

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen
und der Abteilung Pharmakologie der
Lilly Forschung GmbH, Hamburg
Leiter: Prof. Dr. med. H.-J. Mest

**Die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie
MIN 6 unter dem Einfluss adrenerger
Substanzen und Imidazolinen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem
Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt
von

Jan Herden
aus Wetzlar

Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 24.01.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. H.-J. Mest

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Eschenhagen

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. X. Rogiers

Inhaltsverzeichnis

1.) Einleitung	1
1.1) Diabetes mellitus	1
1.2) Die Insulinfreisetzung	2
1.3) Das Sympathische Nervensystem	4
1.3.1) Die Rezeptoren des Sympathischen Nervensystems und ihre Signaltransduktion	4
1.3.2) Nachweis von Adrenozeptoren	5
1.4) Einflüsse des Sympathikus auf die Insulinfreisetzung	6
1.4.1) α -adrenerge Auswirkungen	7
1.4.2) β -adrenerge Auswirkungen	8
1.5) Einflüsse des Parasympathikus auf die Insulinfreisetzung	9
1.6) Die Imidazoline	9
1.7) Aufgabenstellung	12
2.) Material und Methoden	14
2.1) Zellen	14
2.2) Zellkultur	14
2.3) Insulinsekretionsversuche	15
2.4) Radioimmunoassay (RIA)	16
2.5) Substanzen	17
2.6) Strukturformeln	18

2.7) Herkunft der verwendeten Substanzen, Lösungen und Hilfsmittel	19
2.8) Statistische Auswertung	21
2.9) Gefahrstoffe und Sicherheit	21
3.) Ergebnisse	22
3.1) α -Rezeptoren	22
3.1.1) α -agonistisch wirkende Substanzen	22
3.1.2) α -antagonistisch wirkende Substanzen	23
3.1.3) Substanzen mit Imidazolring	24
3.1.4) Kombination von α -Agonisten und α -Anta- gonisten bzw. Imidazolinen	25
3.1.4.1) Prazosin und Phenylephrin	25
3.1.4.2) Phentolamin und BL11778	27
3.1.4.3) Phentolamin und BL11771	30
3.1.4.4) Phentolamin und Moxonidin	32
3.1.4.5) Moxonidin und BL11778	35
3.1.4.6) Moxonidin und BL11771	37
3.2) β - Rezeptoren	40
3.2.1) β -agonistisch wirkende Substanzen	40
3.2.2) β -antagonistisch wirkende Substanzen	41
3.2.3) Kombination von β -Agonisten und β -Antagonisten	43
3.2.3.1) Isoprenalin und (R)-Propranolol	43

3.2.3.2) Isoprenalin und Pindolol	45
3.2.3.3) Terbutalin und (R)-Propranolol	46
3.2.3.4) Terbutalin und Pindolol	48
4.) Diskussion	50
4.1) Substanzen mit Wirkung auf α - und Imidazolin-Rezeptoren	50
4.1.1) α_1 -Adrenergika	50
4.1.2) α_2 -Adrenergika und Imidazoline	51
4.2) Substanzen mit Wirkung auf β -Rezeptoren	58
4.2.1) β -Agonisten	58
4.2.2) β -Antagonisten	60
4.2.3) Kombination von β -Agonisten und β -Antagonisten	61
5.) Zusammenfassung	65
6.) Literaturverzeichnis	66
7.) Danksagung	78
8.) Erklärung	79
9.) Curriculum Vitae	80

Abkürzungs- und Begriffsverzeichnis

Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bell-shaped	glockenförmig
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
downregulation	Abnahme, Herunterregulierung
EBSS	Earle`s Balanced Salt Solution
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal Calf Serum
GLUT	Glukose-Transporter
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HIT	Hamster Insulinoma Tissue
IDDM	Insulin Dependent Diabetes Mellitus
in-vitro	außerhalb des lebenden Organismus
in-vivo	in einem lebenden Organismus
IP3	Inositoltriphosphat
I-Rezeptor	Imidazolin-Rezeptor
K _{ATP} -Kanal	ATP-abhängiger K ⁺ -Kanal
Kir	inwardly rectifying potassium channel
MIN	Mouse Insulinoma
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
M-Rezeptor	Muscarinerner Rezeptor
mRNA	“messenger” Ribonucleinacid

NADP	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat (reduziert)
NIDDM	Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerasechainreaction
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis Toxin
RIN	Rat Insulinoma
RIA	Radioimmunoassay
SPA	Scintillation Proximity Assay
SUR	Sulfonylurea Receptor
target	Zielscheibe, Angriffspunkt
ZNS	Zentrales Nerven System

1.) Einleitung

1.1) Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem Mangel an Insulin beruht. Nach längerer Krankheitsdauer können Spätschäden entstehen, wobei hier die Makroangiopathien, mit Arteriosklerose der Koronar- und Hirngefäße und die Mikroangiopathien, die verantwortlich für die Entstehung von Nephro-, Neuro- und Retinopathie sind, ursächlich beteiligt zu sein scheinen.

Der Diabetes lässt sich generell in zwei Typen klassifizieren (American Diabetes Association, 1997):

Beim Typ-1-Diabetes (IDDM= insulin dependend diabetes mellitus) kommt es zu einer immunologisch, selten auch idiopathisch bedingten, β -Zelldestruktion, die zu einem absoluten Insulinmangel führt.

Der Typ-2-Diabetes (NIDDM= non insulin dependend diabetes mellitus) tritt häufig mit Bluthochdruck und Übergewicht („Metabolisches Syndrom“) in Erscheinung. Er zeichnet sich pathogenetisch in erster Linie durch eine herabgesetzte Insulinwirkung aus, deren Ursachen hauptsächlich in einer Abnahme der Sensibilität und Dichte von Insulinrezeptoren liegen (De Fronzo et al., 1992; Efendic et al., 1984). Diese „Downregulation“ der Insulinrezeptoren hat zur Folge, dass immer mehr Insulin gebildet werden muss, um den Blutzuckerspiegel im Normbereich zu halten. Man spricht hier von einem relativen Insulinmangel.

Neben diesen beiden Hauptformen des Diabetes gibt es zusätzlich noch andere spezifische Faktoren, die zu einer Manifestation der Krankheit führen können, jedoch wesentlich seltener vorkommen. Zu nennen wären hier beispielsweise Erkrankungen mit unterschiedlichen Gendefekten (MODY = maturity-onset diabetes of the young, Typ 1-5), chronische Pankreatitis oder Endokrinopathien (z.B. Cushing-Syndrom).

1.2) Die Insulinfreisetzung

Schema zur Insulinfreisetzung in der β -Zelle

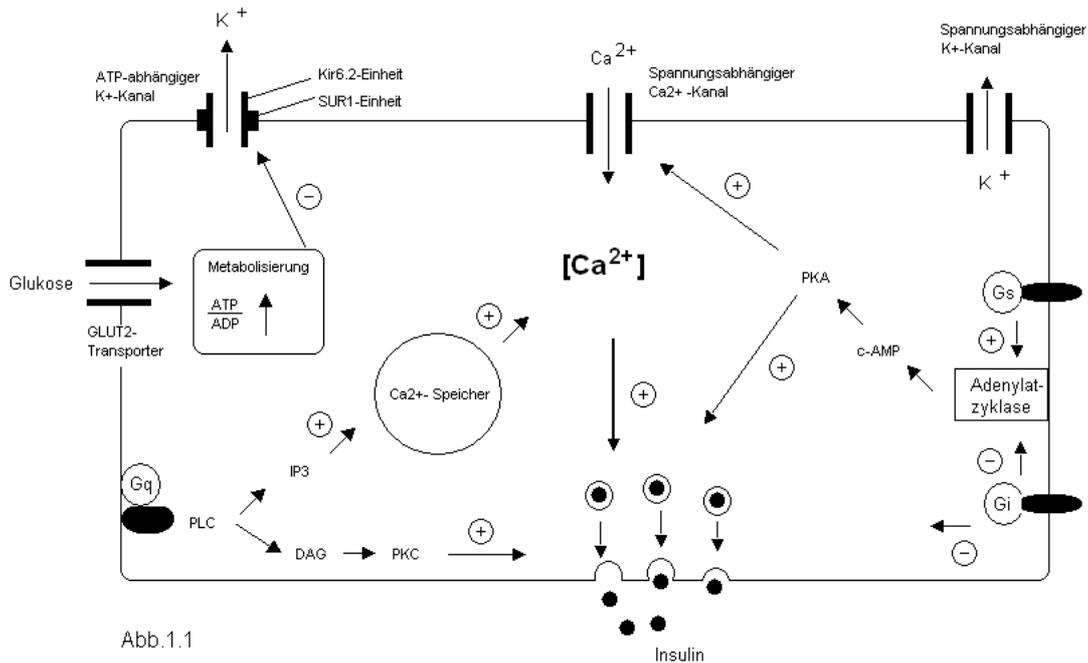


Abb.1.1

Ein Schema zur Insulinfreisetzung aus der β -Zelle des Pankreas ist in Abb.1.1 dargestellt.

Hauptinitiator der Insulinfreisetzung ist Glukose. Glukose erreicht das Innere der Zelle durch membranständige Transporter (GLUT-2) und wird in üblicher Weise von der Zelle verstoffwechselt. Dadurch kommt es zu einem Anstieg des ATP/ADP-Quotienten, was dazu führt, dass ein ATP-abhängiger K^+ -Kanal (K_{ATP} -Kanal) schließt. Somit wird verhindert, dass positive Ionen die Zelle verlassen können (Ashcroft u. Kakei, 1989). Dieser K^+ -Kanal besteht aus einer kanalbildenden Untereinheit (Kir6.2) und einer regulativen Untereinheit (SUR1) (Inagaki et al., 1995; Sakura et al., 1995), an der u.a. die Sulfonylharnstoffe und die Glinidine, welche in der Therapie des Typ2-Diabetes zur Anwendung kommen, ihren Ansatzpunkt haben.

In Folge des Anstiegs der positiven Ionen kommt es zu einer Depolarisation der β -Zelle und zur Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen. Ca^{2+} , welches auf diese Weise in die Zelle gelangt, gilt als Hauptstimulus zur Entleerung der Insulingranula. Der Ca^{2+} -Einstrom scheint darüber hinaus noch durch den Redoxzustand des NADPH/NADP-Quotienten moduliert zu werden, was sich jedoch noch in der Diskussion befindet (Ammon, 1995; Masgrau et al., 2003).

Auch einige „second messenger“ sind in den Sekretionsvorgang der β -Zelle involviert. Hierzu gehört u.a. das Adenylatcyclase-cAMP-System (Takahashi et al., 1999). Aktiviert durch stimulierende G-Proteine, sowie einer abnehmenden Aktivität der Phosphodiesterasen führt dieser „second-messenger“ zu einer gesteigerten Proteinkinase A (PKA)-Aktivität, was u.a. einen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle zur Folge hat. Ammala et al. (1993) fanden allerdings heraus, dass die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nicht der einzige sekretionssteigernde Effekt von cAMP ist.

Als weitere „second-messenger“ sind Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) an der Insulinfreisetzung beteiligt. Beide entstehen unter Einfluss der Phospholipase C (PLC). Während IP3 eine gesteigerte Ca^{2+} -Mobilisierung aus den intrazellulären Speichern bewirkt (Prentki et al., 1985), kommt es durch DAG zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), welche vermutlich, ebenso wie die PKA, über weitere Phosphorylierungsschritte an einer Insulinsekretion beteiligt ist (Brocklehurst u. Hutton, 1984; Arkhammar et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte DAG-Synthese und eine glukoseinduzierte Insulinfreisetzung eng zusammenhängen (Wollheim et al., 1988), und dass es auch Verbindungen zwischen den intrazellulären Wegen dieser Botenstoffe und denen des cAMP gibt (Prentki u. Matschinsky, 1987).

Des Weiteren gibt es noch viele weitere Modulatoren, wie beispielsweise Hormone, Neuropeptide und selbstverständlich auch Neurotransmitter (siehe Kap.1.3), die die glukosevermittelte Steigerung der Insulinfreisetzung beeinflussen (Ammon, 1995).

1.3) Das sympathische Nervensystem

1.3.1) Die Rezeptoren des sympathischen Nervensystems und ihre Signaltransduktion

Wie allgemein bekannt ist wirken die Katecholamine, Adrenalin und Noradrenalin, als klassische Transmitter des sympathischen Nervensystems über bestimmte Rezeptoren, die man als α_1 -, α_2 - und $\beta_{1,2,3+4}$ -Adrenozeptoren bezeichnet. Die α -Rezeptoren kann man, auf Grund ihrer Aminosäuresequenz, in weitere Rezeptorsubtypen unterteilen: $\alpha_{1A}, \alpha_{1B}, \alpha_{1D}$, sowie $\alpha_{2A}, \alpha_{2B}, \alpha_{2C}$. Des Weiteren gibt es noch einen α_{2D} -Rezeptor (Bylund, 1988), der jedoch nicht in allen Spezies vorhanden ist.

Während die α -, sowie β_1 - und β_2 -Rezeptoren in fast allen Geweben vorhanden sind, soll der später entdeckte β_3 -Rezeptor vor allem im Darm und im Fettgewebe vorkommen (Emorine et al., 1994), jedoch gibt es auch Untersuchungen, die ihm vasodilatatorische Fähigkeiten in bestimmten Spezies zuschreiben (Berlan et al., 1994; Shen et al., 1994). Es ist allerdings unbekannt, ob sich auch im Pankreas bzw. der β -Zelle β_3 -Rezeptoren befinden (Graneman et al., 1991; Krief et al., 1993). Der zuletzt entdeckte β -Rezeptor ist der am Herzen vorkommende β_4 -Rezeptor (Kaumann, 1997).

Die Adrenozeptoren lösen ihre Wirkungen wiederum über G-Proteine aus, die in Ruhe als heterotrimere Membranproteine aus einer α -, β -, und γ -Kette bestehen. Nach dem Andocken des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Dissoziation der GTP-beladenen α -Einheit und des $\beta\gamma$ -Komplexes, wobei beide ihrerseits wieder als Effektoren wirken können. Über „second messenger“ oder Öffnung bzw. Schließung von Ionenkanälen werden nun die vielfältigen Wirkungen auf den Zellstoffwechsel übertragen.

Die α_1 -Rezeptoren aktivieren ein G-Protein der G_q -Familie, was zu einer Aktivierung der PLC führt. Als „second messenger“ entstehen hieraus IP3 und DAG (siehe Kap.1.2).

Die α_2 -Rezeptoren führen zu einer Aktivierung von G-Proteinen der G_i -Familie, infolgedessen es zu einer Hemmung der Adenylatcyclase, mit nachfolgendem Abfall der cAMP-Konzentration, und zu einem Öffnen der K^+ -Kanäle bzw. einem Schließen der Ca^{2+} -Kanäle kommt.

Über β_1 - und β_2 -Rezeptoren werden G-Proteine der G_s -Familie stimuliert, was wiederum zur gesteigerten Aktivität der Adenylatcyclase und somit zum vermehrten Anfall von cAMP führt.

Auch von G-Proteinen und ihren Untereinheiten gibt es wieder eine Vielzahl von Subtypen (Gutkind, 1998), so dass auch hier eine große Heterogenität vorherrscht, was wohl auch der Grund ist, dass die genaueren Mechanismen der sympathischen Wirkungen auf zelluläre Reaktionen größtenteils noch unbekannt sind.

Weiterhin besitzen die Adrenozeptoren auch die Fähigkeit, an verschiedenen G-Protein-Subtypen zu binden. Dies wurde von Lang et al. (1995) für α_2 -Rezeptoren und von Daaka et al. (1997) für β_2 -Rezeptoren nachgewiesen, die beispielsweise ihre Kopplung von G_s - auf G_i -Proteine umstellen können.

Auch ist, auf Grund dieser komplex zusammenhängenden Mechanismen, nicht bekannt, ob die spezifischen adrenozeptorvermittelten Signale an der β -Zelle auf genau den oben beschriebenen Wegen übertragen werden.

Beispielsweise wurde eine α_2 -vermittelte Hemmung der Insulinsekretion einer verminderten cAMP-Stimulation zugeschrieben (Yamazaki et al., 1982), dieses wurde jedoch von Ullrich und Wollheim (1984) sowie von Lang et al. (1995) widerlegt.

1.3.2) Nachweis von Adrenozeptoren

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, gibt es verschiedene Subtypen der einzelnen Rezeptoren. Im Menschen sind, in Bezug auf α_2 -Rezeptoren, drei verschiedene chromosomale Lokalisationen, die für drei verschiedene Adrenozeptor-Subtypen codieren, nachgewiesen worden (Kobilka et al., 1987; Lomasney et al., 1990).

Lacey et al. (1996) und Chan et al. (1997) konnten die zugehörige mRNA im menschlichen Pankreas, in isolierten Langerhans'schen Inseln und in der klonalen β -Zell-Linie HIT-T15 nachweisen, was darauf schließen lässt, dass multiple α_2 -Adrenozeptor-Subtypen im Pankreas und auch in der β -Zelle zu finden sind.

Die gleiche Gruppe wies weiterhin das Vorliegen von β_2 -Rezeptor mRNA an den insulinproduzierenden Zellen nach.

1.4) Einflüsse des Sympathikus auf die Insulinfreisetzung

Es ist schon sehr lange bekannt, dass die Katecholamine einen inhibitorischen Einfluss auf die Insulinfreisetzung im Menschen sowie in anderen Spezies haben (Porte et al., 1966; Porte, 1969; Miller, 1981).

Dieser Effekt ist vom physiologischen Standpunkt so zu erklären, dass unter körperlicher Anstrengung oder unter Stress, wenn es zu einer Katecholaminausschüttung kommt, ein hoher Blutzuckerspiegel nötig ist. Da Insulin bekanntlich genau den gegenteiligen Effekt auslöst, ist in Folge dessen eine Hemmung der Insulinausschüttung sinnvoll.

Die ursprüngliche Meinung über den adrenergen Einfluss sieht folgendermaßen aus:

Den α -Rezeptoren wird eine inhibierende Wirkung zugeschrieben, wohingegen über die β -Rezeptoren eine Stimulation erfolgen soll. Da die Katecholamine über beide Rezeptoren wirken, soll in der Summe die inhibierende Wirkung der α -Rezeptoren überwiegen.

Neuere Untersuchungen von Devedjian et al. (2000) bestätigen dies, indem sie an transgenen Mäusen nachwiesen, dass eine Überexpression von α_2 -Rezeptoren zu einer abgeschwächten Insulinsekretion und verminderten Glukosetoleranz führte.

Unter diesen Aspekten wird auch ein weiterer pathogenetischer Faktor des Typ-2-Diabetes diskutiert, der postuliert, dass im Pankreas und somit auch in

der β -Zelle ein basaler adrenerger Tonus vorherrscht. Aufgrund einer Verstärkung dieses Tonus und damit verstärkter adrenerger Inhibition soll es nun zu einer reduzierten Insulinsekretion kommen (Robertson und Porte, 1973). Nilsson et al. (2001) bestätigten diese Überlegungen, indem sie beispielsweise an Ratten zeigten, dass eine Denervierung des Pankreas eine gesteigerte Insulinantwort auf Glukose bewirkte.

1.4.1) α -adrenerge Auswirkungen

Es galt als wahrscheinlich, dass es sich bei der Hemmung der Insulinsekretion um einen α -vermittelten (Porte, 1967), genauer gesagt um einen α_2 -vermittelten Vorgang handelt (Nakadate et al., 1980; Nakaki et al., 1980). Roy et al. (1981) bestätigten dies, indem sie zeigten, dass eine durch Norepinephrin (Noradrenalin) ausgelöste Insulininhibition durch die Blocker mit α_2 -Wirkung Phentolamin, Phenoxybenzamin und Yohimbin aufgehoben wurde, nicht jedoch durch den selektiven α_1 -Blocker Prazosin.

Schon davor gab es eine Vielzahl von Versuchen, in denen der unselektive α -Blocker Phentolamin eine durch Katecholamine gehemmte Insulinausschüttung aufhob (Buse et al., 1970; Lundquist, 1972).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass Phentolamin, auch ohne adrenergen Grundtonus, die Insulinfreisetzung steigerte (Buse et al., 1970; Efendic et al., 1975).

Schulz und Hasselblatt (1988) bestätigten dies in ihrer Arbeit, jedoch zeigte in ihren Untersuchungen Rauwolszin, ebenfalls ein α_2 -Blocker, keine stimulatorischen Eigenschaften. Somit postulierten sie ein Jahr später in einer weiteren Arbeit (1989), dass nicht etwa der α_2 -blockierende Effekt die Insulinfreisetzung bewirkt, sondern dass es sich diesbezüglich um einen anderen Mechanismus handeln müsse. Somit lenkten sie die Aufmerksamkeit auf die Stoffklasse der Imidazoline (siehe Kap.1.6), der auch Phentolamin angehört. Seit dieser Zeit sind die Imidazoline Inhalt vieler

wissenschaftlicher Untersuchungen, die ihre insulinfreisetzenden Wirkungen bestätigen.

1.4.2) β -adrenerge Auswirkungen

Nach gängiger Lehrmeinung wird der Stimulation von β -Rezeptoren, speziell von β_2 -Rezeptoren, eine Steigerung der Insulinsekretion zugeschrieben. Arbeiten von Loubatiers et al. (1971), Massara et al. (1975) und Panagiotidis et al. (1993) bestätigen dies. Harms et al. (1978) konnten zeigen, dass eine β -stimulierte Insulinfreisetzung im Menschen durch Propranolol (nicht-selektiver β -Blocker) effektiver gehemmt werden konnte, als durch Atenolol, bzw. Metoprolol (beide selektive β_1 -Blocker). 1978 führten Lundquist und Ericson Untersuchungen an Mäuseinseln durch, bei denen die basale Insulinsekretion von Propranolol gehemmt wurde.

Allerdings gibt es auch hierzu gegenteilige Untersuchungen. So zeigten beispielsweise Garrino und Henquin (1990) ebenfalls an Mäuseinseln, für Propranolol in hohen Konzentrationen einen glukoseabhängigen Anstieg der Insulinsekretion.

Man sieht, dass es diesbezüglich noch keine einheitliche Meinung gibt. Die überwiegende Lehrmeinung ist jedoch, dass es β_2 -vermittelt, zumindest in-vivo, zu einer Steigerung der Insulinfreisetzung kommt.

Allerdings gilt zu beachten, dass es zwischen In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen große Unterschiede geben kann. Außerdem ist wichtig zu erwähnen, dass es an vielen Variablen, wie beispielsweise Spezies, Dosis oder vorherrschender Glukosekonzentration liegen kann, ob eine Substanz stimulatorisch oder inhibitorisch wirkt, bzw. ob sie überhaupt eine Wirkung zeigt. So zeigten Ribes et al. (1984) und Tilzey et al. (1985) für Adrenalin an unterschiedlichen Spezies, in unterschiedlichen Dosen und unter variierenden Glukosekonzentrationen sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Effekte.

1.5) Einflüsse des Parasympathikus auf die Insulinfreisetzung

Wie im gesamten Organismus sind auch die Wirkungen von Sympathikus und Parasympathikus im Hinblick auf die Insulinfreisetzung gegensätzlich.

So konnte schon sehr früh gezeigt werden, dass eine Stimulation des Vagus zu einer Erhöhung der Insulinspiegel im Plasma führt (Frohmann et al., 1967; Daniel u. Henderson, 1967). Zur selben Zeit wurde weiterhin festgestellt, dass dieser Effekt durch den vagalen Neurotransmitter Acetylcholin (Ach) zustande kommt (Malaisse et al., 1967).

Mit Hilfe der PCR gelang die Darstellung der DNA von muscarinergen M₁- und M₃-Rezeptoren in Ratteninseln und der Nachweis, dass der M₃-Rezeptor für die Insulinfreisetzung verantwortlich ist (Boschero et al., 1995).

1.6) Die Imidazoline

Wie bereits in Kapitel 1.4.1 erwähnt wurde, sind die insulinfreisetzenden Effekte der Imidazolin-Derivate seit einiger Zeit Inhalt vieler Untersuchungen. Es zeigte sich, dass viele Imidazoline eine glukoseabhängige Insulinfreisetzung sowohl in-vitro, als auch in-vivo bewirken.

Le Bihan et al. (1999) bestätigten in ihrer Arbeit, dass wahrscheinlich die Imidazolin-Struktur für diesen stimulatorischen Effekt verantwortlich ist.

Allerdings gibt es auch Imidazolin-Verbindungen, die gegenteilige Effekte zeigen. So ist schon länger bekannt, dass z.B. Moxonidin, das davor u.a. wegen seiner antihypertensiven Wirkung bekannt war, zu einer Hemmung der Insulinsekretion führt (Tsoli et al., 1995).

Der Vorteil, den die Imidazoline gegenüber bereits im Handel befindlichen Insulinsekretagoga wie beispielsweise den Sulfonylharnstoffe (siehe Kap. 1.2) besitzen, besteht darin, dass die meisten Imidazoline, eine Ausnahme ist hier Phentolamin, nur in Anwesenheit von Glukose eine gesteigerte Insulinausschüttung bewirken. Dies würde das Risiko einer Hypoglykämie, eine unerwünschte Nebenwirkung der Sulfonylharnstoffe, minimieren bzw.

ausschließen. Jedoch ist es bis heute noch nicht gelungen, eine Imidazolin-Verbindung als Antidiabetikum auf den Markt zu bringen.

Über welchen Mechanismus die Imidazoline genau wirken ist derzeit noch Gegenstand der Diskussion. Da in ZNS und Gefäßen bereits I₁- und I₂-Imidazolinrezeptoren nachgewiesen wurden (Molderings, 1997), ist das molekulare Target in der β -Zelle, der vermutliche I₃-Rezeptor, noch nicht nachgewiesen, wobei sehr wahrscheinlich ist, dass es sich hierbei um mehrere Bindungsstellen handelt (Eglen et al., 1998; Morgan, 1999).

Der Grund für diese Überlegungen liegt darin, dass für die Imidazoline bisher mehrere Mechanismen, die fast alle in einer gesteigerten Insulinfreisetzung resultieren, nachgewiesen wurden, aber deutlich wurde, dass nicht alle Imidazoline ihre Wirkung über die gleichen Wege erreichen. So ist seit längerem bekannt, dass Imidazoline zu einer Schließung der ATP-abhängigen und auch spannungsabhängigen K⁺-Kanälen führen (Chan et al., 1991; Jonas et al., 1992). Allerdings kann dieser Mechanismus nicht als einziger Angriffspunkt gesehen werden. Sowohl Arbeiten von Chan et al. (2001), als auch Arbeiten von Efanov et al. (2001), in deren Untersuchungen trotz ausgeschaltetem K⁺-Kanal eine gesteigerte Insulinausschüttung gemessen wurde, postulieren einen K⁺-Kanal unabhängigen Mechanismus. Scheltdorf (2001) konnte in seiner Arbeit für einige Imidazoline eine deutliche, konzentrationsabhängige Zelldepolarisation in insulinfreisetzenden Dosen zeigen, aber für manche Verbindungen wurde die Depolarisation erst in Dosierungen nachgewiesen, die ca. 10-mal höher waren als die insulinfreisetzenden Dosierungen. Somit konnte eine Depolarisation als Wirkmechanismus ausgeschlossen werden.

Als K⁺-Kanal unabhängige Mechanismen, über die die Imidazoline in der β -Zelle ihre sekretionssteigernden Wirkungen entfalten, konnten eine gesteigerte Ca²⁺-Freisetzung (Efanova et al., 1998), eine Aktivierung der Proteinkinasen A und C (Zaitsev et al., 1996), sowie eine Erhöhung der DAG-Konzentration (Efanov et al., 2001) nachgewiesen werden.

Somit wird deutlich, dass, nach jetzigem Stand der Forschung, für die Imidazolinwirkung noch kein einheitlicher Wirkmechanismus nachgewiesen wurde, die Steigerung der Insulinfreisetzung jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit durch multiple Mechanismen ausgelöst wird.

1.7) Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Einflüsse von verschiedenen Substanzen mit Angriffspunkt an α - und β -adrenergen Rezeptoren sowie von Imidazolinen, in Ab- und in Anwesenheit von Glukose, auf die Insulinfreisetzung von MIN6-Zellen getestet.

Die Untersuchungen behandelten folgende Fragestellungen:

- 1.) Kann die Insulinfreisetzung durch bestimmte Adrenergika gehemmt oder gesteigert werden, und ist dieser Effekt glukoseabhängig?
- 2.) Inwieweit beeinflussen sich die Adrenergika, wenn sie in Kombination appliziert werden? Kann der Antagonist einer Substanz die jeweilige Wirkung inhibieren oder aufheben bzw. kann durch Kombination mit einem Agonisten die jeweilige Wirkung gesteigert werden?

Hierbei wurden als α -Agonisten das Antihypotonikum Phenylephrin (α_1) und das zentral wirksame Antihypertonikum Moxonidin (α_2) eingesetzt. Als α -Blocker kamen Prazosin (α_1), das ebenfalls blutdrucksenkend wirkt sowie Phenoxybenzamin (α_1, α_2) und Phentolamin (α_1, α_2) zur Anwendung. Phenoxybenzamin dient als Therapeutikum bei Phäochromozytom, während Phentolamin nur noch in der Notfalltherapie bei akuter Herzinsuffizienz zum Einsatz kommt.

Bei diesen Bestimmungen muss man beachten, dass es sich bei Moxonidin und Phentolamin sowohl um Substanzen mit Wirkung auf α -Rezeptoren als auch um Imidazolinderivate handelt.

Des Weiteren wurde die Insulinsekretion nach Applikation der beiden Imidazolinverbindungen BL 11771 und BL 11778 gemessen.

Die Auswirkungen von β -adrenergen Substanzen wurden anhand der β -mimetischen Bronchospasmolytika Isoprenalin (β_1, β_2) und Terbutalin (β_2) sowie dem selektiven β_3 -Agonisten BRL 37344 geprüft. Als β -Blocker wurden

die unselektiven Propranolol (als Enantiomere) und Pindolol sowie der selektive β_1 -Blocker Atenolol getestet.

Die Einflüsse der Substanzen wurden zuerst einzeln untersucht und danach jeweils zwei Substanzen miteinander kombiniert.

Es wurde untersucht, ob sich die beiden α_1 -Adrenergika Phenylephrin und Prazosin gegenseitig beeinflussen. Weiterhin wurden BL 11771 und BL 11778 jeweils mit Moxonidin und Phentolamin, bei denen es sich auch um Imidazoline handelt, getestet und untersucht, ob sich deren Wirkungen auf die Insulinfreisetzung gegenseitig beeinflussen.

An β -Rezeptoren wurde demonstriert, welche Wirkungen Isoprenalin und Terbutalin jeweils in Kombination mit Propranolol und Pindolol zeigen.

2.) Material und Methoden

2.1) Zellen

Alle Versuche wurden an MIN6-Zellen, Subklon M9, (erhalten von Susumo Seino, Chiba University, Japan) durchgeführt. Zum Zweck der Bevorratung waren die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -170°C tiefgefroren. Um die Versuche durchzuführen wurden die Zellen aufgetaut und weiter kultiviert, wobei die Versuche an den Zellpassagen 25 bis 40 erfolgten.

Miyazaki et al. beschrieben 1990 das erste Mal diese β -Zell-Linie, die eine gut durch Glukose induzierbare Insulinsekretion zeigt.

Der Name MIN 6 steht für „Mouse Insulinoma, 6. Subklon“. Diese β -Zell-Linie stammt ursprünglich aus transgenen Mäusen, die auf Grund einer Infektion mit dem Simian-Virus-40-T Antigen β -Zell-Tumore entwickeln. Die in-vivo immortalisierten pankreatischen β -Zellen stellen ein adäquates Hilfsmittel zur Untersuchung von Insulinsekretion und zellulären Mechanismen dar, da sie die physiologische Effektivität der β -Zelle gut widerspiegeln (Ishihara et al., 1993).

2.2) Zellkultur

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 in *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, +Natriumpyruvat)*, mit einem Glukosegehalt von 25 mM, kultiviert und als Behältnisse 162 cm^2 Kulturflaschen gewählt. Zusätzlich wurden dem Medium 10% *Fetales Rinder Serum (FCS)*, 5ml *Penicillin/Streptomycin* und 5 μl *Mercaptoethanol* zugegeben. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt und die Zellen einmal die Woche gesplittet. Hierzu wurden die Zellen mit 10 ml *Phosphate Buffered Saline (PBS⁻, ohne Calciumchlorid und Magnesiumchlorid)* gewaschen und

anschließend, zur Ablösung der adhärennten Zellen vom Flaschenboden, mit 6 ml *Trypsin/EDTA* (1:1 Verdünnung mit *PBS*⁻) für 3 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 25 ml Medium gestoppt, die Zellen mit 1000 rpm zentrifugiert (4 Min., 21°C) und in 10 ml Medium resuspendiert. Die Menge an Zellen wurde nun unter mikroskopischer Sicht mit Hilfe der *Neubauer-Zählkammer* bestimmt und jeweils 3-5 Mio. zusammen mit 40 ml frischem Medium in neue Zellkulturflaschen gefüllt. Man bezeichnet das Umsetzen der Zellen bzw. einen erfolgten Trypsinierungsvorgang als eine Passage.

2.3) Insulinsekretionsversuche

Von den zu testenden Substanzen wurden zuerst Stocklösungen in 100 mM Konzentration (gelöst in 100% *Dimethylsulfoxid*, = *DMSO*) hergestellt und diese dann bei -20°C eingefroren. Zur Durchführung der Versuche wurden die jeweiligen Stocklösungen aufgetaut und in die gewünschte Konzentration verdünnt.

Die Zellen wurden auf *96-Well-Platten* ausgesät, wobei jedes Well mit 3×10^4 Zellen und 200 µl Medium bestückt wurde.

Nach zwei bis drei Tagen weiterer Kultivierung im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit *Earle's Balanced Salt Solution* (*EBSS*) mit 0,1% *Rinderserumalbumin* (*BSA*) gewaschen und für 1 Std. im Brutschrank gehungert.

Danach erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Substanzen in den verschiedenen Konzentrationen, gegebenenfalls den verschiedenen Kombinationen und mit low (0 mM) bzw. high (25 mM) Glukose.

Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurde der Zellüberstand entnommen, per Vakuumfilterapparat durch eine *Mikrofilterplatte* (*Multiscreen MAHVN*) gesaugt, auf der abgelöste, im Überstand schwimmende Zellen zurückgehalten wurden und bei -20°C als Konzentrat tiefgefroren.

Aus diesem Konzentrat konnte man nun den Insulingehalt per Radioimmunoassay (RIA) bestimmen.

Die positive Kontrolle erfolgte bei allen Versuchen, bei denen die Substanzen einzeln (nicht in Kombination) getestet wurden, anhand der Substanz RX871024, welche erwiesenermaßen eine starke Insulinfreisetzung bewirkt (Efanov et al., 1998).

Die positive Kontrolle der Kombinationsversuche erfolgte durch die erhaltenen Ergebnisse der Einzelversuche.

2.4) Radioimmunoassay (RIA)

Die Durchführung zur quantitativen Messung der freigesetzten Insulinmenge erfolgte mit einer leicht modifizierten Variante des *Rat Insulin RIA Kit* der Firma Linco, der, laut Herstellerangabe, 100% Kreuzreaktivität zu Mäuseinsulin zeigt. Hierbei werden im Meerschweinchen gebildeten Ratteninsulinantikörpern eine bekannte Menge von radioaktiv markiertem Insulin sowie die zu messende Lösung mit unmarkiertem Insulin zugegeben. Es kommt nun zu einer kompetitiven Konkurrenz um die begrenzten Bindungsstellen der Insulinantikörper zwischen markiertem und unmarkiertem Insulin. Um darzustellen wieviele Antikörper mit radioaktiv markiertem Insulin besetzt sind, werden dem Gemisch Protein A beschichtete und *antikörperbindende Scintillation Proximity Assay (SPA) Kügelchen* hinzugefügt, die wiederum an den Insulinantikörpern haften. Durch Wechselwirkung des radioaktiven Liganden mit der Fluomikroshäre der Protein A Schicht, entstehen nun Lichtquanten, die im Photomultiplier gemessen werden können. Es korreliert hierbei die Anzahl der gemessenen Lichtimpulse negativ mit der unmarkierten, von den Zellen freigesetzten, Insulinmenge. Mit einer Eichkurve können nun die gemessenen Werte umgerechnet werden.

Der Ansatz für diese Messung erfolgte folgendermaßen: Das gefrorene Konzentrat wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und 1:51 mit *EBSS* (+ 0,1%

BSA) verdünnt. Dann wurden jeweils 50 μl in *Polyethylenphthalat 96 Well-Mikrotiterplatten* pipettiert und 50 μl eines Test-Puffers (0,05 M *Phosphatsalzlösung*, pH 7,4, sowie 0,025 EDTA, 0,1% *NaN₃*, 1% insulinfreies RIA-taugliches BSA), sowie je 50 μl der bereits erwähnten [¹²⁵I] markierten Insulinlösung und der Ratteninsulinantikörper hinzugefügt. Um die Eichkurve zu erhalten, wurden außerdem Ratteninsulinstandards mit den gleichen Lösungen pipettiert. Die Gesamtmischung wurde dann 24 Std. bei Raumtemperatur inkubiert, am nächsten Tag erfolgte die Detektion der o.g. Lichtsignale in einem *Liquid Scintillation + Luminescence Counter*.

2.5) Substanzen

Bei der Durchführung der Versuche wurde der Einfluss folgender Substanzen auf die Insulinfreisetzung von MIN6- Zellen untersucht:

α -Rezeptor-Agonisten:

- Phenylephrin (α_1)
- Moxonidin (α_2)

α -Rezeptor-Antagonisten:

- Prazosin (α_1)
- Phentolamin (α_1, α_2)
- Phenoxybenzamin (α_1, α_2)

Imidazoline:

- BL 11771
- BL 11778
- Moxonidin und Phentolamin (beide besitzen einen Imidazolinring)

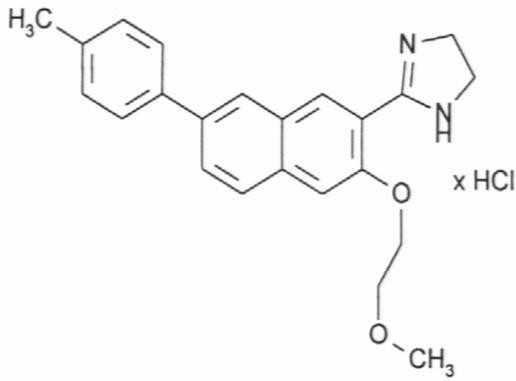
β -Rezeptor-Agonisten:

- Isoprenalin (β_1, β_2)
- Terbutalin (β_2)
- BRL 37344 (β_3)

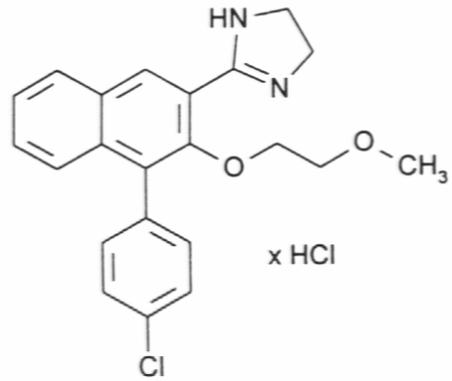
β -Rezeptor-Antagonisten:

- (R)-Propranolol (nicht selektiv)
- (S)-Propranolol (nicht selektiv)
- Pindolol (nicht selektiv)
- Atenolol(β_1)

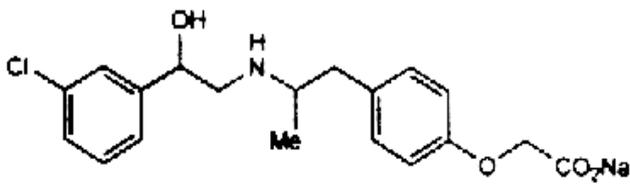
2.6) Strukturformeln



BL 11771



BL 11778



BRL 37344

Abb.1.2:
Stukturformeln
der Substanzen
BL 11771, BL
11778 und BRL
37344

In Abb.1.2 sind die Strukturformeln der Substanzen BL 11771, BL 11778 und BRL 37344 dargestellt. Auf die Abbildung der anderen untersuchten Substanzen wird hier bewusst verzichtet, da es sich hierbei um Substanzen handelt, die zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden und deren Strukturformel in jedem umfassenden Lehrbuch nachgelesen werden kann.

2.7) Herkunft der verwendeten Substanzen, Lösungen und Hilfsmittel

Fa. INVITROGEN (Karlsruhe):

- DMEM (+ Natriumpyruvat)
- Penicillin/Streptomycin
- Mercaptoethanol
- Trypsin/EDTA

Fa. SIGMA (Taufkirchen):

- FCS
- EBSS (+0,1% BSA)
- DMSO
- PBS⁻
- Phenylephrin
- Prazosin
- Phentolamin
- Terbutalin
- (R)-Atenolol

Fa. LILLY FORSCHUNG GmbH (Hamburg):

- BL 11771
- BL 11778
- RX 871024
- Moxonidin

Fa. TOCRIS (Ballwin, MO, USA):

- (R)-Propranolol
- BRL 37344

Fa. ICN BIOMEDICALS INC. (Aurora, Ohio, USA):

- (S)-Propranolol

Fa. RESEARCH BIOCHEMICALS INC. (Natick, MA, USA):

- Phenoxybenzamin
- Pindolol (P125)

Fa. BOEHRINGER (Mannheim):

- Isoprenalin

Fa. MERCK (Darmstadt):

- D(+)-Glukose Monohydrat

Fa. COSTAR (Cambridge, USA):

- Zellkulturflaschen (162 cm²)
- 96-Well-Platten

Fa. WALLAC (Turku, Finnland):

- Polyethylenphthalat 96-Well-Mikrotiterplatten
- Liquid Scintillation + Luminescence Counter

Fa. MILLIPORE (Eschwege):

- Filterplatte Multiscreen MAHVN

Fa. LINCO RESEARCH INC. (St.Charles, MO, USA):

- Rat Insulin RIA Kit

Fa. AMERSHAM INTERNATIONAL (Buckinghamshire, UK):

- Protein A beschichtete antikörperbindende SPA Kügelchen

Fa. JANDEL SCIENTIFIC SOFTWARE (S.Rafael, CA, USA):

- Sigmastat + Sigmaplot Softwarepakete

2.8) Statistische Auswertung

Aus den Einzelwerten wurde in jeder Versuchsreihe jeweils der arithmetische Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) berechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm *Sigmastat* der Fa. Jandel Scientific Software. Hierbei wurden die Werte zuerst dem Student-t-Test unterzogen und bei Nichterfüllung der Kriterien (Normalverteilung, gleiche Varianz) der Mann-Whitney-Test durchgeführt.

Das Signifikanzniveau (p) wurde auf $\leq 0,05$ festgelegt und signifikante Unterschiede graphisch markiert.

EC50- bzw. IC50-Werte wurden mit der Regressionswizardfunktion berechnet.

Die Anzahl der Experimente ($=n$) ist in jeder graphischen Darstellung angegeben.

2.9) Gefahrstoffe und Sicherheit

Bei der Arbeit mit allen verwendeten Chemikalien wurden die Sicherheits- und Entsorgungshinweise der Hersteller beachtet.

Biologisches Material und damit kontaminierte Arbeitsmaterialien wurden nach dem Gebrauch autoklaviert. Die Gentechnischen Arbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 ausgeführt.

3.) Ergebnisse

3.1) α -Rezeptoren

Zuerst wurden die Einflüsse von Substanzen mit Angriffspunkt an α -Rezeptoren bzw. Imidazolin-Rezeptoren einzeln, jeweils unter high (25mM)- und low (0mM)-Glukose Bedingungen, untersucht. Dann wurde geprüft, wie die Substanzen in Kombination wirken und inwieweit sich ihre Wirkungen beeinflussen. Diese Versuche fanden alle nur unter high-Glukose Bedingungen statt.

3.1.1) α -agonistisch wirkende Substanzen

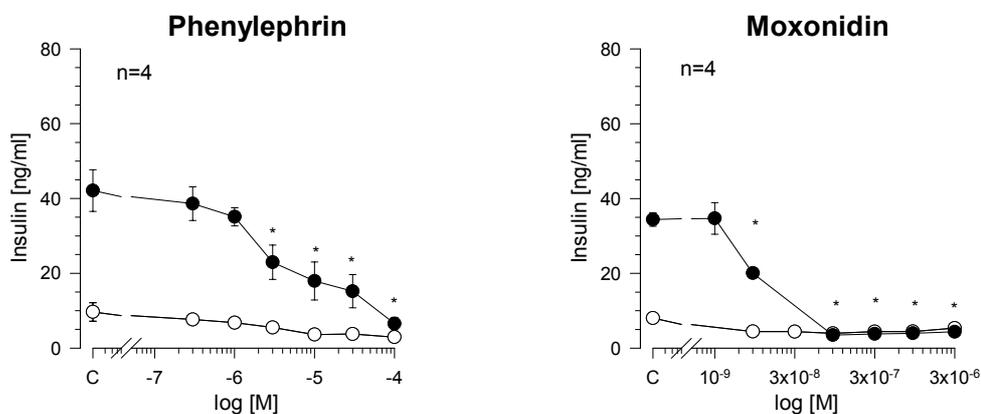


Abb.2:

Konzentrationsabhängiger Einfluss der α -Agonisten Phenylephrin (α_1) und Moxonidin (α_2) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 in Anwesenheit von 0 mM Glukose (o) und 25 mM Glukose (•).

(alle Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Die α -Agonisten Phenylephrin (α_1) und Moxonidin (α_2), welcher auch Affinität zu Imidazolinrezeptoren besitzt, zeigten in Anwesenheit von 25 mM Glukose beide eine dosisabhängige Hemmung der Insulinfreisetzung (siehe Abb.2). Phenylephrin senkte die Sekretion von einem Kontrollwert, der bei 42 ng/ml lag auf 6,5 ng/ml ($EC_{50}=4,0 \times 10^{-6}$), während die Applikation von Moxonidin zu einer Senkung von 34,5 ng/ml auf 4,5 ng/ml führte ($EC_{50}=1,0 \times 10^{-8}$). In Abwesenheit von Glukose führten beide Substanzen zu keiner signifikanten Hemmung.

3.1.2) α -antagonistisch wirkende Substanzen

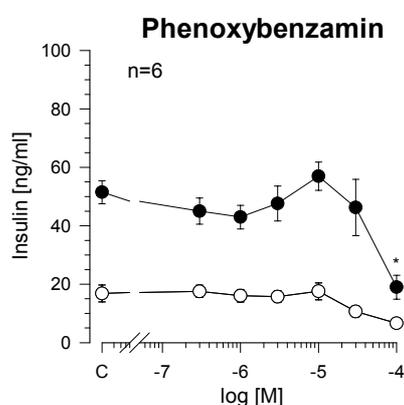
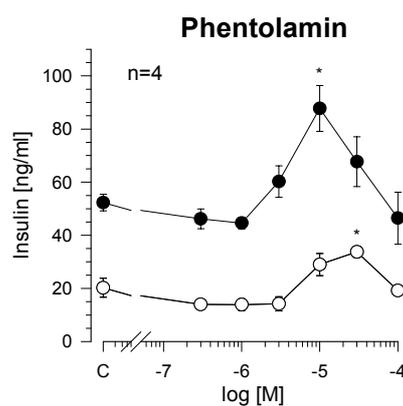
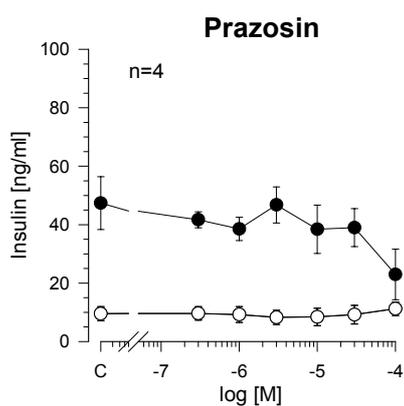


Abb.3:
 Konzentrationsabhängiger Einfluss der α -Antagonisten Prazosin (α_1), Phentolamin (α_1, α_2) und Phenoxybenzamin (α_1, α_2) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 in Anwesenheit von 0 mM Glukose (o) und 25 mM Glukose (•).
 (alle Daten sind als $X \pm SEM$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Der α_1 -Blocker Prazosin zeigte unter high-Glukose Bedingungen keinen Einfluss auf die Insulinsekretion, nur in der höchsten Konzentration (10^{-4}M) war eine Tendenz zur Hemmung erkennbar (siehe Abb.3).

Ebenso verhielt sich Phenoxybenzamin (α_1, α_2), jedoch kam es in der höchsten Konzentration (10^{-4}M) zu einer signifikanten Hemmung der Insulinfreisetzung von einem Kontrollwert, der bei 51 ng/ml lag, auf 19 ng/ml (siehe Abb.3). Ohne Glukose blieben beide Substanzen wirkungslos.

Phentolamin, α -Blocker mit Imidazolring, führte bei 25mM Glukosekonzentration zu einer Steigerung gegenüber der Kontrolle von 52 ng/ml auf 88 ng/ml ($\text{EC}_{50}=3,1 \times 10^{-6}$). Es kam in höheren Konzentrationen zu einem Rückgang des positiven Effektes (siehe Abb.3). Bei Phentolamin war die erhöhte Freisetzung nicht auf die Anwesenheit von Glukose beschränkt. Ohne Glukose kam es zu einem ähnlichen Kurvenverlauf, wobei die Insulinfreisetzung von 20 ng/ml auf 34 ng/ml gesteigert wurde.

Zusammenfassend für die α -Blocker lässt sich sagen, dass bei Anwesenheit von Glukose lediglich die Imidazolinverbindung Phentolamin einen Anstieg der Insulinfreisetzung bewirkt hat, wohingegen die beiden anderen Substanzen wirkungslos blieben.

3.1.3) Substanzen mit Imidazolinring

BL 11778 führte zu einer annähernden Verdopplung der Insulinfreisetzung von 46 ng/ml auf 85 ng/ml ($\text{EC}_{50}=4,0 \times 10^{-7}$). Dieser Effekt war glukoseabhängig, da er nur unter high-Glukose Bedingungen nachzuweisen war (siehe Abb.4). In höherer Konzentration (10^{-5}M) kam es zur Abnahme der gemessenen Insulinmenge.

Einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigte die Substanz BL 11771 (siehe Abb.4). Hier kam es zu einer glukoseabhängigen Steigerung von 48 ng/ml auf 86 ng/ml. Beide Substanzen zeigten, wie auch Phentolamin, einen sogenannten

„bell-shaped“-Kurvenverlauf mit einer Abnahme der Insulinsekretion in höheren Konzentrationen.

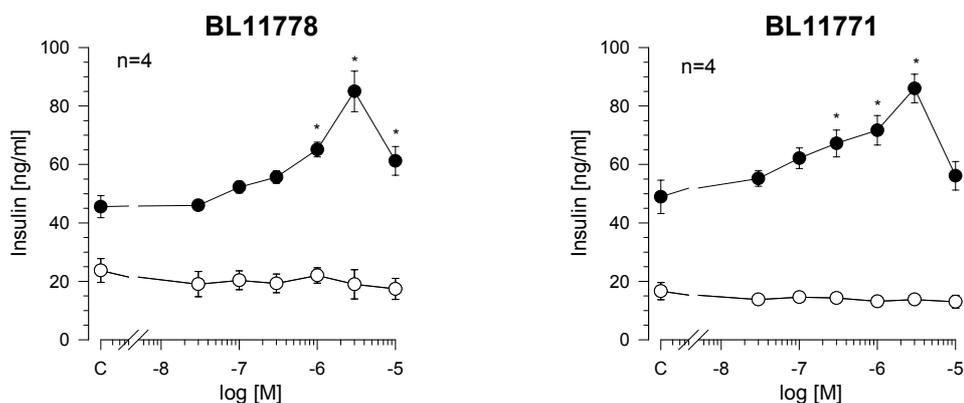


Abb.4:

Konzentrationsabhängiger Einfluss der Imidazoline BL11778 und BL11771 auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 in Anwesenheit von 0 mM Glukose (o) und 25 mM Glukose (•).

(alle Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; * , $p \leq 0,05$)

3.1.4) Kombination von α -Agonisten und α -Antagonisten bzw. Imidazolinen

3.1.4.1) Prazosin und Phenylephrin:

Wie bei den vorherigen Untersuchungen zeigte Prazosin (10^{-5}M) keine Wirkung und Phenylephrin (10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M) eine dosisabhängige Hemmung. Die Wirkung von Phenylephrin konnte durch die Zugabe von Prazosin allerdings antagonisiert werden (siehe Abb.5). Es kam nicht zu einer vollständigen Aufhebung der inhibierenden Wirkung von Phenylephrin, aber zu einer signifikant reduzierten Hemmung in allen Konzentrationen. Bei einer Phenylephrinkonzentration von 10^{-6}M konnte Prazosin die Sekretion von 23 ng/ml auf 40 ng/ml steigern, bei einer Phenylephrinkonzentration von 10^{-4}M kam es zu einer Steigerung von 12,5 ng/ml auf 17 ng/ml.

Ergebnisse

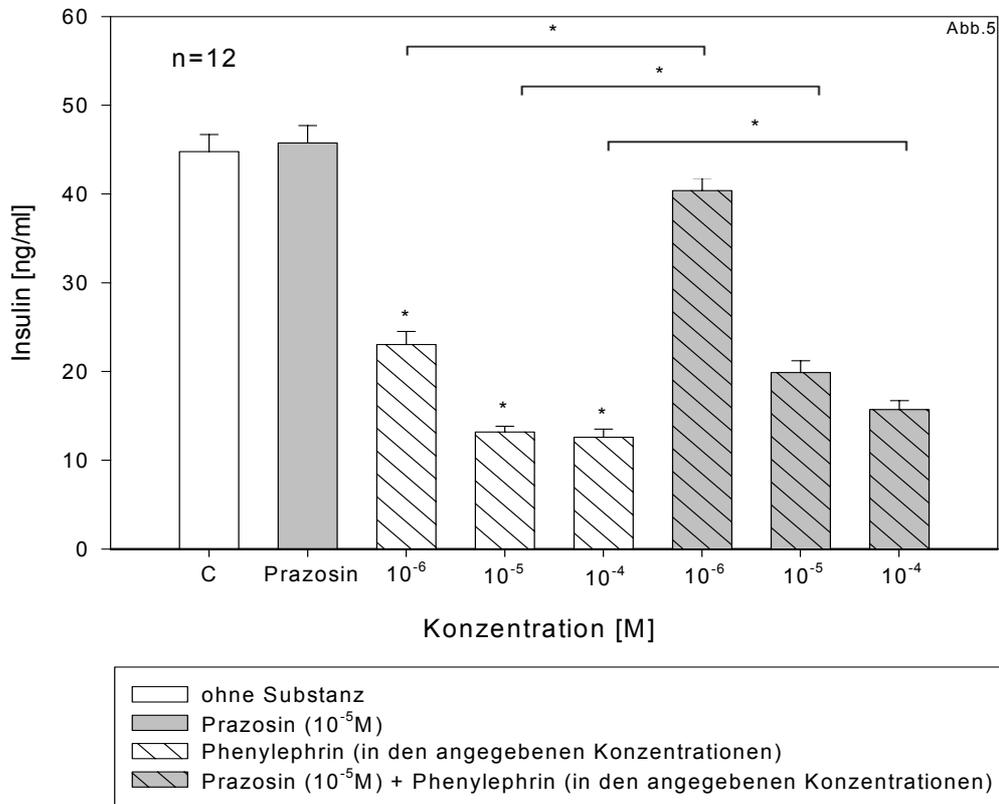


Abb.5:

Der Einfluss von Prazosin (10^{-5} M) und Phenylephrin (10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25 mM Glukose durchgeföhrt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

3.1.4.2) Phentolamin und BL 11778:

Beide Substanzen zeigten einzeln eine dosisabhängige Steigerung der Insulinsekretion.

Bei BL 11778 ($3 \times 10^{-7} \text{M}$, 10^{-6}M , $3 \times 10^{-6} \text{M}$) konnte in Kombination mit Phentolamin in 10^{-7}M und 10^{-6}M Konzentration ein leichter, aber teilweise signifikant additiver Effekt beobachtet werden (siehe Abb.6 u. 7).

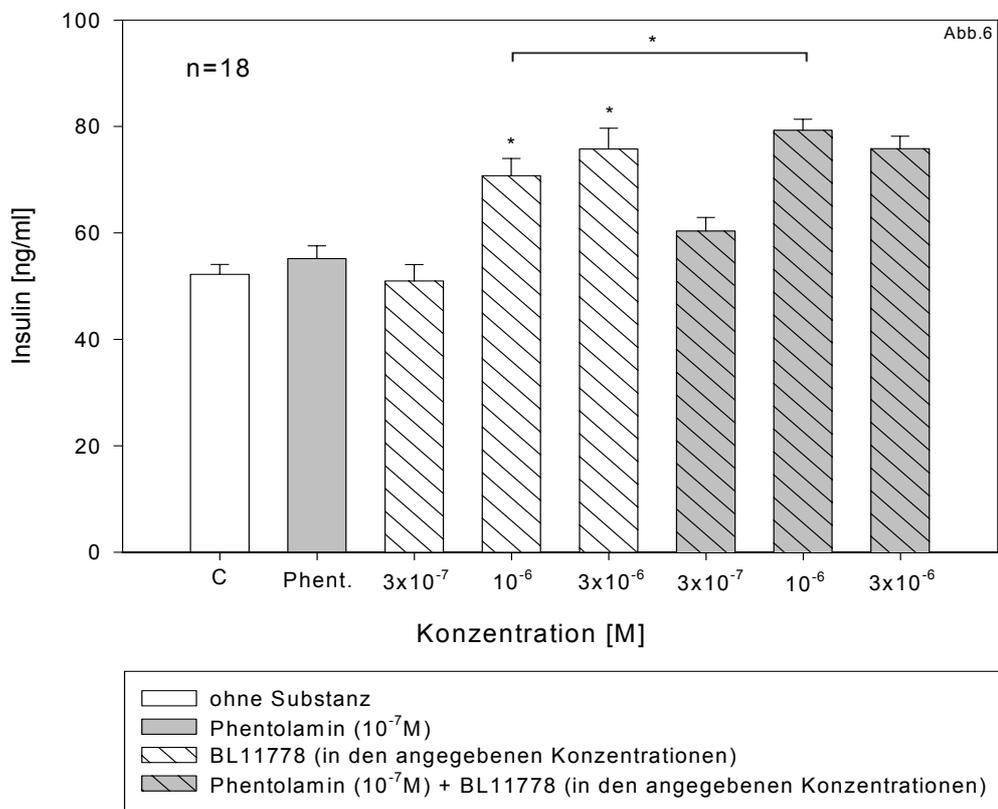


Abb.6:

Der Einfluss von Phentolamin (10^{-7}M) und BL11778 ($3 \times 10^{-7} \text{M}$, 10^{-6}M , $3 \times 10^{-6} \text{M}$) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25 mM Glukose durchgeführt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Ergebnisse

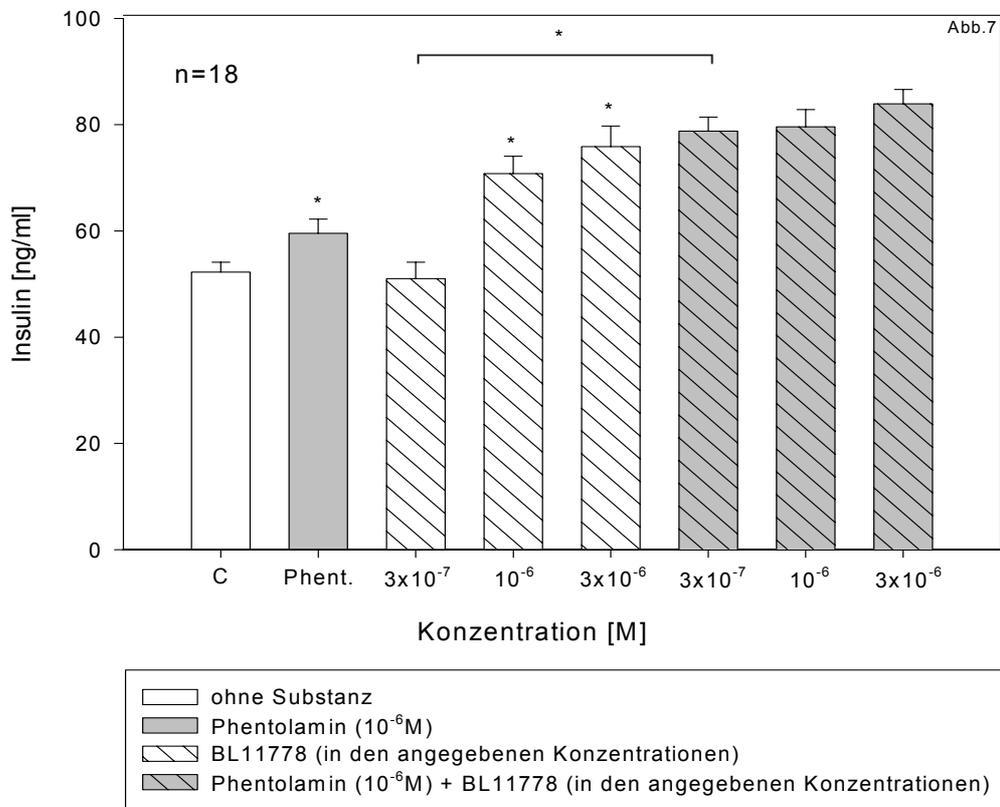


Abb.7:

Der Einfluss von Phentolamin (10⁻⁶M) und BL11778 (3x10⁻⁷M, 10⁻⁶M, 3x10⁻⁶M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25 mM Glukose durchgeföhrt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

So konnte man bei einer Phentolaminkonzentration von 10⁻⁶ M und einer 3x10⁻⁷ M Konzentration von BL 11778, denen einzeln Insulinausschüttungen von 59,5 ng/ml bzw. 51 ng/ml zugrunde lagen, in Kombination eine Steigerung auf 79 ng/ml beobachten.

Eine Erhöhung der Phentolaminkonzentration in den Kombinationsversuchen auf 10^{-5} M führte, nach erreichtem Maximum, zu einer Hemmung der Insulinfreisetzung (siehe Abb.8).

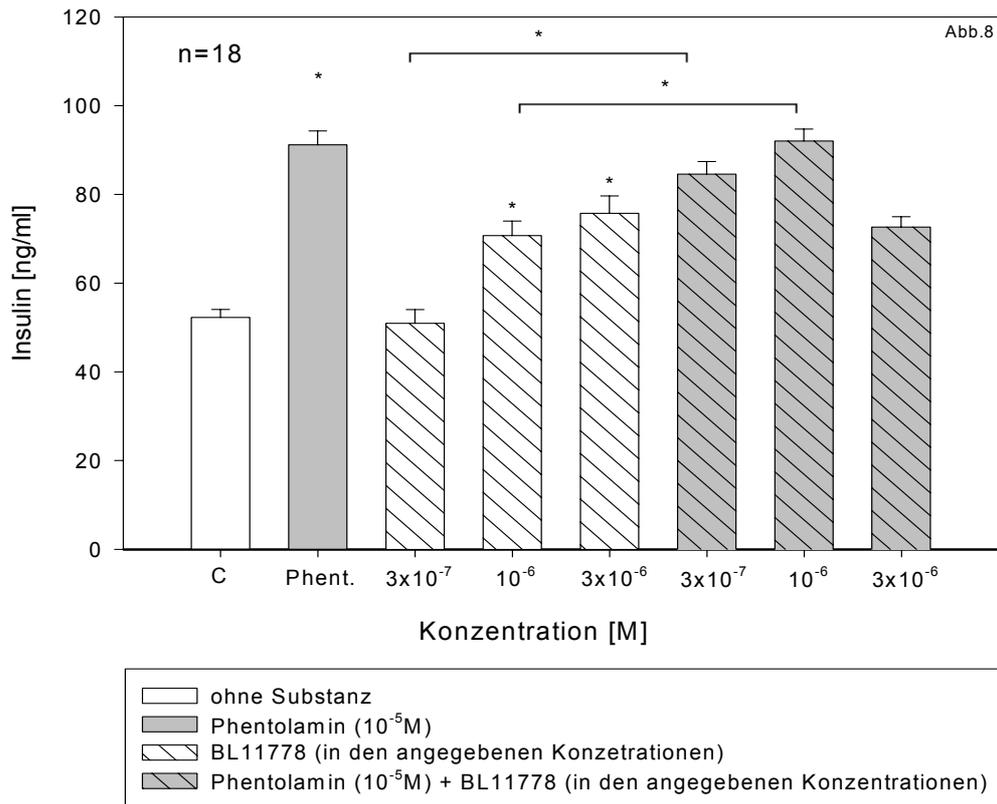


Abb.8:

Der Einfluss von Phentolamin (10^{-5} M) und BL11778 (3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25 mM Glukose durchgeführt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; * , $p \leq 0,05$)

Man kam einzeln zu einer gemessenen Insulinsekretion von 91 ng/ml. Dieser Wert ließ sich durch die Zugabe von 3×10^{-7} M und 10^{-6} M BL 11778 nicht erhöhen. Bei der Zugabe von BL 11778 in 3×10^{-6} M Konzentration kam es zu einer Reduzierung der Insulinausschüttung auf 73 ng/ml.

3.1.4.3) Phentolamin und BL 11771:

Analog zum vorherigen Versuch, zeigte auch BL11771 in Kombination mit Phentolamin, einen fast identischen Kurvenverlauf. Wiederum zeigten beide Substanzen einzeln eine signifikante Steigerung gegenüber der Kontrolle.

Eine Phentolaminkonzentration von 10^{-6} M, der eine Insulinausschüttung von 59 ng/ml zugrunde lag, erhöhte diese, in Kombination mit BL 11771, in 3×10^{-7} M, 10^{-6} M und in 3×10^{-6} M Konzentration, in jedem Versuch auf ca. 77 ng/ml (siehe Abb. 9).

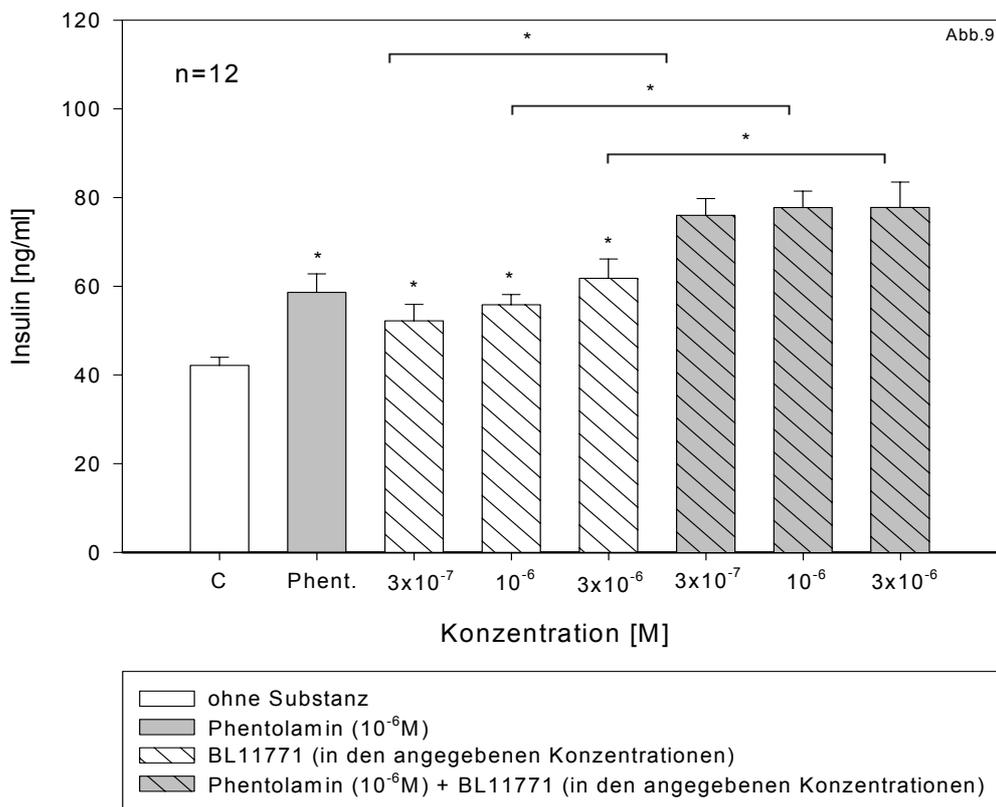


Abb.9:

Der Einfluss von Phentolamin (10^{-6} M) und BL11771 (3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25 mM Glukose durchgeführt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Ergebnisse

Erhöhte man die Phentolaminkonzentration auf 10^{-5} M, konnte die Insulinsekretion mit BL 11771 in 3×10^{-7} M Konzentration auf 81 ng/ml gesteigert werden. Mit den beiden höheren Konzentrationen kam es zu einer Abnahme dieses additiven Effektes auf 76 bzw. 71 ng/ml (siehe Abb.10).

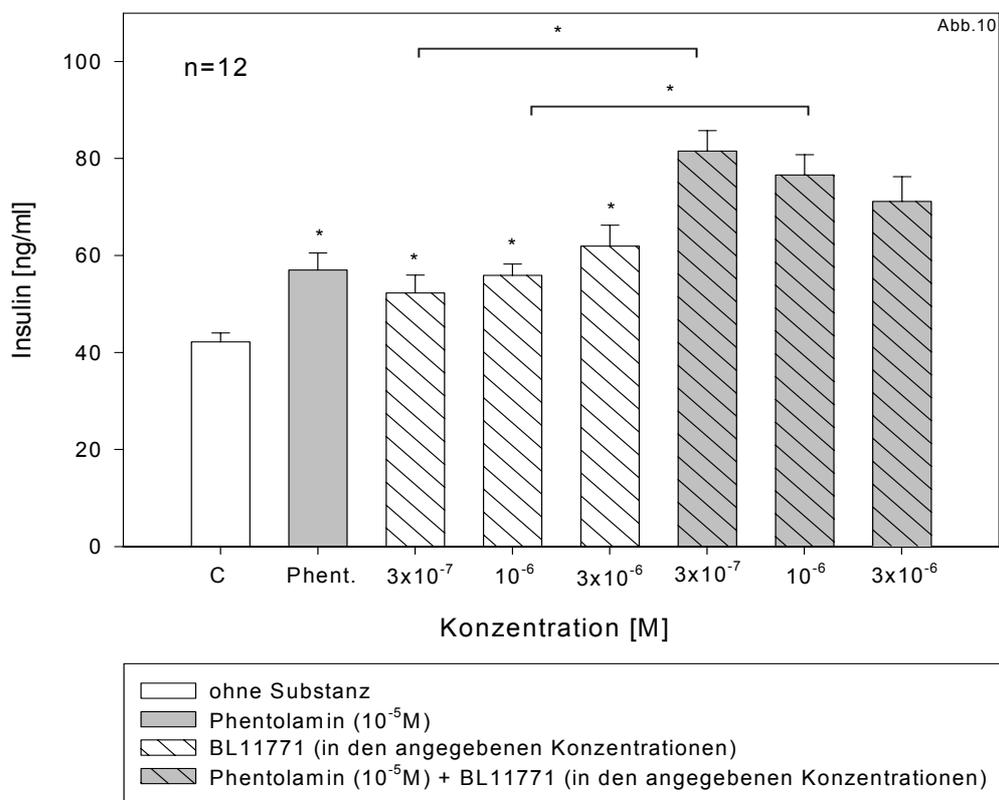


Abb.10:

Der Einfluss von Phentolamin (10^{-5} M) und BL11771 (3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25 mM Glukose durchgeführt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

3.1.4.4) Phentolamin und Moxonidin:

Wiederum zeigte Phentolamin alleine die erwartete dosisabhängige Steigerung der Insulinfreisetzung. Bei Moxonidin alleine kam es zu einer Hemmung. In Kombination konnte gezeigt werden, dass Phentolamin die hemmende Wirkung von Moxonidin in dosisabhängiger Weise antagonisiert (siehe Abb.11-13).

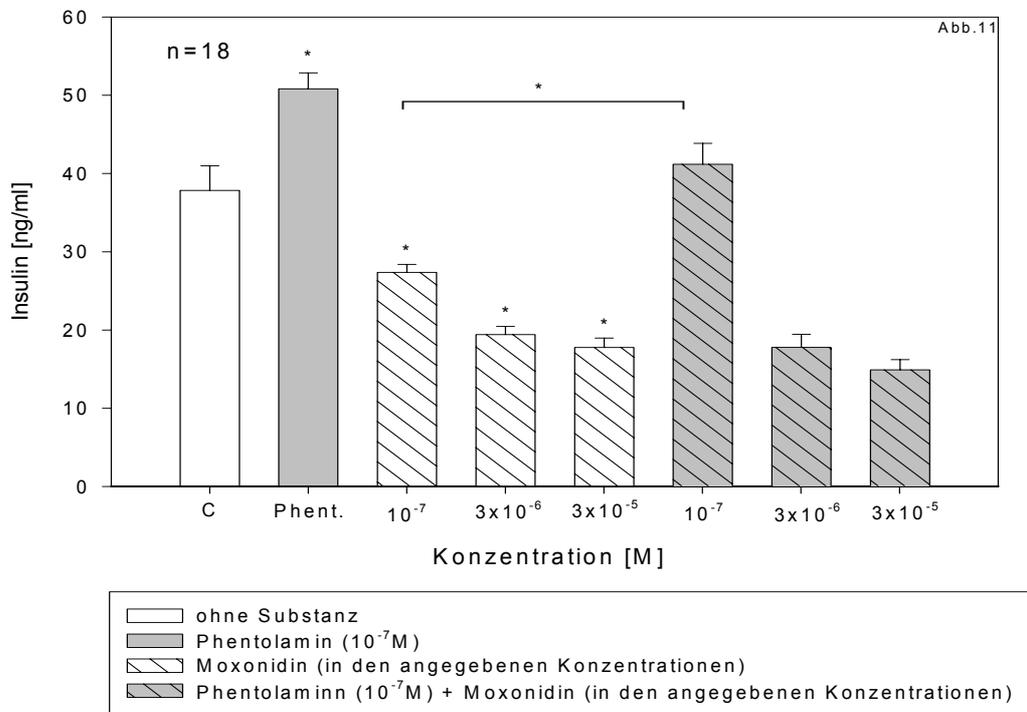


Abb.11:
 Der Einfluss von Phentolamin ($10^{-7}M$) und Moxonidin ($10^{-7}M$, $3 \times 10^{-6}M$, $3 \times 10^{-5}M$) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.
 Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeführt.
 (Daten sind als $X \pm SEM$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Ergebnisse

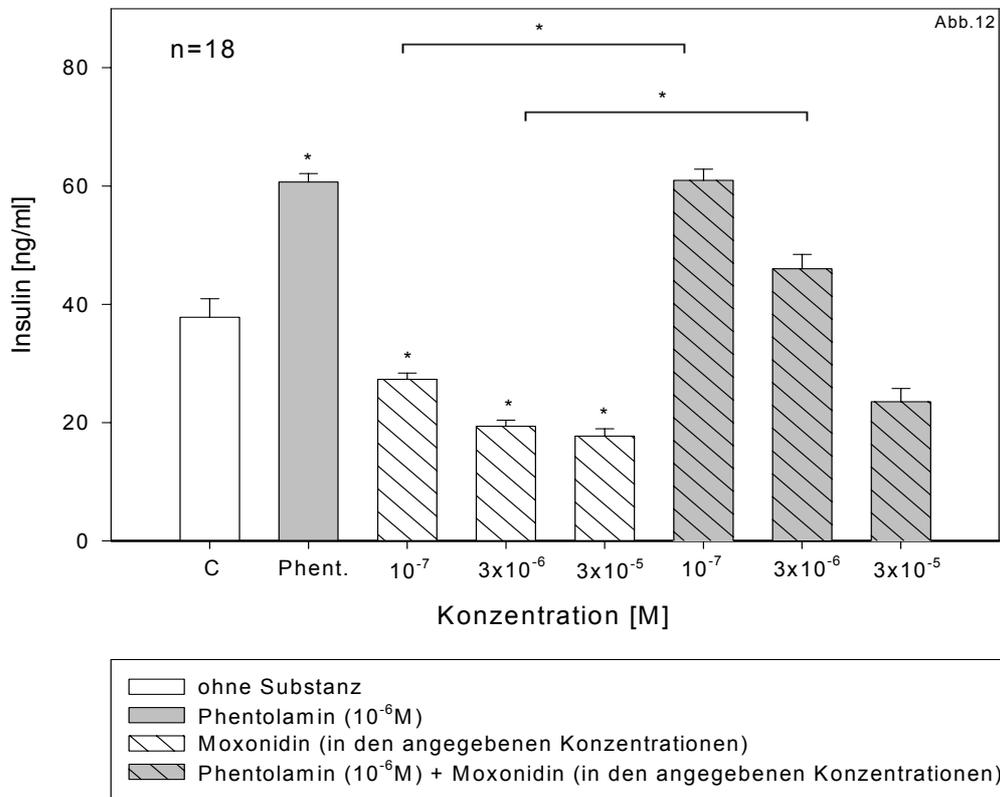


Abb.12:

Der Einfluss von Phentolamin (10^{-6}M) und Moxonidin (10^{-7}M , $3 \times 10^{-6}\text{M}$, $3 \times 10^{-5}\text{M}$) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeföhrt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Ergebnisse

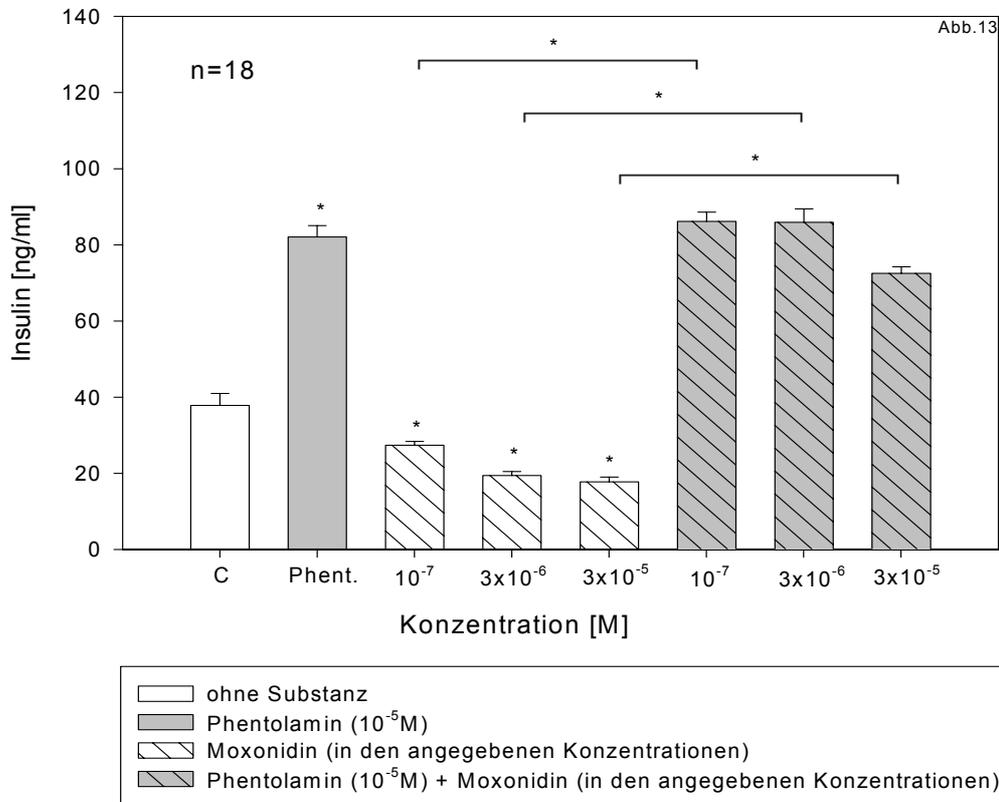


Abb.13:

Der Einfluss von Phentolamin (10⁻⁵M) und Moxonidin (10⁻⁷M, 3x10⁻⁶M, 3x10⁻⁵M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeführt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Wie zu sehen ist, trat mit jeder Erhöhung der Phentolaminkonzentration der hemmende Effekt von Moxonidin immer mehr in den Hintergrund. Bei einer Konzentration von 10⁻⁵ M bewirkte Phentolamin alleine eine Insulinausschüttung von 82 ng/ml. Auch eine Kombination dieser Phentolaminkonzentration mit Moxonidin in 10⁻⁷ M bzw. 3x10⁻⁶ M Konzentration führte nicht zu einer Verminderung der Sekretion. Sie lag immer noch bei ca. 82 ng/ml. Eine Kombination der selben Phentolaminkonzentration mit einer 3x10⁻⁵ M Moxonidin-Lösung hatte eine Ausschüttung von 72 ng/ml zur Folge.

3.1.4.5) Moxonidin und BL 11778:

Der gleiche antagonistische Effekt konnte für Moxonidin und BL 11778 in umgekehrter Weise beobachtet werden. Die insulinfreisetzende Wirkung der Imidazolinverbindung BL 11778 wurde durch Moxonidin in geringer Konzentration (10^{-7} M) zunächst gehemmt (siehe Abb.14).

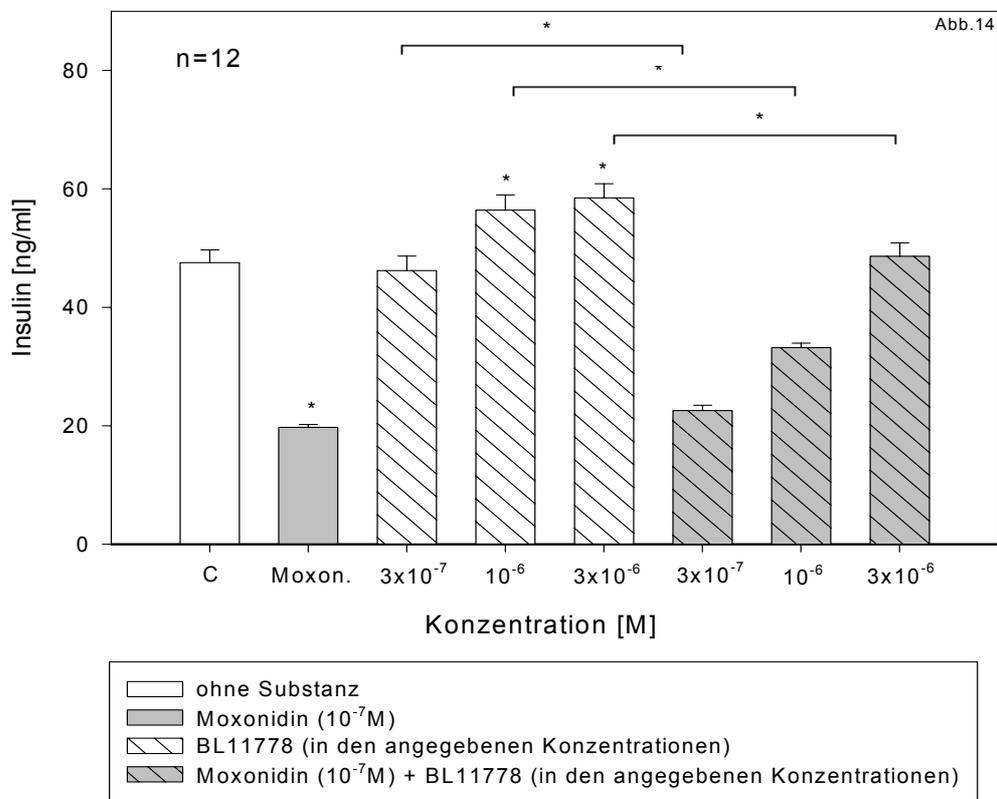


Abb.14:

Der Einfluss von Moxonidin (10^{-7} M) und BL11778 (3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeführt.

(Daten sind als $X \pm SEM$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Bei Moxonidin in höherer Konzentration (10^{-5}) kam es zu einem vollständigen Überwiegen der hemmenden Wirkung (siehe Abb.15).

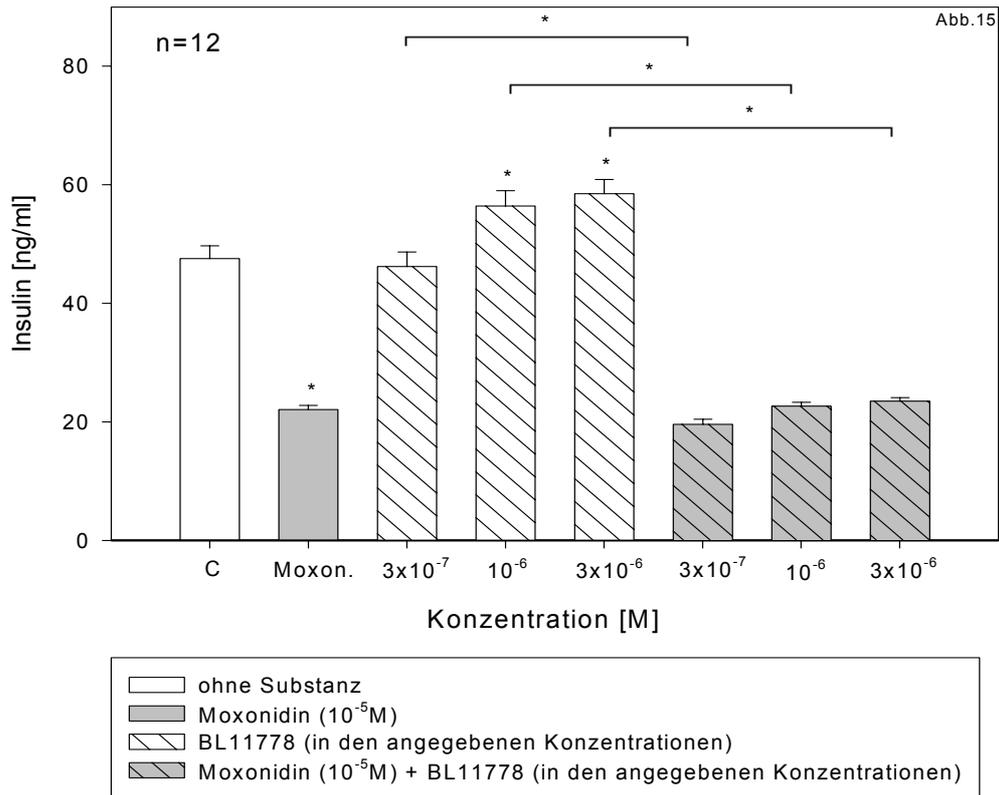


Abb.15:

Der Einfluss von Moxonidin (10^{-5} M) und BL11778 (3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeführt.

(Daten sind als $X \pm$ SEM angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

3.1.4.6) Moxonidin und BL 11771:

Der Antagonismus von Moxonidin ließ sich in gleichem Maße auch für die andere Imidazolinverbindung, BL 11771, nachweisen. Es konnten ähnliche Effekte beobachtet werden (siehe Abb.16 u. 17).

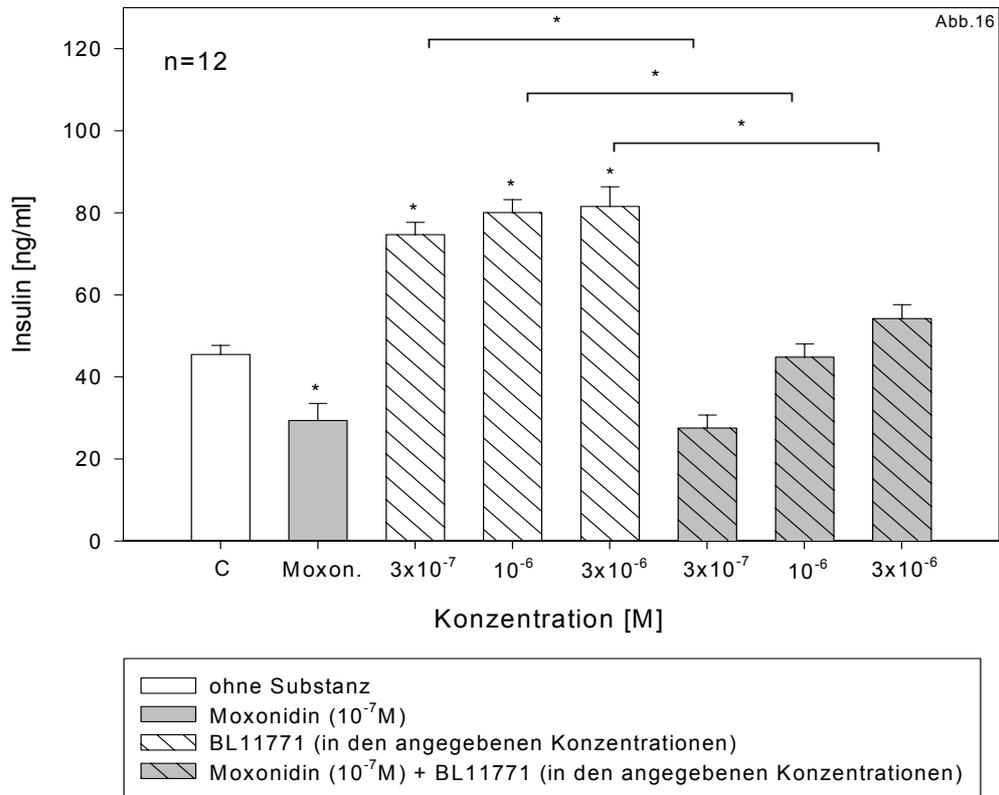


Abb.16:

Der Einfluss von Moxonidin (10^{-7} M) und BL11771 (3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeführt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Ergebnisse

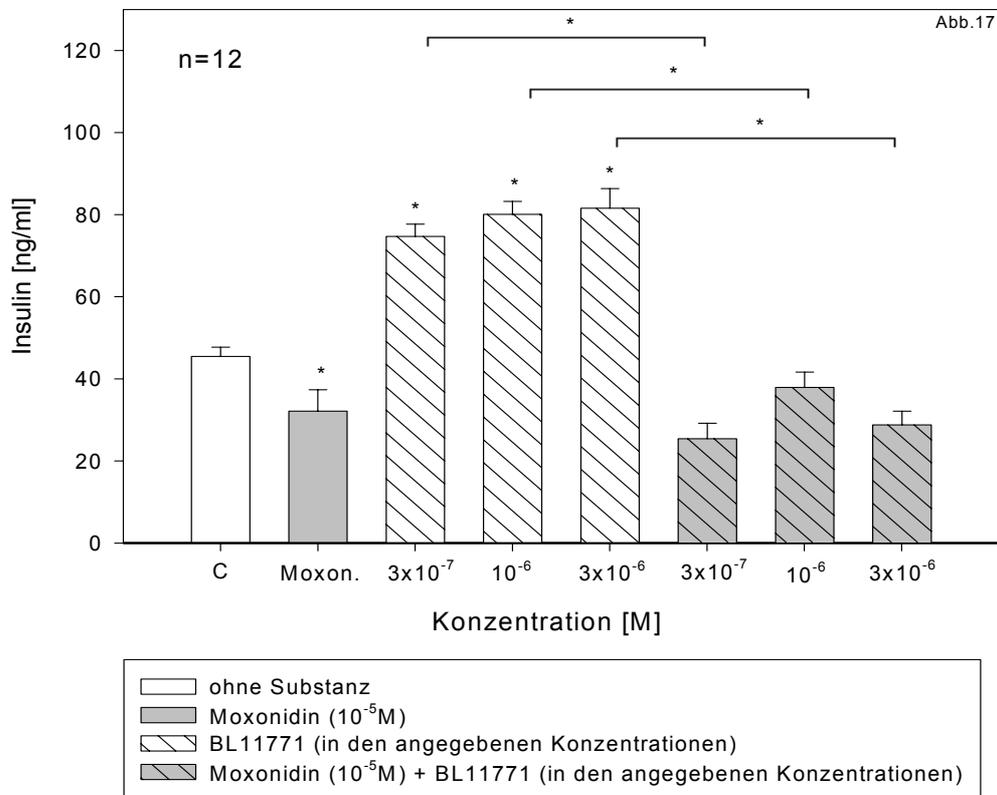


Abb.17:

Der Einfluss von Moxonidin (10^{-5} M) und BL11771 (3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeföhrt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Zusammenfassend lässt sich für die untersuchten Substanzen sagen, dass sich ihre Wirkungen untereinander beeinflussen. Der α -Agonist Phenylephrin in Kombination mit dem α -Antagonisten Prazosin, sowie Moxonidin in Kombination mit Pentolamin und den Imidazolin BL11778 und BL11771 zeigten, im Hinblick auf die Insulinfreisetzung der MIN6-Zelle, eine entgegengesetzte Wirkung und waren in der Lage ihre Wirkungen zu antagonisieren. Weiterhin zeigte Phentolamin in Kombination mit BL11778 und BL11771 eine leichte additive Wirkung.

Ergebnisse

Substanz	IC50 (log[M])
Phenylephrin	$4,0 \times 10^{-6}$
Moxonidin	$1,0 \times 10^{-8}$
Substanz	EC 50 (log[M])
Phentolamin	$3,1 \times 10^{-6}$
BL 11778	$4,0 \times 10^{-7}$
BL 11771	$2,9 \times 10^{-7}$

Tab.1:
IC50-(bzw. EC50) Werte der Substanzen mit Einfluss auf die α -
Rezeptoren sowie der Imidazolinverbindungen BL 11778 und
BL 11771.

3.2) β -Rezeptoren

An den β -Rezeptoren wurden ebenfalls zuerst die Einflüsse der einzelnen Substanzen alleine, unter high- und low-Glukose Bedingungen, getestet und darauffolgend untersucht, wie sie in Kombination wirken.

Alle Kombinationsversuche fanden nur unter high-Glukose Bedingungen statt.

3.2.1) β -agonistisch wirkende Substanzen

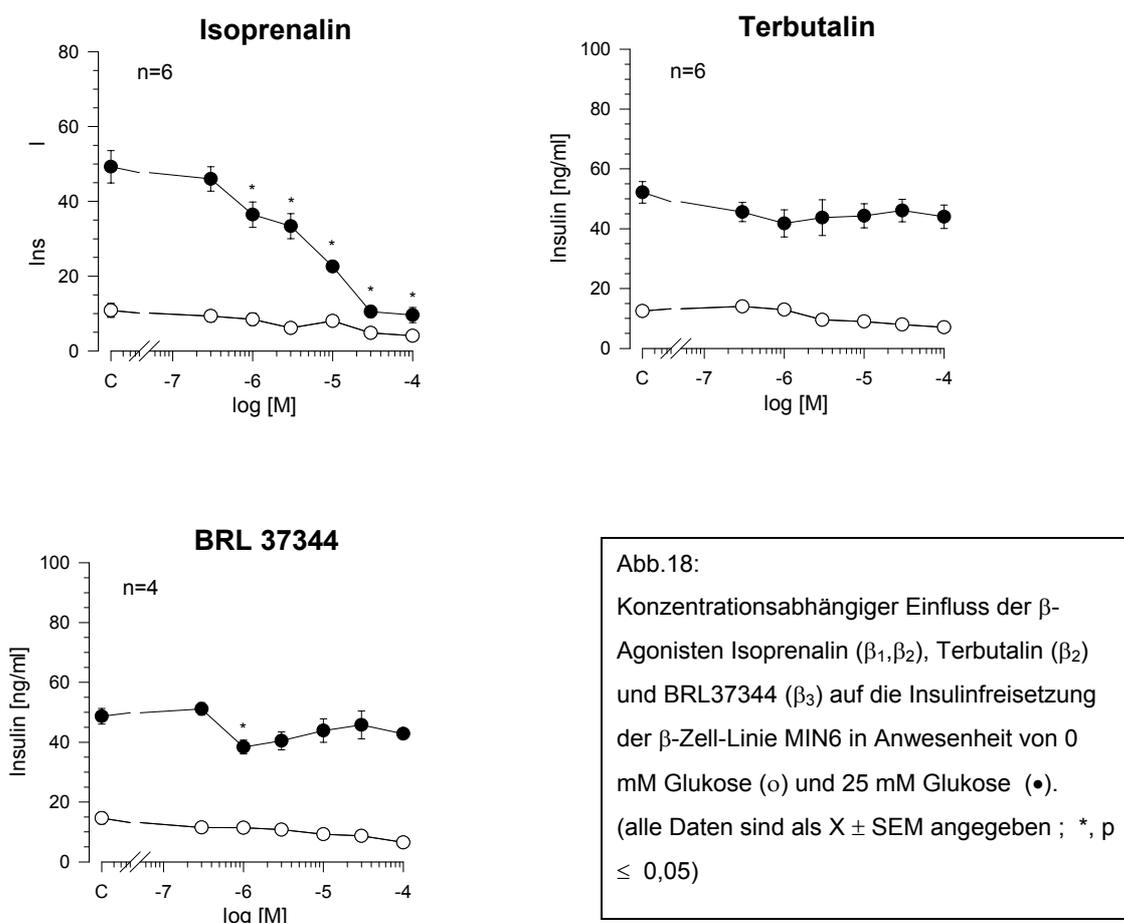


Abb.18:
 Konzentrationsabhängiger Einfluss der β -Agonisten Isoprenalin ($\beta_{1,2}$), Terbutalin (β_2) und BRL37344 (β_3) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 in Anwesenheit von 0 mM Glukose (o) und 25 mM Glukose (\bullet).
 (alle Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Der β_1 - und β_2 -Agonist Isoprenalin senkte in Anwesenheit von Glukose die Insulinfreisetzung dosisabhängig von einem Kontrollwert, der bei 49 ng/ml lag auf 9,5 ng/ml ($IC_{50}=5,3 \times 10^{-6}$). In Abwesenheit von Glukose zeigte die Substanz keine Wirkung (siehe Abb.18).

Der selektive β_2 -Agonist Terbutalin zeigte unter beiden Glukose-Bedingungen keine Veränderung zur Kontrolle.

Ebenso verhielt sich der selektive β_3 -Agonist BRL 37344, jedoch kam es in dieser Versuchsreihe bei einer Konzentration von 10^{-6} M zu einer leichten, auch statistisch signifikanten, Hemmung der Insulinsekretion. Betrachtet man jedoch den Kurvenverlauf und das Ausmaß dieser Verminderung bleibt es Inhalt der Diskussion, ob es sich hierbei nicht um einen Artefakt handeln könnte.

Unter dieser Voraussetzung lässt sich für die β -Agonisten festhalten, dass Isoprenalin eine hemmende Wirkung besitzt, wohingegen Terbutalin und BRL 37344 wirkungslos sind.

3.2.2) β -antagonistisch wirkende Substanzen

Propranolol zeigte sowohl als (R)- als auch als (S)-Enantiomer, welches die pharmakologisch aktive Form darstellt, einen fast identischen Kurvenverlauf: eine dosisabhängige Erhöhung der Insulinsekretion mit einem Maximum bei 3×10^{-5} M und anschließendem Abfall (R-Prop., $EC_{50}=1,0 \times 10^{-5}$; S-Prop., $EC_{50}=8,7 \times 10^{-6}$) (siehe Abb.19).

In maximal wirksamer Konzentration erreichte (R)-Propranolol eine Steigerung der Insulinausschüttung von einem Kontrollwert von 38 ng/ml auf 69 ng/ml und (S)-Propranolol eine Steigerung von 40 ng/ml auf 64 ng/ml.

Diese Ergebnisse waren nur glukoseabhängig zu beobachten.

Der ebenfalls nicht selektive β -Blocker Pindolol zeigte auch einen glukoseabhängigen Anstieg der Insulinfreisetzung, wobei es bei einer Konzentration von 10^{-4} M zu einem weiteren Anstieg der Kurve kam. Insgesamt steigerte Pindolol die gemessene Insulinmenge von 33,5 ng/ml

auf 62 ng/ml. Die Substanz führte also zu einer annähernden Verdopplung im Vergleich zur Kontrolle (EC50=2,7x10⁻⁵).

Der β_1 -selektive Antagonist Atenolol zeigte in Ab- sowie in Anwesenheit von Glukose keine Wirkung.

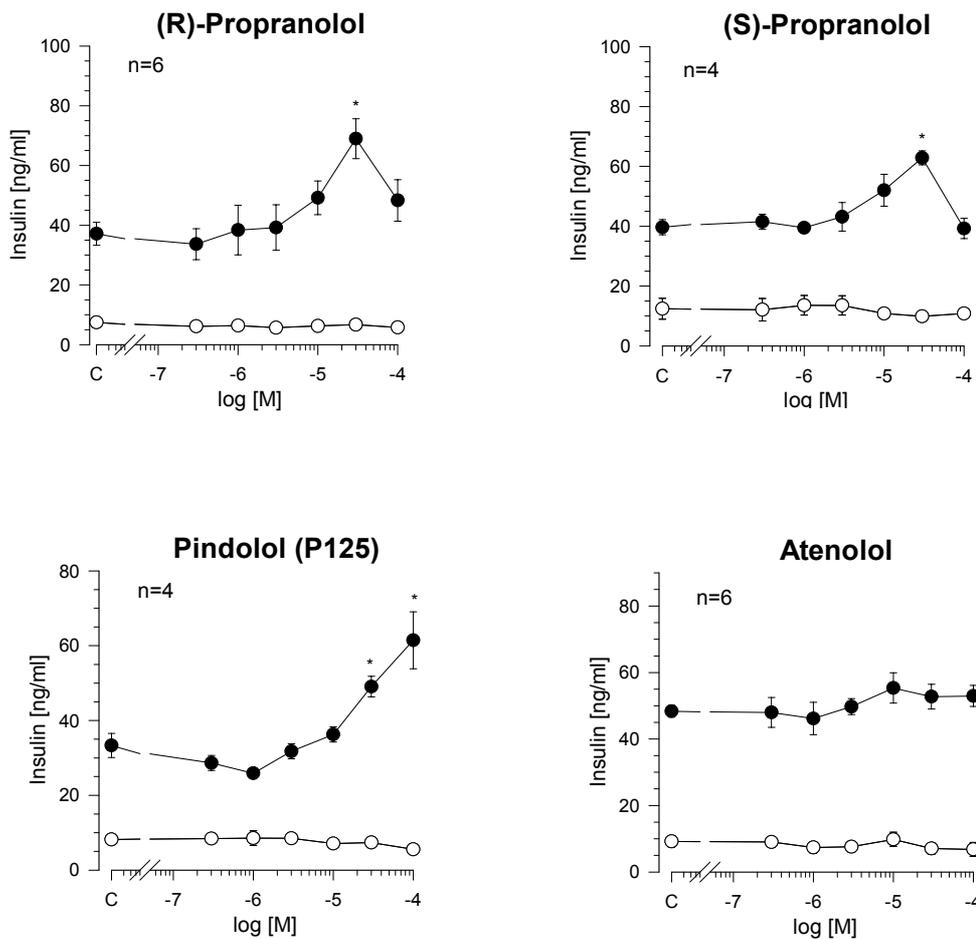


Abb. 19:
 Konzentrationsabhängiger Einfluss der nicht selektiven β -Antagonisten (R)- bzw. (S)-Propranolol und Pindolol, sowie des β_1 -selektiven Antagonisten Atenolol auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 in Anwesenheit von 0 mM Glukose (o) und 25 mM Glukose (•).
 (alle Daten sind als $X \pm SEM$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

3.2.3) Kombination von β -Agonisten und β -Antagonisten

3.2.3.1) Isoprenalin und (R)-Propranolol:

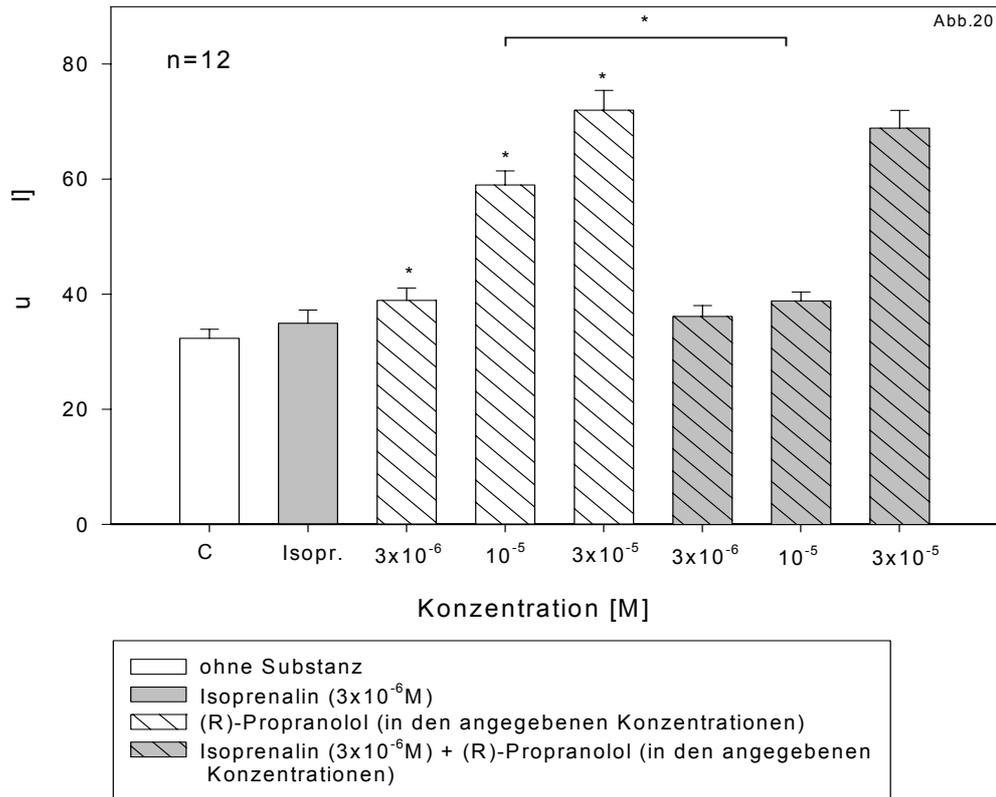


Abb.20:
 Der Einfluss von Isoprenalin ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$) und (R)-Propranolol ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$, 10^{-5} M , $3 \times 10^{-5} \text{ M}$) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.
 Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeföhrt.
 (Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; * , $p \leq 0,05$)

Es zeigte sich, dass Isoprenalin in der Lage war, die Sekretionssteigerung durch (R)-Propranolol ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$, 10^{-5} M , $3 \times 10^{-5} \text{ M}$) zu antagonisieren (siehe Abb.20 u. 21). Auch dieser Effekt war dosisabhängig und bei einer Isoprenalinkonzentration von 10^{-5} M besonders deutlich zu sehen.

Man kann in Abb. 21 sehen, dass diese Isoprenalinkonzentration eine durch $3 \times 10^{-5} \text{M}$ Propranolol induzierte Insulinausschüttung von 72 ng/ml auf 53 ng/ml senken konnte.

In gleichem Maße war Isoprenalin in der Lage, auch die Sekretionssteigerung durch (S)-Propranolol zu inhibieren (Daten nicht gezeigt).

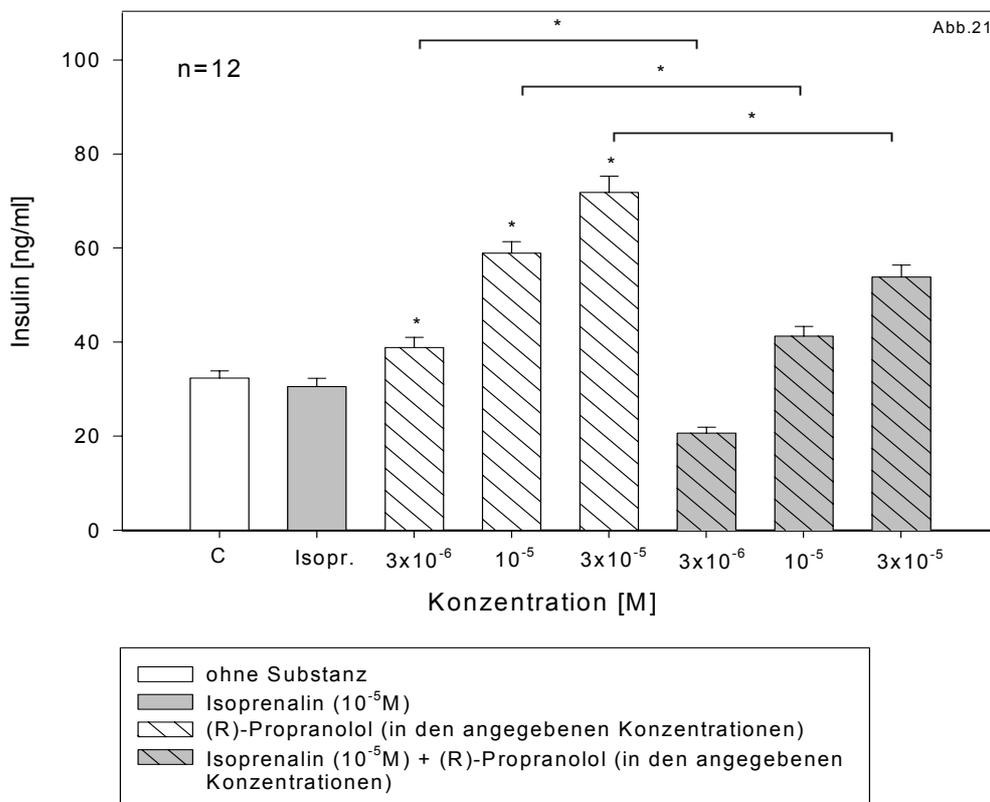


Abb.21:
 Der Einfluss von Isoprenalin (10^{-5}M) und (R)-Propranolol ($3 \times 10^{-6} \text{M}$, 10^{-5}M , $3 \times 10^{-5} \text{M}$) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.
 Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeführt.
 (Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

3.2.3.2) Isoprenalin und Pindolol:

Wie auch bei Propranolol, kam es bei Pindolol ($3 \times 10^{-6} \text{M}$, $3 \times 10^{-5} \text{M}$, 10^{-4}M) zu einer gesteigerten Insulinfreisetzung, die durch Isoprenalin gehemmt werden konnte. Die Hemmung ist bei einer Isoprenalinkonzentration von 10^{-5}M deutlich zu sehen. Isoprenalin konnte in dieser Konzentration den Effekt von 10^{-4}M Pindolol von 36 ng/ml auf 26 ng/ml senken. Man sieht, dass es bei Kombination dieser Isoprenalinkonzentration mit einer niedrigen Pindololkonzentration ($3 \times 10^{-6} \text{M}$) zu einem völligen Überwiegen der Isoprenalinwirkung kommt (siehe Abb.22).

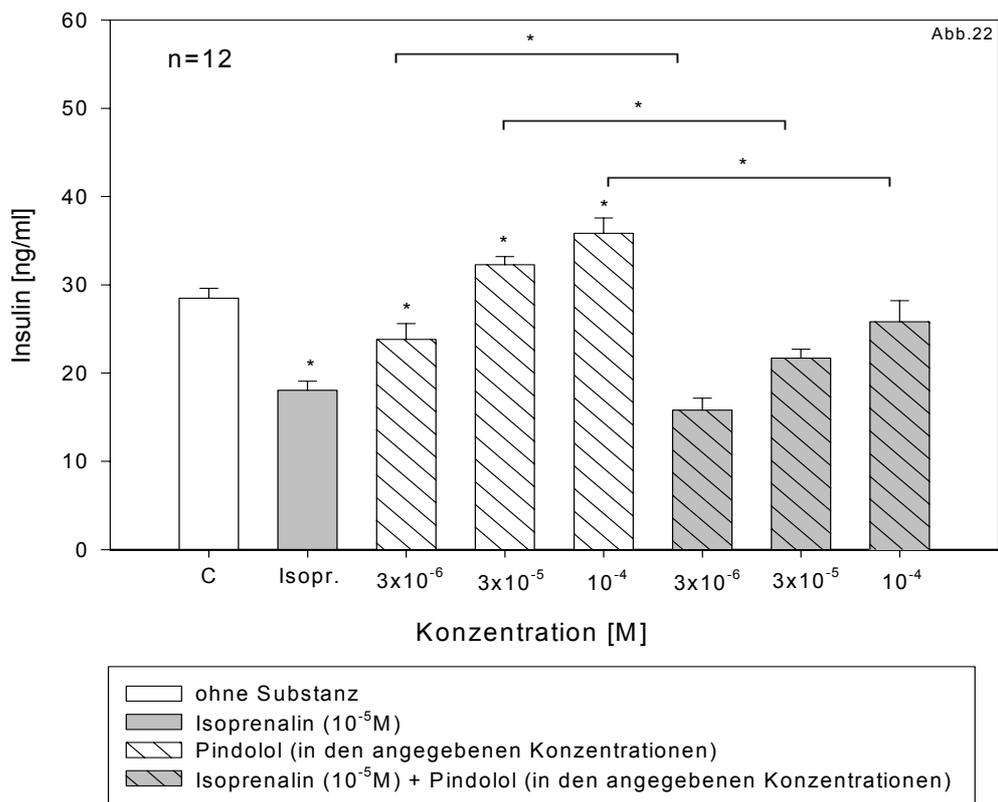


Abb.22:
 Der Einfluss von Isoprenalin (10^{-5}M) und Pindolol ($3 \times 10^{-6} \text{M}$, $3 \times 10^{-5} \text{M}$, 10^{-4}M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.
 Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeführt.
 (Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

3.2.3.3 Terbutalin und (R)-Propranolol:

Wie schon in den Einzelversuchen zeigte Terbutalin alleine keine Wirkung. Auch in Kombination war die Substanz weder in 10^{-6} M, noch in 10^{-4} M Konzentration in der Lage, die gesteigerte Freisetzung durch (R)-Propranolol (3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M) zu beeinflussen.

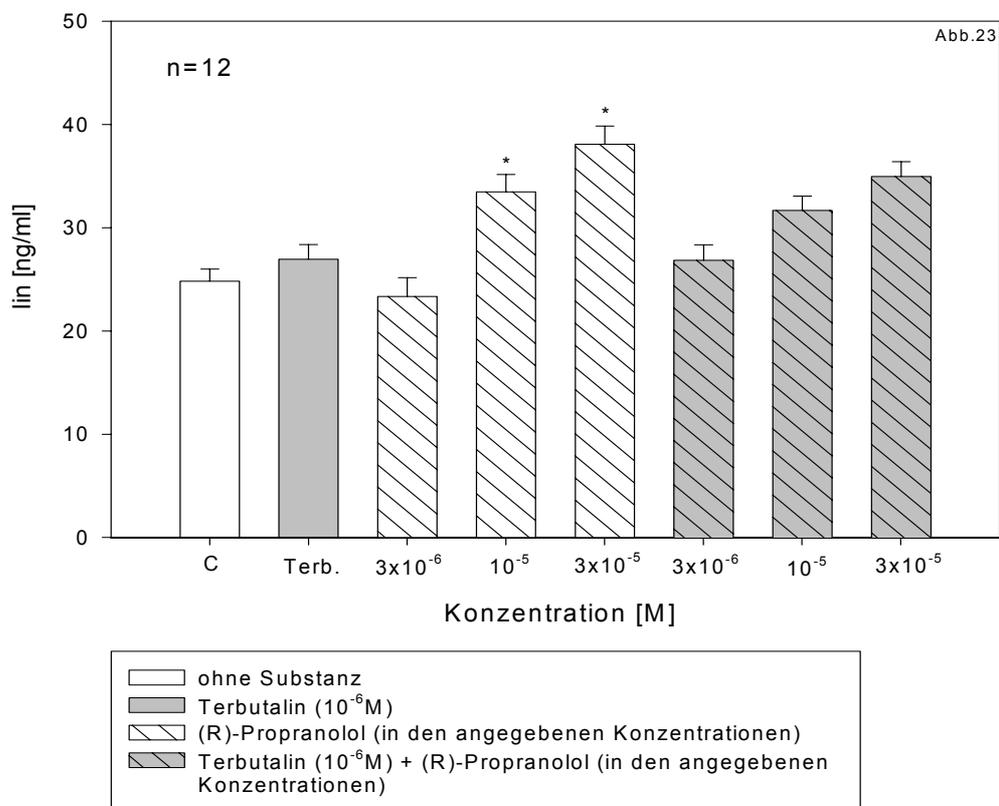


Abb.23:

Der Einfluss von Terbutalin (10^{-6} M) und (R)-Propranolol (3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeföhrt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Ergebnisse

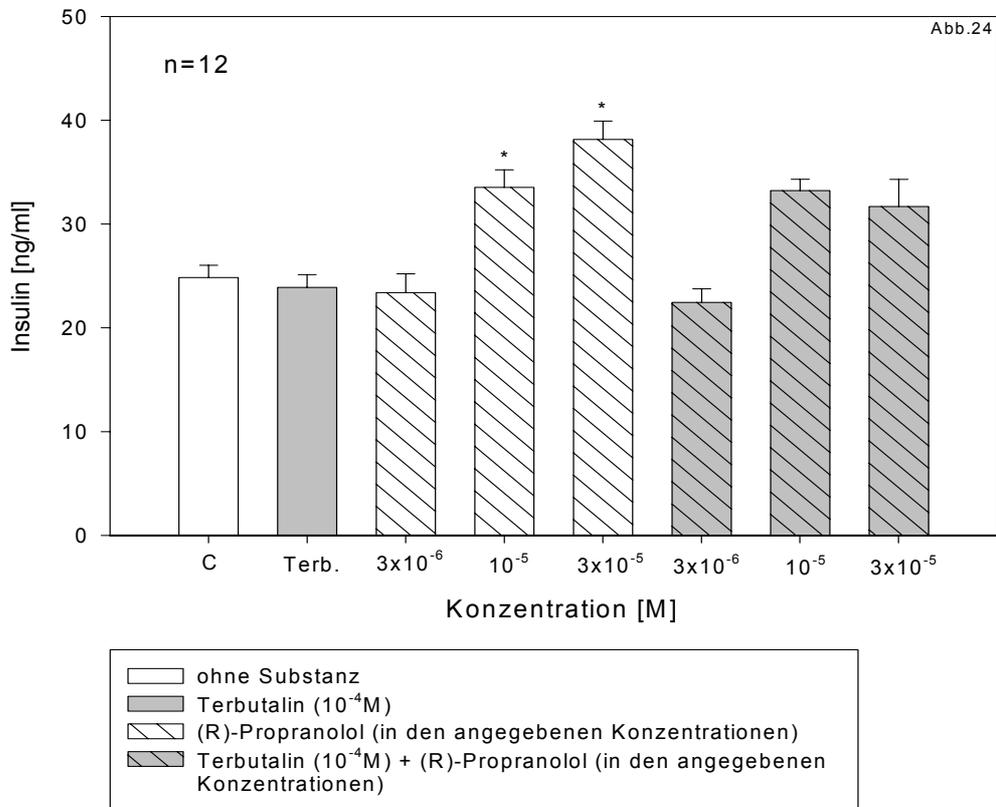


Abb.24:

Der Einfluss von Terbutalin (10^{-4} M) und (R)-Propranolol (3×10^{-6} M, 10^{-5} M, 3×10^{-5} M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeföhrt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Wie in Abb.23 u. 24 zu sehen ist, zeigen die Balken der Insulinfreisetzung von (R)-Propranolol alleine, sowie in Kombination mit Terbutalin keine signifikanten Unterschiede.

Wiederum kam der Versuch mit (S)-Propranolol zu den gleichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

3.2.3.4) Terbutalin und Pindolol:

Bei Pindolol ($3 \times 10^{-6} \text{M}$, $3 \times 10^{-5} \text{M}$, 10^{-4}M) zeigte Terbutalin keine Wirkung und konnte die gesteigerte Insulinfreisetzung nicht beeinflussen (siehe Abb.25).

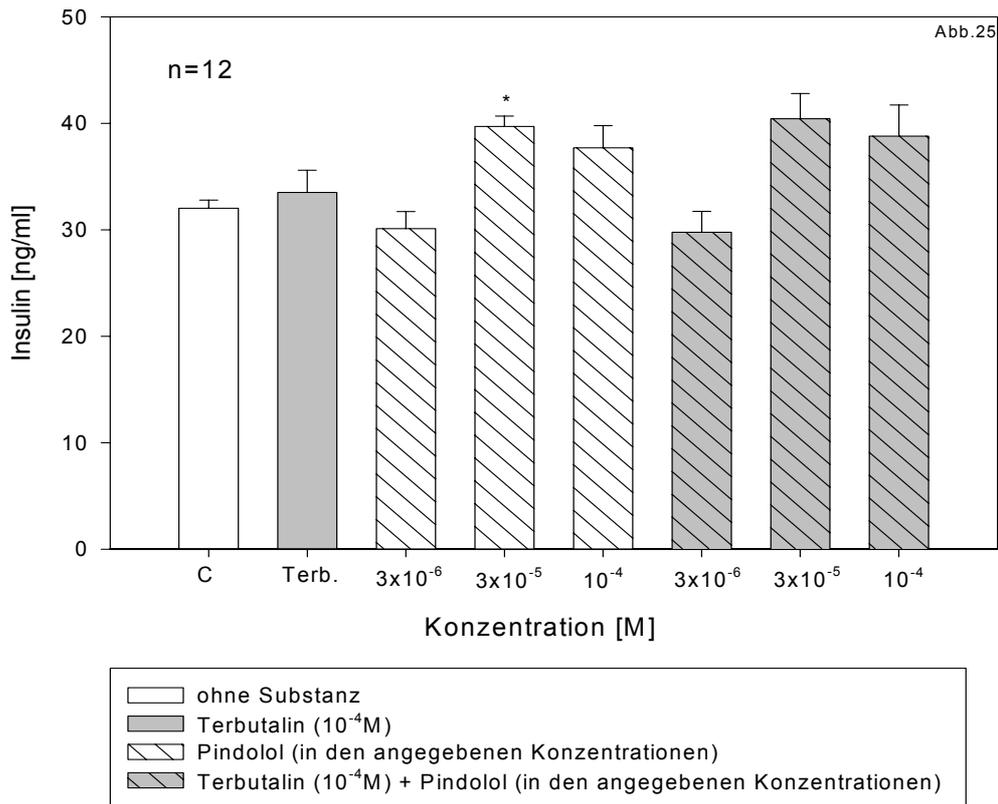


Abb.25:

Der Einfluss von Terbutalin (10^{-4}M) und Pindolol ($3 \times 10^{-6} \text{M}$, $3 \times 10^{-5} \text{M}$, 10^{-4}M) auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 einzeln, sowie in Kombination.

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 25mM Glukose durchgeführt.

(Daten sind als $X \pm \text{SEM}$ angegeben ; *, $p \leq 0,05$)

Zusammenfassend lässt sich für die untersuchten Substanzen festhalten, dass sich ihre Wirkungen untereinander nur teilweise beeinflussen. So lassen sich die sekretionssteigernden Effekte der β -Blocker Propranolol und Pindolol durch den β -Agonisten Isoprenalin hemmen, jedoch ist der selektive β_2 -Agonist Terbutalin dazu nicht in der Lage.

Substanz	IC 50 (log[M])
Isoprenalin	$5,3 \times 10^{-6}$
Substanz	EC 50 (log[M])
(R)-Propranolol	$1,0 \times 10^{-5}$
(S)-Propranolol	$8,7 \times 10^{-6}$
Pindolol	$2,7 \times 10^{-5}$

Tab.2:
IC50- (bzw. EC50) Werte der Substanzen mit Einfluss auf die β -Rezeptoren.

4.) Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Zelllinie verwendet, um Aussagen zur Insulinsekretion zu machen. Zelllinien haben den Vorteil, dass man sie in großen Versuchsreihen einsetzen kann. Andererseits haben sie den Nachteil, nicht in vollem Umfang die physiologischen Bedingungen zu simulieren, da es sich bei diesen Zellen um modifizierte Zellen handelt, bei deren Modifikationen sich auch Veränderungen in der Zellaktivität eingestellt haben können. Ein weiterer Nachteil ist die Tatsache, dass sich die Eigenschaften der Zellen nach mehreren Passagen verändern können.

Weiterhin gilt zu beachten, dass die einzelne β -Zelle nur als kleine Einheit gesehen werden darf. So kann die Insulinsekretion erheblich differieren, wenn man sie an der isolierten Zelle, an Pseudoinseln (Brenner u. Mest, 2004), im Verband der Langerhans'schen Insel oder im gesamten Pankreas betrachtet, da sich beispielsweise die Inselzellen über Zell-Zell-Kontakte gegenseitig beeinflussen und auf diesem Weg die Insulinfreisetzung verändern können (Caton et al., 2002).

Wird die Insulinfreisetzung in-vivo, also am gesamten Organismus gemessen, ist sie einer Vielzahl weiterer einflussnehmender Faktoren unterworfen, was die Vergleichbarkeit zwischen den in-vitro und in-vivo vorkommenden Ergebnissen erheblich erschwert.

4.1) Substanzen mit Wirkung auf α - und Imidazolin-Rezeptoren

4.1.1) α_1 -Adrenergika

Phenylephrin (α_1 -Agonist) zeigte eine Hemmung der Insulinsekretion. Diese Ergebnisse demonstrierten auch Tilzey et al. (1985) bei In-vitro-Versuchen an isolierten Inseln. Jedoch gibt es auch Ergebnisse anderer Untersuchungen, bei denen die Substanz, allerdings in In-vivo-Versuchen an

der Maus, keinen Einfluss auf die Plasmainsulinspiegel hatte (Panagiotidis et al., 1993).

Der Antagonist am α_1 -Rezeptor Prazosin zeigte keinen Einfluss auf die Insulinsekretion. Zu diesen Ergebnissen kamen u.a. auch Garrino und Henquin (1990) bei In-vitro-Versuchen, aber auch Jasik et al. (1996) bei In-vivo-Versuchen am Menschen.

Phenylephrin wirkt nicht auf α_2 -Rezeptoren und hat nur in sehr hohen Konzentrationen einen geringen Einfluss auf die β -Rezeptoren. Um nun zu untersuchen, ob es sich bei den Auswirkungen der Substanz tatsächlich um α_1 -vermittelte Effekte handelt oder diese eventuell durch Wechselwirkung mit anderen Bindungsstellen entstehen, wurde sie mit Prazosin kombiniert.

Man sieht in Abb. 5, dass die hemmende Wirkung von Phenylephrin durch Kombination mit Prazosin aufgehoben werden konnte. Somit kann man vermuten, dass es sich bei der Wirkung von Phenylephrin um einen α_1 -vermittelten Effekt handelt.

4.1.2) α_2 -Adrenergika und Imidazoline

Phentolamin zeigte auch in unseren Versuchen den erwarteten Anstieg der Insulinfreisetzung, wohingegen Phenoxybenzamin, mit ähnlicher α -blockierender Wirkung, die Freisetzung nicht signifikant beeinflussen konnte. Diese Effekte beschrieben u.a. schon Nakaki et al. (1980). Hier konnten die meisten α_2 -Blocker zwar die katecholamin-induzierte Insulinhemmung antagonisieren, zeigten jedoch, mit Ausnahme von Phentolamin, ohne adrenergen Basaltonus keine Effekte.

Da auch in den Versuchen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, kein adrenerger Tonus vorlag, wird hier deutlich, dass die Wirkung von Phentolamin mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht über α_2 -Rezeptoren vermittelt wird und bestätigen die 1989 von Schulz und Hasselblatt erstmals dargelegten Beobachtungen, dass die insulinfreisetzende Wirkung von

Phentolamin nicht der α -blockierenden Wirkung zugeschrieben werden kann, sondern in der Imidazolinstruktur begründet zu sein scheint.

Einen weiteren Beweis, der gegen die Tatsache spricht, dass Phentolamin seine Wirkung an der β -Zelle über die α_2 -Rezeptoren entfaltet, lieferten Proks und Ashcroft (1997), indem sie zeigten, dass Phentolamin über die Kir6.2 Untereinheit des K_{ATP} -Kanals in der β -Zellmembran wirkt (siehe Kap. 1.2), an der auch viele andere Imidazolin-Verbindungen mit sekretionssteigerndem Wirkspektrum ihren Ansatzpunkt haben.

Die vorliegende Arbeit bezog mit BL 11771 und BL 11778 die Wirkung von zwei Imidazolin-Derivaten in ihre Untersuchungen mit ein, die auf α -Rezeptoren ohne Wirkung sind und, wie Abb.1.2 zu entnehmen ist, sich in ihrer Struktur sehr ähnlich sind. Wie die meisten Verbindungen ihrer Stoffklasse zeigten auch diese beiden einen Anstieg der Insulinausschüttung in Anwesenheit von Glukose. Zu identischen Ergebnissen kamen auch Mest et al. (2001), indem sie für BL11778 an MIN6-Zellen, an Ratteninseln sowie an diabetischen Ratten einen glukoseabhängigen Anstieg der Insulinsekretion demonstrierten.

Beide Substanzen zeigen, wie auch Phentolamin und einige der später diskutierten β -Blocker, einen glockenförmigen (= bell-shaped) Kurvenverlauf. Man kann nach erreichtem Maximum einen Rückgang der Insulinsekretion beobachten. Dies ist ein Effekt, der schon öfter beobachtet werden konnte und vermutlich auf toxischen Effekten der Substanzen beruht. Sowohl Mourtada et al. (2000), als auch Scheltdorf (2001) konnten für Phentolamin und andere Imidazoline zytotoxische Effekte in hohen Konzentrationen oder bei langer Anwesenheit im Inkubationsmedium nachweisen.

Wie erwähnt, macht die Glukoseabhängigkeit der Insulinsekretion, die bei vielen Imidazolinen vorliegt, diese Verbindungen zu einem interessanten Hilfsmittel, die Insulinfreisetzung zu steigern, ohne hierdurch Hypoglykämien entstehen zu lassen, die als Nebenwirkungen vieler Antidiabetika, wie z.B.

Sulfonylharnstoffen oder Glinidinen, vorkommen. Interessanterweise zeigte Phentolamin auch ohne Anwesenheit von Glukose einen Anstieg der Insulinsekretion (siehe Abb.3). Es ist allerdings nicht bekannt, welche Gründe für das glukoseunabhängige Sekretionsverhalten verantwortlich sind. Ansatzpunkte hierfür könnten in der Interaktion mit den α -Rezeptoren oder in einer Intensität der K^+ -Kanal Blockade zu suchen sein.

Um zu demonstrieren, wie sich die Imidazoline gegenseitig beeinflussen und ob sich eventuell additive Effekte zeigen, wurde Phentolamin mit BL 11778 (siehe Abb. 6 - 8) und BL 11771 (siehe Abb. 9 u. 10) kombiniert. In beiden Versuchen wird deutlich, dass es in niedrigen Konzentrationen zu einem synergistischen Effekt kommt, sich durch Steigerung der Konzentrationen aber kein additiver Effekt einstellt. Die Konzentrationskurven zeigen nach erreichtem Maximum in beiden Versuchen wieder eine Abnahme der Insulinfreisetzung. Würden beide Substanzen über komplett unterschiedliche Wirkmechanismen verfügen, die sich gegenseitig nicht beeinflussen, müsste man bei gleichzeitiger Applikation einen additiven Effekt beobachten, was jedoch hier nicht der Fall ist. Dass der fehlende additive Effekt mit einer Erschöpfung des freisetzbaren Insulins begründet wird, konnte Scheltdorf (2001) widerlegen. Er zeigte, durch Kombination eines Imidazolins mit einem potenten PKC-Aktivator, dass MIN6-Zellen eine Sekretionskapazität haben, die weit über der durch Imidazoline induzierten Insulinsekretion liegt.

Somit kann man bezüglich des fehlenden additiven Effektes vermuten, dass diese Substanzen weitgehend über die gleichen Wirkmechanismen ihre Wirkung entfalten. Aufgrund der glukoseunabhängigen Sekretionssteigerung, die nur bei Phentolamin zu sehen ist, muss man allerdings beachten, dass die Wirkungsweisen nicht komplett identisch sein können. Dies könnte zum Teil dadurch begründet werden, dass die Imidazoline über mehrere Ansatzpunkte verfügen, was von vielen Arbeitsgruppen postuliert wird (Eglen et al., 1998; Morgan, 1999; siehe Kap.1.6).

Eine weitere untersuchte Verbindung ist mit Moxonidin eine Substanz, die als Agonist sowohl bezüglich der α_2 -Rezeptoren als auch bezüglich der Imidazolin-Rezeptoren wirkt. Somit liegt mit Moxonidin eine Substanz vor, die zwei Affinitäten mit gegensätzlichen Wirkungen aufweist. Einerseits müsste sie aufgrund ihres α_2 -Agonismus eine Hemmung der Insulinsekretion bewirken, nimmt man jedoch die Wirkungen der bereits untersuchten Imidazoline als Vorlage, könnte man davon ausgehen, dass auch Moxonidin eine Steigerung der Insulinfreisetzung bewirkt. Allerdings ist schon seit längerem bekannt, dass Moxonidin zu einer Hemmung der Insulinsekretion führt. Tsoli et al. (1995) konnten dies an Langerhans'schen Inseln der Ratte verdeutlichen, Hirose et al. (1997) führten an der β -Zell-Linie HIT-T15 Versuche durch, in denen Clonidin, welches Moxonidin strukturell ähnlich ist, ebenfalls eine Hemmung des gemessenen Insulins zeigte.

Auch in unseren Versuchen zeigte Moxonidin eine Hemmung der Insulinfreisetzung, was die Frage aufwirft, über welchen Mechanismus diese Hemmung entsteht?

Ein möglicher Ansatz, die Wirkung von Moxonidin zu erklären, liegt darin begründet, dass Chan (1993) und Chan et al. (1994) zeigten, dass die Imidazolin-Bindungsstelle der pankreatischen β -Zelle nicht identisch mit den bekannten I_1 - und I_2 -Bindungsstellen in ZNS und Gefäßen ist. Sie ist, wie bereits erwähnt, als mögliche I_3 -Bindungsstelle noch Gegenstand der Forschung.

Da für Moxonidin aber nur ein Agonismus am I_1 -Rezeptor nachgewiesen ist, könnte man vermuten, dass die Substanz in der β -Zelle über einen Mechanismus wirkt, der wahrscheinlich auch in Beziehung zu der pankreatischen I_3 -Bindungsstelle der Imidazoline steht, jedoch nicht identisch mit dem I_1 -Rezeptor ist, und durch einen Antagonismus an diesem Rezeptor die Insulinsekretion hemmt.

Einen I_1 -unabhängigen Mechanismus implizieren auch die Ergebnisse von Tsoli et al. (1995). Sie demonstrierten an isolierten Langerhans'schen Inseln der Ratte die gleichen negativen Effekte von Moxonidin. Weiterhin zeigte in deren Versuchen die Substanz Cimetidin, ebenfalls selektiver I_1 -Agonist,

jedoch ohne Wirkung auf α -Rezeptoren, keinen Einfluss auf die gemessene Insulinmenge und der I_1 -Antagonist Efaroxan konnte die negative Wirkung von Moxonidin nicht aufheben. Somit kann man hier eine I_1 -vermittelte Wirkung ausschließen. Weiterhin zeigten Tsoli et al. (1995), dass die hemmende Wirkung von Moxonidin durch einen α_2 -Antagonisten teilweise blockiert werden konnte.

Eine weitere interessante Untersuchung zu diesem Sachverhalt führten Scheltdorf und Mest (2002) durch. Hier wurden die MIN6-Zellen mit Pertussistoxin (PTX), einer Substanz, welche die Funktion der α_2 -Adrenozeptoren ausschaltet, präinkubiert. Nach dieser Vorbehandlung führte Moxonidin zu einer deutlichen Steigerung der Insulinsekretion. Durch Messung des Membranpotentials wiesen sie zudem eine Depolarisation bei PTX-vorbehandelten Zellen nach. Ohne PTX-Vorbehandlung zeigten die Zellen nach Moxonidin-Applikation eine Hyperpolarisation und eine Hemmung der Insulinsekretion. Somit schlossen sie hieraus, dass der Imidazolin-Agonismus durch den α_2 -Agonismus maskiert wird, was bedeutet, dass Moxonidin zwar Affinität sowohl zu α_2 -, als auch zu Imidazolin-Rezeptoren hat, jedoch, bezüglich der Insulinsekretion, der α_2 -Agonismus deutlich überwiegt.

Es sollte aber nicht unerwähnt bleiben, dass bezüglich der Moxonidinwirkung auch gegenteilige Untersuchungsergebnisse vorliegen. So zeigte die Substanz bei Olmos et al. (1994) an der β -Zell-Linie RIN-5 AH in hohen Konzentrationen von $5 \times 10^{-4} \text{M}$ eine Steigerung der Insulinfreisetzung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Rösen et al. (1997), die in ihren Versuchen an isolierten Ratteninseln, sowohl stimulierende, als auch inhibierende Wirkungen von Moxonidin in verschiedenen Dosierungen auf die glukoseinduzierte Insulinfreisetzung nachweisen konnten. Dieselbe Forschergruppe zeigte weiterhin in-vivo an Ratten eine Verbesserung der Glukosetoleranz mit Abschwächung der Insulinresistenz nach Behandlung mit Moxonidin. Diesen Effekt schreiben sie allerdings einer zentralen Hemmung des Sympathikotonus zu, was neben einer anti-hypertensiven Wirkung auch in einer verbesserten Insulinwirkung resultieren soll.

Um zu untersuchen, ob Moxonidin und die Imidazoline sich gegenseitig beeinflussen, wurde im Rahmen dieser Arbeit Moxonidin mit Phentolamin, sowie mit BL11778 und BL11771 kombiniert. Hierbei zeigte sich deutlich, dass Phentolamin in der Lage ist, die Hemmung durch Moxonidin aufzuheben und in hoher Konzentration (10^{-5} M) trotz Anwesenheit von Moxonidin die Insulinsekretion zu steigern (siehe Abb. 11-13). Dieser Effekt kann, in Anbetracht der Wirkungsspektren beider Substanzen, folgendermaßen erklärt werden: Zum einen wird der α_2 -agonistische Effekt von Moxonidin durch den α -antagonistischen Effekt von Phentolamin blockiert und Moxonidin führt durch Stimulation der Imidazolin-Rezeptoren seinerseits zu einer Erhöhung der Insulinsekretion. Außerdem wirkt Phentolamin direkt über die Imidazolin-Bindungsstellen sekretionssteigernd, und somit der hemmenden Wirkung von Moxonidin entgegen.

In umgekehrter Weise war Moxonidin in der Lage, den stimulierenden Effekt von BL 11778 und BL 11771 aufzuheben (siehe Abb. 14,15 u. 16,17), was wiederum dem α_2 -Agonismus dieser Substanz zugeschrieben werden kann, der stärker ist als die sekretionssteigernde Wirkung der beiden Imidazoline und in hoher Konzentration (10^{-5} M) deren Effekte völlig überdeckt.

Zusammenfassend lässt sich also für die Insulinfreisetzung der MIN6-Zelle sagen, dass die Ergebnisse bezüglich der α_1 -Rezeptoren die Vermutung nahe legen, dass über sie, zumindest in dieser Zell-Linie und in den gezeigten Versuchen, ein hemmender Effekt erfolgt.

Über die steigernde Wirkung von Phentolamin kann gesagt werden, dass sie vermutlich zum großen Teil aufgrund der Imidazolinstruktur erfolgt, da gleichzeitig gezeigt wurde, dass mit Phenoxybenzamin eine Substanz mit α -blockierenden Eigenschaften, jedoch ohne Einfluss auf Imidazolin-Bindungsstellen, nicht in der Lage ist, eine signifikant gesteigerte Insulinfreisetzung zu erreichen.

Über Moxonidin kann gesagt werden, dass die Substanz in der Lage ist, die sekretionssteigernden Wirkungen der anderen Imidazoline zu

antagonisieren, wobei die Substanz diese Auswirkungen wahrscheinlich zu einem großen Teil über Affinität zu α_2 -Rezeptoren erreicht.

Die schon seit längerem bekannte Anhebung der glukoseinduzierten Insulinfreisetzung durch Imidazoline wurde anhand der beiden Substanzen BL 11778 und BL 11771 demonstriert. Da ihre glukoseabhängige Wirkung die Imidazoline zu einem interessanten Werkzeug als potentielle Antidiabetika macht, aber der exakte Wirkmechanismus der einzelnen Imidazoline noch nicht genau bekannt ist, bleibt in dieser Richtung noch viel Raum für weitere Forschungsansätze, um eventuell in absehbarer Zeit eine Substanz zu etablieren, die diesem erwünschten Wirkprofil entspricht.

4.2) Substanzen mit Wirkung auf β -Rezeptoren

4.2.1) β -Agonisten

Der β_1 - und β_2 -Agonist Isoprenalin senkte in den durchgeführten Versuchen die glucoseinduzierte Insulinfreisetzung dosisabhängig. Dieser Effekt entspricht allerdings nicht den Ergebnissen zu denen der überwiegende Teil der Untersuchungen bezüglich der β -Aktivität gekommen ist. Wie bereits in Kap. 1.4.2 der Einleitung erwähnt, soll die Insulinfreisetzung über β -Rezeptoren, genauer über β_2 -Rezeptoren gesteigert werden. Somit kamen die hier durchgeführten Versuche praktisch zu gegenteiligen Ergebnissen.

Aber auch andere Arbeitsgruppen konnten Ergebnisse demonstrieren, die nicht der gängigen Meinung entsprachen:

So konnten Fyles et al. (1986) an isolierten Ratteninseln durch Isoprenalin zwar einen Anstieg der Adenylatcyclase-Aktivität nachweisen, jedoch kam es in ihren Versuchen bezüglich der Insulinsekretion zu keinen Veränderungen. Bei Niddam et al. (1990) zeigte Isoproterenol, welches $\beta_{1u.2}$ -agonistisch wirkt, an isolierten Ratteninseln ebenfalls keine Effekte.

Terbutalin hatte als selektiver β_2 -Agonist keinen Einfluss auf die glukoseinduzierte Insulinfreisetzung, was ebenso nicht mit der ursprünglichen Meinung übereinstimmt, da über β_2 -Rezeptoren eigentlich die Insulinsekretion stimuliert werden soll.

Bei In-vivo-Versuchen an der Maus konnten beispielsweise Ahren und Lundquist (1981) und Panagiotidis et al. (1993) für Terbutalin einen Anstieg der Insulinsekretion nachweisen, wodurch sie diese These bestätigen konnten.

Atef et al. beschrieben 1996 für den spezifischen β_3 -Rezeptor Agonisten CL 316243, in In-vivo-Versuchen an Ratten, eine gesteigerte Insulinfreisetzung. Jedoch vermuteten sie diesen Effekt aufgrund einer spezifischen Vasodilatation in den Langerhans'schen Inseln, da in diesem Versuch neben

der gesteigerten Insulinsekretion eine Zunahme des insulären Blutflusses gemessen wurde, ohne dass jedoch der gesamte pankreatische Blutfluss beeinflusst wurde. Schon früher wurde durch β_3 -Agonisten ein antidiabetischer Effekt an Ratten und Mäusen festgestellt (Caroll et al., 1985; Cawthorne et al., 1984).

Liu et al. (1998) testeten mit CL 316243 dieselbe Substanz wie Atef et al., ebenfalls an diabetischen Ratten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass der antidiabetische Effekt der Substanz, der sich nach länger andauernder Verabreichung einstellte, auf einer verbesserten Glukose-Verwertung, einer verstärkten Insulin-Sensitivität und auf einer Reduzierung des Körpergewichts beruht. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch Milagro et al. (1999). Sie führten den β_3 -induzierten antidiabetischen Effekt neben einer abgeschwächten hepatischen Glukoseproduktion auf eine gesteigerte Glukoseaufnahme der Skelettmuskulatur zurück, die durch vermehrte Bildung von Glukosetransportern entstanden sein sollte.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss eines spezifischen β_3 -agonisten (BRL 37344) überprüft, welcher die Insulinsekretion jedoch unberührt ließ.

Allerdings machen diese Ergebnisse deutlich, dass es nicht verwunderlich ist, wenn β_3 -Agonisten in Versuchen an isolierten β -Zellen keine Wirkung zeigen, da ihr Angriffspunkt eben nicht direkt an der β -Zelle zu suchen ist und ihr antidiabetischer Effekt nicht alleine auf einer Steigerung der Insulinsekretion basiert. Es wird weiterhin deutlich, dass die β_3 -Agonisten Substanzen darstellen, die sich, aufgrund ihres antidiabetischen Effektes, für die Behandlung des Typ-2-Diabetes als nützlich erweisen könnten.

Führt man sich vor Augen, dass Terbutalin und BRL 37344 auf die Insulinproduktion der MIN6-Zellen ohne Wirkung waren, kommt man zu der Annahme, dass in dieser Zell-Linie der sekretionsinhibierende Effekt von Isoprenalin über β_1 -Rezeptoren ausgelöst wird. Jedoch wird im folgenden Kapitel gezeigt, dass Atenolol, ein β -Blocker mit β_1 -spezifischer Wirkung,

keinen Einfluss auf die Insulinsekretion hat, was diese Behauptung wieder in Frage stellen muss.

4.2.2) β -Antagonisten

Bei den β -Blockern zeigte Propranolol einen deutlichen Anstieg der Insulinsekretion in Anwesenheit von Glukose. Das Interessante hierbei ist die Tatsache, dass nicht nur das (S)-Enantiomer, das normalerweise die pharmakologisch aktive Form darstellt, sondern auch das (R)-Enantiomer die gesteigerte Insulinausschüttung bewirkte.

Auch Pindolol, welches Propranolol in seinem Wirkprofil ähnlich ist und ebenfalls unselektiv die β -Rezeptoren blockiert, war in der Lage die Insulinsekretion zu stimulieren.

Wie bei den β -Agonisten entsprechen diese Ergebnisse nicht der ursprünglichen Meinung über die Insulinsekretion, da man annehmen muss, dass, wenn diese β -agonistisch stimuliert wird, eine Blockade dieser Rezeptoren zu einer Hemmung der Sekretion führt.

Bei bisherigen Untersuchungen zu dieser Problematik, kam man ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen.

So zeigten beispielsweise Northrop et al. (1973) an isolierten Ratteninseln einen stimulierenden Effekt von Propranolol auf die Insulinfreisetzung. Ebenso verhielt es sich bei Garrino und Henquin (1990) an Mäuseinseln. Jedoch trat hier der Effekt erst in sehr hohen und pharmakologisch bereits letalen Dosen auf. Bei In-vivo-Versuchen an anästhesierten Ratten von Hiyoshi et al. (1995) zeigte Propranolol keine Veränderung der gemessenen Insulinmenge, während bei In-vivo-Versuchen von Lundquist und Ericson (1978) eine Hemmung der Insulinfreisetzung festgestellt werden konnte, die nur auf das (S)-Enantiomer beschränkt war.

In den Versuchen zu dieser Arbeit wurde weiterhin der Einfluss des spezifischen β_1 -Antagonisten Atenolol geprüft. Allerdings zeigte die Substanz in unseren Versuchen keine Beeinflussung der Insulinsekretion.

Furman und Tayo (1975) konnten für den selektiven β_1 -Blocker ICI 66082 in-vivo einen positiven Einfluss auf die Insulinsekretion feststellen. Auch die bereits erwähnten Garrino und Henquin (1990) demonstrierten in ihren Versuchen an Mäuseinseln, mit dem β_1 -Blocker Metoprolol, eine gesteigerte Insulinfreisetzung.

Somit könnte man, unter dem Aspekt, dass Propranolol in unseren Versuchen die Insulinsekretion steigerte, Atenolol jedoch nicht, vermuten, dass diese Steigerung über eine Blockade von β_2 -Rezeptoren erfolgt. Jedoch wird auch diese Behauptung wieder in Frage gestellt, da, wie bereits erwähnt, der β_2 -Agonist Terbutalin wirkungslos blieb.

4.2.3) Kombination von β -Agonisten und β -Antagonisten

Wie sind nun die Substanzen in der Lage gewesen, sich gegenseitig zu beeinflussen?

Man kann in den Kombinationsversuchen deutlich sehen, dass Isoprenalin in der Lage war, sowohl die Insulinsekretionssteigerung durch Propranolol, als auch durch Pindolol zu antagonisieren (siehe Abb. 20 - 22). Die Wirkung der beiden β -Blocker blieb jedoch durch Kombination mit Terbutalin vollkommen unbeeinflusst (siehe Abb. 23 - 25).

Dadurch kommt man für die Insulinfreisetzung der MIN6-Zelle zu folgender Schlussfolgerung: Unter dem Aspekt, dass Isoprenalin, aber nicht Terbutalin einen Einfluss auf die gemessene Insulinmenge haben, könnte man schließen, dass hier die β_1 -Rezeptoren einen inhibierenden Einfluss haben. Dieses wird dadurch unterstützt, dass Isoprenalin die Wirkung der β -Blocker beeinflussen kann, Terbutalin jedoch nicht. Allerdings widerspricht dieser

These, dass mit Atenolol ein relativ selektiver β_1 -Antagonist keinen Einfluss auf die Insulinsekretion zeigt.

Betrachtet man die Situation von der anderen Seite, könnte man, unter dem Aspekt, dass Propranolol die Insulinsekretion steigert, Atenolol jedoch nicht, zu dem Schluss kommen, dass die Insulinsekretion eventuell über β_2 -Rezeptoren erfolgt. Dann müsste wiederum Terbutalin zu einem Abfall der Insulinsekretion führen oder zumindest die Wirkung von Propranolol antagonisieren, was beides nicht der Fall war.

Somit könnte man auch annehmen, dass nicht nur der Einfluss auf die β -Rezeptoren, sondern eventuell auch der Einfluss über andere Mechanismen für die Auswirkungen auf die Insulinproduktion verantwortlich sind. Hierfür würde sprechen, dass, wie bereits erwähnt, mit (R)-Propranolol eine Substanz deutlich insulinfreisetzend wirkt, die normalerweise an β -Rezeptoren nicht, oder nur sehr gering, pharmakologisch aktiv ist, was wiederum zu der Frage führt, ob nicht in der strukturellen Zusammensetzung dieser Substanzen der Schlüssel für ihre Wirksamkeit liegt?

Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kamen auch Ahren und Lundquist (1981). Sie beobachteten bei In-vivo-Versuchen an der Maus, dass manche β -Blocker inhibierende Auswirkungen auf die Insulinfreisetzung hatten, wohingegen andere, mit gleichem Wirkprofil an β -Rezeptoren, keine Auswirkungen erkennen ließen. Aus diesen Ergebnissen schlossen sie, dass zwar β -Adrenozeptoren an der Insulinfreisetzung beteiligt sind, allerdings die konventionelle Aufteilung in β_1 und β_2 hier nicht zutrifft.

Wie sind aber die Diskrepanzen in den beobachteten Wirkungsweisen der β -adrenergen Substanzen mit der Lehrmeinung, dass über Stimulierung von β -Rezeptoren eine Steigerung der Insulinfreisetzung erfolgt, und umgekehrt, zu erklären?

Wie eingangs der Diskussion erwähnt, liegt natürlich ein großer Unterschied zwischen In-vivo- und In-vitro-Versuchen, was bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden muss. Somit ist es nicht verwunderlich, wenn es zwischen beiden Versuchsreihen zu unterschiedlichen Wirkungen derselben

Substanz kommt. Beispielsweise untersuchten Flaten et al. (1982) die Plasmaspiegel von Insulin und Gastric Inhibitory Protein (GIP), welches durch Glukoseresorption im Dünndarm aktiviert wird und die Insulinsekretion steigert. In ihren Versuchen führte der β_{1+2} -Agonist Isoproterenol zu einer Erhöhung beider Parameter. Dies zeigt deutlich auf, dass nicht nur die Insulinproduktion selbst, sondern auch die entero-insulinäre-Achse durch β -Rezeptoren beeinflusst wird. Somit bleibt anzunehmen, dass noch weitere Bereiche im Organismus, die ebenfalls unter adrenergem Einfluss stehen, Auswirkungen auf die Insulinfreisetzung haben.

Zudem zeigen Versuche von Lundquist (1972) an Mäusen, dass der Effekt von Propranolol auf die Insulinfreisetzung, und in deren Konsequenz auf den Blutglukosespiegel, auch abhängig von der jeweiligen metabolischen Situation des Individuums sein kann. Gesunde Mäuse reagierten in dieser Versuchsreihe auf die Applikation der Substanz mit einer Hyperglykämie durch verminderte Bildung von Insulin, wohingegen bei diabetischen Mäusen ein hypoglykämischer Effekt beobachtet wurde.

Im Übrigen war auch in diesen Versuchen Propranolol nur als (S)-Enantiomer aktiv.

Zusammenfassend lässt sich für die β -Rezeptoren festhalten, dass es in der MIN6-Zelle durch Stimulation von β -Rezeptoren zu einer Hemmung und durch Blockade von β -Rezeptoren zu einer Steigerung der Insulinsekretion kommt, jedoch die klassische Aufteilung in β_1 - und β_2 -Rezeptoren hier nicht zutrifft.

Hierfür sind, wie bereits erwähnt, zwei Gründe zu nennen: Zum einen zeigte der unselektive β -Agonist Isoprenalin eine Hemmung und der unselektive β -Antagonist Propranolol eine Steigerung der Insulinsekretion, wohingegen der spezifische β_2 -Agonist Terbutalin und der spezifische β_1 -Antagonist Atenolol keine Wirkung zeigten. Zum anderen führte Propranolol auch mit seinem, normalerweise nicht wirksamen, (R)-Enantiomer zu einem deutlich insulinfreisetzenden Effekt.

Allerdings ist die Tatsache, dass sich manche Substanzen gegenseitig sehr gut beeinflussen (siehe Isoprenalin und Propranolol bzw. Pindolol) auch ein Anzeichen dafür, dass die Substanzen nicht unabhängig von β -Rezeptoren wirken, und dass bezüglich der Insulinfreisetzung Mechanismen verantwortlich sein könnten, die eventuell in der Struktur der Substanzen zu suchen sind.

Dieser Fragestellung kann allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr nachgegangen werden, lässt aber weitere Ansatzpunkte deutlich werden, um zu genaueren Einsichten in die Aufgaben der Adrenozeptoren bezüglich der Insulinfreisetzung zu gelangen.

5.) Zusammenfassung

Schon seit vielen Jahren ist bekannt, dass das sympathische Nervensystem mit den Neurotransmittern Adrenalin bzw. Noradrenalin die Insulinfreisetzung beeinflusst. Dabei wird den β -Rezeptoren eine stimulierende und den α -Rezeptoren eine inhibierende Wirkung zugeschrieben. Da die Katecholamine über beide Rezeptoren wirken, soll in der Summe die inhibierende Wirkung der α -Rezeptoren überwiegen. Ende der 80er Jahre wurde die Aufmerksamkeit auf eine neue Substanzklasse, die Imidazoline, gelenkt. Diese Verbindungen sind in der Lage, eine durch Glukose induzierte Insulinfreisetzung zu steigern. Unter diesen Aspekten wurden in dieser Arbeit die Einflüsse von spezifischen α - und β -adrenergen Substanzen, sowie Substanzen aus der Stoffklasse der Imidazoline auf die Insulinfreisetzung der β -Zell-Linie MIN6 untersucht, wobei die Substanzen einzeln und in Kombination getestet wurden.

Aufgrund der Ergebnisse kann gezeigt werden, dass in dieser Zell-Linie über α_1 - und α_2 -Rezeptoren hemmende Einflüsse auf die Insulinfreisetzung erfolgen. Des weiteren wird demonstriert, dass Phentolamin, ein Imidazolinderivat mit α -blockierenden Eigenschaften, die Insulinsekretion steigert. Durch Vergleiche mit anderen α -Blockern wird angenommen, dass dieser Effekt nicht durch α -Wirkung, sondern durch Interaktion an bestimmten Imidazolinbindungsstellen erfolgt. Außerdem wird die Anhebung der durch Glukose induzierten Insulinfreisetzung durch Imidazoline anhand der beiden Substanzen BL 11778 und BL 11771 demonstriert.

Für die β -Rezeptoren wird gezeigt, dass, entgegen der ursprünglichen Lehrmeinung, manche β -Blocker an dieser Zell-Linie die Insulinproduktion steigern, wohingegen es durch den β_1 - und β_2 -Agonisten Isoprenalin zu einer Hemmung kommt. Jedoch kommt man zu dem Schluss, dass in Bezug auf die Insulinsekretion die „klassische“ Aufteilung in β_1 - und β_2 -Rezeptoren wahrscheinlich nicht zutrifft.

6.) Literaturverzeichnis

Ahren B, Lundquist I. Effects of selective and non-selective beta-adrenergic agents on insulin secretion in vivo. *Eur J Pharmacol* 1981 Apr 24;71(1):93-104

Ammala C, Ashcroft FM, Rorsman P. Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells. *Nature* 1993 May 27;363(6427):356-8

Ammon HPT. Wege der Nachrichtenübermittlung bei der Stimulation der Sekretion von Insulin. *Diabetes und Stoffwechsel* 1995;4:311-20

Arkhammar P, Juntti-Berggren L, Larsson O, Welsh M, Nanberg E, Sjöholm A, Kohler M, Berggren PO. Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the beta-cell voltage-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 1994 Jan 28;269(4):2743-9

Ashcroft FM, Kakei M. ATP-sensitive K⁺ channels in rat pancreatic beta-cells: modulation by ATP and Mg²⁺ ions. *J Physiol* 1989 Sep;416:349-67

Atef N, Lafontan M, Double A, Helary C, Ktorza A, Penicaud L. A specific beta 3-adrenoceptor agonist induces increased pancreatic islet blood flow and insulin secretion in rats. *Eur J Pharmacol* 1996 Mar 18;298(3):287-92

Berlan M, Galitzky J, Bousquet-Melou A, Lafontan M, Montastruc JL. Beta-3 adrenoceptor-mediated increase in cutaneous blood flow in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1994 Mar;268(3):1444-51

Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E, Atwater I. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol* 1995 Feb;268(2 Pt 1):E336-42

Brenner MB, Mest HJ. A buffer temperature controlled perfusion system to study temperature dependence and secretagogue-induced kinetics of insulin secretion in MIN6-Pseudoislets. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004 Jul-Aug;50(1):53-7

Brocklehurst KW, Hutton JC. Involvement of protein kinase C in the phosphorylation of an insulin-granule membrane protein. *Biochem J* 1984 May 15;220(1):283-90

Buse MG, Johnson AH, Kuperminc D, Buse J. Effect of alpha-adrenergic blockade on insulin secretion in man. *Metabolism* 1970 Mar;19(3):219-25

Bylund DB. Subtypes of alpha 2-adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol Sci* 1988 Oct;9(10):356-61

Carroll MJ, Lister CA, Sennitt MV, Stewart-Long N, Cawthorne MA. Improved glycemic control in C57Bl/KsJ (db/db) mice after treatment with the thermogenic beta-adrenoceptor agonist, BRL 26830. *Diabetes* 1985 Nov;34(11):1198-204

Caton D, Calabrese A, Mas C, Serre-Beinier V, Wonkam A, Meda P. Beta-cell crosstalk: a further dimension in the stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. *Diabetes Metab* 2002 Dec;28(6pt2):3S45-53; discussion 3S108-12

Cawthorne MA, Carroll MJ, Levy AL, Lister CA, Sennitt MV, Smith SA, Young P. Effects of novel beta-adrenoceptor agonists on carbohydrate metabolism: relevance for the treatment of non-insulin-dependent diabetes. *Int J Obes* 1984;8(1):93-102

Chan SL. Role of alpha 2-adrenoceptors and imidazoline-binding sites in the control of insulin secretion. *Clin Sci (Colch)* 1993 Dec;85(6):671-7

Chan SL, Dunne MJ, Stillings MR, Morgan NG. The alpha 2-adrenoceptor antagonist efaroxan modulates K⁺ATP channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol* 1991 Oct 29;204(1):41-8

Chan SL, Brown CA, Scarpello KE, Morgan NG. The imidazoline site involved in control of insulin secretion: characteristics that distinguish it from I1- and I2-sites. *Br J Pharmacol* 1994 Aug;112(4):1065-70

Chan SL, Perrett CW, Morgan NG. Differential expression of alpha 2-adrenoceptor subtypes in purified rat pancreatic islet A- and B-cells. *Cell Signal* 1997 Jan;9(1):71-8

Chan SL, Mourtada M, Morgan NG. Characterization of a KATP channel-independent pathway involved in potentiation of insulin secretion by efaroxan. *Diabetes* 2001 Feb;50(2):340-7

Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997 Nov 6;390(6655):88-91

Daniel PM, Henderson JR. The effect of vagal stimulation on plasma insulin and glucose levels in the baboon. *J Physiol* 1967 Sep;192(2):317-27

De Fronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. *Diab Care* 1992 March;15(3):318-68

Devedjian JC, Pujol A, Cayla C, George M, Casellas A, Paris H, Bosch F. Transgenic mice overexpressing alpha2A-adrenoceptors in pancreatic beta-cells show altered regulation of glucose homeostasis. *Diabetologia* 2000 Jul;43(7):899-906

Efanov AM, Zaitsev SV, Efanova IB, Zhu S, Ostenson CG, Berggren PO, Efendic S. Signaling and sites of interaction for RX-871024 and sulfonylurea in the stimulation of insulin release. *Am J Physiol* 1998 Apr;274(4 Pt 1):E751-7

Efanov AM, Zaitsev SV, Berggren PO, Mest HJ, Efendic S. Imidazoline RX871024 raises diacylglycerol levels in rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Mar16;281(5):1070-3

Efanov AM, Zaitsev SV, Mest HJ, Raap A, Appelskog IB, Larsson O, Berggren PO, Efendic S. The novel imidazoline compound BL11282 potentiates glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells in the absence of modulation of K(ATP) channel activity. *Diabetes* 2001 Apr;50(4):797-802

Efanova IB, Zaitsev SV, Brown G, Berggren PO, Efendic S. RX871024 induces Ca²⁺ mobilization from thapsigargin-sensitive stores in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1998 Feb;47(2):211-8

Efendic S, Cerasi E, Luft R. Effect of phentolamine and preperfusion with glucose on insulin release from the isolated perfused pancreas from fasted and fed rats. *Diabetologia* 1975 Oct;11(5):407-10

Efendic S, Luft R, Wajngot A. Aspects of the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 1984 Summer;5(3):395-410

Eglen RM, Hudson AL, Kendall DA, Nutt DJ, Morgan NG, Wilson VG, Dillon MP. 'Seeing through a glass darkly': casting light on imidazoline 'I' sites. *Trends Pharmacol Sci* 1998 Sep;19(9):381-90

Emorine L, Blin N, Strosberg AD. The human beta 3-adrenoceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 1994 Jan;15(1):3-7

Flaten O, Sand T, Myren J. Beta-adrenergic stimulation and blockade of the release of gastric inhibitory polypeptide and insulin in man. *Scand J Gastroenterol* 1982 Mar;17(2):283-8

Frohman LA, Ezdinli EZ, Javid R. Effect of vagotomy and vagal stimulation on insulin secretion. *Diabetes* 1967 Jul;16(7):443-8

Furman BL, Tayo FM. Effect of ICI 66082, a beta-adrenoceptor blocking drug on blood glucose in the rat. *Eur J Pharmacol* 1975 Mar;31(1):115-21

Fyles JM, Cawthorne MA, Howell SL. The characteristics of beta-adrenergic binding sites on pancreatic islets of Langerhans. *J Endocrinol* 1986 Nov;111(2):263-70

Garrino MG, Henquin JC. B cell adrenoceptors and sulphonylurea-induced insulin release in mouse islets. *Diabetologia* 1990 Mar;33(3):145-7

Granneman JG, Lahners KN, Chaudhry A. Molecular cloning and expression of the rat beta 3-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 1991 Dec;40(6):895-9

Gutkind JS. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 1998 Jan 23;273(4):1839-42

Harms HH, Gooren L, Spoelstra AJ, Hesse C, Verschoor L. Blockade of isoprenaline-induced changes in plasma free fatty acids, immunoreactive insulin levels and plasma renin activity in healthy human subjects, by propranolol, pindolol, practolol, atenolol, metoprolol and acebutolol. *Br J Clin Pharmacol* 1978 Jan;5(1):19-26

Hirose H, Seto Y, Maruyama H, Dan K, Nakamura K, Saruta T. Effects of alpha 2-adrenergic agonism, imidazolines, and G-protein on insulin secretion in beta cells. *Metabolism* 1997 Oct;46(10):1146-9

Hiyoshi Y, Miura H, Uemura K, Endo H, Ozawa K, Maeda N, Tamagawa T, Iguchi A. Effects of imidazoline antagonists of alpha 2-adrenoceptors on endogenous adrenaline-induced inhibition of insulin release. *Eur J Pharmacol* 1995 Dec 27;294(1):117-23

Inagaki N, Gonoi T, Clement JP 4th, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995 Nov 17;270(5239):1166-70

Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, Katagiri H, Inukai K, Anai M, Kikuchi M, Yazaki Y, Miyazaki JI, Oka Y. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 1993 Nov;36(11):1139-45

Jasik M, Kasperska-Dworak A, Czyzyk A. Effect of nifedipine, captopril and prazosin on secretory function of pancreatic beta-cells in hypertensive patients with type-2 (non-insulin-dependent) diabetes and in hypertensive non-diabetics. *Diabetes Res Clin Pract* 1996 Jun;33(1):59-66

Jonas JC, Plant TD, Henquin JC. Imidazoline antagonists of alpha 2-adrenoceptors increase insulin release in vitro by inhibiting ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. *Br J Pharmacol* 1992 Sep;107(1):8-14

Kaumann AJ. Four β -adrenoceptor subtypes in mammalian heart. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:70-6

Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 1987 Oct 30;238(4827):650-6

Krief S, Lonqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* 1993 Jan;91(1):344-9

Lacey RJ, Chan SL, Cable HC, James RF, Perrett CW, Scarpello JH, Morgan NG. Expression of alpha 2- and beta-adrenoceptor subtypes in human islets of Langerhans. *J Endocrinol* 1996 Mar;148(3):531-43

Lang J, Nishimoto I, Okamoto T, Regazzi R, Kiraly C, Weller U, Wollheim CB. Direct control of exocytosis by receptor-mediated activation of the heterotrimeric GTPases Gi and G(o) or by the expression of their active G alpha subunits. *EMBO J* 1995 Aug 1;14(15):3635-44

Le Bihan G, Rondu F, Pele-Tounian A, Wang X, Lidy S, Touboul E, Lamouri A, Dive G, Huet J, Pfeiffer B, Renard P, Guardiola-Lemaitre B, Manechez D, Penicaud L, Ktorza A, Godfroid JJ. Design and synthesis of imidazoline derivatives active on glucose homeostasis in a rat model of type II diabetes. 2. Syntheses and biological activities of 1,4-dialkyl-, 1,4-dibenzyl-, and 1-benzyl-4-alkyl-

2-(4',5'-dihydro-1'H-imidazol-2'-yl)piperazines and isosteric analogues of imidazoline. *J Med Chem* 1999 May 6;42(9):1587-603

Liu X, Perusse F, Bukowiecki LJ. Mechanisms of the antidiabetic effects of the beta 3-adrenergic agonist CL-316243 in obese Zucker-ZDF rats. *Am J Physiol* 1998 May;274(5 Pt 2):R1212-9

Lomasney JW, Lorenz W, Allen LF, King K, Regan JW, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Expansion of the alpha 2-adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human alpha 2-adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Jul;87(13):5094-8

Loubatieres A, Mariani MM, Sorel G, Savi L. The action of beta-adrenergic blocking and stimulating agents on insulin secretion. Characterization of the type of beta receptor. *Diabetologia* 1971 Jun;7(3):127-32

Lundquist I. Interaction of amines and aminergic blocking agents with blood glucose regulation. I. Beta-adrenergic blockade. *Eur J Pharmacol* 1972 May;18(2):213-24

Lundquist I. Interaction of amines and aminergic blocking agents with blood glucose regulation. II. Alpha-adrenergic blockade. *Eur J Pharmacol* 1972 May;18(2):225-35

Lundquist I, Ericson LE. Beta-Adrenergic insulin release and adrenergic innervation of mouse pancreatic islets. *Cell Tissue Res* 1978 Oct 6;193(1):73-85

Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Wright PH, Ashmore J. Effects of adrenergic and cholinergic agents upon insulin secretion in vitro. *Endocrinology* 1967;80:975-78

Masgrau R, Churchill GC, Morgan AJ, Ashcroft SJ, Galione A. NAADP. A new Second Messenger for Glucose-Induced Ca⁽²⁺⁾ Responses in Clonal Pancreatic Beta Cells. *Curr Biol* 2003 Feb;13(3):247-51

Massara F, Fassio V, Camanni F, Molinatt GM. Salbutamol-induced increase in plasma insulin in man. *Horm Metab Res* 1975;7:94pp

Mest HJ, Raap A, Schloos J, Treinies I, Paal M, Giese U, Koivisto V. Glucose-induced insulin secretion is potentiated by a new imidazoline compound. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;364:47-52

Milagro FI, Gomez-Ambrosi J, Forga L, Martinez JA. A beta3-adrenergic agonist increases muscle GLUT1/GLUT4 ratio, and regulates liver glucose utilization in diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 1999 Mar;1(2):97-104

Miller RE. Pancreatic neuroendocrinology: peripheral neural mechanisms in the regulation of the Islets of Langerhans. *Endocr Rev* 1981 Fall;2(4):471-94

Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, Oka Y, Yamamura K. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 1990 Jul;127(1):126-32

Molderings GJ. Imidazoline receptors: basic knowledge, recent advances and future prospects for therapy and diagnosis. *Drugs Fut* 1997;22(7):757-72

Morgan NG. Imidazoline receptors: new targets for antihyperglycaemic drugs. *Exp Opin Invest Drugs* 1999;8(5):575-84

Mourtada M, Elliott J, Smith JA, Morgan NG. Effects of imidazoline binding site ligands on the growth and viability of clonal pancreatic beta-cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000 Feb;361(2):146-54

Nakadate T, Nakaki T, Muraki T, Kato R. Regulation of plasma insulin level by alpha 2-adrenergic receptors. *Eur J Pharmacol* 1980 Aug 8;65(4):421-4

Nakaki T, Nakadate T, Kato R. Alpha 2-adrenoceptors modulating insulin release from isolated pancreatic islets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1980 Aug;313(2):151-3

Niddam R, Angel I, Bidet S, Langer SZ Pharmacological characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtype involved in the release of insulin from isolated rat pancreatic islets. *J Pharmacol Exp Ther* 1990 Sep;254(3):883-7

Nilsson C, Zoucas E, Lundquist I, Ihse I. Effect of selective denervation of the rat pancreas on pancreatic endocrine function. *Eur Surg Res* 2001;33(2):86-91

Northrop G, Ryan WG, Schwartz TB. Propranolol-induced insulin release in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 1973 Feb;22(2):91-3

Olmos G, Kulkarni RN, Haque M, MacDermot J. Imidazolines stimulate release of insulin from RIN-5AH cells independently from imidazoline I1 and I2 receptors. *Eur J Pharmacol* 1994 Sep 1;262(1-2):41-8

Panagiotidis G, Stenstrom A, Lundquist I. Effects of adrenergic and cholinergic stimulation on islet monoamine oxidase activity and insulin secretion in the mouse. *Eur J Pharmacol* 1993 Mar 23;233(2-3):285-90

Panagiotidis G, Stenstrom A, Lundquist I. Influence of beta 2-adrenoceptor stimulation and glucose on islet monoamine oxidase activity and insulin secretory response in the mouse. *Pancreas* 1993 May;8(3):368-74

Porte D Jr. A receptor mechanism for the inhibition of insulin release by epinephrine in man. *J Clin Invest* 1967 Jan;46(1):86-94

Porte D Jr. Sympathetic regulation of insulin secretion. Its relation to diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 1969 Mar;123(3):252-60

Porte D Jr, Graber AL, Kuzuya T, Williams RH. The effect of epinephrine on immunoreactive insulin levels in man. *J Clin Invest* 1966 Feb;45(2):228-36

Prentki M, Corkey BE, Matschinsky FM. Inositol 1,4,5-trisphosphate and the endoplasmic reticulum Ca²⁺ cycle of a rat insulinoma cell line. *J Biol Chem* 1985 Aug 5;260(16):9185-90

Prentki M, Matschinsky FM. Ca²⁺, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* 1987 Oct;67(4):1185-248

Proks P, Ashcroft FM. Phentolamine block of KATP channels is mediated by Kir6.2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Oct 14;94(21):11716-20

Ribes G, Trimble ER, Blayac JP, Wollheim CB, Loubatieres-Mariani MM. In vivo stimulation of pancreatic hormone secretion by norepinephrine infusion in the dog. *Am J Physiol* 1984 Apr;246(4 Pt 1):E339-43

Rösen P, Ohly P, Gleichmann H. Experimental benefit of moxonidine on glucose metabolism and insulin secretion in the fructose-fed rat. *J Hypertens Suppl* 1997 Jan;15(1):S31-8

Robertson RP, Porte D Jr. Adrenergic modulation of basal insulin secretion in man. *Diabetes* 1973 Jan;22(1):1-8

Roy MW, Jones MS, Lee KC, Miller RE. Splanchnic neural stimulation suppresses secretion of pancreatic somatostatin by alpha₁, insulin by alpha₂ postsynaptic receptors. *Program of the 63rd Annual Meeting of The Endocrine Society*, Cincinnati OH, 1981,p 105(Abstract 91)

Sakura H, Ammala C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM. Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* 1995 Dec 27;377(3):338-44

Scheltdorf M. Wirkmechanismus verschiedener Imidazoline bezüglich ihrer insulinfreisetzenden Eigenschaften in einer Beta-Zelllinie. Dissertation. *Universität Hamburg*, 2001

Scheltdorf M, Mest HJ. Pertussis toxin converts hyperpolarizations caused by alpha₂-adrenoceptor agonists containing an imidazoline moiety into depolarizations in MIN 6 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2002 Jul;366:204-8

Schulz A, Hasselblatt A. Phentolamine, a deceptive tool to investigate sympathetic nervous control of insulin release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988 Jun;337(6):637-43

Schulz A, Hasselblatt A. An insulin-releasing property of imidazoline derivatives is not limited to compounds that block alpha-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1989 Sep;340(3):321-7

Shen YT, Zhang H, Vatner SF. Peripheral vascular effects of beta-3 adrenergic receptor stimulation in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1994 Jan;268(1):466-73

Takahashi N, Kadowaki T, Yazaki Y, Ellis-Davies GC, Miyashita Y, Kasai H. Post-priming actions of ATP on Ca²⁺-dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jan 19;96(2):760-65

Tilzey JF, Waights V, Holmes R. Adrenergic control of insulin release from isolated islet tissue in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* R. *Gen Comp Endocrinol* 1985 Sep;59(3):460-7

Tsoli E, Chan SL, Morgan NG. The imidazoline I1 receptor agonist, moxonidine, inhibits insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Eur J Pharmacol* 1995 Sep 15;284(1-2):199-203

Ullrich S, Wollheim CB. Islet cyclic AMP levels are not lowered during alpha 2-adrenergic inhibition of insulin release. *J Biol Chem* 1984 Apr 10;259(7):4111-5

Wollheim CB, Dunne MJ, Peter-Riesch B, Bruzzone R, Pozzan T, Petersen OH. Activators of protein kinase C depolarize insulin-secreting cells by closing K⁺ channels. *EMBO J* 1988 Aug;7(8):2443-9

Yamazaki S, Katada T, Ui M. Alpha 2-adrenergic inhibition of insulin secretion via interference with cyclic AMP generation in rat pancreatic islets. *Mol Pharmacol* 1982 May;21(3):648-53

Zaitsev SV, Efanov AM, Efanova IB, Larsson O, Ostenson CG, Gold G, Berggren PO, Efendic S. Imidazoline compounds stimulate insulin release by inhibition of K(ATP) channels and interaction with the exocytotic machinery.
Diabetes 1996 Nov;45(11):1610-8

7.)Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. H.-J. Mest ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung meiner Arbeit sowie für das in mich gesetzte Vertrauen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Lilly Forschung GmbH, Hamburg, insbesondere bei Frau S. Wawro, und bei allen Mitdoktoranden für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei meiner Arbeit.

8.)Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

9.)Curriculum Vitae

Name:	Jan Oliver Herden
Geburtsdatum:	08.04.1977
Geburtsort:	Wetzlar
Nationalität:	deutsch
Ausbildung	
1983-1987:	Grundschule Atzbach
1987-1993:	Lahntalschule Atzbach
1993-1996:	Gymnasiale Oberstufe Wetzlar
August 1996 - September 1997:	Zivildienst, Johanniter Unfall Gießen m. anschließender Ausbildung zum Rettungs- Sanitäter
Oktober 1997 - vor. Oktober 2004:	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig- Universität, Gießen
März 2001 - August 2001:	Doktorandenstelle bei der Lilly Forschung GmbH, Hamburg, Anfertigung der vorliegenden Arbeit

Prüfungen

November 2004

3. Staatsexamen

April 2003

2. Staatsexamen

August 2000:

1. Staatsexamen

September 1999:

Physikum

Juni 1996:

Abitur