

Aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und
der Klinischen Abteilung des Deutschen Diabetes-Forschungsinstituts
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Molekulare Zielstrukturen im Alloxan-induzierten Diabetesmodell der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Sabine Schulte im Walde
aus Siegen

Leipzig, 2003

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer: Professor Dr. Fritz Rupert Ungemach
Professor Dr. Helga Gleichmann

Gutachter: Professor Dr. Fritz Rupert Ungemach
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Helga Gleichmann
Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

Professor Dr. Almuth Einspanier
Veterinär-Physiologisches-Chemisches-Institut der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Wilfried Kraft
Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität München

Tag der Verteidigung: 07. November 2003

**Meinen Eltern, Frederik, Sebastian und Ingo
in Liebe und Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	
2.1 Kurze vergleichende Betrachtung:	
Diabetes mellitus in Human- und Veterinärmedizin	2
2.1.1 Definition und Klassifikation	2
2.1.2 Vorkommen und Bedeutung	3
2.1.3 Ätiologie und Pathogenese	4
2.1.4 Symptomatik und Begleiterkrankungen	5
2.1.5 Diagnose und Therapie	7
2.1.6 Zusammenfassung	9
2.2 Glucosetransport und Insulinfreisetzung	9
2.2.1 Glucosetransporter	10
2.2.2 Glucokinase	11
2.3. Alloxan	12
2.3.1 Chemische Eigenschaften	12
2.3.2 Historischer Hintergrund	14
2.3.3 ALX-induzierter Diabetes	15
2.3.4 Protektiva eines ALX-induzierten Diabetes	16
2.3.5 Mögliche Angriffspunkte der ALX-Toxizität	18
2.3.5.1 Plasmamembran	19
2.3.5.2 Mitochondrien	20
2.3.5.3 DNA	20
2.3.5.4 Glucokinase	21
2.3.5.5 Glucosetransporter oder –rezeptor	22
2.4 Bedeutung von ALX für die Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus	23
2.5 Fragestellungen	24

3. Eigene Untersuchungen	26
3.1 Versuchstiere	
3.1.1 Mäuse	26
3.1.2 Organentnahme	26
3.2 Material	
3.2.1 Reagenzien	27
3.2.2 Zellkulturmedien und Gebrauchslösungen	29
3.2.3 Geräte	32
3.2.4 Verbrauchsmaterial	34
3.3 Methoden	
3.3.1 Induktion eines Diabetes - Behandlung der Mäuse	35
3.3.2 Kontrolle des Versuchsverlaufs	35
3.3.3 Effekt der Vorbehandlung mit Glucose-Analoga	36
3.3.4 Effekt der Behandlung mit Zn ²⁺ -angereichertem Trinkwasser	36
3.3.5 Bestimmung der β -Zellfunktion in vivo	37
3.3.6 Isolierung pankreatischer Inseln	37
3.3.7 Behandlung der Mäuse für die Analyse der mRNA-Expression von GLUT2, Glucokinase und Proinsulin	38
3.3.8 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion	38
3.3.8.1 Isolierung von RNA aus pankreatischen Inseln	39
3.3.8.2 Spektrophotometrische Bestimmung der RNA	40
3.3.8.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)	40
3.3.8.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.3.8.5 Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate mit der Gelelektrophorese	43
3.3.8.6 Densitometrische Analyse der RT-PCR-Produkte ..	43
3.3.9 Behandlung der Mäuse für die Bestimmung des Insulingehalts im Pankreas.....	44
3.3.10 Bestimmung des Insulingehalts	44
3.3.11 Immunhistochemischer Nachweis von Insulin	45
3.3.12 Statistische Analyse	46

4.	Ergebnisse	47
4.1	in vivo Befunde	47
4.1.1	Dosisabhängigkeit der ALX-Toxizität	47
4.1.2	Vorbehandlung mit D-G schützte vor einem ALX-induzierten Diabetes	51
4.1.3	5-T-G potenzierte einen ALX-induzierten Diabetes	55
4.1.4	Zn ²⁺ -angereichertes Trinkwasser senkte die ALX-induzierte Hyperglykämie	58
4.1.5	Eingeschränkte β -Zellfunktion euglykämischer Mäuse durch ALX	61
4.1.6	Eingeschränkte β -Zellfunktion euglykämischer Mäuse nach Vorbehandlung mit D-G	63
4.1.7	Eingeschränkte β -Zellfunktion euglykämischer Mäuse nach Behandlung mit Zn ²⁺ -angereichertem Trinkwasser und ALX ..	66
4.2	ex vivo Befunde	
4.2.1	Zeitabhängige Reduktion des Insulingehaltes durch ALX im Pankreas von C57BL/6-Mäusen	68
4.2.2	Dosisabhängige Reduktion des Insulingehaltes durch ALX im Pankreas von 129S3-Mäusen	69
4.2.3	Reduktion des Insulingehalts nach Behandlung mit D-G oder Zn ²⁺ -angereichertem Trinkwasser im Pankreas von 129S3-Mäusen	70
4.2.4	Zeitabhängige Reduktion der mRNA-Expression des GLUT2 und der Glucokinase durch ALX	71
4.2.5	Vorbehandlung mit D-G schützte die mRNA von GLUT2 und Glucokinase vor der Reduktion durch ALX	73
4.2.6	Immunhistochemischer Nachweis von Insulin im Pankreas von C57BL/6-Mäusen	75
5.	Diskussion	79
6.	Zusammenfassung	88
7.	Summary	90
8.	Literaturverzeichnis	92

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
3-OMG	3-O-methyl-D-Glucose
5-T-G	5-Thio-D-Glucose
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ALX	Alloxan
Aqua bidest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	counts pro Minute
Cys	Cystein
Da	Dalton
DAB	Diammoniumbenzthiazolinsulfonat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-G	D-Glucose
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EtBr	Ethidiumbromid

FBS	fötales Rinderserum
F _c	Fragment der konstanten Region eines Antikörpers
FG	Feuchtgewicht
FS	Fructosamine
g	Erdbeschleunigung (9,81 kg x m/s ²)
g	Gramm
G	Guanin
GLUT	Glucosetransporter
GSH	Glutathion
GTT	Glucosetoleranz-Test
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HbA1c	glykierte Hämoglobine
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
HO•	Hydroxylradikal
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
ip	intraperitoneal
iv	intravenös
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KRBH	Kreb's Ringer Bicarbonat Hepes
l	Liter
m	Meter bzw. milli- (10 ⁻³)
min	Minuten
ml	Milliliter
MLD	Multiple-Niedrig-Dosis
mRNA	messenger RNA
MT	Metallothionein
n	nano (10 ⁻⁹)
NaCl	Natriumchlorid

NAD	Nicotinamid-Adenin-di-Nucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-di-Nucleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ^{•-}	Superoxidanionradikal
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
oGT	orale Glucosetoleranz
oGTT	oraler Glucosetoleranztest
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Synthetase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
po	per os
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleinsäure
RNA _{sin}	Ribonucleaseinhibitor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
sek	Sekunden
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert
SOD	Superoxiddismutase
STZ	Streptozotocin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
Zn ²⁺	Zinksulfat

1. Einleitung

Der Diabetes mellitus gewinnt sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin zunehmend an Bedeutung, da die Zahl der Erkrankungen rasch zunimmt. Trotz jahrelanger, intensiver Forschungen konnten weder Ätiologie noch Pathogenese vollständig aufgeklärt werden. Neben genetischer Prädisposition und (Auto-) Immunreaktionen spielen toxische und infektiöse Mechanismen sowie manifestationsfördernde Einflüsse (z.B. Adipositas) eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines Diabetes. Es wurden daher Tiermodelle etabliert, die die Möglichkeit bieten, den Vorgang der β -Zellstörung auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen und nach protektiven Mechanismen zu suchen.

Alloxan (ALX) ist ein klassisches Diabetogen, welches spezifisch die β -Zellen zerstört und seit Jahrzehnten in der Forschung eingesetzt wird, um das Wechselspiel zwischen β -Zelle, Blutglucosekonzentration und Insulinfreisetzung zu untersuchen. Der ALX-induzierte Diabetes löst Symptome aus, die dem spontanen Diabetes in Mensch und Tier vergleichbar sind.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von ALX auf molekulare Strukturen der β -Zelle zu analysieren und mögliche protektive Substanzen zu suchen, die vor ALX-Toxizität schützen. Essentielle Moleküle für die physiologische Funktion der β -Zelle – der Insulinproduktion – sind der Glucosetransporter (GLUT2), die Glucokinase und das Proinsulin. Nach Vorbehandlung mit den Glucoseanaloga D-Glucose (D-G) und 5-Thio-D-Glucose (5-T-G) sowie mit Zink (Zn^{2+})-angereichertem Trinkwasser werden die Einflüsse von ALX auf die o.g. Strukturen über die Bestimmung des Blutzuckers, der oralen Glucosetoleranz (oGT), des pankreatischen Gesamtinsulingehaltes und der mRNA-Expression der Zielgene untersucht.

Durch die Verwendung von ALX mit seinen überwiegend toxischen Wirkungen auf die β -Zelle erhofft man sich im direkten Vergleich mit anderen Diabetogenen, wie z.B. Streptozotocin, einem Diabetogen mit immunologischen und toxischen Wirkungen, präzise Aussagen zu der Pathogenese des Diabetes mellitus und möglicher präventiver Massnahmen machen zu können, um langfristig bei Risikopatienten die Manifestation eines Diabetes mellitus zu verhindern.

2. Literaturübersicht

2.1 Kurze vergleichende Betrachtung: Diabetes mellitus in Human- und Veterinärmedizin

2.1.1 Definition und Klassifikation

Eine einheitliche und umfassende Definition des Diabetes mellitus läßt sich in der Literatur nicht finden. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO 1980) definiert den Diabetes mellitus als einen „ Zustand der chronischen Hyperglykämie, der durch einen Mangel an Insulin oder durch ein Übermaß an insulinantagonisierenden Faktoren gekennzeichnet ist. Diese Imbalanz führt zu Störungen im Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel “ (STOGDALE 1986). Eine Klassifizierung der Diabetes-Typen und weiterer Formen von Kohlenhydratstoffwechselstörungen, wie die Glucose-Intoleranz, wurden von der AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2002) zusammengestellt.

Klassifizierung des Diabetes mellitus:

- Beim Typ-1- oder insulinabhängiger Diabetes sind an der Pathogenese eine genetische Prädisposition, ätiologisch Umwelt- und erworbene Faktoren (z.B. Virusinfektionen) sowie abnorme Immun- bzw. Autoimmunreaktionen beteiligt.
- Beim Typ-2- oder insulinunabhängiger Diabetes ist - neben genetischen und Umweltfaktoren - die Adipositas ein Hauptrisikofaktor, so dass hier zwischen einer fettleibigen und einer nicht-fettleibigen Form unterschieden wird.
- Beim sekundären Diabetes liegen primär andere Grunderkrankungen bzw. Syndrome vor, wie z.B. Pankreaserkrankungen, hormonelle, Arzneimittel- oder chemisch induzierte Störungen, Insulinrezeptorabnormalitäten, bestimmte genetische Erkrankungen sowie mangelhafte Ernährung.

Gestörte Glucosetoleranz:

- Die gestörte Glucosetoleranz ist eine frühe Phase eines Diabetes und wird durch ähnliche Faktoren wie die o.g. Diabetes-Typen ausgelöst, obwohl diese Störung nicht zwingend zu einem manifesten Diabetes führt.

Schwangerschaftsdiabetes:

- Beim Schwangerschaftsdiabetes kann es sich sowohl um eine gestörte Glucose-toleranz handeln, die erstmals während der Schwangerschaft aufgrund komplexer metabolischer und hormoneller Veränderungen auftritt und sich nach Ende der Schwangerschaft häufig wieder normalisiert oder um die Manifestation eines Typ-1- oder Typ-2-Diabetes.

Diese verkürzt wiedergegebene Klassifikation der humanen Diabetes-Formen kann mit Ausnahme des Schwangerschaftsdiabetes auf die Erscheinungsbilder in der Veterinärmedizin übertragen werden.

2.1.2 Vorkommen und Bedeutung

Allein in Deutschland beträgt die Zahl der an Diabetes mellitus erkrankten Menschen etwa 4 Millionen mit einer Dunkelziffer von mindestens 2 Millionen. Weltweit sind ca. 100 Millionen Menschen betroffen. Man geht davon aus, dass sich diese Zahlen in den nächsten 30 Jahren verdoppeln werden. Bei der überwiegenden Zahl dieser Fälle handelt es sich um Typ-2-Diabetiker, wobei die Krankheit gehäuft erst im Alter ab 40 Jahren auftritt; im Gegensatz dazu manifestiert sich der Typ-1-Diabetes vorwiegend in jüngeren Jahren (< 35 Jahre). Eine Geschlechtsprädisposition besteht für den Typ-1- nicht, beim Typ-2- überwiegt der Anteil an Frauen (KNICK 1997).

Bei Katze und Hund stellt der Diabetes mellitus die häufigste endokrine Störung dar. Bei 1,5 bzw. 2% der Sektionsfälle der Tierärztlichen Fakultät der LMU München konnte diese Krankheit festgestellt werden (MINKUS et al. 1991). Die Prävalenz schwankt je nach Patientenkollektiv beim Hund zwischen 1:66 – 1:2000 (LING et al. 1977) und liegt bei der Katze etwa 1:400 (CRENSHAW und PETERSON 1996, PANCIERA et al. 1990), wobei Hündinnen (80% zu 20%) und Kater (60% zu 40%) häufiger erkranken. In der Regel tritt die Krankheit erst im Alter ab 7 Jahren auf (REUSCH 1996), selten erkranken jüngere Tiere (ATKINS et al. 1983,1979, LETTOW et al. 1983). Hunde entwickeln zumeist einen Typ-1- sowie einen sekundären Diabetes, die Angaben schwanken je nach Autor zwischen 80 – 100% (STOGDALE 1986). Bei der Katze liegt im Allgemeinen ein Typ-1- oder Typ-2-

Diabetes vor (REUSCH 1996). Die sekundäre Diabetesform ist bei der Katze selten zu finden, häufig dagegen jedoch die sogenannte Streß- oder passagere Hyperglykämie der Katze (ca. 4% im Vergleich zu 0,6% an Diabetes mellitus erkrankten Katzen) (HOENIG 1999). Diese kann nicht dem eigentlichen Diabeteskomplex zugeordnet werden, da sie häufig nur transient aufgrund von Streßsituationen (Zwangmaßnahmen beim Tierarzt, primäre schwere Grunderkrankungen, z.B. Infektionen, u.a.) auftritt und damit auf ein Übermaß an insulinantagonisierenden Hormonen, wie z.B. Katecholaminen, zurückzuführen ist. Nach Ausschaltung des Stressors reguliert sich der Blutglucosegehalt zumeist innerhalb weniger Wochen und nur selten muß vorübergehend exogen Insulin zugeführt werden (OPITZ 1990).

Der Diabetes mellitus ist bei anderen Tierarten (Pferde, Rinder, Schafe, Schweine, Affen, Fischen, Vögel, Nager u.a.) in Einzelfällen beschrieben worden, jedoch sind diese Fallberichte oft unzureichend hinsichtlich ihrer Ätiologie klassifiziert. Sehr häufig werden in diesem Zusammenhang Pankreatitiden, Hypophysentumore und andere Tumorarten als Grunderkrankung genannt. Aufgrund der bis jetzt unbedeutenden Relevanz des Diabetes mellitus bei diesen Tierarten werden diese Fälle hier ausgeklammert.

2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Wie schon unter 2.1.1 erwähnt, handelt es sich beim Diabetes mellitus ätiologisch um ein heterogenes Geschehen, wobei eine genetische Prädisposition für den Menschen als gesichert gilt und für Hund (Pudel, Dachshund, Labrador, Keeshound) und Katze (Siam) anzunehmen ist (KNICK 1997, STOGDALE 1986, KRAMER et al. 1980, SCHALL und CORNELIUS 1977). Daneben spielen (Auto)-Immunreaktionen (z.B. Inselzellantikörper, Insulin-Autoantikörper, Antikörper gegen Glutaminsäure-decarboxylase), toxische und infektiöse Einflüsse (z.B. Nitrosamine, Virusinfektionen) sowie manifestationsfördernde Faktoren (z.B. Adipositas) wichtige Rollen bei der Entwicklung eines Diabetes mellitus. Das genaue pathogenetische Geschehen ist sowohl in Human- als auch Veterinärmedizin noch weitgehend unbekannt. Man geht davon aus, dass beim Typ-1-Diabetes in erster Linie chronische, pathologische

Autoimmunreaktionen die relativ lange Latenzzeit bis zur Manifestation einleiten - gekennzeichnet durch die komplette Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen und damit einen absoluten Insulinmangel (EISENBARTH 1986) und den weiteren o.g. Faktoren nur eine Triggerfunktion zukommt. Der Typ-2-Diabetes ist in erster Linie durch einen relativen Insulinmangel gekennzeichnet, d.h. die β -Zellen sind zunächst noch in der Lage, Insulin zu produzieren. Genetische Faktoren, Übergewicht, mangelhafte körperliche Aktivität sowie Abnahme der Insulinrezeptoren im Alter führen zu einer Insulinresistenz an den Erfolgsorganen (Leber,- Muskel,- Fettzelle), die schließlich in einer Erschöpfung der Insulinproduktion der β -Zellen endet.

Dieses Geschehen trifft im wesentlichen auch auf ältere, übergewichtige Katzen zu; desweiteren spielen der immun-mediierte Prozess der Inselamyloidose und eine hydropische Degeneration eine bedeutende Rolle bei der Zerstörung der pankreatischen Inseln der Katze (STOGDALE 1986).

Die Pathogenese des Typ-1- und Typ-2-Diabetes beim Hund wird in ähnlicher Weise wie beim Menschen diskutiert, jedoch zeigen sich auch deutliche Unterschiede im Krankheitsbild. So wird bei einem Typ-1-Diabetes des Hundes eine Insulitis nur vereinzelt beobachtet; es handelt sich überwiegend um eine Pankreatitis, obwohl der Nachweis von Autoantikörpern gegen Inselzellen beim diabeteskranken Hund wie beim Menschen ebenfalls gezeigt wurde (HOENIG und DAWE 1992, MINKUS et al. 1991, ATKINS und MACDONALD 1987). Bei den seltenen Erkrankungen in jungen Jahren (<1 Jahr) handelt es sich im Allgemeinen um eine kongenitale Inselhypoplasie. Ausserordentlich häufig findet man beim Hund die sekundäre Form des Diabetes, der Grunderkrankungen, wie akute und chronische Pankreatiden, das Cushing-Syndrom, der Progesteron-induzierte Diabetes der Hündin, aber auch die iatrogene Zuführung von insulinantagonisierenden Hormonen, wie z.B. Glucocorticoide, Progesteron und Somatotropes Hormon zugrunde liegen.

2.1.4 Symptomatik und Begleiterkrankungen

Die vier „klassischen“ Diabetessymptome - Polydipsie, Polyurie, Glucosurie und Gewichtsverlust trotz Polyphagie – sind in der Mehrzahl bei Mensch und Tier zu

finden. Sie sind auf den relativen oder absoluten Mangel an Insulin im Organismus zurückzuführen. Insulin ist ein anaboles Proteohormon der β -Zellen des endokrinen Pankreas und fördert die Aufnahme von Glucose in die Gewebe der Erfolgsorgane (blutzuckersenkende, Glykogen-, Protein- und Fettaufbauende Funktion). Durch den katabolen Effekt der bei Diabetes überwiegenden kontrainsulinären Hormone kommt es zum Abbau der Glykogenreserven, von Eiweiß und Fettdepots mit der Folge des Gewichtsverlustes. Unter physiologischen Bedingungen sollte der Nüchternblutzuckerspiegel beim Menschen unter 126 mg/dl (7mmol/l) und 2 h postprandial nicht über 180 mg/dl (10 mmol/l) liegen, beim Tier, unabhängig von der Nahrungsaufnahme, zwischen 70 und 110 mg/dl. Wird die Nierenschwelle für Glucose überschritten (bei Mensch und Hund altersabhängig zwischen 160-180 mg/dl, bei der Katze etwa 290 mg/dl) (KNICK 1997, REUSCH 1996), kommt es zur *Glucosurie* (Hyperosmolarität des Harns) und damit zu einer Glucose-bedingten osmotischen Diurese (*Polyurie*), die kompensatorisch eine *Polydipsie* zur Folge hat. Bei Insulinmangel und persistierender Hyperglykämie, Fettstoffwechselstörung und allgemeiner Dehydratation kann sich das ketoazidotische Coma diabeticum entwickeln, welches durch den rapiden Anstieg freier Fettsäuren und der damit gesteigerten Ketogenese und entstehenden metabolischen Azidose ausgelöst wird.

Bei unzureichender Behandlung eines Diabetes und mehrjähriger Hyperglykämie können sich schwerwiegende Folgeerkrankungen entwickeln, wie eine diabetische Retino-, Neuro-, Nephro- und Kardiomyopathie infolge mikroangiopathischer Schäden sowie makroangiopathische mit arteriosklerotischen Veränderungen im Herz-Kreislaufsystem und den Füßen.

Der diabetische Katarakt ist die beim Hund am häufigsten vorkommende Komplikation (FELDMAN und NELSON 1987). Oft ist die plötzlich auftretende Blindheit erst der Grund für die Konsultation eines Tierarztes. Katzen entwickeln erst nach langer Krankheitsdauer (>8 Jahre) eine Retinopathie (HATCHELL et al. 1995). Die diabetische Neuropathie scheint dagegen eine relativ häufige Komplikation sowohl beim Hund und als auch bei der Katze zu sein. DAHME et al. (1989) zeigten anhand von Hautbiopsien, dass über 90% der diabetischen Tiere charakteristische Nervenläsionen aufwiesen, die für die bei diesen Tieren häufigen, unspezifischen Allgemeinstörungen verantwortlich gemacht werden.

Die diabetische Nephropathie wird beim Tier meist erst bei Auftreten einer Niereninsuffizienz diagnostiziert (FELDMAN und NELSON 1987). KIRSCH und REUSCH (1993) konnten aber im Urin bei Hunden mit Langzeitdiabetes erhöhte Ausscheidungen von Proteinen nachweisen. Diese Proteinurie wurde als subklinisch verlaufende Vorstufe einer diabetischen Nephropathie gewertet.

Weitere Begleiterkrankungen diabetischer Tiere, wie z.B. Cystitiden, Kardiopathien, Pyodermien und gastrointestinale Störungen werden in der Literatur beschrieben, scheinen aber Ausnahmen zu sein oder sind in ihrer Symptomatik so dominant, dass sie den eigentlichen Diabetes überdecken.

2.1.5 Diagnose und Therapie

Die Diagnose eines Diabetes mellitus ist bei Mensch und Tier mit einer Blutglucosebestimmung schnell und einfach zu stellen. Das Vorliegen von Begleiterkrankungen oder die Suche nach auslösenden Grunderkrankungen hingegen, bedarf einer umfassenden Anamnese und Diagnostik. Eine ausreichende Auswahl an einfach durchzuführenden Testkits zur Bestimmung von Glucose und Ketonkörpern in Blut und Harn geben - neben den klassischen klinischen Symptomen - erste Hinweise auf das Vorliegen eines Diabetes mellitus. Besonders in der Veterinärmedizin hat sich in den letzten Jahren die Bestimmung von Fructosaminen (FS) und glykierten Hämoglobinen (HbA1c) bewährt, da ihre Bildung nicht von kurzfristigen Blutzuckerschwankungen beeinträchtigt wird und somit auf eine längerfristige Hyperglykämie hindeutet, die i.d.R. nur beim Diabetes anzutreffen ist. Eine Streßhyperglykämie der Katze kann so leicht ausgeschlossen werden.

In der Humanmedizin werden HbA1c-Bestimmungen zur Langzeitkontrolle der Stoffwechsellage bei Diabetikern genutzt. HbA1c entstehen als Kondensationsprodukt von Glucose und Hämoglobin und unterliegen keinem enzymatischen Abbau, so dass ihre Eliminierung von der natürlichen Absterberate der Erythrozyten abhängt. Die affinitätschromatische Bestimmung der HbA1c ergibt folgende obere Referenzbereiche: Mensch: 8-10%, Katze: 1,3%, Hund: 2,4%.

Fructosamine entstehen durch die Anlagerung von Glucose an Serumproteine, besonders Albumin, und können durch einfache photometrische Bestimmung analysiert werden. Es werden folgende obere Referenzbereiche genannt: Mensch: 370 $\mu\text{mol/l}$, Katze: 340 $\mu\text{mol/l}$, Hund: 372 $\mu\text{mol/l}$. Ihre Bestimmung wird zur kurzfristigen Überwachung der Stoffwechsellage in der Humanmedizin eingesetzt (KNICK 1997, REUSCH 1996/1993, HOYER-HOTT et al. 1995, KANEKO et al. 1992, STAUDACHER 1990).

Glucosetoleranztests (GTT) werden vorwiegend in der Humanmedizin durchgeführt, um Frühstadien eines Diabetes mellitus bei vorhandener Prädisposition zu diagnostizieren. In der Veterinärmedizin finden sie wenig Anwendung, da ihr diagnostischer Nutzen vorwiegend der Klassifizierung von Kohlenhydratstoffwechselstörungen dient. Die Bestimmung der basalen Plasma-Insulinwerte eignet sich sowohl bei Mensch und Tier zur Diagnostik eines Insulinmangels. Die Referenzwerte betragen für den Menschen 2-15 $\mu\text{U/ml}$, für den Hund 5-25 und für die Katze 7-9 $\mu\text{U/ml}$. In der Humanmedizin hat sich die Bestimmung des C-Peptids aufgrund seiner längeren Halbwertszeit und höheren molaren Konzentration (1,1 – 4,2 ng/ml) von Vorteil erwiesen.

Therapeutisch stellt der Diabetes mellitus sowohl an den behandelnden Arzt/Tierarzt als auch an den Patienten/Patientenbesitzer hohe Ansprüche und erfordert eine lebenslange, disziplinierte Mitarbeit. Während in der Humanmedizin je nach Diabetestyp entweder orale Antidiabetika oder Insulin zur Behandlung der Hyperglykämie eingesetzt werden, findet in der Veterinärmedizin i.d.R. nur das Insulin, vornehmlich mit Langzeitwirkung, eine Anwendung. Beim Hund sind orale Antidiabetika im Allgemeinen wirkungslos und rufen oft schwere Leberschäden hervor. Für die Katze sind sie nur in einigen Fällen des insulinunabhängigen Diabetes in Kombination mit geeigneter Diät als ausreichend wirkungsvoll beschrieben. Die von der amerikanischen Diabetesgesellschaft (1994) empfohlene Diätzusammensetzung für den Menschen (55-60% komplexe Kohlenhydrate, 20-25% Fett, 20% Protein und 15-25 g Rohfaser pro 1000 kcal) hat sich ebenfalls für die Anwendung in der Veterinärmedizin bewährt (BLAXTER et al. 1990, ANDERSON et al. 1979).

2.1.6 Zusammenfassung

Der Diabetes mellitus stellt sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eine bedeutende und an Häufigkeit zunehmende Krankheit dar. Trotz intensiver, jahrelanger Forschung konnten weder die Ätiologie noch die Pathogenese der unterschiedlichen Erscheinungsformen des Diabetes eindeutig geklärt werden. Für die weitere Forschung wurden jedoch hervorragende Tier-Modelle etabliert. Neben den spontan diabetischen Modellen wie der NOD-Maus (Non-Obese-Diabetic) und der BB-Ratte (BioBreeding), bei denen immunologische Prozesse mit Insulinitis zur β -Zelldestruktion führen, existieren z.B. auch chemisch-induzierte Modelle mit Alloxan (ALX) und Streptozotocin (STZ) als Toxine, mit denen spezifisch die β -Zelle zerstört wird. Mit multiplen niedrigen Dosen STZ kann in genetisch empfänglichen Mausstämmen ein Diabetes induziert werden, an denen auch immunologische Reaktionen beteiligt sind. Da dieser induzierte Diabetes die typischen Symptome auslöst, die dem spontanen Diabetes in Mensch und Tier vergleichbar sind, eröffnen diese Diabetogene die Möglichkeit, den Mechanismus der β -Zellzerstörung auf molekularer Ebene zu analysieren und nach protektiven Mechanismen zu suchen. Von grosser Wichtigkeit sind ALX, ein Pyrimidinderivat, und STZ, ein Antibiotikum aus *Streptomyces achromogenes*, aufgrund ihres natürlichen Vorkommens, denn durch ihre spontane Bildung im Körper (ALX) bzw. als Kontamination aus der Umwelt (STZ) werden sie ebenfalls als eine Möglichkeit diabetesverursachender bzw. -auslösender Faktoren angesehen.

2.2 Glucosetransport und Insulinfreisetzung

Der Blutzuckerspiegel wird im gesunden Organismus physiologischerweise auf Werte zwischen 5,5 und 7,8 mmol/l reguliert. Diese Homöostase wird in erster Linie durch die pankreatischen Inselhormone Insulin und Glucagon als direkte Gegenspieler aufrechterhalten. Für die Ausschüttung dieser Hormone ist es essentiell, dass Veränderungen der zirkulierenden Glucosemenge schnell und genau von den Inselzellen registriert werden. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Glucoseerkennungsmechanismus in der pankreatischen β -Zelle im wesentlichen von

zwei Strukturen getragen wird; zum einen sind dies die Glucosetransporter (GLUT), zum anderen das Glucose-phosphorylierende Enzym Glucokinase (MEGLASSON et al. 1986b, MATSCHINSKY 1990, NEWGAARD et al. 1990).

2.2.1 Glucosetransporter

GLUT liegen mit 12-membranüberspannenden Domänen in der Plasmamembran und transportieren die Glucose über erleichterte, energieunabhängige Diffusion entlang eines Konzentrationsgefälles in die Zellen. Bis jetzt sind 5 verschiedene humane GLUT-Isoformen identifiziert, wobei die Isoformen GLUT1-4 für den Glucose- und der GLUT5 für den Fructosetransport zuständig sind (MARSHALL et al. 1993). Der GLUT2 wird nur in der Leber, im Dünndarm, der Niere und in den β -Zellen des Pankreas in hohen Mengen exprimiert - Organe, die entscheidenden Anteil an der Glucosehomöostase haben. Für die Gewebespezifität der einzelnen Isoformen werden Unterschiede in der Aminosäuresequenz verantwortlich gemacht (Homologie der AS-Sequenz der 5 GLUT: 39-65%, Homologie zwischen GLUT der Ratte und des Menschen bis 98%) (BELL et al. 1990). Der GLUT2 besitzt als einziger eine hohe Michaelis-Menten-Konstante für Glucose ($K_m = 66 \text{ mmol/l}$) und damit eine geringe Affinität für Glucose, so dass der Glucosetransport nicht sättigbar ist und linear in physiologischen Konzentrationen verläuft. MARSHALL et al. (1993) postulieren, dass der GLUT2 nicht nur für den schnellen Glucosetransport wichtig ist, sondern auch für das Überschreiten eines „Glucosegrenzwertes“, der die Insulinsekretion induziert. Da das Ausmass der Insulinfreisetzung direkt proportional zur Höhe der Blutglucosekonzentration reguliert werden muß, ist es verständlich, dass Defekte in Expression, Struktur oder/und Funktion des GLUT2 zu einer gestörten Insulinfreisetzung und damit zu einer Hyperglykämie führen können. Die Bedeutung des GLUT2 für die Glucose-stimulierte Insulinsekretion wird noch bei Betrachtung der β -Zelllinien β -TC-, HIT- und RINm5F-Zellen unterstützt. Allen gemein ist die gestörte bzw. fehlende Glucose-stimulierte Insulinsekretion. Sie besitzen eine deutlich geringere GLUT2-Expression im Vergleich zu physiologischen β -Zellen (MARSHALL et al. 1993). Während der prädiabetischen Phase des Typ-1-Diabetes, die durch die Bildung verschiedener β -Zellantikörper gekennzeichnet ist (s.2.1.3), zeigen die Patienten in der frühen Phase nur eine Reduktion der Insulinfreisetzung

auf einen Glucosereiz. Der GLUT2-vermittelte Glucosetransport konnte mit Immunglobulinen (IgG) aus solchen Diabetespatienten reduziert werden (JOHNSON et al. 1990). Im Diabetes-Modell der BB-Ratte exprimieren nur noch die Hälfte der überlebenden β -Zellen den GLUT2. ORCI et al. (1990) beschrieben diese Abnahme der GLUT2-Expression ebenfalls für den Typ-2-Diabetes.

Aus diesen Befunden ist ersichtlich, dass der GLUT2 der β -Zelle eine zentrale Rolle für die Glucoseaufnahme und -induzierte Insulinsekretion besitzt, und dass hier Dysfunktionen unbekannter Genese für die Entwicklung eines Diabetes mellitus ausschlaggebend sein können.

2.2.2 Glucokinase

Die Glucokinase ist eine Hexokinase oder ATP-D-Glucose-6-Phosphotransferase, von denen man bis dato vier verschiedene Isoformen in Säugergewebe identifizieren konnte. Als Hexokinase vom Typ IV wurde sie nur in pankreatischen β -Zellen, in der Leber und in wenigen neuroendokrinen Zellen des Gehirns und des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen. Sie besitzt eine geringe Affinität für Glucose (K_m für Glucose: 7-9 mmol/l) im Vergleich zu den anderen Hexokinase (K_m für Glucose: 0,1-0,001 mmol/l), ist nicht durch physiologische Spiegel an Glucose-6-Phosphat hemmbar und hat eine kleinere Molekülgröße (50 kDa im Vergleich zu 100 kDa der Hexokinase) (BELL et al. 1996). Die humane Glucokinase besteht aus 12 Exons, die eine Region von mehr als 50.000 Basenpaaren (bp) umspannen. Das Enzym bildet eine Tasche, in der die Hexosen binden. Durch immunhistochemische Färbung der Glucokinase konnte ihre Lokalisation in einem limitierten perinukleären Bereich gezeigt werden. In Phasen akuter oder chronischer Hyperglykämie läßt sie sich diffus im Cytoplasma verteilt darstellen; diese Translokation könnte für eine veränderte Enzymaktivität und damit Insulinfreisetzung verantwortlich sein (NOMA et al. 1996). Die Glucokinase gilt als das Signalerkennungssystem der pankreatischen β -Zelle, da sie Veränderungen in der Blutglucosekonzentration mit Veränderungen im Ausmass der Insulinsekretion verbindet (LENZEN und PANTEN 1988c, MEGLASSON und MATSCHINSKY 1984). Die Signalkette für die Insulinfreisetzung wird durch die Phosphorylierung der Glucose mittels der Glucokinase in Gang gesetzt; dies ist der erste und zugleich limitierende Schritt der Glykolyse.

MATSCHINSKY (1990) ist der Meinung, dass schon geringste Aktivitätsverluste der Glucokinase zu einer signifikanten Reduktion der β -Zellsensitivität für Glucose führen. Die Bedeutung der Glucokinase wurde 1996 durch BELL und Mitarbeiter bestätigt, die eine geringere Sensitivität für Glucose in Diabetespatienten beschrieben, bei denen sie Mutationen im Glucokinasegen identifizieren konnten.

2.3 Alloxan

2.3.1 Chemische Eigenschaften

Die chemische Bezeichnung für ALX lautet 2,4,5,6-Tetraoxohexahydropyrimidin. Als Pyrimidinabkömmling ist es strukturell verwandt mit Barbitursäure, Dialursäure, Harnsäure, Uramil und Violursäure (Abb. 1).

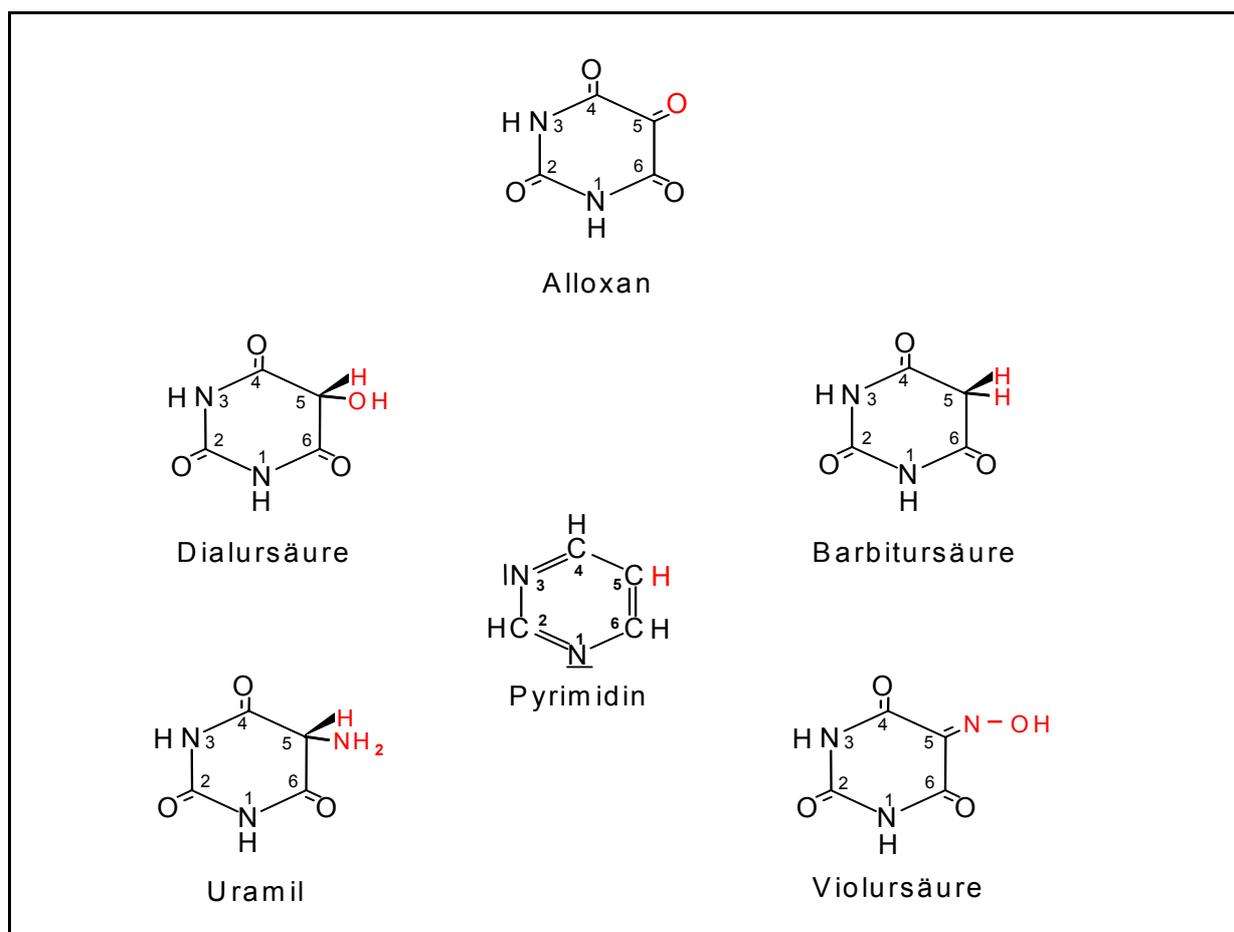


Abb. 1: ALX und verwandte Strukturen

ALX ist eine wasserlösliche Substanz und reagiert leicht sauer ($pK_{a1} = 6,63$), da es sich schnell in Alloxansäure, einem Isomer, umwandelt (Abb. 2). Die Stabilität in Wasser ist von pH und Temperatur abhängig, die Halbwertszeit (HWZ) beträgt unter physiologischen Bedingungen bei pH 7,4 und 37°C ca. 1 Minute, d.h. in Körperflüssigkeiten zerfällt ALX sehr schnell.

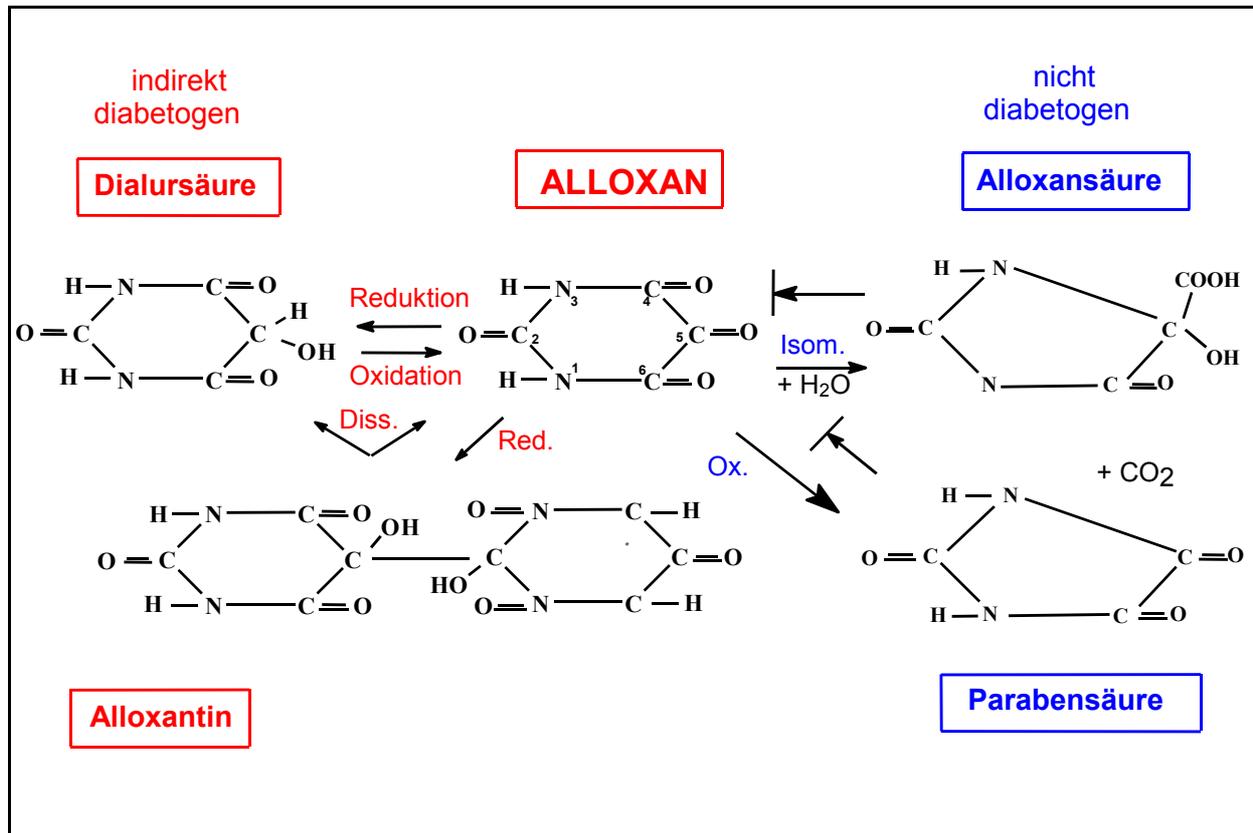


Abb. 2: ALX und seine Transformationsprodukte

Aufgrund seiner hohen Affinität für Thiolgruppen entsteht durch die Reduktion von ALX Dialursäure (= 5-Hydroxybarbitursäure), die indirekt diabetogen wirkt, da sie durch Reoxidation wieder in ALX umgewandelt wird. Dieser Redoxzyklus wird für die Diabetogenität von ALX verantwortlich gemacht, da hierbei freie, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden können (s.2.3.5.3). Alloxantin, eine ebenfalls indirekt diabetogen wirkende Substanz, entsteht als Kondensationsprodukt aus zwei Molekülen ALX. Die durch Oxidation von ALX (unter Abspaltung von Kohlendioxid) entstehende Parabensäure und das Isomer Alloxansäure sind nicht diabetogen.

In zahlreichen Studien wurden die Voraussetzungen für die Diabetogenität von ALX und verwandten Strukturen untersucht. Diabetogen wirken nur solche Substanzen, die 1.) eine hochreaktive, zentrale 5-Carbonylgruppe, welche hydriert werden kann; 2.) mindestens einen unsubstituierten Stickstoff und 3.) einen intakten Pyrimidinkern besitzen (COOPERSTEIN und WATKINS 1981).

Chemische Eigenschaften, wie eine positive Strecker-Reaktion, in deren Verlauf α -Aminosäuren (AS) zu den entsprechenden Aldehyden deaminiert und decarboxyliert werden, sowie ein chelatbildendes Potential können nicht für die Diabetogenität von ALX verantwortlich gemacht werden, da viele andere verwandte, aber nicht diabetogene Substanzen diese Eigenschaften ebenfalls besitzen (RERUP 1970).

Die hohe Affinität für Thiolgruppen ist ein weiteres nicht-spezifisches Merkmal von ALX, jedoch wird diese Eigenschaft in neueren Untersuchungen gerne als Begründung eines möglichen Wirkmechanismus von ALX herangezogen (s.2.3.5.4).

2.3.2 Historischer Hintergrund

ALX wurde schon 1838 von Wöhler und Liebig in ihrer Publikation über Harnsäure erwähnt, und JACOBS (1937) berichtete erstmals über eine initiale Hyperglykämie in mit hohen Dosen ALX behandelten Kaninchen, in deren Folge eine schwere Hypoglykämie, Krämpfe und Tod auftraten. Tatsächlich aber entdeckten erst 1943 DUNN und Mitarbeiter zufällig das diabetogene Potential von ALX, als sie in ihren Untersuchungen über das Crush-Syndrom der Niere verschiedene Harnsäurederivate, u.a. hohe Konzentrationen ALX, verwendeten. Die Tiere verstarben innerhalb weniger Stunden im Koma und zeigten neben den erwarteten Nierenschäden teilweise oder vollständige Nekrose der pankreatischen Inseln. Andere Organe waren nicht betroffen. Diese überraschenden Ergebnisse leiteten intensive Forschungen über ALX ein. Der ALX-induzierte Diabetes zeigt die klassischen Symptome des humanen Diabetes, und so wurden die Begriffe des „Alloxan-Diabetes“ und, als eine neue Form, der des „chemischen Diabetes“ geprägt (RERUP 1970).

2.3.3 ALX-induzierter Diabetes

Neben Hyperglykämie, Glucosurie, Polydipsie, Polyurie und Gewichtsverlust sind Hyperlipidämie, Ketosurie und Acidose die Symptome des ALX-induzierten Diabetes in fast allen untersuchten Tierarten (Maus, Ratte, Kaninchen, Hamster, Hund, Katze, Affe u.a.). Nur das Meerschweinchen scheint gegenüber ALX resistent zu sein. Die Ratte gilt als das sensitivste Tier, da schon 40 mg ALX/kg Körpergewicht (KG) iv in 100% der Tiere einen Diabetes auslösen (Maus 70-100 mg ALX/kg KG iv; Hund 50 - 75 mg ALX/kg KG iv).

Unabhängig von der Art des Applikationsweges verteilt sich ALX sehr schnell über den Blutkreislauf in die Gewebe, passiert die Plazentarschranke, ohne aber einen Diabetes in den Nachkommen zu induzieren (FRIEDGOOD und MILLER 1945).

Es hat sich gezeigt, dass eine diabetogene Dosis ALX sich nicht nur nach Tierart, Tierstamm, Applikationsweg und –dauer richtet, sondern das Alter - jüngere Tiere scheinen resistenter gegenüber ALX zu sein - und Diät - nüchterne Tiere reagieren stärker auf ALX – eine wichtige Rolle spielen. Neben der extrem kurzen HWZ führt dies zu erheblichen Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit von in vivo Experimenten.

Nach ALX-Behandlung sind histologisch innerhalb von 10 Minuten eine Abnahme nukleärer und cytoplasmatischer Granula, ein geschwollenes endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien zu erkennen, später treten Membrandesintegrationen, Karyolysis, und letztendlich innerhalb von 24 h massive β -Zellnekrosen auf (JÖRNS 1997, BOQUIST und LORENTZON 1979, LUKENS 1948, BAILEY et al. 1944). Diese pathologischen Veränderungen sind schon für kleinste ALX-Konzentrationen β -zellspezifisch, wobei die schnelle und hohe Akkumulation von ALX in das endokrine Pankreas, speziell der β -Zellen, für diese Spezifität verantwortlich gemacht wird (GORUS et al. 1982, WEAVER et al. 1978a, HAMMARSTRÖM und ULLBERG 1966).

Lediglich nach Verabreichung sehr hoher ALX-Konzentrationen können z.T. reversible Veränderungen in Niere, Leber und Nebenniere festgestellt werden (LUKENS 1948, HARD und CARR 1944). Gelegentliche Berichte über schwache degenerative Veränderungen von A-Zellen, Hemmung der Glucagonfreisetzung sowie der Glucose-inhibierten Glucagonfreisetzung nach Inkubation von Inseln mit

ALX (GOTO et al. 1978, PAGLIARA et al. 1977) lassen die hohe und selektive Sensitivität der β -Zellen für ALX unberührt. Auffallend ist, dass in allen histologischen Untersuchungen kein Hinweis auf die Infiltration mit Entzündungszellen trotz massiver Nekrosen gefunden wird.

Nach Gabe einer einzelnen, diabetogenen ALX-Dosis zeigt der Blutglucosespiegel einen charakteristischen, 3-phasigen Verlauf (COOPERSTEIN und WATKINS 1981):

1. eine frühe, deutliche Hyperglykämie von 1-4-stündiger Dauer, die aufgrund eines plötzlichen Stopps der Insulinsekretion hervorgerufen wird;
2. eine mehr oder weniger starke Hypoglykämie von 6-12-stündiger Dauer, verursacht aufgrund einer massiven Insulinfreisetzung aus den geschädigten und absterbenden β -Zellen;
3. eine chronische Hyperglykämie nach 24-48 h, die - je nach Ausmass der Reduktion an pankreatischen Inseln - gekennzeichnet ist durch subnormale bis nicht mehr detektierbare Plasmainsulinspiegel und lebenslange Dauer.

2.3.4 Protetiva eines ALX-induzierten Diabetes

Mit der Intensivierung der Forschung über den ALX-induzierten Diabetes konnten eine Reihe von protektiven Substanzen identifiziert werden, die den unterschiedlichsten Stoffklassen angehören. In erster Linie sind dies:

- **Glucoseanaloga:**

Der protektive Effekt von Glucose und Mannose wurde schon früh von SEN und BHATTACHARYA (1952) beschrieben. Der Schutzeffekt weiterer Glucoseanaloga (α - und β -Anomer der D-Glucose (D-G), 3-O-methyl-Glucose (3-OMG), D-Mannose) gegenüber ALX-Toxizität wurde sowohl in vitro als auch in vivo ausführlich beschrieben (ZAWALICH et al. 1979, WEAVER et al. 1978b, MC DANIEL et al. 1976, ROSSINI et al. 1975). Entscheidend ist dabei, dass die Zucker 10 Minuten bis unmittelbar vor der Behandlung mit ALX appliziert bzw. die Inseln vor der Inkubation mit ALX mit diesen behandelt werden. Überraschenderweise besitzt Mannoheptulose keinen protektiven Effekt in Bezug auf die ALX-Diabetogenität; es verhindert sogar den Schutzeffekt der Glucoseanaloga, unabhängig davon, ob es vor, mit oder nach

der Glucose verabreicht wird (ROSSINI et al. 1975, SCHEYNIUS und TÄLJEDAL 1971). LENZEN und Mitarbeiter (1988a) untersuchten verschiedene Glucoseanaloge bezüglich ihres Potentials, die ALX-induzierte Hemmung der Glucokinase zu verhindern. Von den getesteten Substanzen erwies sich am wirkungsvollsten D-G, gefolgt von D-Mannose=D-Mannoheptulose>D-Glucosamin>N-acetyl-D-Glucosamin >>2-desoxy-D-Glucose>3-OMG>D-Galactose. Der protektive Effekt von N-acetyl-D-glucosamin konnte jedoch von anderen Autoren (MEGLASSON et al. 1986a) nicht bestätigt werden. Alle Autoren stimmen jedoch darin überein, dass der protektive Effekt von α -D-G denjenigen des β -Anomers übersteigt.

- **Antioxidantien:**

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Fähigkeit einer Substanz, freie Radikale abzufangen und seinem Potential, vor der ALX-Toxizität zu schützen. Die Vorbehandlung mit verschiedenen Alkoholen (z.B. Butanol) und Harnstoffderivaten (TIBALDI et al. 1979, HEIKKILA et al. 1976) sowie mit Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Dimethylsulfoxid (DMSO) (JÖRNS et al. 1999, ABDEL-RAHMAN et al. 1992, THAETE et al. 1985, GRANKVIST et al. 1981, FISCHER und HAMBURGER 1980) schützt sowohl in vitro als auch in vivo vor ALX-induzierten Funktionsverlusten und Nekrose. Anzumerken ist, dass Dimethylthioharnstoff nicht nur freie Radikale abfängt, sondern auch einen Anstieg des Blutglucosespiegels bewirkt, so dass man davon ausgeht, dass der protektive Effekt in diesem Fall auf eine transiente Hyperglykämie zum Zeitpunkt der ALX-Gabe zurückzuführen ist. (MASUKAWA und NAKANISHI 1994). Auch Melatonin wirkt als Antioxidanz und schützt vor ALX-Toxizität (PIERREFICHE et al. 1993).

- **Sonstige:**

Substanzen, die Sulfhydryl (SH) -Gruppen bereitstellen und dadurch reduzierende Eigenschaften haben, wie z.B. Mono- und Dithiole, Cystein und GSH üben einen Schutzeffekt gegenüber ALX aus. Es wird vermutet, dass diese Stoffe SH-Gruppen wichtiger Strukturen in der Zellmembran als auch SH-Gruppen enthaltene Enzyme in der β -Zelle in der reduzierten Form halten (WATKINS und COOPERSTEIN 1976, SNEER et al. 1971). Barbitursäure als ALX-verwandte Struktur hat ebenfalls einen zumindest teilweise protektiven Effekt, der wahrscheinlich auf eine direkte Reaktion mit ALX zurückzuführen ist (WEAVER et al. 1978c). Nicotinamidadenindinucleotid

(NADPH) wirkt nicht protektiv gemessen an der Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch ALX (ABDEL-RAHMAN et al. 1992), wohingegen es eine ALX-induzierte Permeabilitätserhöhung für Mannitol verhindern soll (COOPERSTEIN und WATKINS 1977). Ca^{2+} -Antagonisten, wie z.B. Verapamil, verhindern die ALX-induzierte Hyperglykämie, die Hemmung der Insulinsekretion und der DNA-Strangbrüche. Man vermutet, dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase durch die ALX-generierten ROS gestört wird (DREWS et al. 2000, KIM et al. 1994)

2.3.5 Mögliche Angriffspunkte der ALX-Toxizität

Im Laufe der jahrzehntelangen Forschung über ALX wurden immer wieder neue Hypothesen zum möglichen Wirkmechanismus und der Zielstrukturen (Abb. 3) dieses Diabetogens favorisiert, wobei jede dieser Theorien bestimmte Effekte von ALX und den untersuchten Protektiva erklären kann, jedoch letztendlich nicht sämtliche durch ALX erzielte Veränderungen an und/oder in der β -Zelle vollständig nachvollziehen lässt.

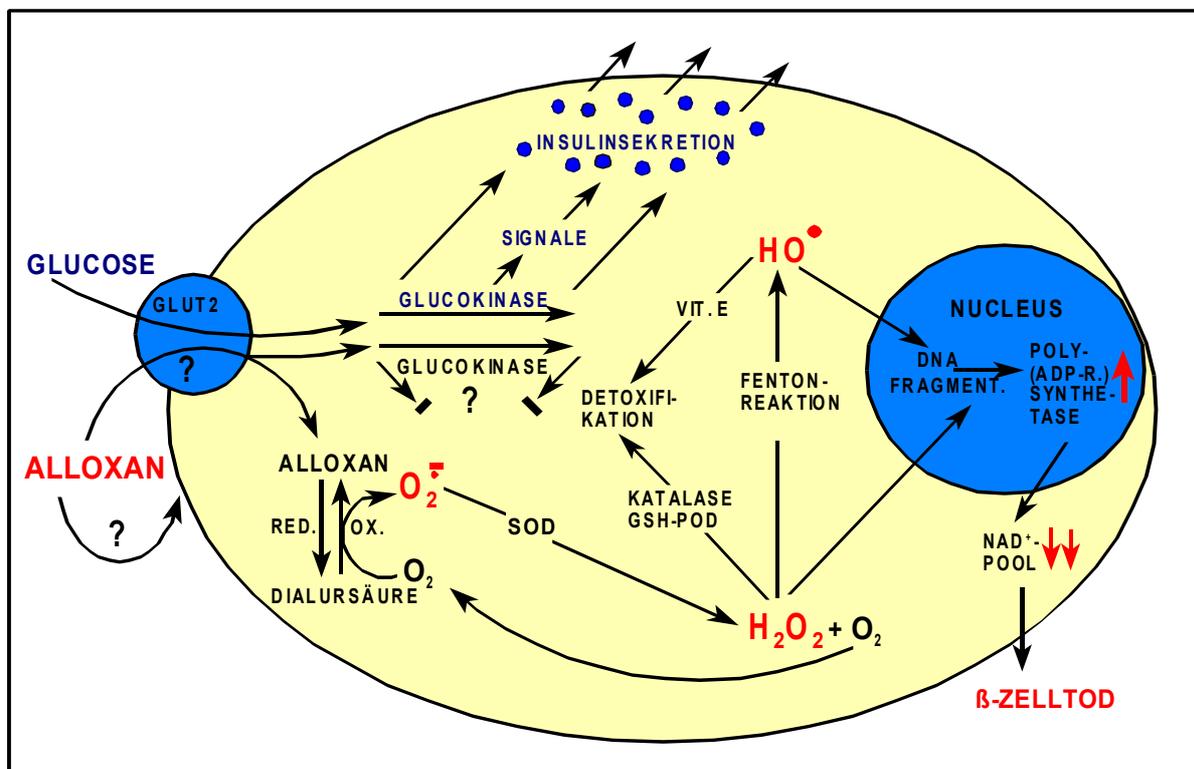


Abb. 3: Hypothesen zum Wirkmechanismus von Alloxan

2.3.5.1 Plasmamembran

In frühen Untersuchungen zum Wirkmechanismus von ALX sprachen viele Untersuchungsergebnisse für die Plasmamembran der β -Zelle als Hauptangriffspunkt. Sicherlich bewirkt ALX Membraneffekte, ob diese jedoch diabetogen sind, ist eine davon unabhängige Frage. WATKINS et al. (1964) zeigten nach Inkubation isolierter Inseln eines Frosches mit einer geringen Konzentration ALX (0,001 mmol/l) einen deutlichen Anstieg der Permeabilität für radioaktiv markiertes Mannitol und Inulin, beides Substanzen, die normalerweise im Extrazellulärraum verbleiben. Später konnten diese Ergebnisse an Säugetierinseln nicht bzw. nur eingeschränkt wiederholt werden; für die erhöhte Aufnahme von Trypanblau wurden deutlich höhere Konzentration ALX (0,02 mmol/l) benötigt (GRANKVIST et al. 1977, MCDANIEL et al. 1975a). Eindeutig sind jedoch morphologische Veränderungen, eine Depolarisation (DEAN und MATTHEWS 1972) und die Veränderung des Rb^+ - und Ca^{++} -Fluss durch die Plasmamembran (HENQUIN et al. 1979, WEAVER et al. 1978a). CARROLL et al. (1994) beschrieben eine erhöhte Leitfähigkeit für K^+ , die vermutlich auf eine Aktivierung von ATP-sensitiven K^+ -Kanälen zurückzuführen ist. In Übereinstimmung zu diesen Befunden konnten DREWS et al. (2000) in isolierten Inseln und β -Zellen von Mäusen eine ALX-induzierte Hyperpolarisation des Plasmamembranpotentials, eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials sowie einen Anstieg des cytosolischen Ca^{++} -Gehalts und Abnahme der ATP-Synthese nachweisen. Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und des ATP-Gehalts in INS-1-Zellen, einer pankreatischen β -Zelllinie der Ratte (SAKURAI et al. 2001), unterstützen diese Befunde, die letztendlich zur Apoptosis der β -Zelle führen. Die Ursache für diese Veränderungen in der β -Zelle ist laut den Autoren in der Generierung von ROS zu suchen. Da alle diese Effekte auch auf eine allgemeine Störung der Integrität der Plasmamembran zurückführbar sind, wurde daraufhin der Einfluß von ALX auf bestimmte Transportsysteme bzw. Plasmamembranmoleküle näher untersucht (s.2.3.5.5). Desweiteren zeigten WEAVER et al. (1978a), dass radioaktiv markiertes ALX zeit- und temperaturabhängig von Inselzellen aufgenommen wird. Daher richteten sich weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus von ALX auf mögliche intrazelluläre Angriffspunkte (s.2.3.5.2-2.3.5.4)

2.3.5.2 Mitochondrien

Elektronenmikroskopische Studien veranlassten BOQUIST und Mitarbeiter (1977), die Mitochondrien der β -Zelle als Ziel der ALX-vermittelten Toxizität anzunehmen, da sich an diesen schon früh degenerative Veränderungen registrieren liessen. Später zeigte diese Arbeitsgruppe (1983), dass ALX von den Mitochondrien aufgenommen wird und diese Aufnahme durch Vorbehandlung mit Glucose reduziert werden konnte; 1985 beschrieben BOQUIST und BOSTRÖM Veränderungen des Ionenflusses, eine Hemmung der mitochondrialen Aconitase, letztendlich der Zellatmung, wodurch der β -Zelltod eingeleitet wird. Andere Autoren (ABDELRAHMAN et al. 1992) schreiben diese Effekte wiederum der Generierung von ROS zu (s.2.3.5.1). Diese Hypothese kann allerdings nicht erklären, warum ALX so schnell und in so geringen Konzentrationen die Glucose-induzierte Insulinsekretion hemmt. Desweiteren zeigten LENZEN und MIRZAIE-PETRI (1992), dass ALX zwar ein Aconitasehemmer ist, aber dieses Enzym nicht der primäre Angriffspunkt für dessen Toxizität sein kann, da nur Citrat als Substrat der Aconitase und nicht Glucose diese vor ALX schützen kann.

2.3.5.3 DNA

Schon 1976 wiesen Studien von HEIKKILA et al. daraufhin, dass ALX aufgrund seines Potentials ROS zu generieren, diabetogen wirkt. Einige Jahre später publizierten OKAMOTO und Mitarbeiter (1981) die Hypothese, dass der Autoxidationszyklus von ALX zu Dialursäure und umgekehrt zu einer Bildung von Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$) führt, die durch die SOD in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt werden, die wiederum in einer durch Eisen (Fe^{2+})-katalysierten Fenton-Reaktion zur Bildung der hochreaktiven Hydroxylradikale (HO^{\bullet}) führen (Abb. 3). Es kommt zu einer DNA-Fragmentation, die zu einer Erschöpfung des intrazellulären NAD^+ -Pools durch Aktivierung der Poly-ADP-Ribose-Synthetase und letztendlich zur β -Zelldestruktion führt. Die essentielle Rolle von ROS wurde von LENZEN und Mitarbeitern (1996) unterstützt, die zeigten, dass die pankreatische Insel einen deutlich geringeren Genexpressionsgehalt der antioxidativen Enzyme SOD, Katalase und GPx im Vergleich zu anderen Organen besitzt, mit der Folge, durch ROS leichter

geschädigt werden zu können. MATHEWS et al. (1999) lieferten einen weiteren Beweis für die Empfänglichkeit von β -Zellen für eine Schädigung durch ROS. Der von ihnen verwendete ALX-resistente Mausstamm hat einen deutlich höheren Gehalt an den antioxidativen Enzymen SOD, GPx und GSH-Reduktase im Vergleich zu einem ALX-sensitiven Mausstamm.

Eine andere Hypothese besagt, dass ROS die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase stören, die sekundär in DNA-Strangbrüchen und β -Zelltoxizität endet (KIM et al. 1994). Die Bildung von ROS und ihr toxisches Potential steht nicht nur im Einklang mit dem ausgeprägten Schutzeffekt exogen zugeführter antioxidativer Substanzen (s.2.3.4), sondern auch mit den schnell auftretenden morphologischen und funktionellen Veränderungen der β -Zelle nach ALX-Behandlung.

2.3.5.4 Glucokinase

Schon früh wurde geschlussfolgert, dass ALX einen Diabetes induziert, indem es spezifisch mit SH-Gruppen β -zelle essentieller Enzyme reagiert, da sowohl Mono- als auch Dithiole vor einem ALX-induzierten Diabetes schützen (LAZAROW 1946,1948). Da aber nur Dithiole die ALX-Toxizität verhindern, vermutete man, dass die Bildung einer Disulfidbrücke innerhalb essentieller SH-Gruppen entscheidender Enzyme durch ALX für deren Aktivitätshemmung verantwortlich ist (SEN und BHATTACHARYA 1952). Diese Autoren zeigten kurze Zeit später, dass eine Vorbehandlung mit Glucose und Mannose vor ALX-induziertem Diabetes schützt (s.2.3.4) und unterstützten damit die Theorie einer Hexokinase-Hemmung durch ALX. Diese Gruppe der Glucose-phosphorylierenden Isoenzyme kommen in allen Zellen eines Organismus vor. Daher konzentrierten sich neuere Untersuchungen auf die Glucokinase (s.2.2.2) als Hauptangriffspunkt der ALX-Toxizität, da nur sie in Leber und pankreatischen Inseln in großer Menge vorkommt. Unterstützt wird die Bedeutung der Glucokinase, und damit einer Interaktion von ALX mit diesem intrazellulären Target, durch die Befunde, dass nach Inkubation isolierter Inseln mit ALX eine Hemmung der Glucose- und Mannose-Oxidation (HENQUIN et al. 1979, GUNNARSSON und HELLERSTRÖM 1973;) und der Glucose-Utilisation (BORG et al. 1979) eintritt.

Die Glucokinase erwies sich als höchst sensitives Enzym gegenüber ALX, da ihre halbmaximale Hemmung schon mit ALX-Konzentrationen unter 10 $\mu\text{mol/l}$ erreicht wird. Die Charakteristika einer Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch ALX und einer Hemmung der β -Zell-Glucokinase weisen große Parallelen auf. Beide sind in isolierten pankreatischen Inseln mit ALX-Konzentrationen von 200-300 $\mu\text{mol/l}$ hemmbar; dieser Effekt ist mit halbmaximalen Konzentrationen von 10 mmol/l Glucose protektierbar. Desweiteren besitzen nur die Zuckermanaloga, die am C-2 einen großen Substituenten besitzen und auf diese Weise ALX den Zugang zu den zwei benachbarten SH-Gruppen in der Tiefe des Enzyms verwehren, eine hohe protektive Potenz (LENZEN et al. 1988b). Lenzen bestätigte die Arbeiten von Lazarow noch detaillierter, indem er zeigte, dass nur die Dithiole die ALX-induzierte Hemmung der Glucokinase rückgängig machen können, die einen mittleren Abstand von 3-4 Å ihrer benachbarten SH-Gruppen besitzen. Damit scheint es nur wahrscheinlich, dass ALX durch eine Interaktion mit benachbarten SH-Gruppen in der Tiefe der Zuckerbindungsstelle der Glucokinase angreift. Es kommt zu einer reversiblen Hemmung dieses Enzyms und damit einem Stopp der Insulinsekretion. Andere Autoren favorisieren jedoch die These, dass ALX nicht im aktiven Zentrum des Enzyms angreift, sondern an einer anderen reaktiven Stelle, so dass es zu einer Konformationsänderung und folglich zu einer Inaktivierung des Enzyms Glucokinase kommt (MEGLASSON et al. 1986a).

Kritisch ist jedoch anzumerken, dass zwar jede Störung des Glucoseerkennungsmechanismus der β -Zelle zu einer Insuffizienz ihrer Funktion führt, die schnell eintretenden histologischen Befunde nach ALX-Behandlung können jedoch mit der Theorie der Glucokinase als alleiniger Zielstruktur nicht hinlänglich erklärt werden. Dies gilt auch für die Vielzahl anderer Enzyme, z.B. der Phosphofruktokinase und der Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (MIWA et al. 1984, COLCA et al. 1983), die als potentielle Zielstrukturen für ALX diskutiert werden. Sie werden zwar durch ALX inhibiert, jedoch nur nach Verwendung wesentlich höherer Konzentration.

2.3.5.5 Glucosetransporter oder -rezeptor

Die Theorie, dass allgemeine Effekte auf die β -Zellmembran für die Toxizität von ALX verantwortlich sind, konnte nicht aufrechterhalten werden. Der protektive Effekt

vieler Glucoseanaloge in vitro und in vivo, das höhere protektive Potential der α -D-Glucose und die ALX-induzierte Hemmung der Insulinsekretion liessen einen Glucoserezeptor in der Plasmamembran vermuten, der eine Signalkette in Gang setzt, die letztendlich zur Insulinfreisetzung führt. Dieser Glucoserezeptor soll durch ALX blockierbar und nicht mit dem GLUT identisch sein (MCDANIEL et al. 1975, MATSCHINSKY et al. 1972). Da aber einige Substanzen, wie z.B. 3-OMG, vor der ALX-induzierten Hemmung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion schützen, jedoch selbst nicht die Insulinsekretion stimulieren und mittels des GLUT in die β -Zelle gelangen (TOMITA et al. 1974, COOPERSTEIN und LAZAROW 1969), scheint die Theorie des Glucoserezeptors ebenfalls nicht haltbar.

Da die die β -Zellmembran passierenden Zucker vor der ALX-Toxizität schützen und ALX eine sterische Ähnlichkeit mit Glucose aufweist, wurde der GLUT als eine weitere Zielstruktur für ALX diskutiert (WATKINS et al. 1973). SCHEYNIUS und TÄLJEDAL (1971) schliessen aus ihren Untersuchungen, dass eine Bindung von D-G, der Glucosetransport oder der Glucosemetabolismus eine Konformationsänderung der β -Zellmembran bewirken, so dass ALX nicht mehr angreifen und funktionelle Defekte verursachen kann, die zu einer Unterbrechung der Signalkette zur Insulinfreisetzung führen. Die Bedeutung der GLUT, besonders der Isoform GLUT2, im MLD-STZ-induzierten Diabetes der Maus wurde von WANG et al. (1998) beschrieben. Für die diabetogen wirkende Substanz STZ scheint der GLUT2 die präferentielle Zielstruktur zu sein, so dass anzunehmen ist, dass der GLUT2 im ALX-induzierten Diabetes ebenfalls eine wichtige Rolle spielen könnte.

2.4 Bedeutung von ALX für die Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus

Das Diabetogen ALX ist aufgrund seiner β -Zellspezifität eine Substanz, die seit über 50 Jahren in der Diabetesforschung eingesetzt wird, um die Funktion der β -Zelle und ihrer Strukturen sowie das Wechselspiel zwischen β -Zelle, Blutglucosekonzentration und Insulinfreisetzung zu untersuchen. Durch die Verwendung von ALX mit seinen überwiegend toxischen Wirkungen auf die β -Zelle erhofft man sich im direkten

Vergleich mit anderen Diabetogenen, wie z.B. STZ, einem Diabetogen mit immunologischen und toxischen Wirkungen, präzise Aussagen zu der Pathogenese des Diabetes mellitus machen zu können.

Desweiteren besteht die Möglichkeit aufgrund der strukturellen Verwandtschaft von ALX mit Harnsäure, dass es im Organismus bei Störungen des Pyrimidin- oder Purinstoffwechsels in relevanten Konzentrationen gebildet wird und so - zumindest eine Triggerfunktion - in der Entstehung des Diabetes mellitus übernimmt. Diese Hypothese wird unterstützt durch zahlreiche Berichte über das Vorkommen von ALX und seinen Derivaten. Schon LIEBIG (1862) konnte ALX im Schleim eines Patienten mit Darmkatarrh nachweisen, ebenso wie LANG (1867) im Urin eines Herzpatienten (COOPERSTEIN und WATKINS 1981). SELIGSON et al. (1951) berichteten über das Vorkommen von Alloxansäure im Urin von sowohl gesunden als auch diabeteskranken Menschen. In einer neueren Studie über frisch manifest an Typ-1-Diabetes erkrankten Kindern konnte gezeigt werden, dass die ALX-Konzentrationen im Blut dieser Patienten signifikant höher waren als die von nicht erkrankten Kindern entsprechenden Alters (MROZIKIEWICZ et al. 1994).

Hier muß jedoch erwähnt werden, dass die Messung von ALX und seinen Derivaten im humanen Material einige methodische Schwierigkeiten in sich birgt, so dass diese Ergebnisse nicht zwingend beweisend für das natürliche Vorkommen von ALX sind. Angezeigt ist die Bestätigung durch eine weitere Untersuchung einer anderen Arbeitsgruppe. Die Fülle an neuen Erkenntnissen über Physiologie und Pathophysiologie der β -Zelle durch die Verwendung des ALX-induzierten Diabetesmodell rechtfertigen jedoch eingehende weitere Untersuchungen, die der Aufklärung der Ätiologie und Pathogenese des Diabetes mellitus dienen.

2.5 Fragestellungen

Der dem ALX-induzierten Diabetes zugrunde liegende pathogenetische Mechanismus ist trotz intensiver Forschungen noch nicht vollständig geklärt. Im Gegenteil, die Komplexität der ALX-Wirkungen wirft immer neue Fragen auf. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von ALX auf molekulare Strukturen der β -Zelle zu untersuchen, um im Vergleich mit Befunden anderer Diabetogene, wie z.B. dem

STZ, mögliche gemeinsame pathogenetische Mechanismen ableiten zu können. Wie unter 2.2 dargestellt, sind der GLUT2, die Glucokinase und das Proinsulin essentielle Moleküle für die physiologische Funktion der β -Zelle. In in vivo und ex vivo Untersuchungen sollen daher sowohl Kurzzeit- als auch Langzeiteffekte von ALX auf diese Strukturen analysiert werden.

Bezugnehmend auf die unter 2.3.4 und 2.3.5 dargestellten Befunde und Hypothesen zum Wirkmechanismus von ALX, sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

in vivo:

- Kann ein ALX-induzierter Diabetes in den zwei Mausstämmen C57BL/6 und 129S3 durch Vorbehandlung mit den Glucoseanaloga D-G und 5-T-G verhindert werden?
- Welchen Einfluss hat die Behandlung der Mäuse mit Zink (Zn^{2+})-angereichertem Trinkwasser auf die Entwicklung eines ALX-Diabetes?
- Sind Langzeiteffekte an der Funktion der β -Zelle nach einmaliger Behandlung mit ALX im oralen Glucosetoleranz-Test feststellbar?

ex vivo:

- Welchen Effekt zeigt die ALX-Behandlung auf die mRNA-Expression von GLUT2, Glucokinase und Proinsulin und inwieweit hat die Vorbehandlung mit D-G einen Einfluss auf diesen Effekt?
- Welchen Einfluss hat die ALX-Behandlung auf den Gesamtinsulingehalt im Pankreas?
- Gibt es immunhistochemisch Unterschiede in den verschiedenen behandelten Mäusen ?

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Mäuse

Zum einem wurden 5-6 Wochen alte, männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6JOLaHsd von der Firma Harlan Winkelmann (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland) und zum anderen Mäuse des Inzuchtstammes 129S3/SVIMJ von den Jackson Laboratories (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Für die in vivo und ex vivo Untersuchungen wurden die Tiere im Alter von 7-8 Wochen eingesetzt. Während der gesamten Zeit wurden die Versuchstiere in Macrolon-Käfigen (Größe N3) zu maximal 5 Tieren unter Standardbedingungen (20°C, 70% Luftfeuchte, max. 0,2 m/sec) gehalten. Sie erhielten ein Alleinfuttermittel (sniff-M-Mäusediät, Versuchstier-Diäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum. Alle Tierversuche waren von der Tierschutzkommission der Bezirksregierung Düsseldorf, Nordrhein-Westfalen, genehmigt (Genehmigung zur Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken vom 26.03.1998; Aktenzeichen: 23.05-230-3-4/98; Anzahl der genehmigten Mäuse: 940).

3.1.2 Organentnahme

Nach schmerzloser Tötung der Mäuse wurden die pankreatischen Inseln für molekularbiologische Untersuchungen isoliert bzw. die Pankreata für die immunhistochemischen Färbungen sowie die Bestimmung des Insulingehalts entnommen.

3.2 Material

3.2.1 Reagenzien

Substanz	Lieferant
Agarose	Roche Diagnostics (Mannheim)
Alloxan	Sigma (Deisenhofen)
Antikörper	DAKO Diagnostica (Hamburg)
Primärantikörper Insulin (gegen Schwein v. Meerschweinchen)	
Sekundärantikörper (Ig gegen Meerschweinchen IgG)	
Antikörperverdünnungsmedium S3022	DAKO Diagnostika (Hamburg)
Benzylpenicillin/Streptomycin	Gibco (Eggenstein)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Chloralhydrat	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
D-Glucose (α -Anomer: 97%)	Sigma (Deisenhofen)
Diaminobenzidin (DAB)-Tabletten	DAKO Diagnostika (Hamburg)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (Deisenhofen)
Dithiothreitol	Gibco (Eggenstein)
dNTP	Amersham Buchler (Braunschweig)
Eisessig	Sigma (Deisenhofen)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	ICN Biochemicals GmbH (Eschwege)
Ethylendiaminetetraacetat	Sigma (Deisenhofen)
Euparal-Einschlußmittel	Chroma-Gesellschaft (Köngen)
Euparal-Essenz	Chroma-Gesellschaft (Köngen)
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG (Berlin)
Hämatoxylin	Merck (Darmstadt)
Hämolyse-reagenz (Digitonin)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 10x	Gibco (Eggenstein)

Insulin RIA 100	Pharmacia & Upjohn (Freiburg)
Isopropylalkohol	Merck (Darmstadt)
Kalium-Aluminium-Sulfat (Kalialaun)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kollagenase Typ V (1,6 U/mg)	Sigma (Deisenhofen)
Lymphocytentrennmedium	Biochrom KG (Berlin)
Methylbenzoat	Merck (Darmstadt)
Mineralöl	ICN Biochemicals GmbH (Eschwege)
M-MLV Reverse Transcriptase	Gibco (Eggenstein)
Molekulargewichtsmarker Typ VI	Roche Diagnostics (Mannheim)
N-(2-hydroxyethyl)-Piperazin-N'- 2-ethan-sulfonsäure (Hepes)	Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
Natriumchloridlösung (NaCl) 0,9%	Braun (Melsungen)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt)
Natriumjodat	Merck (Darmstadt)
Oligo d(T) ₁₆	Pharmacia & Upjohn (Freiburg)
Oligonucleotidprimer	MWG-Biotech GmbH (Ebersberg)
Paraffin, weich, schüttfähig, 51-53°C	Merck (Darmstadt)
Paraffin, hart, schüttfähig, 56-58°C	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (PBS) 10x	Gibco (Eggenstein)
Phosphat-gepufferte NaCl-TS	DAKO Diagnostika (Hamburg)
Phosphorsäure 85%	Merck (Darmstadt)
Pikrinsäure	Merck (Darmstadt)
Rnasin Ribonucleaseinhibitor	Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
RPMI 1640 Pulver ohne D-Glucose	Gibco (Eggenstein)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Sucrose	Sigma (Deisenhofen)
Taq Polymerase	Roche Diagnostics (Mannheim)
5-Thio-D-Glucose (5-T-G)	Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Serva Feinbiochemica (Heidelberg)
TrisCl	ICN Biochemicals GmbH (Eschwege)

TRIZOL™ Reagenz	Gibco (Eggenstein)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30 %)	Merck (Darmstadt)
Xylol	Merck (Darmstadt)
Zinksulfat	Merck (Darmstadt)
Zitronensäure	Merck (Darmstadt)

Alle angegebenen Firmen sind in Deutschland niedergelassen.

3.2.2 Zellkulturmedien und Gebrauchslösungen

Agarose-Gel (1,5 %) (Elektrophorese) *	600 mg Agarose 40 ml TAE-Puffer (0,5 x) 1 µl Ethidiumbromid
Alloxan-Lösung (iv-Injektionslösung)	5 mg Alloxan 1 ml NaCl-Lösung (0,9 %)
Beladepuffer (Elektrophorese) *	Bromphenolblau (0,25 %) Sucrose (40 %) <i>aufbewahren bei 4° C</i>
Bouin´sche Lösung (Fixierungslösung für Paraffinschnitte)*	450 ml gesättigte Pikrinsäure (18 g/1l) 30 ml Eisessig 150 ml Paraformaldehyd (8%) <i>unmittelbar vor Gebrauch frisch ansetzen</i>
DEPC Wasser (0,1 %) + (PCR) *	10 ml DEPC 1000 ml aqua bidest. <i>über Nacht unter dem Abzug rühren lassen, autoklavieren</i>

D-Glucose-Lösung (20%) (oGTT) *	2 g D-Glucose 10 ml NaCl (0,9 %)	
Diaminobenzidin (DAB) (Immunhistochemie)*	1 Tablette in 10 ml PBS-Puffer <i>aauflösen</i> Aliquots á 1 ml DAB <i>bei -20°C lagern</i>	
Ethanol-Lösung (saure) (Insulinbestimmung)*	40 ml H ₃ PO ₄ (1 mmol/l) 380 ml Ethanol 96 % 20 ml aqua bidest.	
Hämolyse-Lösung (Blutzuckermessung)*	Digitonin 0,04 mmol/l Maleinamid > 1.0 mmol/l <i>1 Tablette in 500 ml aqua bidest. lösen</i>	
HBSS-Medium ⁺ (Inselisolierung) *	100 ml HBSS (10 x) 50 ml FCS (inaktiviert, 5 %) 2,4 g Hepes (10 mmol/l) ad 1000 ml aqua bidest.	<i>pH</i>
<i>7,2 –7,4 einstellen</i>		
Kollagenase-Lösung ⁺ (Pankreasdigestion) *	2 mg Kollagenase V 1 ml HBSS-Medium	
Mayers´Hämalaun aus Hämatoxylin (Immunhistochemie) *	1 g Hämatoxylin 200 mg Natriumjodat 50 g Kalialaun 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure ad 1000 ml aqua bidest.	
PBS-Puffer ⁺ (Wasch- und Zentrifugationspuffer) *	50 ml PBS (10 x) 450 ml aqua bidest.	

RPMI 1640-Medium ⁺	8,4 g RPMI 1640 Pulver (+ L-Glutamin; - D-Glucose) 100 ml FCS (inaktiviert, 10 %) 2 g NaHCO ₃ 1,01 g D-Glucose (5,6 mmol/l) 10 ml Benzylpenicillin/Streptomycin (1000 U/ml / 0,1 mg/ml) ad 1000 ml aqua bidest. <i>pH 7,2 –7,4 einstellen</i>
TAE-Puffer (50 x) ⁺ (PCR) *	<i>Stocklösung:</i> 242 g Trisbase 57,1 ml Eisessig 100 ml EDTA (0,5 mol/l; pH 8,0) <i>Gebrauchslösung (0,5 x):</i> 0,04 mol/l Trisacetat 0,001 mol/l EDTA
TE-Puffer ⁺ (PCR) *	Tris-Cl (10 mmol/l; pH 7.6) EDTA (1 mmol/l; pH 8,0)
Zn ²⁺ -angereichertes Trinkwasser	4,5 g ZnSO ₄ 1000 ml Trinkwasser (25 mmol/l)

* = hauptsächlichlicher Verwendungszweck

+ = Lösungen/Kulturmedien wurden vor Gebrauch mit Millipore-Filtern sterilfiltriert

3.2.3 Geräte

Gerät	Lieferant/Hersteller
Autoklav Typ 23	Melag (Berlin, Deutschland)
Blutzuckermeßgerät	Eppendorf EPOS Analyzer 5060 (Hamburg, Deutschland)
Brutschrank mit CO ₂ -Begasung	Heraeus Typ B5060 EK/ CO ₂ (Osterode, Deutschland)
Binokular-Mikroskop	Wild M8 (Leica, Heerbrugg, Schweiz)
Computerprogramme	Microsoft Word, Corel-Word-Presentation, Graphpad Prism, Oligo, Clone
Cryostat Frigocut Modell 2700	Reichert Jung (Cambridge Instruments GmbH Nussloch, Deutschland)
Deckgläser 24 x 50 mm	Menzelgläser (Deutschland)
Densitometer (Omni Media Scanning)	Millipore (Ann Arbor, MI, USA)
Elektronische Analysenwaage	Sartorius Typ 2024 MP6 (Göttingen, Deutschland)
Elektrophoresekammer	Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)
Elektrophorese-Stromversorger	Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)
Fuji Bio-imaging Analyzer BAS 1000	Fuji Photo Film GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Kühlschränke	Bosch (Stuttgart, Deutschland)
Kühlzentrifuge	Beckmann GS-6KR Zentrifuge (München, Deutschland)
LUMI-ANALYST (Version 3.0 for windows)	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
Magnetrührer	Ikamag RH; IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Mikrowellenofen	Siemens (München, Deutschland)
Millipore Schlauchpumpe	Millipore (Eschborn, Deutschland)

Multipette 4780	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Objektträger 76 x26 mm	Menzelgläser (Deutschland)
pH-Meter	Knick-Klees (Düsseldorf, Deutschland)
Photokamerasystem	Polaroid (Offenbach, Deutschland)
Photomikroskop Axiophot	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Präparierbesteck	Medicon (Freiburg, Deutschland)
Schlittenmicrotom HN 40	Reichert-Jung (Nussloch, Deutschland)
Spectrophotometer	Beckmann DU70; INV 3146 (München, Deutschland)
Sterile Werkbank	Heraeus Lamin Air Modell HLB 2472 (Osterode, Deutschland)
Thermocycler TRIO Thermoblock	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermostat	Eppendorf INV 2906 (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifugen	Heraeus Biofuge A (Osterode, Deutschland) Eppendorf Centrifuge 5415 C (Hamburg, Eppendorf)
Ultraschallstab	Bandelin electronics Sonopuls HD 60 (Berlin, Deutschland)
UV-Transluminator	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Vortex	Laborbedarf Behr (Düsseldorf, Deutschland)
Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
γ -Counter	Packard Auto-Gamma 5780; INV 2700 (Frankfurt/Main, Deutschland)
Zentrifuge (Kontron TGA 6)	Kontron Instruments (Neufahrn, Deutschland)

3.2.4 Verbrauchsmaterial

Material	Lieferant
Combitips (2,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einmal-Insulin-Spritzen U40	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Einmal-Kapillarpipetten (20 µl)	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Einmal-Küvetten (12,5 x 12,5 x 45 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Einmal-Pipetten (5 ml; 10 ml)	Oehmen (Düsseldorf, Deutschland)
Einmal-Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einmal-Reagiergefäße (1,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Einmal-Spritzen (2 ml; 5 ml; 10 ml)	Amefa (Kriftel, Deutschland)
Einmal-Tuberkulin-Spritzen (1 ml)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Falcon Zentrifugenröhrchen (15 ml; konisch; steril)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Falcon Gewebekulturschale (sterile Petrischale)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Kanülen (30 G x 1,2; steril)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Kodak 400 ASA Farbfilm	Kodak
Kodak 320 ASA Diafilm	Kodak
Kristallpipettenspitzen	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Millex-GS Einweg Filtereinheit (0,22 µm)	Millipore GmbH (Eschborn, Deutschland)
Polaroid Instant Film Typ 665	Polaroid Cooperation (Cambridge, MA, USA)
Sterivex-GS Filtereinheit (0,22 µm)	Millipore GmbH (Eschborn, Deutschland)
Ultra-Tubes (0,65 ml)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.3 Methoden

3.3.1 Induktion eines Diabetes mellitus - Behandlung der Mäuse

Eine Versuchstiergruppe bestand i.d.R. aus 10 C57Bl/6- oder 129S3/SVIMJ-Mäusen. Jeder Versuchsabschnitt wurde zweimal wiederholt. Im Alter von 8 Wochen erhielten die Mäuse ohne vorheriges Fasten (nüchterne Versuchstiere reagieren sensibler auf Alloxan) zur Induktion eines Diabetes mellitus eine einmalige intravenöse (iv) Injektion von ALX. Es handelte sich dabei um ALX-Konzentrationen zwischen 30 bis 80 mg/kg KG, um zunächst jeweils eine subtoxische Dosis für die verwendeten Mausstämmen zu bestimmen. Das ALX wurde in 4°C kalter, physiologischer Kochsalzlösung unmittelbar vor der Injektion gelöst und innerhalb von 5 min injiziert. Der Tag der Injektion wurde als Tag 0 bezeichnet. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Mäuse. Zur Individualisierung wurde jede Maus am Ohr markiert.

3.3.2 Kontrolle des Versuchsverlaufs

Jedes Versuchstier wurde unmittelbar vor der ALX-Injektion sowie vor jeder Blutentnahme gewogen. Die Blutentnahme zur Bestimmung der Blutglucosekonzentration erfolgte zweimalig im Abstand von je einer Woche vor der ALX-Injektion, zu den Zeitpunkten 6, 24, 30, 48 und 72 Stunden (h) unmittelbar nach der Injektion und dann im weiteren Verlauf des Versuchs einmal wöchentlich. Sechs Wochen nach dem Zeitpunkt 0 wurden die Abstände der Blutentnahme auf 2 Wochen vergrößert. Dazu wurden jedem Versuchstier 20 µl Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus mittels einer Einmal-Kapillarpipette morgens zwischen 9.00 und 12.00 Uhr entnommen. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren die Mäuse nicht nüchtern. In einem EPOS 5060 Autoanalysator wurde die Blutglucosekonzentration enzymatisch über die Reaktion der Hexokinase bestimmt.

Die Normalwerte für C57Bl/6-Mäuse schwankten im Mittel um 7,5 mmol/l, die der 129S3-Mäuse um 5,5 mmol/l. Diejenigen Versuchstiere, die über einen Zeitraum von mindestens 3 aufeinanderfolgenden Wochen einen Blutglucosewert von >11,1

mmol/l (=200 mg/dl) aufwiesen, wurden als persistierend hyperglykämisch und damit als diabetisch diagnostiziert.

3.3.3 Effekt der Vorbehandlung mit Glucose-Analoga

Wie schon von SCHEYNIUS und TÄLJEDAL (1971), BOQUIST et al. (1983) und anderen beschrieben, schützt in vivo eine Vorbehandlung mit hohen Konzentrationen D-G vor einem ALX-induzierten Diabetes. Ebenso konnte in unserer Arbeitsgruppe (GAI 2000) in vitro ein protektiver Effekt der Vorbehandlung mit D-G und ein partieller Schutzeffekt von 5-T-G auf die mRNA des GLUT2 und der Glucokinase gezeigt werden. Um den Effekt von geringen Konzentrationen D-G auf den mit 50 mg ALX/kg KG induzierten Diabetes zu untersuchen, erhielten die Tiere 10-15 Sekunden vor der Injektion eine einmalige iv Injektion von 50, 250, 500 oder 1000 mg D-G/kg KG. Auf die gleiche Weise wurde der Effekt von 50 mg 5-T-G/kg KG iv untersucht, während die Kontrollgruppen ohne Vorbehandlung blieben. Wie unter 3.3.2 beschrieben, wurden auch hier die Körpergewichte, Blutglucosekonzentrationen und Anzahl der diabetischen Mäuse bestimmt.

3.3.4 Effekt der Behandlung mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser

Die Behandlung mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser (25 mmol/l) zeigte im MLD-STZ-Modell (OHLY et al. 1998) eine protektive Wirkung in Bezug auf die Entwicklung eines Diabetes. Um den Effekt von mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser im ALX-induzierten Diabetes zu untersuchen, erhielten die Mäuse analog dem von OHLY et al. (1998) beschriebenen Protokoll eine Woche vor Injektion von 50 mg ALX/kg KG und über die gesamte Versuchsdauer hinweg das mit Zn²⁺-angereicherte Trinkwasser ad libitum. Eine entsprechend behandelte Kontrollgruppe erhielt normales Trinkwasser. Die Körpergewichte und Blutglucosekonzentrationen wurden, wie unter 3.3.2 beschrieben bestimmt, und die Anzahl der persistierend hyperglykämischen Mäuse protokolliert.

3.3.5 Bestimmung der β -Zellfunktion in vivo

Die Bestimmung der β -Zellfunktion in vivo erfolgte mittels des oralen Glucose-toleranztests (oGTT). Bei allen beschriebenen Versuchstiergruppen (s.3.3.1–3.3.4) einschließlich der Kontrollgruppen wurde zu den Zeitpunkten 6, 12 und 18 Wochen nach Tag 0 die oGT bestimmt. Dazu erhielt jede Maus nach einer Fastenzeit von 16 h mittels einer Schlundsonde 2 g D-G/kg KG in NaCl (0,9%) gelöst. Unmittelbar vor (0 min) sowie 15, 30 und 60 min nach der Glucose-Belastung wurde den Mäusen Blut zur Bestimmung der Blutglucosekonzentration (s.3.3.2) entnommen.

3.3.6 Isolierung pankreatischer Inseln

Die Isolierung pankreatischer Inseln erfolgte nach der von GOTOH et al. (1985) beschriebenen Methode mit Modifikationen nach ZIMNY et al. (1993). Die Mäuse wurden durch cervikale Dislokation getötet, die Bauchhöhle entlang der Medianen eröffnet und der Ductus choledochus zwischen Gallenblase und Duodenum freipräpariert. Die Papilla duodeni major wurde mit einer Bulldog-Klemme abgeklemmt, so dass unter einem Stereomikroskop 2 ml einer frisch angesetzten, 4°C kalten Kollagenase-Lösung in den Ductus choledochus und somit retrograd über den Ductus pancreaticus in das Pankreas injiziert werden konnte. Das so aufgeblähte Pankreas wurde vorsichtig von Milz, Magen, Darm und Fettgewebe freipräpariert und in einer Petrischale bei 37°C und unter 5,5 % CO₂-Atmosphäre für 20 min inkubiert, um den Anteil des exokrinen Pankreas zu verdauen. Die Digestion wurde anschließend durch die Zugabe von 10 ml einer eiskalten HBSS-Lösung unterbrochen, das angedaute Gewebe in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) übertragen und mechanisch durch kurzes Schütteln zerkleinert. Durch Zentrifugation bei 320 g für 10-15 sek bei 4°C in der Beckmann GS-6KR Kühlzentrifuge erfolgte die Abtrennung des Überstandes mit exokrinem Gewebeanteil von dem im Sediment angereicherten pankreatischen Inseln. Das Sediment wurde mit 10 ml HBSS-Lösung resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Nach diesem Waschprozeß wurde das Sediment in 10 ml RPMI-Lösung aufgenommen und zu gleichen Volumina

vorsichtig auf 10 mit je 5 ml Ficoll-Lymphocytentrennmedium der Dichte von 1,077 g/l aufgeschichtet. Durch die anschließende ungebremste Zentrifugation für 15 min bei 800 g und 4°C sammelten sich die Inseln in der Trennschicht zwischen RPMI-Medium und Ficoll. Die Trennschicht wurde mittels einer Pipette vorsichtig abgenommen und in eine Petrischale überführt. Sodann wurden die Inseln einzeln mit einer Pipette in eine Petrischale mit RPMI-Kulturmedium übertragen und nochmals verlesen, um eine weitgehende Befreiung vom exokrinen Anteil zu erreichen. Bei dieser Prozedur wurde die Anzahl der Inseln pro Versuchsansatz bestimmt. Abschließend wurden alle Inseln in ein Eppendorfgesäß gesammelt und nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS bei -80°C für die RNA-Isolierung eingefroren.

Für die Analyse der mRNA-Expression des GLUT2, der Glucokinase, von Proinsulin und des Haushaltgens β -Aktin wurden die pankreatischen Inseln von jeweils 10 Mäusen pro Versuchsansatz isoliert.

3.3.7 Behandlung der Mäuse für die Analyse der mRNA-Expression von GLUT2, Glucokinase und Proinsulin

Gruppen von jeweils 10 Mäusen im Alter von 8 Wochen wurden einmalig iv mit 50 mg ALX/kg KG behandelt, zu den Zeitpunkten 5 min, 15 min, 30 min, 1h und 3h nach Injektion getötet, die Inseln nach der unter 3.3.6 beschriebenen Methode isoliert und für die RNA-Isolierung eingefroren. Als Kontrollgruppen dienten Mäuse gleichen Alters, die jedoch unbehandelt blieben.

3.3.8 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Diese sehr sensitive Methode dient der Analyse der mRNA-Expression von definierten Zielgenen, wie in diesem Fall von GLUT2, Glucokinase und Proinsulin. Sie beinhaltet eine Kombination aus reverser Transkription (RT) der mRNA in eine

komplementäre DNA (cDNA) mittels des Enzyms reverser Transkriptase und der sich anschließenden Polymerasekettenreaktion (PCR), bei der diese cDNA als Template dient.

Nach der Entdeckung des hitzestabilen Enzyms Taq-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Temperaturoptimum über 70°C) stand der Entwicklung der PCR durch MULLIS 1985 als einer enzymatischen DNA-Vervielfältigungsmethode in vitro nichts mehr im Wege. Die Taq-DNA-Polymerase verlängert die spezifischen Primer-Paare (Oligonucleotide) entlang der einsträngigen DNA-Matrize. Die gebildeten Nucleinsäureketten sind somit definierter Länge und Sequenz, lagern sich zu einer doppelsträngigen DNA zusammen, die anschließend wieder durch periodische Temperaturwechsel des Thermocyclers hitzedenaturiert wird, so dass sich die Primer erneut an die einsträngige Matrize anlagern und der Prozeß von neuem beginnt. Jeder Reaktionszyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Kettenverlängerung bewirkt eine Verdopplung der gewünschten DNA-Sequenz, so dass sich diese in einer exponentiellen Reaktion bis auf das 10^6 - 10^7 -fache anreichert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung als spezifische Bande mit definierter Anzahl an Basenpaaren (bp) sichtbar gemacht werden kann.

3.3.8.1 Isolierung von RNA aus pankreatischen Inseln

Die für die RNA-Isolierung benötigten Inseln wurden aus Mäusen nach dem Behandlungsschema (s.3.3.7) isoliert (s.3.3.6) und bei -80°C gelagert.

Die Isolierung der RNA aus Inseln erfolgte nach der von CHOMCZYNSKI und SACCI (1987) beschriebenen Methode. Die tiefgefrorenen Inseln wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 1 ml TRIzol versetzt. Diese monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat dient zur Homogenisierung von Gewebe ohne die RNA-Integrität zu zerstören. Mittels einer Einmal-Insulinspritze (40 U/ml) wurde das TRIzol mit Inselgewebe 3-4 mal aufgezogen, das Homogenat mit 200 µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4°C erfolgt die Auftrennung der dissoziierten Nucleo-Protein-Komplexe. Am Boden des Reagiergefäßes befindet sich die organische, rötlich-gefärbte Phenol-Chloroform-

Phase mit gelöster DNA, darüber die weißliche Interphase (Proteine) und im oberen Teil der farblose, wässrige RNA-enhaltene Überstand. Dieser wurde vorsichtig abgenommen und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropylalkohol, kräftigem Durchmischen und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Das RNA-Präzipitat wurde nach der anschließenden Zentrifugation für 10 min (12.000 g und 4°C) als gelförmiges Sediment sichtbar. Der Überstand wurde verworfen, das Präzipitat in 1 ml absolutem Ethanol aufgenommen, die Probe kräftig durchmischt und erneut für 5 min bei 9.500 g und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes folgte ein weiterer Waschvorgang mit 1 ml 75%igem Ethanol, kräftiger Durchmischung und Zentrifugation (5 min, 9.500 g, 4°C), um möglichst alle überflüssigen organischen Anteile und Salze zu entfernen. Abschließend wurde das Sediment bei 56°C für 5 bis 10 min getrocknet und in 10 µl TE-Puffer resuspendiert.

3.3.8.2 Spektrophotometrische Bestimmung der RNA

Durch spektrophotometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm wurde die Menge der isolierten und resuspendierten RNA bestimmt. Dazu wurden 2 µl der RNA-Suspension in 198 µl TE-Puffer (1:100) verdünnt und die OD nach Kalibrierung mit 200 µl TE-Puffer gemessen. Eine OD von 1 entspricht 40 µg/ml einzelsträngiger RNA; somit konnte auf die RNA-Konzentration in der Probe zurückgerechnet werden. Die Reinheit der RNA wurde durch das Verhältnis der Werte bei OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ berechnet. Optimale Werte werden durch ein Verhältnis zwischen >1,8 und ≤2,0 wiedergegeben. Für die Synthese der cDNA wurden Aliquots zu je 1 µg RNA in 4 µl DEPC-Wasser angesetzt und bei -80°C tiefgefroren.

3.3.8.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Von der isolierten RNA, einem Gemisch aus mRNA, tRNA, rRNA u.a., dient die mRNA als Matrize für die enzymatische Synthese der doppelsträngigen DNA durch die reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die Desoxyribonucleosid-Triphosphate komplementär zum RNA-Strang verbindet. Als Startersequenz für die reverse Transkriptase wird ein kurzer, doppelsträngiger

Nucleinsäurebereich benötigt, der durch die Anlagerung von Oligonucleotiden (Oligo (dT)) an den sogenannten Poly-(A)-Schwanz der mRNA entsteht.

Im ersten Schritt der cDNA-Synthese wurde zu 1 µg Gesamt-RNA (in 4 µl DEPC-Wasser) 1 µl Oligo (dT)₁₆ und 5 µl DEPC-Wasser zugegeben, gemischt und für 5 min bei 60°C im Thermocycler inkubiert.

Ein Reaktionsgemisch aus	0,5 µl RNAsin (20U)
	8,0 µl 5 x First Strand Puffer
	4,0 µl DTT (0,1 mol/l)
	4,0 µl dNTP (10 mmol/l)
	1,0 µl RTase (200 U/µl)
	12,5 µl DEPC-Wasser

wurde dem Reaktionsansatz aus RNA und Oligo (dT)₁₆ zupipettiert und nach guter Durchmischung für 1 h bei 37°C und weiteren 10 min bei 72°C inkubiert. Die neu synthetisierte cDNA wurde für die PCR der Zielgene eingesetzt, der verbleibende Rest bei -80°C aufbewahrt.

Negativkontrollen, bei denen die zur Umschreibung der mRNA in cDNA notwendige reverse Transkriptase dem Reaktionsgemisch nicht zugefügt wurde, blieben in der densitometrischen Analyse ohne erkennbare Banden, d.h. die verwendeten Proben waren nicht mit genomischer DNA kontaminiert.

3.3.8.4 PCR

Die PCR der Zielgene GLUT2, Glucokinase und Proinsulin wurde, wie von Watson und Demmer (1995) beschrieben, mit den in Tabelle 1 aufgelisteten Primer-Paaren durchgeführt, wobei als interne Kontrolle das Haushaltsgen β-Aktin (Alonso et al., 1986) ebenfalls amplifiziert wurde.

Tabelle 1: Primer-Paare für GLUT2, Glucokinase, Proinsulin und β -Aktin sowie ihre spezifischen PCR-Bedingungen

mRNA	Primersequenz (5'-/3'-Primer)	Produkt- länge (bp)	Hybridisierungs- temperatur (°C)	Zyklus- anzahl
GLUT2	5'-TGGGATGAAGAGGAGACTGAA-3' 3'-GATAAGTTGGTCGTAAAAAGT-5'	752	55	30
Glucokinase	5'-ACTCCACACCCCACAAATG-3' 3'-CGACAAAAGAACGGACACC-5'	404	57	32
Proinsulin	5'-GGCTTCTTCTACACACCCA-3' 3'-ATGGTCGACCTCTTGATGAC-5'	188	55	26
β -Aktin	5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3' 3'-CTTTAGCACGCACTGTAGTTTCTC-5'	540	55	30

Ein Reaktionsgemisch aus

21,5 μ l DEPC-Wasser
 5,0 μ l 10 x Puffer ohne Mg
 3,0 μ l MgCl₂ (25 mmol/l)
 8,0 μ l dNTP (1,25 mmol/l)
 2,5 μ l 5'-Primer (4 μ mol/l)
 2,5 μ l 3'-Primer (4 μ mol/l)
 2,5 μ l Taq-Polymerase (1U/ μ l)

wurde erstellt, gut durchmischt und mit 5 μ l cDNA versetzt. 50 μ l Mineralöl wurden auf das PCR-Gemisch aufgeschichtet um die Verdunstung zu verhindern, bevor das Reaktionsgefäß für die eigentliche Amplifikation in den Thermocycler gestellt wurde. Die cDNA wurde für 4 min bei 94°C denaturiert, anschließend der Reaktionszyklus aus - Denaturierung für 1 min bei 94°C; Primer-Hybridisierung für 1 min bei der

Primer-spezifischen Temperatur und Verlängerungsreaktion für 1 min bei 72°C - entsprechend der Primer-spezifischen Zykluszahl (Tab. 1) - wiederholt. Abschließend wurde das PCR-Gemisch für 10 min bei 72°C inkubiert und die Amplifikate für die gelelektrophoretische Auftrennung vorbereitet.

3.3.8.5 Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate mit der Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (1µg/ml) angesetzt und für eine halbe Stunde getrocknet. Für die Auftrennung der GLUT2- bzw. der Glucokinase-Amplifikate wurden jeweils 7 µl mit 7 µl des β-Aktin-Amplifikats und 3 µl Auftragepuffer gemischt und in die Kammern aufgetragen. Für die Proinsulin-DNA bestand das Gemisch aus 10 µl des Amplifikats mit 3 µl Auftragepuffer. Die erste Kammer wurde mit 1 µl des Molekulargewichtsmarkers (250 µg/ml), den Bereich von 154 bis 2176 Basenpaare (bp) umfassend, 9 µl DEPC-Wasser und 3 µl Auftragepuffer befüllt. In der Elektrophoresekammer befand sich TAE-Puffer (0,5x); die Elektrophorese erfolgte bei 120 V und 50 mA für 30 min. Mittels UV-Licht wurden die PCR-Produktbanden sichtbar gemacht und densitometrisch analysiert.

3.3.8.6 Densitometrische Analyse der RT-PCR-Produkte

Mit Hilfe des Lumi-Analyst TM der Firma Roche Diagnostics wurden die Intensitäten der PCR-Produkt-Banden des Gels bestimmt. Das Verhältnis des Intensitätenintegrals von GLUT2 bzw. Glucokinase zu dem von β-Aktin wurde berechnet, dasjenige von Proinsulin wurde in Prozent zur Kontrolle angegeben.

3.3.9 Behandlung der Mäuse für die Bestimmung des Insulingehalts im Pankreas

Es wurden 3 Mäuse je Gruppe einmalig 50 mg ALX/kg KG iv injiziert, die Tiere 30 min, 3 h und 24 h nach Injektion getötet und die Pankreata zur Bestimmung des Insulingehalts entnommen, gewogen (Feuchtgewicht (FG)) und bei -80°C tiefgefroren. Die unbehandelte Kontrollgruppe bestand ebenfalls aus 3 Versuchstieren. Aufgrund der kleinen Gruppen kann eine statistische Aussage nur eingeschränkt formuliert werden.

3.3.10 Bestimmung des Insulingehalts

Die Extraktion des Insulins der nach 3.3.9 entnommenen Pankreata erfolgte nach der von ZIEGLER et al. (1985) beschriebenen Methode mit leichten Modifikationen. Zu jeder Probe wurde 6 ml saurer Ethanol gegeben, fein gemörsert und zweimal für je 30 sek mittels Ultraschallstab (170 W) homogenisiert. Die Homogenate wurden über Nacht bei 8°C aufbewahrt. Am folgenden Tag wurde eine erneute Gewebedesintegration mittels Ultraschallstab für 30 sek durchgeführt. Die Überstände wurden nach Zentrifugation bei -20°C bis zur abschließenden Messung aufbewahrt.

Die Bestimmung des Insulins erfolgte mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA). Der verwendete Test-Kit - Pharmacia Insulin RIA 100 - ist ein Doppel-Antikörper-RIA. Dabei konkurriert das in der Probe enthaltene Insulin mit einer definierten Menge radioaktiv-markierten ^{125}J -Insulin um die Bindungsstelle eines spezifischen, in Meerschweinchen hergestellten Antikörpers (AK1). Je mehr ^{125}J -Insulin vom AK1 gebunden wird, desto weniger freies Insulin ist in der Probe enthalten und umgekehrt.

Alle AK1-Insulin- und AK1- ^{125}J -Insulin-Komplexe werden durch die Zugabe eines zweiten Antikörpers, einem anti-Meerschweinchen-IgG vom Schaf (AK2), gebunden und aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes in der anschließenden Zentrifugation mit der Kontron TGA Zentrifuge als Sediment abgetrennt. Nach Entfernung des Überstandes wird die Radioaktivität des Sedimentes und damit die Menge an ^{125}J -

Insulin bestimmt. Diese ist der Menge an unmarkiertem Insulin umgekehrt proportional.

Nach der Dreifachbestimmung der im Test-Kit enthaltenen Standards erfolgte die Messung jeder Probe nach Verdünnung (1:50) als Doppelbestimmung. Anhand der elektronisch erstellten Standardkurve wurde die Konzentration des freien Insulins der Proben in der Einheit U/ml abgelesen. Die dimensionslose Einheit U wurde abschließend in µg Insulin pro mg eingesetztes Pankreas (FG) umgerechnet.

Die einzelnen Arbeitsschritte sahen wie folgt aus:

Zu 100 µl der unbekannt Probe als Verdünnung bzw. zu 100 µl der Insulin-Standardlösungen, die 0, 3, 10, 30, 100 oder 240 µU/ml enthielt, wurden 50 µl ¹²⁵J-Insulin gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl des AK1 und nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur die Zugabe von 2 ml AK2 in jedes Teströhrchen. Nach einer weiteren Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurde das Sediment durch Zentrifugation bei 1.500 g für 10 min abgetrennt. Die Überstände wurden abgesaugt und die Radioaktivität des Sedimentes gemessen.

3.3.11 Immunhistochemischer Nachweis von Insulin

Nach schmerzloser Tötung der Mäuse wurden die Pankreata entnommen und in Bouin'scher Lösung für 24 h fixiert. Nach Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, Isopropanol) für jeweils eine ½ h wurden die Gewebe für 24 h in Methylbenzoat fixiert. Anschließend wurden die Pankreata jeweils für 12 h erst in flüssigem weichen (Schmelztemperatur 37-40°C) und dann in harten Paraffin (Schmelztemperatur 43-45°C) eingebettet, aufgeblickt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Unter Verwendung eines Schlittenmicrotoms wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und je 2 Schnitte auf einem Objektträger über Nacht bei 40°C im Trockenschrank fixiert.

Die eigentliche immunhistochemische Färbung des Insulins erfolgte mit der indirekten Peroxidase-Methode, wobei ein unkonjugierter Primärantikörper das Antigen Insulin bindet. Ein zweiter, enzymmarkierter Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, bewirkt, dass nach Zugabe des

Substrates DAB dieses in einen Farbstoff umgesetzt wird. Dieser ist lichtmikroskopisch leicht zu identifizieren und spiegelt somit die Lokalisation des gesuchten Antigens wieder.

Im Einzelnen sahen die Arbeitsschritte wie folgt aus:

Zunächst wurden die Schnitte für 10 min in Xylol und in einer absteigenden Alkoholreihe (abs., 96%, 70%, je 2 h) entparaffiniert, dann mit 50 µl des Primärantikörpers (AK gegen Schweine-Insulin aus dem Meerschweinchen, Verdünnung 1:50) überschichtet und für 2 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Der anschließende Waschvorgang erfolgte zweimal für 5 min in 200 µl PBS-Puffer. Nach Zugabe von 50 µl Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (AK aus dem Kaninchen gegen Meerschweinchen IgG, Verdünnung von 1:50) wurden die Schnitte erneut für 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Die Aktivierung der Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 200 µl des Substrates DAB und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Durch Oxidation des DAB entstand ein rotbraunes Farbprodukt. Die Reaktion wurde durch einen zweimaligen Waschvorgang für je 5 min mit aqua bidest. beendet und überschüssiges Substrat entfernt. Die Gegenfärbung erfolgte für 5 min mit Mayer's Hämalaun, abschließend wurden die Schnitte für 5 min mit Leitungswasser gebläut und mit Euparol eingedeckt.

Als Negativkontrollen galten die Gewebeschnitte, bei denen die Arbeitsschritte ohne die Inkubation mit dem Primärantikörper durchgeführt wurden.

Die Beurteilung der immunhistochemischen Anfärbung erfolgte mittels des Photomikroskop Axiophot, wobei 400-fache Vergrößerungen der Gewebeschnitte photographisch festgehalten wurden.

3.3.12 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurde innerhalb jeder Versuchsgruppe der Mittelwert (\bar{x}) sowie die Standardabweichung von \bar{x} (SEM) berechnet und die statistische Signifikanz mittels des ungepaarten Student's t-Test bestimmt. Das statistische Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 in vivo Befunde

4.1.1 Dosisabhängigkeit der ALX-Toxizität

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen in den Mausstämmen C57BL/6 und 129S3 eine deutliche Dosisabhängigkeit der ALX-Toxizität nach einmaliger iv Injektion (s.3.3.1 und 3.3.2). Anhand dieser Befunde wurde für jeden Mausstamm eine subtoxische ALX-Konzentration bestimmt, bei der $\leq 50\%$ der Mäuse einen Diabetes entwickelten, d.h. über einen Zeitraum von 3 aufeinanderfolgenden Wochen einen Blutglucose-Spiegel von >200 mg/dl ($=11,1$ mmol/l) aufwiesen. Die mittleren Blutglucosewerte der einzelnen Versuchstiergruppen wurden gegenüber der unbehandelten bzw. der nur mit ALX behandelten Gruppe als Kontrollen über die Flächen unter den Kurven auf ihre Signifikanz überprüft. Hierfür wurden die Mittelwerte der Blutglucosespiegel der einzelnen Versuchstiergruppen über den gesamten Versuchsverlauf mittels des Student's T-Test auf ihre Signifikanz geprüft.

In den C57BL/6-Mäusen (Abb. 4A) konnte eine subtoxische iv Dosis von 50 mg ALX/kg KG ermittelt werden. Die mittleren Blutglucosespiegel dieser Versuchsgruppe lagen bei $11,8 \pm 0,5$ mmol/l, signifikant ($p < 0,001$) abweichend gegenüber denen der unbehandelten Kontrollgruppe mit $7,2 \pm 0,3$ mmol/l. Aus dieser Gruppe wurden 3 von 10 (30%) Mäusen nach ALX-Injektion diabetisch. Die Mäuse zeigten trotz der Hyperglykämie über den gesamten Versuchsverlauf ein weitgehend ungestörtes Allgemeinbefinden. Von den restlichen 7 Mäusen dieser Behandlungsgruppe blieben 4 (40%) permanent euglykämisch, während 3 Mäuse (30%) vorübergehend Blutglucosewerte zwischen 11,4 und 14,7 mmol/l aufwiesen.

Obwohl in der Behandlungsgruppe mit 60 mg ALX/kg KG iv von 19 Tieren nur 8 einen Diabetes entwickelten (42,1%) - mit mittleren Blutglucosewerten von $15,2 \pm 0,3$ mmol/l ($p < 0,001$) - wurde diese Konzentration als toxisch eingestuft, da im Verlauf des Versuches die Mäuse ein reduziertes Allgemeinbefinden aufwiesen bzw. verstarben. Der Versuch wurde daher in dieser Gruppe nach 8 Wochen beendet.

Von den 16 Versuchstieren, die mit 40 mg ALX/kg KG iv behandelt wurden, zeigten einzelne Mäuse mit Blutglucosewerten von 11,9 bis 13,8 mmol/l eine transiente

Hyperglykämie; die mittleren Blutglucosespiegel blieben jedoch mit $7,7 \pm 0,2$ mmol/l im Bereich der unbehandelten, euglykämischen Kontrollgruppe ($7,2 \pm 0,3$ mmol/l).

Die Abbildung 4B zeigt die mittleren Körpergewichte ($x \pm \text{SEM}$) über den gesamten Versuchsverlauf der in Abbildung 4A dargestellten Versuchstiergruppen. Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe blieben die mit ALX behandelten Mäuse geringgradig in der Entwicklung ihres Körpergewichtes zurück. Dieser Unterschied war aber zu keiner Zeit des Versuchs signifikant.

In den 129S3-Mäusen (Abb. 5A) konnte ebenfalls eine Dosisabhängigkeit der ALX-Toxizität gezeigt werden, jedoch bestanden deutliche Unterschiede im Verlauf der Blutglucosewerte im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen. 48 h nach ALX-Injektion waren 7 von 10 (70%) der mit 50 mg ALX/kg KG iv behandelten Mäuse hyperglykämisch mit mittleren Blutzuckerwerten von $14,7 \pm 1,9$ mmol/l. Nach 3 Wochen sanken diese aber auf einen Mittelwert von $8,4 \pm 1,3$ mmol/l. Die Signifikanz beträgt $p \leq 0,01$ für die Flächen unter den Kurven der ALX-behandelten Gruppe mit mittleren Blutglucosewerten von $9,7 \pm 1,2$ mmol/l gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe mit $5,6 \pm 0,1$ mmol/l. Insgesamt wurden nur 2 Tiere von 10 (20%) diabetisch, die Blutglucosewerte der anderen 8 Mäuse bewegten sich nach der 3. Woche im Bereich der Euglykämie. Um den direkten Vergleich mit den C57BL/6-Mäusen zu gewährleisten, wurde in den weiteren Versuchsansätzen mit diesem Mausstamm ebenfalls mit der subtoxischen Dosis von 50 mg ALX/kg KG iv gearbeitet. In der Gruppe, die 40 mg ALX /kg KG iv erhielten, wurde nur eine Maus von 10 (10%) diabetisch (Blutglucosewerte von 12,0 bis 22,2 mmol/l), 2 Mäuse (20%) zeigten eine vorübergehende Hyperglykämie mit Werten von 11,1 bis 11,9 mmol/l, während die übrigen euglykämisch blieben. Der mittlere Blutglucosewert mit $7,6 \pm 0,4$ mmol/l wich signifikant ($p \leq 0,05$) von dem der unbehandelten Mäuse ($5,6 \pm 0,1$ mmol/l) ab. Die 10 Mäuse, die eine einmalige iv Dosis von 30 mg ALX/kg KG erhielten, blieben über die gesamte Versuchsdauer ohne signifikante Abweichung von den Blutglucosespiegeln der unbehandelten Kontrollgruppe.

Die Körpergewichtsentwicklung, wie sie für die 129S3-Mäuse in Abbildung 5B dargestellt ist, zeigt für die entsprechenden Versuchstiergruppen der Abbildung 5A keinen signifikanten Unterschied zu der unbehandelten Gruppe.

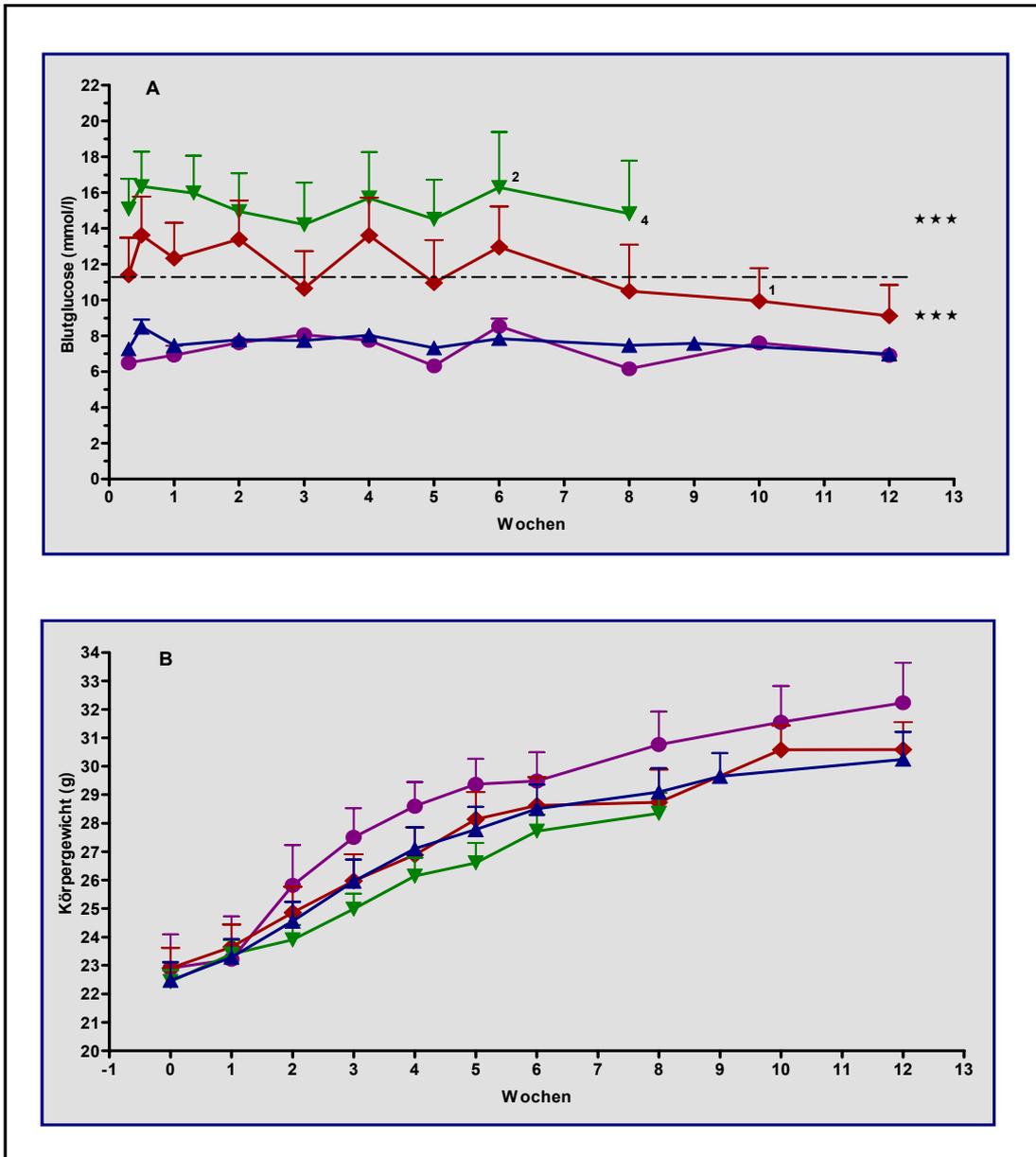
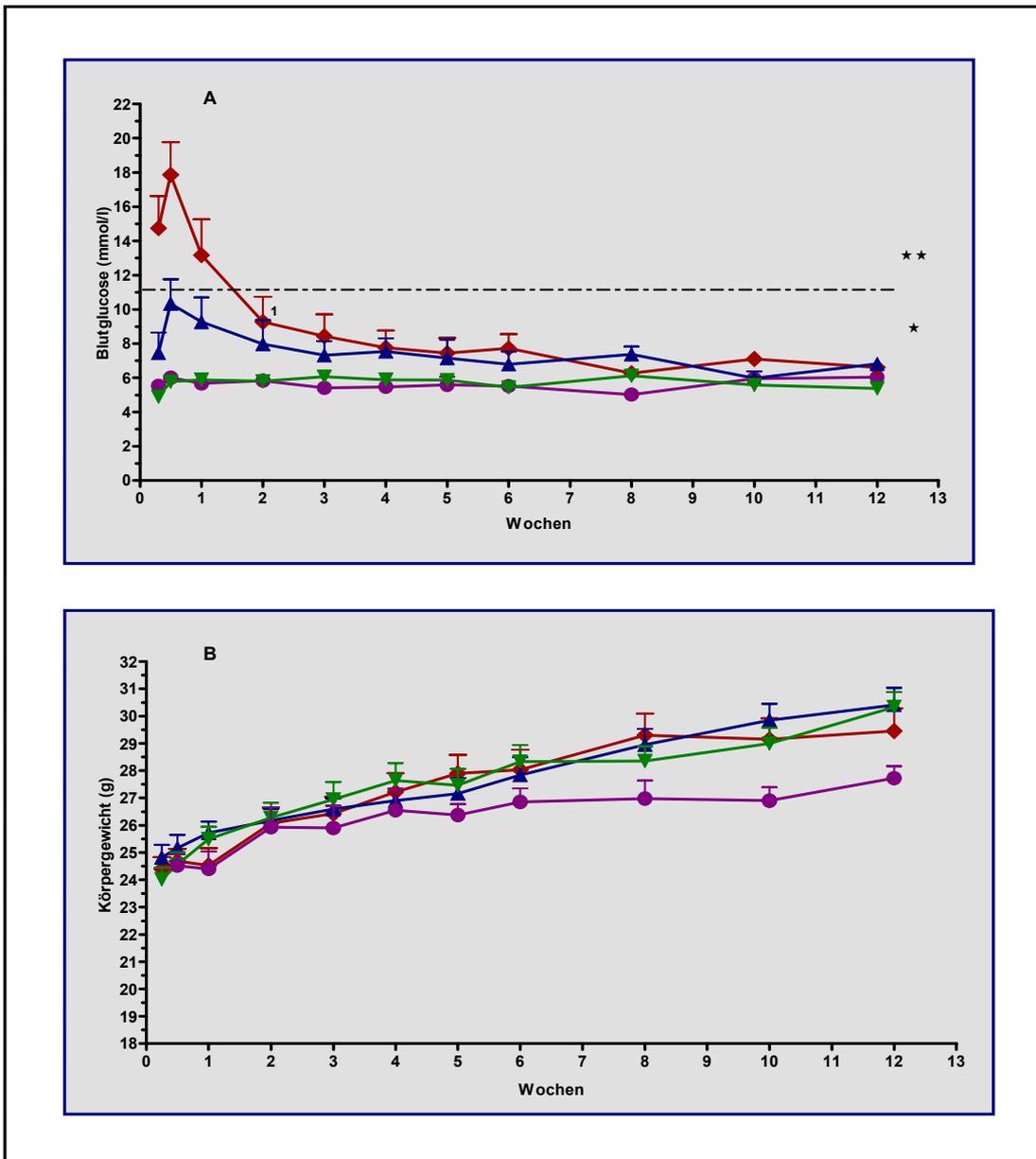


Abbildung 4
Dosisabhängigkeit (A) und Körpergewichtsentwicklung (B) nach einmaliger iv Injektion von ALX in C57BL/6-Mäusen

Blutglucosekonzentrationen ($x \pm \text{SEM}$) und Körpergewichte ($x \pm \text{SEM}$) nach einmaliger iv Injektion von 40 (▲), 50 (◆) und 60 (▼) mg ALX/kg KG. Es wurden je Gruppe 10 Mäuse für die Behandlung eingesetzt. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 6 Mäusen. Die Zahl am Graphen gibt die Anzahl der bis zu dem jeweiligen Zeitpunkt verstorbenen Mäuse je Gruppe an. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanz (***) ($p \leq 0,001$) ist gegenüber der unbehandelten Gruppe berechnet.



4.1.2 Vorbehandlung mit D-G schützte vor einem ALX-induzierten Diabetes

Eine einmalige iv Vorbehandlung mit D-G unmittelbar vor ALX-Injektion (s.3.3.2 und 3.3.3) schützte beide Mausstämme vor einem ALX-induzierten Diabetes (Abb. 6A und 7A).

In den C57BL/6-Mäusen wiesen die mittleren Blutglucosewerte von $11,6 \pm 1,4$ mmol/l ($p < 0,05$) 48 h und $11,2 \pm 0,8$ mmol/l ($p < 0,05$) 3 Wochen nach ALX-Injektion der mit 50 mg D-G/kg KG iv vorbehandelten Mäuse signifikante Unterschiede zu den unbehandelten Kontrolltieren ($6,5 \pm 0,3$ respektive $8,1 \pm 0,3$ mmol/l) auf, jedoch sanken die Blutglucosewerte im weiteren Versuchsverlauf auf Werte im Normbereich. Von den 10 Mäusen dieser Gruppe entwickelte nur eine Maus (10%) einen Diabetes, allerdings konnten in 7 weiteren Mäusen (70%) vorübergehende Blutglucosewerte oberhalb des Grenzwertes von 11,1 mmol/l gemessen werden. Die Blutglucosespiegel schwankten dabei zwischen 11,2 und 19,5 mmol/l zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuchs. Die Signifikanz für die Fläche unter der Kurve beträgt $p < 0,05$ mit mittleren Blutglucosewerten von $9,8 \pm 0,4$ mmol/l gegenüber der unbehandelten Gruppe mit $7,2 \pm 0,2$ mmol/l.

Die Mäuse der ausschliesslich mit 50 mg ALX/kg KG behandelten Gruppe zeigten mit $17,6 \pm 0,6$ mmol/l Blutglucosewerte, die signifikant ($p < 0,001$) über denen der unbehandelten Kontrollgruppe und denen der mit D-G vorbehandelten Mäuse lagen. Von 10 Mäusen entwickelten 6 Tiere einen Diabetes (60%).

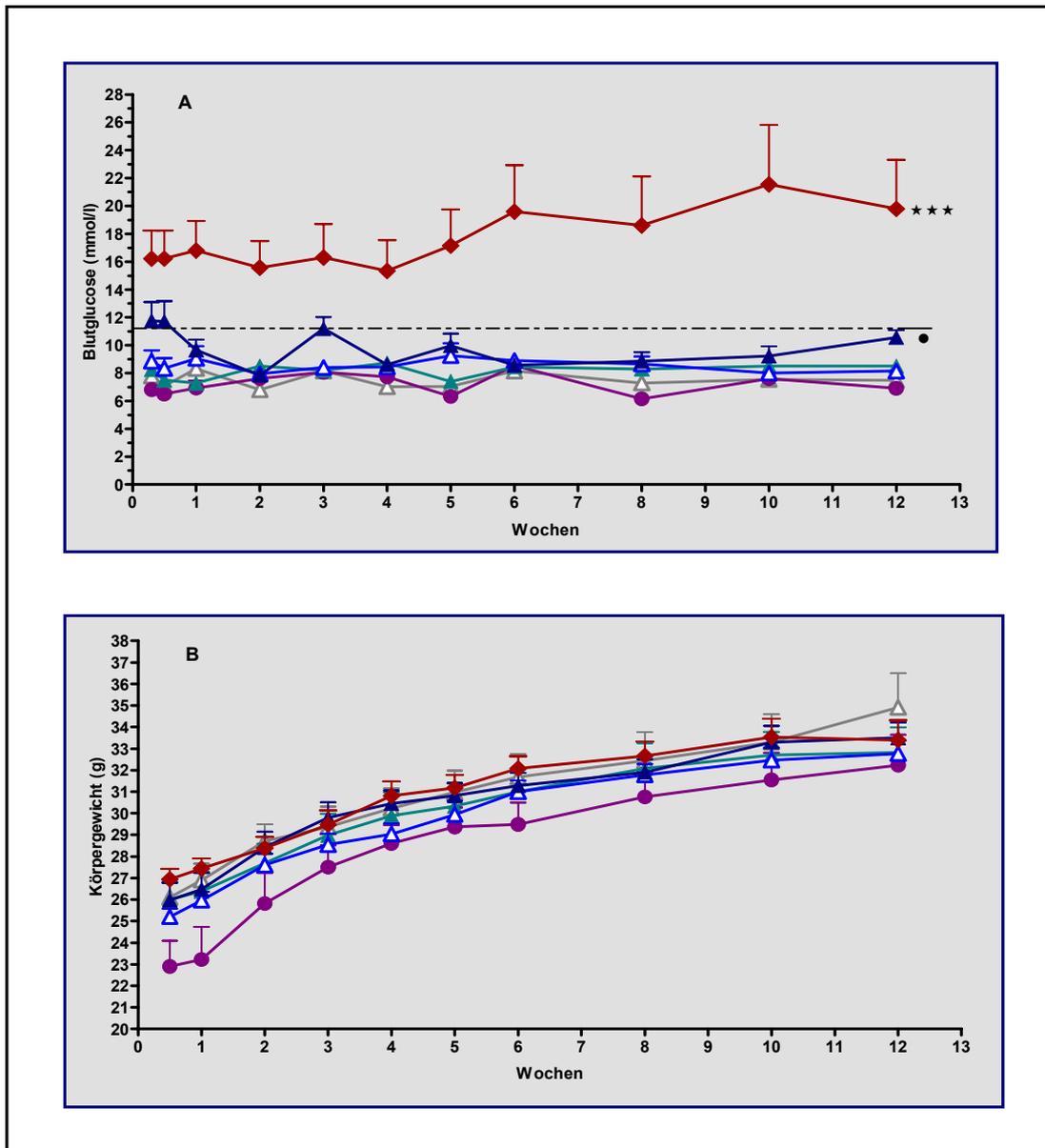
Von den 10 Mäusen, die einmalig mit 250 mg D-G/kg KG iv vorbehandelt wurden, entwickelte kein Tier einen Diabetes - nur eine Maus zeigte vorübergehend hyperglykämische Blutzuckerwerte im Bereich von 11,5 bis 15,7 mmol/l. In den beiden Versuchstiergruppen, die mit hohen Konzentrationen D-G (500 bzw. 1000 mg/kg Kg iv) vorbehandelt wurden, wies von jeweils 10 Tieren pro Gruppe kein Tier zu irgendeinem Zeitpunkt einen hyperglykämischen Blutzuckerspiegel auf.

Die in Abbildung 6B dargestellten Körpergewichte der entsprechenden Versuchstiergruppen der Abbildung 6A zeigten über den gesamten Versuchsverlauf keinen signifikanten Unterschied.

In den 129S3-Mäusen hatte die Vorbehandlung mit der niedrigen Dosis von 50 mg D-G/kg KG iv, wie in Abbildung 7A dargestellt, keinen signifikant protektiven Effekt gegenüber den nur mit 50 mg ALX /kg KG iv behandelten Mäusen. Die mittleren Blutglucosewerte lagen in den vorbehandelten Mäusen bei $11,8 \pm 1,3$ mmol/l im Vergleich mit den nur mit ALX behandelten Mäusen mit $13,8 \pm 1,1$ mmol/l. Der Unterschied zu den mittleren Blutglucosewerten von $5,7 \pm 0,1$ mmol/l der unbehandelten Mäuse war jedoch für beide Gruppen für die Flächen unter den Kurven signifikant ($p < 0,001$). Von den o.g. behandelten 10 Mäusen entwickelten jeweils 4 einen Diabetes (40%). 10 Wochen nach Versuchsbeginn waren die verbliebenen 9 Mäuse in der mit D-G vorbehandelten Gruppe euglykämisch, von den verbliebenen 8 Mäusen in der nur mit ALX behandelten Gruppe war nur noch eine Maus diabetisch.

Die Mäuse, die mit der hohen Konzentration D-G (500 mg/kg KG iv) vorbehandelt wurden, blieben über den gesamten Versuchsverlauf euglykämisch. Die mittleren Blutglucosewerte von $7,8 \pm 1,2$ mmol/l wiesen signifikante ($p \leq 0,001$) Unterschiede zu der nur mit ALX behandelten Gruppe auf.

Die Körpergewichtsentwicklung (Abb. 7B) war in allen Versuchstiergruppen vergleichbar.



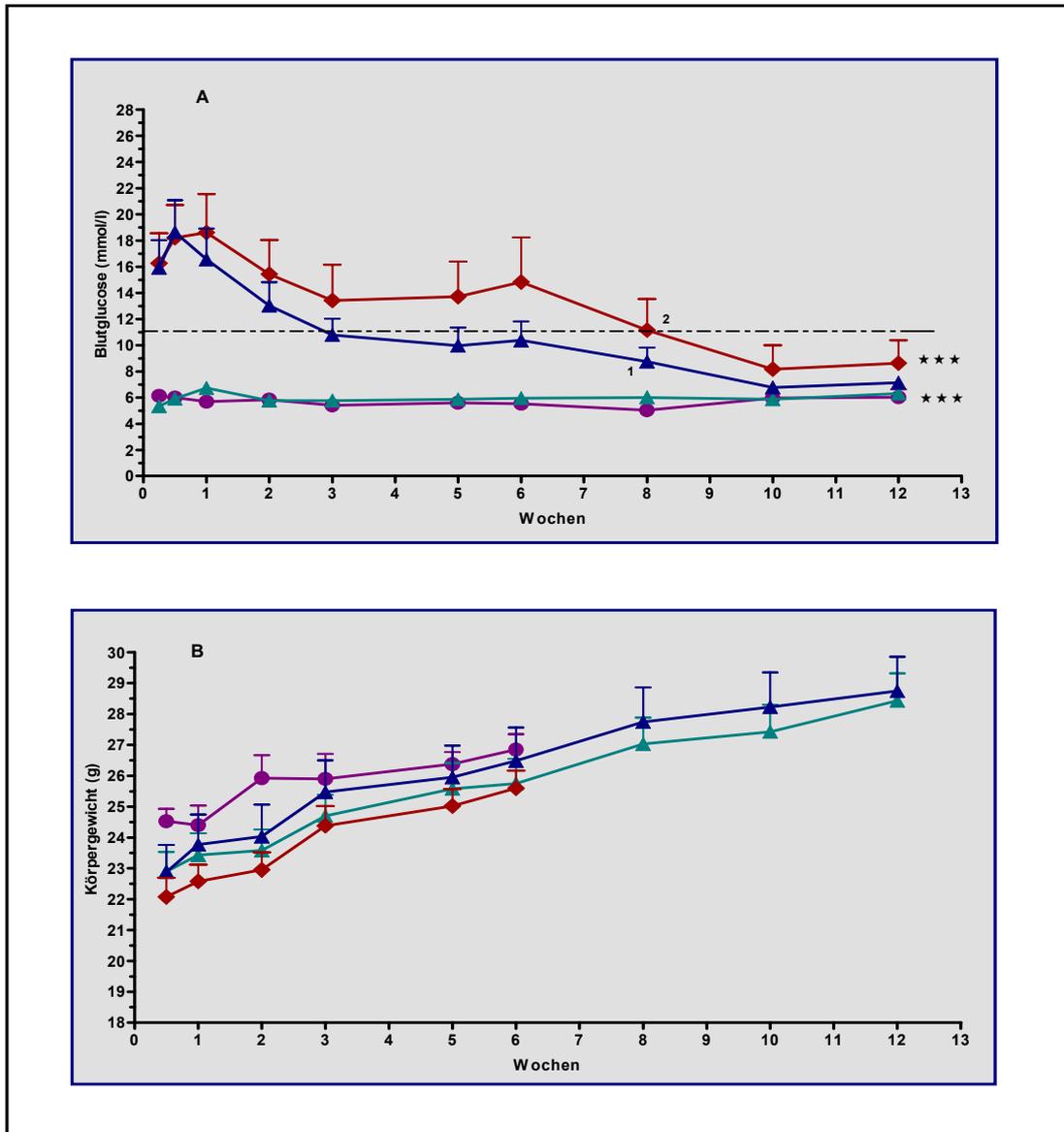


Abbildung 7
Vorbehandlung mit D-G schützte vor einem ALX-induzierten Diabetes in 129S3-Mäusen

Blutglucosekonzentrationen ($x \pm \text{SEM}$) (A) und Körpergewichtsentwicklung ($x \pm \text{SEM}$) (B) nach einmaliger iv Injektion von 50 (◆) mg ALX/kg KG und einmaliger iv Vorbehandlung mit 50 (▲) und 500 (△) mg D-G/kg KG. Es wurden je Gruppe 10 Mäuse für die Behandlung eingesetzt. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 4 Mäusen. Die Zahl am Graphen gibt die Anzahl der bis zu dem jeweiligen Zeitpunkt verstorbenen Mäuse je Gruppe an. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanz (***) $p \leq 0,001$ ist gegenüber der unbehandelten Gruppe bzw. gegenüber der nur mit ALX behandelten Gruppe berechnet.

4.1.3 5-T-G potenzierte einen ALX-induzierten Diabetes

Die Abbildungen 8A und 9A zeigen, dass eine einmalige iv Vorbehandlung mit 50 mg 5-T-G/kg KG unmittelbar vor ALX-Injektion (s.3.3.2 und 3.3.3) in beiden Mausstämmen den ALX-induzierten Diabetes potenzierte.

Dabei waren die mittleren Blutglucosewerte der auf diese Weise vorbehandelten C57BL/6-Mäuse (Abb. 8A) mit $29,7 \pm 2,2$ mmol/l signifikant ($p < 0,001$) höher als die der nur mit ALX behandelten Mäuse mit $18,2 \pm 0,9$ mmol/l und der unbehandelten Mäuse mit $7,3 \pm 0,3$ mmol/l. Die mittleren Blutglucosewerte der nur mit ALX behandelten Mäuse waren ebenfalls für die Flächen unter den Kurven signifikant ($p < 0,001$) abweichend gegenüber denen der unbehandelten Mäuse.

Von den 10 Mäusen, die mit 5-T-G vorbehandelt wurden, entwickelten alle Tiere einen Diabetes (100%), im Gegensatz zu 6 Tieren (60%) in der nur mit ALX behandelten Gruppe. Aufgrund des stark reduzierten Allgemeinzustandes der mit 5-T-G vorbehandelten Tiere wurde der Versuch nach 3 Wochen beendet.

Die ausgeprägte Reduktion des Allgemeinzustandes spiegelte sich auch in einer Körpergewichtsabnahme wieder (Abb. 8B). 3 Wochen nach Versuchsbeginn war das mittlere Körpergewicht der vorbehandelten Mäuse mit $23,3 \pm 1,1$ g signifikant ($p < 0,001$) niedriger als das der unbehandelten ($27,5 \pm 1,0$ g) und der nur mit ALX behandelten Versuchstiere ($29,0 \pm 0,6$ g).

Ein vergleichbares Bild zeigte sich in den 129S3-Mäusen (Abb. 9A und B).

Auch hier waren die mittleren Blutglucosewerte in der mit 5-T-G vorbehandelten Gruppe mit $26,9 \pm 0,8$ mmol/l signifikant ($p < 0,001$) höher als in der nur mit ALX behandelten Gruppe mit $15,8 \pm 0,8$ mmol/l in der nur 4 Mäuse (40%) einen Diabetes entwickelten im Vergleich zu 100% (10 Mäuse) der mit 5-T-G vorbehandelten Gruppe. Die mittleren Blutglucosewerte der unbehandelten Mäuse lagen mit $5,7 \pm 0,2$ mmol/l signifikant ($p < 0,001$) unter denen der mit 5-T-G vorbehandelten und denen der nur mit ALX behandelten Mäuse. Der Versuch wurde ebenfalls aufgrund der starken Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes der mit 5-T-G vorbehandelten Tiere nach 3 Wochen abgebrochen.

Abbildung 9B zeigt, dass 3 Wochen nach Versuchsbeginn das mittlere Körpergewicht der mit 5-T-G vorbehandelten Mäuse mit $22,0 \pm 0,6$ g signifikant ($p < 0,05$) unter dem der nur mit ALX behandelten Mäuse mit $24,4 \pm 0,6$ g lag. Ein Vergleich der Körpergewichte mit denen der unbehandelten Mäuse ist nicht möglich, da diese Gruppe von Versuchbeginn an ein höheres Ausgangsgewicht hatte.

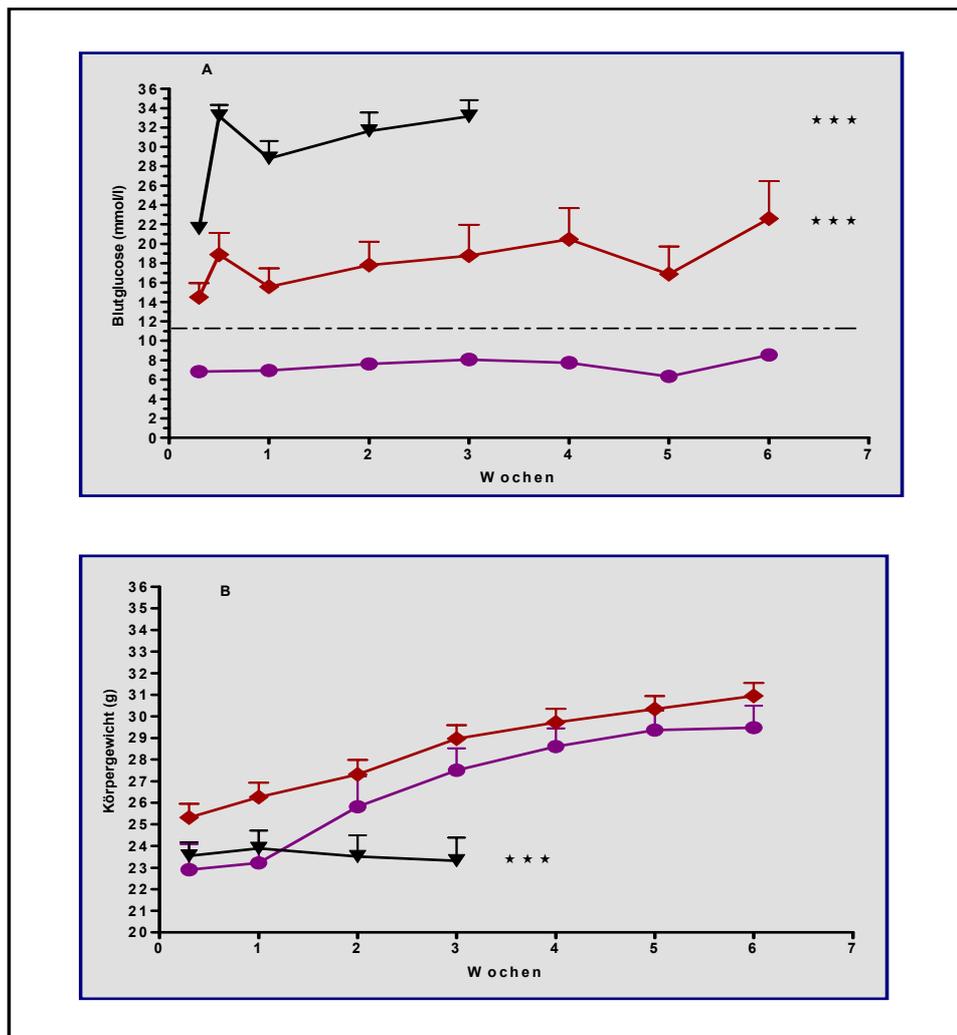


Abbildung 8
Vorbehandlung mit 5-T-G potenzierte einen ALX-induzierten Diabetes in C57BL/6-Mäusen

Blutglucosekonzentrationen ($x \pm \text{SEM}$) (A) und Körpergewichtsentwicklung ($x \pm \text{SEM}$) (B) nach einmaliger iv Injektion von 50 (♦) mg ALX/kg KG und einmaliger iv Vorbehandlung mit 50 (▼) mg 5-T-G/kg KG. Es wurden je Gruppe 10 Mäuse für die Behandlung eingesetzt. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 6 Mäusen. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanz (***) ($p \leq 0,001$) ist gegenüber der unbehandelten Gruppe bzw. gegenüber der nur mit ALX behandelten Gruppe berechnet.

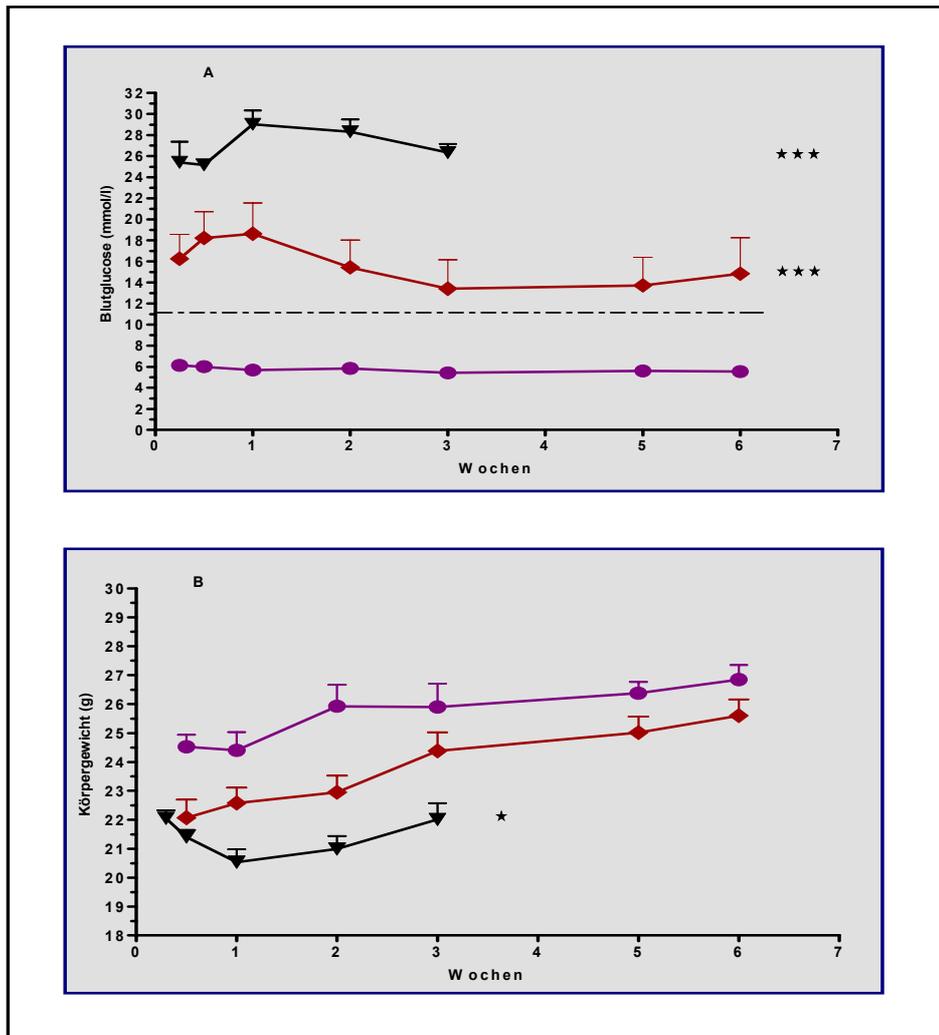


Abbildung 9
Vorbehandlung mit 5-T-G potenzierte einen ALX-induzierten Diabetes in 129S3-Mäusen

Blutglucosekonzentrationen ($x \pm \text{SEM}$) (**A**) und Körpergewichtsentwicklung ($x \pm \text{SEM}$) (**B**) nach einmaliger iv Injektion von 50 (◆) mg ALX/kg KG und einmaliger iv Vorbehandlung mit 50 (▼) mg 5-T-G/kg KG. Es wurden je Gruppe 10 Mäuse für die Behandlung eingesetzt. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 4 Mäusen. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanzen ($*p \leq 0,05$; $***p \leq 0,001$) sind gegenüber der unbehandelten Gruppe bzw. gegenüber der nur mit ALX behandelten Gruppe berechnet.

4.1.4 Zn²⁺-angereichertes Trinkwasser senkte die ALX-induzierte Hyperglykämie

Die Abbildung 10 zeigt, dass die Behandlung mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser (s.3.3.2 und 3.3.4) die ALX-induzierte Hyperglykämie in den C57BL/6-Mäusen über den Versuchsverlauf von 6 Wochen signifikant ($p \leq 0,001$) gesenkt hat.

Die mittleren Blutglucosewerte lagen für die mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser behandelten Mäuse bei $12,9 \pm 0,7$ mmol/l, während die der nur mit ALX behandelten Gruppe $18,2 \pm 0,9$ mmol/l betragen. Dieser Unterschied war für die Flächen unter den Kurven signifikant ($p \leq 0,001$). Die mittleren Blutglucosewerte dieser beiden Versuchstiergruppen lagen ebenfalls signifikant ($p < 0,001$) über dem entsprechenden Wert von $7,3 \pm 0,3$ mmol/l der unbehandelten Kontrollgruppe. Von 10 Mäusen in den behandelten Versuchsansätzen entwickelten jeweils 6 Tiere (60%) einen Diabetes. Nach 6 Wochen verstarben in der mit Zn²⁺-behandelten Gruppe 2 Mäuse.

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in den Körpergewichten der unterschiedlich behandelten Gruppen (Abb. 10B).

In den 129S3-Mäusen hatte die Behandlung mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser keinen Effekt auf die ALX-induzierte Hyperglykämie (Abb. 11A). Die mittleren Blutglucosewerte der mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser behandelten Gruppe betragen $17,8 \pm 1,0$ mmol/l und wiesen keinen signifikanten Unterschied zu denen der nur mit ALX behandelten Mäusen auf ($15,8 \pm 0,8$ mmol/l). Von den 10 Mäusen der mit Zn²⁺-behandelten Gruppe entwickelten 5 Mäuse (50%) einen Diabetes, in der mit ALX behandelten Gruppe war dies bei 4 Mäusen (40%) der Fall. Im Gegensatz zu dem Befund in den C57BL/6-Mäusen verlaufen hier die mittleren Blutglucosewerte der mit Zn²⁺ behandelten Gruppe nahezu parallel zu denen der nur mit ALX behandelten Mäuse.

Die Körpergewichtsentwicklung wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 11B).

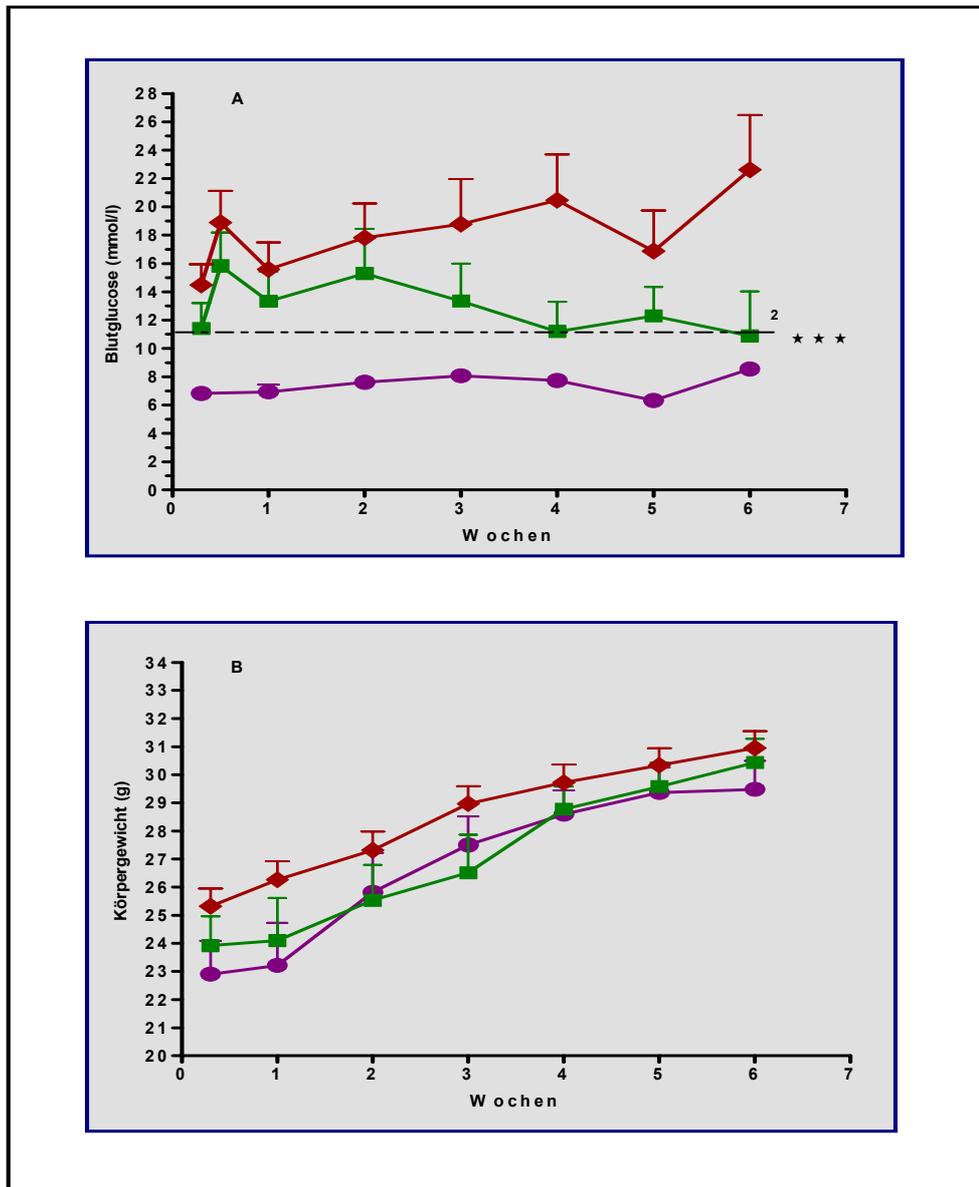


Abbildung 10
Behandlung mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser reduzierte die ALX-induzierte Hyperglykämie in C57BL/6-Mäusen

Blutglucosekonzentrationen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) (A) und Körpergewichtsentwicklung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) (B) nach einmaliger iv Injektion von 50 (◆) mg ALX/kg KG von Mäusen, die 1 Woche vor ALX-Injektion und über die gesamte Versuchsdauer hinweg Zn²⁺-angereichertes Trinkwasser (25 mmol/l) (■) ad libitum erhielten. Es wurden je Gruppe 10 Mäuse für die Behandlung eingesetzt. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 6 Mäusen. Die Zahl an den Kurven gibt die Anzahl der bis zu diesem Zeitpunkt verstorbenen Mäuse an. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanz (***) $p \leq 0,001$ ist gegenüber der unbehandelten bzw. der nur mit ALX behandelten Gruppe berechnet.

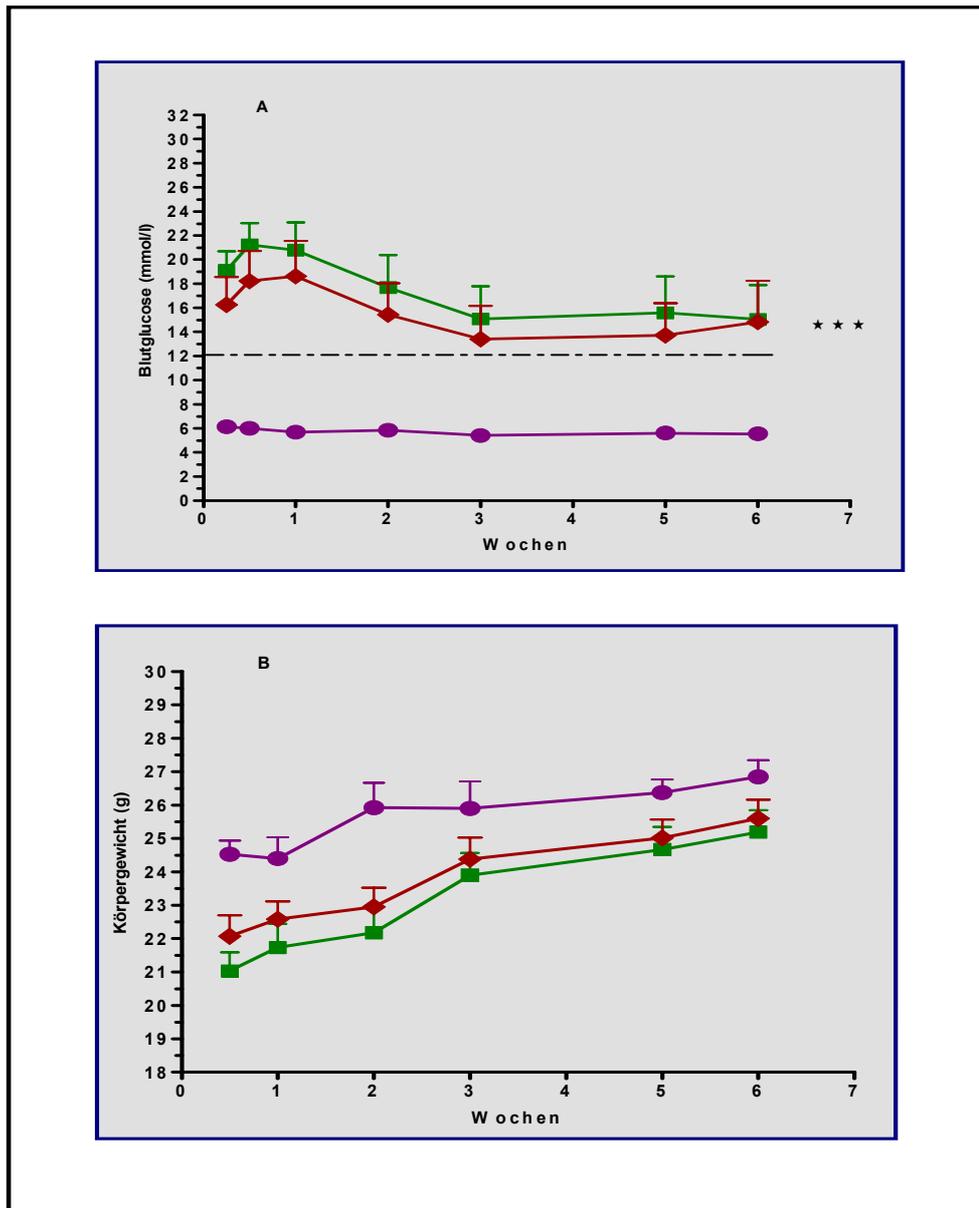


Abbildung 11
Behandlung mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser hatte keinen Effekt auf die ALX-induzierte Hyperglykämie in 129S3-Mäusen
 Blutglucosekonzentrationen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) (A) und Körpergewichtsentwicklung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) (B) nach einmaliger iv Injektion von 50 (◆) mg ALX/kg KG von Mäusen, die 1 Woche vor ALX-Injektion und über die gesamte Versuchsdauer hinweg Zn²⁺-angereichertes Trinkwasser (25 mmol/l) (■) ad libitum erhielten. Es wurden je Gruppe 10 Mäuse für die Behandlung eingesetzt. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 4 Mäusen. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanz (***) $p \leq 0,001$ ist gegenüber der unbehandelten Gruppe berechnet.

4.1.5 Eingeschränkte β -Zellfunktion euglykämischer Mäuse durch ALX

Die 4 C57BL/6-Mäuse, die nach einmaliger iv Injektion von 50 mg ALX/kg KG euglykämisch blieben, zeigten im oGTT, der zu den Zeitpunkten 6, 12 und 18 Wochen nach ALX-Injektion durchgeführt wurde (s.3.3.5), eine signifikante Störung der β -Zellfunktion im Vergleich zu den 6 unbehandelten Kontrollmäusen, welche adäquat durch Insulinsekretion auf den Glucosereiz reagieren konnten (Abb. 12). Die Nüchternblutzuckerspiegel lagen sowohl in der behandelten als auch in der unbehandelten Gruppe zwischen 3,5 und 5,5 mmol/l (Zeitpunkt 0). Im Anschluss an die Glucosebelastung stieg der Blutzuckerspiegel an. In den unbehandelten Mäusen lag er jedoch stets unter dem Schwellenwert für Diabetes und bewegte sich nach 60 min wieder im Normbereich mit einer Konzentration von $7,1 \pm 0,3$ mmol/l. Die mittleren Blutglucosespiegel der mit ALX behandelten Mäuse hingegen lagen nach oraler Glucosebelastung im diabetischen Bereich und blieben, verglichen mit den unbehandelten Kontrollen, auch nach 60 min mit Werten von $10,1 \pm 0,7$, $10,6 \pm 1,0$ und $10,7 \pm 0,7$ mmol/l nach respektive 6, 12 und 18 Wochen signifikant ($p < 0,01$) abweichend. Somit ist zusammenzufassen, dass trotz euglykämischer Stoffwechsellage nach einmaliger ALX-Injektion eine Störung der oGT als Hinweis für eine Reduktion der β -Zellfunktion vorlag.

Vergleichbare Befunde wurden in den 6 129S3-Mäusen erhoben, die nach iv Injektion von 50 mg ALX /kg KG euglykämisch blieben (Abb. 13). Die oGTTs wurden 6 und 12 Wochen nach der ALX-Injektion durchgeführt. Dabei hatten die behandelten Mäuse auch noch 60 min nach oraler Glucosebelastung signifikant erhöhte mittlere Blutglucosewerte im diabetischen Bereich mit respektive $18,4 \pm 1,8$ mmol/l ($p \leq 0,01$) und $12,6 \pm 1,6$ ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen mit $7,2 \pm 0,3$ mmol/l. Im Gegensatz zu den C57BL/6-Mäusen erholte sich nach 12 Wochen die β -Zellfunktion, ohne jedoch den physiologischen Wert zu erzielen.

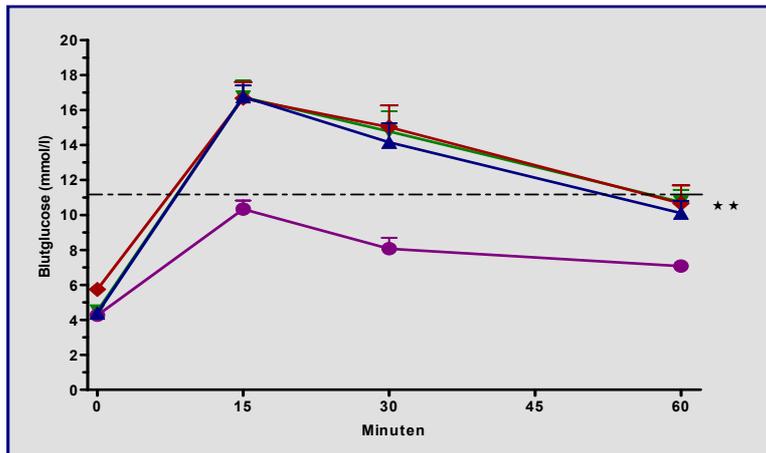


Abbildung 12
Eingeschränkte β -Zellfunktion nach einmaliger iv Injektion von ALX in C57BL/6-Mäusen

Blutglucosekonzentrationen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) im oGTT 6 (▲), 12 (◆) und 18 (▼) Wochen nach einmaliger iv Injektion von 50 mg ALX/kg KG. Die Blutglucose wurde vor, 15 min, 30 min und 60 min nach oraler Belastung mit 2,0 g D-G/kg KG in 4 Mäusen bestimmt, die nach ALX-Injektion über die gesamte Versuchsdauer euglykämisch blieben. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 6 Mäusen. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanz (***) ist gegenüber der unbehandelten Gruppe berechnet.

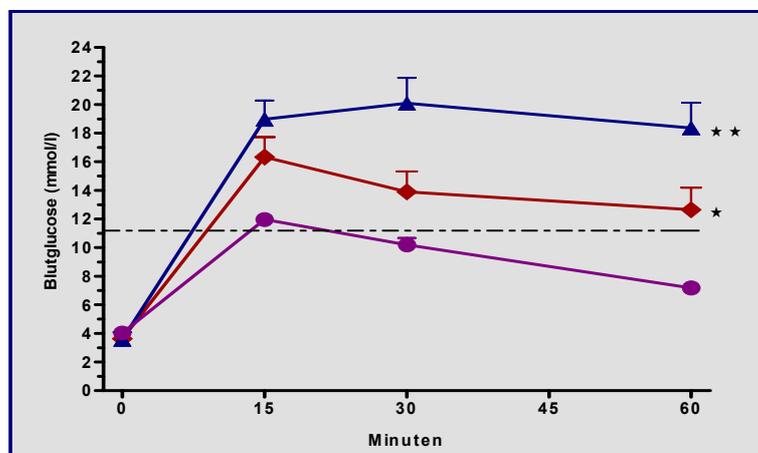


Abbildung 13
Eingeschränkte β -Zellfunktion nach einmaliger iv Injektion von ALX in 129S3-Mäusen

Blutglucosekonzentrationen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) im oGTT 6 (▲) und 12 (◆) Wochen nach einmaliger iv Injektion von 50 mg ALX/kg KG. Die Blutglucose wurde vor, 15 min, 30 min und 60 min nach oraler Belastung mit 2,0 g D-G/kg KG in 6 Mäusen bestimmt, die nach ALX-Injektion über die gesamte Versuchsdauer euglykämisch blieben. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 4 Mäusen. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanz (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$) sind gegenüber der unbehandelten Gruppe berechnet.

4.1.6 Eingeschränkte β -Zellfunktion euglykämischer Mäuse nach Vorbehandlung mit D-G

Die C57BL/6-Mäuse, die nach Vorbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen D-G und anschließender ALX-Injektion über die gesamte Versuchsdauer euglykämisch blieben, zeigten im oGTT eine pathologische oGT (Abb. 14). Die mittleren Blutglucosespiegel der mit 50 mg D-G/kg KG vorbehandelten 9 Mäuse (Abb. 14A) überstiegen 60 min nach oraler Glucosebelastung mit respektive $13,4 \pm 1,0$ mmol/l ($p < 0,001$), $11,5 \pm 1,0$ mmol/l ($p < 0,01$) und $14,2 \pm 1,0$ mmol/l ($p < 0,001$) 6, 12 und 18 Wochen nach der ALX-Injektion signifikant den Wert der unbehandelten Kontrollen mit $7,1 \pm 0,3$ mmol/l. Signifikante Abweichungen ihrer mittleren Blutglucosespiegel wiesen auch die Mäuse auf, die mit höheren Dosen D-G vorbehandelt worden waren. Die entsprechenden Werte lagen für die mit 250 mg D-G/kg KG vorbehandelten 9 Mäuse (Abb. 14B) bei respektive $11,2 \pm 1,1$ mmol/l ($p < 0,05$), $9,1 \pm 0,8$ mmol/l (ns) und $10,1 \pm 0,9$ mmol/l ($p < 0,05$). Die 10 euglykämischen Mäuse (Abb. 14C), die mit 500 mg D-G/kg vorbehandelt worden waren, zeigten hingegen nach 60 min im oGTT signifikant niedrigere, wenn auch verglichen mit den unbehandelten Kontrollen, signifikant erhöhte mittlere Blutglucosekonzentrationen von respektive $9,6 \pm 0,7$ mmol/l ($p < 0,05$), $10,1 \pm 0,7$ mmol/l ($p < 0,01$) und $10,2 \pm 0,5$ mmol/l ($p < 0,01$) 6, 12 und 18 Wochen nach ALX-Injektion. Vergleichbare Blutglucosewerte ergaben sich für die 10 Mäuse der mit 1000 mg D-G/kg KG vorbehandelten Gruppe mit respektive $9,6 \pm 0,5$ mmol/l ($p < 0,01$), $10,0 \pm 0,6$ mmol/l ($p < 0,01$) und $8,7 \pm 0,5$ mmol/l ($p < 0,05$) (Abb. 14D). Somit konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit D-G zwar eine persistierende Hyperglykämie und damit einen Diabetes verhindern konnte, aber nicht eine Schädigung von β -Zellen durch die nachfolgende ALX-Behandlung.

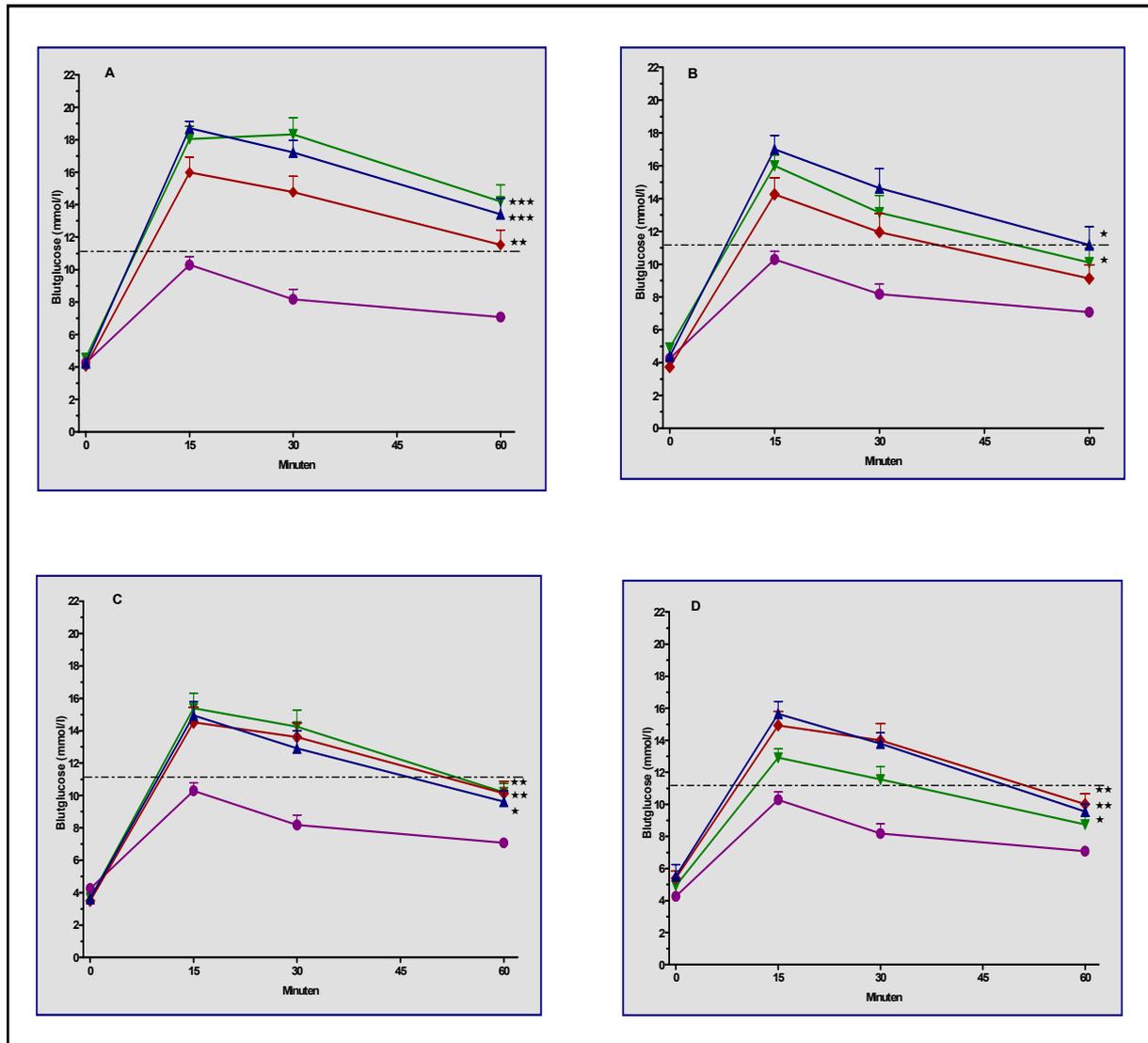


Abbildung 14

Eingeschränkte β -Zellfunktion nach Vorbehandlung mit D-G und einmaliger iv Injektion von ALX in C57BL/6-Mäusen

A-D: Blutglucosekonzentration ($x \pm \text{SEM}$) im oGTT 6 (\blacktriangle), 12 (\blacklozenge) und 18 (\blacktriangledown) Wochen nach Vorbehandlung mit D-G und einmaliger iv Injektion von 50 mg ALX/kg KG. Die Blutglucose wurde vor, 15 min, 30 min und 60 min nach oraler Belastung mit 2,0 g D-G/kg KG in 9 (A, B) bzw. 10 (C, D) Mäusen bestimmt, die nach ALX-Injektion über die gesamte Versuchsdauer euglykämisch blieben. Die unbehandelte Kontrollgruppe (\bullet) bestand aus 6 Mäusen. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanzen (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) sind gegenüber der unbehandelten Gruppe berechnet.

- A:** Vorbehandlung mit 50 mg D-G/kg KG iv
- B:** Vorbehandlung mit 250 mg D-G/kg KG iv
- C:** Vorbehandlung mit 500 mg D-G/kg KG iv
- D:** Vorbehandlung mit 1000 mg D-G/kg KG iv

Auch in den 129S3-Mäusen wiesen die 10 Tiere, die nach Vorbehandlung mit 50 mg D-G/kg KG über die gesamte Versuchsdauer euglykämisch blieben, eine pathologische oGT auf (Abb. 15A). Die mittleren Blutglucosekonzentrationen waren, verglichen mit dem Wert der unbehandelten Kontrollen ($7,2 \pm 0,2$ mmol/l), signifikant höher und betragen 60 min nach Glucosebelastung respektive $19,0 \pm 0,6$ mmol/l ($p < 0,001$) und $10,9 \pm 1,2$ mmol/l ($p < 0,05$) 6 und 12 Wochen nach der Behandlung. (Abb. 15A). Nach Vorbehandlung mit 500 mg D-G/kg KG (Abb. 15B) bestand jedoch nur nach 6 Wochen eine pathologische oGT mit signifikanter Erhöhung der mittleren Blutglucosekonzentration von $11,1 \pm 1,0$ mmol/l ($p < 0,05$). Interessanterweise lag 12 Wochen nach Versuchsbeginn eine normale oGT vor mit einer mittleren Blutglucosekonzentrationen von $7,4 \pm 0,7$ mmol/l, vergleichbar dem Wert der unbehandelten Kontrollen. Demnach ist mit der Zeit eine Erholung der β -Zellfunktion in den Normbereich eingetreten.

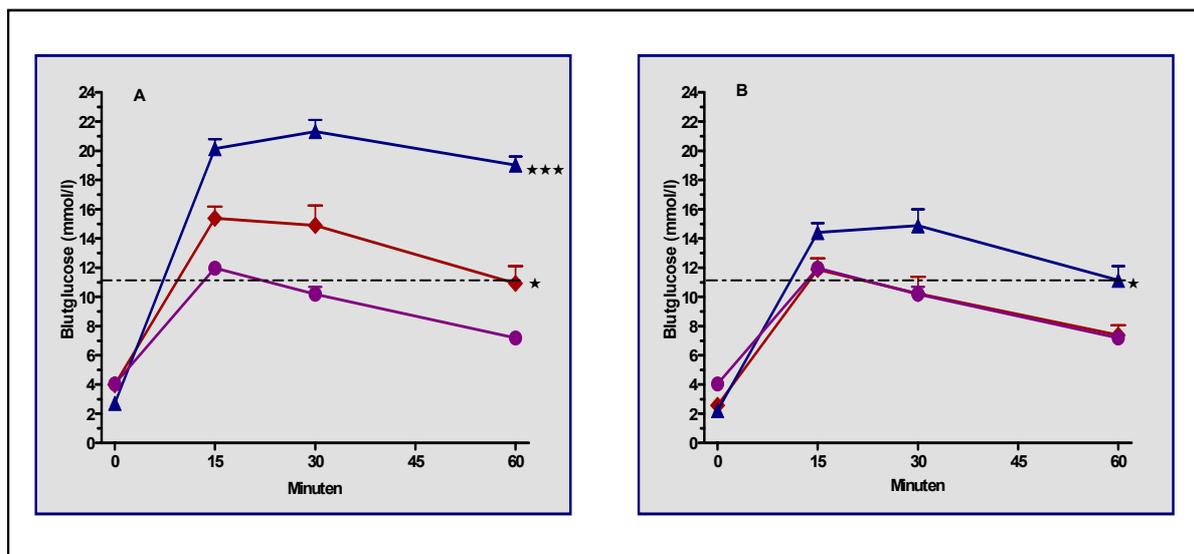


Abbildung 15
Eingeschränkte β -Zellfunktion nach Vorbehandlung mit D-G und einmaliger iv Injektion von ALX in 129S3-Mäusen

A-B: Blutglucosekonzentration ($x \pm \text{SEM}$) im oGTT 6 (▲) und 12 (◆) Wochen nach Vorbehandlung mit D-G und einmaliger iv Injektion von 50 mg ALX/kg KG. Die Blutglucose wurde vor, 15 min, 30 min und 60 min nach oraler Belastung mit 2,0 g D-G/kg KG in 6 (A) bzw. 10 (B) Mäusen bestimmt, die nach ALX-Injektion über die gesamte Versuchsdauer euglykämisch blieben. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 4 Mäusen. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanzen (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$) sind gegenüber der unbehandelten Gruppe berechnet.

A: Vorbehandlung mit 50 mg D-G/kg KG iv
B: Vorbehandlung mit 500 mg D-G/kg KG iv

4.1.7 Eingeschränkte β -Zellfunktion euglykämischer Mäuse nach Behandlung mit Zn^{2+} -angereichertem Trinkwasser und ALX

Die 5 C57BL/6-Mäuse, die nach Behandlung mit Zn^{2+} -angereichertem Trinkwasser und anschließender ALX-Injektion euglykämisch blieben (Abb. 16), zeigten signifikante Abweichungen ihrer Blutglucosewerte gegenüber denen der unbehandelten Mäuse ($7,1 \pm 0,2$ mmol/l) 60 min nach oraler Glucosebelastung. Die mittleren Blutglucosewerte lagen 6, 12 und 18 Wochen nach Alx-Injektion bei respektive $9,9 \pm 1,1$ mmol/l ($p < 0,05$), $11,0 \pm 0,8$ mmol/l ($p < 0,001$) und $16,1 \pm 0,8$ mmol/l ($p < 0,001$).

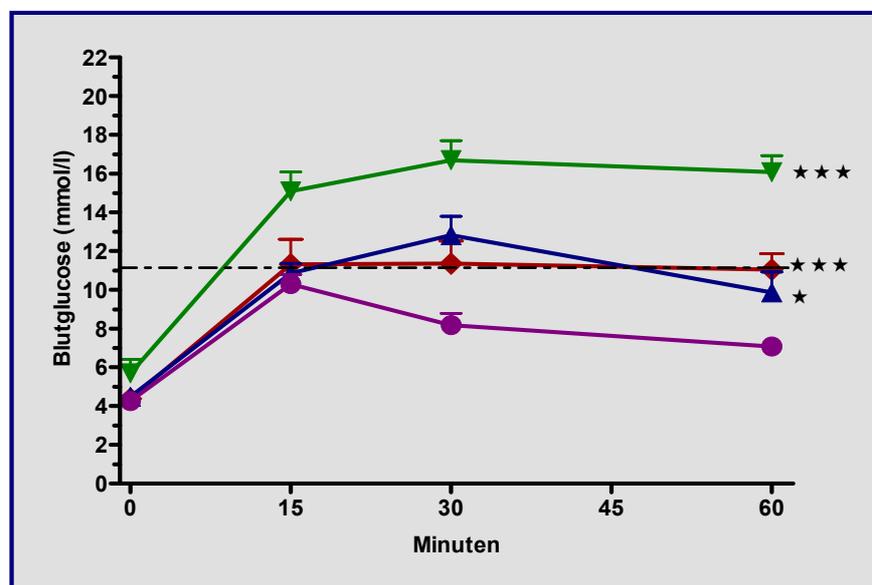


Abbildung 16
Eingeschränkte β -Zellfunktion nach Behandlung mit Zn^{2+} -angereichertem Trinkwasser und einmaliger iv Injektion von ALX in C57BL/6-Mäusen

Blutglucosekonzentrationen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) im oGTT 6 (▲), 12 (◆) und 18 (▼) Wochen nach einmaliger iv Injektion von 50 mg ALX/kg KG in Mäusen, die 1 Woche vor ALX-Injektion und über die gesamte Versuchsdauer hinweg Zn^{2+} -angereichertes Trinkwasser (25 mmol/l) ad libitum erhielten. Die Blutglucose wurde vor, 15 min, 30 min und 60 min nach oraler Belastung mit 2,0 g D-G/kg KG in 5 Mäusen bestimmt, die nach der ALX-Injektion über die gesamte Versuchsdauer euglykämisch blieben. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 6 Mäusen. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanzen (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) sind gegenüber der unbehandelten Gruppe berechnet.

In den 5 129S3-Mäusen lagen die entsprechenden mittleren Blutglucosewerte 6 und 12 Wochen nach der ALX-Injektion ebenfalls signifikant über denen der unbehandelten Kontrollen (Abb. 17). 60 min nach der Glucosebelastung waren Blutglucosewerte von respektive $17,7 \pm 2,2$ mmol/l ($p < 0,01$) und $13,8 \pm 1,9$ mmol/l ($p < 0,05$) messbar. Auch hier ist die pathologische oGT - trotz bestehender Euglykämie - ein Zeichen für die Schädigung der β -Zellfunktion nach der ALX-Behandlung.

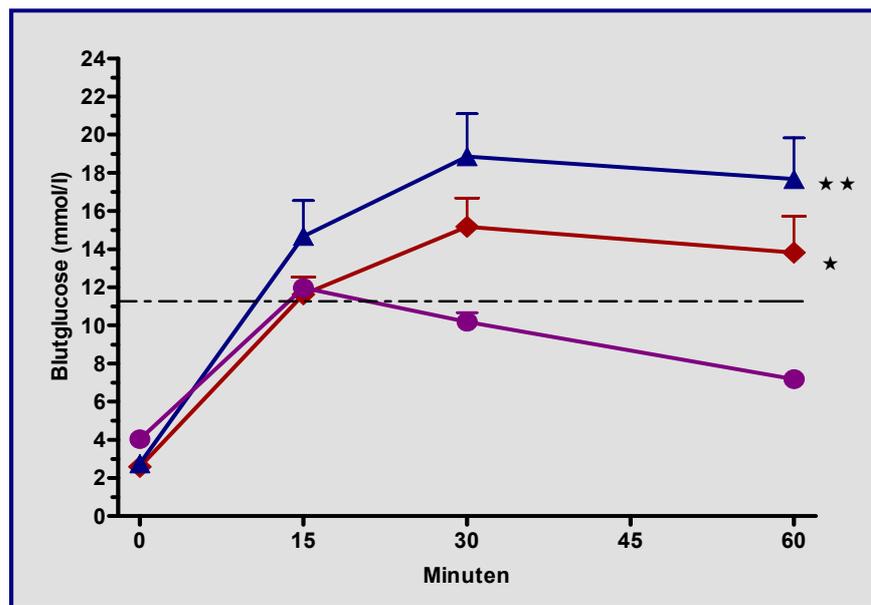


Abbildung 17
Eingeschränkte β -Zellfunktion nach Behandlung mit Zn^{2+} -angereichertem Trinkwasser und einmaliger iv Injektion von ALX in 129S3-Mäusen

Blutglucosekonzentrationen ($x \pm SEM$) im oGTT 6 (▲), 12 (◆) und 18 (▲) Wochen nach einmaliger iv Injektion von 50 mg ALX/kg KG in Mäusen, die 1 Woche vor ALX-Injektion und über die gesamte Versuchsdauer hinweg Zn^{2+} -angereichertes Trinkwasser (25 mmol/l) ad libitum erhielten. Die Blutglucose wurde vor, 15 min, 30 min und 60 min nach oraler Belastung mit 2,0 g D-G/kg KG in 5 Mäusen bestimmt, die nach der ALX-Injektion über die gesamte Versuchsdauer euglykämisch blieben. Die unbehandelte Kontrollgruppe (●) bestand aus 4 Mäusen. Der Schwellenwert (---) Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l. Die Signifikanzen ($*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$) sind gegenüber der unbehandelten Gruppe berechnet.

4.2 ex vivo Befunde

4.2.1 Zeitabhängige Reduktion des Insulingehalts durch ALX im Pankreas von C57BL/6-Mäusen

Nach iv Injektion von 50 mg ALX/kg KG (s.3.3.9) kommt es zu einer signifikanten, zeitabhängigen Reduktion des Insulingehalts im Pankreas von C57BL/6-Mäusen (Abb. 18). Dabei wiesen die unbehandelten Kontrollen einen Insulingehalt von $11,7 \pm 0,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Pankreas (FG) auf. 30 min nach der ALX-Injektion konnte ein Insulingehalt von $11,7 \pm 0,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Pankreas (FG) gemessen werden. Dieser sank – wenn auch nicht signifikant - 3 h nach der ALX-Behandlung auf einen Wert von $10,8 \pm 0,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Pankreas (FG). Nach 24 h war jedoch eine signifikante Reduktion ($p \leq 0,05$) des Insulingehalts mit $7,5 \pm 0,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Pankreas (FG) feststellbar. Somit hat sich der Insulingehalt um 36% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen reduziert. Dies deutet auf eine relativ schnelle toxische Schädigung der pankreatischen β -Zelle hin.

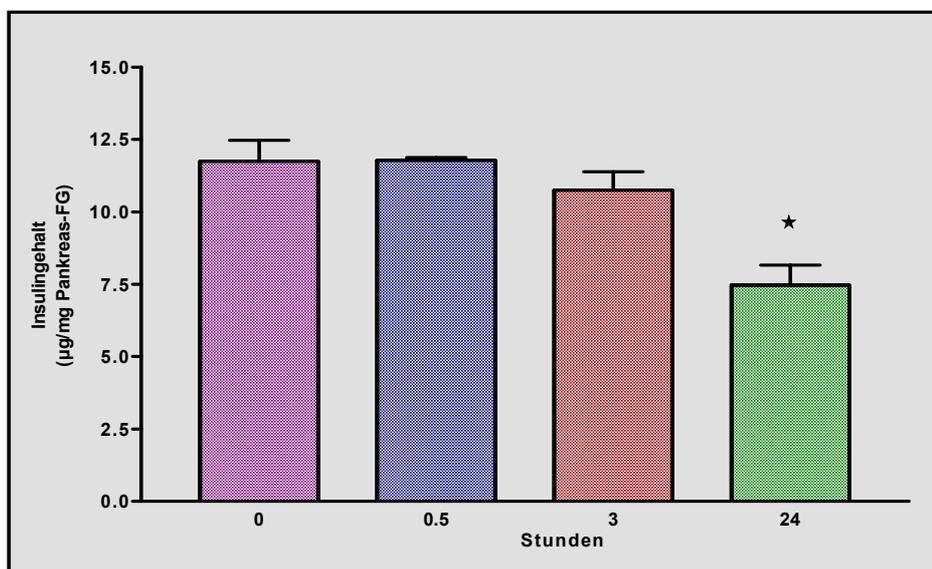


Abbildung 18
Zeitabhängige Reduktion des pankreatischen Insulingehalts nach einmaliger iv Injektion von ALX

Insulingehalt ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) im Pankreas von Mäusen, unmittelbar vor (0=unbehandelte Kontrollen) und 0,5, 3 und 24 h nach iv Injektion von 50 mg ALX/kg KG. Es wurden je Gruppe 3 Mäuse eingesetzt. Die Signifikanz (* $p \leq 0,05$) ist gegenüber der Kontrollgruppe berechnet.

4.2.2 Dosisabhängige Reduktion des Insulingehalts durch ALX im Pankreas von 129S3-Mäusen

In Abhängigkeit von der injizierten ALX-Konzentration verringerte sich 3 Monate nach der ALX-Behandlung der Insulingehalt des Pankreas von 129S3-Mäusen signifikant (Abb. 19). Dabei wurden nur Mäuse berücksichtigt, die nach der Behandlung euglykämisch blieben. Die 10 Mäuse, die eine einmalige iv Injektion von 30 mg ALX/kg KG erhielten, wiesen einen mittleren Insulingehalt von $2,6 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Pankreas (FG) ($p < 0,01$) im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen mit $3,7 \pm 0,3$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Pankreas (FG). Eine noch stärkere Reduktion ihres Insulingehalts ($1,9 \pm 0,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Pankreas (FG), $p < 0,001$) zeigten die 9 Mäuse, welche mit 40 mg ALX/kg KG behandelt worden waren. Der mittlere Insulingehalt der 8 Mäuse, die 50 mg ALX/kg KG erhielten, lag bei $1,8 \pm 0,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Pankreas (FG) ($p < 0,001$). Diese Verringerung des Insulingehalts, bezogen auf das Gesamtpankreas, deutet auf eine bleibende Schädigung der β -Zellen nach der ALX-Behandlung hin. Die Funktion des endokrinen Pankreas ist also permanent eingeschränkt, was die Befunde im oGTT (Abb. 13) bestätigt.

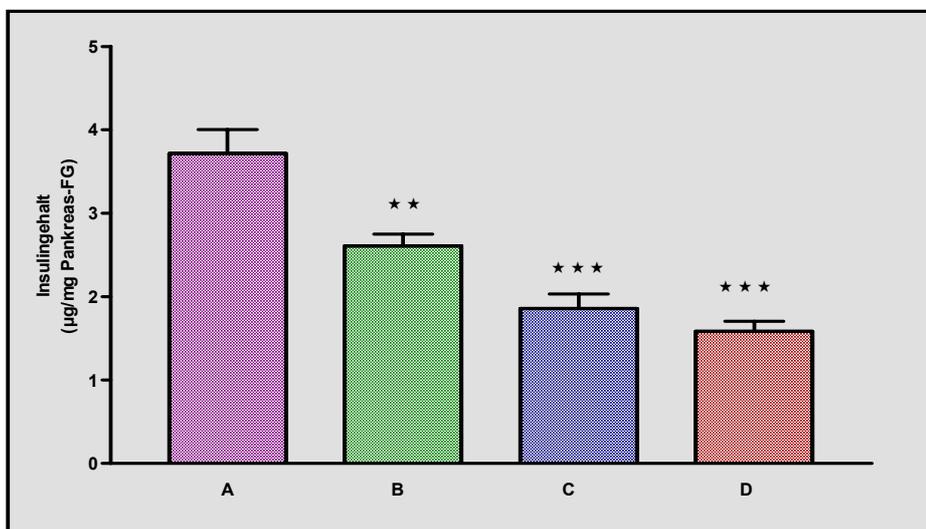


Abbildung 19
Dosisabhängige Reduktion des pankreatischen Insulingehalts 3 Monate nach einmaliger iv Injektion von ALX

Insulingehalt ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) im Pankreas von Mäusen, die einmalig iv 30 (B), 40 (C) bzw. 50 (D) mg ALX/kg KG erhalten hatten und 3 Monate nach der Injektion getötet wurden. Eine unbehandelte Kontrollgruppe (A) bestand aus 4 Mäusen. Die Signifikanzen (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) sind gegenüber der Kontrollgruppe berechnet.

4.2.3 Reduktion des Insulingehalts nach Behandlung mit D-G oder Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser im Pankreas von 129S3-Mäusen

Die 129S3-Mäuse, die nach Behandlung mit D-G bzw. Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser und nachfolgender ALX-Behandlung euglykämisch blieben, wiesen 3 Monate nach der ALX-Injektion einen reduzierten Insulingehalt des Pankreas auf (Abb. 20). Im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen (3,7 ±0,3 µg/mg Pankreas (FG)) war der mittlere Insulingehalt der mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser behandelten Mäuse mit 1,4 ±0,1 µg/mg Pankreas (FG) (p<0,01) signifikant reduziert, ebenso bei den mit 50 mg D-G/kg KG iv vorbehandelten Mäusen (1,9 ±0,5 µg/mg Pankreas (FG), p<0,05). Nicht signifikant war jedoch die Reduktion des mittleren Insulingehalts der mit 500 mg D-G/kg KG vorbehandelten Mäuse mit 2,6 ± 0,4 µg/mg Pankreas (FG). Die Befunde entsprechen den in 4.1.6 beschriebenen, wonach sich die oGT 12 Wochen nach Vorbehandlung mit 500 mg D-G/kg KG und ALX-Injektion nicht signifikant von der der unbehandelten Kontrolle unterschied.

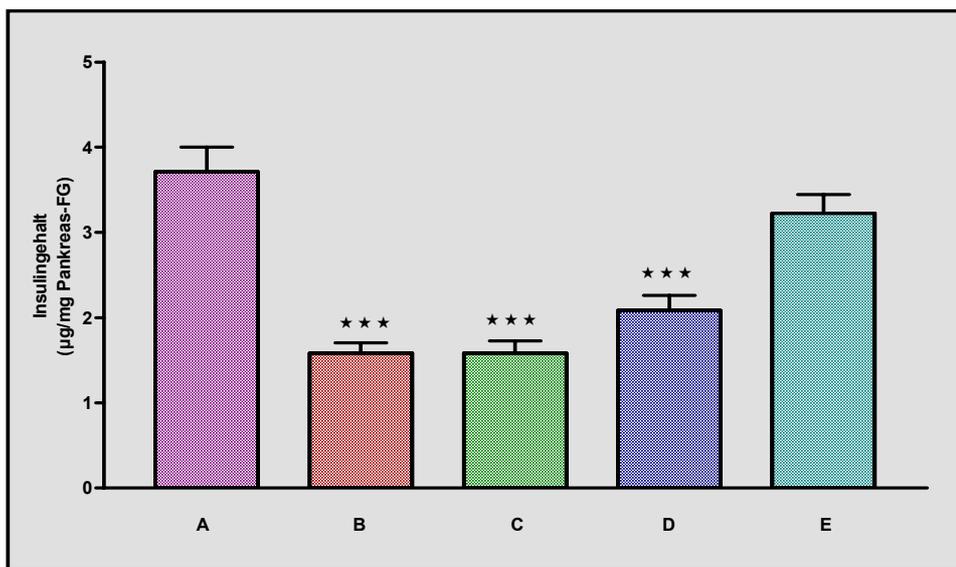


Abbildung 20
Reduktion des pankreatischen Insulingehalts nach einmaliger iv Injektion von ALX und Behandlung mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser oder D-G

Insulingehalt (x ±SEM) im Pankreas von Mäusen, die einmalig iv 50 mg ALX/kg KG (B) erhalten hatten und zusätzlich mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser (25 mmol/l) (C) 1 Woche vor und über den gesamten Versuch oder mit 50 (D) bzw. 500 (E) mg D-G/kg KG iv behandelt wurden. Die Mäuse wurden 3 Monate nach der ALX-Injektion getötet. Eine Behandlungsgruppe bestand aus 7 (C) bzw. 10 (B, D und E) Mäusen. Die unbehandelte Kontrollgruppe (A) bestand aus 4 Mäusen. Die Signifikanz (***) p<0,001 ist gegenüber der unbehandelten Gruppe berechnet.

4.2.4 Zeitabhängige Reduktion der mRNA-Expression des GLUT2 und der Glucokinase durch ALX

In Abhängigkeit von der Zeit konnte eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression des GLUT2 und der Glucokinase, jedoch nicht von Proinsulin, nach iv Injektion von 50 mg ALX /kg KG (s.3.3.8) gemessen werden (Abb. 21). Schon 5 min nach der ALX-Injektion war die Reduktion der mRNA des GLUT2 signifikant ($p < 0,001$) mit einem mittleren Verhältnis GLUT2 zu β -Aktin von $0,30 \pm 0,10$ im Vergleich zu dem der unbehandelten Mäuse mit $1,15 \pm 0,08$. Eine weitere geringfügige Reduktion konnte nach 15 min gemessen werden ($0,24 \pm 0,08$; $p < 0,001$) und 3 h nach Behandlung war die mRNA des GLUT2 auf ein Verhältnis zu β -Aktin von $0,06 \pm 0,03$ ($p < 0,001$) reduziert worden. Eine signifikante Reduktion der mRNA von Glucokinase wurde jedoch erst 30 min nach Behandlung mit ALX festgestellt. Das Verhältnis zu β -Aktin betrug zu diesem Zeitpunkt $0,42 \pm 0,17$ ($p < 0,05$) und reduzierte sich nach 3 h auf einen Wert von $0,32 \pm 0,14$ ($p < 0,05$) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle mit einem Mittelwert von $0,89 \pm 0,11$. Auffällig ist, dass die mRNA von Proinsulin (in % zur Kontrolle angegeben) unverändert exprimiert wurde. Dabei schwanken die Mittelwerte zwischen maximal 110% nach 5 min bis minimal 90% 3 h nach der ALX-Injektion. Somit war die ALX-Toxizität für die mRNA von GLUT2 ausgeprägter als für die Glucokinase, jedoch ohne Einfluß auf die mRNA von Proinsulin.

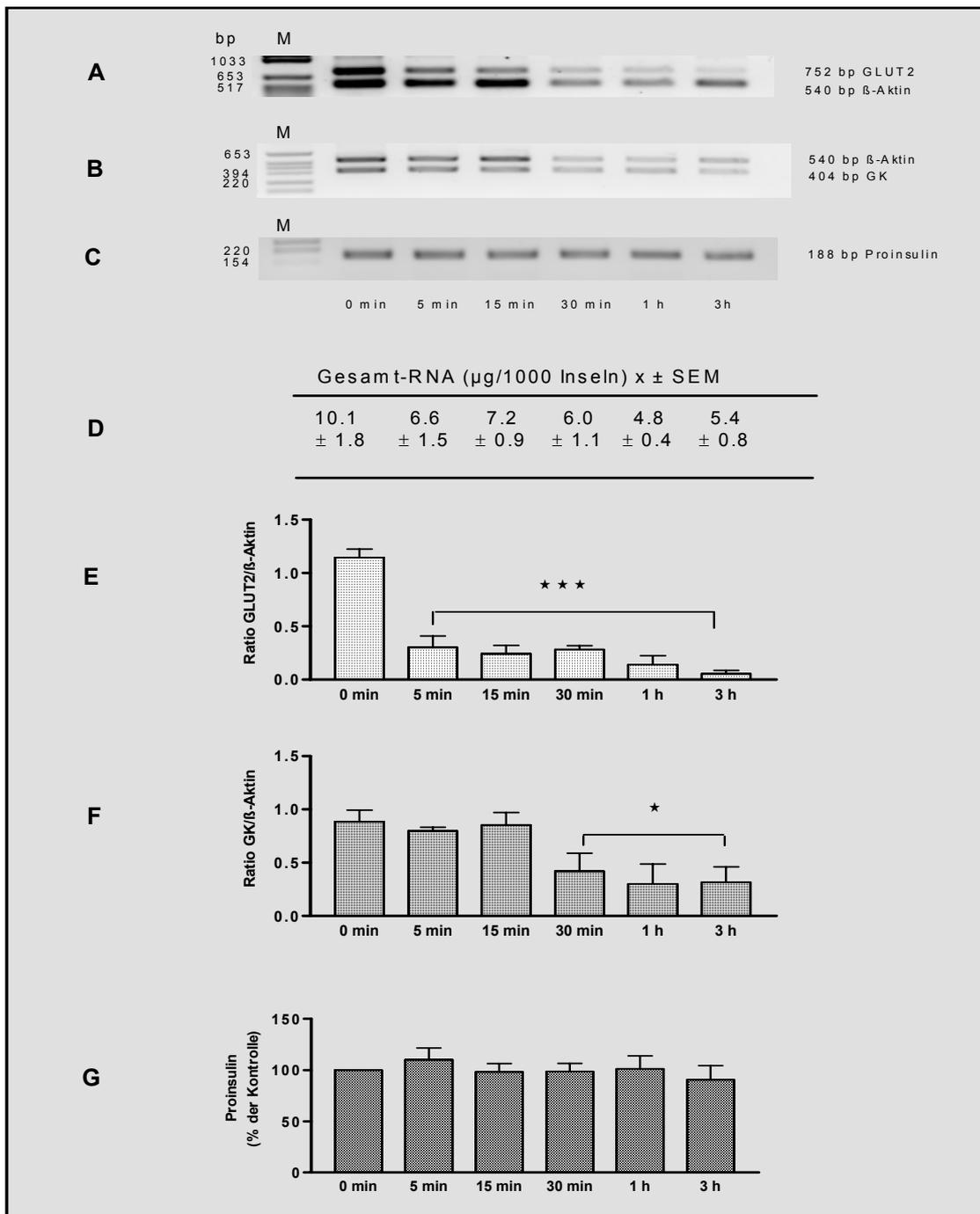


Abbildung 21

ALX reduzierte differentiell und zeitabhängig die mRNA-Expression des GLUT2 und der Glucokinase, ohne die mRNA von Proinsulin zu beeinflussen

Je 10 Mäusen pro Behandlungsgruppe wurden 50 mg ALX/kg KG iv injiziert, die Kontrollgruppe (0) blieb unbehandelt. Die Inselisolierung erfolgte nach 5, 15 und 30 min sowie nach 1 und 3 h. Dargestellt sind die RT-PCR-Produkte von GLUT2 (A), Glucokinase (B), Proinsulin (C) und β -Aktin, der Gesamt-RNA-Gehalt ($x \pm \text{SEM}$) pro 1000 Inseln (D) und die Verhältnisse ($x \pm \text{SEM}$) von GLUT2 (E) und Glucokinase (F) zu β -Aktin. Die mRNA von Proinsulin (G) wird in Prozent der Kontrolle wiedergegeben. Die Signifikanzen ($*p \leq 0,05$; $*** p \leq 0,001$) sind gegenüber der unbehandelten Kontrolle berechnet.

4.2.5 Vorbehandlung mit D-G schützte die mRNA von GLUT2 und Glucokinase vor der Reduktion durch ALX

Die einmalige Vorbehandlung mit 500 mg D-G/kg KG schützte die mRNA des GLUT2 und der Glucokinase vor einer Reduktion durch Injektion von 50 mg ALX/kg KG iv (Abb. 22). Zwar konnte noch eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der mRNA des GLUT2 gemessen werden, diese war jedoch mit einer mittleren Ratio zur mRNA von β -Aktin von $0,61 \pm 0,06$ nach 15 min und $0,46 \pm 0,1$ nach 3 h deutlich geringer ausgeprägt als durch die gleiche ALX-Dosis alleine, wie unter 4.2.4 beschrieben. Die mRNA-Expression der Glucokinase und von Proinsulin hingegen blieben unverändert erhalten und entsprachen der Expression unbehandelter Kontrollen. Aus diesen Befunden lässt sich ersehen, dass der Schutzeffekt einer Vorbehandlung mit D-G auf der Ebene der mRNA liegt, und dass der GLUT2 und die Glucokinase die wahrscheinlich primären Zielstrukturen für ALX sind.

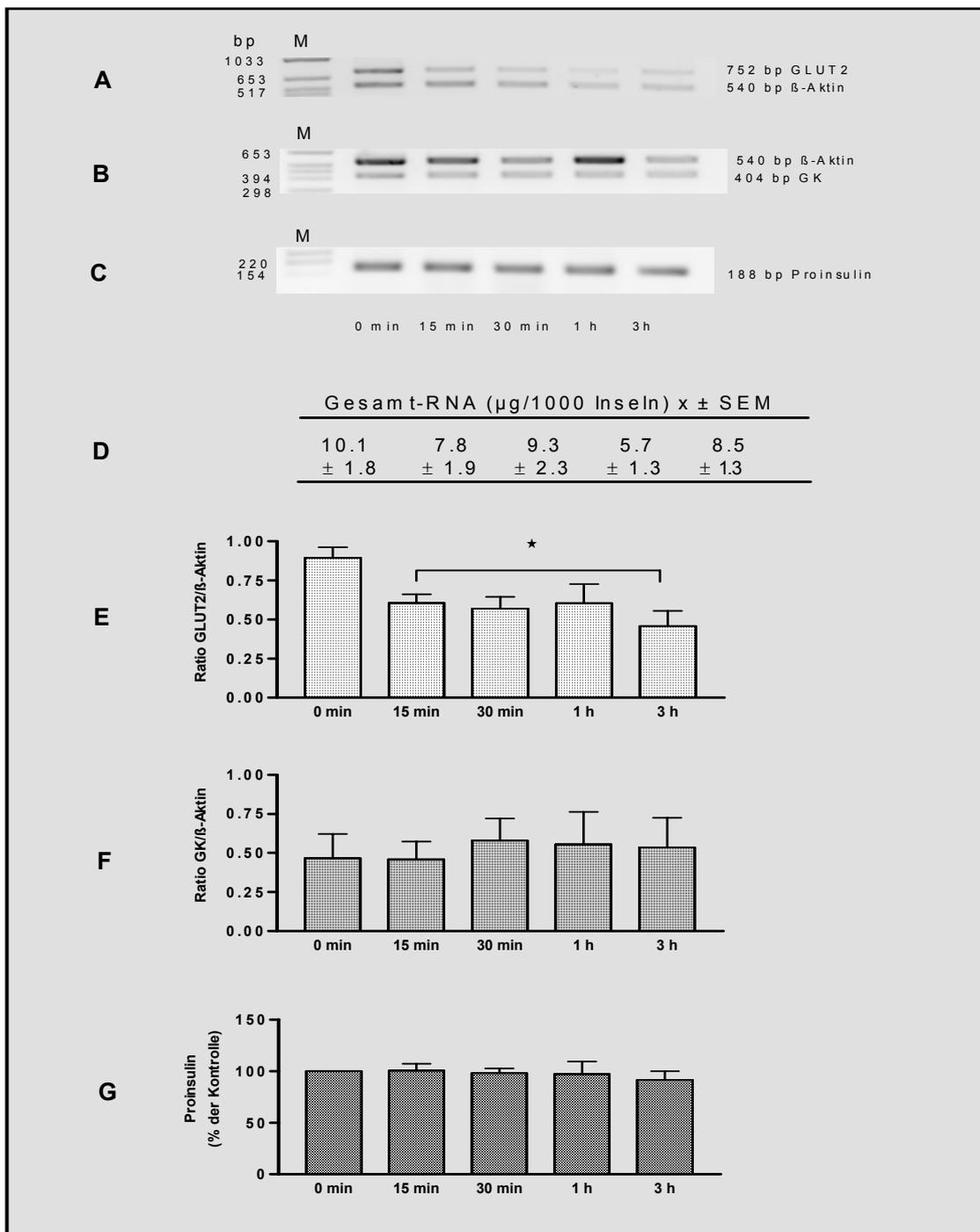


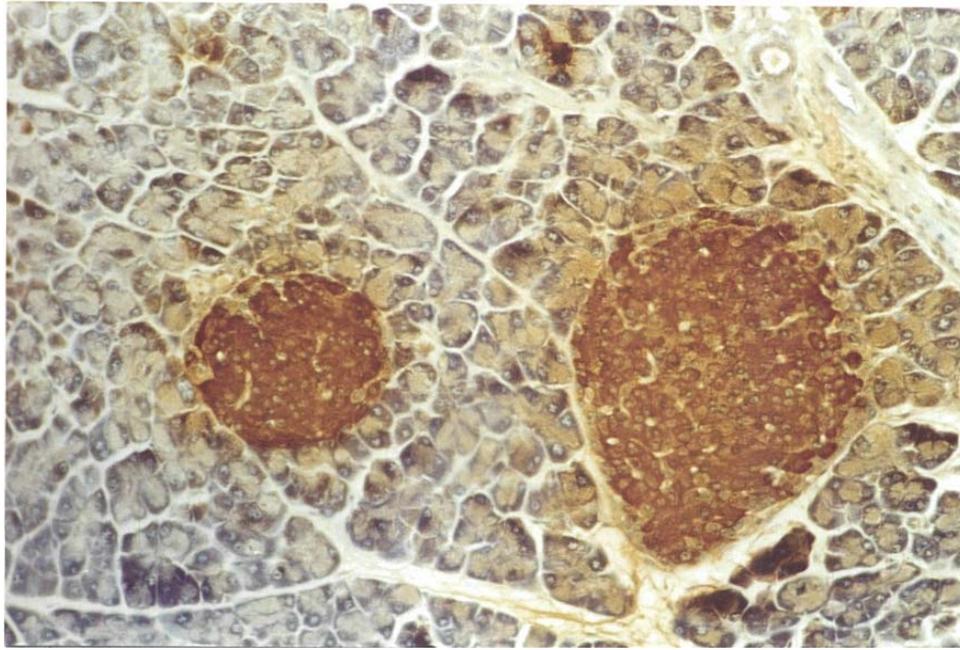
Abbildung 22

Vorbehandlung mit D-G schützte die mRNA des GLUT2 und der Glucokinase vor einer Reduktion durch ALX

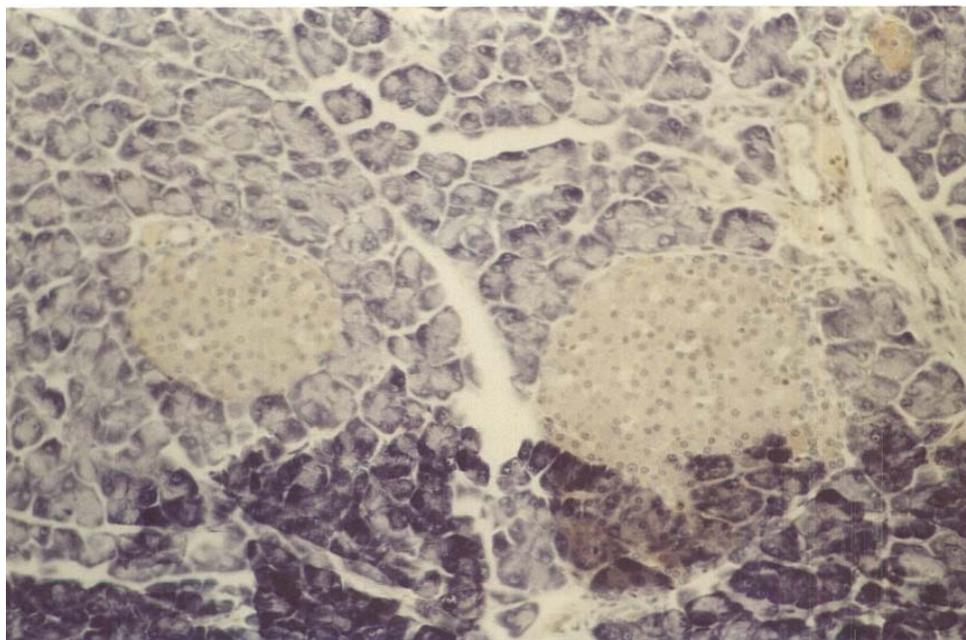
Je 10 Mäusen pro Behandlungsgruppe wurden 500 mg D-G/kg KG unmittelbar vor 50 mg ALX/kg KG iv injiziert, die Kontrollgruppe (0) blieb unbehandelt. Die Inselisolierung erfolgte nach 15 und 30 min sowie nach 1 und 3 h. Dargestellt sind die RT-PCR-Produkte von GLUT2 (**A**), Glucokinase (**B**), Proinsulin (**C**) und β-Aktin, der Gesamt-RNA-Gehalt ($x \pm \text{SEM}$) pro 1000 Inseln (**D**) und die Verhältnisse ($x \pm \text{SEM}$) von GLUT2 (**E**) und Glucokinase (**F**) zu β-Aktin. Die mRNA von Proinsulin (**G**) wird in Prozent der Kontrolle wiedergegeben. Die Signifikanz (* $p \leq 0,05$) ist gegenüber der unbehandelten Kontrolle berechnet.

4.2.6 Immunhistochemischer Nachweis von Insulin im Pankreas von C57BL/6-Mäusen

Durch die immunhistochemische Anfärbung von Insulin im endokrinen Teil des Pankreas von C57BL/6-Mäusen konnte gezeigt werden (s. 3.3.11), dass – je nach ALX-Konzentration - die Anzahl der β -Zellen unterschiedlich stark reduziert wurde. Die Abbildung 23A zeigt ein unbehandeltes Pankreas; eine deutliche Braunfärbung des Insulins im Cytoplasma der β -Zellen ist zu erkennen. Die Abbildung 23B ist die entsprechende Negativkontrolle, bei der während der Färbung der AK1 weggelassen wurde, so dass das Insulin nicht angefärbt wurde. Die Abbildung 23C zeigt die immunhistochemische Anfärbung eines Pankreas einer mit 40 mg ALX/kg KG iv behandelten Maus; die Mehrzahl der β -Zellen scheint aufgrund einer deutlichen Braunfärbung des Cytoplasmas erhalten zu sein. Das Pankreas einer mit 60 mg ALX/kg KG iv behandelten Maus (Abb. 23D) zeigt eine ausgeprägte Reduktion von intakten β -Zellen. Eine starke Verringerung der Insulinfärbung und damit der Anzahl an intakten β -Zellen ist in Abbildung 23E zu erkennen, bei der es sich um das Pankreas einer mit 80 mg ALX/kg KG iv behandelten Maus handelt. Dieser immunhistochemische Befund verdeutlicht nochmals die Dosisabhängigkeit der ALX-Toxizität wie sie schon unter 4.1.1 dargestellt wurde.



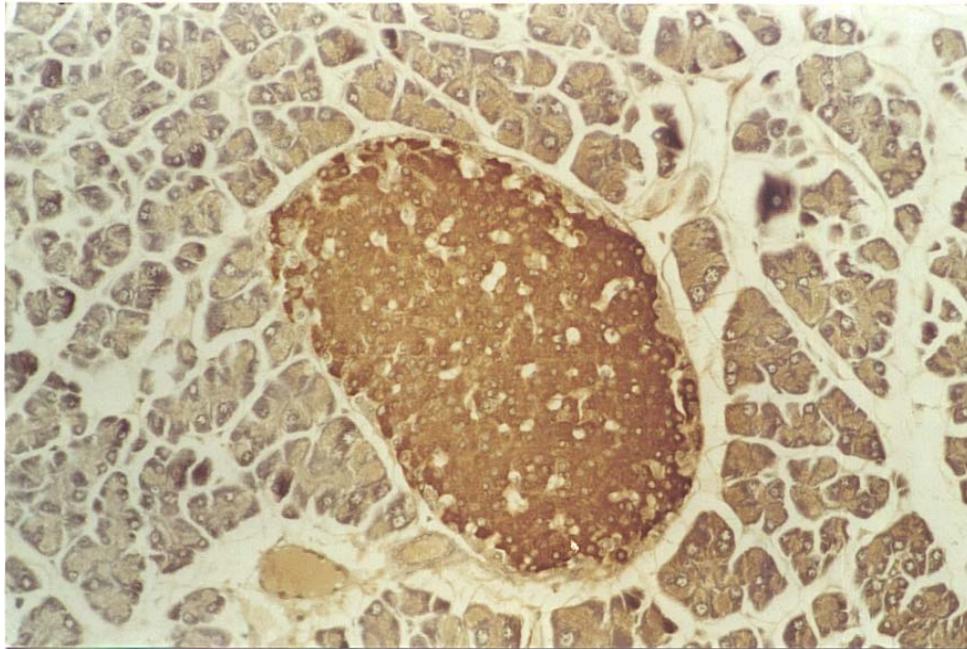
A



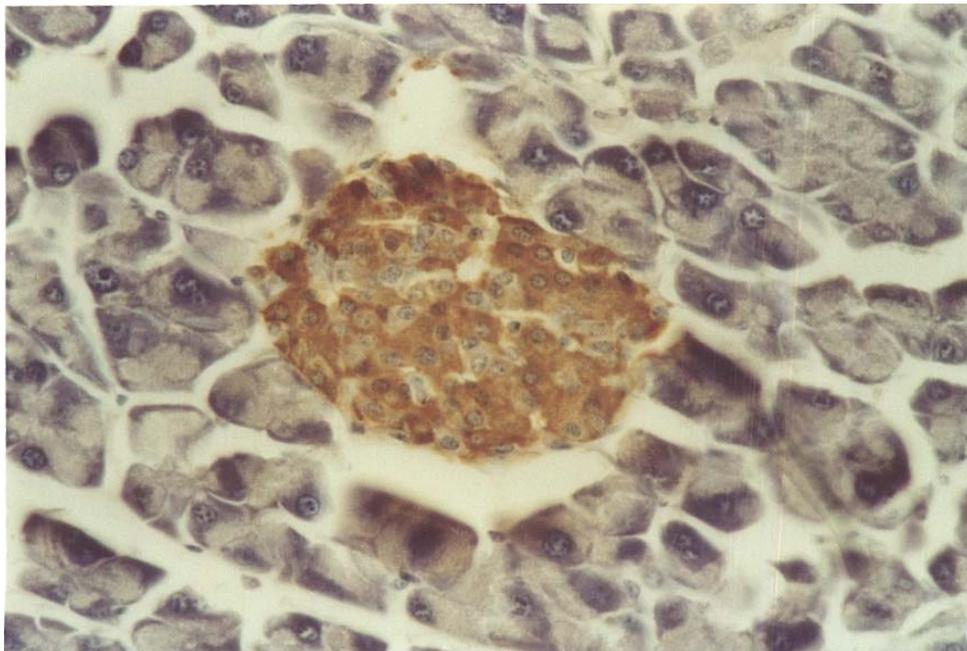
B

**Abbildung 23A und B:
Immunhistochemische Anfärbung von Insulin in pankreatischen Inseln einer unbehandelten Maus**

Repräsentative immunhistochemische Anfärbung von Insulin mit der Immunperoxidase-Methode in Pankreasschnitten einer unbehandelten Maus. (A) Cytoplasmatische Lokalisation von Insulin in den β -Zellen. Verwendet wurde ein Meerschweinchen-anti-Schweine-Insulin-Antikörper. (B) Durch Auslass des Primärantikörpers gegen Insulin blieb die Anfärbung der β -Zellen aus. (400-fache Vergrößerung)



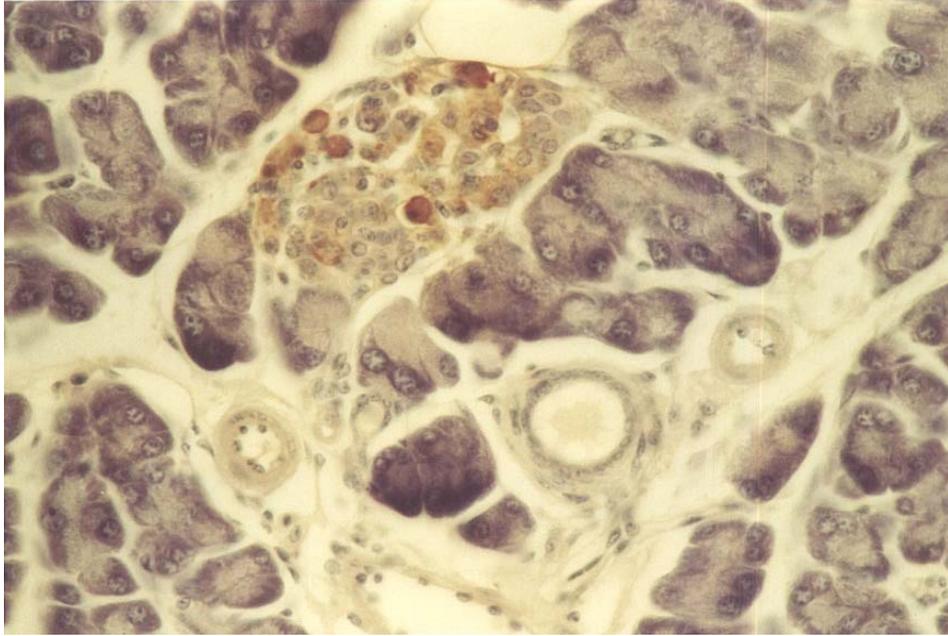
C



D

**Abbildung 23C und D:
Immunhistochemische Anfärbung von Insulin in pankreatischen Inseln von
ALX-behandelten Mäusen**

Repräsentative immunhistochemische Anfärbung von Insulin mit der Immunperoxidase-Methode in Pankreasschnitten ALX-behandelter Mäuse. (C) Pankreas einer Maus, die mit 40 mg ALX/kg KG iv behandelt wurde. Cytoplasmatische Lokalisation von Insulin in den noch überwiegend intakten β -Zellen. (D) Pankreas einer Maus, die mit 60 mg ALX/kg KG iv behandelt wurde. Ausgeprägte Reduktion von intakten Insulin-produzierenden β -Zellen. (400-fache Vergrößerung)



E

Abbildung 23E

Immunhistochemische Anfärbung von Insulin in pankreatischen Inseln von ALX-behandelten Mäusen

Repräsentative immunhistochemische Anfärbung von Insulin mit der Immunperoxidase-Methode in Pankreasschnitten einer Maus, die mit 80 mg ALX/kg KG iv behandelt wurde. Starke Reduktion von intakten Insulin-produzierenden β -Zellen. (400-fache Vergrößerung)

5. Diskussion

Aufbauend auf den Untersuchungen von WANG und GLEICHMANN (1998), die zeigten, dass der GLUT2 die präferentielle, wenn nicht gar selektive Zielstruktur für den induzierten Diabetes mit MLD-STZ ist und den In vitro-Ergebnissen von GAI (1998), die nachwies, dass für ALX sowohl der GLUT2 als auch die Glucokinase Zielstrukturen sind, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, in vivo Zielstrukturen im ALX-induzierten Diabetes zu analysieren.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass 1.) eine iv Injektion von ALX zu einer zeitabhängigen ex vivo Reduktion der mRNA-Expression des GLUT2 und der Glucokinase führt, während die mRNA-Expression von Proinsulin unverändert bleibt; 2.) die einmalige iv Vorbehandlung mit D-G signifikant vor der Reduktion der mRNA-Expression des GLUT2 und der Glucokinase schützt; 3.) die iv Vorbehandlung mit D-G eine ALX-induzierte Hyperglykämie zwar verhindert, jedoch nicht vor einer eingeschränkten oGT in euglykämischen Mäusen schützt; 4.) das Glucoseanalog 5-T-G in vivo - im Gegensatz zu D-G - einen potenzierenden Effekt auf einen ALX-induzierten Diabetes besitzt; 5.) die Behandlung mit Zn²⁺-angereichertem Trinkwasser die ALX-induzierte Hyperglykämie reduziert und 6.) der Insulingehalt im Pankreas 24 h nach ALX-Injektion signifikant reduziert wurde.

Es wurde zunächst die Dosisabhängigkeit der ALX-induzierten Hyperglykämie in den Mausstämmen C57BL/6 und 129S3 bestimmt, wobei die von uns definierte subtoxische Dosis ($\leq 50\%$ diabetische Tiere) bei 50 mg ALX/kg KG iv lag (Abb. 4 und 5). Diese ALX-Konzentration befindet sich in einer vergleichbaren Größenordnung für sogenannte Schwellenwertkonzentrationen, wie sie für andere Mausstämme beschrieben und in Experimenten anderer Arbeitsgruppen eingesetzt worden ist (MATHEWS und LEITER 1999a, KUBISCH et al. 1994,1997, AHREN und SUNDKVIST 1995, GRANKVIST et al. 1981).

Der Schutzeffekt von hohen Dosen D-G vor einem ALX-induzierten Diabetes wurde schon von anderen Autoren (BOQUIST et al. 1983, CROUCH et al. 1981, ZAWALICH et al. 1973, SCHEYNIUS et al. 1971 u.a.) beschrieben. Wir konnten jedoch zeigen, dass auch bereits wesentlich geringere Konzentrationen von D-G (50, 250 und 500 mg/kg KG im Gegensatz zu 750 mg/kg KG bis 4 g/kg KG der o.g.

Autoren) einen ALX-induzierten Diabetes verhinderten (Abb. 6 und 7). Dieser protektive Effekt von D-G in den von uns verwendeten Konzentrationen bezieht sich jedoch nur auf die Entwicklung einer Hyperglykämie. Bestehen blieb eine eingeschränkte β -Zellfunktion, die als pathologische oGT zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten nach der D-G- und ALX-Injektion diagnostiziert wurde. Diese pathologische oGT persistierte in Mäusen, die über die gesamte Versuchsdauer euglykämisch geblieben waren (Abb. 14). Dieser Befund ist ein eindeutiger Hinweis auf Läsionen durch ALX an der β -Zelle, die unter regulärer Mausdiät klinisch nicht erkennbar waren. Mit der pathologischen oGT stimmig war der Befund des reduzierten pankreatischen Insulingehalts nach der ALX-Injektion (Abb. 18). Ähnliche Langzeiteffekte von ALX, wie z.B. eine eingeschränkte Insulinsekretion, wurden ebenfalls von anderen Autoren beobachtet (AHREN und SUNDKVIST 1995).

In früheren Publikationen (WEAVER et al. 1978a/b, ROSSINI et al. 1975, SCHEYNIUS et al. 1971) wurde über Effekte anderer Glucoseanaloga, z.B. D-Mannose, 3-OMG, D-Galactose u.a. berichtet, die entweder zum Teil vor ALX-Toxizität schützten oder, wie im Fall der D-Galactose, keinen Effekt aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigen wir, dass ein weiteres Glucoseanalog, nämlich die nicht-metabolisierbare 5-T-G, signifikant einen ALX-induzierten Diabetes verstärkte (Abb. 8 und 9), obwohl sich 5-T-G nur durch ein Schwefelatom an C₅ von der D-G unterscheidet. Interessanterweise war der protektive Effekt von 5-T-G im MLD-STZ-induzierten Diabetes demjenigen von D-G überlegen (WANG et al. 1993).

Die Ursache für den potenzierenden Effekt von 5-T-G für die ALX-Toxizität, kann aus unseren Untersuchungen nur vermutet werden. Die Möglichkeit, dass 5-T-G eine vermehrte Aufnahme von ALX über den GLUT2 bewirkt, kann ausgeschlossen werden, da zum einen D-G selbst die Aufnahme von ALX fördert und trotzdem vor dessen Toxizität schützt und zum anderen 3-OMG ebenfalls einen protektiven Effekt besitzt, in dem es die Aufnahme von ALX in die β -Zelle hemmt (MALAISSE-LAGAE et al. 1983, BOQUIST et al. 1983, WEAVER et al. 1978a/b). Es ist vorstellbar, dass 5-T-G an den GLUT2 bindet und seine Transporterfunktion dadurch blockiert, ALX jedoch daraufhin verstärkt auf andere Kanäle bzw. Transportsysteme ausweicht, um in die β -Zelle zu gelangen und dort seine toxische Effekte ausübt. Eine weitere Möglichkeit für die potenzierende Wirkung von 5-T-G besteht in der Bereitstellung zusätzlicher Thiolgruppen an der hochreaktiven Carbonylgruppe C₅, die eine

reduzierende Wirkung auf ALX besitzen. Diese könnten somit den Redoxzyklus zwischen ALX und Dialursäure verstärken, was letztendlich zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen würde. Um den potenzierenden Effekt der 5-T-G aufzuklären, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Verabreichung von Zn^{2+} -angereichertem Trinkwasser schützte zwar nicht vor einem ALX-induzierten Diabetes, bewirkte jedoch eine signifikante Reduktion der Hyperglykämie (Abb. 10). Im Gegensatz dazu beobachteten Minami et al. (1999) keinen protektiven Effekt durch eine Zinkbehandlung im ALX-induzierten Diabetes. Hier ist jedoch anzumerken, dass von den Autoren ein anderer Mausstamm und insbesondere eine höhere, sehr toxische Dosis ALX, welche bereits nach 4 Tagen Blutglucosewerte um 1000 mg/dl induziert hatte, verwendet wurde. In den vorgelegten Untersuchungen hingegen wurde, wie unter 4.1.1 definiert, eine subtoxische ALX-Dosis gespritzt, welche die Haltung der Mäuse mit Hyperglykämie über Wochen ermöglichte. Anders sieht es dagegen im MLD-STZ-induzierten Diabetesmodell aus, in dem Zn^{2+} -angereichertes Trinkwasser vor einer Diabetesentwicklung schützte (OHLY et al. 1998/2000).

Die in dieser Arbeit erzielten Befunde mit 5-T-G und Zn^{2+} -angereichertem Trinkwasser im ALX-induzierten Diabetesmodell weisen neben schon bekannten Forschungsergebnissen daraufhin, dass sich der ALX-induzierte vom MLD-STZ-induzierten Diabetes in seiner Pathogenese unterscheidet. Dies wird zusätzlich durch die fehlende T-zellabhängige Immunantwort und der dadurch ausbleibenden zellulären Infiltration der pankreatischen Inseln, also einer Insulitis, im ALX-Diabetes verdeutlicht. So war auch in diesen Untersuchungen bei der immunhistochemischen Färbung von Pancreata ALX-behandelter Mäuse (Abb. 23A-E) keine Leukozyteninfiltration erkennbar. OHLY et al. (2000) konnten hingegen die durch MLD-STZ-induzierte Insulitis differentiell an ihrer Ausprägung beurteilen.

Von ALX ist bekannt, dass es aufgrund seiner ausgeprägt toxischen Wirkung innerhalb von wenigen Minuten zu irreversiblen Veränderungen in der β -Zelle führt (s.2.3.3). Mit den oben beschriebenen Ergebnissen ist zum ersten Mal gezeigt worden, dass - ex vivo - schon innerhalb der ersten 5 Minuten nach der ALX-Injektion eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression des GLUT2 und innerhalb von 30

min eine signifikante Reduktion der Glucokinase-mRNA-Expression eingetreten ist. Diese beiden für die β -Zellfunktion essentiellen Moleküle scheinen somit primäre, wenn nicht gar selektive Angriffspunkte der ALX-Toxizität darzustellen, denn der mRNA-Gehalt an Proinsulin in der β -Zelle wie auch der Insulingehalt des Pankreas in C57BL/6-Mäusen 3 Stunden nach ALX-Injektion waren unverändert.

Die Reduktion der mRNA-Expression von GLUT2 und Glucokinase geht zeitlich der ALX-induzierten Hyperglykämie voraus, was im Einklang mit der Reduktion des pankreatischen Insulingehalts 24 h nach ALX-Injektion steht. Vergleicht man den Gesamt-RNA-Gehalt pro 1.000 Inseln der jeweiligen Versuchsansätze (Abb. 21 und 22), so ist eine Verringerung des mRNA-Gehalts feststellbar, was für einen graduellen Verlust der absoluten Anzahl an β -Zellen spricht. Da aber die mRNA-Expressionen von GLUT2 und Glucokinase im Verhältnis zu der von β -Aktin gesetzt wurden, kann ausgeschlossen werden, dass die Reduktion nur auf dem Verlust an β -Zellmasse beruht. Die mRNA-Expression von β -Aktin erfährt ebenfalls eine leichte Reduktion, diejenige von GLUT2 und Glucokinase ist jedoch wesentlich ausgeprägter. Desweiteren bleibt die mRNA-Expression von Proinsulin bezogen auf den Gesamt-mRNA-Gehalt pro 1.000 Inseln konstant, so dass ein experimentell bedingter Artefact ausgeschlossen werden kann.

Die Reduktion der mRNA von GLUT2 und Glucokinase konnte durch Vorbehandlung mit einer relativ geringen Dosis D-G weitgehend verhindert werden. Dieses Ergebnis läßt darauf schliessen, dass der Schutzeffekt von D-G nicht nur am GLUT2, sondern auch in der β -Zelle ausgeübt wird. Es ist anzunehmen, dass eine hohe Dosis D-G die mRNA des GLUT2 und der Glucokinase vollständig vor einer ALX-induzierten Schädigung schützen könnte. Dies müßte in einem gesonderten Experiment überprüft werden.

Seit einigen Jahren wird generell angenommen, dass ALX durch die Generierung von ROS (Abb. 3) die β -Zelle schädigt (OBERLEY 1988, OKAMOTO 1981, TIBALDI 1979, HEIKKILA 1976). Es handelt sich hierbei in erster Linie um Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (HO^{\bullet}), von denen die HO^{\bullet} das größte toxische Potential besitzen (SATO und BREMNER 1993) und über die Haber-Weiss- und Fentonreaktion in Anwesenheit von katalysierendem Eisen aus

$O_2^{\bullet -}$ und H_2O_2 gebildet werden (JÖRNS et al. 1999, WINTERBOURN und MUNDAY 1989).

Die von OKAMOTO (1981), UCHIGATA et al. (1982) und YAMAMOTO et al. (1981a/b) propagierte Hypothese zur β -Zellzerstörung durch ALX-generierte ROS muß nach neueren Erkenntnissen revidiert werden. Die Autoren definieren die DNA der β -Zelle als die primäre Zielstruktur für ALX-generierte reaktive Metabolite, wobei die daraus resultierenden DNA-Strangbrüche zu einer Aktivierung der PARP mit anschließender Erschöpfung des NAD^+ -Pools führen und damit der Zelltod eingeleitet wird. Die Fähigkeit zur Induktion der PARP durch ALX oder STZ wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt. Während YAMAMOTO et al. (1981a/b) zeigten, dass sowohl STZ als auch ALX zu einer Induktion der PARP führen, wurde dieses durch SANDLER und SWENNE (1983) nur für STZ bestätigt. Da weder Nicotinamid noch NADPH einen protektiven Effekt auf die ALX-induzierte Hemmung der Insulinfreisetzung und Proinsulin-Biosynthese haben (SANDLER et al. 1984), muß davon ausgegangen werden, dass ALX zunächst andere essentielle Moleküle der β -Zelle angreift. Möglicherweise beruhen die unterschiedlichen Befunde auf unterschiedlichen experimentellen Protokollen, wie z.B. auf unterschiedlichen Dosen.

GLUT2 und Glucokinase als zentrale Strukturen des Glucoseerkennungssystem (s.2.2) sind daher besser geeignet, die schnellen, durch ALX verursachten Veränderungen an der β -Zelle zu erklären, wie z.B. die abrupte Unterbindung der Insulinsekretion und die Beobachtung, dass nur die Glucose-stimulierte Insulinsekretion durch ALX gehemmt wird und nicht die anderer Sekretagoga, wie z.B. Glycerinaldehyd, Tolbutamid (HENQUIN et al. 1979) oder Arginin (unveröffentlichte Daten, Dr. Gai).

Wie ist nun zu erklären, dass die in der β -Zelle entstehenden ROS differentiell toxisch auf die mRNA der essentiellen Moleküle GLUT2 und Glucokinase wirken?

Dies ist sicher nur durch das Zusammenspiel mehrerer Komponenten möglich. Eine entscheidende Rolle spielt dabei der Antioxidantienstatus der β -Zelle, denn auch physiologischerweise werden permanent ROS innerhalb und außerhalb des zellulären Kompartiments gebildet, z.B. durch endozytierende Leukozyten, mittels der Xanthin-Oxidase oder in der Atmungskette. Die Zellen schützen sich zum einen

durch spezifische Abwehrenzyme vor einer Schädigung durch ROS. Dazu gehören die SOD, die Katalase und die GPx, die jeweils spezifisch $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 und Lipidperoxide neutralisieren. Zum anderen bieten unspezifische Moleküle zusätzlichen Schutz vor reaktiven Substanzen, wie z.B. Tocopherol, Vitamin C und β -Carotin.

Spezifische Abwehrsysteme gegen die hochtoxischen HO^{\bullet} werden noch diskutiert. Zunehmende Bedeutung erlangt in diesem Zusammenhang das cytosolische Protein Metallothionein (MT). Im Laufe der letzten Jahre weisen Forschungsergebnisse daraufhin, dass MT - neben seiner Fähigkeit Schwermetalle zu binden – ebenfalls ein Scavenger von HO^{\bullet} ist. THORNALLEY und VASAK (1985) sowie KUMARI et al. (1998) wiesen in In vitro-Untersuchungen mit Rattenleber eine deutliche Radikal-Scavenger-Fähigkeit von MT nach. OHLY et al. (2000) zeigten, dass Zn^{2+} -angereichertes Trinkwasser eine Hochregulation von MT in pankreatischen Inseln zur Folge hat und hypothetisierten, dass Zink-induziertes MT durch Abfangen von MLD-STZ-generierten HO^{\bullet} die β -Zellen vor Toxizität und Diabetes schützte.

Warum schützte Zn^{2+} -angereichertes Trinkwasser nicht so effektiv vor dem ALX-induzierten Diabetes verglichen mit MLD-STZ? Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine einzelne Dosis ALX aufgrund seines Redox-Zyklus kontinuierlich mehr ROS generiert, so dass die β -Zelle mit MT-Hochregulation durch Zink nicht genügend Antioxidantien als Abwehrsysteme gegen die toxischen ROS aufbauen kann.

Untersuchungen von LENZEN et al. (1996) ergaben, dass in Mäusen die Gewebe von Lunge, Leber und Niere eine deutlich höhere Expression der antioxidativen Enzyme SOD, Katalase und GPx gegenüber der Expression in pankreatischen Inseln aufwiesen, mit der Ausnahme, dass GPx in den β -Zellen nicht nachweisbar war. Ergänzt wurden diese Ergebnisse durch weitere Untersuchungen desselben Labors (TIEDGE et al. 1997). So wurden in der Insulin-produzierenden Tumorzelllinie RINm5F und in Inseln der Ratte nur sehr geringe Mengen der genannten Antioxidantien gegenüber einer Vielzahl anderer Gewebe gefunden. Desweiteren konnten die Autoren zeigen, dass β -Zellen im Gegensatz zu anderen Geweben nicht in der Lage sind, auf Stresssituationen, wie z.B. Hitzeschock, mit einer Adaptation ihrer Antioxidantien zu reagieren. Somit kommen die Autoren zu dem Schluß, dass

die hohe Sensitivität der β -Zellen gegenüber toxischen Noxen wie ALX durch ihren geringen Gehalt an antioxidativen Substanzen bedingt ist.

MATHEWS und LEITER (1999a) beobachteten in den von ihnen untersuchten Pankreata ALX-resistenter und ALX-sensitiver Mäuse signifikante Unterschiede in der Aktivität der SOD, der Glutathion-Reduktase und GPx. Sie schlossen aus ihren Befunden, dass die ALX-Resistenz dieser Mäuse in einem genetisch bedingten aufregulierten Antioxidantienstatus begründet liegt. Kurze Zeit später (1999b) zeigten dieselben Autoren in Rückkreuzungsversuchen dieser beiden Mausstämmen, dass diese ALX-Resistenz gegenüber freien Radikalen dominant vererbt wird.

Die Bedeutung des Antioxidantienstatus für die Sensitivität von β -Zellen gegenüber reaktiven Metaboliten wird noch durch Untersuchungen belegt, in denen durch Transfektion eine Überexpression der GPx und der Katalase in RINm5F-Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber ROS erzielt wurde (TIEDGE et al. 1998). Desweiteren führte in vivo die systemische Überexpression der cytosolischen CU/Zn-SOD in Mäusen zu einer erhöhten Toleranz gegenüber ALX und STZ (KUBISCH et al. 1994). Die Autoren spezifizierten 1997 ihre Ergebnisse, indem sie durch gezielte Überexpression der CU/Zn-SOD in den β -Zellen der Maus deren Aktivität um 50% steigerten und damit einer ALX-induzierten Hyperglykämie vorbeugen konnten.

Tatsächlich scheint die pankreatische β -Zelle der Maus im Vergleich zu anderen Nagern oder gar dem Menschen den geringsten Gehalt an Antioxidantien und Hitzeschockproteinen aufzuweisen (EIZIRIK 1996, WELSH et al. 1995). Dies könnte erklären, warum die humane β -Zelle gegenüber der ALX-Toxizität wesentlich resistenter ist. Eine entscheidende Rolle spielt in diesem Zusammenhang die abweichende Expression der verschiedenen Isoformen der GLUT. Die humane β -Zelle exprimiert den GLUT2 nur in geringen Mengen (SCHUIT 1996, DE VOS 1995), da der Glucosetransport in die humane β -Zelle in erster Linie von GLUT1 und GLUT3, beides Glucosetransporter mit einer geringen K_m , getragen wird (SCHUIT 1997/1996).

Die Bedeutung des GLUT2 und der Glucokinase für die Glucosehomöostase wurde bereits ausführlich beschrieben. Es ist daher leicht verständlich, dass eine Reduktion der mRNA-Expression und damit der Proteinsynthese dieser beiden Moleküle enorme Auswirkungen auf die Funktionstüchtigkeit der β -Zelle besitzt. Schon Anfang

der 90er Jahre wurde im Nager-Diabetesmodell gezeigt, dass eine Reduktion der GLUT2 mRNA- und Proteinexpression zu einer Reduktion bzw. dem Verlust der Glucose-stimulierten Insulinfreisetzung führt (ORCI et al. 1990, UNGER 1991, WANG und GLEICHMANN 1998). Diese Funktionseinschränkung der β -Zelle wird noch durch die ALX-induzierte Hemmung der Glucokinase-Aktivität verstärkt, da dies ebenfalls zu einem Abbruch der Insulinsekretion führt (s.2.3.5.4).

Eine mögliche Erklärung für den präferentiellen Angriff der ALX-generierten ROS auf die mRNA des GLUT2 und der Glucokinase wären spezifische Signale in der β -Zelle, die gezielt die reaktiven Intermediate der Gentranskription von GLUT2 und Glucokinase zuführen. Desweiteren müsste die mRNA-Halbwertszeit von GLUT2 und Glucokinase im Vergleich zu der von Proinsulin untersucht werden. Da die bedeutendste Aufgabe der β -Zelle die Produktion von Insulin ist, wird das Gen für Proinsulin in weit höherem Mengen und kontinuierlich transkribiert, während die mRNA-Expression von GLUT2 und Glucokinase in pankreatischen β -Zellen entsprechend des Glucoseangebots reguliert wird (TIEDGE und LENZEN 1991). Es ist daher vorstellbar, dass Schwankungen in dem Gehalt an Proinsulin-mRNA, wie sie durch eine ALX-Behandlung hervorgerufen werden, ohne direkt sichtbaren Einfluß bleiben, während die mRNA von GLUT2 und Glucokinase sensitiver auf die generierten ROS reagiert und hier schon kleine Schwankungen im mRNA-Gehalt deutlich zu Tage treten.

In diesem Zusammenhang spielen Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass ALX und STZ in Mäusen zu einer Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF κ B führen. Physiologischerweise erfolgt die Aktivierung durch oxidativen Streß, Xenobiotika, Virusinfekte oder proinflammatorische Cytokine. Die ALX- bzw. STZ-induzierte Aktivierung von NF κ B konnte durch Vorbehandlung mit dem Radikalfänger α -Phenyl-tert-butylnitron oder der GSH-Vorstufe N-Acetylcystein verhindert werden (HO et al. 1999/2000). Ob möglicherweise die mit der NF κ B-Aktivierung verbundene Steigerung inflammatorischer Reaktionen über ROS als Mediatoren zu einer Down-Regulation von bestimmten Genen, darunter GLUT2 und Glucokinase führt, bleibt zu untersuchen.

Zusammenfassend kann aus den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen geschlossen werden, dass ALX nicht ubiquitär in der β -Zelle wirkt oder diese ungerichtet zerstört, sondern vielmehr spezifische Strukturen, wie die mRNA von GLUT2 und Glucokinase, angreift. Es muss jedoch noch geklärt werden, worin die Gründe für den protektiven Effekt der D-G und den potenzierenden Effekt der 5-T-G gegenüber der ALX-Toxizität liegen und inwieweit ALX-induzierte Radikale selektiv wirksam sind, oder ob diese Selektivität auf anderen Mechanismen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, beruht.

Um die Ätiologie und Pathogenese einer derart multifaktoriellen Krankheit wie die des Diabetes mellitus in Human- und Veterinärmedizin aufzuklären und geeignete präventive Maßnahmen benennen zu können, bedarf es noch weiterer intensiver Forschungen.

6. Zusammenfassung

(Molekulare Zielstrukturen im Alloxan-induzierten Diabetesmodell der Maus, Sabine Schulte im Walde, Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie und Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Januar 2003, 110 Seiten, 23 Abbildungen, 1 Tabelle, 145 Referenzen, 5 Farbbilder, Life Sciences 71 (2002) 1681-1694)

Alloxan (ALX) ist ein klassisches Diabetogen, welches in Nagetieren spezifisch pankreatische β -Zellen zerstört und Symptome induziert, die dem humanen Typ-1-Diabetes vergleichbar sind. Durch eine einmalige, intravenöse (iv) Injektion einer subtoxischen Dosis von 50 mg ALX/kg Körpergewicht (KG) werden Schäden an der β -Zelle hervorgerufen, die innerhalb von 48-72 Stunden in $\leq 50\%$ der Mäuse einen Diabetes auslösen (Schwellenwert Euglykämie zu Hyperglykämie ist 11,1 mmol/l). Das toxische Potential von ALX besteht in der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vorwiegend Superoxidanion-, Wasserstoffperoxid- und Hydroxylradikalen. Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob durch ALX präferentiell Strukturen der β -Zelle zerstört werden, die essentiell für die β -Zellfunktion – die Insulinproduktion – sind. Diese sind u.a. der Glucosetransporter 2 (GLUT2), die Glucokinase und das Proinsulin. Daran anschliessend stellte sich die Frage, ob ALX-Toxizität durch Vorbehandlung mit D-Glucose (D-G), 5-Thio-D-Glucose (5-T-G) oder mit Zink-angereichertem Trinkwasser – zur Anreicherung des Antioxidants Metallothionein - verhindert werden kann.

Hierzu wurden männliche C57BL/6- und 129S3-Mäuse entweder einmalig iv mit D-G oder 5-T-G vorbehandelt oder die Mäuse erhielten eine Woche vor der ALX-Injektion und über die gesamte Versuchsdauer hinweg Zink-angereichertes Trinkwasser. Anschliessend wurde der Einfluss auf den ALX-induzierten Diabetes, die orale Glucosetoleranz und die mRNA-Expression der oben genannten Gene mittels RT-PCR untersucht. Der Gesamtinsulingehalt der ALX-behandelten Pancreata wurde über die Bestimmung des immunreaktiven Insulins ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass 1.) die Vorbehandlung mit D-G den ALX-induzierten Diabetes signifikant ($p \leq 0,001$) verhinderte; 2.) trotz Euglykämie in

mit D-G- und ALX-behandelten Mäusen eine pathologische orale Glucosetoleranz über Wochen als ALX-Folgeschaden persistierte; 3.) die Vorbehandlung mit 5-T-G, dem chemisch der D-G ähnlichsten Analog, jedoch den ALX-induzierten Diabetes signifikant ($p \leq 0,001$) potenzierte; 4.) Zink-angereichertes Trinkwasser die ALX-induzierte Hyperglykämie signifikant ($p \leq 0,001$) reduzierte; 5.) ALX zunächst die mRNA-Expression des GLUT2 signifikant ($p \leq 0,001$) reduzierte und nachfolgend auch signifikant ($p \leq 0,05$) die mRNA-Expression der Glucokinase, wenn auch weniger ausgeprägt als für die GLUT2-Expression; 6.) ALX keine Veränderung der mRNA-Expression von Proinsulin auslöste; 7.) die Vorbehandlung mit D-G signifikant ($p \leq 0,05$) die ALX-induzierte Reduktion der mRNA-Expression von GLUT2 und der Glucokinase verhinderte und 8.) der Insulingehalt im gesamten Pankreas 24 h nach ALX-Injektion signifikant ($p \leq 0,05$) reduziert wurde.

Es wird geschlussfolgert, dass der GLUT2 und die Glucokinase primäre Zielstrukturen der ALX-Toxizität unter den verwendeten Versuchsbedingungen sind. Diese Läsionen sind die Ursache für den Diabetes. Durch Vorbehandlung mit D-G können der GLUT2 und die Glucokinase vor ALX-Toxizität geschützt werden, obwohl trotz Euglykämie unter physiologischen Bedingungen eine pathologische orale Glucosetoleranz als ALX-Folgeschaden in den Mäusen persistierte. Es muß noch geklärt werden, worin die Gründe für den protektiven Effekt der D-G und den potenzierenden Effekt der 5-T-G liegen und inwieweit ALX-induzierte Radikale selektiv wirksam sind, oder ob diese Selektivität auf anderen Mechanismen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, beruht.

Letztendlich zeigen diese Befunde, dass sich der pathogenetische Mechanismus von ALX von anderen Diabetogenen unterscheidet, wie z.B. Streptozotocin, welches selektiv den GLUT2 schädigt, der durch Vorbehandlung mit 5-T-G vor der Streptozotocin-Toxizität geschützt werden kann. Daraus ist abzuleiten, dass es in der Präventivmedizin unterschiedlicher Vorsorgemaßnahmen bedarf, um Risikopatienten vor der Manifestation eines Diabetes mellitus zu schützen.

7. Summary

(Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice, Sabine Schulte im Walde, Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology and German Diabetes Research Institute at the Heinrich-Heine-University of Duesseldorf, January 2003, 111 pages, 23 figures, 1 table, 145 references, 5 photographs, Life Sciences 71 (2002) 1681-1694)

Type 1 diabetes results from irreversible damage of insulin-producing β -cells. In laboratory animals, diabetes can be induced with alloxan (ALX). ALX is a potent generator of reactive oxygen species (ROS), which can mediate β -cell toxicity. However, the initial lesions on essential β -cell structures are not known. In this study, we analyzed the effect of ALX on the glucose transporter 2 (GLUT2), glucokinase and proinsulin.

For this purpose, we investigated the effect of pretreatment with the glucose analogues D-glucose (D-G) and 5-thio-D-glucose (5-T-G), as well as with zinc-enriched drinking water to induce the antioxidant metallothionein, on ALX-induced diabetes, on oral glucose tolerance (OGT) and on the mRNA-expression of the above mentioned genes with semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction in male C57BL/6 and 129S3 mice. The total insulin content of ALX-treated pancreata was determined as immune reactive insulin.

One single intravenous (iv) injection of 50 mg ALX/kg body weight (bwt) induced diabetes in $\leq 50\%$ of mice of both strains (blood glucose level ≥ 11.1 mmol/l). One single iv preinjection of D-G prevented significantly ($p \leq 0.001$) diabetes in both strains, yet, in these euglycemic mice, an impaired OGT persisted. In contrast, pretreatment with a single injection of 5-T-G potentiated significantly ($p \leq 0.001$) the toxicity of ALX. Administration of zinc-enriched drinking water, however, reduced ALX-induced hyperglycemia ($p \leq 0.001$). The mRNA-expression of GLUT2 and glucokinase was time-dependently reduced and the effect was more pronounced for GLUT2 ($p \leq 0.001$) than for glucokinase ($p \leq 0.05$). Pretreatment with D-G protected against the mRNA-reduction of both GLUT2 and glucokinase ($p \leq 0.05$). Interestingly, the mRNA-expression of proinsulin remained unaffected as well as the pancreatic total insulin

content. A significant ($p \leq 0.05$) reduction of pancreatic insulin content was found 24 h after ALX-treatment.

In conclusion, ALX exerts differential toxicity on essential β -cell structures. This toxic effect was more pronounced for GLUT2 than for glucokinase mRNA. Pretreatment with D-G prevented ALX-toxicity, whereas in euglycemic mice an impaired OGT persisted. It has to be elucidated, whether ALX-induced ROS select essential β -cell structures or whether, as one possibility, transcription factors in the β -cell are specifically directing ROS to GLUT2 and glucokinase mRNA.

Finally, these results differ from those obtained with other diabetogens, e.g., streptozotocin, which exerts selective toxicity on the GLUT2 and which is prevented by 5-T-G. However, diabetogens damage β -cell function through different pathogenic pathways and, therefore, different interventional regimen may be required to prevent type 1 diabetes in individuals at risk.

8. Literaturverzeichnis

1. ABDEL-RAHMAN, M.S., F.I. ELRAKHAWY und F.A. ISKANDER (1992)
Protection of β -cells against the effect of alloxan
Toxicology Letters 63, 155-164
2. AHREN, B. und G. SUNDKVIST (1995)
Long-term effects of alloxan in mice
Internat. J. of Pancreatology 17 (2), 197-201
3. ALONSO, S., A. MINTY, Y. BOURLET, und M. BIRMINGHAM (1986)
Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates
J. Mol. Evol. 23 (1), 11-22
4. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (1994)
Nutrition recommendations and principles for people with diabetes mellitus
Diabetes Care 17, 519-522
5. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2002)
Clinical practice recommendations
Diabetes Care 25 (suppl 1), 1-148
6. ANDERSON, J.W., W.R. MIDGLEY, und B. WEDMAN (1979)
Fiber and Diabetes
Diabetes Care 2 (4), 369-379
7. ATKINS, C.E. und H.P. CHIN (1983)
Insulin kinetics in juvenile canine diabetics after glucose loading
Am. J. Vet. Res. 44 (4), 596-600
8. ATKINS, C.E., J.R. HILL, und R.K. JOHNSON (1979)
Diabetes mellitus in the juvenile dog: A report of four cases
JAVMA 175 (4), 362-368

9. ATKINS, C.E. und M.J. MACDONALD (1987)
Canine diabetes mellitus has a seasonal incidence: Implications relevant to human diabetes
Diabetes Research 5, 83-87
10. BAILEY, O.T., C.C. BAILEY, und W.H. HAGEN (1944)
Alloxan diabetes in rabbit: Consideration of morphological and physiological changes
Am. J. Med. Sci. 208, 450
11. BELL, G.I., S.J. PILKIS, I.T. WEBER, und K.S. POLONSKY (1996) Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus
Annu. Rev. Physiol. 58, 171-186
12. BELL, G.L., T. KAYANO, J.B. BUSE, C.F. BURANT, J. TAKEDA, D. LON, H. FUKUMOTO und S. SEINO (1990)
Molecular biology of mammalian glucose transporters
Diabetes Care 13, 198-208
13. BLAXTER, A.C., P.J. CRIPPS und T.J. GRUFFYDD-JONES (1990)
Dietary fibre and post prandial hyperglycemia in normal and diabetic dogs
J. Small. Anim. Pract. 3,: 229-233
14. BOQUIST, L. (1977)
The endocrine pancreas in early alloxan diabetes
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. 85, 219-229
15. BOQUIST, L. und T. BOSTRÖM (1985)
Alloxan effects on mitochondria in vitro, studied with regard to inhibition of mitochondrial aconitase
Diabetes & Metabolisme 11, 232-237
16. BOQUIST, L. und R. LORENTZON (1979)
Stereological study of endoplasmic reticulum, Golgi complex and secretory granules in the beta cells of normal and alloxan-treated mice
Virchows Arch. B 31, 235-241

17. BOQUIST, L., L. NELSON und R. LORENTZON (1983)
Uptake of labeled alloxan in mouse organs and mitochondria in vivo and in vitro
Endocrinology 113 (3), 943-948
18. BORG, L.A.H., S.J. EIDE, A. ANDERSSON UND C. HELLERSTRÖM (1979)
Effects in vitro of alloxan on the glucose metabolism of mouse pancreatic β -cells
Biochem. J. 182, 797-802
19. CARROLL, B.P., A.S. MOURA, E. ROJAS, und I. ATWATER (1994)
The diabetogenic agent alloxan increases K^+ permeability by a mechanism involving activation of ATP-sensitive K^+ -channels in mouse pancreatic β -cells
Mol. Cell. Biochem. 140, 127-136
20. CHOMCZYNSKI, P. und N. SACCHI (1987)
Singlestep method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction
Anal. Biochem. 162, 156-159
21. COLCA, J.R., N. KOTAGAI, C. BROOKS, P.E. LACY, M. LANDT und M.L. MC DANIEL (1983)
Alloxan inhibition of a Ca^{2+} - and calmodulin-dependent protein kinase activity in pancreatic islets
J. Biol. Chem. 258 (12), 7260-7263
22. COOPERSTEIN, S.J. und A. LAZAROW (1969)
Fluid compartments of islet and other tissues of the toadfish *Opsanus tau*
Am. J. Physiol. 217, 1784-1788
23. COOPERSTEIN, S.J. und D. WATKINS (1977)
Effect of alloxan on islet tissue permeability: protection and reversal by NADPH
Biochem. Biophys. Res. Com. 79, 756-762
24. COOPERSTEIN, S.J. und D. WATKINS (1981)
Action of toxic drugs on islet cells
In: Cooperstein SJ, Watkins D (eds). The Islets of Langerhans by Academic Press, Inc., New York, ISBN 0-12-187820-1, 387-425

25. CRENSHAW, K.L. und M.E. PETERSON (1996)
Pretreatment clinical and laboratory evaluation of cats with diabetes mellitus:
104 cases (1992-1994)
JAVMA 209 (5), 943-949
26. CROUCH, R.K., S.E. GANDY, G. KIMSEY, R.A. GALBRAITH, G.M.P.
GALBRAITH und M.G. BUSE (1981)
The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs
Diabetes 30, 235-241
27. DAHME, E., A. HAFNER, C. REUSCH und P. SCHMIDT (1989)
Diabetische Neuropathie bei Hund und Katze - eine bioptisch-elektronen-
mikroskopische Studie
Tierärztl. Praxis 17, 177-188
28. DE VOS, A., H. HEIMBER, E. QUARIERT, P. HUYPENS, L. BOUWENS, D.
PIPELEERS und F. SCHUIT (1995)
Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase
gene expression
J. Clin. Invest. 96, 2489-2495
29. DEAN, D.M. und E.K. MATTHEWS (1972)
The bioelectrical properties of pancreatic islet cells: Effect of diabetogenic
agents
Diabetologia 8, 173-178
30. DREWS, G., C. KRÄMER, M. DÜFER und P. KRIPPEIT-DREWS (2000)
Contrasting effects of alloxan on islets and single mouse pancreatic β -cells
Biochem. J. 352, 389-397
31. DUNN, J.S. und N.G.B. MCLETCHIE (1943)
Experimental alloxan diabetes in the rat
Lancet II, 384
32. EISENBARTH, G.S. (1986)
Type I diabetes mellitus: A chronic autoimmune disease
New Engl. J. Med. 314, 1360-1368

33. EIZIRIK, D.L. (1996)
Beta-cell defence and repair mechanisms in human pancreatic islets
Horm. Metabol. Res. 28, 302-305

34. FELDMAN, E.C. und R.W. NELSON (1987)
Canine and feline endocrinology and reproduction
W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1. Auflage, 229-273

35. FISCHER, L.J. und S.A. HAMBURGER (1980)
Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator
Diabetes 29, 213-216

36. FRIEDGOOD, C.A. und A.A. MILLER (1945)
Alloxan in pregnant rats
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59, 62

37. GAI, W. (1998)
Glucose transporter 2 and glucokinase are target molecules for alloxan-induced toxicity in pancreatic β -cells of mice in vitro
(Dissertation med.) Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

38. GORUS, F.K., W.J. MALAISSE und D.G. PIPELEERS (1982)
Selective uptake of alloxan by pancreatic β -cells
Biochem. J. 208, 513-515

39. GOTOH, M., T. MAKI, T. KIYOIZUMI, S. SATOMI und A.P. MONACO (1985)
An improved method for isolation of mouse pancreatic islets
Transplantation 40 (4), 437-438

40. GOTO, Y., Y. SEINO, T. TOMOHIKO, Y. INOUE, S. KADOWAKI, K. MORI und H. Imura (1978)
Modulation by alloxan of glucagon and insulin secretion in the isolated perfused rat pancreas. Endocrinology 102, 1496-1500

41. GRANKVIST, K., A. LERNMARK und I.B. TÄLJEDAL (1977)
Biochem. J. 162, 19-24

42. GRANKVIST, K., S. MARKLUND und I.B. TÄLJEDAL (1981)
Alloxan cytotoxicity in vitro. Microscope photometric analyses of Trypan Blue uptake by pancreatic islet cells in suspension. Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes
Nature 294, 158-160
43. GUNNARSSON, R. und R. HELLERSTROM (1973)
Acute effects of alloxan on the metabolism and inulin secretion of the pancreatic B-cell
Hormon Metabol. Res. 5, 404-409
44. HAMMARSTRÖM, L. und S. ULLBERG (1966)
Specific uptake of labelled alloxan in the pancreatic islets
Nature 212, 708-709
45. HARD, W.L. und C.J. CARR (1944)
Experimental diabetes produced by alloxan
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 55, 214
46. HATCHELL, D.L., C.A. TOTH, C.A. BARDEN und P. SALOUPIS (1995)
Diabetic retinopathy in a cat
Exp. Eye Res. 60, 591-593
47. HEIKKILA, R.E., B. WINSTON und G. COHEN (1976)
Alloxan-induced diabetes - evidence for hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate
Biochem. Pharm. 25, 1085-1092
48. HENQUIN, J.C., P. MALVAUX und A.E. LAMBERT (1979)
Alloxan-induced alteration of insulin release, rubidium efflux and glucose metabolism in rat islets stimulated by various secretagogues
Diabetologia 16, 253-260
49. HO, E., G. CHEN und T.M. BRAY (1999)
Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NF κ B activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice
FASEB J. 13, 1845-1854

50. HO, E., G. CHEN und T.M. BRAY (2000)
Alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) inhibits NF κ B activation offering protection against chemically induced diabetes
Free Rad. Biol. Med. 28 (4), 604-614

51. HOENIG, M. (1999)
Diagnose des Diabetes mellitus bei der Katze
Kleintier konkret 3/99

52. HOENIG, M. und D.L. DAWE (1999)
A qualitative assay for beta cell antibodies. Preliminary results in dogs with diabetes mellitus
Vet. Immunology and Immunopathology 32, 195-203

53. HOYER-HOTT, M.A., C. REUSCH und G. MINKUS (1995)
Glykosylierte Hämoglobine (GHb) bei der Katze: Affinitätschromatographische Bestimmung bei gesunden, permanent (Diabetes mellitus) und passager hyperglykämischen Katzen
Tierärztliche Praxis 23,155-161

54. JOHNSON, J.H., C.B. NEWGARD, J.L. MILBURN, H.F. LODISH und B. THORENS (1990)
The high K_m glucose transporter of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence
J. Biol. Chem. 265: 6548-6551

55. JÖRNS, A., R. MUNDAY, M. TIEDGE und S. LENZEN (1997)
Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated islets in vitro
Endocrinology 139, 283-293

56. JÖRNS, A., M. TIEDGE, S. LENZEN und R. MUNDAY (1999)
Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro
Free Rad. Biol. Med. 26 (9/10), 1300-1304

57. KANEKO, J.J., M. KAWAMOTO, A.A. HEUSNER, E.C. FELDMAN und I. KOIZUMI (1992)
Evaluation of serum fructosamine concentration as an index of blood glucose control in cats with diabetes mellitus
Am. J. Vet. Res. 53 (10), 1797-1801
58. KIM, H.R., H.W. RHO, B.H. PARK, J.W. PARK, J.S. KIM, U.H. KIM und M.Y. CHUNG (1994)
Role of Ca²⁺ in alloxan-induced pancreatic β -cell damage
Biochim. Biophys. Acta 1227, 87-91
59. KIRSCH, M. und C. REUSCH (1993)
Urinbefunde bei Hunden mit Diabetes mellitus. – Gibt es eine diabetische Nephropathie beim Hund?
Tierärztliche Praxis 21, 345-348
60. KNICK, B. und J. KNICK (1997)
Diabetologie
4. Auflage. Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart/Deutschland
61. KRAMER, J.W., S. NOTTINGHAM, J. ROBINETTE, G. LENZ, S. SYLVESTER und M.I. DESSOUKY (1980)
Inherited, early onset, insulin-requiring diabetes mellitus of Keeshond dogs
Diabetes 29: 558-565
62. KUBISCH, H.M., J. Wang, T.M. BRAY und J.P. PHILIPS (1997)
Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic β -cells against oxidative stress
Diabetes 46, 1563-1566
63. KUBISCH, H.M., J. WANG, R. LUCHE, E. CARLSON, T.M. BRAY, C.J. EPSTEIN und J.P. PHILIPS (1994)
Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type 1 diabetes
Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 9956-9959

64. KUMARI, M.V.R., M. HIRAMATSU und M. EBADI (1998)
Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II
Free Rad. Res. 29, 93-101
65. LAZAROW, A. (1946)
Protective effect of glutathione and cysteine against alloxan diabetes in the rat
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 61, 441
66. LAZAROW, A. und J.W. PATTERSON (1948)
The mechanism of glutathione and cysteine protection against alloxan diabetes
Science 108, 308
67. LENZEN, S., F.H. BRAND und U. PANTEN (1988a)
Structural requirements of alloxan and ninhydrin for glucokinase inhibition and
of glucose for protection against inhibition
Br. J. Pharmacol. 95, 851-859
68. LENZEN, S., S. FREYTAG und U. PANTEN (1988b)
Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the
sugar-binding site of the enzyme
Mol. Pharm. 34, 395-400
69. LENZEN, S. und U. PANTEN (1988c)
Alloxan: history and mechanism of action
Diabetologia 31, 337-342
70. LENZEN, S., J. DRINKGERN und M. TIEDGE (1996)
Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with
various other mouse tissues
Free Rad. Biol. Med. 20 (3), 463-466
71. LENZEN, S. und M. MIRZAIIE-PETRI (1992)
Inhibition of aconitase by alloxan and the differential modes of protection of
glucose, 3-O-methylglucose, and mannoheptulose
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 346, 532-536

72. LETTOW, E., M. OPITZ, H. BRIEGER, A.T. MAHROUS, D. KABISCH und H. LOPPNOW (1983)
Juveniler Diabetes mellitus bei einem Hund
kleintierpraxis 28, 119-136
73. LING, G.V., L.J. LOWENSTINE, L.T. PULLEY und J.J. KANEKO (1977)
Diabetes mellitus in dogs: a review of initial evaluation, immediate and long-term management, and outcome
JAVMA 170 (5), 521-530
74. LUKENS, F.D.W. (1948)
Alloxan diabetes
Physiol. Rev. 28, 304
75. MALAISSE, W.J., F. MALAISSE-LAGAE, A. SENER und D.G. PIPELEERS (1982)
Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic β cell
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 927-930
76. MALAISSE-LAGAE, F., A. SENER und W.J. MALAISSE (1983)
Contrasting modes of action of D-glucose and 3-O-methyl-D-glucose as protectors of the rat pancreatic β -cell against alloxan
Biochim. Biophys. Acta 762, 36-43
77. MARSHALL, M.O., H.M. THOMAS, M.J. SEATTER, K.R. GREER, P.J. WOOD und G.W. GOULD (1993)
Pancreatic β -cells express a lower affinity glucose transporter: Functional consequences in normal and diabetic states
Biochem. Society Transactions 21, 164-168
78. MASUKAWA, T. und K. NAKANISHI (1994)
Protection against alloxan-induced diabetes by Diethyldithiocarbamate and Disulfiram in mice
Jpn. J. Pharm. 64, 141-146

79. MATHEWS, C.E. und E.H. LEITER (1999a)
Constitutive differences in antioxidant defense status distinguish alloxan-resistant and alloxan-susceptible mice
Free Rad. Biol. Med. 27 (3/4), 449-455
80. MATHEWS, C.E. und E.H. LEITER (1999b)
Resistance of ALR/Lt islets to free radical-mediated diabetogenic stress is inherited as a dominant trait
Diabetes 48, 2189-2196
81. MATSCHINSKY, F.M. (1990)
Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β -cells and hepatocytes
Diabetes 39, 647-652
82. MATSCHINSKY, F.M, R. LANDGRAF, J. ELLERMAN und J. KOTTER-BRAJTBURG (1972)
Glucoreceptor mechanisms in islets of Langerhans
Diabetes 21, 555-569
83. MC DANIEL, M.L., S. ANDERSON, J. FINK, C. ROTH und P.E. LACY (1975)
Effect of alloxan on permeability and hexose transport in rat pancreatic islets
Endocrinology 97, 68-75
84. MCDANIEL, M.L., C.E. ROTH, C.J. FINK und P.E. LACY (1976)
Effect of anomers of D-glucose on alloxan inhibition of insulin release in isolated perfused pancreatic islets
Endocrinology 99, 535-540
85. MEGLASSON, M. und F.M. MATSCHINSKY (1984)
New perspectives on pancreatic islet glucokinase
Am. J. Physiol. 246, E1 - E8

86. MEGLASSON, M.D., P.T. BURCH, D.K. BERNER, H. NAJAFI und F.M. MATSCHINSKY (1986a)
Identification of glucokinase as an alloxan-sensitive glucose sensor of the pancreatic β -cell
Diabetes 35, 1163-1173
87. MEGLASSON, M.D. und F.M. Matschinsky (1986b)
Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion
Diabetes/Metabolism Rev. 2 (3/4), 163-214
88. MINAMI, T., M. SHIMIZU, H. TANAKA, Y. OKAZAKI und M.G. CHERIAN (1999)
Metallothionein does not protect mouse endocrine cells from damage induced by alloxan injection
Toxicology 132, 33-41
89. MINKUS, G., C. REUSCH, T. HÄNICHEN, F.W. COLBATZKY und W. HERMANN (1991)
Pathologische Veränderungen des endokrinen Pankreas bei Hund und Katze im Vergleich mit klinischen Daten
Tierärztliche Praxis 19, 282-289
90. MIWA, I., H. HARA UND J. OKUDA (1984)
Alloxan inhibition of glucokinase: a possible critical action of alloxan
Biochem. Int. 9, 595
91. MROZIKIEWICZ, A., D. KIELCZEWSKA-MROZIKIEWICZ, Z. LOWICKI, E. CHMARA und K. KORZENIOWSKA (1994)
Blood levels of alloxan in children with insulin-dependent diabetes mellitus
Acta Diabetol. 31, 236-237
92. NATIONAL DIABETES DATA GROUP (1979)
Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance
Diabetes 28, 1039-1057
93. NEWGARD, C.B., C. QUADE, S.D. HUGHES und J.L. MILBURN (1990)
Glucokinase and glucose-transporter expression in liver and islets: implications

for control of glucose homeostasis

Biochem. Soc. Trans. 18, 851-853

94. NOMA, Y., S. BONNER-WEIR, J.B. LATIMER, A.M. DAVALLI und G. WEIR (1996)
Translocation of glucokinase in pancreatic β -cells during acute and chronic hyperglycemia
Endocrinology 137 (4), 1485-1491
95. OBERLEY, L.W. (1988)
Free radicals and diabetes.
Free Rad. Biol. Med. 5, 113-124
96. OHLY, P., C. DOHLE, J. ABEL, J. SEISSLER und H. GLEICHMANN (2000)
Zinc sulphate induces metallothionein in pancreatic islets of mice and protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin
Diabetologia 43, 1020-1030
97. OHLY, P., Z. WANG, J. ABEL und H. GLEICHMANN (1998)
Zinc sulphate induced metallothionein in pancreatic islets and protected against the diabetogenic toxin streptozotocin
Talanta 46, 355-359
98. OKAMOTO, H. (1981)
Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes
Mol. Cell. Biochem. 37, 43-61
99. OPITZ, M. (1990)
Zur Streßhyperglykämie bei Katzen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 103, 151-158

100. ORCI, L., R.H. UNGER, M. RAVAZZOLA, A. OGAWA, I. KOMIYA, D. BAETENS, H.F. LODISH UND B. THORENS (1990)
Reduced β -cell glucose transporter in new onset diabetic BB rats
J. Clin. Invest. 86, 1615-1622
101. PAGLIARA, A.S., S.N. STILLINGS, W.S. ZAWALICH, A.D. WILLIAMS und F.M. MATSCHINSKY (1977)
Glucose and 3-O-methylglucose protection against alloxan poisoning of pancreatic alpha and beta cells
Diabetes 26, 973-979
102. PANCIERA, D.L., C.B. THOMAS, S.W. EICKER und C.E. ATKINS (1990)
Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in cats: 333 cases (1980-1986)
JAVMA 197 (11), 1504-1508
103. PIERREFICHE, G., G. TOPALL, G. COURBOIN, I. HENRIET und H. LABORIT (1993)
Antioxidant activity of melatonin in mice
Res. Com. in Chem. Path. Pharm. 80 (2), 211-223
104. RERUP, C.C. (1970)
Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells
Pharm. Rev. 22 (4), 485-518
105. REUSCH, C. (1996)
Diabetes mellitus bei Hund und Katze
Der praktische Tierarzt 2/1996, 98-110
106. REUSCH, C., M.R. LIEHS, M. HOYER und R. VOCHEZER (1993)
Fructosamine – A new parameter for diagnosis and metabolic control in diabetic dogs and cats
J. Vet. Int. Med. 7, 177-182
107. ROSSINI, A.A., M.A. ARCANGELI und G.F. CAHILL (1975)
Studies of alloxan toxicity on the beta cell
Diabetes 24, 516-522

108. SAKURAI, K., M. KATOH, K. SOMENO und Y. FUJIMOTO (2001)
Apoptosis and mitochondrial damage in INS-1 cells treated with alloxan
Biol. Pharm. Bull. 24, 876-882
109. SANDLER, S. und I. Swenne (1983)
Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse
pancreatic islets in vitro
Diabetologia 25, 444-447
110. SANDLER, S., M. WELSH und A. ANDERSSON (1984)
Nicotinamide does not protect islet β -cell metabolism against alloxan toxicity
Diabetes 33, 937-943
111. SATO, M. und I. BREMNER (1993)
Oxygen free radicals and metallothionein
Free Rad. Biol. Med. 14, 325-337
112. SCHALL, W.D. und L.M. CORNELIUS (1977)
Diabetes mellitus
Vet. Clin. North Am. 7, 613-628
113. SCHEYNIUS, A. und I.B. TÄLJEDAL (1971)
On the mechanism of glucose protection against alloxan toxicity
Diabetologia 7, 252-255
114. SCHUIT, F.C. (1996)
Factors determining the glucose sensitivity and glucose responsiveness of
pancreatic beta cells
Horm. Res. 46, 99-106
115. SCHUIT, F.C. (1997)
Is GLUT2 required for glucose sensing?
Diabetologia 40, 104-111
116. SEN, P.B. und G. Bhattacharya (1952)
Indian J. Physiol. Allied Sci. 6, 112-114

117. SELIGSON, D., H. SELIGSON, B. SHAPIRO, R.G. PALEY, T. RIABOFF und F.D.W. LUKENS (1951)
Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. 10, 124
118. SNEER, A., V. STROIA, M. DINU, B. HERSCOVICI und E. PAPP (1971)
On the mechanism of production of alloxan diabetes. VII. Changes in serum and hepatic reduced glutathione after administration of alloxan to rats
Rev. Med. Chir. 75, 1005-1010
119. STAUDACHER, G. (1990)
Fruktosamine als neues wertvolles Kriterium für die Einstellung diabetischer Tiere sowie ihre photometrische Bestimmung
Tierärztliche Praxis 18, 441-446
120. STOGDALE, L. (1986)
Definition of diabetes mellitus
Cornell Vet. 76, 156-174
121. THAETE, L.C., R.K. CROUCH, M.G. BUSE und S.S. SPICER (1985)
The protective role of copper-zinc superoxide dismutase against alloxan-induced diabetes: Morphological aspects
Diabetologia 28, 677-682
122. THORNALLY, P.J. und M. Vasak (1985)
Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl-radicals
Biochim. Biophys. Acta 827, 36-44
123. TIBALDI, J., J. BENJAMIN, F.S. CABBAT und R.E. HEIKKILA (1979)
Protection against alloxan-induced diabetes by various urea derivatives: Relationship between protective effects and reactivity with the hydroxyl radical
J. Pharm .Exp. Ther. 211 (2), 415-418

124. TIEDGE, M. und S. Lenzen (1991)
Regulation of glucokinase and GLUT2 glucose-transporter gene expression in pancreatic β -cells
Biochem. J. 279, 899-901
125. TIEDGE, M., S. LORTZ, J. DRINKGERN und S. LENZEN (1997)
Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells
Diabetes 46, 1733-1742
126. TIEDGE, M., S. LORTZ, R. MUNDAY und S. LENZEN (1998)
Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species
Diabetes 47, 1578-1585
127. TOMITA, T., P.E. LACY, F.M. MATSCHINSKY und M.L. MCDANIEL (1974)
Effect of alloxan on insulin secretion in isolated rat islets perfused in vitro
Diabetes 23, 517-524
128. UCHIGATA, Y., H. YAMAMOTO, A. KAWAMURA und H. OKAMOTO (1982)
Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis
J. Biol. Chem. 257 (11), 6084-6088
129. UNGER, R.H. (1991)
Diabetic hyperglycemia: Link to impaired glucose transport in pancreatic β cells
Science 251, 1200-1205
130. WANG, Z., C. DOHLE, J. FRIEMANN, B.S. GREEN und H. GLEICHMANN (1993)
Prevention of high- and low-dose STZ-induced diabetes with D-glucose and 5-thio-D-glucose
Diabetes 42, 420-428

131. WANG, Z. und H. GLEICHMANN (1998)
GLUT2 in pancreatic islets: Crucial target molecule in diabetes
Induced with multiple low doses of streptozotocin in mice
Diabetes 47, 50-56
132. WATKINS, D. und S.J. COOPERSTEIN (1976)
Effect of alloxan on islet tissue permeability: protection and reversal by dithiols
J. Pharm. Exp. Ther. 199, 575-582
133. WATKINS, D., S.J. COOPERSTEIN und A. LAZAROW (1964)
Alloxan distribution (in vitro) between cells and extracellular fluid. Am. J. Physiol. 207 (2), 431-435
134. WATKINS, D., S.J. COOPERSTEIN und A. LAZAROW (1973)
Effect of alloxan on islet tissue permeability: protection and reversal by sugars
Am. J. Phys. 224 (3), 718-722
135. WEAVER, D.C., M.L. MC DANIEL und P.E. LACY (1978a)
Alloxan uptake by isolated rat islets of Langerhans
Endocrinology 102 (6), 1847-1855
136. WEAVER, D.C., M.L. MC DANIEL, S.P. NABER, D. BARRY und P.E. LACY (1978b)
Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat Islets of Langerhans
Diabetes 27, 1205-1214
137. WEAVER, D.C., M.L. MCDANIEL und P.E. LACY (1978c)
Mechanism of barbituric-acid protection against inhibition by alloxan of glucose-induced insulin release
Diabetes 27, 71-77
138. WELSH, N., B. MARGULIS, L.A.H. BORG, H.J. WIKLUND, J. SALDEEN und D. FLOODSTRÖM et.al. (1995)
Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: implications for the pathogenesis

- of insulin-dependent diabetes mellitus
Mol. Med. 1 (7), 806-820
139. WINTERBOURN, C.C. und R. MUNDAY (1989)
Glutathione-mediated redox cycling of alloxan
Biochem. Pharm. 38 (2), 271-277
140. YAMAMOTO, H., Y. UCHIGATA und H. OKAMOTO (1981a)
DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin
Biochem. Biophys. Res. Com. 103 (3), 1014-1020
141. YAMAMOTO, H., Y. UCHIGATA und H. OKAMOTO (1981b)
Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets
Nature 294, 284-286
142. ZAWALICH, W.S. und L.M. BEIDLER (1973)
Glucose and alloxan interactions in the pancreatic islets
Am. J. Pharm. 224 (4), 963-966
143. ZAWALICH, W.S., R.C. KARL und F.M. MATSCHINSKY (1979)
Effects of alloxan on glucose-stimulated insulin secretion, glucose metabolism, and cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate levels in rat isolated islets of Langerhans
Diabetologia 16, 115-120
144. ZIEGLER, B., H.J. HAHN und M. ZIEGLER (1985)
Insulin recovery in pancreas and host organs of islet grafts
Exp. Clin. Endocrinol. 85 (1), 53-60
145. ZIMNY, S., F. GOGOLIN, J. ABEL und H. GLEICHMANN (1993)
Metallothionein in isolated pancreatic islets of mice: induction by zinc and streptozotocin, a naturally occurring diabetogen
Arch. Toxicol. 67, 61-65

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Professor Dr. med. Helga Gleichmann danken, die mich als Stipendiatin bereitwillig in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und es mir somit ermöglicht hat, die vorliegende Dissertation anzufertigen. Eine intensive Betreuung, stetes Interesse an den laufenden Versuchen und eine konstruktive Diskussionsbereitschaft waren für sie jederzeit selbstverständlich.

Herrn Professor Dr. med. vet. Fritz Ungemach möchte ich für seine spontane Bereitschaft danken, diese Arbeit an der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig zu vertreten.

Mein ganz besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe, die mich herzlich aufgenommen und deren freundschaftliche und fröhliche Atmosphäre sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Danken möchte ich Frau Dr. Patricia Schott-Ohly für ihre stets freundliche Unterstützung, den vielen lehrreichen Diskussionen und guten Tipps. Frau Claudia Dohle danke ich für die Anfertigung der Gewebeschnitte, die immunhistochemischen Färbungen und die gute Zusammenarbeit. Für seine aufmunternde und hilfsbereite Art danke ich Herrn Dr. Andreas Müller. Wir waren eine „echt gute Truppe“.

Stellvertretend für das Graduiertenkolleg „Toxikologie und Umwelthygiene“ möchte ich Frau Prof. Dr. med. Regine Kahl danken, durch deren großes Engagement ich die Möglichkeit erhalten habe, weitere interessante wissenschaftliche Bereiche kennen zu lernen und meine Dissertation zum Abschluss zu bringen.

Herrn Prof. Dr. med. Werner Scherbaum, Leiter der klinischen Abteilung des Deutschen Diabetes-Forschungsinstitutes, danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Helga Gleichmann durchführen zu können.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern von ganzem Herzen danken, da sie mir so viel in meinem bisherigen Leben ermöglicht haben. Für ihr stetes Vertrauen, die - nicht nur - finanzielle Unterstützung und ihr großes Interesse bin ich ihnen mehr als dankbar.

Meinen Männern – Frederik, Sebastian und Ingo -, sage ich ein liebevolles Dankeschön, da sie mich jederzeit aufgemuntert haben.