

Aus der Abteilung Drug Metabolism and Pharmacokinetics
der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG

Abteilungsleiter: Dr. Willy Roth

(Mentor: Dr. Andreas Greischel)

vorgelegt über

das Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Rüdiger Schulz

**Charakterisierung der Eliminationskinetik
des glukagonähnlichen Peptids-1
als Substrat der Dipeptidyl-Peptidase-IV
mit und ohne Enzymhemmung
am Modell der Ratte**

(Characterisation of elimination kinetics
of glucagon-like peptide-1
as substrate of dipeptidyl-peptidase-IV
with and without enzyme inhibition
in the rat model)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Jan Peter Sandel
aus München

München 2005

gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Andreas Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Schulz
Korreferentin:	Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 3, Absatz 1 und 3 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 1. Februar 1982 (in der Fassung der Fünften Änderungssatzung vom 12. Februar 1999) von Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz betreut.

Meinen Eltern

Θῶμα τὸ διαβήτεω πάθος, οὐ κάρτα ξύνηθες ἀνθρώποισι σαρκῶν καὶ μελέων ἐς οὔρον ἢ ξύντηξις. ὑγρὴ καὶ ψυχρὴ, ὅκως ἐν ὕδρωψι, αἰτίη. ὁδὸς δὲ ἡ ξυνήθης, νεφροὶ τε καὶ κύστις. οὐ γὰρ διαλείπουσι οὐρέοντες, ἀλλὰ ὅκωσπερ ἐξ ἀφέσιος ὀχετῶν ἄπαυστος ἡ φορὴ. χρονίη μὲν ἡ τῆς νούσου φύη, μακροῦ κυῖσκεται χρόνω. βραχύβιος δὲ ὄνθρωπος, ἦν ἡ κατάστασις τελεσθῆ· ὀξεὶη γὰρ ἡ τηκεδῶν, ταχὺς δὲ ὁ θάνατος, ποτὶ καὶ βίος αἰσχροὺς καὶ ἐπίπονους.

(Ein wundersames Leiden ist die Harnruhr, und nicht sehr gewöhnlich bei den Menschen: die Zusammenschmelzung von Fleisch und Bein in den Harn. Feuchtigkeit und Kälte sind die Ursache, wie bei der Wassersucht. Aber der Weg [der Flüssigkeit] ist der gewöhnliche durch Nieren und Harnblase. Sie [die Kranken] hören nämlich nie auf Harn zu lassen, sondern wie aus geöffneten Schläuchen kommt ein unaufhörlicher Fluss. Lange dauert die Entstehung der Krankheit, einige Zeit wird sie [wie eine Leibesfrucht] ausgetragen. Aber der Mensch hat nur noch ein kurzes Leben, wenn der Zustand vollkommen ausgeprägt ist: heftig ist nämlich die Abzehrung, und schnell der Tod nach einem elenden und mühseligen Leben.)

Aretaios von Kappadokien (ca. 80 – 138 n. Chr.)

Περὶ διαβήτεω (*Über die Harnruhr*)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	14
1.1 Ziel der Arbeit	15
1.2 Diabetes mellitus in der Humanmedizin	16
1.3 Diabetes mellitus in der Kleintiermedizin	17
1.3.1 caniner Diabetes mellitus	19
1.3.1.1 Ursachen und Folgeschäden	19
1.3.1.2 Diagnostik beim Hund	20
1.3.1.3 Insulin-Substitution beim Hund	20
1.3.1.4 orale Antidiabetica beim Hund	20
1.3.2 feliner Diabetes mellitus	21
1.3.2.1 Ursachen und Folgeschäden	21
1.3.2.2 Diagnostik bei der Katze	22
1.3.2.3 Insulin-Supplementierung bei der Katze	23
1.3.2.4 orale Antidiabetica bei der Katze	24
<i>Glipizid</i>	24
<i>Acarbose</i>	25
<i>Chrom und Vanadium</i>	25
<i>Metformin</i>	26
1.3.3 pharmakotherapeutische Kontraindikationen bei Diabetes mellitus	26
2 Literatur	27
2.1 Geschichtlicher Hintergrund	27
2.1.1 Geschichte des Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)	27
2.1.2 Geschichte der Dipeptidyl-Peptidase-IV (DPP-IV)	28
2.2 Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)	29
2.2.1 Phylogenie des Proglukagons	29
2.2.2 Struktur von GLP-1	29

2.2.3	Prozessierung von GLP-1	31
2.2.4	C-terminale Amidation von GLP-1	32
2.2.5	Inkretion von GLP-1	33
2.2.6	Inkretin-Wirkung von GLP-1	34
2.2.7	andere Wirkungen von GLP-1	34
2.2.8	GLP-1-Rezeptor	35
2.2.9	Elimination von GLP-1	37
2.3	Dipeptidyl-Peptidase-IV (DPP-IV)	38
2.3.1	Familie der Dipeptidyl-Peptidasen	38
2.3.2	DPP-IV-Gen	39
2.3.3	Funktionen der DPP-IV	39
2.3.4	Substrate der DPP-IV	40
2.3.5	Struktur der DPP-IV	41
2.3.6	Vorkommen der DPP-IV	43
2.4	pharmakologische Aspekte der DPP-IV-Inhibition	44
2.4.1	GLP-1-Anstieg	44
2.4.2	Alternative: Inkretin-Analoga	45
2.4.3	CD26-Hemmung	45
2.4.4	GLP-2-Anstieg	46
2.5	Eliminationskinetik von GLP-1	47
2.5.1	Halbwertszeit bei in-vitro-Versuchsmodellen	47
2.5.2	in-vivo-Versuchsmodelle	48
2.5.2.1	Mensch	48
	<i>Halbwertszeit</i>	48
	<i>Clearance</i>	48
2.5.2.2	Ratte	49
	<i>Halbwertszeit</i>	49
	<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	49
2.5.2.3	Hund	50
	<i>Halbwertszeit und mittlere Verweildauer</i>	50
	<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	50

2.5.2.4 Schwein	51
<i>Halbwertszeit</i>	51
<i>Clearance</i>	51
2.5.3 Zusammenfassung der GLP-1-Kinetik	52
3 Tiere, Material und Methoden	54
3.1 Tiere	54
3.1.1 Tierstamm	54
3.1.2 Physiologie	54
3.1.3 Tierversuchsgenehmigung	55
3.1.4 Tierschutz	55
3.2 Material	56
3.2.1 DPP-IV-Inhibitoren	56
<i>LINCO-DPP-IV-Inhibitor</i>	56
<i>BI-β</i>	56
3.2.2 DPP-IV-Substrate	56
<i>GLP-1 (7-37)</i>	56
<i>GLP-1 (7-36 amide)</i>	57
3.2.3 Test-Kits	57
<i>GLP-1-ELISA-Kit</i>	57
<i>Glukose-Test-Kit</i>	57
3.2.4 Perfusoren und Peristaltik-Pumpe	57
<i>Macro-Perfusor (mL/h)</i>	57
<i>Micro-Perfusor (μL/min)</i>	57
<i>Peristaltik-Pumpe</i>	57
3.2.5 Hardware und Software für die Photometrie	58
<i>Fluoreszenz-Photometer (Umbelliferon-Messung)</i>	58
<i>Fluoreszenz-Photometer-Software (Umbelliferon-Messung)</i>	58
<i>Licht-Photometer (NADH-Messung)</i>	58
<i>Licht-Photometer-Software (NADH-Messung)</i>	58

3.2.6	Waage und Zentrifuge	58
	<i>Analysen-Semimikrowaage</i>	58
	<i>gekühlte Tischzentrifuge</i>	58
3.2.7	Thermostat und Wasserbad	58
	<i>LAUDA-Thermostat</i>	58
	<i>Schüttel-Wasserbad</i>	58
3.2.8	Perfusionsmedium	59
3.2.9	Pharmakokinetik-Software	59
3.3	Methode	60
3.3.1	in-vivo-Infusionsversuche (Glycin-Isoform im Steady-State)	60
3.3.1.1	Tiere	60
3.3.1.2	Narkose	60
3.3.1.3	Zugänge	62
3.3.1.4	isolierte Infusion der Substrat-Lösung	63
3.3.1.5	Parallelinfusion der Substrat-Lösung	63
3.3.1.6	Parallelinfusion der Hemmstoff-Lösung	64
3.3.1.7	Blutproben	64
3.3.2	in-situ-Perfusionsversuche (isoliert perfundierte Ratten-Leber)	66
3.3.2.1	Historisches	66
3.3.2.2	Tiere	66
3.3.2.3	Narkose	67
3.3.2.4	chirurgische Präparation	67
3.3.2.5	Kautelen	70
3.3.2.6	Lebermasse	70
3.3.2.7	portale Flussrate	71
3.3.2.8	IPRL im rezirkulierenden Modell	71
	<i>Addition von Substrat und Hemmstoff</i>	71
	<i>Perfusatproben</i>	72
3.3.2.9	IPRL im Single-Pass-Modell	73
	<i>Addition von Substrat und Hemmstoff</i>	73
	<i>Perfusatproben</i>	73

3.3.3 in-vitro-Stabilitätsversuche	75
3.3.3.1 Substrat-Abbau in Vollblut	75
<i>Substrat-Abbau in Vollblut bei Raumtemperatur (+20 °Celsius)</i>	75
<i>Substrat-Abbau in Vollblut bei Körpertemperatur (+39 °Celsius)</i>	76
3.3.3.2 Substrat-Abbau in Perfusat	77
3.3.4 Prinzip des GLP-1 ELISA	78
3.3.5 Prinzip der Glukose-Messung	79
3.3.6 Messung der BI- β -Proben	79
3.3.7 biometrische Methode	79
<i>statistische Auswertung der in-vivo-Infusionsversuche</i>	80
<i>statistische Auswertung der in-situ-Perfusionsversuche</i>	80
4 Experimente und Ergebnisse	81
4.1 in-vivo-Infusionsversuche	
(Glycin-Isoform im Steady-State ohne und mit DPP-IV Inhibition)	81
4.1.1 Glycin-Isoform im Steady-State ohne BI- β	81
4.1.1.1 Wahl des Applikationsschemas	81
4.1.1.2 computergestützte Dosis-Findung für BI- β	82
4.1.1.3 empirische Dosis-Findung für GLP-1 (Vorversuch)	84
<i>Basislinien-Korrektur</i>	85
<i>Wahl der Infusionsraten</i>	86
4.1.1.4 GLP-1-(7-37)-Infusion ohne DPP-IV-Hemmung	88
<u>GLP-1-(7-37)-Kinetik ohne DPP-IV-Hemmung</u>	<u>90</u>
<i>Halbwertszeit und mittlere Verweildauer</i>	90
<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	90
4.1.1.5 GLP-1-(7-37)-Infusion (GLP-1-Sättigung) ohne DPP-IV-Hemmung	91
<u>GLP-1-(7-37)-Kinetik (GLP-1-Sättigung) ohne DPP-IV-Hemmung</u>	<u>92</u>
<i>Halbwertszeit und mittlere Verweildauer</i>	92
<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	92

4.1.1.6	Berechnung der kinetischen Parameter	93
	<i>Halbwertszeit und mittlere Verweildauer</i>	93
	<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	94
4.1.2	Glycin-Isoform im Steady-State mit BI- β	95
4.1.2.1	GLP-1-(7-37)-Infusion	
	mit niedriger DPP-IV-Hemmung (0,6 [pmol/kg]/h)	95
	<u>GLP-1-(7-37)-Kinetik unter niedriger DPP-IV-Hemmung</u>	<u>96</u>
	<i>Halbwertszeit und mittlere Verweildauer</i>	96
	<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	96
	<u>BI-β-Plasmaspiegel durch niedrige DPP-IV-Hemmung</u>	<u>97</u>
4.1.2.2	GLP-1-(7-37)-Infusion	
	mit mittlerer DPP-IV-Hemmung (2,0 [pmol/kg]/h)	98
	<u>GLP-1-(7-37)-Kinetik unter mittlerer DPP-IV-Hemmung</u>	<u>99</u>
	<i>Halbwertszeit und mittlere Verweildauer</i>	99
	<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	99
	<u>BI-β-Plasmaspiegel durch mittlere DPP-IV-Hemmung</u>	<u>100</u>
4.1.2.3	GLP-1-(7-37)-Infusion	
	mit hoher DPP-IV-Hemmung (6,0 [pmol/kg]/h)	101
	<u>GLP-1-(7-37)-Kinetik unter hoher DPP-IV-Hemmung</u>	<u>102</u>
	<i>Halbwertszeit und mittlere Verweildauer</i>	102
	<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	102
	<u>BI-β-Plasmaspiegel durch hohe DPP-IV-Hemmung</u>	<u>103</u>
4.1.2.4	GLP-1-(7-37)-Infusion	
	mit sub-niedriger DPP-IV-Hemmung (0,1 [pmol/kg]/h)	104
	<u>GLP-1-(7-37)-Kinetik unter sub-niedriger DPP-IV-Hemmung</u>	<u>105</u>
	<i>Halbwertszeit und mittlere Verweildauer</i>	105
	<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	105
	<u>BI-β-Plasmaspiegel durch sub-niedrige DPP-IV-Hemmung</u>	<u>106</u>

4.1.2.5	GLP-1-(7-37)-Infusion	
	mit niedrigster DPP-IV-Hemmung (0,01 [pmol/kg]/h)	107
	<u>GLP-1-(7-37)-Kinetik unter niedrigster DPP-IV-Hemmung</u>	<u>108</u>
	<i>Halbwertszeit und mittlere Verweildauer</i>	108
	<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	108
	<u>BI-β-Plasmaspiegel durch niedrigste DPP-IV-Hemmung</u>	<u>109</u>
4.1.2.6	Zusammenfassung der Wirkungen	
	verschiedener DPP-IV-Hemmungsgrade	110
4.1.2.7	GLP-1-(7-37)-Infusion (GLP-1-Sättigung)	
	mit mittlerer DPP-IV-Hemmung	111
	<u>GLP-1-(7-37)-Kinetik (GLP-1-Sättigung)</u>	
	<u>unter mittlerer DPP-IV-Hemmung</u>	<u>112</u>
	<i>Halbwertszeit und mittlere Verweildauer</i>	112
	<i>Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State</i>	112
	<u>BI-β-Plasmaspiegel (GLP-1-Sättigung)</u>	
	<u>durch mittlere DPP-IV-Hemmung</u>	<u>113</u>
4.1.2.8	Zusammenfassung der Wirkung der DPP-IV-Hemmung	
	bei GLP-1-Sättigung	114
4.1.2.9	Steigerungsfaktoren verschiedener GLP-1-Plasmaspiegel	
	durch DPP-IV-Hemmung	115
	<i>Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel</i>	
	<i>durch 12 (pmol/kg)/h-Infusion</i>	116
	<i>Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel</i>	
	<i>durch 40 (pmol/kg)/h-Infusion</i>	117
	<i>Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel</i>	
	<i>durch 120 (pmol/kg)/h-Infusion</i>	118
4.1.3	Zusammenfassung der Eliminationskinetik von GLP-1 (7-37)	119
4.1.3.1	Zusammenfassung der Steigerungsfaktoren	
	der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel	119
4.1.3.2	Clearance-Werte von GLP-1 (7-37) ohne und mit DPP-IV-Hemmung	120
4.1.3.3	Halbwertszeiten von GLP-1 (7-37) ohne und mit DPP-IV-Hemmung	122
4.1.4	Blutzuckerspiegel unter GLP-1-Infusion	123

4.2 in-situ-Perfusionsversuche	
(isoliert perfundierte Ratten-Leber	
– rezirkulierendes Modell und Single-Pass-Modell)	126
4.2.1 IPRL – rezirkulierendes Modell	126
4.2.1.1 Halbwertszeit	129
4.2.1.2 hepatische Clearance	129
4.2.1.3 portale Flussrate	130
4.2.1.4 hepatischer Extraktionsquotient	130
4.2.1.5 Vergleich der Isoformen	130
4.2.1.6 Verhältnis der Lebermasse zur gesamten Körpermasse	131
4.2.1.7 labordiagnostische Organ-Parameter	131
4.2.1.8 Pharmakokinetik von BI- β	132
4.2.2 IPRL – Single-Pass-Modell	133
4.2.2.1 terminale Halbwertszeit von BI- β	
in der BI- β -Auswaschphase	134
4.2.2.2 terminale Halbwertszeit der Restitution der DPP-IV-Kapazität	
in der BI- β -Auswaschphase	135
4.3 in-vitro-Stabilitätsversuche	136
4.3.1 GLP-1-(7-37)-Abbau in Vollblut	136
4.3.1.1 GLP-1-(7-37)-Abbau in Vollblut bei Raumtemperatur (+20 °Celsius)	136
4.3.1.2 GLP-1-(7-37)-Abbau in Vollblut bei Körpertemperatur (+39 °Celsius)	137
4.3.2 GLP-1-(7-37)-Abbau in Perfusat	140
5 Diskussion	141
5.1 Methodendiskussion	141
5.1.1 Vorteile und Schwachpunkte der Steady-State-Infusion	141
5.1.2 Vorteile und Schwachpunkte der isoliert perfundierten Ratten-Leber	142
5.1.3 Vorteile und Schwachpunkte der Berechnung der kinetischen Parameter	143
5.1.4 Vorteile und Schwachpunkte der Charakterisierung der GLP-1-Kinetik	144

5.2	Ergebnisdiskussion	145
5.2.1	in-vivo-Infusionsversuche (Glycin-Isoform im Steady-State)	145
5.2.1.1	Halbwertszeit von GLP-1	146
5.2.1.2	Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State von GLP-1	147
5.2.1.3	Abhängigkeit der GLP-1-Kinetik vom DPP-IV-Hemmungsgrad	148
	<i>Steigerungsfaktoren von GLP-1 nach dem DPP-IV-Hemmungsgrad</i>	<i>148</i>
	<i>Clearance von GLP-1 nach dem DPP-IV-Hemmungsgrad</i>	<i>149</i>
5.2.1.4	Blutzuckerspiegel unter GLP-1-Infusion	150
5.2.2	in-situ-Perfusionsversuche (isoliert perfundierte Ratten-Leber)	150
5.2.2.1	GLP-1-Kinetik in der rezirkulierenden IPRL	150
	<i>Halbwertszeit von GLP-1 in der rezirkulierenden IPRL</i>	<i>150</i>
	<i>hepatische Clearance von GLP-1 in der rezirkulierenden IPRL</i>	<i>152</i>
	<i>hepatischer Extraktionsquotient von GLP-1 in der rezirkulierenden IPRL</i>	<i>152</i>
5.2.2.2	GLP-1-Kinetik in der Single-Pass-IPRL	153
5.2.3	in-vitro-Stabilitätsversuche	155
5.3	Schlussfolgerungen	156
6	Zusammenfassung	157
7	Summary	159
8	Literaturverzeichnis	161
9	Abbildungsverzeichnis	192
10	Abkürzungsverzeichnis	195
11	Glossar	202
12	Lebenslauf	207
13	Danksagung	209

1 Einleitung

Die durch den Verzehr und den Verdau von kohlenhydrathaltigen Speisen erhöhten Glukose-Konzentrationen im Blut bewirken eine Insulin-Ausschüttung aus den β -Zellen der Langerhansschen Inseln in der Bauchspeicheldrüse. Das 51 Aminosäuren umfassende und knapp 6 kDa schwere Peptid Insulin ist neben seinem wichtigsten Gegenspieler Glukagon (aus den α -Zellen) das zentrale Hormon in der Regulation des Blutzuckerspiegels. Es senkt den Blutzuckerspiegel, indem es durch Koppelung an den Insulin-Rezeptor auf den Körperzellen eine Signaltransduktion auslöst, die zur Exozytose von intrazellulären Glukose-Transportern (GLUT-4) führt [Voigt 1996].

Bei gleichen Blutzuckerspiegeln nach oraler Gabe von Traubenzucker einerseits und nach intravenöser Infusion einer Glukose-Lösung andererseits unterscheidet sich die unmittelbare Verfügbarkeit dieses Energieträgers für die Zellen dahingehend, dass die resultierenden Insulin-Konzentrationen im Blut bei der intravenösen Applikationsform statistisch signifikant geringer ausfallen als bei der oralen [Zunz und LaBarre 1929].

Diese eigentümliche Diskrepanz wurde als Phänomen bei Hunden (Beagles) bereits kurze Zeit nach der Entdeckung des Insulins durch Frederick Banting und Charles Best im Jahre 1921 bekannt. Aber erst mit der Entdeckung des Mechanismus der so genannten entero-insularen Achse [Unger und Eisentraut 1969] war es möglich, dieses Phänomen kausal auf so genannte Inkretine zurückzuführen, die definiert sind als gastro-intestinale Hormone, die auf den enteralen Reiz (Kontakt mit bestimmten Nährstoffen) hin von speziellen Darmzellen in die portale Blutbahn ausgeschüttet werden und die Insulin-Ausschüttung stimulieren, nachdem sie über den systemischen Blutkreislauf zum Inselorgan der Bauchspeicheldrüse gelangt sind [Creutzfeldt 1979, Demuth et al. 2002].

Die durch die Inkretin-Wirkung erreichte Erhöhung der Insulin-Ausschüttung verbessert die Glukose-Toleranz des Organismus und ist deshalb für Patienten des Diabetes mellitus des Typs 2 (non-insulin-dependent diabetes mellitus = NIDDM) angesichts der multiplen angiopathischen Schädwirkungen längerfristig erhöhter Blutzuckerspiegel von erheblicher Bedeutung [Drucker 2003].

Die Verfügbarkeit der die Insulin-Inkretion fördernden Inkretine für den Organismus wird allerdings massiv von dem diese Peptidhormone abbauenden Enzym Dipeptidyl-Peptidase-IV (DPP-IV) eingeschränkt. Die Entwicklung von DPP-IV-Inhibitoren stellt daher in der Gegenwart ein vordringliches Ziel der pharmazeutischen Industrie weltweit dar.

Der entscheidende Vorteil von DPP-IV-Inhibitoren gegenüber den konventionellen oralen Antidiabetica ist die Koppelung ihrer Wirksamkeit an postprandial erhöhte Blutzuckerspiegel, wodurch jedes Hypoglykämierisiko vermieden wird [Drucker 2003].

1.1 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, dem Einsatz von DPP-IV-Inhibitoren als oralen Antidiabetica ohne Hypoglykämierisiko in der Behandlung von Katzen mit insulin-unabhängigem Diabetes mellitus (NIDDM) Vorarbeit durch Charakterisierung der Wirksamkeit eines Hemmstoffes aus der Humanmedizin zu leisten. Als Charakteristikum der Wirksamkeit des DPP-IV-Inhibitors soll die Veränderung der metabolischen Eliminationskinetik des Inkretins Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) dienen, welches auch pharmakodynamisch im Zentrum des Interesses steht. Neben der Wirksamkeitsprüfung von DPP-IV-Inhibitoren dient die Charakterisierung der metabolischen Eliminationskinetik von GLP-1 auch dazu, neue Generationen von Hemmstoffen an Hand des gewonnenen Wirksamkeitsprofils im Sinne des modernen Drug-Designs zu entwickeln und zu verbessern. Im Rahmen der Experimente der vorliegenden Arbeit wurde das in der Diabetesforschung übliche und bewährte Modell der Ratte gewählt.

1.2 Diabetes mellitus in der Humanmedizin

In der Humanmedizin ist der Diabetes mellitus (früher auch als Zuckerharnruhr bezeichnet) in neun von zehn Fällen dem Typ 2 zuzuordnen, der als eine Interaktion zweier Stoffwechselanpassungen beschrieben werden kann: Zum einen die progrediente Insulin-Resistenz der Zielzellen auf Grund einer Down-Regulation der Insulin-Rezeptoren und zum anderen die darauf folgende Dysfunktion der β -Zellen, welche drei Viertel der Langerhansschen Inseln ausmachen, im Sinne einer Erschöpfung nach hypersekretorischen Adaptationsversuchen [Voigt 1996, Tadayyon und Smith 2003].

Diese metabolische Ätiologie bewirkt über Mikro- und Makroangiopathien eine Vielzahl an sekundären Komplikationen, die gemeinhin unter dem Begriff des Insulin-Resistenz-Syndroms zusammengefasst werden: die mikrovaskuläre Pathogenese resultiert vor allem in Retinopathien, Neuropathien und Nephropathien, die makrovaskuläre Pathogenese besonders in Atherosklerose, koronaren Herzerkrankungen und Infarkten. Insgesamt spricht man auch vom atherogenen Effekt der Zuckerkrankheit, der letzten Endes zu ischämischen Gewebeschädigungen führt [Haffner et al. 1998].

Die Inzidenz des NIDDM ist im Laufe der letzten Dekaden deutlich angestiegen, insbesondere auf Grund der Zunahme des prädisponierenden Übergewichts mit Körpermassen-Indices (Body-Mass-Index = BMI) zwischen 25 und 30 oder sogar der Fettleibigkeit (Adipositas), das heißt mit BMI > 30 [Guillausseau und Laloi-Michelin 2003]. Der Körpermassen-Index nach Quételet errechnet sich als Quotient aus Körpermasse in Kilogramm und dem Quadrat der Körpergröße in Metern und hat als Maß zur generellen Beurteilung des Körpergewichts in der Humanmedizin den früher üblichen Broca-Index (Körpermasse in Kilogramm/[Körperlänge in Centimetern minus 100]) ersetzt.

1.3 Diabetes mellitus in der Kleintiermedizin

In der Kleintiermedizin muss speziesspezifisch differenziert werden: Während die Zuckerkrankheit der Katze weitestgehend der Klassifikation und ihrer Verteilung beim menschlichen Patienten vergleichbar ist, verlangt der diabetische Hund wegen des bei dieser Spezies vorherrschenden sekundären Diabetes mellitus gesonderte Betrachtung. Grundsätzlich lassen sich jedoch bei beiden Tierarten alle drei Formen der Zuckerkrankheit unterscheiden: der primäre Diabetes mellitus mit absolutem oder relativem Insulin-Mangel und der sekundäre Diabetes mellitus [Hoenig 2002].

Dem absoluten Insulin-Mangel, das heißt einem so genannten insulin-abhängigen Diabetes mellitus (insulin-dependent diabetes mellitus = IDDM) oder Typ 1, liegt eine fehlende oder stark verminderte Insulin-Inkretion zu Grunde. Pathologisch wird der Typ 1-Diabetes heute den autoimmunen Erkrankungen zugeordnet, wobei es bei entsprechender genetischer Disposition unter dem Einfluß verschiedener Faktoren zu einer so genannten Insulitis unter Beteiligung von zytotoxischen T-Lymphozyten und unter Bildung von β -Zell-spezifischen Antikörpern mit nachfolgender Zerstörung der β -Zellen kommt. Das eigentliche Zielantigen dieser Autoimmunreaktion ist bislang unbekannt [Schmidt und Dahme 1999, O'Brien 2002].

Der relative Insulin-Mangel, das heißt ein so genannter insulin-unabhängiger Diabetes mellitus (non-insulin-dependent diabetes mellitus = NIDDM) oder Typ 2, basiert pathophysiologisch auf einer Insulin-Resistenz der peripheren Zielzellen (vor allem der Leber und der Skelettmuskulatur). Bezüglich der Pathogenese sind zwei Phasen zu unterscheiden: In der ersten Phase kommt es auf Grund einer chronisch hyperkalorischen Ernährung mit komplementärer Bewegungsarmut zu verlängerten passageren Hyperglykämien und adaptiv zu Hypersekretion von Insulin und entsprechend massiv vermehrter Insulin-Synthese (latenter = subklinischer Diabetes mellitus). In der zweiten Phase kommt es auf Grund einer Down-Regulation der Anzahl der Insulin-Rezeptoren auf den Zielzellen zu einer Verlangsamung der Signaltransduktion, das heißt der Exozytose der intrazellulären Glukose-Transporter (GLUT-4). Im Sinne des kybernetischen Modells einer positiven Rückkopplung führen die wiederum verlängerten Hyperglykämien schließlich zur reaktiven Erschöpfung der β -Zellen (manifeste = klinischer Diabetes mellitus) [Schmidt und Dahme 1999, O'Brien 2002].

Der sekundäre Diabetes mellitus in Folge einer anderen, das heißt primär nicht β -zellulären Pathologie lässt sich zwei ätiologischen Gruppen zuordnen: einerseits der Gruppe der Pankreatopathien mit pathogenetischen Parallelen zum Typ 1-Diabetes und andererseits der

Gruppe der Endokrinopathien mit pathogenetischen Parallelen zum Typ 2-Diabetes. Die diabetogenen Pankreatopathien mit der Folge der β -Zell-Destruktion auf Grund einer Pankreasfibrose sind die akute nekrotisierende Pankreatitis und die chronisch rezidivierende Pankreatitis auf der Basis einer Entzündung des (bei der Katze) benachbarten Gallengangsystems oder einer stressinduzierten Steatitis im peripankreatischen Fettgewebe. Die diabetogenen Endokrinopathien durch Überproduktion insulin-antagonistischer Hormone mit der Folge der β -Zell-Dysfunktion sind der Hyperadrenokortizismus, der Hypersomatotropismus, das Phäochromozytom und die Thyreotoxikose. Diese diabetogenen, weil insulin-antagonistischen Hormone (neben Glukagon handelt es sich hierbei um ACTH, Glukokortikoide, Somatotropin, Adrenalin, Noradrenalin und TSH) führen prinzipiell über eine kompensatorische Sekretionssteigerung der β -Zellen zu einem irreversiblen Erschöpfungszustand derselben, worin die Parallele zur Pathogenese des NIDDM besteht [Siegel 1982, Schmidt und Dahme 1999].

Der Hyperadrenokortizismus als Ursache des so genannten Steroiddiabetes ist zu differenzieren in das häufigere adrenale Cushing-Syndrom, in den selteneren hypophysären Morbus Cushing und in die chronische oder inadäquate Therapie mit Glukokortikoiden. Glukokortikoide wirken diabetogen durch Stimulation der Glukoneogenese sowie der Glykogenolyse einerseits und durch Hemmung der peripheren Glukose-Utilisation (eigentlicher Insulin-Antagonismus) andererseits [Siegel 1982].

Beim Hypersomatotropismus – auch bekannt als Gigantismus (vor dem Epiphysenfugenschluss) beziehungsweise als Akromegalie (nach dem Epiphysenfugenschluss) – handelt es sich in der Regel um einen über Gestagene vermittelten Somatotropin-Überschuss aus der Milchdrüse, wo Somatotropin (STH) bei der Hündin zusätzlich zur Synthese im Hypophysenvorderlappen gebildet wird. Der Gestagenstimulus für diese mammäre STH-Freisetzung rührt entweder von der physiologischen Progesteron-Ausschüttung (post ovulationem) im Rahmen der Gravidität, der Laktation, des Metöstrus beziehungsweise der Scheinträchtigkeit (Lactatio falsa) her oder iatrogen von der chronischen Therapie mit Gestagenen im Rahmen der Läufigkeitsunterdrückung. Die diabetogene Wirkung des Somatotropins besteht in erster Linie in einer Hemmung der peripheren Glukose-Utilisation [Siegel 1982].

Das Phäochromozytom (Neoplasie der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks) führt zu einem Überangebot an Katecholaminen (Adrenalin und Noradrenalin), die neben einer Steigerung von Glukoneogenese und Glykogenolyse eine direkte Hemmung der Insulin-Inkretion bewirken [Siegel 1982].

Die Thyreotoxikose auf Grund einer Hyperthyreose steigert durch ein Überangebot an Schilddrüsenhormonen (Trijodthyronin und sein Prohormon Thyroxin) nahezu alle anabolen Stoffwechselprozesse des Körpers, einschließlich Resorption und Synthese von Glukose [Siegel 1982].

Wie beim Menschen ist ungeachtet der teilweise andersgearteten Pathogenese auch bei den beiden vorrangigen Kleintierspezies die Inzidenz der Diagnose Diabetes mellitus ansteigend. Unklar ist derzeit noch, ob dies durch eine tatsächliche Zunahme der Vorkommenshäufigkeit oder durch eine fortbildungsbedingt verbesserte Diagnostik in der Kleintierpraxis verursacht ist [Hoenig 2002].

1.3.1 caniner Diabetes mellitus

1.3.1.1 Ursachen und Folgeschäden

Insgesamt wird die Prävalenz des Phänomens des caninen Diabetes mellitus auf 0,3 bis 1,0 % der Gesamtpopulation von *Canis lupus forma familiaris* geschätzt [Neuvians und Berger 2002].

Der canine IDDM oder Typ 1-Diabetes, das heißt eine autoimmun medierte β -Zell-Destruktion, insbesondere induziert in Folge einer caninen Parvovirose ist beim Hund insgesamt selten. Darüberhinaus tritt der Typ 1-Diabetes signifikant gehäuft bei Rassen mit vermutlich entsprechender genetischer Prädisposition auf, zu welchen Beagle, Cairn-Terrier, Keeshound, Mops, Samojede, Teckel, Zwergpinscher, Zwergpudel und Zwergschnauzer zählen [Siegel 1982, Hess et al. 2000].

Der canine NIDDM oder Typ 2-Diabetes, das heißt eine Adipositas-korrelierte β -Zell-Dysfunktion mit verzögertem Insulin-Release der β -Zellen, Down-Regulation der peripheren Insulin-Rezeptoren und schließlich vakuolärer Degeneration der Inselzellen, ist beim Hund ebenfalls insgesamt selten [Hoenig 2002, Reusch und Hähnle 2001].

Der sekundäre Diabetes mellitus stellt die zweithäufigste Endokrinopathie des Hundes überhaupt dar. Da er insbesondere auf Grund des mammären Hypersomatotropismus vorkommt, handelt es sich beim Patientengut in acht von zehn Fällen von caninem Diabetes mellitus um adulte, nichtovarietomierte Hündinnen [Hoenig 2002, Reusch und Hähnle 2001].

Als typischer chronischer Folgeschaden kann beim Hund die diabetische Katarakt angesehen werden. Dabei wird die Plasma-Glukose nach Diffusion in die Linse unter Umgehung der

Glykolyse und des Pentosephosphatweges anaerob zu Sorbitol metabolisiert, welches osmotisch Gewebewasser nach sich zieht (griechisch „kataraktes“ = Wasserfall). Dies zerstört die geordnete Struktur der Linsenfasern durch Quellung und durch Bildung von äquatorialen Vakuolen, womit der Visus durch fortschreitende Trübung behindert wird [Martin 1995, Richter et al. 2002].

1.3.1.2 Diagnostik beim Hund

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Katze gilt beim Hund schon eine persistierende Nüchternhyperglykämie von über 150 mg/dL (8,3 mmol/L) als beweisend für die Diagnose des Diabetes mellitus. Physiologisch sind Nüchternwerte im Plasma von 70 bis 120 mg/dL (3,9 bis 6,7 mmol/L). Die Nierenschwelle für Glukose liegt mit 180 mg/dL (10 mmol/L) deutlich niedriger als bei der Katze und führt daher schon früher zu dem durch Glukosurie bedingten Symptomkomplex von Polyurie und Polydipsie. Der Referenzbereich der Plasma-Fruktosamine liegt unter 370 µmol/L (400 bis 500 µmol/L gelten als gut eingestellt und Werte über 650 µmol/L gelten als unzureichend eingestellt) [Reusch und Hähnle 2001, Feldman und Nelson 1996].

1.3.1.3 Insulin-Substitution beim Hund

Bei dem in der Kleintierpraxis üblichen Präparat „Caninsulin“ (Intervet, Akzo Nobel) handelt es sich um porcines Intermediärinsulin (70 % kristallines Zink-Insulin und 30 % amorphes Zink-Insulin). Da sich porcines Insulin von caninem strukturell nicht unterscheidet, dürfte die Wirksamkeit des Substituts mit der des körpereigenen Insulins identisch sein. Ziel der Einstellung mit Insulin sind Tagesprofile zwischen 90 mg/dL (5,0 mmol/L) und 180 mg/dL (10,0 mmol/L) [Reusch und Hähnle 2001].

1.3.1.4 orale Antidiabetica beim Hund

Auf Grund der Prävalenzverteilung zwischen insulin-abhängigem (einschließlich sekundärer Ätiologie und Pathogenese) und insulin-unabhängigem Diabetes mellitus ist der Einsatz von oralen Antidiabetica beim Hund nicht indiziert [Nelson 2000, Reusch und Hähnle 2001, Aurich 2002].

1.3.2 feliner Diabetes mellitus

1.3.2.1 Ursachen und Folgeschäden

Insgesamt wird die Prävalenz des Phänomens des felinen Diabetes mellitus auf 0,1 bis 0,3 % der Gesamtpopulation von *Felis silvestris forma catus* geschätzt [Neuvians und Berger 2002].

Der feline IDDM oder Typ 1-Diabetes, das heißt eine autoimmun vermittelte β -Zell-Destruktion, ist bei der Katze ein insgesamt seltenes Geschehen. In Einzelfällen wurde diese Form auch nach überstandener Panleukopenie (Infektion mit dem felinen Parvovirus) beschrieben. Am häufigsten ist dieser Typ noch im Zusammenhang mit einem pankreatischen Adenokarzinom zu beobachten [Rand 1999].

Der feline NIDDM oder Typ 2-Diabetes entspricht sowohl hinsichtlich der Prävalenz (als häufigste Form) als auch bezüglich der Pathophysiologie mit reduzierter Insulin-Wirkung in der Peripherie und typischer β -Zell-Amyloidose in Folge der reaktiven Hyperstimulation der Insulin-Inkretion weitestgehend dem Typ 2 des humanen Diabetes mellitus. Der wichtigste „Risikofaktor“ scheint das Alter zu sein: Jede zweite diabetische Katze ist älter als sechs Jahre. Danach folgen die „Risikofaktoren“ Adipositas, Kastration und männliches Geschlecht (67 %) in abnehmender Gewichtung [Feldman 1996].

Der feline sekundäre Diabetes mellitus in Folge einer Hyperthyreose ist bezüglich der Bedeutung seiner Prävalenz umstritten, da auch die Prävalenz der zugrundeliegenden Schilddrüsenüberfunktion uneinheitlich bewertet wird [Panciera et al. 1990].

Die sekundären Schadwirkungen der chronisch erhöhten Blutzuckerwerte manifestieren sich bei Katzen vor allem in Nephropathien (chronische Niereninsuffizienz) und sensorimotorischen Neuropathien, welche sich typischerweise in Form einer plantigraden Fußung der Beckengliedmaße mit der Konsequenz einer kaninchenähnlichen Körperhaltung manifestieren. Die plantigrade Positur basiert auf einer unter Insulin-Therapie meist reversiblen Sekundärschädigung der Schwannschen Scheiden der Nerven des Plexus lumbosacralis durch mikrovaskuläre Primärschädigung der versorgenden Gefäße [Mizisin et al. 2002].

Auf Grund des hohen Glukose-Gehalts des Harns werden bakterielle Zystitiden vor allem durch *Escherichia coli* und (häufig nach kurzfristig erfolgreicher Antibiose) mykotische Zystitiden insbesondere durch *Candida albicans* gefördert. Unter den prädisponierenden

Faktoren einer Zystitis nimmt die Zuckerkrankheit somit einen führenden Platz ein [Kirsch 1998, Pressler et al. 2003].

Sehr viel seltener als beim Menschen kommt es bei diabetischen Katzen zu hypertensiv bedingten Retinopathien, was vor allem darauf zurückzuführen ist, dass (anders als in der Humanmedizin) mit dem felines Diabetes mellitus in der Regel keine chronische Blutdruck-erhöhung kausal assoziiert zu sein scheint [Sennello et al. 2003].

Auch die für den Hund typische diabetische Katarakt stellt bei der Katze eine Seltenheit dar wegen des andersartigen Zuckerstoffwechsels in der Linse des adulten Katzenauges, da die Enzymaktivität der felines Aldosereduktase mit zunehmendem Alter abnimmt und somit den anaeroben Sorbitol-Shortcut nicht mehr erlaubt. Lediglich bei den seltenen juvenilen felines Diabetikern sind diabetische Katarakte zu beobachten [Martin 1995, Richter et al. 2002].

1.3.2.2 Diagnostik bei der Katze

Ab einem Absinken der Insulin-Inkretion auf etwa ein Viertel der physiologischen β -Zell-Funktion treten erste Symptome wie der Polyurie/Polydipsie-Komplex und Gewichtsabnahme auf. Der latente Diabetes mellitus – also die übermäßige Erhöhung der postprandialen Blutzuckerspiegel bei Nüchternwerten im Referenzbereich – ist in der Katzenheilkunde nicht zu diagnostizieren, da auf Grund der durch Stresshormone (insbesondere Noradrenalin) induzierten, passageren Hyperglykämie bei gesunden Katzen in praxi nur selten Blutzuckerspiegel unter dem kritischen Wert von 180 mg/dL (10 mmol/L) gemessen werden. Physiologisch sind Nüchternwerte im Plasma von 70 bis 150 mg/dL (3,9 bis 8,3 mmol/L). Aus diesem Grund ist trotz der relativ hohen Nierenschwelle für Glukose von 300 mg/dL (16,7 mmol/L) auch eine Glukosurie allein noch kein diagnostisch verwertbares Indiz [Lutz und Rand 1995, Rand et al. 2002].

Erst der mit dauerhaft erhöhten Nüchternwerten einhergehende manifeste Diabetes mellitus ist auf Grund von Produkten der irreversiblen Maillard-Reaktion zwischen der Plasma-Glukose und den Plasma-Proteinen sicher zu diagnostizieren. Die Maillard-Reaktion ist die nichtenzymatische Reaktion reduzierender Zucker mit den Lysin-Resten von Proteinen und Peptiden zu stabilen Amadori-Produkten. Unter dem Begriff der Fruktosamine werden alle plasmalöslichen Amadori-Produkte (glykosylierte Plasma-Proteine) zusammengefasst. Die Bestimmung der Fruktosamine erlaubt eine retrospektive Beurteilung des plasmatischen Glukose-Stoffwechsels über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen. Der Referenzbereich der Plasma-Fruktosamine liegt unter 340 μ mol/L (350 bis 450 μ mol/L gelten als gut

eingestellt und Werte über 600 $\mu\text{mol/L}$ gelten als unzureichend eingestellt) [Feldman und Nelson 1996].

Histologisch zeigt sich bei der Katze mit zunehmendem Alter eine sonst nur bei Primaten bekannte Amyloidose der Langerhansschen Inseln auf Grund des Amyloid-Polypeptids der β -Zellen. Dieses Amyloid ist ein Derivat des zusammen mit Insulin ausgeschütteten Peptidhormons Amylin, welches den Glykogenstoffwechsel funktionell im Sinne des Glukagon beeinflusst. Dieses degenerative Phänomen scheint jedoch ein Nebeneffekt der β -Zell-Erschöpfung zu sein und nicht ihre Ursache. Bei felines wie bei humanen Patienten des NIDDM steigt die Wahrscheinlichkeit einer β -Zell-Amyloidose auf 90 %. [Lutz und Rand 1995, O'Brien 2002].

1.3.2.3 Insulin-Supplementierung bei der Katze

Das Peptid Insulin als das zentrale Hormon in der Blutzucker-Regulation setzt sich aus zwei Ketten zusammen, die über mehrere Disulfid-Brücken verbunden sind: die A-Kette mit 21 Aminosäuren und die B-Kette mit 30 Aminosäuren [Feldman 1996].

Bovines Insulin ist dem felines am ähnlichsten, sie unterscheiden sich nur in einer Aminosäure, nämlich in Position 18 der A-Kette: Histidin bei der Katze und Asparagin beim Rind. Porcines beziehungsweise das analoge canine Insulin unterscheidet sich vom felines in den Positionen 8 (Threonin statt Alanin) und 10 (Isoleucin statt Valin) der A-Kette. Das auch wegen seiner Reinheit den Markt beherrschende rekombinante Human-Insulin unterscheidet sich vom felines in den genannten Positionen 8, 10 und 18 der A-Kette sowie in Position 30 (Threonin statt Alanin) der B-Kette, somit sind die strukturellen Unterschiede zwischen diesen beiden Spezies am größten [Feldman 1996].

Die Insulin-Supplementierung mit einem Intermediärpräparat ist die Therapie der Wahl für zwei Drittel der diabetischen Katzen. Leider erfolgt allzu häufig eine Überdosierung (die durch die Wirkung des Somogyi-Overswings leicht unbemerkt bleibt oder sogar zu weiterer Dosis-Erhöpfung verleitet), da die Katze auf Grund der Insulin-Unabhängigkeit sehr häufig noch über eine Residualkapazität der Insulin-Inkretion verfügt. Daher sollte die Insulin-Supplementierung bei der Katze nur nach einem Glukose-Toleranztest zur Prüfung dieser funktionellen Residualkapazität der β -Zellen und unter engmaschiger Blutzuckerbestimmung erfolgen („Serial Glucose Monitoring“ am besten an Hand von Kapillarblut, das vom Besitzer mittels „Footpad Prick“ in vertrauter Umgebung gewonnen wird) [Rand und Martin 2001, Casella et al. 2002]. Der Somogyi-Overswing stellt einen Schutzmechanismus des

Organismus gegen hypoglykämische Stoffwechsellagen dar, der bei Blutzuckerwerten unter 55 mg/dL (3,0 mmol/L) im Sinne des Selyeschen Adaptationssyndroms durch körpereigene Stresshormone reaktiv zu einer kurzfristigen Hyperglykämie führt [Feldman 1996].

Das Hauptrisiko der Insulin-Supplementierung besteht in dieser möglichen Überdosierung (meist im Zusammenhang mit einer nachfolgenden mangelhaften Futteraufnahme) mit der Folge einer potentiell lebensbedrohlichen Hypoglykämie. Da Neuronen im Gegensatz zu allen anderen Körperzellen Fettsäuren nicht als Energieträger nutzen können, reagiert das ZNS äußerst sensibel auf einen Blutzuckermangel. Bei der Katze ist neben der β -zellulären Residualkapazität als weiterer Hypoglykämie-Risikofaktor das Phänomen der im angelsächsischen Schrifttum so genannten „Honeymoon-Perioden“ bekannt. Dabei handelt es sich um spontane Remissionen (transiente Phasen mit ausreichender Insulin-Inkretion) meist innerhalb der ersten drei Monate nach therapiebedingter Blutzucker-Normalisierung, die durch die gewohnte additive Insulin-Supplementierung in einen Unterzucker münden können [Feldman 1996, Rand 1999, Hoenig 2002].

1.3.2.4) orale Antidiabetica bei der Katze

Zur Behandlung des insulin-unabhängigen Diabetes bei der Katze mit oralen Antidiabetica liegen bislang nur geringe Erfahrungen vor. Da jedoch ein gutes Drittel der felines Diabetiker dauerhaft auf orale Antidiabetica (vor allem Glipizid) anspricht, erscheinen umfangreichere Erfahrungen wünschenswert. Grundsätzlich gilt die Empfehlung, jeden Einsatz von oralen Antidiabetica mit einer Diät zu verbinden, die arm an leichtverdaulichen Kohlenhydraten ist. Bedauerlicherweise steht diese Empfehlung bisweilen im direkten Widerspruch zu der Notwendigkeit, den Eiweiß-Anteil in der Ration einer älteren Katze aus Rücksicht auf bei dieser Altersgruppe häufig zugleich bestehende Nephropathien zu reduzieren, da daraus resultierende gustatorische Einbußen nicht selten nur durch leichtverdauliche Kohlenhydraten ausgeglichen werden können [Martin und Rand 2000].

Die nachfolgende Übersicht über die bislang in der Katzenheilkunde erprobten oralen Antidiabetica veranschaulichen den Bedarf für neue Typ-2-Therapeutica und für weitere Forschung auf diesem Gebiet.

Glipizid

Die meisten Erfahrungen mit oralen Antidiabetica bei Katzen liegen zu Glipizid vor, einem Sulfonylurea-Derivat der zweiten Generation. Die Sulfonylurea-Derivate der zweiten Generation haben eine bis zu hundertfach höhere Wirksamkeit als die der ersten Generation. Als erfolgversprechende Dosierung hat sich eine Gabe von 0,25 bis 0,5 mg/kg KM zweimal täglich etabliert. Die Verbesserung der Glukose-Toleranz ist bei gut einem Drittel der diabetischen Katzen überzeugend und macht die Insulin-Supplementierung verzichtbar. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass mit klinischer Besserung in der Regel nicht vor Ablauf eines Monats zu rechnen ist [Feldman et al. 1997, Kraft 2000, Martin und Rand 2000].

Der pharmakodynamische Effekt der Sulfonylurea-Derivate besteht in einer direkten, vom Blutzuckerspiegel unabhängigen Stimulation der β -Zellen zur Insulin-Inkretion. Dadurch ist unter Glipizid-Gabe ebenso ein Hypoglykämie-Risiko gegeben wie unter Insulin-Supplementierung. Darüberhinaus steigert jedes orale Antidiabetikum, das die Insulin-Inkretion direkt fördert, bei der Katze die Entwicklung einer β -Zell-Amyloidose und kann daher sogar zu einer Exazerbation der ursächlichen β -Zell-Erschöpfung führen. Die Erfolgsrate der modernen Sulfonylurea-Derivate in der Therapie der felines Zuckerkrankheit wird mit bis zu 50 % angegeben [Ford 1995, O'Brien 2002].

Acarbose

Die Pharmakodynamik dieses Enzym-Inhibitors besteht in der Hemmung der epithelständigen α -Glukosidase im Dünndarm, welche Disaccharide und Oligosaccharide im Chymus zu resorbierbaren Monosacchariden spaltet. Durch die verzögerte Resorption werden hohe Blutzuckerspitzen verhindert. Der Abbau der Kohlenhydrate durch bakterielle Enzyme im Dickdarm führt jedoch häufig zu gastro-intestinalen Störungen wie Meteorismus, Flatulenz und Diarrhöe. Im Zusammenspiel mit einer an Kohlenhydraten armen Diät konnten bei Katzen durchaus ermutigende Ergebnisse erzielt werden [Mazzaferro et al. 2003].

Chrom und Vanadium

Die essentiellen metallischen Spurenelemente Chrom und Vanadium hemmen das Enzym Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP), das den Insulin-Rezeptor dephosphoryliert und damit

inaktiviert. Eine PTP-Inhibition verlängert somit die Signal-Transduktion und verstärkt folglich die Insulin-Wirkung an der Zielzelle. Chrom und Vanadium hemmen allerdings eine Vielzahl an Proteinen, darunter Calciumkanäle und Adenylatzyklen. Daher sind sie nur als Salze der Picolinsäure, einem Tryptophan-Derivat, (Chrom-Picolinat) und der Schwefelsäure (Vanadyl-Sulfat) im Einsatz, die durch Verbesserung der Bioverfügbarkeit eine Dosis-Reduktion erlauben. Da Chrom nicht gespeichert, sondern relativ rasch renal ausgeschieden wird, gilt sein Toxizitätspotential als vernachlässigbar. Während der Einsatz von Chrom bei feline Diabetikern ohne Einfluss auf die Glukose-Toleranz blieb, wurde von ersten erfolgreichen Versuchen berichtet, mit Vanadium-Sulfat den Blutzuckerspiegel von diabetischen Katzen zu normalisieren. Darüberhinaus werden günstige Effekte auf das Muskelwachstum und die Reduktion der Körperfettmasse postuliert. [Cohn et al. 1999, Nelson 2000].

Metformin

Die Pharmakodynamik dieses in der Humanmedizin erfolgreich eingesetzten Biguanid-Derivats besteht in der Reduktion der Glukose-Resorption aus dem Darm und Stimulation der Glukose-Aufnahme im Gewebe. Die wenigen Untersuchungen zur Wirksamkeit bei feline Diabetikern lieferten keine zufrieden stellenden Ergebnisse, deuteten vielmehr daraufhin, dass die unerwünschten Wirkungen (Lethargie, Anorexie und Emesis) bei Katzen dominieren [Nelson et al. 2004].

1.3.3 pharmakotherapeutische Kontraindikationen bei Diabetes mellitus

Grundsätzlich ist bei Patienten des Diabetes mellitus die therapeutische Anwendung jedes diabetogenen Pharmakons, das heißt jedes Wirkstoffes, der geeignet ist, den Blutzuckerspiegel zu erhöhen oder die Glukose-Toleranz zu erniedrigen, kontraindiziert. Neben den Glukokortikoiden besteht eine derartige Kontraindikation auch bei weniger offensichtlichen, wengleich im oben genannten Sinne ebenso diabetogenen Pharmaka wie den α_2 -Agonisten Medetomidin und Xylazin auf Grund des hyperglykämischen Effektes dieser Thiazin-Derivate [Ambrisko und Hikasa 2002, Ebert et al. 2002]. Umso mehr muss von Wirkstoffen aus der Gruppe der Antidiabetica eine diesbezügliche Unbedenklichkeit gefordert werden, die jedes neue Antidiabeticum unter Beweis zu stellen hat.

2 Literatur

2.1 Geschichtlicher Hintergrund

2.1.1 Geschichte des Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)

Ende der 1960-er Jahre wurde der funktionale Zusammenhang zwischen gastro-intestinalen Hormonen und dem endokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse, den Langerhansschen Inseln, erstmals definiert und als entero-insulare Achse bezeichnet [Unger und Eisentraut 1969]. Bei dem gastro-intestinalen Hormon der entero-insularen Achse, das damals im Zentrum der Betrachtung stand, handelte es sich um das zu den regulatorischen Peptiden zählende Glucose-dependent Insulinotropic Peptide (GIP), auch bekannt als Gastric Inhibitory Polypeptide [Unger und Eisentraut 1969].

Erst in den 1980-er Jahren wurden zwei glukagonähnliche Peptide, die zusammen mit Glukagon in einem gemeinsamen Propeptid ihren Ursprung haben, in Hamster-Prä-Proglukagon entdeckt: nämlich Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) und Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2) [Bell et al. 1983 (b)]. Bald darauf wurde für GLP-1 eine derjenigen des GIP vergleichbare insulinotrope Wirkung gezeigt [Holst et al. 1986].

Alle drei Peptidhormone gehören zur entero-insularen Achse und beeinflussen – zum Teil synergistisch – die Insulin-Ausschüttung (GLP-1 und GIP) [Kreymann et al. 1987, Nauck et al. 1993 (a), Damholt et al. 1996], das Sättigungsgefühl (GLP-1 und GLP-2) [Meier et al. 2002 (a)], die Magensäuresekretion (GLP-1, GLP-2 und GIP) [Layer et al. 1995], die Magen-Darm-Motilität (GLP-1 und GLP-2) [Wettergren et al. 1993] und sogar die intestinale Mucosa-Regeneration und Permeabilität (GLP-2) [Drucker et al. 1996, Lambeir et al. 2002].

Die Peptidhormone werden von spezialisierten endokrinen Zellen der Darmwand, den so genannten K-Zellen im Duodenum (GIP) und den so genannten L-Zellen in Jejunum, Ileum und Colon (GLP-1 und GLP-2), sezerniert [Ørskov et al. 1986, Ørskov et al. 1989].

Bereits im Jahre 1988 wurde entdeckt, dass auch im zentralen Nervensystem (ZNS) von Ratten im Bereich des Hypothalamus GLP-1 in einer Größenordnung von $5,5 \pm 0,4$ pmol/g Gewebe synthetisiert wird [Kreymann et al. 1988]: Die Neuronen der Pars caudalis des Nucleus Tractus solitarii transkribieren die mRNA von Prä-Proglukagon und prozessieren das Peptid posttranslational zu GLP-1 (7-37) und GLP-1 (7-36) amide wie in den intestinalen L-Zellen [Larsen et al. 1997].

2.1.2 Geschichte der Dipeptidyl-Peptidase-IV (DPP-IV)

Im Jahre 1966 wurde in Homogenisaten von Ratten-Lebern ein Enzym entdeckt, das die Verbindung Gly-Pro-2-Naphthylamid zu dem Dipeptid Glycylprolin und Naphthylamin umsetzt, dementsprechend wurde diese Peptidase Glycylprolin-Naphthylamidase genannt. Da die Aminosäuresequenz Gly-Pro in Kollagenen häufig auftritt, wurde dem Enzym eine mögliche Rolle im Bindegewebsstoffwechsel zugesprochen [Hopsu-Havu und Glenner 1966]. Da die Peptidase jedoch die in Kollagenen meist auf Gly-Pro folgenden Strukturen Pro-Pro oder Pro-Hyp nicht spalten konnte, blieb die Zuordnung der Funktion fraglich. Erst 1978 gelangte das schließlich als Dipeptidyl-Peptidase-IV (DPP-IV) bezeichnete Enzym wieder in den Fokus des Interesses, nämlich als inaktivierende Hydrolase des vasodilatativen Cotransmitters Substanz P (von englisch „Powder“ = der getrocknete Extrakt der ersten Isolierung) [Heymann und Mentlein 1978].

Dass es sich bei DPP-IV um das Enzym handelt, das für die Degradation der Inkretine GLP-1 und GIP beim Menschen primär verantwortlich ist, konnte Mitte der 1990-er Jahre gezeigt werden [Mentlein et al. 1993, Kieffer et al. 1995].

2.2 Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1)

2.2.1 Phylogenie des Proglukagons

Während das Peptidhormon GLP-1 bei Säugetieren primär über Inkretinwirkung verfügt und GLP-2 primär Motilität und Sekretion des Magens reguliert, exprimiert bei Knochenfischen (Osteichthyes) das entsprechende Proglukagon codierende Gen nur enterales Glukagon und GLP-1 (mit primärer Glukagonwirkung), wohingegen Amphibien neben Glukagon, GLP-1 und GLP-2 über ein weiteres regulatorisches Peptid (GLP-1B) verfügen [Mojsov 2000].

Diese phylogenetischen Unterschiede werden neben anderen Erkenntnissen der Genanalyse als Indiz dafür gewertet, dass die glukagonähnlichen Peptide durch Sequenz-Triplikation des Glukagon codierenden Gens auf der Basis einer frühen Polyploidisierung des Genoms entstanden sind. Nach Punktmutationen mit der Folge des Austausches einzelner Aminosäuren durch andere haben die neuen Glukagon-Derivate vermutlich ihre eigene funktionale Bestimmung gefunden [Bell et al. 1983 (a), Irwin et al. 1999].

Die Aminosäuresequenz von GLP-1 ist evolutionär höchst konservativ, so dass die Diversifikation des Proglukagon codierenden Gens in die Sequenzen von Glukagon, GLP-1 und GLP-2 vor die Diversifikation der Vertebraten vor 500 Millionen Jahren datiert wird. So überrascht es kaum, dass anscheinend alle Säugetiere über eine identische GLP-1-Struktur verfügen [Lopez et al. 1984, Irwin et al. 1999].

2.2.2 Struktur von GLP-1

Die Zuordnung von GLP-1 als so genanntes „Intestinal Proglucagon-derived Peptide“ zu den glukagonähnlichen Peptiden beruht neben der tatsächlichen Abstammung von Proglukagon auf der mehr als 50 %-igen Homologie zu Glukagon (und zu GLP-2) [Holst 1999]. Peptide der Glukagon-Peptidfamilie (zu der auch das Vasoactive Intestinal Polypeptide = VIP gehört) weisen N-terminal insofern eine beträchtliche Sequenz-Homologie auf, als hier der Peptidanfang nur entweder Tyr-Ala, His-Ala oder His-Ser lauten kann [Mentlein et al. 1993].

Primär- und Sekundärstruktur der 30 Aminosäuren von GLP-1 (7-37) (**rot** = AS in β -Turns; **blau** = AS in α -Helices) [Sasaki et al. 1975, Lambeir et al. 2002]:

H₂N-His-Ala-Glu-**Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-**
-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-COOH

Zum Vergleich die Aminosäuresequenz von 1.) GLP-2, das in 11 von 30 Aminosäuren dem GLP-1 gleicht und von 2.) Glukagon, das in 14 von 30 Aminosäuren mit GLP-1 identisch ist (*kursiv* = zu GLP-1 homologe AS) [Sasaki et al. 1975, Lambeir et al. 2002]:

1.) H₂N-*His-Ala*-Asp-**Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-**
-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-*Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp*-COOH

2.) H₂N-*His-Ser-Gln*-**Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-**
-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-*Leu-Met-Asn-Thr*-COOH

Die hohe Variabilität der C-terminalen Sequenz innerhalb der Glukagon-Familie könnte ein Hinweis dafür sein, dass diese Struktur weniger einen funktionellen Charakter hinsichtlich der Hormonwirkung hat, sondern möglicherweise eher eine Art Schutz vor C-terminal angreifenden abbauenden Enzymen im Sinne eines unspezifischen „Futters“ für Peptidasen darstellt [Adelhorst et al. 1994, Knudsen und Pridal 1996]. So sinkt die relative Bindungsaffinität von C-terminal degradiertem GLP-1 an den GLP-1-Rezeptor deutlich langsamer als von N-terminal degradiertem GLP-1.

Angegeben sind die relative Bindungsaffinität und die relative Adenylatzyklase-Aktivität am geklonten humanen GLP-1-Rezeptor im Vergleich zum ursprünglichen Peptidhormon GLP-1 (7-36 amide), dessen EC₅₀ mit dem Faktor 1 gleichgesetzt wurde:

<u>Inkretin:</u>	<u>Bindungsaffinität:</u>	<u>Adenylatzyklase-Aktivität</u>
GLP-1 (7-36 amide)	1	1
GLP-1 (7-35)	0,12	0,081
GLP-1 (7-34)	0,028	0,011
GLP-1 (9-36 amide)	0,0095	(nicht gemessen)

[Knudsen und Pridal 1996]

2.2.3 Prozessierung von GLP-1

Das gemeinsame Propeptid von Glukagon, GLP-1 und GLP-2, das Proglukagon (160 Aminosäuren = die Sequenz von AS 21 bis AS 180 des Prä-Proglukagons), unterliegt einer so genannten differentiellen posttranslationalen Prozessierung – je nach Expressionsniveau des verantwortlichen Enzyms im jeweiligen Zelltyp (in Gehirn, Darm und Bauchspeicheldrüse) [Mojsov et al. 1986]:

Bei diesen Enzymen handelt es sich um die der Serinprotease Subtilisin ähnlichen Endopeptidasen Prohormone Convertase-1 im ZNS (PC-1), die identisch ist mit der Prohormone Convertase-3 im Darm (PC-3), und Prohormone Convertase-2 im Pankreas (PC-2) [Rouillé et al. 1995].

In den darmwandständigen L-Zellen sowie in den Neuronen des caudalen Nucleus Tractus Solitarii prozessiert die hier vorherrschende PC-1/3 Proglukagon zu Glicentin, GLP-1, Intervening Peptide-2 (IP-2) und GLP-2. Die Bezeichnung Glicentin leitet sich von GLI = Glucagon-Like Immunoreactivity und lateinisch „centum“ = hundert (Aminosäuren) ab, tatsächlich umfasst Glicentin jedoch nur die Proglukagon-Sequenz 1-69 [Ørskov et al. 1986].

<u>Prozessierungsprodukt (L-Zelle):</u>	<u>Proglukagon-Sequenz:</u>
Glicentin	1-69
<i>(GRPP/Oxyntomodulin</i>	<i>1-30/33-69)</i>
GLP-1	72-108
IP-2	111-123
GLP-2	126-158

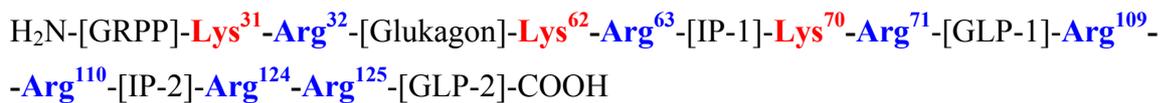
[Rouillé et al. 1997]

In pankreatischen α -Zellen prozessiert die hier dominierende PC-2 Proglukagon zu Glicentin-Related Pancreatic Polypeptide (GRPP), Glukagon, Intervening Peptide-1 (IP-1) und Major Proglucagon Fragment (MPGF) [Holst et al. 1994].

<u>Prozessierungsprodukt (α-Zelle):</u>	<u>Proglukagon-Sequenz:</u>
GRPP	1-30
Glukagon	33-61
IP-1	64-69
MPGF	72-158

[Rouillé et al. 1997]

Glicentin umfasst somit die Sequenzen von GRPP, Glukagon und IP-1, während MPGF die Sequenzen von GLP-1, IP-2 und GLP-2 umfasst. Die Spaltungsstellen sind dibasisch, das heißt zwischen zwei basischen Aminosäuren lokalisiert. Die L-Zellen-assoziierte PC-1/3 spaltet Arg-Arg-Strukturen, die pankreatische PC-2 spaltet Lys-Arg-Bindungen [Rouillé et al. 1997]:



Die intestinale PC-1/3 ist auch für die N-terminale Trunkierung von GLP-1 um ein Hexapeptid zu truncated-GLP-1 (tGLP-1, im Weiteren nur GLP-1 genannt) verantwortlich. Die 30 Aminosäuren von GLP-1 (7-37) entsprechen der Proglukagon-Sequenz 78 bis 108. [Ørskov et al. 1989, Rouillé et al. 1995].

Die Intervening Peptides IP-1 und IP-2 steuern die differentielle posttranslationale Prozessierung der drei Hauptpeptide Glukagon, GLP-1 und GLP-2 als Transkriptionsfaktoren im Sinne der negativen Rückkopplung [Rouillé et al. 1997].

Das N-terminale Hexapeptid, das zur Aktivierung des Peptidhormons abgespalten werden muss, könnte ähnlich der N-terminalen Prä-Sequenz des Prä-Proinsulins dazu dienen, die extrazelluläre Determination des Peptids zu kennzeichnen [Rouillé et al. 1995].

2.2.4 C-terminale Amidation von GLP-1

GLP-1 tritt in zwei biologisch äquipotent aktiven Formen (Isoformen) auf: Zu etwa drei Vierteln als GLP-1 (7-36) amide und zu etwa einem Viertel als GLP-1 (7-37). Nachdem die Abspaltung des N-terminalen Hexapeptids durchlaufen ist, wird in etwa 75 % der Fälle die C-terminale Aminosäure Glycin in Position 37 durch eine Aminogruppe ersetzt [Ørskov et al. 1993, Drucker 2003].

Im Gegensatz zu anderen Peptidhormonen wie Gastrin und Cholezystokinin stellt die C-terminale Amidation keine biologische Aktivierung dar, da die beiden Isoformen über identische biologische Aktivität am GLP-1-Rezeptor verfügen. Vielmehr wird für die Amidation der C-terminalen Carboxylgruppe eine Schutzfunktion vor diesseitiger Degradation (unter anderem durch die neutrale Endopeptidase 24.11) diskutiert [Adelhorst et al. 1994, Knudsen und Pridal 1996].

2.2.5 Inkretion von GLP-1

Auf die luminale Stimulation durch aus dem Nahrungsbrei freigesetzte Glukose und (in geringerem Maße) freie Fettsäuren antworten die Proglukagon produzierenden L-Zellen mit der endokrinen Ausschüttung von GLP-1 und GLP-2 innerhalb von 15 ± 10 Minuten nach Beginn der Nahrungsaufnahme [Kreymann et al. 1987]. L-Zellen (von englisch „large“ wegen der auffallenden Größe der proglukagonhaltigen Granula, deren Durchmesser bei verschiedenen Tierarten zwischen 360 und 380 nm beträgt) finden sich im gesamten Gastro-Intestinal-Trakt, sind jedoch schwerpunktmäßig in der Darmwand des Ileums situiert. Der Anteil der GLP-1-immunoreaktiven Zellen an der Gesamtzahl endokriner Zellen beträgt 40 % im Ileum, wo mit 90 pmol/g auch die höchste Konzentration in einem Gewebe gefunden wurde [Ørskov et al. 1986, Ørskov et al. 1989, Eissele et al. 1992, Mortensen et al. 2003].

Die GLP-1-Inkretion kann nur mit resorbierbarer Glukose provoziert werden, wohingegen nichtresorbierbare Glukose-Derivate (wie zum Beispiel 2-desoxy-Glukose) keine Stimulation der L-Zellen bewirken [Sugiyama et al. 1994].

Die basale Plasma-Konzentration von GLP-1 beträgt bei gesunden Erwachsenen der europäischen Menschenrasse 1,4 bis 2,2 pmol/L [Herrmann et al. 1995], postprandial steigt der Wert auf 20 bis 30 pmol/L [Ahrén et al. 1997]. Angehörige der negriden Menschenrasse haben sowohl nüchtern als auch im oralen Glukose-Toleranztest höhere GLP-1-Plasma-Konzentrationen und neigen auf Grund der daraus resultierenden temporären Hyperinsulinämie sowie der folglich schneller progredienten Insulin-Resistenz häufiger zur Erkrankung an NIDDM [Velasquez-Mieryer et al. 2003].

Interessanterweise scheint insofern eine Art Synergieeffekt der beiden Inkretine GLP-1 und GIP (aus den so genannten K-Zellen, die mit 24 % und über 150 pmol/g vor allem im proximalen Jejunum situiert sind) zu bestehen, als GIP die Freisetzung von GLP-1 parakrin oder endokrin fördert. Der Synergieeffekt auf die Insulin-Inkretion ist allerdings lediglich

additiver und nicht potenzierender Natur [Nauck et al. 1993 (a), Damholt et al. 1996, Meier et al. 2002 (b), Mortensen et al. 2003].

2.2.6 Inkretin-Wirkung von GLP-1

Die Förderung der Insulin-Inkretion ist die Funktion, die zur Bezeichnung von GLP-1 und GIP als so genannte Inkretine geführt hat, wobei die Inkretin-Wirkung des GLP-1 gegenüber derjenigen des GIP dominant zu sein scheint [Fehmann et al. 1995, Meier et al. 2002 (b)]. Inkretine sind definiert als Hormone, die erstens von endokrinen Zellen des Gastro-Intestinal-Traktes durch den Reiz des Kontaktes mit Nährstoffen, insbesondere Kohlenhydraten, sezerniert werden und zweitens bei physiologischen Plasma-Konzentrationen die Insulin-Inkretion in Gegenwart erhöhter Blutzuckerspiegel stimulieren [Creutzfeldt 1979, Demuth et al. 2002].

Die Inkretin-Wirkung von GLP-1 wurde ebenso wie die Glukose-Abhängigkeit der GLP-1-Inkretion bereits 1985 gezeigt [Schmidt et al. 1985]. Einzig bei partiell gastrektomierten Patienten, die in der Folge der chirurgischen Intervention das so genannte Late-Dumping-Syndrom entwickelt haben, das heißt bei denen der Chymus zu schnell in den Dünndarm entlassen wird, tritt nach einer raschen postprandialen Hyperglykämie innerhalb von einer bis drei Stunden eine reaktive Hypoglykämie auf, deren Ursache in dem hyperinsulinämischen Effekt von gleichzeitig beobachteten abnorm hohen GLP-1-Plasma-Konzentrationen vermutet wird [Toft-Nielsen et al. 1998].

GLP-1 und GIP stimulieren additiv-synergistisch die glukoseabhängige Insulin-Ausschüttung der β -Zellen der Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse durch Verstärkung der Sensitivität der β -Zelle auf den Reiz eines erhöhten Blutzuckerspiegels, was auch als Induktion der Glukose-Kompetenz der β -Zelle bezeichnet wird [Holz et al. 1993, Meier et al. 2002 (b)]. Es werden bis zu 50 % der Insulin-Inkretion beim gesunden Menschen auf diesen Inkretin-Effekt zurückgeführt [Tadayyon und Smith 2003].

2.2.7 andere Wirkungen von GLP-1

Die indirekt blutzuckersenkende Wirkung des GLP-1 kann neben der Sensibilisierung der β -Zellen auch darauf zurückgeführt werden, dass GLP-1 einen suppressiven Effekt auf die pankreatische Glukagon-Inkretion ausübt [Ørskov et al. 1988]. Die Hemmung der α -Zellen der Langerhansschen Inseln verläuft über eine parakrine Inhibition durch Somatostatin,

dessen Ausschüttung aus Langerhansschen δ -Zellen seinerseits von GLP-1 stimuliert wird [Fehmann et al. 1995, Gromada et al. 1998].

Weiterhin stimuliert GLP-1 die Proliferation und Regeneration der β -Zellen der Langerhansschen Inseln ausgehend von Gangepithelzellen [Xu et al. 1999, Tourrel et al. 2002] sowie die Biosynthese von Proinsulin (durch Aktivitätssteigerung des Promotoren des Proinsulin codierenden Gens) [Fehmann und Habener 1992, Egan et al. 1998] und inhibiert die gastro-intestinale Motilität (als funktioneller Bestandteil der so genannten „Ileal Brake“) [Wettergren et al. 1993, Tolessa et al. 1998] sowie die Sekretion der Magensäure [Schjoldager et al. 1989].

GLP-1 stimuliert in der Leber und in der quergestreiften Muskulatur die Glykogen-Synthese [Valverde et al. 1994] und im Fettgewebe die Lipogenese [Oben et al. 1991] durch die Erhöhung des Insulin/Glukagon-Quotienten [Hvidberg et al. 1994].

Besondere Beachtung verdienen die zentralnervösen Wirkungen von GLP-1, auf die schon die Synthese im caudalen Nucleus Tractus Solitarii hinweist: das Sättigungsgefühl nimmt zu (beziehungsweise Hunger und resultierende Nahrungsaufnahme nehmen ab), was als anorexigener (verzehrreduzierender) Effekt gerade für Patienten des NIDDM im Hinblick auf die hier notwendigen kalorisch restriktiven Diäten relevant ist [Meier et al. 2002 (a)]. Ebenso nehmen Durst und resultierende Flüssigkeitsaufnahme ab [Flint et al. 1998]. Nur der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass GLP-1 die Körperkerntemperatur senkt [Tang-Christensen et al. 1996] und die hypothalamische Ausschüttung von TSH und LHRH erhöht [Beak et al. 1996, Beak et al. 1998].

2.2.8 GLP-1-Rezeptor

GLP-1-Rezeptoren finden sich außer auf den β -Zellen des endokrinen Pankreas auch auf Zellen des Magens [Uttenthal et al. 1990], im Gehirn [Shimizu et al. 1987] und in der Lunge [Richter et al. 1991].

Zur Glukagonrezeptorfamilie, der Unterfamilie B1 (Typ Sekretin-Rezeptor) der an stimulatorische GTP-bindende Proteine (Gs) gekoppelten Rezeptoren, zählen neben den Rezeptoren für die beiden glukagonähnlichen Peptide GLP-1 und GLP-2 die Rezeptoren für Glukagon [Jelinek et al. 1993], für Sekretin [Ishihara et al. 1991], für Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) [Sreedharan et al. 1991] und für das Neuropeptid Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) [Hosoya et al. 1993].

Die Bindung von GLP-1 an seinen Rezeptor aktiviert das heterotrimere Gs-Protein, bestehend aus den Untereinheiten α , β und γ . Die Gs α -Untereinheit aktiviert die Adenylatzyklase zur Produktion von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP), welches an den gespeicherten Calcium freisetzenden Ryanodinrezeptor bindet [Holz et al. 1999], die spannungsabhängigen Calcium-Kanäle (Voltage-Dependent Calcium-Channel = VDCC) stimuliert [Suga et al. 1997] und die spannungsabhängigen Kalium-Kanäle (K_V) antagonisiert [MacDonald et al. 2002]. Gleichzeitig aktiviert das Gs $\beta\gamma$ -Dimer die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), welche den Transkriptionsfaktor Pancreatic Duodenal Homeobox-1 (PDX-1) und die Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) aktiviert [Leech et al. 2000]. Darüberhinaus bindet das Gs $\beta\gamma$ -Dimer hemmend an die SUR-1-Untereinheit von ATP-sensitiven Kalium-Kanälen (K_{ATP}) [Ashcroft 2000].

Die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors bewirkt

- a) die Potenzierung der glukoseabhängigen Insulin-Ausschüttung,
- b) die Aktivierung der Transkription des Proinsulin codierenden Gens und
- c) die Stimulation der Proliferation der β -Zellen [Drucker 2003].

Die Potenzierung der glukoseabhängigen Insulinausschüttung hat eine dreifache Ursache:

Zum einen resultiert sie aus der Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration via Aktivierung des Ryanodinrezeptors und Stimulation der VDCC. Zum anderen resultiert sie aus der Senkung der Depolarisationsschwelle durch Reduzierung des Membranpotentials via Inhibition der K_{ATP} . Zum dritten resultiert sie aus der Verlängerung der von Glukose ausgelösten Aktionspotentiale durch Verlangsamung der Repolarisierung via Antagonisierung der K_V [Suga et al. 1997, Ashcroft 2000, MacDonald et al. 2002].

Die Aktivierung der Transkription des Proinsulin codierenden Gens und die Stimulation der Proliferation der β -Zellen resultieren aus der Wirkung des Transkriptionsfaktors PDX-1 und derjenigen der MAPK [Leech et al. 2000].

Im Jahre 1992 wurde ein Toxin im Speichel von Gila-Monstern (*Heloderma suspectum*) als potenter GLP-1-Rezeptor-Agonist identifiziert: Exendin-4, wobei es sich um einen so genannten Superagonisten handelt, da Exendin-4 noch stärkere Wirkung am GLP-1-Rezeptor entfaltet als GLP-1 selber [Eng et al. 1992].

Gila-Monster sind Krustenechsen, deren Habitat die ariden und semiariden Regionen Mexikos und des Südens der Vereinigten Staaten umfasst. In den Zellen der umgewandelten Unterlippendrüsen wird das toxische Peptid synthetisiert, sezerniert und dann zu gefurchten Zähnen des Unterkiefers weitergeleitet. Zur Familie der Helodermatidae zählt neben *Heloderma suspectum* (Gila-Monster) nur noch die Spezies *Heloderma horridum* (Mexican

beaded lizard), die das Toxin Exendin-3 in ihren Unterlippendrüsen produziert. Exendin-3 ist jedoch auf Grund seiner ausgeprägten unerwünschten Wirkungen nicht von pharmakologischem Interesse [López de Maturana et al. 2002].

Zum Vergleich die Aminosäuresequenz von Exendin-4, einem GLP-1-Rezeptor-Superagonisten, der aus dem giftigen Speichel des Gila-Monsters (*Heloderma suspectum*) isoliert wurde (*kursiv* = zu GLP-1 homologe AS) [López de Maturana et al. 2002]:

H₂N-*His*-Gly-Glu-**Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp**-Leu-**Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala**-**Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp**-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-COOH

2.2.9 Elimination von GLP-1

Biologisch aktives GLP-1 hat in vivo nur eine Halbwertszeit von 90 bis 120 Sekunden [Deacon et al. 1995, Kieffer et al. 1995]. Die Clearance beruht primär auf der enzymatischen Aktivität der beinahe ubiquitären DPP-IV, sekundär auf der glomerulären Filtration (GFR) des Peptids in der Niere [Ruiz-Grande et al. 1993] sowie – zu einem sehr geringen Teil – auf der enzymatischen Aktivität der endopeptidale Bindungen angreifenden neutralen Endopeptidase mit dem Enzym-Code 3.4.24.11 (NEP 24.11) [Hupe-Sodmann et al. 1995].

Bei der renalen Elimination von GLP-1 ist die GFR des Gesamtpeptids von der N-terminalen Inaktivierung durch DPP-IV auf den Endothelzellen der Nierengefäße zu unterscheiden [Ruiz-Grande et al. 1993].

Die in-vitro-Halbwertszeit wird in der Literatur – anscheinend in Abhängigkeit vom gewählten Versuchsmodell – mit Werten zwischen 30 und 100 Minuten angegeben [Kieffer et al. 1995, Wettergren et al. 1998, Hinke et al. 2002]. Die in-vitro-Halbwertszeit ist damit deutlich länger als die in-vivo-Halbwertszeit [Lambeir et al. 2002].

2.3 Dipeptidyl-Peptidase-IV (DPP-IV)

2.3.1 Familie der Dipeptidyl-Peptidasen

Die Familie der Dipeptidyl-Peptidasen stellt eine Unterklasse der Familie der Prolyl-Oligo-Peptidasen (POP) dar. Bis heute sind sieben Dipeptidyl-Peptidasen (DPP-I bis DPP-IV, DPP5, DPP7 und DPP8), ein katalytisch inaktives Dipeptidyl-Peptidase-Related Protein (DPP6) und ein katalytisch aktives Dipeptidyl-Peptidase-Like Protein (DPP9) beschrieben [Olsen und Wagtmann 2002].

Die vier wichtigsten Dipeptidyl-Peptidasen werden mit den römischen Zahlen I bis IV gekennzeichnet. Diese vier Enzyme werden auf der Grundlage ihrer wichtigsten Eigenschaft, nämlich ihrer katalytischen Aktivität, an Hand ihrer relativen Substratspezifität differenziert:

<u>Enzym:</u>	<u>EC:</u>	<u>N-terminus des Substrats:</u>	<u>Determinationssubstrat:</u>
DPP-I	3.4.14.1	Xaa-Arg	Gly-Arg-4-Methoxynaphthylamid
DPP-II	3.4.14.2	Xaa-Ala (Xaa-Pro)	Lys-Ala-4-Methoxynaphthylamid
DPP-III	3.4.14.4	Xaa-Arg	Arg-Arg-4-Methoxynaphthylamid
DPP-IV	3.4.14.5	Xaa-Pro (Xaa-Ala)	Gly-Pro-4-Methoxynaphthylamid

Alle Dipeptidyl-Peptidasen sind Serin-Proteasen. Die Dipeptidyl-Peptidasen DPP-IV, DPP6, DPP8 und DPP9 zählen zur Subfamilie S9b innerhalb der Familie S9. Die dreidimensionale Struktur innerhalb der Serin-Proteasen-Familie S9 ist relativ konservativ und beinhaltet eine β -Propeller-Domäne und eine α/β -Hydrolase-Domäne ähnlich derjenigen der Acetylcholinesterase [Olsen und Wagtmann 2002, Drucker 2003].

Die DPP-IV-ähnliche Enzymaktivität auch anderer, das heißt nicht-strukturverwandter Proteasen wird unter dem rein funktional deskriptiven Begriff DPP-IV Activity and/or Structure Homologues (DASH) subsumiert [Olsen und Wagtmann 2002].

DPP-I und DPP-II sind lysosomale Peptidasen, DPP-III findet sich im Zytoplasma und nur DPP-IV ist eine ektoenzymale (zelloberflächenständige und im Plasma befindliche) Dipeptidase. Somit kommt dem plasmaaktiven Enzym DPP-IV eine bedeutendere Stellung in der GLP-1-Degradation zu als dem auf Lysosomen beschränkten Enzym DPP-II, obgleich dieses eine größere Substrataffinität zur Xaa-Ala-Struktur der glukagonähnlichen Peptide aufweist [McDonald et al. 1986].

2.3.2 DPP-IV-Gen

Das DPP-IV-Gen umfasst etwa 70.000 Basenpaare (70 kb), enthält 26 Exons, deren Umfang zwischen 1,4 und 45 kb rangieren, und ist auf dem langen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert, interessanterweise in unmittelbarer Nachbarschaft des Proglukagon codierenden Gens [Drucker 2003].

Die Exons 8 und 9 (die später sialinsäurereich glykosylierte β -Propeller-Domäne) sowie 20 bis 26 (die katalytische Ser-Asp-His-Triade) sind sehr konservativ, da sie die katalytisch aktiven Strukturen codieren [Abbott et al. 1999].

2.3.3 Funktionen der DPP-IV

Die Dipeptidyl-Aminopeptidase-IV (DPP-IV) hat eine zweifache Funktion im Organismus: Einerseits fungiert sie als regulatorische Protease einer ausgesprochen großen Anzahl an Substraten. In dieser Funktion stutzt die zur Gruppe der nicht-klassischen Serin-Proteasen zählende DPP-IV den N-Terminus von Peptiden, die in pänultimaler Position Prolin oder Alanin aufweisen, um das entsprechende Dipeptid Xaa-Pro beziehungsweise Xaa-Ala. Dass DPP-IV durch Inaktivierung der Inkretine GLP-1 und GIP einen Einfluss auf die Regulation des Blutzuckerspiegels ausübt, konnte eindeutig gezeigt werden [Marguet et al. 2000].

Andererseits fungiert sie als CD26 (CD = Cluster of Differentiation) auf der Membran von T₄-Helferzellen (CD4⁺-Thymozyten) stimulatorisch bei der Transduktion mitogener Signale im Rahmen der lymphozytären Aktivierung im Sinne der Differenzierung, DNA-Replikation und Proliferation [Gorrell et al. 2001]. Dieses CD26-Glykoprotein (in der sialinsäurereich glykosylierten β -Propeller-Domäne) ist identisch mit dem ADA-bindenden Protein (ADAbp) auf den T₄-Helferzellen. Es entspricht damit zugleich dem Thymocyte Activating Molecule (THAM) der Mäuse [Marguet et al. 1992].

Die Adenosin-Desaminase ihrerseits katalysiert Adenosin-Monophosphat (AMP) zu Inosin-Monophosphat (durch Desaminierung des Adenins zu Hypoxanthin) im Rahmen des Purinnukleotid-Abbaus. Bleibt dieser Schritt aus, so tritt das verbleibende AMP nach Phosphorylierung zu Adenosin-Diphosphat (ADP) in die Purinnukleotid-Biosynthese ein. ADP wird von der Ribonukleotid-Reduktase zu desoxy-Adenosin-Diphosphat reduziert. Nach einem weiteren Phosphorylierungsschritt entsteht desoxy-Adenosin-Triphosphat, das durch Kumulation die Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase im Sinne einer Produkthemmung

blockiert. In der Folge bleibt die Synthese der anderen desoxy-Nukleotide aus. Die DNA-Replikation und damit die T-Zell-Proliferation kann somit in Ermangelung an Substraten der DNA-Polymerasen nicht weiter erfolgen. Dies beschreibt die Pathogenese des vorherrschenden Typs der Severe Combined Immuno-Deficiency (SCID) [Abbas et al. 1997].

Diese zweite Funktion führt dazu, dass DPP-IV-Inhibitoren im Hinblick auf CD26 auch eine gewisse immunsuppressive Wirkung zugesprochen wird, was eine eigene pharmakologische Perspektive (beispielsweise in der Therapie der rheumatoiden Arthritis) eröffnet [Tanaka et al. 1997, Williams et al 2003].

2.3.4 Substrate der DPP-IV

Als Substrat der DPP-IV kommen allgemein Peptide in Frage, die am N-terminus pänultimal die Aminosäuren Prolin oder Alanin und somit die Struktur Xaa-Pro oder Xaa-Ala (wie im Falle des GLP-1) aufweisen. In dieser Position werden auch die Aminosäuren Hydroxyprolin, Serin, Glycin, Valin und Leucin von DPP-IV akzeptiert, wenngleich mit deutlich reduzierten Spezifitätskonstanten [Demuth und Heins 1995].

Zu den Substraten mit N-terminaler Xaa-Pro-Struktur zählen

Substrate mit hoher Katalyse-Rate:

Neuropeptid Y und
Peptid YY
[Mentlein 1999].

Substrate mit mittlerer Katalyse-Rate:

Endomorphin-2,
Enterostatin und
Substanz P
[Mentlein 1999].

Substrate mit niedriger Katalyse-Rate:

Eotaxin,
Gastrin-Releasing Peptide,
Human Chorionic Gonadotropin,
Prolactin,
RANTES (Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted),
Trypsinogenpropeptid und Trypsinogen
[Mentlein 1999].

Zu den Substraten mit N-terminaler Xaa-Ala-Struktur zählen

Substrate mit mittlerer Katalyse-Rate:

GIP,

GLP-1,

GLP-2 und

Somatoliberin (identisch mit Growth Hormone-Releasing Hormone = GHRH)

[Mentlein 1999].

Entgegen anderslautenden Veröffentlichungen [zum Beispiel Drucker 2003] ist MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit kein Substrat der DPP-IV, wie mit Hilfe der isoliert perfundierten Ratten-Leber gezeigt werden konnte [„Investigation on the elimination of MCP-1 by the isolated perfused liver of the rat“, unveröffentlichte Arbeit von Dr. Andreas Greischel, Abteilung Drug Metabolism and Pharmacokinetics der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, 2000].

2.3.5 Struktur der DPP-IV

DPP-IV stellt ein homodimeres Membranprotein dar, dessen beide identische Untereinheiten jeweils über ein unabhängiges katalytisches Zentrum verfügen.

Die membranassoziierte Form ist 110 kDa schwer und 766 (bei der Ratte 767) Aminosäuren lang, von denen 22 hydrophobe Reste der Verankerung in der Zellmembran dienen und N-terminal ein hydrophiles Hexapeptid ins Zytoplasma hineinragt. Diese Struktur zählt zum Typ II der integralen Membranproteine [Misumi et al. 1992]. Die plasmalösliche Form ist um die hydrophobe und zytoplasmatische Domäne kürzer und dementsprechend 738 Aminosäuren lang und 100 kDa schwer [Drucker 2003].

Die extrazelluläre Domäne gliedert sich weiter in ein membrannahes flexibles Segment (von AS 29 bis AS 48), eine sialinsäurereich glykosylierte Region mit β -Propeller-Domäne (von AS 49 bis AS 324), eine cysteinreiche Region (von AS 325 bis AS 552) und die C-terminale katalytische Region mit der katalytischen Triade Ser 630/631, Asp 708/709 und His 740/741 (von AS 553 bis AS 766/767) [Mentlein 1999].

Die β -Propeller-Domäne ist bei Enzymen der POP-Familie aus sieben vierfach gefalteten β -Faltblättern aufgebaut. Die quasi-rotationssymmetrische Anordnung dieser β -Faltblätter gibt der Domäne in der entsprechenden Aufsicht das Aussehen eines Propellers. Zum einen fungiert diese Struktur als restriktiver Trichter (in dessen Fokus die katalytische Ser-Asp-His-

Triade sitzt), der größere Peptide und Proteine vor endoproteolytischer Spaltung bewahrt. Zum anderen liegt hier die Bindungsstelle für ADA [Abbott et al. 1999].

Die Anordnung der katalytischen Triade (Ser-Asp-His) ist nicht-klassisch für Serin-Proteasen, nämlich umgekehrt im Vergleich zu der bei Serin-Proteasen klassischen Anordnung (His-Asp-Ser) wie beispielsweise bei Trypsin oder Chymotrypsin. Der Serinrest 630/631 ist hingegen in die Konsensussequenz für sämtliche Serinproteasen Gly-X-Ser-X-Gly (von AS 628/629 bis AS 632/633) eingebettet [David et al. 1993].

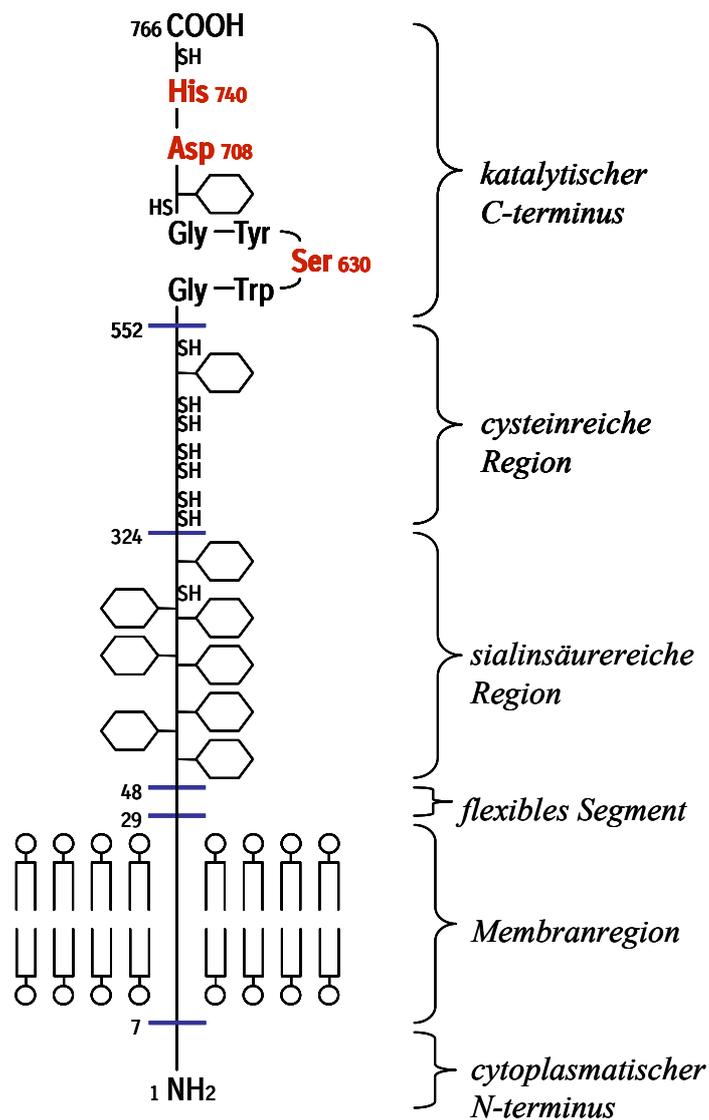


Abb. 1: Schematische (aufgefaltete) Struktur der humanen DPP-IV [Mentlein 1999]

2.3.6 Vorkommen der DPP-IV

Die DPP-IV kommt bei Säugetieren sowohl membranassoziiert als auch plasmalöslich vor. Die Expression des DPP-IV-Gens in vielen verschiedenen Körpergeweben von Mammalia konnte nachgewiesen werden, wobei oftmals der Zusammenhang mit älteren Beschreibungen hergestellt werden konnte [Mentlein 1999, Drucker 2003].

Die Häufigkeit, mit der das DPP-IV-Gen in den verschiedenen Gewebetypen exprimiert wird, weist große Unterschiede auf (gerundete Aktivitätsangaben):

Mit Abstand am häufigsten exprimiert wird das DPP-IV-Gen im Nierenkortex (auf den Podozyten und auf dem proximalen Tubulusepithel) [Kettmann et al. 1992] mit 14,2 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)/g [Labsch et al. 1981 und Yaron und Naider 1993], in der Lunge mit 3,0 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)/g [Labsch et al. 1981], im Darm (auf den jejunalen und ilealen Enterozyten) [Yaron und Naider 1993] und in der Leber (auf den Hepatozyten und auf dem Gallengangsepithel) mit jeweils 1,7 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)/g [Labsch et al. 1981], in der Parotis und in der Milz mit jeweils 1,6 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)/g [Labsch et al. 1981], im Hoden (im Seminalplasma) mit 1,4 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)/g [Küllertz et al. 1986], auf aktivierten T₄-Helfer-Lymphozyten (als CD26) [Mentlein et al. 1984] mit 0,5 (nmol/min)/10⁶ Zellen [Mentlein et al. 1991 und De Meester et al. 1992] und schließlich auf dem Kapillarendothel [Lojda 1979] mit 7 (nmol/min)/10⁶ Zellen [Mentlein 1988].

Weiterhin konnte DPP-IV-Aktivität (ohne quantifizierende Aktivitätsangaben) auf den Trophoblasten in der Plazenta [Püschel et al. 1982] und auf den Fibroblasten [Piazza et al. 1989] gezeigt werden. Zu den wenigen Gewebetypen, auf denen keine DPP-IV-Aktivität nachgewiesen werden konnte, zählen die Astroglia, die Oligodendroglia sowie die Neuronen des ZNS [Mentlein et al. 1990]. Außerdem sind die β -Zellen des endokrinen Pankreas als Träger von GLP-1-Rezeptoren frei von DPP-IV [Hupe-Sodmann et al. 1997].

Die Aktivität der freien DPP-IV im humanen Plasma wird mit 25 units/L angegeben [Lambeir et al. 2002]. Der Hauptanteil (95 %) der DPP-IV-Aktivität im Vollblut beziehungsweise im Serum wird dem von T₄-Helferzellen abgetrennten plasmalöslichen CD26 (soluble CD26 = sCD26) zugeordnet [Durinx et al. 2000].

2.4 pharmakologische Aspekte der DPP-IV-Inhibition

2.4.1 GLP-1-Anstieg

Besondere Beachtung fand die Entdeckung im Jahre 1992, dass GLP-1 einen positiven Effekt auf Patienten des Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM) ausübt, indem das Inkretin durch Aktivierung der Residualkapazität der insulinproduzierenden β -Zellen indirekt den Blutzuckerspiegel zu senken im Stande ist [Gutniak et al. 1992].

Dieser therapeutische Effekt war allerdings nur unter der rein experimentellen Bedingung einer intravenösen Dauerinfusion zu erreichen, da die Wirkung einzelner subkutaner Bolus-Injektionen von GLP-1 enttäuschend war: Nach kurzem Anstieg sank die Insulin-Konzentration im Blut sehr schnell wieder ab und der Blutzuckerspiegel stieg entsprechend an. Die Erklärung dieser kurzen Wirksamkeit ergab sich aus der Beschreibung der rasanten Inaktivierung von GLP-1 (7-36) amide beziehungsweise GLP-1 (7-37) durch das abbauende Enzym DPP-IV zu GLP-1 (9-36) amide beziehungsweise GLP-1 (9-37) [Mentlein et al. 1993]. Da auch die Ausschüttung von endogenem GLP-1 bei NIDDM-Patienten reduziert ist [Vilsbøll et al. 2001], wurden in den folgenden Jahren zwei grundsätzliche Ansätze der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 (NIDDM) im Hinblick auf den Mechanismus der entero-insularen Achse beschrieben [Drucker 2003]:

Zum einen existiert der indirekte Weg der Förderung der Inkretin-Wirkung durch Inhibition des abbauenden Enzyms [Ahrén et al. 2002].

Vorteile:

(+) orale Applikation ist möglich;
(+) kürzere Wirkung (Stunden bis Tag);
(+) ZNS-Nebenwirkungen durch GLP-1 unwahrscheinlich, weil nur die endogenen Plasma-Konzentrationen stabilisiert werden;
(+) DPP-IV-Inhibition stabilisiert auch die endogenen Plasma-Konzentrationen von GIP, deshalb wird potentiell der Synergieeffekt zwischen GIP und GLP-1 gefördert.

[Drucker 2003]

Nachteile:

(-) multiple Targets, weil mit DPP-IV ein pleiotropes Enzym inhibiert wird, deshalb ist das Sicherheitsprofil schlechter charakterisierbar;
(-) immunsuppressiver Effekt durch CD26-Hemmung ist wahrscheinlich.

[Drucker 2003]

Zum anderen existiert der direkte Weg der Applikation von GLP-1-Analoga, die selbst keine Substrate der DPP-IV darstellen (zum Beispiel Exendin-4) [Drucker 2003].

2.4.2 Alternative: Inkretin-Analoga

Vorteile:

(+) gezieltere Wirkung ist möglich, da nur ein einziges Target (GLP-1-Rezeptor) existiert, deshalb ist die biologische Wirkung präziser definiert;
(+) potentere Induktion des Sättigungsgefühls;
(+) potentere Inhibition der Magenentleerung.

[Drucker 2003]

Nachteile:

(-) Injektion ist nötig;
(-) Überdosis ist potentiell problematisch, weil GLP-1 potentiell ZNS-wirksam ist;
(-) längere Wirkung (Tage bis Wochen?).

[Drucker 2003]

Der lediglich theoretische Weg der Applikation von GIP-Analoga wurde nicht verfolgt, da GIP bei NIDDM-Patienten im Gegensatz zu GLP-1 seine insulinotrope Potenz massiv eingebüßt hat [Nauck et al. 1993 (b), Meier et al. 2001].

2.4.3 CD26-Hemmung

Auf Grund der Rolle, die CD26/ADA_{bp} in der Aktivierung von T₄-Helferzellen spielt, führt eine DPP-IV-Inhibition auch zur Hemmung der Produktion von Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-4 (IL-4) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [Reinhold et al. 1998]. Auf der Grundlage dieser Kenntnis wird eine zentrale Rolle der DPP-IV/CD26/ADA_{bp} in der Regulation von autoimmunen Erkrankungen diskutiert, was eine mögliche therapeutische Perspektive für Immunopathien wie die rheumatoide Arthritis darstellt [Tanaka et al. 1997, Williams et al. 2003].

2.4.4 GLP-2-Anstieg

Das pharmakologische Potential der reduzierten GLP-2-Degradation in der Therapie von Enteropathien im Sinne einer beschleunigten Erholung der intestinalen Mucosa auf Grund der Steigerung der Proliferation einerseits sowie der Blockade der Apoptosis der Darmepithelzellen andererseits ist eine weitere Perspektive der DPP-IV-Inhibition, die allerdings zum gegenwärtigen Zeitpunkt im Schatten der möglichen Diabetestherapie steht. Dieser Effekt auf die Darmschleimhaut bedeutet allerdings zugleich auch eine Steigerung der Resorptionskapazität, was möglicherweise die antidiabetische Wirkung beeinträchtigen könnte [Drucker et al. 1996, Lambeir et al. 2002].

2.5 Eliminationskinetik von GLP-1

2.5.1 Halbwertszeit bei in-vitro-Versuchsmodellen

Mit radioaktivem Jod-125 markiertes GLP-1 (7-36 amide) in einer ursprünglichen Konzentration von etwa 50 nmol/L in 20 %-igem, in vitro bei +37 °Celsius inkubiertem Wistar-Ratten-Serum wies in der Messung durch HPLC eine Halbwertszeit von 1,7 Stunden auf, eine Zeitspanne, die sich unter der Wirkung des DPP-IV-Hemmstoffes Diprotin-A in einer Konzentration von 0,1 mmol/L auf 15 Stunden verlängerte [Kieffer et al. 1995].

In unverdünntem, in vitro bei +37 °Celsius inkubiertem Human-Plasma war die Halbwertszeit der ursprünglich 0,4 nanomolaren Glycin-Isoform ohne DPP-IV-Hemmung im Sandwich-ELISA mit 32 ± 3 Minuten um etwa ein Viertel kürzer als diejenige der ursprünglich 0,4 nanomolaren Amid-Isoform mit 42 ± 2 Minuten ($p = 0,007$). Die Halbwertszeiten beider Isoformen waren damit immer noch deutlich länger als die in vivo gemessenen Halbwertszeiten. Ein Unterschied in dieser Größenordnung blieb auch unter DPP-IV-Inhibition mittels Diprotin-A in einer Konzentration von 0,1 mmol/L bestehen, nämlich 81 ± 11 Minuten Halbwertszeit bei GLP-1 (7-37) und 130 ± 11 Minuten bei GLP-1 (7-36 amide) ($p = 0,004$) [Wettergren et al. 1998].

GLP-1 (7-36 amide) in einer ursprünglichen Konzentration von 12 $\mu\text{mol/L}$ in 20 %-igem, in vitro bei +30 °Celsius inkubiertem Human-Serum wies in der Messung durch Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight – Mass Spectrometry (MALDI–TOF–MS) eine Halbwertszeit von $49,8 \pm 3,3$ Minuten auf, eine Zeitspanne, die sich in Anwesenheit von 1,0 millimolarem Metformin, einem potentiellen DPP-IV-Inhibitor, nicht signifikant auf $53,5 \pm 3,3$ Minuten verlängerte ($p > 0,05$) [Hinke et al. 2002].

2.5.2 in-vivo-Versuchsmodelle

2.5.2.1 Mensch

Bei sechs nüchternen jungen Erwachsenen (vier Männer, zwei Frauen) wurden intravenöse Infusionen mit beiden GLP-1-Isoformen in einer Konzentration von 1,5 (pmol/kg)/min in die V. antecubitalis ohne parallele DPP-IV-Hemmung unternommen. Die Blutprobenentnahmen erfolgten an der kontralateralen V. antecubitalis. Nach einer 20-minütigen Basalphase wurde über eine Zeitspanne von 60 Minuten eine der beiden GLP-1-Isoformen kontinuierlich infundiert. Zwischen den Applikationen der GLP-1-Isoformen lag bei jedem Probanden ein Zeitabstand von mindestens einer Woche. Die GLP-1-Plasmaspiegel wurden mittels RIA während und noch zwei Stunden nach Absetzen der Infusion überprüft. Die resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel befanden sich im Bereich von 100 bis 200 pmol/L [Ørskov et al. 1993].

Halbwertszeit

Die Halbwertszeit der Amid-Isoform wich mit $5,3 \pm 0,4$ Minuten nicht signifikant von derjenigen der Glycin-Isoform mit $6,1 \pm 0,8$ Minuten ($p > 0,05$) ab [Ørskov et al. 1993].

Clearance

Die Clearance der Amid-Isoform wich mit $14,6 \pm 2,4$ (mL/min)/kg nicht signifikant von derjenigen der Glycin-Isoform mit $12,2 \pm 1,0$ (mL/min)/kg ($p > 0,05$) ab [Ørskov et al. 1993].

2.5.2.2 Ratte

Bei sechs Wistar-Rattenböcken wurden kontinuierliche intravenöse Infusionen einer GLP-1-(7-37)-Lösung in einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ mit einer Infusionsrate von 0,5 nmol/min über einen Zeitraum von 60 Minuten in die V. femoralis ohne parallele DPP-IV-Hemmung unternommen. Die Blutprobenentnahmen erfolgten an der katheterisierten V. jugularis. Die Plasma-Konzentration an GLP-1 (7-37) wurde mittels RIA während und noch 16 Minuten nach Absetzen der Infusion überprüft. Die resultierenden Plasmaspiegel an GLP-1 (7-37) beliefen sich auf etwa 100 nmol/L [Oshima et al. 1988].

In einem anderen Versuch am Rattenmodell wurde die Verteilung von mit radioaktivem Jod-125 markiertem GLP-1 (7-36 amide) nach intravenöser Bolus-Injektion mit Hilfe einer Gammakamera verfolgt [Hassan et al. 1999].

Halbwertszeit

Die kontinuierliche Infusion in die V. femoralis ergab eine Halbwertszeit nach Absetzen der GLP-1-(7-37)-Lösung von $39,5 \pm 15,5$ Minuten [Oshima et al. 1988].

Die mittels Gammakamera ermittelte Halbwertszeit des radioaktiv markierten GLP-1 (7-36 amide) wurde mit $3,3 \pm 0,6$ Minuten beziffert [Hassan et al. 1999].

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Die Clearance von GLP-1 (7-37) unter kontinuierliche Infusion in die V. femoralis wurde mit $18,6 \pm 8,6$ (mL/min)/kg und das scheinbare Verteilungsvolumen im Steady-State mit $516,3 \pm 92,1$ mL/kg beziffert [Oshima et al. 1988].

Die Clearance von Jod-125-markiertem GLP-1 (7-36 amide) nach Bolus-Injektion wurde mit 117 ± 15 (mL/min)/kg und das scheinbare Verteilungsvolumen im Steady-State mit 557 ± 61 mL/kg beziffert [Hassan et al. 1999].

2.5.2.3 Hund

Bei vier Hunden der Rasse Beagle wurden intravenöse Infusionen mit beiden GLP-1-Isoformen in einer Konzentration von 50 µg/kg (15 nmol/kg) innerhalb von zwei Minuten in die V. cephalica ohne parallele DPP-IV-Hemmung unternommen. Die Plasma-Konzentration an GLP-1 wurde mittels Sandwich-ELISA während und nach Absetzen der Infusion zum Zwecke der Charakterisierung der kinetischen Parameter überprüft. Die resultierenden GLP-1-Plasma-Konzentrationen beliefen sich auf einen Bereich zwischen 100 und 200 nmol/L [Pridal et al. 1996].

Halbwertszeiten und mittlere Verweildauer

Die initiale Halbwertszeit betrug bei der Amid-Isoform $2,1 \pm 0,1$ Minuten und bei der Glycin-Isoform $2,4 \pm 0,3$ Minuten. Die terminale Halbwertszeit betrug bei der Amid-Isoform 68 ± 6 Minuten und bei der Glycin-Isoform 81 ± 3 Minuten. Für die mittlere Verweildauer der Amid-Isoform wurde ein Wert von $6,2 \pm 0,3$ Minuten ermittelt und für diejenige der Glycin-Isoform ein Wert von 36 ± 5 Minuten [Pridal et al. 1996].

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Für die Amid-Form von GLP-1 wurde die totale Plasma-Clearance mit 25 ± 3 (mL/min)/kg und das scheinbare Verteilungsvolumen im Steady-State mit 160 ± 20 mL/kg beziffert. Für die Glycin-Isoform bezifferte sich die totale Plasma-Clearance auf 22 ± 4 (mL/min)/kg und das scheinbare Verteilungsvolumen im Steady-State auf 840 ± 240 mL/kg [Pridal et al. 1996].

2.5.2.4 Schwein

Bei sieben nüchternen mit Halothan anästhesierten Schweinen wurden intravenöse Dauerinfusionen von GLP-1 (7-36 amide) mit einer konstanten Infusionsrate von $4,95 \pm 0,21$ (pmol/kg)/min in die linke V. auricularis medialis ohne parallele DPP-IV-Hemmung durchgeführt. Die Blutprobenentnahmen erfolgten an der katheterisierten rechten A. carotis communis und an der katheterisierten rechten V. jugularis interna. Nach einer 5-minütigen Basalphase wurde über eine Zeitspanne von 30 Minuten die GLP-1-(7-36 amide)-Lösung kontinuierlich infundiert. Die Plasma-Konzentration an GLP-1 wurde sowohl mittels RIA als auch mittels ELISA während und noch 30 Minuten nach Absetzen der Infusion überprüft. Die resultierenden Plasmaspiegel an GLP-1 (7-36 amide) beliefen sich auf einen Bereich zwischen 300 und 400 pmol/L (RIA) beziehungsweise auf einen Bereich zwischen 50 und 100 pmol/L (ELISA) [Deacon et al. 1996 (a)].

Durch Parallelinfusion einer Lösung des spezifischen Enzyminhibitors Diprotin-A mit einer Infusionsrate von 720 ± 55 (nmol/kg)/min wurde eine Steigerung des GLP-1-Plasmaspiegels im Fließgleichgewicht um den Faktor 2,6 erreicht, nämlich von $19,5 \pm 4,4$ % auf $51,1 \pm 9,4$ % Anteil des intaktiven Peptids an der gesamten Immunoreaktivität im RIA ($p < 0,01$) [Deacon et al. 1996 (b)].

Halbwertszeit

Die Halbwertszeit von GLP-1 (7-36 amide) ohne parallele DPP-IV-Hemmung wurde auf $1,5 \pm 0,4$ Minuten beziffert [Deacon et al. 1996 (a)]. Unter DPP-IV-Hemmung durch Diprotin A konnte überraschenderweise mit dem gewählten Versuchsdesign keine signifikante Verlängerung der Halbwertszeit festgestellt werden ($1,9 \pm 0,5$ Minuten) ($p > 0,05$) [Deacon et al. 1996 (b)].

Clearance

Die Ganzkörper-Clearance von GLP-1 (7-36 amide) ohne parallele DPP-IV-Hemmung wurde auf einen Wert von $106,8 \pm 14,7$ (mL/min)/kg beziffert [Deacon et al. 1996 (a)]. Unter DPP-IV-Hemmung durch Diprotin-A sank die Clearance auf $36,7 \pm 10,3$ (mL/min)/kg [Deacon et al. 1996 (b)].

2.5.3 Zusammenfassung der GLP-1-Kinetik

Eine Übersicht über die in der oben zitierten Literatur genannten, in-vitro-gewonnenen Daten der kinetischen Parameter von GLP-1 (ohne und mit paralleler DPP-IV-Hemmung) gibt die folgende Tabelle:

<u>GLP-1-Isoform</u>	<u>t1/2 [min] (DPP-IV-positiv)</u>	<u>t1/2 [min] (DPP-IV-negativ)</u>
Amid	102	900
Glycin	32 ± 3	81 ± 11
Amid	42 ± 2	130 ± 11
Amid	49,8 ± 3,3	53,5 ± 3,3

Zusammenfassend lässt sich zu den in-vitro-gewonnenen Daten sagen, dass sowohl die Größenordnung der Halbwertszeit (zwischen 30 und 100 Minuten) als auch das Ausmaß der durch DPP-IV-Hemmung erreichten Halbwertszeit-Verlängerung (zwischen dem Faktor 9 und dem Faktor 1) stark divergieren – offensichtlich in Abhängigkeit vom gewählten Versuchsdesign.

Eine Übersicht über die in der oben zitierten Literatur genannten, in-vivo-gewonnenen Daten der kinetischen Parameter von GLP-1 (ohne parallele DPP-IV-Hemmung) gibt die folgende Tabelle:

<u>Spezies (Isoform)</u>	<u>t1/2 [min]</u>	<u>CL [(mL/min)/kg]</u>
Mensch (Amid)	5,3 ± 0,4	14,6 ± 2,4
Mensch (Glycin)	6,1 ± 0,8	12,2 ± 1,0
Hund (Amid)	2,1 ± 0,1	25 ± 3
Hund (Glycin)	2,4 ± 0,3	22 ± 4
Ratte (Amid)	3,3 ± 0,6	117 ± 15
Ratte (Glycin)	39,5 ± 15,5	18,6 ± 8,6
Schwein (Amid)	1,5 ± 0,4	106,8 ± 14,7

Die kinetischen Parameter von GLP-1 unter gleichzeitiger DPP-IV-Hemmung beim Schwein:

<u>Spezies (Isoform)</u>	<u>t_{1/2} [min]</u>	<u>CL [(mL/min)/kg]</u>
Schwein (Amid)	1,9 ± 0,5	36,7 ± 10,3

Zusammenfassend lässt sich zu den bei verschiedenen Säugerspezies in-vivo-gewonnenen Daten sagen, dass zum einen die Halbwertszeit speziesunabhängig weitaus konsistenter ausfällt (von der Halbwertszeit der Glycin-Isoform bei der Ratte [Oshima et al. 1988] abgesehen im arithmetischen Mittel $3,5 \pm 1,9$ Minuten) als bei den in-vitro-gewonnenen Daten, zum anderen die Clearance-Werte (scheinbar unabhängig von der Halbwertszeit) in zwei Gruppen zerfallen (Werte um 18 ± 5 [Oshima et al. 1988, Ørskov et al. 1993, Pridal et al. 1996] und Werte um 112 ± 7 [Deacon et al. 1996 (a), Hassan et al. 1999]) und zum dritten die nicht-signifikante Verlängerung der Halbwertszeit unter DPP-IV-Hemmung mit einer signifikanten Absenkung der totalen Clearance einhergeht [Deacon et al. 1996 (b)].

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere

3.1.1 Tierstamm

Es wurden ausschließlich Rattenböcke des Stammes CrlGlxBrlHan:Wist verwendet. Die Bezeichnung dieses Auszuchtstammes (durch den Doppelpunkt als solcher charakterisiert) folgt den Konventionen des *Rat Genome and Nomenclature Committee* und spiegelt die Zuchthistorie wider:

Der englische Biologe Henry Donaldson brachte im Jahre 1906 einige Albinoratten von Europa zum Wistar-Institut nach Philadelphia, Pennsylvania, USA. Bei diesen Ratten handelte es sich um domestizierte Wanderratten (*Rattus norvegicus*) mit homozygoter autosomal-rezessiver Defektallele der Melaninsynthese, die die Ausgangsbasis des Wistar-Albino-Stammes (Wist) darstellten. Im Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover (Han) wurden 1958 aus einer Wistar-Auszuchtpopulation selektiv besonders kleinwüchsige Ratten zur weiteren Zucht verwendet, um eine etwas kleinere Auszuchtrate zu etablieren. Tiere dieses Auszuchtstammes kamen im Verlauf der Jahre von 1989 bis 1997 über die schweizerischen Biological Research Laboratories (Brl) und die englische GlaxoWellcome (Glx) zum jetzigen Züchter Charles River Laboratories (Crl), Sulzfeld [persönliche Mitteilung von Jutta Davidson, Technical Manager bei Charles River Deutschland].

3.1.2 Physiologie

Auf das Einhalten der physiologischen Funktionsdaten der Ratten in Narkose wurde durch entsprechendes Monitoring geachtet: physiologische Atemfrequenz zwischen 60 und 100 pro Minute, physiologische Pulsfrequenz zwischen 250 und 400 pro Minute und physiologische Körpertemperatur zwischen 37,0 und 39,5 °Celsius (in der Tagesphase durchschnittlich 37,2 °Celsius und in der nächtlichen Plateauphase durchschnittlich 38,1 °Celsius) [Scales und Kluger 1987].

Die Körpermasse der verwendeten Ratten lag zwischen 200 und 400 g. Durch die direkte Korrelation von Körpermasse und Alter bei der Ratte entspricht dies einer Altersspanne zwischen 7 und 14 Wochen.

3.1.3 Tierversuchsgenehmigung

Die Genehmigungen für die Steady-State-Infusionsversuche wurde im Rahmen des Versuchsvorhabens Nummer 00-014 (Tierversuche unter Betäubung ohne Wiedererwachen) beantragt. Die Genehmigung für die isoliert perfundierte Ratten-Leber wurde im Rahmen des Versuchsvorhabens Nummer 02-004 (Organentnahme ohne Vorbehandlung) beantragt. Die Genehmigung für beide Tierversuchsanträge wurde vom zuständigen Regierungspräsidium in Tübingen unter dem Aktenzeichen 35/9185.81-8 erteilt.

3.1.4 Tierschutz

Die Narkose wurde nach den Kriterien des Kapitels „Anästhesie beim Versuchstier“ im *Handbuch über Möglichkeiten und Methoden zur Verbesserung, Verminderung und Vermeidung von Tierversuchen* durchgeführt [Erhardt et al. 1994], die Durchführung der Versuche und die abschließende Tötung orientierten sich an den ethischen Standards des Institute of Laboratory Animal Resources, wie sie in den Kapiteln „Surgery“ und „Euthanasia“ des *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* erläutert werden [Institute of Laboratory Animal Resources 1996].

Um bei den Infusionsversuchen Schädwirkungen durch Hypervolämie auszuschließen, wurde das Maximum der intravenös infundierten Volumina ($34,4 \text{ [mL/kg]/h}$ GLP-1-Lösung + $13,2 \text{ [mL/kg]/h}$ Inhibitorlösung = $47,6 \text{ [mL/kg]/h}$) so gewählt, dass diese deutlich unterhalb der Grenze von 60 (mL/kg)/h lagen, jenseits welcher bei Ratten erstmals pulmonäre Läsionen histologisch nachweisbar sind [Morton et al. 1997].

3.2 Material

3.2.1 DPP-IV-Inhibitoren

LINCO-DPP-IV-Inhibitor

(Catalog # DPP4) = nicht näher spezifizierter DPP-IV-Hemmstoff für die Stabilisierung der Proben für den GLP-1-ELISA-Kit von LINCO Research Inc., St. Charles, Missouri, USA.

BI-β

Molekulargewicht: 471,6 g/mol;

Inhibitionsmechanismus: kompetitive Hemmung;

Ki (Inhibitionskonstante) = 2,3 nmol/L und Km (Michaelis-Konstante) = 14,1 nmol/L [errechnet nach der Gleichung $K_i = IC_{50}/(1+[Substrat]/K_m)$ aus empirisch gewonnenen IC_{50} -Daten von Dr. Mohammad Tadayyon, Abteilung Stoffwechselforschung der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG];

Plasma-Protein-Bindung (Ratte) = 92 % und Bindung an bovines Serumalbumin = 35 % [unveröffentlichte Daten der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG];

Totale Clearance (Ratte bei einer Dosis von 1 mg/kg) = 13 ± 4 (mL/min)/kg und terminale Halbwertszeit (Ratte bei einer Dosis von 1 mg/kg) = $2,5 \pm 0,1$ h [unveröffentlichte Daten der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG].

3.2.2 DPP-IV-Substrate

GLP-1 (7-37)

Glucagon-Like Peptide 1, Fragment 7-37 human (Katalognummer G-9416), SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen

Molekulargewicht: 3.355,7 g/mol.

GLP-1 (7-36 amide)

Glucagon-Like Peptide 1, Fragment 7-36 amide human (Katalognummer G-8147), SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen

Molekulargewicht: 3.297,7 g/mol;

Km (GLP-1) = 4,5 $\mu\text{mol/L}$ [Mentlein et al. 1993];

Die Wiederfindungsrate im EIA beträgt nach einmaligem Einfrieren auf -80 °Celsius 97,5 % und nach zweimaligem Einfrieren auf -80 °Celsius 97,1 % [Brunn et al. 1999].

3.2.3 Test-Kits

GLP-1-ELISA-Kit

Glucagon-Like Peptide-1 (active) ELISA Kit, 96-Well Plate (Catalog # EGLP-35K), LINCO Research Inc., St. Charles, Missouri, USA.

Glukose-Test-Kit

Granutest® 250 Glucose (Katalognummer 1.12194.0001), Diagnostica Merck KG, Darmstadt

3.2.4 Perfusoren und Peristaltik-Pumpe

Macro-Perfusor (mL/h)

„PILOT-Anästhesie“, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Micro-Perfusor ($\mu\text{L/min}$)

„CMA 100 Microinjection Pump“, CMA Microdialysis, Solna, Schweden

Peristaltik-Pumpe

„REGLO-Digital“, Type MS-4/8-100, ISMATEC 834, 4 Kanäle, 8 Rollen, Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugstetten. Die Peristaltik-Pumpe förderte jeweils 30 mL/min in jedem von zwei Siliconschläuchen („Tygon-R-3607“, 3,17 mm ID, Wandstärke 0,86 mm, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld), zusammen also 60 mL/min, die durch ein Y-Stück in einen Schlauch zusammengeführt wurden.

3.2.5 Hardware und Software für die Photometrie

Fluoreszenz-Photometer (Umbelliferon-Messung)

„Spectra-MAX-Gemini-XS“, Molecular Devices GmbH, Ismaning/München

Fluoreszenz-Photometer-Software (Umbelliferon-Messung)

SOFTmaxPRO, Version 3.1.2, Molecular Devices GmbH, Ismaning/München

Licht-Photometer (NADH-Messung)

„Spectra-MAX-Plus“, Molecular Devices GmbH, Ismaning/München

Licht-Photometer-Software (NADH-Messung)

SOFTmaxPRO, Version 3.0, Molecular Devices GmbH, Ismaning/München

3.2.6 Waage und Zentrifuge

Analysen-Semimikrowaage

„AT-261-DeltaRange“, Mettler-Toledo GmbH, Gießen

gekühlte Tischzentrifuge

„Centrifuge 5417 R“, Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

3.2.7 Thermostat und Wasserbad

LAUDA-Thermostat

Type K2, Messgeräte-Werk LAUDA, Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

Schüttel-Wasserbad

„GFL 1083“, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Bergwedel

3.2.8 Perfusionsmedium

Als Perfusat dienten 80 mL eines erweiterten Krebs-Henseleit-Puffers:

<u>Substanz:</u>	<u>Konzentration der Ausgangslösung:</u> [mmol/L]	<u>Anteil an der Gesamtlösung:</u> [%]	<u>Konzentration in der Gesamtlösung:</u> [mmol/L]
NaCl	154,0	76,9	118,4
KCl	154,0	3,1	4,8
CaCl ₂	110,0	2,3	2,5
KH ₂ PO ₄	154,0	0,8	1,2
MgSO ₄	154,0	0,8	1,2
NaHCO ₃	154,0	16,1	24,8

Die Salze Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Magnesiumsulfat (alle in der Qualität „pro analysi“) sowie das Salz Kaliumhydrogenphosphat (in der Qualität „purissimum“) waren von Merck KGaA, Darmstadt, das Salz Natriumhydrogencarbonat (in der Qualität „purissimum“) und das Salz Calciumchlorid (in der Qualität „purum“) waren von Riedel-de Haën, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze.

Dieses Puffer-System wurde durch Zugabe von Glukose – auf eine Endkonzentration von 12 mmol/L (physiologische Glukose-Konzentration im Serum bei 2 bis 5 Monate alten Rattenböcken: $10,2 \pm 1,2$ mmol/L [Loeb 1999]) – und von bovinem Serumalbumin – auf eine Endkonzentration von 2 % w/v (physiologische Albumin-Konzentration im Plasma bei Rattenböcken: $3,3 \pm 0,2$ % w/v [laut GALAS]) – zum Perfusionsmedium erweitert. Dieses Perfusionsmedium wurde nun noch durch Titration mit 1-normaler HCl-Lösung auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 gebracht und somit schließlich zum gebrauchsfertigen (nativen) Perfusat vervollständigt.

3.2.9 Pharmakokinetik-Software

TOPFIT, Version 2.0, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis System for the PC, Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach/Riss, Schering AG, Berlin, Gödecke AG, Freiburg/Breisgau zur computergestützten Dosis-Findung für BI- β durch kompartmentelle Auswertung.

3.3 Methode

3.3.1 in-vivo-Infusionsversuche (Glycin-Isoform im Steady-State)

3.3.1.1 Tiere

Zur Anwendung kamen insgesamt 43 Rattenböcke der Gewichtsklasse von 200 bis 400 g KM für die Versuche mit der Glycin-Isoform von GLP-1 (zwischen vier und sieben Ratten pro DPP-IV-Hemmungsgrad). Alle Ratten hatten bei Versuchsbeginn 10 ± 2 Stunden gefastet. Jede Ratte wurde zur exakten Dosierung von Narcotica und Infusionsrate gewogen.

3.3.1.2 Narkose

Die Narkose wurde mit dem Narcoticum Thiobutabarbital („Inactin“ 5 %-ige Lösung, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen) 100 mg/kg i.p. angeflutet, nach Wirkeintritt mit dem Anästheticum Ketamin („Ketamin 5 %“, Bela-Pharm GmbH & Co. KG, Vechta) 60 mg/kg i.p. stabilisiert und zur Vermeidung einer Hypersalivation das Anticholinergicum Atropin („Atropinum sulfuricum solutum 1 %“, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen) 0,1 mg/kg i.m. appliziert.

Der Eintritt in die zweite Stufe des chirurgischen Toleranzstadiums (III/2) wurde beurteilt an Hand der Kriterien einer spezifisch auf die Ratte bezogenen Abwandlung des allgemeinen Schemas der Narkosestadien nach Guedel [Erhardt et al. 1994]:

Stadium I (Analgesiestadium):

Ratte weckbar,
alle Reflexe = positiv.

Stadium II (Exzitationsstadium):

Ratte nicht weckbar,
allgemeine Hyperreflexie,
Pupillen mydriatisch,
forcierte Atmung,
Muskulatur hypertonisch.

Stadium III (Toleranzstadium)

Stufe 1 (III/1): Stellreflex = negativ,
alle übrigen Reflexe = (verzögert) positiv,
Pupillen miotisch (wenn nicht atropinisiert),
geringgradiger Exophthalmus,
costo-abdominale Atmung.

*Stufe 2 (III/2): Stellreflex, Palpebralreflex
und Interdigitalreflex = negativ,
alle übrigen Reflexe = (verzögert) positiv,
Pupillen miotisch (wenn nicht atropinisiert),
mittelgradiger Exophthalmus,
(costo-)abdominale Atmung,
Muskulatur relaxiert.*

Stufe 3 (III/3): Cornealreflex = (verzögert) positiv,
alle übrigen Reflexe = negativ,
Pupillen mydriatisch,
hochgradiger Exophthalmus,
abdominal forcierte Atmung.

Stadium IV (Asphyxiestadium):

alle Reflexe = negativ,
Asphyxie oder Schnappatmung,
Pupillen hochgradig mydriatisch.

Zusätzlich wurde die Sauerstoffsättigung des Blutes über die Färbung der sichtbaren Schleimhäute abgeschätzt. Zur Vermeidung einer narkosebedingten Hypothermie waren die Tiere während der Versuche auf einer elektrischen Wärmematte gelagert, und ihre Körpertemperatur wurde durch rektale Messung kontrolliert (Mini-Thermometer mit Temperaturfühler im Sondenrohr 30 mm × 2,2 mm, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg).

3.3.1.3 Zugänge

Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums (III/2) wurde die äußere Haut der Kehlgangsregion auf einer Strecke von 2 cm zwischen den Processus angulares mandibulae und dem Manubrium sterni eröffnet und das Platysma colli (der M. cutaneus colli auf der äußeren Rumpffaszie) zwischen den beiden prominenten Glandulae mandibulares und den Mm. sternohyoidei et sternothyroidei bis auf die ventrale Oberfläche der Trachea stumpf getrennt. Etwa drei Knorpelspangen caudal der Glandula thyroidea wurde die Trachea mit einer Mikro-Schere transversal zwischen zwei Knorpelspangen eingeschnitten, um einen 30 mm langen Trachealtubus (Polyethylen-Katheter von Portex Ltd., Hythe, Kent, UK, 1,40 mm ID und 1,90 mm OD) 10 mm tief in Richtung auf die Bifurkation einzuführen.

Die linke A. carotis communis wurde unter der prominenten Gl. mandibularis zwischen den vereinigten Bäuchen der Mm. sternohyoideus et sternothyroideus (medial), dem M. longus colli (dorsal) und dem M. sternomastoideus (lateral) durch sagittales Spreizen einer feinen anatomischen Pinzette freigelegt. Ebenfalls durch vorsichtigen Pinzetteneinsatz wurde die A. carotis communis vom Truncus vagosympathicus getrennt, um diesen nicht durch Einbinden in die Ligaturen zu irritieren. Nach Anlegen einer rostralen Ligatur und nach Setzen eines atraumatischen Gefäß-Clips 10 mm caudal davon wurde das Gefäß mit einer Mikro-Schere eröffnet. Nach Einfädung von 5 mm des insgesamt 20 cm langen, am anderen Ende auf eine 25-Gauge-Kanüle geschobenen arteriellen Katheters (Polyethylen-Katheter von Portex Ltd., Hythe, Kent, UK, 0,40 mm ID und 0,80 mm OD, etwa 60 µL vorgelegtes Volumen) wurde dieser in eine Ligatur eingebunden und der Gefäß-Clip entfernt.

Ebenso wurden die beiden Vv. jugulares externae, die unmittelbar unter dem Platysma colli zwischen den Mm. sternomastoidei (medial) und den Mm. brachiocephalici (dorsolateral) oberflächlich aufliegen, mit jeweils einem insgesamt 40 cm langen, am anderen Ende auf eine 27-Gauge-Kanüle geschobenen venösen Katheter (Polyethylen-Katheter von Portex Ltd., Hythe, Kent, UK, 0,28 mm ID und 0,61 mm OD, jeweils etwa 110 µL vorgelegtes Volumen) auf einer Länge von 5 mm kanüliert [Olds 1984, Komárek 2000, Remie 2000].

Auf diese Weise wurden bei den Tieren, denen parallel die Substrat- und die Hemmstofflösung infundiert wurde, insgesamt drei Zugänge gelegt. Die anderen Tiere hatten neben dem arteriellen nur einen venösen Zugang und somit insgesamt nur zwei Gefäßkatheter.

3.3.1.4 isolierte Infusion der Substrat-Lösung

Bei den Versuchen ohne parallele Infusion der Hemmstoff-Lösung wurde vor Beginn der Infusion 15 Minuten lang (bis $t_3 = 15$ min) nur auf die Stabilität der Narkose geachtet und dabei die Blutproben für die Messung der Basisspiegel gewonnen.

Zum Zeitpunkt $t_3 = 15$ min wurde dann am venösen Zugang eine Substrat-Lösung der Konzentration 5 nmol/L mit einer Infusionsleistung des Perfusors „PILOT-Anästhesie“ von 2,4 (mL/h)/kg angelegt; von $t_3 = 15$ min bis $t_6 = 75$ min wurden somit 12 (pmol/h)/kg Substrat appliziert.

Zum Zeitpunkt $t_6 = 75$ min wurde die Infusionsleistung auf 8,0 (mL/h)/kg gesteigert, das heißt, von $t_6 = 75$ min bis $t_9 = 135$ min wurden somit 40 (pmol/h)/kg Substrat appliziert.

Zum Zeitpunkt $t_9 = 135$ min wurde die Infusionsleistung auf 24,0 (mL/h)/kg gesteigert, das heißt, von $t_9 = 135$ min bis $t_{12} = 195$ min wurden somit 120 (pmol/h)/kg Substrat appliziert.

Zum Zeitpunkt $t_{12} = 195$ min wurde jegliche Infusion der Substrat-Lösung gestoppt.

3.3.1.5 Parallelinfusion der Substrat-Lösung

Bei den Versuchen unter paralleler Infusion der Hemmstoff-Lösung wurde 60 Minuten (bis $t_3 = 60$ min) nur auf die Stabilität der Narkose geachtet und dabei der DPP-IV-Hemmstoff infundiert, ohne zusätzliche Applikation des Substrats.

Zum Zeitpunkt $t_3 = 60$ min wurde dann am zweiten venösen Zugang eine Substrat-Lösung der Konzentration 5 nmol/L mit einer Infusionsleistung des Perfusors „PILOT-Anästhesie“ von 2,4 (mL/h)/kg angelegt; von $t_3 = 60$ min bis $t_6 = 120$ min wurden somit 12 (pmol/h)/kg Substrat appliziert.

Zum Zeitpunkt $t_6 = 120$ min wurde die Infusionsleistung auf 8,0 (mL/h)/kg gesteigert, das heißt, von $t_6 = 120$ min bis $t_9 = 180$ min wurden somit 40 (pmol/h)/kg Substrat appliziert.

Zum Zeitpunkt $t_9 = 180$ min wurde die Infusionsleistung auf 24,0 (mL/h)/kg gesteigert, das heißt, von $t_9 = 180$ min bis $t_{12} = 240$ min wurden somit 120 (pmol/h)/kg Substrat appliziert.

Zum Zeitpunkt $t_{12} = 240$ min wurde jegliche Infusion der Substrat-Lösung gestoppt.

3.3.1.6 Parallelinfusion der Hemmstoff-Lösung

Zum Zeitpunkt t_0 wurde jedem Tier an einem venösen Zugang eine Inhibitor-Lösung der Konzentration 2,12 mmol/L in einer niedrigen Dosis von 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ (das sind 141 $\mu\text{L/kg}$) oder in einer mittleren Dosis von 1 $\mu\text{mol/kg}$ (das sind 472 $\mu\text{L/kg}$) oder in einer hohen Dosis von 3 $\mu\text{mol/kg}$ (das sind 1.415 $\mu\text{L/kg}$) als Bolus appliziert.

Daran unmittelbar anschließend wurde über denselben venösen Zugang die gleiche Inhibitor-Lösung der Konzentration 2,12 mmol/L wiederum in einer niedrigen Dosis von 0,6 ($\mu\text{mol/h}$)/kg (das sind 283 [$\mu\text{L/h}$]/kg) oder in einer mittleren Dosis von 2 ($\mu\text{mol/h}$)/kg (das sind 943 [$\mu\text{L/h}$]/kg) oder in einer hohen Dosis von 6 ($\mu\text{mol/h}$)/kg (das sind 2.829 [$\mu\text{L/h}$]/kg) als Dauerinfusion mittels des Perfusors „CMA 100 Microinjection Pump“ bis Versuchsende ($t_{\text{end}} = 249 \text{ min}$) angelegt. Später wurde dieses Schema um niedrigere Hemmstoff-Dosen erweitert.

3.3.1.7 Blutproben

Bei den Versuchen ohne parallele Infusion der Hemmstoff-Lösung wurden die Blutproben eines Einzelvolumens von 250 μL zu folgenden Zeitpunkten aus der A. carotis zur Substrat- und zur Blutzucker-Bestimmung entnommen:

1. zum Zeitpunkt t_1 = 1 min (0,017 h),
2. zum Zeitpunkt t_2 = 10 min (0,167 h),
3. zum Zeitpunkt t_4 = 65 min (1,083 h),
4. zum Zeitpunkt t_5 = 74 min (1,233 h),
5. zum Zeitpunkt t_7 = 125 min (2,083 h),
6. zum Zeitpunkt t_8 = 134 min (2,233 h),
7. zum Zeitpunkt t_{10} = 185 min (3,083 h),
8. zum Zeitpunkt t_{11} = 194 min (3,233 h),
9. zum Zeitpunkt t_{13} = 196 min (3,267 h) und
10. zum Zeitpunkt t_{14} = 205 min (3,417 h) = t_{end} .

Bei den Versuchen mit paralleler Infusion der Hemmstoff-Lösung wurden die Blutproben eines Einzelvolumens von 250 μL zu folgenden Zeitpunkten aus der A. carotis zur Substrat- und Blutzucker-Bestimmung entnommen:

1. zum Zeitpunkt t_1 = 50 min (0,833 h),
2. zum Zeitpunkt t_2 = 59 min (0,983 h),
3. zum Zeitpunkt t_4 = 110 min (1,833 h),
4. zum Zeitpunkt t_5 = 119 min (1,983 h),
5. zum Zeitpunkt t_7 = 170 min (2,833 h),
6. zum Zeitpunkt t_8 = 179 min (2,983 h),
7. zum Zeitpunkt t_{10} = 230 min (3,833 h),
8. zum Zeitpunkt t_{11} = 239 min (3,983 h),
9. zum Zeitpunkt t_{13} = 241 min (4,017 h) und
10. zum Zeitpunkt t_{14} = 249 min (4,150 h) = t_{end} .

Bei den Versuchen mit paralleler Infusion der Hemmstofflösung wurden zusätzlich die Blutproben eines Einzelvolumens von 110 μL zu folgenden Zeitpunkten aus der A. carotis zur Inhibitorspiegel-Kontrolle entnommen:

1. zum Zeitpunkt t_2 = 59 min (0,983 h),
2. zum Zeitpunkt t_5 = 119 min (1,983 h),
3. zum Zeitpunkt t_8 = 179 min (2,983 h),
4. zum Zeitpunkt t_{11} = 239 min (3,983 h) und
5. zum Zeitpunkt t_{14} = 249 min (4,150 h) = t_{end} .

Die Blutproben wurden sofort nach Gewinnung in 1,0 mL-fassende, EDTA-haltige „Probenröhrchen für hämatologische Untersuchungen“ (von KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth) gegeben, in denen 10 μL des „DPP-IV-Inhibitors“ von LINCO-Research vorgelegt waren, und unmittelbar in einer Kühlzentrifuge (8 Minuten, 1.200 g, +4 °Celsius) verarbeitet, das gewonnene Plasma in 0,5 mL-fassende „Micro-Test-Tubes“ (von Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) zu Volumina von 100 μL (für den Substrat-ELISA), von 20 μL (für die Blutzuckerbestimmung) und (bei den Versuchen mit paralleler DPP-IV-Hemmung) von 50 μL (für die Hemmstoff-Analytik) aufgeteilt und (bei -20 °Celsius) tiefgefroren. Der Chelatbildner EDTA bindet koordinativ den Blutgerinnungs-

faktor IV (ionisiertes Calcium) und verhindert dadurch die für die Blutgerinnungskaskade nötige Verankerung des Prothrombinase-Komplexes an den Phospholipiden der Thrombozyten-Membran.

Zwischen den Entnahmen der Blutproben wurden die Katheter mit heparinhaltiger isotonischer Kochsalzlösung gefüllt, um einen thrombotischen Verschluss zu verhindern. Die Konzentration an Heparin betrug 100 IU/mL (eine Ampulle Liquemin® N 10.000 von Hoffmann-La Roche AG, Basel, in einer 100 mL-Flasche isotoner Kochsalz-Lösung 0,9 % von B. Braun Melsungen AG, Melsungen).

3.3.2 in-situ-Perfusionsversuche (isoliert perfundierte Ratten-Leber)

3.3.2.1 Historisches

Die erste Leberperfusion wurde 1654 von Francis Glisson (1598-1677), dem Entdecker der nach ihm benannten Trias aus V. interlobularis, A. interlobularis und Ductus biliferus sowie der bindegewebigen Leberkapsel, durchgeführt, wobei ihm Kuhmilch als Perfusionsmedium und ein Federkiel als Pfortaderkanüle dienten [Grosse-Siestrup et al. 2002].

3.3.2.2 Tiere

Zur Anwendung kamen insgesamt 25 Rattenböcke der Gewichtsklasse von 200 bis 400 g KM, nämlich 19 Ratten für das rezirkulierende Perfusionsmodell und sechs Ratten für das Single-Pass-Verfahren. Da endogene Peptidhormon-Konzentrationen in der IPRL keine Rolle spielen, wurde auf das Nüchternsetzen der Tiere verzichtet. Jede Ratte wurde zur exakten Dosierung von Narkotika und zur Bestimmung der Relation von Organ- zu Körpermasse gewogen.

3.3.2.3 Narkose

Die gefütterten Donor-Ratten wurden anästhesiert mit dem Narcoticum Thiobutabarbital („Inactin“ 5 %-ige Lösung, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen) 100 mg/kg i.p. und mit dem Anästheticum Ketamin („Ketamin 5 %“, Bela-Pharm GmbH & Co. KG, Vechta) 60 mg/kg i.p. stabilisiert. Nach Eintritt des chirurgischen Toleranzstadiums (III/2) wurden die Tiere auf den schwenkbaren „OP-Table“ (Type 862, Size 5, Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugstetten) umgelagert, an den Carpal- und Tarsal-Gelenken mit Krokodilklemmen fixiert und in eine sagittale Schräglage (etwa 45 °) mit dem Kopf nach oben verbracht.

3.3.2.4 chirurgische Präparation

Die rasierte Haut wurde median eröffnet und durch Spreizen der Branchen einer stumpfen Schere subkutan breitflächig zu den Flanken hin freipräpariert. In die an der Innenfläche des linken Oberschenkels dabei zu Tage tretende Vena femoralis wurden 50 I.U. Heparin (100 I.U./mL isotonischer NaCl-Lösung) injiziert.

Das Abdomen wurde in der Linea alba eröffnet und nach caudal bis zur Beckensymphyse und nach cranial bis zum Schaufelknorpel (Cartilago xiphoidea) aufgeschnitten, ohne das Zwerchfell zu beschädigen. Transversale Entlastungsschnitte wurden subkostal zu beiden Seiten durchgeführt.

Eine doppelte Ligatur mit chirurgischer Seide (metric 3 = USP 2/0, Polysuture AG, Luxemburg) wurde lose an der Leberpforte um die Pfortader gelegt. Die distale Ligatur (caudal der V. gastroduodenalis) wurde nun mit einem chirurgischen Knoten fixiert. Nachdem die 16-Gauge-Kanüle auf Höhe der V. gastroduodenalis in die Pfortader eingeführt worden war, wurde die proximale Ligatur (cranial der V. gastroduodenalis) durch einen chirurgischen Knoten fixiert, wie die Abbildung 2 zeigt.

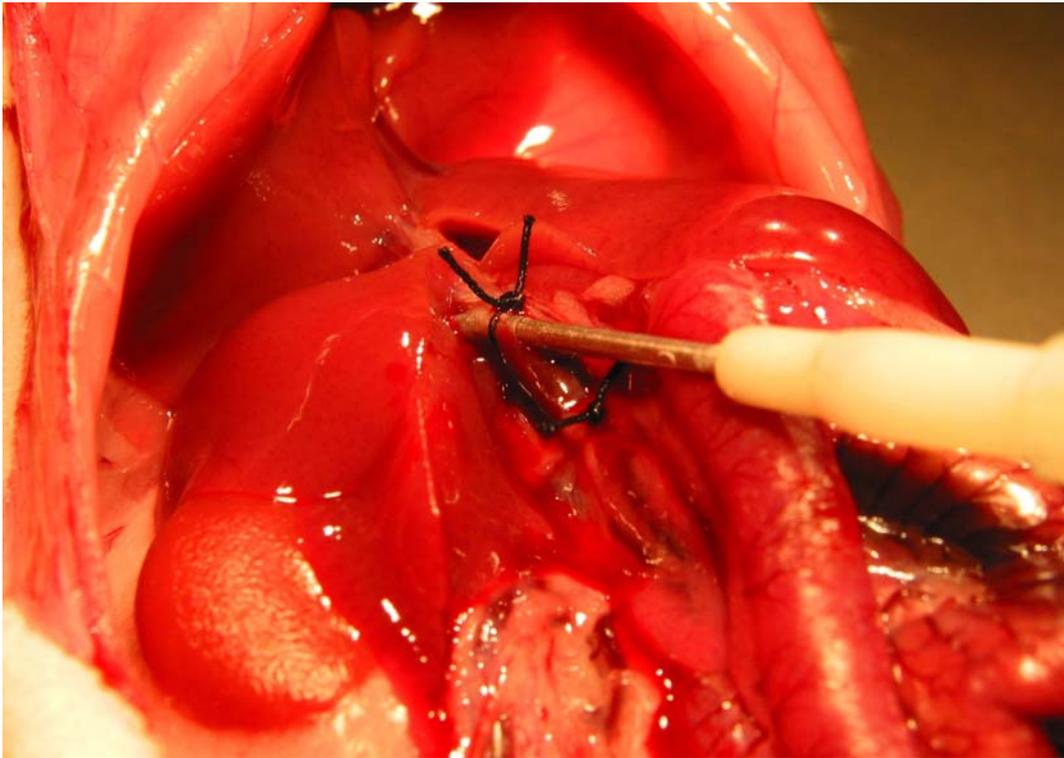


Abb. 2: 16-Gauge-Kanüle auf Höhe der V. gastroduodenalis in der Pfortader ligiert
– Präparationsstatus der Ratten-Leber unmittelbar vor Beginn der Perfusion

Die Leberperfusion wurde in situ mit präoxygenierter, körperwarmer und BSA-freier Pufferlösung aus einem hydrostatischen Reservoir eingeleitet und das Organ dadurch weitestgehend entblutet. Unmittelbar darauf wurde die abdominale Aorta durchtrennt und der Thorax durch Einschnitt in das Zwerchfell eröffnet. Zu diesem Zeitpunkt starb die Ratte. Zur Exenteration der Leber wurde das Zwerchfell entlang der Zwerchfellpfeiler von rechts nach links durchtrennt und daraufhin die intrathorakale hintere Hohlvene und der Ösophagus durchschnitten. Die linken Leberlappen (Lobi hepatis sinistri medialis et lateralis) wurden vorsichtig aus ihren ligamentösen Bindungen (Ligg. gastricum, duodenale et lienale), die das kleine Netz (Omentum minus) bilden, mit Hilfe einer feinen Schere herausgelöst. Abschließend wurde die intraabdominale hintere Hohlvene distal der Ligatur durchtrennt.

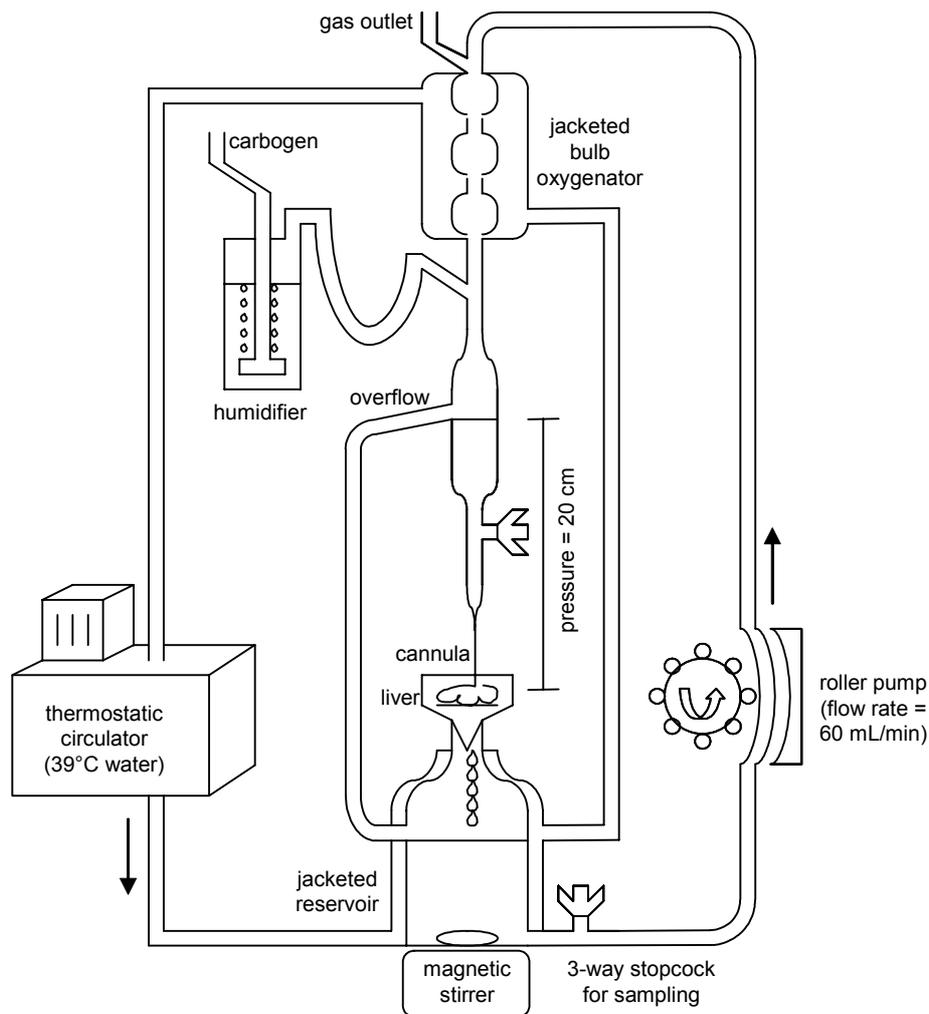


Abb. 3: Schematische Darstellung der IPRL im rezirkulierenden Modell

Die Leber wurde zu einer Perspex-Plattform transferiert und an den Dreiwegehahn angeschlossen. Dabei war unbedingt auf die Abwesenheit von Luftblasen zu achten, die als Emboli Teile des intrahepatischen Gefäßsystems von der Perfusion abtrennen würden.

Das Arrangement der Lobi hepatis wurde kontrolliert und das verbliebene Zwerchfell unter der Leber ausgebreitet, um eine Obstruktion des Flusses aus den Vv. hepaticae zu vermeiden. Die Oberfläche der Leber wurde mit körperwarmer isotonischer NaCl-Lösung gespült. Die Kammer wurde geschlossen und die Zirkulation (wie sie die Abbildung 3 zeigt) in Gang gesetzt.

Die Präparation vom Setzen der Portalkanüle bis zum Anschluss an die Zirkulation sollte maximal vier Minuten dauern. Danach sind erste hypoxämische Organschäden feststellbar [Meijer et al. 1981, Remie 2000].

3.3.2.5 Kautelen

Nach der Bestimmung der Flussrate zum Perfusionsende und der Perfusatprobennahme zur Messung der Leberenzyme wurde die Gefäßintegrität der Leber geprüft, indem 0,2 %-ige Methylenblau-Lösung via Portalvene in das Organ injiziert wurde. Nur wenn sich eine gleichmäßige Blaufärbung von wenigstens drei Vierteln der Leber abzeichnete und der blaue Perfusatfluss ausschließlich über die Vv. hepaticae abfloss, wurde das betreffende Organ in der Statistik berücksichtigt.

Um das Risiko einer mikrobiellen Kontamination der Leber zu minimieren, wurde die gesamte IPRL-Apparatur zwischen den einzelnen Perfusionsversuchen mit einer 5 %-igen Mucosal®-Lösung (Merz Consumer Care GmbH, Frankfurt am Main) beschickt und erst vor Beginn eines neuen Experiments mit mehreren Litern destillierten Wassers durchspült, bevor erneut natives Perfusionsmedium eingesetzt wurde. Aus demselben Grund wurden die Perspex-Plattform, die Portalkanüle, sowie das Präparationsinstrumentarium nach jedem Gebrauch desinfiziert. Diese Kautelen waren notwendig, da auch innerhalb von kurzen Perfusionszeiten ein mikrobielles Wachstum den intrahepatischen Fluss obstruieren kann [Meijer et al 1981].

3.3.2.6 Lebermasse

Nach Prüfung der Gefäßintegrität wurde das nichthepatische Gewebe entfernt und die Leber gewogen. Der Fehler durch das zusätzliche Gewicht der gespeicherten Flüssigkeit wurde bewusst in Kauf genommen, da er zur reinen Organmasse noch den Faktor des intravasalen Organvolumens beitrug.

3.3.2.7 portale Flussrate

Während der in-situ-Perfusionsversuche wird die portale Flussrate im Perfusionsmodell nur durch den Druck der 20 cm hohen Wassersäule über der Leberpforte und durch die Durchmesser der perfundierten Lebergefäße determiniert.

Zur Bestimmung dieser Flussrate wurde ein Subtraktionsverfahren angewandt: Unmittelbar nach Ende der Perfusion ($t_{15} = 79 \text{ min} = t_{\text{end}}$) wurde der Dreiwegehahn vor der 16-Gauge-Kanüle geschlossen, die Peristaltik-Pumpe angehalten und der Überlaufschlauch von seiner Mündung in das ummantelte Reservoir abgezogen und in einen 50 mL Messzylinder umgelenkt. Dann wurde zeitgleich der Dreiwegehahn geöffnet und die Peristaltik-Pumpe wieder in Gang gesetzt, um für exakt 60 Sekunden das Perfusatvolumen aus dem Überlauf aufzufangen. Die Differenz zwischen der Pumpleistung der Peristaltik-Pumpe (in mL/min) und dem in 60 Sekunden aufgefangenen Überlaufvolumen wurde als die Flussrate des Perfusats durch die Leber angenommen.

3.3.2.8 IPRL im rezirkulierenden Modell

Addition von Substrat und Hemmstoff

Nach Ablauf der 20-minütigen Äquilibrationsphase, in der sich die intrahepatische Flussrate stabilisieren sollte, wurde zum Zeitpunkt $t_0 = 20 \text{ min}$ an dem der Kanüle unmittelbar vorgeschalteten Dreiwegehahn 2 mL einer Substrat-Lösung der Konzentration 5 nmol/L als Bolus in das rezirkulierende System appliziert. Diese 2 mL enthielten folglich 10 pmol Substrat. Die resultierende Konzentration im Gesamtvolumen des Perfusats von 82 mL betrug somit 120 pmol/L Substrat.

Zum Zeitpunkt $t_{10} = 50 \text{ min}$ wurden über denselben Zugang 2,5 mL als Bolus in den Perfusionskreislauf eingespritzt, nämlich ein Gemisch aus 2 mL der vorgenannten 5 nanomolaren Substrat-Lösung und 0,5 mL einer Hemmstoff-Lösung der Konzentration 212 $\mu\text{mol/L}$. Der halbe Milliliter Inhibitorlösung enthielt folglich 106 nmol Hemmstoff. Die resultierende Konzentration im Gesamtvolumen des Perfusats von 84 mL betrug somit 1,3 $\mu\text{mol/L}$ Hemmstoff. Die geringgradig niedrigere Substrat-Konzentration im zweiten Teil des Versuchs durch das größere Perfusatvolumen wurde vernachlässigt.

Perfusatproben

An dem dem ummantelten Reservoir unmittelbar nachgeschalteten Dreiwegehahn wurden zu folgenden Zeitpunkten Perfusatproben eines Einzelvolumens von 120 μL in 0,5 mL-fassende „Micro-Test-Tubes“ (von Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) zur Bestimmung der Substrat-Konzentration entnommen und bis zur Messung (bei $-20\text{ }^\circ\text{Celsius}$) tiefgefroren:

1. zum Zeitpunkt t_1 = 22 min (0,367 h),
2. zum Zeitpunkt t_2 = 25 min (0,417 h),
3. zum Zeitpunkt t_3 = 30 min (0,50 h),
4. zum Zeitpunkt t_4 = 40 min (0,667 h),
5. zum Zeitpunkt t_5 = 49 min (0,817 h),
6. zum Zeitpunkt t_{11} = 52 min (0,867 h),
7. zum Zeitpunkt t_{12} = 55 min (0,917 h),
8. zum Zeitpunkt t_{13} = 60 min (1,0 h),
9. zum Zeitpunkt t_{14} = 70 min (1,167 h) und
10. zum Zeitpunkt t_{15} = 79 min (1,317 h) = t_{end} .

An demselben Dreiwegehahn wurden zu folgenden Zeitpunkten zusätzlich die Perfusatproben eines Einzelvolumens von 50 μL in 0,5 mL-fassende „Micro-Test-Tubes“ (von Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) zur Inhibitorspiegel-Kontrolle entnommen und bis zur Messung (bei $-20\text{ }^\circ\text{Celsius}$) tiefgefroren:

1. zum Zeitpunkt t_{11} = 52 min (0,867 h),
2. zum Zeitpunkt t_{12} = 55 min (0,917 h),
3. zum Zeitpunkt t_{13} = 60 min (1,0 h),
4. zum Zeitpunkt t_{14} = 70 min (1,167 h) und
5. zum Zeitpunkt t_{15} = 79 min (1,317 h) = t_{end} .

3.3.2.9 IPRP im Single-Pass-Modell

Addition von Substrat und Hemmstoff

Nach Ablauf der 20-minütigen (rezirkulierenden) Äquilibrationsphase, in der sich die intrahepatische Flussrate stabilisieren sollte, wurde zum Zeitpunkt $t_0 = 20$ min die Zirkulation durch die Peristaltik-Pumpe für wenige Sekunden unterbrochen und der Schlauch, der die Zuleitung des Perfusats zum ummantelten Kolben-Oxygenator bildete, in ein (mittels Wasserbecken auf +39 °Celsius erwärmtes) Perfusat-Reservoir mit einem Gesamtvolumen von 3.727,6 mL (zwei Gefäße zu je 1.863,8 mL) umgeleitet. In das Perfusat-Reservoir von 1.860 mL waren zuvor 7,6 mL (pro Gefäß je 3,8 mL) einer 50 nanomolaren Substrat-Lösung appliziert worden, so dass durch die sofort anschließend wieder in Gang gesetzte Peristaltik-Pumpe nun Perfusat mit einer Endkonzentration an Substrat von 100 pmol/L durch die Leber gepumpt wurde.

Zum Zeitpunkt $t_4 = 35,5$ min wurde der Zuleitungsschlauch in ein gleichfalls auf Körpertemperatur erwärmtes Perfusat-Reservoir mit einem Gesamtvolumen von 677 mL umgeleitet. In dieses zweite Perfusat-Reservoir von 660 mL waren zuvor 1,4 mL der 50 nanomolaren Substrat-Lösung sowie 15,6 mL einer 2,12 mikromolaren Hemmstoff-Lösung appliziert worden, so dass nun Perfusat der Endkonzentrationen an Substrat von 100 pmol/L sowie an Hemmstoff von rund 50 $\mu\text{mol/L}$ durch die Leber gepumpt wurde. Die geringgradig unter 50 $\mu\text{mol/L}$ (48,9 $\mu\text{mol/L}$) liegende Hemmstoff-Konzentration wurde in Anbetracht der sehr großzügig gewählten Dimension vernachlässigt.

Zum Zeitpunkt $t_9 = 45,5$ min wurde der Zuleitungsschlauch wieder zurück in das nur Substrat enthaltende Perfusat-Reservoir umgeleitet.

Perfusatproben

Der dem ummantelten Reservoir unmittelbar nachgeschalteten Dreiwegehahn wurde demontiert und aus dem durch dieses Leck im ummantelten Reservoir fließenden Perfusat-Strom wurden zu folgenden Zeitpunkten Perfusatproben eines Einzelvolumens von 120 μL in 0,5 mL-fassende „Micro-Test-Tubes“ (von Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) zur Substratspiegel-Bestimmung entnommen und bis zur Messung (bei -20 °Celsius) tiefgefroren:

(GLP-1 (7-37)-Extraktionsphase)

1. zum Zeitpunkt t_1 = 30 min (0,50 h),
2. zum Zeitpunkt t_2 = 32 min (0,533 h),
3. zum Zeitpunkt t_3 = 35 min (0,583 h),

Nach dem Wechsel des Perfusionsmediums zum Zeitpunkt $t_4 = 35,5$ min:

(BI- β -Einwaschphase)

4. zum Zeitpunkt t_7 = 40 min (0,667 h),
5. zum Zeitpunkt t_8 = 45 min (0,750 h),

Nach der Rückkehr zum ursprünglichen Perfusionsmediums zum Zeitpunkt $t_9 = 45,5$ min:

(BI- β -Auswaschphase)

6. zum Zeitpunkt t_{12} = 50 min (0,833 h),
7. zum Zeitpunkt t_{13} = 55 min (0,917 h),
8. zum Zeitpunkt t_{15} = 65 min (1,083 h),
9. zum Zeitpunkt t_{18} = 80 min (1,333 h) und
10. zum Zeitpunkt t_{20} = 90 min (1,50 h) = t_{end} .

An demselben Dreiwegehahn wurden zu folgenden Zeitpunkten zusätzlich die Perfusatproben eines Einzelvolumens von 50 μL in 0,5 mL-fassende „Micro-Test-Tubes“ (von Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) zur Inhibitorspiegel-Kontrolle entnommen und bis zur Messung (bei -20 °Celsius) tiefgefroren:

Nach dem Wechsel des Perfusionsmediums zum Zeitpunkt $t_4 = 35,5$ min:

(BI- β -Einwaschphase)

1. zum Zeitpunkt t_5 = 36 min (0,60 h),
2. zum Zeitpunkt t_6 = 37 min (0,617 h),
3. zum Zeitpunkt t_7 = 40 min (0,667 h),
4. zum Zeitpunkt t_8 = 45 min (0,750 h),

Nach der Rückkehr zum ursprünglichen Perfusionsmediums zum Zeitpunkt $t_9 = 45,5$ min:

(BI- β -Auswaschphase)

5. zum Zeitpunkt t_{10} = 46 min (0,767 h),
6. zum Zeitpunkt t_{11} = 47 min (0,783 h),
7. zum Zeitpunkt t_{12} = 50 min (0,833 h),
8. zum Zeitpunkt t_{13} = 55 min (0,917 h),
9. zum Zeitpunkt t_{14} = 60 min (1,0 h),
10. zum Zeitpunkt t_{15} = 65 min (1,083 h),
11. zum Zeitpunkt t_{16} = 70 min (1,167 h),
12. zum Zeitpunkt t_{17} = 75 min (1,250 h),
13. zum Zeitpunkt t_{18} = 80 min (1,333 h),
14. zum Zeitpunkt t_{19} = 85 min (1,417 h) und
15. zum Zeitpunkt t_{20} = 90 min (1,50 h) = t_{end} .

3.3.3 in-vitro-Stabilitätsversuche

3.3.3.1 Substrat-Abbau in Vollblut

Substrat-Abbau in Vollblut bei Raumtemperatur (+20 °Celsius)

Durch Blutentnahme von 1,0 mL pro Tier wurde von drei nüchternen Ratten frisches Vollblut gewonnen und in einer 4,5 mL-fassenden, EDTA-haltigen „Kabevette“ (von KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth) zum Ausgleich der Basislinie gepoolt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden aus diesem Vollblutpool Volumina von jeweils 200 μL auf 10 EDTA-haltige „Probenröhrchen für hämatologische Untersuchungen“ (von KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth) aufgeteilt.

Jeweils zwei Probenröhrchen wurden nun zu einem Doppelansatz zusammengefasst und zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ sec (0 min) mit 50 μL einer 455 picomolaren Substrat-Lösung versehen, so dass in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von 10 μL des „DPP-IV-Inhibitors“ von LINCO-Research insgesamt 5 Applikationsmodi zu Stande kamen (die Endkonzentration an Substrat in den 260 μL Gesamtvolumen betrug – unter Vernachlässigung der Basislinie – 87 pmol/L):

- 1.) Modus 1: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_0 = 0 sec (0 min),
- 2.) Modus 2: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_1 = 10 sec (0,167 min),
- 3.) Modus 3: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_2 = 30 sec (0,50 min),
- 4.) Modus 4: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_3 = 60 sec (1,0 min) und
- 5.) Modus 5: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_4 = 120 sec (2,0 min) = t_{end} .

Die Blutproben von 260 μL wurden unmittelbar im Anschluss an die Hemmstoff-Zugabe in einer Kühlzentrifuge (8 Minuten, 1.200 g, +4 $^\circ\text{Celsius}$) verarbeitet und in Volumina von 100 μL des gewonnenen Plasmas (für den Substrat-ELISA) in 0,5 mL-fassende „Micro-Test-Tubes“ (von Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg)  bergef hrt und (bei -20 $^\circ\text{Celsius}$) tiefgefroren.

Substrat-Abbau in Vollblut bei Körpertemperatur (+39 $^\circ\text{Celsius}$)

Durch Blutentnahme von 1,5 mL pro Tier wurde von vier verschiedenen Ratten frisches Vollblut gewonnen und getrennt in Einzelvolumina von 200 μL in jeweils sieben verschiedene 1 mL-fassenden, EDTA-haltigen „Probenröhrchen für hämatologische Untersuchungen“ (von KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth) pro Tier aufgeteilt und im Schüttel-Wasserbad gleichmäßig bewegt und bei +39 $^\circ\text{Celsius}$ temperiert.

In das jeweils erste Röhrchen pro Tier wurde zur Bestimmung der Basislinie (der Plasma-Konzentration an endogenem GLP-1 und unspezifischen Faktoren) zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ sec (0 min) 10 μL des „DPP-IV-Inhibitors“ von LINCO-Research sowie 50 μL isotonische NaCl-Lösung als Blank pipettiert. Die übrigen Röhrchen pro Tier wurden zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ sec (0 min) mit 50 μL einer 555 picomolaren Substrat-Lösung versehen, so dass in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von 10 μL des „DPP-IV-Inhibitors“ von LINCO-Research zusätzlich zu den Blanks insgesamt 6 Applikationsmodi zu Stande kamen (die Endkonzentration an Substrat in den 260 μL Gesamtvolumen der Modi 1-6 betrug – abzüglich der Basislinie – 107 pmol/L):

- 1.) Modus 1: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_1 = 10 sec (0,167 min),
- 2.) Modus 2: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_2 = 30 sec (0,50 min),
- 3.) Modus 3: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_3 = 60 sec (1,0 min),
- 4.) Modus 4: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_4 = 120 sec (2,0 min),
- 5.) Modus 5: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_5 = 300 sec (5,0 min) und
- 6.) Modus 6: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_6 = 600 sec (10,0 min) = t_{end} .

Die Blutproben von 260 μL wurden unmittelbar im Anschluss an die Hemmstoff-Zugabe in einer Kühlzentrifuge (8 Minuten, 1.200 g, +4  Celsius) verarbeitet und in Volumina von 100 μL des gewonnenen Plasmas (für den Substrat-ELISA) in 0,5 mL-fassende „Micro-Test-Tubes“ (von Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg)  bergef hrt und (bei -20  Celsius) tiefgefroren.

3.3.3.2 Substrat-Abbau in Perfusat

Nach 20 minütiger Perfusion im Rahmen der  quibrierungsphase, in der sich die intrahepatische Flussrate stabilisieren sollte, wurden aus dem Perfusat von zwei verschiedenen isoliert perfundierten Ratten-Lebern im rezirkulierenden Modell jeweils Volumina von 300 μL entnommen und in drei Einzelvolumina von jeweils 100 μL auf 0,5 mL-fassende „Micro-Test-Tubes“ (von Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) aufgeteilt und im Schüttel-Wasserbad gleichm sig bewegt und bei +39  Celsius temperiert.

Jeweils zwei Probenröhrchen wurden nun zu einem Doppelansatz zusammengefasst und zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ sec (0 min) mit 30 μL einer 455 picomolaren Substrat-Lösung versehen, so dass in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von 10 μL des „DPP-IV-Inhibitors“ von LINCO-Research insgesamt 3 Applikationsmodi zu Stande kamen (die Endkonzentration an Substrat in den 140 μL Gesamtvolumen der Modi 1-3 betrug 97 pmol/L):

- 1.) Modus 1: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_0 = 0 sec (0 min),
- 2.) Modus 2: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_2 = 300 sec (5,0 min) und
- 3.) Modus 3: DPP-IV-Inhibitor-Zugabe zum Zeitpunkt t_3 = 600 sec (10,0 min) = t_{end} .

3.3.4 Prinzip des GLP-1-ELISA

Das Spektrum der Messbarkeit des kommerziellen Test-Kits reicht von 2 bis 100 pmol/L. Um sich eine Vorstellung vom Verdünnungsgrad dieses Konzentrationsbereichs zu machen, wird folgender Vergleich angestellt: Etwa 8 pmol/L entspricht der Konzentration von Saccharose (Molekulargewicht 342,3 g/mol) im Wesslinger See – mit einem Volumen von 1.047.000 m³ der kleinste der fünf Binnengewässer im oberbayerischen Fünfseenland – nachdem man ein Stück Würfelzucker (2,8 g) hineingeworfen hat.

In der ersten Reaktion werden die GLP-1-haltigen Plasmaproben, die mit DPP-IV-Inhibitor stabilisiert sind, in die Wells der Mikrotiterplatte gegeben, deren Wände mit monoklonalen Anti-GLP-1-Antikörpern beschichtet sind. GLP-1 (7-36 amide) und GLP-1 (7-37) aus der Plasmaprobe werden von den wandständigen Antikörpern spezifisch N-terminal gebunden.

Je 100 µL Probenvolumen werden mit 100 µL Test-Puffer gemischt, welcher sich zusammensetzt aus 50 millimolarer PBS (pH 6,8), Protease-Inhibitor von Linco-Research, Tween 20 (Poly[oxyethylen][20]-sorbitan-monolaureat), 0,08 % Natriumazid (NaN₃) und 1 % BSA.

Nachdem die ungebundene Plasmaprobe mit Wasch-Puffer (10 millimolarer PBS, Tween 20 und Natriumazid) ausgespült worden war, wurden in der zweiten Reaktion polyklonale Anti-GLP-1-Antikörper zugegeben, die an ihrem kristallisierbaren Fragment (Fc) mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren und sich an die immobilisierten GLP-1-Moleküle banden.

Nachdem das ungebundene Konjugat wiederum ausgespült worden war, wurde nun das Substrat Methyl-Umbelliferyl-Phosphat (MUP) zugegeben, das in der nun einsetzenden Enzymreaktion von der konjugierten alkalischen Phosphatase zu fluoreszierendem Umbelliferon umgesetzt wurde.

Zur Messung der zum Gehalt der Plasmaprobe an physiologisch aktivem GLP-1 direkt proportionalen Konzentration an entstandenem Umbelliferon wurde die Fluoreszenz-Aktivität im Fluoreszenz-Photometer bei der Exzitationswellenlänge $\lambda = 355$ und der Emissionswellenlänge $\lambda = 460$ an Hand von Standards (2 pmol/L, 5 pmol/L, 10 pmol/L, 20 pmol/L, 50 pmol/L und 100 pmol/L) quantifiziert. Die Inkubation wurde durch die Stopp-Lösung beendet, wenn der 100 picomolare Standard ungefähr 50.000 RFU (bezogen auf einen internen Standard) Fluoreszenz zeigte.

Eine Interferenz des parallel infundierten beziehungsweise parallel perfundierten DPP-IV-Hemmstoffes BI- β konnte durch separate in-vitro-Interaktionstests ausgeschlossen werden (nicht gezeigt).

3.3.5 Prinzip der Glukose-Messung

Glukose-Dehydrogenase (Glu-DH) katalysiert die Oxidation von Glukose zu Glukonolakton nach folgender Gleichung:



Der Zusatz von Mutarotase beschleunigt den Reaktionsverlauf. Die zum Glukose-Gehalt der Plasmaprobe direkt proportionale Extinktion durch NADH wird im Licht-Photometer bei der Wellenlänge $\lambda = 334 \text{ nm}$ (Absorptionsmaximum von NADH) an Hand von Standards quantifiziert.

3.3.6 Messung der BI- β -Proben

Die Messung der im Rahmen der vorgenommenen in-vivo-Infusionsversuche und in-situ-Perfusionsversuche gewonnenen BI- β -Proben wurde von der Gruppe Bioanalytics der Abteilung Drug Metabolism and Pharmacokinetics der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach/Riss durchgeführt.

Der Gehalt der Plasma- beziehungsweise Perfusat-Proben an dem DPP-IV-Hemmstoff BI- β wurde mittels HPLC gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) standardmäßig quantitativ gemessen. Die analytische Bestimmungsgrenze (Limit of Quantitation = LOQ) lag bei 1 nmol/L.

3.3.7 biometrische Methode

Die biometrische Auswertung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten wurde von Herrn Dr. Michael Meyners aus der Gruppe Clinical Biostatistics der Abteilung Medical Data Services der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach/Riss durchgeführt.

Der Begriff des statistisch signifikanten Unterschieds, der die Irrtumswahrscheinlichkeit p (englisch „probability“) quantitativ festlegt, mit welcher ein Unterschied zwischen zwei Resultaten rein zufällig auftritt, wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt, wenn $p < 0,05$ war. Das heißt, es wurde in Kauf genommen, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 % ein

angenommener Unterschied zufällig entstanden sein konnte, obwohl in Wahrheit kein Unterschied bestand (so genannter α -Fehler im Falle der Alternativhypothese).

statistische Auswertung der in-vivo-Infusionsversuche

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Softwarepakete SAS Version 8.2 und S-Plus 6.1 durchgeführt. Zielparameter waren der resultierende GLP-1-Plasmaspiegel (mit Korrektur der Basislinie) und die aus diesem berechnete totale Clearance. Zur Deskription der Daten wurden zunächst getrennt nach BI- β -Dosierung und Infusionsrate an exogenem GLP-1 die Anzahl der auswertbaren Beobachtungen (N) sowie deren Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD) bestimmt. Auf der Grundlage von Varianzanalysen (ANOVA) für mehr als zwei unverbundene Stichproben einerseits in Bezug auf die resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel und andererseits in Bezug auf die Clearance-Werte wurden die Werte getrennt nach BI- β -Dosierungen und Infusionsraten an exogenem GLP-1 paarweise miteinander verglichen und die entsprechenden p-Werte bestimmt. Bei den Vergleichen ohne Berücksichtigung der Kontrolle (Vergleiche der Steigerungsfaktoren untereinander) war es notwendig, das multiple Niveau zu berücksichtigen und entsprechend zu adjustieren. Hierzu wurde die Korrektur nach Bonferroni-Holm verwendet.

statistische Auswertung der in-situ-Perfusionsversuche

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Softwarepakets SAS Version 8.2 durchgeführt. Die drei Zielparameter Halbwertszeit, hepatische Clearance und hepatischer Extraktionsquotient der beiden Isoformen wurden unabhängig voneinander betrachtet. Zur Deskription der Daten wurden zunächst getrennt nach der Isoform die Anzahl der auswertbaren Beobachtungen (N) sowie deren Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD) bestimmt. Es wurde angenommen, dass die Beobachtungen aus normalverteilten Grundgesamtheiten stammen. Mit Hilfe eines F-Tests wurde untersucht, ob es deutliche Hinweise auf Ungleichheit der Varianzen in den beiden Gruppen (Amid-Isoform und Glycin-Isoform) gibt. War dies nicht der Fall, so wurde für den Vergleich der jeweiligen Mittelwerte der t-Test für zwei unverbundene (homoskedastische) Stichproben angewandt und der entsprechende p-Wert bestimmt, andernfalls lag das so genannte Behrens-Fisher-Problem (heteroskedastische Stichproben) vor. In diesem Fall wurde als Approximation die Korrektur nach Satterthwaite verwendet.

4 Experimente und Ergebnisse

4.1 in-vivo-Infusionsversuche (Glycin-Isoform im Steady-State ohne und mit DPP-IV Inhibition)

4.1.1 Glycin-Isoform im Steady-State ohne BI- β

4.1.1.1 Wahl des Applikationsschemas

Die aus der Literatur bekannte, extrem kurze Halbwertszeit von GLP-1 in vivo von 1 bis 2 Minuten ließ im Stadium der Versuchsplanung früh den Gedanken aufkommen, durch Dauerinfusion des 3,3 kDa schweren Peptidhormons ein Fließgleichgewicht (Steady-State) zwischen exogener Zufuhr und endogenem Abbau auf den verschiedenen Wegen der körpereigenen Clearance herzustellen, wie es in der Abbildung 4 skizziert ist. Da die Abhängigkeit der Clearance von der Substrat-Konzentration nicht-linearer Natur ist, war zum einen die Clearance als zentraler Kinetik-Parameter nur im Fließgleichgewicht zu bestimmen und waren zum anderen Steady-State-Infusionen in verschieden hohen Raten notwendig.

Der Erwartung nach sollten sich die Fließgleichgewichte der jeweiligen Substrat-Infusionsraten unter paralleler Infusion des DPP-IV-Inhibitors BI- β auf entsprechend höhere Niveaus verschieben. Zusätzlich sollte nach Absetzen der Infusion die Geschwindigkeit des Abfalls vom Steady-State-Niveau auf die Basislinie und die Geschwindigkeitsänderung dieses Abfalls unter Hemmstoffeinfluss bestimmt werden.

Um sinnvolle Plasmaspiegel von DPP-IV-Hemmstoff einerseits und von GLP-1 andererseits zu erreichen, mussten zuerst geeignete Infusionsraten für die Hemmstoff-Lösung und für die GLP-1-Lösung gefunden werden.

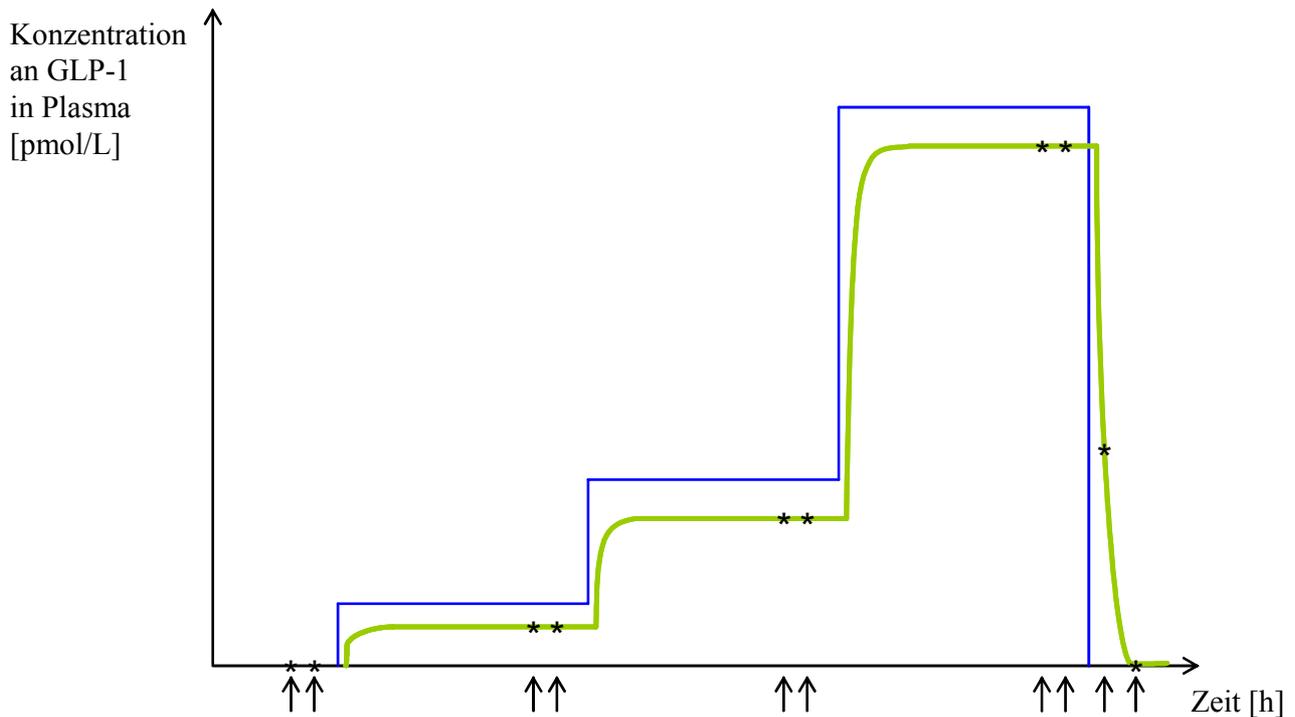


Abb. 4: Applikationsschema von GLP-1 mit resultierenden GLP-1-Plasmaspiegeln (blau = Infusionsdosis, grün = Plasmaspiegel, Pfeile = Zeitpunkte der Blutprobenentnahme)

4.1.1.2 computergestützte Dosis-Findung für BI- β

Zu Beginn war aus pharmakodynamischen Vorarbeiten bekannt, dass eine perorale Dosis des DPP-IV Hemmstoffes BI- β von 3,0 mg/kg bei Ratten eine erste deutliche Wirkung in Hinsicht auf einen Anstieg der GLP-1-Inkretion zur Folge hat [persönliche Mitteilung von Dr. Mohammad Tadayyon, Abteilung Stoffwechselforschung der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG].

Zudem war bekannt, dass eine perorale Dosis von 10 mg/kg bei Ratten im Peak (nach zwei Stunden) eine Plasma-Konzentration von 1,0 $\mu\text{mol/L}$ erzeugt [unveröffentlichte Daten der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG].

Aus der bekannten Dosislinearität von BI- β bei der Ratte [unveröffentlichte Daten der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG] konnte nun auf eine Plasma-Konzentration im Peak von etwa 0,3 $\mu\text{mol/L}$ in Folge der wirksamen Dosis von 3,0 mg/kg geschlossen werden.

Durch kompartimentelle Auswertung mit Hilfe der Pharmakokinetik-Software TOPFIT, Version 2.0, wurde das geeignete Pharmakokinetik-Modell an Hand der Plasmaspiegel von

BI- β nach intravenöser Bolus-Applikation bei der Ratte [unveröffentlichte Daten der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG] ermittelt.

Dabei wurde im ersten Schritt die mathematische Formel zur Optimierung des Kurvenverlaufs erstellt und im zweiten Schritt das Infusionsschema an Hand der erstellten mathematischen Funktion simuliert. In der iterativen Anpassung der Messdaten an ein Pharmakokinetik-Modell erwies sich das 2-Kompartiment-Modell als ausreichend genau. Iteration ist ein mathematisches Verfahren zur Verbesserung von Näherungslösungen durch ständiges Wiederholen desselben Rechenablaufs unter Optimierung der Koeffizienten. Iterationen werden angewandt bei Datenreihen, deren Kurvenverlauf sich mit einer mathematischen Gleichung nicht eindeutig beschreiben lässt.

Um nun herauszufinden, wie diese Zielgröße der BI- β -Konzentration im Plasma von 0,3 $\mu\text{mol/L}$ erreicht werden könnte, wurden in dem genannten 2-Kompartiment-Modell diverse Applikationsmodi mittels TOPFIT-Programm simuliert. Die Kombination von einem initialen Bolus von 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ und einer Dauerinfusion von 0,6 ($\mu\text{mol/kg}$)/h ergab eine über mehrere Stunden stabile Plasma-Konzentration zwischen 0,2 und 0,4 $\mu\text{mol/L}$ und damit die optimale Anpassung an die Zielgröße.

Das Dreifache der Dauerinfusion, also (gerundet) 2,0 ($\mu\text{mol/kg}$)/h, wurde als mittlere Dosierung und das Zehnfache, also 6,0 ($\mu\text{mol/kg}$)/h, als hohe Dosierung eingesetzt, jeweils nach dem entsprechenden initialen Bolus von 1,0 $\mu\text{mol/kg}$ beziehungsweise 3,0 $\mu\text{mol/kg}$.

4.1.1.3 empirische Dosis-Findung für GLP-1 (Vorversuch)

Die Infusionsrate an exogenem GLP-1 wurde in einem eigenen Vorversuch ohne parallele Hemmstoffinfusion im Sinne einer Dosis-Findung bestimmt. Die Zielvorgabe bestand darin, dass die resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel möglichst im unteren Drittel des Standardspektrums des ELISA-Kits von 2 bis 100 pmol/L angesiedelt sein sollten, um Spielraum nach oben für die zu erwartenden Steigerungen unter Hemmstoffeinfluss zu haben. Die im Vorversuch (Dosis-Findung) bei den verwendeten fünf Tieren mit Infusionsraten von 8, 80 und 800 [(pmol/kg)/h] (ohne parallele Hemmstoff-Infusion) erzielten Plasmaspiegel von GLP-1 (7-37) zeigt die Abbildung 5. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

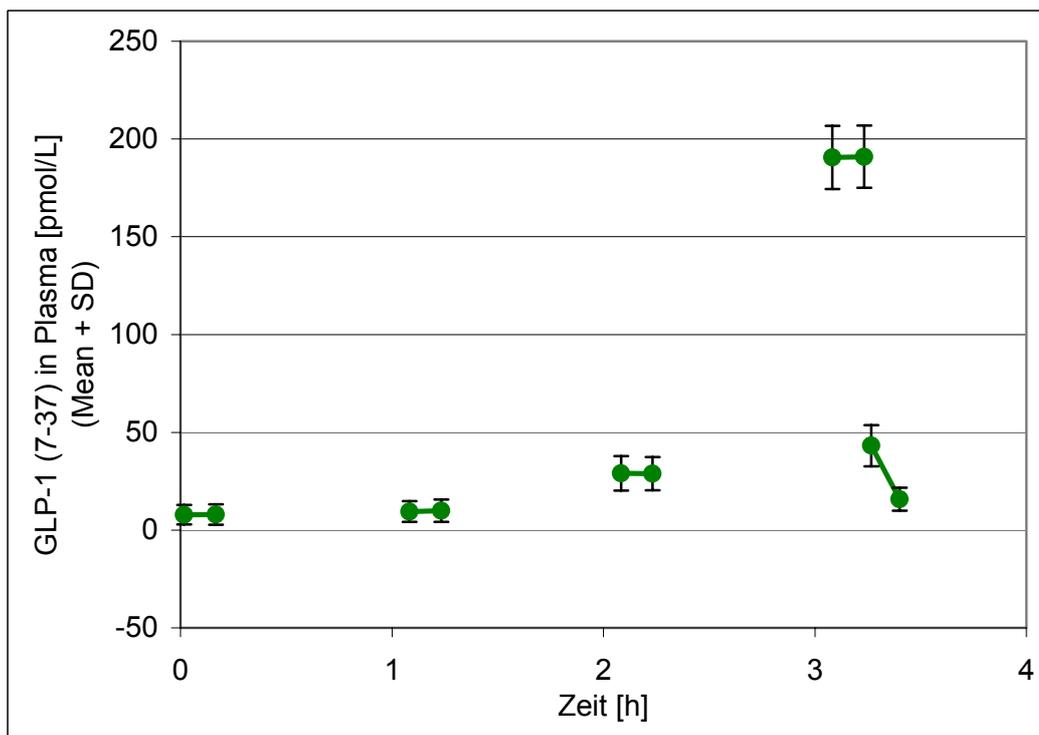


Abb. 5: Vorversuch (Dosis-Findung) mit Originaldaten

Basislinien-Korrektur

Die durchgehend hohen GLP-1-Plasmaspiegel bei einer einzelnen Ratte gaben einen ersten Hinweis auf eine unspezifische Reaktion des Assays mit individuellen Plasmabestandteilen, die sehr wahrscheinlich nicht GLP-1 waren, da eine Subtraktion der individuellen Basislinie (= arithmetisches Mittel der Messwerte der beiden Proben des „endogenen Plasmaspiegels“ vor Beginn der GLP-1-Infusion) durchgehend ein konsistentes Bild des Infusionsverlaufs im interindividuellen Vergleich ergab, wie ein Vergleich der Abbildungen 5 und 6 veranschaulicht. An dieser Basislinienkorrektur wurde daher bei allen weiteren Assays festgehalten. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

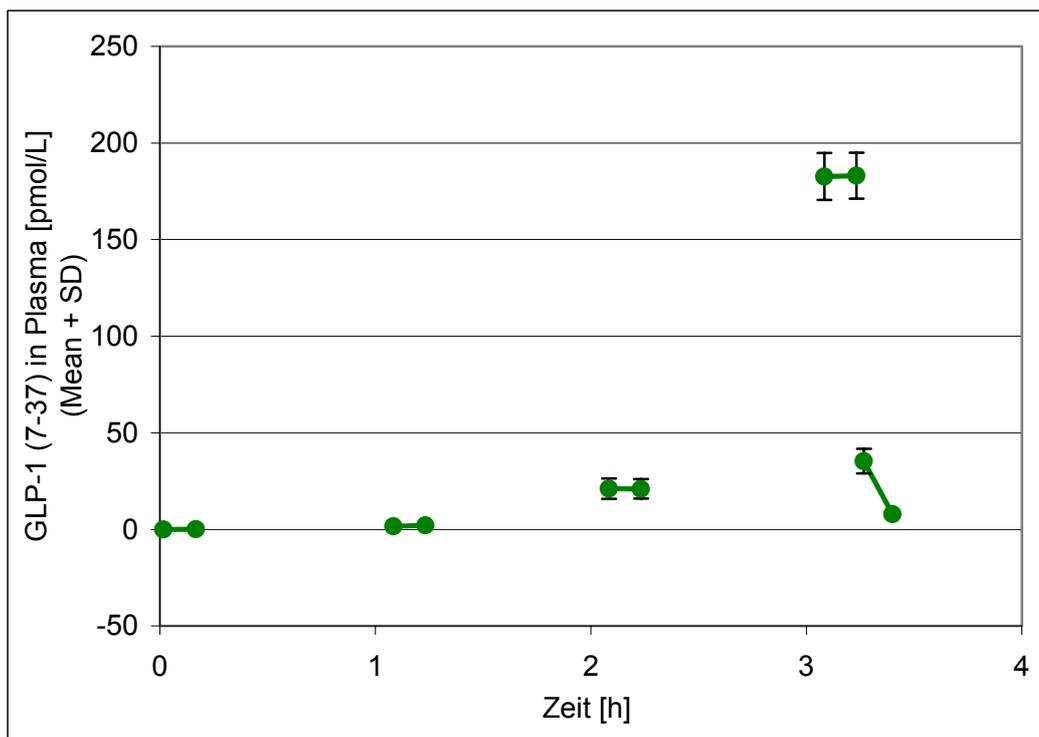


Abb. 6: Vorversuch (Dosis-Findung) mit Korrektur der Basislinie

Wahl der Infusionsraten

Aus dem Verhältnis zwischen Infusionsrate und resultierendem Plasmaspiegel konnten die notwendigen Infusionsraten für erwünschte Plasmaspiegel abgeschätzt werden (Abbildung 7). So wurden Infusionsraten an GLP-1 in der geometrischen Steigerung von 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h gewählt, da von diesen resultierende Plasmaspiegel deutlich unter 50 pmol/L zu erwarten waren. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

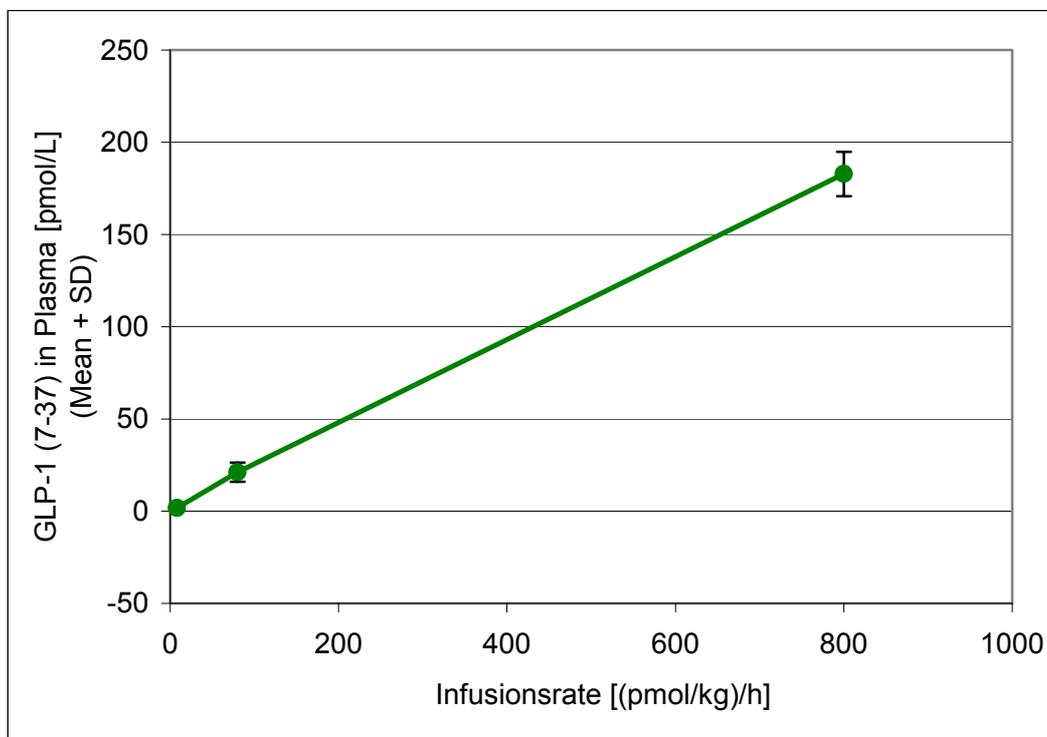


Abb. 7: Verhältnis von Infusionsrate und resultierendem Plasmaspiegel (Vorversuch)

Später wurde dieses Schema um niedrigere BI- β -Dosen und höhere Infusionsraten an exogenem GLP-1 (7-37) erweitert. Einen Überblick über die letztlich angewandten Infusionskombinationen gibt die nachfolgende Tabelle:

<u>GLP-1 (7-37)</u>	<u>BI-β</u>					
<u>[(pmol/kg)/h]</u>	<u>[(μmol/kg)/h]</u>					
		<i>niedrigste</i>	<i>sub-niedrige</i>	<i>niedrige</i>	<i>mittlere</i>	<i>hohe</i>
		<i>Dosis</i>	<i>Dosis</i>	<i>Dosis</i>	<i>Dosis</i>	<i>Dosis</i>
0	0	0,01	0,1	0,6	2,0	6,0
12	0	0,01	0,1	0,6	2,0	6,0
40	0	0,01	0,1	0,6	2,0	6,0
120	0	0,01	0,1	0,6	2,0	6,0
300	0				2,0	
1.500	0				2,0	

4.1.1.4 GLP-1-(7-37)-Infusion ohne DPP-IV-Hemmung

Für diesen Versuch wurden sechs Tiere verwendet, um eine relativ große Gruppe von Kontrolltieren zu haben. Die aus der applizierten Dosis resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel der Infusionsraten mit 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h zeigt die Abbildung 8. Das Ergebnis entsprach damit weitgehend den ursprünglichen Erwartungen, wie sie in der Abbildung 4 skizziert sind. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

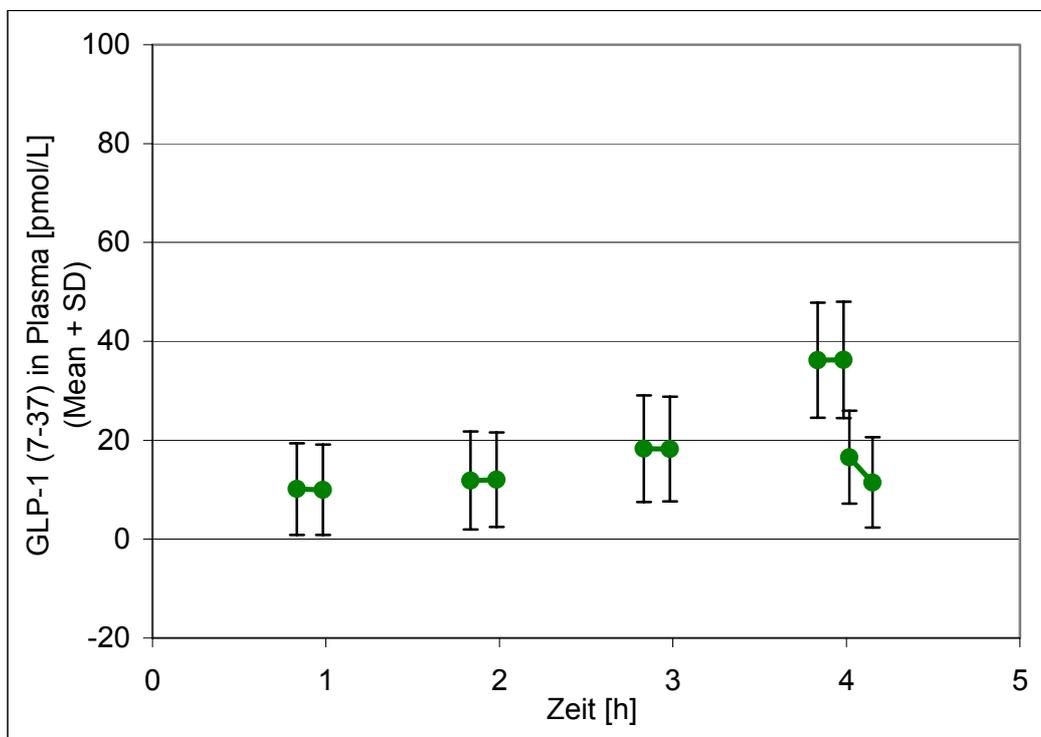


Abb. 8: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel ohne DPP-IV-Hemmung
(mit Originaldaten)

Wieder erwies sich die Korrektur der Basislinie, also die Subtraktion des arithmetischen Mittels der Messwerte der beiden Proben vor Beginn der GLP-1-Infusion, als durchgehend konsistenter im Hinblick auf den interindividuellen Vergleich der GLP-1-Plasmaspiegel, wie der Vergleich mit der Abbildung 9 veranschaulicht. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

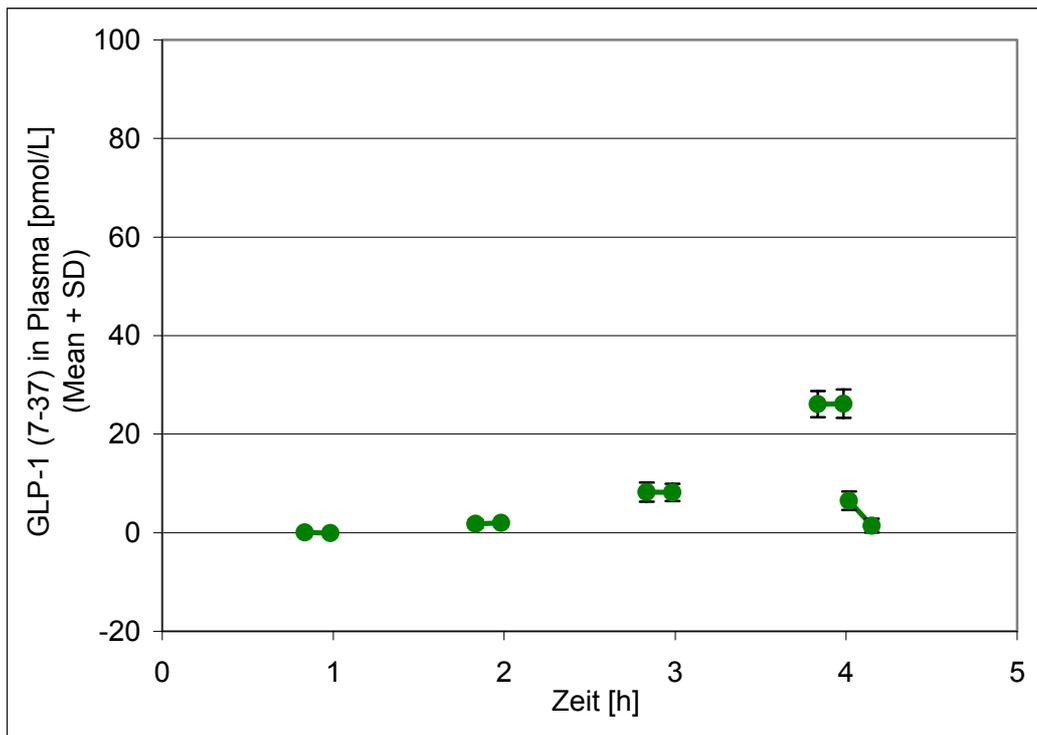


Abb. 9: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel ohne DPP-IV-Hemmung
(mit Korrektur der Basislinie)

Im Weiteren wird daher auf die graphische Darstellung der Originaldaten verzichtet und nur mehr die Daten nach Subtraktion der individuellen Basislinie gezeigt.

GLP-1-(7-37)-Kinetik ohne DPP-IV-Hemmung

Halbwertszeit und mittlere Verweildauer

Die Halbwertszeit von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion ohne parallele DPP-IV-Hemmung betrug im arithmetischen Mittel $0,50 \pm 0,10$ Minuten. Die mittlere Verweildauer (MRT) von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion ohne parallele DPP-IV-Hemmung betrug durchschnittlich $0,73 \pm 0,15$ Minuten. Die mittlere Verweildauer ist die Zeit, die die intakten Moleküle eines Wirkstoffes (die so genannte Muttersubstanz) im Organismus durchschnittlich verweilen. Das Konzept der MRT ist allgemeiner als das der Halbwertszeit.

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Die Clearance von GLP-1 (7-37) ohne parallele DPP-IV-Hemmung ist zu unterscheiden nach der durch die Infusionsrate applizierten Dosis. Die nachfolgende Tabelle (arithmetische Mittel \pm Standardabweichung) gibt Auskunft über die Clearance-Werte (und die V_{ss}-Werte) der jeweiligen Infusionsrate:

<u>Dosis</u>	<u>Clearance</u>	<u>V_{ss}</u>
[(pmol/kg)/h]	[(mL/min)/kg]	[mL/kg]
12	$139,0 \pm 57,0$	
40	$86,3 \pm 18,9$	
120	$72,6 \pm 14,5$	52,8

4.1.1.5 GLP-1-(7-37)-Infusion (GLP-1-Sättigung) ohne DPP-IV-Hemmung

Da die Clearance in Abhängigkeit von der durch die Infusionsrate applizierten Dosis absank, stellte sich die Frage, wie weit diese Absenkung durch exzessive GLP-1-Infusion zu treiben war, genauer gesagt auf welchen Mindestwert die Fähigkeit des Organismus zum Abbau von GLP-1 zu senken war, indem die Degradation gesättigt wurde. Relativ willkürlich wurde für diesen Sättigungsversuch das 2,5-fache und das 5-fache der bislang maximalen Infusionsrate gewählt, also 300 und 1.500 (pmol/kg)/h.

Für diesen Versuch wurden vier Tiere verwendet. Die resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel der Infusionen mit 12, 40, 120, 300 und 1.500 (pmol/kg)/h zeigt die Abbildung 10. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

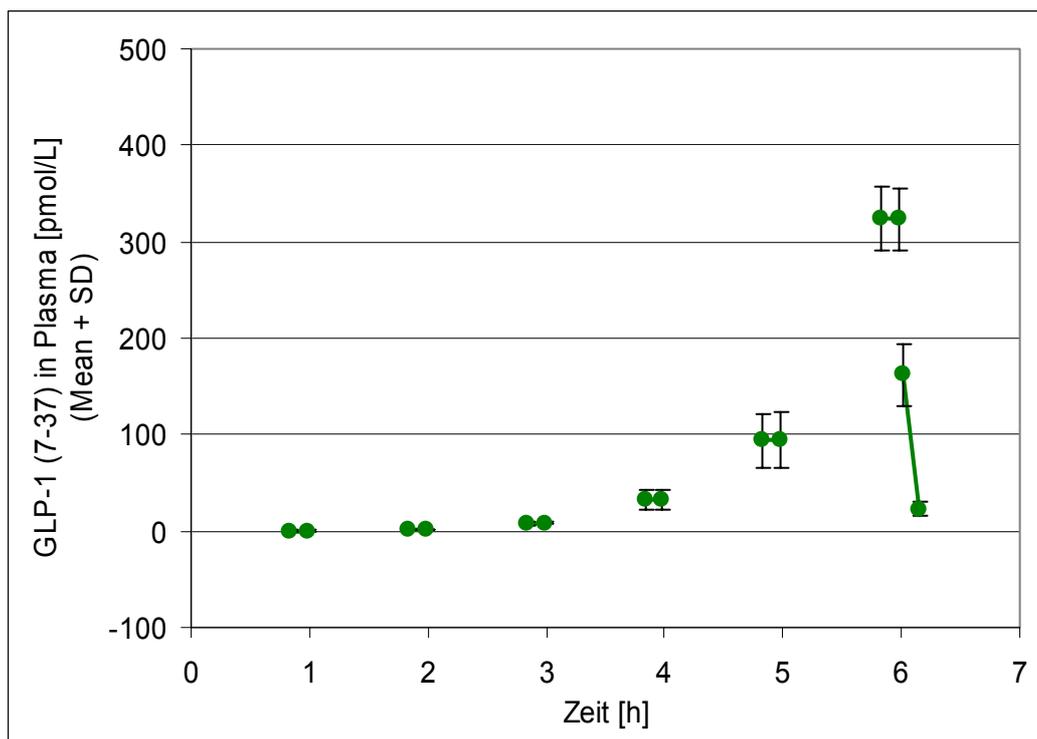


Abb. 10: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit GLP-1-Sättigung ohne DPP-IV-Hemmung (mit Korrektur der Basislinie)

GLP-1-(7-37)-Kinetik (GLP-1-Sättigung) ohne DPP-IV-Hemmung

Halbwertszeit und mittlere Verweildauer

Die Halbwertszeit von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter GLP-1-Sättigung ohne parallele DPP-IV-Hemmung betrug im arithmetischen Mittel $1,00 \pm 0,14$ Minuten. Die mittlere Verweildauer von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter GLP-1-Sättigung ohne parallele DPP-IV-Hemmung betrug durchschnittlich $1,45 \pm 0,21$ Minuten.

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Die Clearance von GLP-1 (7-37) unter GLP-1-Sättigung ohne parallele DPP-IV-Hemmung ist wiederum zu differenzieren nach der durch die Infusionsrate applizierten Dosis. Die exzessiven Infusionsraten 300 und 1.500 (pmol/kg)/h hatten Clearance-Werte von $57,1 \pm 17,4$ und $77,8 \pm 7,8$ (mL/min)/kg zur Folge beziehungsweise zeigten Verteilungsvolumina im Steady-State von 82,6 und 112,6 mL/kg.

4.1.1.6 Berechnung der kinetischen Parameter

Halbwertszeit und mittlere Verweildauer

Die Halbwertszeit wurde berechnet, indem die Werte der letzten drei GLP-1-Plasma-Konzentrationen (0-Minuten-Wert, 1-Minuten-Wert und 9-Minuten-Wert nach Absetzen der Infusion) jedes Infusionsversuchs zur Basis e logarithmiert wurden (natürlicher Logarithmus) und die Steigungskonstante der Funktionsgerade durch diese drei Punkten mit der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k gleichgesetzt wurde. Die Steigungskonstante der Funktion ihrerseits wurde nach der Gleichung $k = \Delta y / \Delta x = (y_1 - y_2) / (x_2 - x_1)$ berechnet. Dabei waren x_1 und x_2 die Zeitpunkte 0 Minuten und 1 Minute nach Absetzen der Infusion, y_1 und y_2 die entsprechenden GLP-1-Plasma-Konzentrationen im natürlichen Logarithmus. Der Zeitpunkt 0 Minuten war der arithmetische Mittelwert der beiden Messpunkte der letzten Infusionsstufe vor Absetzen der Infusion. Aus der Kenntnis der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k folgte nach der Formel $t_{1/2} = \ln(2)/k$ [Derendorf 2002] logisch die Kenntnis der Halbwertszeit als des sekundären kinetischen Parameters. Diese Formel folgt ihrerseits aus der Gleichung $t_{1/2} = (\ln[2] \times V_c) / CL$ [Derendorf 2002], da die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante den Zusammenhang zwischen den beiden primären kinetischen Parametern Clearance und scheinbarem Verteilungsvolumen beschreibt $k = CL/V_d$ [Derendorf 2002]. Da der 9-Minuten-Wert nach Absetzen der Infusion in aller Regel auf das Niveau der Basislinie abgefallen war, wurde die Halbwertszeit im Interesse der Konsistenz der Methode und damit der Vergleichbarkeit der verschiedenen Halbwertszeiten nur aus den ersten beiden Punkten berechnet und schließlich auf die Berücksichtigung des 9-Minuten-Wertes gänzlich verzichtet.

Die mittlere Verweildauer wurde nach der Formel $MRT = 1/k$ [Derendorf 2002] aus derselben Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k errechnet wie die Halbwertszeit. Dementsprechend lieferte ihre Kalkulation keine weitergehende Information.

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Die Clearance wurde nach der Formel $CL = k_0/C_{ss}$ [Gibaldi und Perrier 1982] direkt aus den Plasmaspiegeln an GLP-1 berechnet, also als Quotient aus Infusionsrate und jeweiliger Plasma-Konzentration an GLP-1 im Steady-State zwischen Zufuhr und Abbau. Den Zustand des Fließgleichgewichtes zum Zeitpunkt der Probennahme als erreicht anzusehen, war legitim, da nach den Gesetzen der Pharmakokinetik die Geschwindigkeit des Absinkens einer Wirkstoff-Konzentration nach Absetzen der zuführenden Infusion (constant-rate regimen) identisch ist mit derjenigen Geschwindigkeit, mit welcher das Fließgleichgewicht nach Einsetzen der Infusion erreicht wird [Rowland und Tozer 1995 (a)]. Da nun die Halbwertszeit von GLP-1 nach Absetzen der Infusion so extrem kurz ausfiel, durfte davon ausgegangen werden, dass auch das Steady-State extrem schnell erreicht wurde. Da nach der fünffachen Halbwertszeit in der Pharmakokinetik vereinfacht die vollständige Elimination angenommen wird, durfte folglich nach fünffacher Halbwertszeit auch der Steady-State-Zustand angenommen werden, auf jeden Fall nach dem gewählten Zeitintervall zwischen den Probenahmen.

Das scheinbare Verteilungsvolumen im Steady-State wurde nach der Formel $V_{ss} = CL \times MRT$ [Gibaldi und Perrier 1982] lediglich aus den bereits bekannten Größen Clearance (der letzten GLP-1-Plasmaspiegel vor Absetzen der Infusion) und mittlere Verweildauer abgeleitet.

4.1.2 Glycin-Isoform im Steady-State mit BI- β

4.1.2.1 GLP-1-(7-37)-Infusion mit niedriger DPP-IV-Hemmung (0,6 [$\mu\text{mol/kg}$]/h)

Bei diesem Versuch kamen vier Tiere zur Anwendung. Die aus der applizierten Dosis resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel der GLP-1-(7-37)-Infusionsraten mit 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h mit paralleler BI- β -Infusion in der niedrigen Dosierung von 0,6 ($\mu\text{mol/kg}$)/h zeigt die Abbildung 11. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

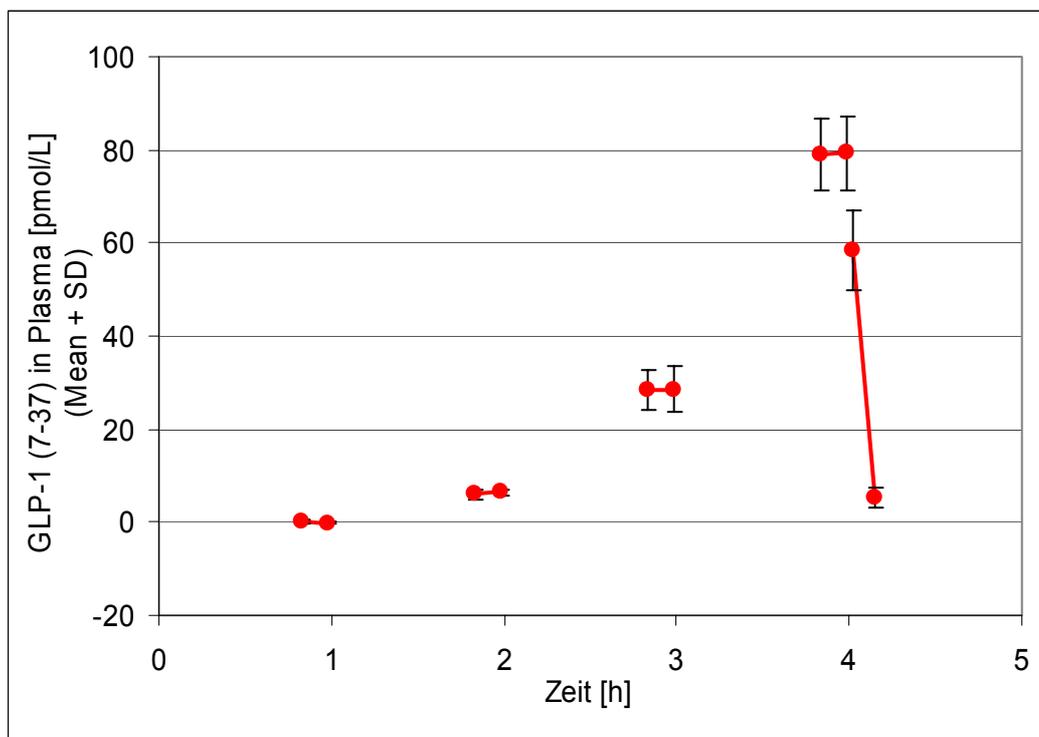


Abb. 11: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit niedriger DPP-IV-Hemmung
(mit Korrektur der Basislinie)

GLP-1-(7-37)-Kinetik unter niedriger DPP-IV-Hemmung

Halbwertszeit und mittlere Verweildauer

Die Halbwertszeit von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter niedriger DPP-IV-Hemmung (0,6 [$\mu\text{mol/kg}$]/h BI- β) betrug im arithmetischen Mittel $2,36 \pm 0,52$ Minuten. Die mittlere Verweildauer von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter niedriger DPP-IV-Hemmung betrug durchschnittlich $3,40 \pm 0,75$ Minuten (Mean \pm SD).

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Auch die Clearance von GLP-1 (7-37) unter niedriger DPP-IV-Hemmung (0,6 [$\mu\text{mol/kg}$]/h BI- β) ist zu differenzieren nach der durch die Infusionsrate applizierten Dosis. Die nachfolgende Tabelle (arithmetische Mittel \pm Standardabweichung) gibt Auskunft über die Clearance-Werte (und die V_{ss} -Werte) der jeweiligen Infusionsrate:

<u>Dosis</u>	<u>Clearance</u>	<u>V_{ss}</u>
[($\mu\text{mol/kg}$)/h]	[(mL/min)/kg]	[mL/kg]
12	$32,8 \pm 5,0$	
40	$24,0 \pm 4,4$	
120	$25,5 \pm 2,4$	86,6

BI- β -Plasmaspiegel durch niedrige DPP-IV-Hemmung

Die aus der Kombination von einem initialen Bolus von 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ und einer Dauerinfusion von 0,6 ($\mu\text{mol/kg}$)/h resultierende Plasma-Konzentration an BI- β im Verlaufe der Parallelinfusion mit GLP-1 (7-37) zeigt die Abbildung 12. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

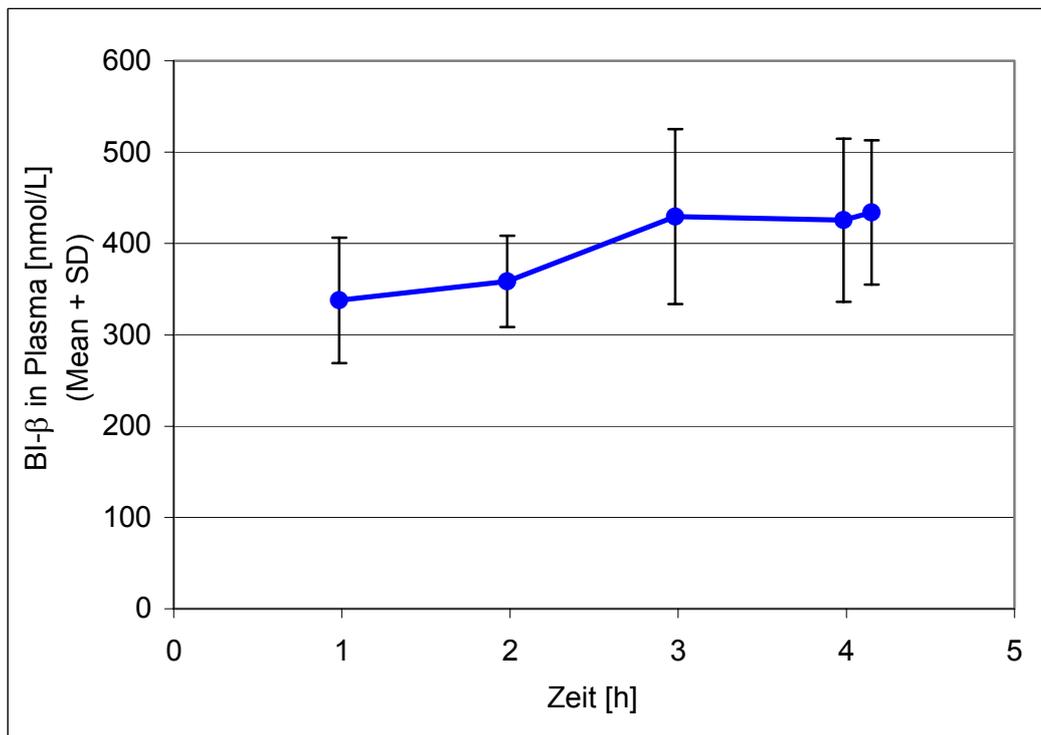


Abb. 12: BI- β -Plasmaspiegel durch niedrige DPP-IV-Hemmung
(600 [nmol/kg]/h)

4.1.2.2 GLP-1-(7-37)-Infusion mit mittlerer DPP-IV-Hemmung (2,0 [μmol/kg]/h)

Bei diesem Versuch kamen fünf Tiere zur Anwendung. Die aus der applizierten Dosis resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel der GLP-1-(7-37)-Infusionsraten mit 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h mit paralleler BI-β-Infusion in der mittleren Dosierung von 2,0 (μmol/kg)/h zeigt die Abbildung 13. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

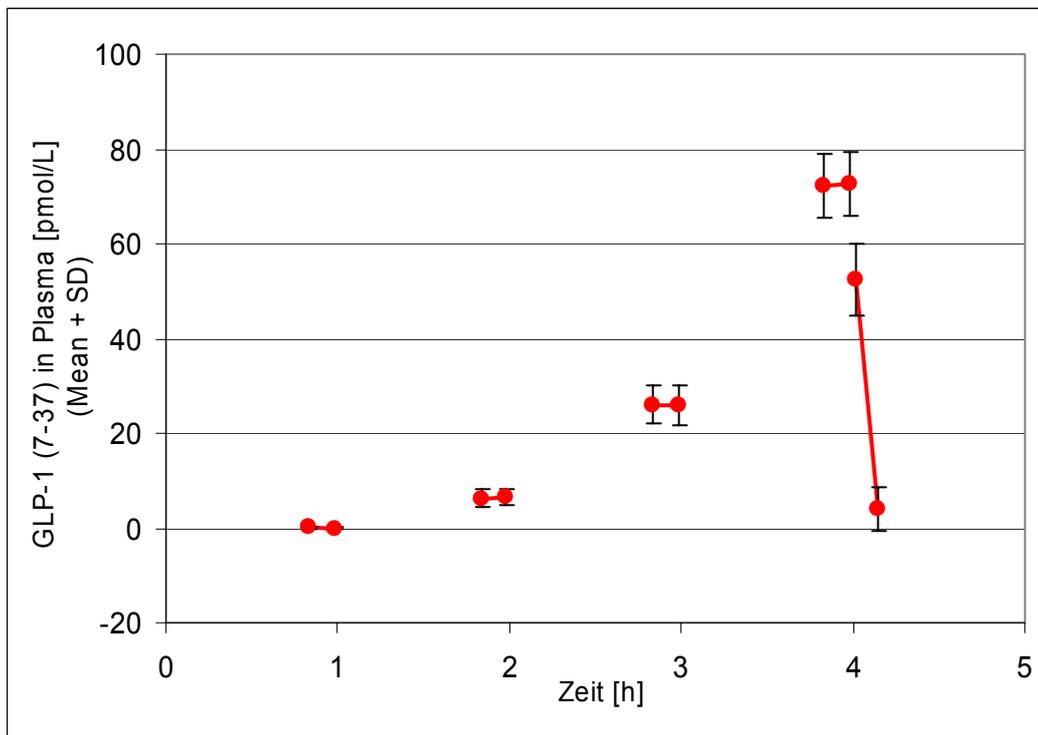


Abb. 13: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit mittlerer DPP-IV-Hemmung (mit Korrektur der Basislinie)

GLP-1-(7-37)-Kinetik unter mittlerer DPP-IV-Hemmung

Halbwertszeit und mittlere Verweildauer

Die Halbwertszeit von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter mittlerer DPP-IV-Hemmung (2,0 [µmol/kg]/h BI-β) betrug im arithmetischen Mittel $2,24 \pm 0,58$ Minuten. Die mittlere Verweildauer von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter mittlerer DPP-IV-Hemmung betrug durchschnittlich $3,23 \pm 0,83$ Minuten.

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Auch die Clearance von GLP-1 (7-37) unter mittlerer DPP-IV-Hemmung (2,0 [µmol/kg]/h BI-β) ist zu differenzieren nach der durch die Infusionsrate applizierten Dosis. Die nachfolgende Tabelle (arithmetische Mittel ± Standardabweichung) gibt Auskunft über die Clearance-Werte (und die V_{ss}-Werte) der jeweiligen Infusionsrate:

<u>Dosis</u>	<u>Clearance</u>	<u>V_{ss}</u>
[(pmol/kg)/h]	[(mL/min)/kg]	[mL/kg]
12	$34,0 \pm 12,2$	
40	$26,2 \pm 4,7$	
120	$27,8 \pm 2,6$	89,6

BI- β -Plasmaspiegel durch mittlere DPP-IV-Hemmung

Die aus der Kombination von einem initialen Bolus von 1,0 $\mu\text{mol/kg}$ und einer Dauerinfusion von 2,0 ($\mu\text{mol/kg}$)/h resultierende Plasma-Konzentration an BI- β im Verlaufe der Parallelinfusion mit GLP-1 (7-37) zeigt die Abbildung 14. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

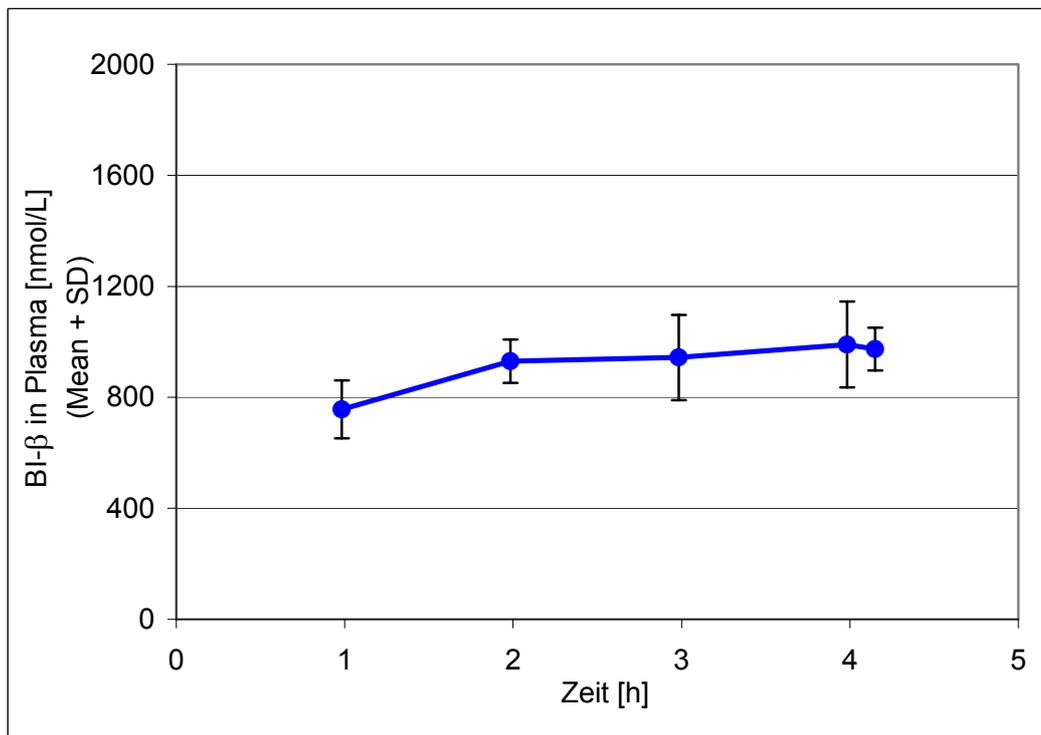


Abb. 14: BI- β -Plasmaspiegel durch mittlere DPP-IV-Hemmung
(2.000 [nmol/kg]/h)

4.1.2.3 GLP-1-(7-37)-Infusion mit hoher DPP-IV-Hemmung (6,0 [$\mu\text{mol/kg}$]/h)

Bei diesem Versuch kamen vier Tiere zur Anwendung. Die aus der applizierten Dosis resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel der GLP-1-(7-37)-Infusionsraten mit 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h mit paralleler BI- β -Infusion in der hohen Dosierung von 6,0 ($\mu\text{mol/kg}$)/h zeigt die Abbildung 15. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

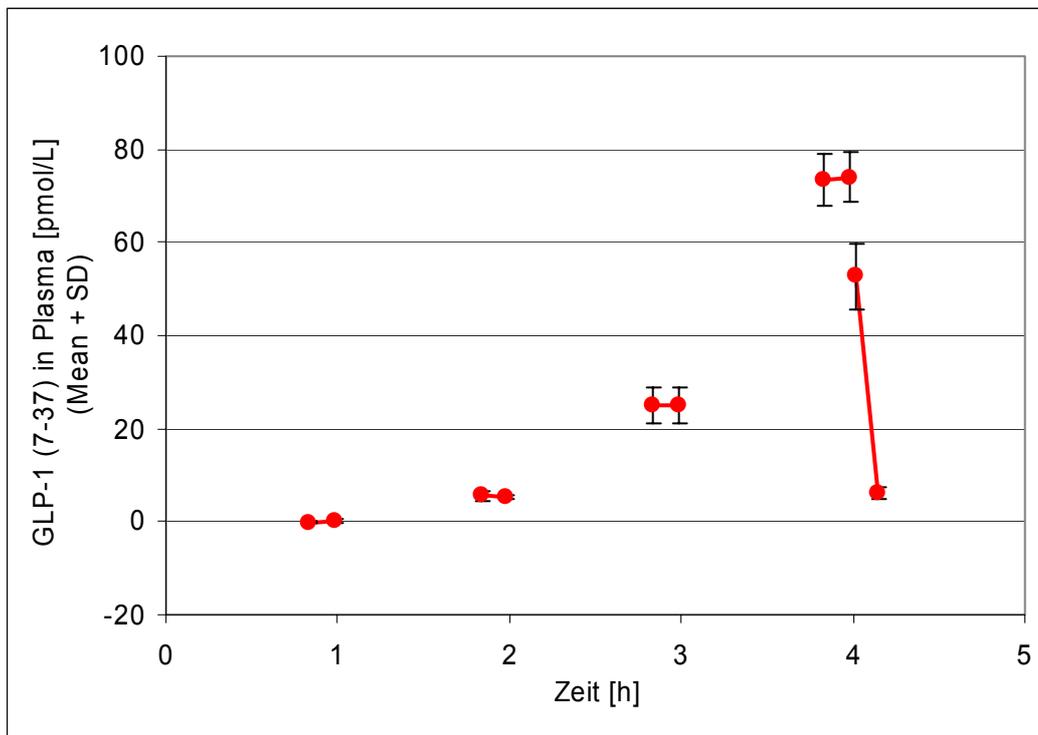


Abb. 15: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit hoher DPP-IV-Hemmung
(mit Korrektur der Basislinie)

GLP-1-(7-37)-Kinetik unter hoher DPP-IV-Hemmung

Halbwertszeit und mittlere Verweildauer

Die Halbwertszeit von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter hoher DPP-IV-Hemmung (6,0 [µmol/kg]/h BI-β) betrug im arithmetischen Mittel $2,12 \pm 0,48$ Minuten. Die mittlere Verweildauer von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter hoher DPP-IV-Hemmung betrug durchschnittlich $3,06 \pm 0,70$ Minuten.

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Auch die Clearance von GLP-1 (7-37) unter hoher DPP-IV-Hemmung (6,0 [µmol/kg]/h BI-β) ist zu differenzieren nach der durch die Infusionsrate applizierten Dosis. Die nachfolgende Tabelle (arithmetische Mittel ± Standardabweichung) gibt Auskunft über die Clearance-Werte (und die V_{ss}-Werte) der jeweiligen Infusionsrate:

<u>Dosis</u>	<u>Clearance</u>	<u>V_{ss}</u>
[(pmol/kg)/h]	[(mL/min)/kg]	[mL/kg]
12	$36,6 \pm 4,2$	
40	$27,2 \pm 3,9$	
120	$27,2 \pm 1,9$	83,3

BI- β -Plasmaspiegel durch hohe DPP-IV-Hemmung

Die aus der Kombination von einem initialen Bolus von 3,0 $\mu\text{mol/kg}$ und einer Dauerinfusion von 6,0 ($\mu\text{mol/kg}$)/h resultierende Plasma-Konzentration an BI- β im Verlaufe der Parallelinfusion mit GLP-1 (7-37) zeigt die Abbildung 16. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

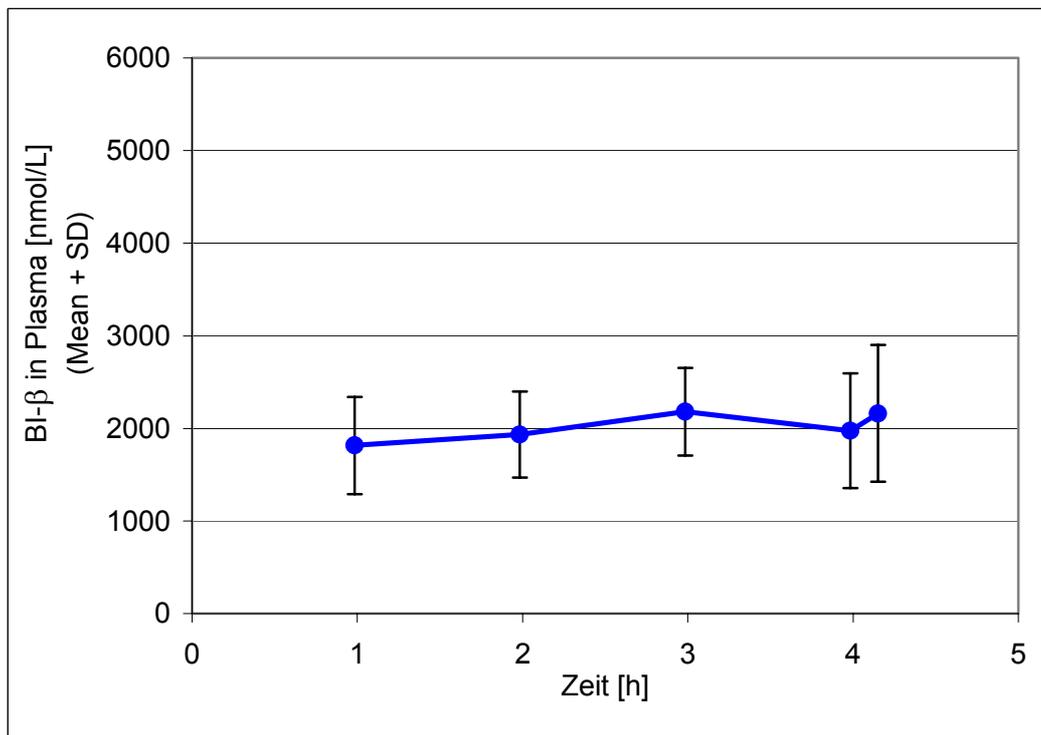


Abb. 16: BI- β -Plasmaspiegel durch hohe DPP-IV-Hemmung
(6.000 [nmol/kg]/h)

4.1.2.4 GLP-1-(7-37)-Infusion mit sub-niedriger DPP-IV-Hemmung (0,1 [µmol/kg]/h)

Da die Halbwertszeit selbst unter hoher DPP-IV-Hemmung nicht weiter verlängert wurde, sondern tendenziell eher wieder abfiel, lag der Schluss nahe, dass möglicherweise bereits die maximale Wirkung mit mittlerer DPP-IV-Hemmung erreicht war. Auch die Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel schienen von der Dosis des Hemmstoffs insofern unabhängig zu sein, dass keine deutliche Dosis-Wirkungs-Relation erkennbar war, sondern lediglich eine Art „Ja/Nein-Antwort“ (mit Hemmstoff/ohne Hemmstoff) zu erhalten war. Daher wurden die Versuche mit weiteren, noch niedrigeren BI-β-Dosen wiederholt, nämlich mit der „sub-niedrigen“ DPP-IV-Hemmung durch 0,1 (µmol/kg)/h BI-β und mit der „niedrigsten“ DPP-IV-Hemmung durch 0,01 (µmol/kg)/h BI-β.

Diesem Versuch wurden vier Tiere unterzogen. Die aus der applizierten Dosis resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel der GLP-1-(7-37)-Infusionsraten mit 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h mit paralleler BI-β-Infusion in der sub-niedrigen Dosierung von 0,6 (µmol/kg)/h zeigt die Abbildung 17. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

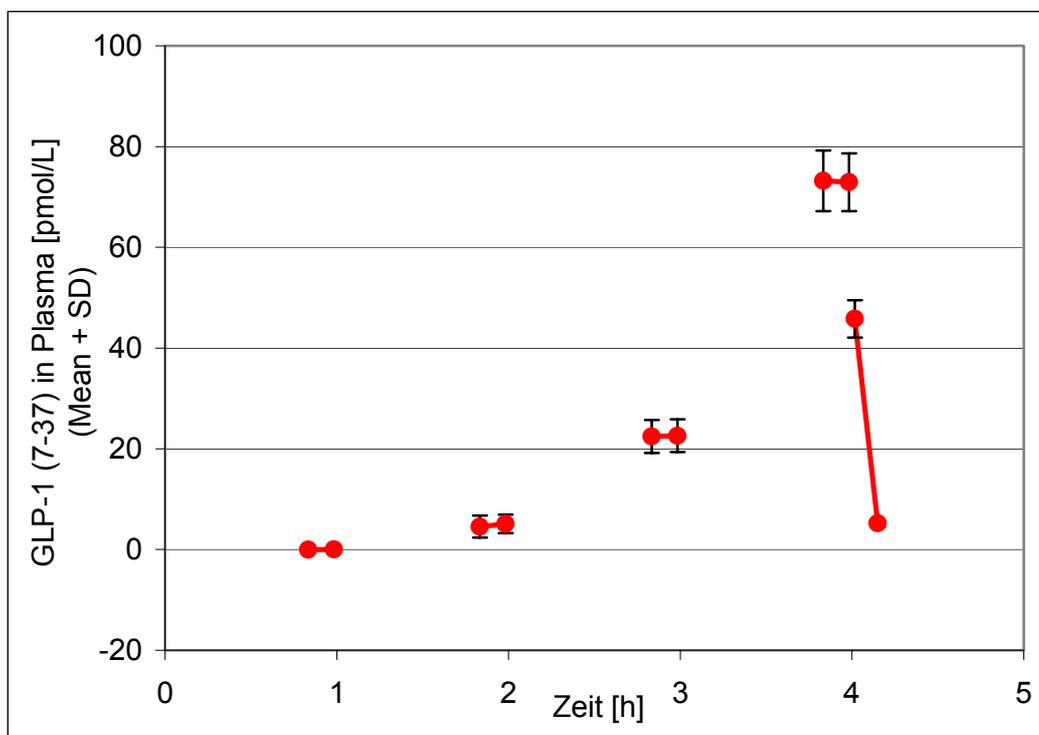


Abb. 17: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit sub-niedriger DPP-IV-Hemmung (mit Korrektur der Basislinie)

GLP-1-(7-37)-Kinetik unter sub-niedriger DPP-IV-Hemmung

Halbwertszeit und mittlere Verweildauer

Die Halbwertszeit von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter sub-niedriger DPP-IV-Hemmung (0,1 [µmol/kg]/h BI-β) betrug im arithmetischen Mittel $1,55 \pm 0,39$ Minuten. Die mittlere Verweildauer von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter sub-niedriger DPP-IV-Hemmung betrug durchschnittlich $2,24 \pm 0,56$ Minuten.

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Auch die Clearance von GLP-1 (7-37) unter sub-niedriger DPP-IV-Hemmung (0,1 [µmol/kg]/h BI-β) ist zu differenzieren nach der durch die Infusionsrate applizierten Dosis. Die nachfolgende Tabelle (arithmetische Mittel ± Standardabweichung) gibt Auskunft über die Clearance-Werte (und die V_{ss}-Werte) der jeweiligen Infusionsrate:

<u>Dosis</u>	<u>Clearance</u>	<u>V_{ss}</u>
[(pmol/kg)/h]	[(mL/min)/kg]	[mL/kg]
12	$46,2 \pm 15,1$	
40	$30,1 \pm 4,8$	
120	$27,5 \pm 2,3$	61,7

BI- β -Plasmaspiegel durch sub-niedrige DPP-IV-Hemmung

Die aus der Kombination von einem initialen Bolus von 0,05 $\mu\text{mol/kg}$ und einer Dauerinfusion von 0,1 ($\mu\text{mol/kg}$)/h resultierende Plasma-Konzentration an BI- β im Verlaufe der Parallelinfusion mit GLP-1 (7-37) zeigt die Abbildung 18. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

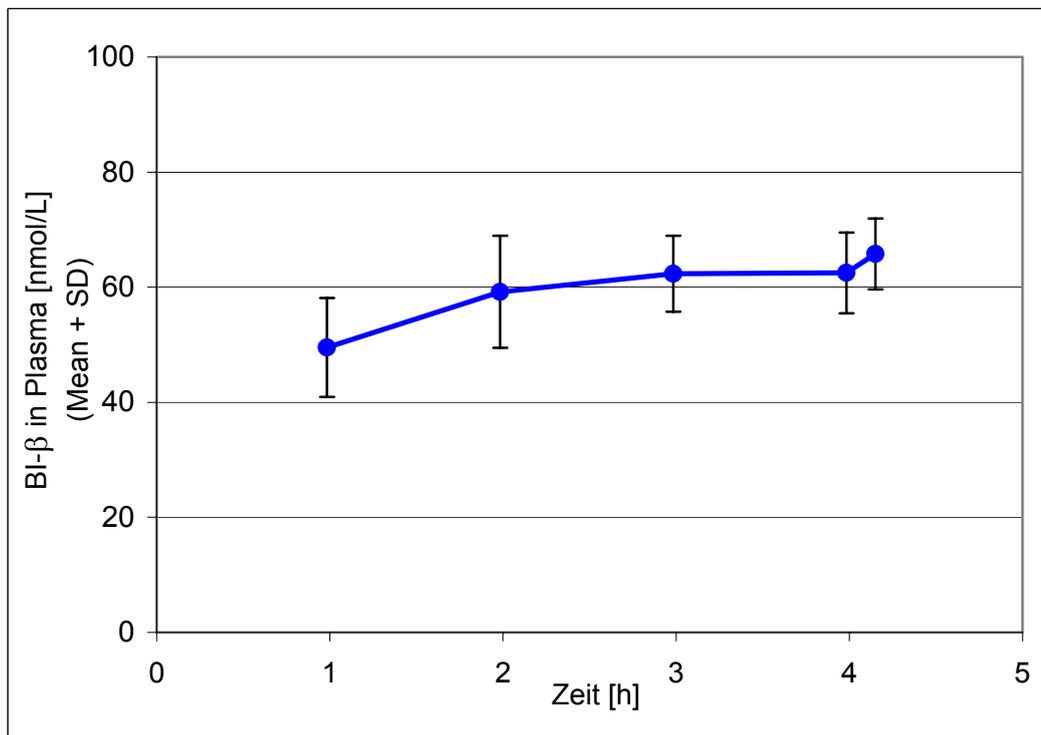


Abb. 18: BI- β -Plasmaspiegel durch sub-niedrige DPP-IV-Hemmung
(100 [nmol/kg]/h)

4.1.2.5 GLP-1-(7-37)-Infusion mit niedrigster DPP-IV-Hemmung (0,01 [$\mu\text{mol/kg}$]/h)

Diesem Versuch wurden sieben Tiere unterzogen. Diese im Vergleich zu den übrigen Steady-State-Infusionsversuchen erhöhte Tierzahl wurde vorsorglich im Sinne einer Sicherheitsmarge eingesetzt, weil damit gerechnet werden musste, dass die aus der BI- β -Infusion resultierenden Inhibitor-Plasmaspiegel im Bereich der analytischen Bestimmungsgrenze (LOQ) von 1 nmol/L liegen würden (vergleiche 3.3.6).

Die aus der applizierten Dosis resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel der GLP-1-(7-37)-Infusionsraten mit 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h mit paralleler BI- β -Infusion in der niedrigsten Dosierung von 0,01 ($\mu\text{mol/kg}$)/h zeigt die Abbildung 19. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

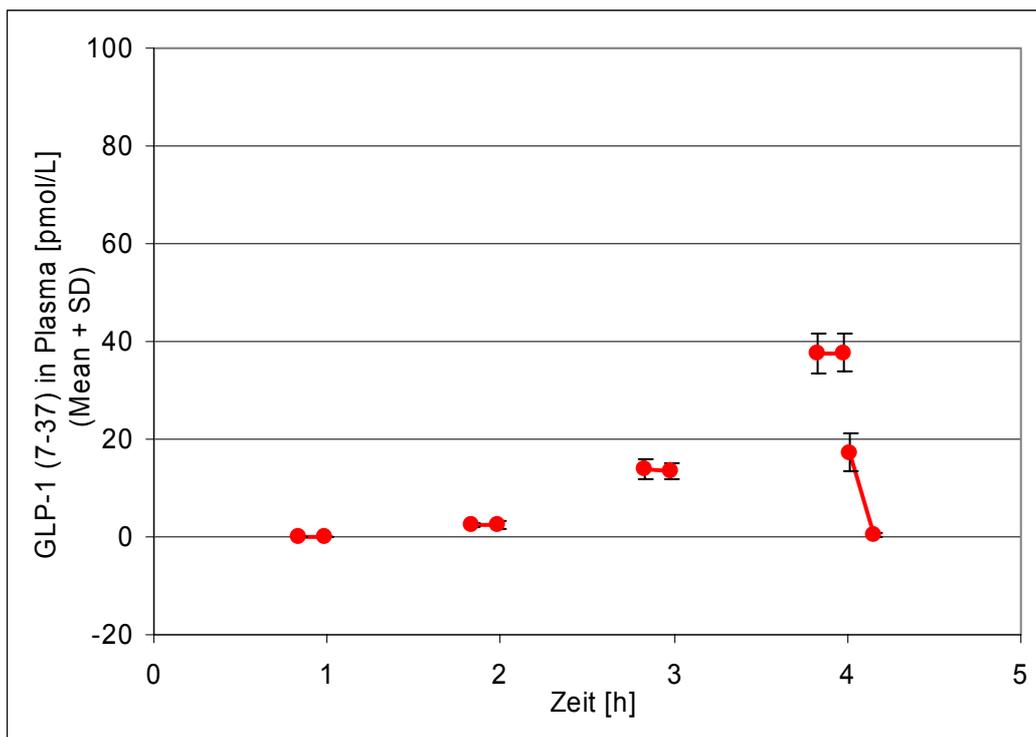


Abb. 19: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit niedrigster DPP-IV-Hemmung (mit Korrektur der Basislinie)

GLP-1-(7-37)-Kinetik unter niedrigster DPP-IV-Hemmung

Halbwertszeit und mittlere Verweildauer

Die Halbwertszeit von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter niedrigster DPP-IV-Hemmung (0,01 [$\mu\text{mol/kg}$]/h BI- β) betrug im arithmetischen Mittel $0,89 \pm 0,13$ Minuten. Die mittlere Verweildauer von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter niedrigster DPP-IV-Hemmung betrug durchschnittlich $1,29 \pm 0,18$ Minuten.

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Auch die Clearance von GLP-1 (7-37) unter niedrigster DPP-IV-Hemmung (0,01 [$\mu\text{mol/kg}$]/h BI- β) ist zu differenzieren nach der durch die Infusionsrate applizierten Dosis. Die nachfolgende Tabelle (arithmetische Mittel \pm Standardabweichung) gibt Auskunft über die Clearance-Werte (und die V_{ss} -Werte) der jeweiligen Infusionsrate:

<u>Dosis</u>	<u>Clearance</u>	<u>V_{ss}</u>
[($\mu\text{mol/kg}$)/h]	[(mL/min)/kg]	[mL/kg]
12	$84,0 \pm 14,8$	
40	$49,3 \pm 5,6$	
120	$53,6 \pm 5,6$	69,1

BI- β -Plasmaspiegel durch niedrigste DPP-IV-Hemmung

Die aus der Kombination von einem initialen Bolus von 0,005 $\mu\text{mol/kg}$ und einer Dauerinfusion von 0,01 ($\mu\text{mol/kg}$)/h resultierende Plasma-Konzentration an BI- β im Verlaufe der Parallelinfusion mit GLP-1 (7-37) zeigt die Abbildung 20. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

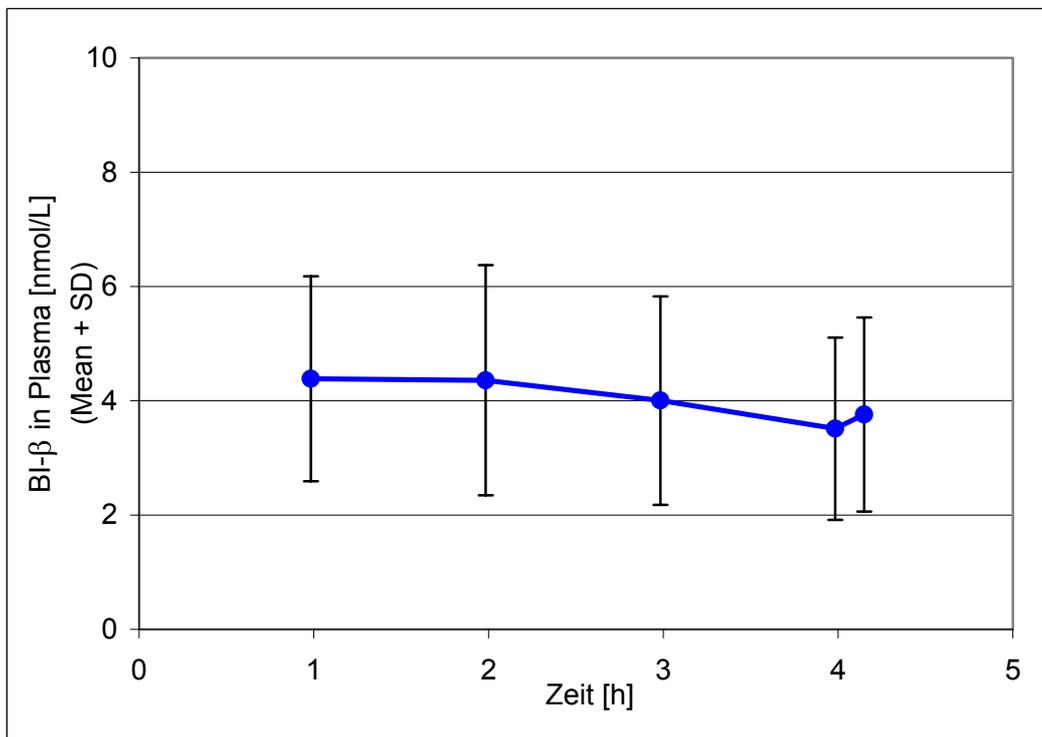


Abb. 20: BI- β -Plasmaspiegel durch niedrigste DPP-IV-Hemmung
(10 [nmol/kg]/h)

4.1.2.6 Zusammenfassung der Wirkungen verschiedener DPP-IV-Hemmungsgrade

Einen Überblick über die arithmetisch gemittelten Plasmaspiegel der GLP-1-(7-37)-Infusionsraten mit 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h, die aus den Infusionsregimen ohne parallele DPP-IV-Hemmung, mit niedrigster, sub-niedriger, niedriger, mittlerer und hoher DPP-IV-Hemmung durch BI- β resultierten, zeigt die Abbildung 21.

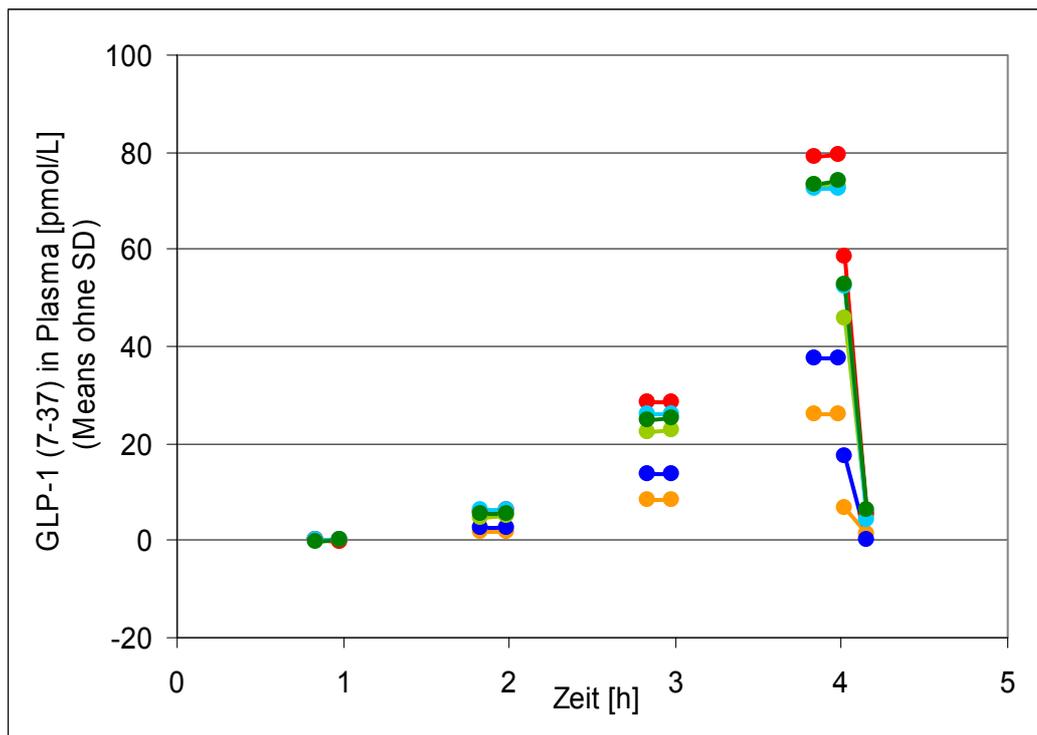


Abb. 21: Zusammenfassung – arithmetische Mittelwerte der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel ohne und mit niedrigster, sub-niedriger, niedriger, mittlerer und hoher DPP-IV-Hemmung (mit Korrektur der Basislinie)

[hellrot = ohne BI- β , dunkelblau = mit niedrigster BI- β -Dosis,
hellgrün = mit sub-niedriger BI- β -Dosis, dunkelrot = mit niedriger BI- β -Dosis,
hellblau = mit mittlerer BI- β -Dosis, dunkelgrün = mit hoher BI- β -Dosis]

In dieser Darstellung deutete sich bereits an, dass die stärkste Steigerung des resultierenden Plasmaspiegels an GLP-1 (7-37) nicht durch die hohe DPP-IV-Hemmung durch die BI- β -Dosis von 6,0 (pmol/kg)/h erreicht wurde, sondern schon durch die niedrige DPP-IV-Hemmung, also durch die BI- β -Dosis von 0,6 (pmol/kg)/h.

4.1.2.7 GLP-1-(7-37)-Infusion (GLP-1-Sättigung) mit mittlerer DPP-IV-Hemmung

Zum Vergleich der Auswirkung der DPP-IV-Hemmung auf die Halbwertszeit von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion von exzessiven GLP-1-Dosen wurde der Versuch 4.1.1.5 mit paralleler DPP-IV-Hemmung in mittlerer Dosierung wiederholt, wovon ein noch deutlicheres Absinken der Clearance als durch GLP-1-Sättigung allein oder durch mittlere DPP-IV-Hemmung allein erwartet wurde.

Für diesen Versuch wurden vier Tiere verwendet. Die aus der applizierten Dosis resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel der GLP-1-(7-37)-Infusionsraten mit 12, 40, 120, 300 und 1.500 (pmol/kg)/h mit paralleler BI- β -Infusion in der mittleren Dosierung von 2,0 ($\mu\text{mol/kg}$)/h zeigt die Abbildung 22. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

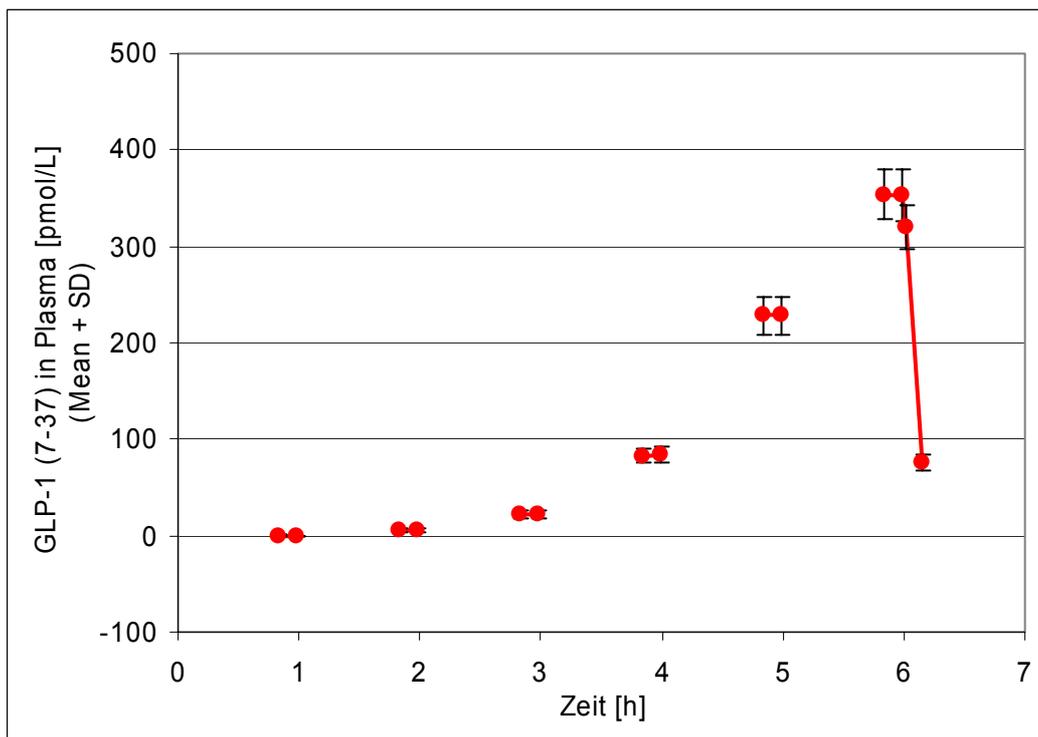


Abb. 22: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit GLP-1-Sättigung und mittlerer DPP-IV-Hemmung (mit Korrektur der Basislinie)

GLP-1-(7-37)-Kinetik (GLP-1-Sättigung) unter mittlerer DPP-IV-Hemmung

Halbwertszeit und mittlere Verweildauer

Die Halbwertszeit von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter GLP-1-Sättigung und unter mittlerer DPP-IV-Hemmung (2,0 [µmol/kg]/h BI-β) betrug im arithmetischen Mittel $7,02 \pm 0,27$ Minuten. Die mittlere Verweildauer von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion unter GLP-1-Sättigung und unter mittlerer DPP-IV-Hemmung betrug durchschnittlich $10,13 \pm 0,39$ Minuten.

Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State

Die Clearance von GLP-1 (7-37) unter GLP-1-Sättigung und unter mittlerer DPP-IV-Hemmung (2,0 [µmol/kg]/h BI-β) ist wiederum zu differenzieren nach der durch die Infusionsrate applizierten Dosis. Die nachfolgende Tabelle (arithmetische Mittel ± Standardabweichung) gibt Auskunft über die Clearance-Werte (und die V_{ss}-Werte) der jeweiligen Infusionsrate:

<u>Dosis</u>	<u>Clearance</u>	<u>V_{ss}</u>
[(pmol/kg)/h]	[(mL/min)/kg]	[mL/kg]
12	$44,9 \pm 16,1$	
40	$31,2 \pm 5,3$	
120	$24,2 \pm 2,5$	
300	$22,0 \pm 2,0$	
1.500	$71,0 \pm 5,5$	719,4

BI- β -Plasmaspiegel (GLP-1-Sättigung) durch mittlere DPP-IV-Hemmung

Die aus der Kombination von einem initialen Bolus von 1,0 $\mu\text{mol/kg}$ und einer Dauerinfusion von 2,0 ($\mu\text{mol/kg}$)/h resultierende Plasma-Konzentration an BI- β im Verlaufe der Parallelinfusion mit GLP-1 (7-37) zeigt die Abbildung 23. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

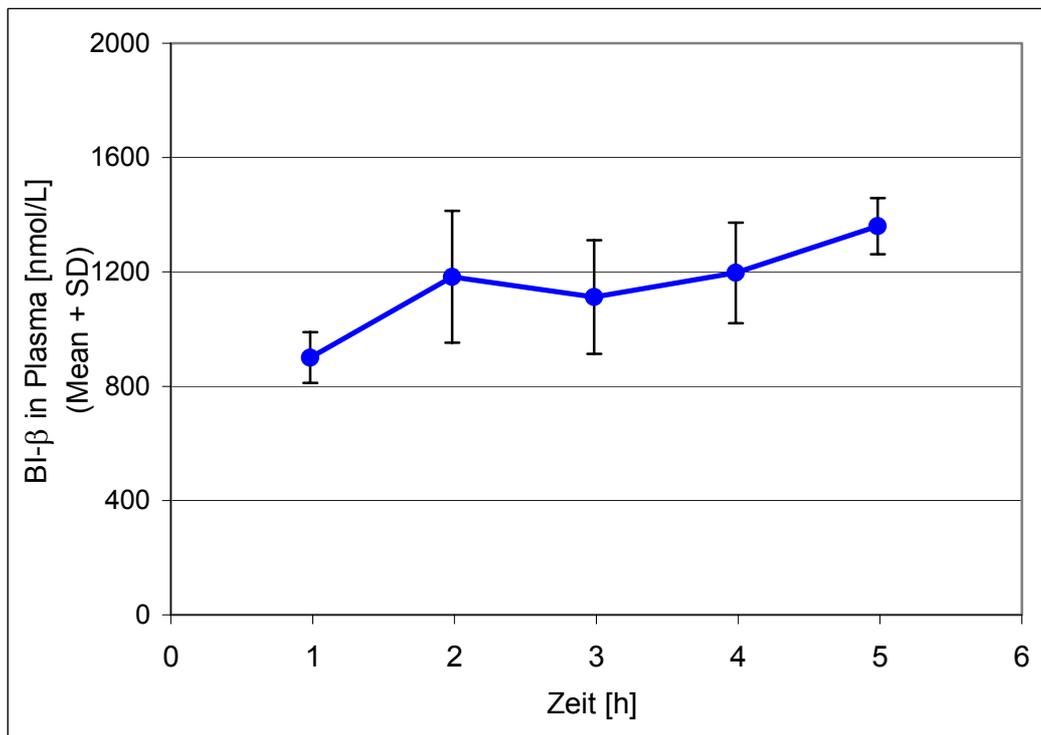


Abb. 23: BI- β -Plasmaspiegel bei GLP-1-Sättigung durch mittlere DPP-IV-Hemmung
(2.000 [nmol/kg]/h)

4.1.2.8 Zusammenfassung der Wirkung der DPP-IV-Hemmung bei GLP-1-Sättigung

Einen Überblick über die arithmetisch gemittelten Plasmaspiegel der GLP-1-(7-37)-Infusionsraten mit 12, 40, 120, 300 und 1.500 (pmol/kg)/h, also unter GLP-1-Sättigung, die aus den Infusionsregimen ohne parallele DPP-IV-Hemmung und mit mittlerer DPP-IV-Hemmung durch BI- β (2.000 [nmol/kg]/h) resultierten, zeigt die Abbildung 24. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

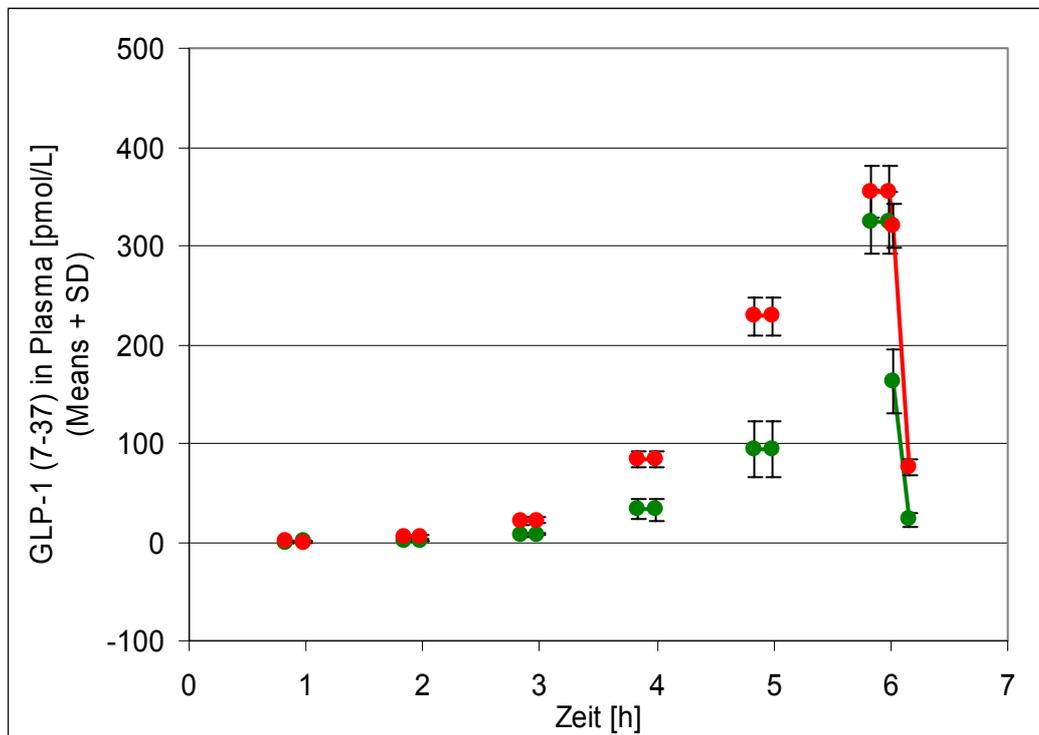


Abb. 24: Zusammenfassung – arithmetische Mittel der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel bei GLP-1-Sättigung ohne und mit mittlerer DPP-IV-Hemmung
[rot = GLP-1 (7-37) mit GLP-1-Sättigung und mittlerer DPP-IV-Hemmung,
grün = GLP-1 (7-37) mit GLP-1-Sättigung ohne DPP-IV-Hemmung]

4.1.2.9 Steigerungsfaktoren verschiedener GLP-1-Plasmaspiegel durch DPP-IV-Hemmung

Die Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel im Fließgleichgewicht, das heißt der Quotient aus dem geometrischen Mittel der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel einer bestimmten Infusionsstufe (0, 12, 40 oder 120 [pmol/h]/kg) unter einem bestimmten DPP-IV-Hemmungsgrad (niedrigste, sub-niedrige, niedrige, mittlere und hohe DPP-IV-Hemmung) und dem geometrischen Mittel der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel derselben Infusionsstufe ohne parallele DPP-IV-Hemmung, erwies sich neben den kinetischen Parametern als interessante Größe zur Charakterisierung der Wirkung des DPP-IV-Inhibitors BI-β. Der geometrischen Mittelung wurde der Vorzug vor der arithmetischen gegeben, um einer zu starken Gewichtung einzelner, das heißt von der Schar der übrigen Werte deutlich abweichender Werte entgegenzuwirken.

Die Unterschiede zwischen den resultierenden GLP-1-Plasmaspiegeln in Abhängigkeit von der Infusionsrate an exogenem GLP-1, die der Berechnung der Steigerungsfaktoren zu Grunde liegen, waren signifikant im Falle des Unterschieds zwischen den GLP-1-Infusionsraten 12 (pmol/kg)/h und 40 (pmol/kg)/h ($p = 0,006$), im Falle des Unterschieds zwischen den GLP-1-Infusionsraten 40 (pmol/kg)/h und 120 (pmol/kg)/h ($p < 0,003$), im Falle des Unterschieds zwischen den GLP-1-Infusionsraten 120 (pmol/kg)/h und 300 (pmol/kg)/h ($p < 0,003$) sowie im Falle des Unterschieds zwischen den GLP-1-Infusionsraten 300 (pmol/kg)/h und 1.500 (pmol/kg)/h ($p < 0,003$). Diese p-Werte sind jeweils adjustiert (Korrektur nach Bonferroni-Holm).

Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch 12 (pmol/h)/kg-Infusion

Die Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch die Infusion von 12 (pmol/h)/kg, das heißt die relative Erhöhung der GLP-1-Plasmaspiegel durch parallele Infusion des DPP-IV-Inhibitors BI- β , berechnet als der Quotient aus dem geometrischen Mittel der GLP-1-Plasmaspiegel zu den Zeitpunkten 1,833 h (110 min) und 1,983 h (119 min) unter der niedrigsten (4.1.2.5), der sub-niedrigen (4.1.2.4), der niedrigen (4.1.2.1), der mittleren (4.1.2.2) beziehungsweise der hohen DPP-IV-Hemmung (4.1.2.3) und dem geometrischen Mittel der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel zu denselben Zeitpunkten ohne parallele DPP-IV-Hemmung (4.1.1.4 und 4.1.1.5) zeigt die Abbildung 25.

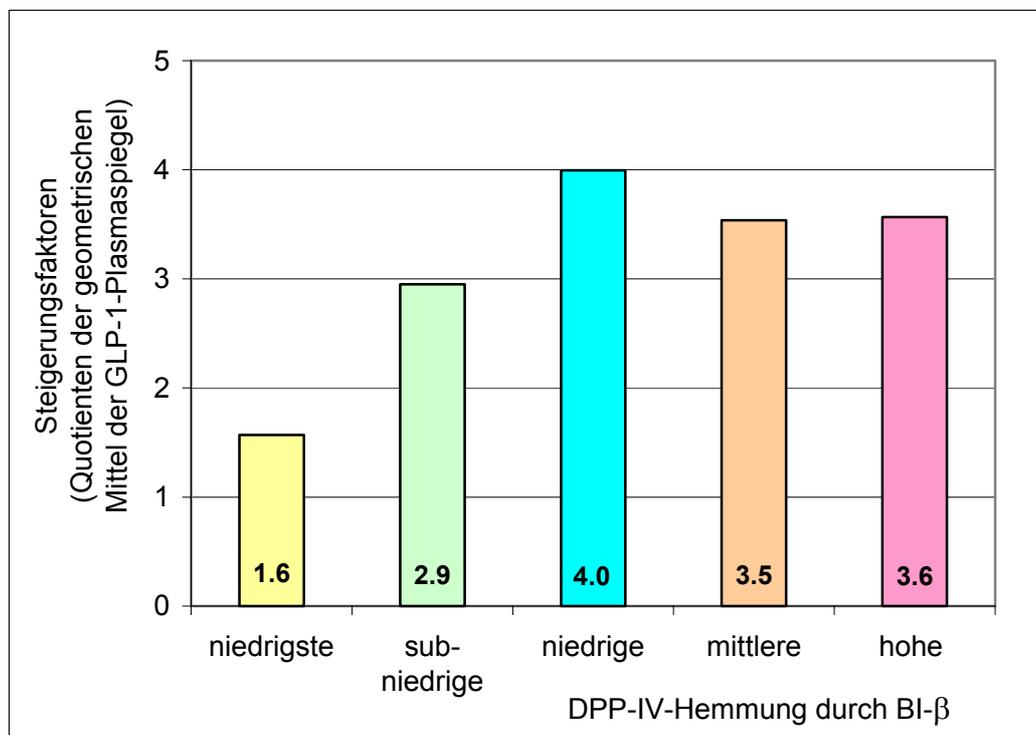


Abb. 25: Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch 12 (pmol/h)/kg-Infusion unter verschiedenen DPP-IV-Hemmungsgraden

Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch 40 (pmol/h)/kg-Infusion

Die Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch die Infusion von 40 (pmol/h)/kg, das heißt der Quotient aus dem geometrischen Mittel der GLP-1-Plasmaspiegel zu den Zeitpunkten 2,833 h (170 min) und 2,983 h (179 min) unter der niedrigsten (4.1.2.5), sub-niedrigen (4.1.2.4), niedrigen (4.1.2.1), mittleren (4.1.2.2) und hohen DPP-IV-Hemmung (4.1.2.3) und dem geometrischen Mittel der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel zu denselben Zeitpunkten ohne parallele DPP-IV-Hemmung (4.1.1.4 und 4.1.1.5) zeigt die Abbildung 26.

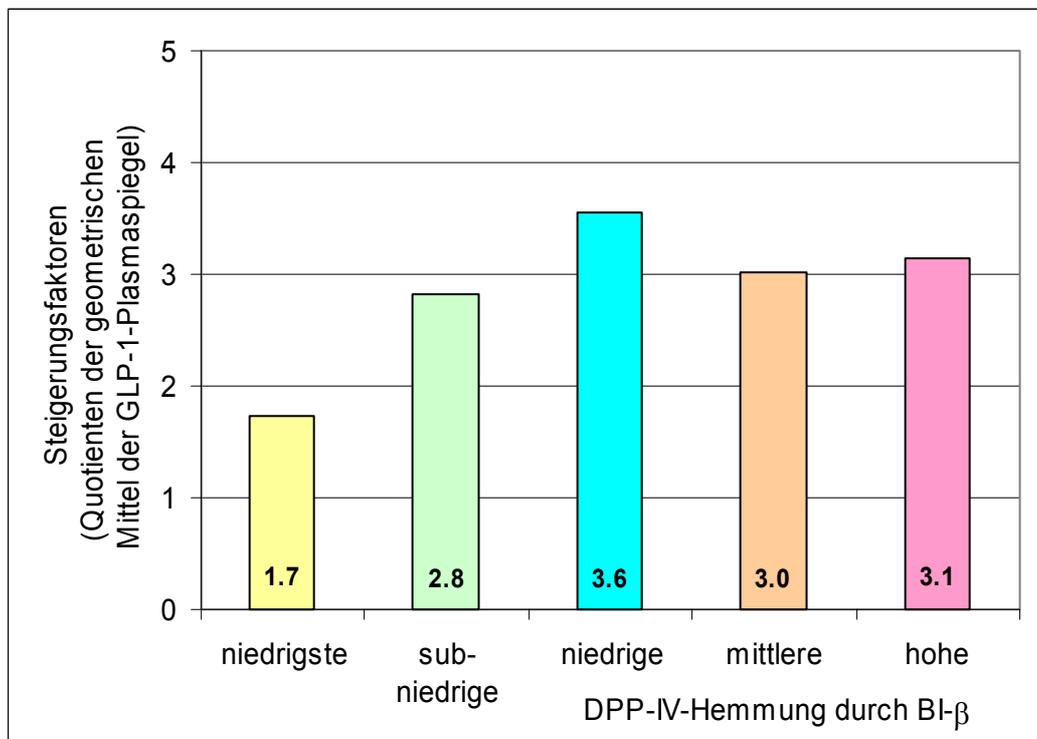


Abb. 26: Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch 40 (pmol/h)/kg-Infusion unter verschiedenen DPP-IV-Hemmungsgraden

Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch 120 (pmol/h)/kg-Infusion

Die Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch die Infusion von 120 (pmol/h)/kg, das heißt der Quotient aus dem geometrischen Mittel der GLP-1-Plasmaspiegel zu den Zeitpunkten 3,833 h (230 min) und 3,983 h (239 min) unter der niedrigsten (4.1.2.5), sub-niedrigen (4.1.2.4), niedrigen (4.1.2.1), mittleren (4.1.2.2) und hohen DPP-IV-Hemmung (4.1.2.3) und dem geometrischen Mittel der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel zu denselben Zeitpunkten ohne parallele DPP-IV-Hemmung (4.1.1.4 und 4.1.1.5) zeigt die Abbildung 27.

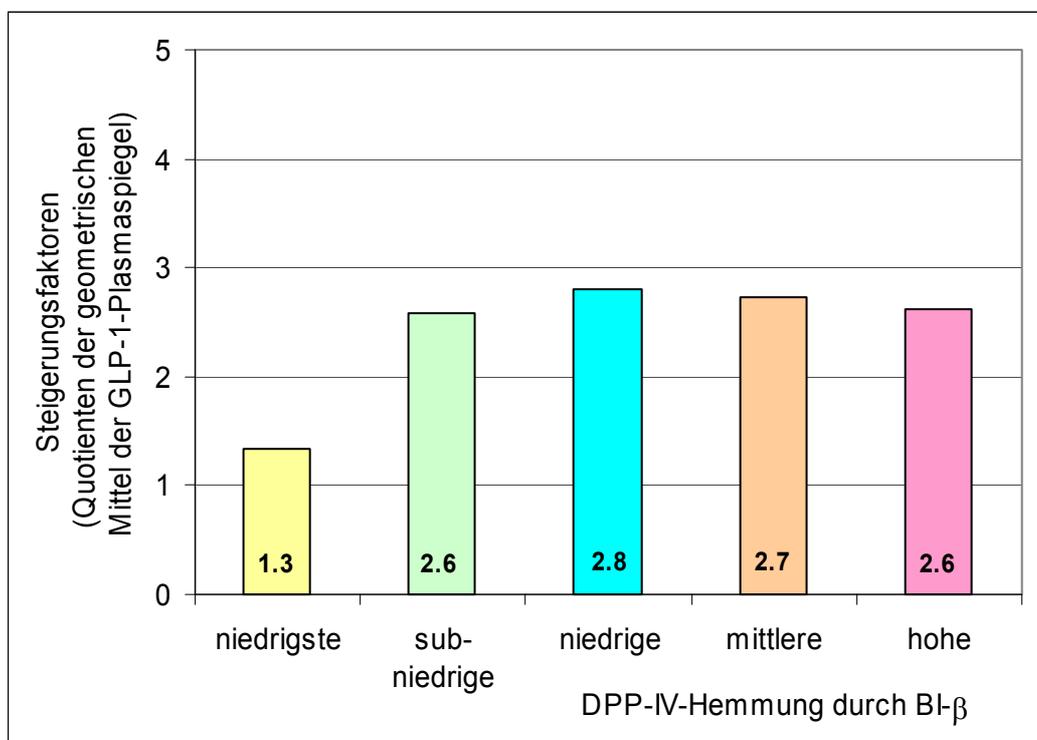


Abb. 27: Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch 120 (pmol/h)/kg-Infusion unter verschiedenen DPP-IV-Hemmungsgraden

4.1.3 Zusammenfassung der Eliminationskinetik von GLP-1 (7-37)

4.1.3.1 Zusammenfassung der Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel

Einen Überblick über die ihrerseits wiederum geometrisch gemittelten Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel aller Infusionsstufen (0, 12, 40 und 120 [pmol/h]/kg), differenziert nach den verschiedenen DPP-IV-Hemmungsgraden (niedrigste, sub-niedrige, niedrige, mittlere und hohe DPP-IV-Hemmung) bietet die Abbildung 28.

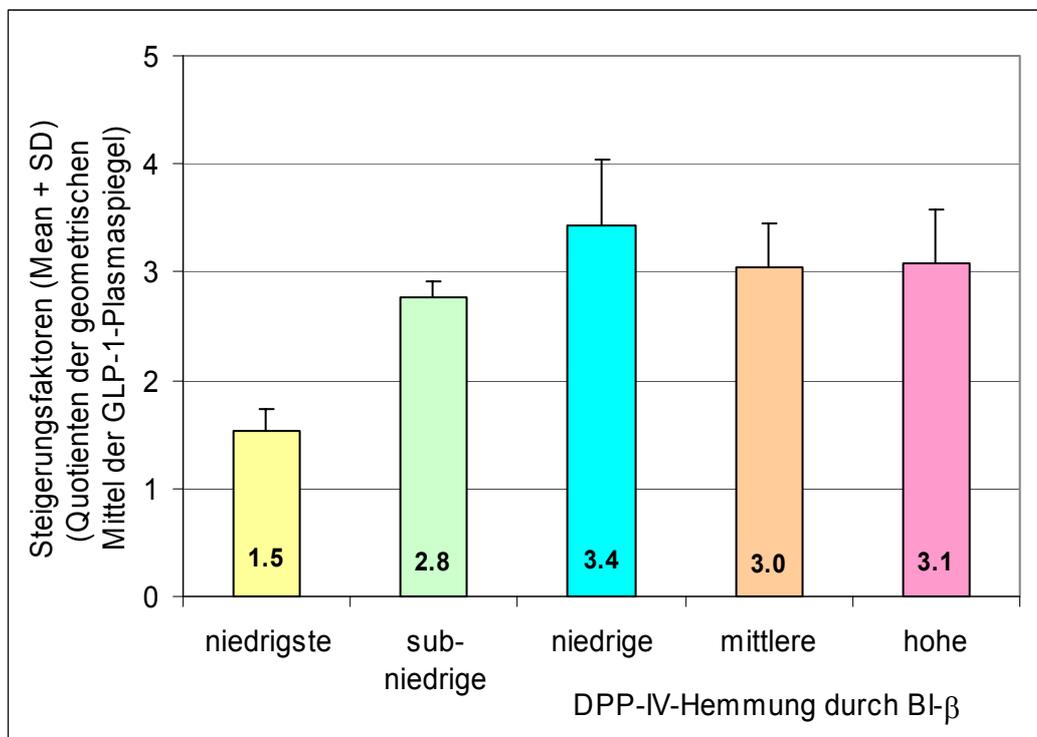


Abb. 28: Zusammenfassung der Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel

Der Unterschied der GLP-1-Plasmaspiegel unter niedrigster DPP-IV-Hemmung (gegenüber den GLP-1-Plasmaspiegeln ohne parallele DPP-IV-Hemmung = Steigerungsfaktor) war signifikant ($p = 0,007$ [nicht adjustiert]). Auch alle übrigen Steigerungsfaktoren (gegenüber den GLP-1-Plasmaspiegeln ohne parallele DPP-IV-Hemmung) waren signifikant ($p < 0,001$ [nicht adjustiert]).

Der Unterschied zwischen den Steigerungsfaktoren unter niedrigster DPP-IV-Hemmung und den Steigerungsfaktoren unter niedriger DPP-IV-Hemmung war signifikant ($p < 0,002$), der Unterschied zwischen den Steigerungsfaktoren unter niedrigster DPP-IV-Hemmung und den

Steigerungsfaktoren unter sub-niedriger DPP-IV-Hemmung war ebenfalls signifikant ($p = 0,041$). Alle übrigen Unterschiede zwischen den Steigerungsfaktoren waren hingegen nicht signifikant ($p > 0,324$). Diese p-Werte sind jeweils adjustiert (Korrektur nach Bonferroni-Holm).

4.1.3.2 Clearance-Werte von GLP-1-(7-37) ohne und mit DPP-IV-Hemmung

Die Clearance ist grundsätzlich eine additive Größe, weshalb sich auch die Clearance von GLP-1 auf den wichtigsten Eliminationswegen des Organismus mathematisch als folgender Ausdruck definieren lässt: $CL = CL_R + CL_{DPP-IV} + CL_X$. Daher ist die Situation der DPP-IV-Hemmung zu beschreiben als das Verhältnis der totalen Clearance ohne BI- β zur totalen Clearance mit BI- β beziehungsweise als der Quotient:

$$\frac{(CL_R + CL_{DPP-IV} + CL_X) \text{ ohne BI-}\beta}{(CL_R + CL_{DPP-IV} + CL_X) \text{ mit BI-}\beta}$$

Dieser mathematische Ausdruck verdeutlicht, warum sowohl die Erhöhung der DPP-IV-Hemmung als auch die Erhöhung der Infusionsrate an exogenem GLP-1 zu einem Absinken der Clearance führt. Im ersten Falle wird der Summand CL_{DPP-IV} im Nenner (Denominator) des Quotienten kleiner, so dass der Nenner im Verhältnis zum Zähler (Numerator) ebenfalls kleiner wird. Im zweiten Falle steigt der Wert des Summanden renale Clearance (CL_R) im Nenner des Quotienten durch mit dem GLP-1-Plasmaspiegel proportional zunehmende GFR von GLP-1 wegen der gleichzeitigen Restriktion von CL_{DPP-IV} verhältnismäßig stärker als im Zähler an, so dass der Wert des Quotienten insgesamt sinkt.

Die Abbildung 29 veranschaulicht die Größenverhältnisse der Clearance-Werte von GLP-1 (7-37) differenziert nach den Infusionsraten 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h einerseits und verschiedenen DPP-IV-Hemmungsgraden andererseits, wobei die DPP-IV-Hemmungsgrade sub-niedrig, niedrig, mittel und hoch ihrerseits noch einmal zu einem arithmetischen Mittelwert (= Mean) mit Standardabweichung (= SD) zusammengefasst wurden.

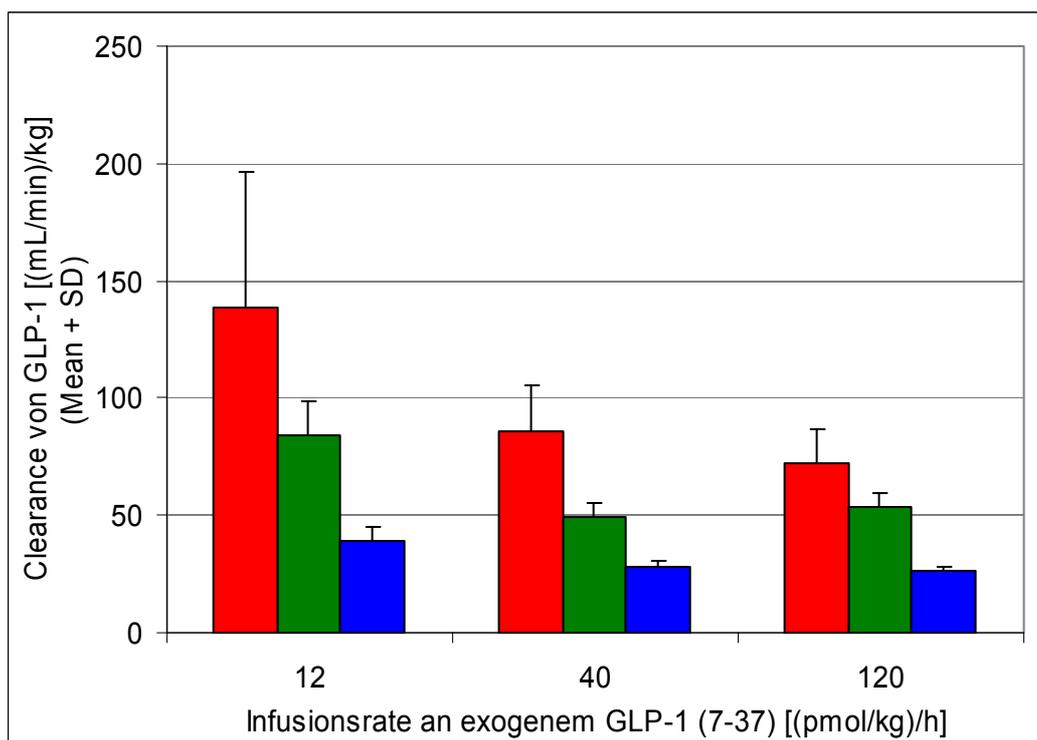


Abb. 29: Vergleich der Clearance von GLP-1 (7-37) ohne BI-β, unter niedrigster DPP-IV-Hemmung und unter höherer DPP-IV-Hemmung
 [rot = ohne BI-β, grün = mit niedrigster BI-β-Dosis, blau = mit sub-niedriger (und höherer) BI-β-Dosis]

Die Plausibilität dieser Vorgehensweise wird daran deutlich, dass die vergleichsweise geringfügigen Standardabweichungen sich auf die Unterschiede zwischen den genannten DPP-IV-Hemmungsgraden beziehen. Lediglich die Clearance-Werte unter der niedrigsten DPP-IV-Hemmung weicht von der sonstigen Clearance unter BI-β-Einfluss ab und liegt etwa im Mittelfeld zwischen der Clearance von GLP-1 (7-37) ohne BI-β und derjenigen unter sub-niedriger (und höherer) DPP-IV-Inhibition.

Die Unterschiede zwischen den Clearance-Werten in Abhängigkeit vom DPP-IV-Hemmungsgrad waren signifikant im Falle des Unterschieds zwischen den Clearance-Werten unter niedrigster DPP-IV-Hemmung und den Clearance-Werten unter sub-niedriger (und höherer) DPP-IV-Hemmung ($p = 0,006$).

Die Unterschiede zwischen den Clearance-Werten in Abhängigkeit von der Infusionsrate an exogenem GLP-1 waren signifikant im Falle der Unterschiede zwischen den Clearance-Werten unter den GLP-1-Infusionsraten 12 (pmol/kg)/h und 40 (pmol/kg)/h ($p < 0,003$). Die Unterschiede zwischen den Clearance-Werten unter den GLP-1-Infusionsraten 40 (pmol/kg)/h

und 120 (pmol/kg)/h waren hingegen nicht signifikant ($p = 1,0$). Diese p -Werte sind jeweils adjustiert (Korrektur nach Bonferroni-Holm).

4.1.3.3 Halbwertszeiten von GLP-1 (7-37) ohne und mit DPP-IV-Hemmung

Einen Überblick über die Halbwertszeiten von GLP-1 (7-37) nach Absetzen der Infusion ohne und mit verschiedenen DPP-IV-Hemmungsgraden in ansteigender Reihenfolge zeigt die Abbildung 30. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

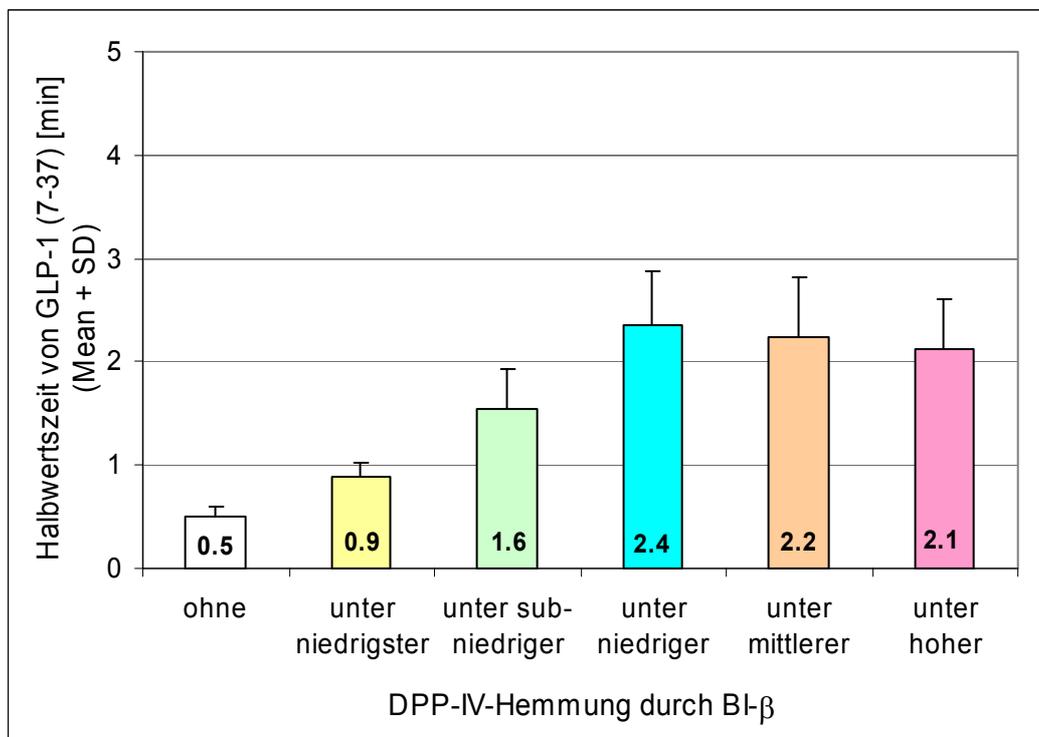


Abb. 30: Halbwertszeiten von GLP-1 (7-37) ohne und mit ansteigender DPP-IV-Hemmung

4.1.4 Blutzuckerspiegel unter GLP-1-Infusion

Der Plasmagehalt an Glukose unter dem Einfluss von zum Teil exzessiven GLP-1-Plasmaspiegeln bei nüchternen Tieren war wichtig als Größe, die eine mögliche, wenngleich unwahrscheinliche direkte Wirkung von super-physiologischen Konzentrationen des Peptidhormons auf β -Zellen im Sinne eines Releasing-Faktors verifizieren oder falsifizieren helfen sollte.

Auf die direkte Messung des eventuell ausgeschütteten Insulins wurde auf Grund der sehr kurzfristigen Peaks der Insulin-Inkretion im Interesse der Messgenauigkeit zu Gunsten des deutlich stabileren, wenn auch nur indirekten Parameters Blutzucker verzichtet.

Den mittleren Plasmagehalt an Glukose während der Infusionsversuche mit der Glycin-Isoform differenziert nach den unterschiedlichen Graden der DPP-IV-Hemmung, das heißt ohne BI- β (4.1.1.4), unter sub-niedriger BI- β -Dosis (4.1.2.4), unter niedriger BI- β -Dosis (4.1.2.1), unter mittlerer BI- β -Dosis (4.1.2.2) und unter hoher BI- β -Dosis (4.1.2.3), zeigt die Abbildung 31. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

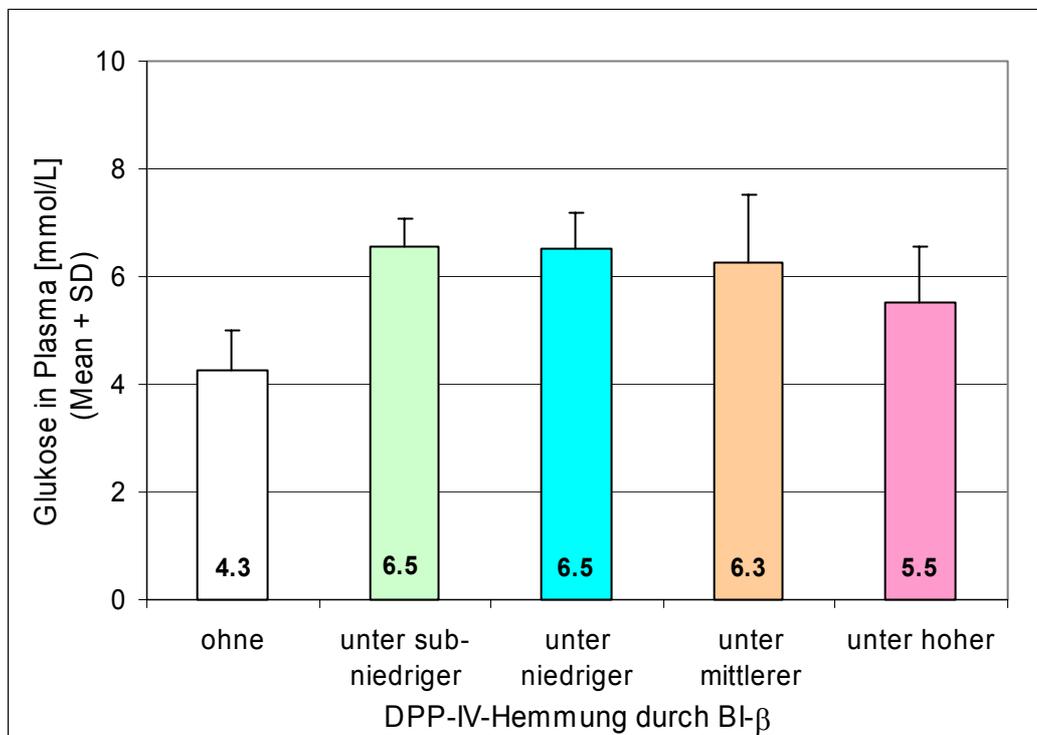


Abb. 31: mittlerer Plasmagehalt an Glukose während der Infusionsversuche mit GLP-1 (7-37)

Den Vergleich der arithmetisch gemittelten Plasma-Glukose-Spiegel während des Versuchs ohne BI- β (4.1.1.4) mit den arithmetisch gemittelten Plasma-Glukose-Spiegeln während der Versuche unter sub-niedriger BI- β -Dosis (4.1.2.4), unter niedriger BI- β -Dosis (4.1.2.1), unter mittlerer BI- β -Dosis (4.1.2.2) und unter hoher BI- β -Dosis (4.1.2.3) zeigt die Abbildung 32. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

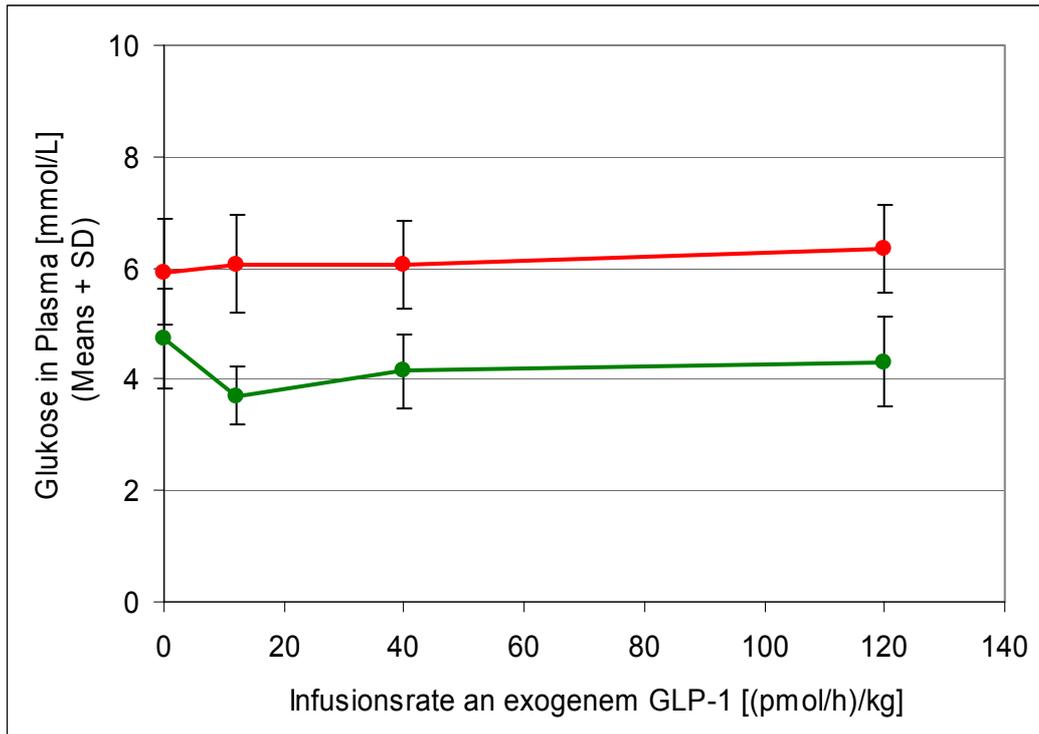


Abb. 32: mittlerer Plasmagehalt an Glukose unter GLP-1-(7-37)-Infusion mit und ohne DPP-IV-Hemmung

[rot = GLP-1 (7-37) mit DPP-IV-Hemmung,

grün = GLP-1 (7-37) ohne DPP-IV-Hemmung]

Selbst unter dem Einfluss exzessiver Infusionsraten an exogenem GLP-1, wie sie in den GLP-1-(7-37)-Sättigungsversuchen ohne BI- β (4.1.1.5) und den GLP-1-(7-37)-Sättigungsversuchen unter mittlerer BI- β -Dosis (4.1.2.7) appliziert wurden, zeigte sich keinerlei Absenkung des Blutzuckerspiegels, wie die Abbildung 33 verdeutlicht. Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

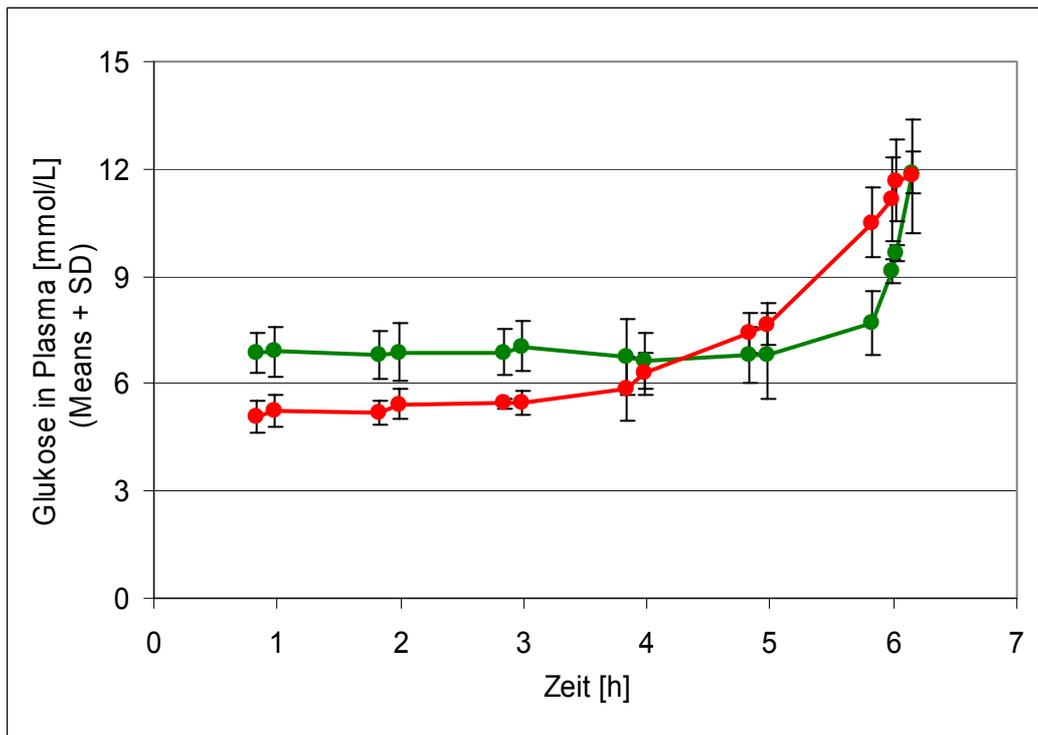


Abb. 33: mittlerer Plasmagehalt an Glukose unter GLP-1-(7-37)-Infusion mit GLP-1-Sättigung (mit und ohne DPP-IV-Hemmung)
[rot = GLP-1 (7-37) mit GLP-1-Sättigung und DPP-IV-Hemmung,
grün = GLP-1 (7-37) mit GLP-1-Sättigung ohne DPP-IV-Hemmung]

4.2 in-situ-Perfusionsversuche (isoliert perfundierte Ratten-Leber – rezirkulierendes Modell und Single-Pass-Modell)

4.2.1 IPRL – rezirkulierendes Modell

Im rezirkulierenden Modell wurde bei elf Ratten-Lebern die Glycin-Isoform (GLP-1 [7-37]) als Substrat gewählt und später der Versuch mit der Amid-Isoform (GLP-1 [7-36 amide]) an acht Organen wiederholt. Die resultierenden Substratspiegel im Perfusat zeigen die Abbildungen 34 (für die Glycin-Isoform) und 35 (für die Amid-Isoform). Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

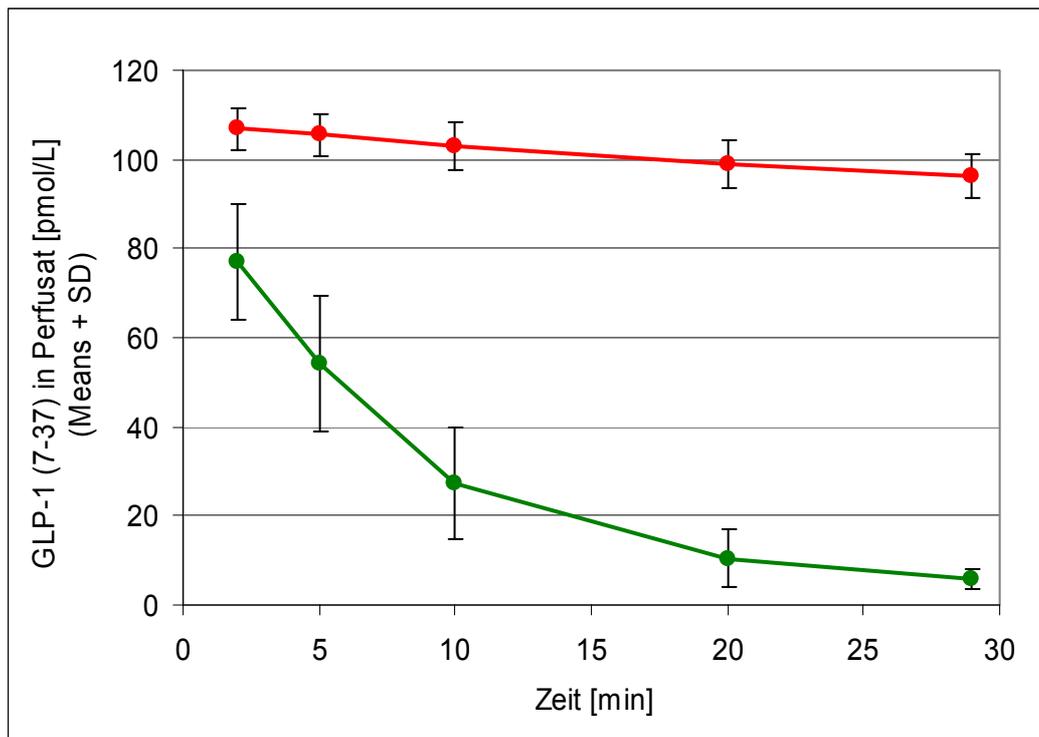


Abb. 34: Elimination von GLP-1 (7-37) in der IPRL

mit und ohne DPP-IV-Hemmung durch BI- β

[grün = GLP-1 (7-37) ohne DPP-IV-Hemmung,

rot = GLP-1 (7-37) mit niedriger DPP-IV-Hemmung]

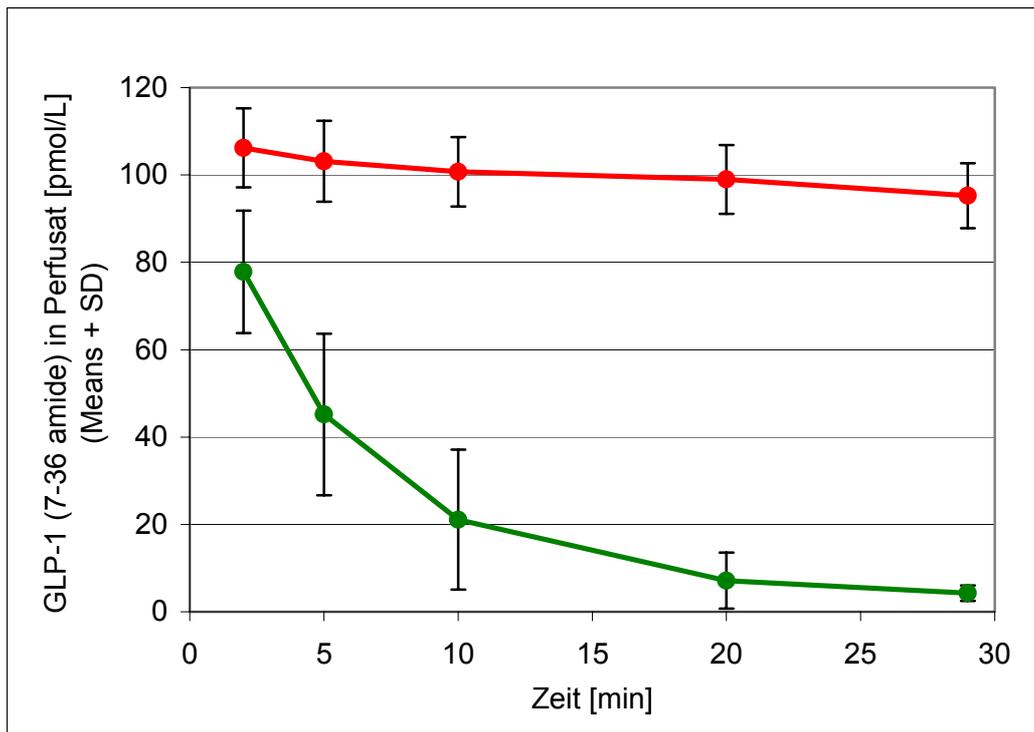


Abb. 35: Elimination von GLP-1 (7-36 amide) in der IPRL
mit und ohne DPP-IV-Hemmung durch BI- β
[grün = GLP-1 (7-36 amide) ohne DPP-IV-Hemmung,
rot = GLP-1 (7-36 amide) mit niedriger DPP-IV-Hemmung]

Die zugleich gemessenen Wirkstoffspiegel zeigen die Abbildungen 36 (für die IPRL mit der Glycin-Isoform) und 37 (für die IPRL mit der Amid-Isoform). Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

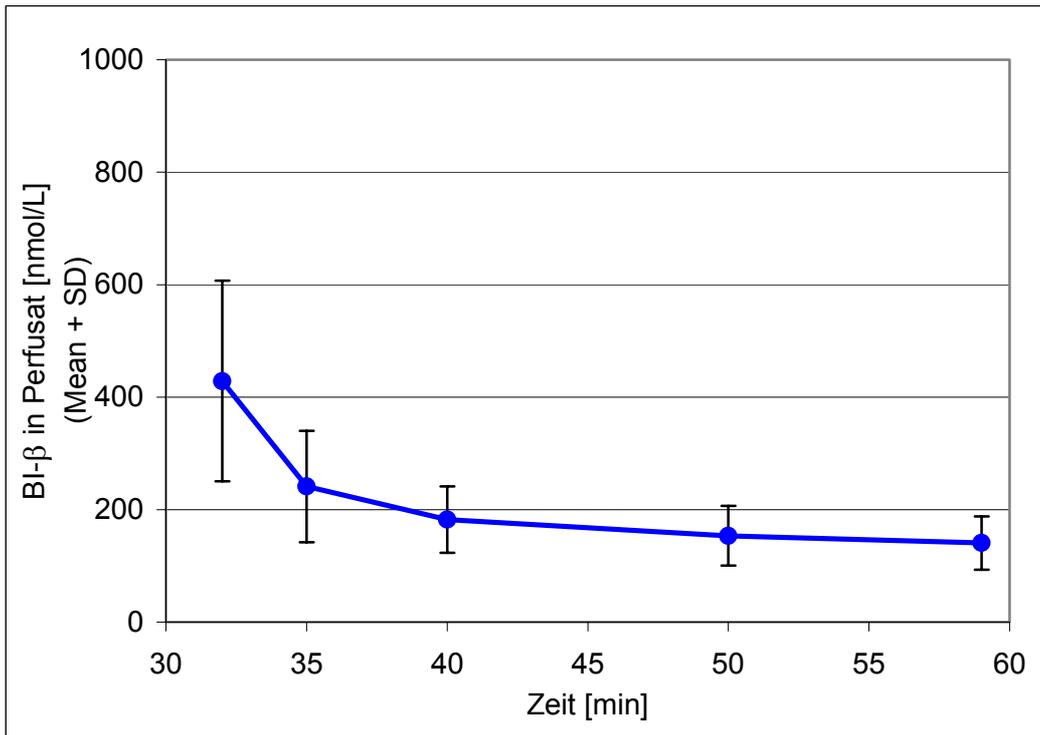


Abb. 36: BI-β-Konzentrationen in der IPRL mit der Glycin-Isoform nach Applikation von 1,3 $\mu\text{mol/L}$ in das Perfusat

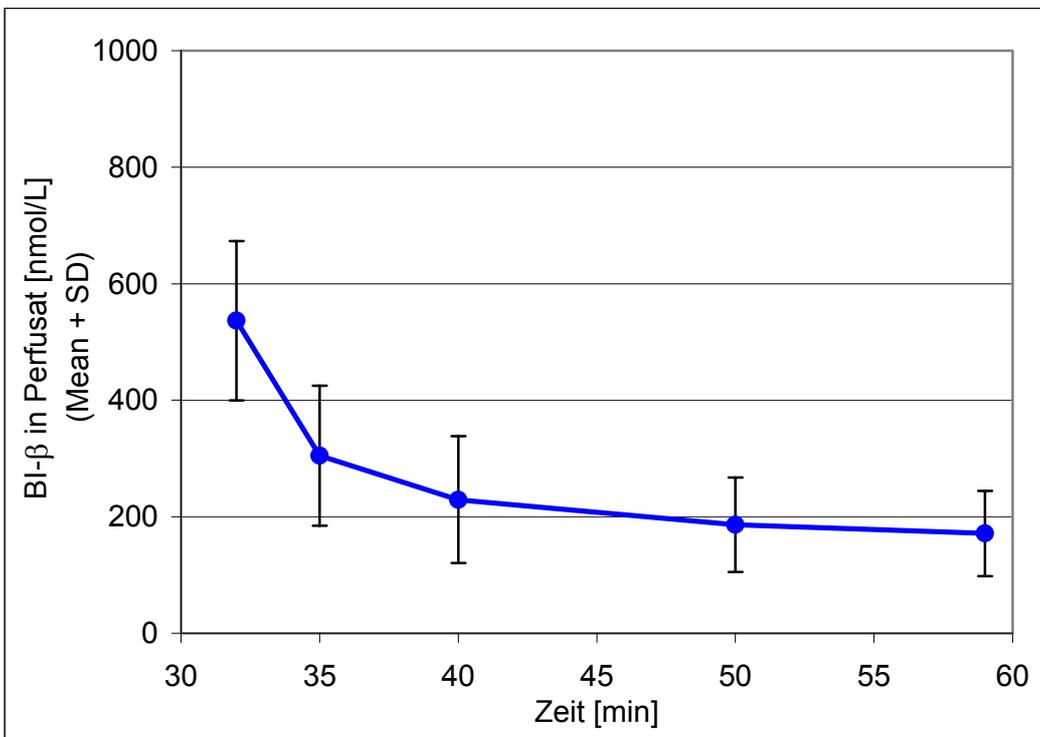


Abb. 37: BI-β-Konzentrationen in der IPRL mit der Amid-Isoform nach Applikation von 1,3 $\mu\text{mol/L}$ in das Perfusat

Bei beiden Isoformen folgte der Abbau ohne Hemmung durch BI- β einer mono-exponentiellen Funktion, da die Werte in der halblogarithmischen Darstellung auf einer Geraden liegen (nicht gezeigt).

4.2.1.1 Halbwertszeit

Die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k wurde mit der Steigungskonstante k der Funktionsgeraden in der halblogarithmischen Darstellung der GLP-1-Konzentrationswerte gleichgesetzt. Die nach der Gleichung $t_{1/2} = \ln(2)/k$ [Derendorf 2002] errechneten individuellen Halbwertszeiten bildeten im arithmetischen Mittel den Wert $5,7 \pm 1,5$ Minuten. Nach den beiden Isoformen differenziert betragen die Halbwertszeit der Glycin-Isoform $6,1 \pm 1,6$ Minuten und die der Amid-Isoform $5,0 \pm 1,3$ Minuten. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,114$).

4.2.1.2 hepatische Clearance

Das scheinbare (zentrale) Verteilungsvolumen (V_c) wurde mit dem Perfusatvolumen identifiziert und die hepatische Clearance von GLP-1 wurde nach der Formel $CL = V_c \times k$ [Derendorf 2002] errechnet. So wurde die individuelle hepatische Clearance für jede einzelne Leber bestimmt, im arithmetischen Mittel $10,3 \pm 2,3$ mL/min. Anschließend wurde dieser organspezifische Wert in Bezug zum Gesamtorganismus gesetzt, indem er jeweils durch die individuelle Körpermasse dividiert wurde. Im arithmetischen Mittel betrug die hepatische Clearance somit $34,2 \pm 8,0$ (mL/min)/kg KM.

Nach den beiden Isoformen differenziert betragen die hepatische Clearance der Glycin-Isoform $9,5 \pm 2,2$ mL/min beziehungsweise $30,6 \pm 6,0$ (mL/min)/kg KM und diejenige der Amid-Isoform $11,5 \pm 2,0$ mL/min beziehungsweise $39,3 \pm 7,9$ (mL/min)/kg KM. Der Unterschied zwischen den organspezifischen Clearance-Werten war nicht signifikant ($p = 0,059$), wohingegen der Unterschied zwischen den auf die Körpermasse bezogenen Clearance-Werten signifikant war ($p = 0,014$).

4.2.1.3 portale Flussrate

Die portale Flussrate (Q_H) zu Ende des Perfusionsversuchs betrug im arithmetischen Mittel $37,6 \pm 10,8$ mL/min pro Leber beziehungsweise $124,7 \pm 38,2$ (mL/min)/kg KM. Dabei war keine ausgeprägte, sondern lediglich eine geringgradige Abhängigkeit der Halbwertszeit von der portalen Flussrate feststellbar (nicht gezeigt).

4.2.1.4 hepatischer Extraktionsquotient

Der hepatische Extraktionsquotient wurde nach der Formel $E_H = CL_H/Q_H$ [Derendorf 2002] berechnet. Herangezogen wurden jeweils die individuellen Werte, multipliziert mit 100 (Prozent). Das arithmetische Mittel des hepatischen Extraktionsquotienten aller Lebern betrug $29,8 \pm 10,7$ %.

Nach den beiden Isoformen differenziert betragen der hepatische Extraktionsquotient der Glycin-Isoform $30,1 \pm 13,6$ Minuten und derjenige der Amid-Isoform $29,4 \pm 5,6$ Minuten. Dieser Unterschied war bei deutlich ungleichen Varianzen ($F = 0,026$) nicht signifikant ($p = 0,881$ [Satterthwaite-Korrektur]).

4.2.1.5 Vergleich der Isoformen

Im Vergleich der Isoformen lassen sich außer den (auf die Körpermasse bezogenen) Clearance-Werten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Glycin-Isoform (GLP-1 [7-37]) und der Amid-Isoform (GLP-1 [7-36 amide]) ausmachen. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der Steady-State-Infusionsversuche, die mit der Amid-Isoform unternommen wurden und auch in vivo keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isoformen erkennen ließen (nicht gezeigt).

4.2.1.6 Verhältnis der Lebermasse zur gesamten Körpermasse

Der Anteil der Lebermasse an der Körpermasse beträgt bei der Ratte laut Literatur 4 % (zum Zwecke des interspeziellen Vergleichs sei angeführt, dass der Lebermassenanteil beim Menschen nur 2,4 % beträgt) [Boxenbaum 1980]. Tatsächlich konnte diese Zahl im Rahmen der vorliegenden Arbeit ungefähr bestätigt werden, da der Anteil der Lebermasse an der Körpermasse nach Abschluss der Perfusion im Durchschnitt $4,8 \pm 0,3$ % betrug. Bei der Betrachtung des scheinbar höheren Massenanteils müssen nicht quantifizierte Perfusat-Rückstände im Organ berücksichtigt werden, die ihrerseits jedoch ein Ausdruck des intravasalen Organvolumens sind.

4.2.1.7 labordiagnostische Organparameter

Zur Prüfung der Aufrechterhaltung der parenchymalen Organintegrität wurden als letzter Schritt nach Abschluss der Leberperfusion 2 mL des zuletzt gewonnenen Perfusats separat auf ihren Gehalt an organspezifischen Enzymen untersucht. Als Parameter wurden gewählt (in der Reihenfolge ihrer Organspezifität für die Leber): Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST) und Laktat-Dehydrogenase (LDH). Die Messung wurde vom Labor Clinical Pathology der Gruppe Pathology der Abteilung Non Clinical Drug Safety der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach/Riss mittels UV-Photometrie durchgeführt. Die Ergebnisse (arithmetische Mittel \pm Standard-abweichung) zeigt die folgende Tabelle:

	<u>GLDH:</u>	<u>ALT:</u>	<u>AST:</u>	<u>LDH:</u>
	[U/L]	[U/L]	[U/L]	[U/L]
<u>Perfusat:</u>	$3,1 \pm 1,4$	$12,3 \pm 7,3$	$49,2 \pm 26,1$	$110,6 \pm 90,0$
<u>Serum:</u>	$7,6 \pm 0,4$	$27,3 \pm 7,6$	$62,1 \pm 17,3$	$225,0 \pm 87,5$

Die zum Zwecke des Vergleichs angegebenen durchschnittlichen Blutserumwerte sind der Literatur entnommen [O'Brien et al. 2002, Loeb 1999]. Da die Enzymspiegel im Vergleich zu den Referenzbereichen im Blutserum (Rattenböcke, zwei bis fünf Monate alt) nicht als erhöht einzustufen waren, sondern nur zwischen 40 und 80 % der durchschnittlichen Serumwerte erreichten, wurde die Organintegrität als gegeben angesehen.

Zusätzlich wurde die Glukose-Konzentration im Perfusat geprüft, die mit $11,6 \pm 3,3$ mmol/L für die Energieversorgung der Leber als ausreichend anzusehen war, da die durchschnittliche Glukose-Konzentration im Serum für diese Gruppe (Rattenböcke, 2-5 Monate alt) mit $10,2 \pm 1,2$ mmol/L angegeben wird [Loeb 1999].

4.2.1.8 Pharmakokinetik von BI- β

Der Abfall von durchschnittlich 474 ± 167 nmol/L auf durchschnittlich 154 ± 60 nmol/L ist in zwei Phasen zu differenzieren: In der ersten Phase ($t_{10} = 50$ min bis $t_{12} = 55$ min mit einer Steigungskonstante $k = 0,1938 \text{ min}^{-1}$ [lineare ungewichtete Regression in halb-logarithmischer Darstellung, Excel]) befindet sich der DPP-IV-Inhibitor vermutlich in einer Verteilung zwischen Lebergewebe und Perfusat.

Sobald diese Distributionsphase in ein Verteilungsgleichgewicht gemündet ist, unterliegen die Wirkstoff-Konzentrationen in der zweiten Phase ($t_{13} = 60$ min bis $t_{15} = 79$ min = t_{end} mit einer Steigungskonstante $k = 0,0141 \text{ min}^{-1}$ [lineare ungewichtete Regression in halb-logarithmischer Darstellung, Excel]) nur noch dem Einfluss der Verstoffwechslung.

Diese Differenzierung zwischen der initialen Distributionsphase (= α -Phase) und der terminalen Metabolismusphase (= β -Phase) wird durch die signifikant unterschiedlichen Steigungskonstanten der Funktionsgeraden in der halblogarithmischen Darstellung der BI- β -Konzentrationen untermauert (nicht gezeigt).

Bei der Berechnung des scheinbaren Verteilungsvolumens im Verteilungsgleichgewicht (V_{ss}) weist ein arithmetischer Mittelwert von $8,02 \pm 3,97$ L auf eine etwa 100-fach höhere Anreicherung von BI- β im Lebergewebe als im Perfusat (Volumen = 84 mL) hin.

4.2.2 IPRL – Single-Pass-Modell

Um die Off-Kinetik des Inhibitors BI- β vom „Rezeptor“, nämlich vom Zielenzym DPP-IV zu charakterisieren, wurden sechs Ratten-Lebern im Single-Pass-Verfahren (das heißt unter einmaliger Leberpassage des Perfusats) mit der Glycin-Isoform von GLP-1 beziehungsweise in der 10-minütigen Einwaschphase zusätzlich mit BI- β perfundiert. Die resultierenden Perfusat-Konzentrationen von GLP-1 (7-37) und BI- β zeigt die Abbildung 38 (Zeitangaben ohne die 20-minütige Äquilibrationsphase). Angegeben werden die arithmetischen Mittelwerte (= Mean) und die Standardabweichungen (= SD).

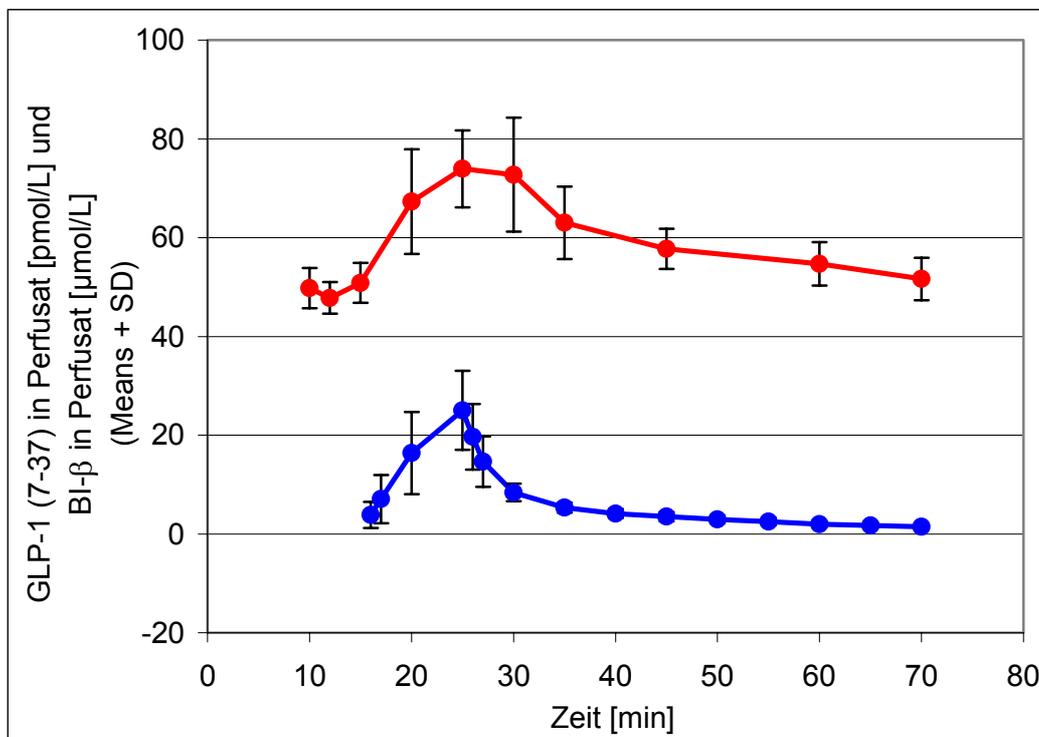


Abb. 38: GLP-1 (7-37)-Konzentrationen und BI- β -Konzentrationen im Perfusat im Single-Pass-Modell der IPRL

[rot = Perfusat-Konzentration von GLP-1 (7-37) in pmol/L,

blau = Perfusat-Konzentration von BI- β in $\mu\text{mol/L}$]

Selbst unter DPP-IV-Hemmung im mikromolaren Bereich kommt es dennoch nur zu einer $48,4 \pm 4,8$ %-igen Hemmung (berechnet mittels Division des höchsten GLP-1-Wertes [zum Zeitpunkt $t_8 = 45$ min] durch die 100 % der Ausgangskonzentration an GLP-1 im nativen Perfusat). Zudem fällt die GLP-1-Konzentration innerhalb der BI- β -Auswaschphase

(von $t_9 = 45,5$ min bis $t_{20} = 90$ min = t_{end}) auf ihr Ausgangsniveau von $49,5 \pm 3,2$ zurück, obwohl im Perfusat noch Hemmstoff in relevanter Größenordnung messbar ist.

4.2.2.1 terminale Halbwertszeit von BI- β in der BI- β -Auswaschphase

Im natürlichen Logarithmus der Hemmstoff-Konzentrationen im Perfusat lassen sich zwei verschiedene Steigungsgeraden innerhalb der gesamten BI- β -Auswaschphase (also von $t_{10} = 46$ min bis $t_{20} = 90$ min = t_{end}) unterscheiden. Alle Werte zwischen $t_{10} = 46$ min und $t_{12} = 50$ min liegen im arithmetischen Mittel auf einer Funktionsgeraden mit der Steigungskonstante $k = 0,1963 \text{ min}^{-1}$ (nicht gezeigt), während alle Werte zwischen $t_{13} = 55$ min und $t_{20} = 90$ min = t_{end} im arithmetischen Mittel auf einer Funktionsgeraden mit der Steigungskonstante $k = 0,0373 \text{ min}^{-1}$ (lineare ungewichtete Regression in halblogarithmischer Darstellung, Excel) liegen, wie die Abbildung 39 zeigt (Zeitangaben ohne die 20-minütige Äquilibrationsphase). Die nach der Formel $t_{1/2} = \ln(2)/k$ [Derendorf 2002] aus den individuellen Steigungskonstanten kalkulierte terminale Halbwertszeit von BI- β betrug im arithmetischen Mittel $19,7 \pm 4,8$ Minuten.

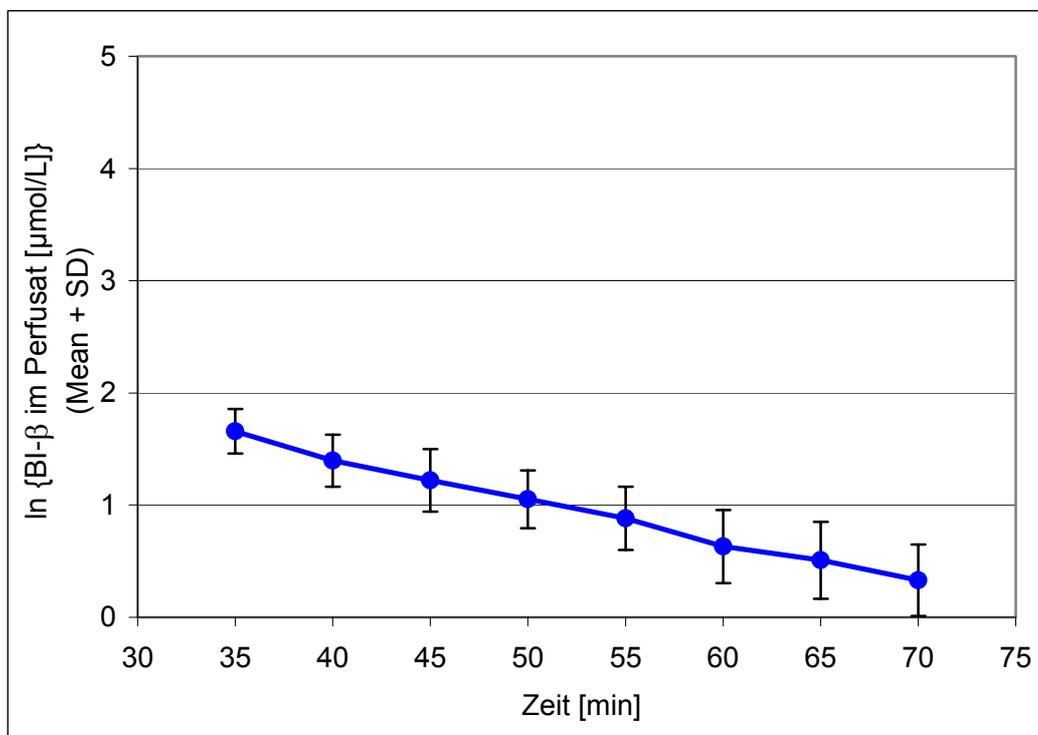


Abb. 39: terminale Halbwertszeit von BI- β
in der BI- β -Auswaschphase (von 35 [55] min bis 70 [90] min)
im Single-Pass-Modell der IPRL [$\ln C(t) = -0,0373t + 2,92$]

4.2.2.2 terminale Halbwertszeit der Restitution der DPP-IV-Kapazität in der BI- β -Auswaschphase

Die terminale Halbwertszeit der Restitution der DPP-IV-Kapazität zum Abbau von GLP-1 (7-37) wurde errechnet unter Bezugnahme auf die terminale Halbwertszeit von BI- β in der BI- β -Auswaschphase (von $t_{13} = 55$ min bis $t_{20} = 90$ min = t_{end}). Die zur Basis e logarithmierten GLP-1-Konzentrationen innerhalb dieser Zeitspanne lagen im arithmetischen Mittel alle auf einer Funktionsgeraden mit der Steigungskonstante $k = 0,0408 \text{ min}^{-1}$ (lineare ungewichtete Regression in halblogarithmischer Darstellung, Excel), wie die Abbildung 40 zeigt (Zeitangaben ohne die 20-minütige Äquilibrationphase). Die Halbwertszeit der Restitution der DPP-IV-Kapazität wurde nach der Formel $t_{1/2} = \ln(2)/k$ [Derendorf 2002] aus den individuellen Steigungskonstanten der zur Basis e logarithmierten GLP-1-Konzentrationen errechnet und betrug im arithmetischen Mittel $19,9 \pm 16,1$ Minuten.

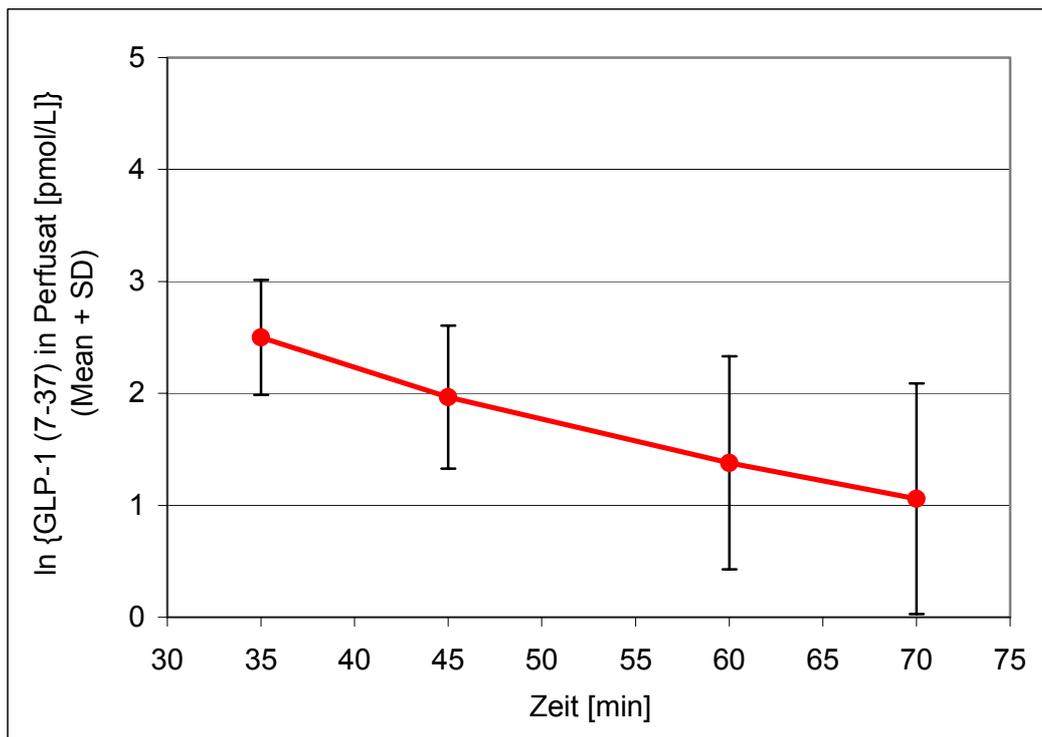


Abb. 40: terminale Halbwertszeit der DPP-IV-Restitution (GLP-1-Abbau)
in der BI- β -Auswaschphase (von 35 [55] min bis 70 [90] min)
im Single-Pass-Modell der IPR [InC(t) = -0,0408t + 3,87]

4.3 in-vitro-Stabilitätsversuche

4.3.1 GLP-1-Abbau in Vollblut

4.3.1.1 GLP-1-Abbau in Vollblut bei Raumtemperatur (+20 °Celsius)

Um die DPP-IV-Aktivität in Vollblutproben und damit die Stabilität der im Laufe der in-vivo-Infusionsversuche genommenen Blutproben während der Probenverarbeitung bis zur Abkühlung in der Zentrifuge auf +4 °Celsius sicherzustellen, sollte der ungehemmte Abbau von GLP-1 (7-37) durch plasmalösliche DPP-IV bei Raumtemperatur (+20 °Celsius) über einen Zeitraum von 120 sec (2 min) quantifiziert werden. Dies sollte die theoretisch nicht auszuschließende Situation simulieren, dass der im Probenröhrchen vorgelegte „DPP-IV-Inhibitor“ mit seinem geringen Volumen von nur 10 µL sich nicht ausreichend schnell in der Blutprobe mit einem Volumen von 250 µL (für GLP-1-ELISA) beziehungsweise 360 µL (für GLP-1-ELISA und BI-β-Analytik) verteilt und somit der Zeitpunkt der Probenentnahme nicht mit dem Abstoppen der Degradationsreaktion gleichzusetzen sei. Der Einsatz eines Vortex-Mixers verbot sich, da es im Interesse der Sensitivität des GLP-1-ELISA eine Hämolyse zu vermeiden galt. Im arithmetischen Mittel fanden sich aber selbst nach 120 sec (2,0 min) noch $88,6 \pm 1,6$ % der ursprünglich eingesetzten GLP-1-Konzentration ohne DPP-IV-Inhibition, wie die Abbildung 41 zeigt:

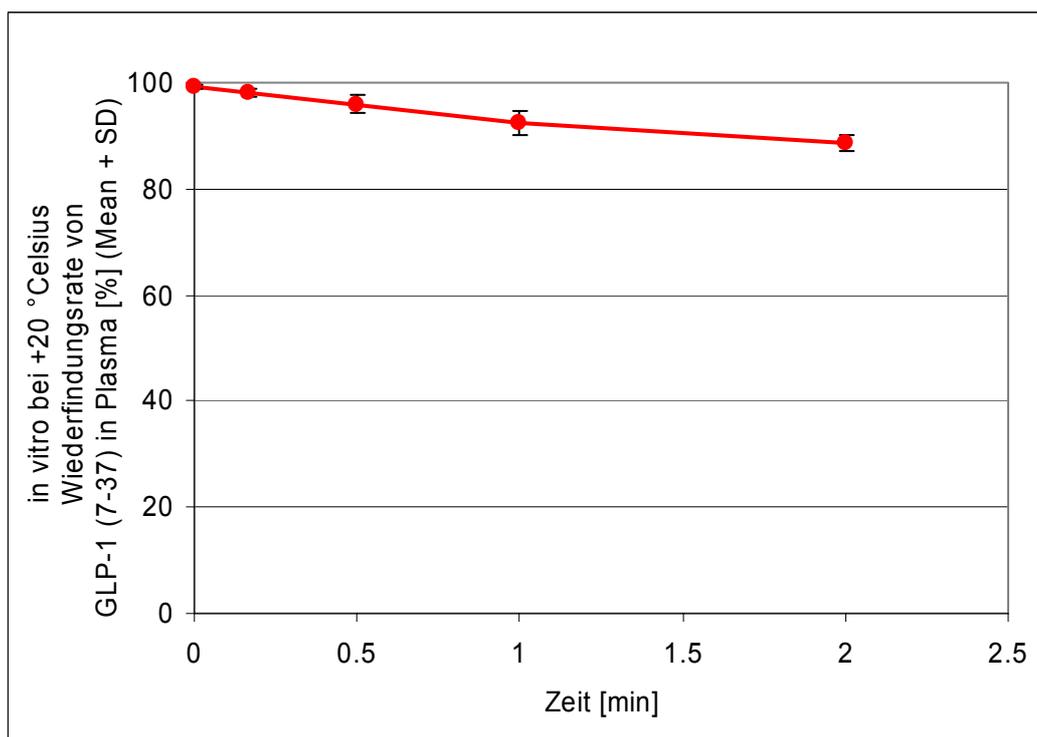


Abb. 41: Degradation von GLP-1 (7-37)

= DPP-IV-Aktivität in Ratten-Vollblut bei Raumtemperatur (+20 °Celsius)

4.3.1.2 GLP-1-Abbau in Vollblut bei Körpertemperatur (+39 °Celsius)

Um den Anteil der plasmalöslichen DPP-IV-Fraktion (sCD26) an der totalen Clearance zu quantifizieren, wurde GLP-1 (7-37) im Vollblut von vier verschiedenen Tieren über 10 Minuten inkubiert. Im natürlichen Logarithmus der GLP-1-Konzentrationen im Vollblut lassen sich zwei Geraden mit verschiedener Steigung innerhalb der gesamten Inkubationsszeit (also von $t_1 = 10 \text{ sec [0,167 min]}$ bis $t_6 = 600 \text{ sec [10,0 min]} = t_{\text{end}}$) unterscheiden. Alle Werte zwischen $t_1 = 0,167 \text{ min}$ und $t_3 = 1,0 \text{ min}$ liegen im arithmetischen Mittel auf einer Funktionsgeraden mit der Steigungskonstante $k = 0,083 \text{ min}^{-1}$ (nicht gezeigt), während alle Werte zwischen $t_4 = 2,0 \text{ min}$ und $t_6 = 10,0 \text{ min} = t_{\text{end}}$ im arithmetischen Mittel auf einer Funktionsgeraden mit der Steigungskonstante $k = 0,0201 \text{ min}^{-1}$ (nicht gezeigt) liegen. Die terminale Halbwertszeit, die sich nach der Formel $t_{1/2} = \ln(2)/k$ [Derendorf 2002] aus dem letztgenannten k-Wert berechnen lässt, darf gegenüber der initialen Halbwertszeit als dominant angenommen werden, wie das so genannte Abschälverfahren (englisch „Feathering“, nicht gezeigt) bei der Abbildung 42 nahelegt:

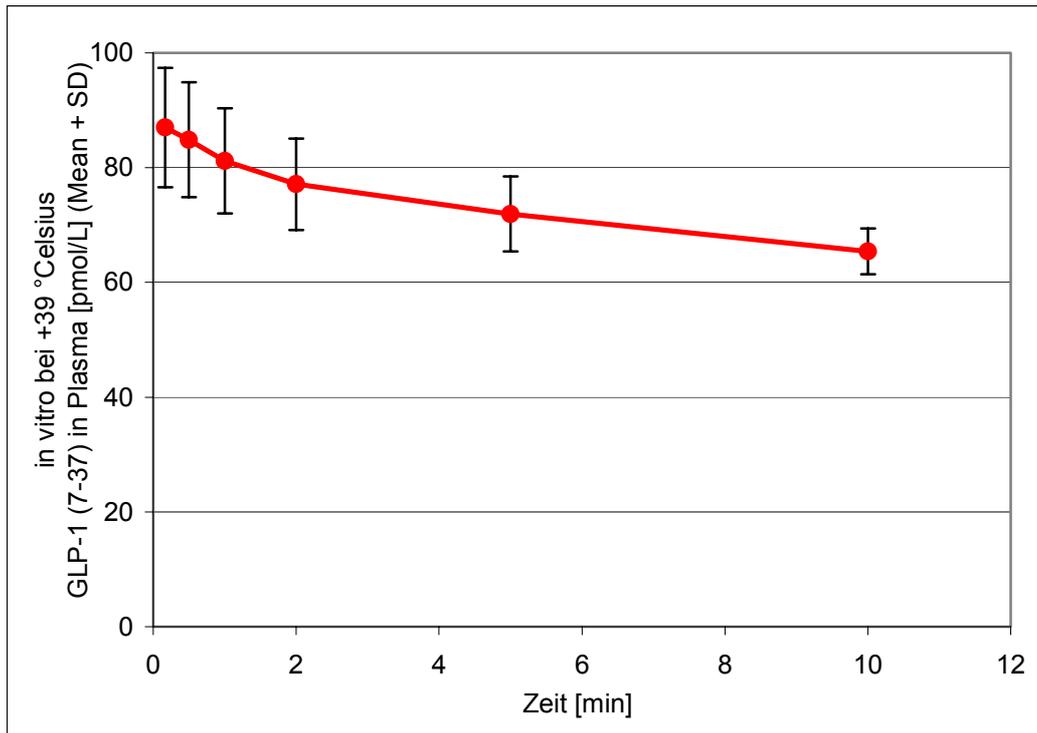


Abb. 42: Degradation von GLP-1 (7-37)

= DPP-IV-Aktivität in Ratten-Vollblut bei Körpertemperatur (+39 °Celsius)

Da das gesamte Vollblut eines Säugerorganismus etwa 7 % der Körpermasse ausmacht und Vollblut eine durchschnittliche Dichte von 1,055 g/mL aufweist [Boylan et al. 1976], dürfen ungefähr 66 mL (70 g/1,055 g/mL) pro Kilogramm als relatives Blutvolumen angenommen werden. Bei Abzug eines durchschnittlichen Hämatokrits bei Rattenböcken von 50 % (laut GALAS) verbleiben 33 mL Plasma pro Kilogramm als Verteilungsvolumen (V_c). Unter Bezug auf die dominante Halbwertszeit mit dem k-Wert $0,0201 \text{ min}^{-1}$ (lineare ungewichtete Regression in halblogarithmischer Darstellung, Excel) kann die GLP-1-Clearance durch die plasmalösliche DPP-IV (sCD26) einfach nach der Formel $CL = V_c \times k$ [Derendorf 2002] berechnet werden und weist einen Wert von etwa 0,7 (mL/min)/kg auf.

Den Vergleich zwischen den ermittelten beziehungsweise errechneten Clearance-Werten aus den in-vivo-Infusionsversuchen (vergleiche 4.1.1.5), aus den in-situ-Perfusionsversuchen (vergleiche 4.2.1.2) und aus den in-vitro-Stabilitätsversuchen, jeweils ohne parallele DPP-IV-Hemmung und bezogen auf eine GLP-1-Konzentration in der jeweiligen Matrix von etwa 100 pmol/L, zeigt die Abbildung 43:

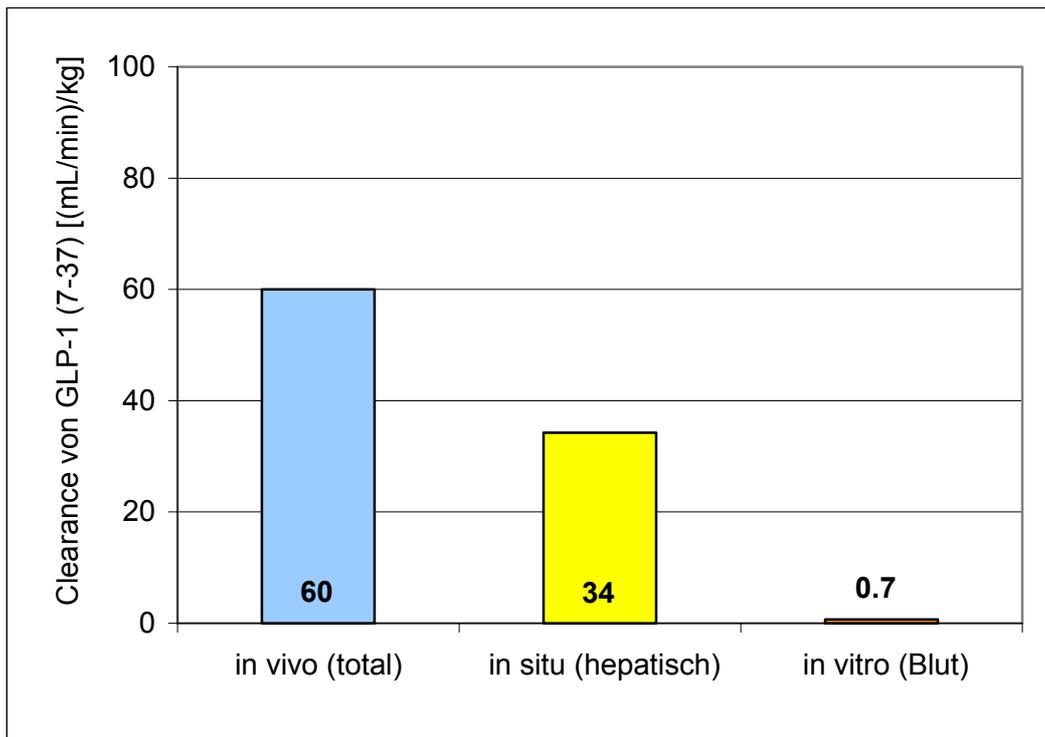


Abb. 43: Clearance von GLP-1 ohne DPP-IV-Hemmung im Vergleich (bei einer Matrix-Konzentration von etwa 100 pmol/L)

Der Clearance-Wert aus dem in-vivo-Infusionsversuch ergibt sich bei graphischer Auftragung der Clearance-Werte unter bestimmten Infusionsraten an exogenem GLP-1 (7-37) bei GLP-1-Sättigung ohne parallele DPP-IV-Hemmung (vergleiche 4.1.1.5) gegen die zugehörigen GLP-1-Plasmaspiegel, aus denen sie nach der Formel $CL = k_0/C_{ss}$ [Gibaldi und Perrier 1982] errechnet wurden. Dabei zeigt sich eine kontinuierliche Clearance von etwa 60 (mL/min)/kg im Bereich der GLP-1-Plasma-Konzentration von 50 bis 150 pmol/L (nicht gezeigt). Somit ist die Vergleichbarkeit mit der Ausgangskonzentration im nativen IPRL-Perfusat von annähernd 100 pmol/L unabhängig von der Frage der Linearität der Eliminationskinetik von GLP-1 gegeben.

4.3.2 GLP-1-Abbau in Perfusat

Nach der 20-minütigen Äquilibrationsphase war das vordem goldgelbe und klare Perfusionsmedium braunrot und getrübt, so dass die Bedenken im Raum standen, dass trotz Entblutung während der Präparation doch noch DPP-IV-aktive Blutreste durch die Perfusion aus der Leber in das rezirkulierende Perfusat ausgewaschen worden sein könnten. Daher wurde GLP-1 (7-37) im Perfusat aus zwei Perfusionen (ohne Substrat und ohne Hemmstoff) über 10 Minuten inkubiert. Im arithmetischen Mittel fanden sich aber selbst nach 600 sec (10,0 min) noch $95,8 \pm 0,1$ % der ursprünglich eingesetzten GLP-1-Konzentration (nicht gezeigt). Daher wurde der Verlust durch im Perfusat befindliche plasmalösliche DPP-IV als vernachlässigbar angesehen.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Vorteile und Schwachpunkte der Steady-State-Infusion

GLP-1 wird im Organismus sehr rasch eliminiert, wobei der zugrunde liegende enzymatische Abbau durch das Enzym DPP-IV sättigbar ist. Auf Grund dieser beiden Fakten ist eine exakte Charakterisierung der Eliminationskinetik von GLP-1 in vivo nur unter Steady-State-Bedingungen möglich.

Der Schwerpunkt der Betrachtung liegt bei den Steady-State-Infusionsversuchen auf den resultierenden GLP-1-Plasmaspiegeln beziehungsweise den relativen Steigerungsfaktoren unter verschiedenen Graden der DPP-IV-Hemmung. Aus diesen lässt sich die Clearance nach der Formel $CL = k_0/C_{ss}$ [Gibaldi und Perrier 1982] einfach und korrekt ableiten. Die rasche Elimination von GLP-1 erlaubt dabei eine gestufte Steady-State-Infusion zur Bestimmung der Clearance von GLP-1 bei verschiedenen hohen resultierenden GLP-1-Plasmaspiegeln an ein und demselben Tier.

Leider lässt sich die Halbwertszeit in diesem Versuchsmodell aus mehreren Gründen nicht zuverlässig genug berechnen: zum einen ist die Genauigkeit der Bestimmung von Werten auf der Grundlage der Berechnung aus nur zwei (zudem kurz aufeinander folgenden) Punkten offensichtlich extrem gering (vergleiche 4.1.1.6) und zum anderen ist die derart berechnete Halbwertszeit in hohem Maße abhängig von der Größenordnung der GLP-1-Plasmaspiegel unmittelbar vor Absetzen der Infusion. Das beruht wiederum auf der nicht-linearen Kinetik (Kinetik nullter Ordnung) der metabolischen GLP-1-Elimination durch das Enzym DPP-IV in vivo, bei der die Halbwertszeit definitionsgemäß nicht konstant ist.

Hinzu kommt die zu berücksichtigende Tatsache, dass die resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel in Folge der exzessiven Infusionsraten an exogenem GLP-1 über 120 (pmol/kg)/h (GLP-1-Sättigung) deutlich oberhalb der physiologischen GLP-1-Plasma-Konzentrationen zwischen 1,4 und 30 pmol/L angesiedelt sind. Dies muss sowohl bei der Betrachtung der gemessenen Clearance als auch bei derjenigen der Halbwertszeit berücksichtigt werden.

Bedauerlicherweise befindet man sich diesbezüglich gewissermaßen in einer methodologischen Zwickmühle, da die gänzlich unphysiologischen GLP-1-Plasmaspiegel, die aus den exzessiven Infusionsraten der exogenen Zufuhr resultieren, weitaus genauere Ergebnisse liefern als die stärker streuenden endogenen GLP-1-Plasma-Konzentrationen. Darin dürfte auch die Tatsache begründet liegen, dass alle bisherigen Steady-State-Infusionsversuche [Oshima et al. 1988, Ørskov et al. 1993, Pridal et al. 1996, Deacon et al. 1996 (a), Deacon et al. 1996 (b)] das physiologischen Spektrum der GLP-1-Plasma-Konzentrationen außer Acht gelassen haben.

Ein weiterer Nachteil des gewählten Versuchsmodells ist die zentrale Zufuhr von exogenem GLP-1 über die V. jugularis, was nicht dem natürlichen Inkretionsweg aus den intestinalen L-Zellen entspricht. Damit wird mit dem Versuchsmodell der Steady-State-Infusionen zwar die systemische Elimination korrekt betrachtet, die mögliche (und wahrscheinliche) prä-systemische Elimination bleibt aber unberücksichtigt. Diesem Mangel wurde durch den Einsatz des Versuchsmodells der isoliert perfundierten Ratten-Leber Rechnung getragen.

5.1.2 Vorteile und Schwachpunkte der isoliert perfundierten Ratten-Leber

Der Vorteil des Versuchsmodells der isoliert perfundierten Ratten-Leber (IPRL) ist die einfache und sichere Erfassung der kinetischen Parameter Halbwertszeit in der Leber, hepatische Clearance und des hiervon abgeleiteten hepatischen Extraktionsquotienten unter Ausblendung anderer Einflussfaktoren des Organismus. Der Vergleich mit den Ergebnissen der in-vivo-Infusionsversuche erlaubt die Abschätzung der Bedeutung der Leber für die Eliminationskinetik von GLP-1 im Gesamtorganismus.

In der Ausblendung anderer Einflussfaktoren des Organismus liegt aber zugleich der Schwachpunkt der Methode, auch wenn die Leber das zentrale Eliminationsorgan im Sinne des First-Pass-Effektes zu sein scheint. Zudem ist der Einfluss des DPP-IV-Inhibitors BI- β auf die totale Clearance des Gesamtorganismus aus der IPRL nicht zuverlässig abzuschätzen.

Da die intrahepatische DPP-IV-Aktivität nahezu komplett gehemmt wurde, ist die totale Clearance des Gesamtorganismus den übrigen Eliminationswegen unterworfen, die an Hand des Versuchsmodells der IPRL nicht abgeklärt werden können. Desweiteren ist die IPRL ein artifizielles System mit mehreren nur annähernd physiologischen Parametern (ausschließlich venöse Perfusion, druckbedingte Flussrate, Konzentration und Spezifität des Albumins sowie fehlende Erythrozyten), deren tatsächlicher Einfluss nicht bekannt ist.

Die scheinbar lineare Kinetik (Kinetik erster Ordnung) angesichts der Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Substrat-Konzentration könnte darauf zurückzuführen sein, dass die gewählte Substrat-Konzentration weit unterhalb der Sättigung der Enzymkapazität angesiedelt ist. Daher wären weitere Versuche mit verschiedenen hohen Substrat-Konzentrationen empfehlenswert.

5.1.3 Vorteile und Schwachpunkte der Berechnung der kinetischen Parameter

Sowohl bei der Formel $t_{1/2} = \ln(2)/k$ [Derendorf 2002] als auch bei der Formel $MRT = 1/k$ [Derendorf 2002] ist kritisch anzumerken, dass diese Formeln nur für mono-exponentielle Funktionen gelten, da die Halbwertszeit und die mittlere Verweildauer nur bei einer linearen Kinetik (Kinetik erster Ordnung) konstant sind.

Für die Schätzung der Halbwertszeit und der mittleren Verweildauer im durch Steady-State-Infusion entstehenden Konzentrationsbereich wurde eine hypothetische Mono-Exponentialität des Kurvenverlaufs nach Absetzen der Infusion angenommen, obwohl auf Grund der metabolischen Elimination durch das Enzym DPP-IV von einer nicht-linearen Kinetik auszugehen war, weshalb das Versuchsmodell der Steady-State-Infusion ursprünglich gewählt worden war.

Dennoch so zu verfahren, empfahl sich angesichts der für die klinische Betrachtung größeren Anschaulichkeit und der für die biologische Wirksamkeit größeren Relevanz der Parameter Halbwertszeit und mittlere Verweildauer gegenüber dem Parameter Clearance. Die größere Relevanz des Parameters Halbwertszeit ergibt sich aus der Berücksichtigung des scheinbaren Verteilungsvolumens bei der Berechnung nach der Gleichung $t_{1/2} = (\ln[2] \times V_c)/CL$ [Derendorf 2002].

Andererseits ist die Clearance besser zur kinetischen Charakterisierung von Wirkstoffen geeignet, da gleichzeitige Veränderungen von scheinbarem Verteilungsvolumen und Clearance (zum Beispiel durch Induktion der Protein-Biosynthese von abbauenden Enzymen und von bindenden Plasma-Proteinen) die Halbwertszeit unbeeinflusst lassen können.

Das scheinbare Verteilungsvolumen im Steady-State zu berechnen, empfahl sich, da die Größenordnung der auf diese Weise ermittelten Werte Rückschlüsse auf die an dem scheinbaren Verteilungsvolumen beteiligten Flüssigkeitsräume gestattete (vergleiche 4.1.1.4).

5.1.4 Vorteile und Schwachpunkte der Charakterisierung der GLP-1-Kinetik

Die Verknüpfung und der Vergleich der Daten aus grundsätzlich verschiedenen Versuchsmodellen muss immer kritisch hinterfragt werden. So ist zum Beispiel der Vergleich der hepatischen Clearance in der IPRL mit der totalen Clearance in den Steady-State-Infusionsversuchen nicht als zwingend schlüssig zu rechtfertigen. Andererseits hat die Anwendung mehrerer verschiedener Versuchsmodelle den Vorteil der komplementären Beleuchtung verschiedener kinetischer Aspekte durch unterschiedliche Verfahren.

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 in-vivo-Infusionsversuche (Glycin-Isoform im Steady-State)

Bei den in der Literatur anzutreffenden Untersuchungen zur GLP-1-Kinetik unter Infusion von exogenem GLP-1 wurden bisher nur Einzelbefunde auf der Grundlage einer bestimmten Auswahl von GLP-1-Infusionsrate und Hemmstoff-Dosis erhoben. Das Peptidhormon GLP-1 unterliegt jedoch primär einer sättigbaren metabolischen Elimination durch das Enzym DPP-IV, weshalb die gewählten Infusionsraten an exogenem GLP-1 beziehungsweise die daraus resultierenden GLP-1-Plasmaspiegel eine nicht zu unterschätzende Bedeutung im Hinblick auf die Bewertung der Ergebnisse hat.

In der vorliegenden Arbeit werden erstmals die resultierenden Plasmaspiegel an GLP-1 in Folge von gestuften, das heißt systematisch diversifizierten Infusionsraten und Hemmstoff-Dosen im Hinblick auf ihren Einfluss auf die GLP-1-Kinetik beschrieben. Dadurch konnte zum einen die Eliminationskinetik von GLP-1 systematisch charakterisiert, zum anderen die Dosis-Findung für den DPP-IV-Inhibitor unterstützt und zum dritten der maximale Effekt der DPP-IV-Inhibition auf die Steigerung der GLP-1-Plasmaspiegel beschrieben werden.

Desweiteren darf die Rolle der physiologischen GLP-1-Plasma-Konzentrationen zwischen 1,4 und 30 pmol/L nicht unterschätzt werden. Die in der vorliegenden Arbeit gewählten Infusionsraten an exogenem GLP-1 von 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h resultieren (nach Subtraktion der Basislinien) in GLP-1-Plasmaspiegeln im genannten Spektrum. Frühere Steady-State-Infusionsversuche an Ratten [Oshima et al. 1988], an Hunden [Pridal et al. 1996] und an Schweinen [Deacon et al. 1996 (a), Deacon et al. 1996 (b)] ließen dies unberücksichtigt und haben resultierende GLP-1-Plasmaspiegel gewählt, die weit oberhalb der physiologischen GLP-1-Plasma-Konzentrationen lagen. Bei den Infusionsversuchen an Schweinen sind allerdings gravierende Unterschiede in Abhängigkeit vom angewandten Assay festzustellen [Deacon et al. 1996 (a), Deacon et al. 1996 (b)]. Lediglich bei Steady-State-Infusionsversuchen an Menschen [Ørskov et al. 1993] wurden zwar niedrigere, aber immer noch unphysiologisch hohe resultierende GLP-1-Plasmaspiegel über 100 pmol/L gewählt (vergleiche 5.1.1).

5.2.1.1 Halbwertszeit von GLP-1

Eine korrekte Charakterisierung der Halbwertszeit von GLP-1 in vivo in Abhängigkeit von der Infusionsrate an exogenem GLP-1 oder vom DPP-IV-Hemmungsgrad ist aus theoretischen und praktischen Gründen der gewählten Methode nicht möglich (vergleiche 5.1.1). Somit fungiert der Vergleich der Halbwertszeiten (vergleiche 4.1.3.3) lediglich als ein Hinweis auf eine Tendenz. Die Größenordnung der mittels des gewählten Zweipunktverfahrens errechneten Halbwertszeit ohne parallele DPP-IV-Hemmung lag mit $0,5 \pm 0,1$ Minuten deutlich unter der in der Literatur anzutreffenden Halbwertszeit von durchschnittlich $3,5 \pm 1,9$ Minuten (vergleiche 2.5.3). Zur exakten (wenn auch nur organbezogenen) Quantifizierung der GLP-1-Halbwertszeit sei auf die Ergebnisdiskussion der in-situ-Perfusionsversuche verwiesen.

Die im Rahmen der Steady-State-Infusionsversuche ermittelte GLP-1-Halbwertszeit ohne parallele DPP-IV-Hemmung von $0,5 \pm 0,1$ Minuten kann vernünftigerweise nur mit einer GLP-1-Halbwertszeit verglichen werden, die auch von vergleichbaren GLP-1-Plasmaspiegeln (26 ± 3 pmol/L GLP-1 ohne BI- β) vor Absetzen der Infusion ausgeht, da auf Grund der metabolischen Elimination durch das Enzym DPP-IV vom Vorliegen einer nicht-linearen Kinetik (Kinetik nullter Ordnung) ausgegangen werden muss. Die einzigen Halbwertszeiten, die diesem Ausgangsplasmaspiegel an GLP-1 entsprechen, sind die GLP-1-Halbwertszeit unter niedrigster DPP-IV-Hemmung mit $0,9 \pm 0,1$ Minuten (38 ± 4 pmol/L GLP-1) und annähernd noch die GLP-1-Halbwertszeit unter mittlerer DPP-IV-Hemmung mit $2,2 \pm 0,6$ Minuten (73 ± 7 pmol/L GLP-1).

Im Ganzen gesehen ergibt sich hier jedoch ein ganz ähnliches Bild wie jenes, das sich bei der Zusammenfassung der Steigerungsfaktoren bereits als Tendenz abzeichnete (4.1.3.1). Die deutlichste Verlängerung der Halbwertszeit ist ebenso wie die stärkste Steigerung des GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegels unter der Wirkung der niedrigen DPP-IV-Hemmung zu verzeichnen. Allerdings ist die Verlängerung der Halbwertszeit oberhalb der sub-niedrigen DPP-IV-Hemmung nicht signifikant. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der totalen Clearance, was auf Grund der gegenseitigen Abhängigkeit dieser beiden kinetischen Parameter, wie sie in der Gleichung $t_{1/2} = (\ln[2] \times Vc)/CL$ [Derendorf 2002] zum Ausdruck kommt, nicht anders zu erwarten war.

5.2.1.2 Clearance und Verteilungsvolumen im Steady-State von GLP-1

Offensichtlich sinkt die Clearance von GLP-1 mit steigender Dosis an GLP-1, das heißt, die Fähigkeit des Organismus zum Substrat-Abbau nimmt ab, wahrscheinlich da die Degradation (unter anderem durch das abbauende Enzym DPP-IV) gesättigt wird. Die Entscheidung für das Versuchsmodell der Steady-State-Infusionen war folglich richtig, da die Clearance nur im Steady-State korrekt bestimmt werden kann, wenn die Kinetik auf Grund der hier vorliegenden metabolischen Elimination durch das Enzym DPP-IV nicht-linear ist.

Die Clearance von GLP-1 differenziert nach der Infusionsrate an exogenem GLP-1 sinkt entsprechend der sättigbaren Elimination (nicht-lineare Kinetik oder Kinetik nullter Ordnung) mit steigender Infusionsrate ab (von 12 auf 40 [pmol/kg]/h um durchschnittlich $36 \pm 7\%$ beziehungsweise von 12 auf 120 [pmol/kg]/h um durchschnittlich $39 \pm 8\%$), so dass die deutlichste Absenkung des Clearance-Wertes unter jeweils identischer DPP-IV-Hemmung bereits im Bereich der physiologischen GLP-1-Plasma-Konzentrationen zwischen 1,4 und 30 pmol/L zu finden ist und höhere GLP-1-Infusionsraten zu keiner weiteren Absenkung der Clearance führen.

Bei graphischer Auftragung der Clearance-Werte unter den Infusionsraten 12, 40 und 120 (pmol/kg)/h an exogenem GLP-1 (7-37) ohne parallele DPP-IV-Hemmung (vergleiche 4.1.1.5) gegen die zugehörigen GLP-1-Plasmaspiegel, aus denen sie nach der Formel $CL = k_0/C_{ss}$ [Gibaldi und Perrier 1982] errechnet wurden, zeigt sich die erwartungsgemäß deutliche Abhängigkeit des kinetischen Parameters Clearance vom zeitgleich vorliegenden GLP-1-Plasmaspiegel (nicht gezeigt). So können im Bereich der physiologischen GLP-1-Plasma-Konzentrationen zwischen 1,4 und 30 pmol/L Clearance-Werte zwischen 140 und 70 (mL/min)/kg auftreten. Werden die GLP-1-Plasmaspiegel durch Steady-State-Infusion versuchsbedingt über die physiologischen Grenzen hinaus gesteigert, so sind noch niedrigere Clearance-Werte zu erwarten. Im Lichte dieses Zusammenhangs betrachtet, scheint die Autorengruppe mit den Clearance-Werten um 112 ± 7 (mL/min)/kg [Deacon et al. 1996 (a), Hassan et al. 1999] noch eher die physiologischen Verhältnisse widerzuspiegeln, während die Autorengruppe mit den Clearance-Werten um 18 ± 5 (mL/min)/kg [Oshima et al. 1988, Ørskov et al. 1993, Pridal et al. 1996] wahrscheinlich den Nebeneffekten des eigenen Versuchsdesigns – nämlich unphysiologisch hohen resultierenden GLP-1-Plasmaspiegeln – unterlegen ist.

Allerdings steigt die Clearance (und damit die Zunahme der Abbaufähigkeit) unter exzessiven Infusionsraten an exogenem GLP-1 wieder an. Dieser Wiederanstieg der Clearance-Werte unter der GLP-1-Infusionsrate von 1.500 (pmol/kg)/h könnte zum einen die Folge einer forcierten Diurese durch Anstieg des intravasalen Druckes auf Grund der mit hohen Infusionsraten einhergehenden hohen Infusionsvolumina zu sehen sein. Zum anderen könnte der Wiederanstieg der Clearance-Werte durch eine Freisetzung der intrazellulär (lysosomal) lokalisierten DPP-II auf Grund von zytotoxischen Effekten dieser exzessiv hohen Dosen bedingt sein.

Die Größenordnung des scheinbaren Verteilungsvolumens im Steady-State erlaubt den sicheren Rückschluss auf eine ausschließliche Verteilung im Extrazellulärraum, da dieser 160 mL/kg (45 mL/kg Plasma + 115 mL/kg interstitielle Flüssigkeit) [Boylan et al. 1976] umfasst. Dies ist gleichwohl lediglich eine Bestätigung der Erwartung an das Verteilungsverhalten eines derartigen Peptids.

5.2.1.3 Abhängigkeit der GLP-1-Kinetik vom DPP-IV-Hemmungsgrad

Die Betrachtung der Abhängigkeit der Steigerungsfaktoren und der Clearance-Werte vom DPP-IV-Hemmungsgrad, das heißt von den Plasma-Konzentrationen des Inhibitors BI- β , ist primär von pharmakologischem Interesse unter dem Aspekt der Dosis-Findung beziehungsweise des so genannten PK-PD-Modellings (der Korrelationsbeschreibung zwischen dem pharmakokinetischen Schicksal eines Wirkstoffes und seinen pharmakodynamischen Effekten). Ein Vergleich der hier für den DPP-IV-Inhibitor BI- β vorliegenden Ergebnisse mit den Effekten der DPP-IV-Hemmung durch in früheren Arbeiten eingesetzten DPP-IV-Inhibitoren würde mit den dann erforderlichen umfangreichen enzymkinetischen Einlassungen der Rahmen der vorliegenden Arbeit bei weitem überschreiten.

Steigerungsfaktoren von GLP-1 nach dem DPP-IV-Hemmungsgrad

Die Steigerungsfaktoren, das heißt die relative Erhöhung der GLP-1-Plasmaspiegel durch parallele Infusion des DPP-IV-Inhibitors BI- β , nehmen mit zunehmender Infusionsrate an exogenem GLP-1 signifikant ab (von 12 auf 40 [pmol/kg]/h um durchschnittlich 10 ± 5 % beziehungsweise von 12 auf 120 [pmol/kg]/h um durchschnittlich 23 ± 9 %).

Somit sind die stärksten Steigerungen im Bereich der physiologischen GLP-1-Plasma-Konzentrationen anzutreffen, die geringsten hingegen bei exzessiven GLP-1-Infusionsraten von 300 (pmol/kg)/h (von 12 auf 300 [pmol/kg]/h um 31 %). Da in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal ein Versuchsdesign mit gestuften, das heißt systematisch diversifizierten Infusionsraten angewandt wurde, ist ein Vergleich mit der Literatur nicht möglich.

Optimale, das heißt durch BI- β -Dosiserhöhung nicht weiter signifikant anhebbare Steigerungsfaktoren der GLP-1-Plasmaspiegel (nämlich Steigerungsfaktor 4,0 unter der den durchschnittlichen physiologischen GLP-1-Plasma-Konzentrationen am besten entsprechenden GLP-1-Infusionsrate von 12 [pmol/kg]/h) werden bereits unter Dosen des DPP-IV-Hemmstoffs BI- β erreicht, die zu Plasma-Konzentrationen des Inhibitors von etwa 0,4 $\mu\text{mol/L}$ führen (niedrige DPP-IV-Hemmung – vergleiche 4.1.2.9).

Clearance von GLP-1 nach dem DPP-IV-Hemmungsgrad

Die Clearance von GLP-1 kann mit Gabe des DPP-IV-Hemmstoffes BI- β auf tiefstens 10 (mL/min)/kg absinken, da dieser Wert der GFR in der Niere entspricht. Als Referenzgröße wird die Inulin-Clearance der Ratte mit rund 10 (mL/min)/kg beziffert [Harvey und Malvin 1965, Wüthrich 2000]. Unter maximaler DPP-IV-Blockade durch mittlere DPP-IV-Hemmung (bei GLP-1-Sättigung mit 300 [pmol/kg]/h GLP-1 [7-37] – vergleiche 4.1.2.7) ist die Differenz zwischen dem dann erreichten Clearance-Wert von 22 ± 2 (mL/min)/kg und der genannten renalen Clearance von 10 (mL/min)/kg gleich der Summe der alternativen Eliminationswege, also etwa 12 (mL/min)/kg.

Die Clearance-Werte differenziert nach dem DPP-IV-Hemmungsgrad sinken nicht-linear mit steigendem DPP-IV-Hemmungsgrad ab, allerdings signifikant nur bis zur sub-niedrigen DPP-IV-Hemmung (von 0 auf niedrigste DPP-IV-Hemmung um durchschnittlich 36 ± 9 % beziehungsweise von 0 auf sub-niedrige und höhere DPP-IV-Hemmung um durchschnittlich 68 ± 4 %). Somit werden minimale, das heißt durch BI- β -Dosiserhöhung nicht weiter absenkbare Clearance-Werte bereits unter Dosen des DPP-IV-Hemmstoffs BI- β erreicht, die zu Plasma-Konzentrationen des Inhibitors von etwa 0,06 $\mu\text{mol/L}$ führen (sub-niedrige DPP-IV-Hemmung – vergleiche 4.1.3.2).

In der Zusammenschau der Abhängigkeit der Steigerungsfaktoren und der Abhängigkeit der Clearance-Werte vom DPP-IV-Hemmungsgrad liegt der Schluss nahe, dass mit einer Plasma-Konzentration des DPP-IV-Hemmstoffes BI- β im Bereich von 0,04 und 0,6 $\mu\text{mol/L}$ bereits die maximale DPP-IV-Inhibition erreicht ist.

5.2.1.4 Blutzuckerspiegel unter GLP-1-Infusion

Tatsächlich ist unter DPP-IV-Hemmung durch BI- β eher eine Erhöhung als eine Absenkung des Blutzuckerspiegels zu beobachten. Mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit kann jedoch ein Insulin-Release durch erhöhte GLP-1-Plasmaspiegel ausgeschlossen werden.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die unter DPP-IV-Hemmung erhöhten Blutzuckerspiegel wären unerwünschte Wirkungen der Substanz im Sinne einer zellulären Stressung, die durch Botenstoffe zur Aktivierung des Stresshormon-Systems geführt haben könnte. Ob die anscheinend den Blutzuckerspiegel erhöhende Wirkung der parallelen DPP-IV-Hemmung ein methodischer Nebeneffekt ist (zum Beispiel durch den zweiten Jugularis-Katheter) oder ein Substanzeffekt von BI- β und damit eventuell auf eine pharmakotherapeutische Kontraindikation (vergleiche 1.3.3) hinweist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Der terminale Anstieg des Blutzuckerspiegels sowohl mit als auch ohne parallele DPP-IV-Hemmung dürfte höchst wahrscheinlich auf die hypovolämische Stressung zurückzuführen sein, die die Abnahme relativ großer Blutvolumina in kurzen Zeitabständen hintereinander unvermeidlich bedeutet.

5.2.2 in-situ-Perfusionsversuche (isoliert perfundierte Ratten-Leber)

5.2.2.1 GLP-1-Kinetik in der rezirkulierenden IPRL

Halbwertszeit von GLP-1 in der rezirkulierenden IPRL

In den bisherigen Untersuchungen zur Halbwertszeit von GLP-1 wurden entweder in-vitro-Verfahren verwendet, die kaum dazu geeignet waren, die tatsächlichen physiologischen Verhältnisse wiederzugeben, oder in-vivo-Untersuchungen, die – wie die Steady-State-Infusionsversuche der vorliegenden Arbeit – den Imponderabilien von extremer Kürze der Halbwertszeit und geringer Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf Grund der Abhängigkeit vom Ausgangsniveau der GLP-1-Plasma-Konzentration unterworfen waren. Indem hier zum ersten Mal das Substrat GLP-1 (in beiden Isoformen) dem bekannten in-situ-Versuchsmodell der isoliert perfundierten Ratten-Leber (IPRL) unterzogen wird, wird zugleich ein Mittelweg zwischen der wenig physiologischen in-vitro-Situation und der schlecht messbaren in-vivo-Situation begangen. Ein Vergleich mit der Literatur ist deshalb nicht möglich.

Die tatsächlich unphysiologisch hohe Ausgangskonzentration von GLP-1 im nativen Perfusat von über 100 pmol/L war nötig, um den Abfall der Konzentration durch die intrahepatische Elimination überhaupt zeigen zu können. Daher wurde die hepatische Clearance auch dem entsprechenden Wert unter einer annähernd gleich hohen Matrix-Konzentration in vivo gegenübergestellt (vergleiche 4.3.1.2).

Das Hauptaugenmerk bei der Betrachtung der Ergebnisse der IPRL im rezirkulierenden Modell ruht auf der Halbwertszeit, da dieser Parameter mit der Formel $t_{1/2} = \ln(2)/k$ [Derendorf 2002] ohne Einfluss anderer Faktoren direkt aus der Steigungskonstante k errechnet wird. Die Halbwertszeit ist mit $5,0 \pm 1,3$ Minuten für die Amid-Isoform und mit $6,1 \pm 1,6$ Minuten für die Glycin-Isoform (im arithmetischen Mittel aller neunzehn Lebern $5,7 \pm 1,5$ Minuten) zu beziffern. Der Unterschied zwischen den Isoformen ist mit $p = 0,114$ nicht signifikant.

Die Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Substrat-Konzentration folgt auf Grund der metabolischen Elimination durch das Enzym DPP-IV einer nicht-linearen Kinetik (Kinetik nullter Ordnung). Dass diese Abhängigkeit hier dennoch als linear erscheint, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die gewählte Substrat-Konzentration weit unterhalb der Sättigung der Enzymkapazität angesiedelt ist.

Wie die Berechnung des scheinbaren Verteilungsvolumens im Steady-State gezeigt hat, überschreitet das Peptidhormon GLP-1 im Bereich der physiologischen GLP-1-Plasma-Konzentrationen erwartungsgemäß nicht die Grenzen des Extrazellulärraumes (vergleiche 5.2.1.2). Vor diesem Hintergrund lässt sich die Aussage treffen, dass jede in-vivo-Halbwertszeit, die gleichgroß oder sogar größer als die mit ausreichender Exaktheit gemessene in-situ-Halbwertszeit von GLP-1 mit $5,7 \pm 1,5$ Minuten ist [Oshima et al. 1988, Ørskov et al. 1993], nicht der tatsächlichen in-vivo-Halbwertszeit entsprechen kann, da die übrigen Eliminationsorgane die GLP-1-Halbwertszeit mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit weiter verkürzen. Nichtsdestoweniger legt der Vergleich der hepatischen Clearance-Werte der IPRL mit den totalen Clearance-Werten der Steady-State-Infusionsversuche eine überragende Rolle der Leber für die GLP-1-Elimination nahe (vergleiche 4.3.1.2).

In Anwesenheit des DPP-IV-Hemmstoffes BI-β in einer Perfusat-Konzentration, die den BI-β-Plasmaspiegeln durch niedrige DPP-IV-Hemmung entsprechen, verlängert sich die Halbwertszeit von GLP-1 im in-situ-Perfusionsversuch von $5,7 \pm 1,5$ auf 230 ± 135 Minuten – ein Wert, der vernünftigerweise nur in seiner ungefähren Größenordnung registriert werden sollte.

Nichtsdestoweniger wird dadurch deutlich, dass eine DPP-IV-Hemmung in maximal wirksamer Dosis unzweifelhaft zu einer signifikanten Verlängerung der GLP-1-Halbwertszeit führt. Eine kaum messbare Veränderung der Halbwertszeit durch DPP-IV-Hemmung in noch höherer Dosierung von $1,5 \pm 0,4$ auf $1,9 \pm 0,5$ Minuten [Deacon et al. 1996 (b)] erscheint daher wenig plausibel und eher durch die grundsätzlich problematische Messung der GLP-1-Halbwertszeit im Rahmen eines Infusionsversuches verursacht.

hepatische Clearance von GLP-1 in der rezirkulierenden IPRL

Die Berechnung der hepatischen Clearance nach der Formel $CL = k \times V_c$ [Derendorf 2002] dient primär dem Vergleich mit der totalen Clearance des Gesamtorganismus im Steady-State-Infusionsversuch bei gleichen Ausgangskonzentrationen im Plasma wie im Perfusat, um auf diesem Wege den Beitrag der Leber zur in-vivo Elimination von GLP-1 zu quantifizieren. Die hepatische Clearance beträgt im arithmetischen Mittel aller neunzehn Lebern 10 ± 2 mL/min beziehungsweise auf die Körpermasse bezogen 34 ± 8 (mL/min)/kg und macht damit mehr als die Hälfte der totalen Clearance in vivo aus, welche bei einer vergleichbaren Ausgangskonzentration von 100 pmol/L mit 60 (mL/min)/kg zu beziffern ist (vergleiche 4.3.1.2). Der Anteil der hepatischen Clearance an der totalen Clearance beträgt somit 57 ± 13 % und unterstreicht damit die primäre Rolle der Leber in der gesamten Elimination.

Dem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den auf die Körpermasse bezogenen Clearance-Werten der beiden Isoformen ($p = 0,014$) ist der statistisch nicht signifikante Unterschied zwischen den Halbwertszeiten der beiden Isoformen ($p = 0,114$) gegenüberzustellen, wobei sich beide Parameter aus der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante k errechnen. Ob der grenzwertig (nicht-)signifikante Unterschied zwischen den organspezifischen Clearance-Werten der beiden Isoformen ($p = 0,059$) denjenigen des Parameters unter Berücksichtigung der gesamten Körpermasse bei größerer Stichprobenzahl bestätigt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Angesichts der Größenordnung der Werte entspricht allerdings auch einer statistischen Signifikanz kaum eine biologische Relevanz.

hepatischer Extraktionsquotient von GLP-1 in der rezirkulierenden IPRL

Der hepatische Extraktionsquotient lag mit dem arithmetischen Mittelwert von 30 ± 11 % im unteren Drittel des Spektrums. Ein Extraktionsquotient unter 30 % gilt nach der üblichen

Klassifikation als niedrig [Rowland und Tozer 1995 (b)]. Dies steht im Einklang mit der geringen Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Flussrate, so dass GLP-1 als so genanntes „Low-Extraction-Substrat“ klassifiziert werden darf, das heißt, die hepatische Elimination ist in erster Linie von der intrinsischen Clearance (CL_{int}) durch die katalytische Aktivität der intrahepatischen DPP-IV sowie vom freien Anteil an GLP-1 (f_U) beziehungsweise von seiner Bindung an Blutbestandteile und weniger vom Leberblutfluss (Q_H) abhängig. Man kann also im Falle des Peptidhormons GLP-1 von einer kapazitätslimitierten Clearance oder restriktiven Elimination (im Gegensatz zu einer perfusionslimitierten Clearance oder nicht-restriktiven Elimination bei „High-Extraction-Substraten“) der Leber sprechen. Demnach gehen nur etwa 30 % des vom Darm sezernierten GLP-1 im First-Pass der Leber verloren und stehen in vivo den im systemischen Kreislauf nachgeschalteten β -Zellen nicht mehr zur Verfügung.

5.2.2.2 GLP-1-Kinetik in der Single-Pass-IPRL

Die Beschreibung der GLP-1-Kinetik, nämlich die Halbwertszeit von GLP-1 in der Auswaschphase des DPP-IV-Hemmstoffs BI- β dient primär als Indikator für die Halbwertszeit der Restitution der katalytischen Aktivität der DPP-IV beziehungsweise als Maß für die Geschwindigkeit der Abdiffusion („Off-Kinetik“) des Inhibitors BI- β von seinem „Rezeptor“ DPP-IV.

Die beiden Hypothesen zur Erklärung für die „Ja/Nein-Antwort“ (mit Hemmstoff/ohne Hemmstoff) in der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Hemmstoff-Dosis und Steigerungswirkung auf die GLP-1-Plasmaspiegel waren: zum einen die Möglichkeit, dass die gewählten Hemmstoff-Dosen zu hoch und damit weit jenseits der IC_{50} angesiedelt waren (vergleiche 4.1.2.4) und zum anderen die Möglichkeit, dass der Inhibitor sehr rasch an den „Rezeptor“ DPP-IV andockte, aber allzu langsam von selbigem wieder abdiffundierte, so dass das katalytische Zentrum der DPP-IV bereits von BI- β besetzt war, wenn die exogen zugeführten Substratmengen anfluteten.

Der Unterschied der Steigungskonstanten der Funktionsgeraden von $t_{10} = 46$ min bis $t_{12} = 50$ min und der Funktionsgeraden von $t_{13} = 55$ min bis $t_{20} = 90$ min = t_{end} legt den Schluss nahe, dass während der initialen Halbwertszeit (in den ersten 5 bis 10 Minuten) der BI- β -Auswaschphase ein Auswaschen auch von anderen Bindungsstellen als während der terminalen Halbwertszeit erfolgt. Da die Extraktionsrate von GLP-1 (7-37) innerhalb dieser terminalen Halbwertszeit wieder das ungehemmte Ausgangsniveau erreicht (also die katalytische Aktivität von DPP-IV offenbar vollkommen wiederhergestellt ist), ist zudem

davon auszugehen, dass die Bindungsstellen der terminalen Halbwertszeit überwiegend nicht mit DPP-IV identisch sind. In diesem Zusammenhang ist auch an eine biliäre Exkretion zu denken, die durch Unterlassung der Katheterisierung des Gallengangs unbemerkt zurück in das Perfusat gelangt sein könnte. Dieser Aspekt ist auch konsistent mit der etwa 100-fach höheren Anreicherung von BI- β im Lebergewebe als im Perfusat, wie aus der IPRL im rezirkulierenden Modell bekannt ist, da diese von der großen Kapazität der Leber zur unspezifischen Bindung von BI- β im Lebergewebe zeugt.

Die Restitution der katalytischen Aktivität der DPP-IV im Single-Pass-Modell der IPRL darf größenordnungsmäßig als Maß für die Off-Kinetik des Inhibitors BI- β vom „Rezeptor“ DPP-IV angenommen werden und spricht somit eindeutig für eine Halbwertszeit der Off-Kinetik kleiner als 30 Minuten. Diese Halbwertszeit ist angesichts der Dauer der Steady-State-Infusionen nicht als lang anzusehen im Sinne der beschriebenen Besetzung des katalytischen Zentrums der DPP-IV.

Im Lichte dieses Ergebnisses und der Ergebnisse des Steady-State-Infusionsversuchs mit niedrigster DPP-IV-Hemmung (nämlich Zwischenwerte sowohl der totalen Clearance als auch der Steigerungsfaktoren von GLP-1) lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass mit Plasmaspiegeln des DPP-IV-Hemmstoffs BI- β zwischen 0,06 und 0,4 $\mu\text{mol/L}$ bereits maximale DPP-IV-Inhibition erreicht ist.

Die offenbar vollständige Wiederherstellung der katalytischen Aktivität von DPP-IV am Ende der Auswaschphase, obwohl im Perfusat noch Hemmstoff in relevanter Größenordnung messbar ist, sowie das scheinbare Verteilungsvolumens im Steady-State (V_{ss}) von etwa 100-fach höherer Anreicherung von BI- β im Lebergewebe im Vergleich zum Perfusat unterstützen die bereits im Zusammenhang mit der terminalen Halbwertszeit angesprochene Annahme, dass es eine (parenchymal-hepatische oder endotheliale) Gewebefixierung des DPP-IV-Inhibitors abseits des „Rezeptors“ DPP-IV gibt.

Die Tatsache, dass es unter DPP-IV-Hemmung im mikromolaren Bereich dennoch nur zu einer etwa 50 %-igen Hemmung beziehungsweise nur zu einer anderthalbfachen Steigerung kommt, ist ebenso wie das tendenzielle Absinken der Steigerungsfaktoren unter hohen BI- β -Dosen in den Steady-State-Infusionsversuchen (vergleiche 4.1.2.9) theoretisch auf zytotoxische Effekte zurückzuführen, wodurch die intrazellulär (lysosomal) lokalisierte DPP-II freigesetzt worden sein könnte, welche somit zur Absenkung des GLP-1-Plasmaspiegels durch zusätzliche Inaktivierung des Peptidhormons beigetragen haben könnte. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass das Perfusat am Ende des Versuchs praktisch frei von DPP-IV-Aktivität ist, wie die in-vitro-Stabilitätstests zeigen. Noch weniger wahrscheinlich,

wenngleich im Rahmen dieser Arbeit nicht mit Sicherheit auszuschließen, sind Clusterbildungen des DPP-IV-Inhibitors bei hohen Plasmaspiegeln, der dann durch diese Aggregation zu Polymeren nicht mehr an den biologischen „Rezeptor“ DPP-IV andocken kann. Diese Möglichkeit erscheint unter anderem deshalb weniger wahrscheinlich, weil sich auch das Verhalten der Steigerungsfaktoren bei den Steady-State-Infusionsversuchen in Abhängigkeit von den GLP-1-Infusionsraten unterscheidet: geringe exogene GLP-1-Plasmaspiegel zeigen den Abfall der Steigerung unter hohen Inhibitor-Dosen in viel stärkerem Maße als mittlere und hohe GLP-1-Plasmaspiegel.

5.2.3 in-vitro-Stabilitätsversuche

Versuche in unterschiedlichen Matrices wie Plasma [Wettergren et al. 1998] und Serum [Kieffer et al. 1995, Hinke et al. 2002] – noch dazu von so verschiedenen Spezies wie Mensch [Hinke et al. 2002] und Ratte [Kieffer et al. 1995] und in verschiedenen Verdünnungen – zu vergleichen ist nicht unproblematisch, wenngleich zumindest der Unterschied zwischen den Matrices Plasma (mit Blutgerinnungsfaktoren) und Serum (ohne Blutgerinnungsfaktoren) keinen Einfluss auf die Degradation von GLP-1 durch DPP-IV haben dürfte.

Die Beschreibungsversuche der GLP-1-Kinetik auf der Basis von in-vitro-Untersuchungen, die sich zudem gezwungenermaßen auf die Halbwertszeit beschränken, sind inadäquat und nicht geeignet zur Charakterisierung der Eliminationskinetik von GLP-1 im Organismus. Dies wird deutlich im Vergleich sowohl zu den in-vivo-Daten aus der Literatur als auch zu den Ergebnissen der in-vivo-Infusionsversuche und der in-situ-Perfusionsversuche der vorliegenden Arbeit.

Durchaus vergleichbar erscheinen aber die in-vitro-Daten aus der Literatur mit den in-vitro-Stabilitätsversuchen. So liegt die dominante terminale Halbwertszeit von 100 pmol/L GLP-1 (7-37) inkubiert in Rattenvollblut bei +39 °Celsius mit 40 ± 17 Minuten (vergleiche 4.3.1.2) in der Größenordnung der Halbwertszeit von 400 pmol/L der Glycin-Isoform inkubiert in unverdünntem Human-Plasma bei +37 °Celsius mit 32 ± 3 Minuten [Wettergren et al. 1998]. Diese Vergleichbarkeit der Größenordnung der terminalen Halbwertszeit trotz der sehr unterschiedlichen Substrat-Konzentrationen könnte darauf hindeuten, dass die nicht-lineare Kinetik (Kinetik nullter Ordnung) der metabolischen Elimination durch das Enzym DPP-IV bei den in-vitro-Versuchen in den Hintergrund tritt zu Gunsten einer nicht-enzymatischen Inaktivierung, die auf Grund der linearen Kinetik (Kinetik erster Ordnung) eine konstante, das heißt von der Substrat-Konzentration unabhängige Halbwertszeit aufweist.

5.3 Schlussfolgerungen

In den letzten Jahren wurden im Interesse der Verminderung (Reduction) und Vermeidung (Replacement) von Tierversuchen vermehrt Anstrengungen unternommen, in-vitro-gewonnene Daten auf in-vivo-gegebene Verhältnisse zu extrapolieren. Die in-vitro-gemessenen Halbwertszeiten des glukagonähnlichen Peptids-1 sind jedoch offensichtlich sowohl hinsichtlich ihrer Größenordnung als auch in Bezug auf die postulierten Unterschiede zwischen den beiden GLP-1-Isoformen von geringer Aussagekraft für die in-vivo-gegebenen Verhältnisse.

Die Verwendung von kombinierten Steady-State-Infusionen ist ein geeignetes Verfahren zur Dosis-Findung für DPP-IV-Inhibitoren, soweit man die Größenordnung der in vivo tatsächlich bestehenden GLP-1-Plasma-Konzentrationen im Auge behält.

Keine der in der Literatur zitierten oder in dieser Arbeit verwendeten Methoden ist alleine für sich genommen dazu geeignet, die Eliminationskinetik eines Enzymsubstrates in toto zu charakterisieren. Erst die Kombination mehrerer Verfahren ermöglicht die Erfassung der wichtigsten kinetischen Parameter. Allerdings muss dann immer auch die Gewichtung der Ergebnisse aus verschiedenen Verfahren kritisch diskutiert werden.

Trotz der hervorragenden Rolle, die die Leber beim First-Pass-Effekt spielt, kommen von den im Darm gebildeten GLP-1-Molekülen kontinuierlich (weil von der Flussrate unabhängig) immerhin 70 % im systemischen Kreislauf (und folglich bei den β -Zellen des endokrinen Pankreas) an. Damit ist es der Natur anscheinend gelungen, die Bedeutung der Filterfunktion der Leber im Interesse der Bioverfügbarkeit von GLP-1 und damit der Funktion der entero-insularen Achse gering zu halten.

6 Zusammenfassung

Orale und intravenöse Glukose-Applikationen führen zu vergleichbar hohen Blutzuckerspiegeln, aber zu unterschiedlich hohen Insulin-Ausschüttungen. Spezialisierte Darmzellen reagieren auf Glukose im Chymus mit Ausschüttung von Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) in die portale Blutbahn, einem Peptidhormon, das die β -Zellen für den folgenden Glukose-Reiz sensibilisiert und somit selektiv unter erhöhten Blutzuckerspiegeln die Insulin-Freisetzung verstärkt, ohne diese selber zu provozieren. Die Funktion dieser entero-insularen Achse wird von der körpereigenen Dipeptidyl-Peptidase-IV (DPP-IV) limitiert.

Der gegenwärtig modernste Ansatz in der humanmedizinischen Behandlung des nicht-insulin-abhängigen Diabetes mellitus (NIDDM) zielt auf die Hemmung der DPP-IV ab, um die GLP-1-Plasma-Konzentration zu erhöhen und um dadurch wiederum den Insulin-Release in Abhängigkeit von erhöhten Blutzuckerspiegeln zu steigern. Im Vordergrund stehen dabei die Vorteile der sicheren Vermeidung von insulinbedingten Hypoglykämien einerseits und der Möglichkeit der oralen Administration des Enzyblockers andererseits.

Im Gegensatz zum Hund, bei dem sich die Zuckerkrankheit fast ausschließlich als sekundärer (insulin-abhängiger) Diabetes mellitus manifestiert, herrscht beim Menschen wie bei der Katze der Typ 2 (NIDDM) vor, weshalb bei letzterer Spezies der Einsatz von oralen Antidiabetica durchaus Erfolg verspricht, wie die Erfahrungen mit dem Sulfonylurea-Derivat Glipizid zeigen. Da die Residualkapazität der β -Zellen von feline Diabetikern und damit der körpereigene Insulin-Release jedoch erheblichen Schwankungen unterworfen ist, ist damit auch ein Hypoglykämie-Risiko gegeben, das unter DPP-IV-Hemmung vermeidbar wäre.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss eines DPP-IV-Hemmstoffes auf die Eliminationskinetik von GLP-1 mit Hilfe von systematisch kombinierten Infusionsregimes des Enzymsubstrates (GLP-1) und des Enzyminhibitors am Modell der Ratte beschrieben. Die Hemmstoff-Dosis mit dem maximalen Effekt wird ermittelt und der Anteil der hepatischen Clearance und der Vollblut-Clearance an der totalen Elimination von GLP-1 ohne DPP-IV-Hemmung mit Hilfe der isoliert perfundierten Ratten-Leber sowie durch in-vitro-Tests wird annähernd quantifiziert. Schließlich wird die Abhängigkeit der Ergebnisse von dem gewählten Versuchsdesign demonstriert.

Die totale Clearance des DPP-IV-Substrates GLP-1 beziffert sich ohne Hemmstoff auf mindestens 57 ± 17 (mL/min)/kg und unter Einfluss des DPP-IV-Inhibitors auf mindestens 22 ± 2 (mL/min)/kg. Die totale Clearance ist in hohem Maße von der jeweiligen Plasma-

Konzentration abhängig, so dass die Clearance-Werte im Bereich der physiologischen GLP-1-Plasma-Konzentrationen zwischen 139 ± 57 (mL/min)/kg und 73 ± 15 (mL/min)/kg streuen. Im Durchschnitt aller GLP-1-Infusionsraten wurde die maximale Steigerung der GLP-1-Plasmaspiegel (Faktor 3,4) unter einer Hemmstoff-Konzentration von $0,4 \mu\text{mol/L}$ Plasma erreicht. Die Leber hat als zentrales Entgiftungsorgan einen Anteil von 57 % (34/60) an der totalen Clearance des Gesamtorganismus, die plasmalösliche DPP-IV hingegen nur einen Anteil von etwas über 1 % (0,7/60). Der relativ niedrige hepatische Extraktionsquotient von 30 ± 11 % erlaubt im Umkehrschluss sieben von zehn GLP-1-Molekülen trotz First-Pass-Effekt den Eintritt in den systemischen Kreislauf und damit die Möglichkeit, die Rezeptoren auf den β -Zellen zu erreichen (70 % Bioverfügbarkeit). Die Halbwertszeit der Amid-Isoform (7-36 amide) in der isoliert perfundierten Ratten-Leber beträgt $5,0 \pm 1,3$ Minuten und unterscheidet sich damit statistisch nicht signifikant ($p = 0,114$) von der Halbwertszeit der Glycin-Isoform (7-37) mit $6,1 \pm 1,6$ Minuten.

7 Summary

Characterisation of elimination kinetics of glucagon-like peptide-1 as substrate of dipeptidyl-peptidase-IV with and without enzyme inhibition in the rat model

Orally and intravenously administered glucose yields comparable levels of glucose in plasma but different responses of insulin-release. Specialised mucosa cells react to glucose contents in chyme with release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) into the portal bloodstream, a peptide hormone, that makes beta-cells more sensitive to the subsequent glucose stimulus and thereby enhances the insulin-release exclusively under increased blood glucose levels without causing the insulin-release directly. The capacity of this entero-insular axis is limited primarily by the endogenous enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV).

Prevailingly the most progressive approach to therapy of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) in human medicine is targeted on the inhibition of DPP-IV, in order to raise GLP-1 concentration in plasma and to increase consequently the insulin-release in dependence on elevated blood glucose levels. In the limelight of discussion are the advantages of certain avoidance of insulin-caused hypoglycaemia on the one hand and the possibility of oral administration of the antienzyme on the other hand.

In contrast to the condition in dogs, where the disease manifests almost exclusively in the form of secondary (insulin-dependent) diabetes mellitus, the type 2 (NIDDM) predominates in humans as well as in cats, whence it comes that the employment of oral antidiabetics in the latter species is quite promising, as the experience with the sulfonyl urea derivative glipizide has shown. As however the residual capacity of beta-cells of feline diabetics with regard to the release of endogenous insulin is subject to considerable variation, the risk of inducing hypoglycaemia is given by use of both insulin and sulfonyl urea derivatives, whereas this threat is circumvented by use of DPP-IV-inhibitors.

In the present thesis the effect of DPP-IV inhibition on the elimination kinetics of GLP-1 is described by means of systematically combined infusion of the enzyme's substrate (GLP-1) and its antienzyme in the rat model. The maximum effective dose of DPP-IV inhibitor is determined and the portion of hepatic clearance and whole blood clearance of total elimination of GLP-1 without concurrent DPP-IV inhibition is quantified approximately by means of isolated perfused rat livers and in-vitro-experiments. Finally the dependence of results on the respective experimental design is demonstrated.

The total clearance of GLP-1 as substrate of DPP-IV without concurrent inhibition amounts to at least 57 ± 17 (mL/min)/kg and under influence of the DPP-IV-inhibitor to at least 22 ± 2 (mL/min)/kg. The value of clearance is highly dependent on the respective substrate concentration in plasma, so that the values range from 139 ± 57 (mL/min)/kg to 73 ± 15 (mL/min)/kg within the bounds of physiological GLP-1 concentrations in plasma. The maximum increase of GLP-1 levels in plasma (factor 3.4) on average of all GLP-1 infusion rates was attained by a DPP-IV inhibitor concentration in plasma of $0.4 \mu\text{mol/L}$. The liver as central detoxication-organ figures out at 57 % (34/60) of total clearance, the soluble DPP-IV fraction in plasma however accounts for only about 1 % (0.7/60) of total clearance. The relatively low hepatic extraction ratio of 30 ± 11 % reversely allows seven out of ten GLP-1 molecules to enter the systemic circulation in spite of the first-pass-effect and thereby to reach possibly the receptors on the beta-cells (70 % bioavailability). The half-life of GLP-1 (7-36 amide) in the isolated perfused rat liver amounts to 5.0 ± 1.3 minutes, hereby differing statistically not significantly ($p = 0.114$) from the half-life of GLP-1 (7-37) with 6.1 ± 1.6 minutes.

8 Literaturverzeichnis

1 **Abbas** AK, Lichtman AH, Pober JS (1997):

Congenital and Acquired Immunodeficiencies (Severe Combined Immunodeficiencies)

in **Abbas** AK, Lichtman AH, Pober JS (Hrsg.):

Cellular and Molecular Immunology, 3rd edition, WB Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, 446-448

2 **Abbott** CA, McCaughan GW, Gorrell MD (1999):

Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted β -propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity.

FEBS Letters, **458**, 278-284

3 **Adelhorst** K, Hedegaard BB, Knudsen LB, Kirk O (1994):

Structure-activity studies of glucagon-like peptide-1.

J Biol Chem, **269**, 6275-6278

4 **Ahrén** B, Holst JJ, Mårtensson H, Balkan B (2000):

Improved glucose tolerance and insulin secretion by inhibition of dipeptidyl peptidase IV in mice.

Eur J Pharm, **404**, 239-245

5 **Ahrén** B, Larsson H, Holst JJ (1997):

Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus.

J Clin Endocrinol Metab, **82**, 473-478

6 **Ahrén** B, Simonsson E, Larsson H, Landin-Olsson M, Torgeirsson H, Jansson PA, Sandqvist M, Båvenholm P, Efencic S, Eriksson JW, Dickinson S, Holms D (2002):

Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes.

Diab Care, **25**, 869-875

7 **Ambrisko** TD, Hikasa Y (2002):

Neurohormonal and metabolic effects of medetomidine compared with xylazine in beagle dogs.

Can J Vet Res, **66**, 42-49

8 **Ashcroft** SJH (2000):

The β -cell K_{ATP} channel.

J Membr Biol, **176**, 187-206

9 **Aurich** JE (2002):

Endokrinpharmakologie (Pancreashormone)

in **Frey** HH, Löscher W (Hrsg.):

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 2.Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 310-312

10 **Beak** SA, Heath MM, Small CJ, Morgan DGA, Ghatei MA, Taylor AD, Buckingham JC, Bloom SR, Smith DM (1998):

Glucagon-like peptide-1 stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion in a rodent hypothalamic neuronal cell line.

J Clin Invest, **101**, 1334-1341

11 **Beak** SA, Small CJ, Ilovaiskaia I, Hurley JD, Ghatei MA, Bloom SR, Smith DM (1996):

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) releases thyrotropin (TSH): characterization of binding sites for GLP-1 on alpha-TSH cells.

Endocrinology, **137**, 4130-4138

12 **Bell** GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC (1983) [a]:

Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene.

Nature, **304**, 368-371

13 **Bell** GI, Santerre RF, Mullenbach GT (1983) [b]:

Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides.

Nature, **302**, 716-718

14 **Bermppohl F, Löster K, Reutter W, Baum O (1998):**

Rat dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) exhibits endopeptidase activity with specificity for denatured fibrillar collagens.

FEBS Letters, **428**, 152-156

15 **Bongers J, Lambros T, Ahmad M, Heimer EP (1992):**

Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs.

Biochim Biophys Acta, **1122**, 147-153

16 **Bonic A, Mackin RB (2003):**

Expression, purification, and PC1-mediated processing of human proglucagon, glicentin, and major proglucagon fragment.

Protein Expr Purif, **28**, 15-24

17 **Boxenbaum H (1980):**

Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance; extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin.

J Pharmakokinet Biopharm, **8**, 165-176

18 **Boylan JW, Deetjen P, Kramer K (1976):**

Salz- und Wasserhaushalt

in Deetjen P, Boylan JW, Kramer K (Hrsg.):

Niere und Wasserhaushalt, 3. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, 103-144

19 **Bozkurt A, Näslund E, Holst JJ, Hellström PM (2002):**

GLP-1 and GLP-2 act in concert to inhibit fasted, but not fed, small bowel motility in the rat.

Regul Pept, **107**, 129-135

20 **Brunn C (1999):**

Regulation der GLP-1 Sekretion intestinaler L-Zellen. Vergleich der enteroendokrinen GLUTag Zelllinie mit einer Primärkultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC).

Dissertatio rerum naturalium, Fachbereich Chemie, Universität Hamburg

- 21 **Buchan** AM, Polak JM, Capella C, Solcia E, Pearse AG (1987):
Electroimmunocytochemical evidence for the K-cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man.
Histochemistry, **56**, 37-44
- 22 **Casella** M, Wess G, Reusch CE (2002):
Measurement of capillary glucose concentrations by pet owners: a new tool in the management of diabetes mellitus.
J Am Anim Hosp Assoc, **38**, 239-245
- 23 **Cohn** LA, Dodam JR, McCaw DL, Tate DJ (1999):
Effects of chromium supplementation on glucose tolerance in obese and nonobese cats.
Am J Vet Res, **60**, 1360-1363
- 24 **Creutzfeldt** W (1979):
The incretin concept today.
Diabetologia, **16**, 75-85
- 25 **Damholt** AB, Buchan AMJ, Kofod H (1996):
GLP-1 release from canine L-cells is regulated by GIP, but not by glucose.
Regul Pept, **64**, 30
- 26 **Damholt** AB, Buchan AM, Kofod H (1998):
Glucagon-like peptide 1 secretion from canine L-cells is increased by glucose-dependent insulinotropic peptide but unaffected by glucose.
Endocrinology, **139**, 2085-2091
- 27 **David** F, Bernard AM, Pierres M, Marguet D (1993):
Identification of serine 624, aspartic acid 702, and histidine 734 as the catalytic triad residues of mouse dipeptidyl peptidase IV (CD26).
J Biol Chem, **268**, 17247-17252

28 **Deacon** CF, Hughes TE, Holst JJ (1998):

Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide-1 in the anesthetized pig.

Diabetes, **47**, 764-769

29 **Deacon** CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ (1995):

Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide-1 are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and healthy subjects.

Diabetes, **44**, 1126-1131

30 **Deacon** CF, Plamboeck A, Møller S, Holst JJ (2002):

GLP-1-(9-36) amide reduces blood glucose in anesthetized pigs by a mechanism that does not involve insulin secretion.

Am J Physiol Endocrinol Metab, **282**, 873-879

31 **Deacon** CF, Pridal L, Klarskov L, Olesen M, Holst JJ (1996) [a]:

Glucagon-like peptide-1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig.

Am J Physiol, **271**, 458-464

32 **Deacon** CF, Pridal L, Olesen M, Klarskov L, Holst JJ (1996) [b]:

Dipeptidyl peptidase IV inhibition influences GLP-1 metabolism in vivo.

Regul Pept, **64**, 30

33 **De Meester** I, Vanhoof G, Hendriks D, Demuth HU, Yaron A, Scharpé S (1992):

Characterization of dipeptidyl peptidase IV (CD26) from human lymphocytes.

Clin Chim Acta, **210**, 23-34

34 **Demuth** HU, Heins J (1995):

Catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV.

in **Fleischer** B (Hrsg.):

Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response,

Landes Bioscience, Georgetown, Texas, 1-37

35 **Demuth** HU, Hinke SA, Pederson RA, McIntosh CHS (2002):

Rebuttal to Deacon and Holst: „metformin effects on dipeptidyl peptidase IV degradation of glucagon-like peptide-1“ versus „dipeptidyl peptidase inhibition as an approach to the treatment and prevention of type 2 diabetes: a historical perspective“.

Biochem Biophys Res Commun, **296**, 229-232

36 **Derendorf** H (2002):

Grundlagen der Pharmakokinetik

in **Derendorf** H, Gramatté T, Schäfer HG (Hrsg.):

Pharmakokinetik – Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie, 2.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 17-99

37 **Doyle** ME, Theodorakis MJ, Holloway HW, Bernier M, Greig NH, Egan JM (2003):

The importance of the nine-amino acid C-terminal sequence of exendin-4 for binding to the GLP-1 receptor and for biological activity.

Regul Pept, **114**, 153-158

38 **Drucker** DJ (2003):

Therapeutic potential of dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes.

Expert Opin Investig Drugs, **12**, 87-100

39 **Drucker** DJ, Erlich P, Asa SL, Brubaker PL (1996):

Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2.

Proc Natl Acad Sci USA, **93**, 7911-7916

40 **Durinx** C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A, Scharpé S, De Meester I (2000):

Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides.

Eur J Biochem, **267**, 5608-5613

41 **Ebert** U, Frey HH, Schulz R (2002):

Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS), Analgetica

in **Frey** HH, Löscher W (Hrsg.):

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 2.Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 107-119

42 **Egan** JM, Zhou J, Perfetti R, Elahi D (1998):

GLP-1 is a trophic factor.

Dig Dis Sci, **43**, 1902

43 **Eissele** R, Göke R, Willemer HP, Harthus H, Vermeer H, Arnold R, Göke B (1992):

Glucagon-like peptide-1 cells in the gastro-intestinal tract and pancreas of rat, pig and man.

Eur J Clin Invest, **22**, 283-291

44 **Elahi** D, McAloon-Dyke M, Fukagawa NK, Meneilly GS, Sclater AL, Minaker KL, Habener JF, Andersen DK (1994):

The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7–37) in normal and diabetic subjects.

Regul Pept, **51**, 63-74

45 **Eng** J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP (1992):

Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from heloderma suspectum venom.

J Biol Chem, **267**, 7402-7405

46 **Erhardt** W, Henke J, Brill T (1994):

Anästhesie bei Versuchstieren

in **Scheuber** HP (Hrsg.):

Handbuch über Möglichkeiten und Methoden zur Verbesserung, Verminderung und Vermeidung von Tierversuchen, Thomas Denner Verlag, München

47 **Fehmann** HC, Göke R, Göke B (1992):

Glucagon-like peptide-1(7–37)/(7–36) amide is a new incretin.

Mol Cell Endocrinol, **85**, 39-44

48 **Fehmann** HC, Göke R, Göke B (1998):

Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide.

Endocr Rev, **16**, 390-410

49 **Fehmann** HC, Habener JF (1992):

Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma β TC-1 cells.

Endocrinology, **130**, 159-166

50 **Feldman** EC (1996):

Diseases of the Endocrine Pancreas

in **Ettinger** SJ, Feldman EC (Hrsg.):

Textbook of Veterinary Internal Medicine – Diseases of the Dog and Cat, 5th edition, WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania

51 **Feldman** EC, Nelson RW (1996):

Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 2nd edition, WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania

52 **Feldman** EC, Nelson RW, Feldman MS (1997):

Intensive 50-week evaluation of glipizide administration in 50 cats with previously untreated diabetes mellitus.

J Am Vet Med Assoc, **210**, 772-777

53 **Flint** A, Raben A, Astrup A, Holst JJ (1998):

Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans.

J Clin Invest, **101**, 515-520

54 **Ford** SL (1995):

NIDDM in the cat: treatment with the oral hypoglycemic medication, glipizide.

Vet Clin North Am Small Anim Pract, **25**, 599-615

55 **Gibaldi M, Perrier D (1982):**

Clearance Concepts

in **Gibaldi M, Perrier D:**

Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, New York, 319-354

56 **Göke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, Göke B (1993):**

Exendin-4 is a highly potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting β -cells.

J Biol Chem, **268**, 19650-19655

57 **Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW (2001):**

CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes.

Scand J Immunol, **54**, 249-264

58 **Gromada J, Holst JJ, Rorsman P (1998):**

Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1

Pflügers Arch, **435**, 583-594

59 **Grosse-Siestrup C, Nagel S, Unger V, Meissler M, Pfeffer J, Fischer A, Groneberg DA (2002):**

The isolated perfused liver: a new model using autologous blood and porcine slaughterhouse organs.

J Pharmacol Toxicol Methods, **46**, 163-168

60 **Guillausseau PJ, Laloi-Michelin M (2003):**

Physiopathologie du diabète de type 2.

La revue de médecine interne, **24**, 730-737

61 **Gutniak M, Ørskov C, Holst JJ, Ahrén B, Efendic S (1992):**

Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus.

N Engl J Med, **326**, 1316-1322

- 62 **Haffner** SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M (1998):
Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction.
N Engl J Med, **339**, 229-234
- 63 **Harvey** AM, Malvin RL (1965):
Comparison of creatinine and inulin clearances in male and female rats.
Am J Physiol, **209**, 849-852
- 64 **Hassan** M, Eskilsson A, Nilsson C, Jonsson C, Jacobsson H, Refai E, Larsson S, Efendic S (1999):
In vivo dynamic distribution of ¹³¹J-glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat studied by gamma camera.
Nuclear Medicine and Biology, **26**, 413-420
- 65 **Herrmann** C, Göke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Göke B (1995):
Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients.
Digestion, **56**, 117-126
- 66 **Hess** RS, Kass PH, Ward CR (2000):
Breed distribution of dogs with diabetes admitted to a tertiary care facility.
J Am Vet Med Assoc, **216**, 1414-1417
- 67 **Heymann** E, Mentlein R (1978):
Liver dipeptidyl aminopeptidase IV hydrolyzes substance P.
FEBS Letters, **91**, 360-364
- 68 **Hinke** SA, Kühn-Wache K, Hoffmann T, Pederson RA, McIntosh CHS, Demuth HU (2002):
Metformin effects on dipeptidyl peptidase IV degradation of glucagon-like peptide-1
Biochem Biophys Res Commun, **291**, 1302-1308

69 **Hoenig M (2002):**

Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats.

Mol Cell Endocrinol, **197**, 221-229

70 **Holst JJ (1999):**

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): an intestinal hormone, signalling nutritional abundance, with an unusual therapeutic potential.

Trends Endocrinol Metab, **10**, 229-235

71 **Holst JJ, Bersani M, Johnsen AH, Kofod H, Hartmann B, Ørskov C (1994):**

Proglucagon processing in porcine and human pancreas.

J Biol Chem, **269**, 18827-18833

72 **Holst JJ, Deacon CF (1998):**

Inhibition of the activity of dipeptidyl peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes.

Diabetes, **47**, 1663-1670

73 **Holst JJ, Ørskov C, Schwartz TW, Buhl T, Baldiserra FGA (1986):**

Proglucagon 78-107, a potent insulinotropic hormone from lower small-intestine.

Diabetologia, **29**, 549

74 **Holz GG, Kuhlreiber WM, Habener JF (1993):**

Pancreatic β -cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37).

Nature, **361**, 362-365

75 **Holz GG, Leech CA, Heller RS, Castonguay MA, Habener JF (1999):**

cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca^{2+} stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic β -cells. A Ca^{2+} signaling system activated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37).

J Biol Chem, **274**, 14147-14156

76 **Hopsu-Havu** VK, Glenner GG (1966):

A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl- β -naphthylamide.

Histochemie, **7**, 197-201

77 **Hosoya** M, Onda H, Ogi K, Masuda Y, Miyamoto Y, Ohtaki T, Okazaki H, Arimura A, Fukino M (1993):

Molecular cloning and functional expression of rat cDNAs encoding the receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP).

Biochem Biophys Res Commun, **194**, 133-143

78 **Hughes** TE, Mone MD, Russell ME, Weldon SC, Villhauer EB (1999):

NVP-DPP728 (1- [[[2- [(5- cyanopyridin -2- yl) amino] ethyl] amino] acetyl] -2- cyano -(S)-pyrrolidine), a slow-binding inhibitor of dipeptidyl peptidase IV.

Biochemistry, **38**, 11597-11603

79 **Hupe-Sodmann** K, Göke R, Göke B, Thole HH, Zimmermann B, Voigt K, McGregor GP (1997):

Endoproteolysis of glucagon-like peptide (GLP)-1 (7-36) amide by ectopeptidases in RINm5F cells.

Peptides, **18**, 625-632

80 **Hupe-Sodmann** K, McGregor GP, Bridenbaugh R, Göke R, Göke B, Thole H, Zimmermann B, Voigt K (1995):

Characterization of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides.

Regul Pept, **58**, 149-156

81 **Hvidberg** A, Nielsen MT, Hilsted J, Ørskov C, Holst JJ (1994):

Effect of glucagon-like peptide-1 (proglucagon 78-107 amide) on hepatic glucose production in healthy man.

Metabolism, **43**, 104-108

82 **Institute of Laboratory Animal Resources**, Commission on Life Sciences, National Research Council (1996):

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

National Academy Press, Washington D.C., 60-67

83 **Irwin DM**, Huner O, Youson JH (1999):

Lamprey proglucagon and the origin of glucagon-like peptides.

Mol Biol Evol, **16**, 1548-1557

84 **Ishihara T**, Nakamura S, Kaziro Y, Takahashi T, Takahashi K, Nagata S (1991):

Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor.

EMBO Journal, **10**, 1635-1641

85 **Jelinek LJ**, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, Sprecher CA, O'Hara PJ, Foster D, Walker KM, Chen LHJ, McKernan PA, Kindsvogel W (1993):

Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor.

Science, **259**, 1614-1616

86 **Kähne T**, Lendeckel U, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D (1999):

Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth.

Int J Mol Med, **4**, 3-15

87 **Kettmann U**, Humbel B, Holzhausen HJ (1992):

Ultrastructural localization of dipeptidyl peptidase-IV in the glomerulum of the rat kidney.

Acta Histochem, **92**, 225-227

88 **Kieffer TJ**, McIntosh CHS, Pederson RA (1995):

Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide-1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV.

Endocrinology, **136**, 3585-3596

89 **Kirsch M (1998):**

Incidence of bacterial cystitis in diabetic dogs and cats at the time of diagnosis. Retrospective study for the period 1990-1996.

Tierärztl Prax Ausg K, **26**, 32-36

90 **Kjems LL, Holst JJ, Vølund A, Madsbad S (2003):**

The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion.

Diabetes, **52**, 380-386

91 **Knudsen LB, Pridal L (1996):**

Glucagon-like peptide-1-(9-36) amide is a major metabolite of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide after in vivo administration to dogs, and it acts as an antagonist on the pancreatic receptor.

Eur J Pharm, **318**, 429-435

92 **Komárek V (2000):**

Gross Anatomy (Agricultural University Prague)

in **Krinke GJ** (Hrsg.):

The Laboratory Rat, Academic Press, San Diego, California, 385-400

93 **Kraft WRM (2000):**

Endokrinologie – Diabetes mellitus

in **Kraft WRM, Hirschberger J** (Hrsg.):

Kleintierkrankheiten, Innere Medizin, 3.Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 810-817

94 **Kreymann B, Kanse S, Ghatel MA, Williams G, Bloom SR (1988):**

Glucagon-like peptide-1 7–36, a new brain-gut hormone.

Regul Pept, **22**, 414

95 **Kreymann B, Williams G, Ghatel MA, Bloom SR (1987):**

Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man.

Lancet, **330**, 1300-1304

96 **Küllertz G**, Nagy M, Fischer G, Barth A (1986):

Isolierung und Charakterisierung der Dipeptidyl-Peptidase IV aus humanem Seminalplasma.

Biomed Biochim Acta, **45**, 291-303

97 **Labsch B**, Heins J, Hilse H, Barth A, Oehme P (1981):

Die Aktivität der Dipeptidyl-Peptidase-IV in verschiedenen Geweben der Ratte und ihre mögliche Beziehung zum Substanz-P-Metabolismus.

Pharmazie, **36**, 161-163

98 **Lambeir AM**, Borloo M, De Meester I, Belyaev A, Augustyns K, Hendriks D, Scharpé S, Haemers A (1996):

Dipeptide-derived diphenyl phosphonate esters: mechanism-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV.

Biochim Biophys Acta, **1290**, 76-82

99 **Lambeir AM**, Díaz Pereira JF, Chacón P, Vermeulen G, Heremans K, Devreese B, Van Beeumen J, De Meester I, Scharpé S (1997):

A prediction of DPP-IV/CD26 domain structure from a physico-chemical investigation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) from human seminal plasma.

Biochim Biophys Acta, **1340**, 215-226

100 **Lambeir AM**, Proost P, Scharpé S, De Meester I (2002):

A kinetic study of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2 truncation by dipeptidyl peptidase IV, in vitro.

Biochem Pharmacol, **64**, 1753-1756

101 **Larsen PJ**, Tang-Christensen M, Holst JJ, Ørskov C (1997):

Distribution of glucagon-like peptide-1 and other proglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem.

Neuroscience, **77**, 257-270

102 **Layer P**, Holst JJ, Grandt D, Goebell H (1995):

Ileal release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1): association with inhibition of gastric acid in humans.

Dig Dis Sci, **40**, 1074-1082

103 **Leech CA**, Holz GG, Chepurny O, Habener JF (2000):

Expression of cAMP-regulated Guanine Nucleotide exchange factors in pancreatic β -cells.

Biochem Biophys Res Commun, **278**, 44-47

104 **Loeb WF** (1999):

The Rat

in **Loeb WF**, Quimby FW (Hrsg.):

The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, 2nd edition, Taylor & Francis, Philadelphia, 33-48 und 643-726 (Appendix)

105 **Lojda Z** (1979):

Studies on dipeptidyl(amino)peptidase IV (glycyl-proline naphthylamidase), II. Blood vessels.

Histochemistry, **59**, 153-166

106 **López LC**, Li WH, Frazier ML, Luo CC, Saunders GF (1984):

Evolution of glucagon genes.

Mol Biol Evol, **1**, 335-344

107 **López de Maturana R**, Donnelly D (2002):

The glucagon-like peptide-1 receptor binding site for the N-terminus of GLP-1 requires polarity at Asp198 rather than negative charge.

FEBS Letters, **530**, 244-248

108 **Lugari R**, Ugolotti D, Dei Cas A, Barilli AL, Iotti M, Marani B, Orlandini A, Gnudi A, Zandomenighi R (2001):

Urinary excretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide in human type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus.

Horm Metab Res, **33**, 568-571

109 **Lutz TA, Rand JS (1995):**

Pathogenesis of feline diabetes mellitus.

Vet Clin North Am Small Anim Pract, **25**, 527-552

110 **MacDonald PE, Salapatek AMF, Wheeler MB (2002):**

Glucagon-like peptide-1 receptor activation antagonizes voltage-dependent repolarizing K⁺-currents in β-cells.

Diabetes, **51**, 443-447

111 **Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard AM, Pierres M, Nielsen PF, Ribet U, Watanabe T, Drucker DJ, Wagtmann N (2000):**

Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26.

Proc Natl Acad Sci USA, **97**, 6874-6879

112 **Marguet D, Bernard AM, Vivier I, Darmoul D, Naquet P, Pierres M (1992):**

cDNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule. A multifunctional ecto-dipeptidyl peptidase IV (CD26) included in a subgroup of serine proteases.

J Biol Chem, **267**, 2200-2208

113 **Martin CL (1995):**

Metabolische Katarakt

in **Martin CL (Hrsg.):**

Augenkrankheiten bei Hund und Katze (Pferd, Wiederkäuer), Verlag M&H Schaper, Alfeld-Hannover, 314-317

114 **Mazzaferro EM, Greco DS, Turner AS, Fettman MJ (2003):**

Treatment of feline diabetes mellitus using an alpha-glucosidase inhibitor and a low-carbohydrate diet.

J Feline Med Surg, **5**, 183-189

115 **McDonald JK, Barrett AJ (1986):**

Exopeptidases.

in **McDonald JK, Barrett AJ (Hrsg.):**

Mammalian Proteases – A Glossary and Bibliography, Academic Press, London, 111-119

116 **Meier JJ**, Gallwitz B, Schmidt WE, Nauck MA (2002) [a]:

Glucagon-like peptide-1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives.

Eur J Pharm, **440**, 269-279

117 **Meier JJ**, Hücking K, Deacon C, Holst JJ, Schmiegel W, Nauck MA (2001):

Reduced insulinotropic effects of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes.

Diabetes, **50**, 2497-2504

118 **Meier JJ**, Nauck Ma, Schmidt WE, Gallwitz B (2002) [b]:

Gastric inhibitory polypeptide: the neglected incretin revisited.

Regul Pept, **107**, 1-13

119 **Meijer DKF**, Keulemans K, Mulder GJ (1981):

Isolated perfused rat liver technique.

Meth Enzymol, **77**, 85-94

120 **Mentlein R** (1988):

Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides.

FEBS Letters, **234**, 251-256

121 **Mentlein R** (1999):

Dipeptidyl peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides.

Regul Pept, **85**, 9-24

122 **Mentlein R**, Gallwitz B, Schmidt WE (1993):

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

Eur J Biochem, **214**, 829-835

- 123 **Mentlein R**, Heymann E, Scholz W, Feller AC, Flad HD (1984):
Dipeptidyl peptidase IV as a new surface marker for a subpopulation of human T-lymphocytes.
Cell Immunol, **89**, 11-19
- 124 **Mentlein R**, Kolszynski M von, Sprang R, Lucius R (1990):
Proline-specific proteases in cultivated neuronal and glial cells.
Brain Res, **527**, 159-162
- 125 **Mentlein R**, Rix H, Feller AC, Heymann E (1986):
Characterization of dipeptidyl peptidase IV from lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia of T-type.
Biomed Biochim Acta, **45**, 567-574
- 126 **Mentlein R**, Staves R, Rix-Matzen H, Tinneberg HR (1991):
Influence of pregnancy on dipeptidyl peptidase IV activity (CD26 leucocyte differentiation antigen) of circulating lymphocytes.
Eur J Clin Chem Clin Biochem, **29**, 477-480
- 127 **Misumi Y**, Hayashi Y, Arakawa F, Ikehara Y (1992):
Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase-IV, a serine proteinase on the cell surface.
Biochim Biophys Acta, **1131**, 333–336
- 128 **Mizisin AP**, Shelton GD, Burgers ML, Powell HC, Cuddon PA (2002):
Neurological complications associated with spontaneously occurring feline diabetes mellitus.
J Neuropathol Exp Neurol, **61**, 872-884
- 129 **Mojsov S** (2000):
Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the control of glucose metabolism in mammals and teleost fish.
Am Zool, **40**, 246-258

- 130 **Mojsov S**, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF (1986):
Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing.
J Biol Chem, **261**, 11880-11889
- 131 **Mooney MH**, Abdel-Wahab YHA, McKillop AM, O'Harte FPM, Flatt PR (2002):
Evaluation of glycosylated glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in intestinal tissue of normal and diabetic animal models.
Biochim Biophys Acta, **1569**, 75-80
- 132 **Mortensen K**, Christensen LL, Holst JJ, Ørskov C (2003):
GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine.
Regul Pept, **114**, 189-196
- 133 **Morton D**, Safron JA, Rice DW (1997):
Effects of infusion rates in rats receiving repeated large volumes of saline solution intravenously.
Lab Anim Sci, **47**, 656-659
- 134 **Nauck MA**, Bartels E, Ørskov C, Ebert R, Creutzfeldt W (1993) [a]:
Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide 1 (7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations.
J Clin Endocrinol Metab, **76**, 912-917
- 135 **Nauck MA**, Heimesaat MM, Ørskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W (1993) [b]:
Preserved incretin activity of glucagon-like peptide-1 (7-36 amide), but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus.
J Clin Invest, **91**, 301-307

136 **Nauck** MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, Ørskov C, Ritzel R, Schmiegel WH (1997):

Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans.

Am J Physiol, **273**, 981-988

137 **Nelson** RW (2000):

Oral medications for treating diabetes mellitus in dogs and cats.

J Small Anim Pract, **41**, 486-490

138 **Nelson** RW, Spann D, Elliott D, Brondos A, Vulliet R (2004):

Evaluation of the oral antihyperglycemic drug metformin in normal and diabetic cats.

J Vet Intern Med, **18**, 18-24

139 **Neuvians** TP, Berger M (2002):

Diabetes care in cats and dogs.

Diabet Med, **19**, 77-79

140 **Oben** J, Morgan L, Fletcher J, Marks V (1991):

Effect of the entero-pancreatic hormones, gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like polypeptide-1 (7-36) amide, on fatty acid synthesis in explants of rat adipose tissue.

J Endocrinol, **130**, 267-272

141 **O'Brien** PJ, Slaughter MR, Polley SR, Kramer K (2002):

Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats.

Lab Anim, **36**, 313-321

142 **O'Brien** TD (2002):

Pathogenesis of feline diabetes mellitus

Mol Cell Endocrinol, **197**, 213-219

- 143 **O'Harte** FPM, Mooney MH, Kelly CMN, McKillop AM, Flatt PR (2001):
Degradation and glyceimic effects of His7-glucitol glucagon-like peptide-1 (7-36 amide) in obese diabetic ob/ob mice.
Regul Pept, **96**, 95-104
- 144 **Olds** RJ, Olds JR (1984):
Farbatlas der Anatomie der Ratte: Sektionsanleitung
(übersetzt aus dem Englischen von Fritz-Helmut Feder), Schober Verlag, Hengersberg
- 145 **Olsen** C, Wagtmann N (2002):
Identification and characterization of human DPP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidase IV.
Gene, **299**, 185-193
- 146 **Ørskov** C, Bersani M, Johnsen AH, Højrup P, Holst JJ (1989):
Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine.
J Biol Chem, **264**, 12826-12829
- 147 **Ørskov** C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS, Nielsen OV (1986):
Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas.
Endocrinology, **119**, 1467-1475
- 148 **Ørskov** C, Holst JJ, Nielsen OV (1988):
Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107)-amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach.
Endocrinology, **123**, 2009-2013
- 149 **Ørskov** C, Rabenhøj L, Kofod H, Wettergren A, Holst JJ (1994):
Production and secretion of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in man.
Diabetes, **43**, 535-539

- 150 **Ørskov C**, Wettergren A, Holst JJ (1993):
Biological effects and metabolic rates of glucagon-like peptide-1 7-36 amide and glucagon-like peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable.
Diabetes, **42**, 658-661
- 151 **Oshima I**, Hirota M, Ohboshi C, Shima K (1988):
Comparison of half-disappearance times, distribution volumes and metabolic clearance rates of exogenous glucagon-like peptide-1 and glucagons in rats.
Regul Pept, **21**, 85-93
- 152 **Panciera DL**, Thomas CB, Eicker SW, Atkins CE (1990):
Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in cats: 333 cases (1980-1986).
J Am Vet Med Assoc, **197**, 1504-1508
- 153 **Piazza GA**, Callanan HM, Mowery J, Hixson D (1989):
Evidence of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin mediated interactions of hepatocytes with extra cellular matrix.
Biochem J Biochemical Journal, **262**, 327-334
- 154 **Pressler BM**, Vaden SL, Lane IF, Cowgill LD, Dye JA (2003):
Candida spp. urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome.
J Am Anim Hosp Assoc, **39**, 263-270
- 155 **Pridal L**, Deacon CF, Kirk O, Christensen JV, Carr RD, Holst JJ (1996):
Glucagon-like peptide-1 (7-37) has a larger volume of distribution than glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in dogs and is degraded more quickly in vitro by dog plasma.
Eur J Drug Metab Pharmacokinet, **21**, 51-59
- 156 **Püschel G**, Mentlein R, Heymann E (1982):
Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta.
Eur J Biochem, **126**, 359-365

157 **Rachman** J, Barrow BA, Levy JC, Turner RC (1997):
Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM.
Diabetologia, **40**, 205-211

158 **Rand** JS (1999):
Current understanding of feline diabetes: part 1, pathogenesis.
J Feline Med Surg, **1**, 143-153

159 **Rand** JS, Kinnaird E, Baglioni A, Blackshaw J, Priest J (2002):
Acute stress hyperglycemia in cats is associated with struggling and increased concentrations of lactate and norepinephrine.
J Vet Intern Med, **16**, 123-132

160 **Rand** JS, Martin GJ (2001):
Management of feline diabetes mellitus.
Vet Clin North Am Small Anim Pract, **31**, 881-913

161 **Reinhold** D, Hemmer B, Gran B, Born I, Faust J, Neubert K, McFarland HF, Martin R, Ansorge S (1998):
Inhibitors of dipeptidyl peptidase-IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4+ T cell clones.
J Neuroimmunol, **87**, 203-209

162 **Remie** R (2000):
Experimental Surgery (Groningen University)
in **Krinke** GJ (Hrsg.):
The Laboratory Rat, Academic Press, San Diego, California, 385-400

163 **Reusch** C, Hähnle B (2001):
Diabetes mellitus
in **Niemand** HG, Suter PF (Hrsg.):
Praktikum der Hundeklinik, 9.Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin, 974-979

164 **Richter** G, Göke R, Göke B, Schmidt H, Arnold R (1991):

Characterization of glucagon-like peptide-I(7–36)amide receptors of rat lung membranes by covalent cross-linking.

FEBS Letters, **280**, 247-250

165 **Richter** M, Guscetti F, Spiess B (2002):

Aldose reductase activity and glucose-related opacities in incubated lenses from dogs and cats.

Am J Vet Res, **63**, 1591-1597

166 **Roberge** JN, Brubaker PL (1993):

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

Endocrinology, **133**, 233-240

167 **Rosenblum** JS, Kozarich JW (2003):

Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery.

Curr Opin Chem Biol, **7**, 1-9

168 **Rouillé** Y, Bianchi M, Irminger JC, Halban PA (1997):

Role of the prohormone convertase PC2 in the processing of proglucagon to glucagon.

FEBS Letters, **413**, 119-123

169 **Rouillé** Y, Martin S, Steiner DF (1995):

Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide.

J Biol Chem, **270**, 26488-26496

170 **Rowland** M, Tozer TN (1995):

a) Chapter 6: Constant-Rate Regimens

b) Chapter 11: Elimination

in **Rowland** M, Tozer TN (Hrsg.):

Clinical Pharmacokinetics – Concepts and Applications, 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, Media, Philadelphia, (a) 66–82, (b) 156-184

171 **Ruiz-Grande** C, Alarcón C, Alcantara A, Castilla C, Lopez Novoa JM, Villanueva-Penacarrillo ML, Valverde I (1993):

Renal catabolism of truncated glucagon-like peptide-1.

Horm Metab Res, **25**, 612-616

172 **Ryan** AS, Egan JM, Habener JF, Elahi D (1996):

Does GLP-1 have an insulin-like effect during euglycemia in humans?

Regul Pept, **64**, 165

173 **Sasaki** K, Dockerill S, Adamiak DA, Tickle IJ, Blundell T (1975):

X-ray analysis of glucagon and its relationship to receptor binding.

Nature, **257**, 751-757

174 **Scales** WE, Kluger MJ (1987):

Effect of antipyretic drugs on circadian rhythm in body temperature of rats.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, **253**, 306-313

175 **Schepp** W, Schmidtler J, Riedel T, Dehne K, Schusdziarra V, Holst JJ, Eng J, Raufman JP, Classen M (1994):

Exendin-4 and exendin-(9-39)NH₂: agonist and antagonist, respectively, at the rat parietal cell receptor for glucagon-like peptide-1-(7-36)NH₂.

Eur J Pharm, **269**, 183-191

176 **Schjoldager** BT, Mortensen PE, Christiansen J, Ørskov C, Holst JJ (1989):

GLP-1 (glucagon-like peptide-1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans.

Dig Dis Sci, **34**, 703-708

177 **Schmidt** P, Dahme E (1999):

Organe der inneren Sekretion (endokrines System), Inselorgan

in **Dahme** E, Weiss E (Hrsg.):

Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 5.Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 479-482

178 **Schmidt** WE, Siegel EG, Creutzfeldt W (1985):

Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets.

Diabetologia, **28**, 704-707

179 **Scrocchi** LA, Brown TJ, Maclusky N (1996):

Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide receptor gene.

Nat Med, **2**, 1254-1258

180 **Šedo** A, Malík R (2001):

Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities?

Biochim Biophys Acta, **1550**, 107-116

181 **Sennello** KA, Schulmann RL, Prosek R, Siegel AM (2003):

Systolic blood pressure in cats with diabetes mellitus

J Am Vet Med Assoc, **223**, 198-201

182 **Shimizu** I, Hirota M, Ohboshi C, Shima K (1987):

Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in rat brain.

Endocrinology, **121**, 1076-1082

183 **Siegel** ET (1982):

Unterfunktion: Diabetes mellitus

in **Siegel** ET (Hrsg.):

Endokrine Krankheiten des Hundes, Paul Parey Verlag, Berlin, 110-134

184 **Sreedharan** SP, Robichon A, Peterson KE, Goetzl EJ (1991):

Cloning and Expression of the Human Vasoactive Intestinal Peptide Receptor.

Proc Natl Acad Sci USA, **88**, 4986-4990

185 **Suga S**, Kanno T, Dobashi Y, Wakui M (1997):

GLP-1 (7-36) amide activates L-type Ca^{2+} channels of pancreatic β -cells through cAMP signaling.

Jpn J Physiol, **47**, 13-14

186 **Sugiyama K**, Manaka H, Kato T, Yamatani K, Tominaga M, Sasaki H (1994):

Stimulation of truncated glucagon-like peptide-1 release from the isolated perfused canine ileum by glucose absorption.

Digestion, **55**, 24-28

187 **Tadayyon M**, Smith SA (2003):

Insulin sensitisation in the treatment of type 2 diabetes.

Expert Opin Investig Drugs, **12**, 307-324

188 **Tanaka S**, Murakami T, Horikawa H, Sugiura M, Kawashima K, Sugita T (1997):

Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV.

Int J Immunopharmacol, **19**, 15-24

189 **Tang-Christensen M**, Larsen PJ, Göke R, Fink-Jensen A, Jessop DS, Møller M, Sheikh SP (1996):

Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats.

Am J Physiol, **271**, 848-856

190 **Toft-Nielsen MB**, Madsbad S, Holst JJ (1998):

Exaggerated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) could cause reactive hypoglycaemia.

Diabetologia, **41**, 1180-1186

191 **Toft-Nielsen MB**, Madsbad S, Holst JJ (1999):

Continuous subcutaneous infusion of glucagon-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in type 2 diabetic patients.

Diab Care, **22**, 1137-1143

192 **Tolessa T**, Gutniak M, Holst JJ, Efendic S, Hellerström PM (1998):

Inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 on small bowel motility.

J Clin Invest, **102**, 764-774

193 **Tourel C**, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B (2002):

Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the β -cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4.

Diabetes, **51**, 1443-1452

194 **Turton MD**, O'Shea D, Gunn I (1996):

A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding.

Nature, **379**, 69-72

195 **Unger RH**, Eisentraut AM (1969):

Entero-insular axis.

Arch Intern Med, **123**, 261-266

196 **Uttenthal LO**, Blazquez E (1990):

Characterization of high-affinity receptors for truncated glucagon-like peptide-1 in rat gastric glands.

FEBS Letters, **262**, 139-141

197 **Van Eyll B**, Lankat-Buttgereit B, Bode HP, Göke R, Göke B (1994):

Signal transduction of the GLP-1-receptor cloned from a human insulinoma.

FEBS Letters, **348**, 7-13

198 **Velasquez-Mieyer PA**, Cowan PA, Umpierrez GE, Lustig RH, Cashion AK, Burghen GA (2003):

Racial differences in glucagon-like peptide-1 (GLP-1) concentrations and insulin dynamics during oral glucose tolerance test in obese subjects.

Int J Obes Relat Metab Disord, **27**, 1359-1364

199 **Vilsbøll T**, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ (2001):

Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients.

Diabetes, **50**, 609-613

200 **Vilsbøll T**, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ (2003):

Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects.

Regul Pept, **111**, 167-179

201 **Voigt K** (1996):

Endokrines System (Der Inselapparat des Pankreas)

in **Klinke R** und **Silbernagl S** (Hrsg.):

Lehrbuch der Physiologie, 2.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 477-483

202 **Wagner L**, Naudé RJ, Oelofsen W, Naganuma T, Muramoto K (1999):

Isolation and partial characterization of dipeptidyl peptidase IV from ostrich kidney.

Enzyme Microb Technol, **25**, 576-583

203 **Wettergren A**, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ (1993):

Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man.

Dig Dis Sci, **38**, 665-673

204 **Wettergren A**, Pridal L, Wøjdemann M, Holst JJ (1998):

Amidated and non-amidated glucagon-like peptide-1 (GLP-1): non-pancreatic effects (cephalic phase acid secretion) and stability in plasma in humans.

Regul Pept, **77**, 83-87

205 **Williams** YN, Baba H, Hayashi S, Ikai H, Sugita T, Tanaka S, Miyasaka N, Kubota T (2003):

Dipeptidyl peptidase IV on activated T cells as a target molecule for therapy of rheumatoid arthritis.

Clin Exp Immunol, **131**, 68-74

206 **Wüthrich** RP (2000):

The urinary system (University Zurich)

in **Krinke** GJ (Hrsg.):

The Laboratory Rat, Academic Press, San Diego, California, 385-400

207 **Xu** G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S (1999):

Exendin-4 stimulates both β -cell replication and neogenesis, resulting in increased β -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats.

Diabetes, **48**, 2270-2276

208 **Yaron** A, Naider F (1993):

Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins.

Crit Rev Biochem Mol Biol, **28**, 31-81

209 **Zander** M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ (2002):

Effect of 6-week course of glucagon-like peptide-1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and β -cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study.

Lancet, **359**, 824-830

210 **Zunz** E, LaBarre J (1929):

Contributions à l'étude des variations physiologiques de la sécrétion interne du pancreas: Relations entre les sécrétions externe du pancreas.

Arch Int Physiol Biochim Biophys, **31**, 20-44

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung:	Seite:
Abb. 1: Schematische (aufgefaltete) Struktur der humanen DPP-IV	42
Abb. 2: 16-Gauge-Kanüle auf Höhe der V. gastroduodenalis in der Pfortader ligiert – Präparationsstatus der Ratten-Leber unmittelbar vor Beginn der Perfusion	68
Abb. 3: Schematische Darstellung der IPRL im rezirkulierenden Modell	69
Abb. 4: Applikationsschema von GLP-1 mit resultierenden GLP-1-Plasmaspiegeln	82
Abb. 5: Vorversuch (Dosis-Findung) mit Originaldaten	84
Abb. 6: Vorversuch (Dosis-Findung) mit Korrektur der Basislinie	85
Abb. 7: Verhältnis von Infusionsrate und resultierendem Plasmaspiegel (Vorversuch)	86
Abb. 8: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel ohne DPP-IV-Hemmung mit Originaldaten	88
Abb. 9: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel ohne DPP-IV-Hemmung mit Korrektur der Basislinie	89
Abb. 10: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit GLP-1-Sättigung ohne DPP-IV-Hemmung mit Originaldaten	91
Abb. 11: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit niedriger DPP-IV-Hemmung mit Korrektur der Basislinie	95
Abb. 12: BI- β -Plasmaspiegel durch niedrige DPP-IV-Hemmung	97
Abb. 13: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit mittlerer DPP-IV-Hemmung mit Korrektur der Basislinie	98
Abb. 14: BI- β -Plasmaspiegel durch mittlere DPP-IV-Hemmung	100
Abb. 15: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit hoher DPP-IV-Hemmung mit Korrektur der Basislinie	101
Abb. 16: BI- β -Plasmaspiegel durch hohe DPP-IV-Hemmung	103
Abb. 17: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit sub-niedriger DPP-IV-Hemmung mit Korrektur der Basislinie	104
Abb. 18: BI- β -Plasmaspiegel durch sub-niedrige DPP-IV-Hemmung	106
Abb. 19: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit niedrigster DPP-IV-Hemmung mit Korrektur der Basislinie	107
Abb. 20: BI- β -Plasmaspiegel durch niedrigste DPP-IV-Hemmung	109

Abb. 21: Zusammenfassung – GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel ohne und mit niedrigster, sub-niedriger, niedriger, mittlerer und hoher DPP-IV-Hemmung	110
Abb. 22: GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel mit GLP-1-Sättigung und mittlerer DPP-IV-Hemmung mit Korrektur der Basislinie	111
Abb. 23: BI- β -Plasmaspiegel durch mittlere DPP-IV-Hemmung (GLP-1-Sättigung)	113
Abb. 24: Zusammenfassung – arithmetische Mittel der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel bei GLP-1-Sättigung ohne und mit mittlerer DPP-IV-Hemmung	114
Abb. 25: Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch 12 (pmol/h)/kg-Infusion unter verschiedenen DPP-IV-Hemmungsgraden	116
Abb. 26: Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch 40 (pmol/h)/kg-Infusion unter verschiedenen DPP-IV-Hemmungsgraden	117
Abb. 27: Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel durch 120 (pmol/h)/kg-Infusion unter verschiedenen DPP-IV-Hemmungsgraden	118
Abb. 28: Zusammenfassung der Steigerungsfaktoren der GLP-1-(7-37)-Plasmaspiegel	119
Abb. 29: Vergleich der Clearance von GLP-1 (7-37) ohne BI- β , unter niedrigster DPP-IV-Hemmung und unter höherer DPP-IV-Hemmung	121
Abb. 30: Halbwertszeiten von GLP-1 (7-37) ohne und mit ansteigender DPP-IV-Hemmung	122
Abb. 31: mittlerer Plasmagehalt an Glukose während der Infusionsversuche mit GLP-1 (7-37)	123
Abb. 32: mittlerer Plasmagehalt an Glukose unter GLP-1-(7-37)-Infusion (mit und ohne DPP-IV-Hemmung)	124
Abb. 33: mittlerer Plasmagehalt an Glukose unter GLP-1-(7-37)-Infusion mit GLP-1-Sättigung (mit und ohne DPP-IV-Hemmung)	125
Abb. 34: Elimination von GLP-1 (7-37) in der IPRL mit und ohne DPP-IV-Hemmung durch BI- β	126
Abb. 35: Elimination von GLP-1 (7-36 amide) in der IPRL mit und ohne DPP-IV-Hemmung durch BI- β	127
Abb. 36: BI- β -Konzentrationen in der IPRL mit der Glycin-Isoform nach Applikation von 1,3 μ mol/L Perfusat	128
Abb. 37: BI- β -Konzentrationen in der IPRL mit der Amid-Isoform nach Applikation von 1,3 μ mol/L Perfusat	128

Abb. 38: GLP-1 (7-37)-Konzentrationen und BI- β -Konzentrationen im Perfusat im Single-Pass-Modell der IPRL	133
Abb. 39: terminale Halbwertszeit von BI- β in der BI- β -Auswaschphase (von 35 [55] min bis 70 [90] min) im Single-Pass-Modell der IPRL	134
Abb. 40: terminale Halbwertszeit der DPP-IV-Retention (GLP-1-Abbau) in der BI- β -Auswaschphase (von 35 [55] min bis 70 [90] min) im Single-Pass-Modell der IPRL	135
Abb. 41: Degradation von GLP-1 (7-37) = DPP-IV-Aktivität in Ratten-Vollblut bei Raumtemperatur (+20 °Celsius)	137
Abb. 42: Degradation von GLP-1 (7-37) = DPP-IV-Aktivität in Ratten-Vollblut bei Körpertemperatur (+39 °Celsius)	138
Abb. 43: Clearance von GLP-1 ohne DPP-IV-Hemmung im Vergleich (bei einer Matrix-Konzentration von etwa 100 pmol/L)	139

10 Abkürzungsverzeichnis

A

A. = Arteria

ACTH = Adreno-Cortico-Tropes Hormon

ADA = Adenosin-Desaminase

ADAbp = ADA-bindendes Protein (ADA-binding protein)

ADP = Adenosin-Diphosphat

Ala = Alanin

AMP = Adenosin-Monophosphat

ANOVA = Varianzanalyse (Analysis Of Variance)

Arg = Arginin

AS = Aminosäure(n)

Asn = Asparagin

Asp = Asparaginsäure/Aspartat

ATP = Adenosin-Triphosphat

AUC = Fläche unter der Konzentrations/Zeit-Kurve (Area Under the Curve)

= (Charakteristikum der Bioverfügbarkeit f [AUC = f × D/CL])

B

b = Basenpaar

BMI = Körpermasse-Index (Body-Mass-Index) in [kg/m²]

BS = Base eines Wirkstoffes

BSA = bovines Serumalbumin

BZ = Benzoat (Salz der Benzoesäure)

C

c = centi- (hundertster Teil von)

C = Konzentration

Ca = Calcium

C_A = Konzentration im arteriellen Vollblut (Präsentationsrate)

cAMP = zyklisches AMP (cyclic AMP)

CD = Differenzierungsantigen (Cluster of Differentiation)

CL = totale Clearance eines Wirkstoffes aus dem Vollblut, Plasma, Serum oder Perfusat
(totale Clearance im Steady-State [$CL = k_0/C_{ss}$])

CL_H = hepatischer Clearance-Anteil ($CL_H = Q_H \times E_H$)

CL_{int} = intrinsische Clearance eines Eliminationsorgans

CL_R = renaler Clearance-Anteil

CL_X = nicht spezifizierter Clearance-Anteil

C_{ss} = Konzentration im Fließgleichgewicht (Steady-State)

C-Terminus = Carboxylgruppe am (so definierten) Ende eines Peptids

C_V = Konzentration im venösen Vollblut

Cys = Cystein

D

D = Dosis

Da = Dalton (1 Da = Masse eines Nukleons)

DASH = DPP-IV Activity and/or Structure Homologues

DPP-(I-IV) = Dipeptidyl-Peptidase-(I-IV)

DPP6 = DPP-verwandtes Protein 6 (DPP-related protein 6)

DPP9 = DPP-ähnliches Protein 9 (DPP-like protein 9)

E

e (Eulersche Zahl) = $\lim (1+1/n)^n$ mit n gegen positiv unendlich = 2,71...

E = Extraktionsquotient (Extraction Ratio)

= Verhältnis von Extraktionsrate zu Präsentationsrate [$(C_A - C_V)/C_A$]

EC = Enzym-Code

EC_{50} = Konzentration eines Pharmakons, die 50 % von E_{max} bewirkt

EDTA = Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat

E_H = hepatischer Extraktionsquotient

EIA = Enzyme Immuno-Assay

ELISA = enzymgekoppelter Antikörperbindungstest

(Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay)

E_{max} = maximaler Effekt eines Pharmakons

F

f = Bioverfügbarkeit (bioavailable fraction)

(Anteil eines Wirkstoffes, der unverändert in den systemischen Kreislauf gelangt)

F-Test = statistischer Test zur Überprüfung von Unterschieden der Varianzen (nach Fisher)

f_U = freier (ungebundener) Wirkstoff-Anteil im Plasma oder Serum (fraction unbound)

G

g (Masse) = Gramm (Tausendstel eines Kilogramms = SI-Basiseinheit der Stoffmasse)

g (Zentrifugalbeschleunigung) = Vielfache der Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m/s}^2$

G = Gauge (US-amerikanische Messlehre für Durchmesser – unter anderem von Kanülen)

GALAS = Global Alliance for Laboratory Animal Standardization

GFR = glomeruläre Filtrationsrate

GIP = glukoseabhängiges insulinotropes Polypeptid

(Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide)

(identisch mit Gastric Inhibitory Polypeptide = Enterogastron)

Gl(l). = Glandula(e)

Gln = Glutamin

GLP-1 = glukagonähnliches Peptid-1 (Glucagon-Like Peptide 1 = Enteroglukagon-1)

GLP-2 = glukagonähnliches Peptid-2 (Glucagon-Like Peptide 2 = Enteroglukagon-2)

Glu = Glutaminsäure/Glutamat

Gluc-DH = Glukose-Dehydrogenase

GLUT-4 = insulin-abhängiger Glukose-Transporter

Gly = Glycin

GnRH = Gonadotropin-Releasing Hormone (identisch mit LHRH)

G-Protein = GTP-bindendes Protein

GRPP = Glicentin-Related Pancreatic Polypeptide

Gs = stimulatorisches G-Protein

GTP = Guanosin-Triphosphat

H

h = Stunde (hour)

H = Wasserstoff

His = Histidin

HPLC = Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
(High Performance Liquid Chromatography)

Hyp = Hydroxyprolin

I

IC₅₀ = Konzentration eines hemmendes Pharmakons, die 50 % von I_{max} bewirkt

ID = innerer Durchmesser (Inner Diameter)

IDDM = insulin-abhängiger Diabetes mellitus (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus)

IFN- γ = Interferon- γ

IL-4 = Interleukin-4

Ile = Isoleucin

i.m. = intramuskulär

I_{max} = maximale Inhibition durch ein hemmendes Pharmakon

i.p. = intraperitoneal

IP-1 = Intervening Peptide-1

IP-2 = Intervening Peptide-2

IPRL = isoliert perfundierte Ratten-Leber (Isolated Perfused Rat Liver)

IU = internationale Einheiten (International Units)

i.v. = intravenös

K

k (Präfix) = kilo- (tausendfacher Wert von)

k (Konstante) = Mikrokonstante für den Transfer zwischen Kompartimenten
= Eliminationsgeschwindigkeitskonstante im Falle einer linearen Kinetik
= Steigungskonstante der Funktionsgeraden im natürlichen Logarithmus

k₀ = Infusionsrate in [(mol/min)/kg]

K = Kalium

K_{ATP} = ATP-abhängige Kaliumkanäle

K_i = Inhibitionskonstante

(Konzentration des Inhibitors, bei der 50 % des Enzyms
in Abwesenheit des Substrats gebunden sind)

K_m = Michaelis-Konstante

(Substrat-Konzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit V_{max}/2 erreicht)

KM = Körpermasse

K_V = spannungsabhängige Kaliumkanäle (Voltage-dependent K-channels)

L

L = Liter

λ = Wellenlänge

Leu = Leucin

LHRH = Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (identisch mit GnRH)

Lig(g). = Ligamentum (Ligamenta)

LOQ = analytische Bestimmungsgrenze (Limit Of Quantitation)

Lys = Lysin

M

m (Präfix) = milli- (tausendster Teil von)

m (Einheit) = Meter (SI-Basiseinheit der Länge)

M = molar (mol/L)

M(m). = Musculus (Musculi)

μ = mikro- (millionster Teil von)

MALDI-TOF-MS = Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation –
Time of Flight – Mass Spectrometry

MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinase

MCP-1 = Monocyte Chemoattractant Protein-1

Met = Methionin

min = Minute

mol = $6,022 \times 10^{23}$ (Avogadro-Konstante) Teilchen eines Stoffes
(SI-Basiseinheit der Stoffmenge)

MPGF = Major Proglucagon Fragment

mRNA = Boten-Ribonukleinsäure (messenger Ribonucleic Acid)

MRT = mittlere Verweildauer (Mean Residence Time)

MS/MS = Tandem-Massenspektrometrie

MUP = Methyl-Umbelliferyl-Phosphat

N

n = nano- (milliardster Teil von)

N = Anzahl (Numerus)

NAD⁺ = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (ohne Reduktionsäquivalent)

NADH = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (mit Reduktionsäquivalent)

NEP = neutrale Endopeptidase

NIDDM = insulin-unabhängiger Diabetes mellitus
(Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus)

N-Terminus = Aminogruppe am (so definierten) Anfang eines Peptids

O

OD = äußerer Durchmesser (Outer Diameter)

P

p (Präfix) = pico- (billionster Teil von)

p = Irrtumswahrscheinlichkeit (Probability)

PBS = phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate-Buffered Saline)

PC-1 = Propeptid Convertase-1

PC-2 = Propeptid Convertase-2

PD = Pharmakodynamik

PDX-1 = Pancreatic Duodenal Homeobox-1

pH = pondus Hydrogenii

(negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an Hydrogeniumionen)

Phe = Phenylalanin

PK = Pharmakokinetik

p.o. = per os

POP = Prolyl-Oligo-Peptidase

Pro = Prolin

PTP = Protein-Tyrosin-Phosphatase

Q

Q_H = hepatische Flussrate (von Vollblut beziehungsweise Perfusat)

R

RFU = relative Fluoreszenzeinheit (Relative Fluorescence Unit)

RIA = Radio-Immuno-Assay

S

sCD26 = plasmalöslicher (soluble) Cluster of Differentiation 26 (= plasmalösliche DPP-IV)

SD = Standardabweichung (Standard Deviation = Quadratwurzel aus der Varianz)

sec = Sekunde (SI-Basiseinheit der Zeit)

Ser = Serin

SI = Système International d'unités mit sieben Basiseinheiten

(Meter, Kilogramm, Sekunde, Ampère, Kelvin, Mol und Candela)

ss = Fließgleichgewicht (Steady-State)

STH = somatotropes Hormon (Somatotropin)

T

t = Zeit

$t_{1/2}$ = Halbwertszeit

tGLP-1 = truncated Glucagon-Like Peptide-1, Proglukagon-Sequenz 72-108

ohne N-terminales Hexapeptid (= GLP-1 [7-37] oder GLP-1 [7-36 amide])

THAM = T-Zellen-aktivierendes Molekül (Thymocyte Activating Molecule)

Thr = Threonin

TNF- α = Tumornekrosefaktor- α

Trp = Tryptophan

TSH = Thyreotropin (Thyreoida-stimulierendes Hormon)

t-Test = statistischer Test auf der Grundlage der t-Verteilung (nach Student)

Tyr = Tyrosin

T-Zellen = Thymus-gereifte Lymphozyten (Thymozyten)

V

V(v). = Vena(e)

Val = Valin

V_c = scheinbares (zentrales) Verteilungsvolumen (central Volume of distribution)

VDCC = spannungsabhängige Calciumkanäle (Voltage-Dependent Ca-Channel)

V_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit in der Michaelis-Menten-Kinetik

V_{ss} = scheinbares Verteilungsvolumen im Steady-State

X

Xaa = beliebige Aminosäure (X amino acid)

11 Glossar

Clearance (CL)

Die Clearance ist als theoretisches Volumen definiert, welches pro Zeiteinheit vollständig von einem Wirkstoff befreit wird, und hat dementsprechend die Dimension eines Volumens pro Zeiteinheit. Die Clearance informiert darüber, wie effizient ein Wirkstoff eliminiert wird. Zumeist wird die Clearance als Quotient aus Eliminationsgeschwindigkeit (Masse pro Zeiteinheit) und Plasma-Konzentration (Masse pro Volumen) eines Wirkstoffes berechnet. Die totale Clearance des Gesamtorganismus setzt sich aus den Clearance-Anteilen der einzelnen Eliminationsorgane zusammen (siehe hepatische Clearance und renale Clearance).

dominante Halbwertszeit

Die Halbwertszeit bei mehr-kompartimentellen und somit multi-exponentiellen Systemen, die den größten Beitrag zur AUC liefert. Häufig stimmt die Größe der dominanten Halbwertszeit mit der der terminalen Halbwertszeit überein.

Elimination

Unter Elimination versteht man die Summe aller Prozesse, welche dazu beitragen, dass ein Wirkstoff im Organismus chemisch transformiert und dadurch inaktiviert (= Metabolismus oder Biotransformation) oder aus dem Organismus entfernt wird (= Exkretion).

First-Pass-Effekt

Als First-Pass-Effekt wird der Prozess bezeichnet, durch den eine Wirkstoffmenge während der ersten Leberpassage vermindert werden kann, das heißt einer Metabolisierung der Substanz vor Erreichen des systemischen Kreislaufs unterliegt. Der First-Pass-Effekt liegt somit immer vor, wenn ein Molekül nach dessen Resorption nicht mehr im zentralen Kompartiment auftaucht.

Fließgleichgewicht (Steady-State = ss)

Ein Fließgleichgewicht ist ein Zustand, bei welchem pro Zeiteinheit die verabreichte und die eliminierte Wirkstoffmenge gleich groß sind, das heißt, dass sich Zufuhr und Elimination die Waage halten und dadurch ein konstanter Plasmaspiegel erreicht wird.

Glukose-Toleranztest

Die Kapazität der β -Zellen der Langerhansschen Inseln zur Insulin-Inkretion kann durch intravenöse Injektion von 0,5 g Glukose/kg Körpermasse beim nüchternen Patienten und Blutentnahme vor sowie 15, 30, 45, 60 und 120 Minuten nach der Injektion indirekt bestimmt werden. Bei gesunden Tieren hat Glukose eine Halbwertszeit in Plasma von etwa 20 Minuten, so dass nach 120 Minuten ($5 \times t_{1/2} = 100 \text{ min}$) der Ausgangswert wieder erreicht sein sollte.

Halbwertszeit ($t_{1/2}$)

Zeitdauer, die während einer mono-exponentiellen Elimination eines Wirkstoffes verstreicht, bis die Menge im betrachteten Kompartiment auf die Hälfte des jeweiligen Ausgangswertes abgefallen ist. Bei einer linearen Kinetik ist die Halbwertszeit konstant.

hepatische Clearance (CL_H)

Die hepatische Clearance ist ein Teil der totalen Clearance. Die hepatische Clearance lässt sich auf Grund der Leberdurchblutung (Q_H) und der Wirkstoff-Konzentration in den zuführenden Gefäßen (A. hepatica und V. portae) und in den ableitenden Gefäßen (Vv. hepaticae) errechnen.

initiale Halbwertszeit

Halbwertszeit des zentralen Kompartiments bei mehr-kompartimentellen und somit multi-exponentiellen Systemen, wobei das Blutplasma das „Gewebe“ mit der kleinsten Bindungskonstante für den Wirkstoff darstellt.

insulin-abhängiger Diabetes mellitus (IDDM)

Chronische Hyperglykämie mit daraus folgender Störung anderer Stoffwechselprozesse und Organschäden, die vor allem durch Gefäßveränderungen (Mikro- und Makroangiopathien) bedingt sind. Ätiologisch liegt der Entstehung ein absoluter Insulin-Mangel, das heißt eine fehlende oder verminderte Insulin-Inkretion zugrunde. Der IDDM oder Typ 1-Diabetes wird den autoimmunen Erkrankungen zugeordnet, wobei es bei entsprechender genetischer Disposition unter dem Einfluß verschiedener Faktoren zu einer lymphozytären Insulitis mit nachfolgender Zerstörung der β -Zellen kommt. Beim Typ 1-Diabetes sind die klassischen Symptome der Glukosurie, Polyurie und Polydipsie meist vorhanden, er beginnt fast immer akut mit einer diabetischen Ketoazidose.

insulin-unabhängiger Diabetes mellitus (NIDDM)

Chronische Hyperglykämie mit daraus folgender Störung anderer Stoffwechselprozesse und Organschäden, die vor allem durch Gefäßveränderungen (Mikro- und Makroangiopathien) bedingt sind. Ätiologisch liegt der Entstehung ein relativer Insulin-Mangel durch verzögertes Ansprechen der Insulin-Rezeptoren zugrunde. Beim NIDDM oder Typ 2-Diabetes besteht eine Insulin-Resistenz vor allem der Leber und der Skelettmuskulatur, nachfolgend auch eine Störung der Inselfunktion. Als wichtigster Faktor für die Entstehung eines Typ 2-Diabetes gilt die Adipositas beziehungsweise die ihr zugrundeliegende Lebensweise. Der Typ 2-Diabetes beginnt meist allmählich, die klassischen Symptome der Glukosurie, Polyurie und Polydipsie fehlen lange Zeit.

Kompartimente

Kompartimente sind die theoretischen Räume, die ein Wirkstoff zu besetzen scheint, nachdem die Verteilungsvorgänge abgeschlossen sind. Bei gleichmäßiger Verteilung im Organismus liegt ein einziges Kompartiment vor. Bei unterschiedlicher Verteilung in verschiedenen Geweben mit ihren verschiedenen Bindungskonstanten und daraus folgenden unterschiedlichen Eliminationsgeschwindigkeiten werden entsprechend viele Kompartimente angenommen. Einige Kompartimente werden auf Grund ihrer Funktion näher spezifiziert. So wird das Blutplasma im Organismus üblicherweise als zentrales Kompartiment, Muskulatur und Fettgewebe als (flaches beziehungsweise tiefes) peripheres Kompartiment sowie Urin und Faeces als exkretorisches Kompartiment bezeichnet.

lineare Kinetik

Eine lineare Kinetik oder Kinetik erster Ordnung ist vorhanden, wenn die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung im Plasma direkt proportional der Konzentration des noch unveränderten Wirkstoffes ist (mono-exponentieller Verlauf). Substanzen, die sich so verhalten, haben eine konstante Halbwertszeit.

mittlere Verweildauer (Mean Residence Time = MRT)

Die mittlere Verweildauer ist der Mittelwert der statistischen Verteilung der Verweilzeit der intakten Moleküle eines Wirkstoffes im Organismus. Das Konzept der MRT ist allgemeiner als das der Halbwertszeit. Für mono-exponentielle Funktionen wie die lineare Kinetik gilt die Beziehung zwischen MRT und Halbwertszeit: $MRT = 1/k$ und $t_{1/2} = \ln(2) \times MRT$.

nicht-lineare Kinetik

Bei einer nicht-linearen Kinetik oder Kinetik nullter Ordnung ist die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung im Plasma nicht proportional zur Konzentration des noch unveränderten Wirkstoffes. In diesem Fall ist die Wirkstoffelimination pro Zeiteinheit konstant. Die Erklärung für Kinetiken nullter Ordnung ist zumeist in der Sättigung der für die Elimination verantwortlichen Enzyme zu finden. Sobald die Wirkstoff-Konzentration den Sättigungsbereich der Enzyme durch Abbau deutlich unterschritten hat, geht die nicht-lineare in eine lineare Kinetik über. Das klassische Beispiel für eine nicht-lineare Kinetik ist die Ethanol-Elimination durch die hepatische Alkohol-Dehydrogenase bei Blutspiegeln, die den K_m -Wert für Ethanol von 0,1 g/L (0,1 Promille) übersteigen.

Pharmakodynamik (PD)

Teilgebiet der Pharmakologie, das sich mit den Wirkungen und den Wirkungsmechanismen pharmakologischer Wirkstoffe befasst.

Pharmakokinetik (PK)

Teilgebiet der Pharmakologie, das sich mit den Veränderungen der Konzentration von pharmakologischen Wirkstoffen als Funktion der Zeit befasst. Unterteilt werden diese Veränderungen in Aufnahme (Absorption), Verteilung (Distribution), Verstoffwechselung (Metabolismus = Biotransformation) und Ausscheidung (Exkretion). Die beiden letzten Schritte werden auch unter dem Begriff Elimination zusammengefasst.

renale Clearance (CL_R)

Die renale Clearance ist ein Teil der totalen Clearance. Die Wirkstoffmenge, die mit dem Urin ausgeschieden wird, hängt von der glomerulären Filtrationsrate, der aktiven tubulären Sekretion und der tubulären Rückresorption ab.

sekundärer Diabetes mellitus

Beim sekundären Diabetes handelt es sich um eine chronische Blutzuckererhöhung, die ihre Ursache in einer anderen Primärerkrankung hat: einerseits der Gruppe der Pankreatopathien mit pathogenetischen Parallelen zum Typ-1-Diabetes und andererseits der Gruppe der Endokrinopathien mit pathogenetischen Parallelen zum Typ-2-Diabetes. Die diabetogenen Pankreatopathien mit der Folge der β -Zell-Destruktion auf Grund einer Pankreasfibrose sind die akute nekrotisierende Pankreatitis und die chronisch rezidivierende Pankreatitis. Die

diabetogenen Endokrinopathien durch Überproduktion insulin-antagonistischer Hormone mit der Folge der β -Zell-Dysfunktion sind der Hyperadrenokortizismus, der Hypersomatotropismus, das Phäochromozytom und die Thyreotoxikose.

Steady-State (ss)

(siehe Fließgleichgewicht)

terminale Halbwertszeit

Halbwertszeit desjenigen Kompartiments bei mehr-kompartimentellen und somit multi-exponentiellen Systemen, welches im langsamsten Verteilungsgleichgewicht mit dem zentralen Kompartiment steht, also jenes Gewebe mit der größten Bindungskonstante für den verabreichten Wirkstoff.

Verteilung

Unter Verteilung versteht man den Transfer eines Wirkstoffes vom Verabreichungsort in den systemischen Kreislauf und – in Abhängigkeit von der Lipophilie des Wirkstoffes – anschließend in das extrazelluläre und intrazelluläre Wasser und Gewebe.

Verteilungsvolumen (V_c)

Das scheinbare (zentrale) Verteilungsvolumen ist als das theoretische Volumen definiert, das – ausgehend von der gemessenen Wirkstoff-Konzentration im Blutplasma nach der Verteilung des Wirkstoffes – benötigt wird, um die Gesamtmenge des Wirkstoffes im Organismus aufzunehmen. Entsprechend lässt sich das scheinbare Verteilungsvolumen als Quotient aus der Menge des Wirkstoffes im Organismus und der Plasma-Konzentration des Wirkstoffes berechnen. Das scheinbare Verteilungsvolumen entspricht keinen realen Körperteilen und kann auch viel größer sein als das Volumen des Organismus.

Verteilungsvolumen im Steady-State (V_{ss})

Wird nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes der Steady-State-Zustand erreicht, dann ist der Wirkstofftransfer vom zentralen ins periphere Kompartiment gleich dem in Gegenrichtung. Das scheinbare Verteilungsvolumen im Steady-State gibt am realistischsten das Verteilungsvolumen eines Wirkstoffes wieder. Seine Kenntnis erlaubt die Berechnung der Gesamtmenge des Wirkstoffes im untersuchten Kompartiment aus einer experimentell ermittelten Wirkstoff-Konzentration.

12 Lebenslauf

Name: Sandel
Vornamen: Jan Peter
Geburtsdatum: 24. Mai 1973
Geburtsort: München
Konfession: freichristlich
Vater: Dr. med. Peter Martin Sandel, Allgemeinarzt
Mutter: Irmtraud Sandel, geb. Hutter, Krankenschwester

Schulen:

1979 – 1987 Rudolf-Steiner-Schule, München/Schwabing
1988 – 1993 Otto-von-Taube-Gymnasium, Gauting bei München
(Leistungskurse: Biologie und Latein)
9. Juli 1993 Abitur (Gesamtnote: 1,7)

Zivildienst:

1993 – 1994 Deutscher Caritas-Verband, München

Studium:

WS 1994 Philosophie und Lateinische Philologie
(Schwerpunkt: Rutilius Claudius Namatianus)
Ludwig-Maximilians-Universität, München
SS 1995 Philosophie und Alte Geschichte
(Schwerpunkt: Verfassung der Römischen Republik)
Katholische Universität, Eichstätt
WS 1995 – WS 2000 Tiermedizin
Ludwig-Maximilians-Universität, München
WS 1997 – SS 1998 studentische Hilfskraft am Institut für Tieranatomie I (Prof. Liebich)
der Ludwig-Maximilians-Universität, München
19. Januar 2001 Staatsexamen (Gesamtnote: 2,12)
5. Februar 2001 Approbation zum Tierarzt

Praktika:

- März & April 1999 Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik (Prof. Stolla)
der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- März & April 2000 Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischer Herkunft (Prof. Stolle)
der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Mai & Juni 2000 Tierärztliche Praxis Dr. Schwarz & Dr. Winzinger
in Gräfelfing bei München

Berufserfahrung:

- 4/2001 – 11/2001 Assistent in der Groß- und Kleintierpraxis Wilhelm B. Janssen
in Wittmund, Ostfriesland
(Schwerpunkt: Gynäkologie der Rinder und Pferde)
- 12/2001 – 1/2003 Assistent in der Kleintierklinik Dr. Jürgen Scholten
in Porta Westfalica, Westfalen
(Schwerpunkte: Chirurgie, Ophthalmologie
und Sonographie der Kleintiere)
- 2/2003 – 1/2005 Doktorand bei der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG,
Abteilung Drug Metabolism and Pharmacokinetics,
Gruppe Non Clinical Pharmacokinetics (Tierkinetik)
in Biberach/Riss, Oberschwaben

13 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. Februar 2003 bis zum 31. Juli 2004 in der Gruppe Non Clinical Pharmacokinetics, Abteilung Drug Metabolism and Pharmacokinetics der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach/Riss angefertigt.

Zu großem Dank verpflichtet fühle ich mich gegenüber meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz, Lehrstuhlinhaber am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine allzeit aufmerksame und freundliche Unterstützung von universitärer Seite.

Bei meinem Mentor, Herrn Dr. Andreas Greischel, Leiter der Gruppe Non Clinical Pharmacokinetics, Abteilung Drug Metabolism and Pharmacokinetics der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach/Riss, bedanke ich mich ganz besonders herzlich für die stets freundliche, immer konstruktive und unendlich geduldige Betreuung der Arbeit von industrieller Seite.

Mein herzlicher Dank gilt dem Abteilungsleiter der Abteilung Drug Metabolism and Pharmacokinetics der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach/Riss Herrn Dr. Willy Roth, der mich als Doktorand akzeptiert hat, und den beiden Berufskollegen Herrn Dr. Oliver Rau und Herrn Dr. Lukas Schmid, die mich als Doktorand vorgeschlagen haben.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Holger Fuchs und Herrn Dr. H.-D. Held, beide Laborleiter in der Gruppe Non Clinical Pharmacokinetics, für ihre konstruktive Kritik und Aufmunterung in den dunkleren Stunden der Entstehung dieser Arbeit. Herrn Dr. Holger Fuchs danke ich darüber hinaus für die Anfertigung der Photographie der isoliert perfundierten Ratten-Leber.

Besonderer Dank gebührt der Gruppe Bioanalytics für die zuletzt mehr als außerplanmäßige Messung der BI- β -Proben und das Gastrecht im ELISA-Labor. Stellvertretend für ihre Mitarbeiter sei nur die Gruppenleiterin Frau Dr. Barbara Withopf genannt.

Dank schulde ich auch dem Labor Clinical Pathology der Gruppe Pathology der Abteilung Non Clinical Drug Safety für die Messung der labordiagnostischen Organparameter in den Perfusatproben der isoliert perfundierten Ratten-Leber. Stellvertretend für seine Mitarbeiter sei nur der Laborleiter Herr Dr. Rainer Zimmermann genannt.

Zu Dank verpflichtet bin ich schließlich auch Herrn Dr. Michael Meyners aus der Gruppe Clinical Biostatistics der Abteilung Medical Data Services für die freundliche Unterstützung bei der biometrischen Kanalisierung der experimentell gewonnenen Datenflut.

Last but not least danke ich allen Laborantinnen und Laboranten bei der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach/Riss, die mir auf dem bisweilen steinigen Weg der technischen Umsetzung des erdachten Versuchsdesigns mit Rat und Beispiel zur Seite gestanden haben. Sie alle zu nennen, würde Seiten füllen.