

5 Zusammenfassung und Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass es durch Einsatz neuartiger niedermolekularer und hochselektiver Aktivatoren der Insulin-, Somatostatin- und Antagonisten der Glukagonrezeptoren möglich ist, die Hyperglykämie beim Diabetes mellitus Typ 2 und die Adipositas günstig zu beeinflussen. Darüber hinaus bieten diese Substanzen eine Basis für die Weiterentwicklung oral bioverfügbarer nichtpeptiderger Antidiabetika. Diese sollten eine verbesserte Selektivität für die oben genannten Rezeptoren und damit eine verbesserte Effektivität und ein geringes Spektrum von Nebenwirkungen verlängerte Halbwertszeit und erweitertes Aktionsspektrum aufweisen. Aufgrund einer guten Passage durch die Blut-Hirn-Schranke interagieren die hier genannten Liganden mit den spezifischen Rezeptoren des zentralen Nervensystems.

Im Einzelnen ergaben die Ergebnisse vorliegender Studien folgende neue Erkenntnisse:

1) Die Anwendung niedermolekularer, oral bioverfügbarer Insulinrezeptor-Aktivatoren, die mit der beta-Untereinheit des Insulinrezeptors interagieren, verbessert die diabetische Stoffwechsellage, gemessen an einer Senkung der Hyperglykämie, Steigerung der Insulinsensitivität und Senkung der Plasma-Lipidkonzentration. Aufgrund einer guten Passage durch die Blut-Hirn-Schranke interagieren IRA mit den Insulinrezeptoren des zentralen Nervensystems. Die in der IRA-Gruppe beobachtete Suppression der NPY- und Stimulation der POMC-Expression spricht dafür, dass die verminderte Nahrungsaufnahme auf die differenzielle Aktivierung/Reduktion anorexigener und orexigener Neuropeptide zurück zu führen ist. Diese Daten sind komplementär zu den Beobachtungen von Prof. Rossetti und seiner Mitarbeitern in Ratten. Diesen Tieren wurde exogenes Insulin in den dritten Hirnventrikel appliziert (6). Diese Maßnahme resultierte in einer Reduktion der Fettgewebssmasse, die von einer Gewichtsabnahme begleitet war (6). Es kam zu einer ca. 40-prozentigen Reduktion der endogenen Glukoseproduktion, obwohl die Insulin-Plasmaspiegel sich nicht zwischen der Insulin- und Kontrollgruppe unterschieden. Die besondere Rolle des Insulins im zentralen Nervensystem wurde eindrucksvoll durch die Arbeitsgruppe von Prof. Kahn und seinen Mitarbeitern im Tiermodell mit einer Deletion des Insulinrezeptoren im zentralen Nervensystem belegt (5). Weibliche Tiere mit der Hirnspezifischen Insulinrezeptor-Deletion waren bereits unter normokalorischer Diät schwerer,

hatten erhöhte Fettgewebsmasse und nahmen mehr Nahrung zu sich im Vergleich zu den nichtmutierten Tieren (5). Unter Zufuhr hochkalorischer, fettreicher Diät waren Tiere beider Geschlechter schwerer und hyperphagisch im Vergleich zu nichtmutierten Kontrolltieren (5).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Studie steht die kürzlich beschriebene Beobachtung in Ratten, die mit Antisens-Oligonukleotiden gegen den Insulinrezeptor behandelt worden sind (71). Intrazerebrale Applikation der Oligonukleotiden in den dritten Ventrikel resultierte in einer Suppression der Expression der Insulinrezeptoren im Nukleus arcuatus des Hypothalamus um ca. 80 Prozent (71). Diese Maßnahme führte zur Hyperphagie und Adipositas im Vergleich zu Tieren, die mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelt wurden (71). Die Zunahme der Fettgewebsmasse korrelierte mit Anstieg der Leptinkonzentration, einem Peptidhormon welches aus dem Fettgewebe sezerniert wird, und welches neben Insulin als Serummarker für die körpereigene Fettmasse verwertbar ist. Die mit Antisens-Oligonukleotiden behandelten Tiere wiesen eine periphere Insulinresistenz mit verminderter Hemmung der Glukoneogenese auf.

In einer weiteren Studie wurde eine Herunterregulation der hypothalamischen Insulinrezeptoren durch intraventrikuläre Injektion von Oligonukleotiden gegen die Insulinrezeptoren erreicht. Diese Tiere wiesen ebenfalls eine verminderte Insulinsensitivität auf (6). Die Induktion einer Hyperinsulinämie durch Zufuhr von exogenen Insulin führte zur 25% Verminderung der endogenen Glukoneogenese in Ratten, die mit Antisens-Oligonukleotiden behandelt worden sind, im Vergleich zu einer 55 % Reduktion bei den Kontrolltieren (6). Insulin wurde eine negative Feedback-Rolle in der Regulation der Energiehomöostase zugeschrieben (72). Hierbei wird dem Nukleus arcuatus des Hypothalamus eine zentrale Rolle zugewiesen (73). Die dort exprimierten Neuropeptide POMC, NPY sowie AGRP (agouti-related Protein) spielen eine besondere Rolle für die Regulation der Nahrungsaufnahme spielen. Aus früheren Publikationen ist bekannt, dass die intrazerebrale Applikation von Insulin die Expression orexigener Hormone (AGRP und NPY) reduziert. Die Expression beider Moleküle wird nach Injektion von Antisens-Oligonukleotiden gegen den Insulinrezeptor stimuliert (71). Im Einklang mit diesen Daten haben wir auch in unserer Studie eine Suppression von NPY beobachtet, während die Expression des katabol-wirksamen POMC gesteigert war. Diese differenzielle Regulation des orexigen/anorexigenen Systems ist vermutlich für die aus therapeutischer Sicht erwünschte Wirkung auf die Nahrungsaufnahme und damit zusammenhängende

Gewichtsentwicklung und Fettgewebsveränderung sowohl im Modell der Adipositas als auch des Diabetes mellitus Typ 2 verantwortlich.

Die Reduktion der Körpergewichtszunahme unter Zufuhr einer fettreichen Ernährung mit Zusatz von IRA korreliert nicht nur mit einer verminderten Fettakkumulation des weißen und des braunen Fettgewebes sondern auch mit einer verminderten Leberverfettung. Da die Insulinresistenz der Fettgewebsmasse direkt proportional ist, lässt sich durch Reduktion der Fettgewebsmasse die Insulinresistenz vermindern.

Die intranasale Applikation von Insulin führte auch bei gesunden männlichen Probanden zur Reduktion der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts (74;75). Infolge der nasalen Applikationsroute treten signifikante Mengen von Insulin in den intrazerebrospinalen Raum über und werden daher zentral wirksam (74). Überraschend wurden jedoch bei Frauen eine Gewichtszunahme beobachtet. Diese ist am wahrscheinlichsten auf eine Akkumulation des extrazellulären freien Wassers zurück zu führen (74). Gründe hierfür sind rein spekulativ und werden zurzeit erörtert. Da in unseren Tierversuchen keine weiblichen Tiere eingesetzt worden sind, um den Einfluss des Östrogenzyklus auszuschließen ist nicht klar, ob die beobachteten Veränderungen geschlechtsabhängig sind.

Durch Verminderung der Fettakkumulation in der Leber können IRA einen Schutz vor Entstehung einer *steatosis hepatis* bieten, die bei Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 vorkommt und später zur Fibrose, Zirrhose und Leberinsuffizienz führen kann. Ähnliche Effekte sind wurden bei der Therapie mit Metformin beobachtet (31). Im Mausmodell des Diabetes mellitus Typ 2 reduzierte Metformin die Nahrungsaufnahme, das Gewicht, die Akkumulation von Fett in den Hepatozyten und verbesserte die Insulinsensitivität (31). Als Mechanismen wurde die Suppression der Expression des TNF-alpha (*tumor-necrosis factor-alpha*) und UCP-2 (*uncoupling protein-2*) in den Hepatozyten vorgeschlagen (31). Beide Moleküle sind ursächlich mit der Entstehung der *steatosis hepatis* in Verbindung gebracht worden (31;76). Darüber hinaus reduzierte Metformin die Bindung der DNA an den Transkriptionsfaktor SREBP-1 (*sterol regulatory element binding protein-1*), dessen Expression in Tiermodellen und beim Menschen mit Adipositas und Insulinresistenz erhöht ist (77). Die Wirkung von SREBP-1 besteht unter anderem in einer Stimulation Insulin-bedingter Lipogenese und Fettakkumulation in den Hepatozyten (77). Es ist unklar, ob diese peripheren Effekte eine Rolle bei der IRA-abhängigen Reduktion der *steatosis hepatis* eine Rolle spielen. Zur Klärung dieser Frage werden zur Zeit Untersuchungen durchgeführt. Insgesamt bieten IRA eine neuartige und weiter zu evaluierende

Therapieoption an. Aktuell werden diese Substanzen in höheren Spezies (Hunde/Affen) eingesetzt. Die Ergebnisse hierzu stehen noch aus.

2) Die erhöhte endogene hepatische Glukoseproduktion ist hauptsächlich für die Nüchtern-Hyperglykämie beim Diabetes mellitus Typ 2 verantwortlich. Daher wurde die Blockade von Glukagonrezeptoren als ein Therapieziel bei der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 postuliert. Die Reduktion der Expression von Glukagonrezeptoren durch Applikation von Antisens-Oligonukleotiden führte zur Verbesserung der gestörten Stoffwechsellage in Tiermodellen des Diabetes mellitus. Immunoneutralisierung des endogenen Glukagons durch spezifische Glukagon Antikörper führt ebenfalls zur Senkung der Blutglukosespiegel. Die Deletion des Glukagonrezeptores in Mäusen resultiert in einer Reduktion von Blutglukosekonzentration und wenn die Tiere über einen Zeitraum von 24-Stunden hungern, entwickeln sie eine Hypoglykämie (78). Aus den immunohistochemischen und funktionellen *in vitro* Studien z. B. an isolierten Hepatozyten ist bekannt, dass Glukagonrezeptoren in hoher Dichte in der Leber exprimiert werden. Die Wirkung des Glukagons ist daher das Resultat der Interaktion von Glukagon mit den hepatischen Rezeptoren. Glukagon-Bindungsstellen sind jedoch auch in anderen Geweben z. B. in Nieren, Pankreas, Intestinum und Fettgewebe nachweisbar. In Übereinstimmung mit der Literatur wurden die meisten Bindungsstellen für Glukagon in der Leber identifiziert, während eine deutlich geringere Bindung an die Nieren-Glukagonrezeptoren nachgewiesen werden konnte. Unsere Daten zeigen erstmalig, dass sich Glukagon zu über 75% in der Leber anreichert, während extrahepatische Gewebe (hauptsächlich die Nieren) ca. 25% des radioaktiv markierten Glukagon binden. Aus unseren Untersuchungen lässt sich ableiten, dass die nichtpeptiderge Glukagonrezeptor-Antagonisten mit den hepatischen Glukagonrezeptoren interagieren, während die Bindung an die extrahepatischen Glukagonrezeptoren vernachlässigbar gering ist. Die kompetitive Verdrängung des Glukagons von hepatischen Rezeptoren durch die Glukagonrezeptor-Antagonisten führt zur Senkung der endogenen (hepatischen) Glukoseproduktion und resultiert einer Reduktion der Hyperglykämie beim Diabetes mellitus Typ 2. Diese Ergebnisse werden von der Arbeitsgruppe von Dr. Zhang von Merck Research Laboratorien unterstützt. Sie konnte eindrucksvoll demonstrieren, dass nichtpeptiderge Glukagonrezeptor-Antagonisten wirksam auch den Glykogenabbau an isolierten Hepatozyten hemmen können (79). Diese Beobachtung wurde von der gleichen Arbeitsgruppe auch im perfundierten Lebermodell bestätigt (79). Eine potentielle

Nebenwirkung der Glukagonrezeptor-Blockade wäre die Entwicklung einer Hypoglykämie. Diese Nebenwirkung war jedoch in den mit Glukagonrezeptor-Antagonisten-behandelten ob/ob Mäusen nicht nachweisbar. Als Erklärung sind eine erhöhte Freisetzung von Katecholaminen, Cotricosteroiden und des Wachstumshormons als gegenregulatorische Mechanismen zur Verhinderung einer Hypoglykämie zu diskutieren.

Zusammenfassend, zeigen diese Studien erstmalig, dass die Bindung des Glukagons hauptsächlich an hepatischen Rezeptoren erfolgt. Der Einsatz von Glukagonrezeptor-Antagonisten reduziert die endogene Glukoseproduktion. Die Senkung der Hyperglykämie ist da Ergebnis einer kompetitiven Verdrängung des Glukagons von den hepatischen Rezeptoren. Insgesamt eignen sich diese oral bioverfügbaren Substanzen für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2.

3)

Die Suppression der Glukagonsekretion durch sst2-selektive Agonisten beruht auf einer selektiven Hemmung der Sekretion der pankreatischen A-Zelle ohne Beeinflussung der Insulinproduzierenden B-Zelle. Die Sekretion des Insulins wird hauptsächlich durch sst5 gehemmt, wobei in pharmakologischer Dosis auch sst2-Agonisten diesen Prozess beeinflussen können. Hochgradig sst2-selektive Somatostatin-Agonisten können wirksam die Hyperglukagonämie beim Diabetes mellitus Typ 2 senken. Dieser Effekt geht mit einer Reduktion der Glukagonkonzentration einher, während die Insulinkonzentration unverändert bleibt. Die Tatsache, dass die Hypoglykämie nicht induziert wird kann spekulativ dadurch erklärt werden, dass es nach Abfall der Glukosekonzentration zur vermehrten Freisetzung gegenregulatorischer Hormone kommt, z. B. Katecholamine oder ACTH. Weiterführende Untersuchungen werden aktuell durchgeführt, um die Gültigkeit dieser Hypothese zu untermauern. Die Rolle des sst2 für die Regulation der Glukagonfreisetzung *in vitro* konnten wir zusätzlich im Rahmen unserer neuen Untersuchungen auch an isolierten humanen Pankreasinseln nachweisen (68). Diese Daten sind mit den vor kurzem publizierten Daten an isolierten humanen Pankreasinseln unter Verwendung eines sst2-Antagonisten vereinbar. Applikation des sst2-selektiven Antagonisten führte zu einer Steigerung der basalen Glukagonsekretion und reduzierte somit Somatostatin-abhängige Hemmung der Glukagonsekretion. Studien zur *in vivo* Wirkung von hochgradig sst2-selektiven Agonisten/Antagonisten beim Diabetes mellitus sind bisher jedoch noch nicht durchgeführt worden.

Im Gegensatz zu unseren Daten mit dem sst2, sst3 und sst5-selektiven Agonisten stehen die Untersuchungsergebnisse mit Octreotid. Applikation dieses Agonisten zeigte keine Wirkung auf die Hyperglykämie bei den behandelten Patienten (80). Dieser Effekt ist bedingt durch die zusätzlich zur Senkung der Glukagonsekretion, reduzierte Insulinfreisetzung, da Octreotid sowohl die A- als auch die B-Zell-Rezeptoren für Somatostatin aktiviert werden. Darüber hinaus kann eine unterschiedliche Somatostatinrezeptor-Expression für diesen Effekt verantwortlich sein. Eigene aktuelle Untersuchungen werden zurzeit durchgeführt und erste Daten sprechen dafür, dass der Rezeptorbesatz der pankreatischen A- und B-Zellen der Mäuse und Menschen gewebsspezifische Expressionsmuster aufweist.

Darüber hinaus zeigten unsere Studien, dass eine Suppression der GH-Sekretion durch den sst2-selektiven Agonisten, zumindest beim Nüchternzustand, nicht auftritt. Eigene neue Daten sprechen außerdem noch dafür, dass es auch im Tiermodell des Diabetes mellitus nicht zur Suppression der GH-Freisetzung durch sst2-Agonisten kommt.

Des Weiteren haben unsere Untersuchungen gezeigt, dass die Deletion des sst5 zur Verbesserung der Insulinsensitivität beitragen kann. In diesen Tieren waren sowohl die Glukose- als auch die Insulinkonzentration vermindert. Die niedrigeren Insulinspiegel in den sst5-gendefizienten Mäusen sind mit den Daten aus den *in vitro* Untersuchungen vereinbar. In diesem System der isolierten Pankreasinseln führt der sst5-Agonist zur Senkung der Insulinsekretion. Warum es letztendlich trotz vermindelter Insulinspiegel nicht zum Anstieg der Glukosekonzentration in den mutierten Tieren kommt, ist nicht klar. Ob dieser Effekt für die temporäre Verminderung der Fettgewebssmasse bei den sst5-gendefizienten Tieren verantwortlich ist, ist ebenfalls nicht untersucht. Ob Gegenregulationsmechanismen diese günstige Wirkung danach aufheben, ist Gegenstand aktueller Experimente. Insgesamt eignen sich die sst5-selektive Agonisten aufgrund der *in vitro* beobachteten Senkung der Insulinsekretion zur Therapie z. B. von Octreotid-resistenten Insulin-produzierenden neuroendokrinen Tumoren, die keine sst2 Expression aufweisen, und stattdessen sst5 aufweisen.

Zusammenfassend können alle 3 hier untersuchten Prinzipien eine therapeutische Option beim Diabetes mellitus Typ 2 bilden. Ob die hier vorgestellten Daten, die an den Nagetieren mit experimentell induzierten metabolischen Erkrankungen auf höhere Spezies übertragbar sind und ob sie auch in anderen Krankheitsmodellen ihre Gültigkeit besitzen, ist Gegenstand aktueller Studien.