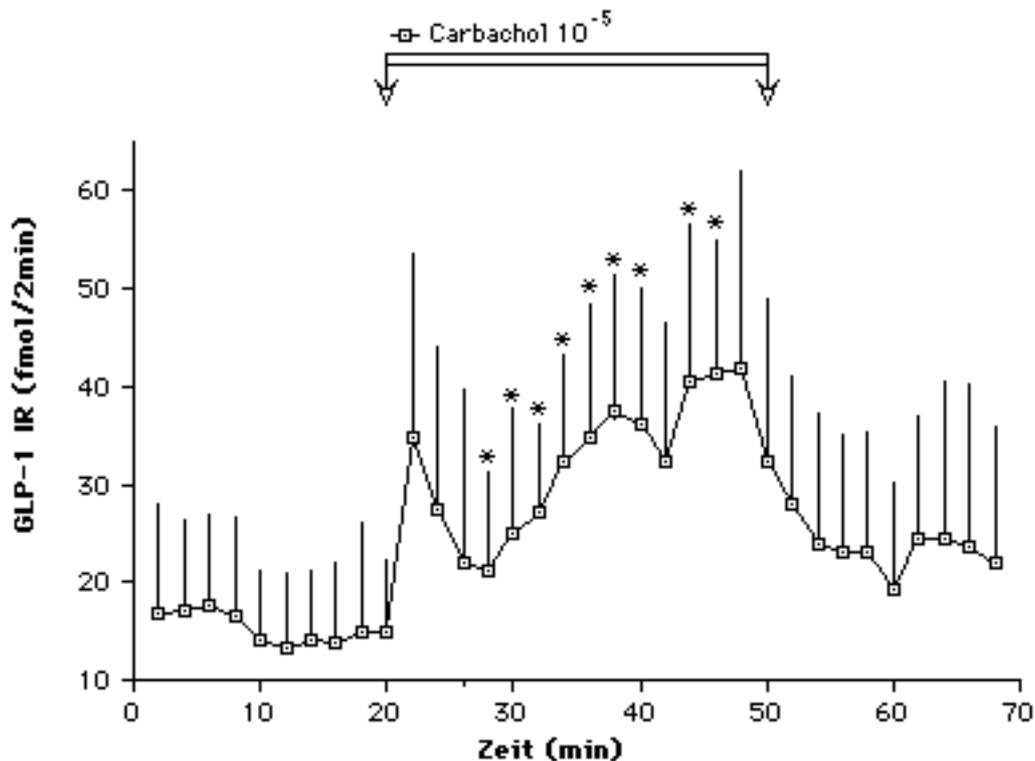


Abb.7: GLP-1-Freisetzung nach vaskulärer Infusion von Carbachol  $10^{-5}$  molar (Stimulationszeitraum gekennzeichnet durch horizontalen Balken mit Pfeilen). (N=4) Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M in fmol/2 Min. \* = p < 0,05 gegenüber basal. GLP-1 IR = GLP-1-Immunoreaktivität.

Bei den Versuchen zur GLP-1-Freisetzung durch vaskuläre Infusion von Carbachol  $10^{-5}$  ergab sich in der Basalphase ein Mittelwert von  $15,3 \pm 9,7$  fmol/2min bei konstanter Freisetzung von GLP-1. Die GLP-1-Freisetzung nach Carbacholinfusion erfolgte zweiphasig. Nach Beginn der Stimulationsphase erreichte die GLP-1-Ausschüttung einen ersten Höchstwert von  $32,0 \pm 14,5$  fmol/2 Min. Danach fiel die GLP-1 Freisetzung wieder ab, um 6 Minuten nach Stimulationsbeginn erneut anzusteigen. Vor Stimulationsende wurde dann ein zweiter Höchstwert von  $41,8 \pm 20,2$  fmol/2 Min. erreicht (Abb. 7). Nach Stimulationsende fiel die GLP-1-Freisetzung wieder stark ab (N = 4).

Der Mittelwert der GLP-1-Freisetzung in der Stimulationsphase betrug  $29,2 \pm 9,9$  fmol/2 Min. Durch die Infusion einer  $10^{-5}$  molaren Carbachollösung ließ sich die GLP-1-Ausschüttung gegenüber der Basalrate um ca. 90 % steigern ( $p < 0,05$ ).

Insgesamt wurden während der 30-minütigen Infusionsphase  $202,7 \pm 36,2$  fmol GLP-1 über basal freigesetzt.

## 6.2 GLP-1-Freisetzung durch vaskulärer Infusion einer $10^{-5}$ molaren Methacholinlösung

Wie im vorherigen Versuch wurde auch hier nach einer 20-minütigen Basalphase eine 30-minütige Stimulationsphase angeschlossen.

In dieser erfolgte die vaskuläre Infusion mit einer  $10^{-5}$  molaren Methacholinlösung (muscarinerner Agonist). Während der gesamten Versuchsdauer wurde auch hier eine 0,9 %ige NaCl-Lösung luminal infundiert.

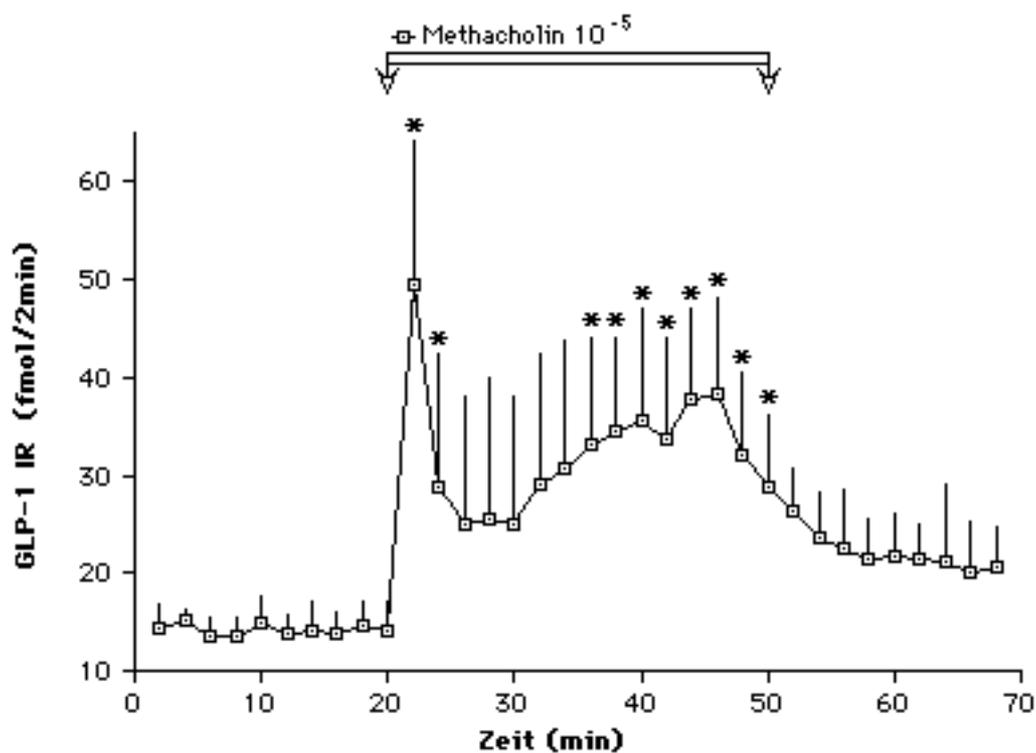


Abb. 8: GLP-1 Freisetzung nach vaskulärer Infusion von Methacholin  $10^{-5}$  molar. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M in fmol/2Min. (N=5). (Der Stimulationszeitraum ist durch den horizontalen Balken mit Pfeilen gekennzeichnet). \* =  $p < 0,05$  gegenüber basal. GLP-1 IR= GLP-1-Immunoreaktivität.

In der Basalphase lag die GLP-1-Freisetzung konstant bei einem Mittelwert von  $13,3 \pm 2,8$  fmol/2 Min. In der Stimulationsphase erfolgte die GLP-1-Freisetzung zweigipfelig. Sofort nach Infusionsbeginn der Methacholinlösung stieg die GLP-1-Freisetzung sehr stark an, als Höchstwert wurden  $49,4 \pm 14,8$  fmol/2 Min. erreicht. Danach erfolgte ein Abfall und nach einem langsamen erneuten Anstieg wurde ein zweiter Höchstwert gegen Ende der Stimulationsphase mit  $38,3 \pm 9,8$  fmol/2 Min. erreicht (Abb. 8). Auch hier kam es nach Beendigung der vaskulären Infusion zu einem schnellen Abfall der GLP-1-Freisetzung (N = 5).

Insgesamt wurden in der Stimulationsphase mit Methacholin  $250,6 \pm 114,1$  fmol GLP-1/30 Min. über basal ( $p < 0,05$ ) freigesetzt.

### 6.3 Interaktion zwischen luminaler und vaskulärer Stimulation der L-Zelle

Bei geringfügig verändertem Versuchsaufbau erfolgte nach einer Basalphase von 10 Minuten die vaskuläre Infusion von Atropin  $10^{-5}$  über insgesamt 50 Minuten. 20 Minuten nach Beginn der vaskulären Atropininfusion wurde zusätzlich über 30 Minuten eine Glukoselösung 5 % in 0,9 % NaCl luminal infundiert.

In den ersten 10 Minuten der Basalphase betrug der Mittelwert der GLP-1-Freisetzung  $14,2 \pm 8,3$  fmol/2 Min., in der Basalphase mit Atropininfusion betrug der Mittelwert  $15,9 \pm 7,9$  fmol/2 Min. (kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Basalphasen).

Vergleich der GLP-1-Freisetzung nach alleiniger luminaler Glukoseinfusion mit der Freisetzung nach gleichzeitig vaskulärer Atropin- und luminaler Glukoseinfusion

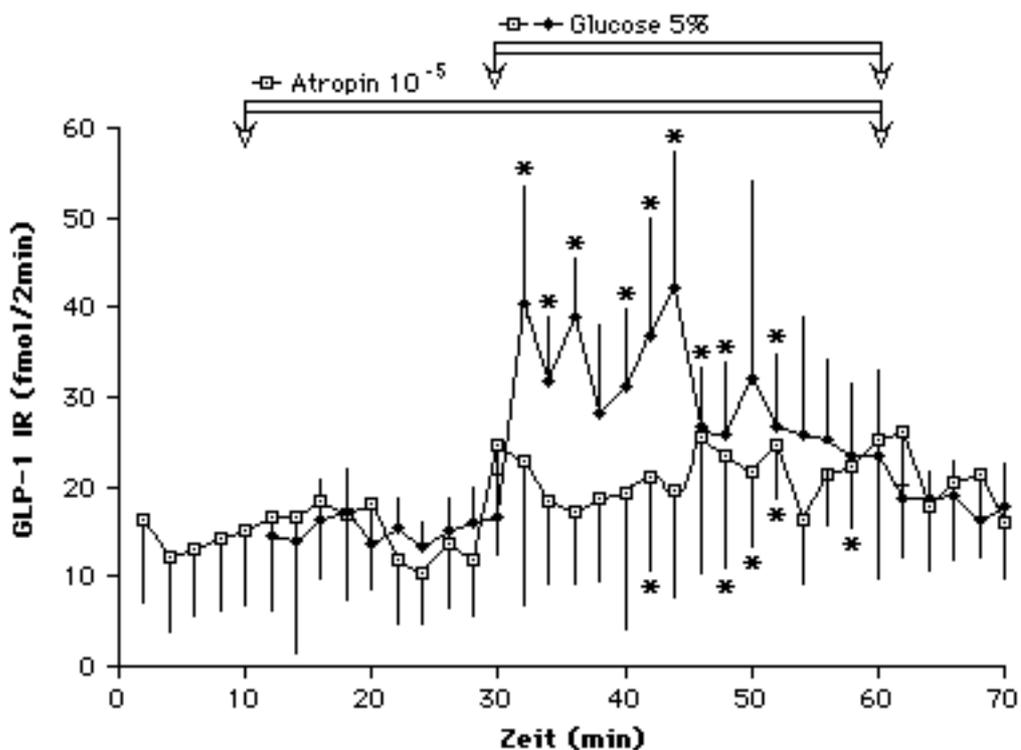


Abb. 10: GLP-1 Freisetzung nach Infusion von Atropin  $10^{-5}$  vaskulär und Glukose 5 % in 0,9 % NaCl luminal (N = 7) im Vergleich mit Glukose 5 % in 0,9 % NaCl luminal (N = 5). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM in fmol/2 Min. \* = p < 0,05 gegenüber basal. GLP-1 IR= GLP-1-Immunoreaktivität. Die Balken mit Pfeilen markieren die Zeiträume der jeweiligen Stimmulationsphasen.

Durch die zusätzliche Infusion von Glukose 5 % in 0,9 % NaCl stieg der Mittelwert in der Stimulationsphase auf  $21,4 \pm 10,8$  fmol/2 Min. ( $p < 0,05$ ), (Abb. 10).

Während der luminalen Infusionsphase mit Glucose konnte, während der gleichzeitigen Atropininfusion, insgesamt eine Ausschüttung von  $90,0 \pm 35,1$  fmol/30 Min. über basal nachgewiesen werden. Dies entsprach einer Steigerung gegenüber basal von 39 %.

Vergleich der Ausschüttung von GLP-1 nach luminaler Glukoseinfusion (5 %) mit der GLP-1-Freisetzung nach luminaler Glukoseinfusion (5 %) bei gleichzeitiger vaskulärer Infusion von Atropin  $10^{-5}$

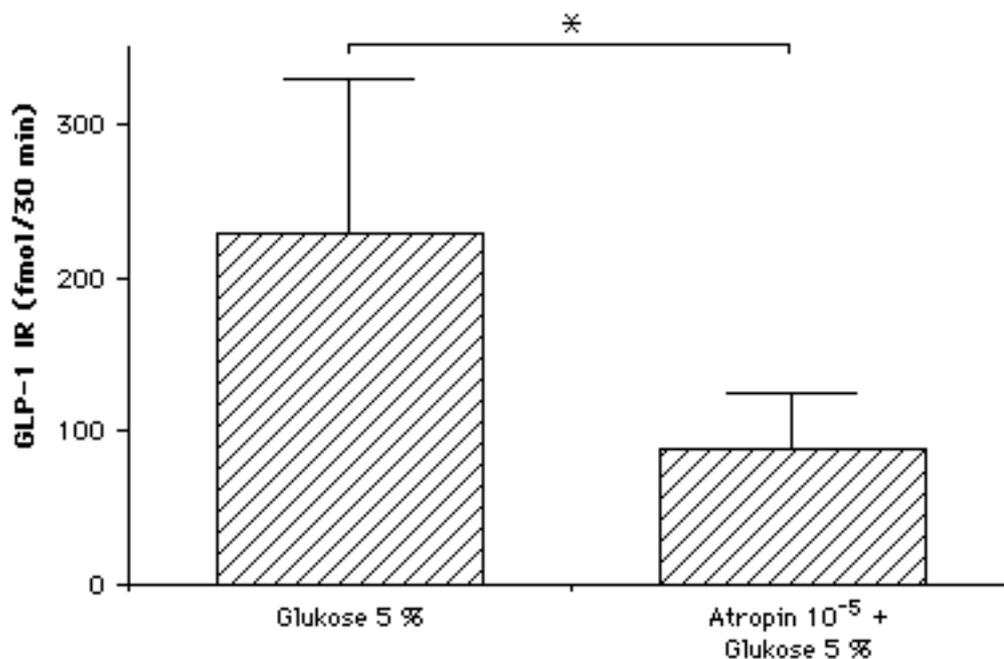


Abb. 11: Integrierte GLP-1-Freisetzung innerhalb von 30 Minuten in fmol über basal (mit Standardabweichung) nach luminaler Infusion einer 5 % Glukoselösung in 0,9 % NaCl im Vergleich zu einer gleichzeitigen vaskulären Atropin ( $10^{-5}$ )- und luminalen 5 %igen Glukoseinfusion in 0,9 % NaCl. \* =  $p < 0,05$ . GLP-1 IR = GLP-1 Immunoreaktivität.

## **IX Diskussion**

### **1 Diskussion des Modells des isolierten, vaskulär perfundierten Rattendünndarms**

Zur Untersuchung der GLP-1-Freisetzung aus den L-Zellen der Dünndarmmukosa wurde in dieser Arbeit ein in vitro Modell benutzt. Im Folgenden sollen einige Vorzüge dieser Methode im Vergleich mit anderen Versuchsmodellen zur Untersuchung der Hormonfreisetzung aus dem Darm betrachtet werden.

Ein in vitro perfundiertes Tierdarmmodell wurde gewählt, da die Möglichkeit einer gezielten Isolation des Präparats vom Ganztier, bei Erhaltung der physiologischen Einheit der Darmmukosa, gegeben ist. Stimuli, die die L-Zellen beeinflussen, können so in weitgehend physiologischer Umgebung ablaufen, z. B. die gerichtete Einwirkung (von luminal oder von vaskulär) der Substanzen auf diese Zellen.

Dieses ist bei intestinalen Zellkulturen nicht gegeben, denn es kommt zu einer Aufhebung der physiologischen Zellordnung, und die zu untersuchenden Substanzen können von allen Seiten an die Zellen herantreten. So können durch den Verlust des Konzentrationsgradientens für Ionen und Nährstoffe auch unphysiologische Effekte entstehen.

Wie oben dargelegt, handelt es sich bei den L-Zellen jedoch um Zellen, die ihre Funktion gerade aufgrund ihrer polaren Anordnung innerhalb des Epithels erfüllen. So erreichen sie unter physiologischen Bedingungen nur mit ihrem apikalen Ausläufer die luminale Darmsoberfläche und können so Kontakt zu luminalen Stimuli aufnehmen.

Ein Vorteil von Zellkulturversuchen könnte die gezielte Stimulation von einzelnen Zelltypen sein. Unter den zur Zeit verfügbaren Zellkulturlinien gibt es jedoch keine monohormonale, nur GLP-1 produzierende Zelllinie.

Durch die Isolation des Präparats vom Ganztier konnten sowohl nervale Einflüsse auf den Darm, als auch Interaktionen mit Hormonen unterbunden werden. Zu diesen kommt es z.B. bei Versuchen zur GLP-1-Ausschüttung nach oraler Gabe von Testsubstanzen am Menschen oder am Ganztier. Hier ist besonders die Interaktion mit GIP (gastric

inhibitory peptide) zu nennen, das aus dem Duodenum freigesetzt wird. Diese tritt, sowohl im Tiermodell mit nur luminaler Isolation des Darms, als auch bei Versuchen am Menschen, auf (Roberge und Brubaker, 1993; Herrmann et al., 1993a) und wird verdeutlicht durch einen GLP-1-Anstieg nach Glukoseinfusion in einem nur luminal isolierten Duodenumpräparat, in dem es keine wesentliche Anzahl GLP-1-freisetzender L-Zellen gibt (Roberge und Brubaker, 1993). Bei diesen Versuchen muß es daher zu einer Beeinflussung der GLP-1-produzierenden Zellen durch unbekannte (nervale und/oder humorale) Faktoren gekommen sein.

Um Untersuchungen der Freisetzungsmechanismen von GLP-1 aus den L-Zellen durchzuführen, sollte die Möglichkeit der gezielten Applikation von Peptiden und Neurotransmittern, sowie ggf. Hemmstoffen derselben, gegeben sein. Da eine solche bei Testpersonen aufgrund der Auswirkungen auf den Gesamtorganismus teilweise nicht unproblematisch ist, und zudem die oben beschriebenen Wechselwirkungen nicht auszuschließen sind, waren Versuche mit Testpersonen für die hier zu untersuchende Fragestellung nicht sinnvoll.

Ein zusätzlicher Vorteil eines in vitro perfundierten, vaskulär isolierten Darmmodells ist, daß die GLP-1-Freisetzung direkt aus den, den Darm drainierenden Venen gemessen werden kann, und daher die hier gemessenen GLP-1-Werte direkt die Freisetzung aus den L-Zellen widerspiegeln. Bei Versuchen mit GLP-1-Bestimmungen aus dem Plasma vom Ganztier oder am Menschen erfassen die Messungen jedoch immer eine Bilanz der GLP-1-Produktion und des Abbaues.

In dieser Arbeit wurde die adäquate Oxygenierung des Darmmodells mit einer Blutersatzperfusion gewährleistet, bei der es zu keiner Rezirkulation des vaskulären Perfusionsmediums kommt. Dieses ist möglich, da die Blutersatzperfusion in frei bestimmbarer Menge zur Verfügung steht und so nach der Passage der Darmgefäße in kurzen Abständen gesammelt werden kann. So kann zum einen eine Zeitabhängigkeit der Hormonausschüttung dokumentiert werden, zum anderen werden die Darmgefäße während der gesamten Versuchsdauer mit einem gleichbleibenden vaskulären Perfusat durchströmt. Dadurch wird eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten verhindert, die Einfluß auf die Zellfunktionen im Sinne eines Feed-Back-Mechanismus nehmen

könnten. Dieses findet man z. B. bei Versuchen mit Zellkulturen oder am Modell des evertierten Darmsacks, bei denen sich die von den Zellen sezernierten Produkte in der umgebenden Nährlösung bzw. Badeflüssigkeit anreichern.

Feed-Back Mechanismen sind auch bei Versuchen mit nur luminal isolierten Darmschlingen, bei denen die GLP-1-Bestimmung aus einer peripheren Vene erfolgt, nicht auszuschließen. Auch wenn dieser Versuchsaufbau praktikabler ist, da er ohne eine aufwendige Blutersatzperfusion auskommt, kommt er für die hier zu untersuchenden Mechanismen nicht in Frage.

Ein solches Modell kann zudem wegen der häufigen Blutabnahmen nur bei Tieren mit einem größeren Blutvolumen angewendet werden (Namba et al., 1990), oder es muß eine Einschränkung der Untersuchungszeitpunkte (Roberge und Brubaker 1991: Blutabnahmen aus V. jugularis alle 10 min) vorgenommen werden.

Durch die Verwendung eines Blutersatzpräparates werden in den hier vorgestellten Versuchen außerdem Abbauvorgänge des ausgeschütteten Peptids durch Enzyme des Blutes vermieden, welche erst kürzlich für GLP-1 nachgewiesen wurden (Mentlein et al., 1993).

## **2 Diskussion der Vitalitätsparameter**

Bei konstanter Blutersatzperforationsrate („arterieller“ Zufluß) konnte aufgrund der alle 2 Minuten erfolgenden Volumenmessungen des „venösen“ Efflux eine Volumenkonstanz sichergestellt werden, die während des Versuches direkt überprüfbar war. Schon Salvioli bemerkte einen Verlust von Perforationsmedium und auch andere Autoren werteten den Verlust von Perforationsmedium als schlechtes Vitalitätsmerkmal, welches meist in Zusammenhang mit einer Ödementstehung des Präparates gesehen wurde (Salvioli, 1880; Kavin et al., 1967; Hohenleitner und Senior, 1969).

Der Perforationsdruck, mit dem der Blutersatzes in dieser Arbeit infundiert wurde, blieb über die gesamte Perforationszeit konstant. Eine in einer früheren Arbeit (Kavin et al., 1967) gesehene anfängliche Vasokonstriktion mit Blutdruckanstieg war an dem hier vorgestellten Modell nicht nachweisbar. Dieses kann am ehesten durch eine verbesserte Präparationstechnik mit einer geringeren Traumatisierung des Gewebes begründet werden.

Die Frage der Zusammensetzung des geeigneten Perforationsmediums wird kontrovers diskutiert. Es wurde versucht, Blutersatz mit reinen Elektrolytlösungen herzustellen. Eine Methode, die gegenüber mit Erythrozyten angereicherten Lösungen oder Vollblut vor allem praktikabler ist, da solche Lösungen in unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen. Allerdings konnte eine adäquate Sauerstoffaufnahme des Präparates bei Perforationen ohne Erythrozyten nur unter Zugabe von cholinergen oder serotoninerg/histaminergen Blockern bzw. Steroiden zur Reduktion der Darmmotilität und Unterdrückung der Immunantwort gewährleistet werden. Unter diesen Bedingungen konnten ähnliche Sauerstoffaufnahmen gemessen werden wie in den Versuchen mit Erythrozyten (Hohenleitner und Senior, 1969), es wurden jedoch keine morphologischen Kontrollen der Präparate durchgeführt.

Da bei der gegebenen Fragestellung die Mechanismen der Ausschüttung eines Hormons untersucht werden sollen, kommt eine grundsätzliche Blockierung nervaler oder humoraler Wechselwirkungen nicht in Frage, da solche Antagonisten selbst zu Veränderungen der Hormonfreisetzung führen können.

Später konnte mit Erythrozyten-freien Lösungen zwar ein recht hoher Sauerstoffverbrauch des Präparates gemessen werden ( $130 \pm 30 \mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  Trockengewicht), morphologische Untersuchungen zeigten jedoch geringe Überlebenszeiten des Präparates (Herrmann, 1989).

Der höchste Sauerstoffverbrauch der Präparate wird bei Perfusionen mit heparinisiertem Rattenvollblut erreicht, 200 bzw. 260-320  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  Trockengewicht (Sakai et al., 1980; Windmueller et al., 1970). Da bei solchen Perfusionen aufgrund der geringen vorhandenen Blutmenge eine Rezirkulation des Blutes unvermeidbar ist, konnte Vollblut für die hier zu untersuchende Fragestellung nicht benutzt werden. Durch die bei Rezirkulation sich anreichernden Hormonen sind Feed-Back-Mechanismen auf die weitere Ausschüttung der Hormone nicht auszuschließen. Zusätzlich könnten andere in das Blut sezernierte Hormone die Ausschüttung des zu untersuchenden Hormons verändern.

Bei der Perfusion des Darms mit Rattenvollblut allein wurde zudem in einer Arbeit eine Hyperämie und Hypersekretion beschrieben, die erst durch gleichzeitige Norepinephrin und Glukokortikoidapplikation zu verhindern waren (Windmueller et al., 1970), eine Maßnahme, die bei Versuchen zur Freisetzung von Hormonen, aufgrund der Wirkungen dieser Stoffe auf die Hormonfreisetzung, nicht zu vertreten wäre.

Da für die in dieser Arbeit zugrundegelegte Fragestellung eine grundsätzliche Blockade oder Stimulation von Rezeptoren nicht in Frage kam, und eine Rezirkulation von Rattenvollblut aus den oben genannten Gründen ebenfalls ausschied, wurde ein Krebs-Henseleit-Puffer, der mit 25 % Rindererythrozyten angereichert wurde, ausgewählt. Ein gegenüber den physiologischen Spiegeln (35 - 45 %, Ochsenfahrt, 1979) verminderter Hämatokrit wurde aus Gründen der besseren Fließeigenschaften des Blutes gewählt. So konnte ein bis zum Versuchsende praktisch konstanter Sauerstoffverbrauch gemessen werden, der in der Größenordnung der Ergebnisse mit Rattenvollblut lag. Bei einer anderen Arbeit mit einer Blutersatzperfusion aus in Elektrolytlösung resuspendierten Erythrozyten wurde ein geringerer Sauerstoffverbrauch (40-160  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  Trockengewicht) gemessen (Kavin et al., 1967), auch hier konnte die Vitalität der Präparate durch morphologische Studien belegt werden.

Als weiterer Parameter für ein vitales Präparat wird der Glukoseverbrauch angesehen (Kavin et al., 1967; Hanson und Parson, 1977). Bei der hier vorgestellten Präparation blieb der Glukoseverbrauch über den Perfusionszeitraum von 60 Minuten konstant. Ein Vergleich der absoluten Werte des Glukoseverbrauches unterschiedlicher Präparationen ist schwierig, da die Länge der untersuchten Darmstücke und dessen Lokalisation variieren. Es wird jedoch ein in der Größenordnung vergleichbarer Glukoseverbrauch von anderen Autoren berichtet (Hanson und Parson, 1977). Es wird jedoch betont, daß vor allem der innerhalb eines Versuches konstante Glukoseverbrauch ein bedeutsamer Marker für die Vitalität ist (Kavin et al., 1967).

Die prozentuale Konversion von Glukose in Laktat liegt, in Übereinstimmung mit oben genannten Untersuchungen (Hanson und Parson, 1977), bei 33 %. Dies spricht für eine im wesentlichen aerob ablaufende Verstoffwechslung von Glukose und somit ebenfalls für eine gute Sauerstoffversorgung des Präparates.

Nicht zuletzt kann eine Unversehrtheit des Präparates durch histologische Studien belegt werden. Hier wurde vor allem auf Zell- oder Lymphödeme, Zellzerstörung, Hämorrhagien und Nekrosen geachtet. Alle diese Zeichen verminderter Vitalität wurden in den hier durchgeführten Versuchen nach 70 Minuten Perfusionszeit nicht gesehen.

Die genannten Vorzüge des Modells für die hier zu untersuchende Fragestellung erfordern jedoch einen hohen methodischen Aufwand, um ein vitales Präparat zu erhalten.

Die Präparation des Darms vom Ganztier muß sehr sorgfältig, schnell und ohne Traumatisierung des Darms durchgeführt werden. Ebenso muß die Blutersatzlösung vor jedem Versuchstag frisch zubereitet werden, da die Erythrozyten sonst überaltern. Somit ist man zeitlich an das Vorhandensein von frischem Rinderblut gebunden.

Die Methode des in vitro perfundierten Darms ist daher insgesamt ein sehr aufwendiges Versuchsmodell, das nur unter strengster Kontrolle aller die Vitalität des Präparates gefährdenden Faktoren verwertbare Ergebnisse liefert.

### 3 Bewertung der experimentellen Daten

#### 3.1 Kann an dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell durch luminale Infusion eines Nahrungsmittelgemisches die GLP-1-Freisetzung im portalen Effluat gemessen werden?

Bei jedem Versuch wurde eine 20-minütige Basalphase mit luminaler Infusion einer 0,9 %igen NaCl-Lösung durchgeführt. Bei allen Versuchen zeigte sich eine Konstanz der basalen GLP-1-Ausschüttung.

Bei den Stimulationsversuchen mit einer **gemischten Diät** sollte zunächst gezeigt werden, daß durch eine luminale Infusion dieser Lösung eine GLP-1-Freisetzung an dem hier verwendeten Versuchsmodell gemessen werden konnte.

Aufgrund des Verlaufs der GLP-1-Freisetzung pro Zeit ist von einer aktiven Freisetzung des Hormons aus den L-Zellen auszugehen, da es nach einer konstanten Basalfreisetzung zu einem prompten GLP-1-Anstieg unter Stimulation und zu einem Abfall der GLP-1-Freisetzung nach Stimulationsende kommt. Ein solcher Verlauf der Hormonfreisetzung würde sich bei einer z. B. durch Zellzerstörung bedingten Freisetzung nicht nachweisen lassen.

Die Ergebnisse der GLP-1-Ausschüttung durch eine gemischte Diät werden bestätigt durch Versuche an gesunden Probanden, bei denen nach einem Standardfrühstück ein Maximum mit einer Verdoppelung der GLP-1-Freisetzung gegenüber den präprandialen Werten nach 45 bzw. 30 Minuten gemessen wurde (Kreymann et al. 1987; Morgan et al., 1993).

Allerdings ist ein direkter Vergleich der Daten von Versuchen an Probanden mit den an diesem Tiermodell gewonnenen Daten nicht zulässig, da hier keine Abbauvorgänge des GLP-1, und auch keine basalen Spiegel von GLP-1 wie bei Messungen im Plasma vorliegen.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, daß die luminale Infusion einer gemischten Diät eine direkte Wirkung auf die L-Zellen bezüglich der GLP-1-Ausschüttung hat. Die Form der Ausschüttungskurve zeigt zudem, daß es sich um eine aktive Freisetzungsreaktion und nicht um eine durch Zellzerstörung ausgelöste GLP-1-Freisetzung handelt.

Zur genaueren Differenzierung der Stimuli auf die L-Zellen wurden Versuche durchgeführt, die den Einfluß einzelner Nahrungsmittelbestandteile auf die GLP-1-Freisetzung untersuchen.

### **3.2 Welche Nahrungsmittelbestandteile beeinflussen nach luminaler Infusion die GLP-1 Ausschüttung ?**

#### - Gabe von Glukoselösungen intraluminal

Bei intraluminaler Stimulation mit **Glukose 2,5 % in 0,9 % NaCl** zeigte sich keine signifikante Steigerung der GLP-1-Freisetzung im Vergleich mit der basalen Freisetzung von GLP-1.

Bei intraluminaler Gabe von **5 % Glukose in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung** wurde eine gegenüber der Basalrate verdoppelte GLP-1-Ausschüttung gemessen. Der maximale Anstieg gegenüber dem mittleren Basalwert betrug 250 %.

Diese Ergebnisse legen nahe, daß es eine vom Glukosegehalt abhängige Schwelle der verstärkten GLP-1-Freisetzung gibt. In einer neueren Arbeit konnte eine vom kalorischen Gehalt der Glukoseapplikation abhängige GLP-1-Freisetzung nachgewiesen werden, es wurde hier erst eine Freisetzung von GLP-1 bei 2,2 kcal/Minute in das Duodenum gesehen (Schirra et al., 1996).

Bei lediglich luminal vom Gesamttier separierten Hundedarmschlingen ergab sich eine 70 %ige Erhöhung der GLP-1-Freisetzung nach luminaler Glukoseinfusion (Shima et al., 1990); bei gleichem Versuchsaufbau am Rattendarm ergab sich eine maximale Erhöhung der GLP-1-Spiegel um das Vierfache der Basalwerte (Roberge and Brubaker, 1993).

Versuche an gesunden Probanden nach oraler Gabe von Glukoselösung ergaben ähnliche Steigerungen der GLP-1-Ausschüttung. Diese variieren von einer 180 % - 300 % Steigerung über basal (Kreymann et al., 1987; Herrmann et al., 1995; D'Alessio et al., 1993; Morgan et al., 1993).

Die Ergebnisse zeigen unabhängig vom benutzten Versuchsaufbau und der Tierspezies eine ähnliche Reaktion der GLP-1-Freisetzung auf Glukose. Jedoch sei nochmals auf die in den Modellen variierenden Einflußgrößen auf die GLP-1-Freisetzung (nerval und humoral) hingewiesen.

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten isolierten, vaskulär perfundierten Darmmodell kommt es zu keiner zusätzlichen, unkalkulierbaren nervalen oder humoralen Stimulation, wie diese bei Versuchen am Menschen oder nicht vollständig vom Gesamttier isolierten Darmmodellen vorkommen.

Unter physiologischen Umständen ist im distalen Dünndarm der Ratte, unabhängig von der zugeführten Diät, eine Glukosekonzentration von 1-1,5 mM nachweisbar (Ferraris et al., 1990). Es ist also anzunehmen, daß nur unter pathologischen Gegebenheiten eine Erhöhung der Glukosespiegel im distalen Dünndarm zu finden ist.

Diese sind z.B. bei Patienten mit Dumping Syndrom nach Gastrektomie zu finden. Es konnte bei solchen Patienten eine, wahrscheinlich durch die schnelle Nahrungspassage in den unteren Dünndarm bedingte, starke Erhöhung der GLP-1-Spiegel gemessen werden (Kreymann, 1987).

So ist anzunehmen, daß es in Fällen von Malassimilation im oberen Dünndarm zu ausreichend hohen Nahrungsspiegeln im unteren Dünndarm kommen kann.

Da beim Menschen die Dichte von GLP-1-enthaltenden Zellen im Jejunum höher ist als im Ileum (Eissele et al., 1992), ist die Wahrscheinlichkeit, daß bei Malassimilationszuständen im oberen Dünndarm Glukose in nennenswerten Mengen die GLP-1-produzierenden Zellen erreicht, zudem wesentlich größer. Daß dieses schon unter physiologischen Bedingungen bei erhöhtem kalorischem Glukose-Angebot der Fall sein kann, wurde ebenfalls in Betracht gezogen (Schirra et al., 1996).

Als Schlußfolgerung aus den hier erhobenen Daten kann man davon ausgehen, daß eine Einwirkung von Glukose auf die L-Zellen ein bedeutender Stimulus für die GLP-1-Freisetzung ist - wenn auch unter physiologischen Bedingungen vermutlich nicht als alleiniger Faktor.

Als alleiniger Stimulus auf die L-Zellen sind hierfür jedoch höhere Glukosespiegel nötig, da eine Konzentration von 2,5 % Glukose bei diesem Versuchsaufbau zu keiner signifikanten Steigerung der GLP-1-Freisetzung führte. Unter der Gesamtwirkung einer Nahrungsmittelaufnahme in den Körper können jedoch zusätzliche regulierende Einflüsse vorliegen (z. B. nerval), so daß auch geringere Mengen Glukose im Ileum eine GLP-1-Freisetzung bewirken.

### - Abhängigkeit der GLP-1-Ausschüttung von der Glukoseresorption

Bei den Versuchen zur GLP-1-Freisetzung durch intraluminal verabreichte Glukose findet sich eine deutliche Abhängigkeit der GLP-1-Freisetzung von der in den intraluminalen Lösungen verwendeten NaCl-Konzentration. So zeigte sich bei intraluminal applizierter Lösung von Glukose 5 % in Aqua destillata nur ein 18 %iger Anstieg der GLP-1-Freisetzung gegenüber den Basalwerten. Im Gegensatz dazu konnte bei luminaler Applikation von Glukose 5 % in 0,9 % NaCl die GLP-1-Freisetzung gegenüber basal um 100 % gesteigert werden.

Diese Ergebnisse werden gestützt durch Untersuchungen am nur luminal isolierten Rattenileum, bei denen es nach einer 200 mM Glukoseinfusion ebenfalls zu keinem signifikanten Anstieg der "gut glucagon-like peptide" (GLI)-Spiegel gekommen ist. Da die parallel gemessenen Blutglukosespiegel während der luminalen Infusion nicht anstiegen, ist anzunehmen, daß aus der luminalen Glukoseinfusion keine Glukose resorbiert wurde (Roberge, 1991).

Die obengenannten Untersuchungen legen die Hypothese nahe, daß die GLP-1-Freisetzung aus den L-Zellen von der Resorption der Glukose abhängig ist und nicht vom Kontakt der Zellen mit luminaler Glukose.

Untersuchungen zur Regulation des intestinalen Glukosetransports in den Enterozyten nehmen zwei Mechanismen zur Glukoseresorption an:

1. Einen Na<sup>+</sup>-abhängigen Glukosetransport in die Enterozyten, wobei der Na<sup>+</sup>-Gradient in den Zellen aufgrund einer basolateral lokalisierten Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase niedrig gehalten wird. Die Glukose wird dann durch einen Na<sup>+</sup>-unabhängigen basolateralen „Carrier“ wieder aus den Zellen ins Blut transportiert. (Philpott et al., 1992).

2. Ebenfalls wird ein parazellulärer Transport der Glukose in die Blutbahn beschrieben. Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß die "tight junctions" hochdynamische Strukturen sind und nicht nur eine Funktion als Diffusionsbarriere zwischen den Enterozyten ausüben (Madara et al. 1987).

Ob jedoch in den endokrinen Zellen des Darms ebensolche Mechanismen zur Glukoseaufnahme bestehen, oder ob die an die L-Zellen angrenzenden Enterozyten nach Glukoseaufnahme Signale zur GLP-1-Ausschüttung an diese weitergeben, ist unbekannt.

Im Gegensatz zu den Versuchen nach oraler Aufnahme von Glukose bei gesunden Probanden, bei denen ja in vielen Versuchen eine starke GLP-1-Ausschüttung gemessen wurde (s.o.), ist in den luminal isolierten Darmschlingen bei alleiniger Glukosegabe in Aqua destillata scheinbar nicht genügend  $\text{Na}^+$  vorhanden um die  $\text{Na}^+$ -gekoppelte Glukoseaufnahme zu gewährleisten.

In einer neueren Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß am vaskulär und nerval isolierten Kaninchenileum eine erhöhte GLP-1-Freisetzung zwar nach Glukose 5 % in NaCl, jedoch nicht nach Saccharose (welche aufgrund niedriger Saccharinaseaktivität im tiefen Dünndarm nicht gespalten wird) und auch nicht nach 2-Desoxyglukose (da ohne notwendige Hydroxygruppe an C-2 zur Resorption) gemessen wurde (Sugiyama et al., 1994).

Wird Phlorizin, ein Hemmer des  $\text{Na}^+$ /Glukose-Transports, intraluminal appliziert, verhindert es vollständig sowohl einen Blutglukoseanstieg, als auch eine GLP-1-Freisetzung nach Glukose 5 %-Applikation (Sasaki et al., 1993).

Dies sind deutliche Belege für eine an die  $\text{Na}^+$ -abhängige Glukoseaufnahme gekoppelte GLP-1-Freisetzung aus den L-Zellen.

Es zeigte sich jedoch bei den hier durchgeführten Versuchen mit einer luminal infundierten Konzentration von 5 % Glukose in 1,8 % NaCl ein Anstieg der GLP-1-Ausschüttung von nur 54 % in der Stimulationsphase gegenüber der gemittelten Basalfreisetzung.

Dies entspricht nur ca. der halben GLP-1-Freisetzung im Vergleich zur luminalen Stimulation mit 5 % Glukose in 0,9 % NaCl.

Ein deutlich erhöhter  $\text{Na}^+$ -Spiegel im distalen Dünndarm (308 mmol/l in 1,8 % NaCl gegen 154 mmol/l in 0,9 % NaCl) scheint die GLP-1-Freisetzung aus den L-Zellen zu behindern. Unter physiologischen Bedingungen werden  $\text{Na}^+$ -Spiegel um  $137 \pm 8$  mmol/l im unteren Gastrointestinaltrakt gemessen (Ferraris et al., 1990). Wie oben dargelegt, wird Glukose zum Großteil durch  $\text{Na}^+$ -gekoppelte Transporter in die Enterozyten aufgenommen. Man geht jedoch davon aus, daß bei erhöhter luminaler Lösungskonzentration größere Teile der Nährstoffmenge auf parazellulärem Wege das

Darmlumen verlassen und so das Blut erreichen (Atisook et al., 1990). Wenn es in den hier vorgestellten Versuchen zu einer größeren Menge parazellulär diffundierenden Natriums und Wassers kommt, könnte die hierbei verstärkt parazellulär aufgenommene Glukose ohne Einfluß auf die GLP-1-Ausschüttung bleiben. Dies könnte, rein hypothetisch, die hier beobachtete Verringerung der GLP-1-Freisetzung unter erhöhten  $\text{Na}^+$ -Spiegeln erklären.

#### - Gabe von verschiedenen Fettemulsionen intraluminal

Nach luminaler Infusion einer **Fettemulsion** (Inhaltsstoffe: Sojabohnenöl, mittelkettige Triglyceride (MCT), Phospholipide und Glycerol) in das Ileum konnte keine signifikante Steigerung der GLP-1-Freisetzung gegenüber den Basalwerten bei luminaler Infusion von NaCl 0,9 % gemessen werden.

Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, ob die verabreichte Emulsion eine genügend kleine Teilchengröße aufweist, um in ausreichend dichten Kontakt mit den Zellmembranen zu treten.

In der Emulsion liegt eine den Chylomikronen ähnliche Teilchengröße vor (0,5 - 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser), während die Mizellen von Emulsionen, die mit Gallensäuren versetzt wurden, einen Durchmesser von 3 - 6 nm haben (Silbernagel und Despopoulos, 1988), und somit eine wesentlich größere Oberfläche aufweisen.

Zum Ausschluß, ob nicht Gallensalze selbst, die ja im distalen Ileum resorbiert werden, die GLP-1-Ausschüttung erhöhen, wurde eine reine **Gallensalzlösung 20 mM** luminal infundiert. Die hier verwendete Gallensäure ist eine an Taurin gekoppelte primäre Gallensäure, die ca. ein Viertel der im Darmlumen vorhandenen Gallensalzkonzentration ausmacht und aufgrund ihrer Polarität am stärksten und aktiv im Ileum resorbiert wird (Schmidt und Thews, 1986).

Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der GLP-1-Ausschüttung von durchschnittlich 30 % gegenüber den Basalwerten. Somit scheint Taurocholsäure eine geringe stimulierende Wirkung auf die GLP-1-Freisetzung zu haben.

Bereits in früheren Arbeiten ist eine Steigerung der GLP-1-Freisetzung durch Gallensalze beschrieben. Bei dieser Arbeit wurden die Lösungen (219 mM Gallensalzkonzentration) in eine nur luminal isolierte Ileumschlinge vom Hund

infundiert; genaue Angaben über die Höhe des GLP-1-Anstieges liegen dabei nicht vor (Namba et al., 1990).

Eine starke GLP-1-Sekretion nach Gallensalzinfusion ist am isolierten, perfundierten Rattenkolon gemessen worden. Bei diesen Experimenten stellte sich eine deutliche Abhängigkeit der Ausschüttung von den verwendeten Gallensalzen dar. So wurde mit einer 2 mM Lösung Hyodeoxycholsäure ein deutlicher Anstieg der GLP-1-Spiegel erzeugt, nicht jedoch mit Taurochol-, Chol- oder Deoxycholsäure. Fraglich ist jedoch, ob diese Konzentration für den Dickdarm physiologisch ist, da schon bei Konzentrationen von 3 mmol Gallensäuren/Liter Durchfälle beobachtet wurden (Schmidt und Thews, 1986).

Bei deutlich über den physiologischen Spiegeln im Kolon liegenden Konzentration von 20 mM konnte neben Hyodeoxycholsäure auch Taurocholsäure einen GLP-1-Anstieg bewirken (Plaisancié et al., 1995).

Arbeiten am Menschen zeigen wiederum, daß die Infusion von Deoxycholsäure in das Kolon einen starken Anstieg der Enteroglukagonspiegel hervorruft (Adrian et al., 1993). Daher scheint die GLP-1-Ausschüttung durch Gallensalze nicht nur speziesspezifisch und von der Art des Gallensalzes, sondern auch von der Lokalisation der Stimulation im Darm abhängig zu sein.

Um einen besseren Kontakt der Triglyceridemulsion mit den Zellmembranen zu gewährleisten, wurde, wie oben dargestellt, in einer nächsten Versuchsreihe eine Mischung der **Fettemulsion mit 20 mM Gallensalzen** verabreicht. Hier zeigt sich nur eine Steigerung der GLP-1-Ausschüttung von 13 % gegenüber den Basalwerten.

Daraus läßt sich folgern, daß weder mittelkettige Triglyceride noch unverdaute Triglyceride, Phospholipide oder Glycerol zur einer wesentlichen direkten GLP-1-Ausschüttung aus den L-Zellen des Ileums der Ratte beitragen.

An Arbeiten zur nährstoffabhängigen GIP-Freisetzung zeigt sich, daß nur langkettige Fettsäuren und hydrolysierte Triglyceride die GIP Freisetzung steigern. Patienten mit zystischer Fibrose, also ohne oder mit nur geringer Lipaseaktivität, zeigen keine erhöhte GIP-Ausschüttung nach Applikation von Triglyceriden, wohl aber nach Zugabe von Lipase. Mittelkettige Triglyceride und Glycerol konnten dagegen die GIP-Ausschüttung

nicht steigern. Es wird hier vermutet, daß die Kettenlänge der Fettsäuren bei der Ausschüttung eine Rolle spielt (Ross, 1981).

Es kann also angenommen werden, daß die GLP-1-Freisetzung durch Fette, ähnlich wie die GIP-Freisetzung, nur durch direkten Kontakt von langkettigen Fettsäuren mit den L-Zellen ausgelöst wird. Im hier vorgestellten Versuch standen mittelkettige Triglyceride zur Resorption bereit, durch die es zu keiner wesentlichen GLP-1-Ausschüttung kam. Durch die fehlende Lipaseaktivität kommt es zu einer ungenügenden Spaltung des Sojaöls, welches zum größten Teil aus Triglyceriden besteht (Bäßler et al., 1975). Daher ist davon auszugehen, daß keine ausreichenden Mengen an langkettigen Fettsäuren in den Mizellen vorliegen.

Bei Arbeiten am nur luminal vom Ganztier isolierten Rattendarm kann nach luminaler Applikation einer Maisöl/Gallensalzmischung nach ca. 30 Minuten eine erhöhte "gut glukagon-like Immunoreaktivität" (entspricht Glicentin und Oxyntomodulin) gefunden werden (Roberger and Brubaker, 1991 bzw. 1993).

Bei diesen Versuchen wurde eine einmal eingefüllte Menge von Fett/Gallensalzmischung im Ileum belassen, so daß - im Gegensatz zu dem hier vorgestellten Modell mit kontinuierlicher Perfusion durch das Lumen - der Aufnahme der emulgierten Fette mehr Zeit zur Verfügung steht. So scheint auch die Dauer des Kontakts der Fette mit der mukosalen Oberfläche eine Rolle bei der Resorption zu spielen.

Beim Menschen steigt die GLP-1-Freisetzung nach oraler Applikation von Fetten in Form von Sahne (25 g Fett, 2 g Proteine, 2,5 g KH) oder Maisöl in unterschiedlichem Maße an. So wird von einer schnellen kurzen (Morgan et al., 1993), 2-fachen (D'Allessio et al., 1993) oder bis zu einem 12-fachen Anstieg der GLP-1-Freisetzung über basal berichtet (Herrmann et al., 1993a).

Wie oben schon angesprochen, kann man bei oralen Applikationsversuchen davon ausgehen, daß die GLP-1-Ausschüttung aus den L-Zellen nicht nur durch direkten Kontakt der Substanzen mit den L-Zellen zustande kommt. Vielmehr scheinen auch mit der Nahrungsaufnahme ausgelöste vagale Reize und humorale Faktoren eine Rolle zu spielen. Die nach oraler Nahrungsaufnahme sehr früh ansteigenden GLP-1-Spiegel (ca. 15 Minuten) sprechen dafür (Herrmann et al., 1993a).

So wurde in zwei der obengenannten Arbeiten ebenfalls die GIP-Freisetzung gleichzeitig zur GLP-1-Ausschüttung bestimmt (Morgan et al., 1993; Herrmann et al., 1993a). Beide Peptide steigen nach der oralen Applikation parallel an, wobei die GIP-Spiegel in letzterer Arbeit etwas früher anzusteigen begannen als die GLP-1-Spiegel.

So kann im Zusammenhang mit den in der hier vorgestellten Arbeit erhobenen Daten vermutet werden, daß die GLP-1-Freisetzung nach oraler Fettaufnahme zum größten Teil durch die im Duodenum freigesetzten Hormone oder nervale Verbindungen ausgelöst wird.

Gallensäuren, mittelkettige Triglyceride oder ungespaltene Triglyceride scheinen nur in geringem Maße direkte Stimuli für die L-Zellen zu sein.

#### - Gabe eines Aminosäuregemisches intraluminal

Nach luminaler Infusion eines **Aminosäuregemisches** konnte kein signifikanter Anstieg des gemittelten GLP-1-Spiegels über basal gemessen werden. Man kann also davon ausgehen, daß Aminosäuren im distalen Ileum die GLP-1-Freisetzung im hier verwendeten Modell nicht steigern.

Diese Ergebnisse werden gestützt durch Versuche am isolierten, perfundierten Rattencolon. Dort wurde nach Applikation einer intraluminalen Aminosäuremischung ebenfalls kein Anstieg der GLP-1-Freisetzung gemessen (Plaisancié et al., 1995).

Beim Menschen zeigen zwei Studien nach Applikation von hydrolysierten Milchprodukten bzw. Peptonen in das Ileum über eine oroileale Sonde ebenfalls keinen Anstieg der Enteroglukagon- bzw. GLP-1-Freisetzung (Spiller et al, 1988, Layer und Holst, 1993).

Andere Arbeiten zeigen nach oraler Aufnahme von gegrilltem Truthahn oder 25 g Aminosäuren eine bis zum dreifachen der Basalwerte angesteigende GLP-1-Antwort (Herrmann et al., 1993a; Morgan et al., 1993).

Es ist aufgrund der dargestellten Ergebnisse anzunehmen, daß ein direkter Kontakt von Aminosäuren (im isolierten Tierpräparat oder über eine Sonde in das Ileum) mit den L-Zellen keine GLP-1-Freisetzung bedingt.

Im Gegensatz dazu könnten duodenale Hormone (z.B. GIP) oder vagale Reize die Ausschüttung von GLP-1 triggern, wie in den Versuchen nach oraler Nahrungsmittelapplikation beim Menschen gezeigt ist. Diese Hypothese stützen

Arbeiten, bei denen nach oraler Applikation von Aminosäuren ein parallel zu den GLP-1-Spiegeln ansteigender GIP-Spiegel gemessen wurde (Herrmann et al., 1995). Schon früher konnte die GIP-Freisetzung nach Aminosäurenapplikation dargelegt werden (Thomas et al., 1978).

### 3.3 GLP-1- Freisetzung durch Neurotransmitter

In den hierzu durchgeführten Versuchen wurde die GLP-1-Ausschüttung aus den L-Zellen nicht durch luminale Stimulation, sondern durch vaskulär applizierte Neurotransmitter untersucht.

In einer ersten Versuchsreihe wurde Carbachol  $10^{-5}$ , ein muscarinerner und nicotinerger Agonist, vaskulär infundiert. In einer zweiten Versuchsreihe wurde mit Metacholin  $10^{-5}$ , einem rein muscarinergen Agonisten, stimuliert.

Die GLP-1-Ausschüttung war gegenüber basal während beider vaskulärer Stimulationsphasen etwa verdoppelt.

Die Ergebnisse belegen eine starke GLP-1-Freisetzung nach Applikation von cholinergen Agonisten, so daß dieses eine Beeinflussung des N. vagus auf die L-Zellen nahelegt.

Wie Eingangs dargestellt, wird auch von anderen Arbeitsgruppen angenommen, daß die GLP-1-Freisetzung nicht nur durch direkten Kontakt mit Nahrungsbestandteilen, sondern u. a. auch durch nervale Regelkreise, extrinsisch oder intramural zwischen oberem und unterem Darm, gesteuert wird (Ensinck und D'Alessio, 1992).

Zu ähnlichen Ergebnissen führt die Stimulation des isoliert, perfundierten Rattencolon mit dem muscarinergen Agonisten Bethanechol. Dort kam es jedoch nur bei Applikation von  $10^{-4}$  molarer Lösung zu einem starken Ansteigen der GLP-1-Sekretion (Plaisancié et al., 1994).

Die genannten Ergebnisse werden ebenfalls durch Arbeiten an Zellkulturen gestützt. Dort wurde eine intestinale Tumorzelllinie der Maus (STC-1) für die Versuche genutzt; es konnte eine Steigerung der GLP-1-Freisetzung nach Applikation von Carbachol (Maximum bei 1 mM) gezeigt werden. Zudem wurde eine Erhöhung des intrazellulären Calciums während der Stimulation gemessen.

In diesem Zusammenhang weitergeführte Versuche konnten einen muscarinergen Rezeptor auf den STC-1-Zellen nachweisen (Abello et al., 1994).

Somit könnte die in den dargestellten Versuchen nachgewiesene Stimulation von GLP-1 durch Cholinergika ebenfalls direkt durch muscarinerge Rezeptoren auf den L-Zellen vermittelt werden.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob an den L-Zellen luminale Stimuli und Neurotransmitterregulation interagieren.

Dafür wurde während der Versuche gleichzeitig, sowohl luminal mit 5 % Glukose in 0.9 % NaCl stimuliert, als auch vaskulär eine Infusion mit Atropin  $10^{-5}$  appliziert. Atropin ist ein muscarinerner Antagonist, welches im gesamten Darmnervensystem als Neurotransmitter vorkommt.

Es zeigten sich zunächst keine signifikanten Veränderungen der GLP-1-Ausschüttung während der vaskulären Atropininfusion im Vergleich mit der vorangehenden Basalperiode.

Unter Weiterführung der vaskulären Atropininfusion wurde nun in der Stimulationsphase die Glukoselösung luminal infundiert. Dabei kam es zu einem signifikanten Anstieg der GLP-1-Freisetzung um 40 % über dem durchschnittlichen Basalwert. Der GLP-1-Anstieg in diesem Versuch fiel somit im Vergleich zu einer alleinigen luminalen Glukoseinfusion (5 % in 0,9 % NaCl) signifikant geringer aus.

Die Atropininfusion konnte die durch Glukose ausgelöste GLP-1-Freisetzung jedoch nicht vollständig unterbinden.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die GLP-1-Freisetzung der L-Zellen auf unterschiedliche Stimuli reagieren, und diese Stimuli eine gemeinsame Modulation der GLP-1-Antwort bewirken.

Da nur ein Teil der durch Glukose ausgelösten GLP-1-Freisetzung durch Atropin gehemmt wird, und Atropin auf die basale Freisetzung von GLP-1 keinen Einfluß hat, könnte man annehmen, daß es durch die Glukoseinfusion zu einer Acetylcholinfreisetzung (z. B. durch Enterozyten) kommt, die dann durch Atropin gehemmt werden kann.

Die durch die Glukose-Stimulation vermittelte GLP-1-Freisetzung könnte durch die Atropininfusion auch direkt in den L-Zellen moduliert werden, so daß eine Verstärkung der durch Glukose ausgelösten GLP-1-Ausschüttung durch der N. vagus oder andere cholinerge Stimulationen denkbar wäre. Diese Interaktionen müssen durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Mit diesem Modell könnte ebenfalls die Regulation der GLP-1-Freisetzung durch Neuropeptide, die in großer Vielzahl im enterischen Nervensystem vorhanden sind (Sundler et al., 1989), untersucht werden. So z. B. die endokrinen Interaktionen von GIP an den L-Zellen, die an diesem Modell ohne störende Einflüsse nervaler oder humoraler Art untersucht werden können.

## **X Literaturverzeichnis**

**Abello, J.**, F. Ye, A. Bosshard, C. Bernard, J.C. Cuber, J.A. Chayvialle:

Stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion by musarinic agonist in a murine intestinal endocrine cell line.

Endocrinologie 134, 2011-17 (1994)

**Adrian, T.E.**, G.H. Ballentyne, W.E. Longo, A.J. Bilchik, S. Graham, M.D. Basson:  
Deoxycholate is an important releaser of peptide YY and enteroglucagon from the human colon.

Gut 34, 1219-24 (1993)

**Artisook, K.**, S. Carlson, J.L. Madara:

Effects of phlorizin and sodium on glucose-elicited alteration of cell junctions in intestinal epithelia.

Am. J. Physiol. 258 (Cell Physiol. 27), C77-85 (1990)

**Baldissera, F.G.A.**, O.V. Nielsen, J.J. Holst:

The intestinal mucosa preferentially releases somatostatin-28 in pigs.

Regul. Peptides 11, 251-62 (1985)

**Bäßler, K.H.**, W. Fekl, K. Lang:

Grundegriffe der Ernährungslehre.

Springer Verlag, Berlin, (1975)

**Bradbury, A.F.**, D.G. Smyth:

Peptide amidation.

Trends Biochem. Sci. 16, 112-5 (1991)

**Brown, J.C.**, J.R. Dryburgh, S.A. Ross, J. Dupré:

Identification and action of gastric inhibitory polypeptide.

Recent. Prog. Horm. Res. 31, 487-532 (1975)

**Brubaker, P.L.:**

Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides.

Endocrinology 128, 3175-82 (1991)

**Buffa, R., J. M. Polak, A. G. E. Pease, E. Solcia, J. Grimelius:**

Identification of the intestinal cellstoring gastric inhibitory polypeptide.

Histochemistry 43, 249-55 (1975)

**Byrne, M., B. Göke.:**

Human studies with glucagon-like peptide-1: potential of the gut hormone for clinical use.

Diabetic medicine 13, 854-860 (1996)

**Creutzfeldt, W., R. Ebert:**

New developments in the incretin concept.

Diabetologia 28, 565-573 (1985)

**Creutzfeldt, W.:**

The incretin concept today.

Diabetologia 16, 75-88 (1979)

**Cuber, J.C., C. Herrmann, P. Kitabgi, A. Bosshard, C. Bernard, F. de Nadai, J.A.**

Chayvialle:

Neuromedin-N is not released with neurotensin from rat ileum.

Endocrinology 126, 1584-92 (1990)

**Dubois, R.S., G.D. Vaughan, C.C. Roy:**

Isolated rat small intestine with intact circulation.

In: Organ perfusion and preservation. Ed. Norman, J.C., Appelton-Century crofts,

New York, pp. 863-75 (1968)

**D'Alessio, D.,** R. Thirlby, E. Laschansky, H. Zebroski, J. Ensinck:  
Response of tGLP-1 to nutrients in humans.  
Digestion 54, 377-79 (1993)

**Ebert, R.,** W. Creutzfeldt:  
Influence of gastric inhibitory polypeptide antiserum on glucose induced insulin secretion  
in rats.  
Endocrinology 111 Vol. 5, 1601-6 (1982)

**Eissele, R.,** R. Göke, S. Willemer, H.-P. Harthus, H. Vermer, R. Arnold, B. Göke:  
Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat and man.  
Europ. Journ. of Clin. Invest. 22, 283-291 (1992)

**Elrick, H.,** L. Stimmler, C.J. Hlad, Y. Arai:  
Plasmainulin response to oral and intravenous glucose administration.  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 24, 1076-82 (1964)

**Ensinck L.W.** and D.A. D'Alessio:  
The enteroinsular axis revisited- A novel role for an incretin.  
N. Engl. J. Med. 326, 1352-53 (1992)

**Fehmann, H.C.,** B. Göke, R. Göke, M.E. Trautmann, R. Arnold:  
Synergistic stimulatory effect of glucagon-like peptide-1(7-36)amid and glucose-  
dependent insulin-releasing polypeptide on the endocrine rat pancreas.  
FEBS Lett. 252, 103-112 (1989)

**Fehmann, H.C.,** R. Göke, B. Göke:  
Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-1(7-36)amid  
and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide.  
Endocrine Reviews 16, 390-407 (1995)

**Ferraris, R.P.**, S. Yashharpour, K.C.K. Lloyd, R. Mirzayan, J.M. Diamond:  
Luminal glucose concentration in the gut under normal condition.  
Am. J. Physiol. 259, 822-37 (1990)

**Fisher, R.B.**, D.S. Parson:  
A preparation of surviving rat small intestine for the study of absorption.  
J. Physiol. (London) 110, 36-46 (1949)

**Furness, J.B.**, M. Costa:  
Types of nerves in the enteric nervous system.  
Neurosciencs 5, 1-20 (1980)

**Göke, R.**, G. Richter, F Kolligs:  
How do individual meal constituents influence the release of GLP-1 in humans?  
Digestion 54, 380 (1993a)

**Göke, R.**, H. C. Fehmann, T. Linn, H. Schmidt, M. Krause, J. Eng, B. Göke:  
Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amid an antagonist at  
the glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptor on insulin secreting cells.  
J. Biol. Chem. 268, 19650-55 (1993b)

**Göke, R.**, H.-C. Fehmann and B. Göke:  
Glucagon-like peptide 1 (7-36)amide is a new incretin/enterogastrone candidate.  
Eur. J. Clin. Invest. 21, 135-44 (1991)

**Göke, R., J. M.Conlon:**  
Receptors for glucagon-like peptide-1 (7-36)amide on rat insulinoma derived cells.  
J. Endocrinol. 116, 357-62 (1988)

**Gutniak, M.**, C. Orskov, J.J. Holst, B. Ahrén, S. Efendic:  
Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in normal subjects and

patients with diabetes mellitus.

N. Engl. J. Med. 326, 1316-22 (1992)

**Hammersen, F.:**

Histologie: Farbatlas der mikroskopischen Anatomie.

Urban und Schwarzenberg, München, 3. Auflage, pp. 145-150 (1985)

**Hanson, P.J., D.S. Parson:**

The utilization of glucose and production of lactate by in vitro preparations of rat small intestine: Effect of vascular perfusion.

J. Physiol. 255, 775-95 (1976)

**Hartmann, F., D. Vielliard-Baron, R. Heinrich:**

Isolated perfusion of the small intestine using perfluortributylamin as artificial oxygen carrier.

Adv. Exp. Med. Biol. 180, 711-20 (1984)

**Herrmann, C.:**

Serotoninfreisetzung vom isolierten, in-situ perfundierten Rattendünndarm.

Inauguraldissertation, Marburg, 1989

**Herrmann, C., J.C. Cuber, J. Abello, T. Dakka C. Bernard, J.A. Chayvialle:**

Release of ileal neurotensin in the rat by neurotransmitters and neuropeptides.

Regulat. Peptides 32, 181-92 (1991a)

**Herrmann, C., J.C. Cuber, T. Dakka, C. Bernard, J.A. Chayvialle:**

Bombesin potentiates taurocholic acid-induced neurotensin release in rat.

Endocrinology 128, 2853-57 (1991b)

**Herrmann, C., R. Göke, G. Richter, H.C. Fehmann, R. Arnold, B. Göke:**

Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma

levels in response to nutrients.

Digestion 56, 117-126 (1995)

**Hirota, M.**, I. Shimizu, C. Ohboshi, T. Nishino, K. Shima:

A large molecular form of glucagon-like peptide-1 immunoreactivity is co-released with glucagon from pancreas by arginin in normal subjects.

Clin. Chim. Acta 167, 293-302 (1987)

**Hohenleitner, F.J.**, J.R. Senior:

Metabolism of canine small intestine vascularly perfused in vitro.

J. Appl. Physiol. 1, 119-128 (1969)

**Holst, J.J.**, S.L. Lauritsen, S.L. Jensen, O.V. Nielsen, O.B. Schaffalitzky de Muckadell:

Secretin release from the isolated vascularly perfused pig duodenum.

J.Physiol. 318, 327-37 (1981)

**Holzer, P.**, F. Lembeck:

Effect of neuropeptides on the efficiency of the peristaltic reflex.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, 257-264 (1979)

**Jacobs, P.**, T.H. Bothwell, R.W. Charlton:

Intestinal iron transport: studies using a loop of gut with an artificial circulation.

Am. J. Physiol. 210, 694-700 (1966)

**Kavin, H.**, N.W. Levin, M. M. Stanley:

Isolated perfused rat small bowel-technic, studies of viability, glucose absorption.

J. Appl. Physiol. 22, 604-11 (1967)

**Kolligs, F.**, H.C. Fehmann, R. Göke, B. Göke:

Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide 1 receptor antagonist exendin (9-39)amid.

Diabetes 44 (1), 16-9 (1995)

**Kosaka, T.,** R.K.S. Lim:

Demonstration of the hormonal agent in fat inhibition of gastric secretion.

Society of Experimental Biology and Medicine 27, 890-91 (1930)

**Kreymann, B.,** M.A. Ghatai, G. Williams, S.R. Bloom:

Glucagon-like peptide-1 (7-36): A physiological incretin in man.

Lancet 2, 1300-4 (1987)

**La Barre, J.,** E.U. Still:

Studies on the physiology of secretin 3. Further studies on the effect of secretin on the blood sugar.

Am. J. Physiol. 91, 649-53 (1930)

**Layer, P.** and J.J. Holst:

GLP-1: A humoral mediator of the ileal brake in humans?

Digestion 54, 385-86 (1993)

**Lee, J.S:**

Flows and pressures in lymphatic and blood vessels of intestine in water absorption.

Am. J. Physiol. 200, 979-83 (1961)

**Levin, S.L.,** M.Z. Pehlevanian, A.E. Lavee, R.I. Adachi:

Secretion of an insulintropic factor from isolated, perfused rat intestine.

Am. J. Physiol. 236, E 710-20 (1979)

**Madara, J.,** and J.R. Pappenheimer:

Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia.

J. Membr. Biol. 100, 149-64 (1987)

**Mc Intyre, N.,** C.D. Holdsworth, D.S. Turner:

New interpretation of oral glucose tolerance.

Lancet 2, 20-21 (1964)

**Mentlein, R.,** B. Gallwitz, W.E. Schmidt:

Dipeptidyl-peptidase 4 hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 (7-36)amide, peptide histidine, methionine and is responsible for their degradation in human serum.

Eur. J. Biochem. 214, 829-35 (1993)

**Mojsov, S.,** G. Heinrich, I. B. Wilson, M. Ravanola, L. Orci, J. Habener:

Preproglukagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing.

J. Biol. Chem. 261, 1180-9 (1986)

**Mojsov, S.,** G.C. Weir, J.F. Habener:

Insulintropin: Glucagon-like peptide (7-37) coencoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas.

J. Clin. Invest. 79, 616-19 (1987)

**Mojsov, S.,** M.G. Kopczynski, J.F. Habener:

Both amidated and nonamidated forms of glucagon-like peptide-1 are synthesized in the rat intestine and the pancreas.

J. Biol. Chem. 265, 8001-8 (1990)

**Moore, B.,** E.S. Edie, J.H. Abraham:

On the treatment of diabetes mellitus by acid extracts of duodenal mucous membrane.

Biochem. J. 1, 28-38 (1906)

**Morgan, L.,** R. Elliott, J. Tredger, J. Nightingale, V. Marks:  
GLP-1 secretion in response to nutrients in man.  
Digestion 54, 374-76 (1993)

**Nakano, J.,** K. Miyazaki, A. Funakoshi, K. Tateishi, T. Hamaoka, H. Yajima:  
Gastrin releasing peptide stimulates cholecystokinin secretion in perfused rat duodenum.  
Regulatory peptides 23, 153-159 (1988)

**Namba, M.,** H. Itoh, N. Watanabe, N. Kono, R. Komatsu, T. Matsuyama, M. Hirota,  
K. Shima, S. Tarui:  
Multiple forms of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like immunoreactivities in  
canine gastrointestinal tract and their release into circulation.  
Biomed. Research 11, 247-54 (1990)

**Nathan, D.M.,** E. Schreiber, H. Fogel, S. Mojsov, J.F. Habener:  
Insulinotropic action of glucagon-like peptide-1(7-37) in diabetic and nondiabetic  
subjects.  
Diabetes Care 15, 270-76 (1992)

**Nauck, M.A.,** N. Kleine, C. Orskov, J.J. Holst, B. Wilms, W. Creutzfeldt:  
Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous GLP-1 (7-36amide) in type 2  
diabetic (noninsulin dependent) patients.  
Diabetologia 36, 741-44 (1993)

**Nicholls, T.J.,** H.J. Leese, J.R. Bronk:  
Transport and metabolism of glucose by rat small intestine.  
Biochem. J. 212, 183-87 (1983)

**Ochsenfahrt, H:**  
The relevance of blood flow for the absorption of drugs in the vascularly perfused,

isolated intestine of the rat.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 306, 105-12 (1979)

**Ohnell, R.:**

The artificially perfused mammalian intestine as a useful preparation for studying intestinal absorption.

J. Cell Comp. Physiol. 13, 155-58 (1939)

**Orskov, C., J. Jeppesen, S. Madsbad, J.J.Holst:**

Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginin.

J. Clin. Invest. 87, 415-23 (1991)

**O`Dorisio, T. M., S. Cataland, M. Stevenson, E. Mazzaferri:**

Gastric inhibitory polypeptide (GIP): Intestinal distribution and stimulation by amino acid and medium-chain triglycerides.

Am. J. Dig. Dis. 21, 761-64 (1976)

**Philpott, D.J., J.D. Butzner, J.B. Meddings:**

Regulation of intestinal glucose transport.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 70, 1201-7 (1992)

**Plaisancié P., C. Benard, J.A. Chayvialle, J.C. Cuber:**

Regulation of glucagon-like peptide-1(7-36)amide secretion by intestinal neurotransmitters and hormones in the isolated perfused rat colon.

Endocrinology 135, 2398-403 (1994)

**Plaisancié, P., V. Dumoulin, J.A. Chayvialle, J.C. Cuber:**

Luminal glucagon-like peptide-1(7-36)amide-releasing factors in the isolated vascularly

perfused rat colon.

J. Endocrin. 145, 521-26 (1995)

**Porteous, J.W.**, J.D. Hutchison, V. Undrill:

The lumenally and vascularly perfused small intestine as an experimental system for the study of translocation and metabolism.

Pro. Nutr. Soc. 43, 141-60 (1984)

**Prazelt, C.**, E. Schiltz:

Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5007-11 (1986)

**Rauber/Kopsch**, Hrsg. von H. Leonhardt, B. Tillmann, G. Töndury, K. Zilles:

Anatomie des Menschen.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Band II, pp. 230-35 (1987)

**Roberge, J.N.**, P.L. Brubaker:

Secretion of proglucagon-derived peptides in response to intestinal luminal nutrients.

Endocrinology 128, 3169-74 (1991)

**Roberge, J.N.**, P.L. Brubaker:

Regulation of intestinal proglucagon-like derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop.

Endocrinology 133, 233-40 (1993)

**Roese, H.F.:**

Methoden zum Studium der Physiologie und Pharmakologie des künstlich durchbluteten Säugetierdarms.

Pflügers Arch. Ges. Physiol. 226, 184-197 (1930)

**Ross, S.,** E. Shaffer:

The importance of triglyceride hydrolysis for the release of gastric inhibitory peptide.

Gastroenterologie 80, 108-11 (1981)

**Sakai, K.,** M. Akima, Y. Hinohara, M. Sasaki, R. Niki:

Vascularly perfused rat small intestine: A research model for drug absorption.

Japan J. Pharmacol. 30, 231-41 (1980)

**Salvioli, G.:**

Eine neue Methode für die Untersuchung der Funktionen des Dünndarms.

Arch. Physiol. (Leipzig) 85, 97-112 (1880)

**Sasaki, H.,** H. Manaka, K. Yamatani, M. Tominaga:

GLP-1 secretion coupled with Na<sup>+</sup>/glucose transporter from the isolated perfused canine ileum.

Digestion 54, 365-66 (1993)

**Schirra, J.,** M. Katschinski, C. Weidmann, T. Schäfer, U. Wank, R. Arnold, B. Göke:

Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans.

J. Clin. Invest. 97, 92-103 (1996)

**Schmidt, R.F.** und G. Thews (Hrsg.):

Physiologie des Menschen

Springer Verlag Berlin, pp. 759-63, 23. Auflage (1988)

**Shima, K.,** T. Suda, K. Nishimoto, S. Yoshimoto:

Relationship between molecular structures of sugars and their ability to stimulate the release of glucagon-like peptide-1 from canine ileal loops.

Acta Endocrin. (Copenh.) 123, 464-70 (1990)

**Shima, M.**, M. Hirota, C. Ohboshi, M. Sato, T. Nishino:  
Release of glucagon-like peptide-1 immunoreactivity from the perfused rat pancreas.  
Acta Endocrinol. (Copenh.) 114, 531-6 (1987)

**Silbernagel S.** und A. Despopoulos:  
Taschenatlas der Physiologie  
Thieme, Stuttgart, pp. 218-21, 3. Aufl. (1988)

**Spiller R.C.**, I.F. Trotman, T.E. Adrian, S.R. Bloom, J.J. Misiewicz, D.B. A. Silk:  
Further characterisation of the "ileal brake" reflex in man- effect of ileal infusion of  
partial digests of fat, protein, and starch on jejunal motility and release of neurotensin,  
enteroglucagon, and peptide YY.  
Gut 29, 1024-51 (1988)

**Sugiyama, K.**, H. Manaka, T. Kato, K. Yamatani, M. Tomiaga, H. Sasaki:  
Stimulation of truncated glucagon-like peptide-1 release from the isolated perfused  
canine ileum by glucose absorption.  
Digestion 55, 24-28 (1994)

**Sundler, F.**, G. Böttcher, E. Eklblad, R. Hakanson:  
The neuroendocrine system of the gut.  
Acta oncologica 28, 1303-314 (1989)

**Suzuki, S.**, K. Kawai, S. Ohashi, H. Mukai, K. Yamashita:  
Comparison of the effects of various C-terminal and N-terminal fragment peptides of  
glucagon-like peptide-1 on insulin and glucagon release from the isolated perfused rat  
pancreas.  
Endocrinology 125, 3109-14 (1989)

**Thomas, F.B.**, D. Sinar, E.L. Mazzaferri, S. Cataland, H.S. Mekhijan, J.H. Caldwell,  
J.J. Fromkes:  
Selectiv release of gastric inhibitory polypeptide by intraduodenal amino acid perfusion

in man.

Gastroenterology 74, 1261-65 (1978)

**Unger, R.H.**, A.M. Eisentraut:

Enteroinsular axis.

Arch. Intern. Med. 123, 261-6 (1969)

**Valverde, I.**, M. Morales, F. Clemente, M.I. Lopez-Delgado, E. Delgado, A. Perea,

M.L. Villanueva-Penacarrillo:

Glucagon-like peptide-1: a potent glycogenic hormone.

FEBS-Lett. 349, 313-6 (1994)

**Villanueva-Penacarrillo, M.L.**, A.I. Alcántara, F. Clemente, E. Delgado, I. Valverde:

Potent glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in skeletal muscle.

Diabetologia 37, 1163-66 (1994)

**Wang, Z.**, R.M. Wang, A.A. Owji, D.M. Smith, M.A. Gathe, S.R. Bloom:

Glucagon-like peptide 1 is a physiological incretin in rat.

J. Clin. Invest. 95 (1), 417-21 (1995)

**Wilson, T.H.**, G. Wiseman:

The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface.

J. Physiol. 218, 116-125 (1954)

**Wilson, T.H.:**

The role of lactic acid production in glucose absorption from the intestine.

J. Biol. Chem. 222, 751-56 (1956)

**Windmueller, H.G.**, A.E. Spaeth, C.E. Ganote:

Vascular perfusion of isolated rat gut: norepinephrine and glucocorticoid requirement.

Am. J. Physiol. 218, 197-204 (1970)

**Woods, S.C., D. Porte jr.:**

Neural control of the endocrine pancreas.

Physiol. Rev. 54, 596-619 (1974)

**Yada, T., K. Itoh, M. Nakata:**

Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and a rise in cAMP increase cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in rat pancreatic beta-cells by enhancing  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity.

Endocrinology 133(4), 1685-92 (1993)

**Zunz, E., J. La Barre:**

Contribution a l'étude des variations physiologiques de la sécrétion interne du pancréas: relation entre le sécrétion externe et interne du pancréas.

Arch. Int. Physiol. Biochem. 31, 20-44 (1929)

## **Danksagung**

Für die Unterstützung bei der Entstehung der vorliegenden Dissertation gilt den Folgenden mein herzlicher Dank:

Herrn Prof. Dr. B. Göke für die Bereitstellung der technischen Mittel und die fruchtbaren Diskussionen in seinem Arbeitskreis.

Frau Dr. Ch. Herrmann-Rinke für die Überlassung des Themas und die ständige fachliche Unterstützung während aller Phasen der Arbeit.

Herrn Dr. R. Eissele für die Auswertung der histologischen Schnitte.

Den MTA Herrn H. Schmidt und Herrn L. Kranitz für die Durchführung der Vitalitätsnachweise und die gute Arbeitsatmosphäre während der langen Zeiten im Labor.

Meinen Eltern, die mir durch Ihren in jeder Hinsicht großzügigen Beistand die Möglichkeit zu dieser Dissertation eröffneten.

Henning für seine Unterstützung in allen Lebenslagen ...

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Marburg:

Amon, Arnold, Aumüller, Bauer, Baum, Braasch, Drenckhahn, Eschenbach, Feddersen, Fuhrmann, Ganz, Gensch, Geus, B. Göke, R. Göke, Görck, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Griss, Happle, Hielscher, Hilgermann, Höhl, Huffmann, Kaffarnik, Kern, Klein, Kleinsasser, Klose, Koecke, Koolmann, Koop, Kretschmer, Lange, Lennartz, Lührmann, Maisch, Mannheim, Oepen, Paul, Pohlen, Remschmidt, Riedmüller, Rinze, Rothmund, Schröder, Schüffel, Schulz, Siegrist, Slenzka, Thomas, Unsicker, Voigt, von Wichert, Wiegand.

in Kassel:

Dupont, Fietze-Fischer, Hartung, Petres, Voss.

in Basel:

Ackermann, Herzog, Looser, Schuppisser, Tondelli.