

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Dr. agr. Bernd Fischer)

Ergebnisse zum Einfluss chronischer Melatoningaben  
auf pankreatische  $\beta$ -Zellen und Pinealorgan von Wistar-  
und Typ2-diabetischen GOTO-KAKIZAKI-Ratten

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Helena Schucht, geboren am 14.11.1983 in Rokycany (Tschechische Republik)  
Betreuer: Prof. Dr. med. Elmar Peschke

Gutachter:

1. Prof. Dr. phil. nat. Stephan Steinlechner
2. Prof. Dr. med. Peter Michael Jehle
3. Prof. Dr. med. Elmar Peschke

Datum der Disputation: 28. 6. 2011

## Referat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde chronischer Einfluss von Melatonin sowohl auf 16 stoffwechselgesunde als auch 16 Typ2-diabetische Ratten untersucht. Die Melatoningabe erfolgte durch das Trinkwasser (2,5 mg/kg KG), immer zur Dunkelperiode. Dies führte nach 64 Tagen zu einem statistisch signifikanten Melatoninanstieg im Plasma. Die exogene Melatoninapplikation bedingte interessanterweise keinerlei Änderungen der pankreatischen MT<sub>1</sub>-Rezeptor-Expression weder bei stoffwechselgesunden Wistar- noch bei Typ2-diabetischen GK-Ratten. Im Gegensatz dazu zeigten die Melatonin-behandelten Wistar-Ratten im Vergleich zu den Kontrollen ein erhöhtes pankreatisches MT<sub>2</sub>-Rezeptor-Expressionsniveau. Zudem war die Expression der MT<sub>2</sub>-mRNA von unbehandelten GK-Ratten im Vergleich zu der von Wistar-Ratten erhöht. Die endogene Melatoninbiosynthese in der Epiphyse blieb auf Grund der unveränderten pinealen AA-NAT-mRNA-Expression nach chronischer enteraler Melatoninapplikation unbeeinflusst. Versuchsbegleitend wurde u. a. eine Reduktion der Futtermittelaufnahme sowie des Körpergewichts von Melatonin-behandelten Wistar-, nicht jedoch von GK-Ratten, registriert. Der Einfluss von Melatonin auf die Glukosespiegel ist eher marginal, die Melatoninbehandlung hatte keine wesentliche Auswirkung auf die Blutglukosekonzentration der normoglykämischen Wistar- sowie der hyperglykämischen GK-Ratten. Auch die mittels PCR bestimmten Glukagon-, GLUT2- und GCK-mRNA-Expressionsstärken in den Pankreata von Wistar- und GK-Ratten wiesen nach der Melatoninapplikation keine quantitativen Unterschiede auf. Die chronische Melatoninapplikation hat jedoch einen nachhaltigen Einfluss auf die Insulinsekretion, indem das Melatonin die Insulinsekretion rezeptorvermittelt hemmt. Die Senkung der Insulinkonzentration im Plasma nach Melatoninapplikation wurde mittels RIA mit geringen quantitativen Unterschieden sowohl bei normoinsulinämischen Wistar- als auch bei hyperinsulinämischen GK-Ratten festgestellt. Begleitend wurde eine Aufregulierung der Insulinrezeptor-mRNA-Expression in den Epiphysen von Melatonin-behandelten Wistar-Ratten gefunden. Die Senkung der Insulinspiegel nach chronischer Melatoninapplikation sowohl bei Wistar- als auch bei GK-Ratten ging mit einem abgeschwächten Immunfluoreszenzsignal in deren pankreatischen Inseln einher. Die Ergebnisse bestätigen die aus der Literatur bekannten Antagonismen zwischen Melatonin und Insulin bei der Wistar- und erstmalig bei der Typ2-diabetischen GK-Ratte. Es spricht viel dafür, dass Melatonin eine Schutzfunktion für die pankreatische  $\beta$ -Zelle erfüllt, da es hyperinsulinämische Entgleisungen, wie sie bei Typ2 *Diabetes mellitus* vorkommen, reduziert.

Schucht, Helena: Ergebnisse zum Einfluss chronischer Melatoningaben auf pankreatische  $\beta$ -Zellen und Pinealorgan von Wistar- und Typ 2-diabetischen GOTO-KAKIZAKI-Ratten. Halle an der Saale, Univ., Med. Fak., Diss., 74 S., 2011

## Inhaltsverzeichnis

	Verzeichnis der Abkürzungen	-III-
1	Einleitung	-1-
1.1	Zuckerkrankheit, <i>Diabetes mellitus</i>	-1-
1.1.1	Typ2 <i>Diabetes mellitus</i> beim Menschen	-1-
1.1.2	GOTO-KAKIZAKI-Ratte, ein Tiermodell des Typ2 <i>Diabetes mellitus</i>	-2-
1.2	Circadianes System	-5-
1.2.1	Zentraler Oscillator	-5-
1.2.2	Periphere Oscillatoren	-6-
1.2.3	Circadiane Rhythmen	-7-
1.3	Melatonin	-8-
1.3.1	Pluripotenz	-8-
1.3.2	Synthese	-9-
1.3.3	Rezeptoren	-10-
1.4	Endokrine Pinealo-Pankreatische Achse	-11-
1.4.1	Phänomenologie des Insulin-Melatonin-Antagonismus	-11-
1.4.2	Melatoninrezeptor-vermittelte Sekretionshemmung von Insulin	-11-
1.4.3	Zusammenspiel von Insulin und Melatonin	-13-
1.5	Melatoninapplikation im Tierversuch	-14-
1.5.1	Melatoninapplikation <i>per os</i> und Glukosehomöostase	-14-
1.5.2	Pharmakokinetik von Melatonin	-15-
2	Ziele der Arbeit	-17-
3	Material und Methoden	-18-
3.1	Versuchsbegleitende Untersuchungen	-18-
3.1.1	Experimentelles Design	-18-
3.1.2	Trinkmenge	-19-
3.1.3	Futtermenge	-20-
3.1.4	Gewicht	-20-
3.1.5	Melatoninapplikation <i>per os</i>	-20-
3.2	Blut- und Plasmawerte	-21-
3.2.1	Blutglukose	-21-
3.2.2	Melatonin-Radioimmunoassay	-21-
3.2.3	Insulin-Radioimmunoassay	-22-
3.3	Molekularbiologische Untersuchungen	-22-
3.4	Morphologische Untersuchungen	-24-
3.4.1	Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin	-24-
3.4.2	Immunhistochemie	-24-

3.5	Statistische Auswertung und grafische Darstellung	-26-
4	Ergebnisse	-27-
4.1.1	Merkmale der Wistar- und GK-Ratten zu Versuchsbeginn	-27-
4.1.2	Gewicht zu Versuchsbeginn	-27-
4.1.3	Blutglukose zu Versuchsbeginn	-27-
4.2	Versuchsbegleitende Befunde	-28-
4.2.1	Wasseraufnahme	-29-
4.2.2	Futteraufnahme	-29-
4.2.3	Gewichtsentwicklung	-30-
4.3	Untersuchungen nach Abschluss der Melatonin-Applikation	-31-
4.3.1	Melatoninplasmakonzentration und Epiphysen-AA-NAT-mRNA	-31-
4.3.2	Blutglukose	-34-
4.3.3	Insulin	-34-
4.3.4	Insulinplasmakonzentration und pineale Insulin-Rezeptor-mRNA	-35-
4.3.5	Insulin-mRNA im Pankreas	-37-
4.3.6	Glukagon-mRNA im Pankreas	-37-
4.3.7	Morphologie der pankreatischen Inseln	-38-
4.3.8	Lokalisation der Inselhormone in den pankreatischen Inseln	-39-
4.3.9	Glukosesensorkomplex im Pankreas	-41-
4.3.10	Immunhistochemische Untersuchung des Glucosetransporter 2 (GLUT2) in pankreatischen Inseln	-42-
4.3.11	MT <sub>1</sub> -Rezeptor-mRNA im Pankreas	-43-
4.3.12	Immunhistochemische Untersuchung des MT <sub>1</sub> -Rezeptors in pankreatischen Inseln	-44-
4.3.13	MT <sub>2</sub> -Rezeptor-mRNA im Pankreas	-46-
5	Diskussion	-47-
6	Zusammenfassung	-58-
7	Literaturverzeichnis	-59-
8	Thesen	-71-
	Selbständigkeitserklärung und Erklärung über Promotionsversuche	-V-
	Lebenslauf	-VI-
	Danksagung	-VII-

## Verzeichnis der Abkürzungen

AA-NAT	Arylalkylamin-N-acetyltransferase
AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
BZ	Blutzucker
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNS	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
Clock	<i>circadian locomoter output cycles kaput</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CREBP	cAMP response element-binding protein
CRE	<i>cAMP response elements</i>
Ct	<i>cycle time</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
D	Dunkelperiode
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGP	Endogene Glukoseproduktion
GK	GOTO-KAKIZAKI-Ratte/n
GCK	Glucokinase
GKC	GOTO-KAKIZAKI-Ratte/n der Kontroll-Gruppe
GKM	GOTO-KAKIZAKI-Ratte/n der Melatoninapplikations-Gruppe
GLUT2	Glukosetransporter 2
GLUT4	Glukosetransporter 4
GSC	Glukosesensorkomplex
HE	Hämalaun-Eosin
HIOMT	Hydroxyindol-O-methyltransferase
IDDM	<i>insulin-dependent diabetes mellitus</i>
INS-1	Insulinoma-1-Zelle
IP3	Inositoltriphosphat
IUPHAR	<i>The International Union of Basic and Clinical Pharmacology</i>
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
Kg KG	Kilogramm Körpergewicht
L : D	Licht zu Dunkel-Verhältnis
M	mol/l

MEZ	mitteleuropäische Zeit
<i>MTNR1B</i>	MT2-Gen
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MT <sub>1</sub> -Rezeptor	Melatoninrezeptor Typ 1
MT <sub>2</sub> -Rezeptor	Melatoninrezeptor Typ 2
n	Stichprobenumfang
NADH/NAD	Verhältnis der reduzierten zur oxidierten Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NPV	<i>Nucleus paraventricularis</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBT	Phosphatgepufferte Tritonlösung
PLC	Phospholipase C
QRS	durch die Depolarisation der beiden Herzkammern verursachte Gruppe von Ausschlägen im Elektrokardiogramm
QT	Intervall von Anfang der Q-Zacke bis zum Ende der T-Welle im Elektrokardiogramm
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SCN	<i>Nucleus supra-chiasmaticus</i>
STZ	Streptozotocin
T2DM	Typ2 <i>Diabetes mellitus</i>
T1DM	Typ1 <i>Diabetes mellitus</i>
$\tau$	Periodenlänge
WC	Wistar-Ratte/n der Melatoninapplikations-Gruppe
WM	Wistar-Ratte/n der Kontroll-Gruppe

# 1 Einleitung

## 1.1 Zuckerkrankheit, *Diabetes mellitus*

### 1.1.1 Typ2 *Diabetes mellitus* beim Menschen

Eine Gruppe von Krankheitsbildern mit einem gemeinsamen Erscheinungsbild, wie einer erhöhten Nüchtern glukose im venösen Blut ( $\geq 7.0$  mmol/l) und/oder zu hohen Blutglukosekonzentrationen nach Durchführung eines oralen Glukosetoleranztests ( $\geq 11.1$  mmol/l), wird dem *Diabetes mellitus* zugeordnet (Report of a WHO/IDF Consultation, 2006). Ursprünglich wurde eine Gruppe von Krankheiten mit dem Symptom der Zuckerausscheidung im Urin beschrieben, der heute dafür gebräuchliche Ausdruck *Diabetes mellitus* bedeutet soviel wie „honigsüßer Durchfluss“. Neben der Glukosestoffwechselstörung wird der Typ2 *Diabetes mellitus* (T2DM) auch von einer herabgesetzten Insulinwirkung bei relativem Insulinmangel und einer pathologischen Insulinsekretion begleitet. Im Gegensatz zu Typ2 Diabetes manifestiert sich der Typ1 *Diabetes mellitus* (T1DM) meist schon in der Jugend; durch einen autoimmunen Zerstörungsprozess der  $\beta$ -Zellen weist der Erkrankte in der Folge einen absoluten Insulinmangel auf. Im Einzelnen ist der T2DM von pathologischer Glukosetoleranz, Insulinresistenz, Funktionsveränderungen des GLUT4 im Fett- und Muskelgewebe, Störungen der Glukagonaktivität sowie einem pathologischen metabolischen Milieu gekennzeichnet. Der manifeste Diabetes bringt Spät komplikationen mit sich, die alle Organsysteme betreffen können (Rakovac et al., 2009). Als Beispiele stehen mikrovaskuläre Komplikationen im Vordergrund, wie Nephropathien (Rivero et al., 2009), Retinopathien (Paulus und Gariano, 2009), kardiovaskuläre Komplikationen (Weckbach et al., 2009), Wundheilungsstörungen (Pradhan et al., 2009), Knochenveränderungen (Ahmad et al., 2003), kognitive Störungen (Moreira et al., 2007a) und Neuropathien (Dobretsov et al., 2007). Als tragende Säulen der Diabetogenese werden heute Umweltfaktoren, hereditäre Faktoren sowie das biologische Verhalten anerkannt (Rich et al., 2009). Diese Volkskrankheit der hochzivilisierten Länder bedroht die Lebensqualität der Betroffenen, wirft Fragen in der nachhaltigen Finanzierbarkeit der medizinischen Versorgung auf und bedeutet damit eine starke sozioökonomische Belastung.

### 1.1.2 GOTO-KAKIZAKI-Ratte, ein Tiermodell des Typ2 *Diabetes mellitus*

Für die chronische Melatoninapplikation wurden die an T2DM leidenden GOTO-KAKIZAKI (GK)- als auch metabolisch gesunde Wistar-Ratten gewählt. Die GK-Ratte ist eine Auszuchtlinie der Wistar-Ratte, die wiederum von der unter Standardbedingungen gezüchteten *Rattus norvegicus domesticus* abstammt. Die GK-Ratte wurde durch selektive Kreuzungen von Individuen mit abnorm hohen Blutzuckerwerten gezüchtet (Goto et al., 1975). Die GK-Ratte entwickelt Merkmale, die mit den T2DM-Komplikationen des Menschen direkt verglichen werden können, wie z. B. Fibrose, Fettinfiltration, Makrophagen- und Amyloidablagerungen in den LANGERHANSschen Inseln, Reduktion der  $\beta$ -Zellmasse und multiple funktionelle  $\beta$ -Zelldefekte. Eine polygenetische Ätiologie und mütterliche Hyperglykämie während der Gravidität sind ebenfalls Merkmale des T2DM, sowohl bei der GK-Ratte als auch beim Menschen (Portha et al., 2008).

Die GK-Ratte hat postnatal zunächst normale Nüchtern-Blutglukosewerte. Die sich während der Ontogenese etablierende milde Hyperglykämie (Portha, 2005) und Hyperinsulinämie (Peschke et al., 2006b) gehören zu den bestimmenden Merkmalen der GK-Ratte. Dies bietet Parallelen zum menschlichen T2DM, welcher ebenfalls in der Regel erst im Laufe des Lebens klinisch manifest wird. Im Gegensatz dazu ist die Wistar-Ratte zeitlebens normoglykämisch, während die adulte GK-Ratte eine gestörte glukoseinduzierte Insulinsekretion, eine verminderte  $\beta$ -Zellanzahl (Portha et al., 2008) sowie verminderte Insulinsensitivität der extrapankreatischen Gewebe zeigt (Ostenson und Efendic, 2007). Die diabetische GK-Ratte ist ein Modell des T2DM mit normalem bis erniedrigtem Gesamtgewicht und dennoch erhöhtem visceralen Fettansatz (Srinivasan und Ramarao, 2007). Darüber hinaus weist sie Veränderungen der systemischen Adipokininkonzentration auf (Wolden-Hanson et al., 2000). Bei bereits hyperglykämischen GK-Ratten wurden erhöhte Leptinkonzentrationen im Vergleich zu jeweils gleichaltrigen Wistar-Ratten gemessen (Movassat et al., 2008). Für das niedrigere Gewicht ist ein vermindertes Wachstum verantwortlich. Trotz exzessiver visceraler sowie retroperitonealer Fetteinlagerungen hat die GK-Ratte im Vergleich zu der Wistar-Ratte ein typischerweise um 10-30% erniedrigtes Körpergewicht (Giroix et al., 1999 a, b). Der T2DM geht jedoch üblicherweise beim Menschen mit einem erhöhten Körpergewicht einher. Neben diesem diabetischen Erscheinungsbild sind auch Populationen von untergewichtigen an T2DM leidenden Menschen beschrieben worden (Srinivasan und Ramarao, 2007). Neben der Stammherkunft und dem Lebensalter der Tiere ist ein weiterer für die Interpretation der Versuchsdaten zu berücksichtigender Faktor das Geschlecht der GK-Ratten. Das Geschlecht spielt z. B.

eine Rolle in der pankreatischen Inseldurchblutung und folglich im Glukosehaushalt (Huang et al., 2008). Auch das Ausmaß der diabetogenen kardiovaskulären Komplikationen koinzidiert mit der Geschlechtszugehörigkeit (Desrois et al., 2004). Da sich bei weiblichen Versuchstieren wahrscheinlich aufgrund der Wirkung von Östrogenen die metabolischen Parameter zu denen der männlichen Tieren unterscheiden, sind in der vorliegenden Arbeit nur männliche Ratten in die Versuche einbezogen worden. Bei zwei Monate alten GK-Ratten einer Pariser Kolonie wurden mittels der Mikroarraymethode beachtliche Diskrepanzen im Expressionsniveau von mRNAs im Vergleich zu den metabolisch unauffälligen Wistar-Ratten gefunden. Dies betraf die Expression der für die Glukoseverwertung, für Inkretin, für Glukokortikoid-Signalkaskaden und der für einige Ionentransportsysteme sowie für Mitose und Apoptose kodierenden Gene (Ghanaat-Pour et al., 2007). Den GK-Rattenstamm zeichnet im Vergleich zu stoffwechselgesunden Wistar-Ratten eine erhöhte Blutglukose, ein geringer  $\beta$ -Zellpool (Calderari et al., 2007), gesteigerte endogene Glukoseproduktion sowie eine erhöhte Pyruvatproduktion im CORI-Zyklus aus (Sena et al., 2007). Weitere Merkmale der GK-Ratte sind eine verlangsamte Herzfrequenz, verlängerte QRS- und QT-Intervalle im Elektrokardiogramm, Fehlen der altersassoziierten Herzfrequenzreduktion (Howarth und Qureshi, 2008) und nicht zuletzt die Parallelen mit den bekannten Funktionsstörungen der  $\beta$ -Zelle beim Menschen (Portha et al., 2008). Die bei GK-Ratten auftretende Störung der glukosestimulierten Insulinsekretion wurde am perfundierten Pankreas (Abdel-Halim et al., 1993, 1994), an isolierten Inseln (Sener et al., 1993) sowie an  $\beta$ -Zellen untersucht (Hughes et al., 1998). Im Verhalten der GK-Ratte ist eine verminderte lokomotorische Aktivität und eine reduzierte Lernfähigkeit aufgefallen (Moreira et al., 2007b). Komplexe Regulationsmechanismen des intermediären Stoffwechsels beinhalten bei GK-Ratten ein breites Spektrum von Funktionsstörungen (Ostenson und Efendic, 2007). Das glukotoxische und lipotoxische Milieu ist wahrscheinlich nicht der einzige Grund für die Störung der Insulinfreisetzung (Poitout und Robertson, 2002; Ostenson et al., 2007). Für den T2DM ist ein Zusammenspiel der genetischen Prädisposition sowie der inadäquaten erworbenen Insulinsensitivität verantwortlich. Letztere ist eine Folge der verminderten  $\beta$ -Zellanzahl (Movassat et al., 2007), die sich durch pränatale Prägung (Portha, 2005) mit sekundärem  $\beta$ -Zellverlust und/oder durch chronische Glukotoxizität erklärt (Poitout und Robertson, 2002). Für die verschiedenen diabetesassoziierten intrazellulären Defekte in der  $\beta$ -Zelle der GK-Ratten gibt es mehrere Ursachen, z. B. Veränderungen des Transports durch Membranen (Gaisano et al., 2002), das gestörte NADH/NAD-Verhältnis (Ferreira et al., 1999) oder die abnormale Aktivierung einiger Phospholipase C-Isoenzyme (Warwar et al., 2006). Das morphologische Korrelat der funktionellen

Störungen ist die typische "Seestern"-Form der Inseln (Guenifi et al., 1995), bedingt durch fibröse Durchwachsungen sowie qualitativ veränderte Mikroarchitektur bei einzeln verbliebenen endokrinen Straßen. Progressive inflammatorisch-fibrosierende insuläre Veränderungen bestimmen das histologische Bild der pankreatischen Inseln von GK-Ratten (Homo-Delarche et al., 2006). Obwohl angenommen wird, dass entzündliche Prozesse den Fibrose- und den "Seestern"-Formen zugrunde liegen, sind die primären Auslöser und die Triggerfaktoren der Entzündung und Fibrosierung noch nicht klar erkannt. Bekannterweise ist die „normale“ mitochondriale Funktion für die regelrechte endokrine Pankreasfunktion nicht unwesentlich. Die Mitochondrienfunktion der Typ2-diabetischen GK-Ratte ist jedoch, ebenfalls wie die der Typ1-diabetischen Ratten, eingeschränkt (Lenzen, 2008). Eine falsche Diät kann eine zusätzliche Belastung der Mitochondrien auslösen (Mizukami et al., 2008). Die Inselmorphologie, Genexpression und Funktion des menschlichen T2DM ähnelt derjenigen, wie sie bei GK-Ratten bekannt ist (Ostenson und Efendic, 2007). Auch bei Typ2-diabetischen Patienten kommt es zu einer Reduktion der  $\beta$ -Zellen bis zu 50% (Deng et al., 2004). Zuchtunterschiede einzelner GK-Rattenkolonien bewirken Abweichungen in manchen physiologischen Parametern beim GK-Stamm selbst und komplizieren so einen direkten Vergleich der bisher publizierten Studien. Fehlende tageszeitabhängige Beobachtungen und fehlende Berücksichtigungen von Alters- und Geschlechtsspezifika erschweren die Entwicklung eines einheitlichen Bildes der Diabetogenese bei GK-Ratten. Der sich daraus ergebende Forschungsbedarf ist deshalb umso dringlicher.

Zusammenfassend betrachtet ist die GK-Ratte ein gutes Modell für den menschlichen T2DM. Die pankreatischen Inseln der GK-Ratte weisen multiple pathogenetische Ursachen auf wie:

- 1.) Die Präsenz von einigen unabhängigen Loci im Genom, die für diabetesassoziierte Veränderungen ohne eine gleichzeitig verminderte  $\beta$ -Zellanzahl verantwortlich sind. Hierbei handelt es sich um eine breite Region auf dem Chromosom 1, welche Diabetes- und Übergewichts-assoziierte Genorte abdeckt (Wallis et al., 2008).
- 2.) Eine Gestationsdiabetes-getriggerte epigenetische Programmierung, die zu einer Verminderung der  $\beta$ -Zellanzahl, ihrer Neogenese und Proliferation führt.
- 3.) Der Verlust der  $\beta$ -Zellen bei einer veränderten Inselmikroarchitektur als Antwort auf Hyperglykämie, Hyperlipidämie, Inflammationsmediatoren und oxidativem Stress (Homo-Delarche et al., 2006; Portha et al., 2008).

Der Glukosesensorkomplex (GSC) besteht aus Glukosetransporter 2 (GLUT2) und Glucokinase (GCK). Postprandial steigt die Blutglukose an und durch die regelrechte Funktion der  $\beta$ -Zelle kommt es zur glukosestimulierten Insulinsekretion. Nach dem Transport von Glukose mittels GLUT2 in die  $\beta$ -Zelle wird Glukose durch die GCK in Glukose-6-Phosphat umgewandelt und weiter in die Glykolyse und Glukoseoxidation eingeschleust, wobei das Adenosintriphosphat (ATP) entsteht. Ein erhöhter ATP/ADP-Quotient lässt die ATP-regulierten  $K^+$ -Kanäle schließen. Erst wenn die meisten von diesen Kanälen (ca. > 99%) geschlossen sind, depolarisiert die Membran. Die spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ werden geöffnet. Es folgt die Insulinexocytose. Funktionsbeeinträchtigungen des GSC sind bei der GK-Ratte insofern von Bedeutung, als neben einer fortschreitenden GLUT2-Unterexpression der RNA (Frese et al., 2007) die insuffiziente Insulinantwort auf Glukose an die gestörte ATP-Produktion sowie an ein gestörtes Schließen von ATP-regulierten Kaliumkanälen geknüpft ist (Tsuura et al., 1993). Es wird über eine verminderte Expression von GLUT2- sowie GCK-mRNA bei 42 Wochen alten GK-Ratten berichtet, wobei das GCK-mRNA-Expressionsniveau bereits von sehr jungen GK-Tieren gegenüber gleichaltrigen Wistar-Ratten erhöht war. In der pankreatischen Insel zeigen GLUT2- bzw. GCK-mRNA-Transkripte eine circadiane Oscillation, deren Amplituden bei GK-Ratten weniger ausgeprägt sind (Frese et al., 2007). Die Transkription der pankreatischen Melatoninrezeptoren ist bei den GK-Ratten im Vergleich zu Wistar-Ratten während der Dunkelperiode hochreguliert (Peschke et al., 2006b, 2007). Die Melatoninrezeptoren modulieren die Suppression der glukoseinduzierten Insulinsekretion (Peschke et al., 200, 2002). Das Auftreten bestimmter genetischer Polymorphismen im  $MT_2$ -Rezeptor-Gen stellt wahrscheinlich ein Risiko dar, an T2DM zu erkranken (Prokopenko et al., 2009; Sparso et al., 2009). In Anbetracht dieser Zusammenhänge spielt das Melatonin möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des T2DM.

## **1.2 Circadianes System**

### **1.2.1 Zentraler Oscillator**

Nahezu alle Lebensformen unterliegen photoperiodischen Einflüssen. Die sogenannten Zeitgeber sind Informationsvermittler zwischen der sich verändernden Außenwelt (Tages-, Wochen-, Monats-, Jahreszeit usw.) und der „Inneren Uhr“ des Organismus. Sie ermöglichen somit eine Feinabstimmung von endogen generierten circadianen Rhythmen an die äußeren Einflüsse (Synchronisation). Der endogene Tages-Rhythmus beträgt circa 24 h (20-28 h, circadianer Rhythmus), ein ultradianer Rhythmus hat eine kürzere Periode ( $\tau < 20$  h) und der infradiane Rhythmus weist

Perioden auf, die mehr als 28 h dauern. Weitere bekannte Rhythmen sind z. B. die circamensuellen ( $\tau = \text{ca. } 1 \text{ Monat}$ ) und circannualen ( $\tau = \text{ca. } 1 \text{ Jahr}$ ) Oscillationen (Haus, 2007). Der Hauptgenerator (die „Innere Uhr“) der endogenen circadianen Oscillation ist im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) lokalisiert (Moore, 1993; Reppert und Weaver, 2002). Die Ursache für die circadiane Oscillation sind zwei sich rhythmisch beeinflussende *feedback-loops* der dimeren Uhrengeneprodukte BMAL/CLOCK und CRY/PER, die den chronobiologischen Takt generieren und konsekutiv die rhythmischen cellulären Funktionen steuern. Durch den *output* des Oscillators werden auf neuronalem Wege oder über humorale Faktoren, wie z. B. Melatonin, die zellulären Abläufe in der Peripherie abgestimmt. Der circadiane Rhythmus wird durch verschiedene Zeitgeber an den physikalischen Tag/Nachtwechsel angepasst. Der SCN selbst benötigt *input*-Signale mit synchronisierender Bedeutung (Stephan und Zucker, 1972). Ein solcher Zeitgeber für den SCN ist der Licht-Dunkel-Wechsel, der über neuronale Verschaltung zum Pinealocyten gelangt und dort in ein endokrines Signal, das Melatonin, umgewandelt wird. Das lipophile Melatonin, das alle Zellmembranen und auch die Blut-Hirn-Schranke (Vitte et al., 1988) überwindet, übt über membranständige Rezeptoren (Gauer et al., 1993; Agez et al., 2009) wiederum eine synchronisierende Funktion auf den SCN aus. Der SCN steuert multiple physiologische Abläufe mit Auswirkung auf entsprechende Organfunktionen (Buijs et al., 2003; Perreau-Lenz et al., 2004). So kann durch Melatoninapplikation mit einer Phasenverschiebung der circadianen Rhythmik gerechnet werden (Peschke und Peschke, 1998), die zur Modifizierung der physiologischen Rhythmen führen kann.

### 1.2.2 Periphere Oscillatoren

Es ist heute davon auszugehen, dass periphere Gewebe und Organe über eine ähnliche Infrastruktur wie der SCN, nämlich über eine durch Uhrengene angetriebene „Innere Uhr“ verfügen (Mühlbauer und Peschke, 2007a). Man spricht von den peripheren Oscillatoren 2. Ordnung („*slave oscillators*“), im Gegensatz zum autonomen „*master*“-Oscillator im SCN. Diese peripheren Uhren wurden in zahlreichen Geweben (Peschke, 2008), unter anderem auch in pankreatischen Inseln erstmals 1998 beschrieben (Peschke und Peschke, 1998). Mittels einer Perifusionsanlage wurde bei isolierten pankreatischen Inseln metabolisch gesunder Ratten ein circadianer Rhythmus der Insulinsekretion gesichert ( $\tau = 22 \text{ bis } 26 \text{ h}$ ). Die (semi)-autonome Insulinsekretionsrhythmik (Peschke und Peschke, 1998; Haus, 2007) und die circadian-periodisch exprimierten Uhrengene im Pankreas (Mühlbauer et al., 2004) unterstützen die Hypothese, dass die circadianen Rhythmen der pulsatischen

Insulinfreisetzung in der  $\beta$ -Zelle selbst generiert werden. Der Insulinsekretionsrhythmus ist so robust, dass er bei kontinuierlich parenteraler Ernährung, Insulin- sowie Glukosezufuhr und ebenso beim Fasten persistiert (Haus, 2007). Generell gibt es jedoch weitere Oscillationen der Insulinsekretion von verschiedener Periodenlänge (insbesondere ultradiane Insulinsekretionsrhythmen von 10-20 min). Der Sinn der ultradianen Insulinsekretion mit Insulinkonzentrationsmaxima am späten Nachmittag liegt z. B. in einer optimierten peripheren Glukoseverwertung. Bei Diabetikern und Menschen mit gestörter Glukosetoleranz gehen die ultradianen Insulinrhythmen teilweise verloren (Boden et al., 1996; Haus, 2007). Im Alter sind die ultradianen (80-150 min) Rhythmen und deren Amplituden weniger deutlich ausgeprägt. Es besteht gleichzeitig eine gewisse Tendenz zu Hyperglykämie oder gestörter Glukosetoleranz (Haus, 2007). Die Blutglukose (Mejean et al., 1988) sowie die Ergebnisse des oralen Glukosetoleranztests (Jarrett et al., 1972; Dos Santos et al., 2006) weisen einen tagesrhythmischen Charakter auf. Auch die Inselhormone Glukagon und Somatostatin folgen einer pulsatilen Sekretion (Goodner et al., 1991). Der Insulinrezeptor zeigt eine circadian periodische Funktionsleistung in Monocyten und Adipocyten (Beck-Nielsen und Pedersen, 1978; Feuers et al., 1990). Insulinrezeptortranskripte konnten ebenfalls im Pinealorgan beschrieben werden, ebenso wie ihre tageszeitabhängige Schwankungen (Peschke et al., 2006 b).

### **1.2.3 Circadiane Rhythmen**

Die peripheren Oscillatoren sind der vom SCN vorgegebenen Periodenlänge ( $\tau$ ) unterworfen. Während ein herauspräparierter SCN so lange autonom oscilliert wie er *ex vivo* überleben kann, verlieren die peripheren Oscillatoren *ex vivo* nach einigen Tagen ihre Amplitudenhöhe (Haus, 2007). Aber auch gegensätzliche Ergebnisse sind beschrieben, nämlich dass auch periphere Oscillatoren *ex vivo* ihre Amplitudenlänge beibehalten, z. B. die rhythmische Insulinsekretion der explantierten pankreatischen Insel (Peschke und Peschke, 1998). Die peripheren Oscillatoren können durch verschiedene Disruptoren von dem SCN entkoppelt werden. Hingegen können einige Hormone die Desynchronisierung wieder aufheben. Im Falle der peripheren Oscillatoren kann eine Vielzahl von Faktoren neben dem Melatonin (an Geweben mit Melatoninrezeptor-Ausstattung) die synchronisierende Aufgabe übernehmen (Mistlberger und Skene, 2005). Zu diesen gehören beispielsweise Nahrungsaufnahme während „atypischen“ Zeiten (Krauchi et al., 2002), Nahrungsrestriktion (Challet et al., 1997; Damiola et al., 2000), körperliche Aktivität (Redlin und Mrosovsky, 1997), auditive Stimuli (Goel, 2005) oder Temperaturschwankungen (Van Someren und Riemersma-Van Der Lek, 2007). In diesem Sinne prädisponieren „Fehl“-

Verhaltensweisen die Desynchronisation des Zusammenspiels zwischen peripheren Oscillatoren und dem SCN. Unter Schichtarbeitern, Personen mit Schlafstörungen und „Lichtsmog“-Exponierten wurden eine erhöhte Prävalenz des metabolischen Syndroms und/oder Fettleibigkeit sowie pathologische Insulin- und Glukosekonzentrationen gefunden (Prasai et al., 2008). Es wird angenommen, dass der SCN die tägliche Blutglukoseschwankungen kontrolliert (Kalsbeek et al., 2004), welche beim *Diabetes* entgleist sind. In einem Mausmodell mit Mutation im Uhrengen *circadian locomoter output cycles kaput (Clock)* entfaltet sich phänotypisch eine pathologische Glukose- und Insulinhomöostase (Turek et al., 2005). Darüber hinaus wird die diabetische Hyperglykämie durch eine erhöhte endogene hepatische Glukoseproduktion (EGP) aufrechterhalten, die wiederum bei Typ2-Diabetikern einem SCN-kontrollierten circadianen Rhythmus gehorcht, während diese Art der EGP-Regulation bei metabolisch Gesunden nicht nachweisbar ist (Radziuk und Pye, 2006). Ein wichtiger Bestandteil des circadianen Systems der Säugetiere, das Melatonin, kann in diabetische Situationen eingreifen, indem es die periphere *pacemaker*-Funktion in der pankreatischen Insel moduliert. Durch den Synchronisator Melatonin wird die Amplitude der Insulinsekretion isolierter pankreatischer Inseln um mehrere Stunden verschoben (Peschke und Peschke, 1998; Picinato et al., 2002b). Somit übernimmt Melatonin möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von *Diabetes mellitus*-assoziierten metabolischen Störungen.

### **1.3 Melatonin**

#### **1.3.1 Pluripotenz**

Bekannt ist die Epiphyse seit dem 3. vorchristlichen Jahrhundert (Herophilus von Alexandria). Im 17. Jahrhundert hatte Descartes der Epiphyse den Sitz des *Sensorium commune* zugeschrieben. Die biologische Rhythmengenerierung, die Verknüpfung zum optischen System sowie zum Endokrinium erfüllen schließlich alle zusammen die Voraussetzungen für die „Erkennung der Welt“ (Descartes), für die Orientierung in Raum und Zeit sowie für die höheren Gedankenfunktionen (Peschke, 2004; Arushanian et al., 2006). In spirituellen Kreisen wurde die Epiphyse immens populär indem in ihr Shivas Auge, das „dritte Auge“, gesehen wurde. Aaron Lerner und Mitarbeiter waren die Ersten, die 1958 das Melatonin aus Rinderepiphysen gewannen und 1959 die chemische Struktur klären konnten (Lerner et al., 1958, 1959). Klinisch sind einige Krankheitsbilder bekannt, die mit einem erniedrigten Melatoninspiegel einhergehen (Status diabeticus, Morbus Alzheimer, Osteoporose, Alterungsprozess, Autismus, usw.).

### 1.3.2 Synthese

Unter einem natürlichen Wechsel der Hell-/Dunkelperiode trägt der photische Stimulus entscheidend zur Synchronisation des SCN bei. Von der Retina wird die Lichtinformation auf einem multisynaptischen Weg (Buijs et al., 2006), unter sympathischer Modulation in den Pinealocyten, in ein endokrines Signal übersetzt (Axelrod und Wurtman, 1966). Folgende Vorstellung des photoneuroendokrinen Systems mit dem Pinealorgan als hormone sezernierendem Effektororgan ist allgemein akzeptiert. Die Lichtinformation der Außenwelt gelangt bis zu den Pinealocyten auf folgenden Weg: Retina - *Tractus retinohypothalamicus* - *Nucleus suprachiasmaticus* des Hypothalamus - *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus - *Columna intermediolateralis* - *Ganglion cervicale superius* - *Nervi coronarii* - *Glandula pinealis*. Schon vor mehr als einem Jahrhundert spricht der österreichische Neurologe, Heinrich Obersteiner, von einer „nicht übersehbaren Wurzel der optischen Bahn“, welche in die, den III. Hirnventrikel umgebende, graue Substanz eintritt, die retinohypothalamische Projektion (Obersteiner, 1888).

Der unentbehrliche Baustein für die Melatoninbiosynthese ist die essentielle Aminosäure Tryptophan, die mit der Nahrung aufgenommen wird. Tryptophan wird in die Epiphyse mit Hilfe eines hochaffinen Transporters eingeschleust (Gutierrez et al., 2003) und zu Serotonin (5-Hydroxytryptophan) hydroxyliert und decarboxyliert. Serotonin wird durch die cytoplasmatische Arylalkylamin-N-acetyltransferase (AA-NAT) acetyliert und schließlich durch die Hydroxyindol-O-methyltransferase (HIOMT) zu Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin) methyliert (Simonneaux und Ribelayga, 2003). Das lipophile Melatonin wird nicht intracellulär gespeichert sondern sofort nach der Synthese vom Pinealocyten abgegeben. Nachtaktive Tiere, wie die Ratten, zeigen ebenso wie tagaktive Lebewesen, wie die „meisten“ Menschen, einen erhöhten Melatoninspiegel nur während der Dunkelperiode (Vasicek et al., 2005). Die Synthese von Melatonin wird allerdings speziesspezifisch reguliert. Bei Nagern ist für die Melatoninsynthese die transkriptionelle Regulierung der AA-NAT entscheidend. Es gilt dabei, dass nur die stimulierten Pinealocyten die AA-NAT-mRNA exprimieren. Konsekutiv erscheint mit Latenz von 1 bis 2 h das AA-NAT-Protein: die Melatoninbiosynthese kann stattfinden. Mithilfe des inhibitorischen Transkriptionsfaktors *inducible cAMP early repressor* wird die Melatoninsynthese beendet. Im Gegensatz dazu regulieren Huftiere und Primaten die Melatoninproduktion ausschließlich auf dem posttranskriptionellen Niveau. Dabei wird das funktionstüchtige AA-NAT-Enzym kontinuierlich produziert und dem Bedarf durch den proteasomalen Abbau angepasst (Stehle et al., 2001; Schomerus und Korf, 2005). Aus funktioneller Sicht liegt das

chronoendokrine Zentrum, die *Glandula pinealis*, in einem komplexen *input-output*-Netz und erhält Signale durch zahlreiche Botenstoffe (Simonneaux und Ribelayga, 2003). Extrapineal identifizierte Melatonin syntheseorte wie z. B. neuroendokrine retinale Zellen, das diffuse neuroendokrine System im Verdauungstrakt, die HARDERSche Drüse sowie manche Immunzellen besitzen eine eigene Enzymausstattung für die Melatoninbiosynthese (Hardeland, 2008).

### 1.3.3 Rezeptoren

Seitdem durch die  $^{125}\text{I}$ -Markierung die Lokalisation von Melatoninbindungsstellen im Gewebe ermöglicht war, wurden die Melatonin-bindenden Orte bei verschiedenen Säugetierspezies im Gehirn, z. B. in den *Nuclei dorsomediales* und *ventromediales hypothalami*, im vorderen Hypothalamus, in der *Area preoptica medialis*, im *Nucleus paraventricularis*, im *Hippocampus*, in der *Area postrema*, der *Amygdala*, der *Retina*, im SCN, in der *Pars tuberalis* der Hypophyse sowie im Cortex cerebri nachgewiesen. Aufgrund des Affinitätsvergleiches dieser G-Protein gekoppelten Melatonin-bindenden Proteine erfolgte eine Unterscheidung in den hochaffinen Rezeptor mit  $K_d < 200 \text{ pM}$  ( $\text{MT}_1$ ) und den niedrigaffinen Rezeptor mit  $K_d$  von ca. 0,9-10 nM ( $\text{MT}_2$ ). Der erfolgreichen Klonierung der ursprünglich als  $\text{Mel}_{1a}$  bzw.  $\text{Mel}_{1b}$  bezeichneten Melatoninrezeptoren in den 90er Jahren durch Reppert und Mitarbeiter (Reppert et al., 1996) folgte im Jahr 2009 die letzte Nomenklaturvereinbarung durch die *International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification* (IUPHAR). Derzeit werden diese Isoformen  $\text{MT}_1$ - bzw.  $\text{MT}_2$ -Rezeptoren genannt. Die dritte Melatoninrezeptorisoform,  $\text{Mel}_{1c}$ , kommt bei den Säugetieren nicht vor und ist nur ein strukturverwandtes Melatonin-bindendes Protein. Schließlich wurde die pharmakologische Spezifität rekombinanter Melatoninrezeptoren mit dem Ziel der Unterscheidung einzelner Subtypen im nativen Gewebe geprüft (Reppert, 1997). Bislang wurde deren Transkription in zahlreichen Organen nachgewiesen (von Gall et al., 2002). Die membrangebundenen  $\text{MT}_1$ - und  $\text{MT}_2$ -Rezeptoren werden auch in der Ratten-Insulinoma (INS-1)-Zelle sowie in den pankreatischen Inseln von Mensch und Ratte exprimiert (Peschke et al., 2000; 2002; Mühlbauer und Peschke 2007b; Ramracheya et al., 2008). Diese wurden autoradiographisch sowie immunhistochemisch und funktionell nachgewiesen. Der spezifische, hochaffine  $\text{MT}_1$ -Rezeptor hemmt die Adenylatcyclase (AC). Die cytosolische cAMP-Konzentration fällt ab. Auf diesem Weg hemmt das Melatonin Sekretionsvorgänge. Die dem  $\text{MT}_2$ -Rezeptor angeschlossene intracelluläre cGMP-Kaskade führt vermutlich ebenfalls zur Senkung der Insulinsekretion (Stumpf et al. 2008, 2009; Peschke et al. 2009).

## 1.4 Endokrine Pinealo-Pankreatische Achse

### 1.4.1 Phänomenologie des Insulin-Melatonin-Antagonismus

Während der Dunkelperiode koinzidieren bei Säugern Melatonin-Peaks mit Insulin-Absenkungen. Während der Hellperiode werden hingegen Insulin-Peaks bei niedrigen Melatoninkonzentrationen im Plasma ermittelt (Boden et al., 1996; Peschke et al., 2006b). Bei den unter T2DM leidenden hyperinsulinämischen Ratten ist die nächtliche Amplitude der Melatoninplasmakonzentration reduziert (Peschke et al., 2006b) während nach Induktion eines Typ1 *Diabetes mellitus* (T1DM) durch Streptozotocin (STZ) hohe Melatoninplasmakonzentrationen neben einem Insulinmangel im Rattenmodell nachgewiesen wurden (Peschke et al., 2008). Das STZ zerstört selektiv die pankreatische  $\beta$ -Zelle. Dort kommt es zu einer massiven mitochondrialen Belastung durch freie Sauerstoffradikale (ROS). Schließlich erzeugt das STZ einen absoluten Insulinmangel. Zusätzlich entwickeln sich eine erhöhte Blutglukose und Transkriptionsveränderungen des pinealen Insulinrezeptors. Die Folgen der radikal-oxidativen Belastung können durch einen sog. Radikalfänger wie Melatonin gelindert werden, da Melatonin die mitochondriale Funktion verbessern kann (Lopez, 2009) und die  $\beta$ -Zellnekrose teilweise zu vermeiden hilft (Ebelt et al., 2000). Exogen zugeführtes Insulin (Champney et al., 1985) aber auch T2DM-assoziierte Hyperinsulinämie (Peschke et al., 2006b; Kedziora-Kornatowska et al., 2009) gehen mit erniedrigten nächtlichen Melatoninplasmakonzentrationen einher. Die Insulinopenie beim STZ-induziertem T1DM ist hingegen mit erhöhten nächtlichen Melatoninkonzentrationen assoziiert (Peschke et al., 2008). Zudem entwickelte sich nach chronischen Melatoningaben *per os* eine erniedrigte Insulinplasmakonzentration (Nishida et al., 2002, Peschke et al., 2010). Insbesondere bei Patienten mit einem metabolischen Syndrom war das Serumlipidprofil umso günstiger, je höher der nächtliche Melatonin/Insulin-Quotient war (Robeva et al., 2008). Postmenopausale Frauen, bei denen erhöhte Melatoninkonzentrationen gemessen wurden, wiesen eine erniedrigte Serum-C-Peptid- sowie Blutglukose-Konzentration auf (Starka et al., 2008).

### 1.4.2 Melatoninrezeptorvermittelte Sekretionshemmung von Insulin

Mittels technischer Möglichkeiten wie Super- oder Perifusion konnte die spezifisch bzw. unspezifisch stimulierte Insulinsekretion durch zwei chemisch ähnliche Indolamine dosisabhängig moduliert werden. Das Melatonin hemmte die Glukose- bzw. Kaliumchlorid-stimulierte Insulinsekretion, während das Serotonin sie erhöhte. Im Gegensatz dazu blieb die basale Insulinsekretion von einer pharmakologischen Dosis Melatonin (1 $\mu$ M) unbeeinflusst (Peschke et al., 1997). Diese Befunde fanden mehrfach

Bestätigung (Kemp et al., 2002; Picinato et al., 2002b; Peschke et al., 2006a, 2009). Die Melatoninrezeptoren werden in den  $\beta$ -Zellen pankreatischer Inseln exprimiert (Peschke et al., 2000, 2002; Ramracheya et al., 2008). Dort vermitteln sie den hemmenden Einfluss auf die Insulinsekretion. Nach der Besetzung der spezifischen, hochaffinen  $G_{i\alpha}$ -gekoppelten  $MT_1$ -Rezeptoren durch Liganden wird die intracelluläre cAMP-Konzentration durch Hemmung der Adenylatcyclase (AC) in den  $\beta$ -Zellen gesenkt und konsekutiv die Insulinfreisetzung gedrosselt (Peschke et al., 2002, 2006a). Die Melatoninbehandlung der INS1-Zellen hatte aber auch eine Stimulierung der IP3-Freisetzung mit konsekutiver Steigerung der Insulinsekretion zur Folge (Bach et al., 2005). Dieser Weg, *via*  $G_{q11}$ -Kopplung des  $MT_1$ -Rezeptors, übertrifft jedoch quantitativ die auf dem cAMP-Weg vermittelte Insulinsekretionshemmung nicht (Peschke, 2008). Kürzlich wurde ein dritter Melatoninsignalweg über den  $MT_2$ -Rezeptor beschrieben, der die Hemmung der Guanylatcyclase (GC) und des cGMP-Weges zu Folge hat. Hierdurch wird die Insulinsekretion wie auf dem cAMP-Weg gesenkt (Stumpf et al., 2008b). Trotz einer suffizienten, jedoch funktionell unterlegenen  $G_{q11}$ -IP3-Kaskade, überwiegt in der Summe die Insulinsekretionshemmung als Antwort auf die Melatoninbindung an seine Membranrezeptoren in der  $\beta$ -Zelle. Die Expression der  $MT_1$ -Rezeptor-mRNA ist in der Insel vergleichsweise stärker als die der  $MT_2$ -Rezeptor-mRNA (Mühlbauer und Peschke, 2007). Ergebnisse weiterführender Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung von Melatonin für die Regulierung der Insulinsekretion beim T2DM. In diesem Kontext wurde ein erhöhtes mRNA-Expressionsniveau der membranständigen Melatoninrezeptoren bei diabetischen Patienten gefunden (Peschke et al., 2006b; Mühlbauer und Peschke, 2007a). Sie fand Bestätigung durch immunhistochemische und autoradiografische Darstellung der Melatoninrezeptoren in den pankreatischen Inseln (Peschke et al., 2007). Aktuelle Publikationen weisen das Auftreten von Genvarianten im  $MT_2$ -Rezeptor-codierenden Gen (*MTNR1b*) im Kontext der Diabetogenese des T2DM nach (Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009). Die Träger eines bestimmten *single nucleotid polymorphism* (SNP, Austausch einer einzigen Aminosäure im Intron der nicht translatierten Abschnitte des *MTNR1b*) repräsentieren laut genomweiter Assoziationsstudien eine Risikogruppe des T2DM (Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009; Staiger et al., 2008). Ihr Phänotyp ist durch ein erhöhtes  $MT_2$ -mRNA-Expressionsniveau sowie durch ein pathologischen *first phase insulin response* im oralen und intravenösen Glukosetoleranztest charakterisiert (Bouatia-Naji et al., 2009; Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009). Letztere drei Sachverhalte treffen für die GK-Ratte gleichfalls zu, wodurch Ähnlichkeiten des T2DM bei Ratte und Mensch unterstrichen werden. Die bisherigen *in vitro*-Studien belegen eine Insulinsekretionshemmung durch Melatonin *via* membranständiger  $MT_1$ -, vor allem

aber  $MT_2$ -Rezeptoren, und einen funktionellen Melatonin-Insulin-Antagonismus (Peschke et al., 2009).

### 1.4.3 Zusammenspiel von Insulin und Melatonin

Obwohl die Gesetzmäßigkeiten der Pinealo-Pankreatischen-Achse noch nicht erschöpfend geklärt sind, gibt es dennoch Hinweise für ein *feedback* zwischen Pinealocyten und pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Bei einer Hyperinsulinämie der GK-Ratte wurde eine, vermutlich kompensatorisch, erhöhte Expression pinealer AA-NAT-mRNA bei Aktivitätsminderung dieses Enzyms während der Dunkelperiode beobachtet (Peschke et al., 2006b). Ein Insulinüberangebot hemmt bei Hamstern die Melatoninproduktion in der Epiphyse (Champney et al., 1985; Chik et al., 1997). Der Einfluss von Insulin auf explantierte Epiphysen der Ratte bestand in einer Suppression der Norepinephrin-stimulierten Melatoninsynthese (Peschke et al., 2008). Dementsprechend weist die hyperinsulinämische GK-Ratte erniedrigte Melatoninspiegel auf. Dabei kombiniert sich eine erhöhte pineale Insulinrezeptor-mRNA-Expression während der Hellperiode mit einer Hochregulierung von pankreatischen Melatoninrezeptor-Transkripten während der Dunkelperiode (Peschke et al., 2006b). Das Insulin moduliert die Pinealocytenfunktion z. B. durch eine Hemmung der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle (Chik et al., 1997). Der Insulinrezeptor ist im neuronalen Gewebe weit verbreitet. Dieser membranständige Tyrosinkinasegekoppelte Rezeptor vermittelt für Energiehaushalt und Reproduktion wichtige Vorgänge. Nach Bindung des Insulins am extracellulären Teil des Rezeptors wird die Tyrosinkinaseaktivität der  $\beta$ -Ketten stimuliert. Sie phosphorylieren sich selbst und andere Proteine, wie die Insulinrezeptorsubstrate IRS-1 und IRS-2. Deren phosphorylierte Tyrosinreste werden weitergereicht an IRS-aktivierbare Enzyme, wie zum Beispiel an die *phosphoinositid-3-kinase* (PI3)-Kinase. Dieses Enzym fördert die Bildung von Phosphatidylinositoltrisphosphat (PIP3). Schließlich aktiviert die Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 weitere Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, die ihrerseits die schnellen Wirkungen von Insulin auslösen. Ein zweiter Weg, der nach Bindung an IRS-1 oder IRS-2 ebenfalls aktiviert wird, ist die Ras-Kaskade, die schließlich zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führt und somit zur Veränderung der Genexpression. Diese Transduktion ist für die Zellteilung wichtig. Über die Ras-Kaskade werden die Insulin-Langzeiteffekte ausgelöst. Darüber hinaus aktiviert das Insulin auch eine ubiquitär vorkommende Phosphodiesterase (PDE), die das wirksame cAMP in das unwirksame AMP überführt. Das Insulin senkt somit den cAMP-Spiegel in Zellen und antagonisiert die Wirkung von Glucagon und Adrenalin.

## 1.5 Melatoninapplikation im Tierversuch

### 1.5.1 Melatoninapplikation *per os* und die Glukosehomöostase

Ein Spektrum an zuverlässigen, aber teilweise sich widersprechenden Studien spiegelt die Komplexität der Bedeutung von Melatonin für den Stoffwechsel der Kohlenhydrate wider (Peschke, 2008). Die metabolische Situation des T2DM verschlechtert sich durch eine zusätzliche Pinealektomie (Nishida et al., 2003), während sie von chronischer Melatoninapplikation eindeutig profitiert (Nishida et al., 2002). Das Melatonin ist in der Lage, die nach einer Pinealektomie folgende Hyperglykämie sowie die Insulinantwort zu verbessern, während die alleinige Melatoninapplikation die verlorene circadiane Glukoseschwankung nicht wiederherstellen konnte (la Fleur et al., 2001). Die Anwendung von Melatonin *per os* zeigt beim Versuchstier eine Insulin-suppressive Wirkung (Nishida, 2005). Neben Melatonin, das als exogener Zeitgeber den circadianen Rhythmus peripherer Oscillatoren *in vivo* zu synchronisieren vermag (Rajaratnam und Redman, 1997; Li et al., 2004; Emens et al., 2005; Paulose et al., 2009), wurden direkte Effekte von Melatonin auf die  $\beta$ -Zelle *in vitro* mehrfach beschrieben (Peschke, 2008). Ferner existieren Berichte über die Wirkung von Melatonin auf den Glukose- und Insulinhaushalt *in vivo*. Nach chronischen Melatoningaben war eine verringerte Insulinkonzentration im Plasma festzustellen (Wolden-Hanson et al. 2000, Rasmussen et al., 2001; Nishida, 2002, 2005; Bojkova et al., 2008). Eine wesentliche Senkung der Blutglukose trat dabei nicht auf. Aber auch eine fehlende Wirkung von Melatonin auf das zirkulierende Insulin, verbunden mit einer Senkung der Glukosekonzentration im Plasma, wurde beschrieben (Prunet-Marcassus et al., 2003). Einigen Berichten zu Folge führten Melatoningaben bei der Wistar-Ratte sogar zu einem Anstieg des Glukosespiegels (Fabis et al., 2002). Bei postmenopausalen Frauen wurde die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität nach Melatoningaben verschlechtert (Cagnacci et al., 2001), während bei pinealektomierten Ratten eine Melatoninapplikation zu einer verstärkten glukosestimulierten Insulinsekretion führte (la Fleur et al., 2001). Die Tatsache, dass Melatonin als Zeitgeber in den Insulinsekretionsrhythmus *in vitro* eingreifen kann, wirft Fragen auf, wie beispielsweise nach der Melatoninfunktion für die periodischen Insulinsekretion *in vivo*. Die bisherigen Ergebnisse implizieren also eine positive Wirkung von Melatonin auf metabolische Entgleisungen des diabetischen Formenkreises. Eine Melatoninapplikation könnte für die  $\beta$ -Zelle von positiver Bedeutung sein und somit der langfristigen Anwendung von Melatonin therapeutische Möglichkeiten eröffnen. Einige Nebeneffekte einer Melatoninapplikation wurden bereits belegt, wie z. B. auf das Körpergewicht. Chronische Melatoningaben (4  $\mu$ g/ml) senken das Körpergewicht von männlichen und weiblichen Ratten (Bojkova et al., 2008). Andererseits senkte

Melatonin bei einer Trinkwasserkonzentration von 0,1 µg/ml das Körpergewicht drei Monate alter metabolisch unauffälliger Ratten nicht. Erst bei 10 Monate alten männlichen Ratten, die bereits ein erhöhtes Körpergewicht hatten, etablierte sich nach chronischer enteraler Melatoninapplikation von 0,2 - 0,4 µg/ml im Trinkwasser eine dosisabhängige Gewichtsreduktion. Melatonin in einer Dosis von 0,2 µg/ml verabreicht hielt eine Gewichtszunahme der lipidreich gefütterten aber sonst metabolisch unauffälligen Ratten auf (Prunet-Marcassus et al., 2003; Puchalski et al., 2003). Bei älteren Ratten war die altersassoziierte Fetteinlagerung des visceralen Bauchfettes sogar unter Melatoninbehandlung rückläufig (Wolden-Hanson et al., 2000; Rasmussen et al., 2001; Prunet-Marcassus et al., 2003).

### **1.5.2 Pharmakokinetik von Melatonin**

Die Resorptionszeit von Melatonin *per os* bis zur maximalen Plasmakonzentration liegt zwischen 30 s und 6 min. Die biologische Halbwertszeit von Melatonin beträgt 30 bis 60 min. Das Melatonin wird beim Menschen mit ca. 15% Bioverfügbarkeit nach einer Gabe *per os* rasch resorbiert (DeMuro et al., 2000). Andere Autoren zeigten, dass der enterale Bioverfügbarkeit bei Ratten ca. 53,5% und bei Hunden erstaunlicherweise nahezu 100% betrug (Yeleswaram et al., 1997). Die mittlere Bioverfügbarkeit ist bei Frauen nach einer oralen Melatoninaufnahme höher (17%) als bei männlichen Probanden (9%) (Fourtillan et al., 2000). Die höchste Melatoninplasmakonzentration wird beim Menschen 2 h nach Applikation erreicht (Anderson et al., 1993). Im Allgemeinen scheiden Kinder Melatonin nach parenteraler Gabe schneller aus als junge Erwachsene (Cavallo und Ritschel, 1996). Die hepatische Metabolisierung von Melatonin scheint bei der Ratte schneller zu verlaufen als beim Menschen (Yeleswaram et al., 1997). Circa 50-75% der Melatoninmenge im Plasma ist reversibel an Proteine gebunden, wie z. B. an das  $\alpha_1$ -saure Glykoprotein und an Albumin (Morin et al., 1997). Bei der Ratte liegt die relative Plasmaproteinbindung, unabhängig von der Tageszeit, bei 33% (Depres-Brummer et al., 1996). Beim Menschen sind die meisten individuell variablen Amplituden der Plasmaspiegel und Anflutungszeiten wahrscheinlich durch multifaktorielle Umwelteinflüsse sowie Verhaltensweisen bedingt (Burgess und Fogg, 2008). Die nächtliche endogene Melatoninproduktion des Menschen erreicht ihren Gipfel zwischen dem 6. und 20. Lebensjahr, um nach dem 25. Lebensjahr rapide abzufallen. Danach folgt eine altersbedingte schleichende Abnahme des Melatoninspiegels im Blut. Bei der Ratte und beim Rhesusaffen steigt die Melatoninkonzentration z. B. durch einen Nahrungsentzug an. Ein Anstieg der Melatoninkonzentration ist auch nach Behandlung mit Pharmaka wie Fluvoxamin (Hartter et al., 2000), Desipramin (Palazidou et al., 1992), Doxepin (Hajak et al., 1996)

oder auch nach Kälteexposition beobachtet worden (Tannenbaum et al., 1988). Beim Menschen geht Schmerz, Übergewicht, intermittierendes oder kurzzeitiges Fasten (Berga et al., 2001; Bogdan et al., 2001; Roky et al., 2004), chronische Schlaflosigkeit und die Einnahme von Medikamenten mit erniedrigten Melatoninspiegeln einher. Insbesondere Beta-Blocker (Cowen et al., 1985), Diazepam (Wakabayashi et al., 1991) und Clonidin (Munoz-Hoyos et al., 2000) senken die Plasmakonzentration von Melatonin. Während die Melatoninplasmakonzentrationen beim erwachsenen Menschen während der Hellperiode zwischen 10-40 pg/ml (Tutuncu et al., 2005; Peschke et al., 2006b; Robeva et al., 2008) und bei der Ratte zwischen 80 und 130 pg/ml (Tutuncu et al., 2005; Danel und Touitou, 2006; Peschke et al., 2006b; Robeva et al., 2008) liegen, können die intracellulären und intranucleären Konzentrationen aufgrund der Lipophilie von Melatonin den Plasmaspiegel um ein Vielfaches überschreiten. Manche Zellen akkumulieren das Melatonin im Zellkern (Menendez-Pelaez et al., 1993). Dadurch kann es zu unvorhersagbaren Gewebekonzentrationsabweichungen kommen (Guardiola-Lemaitre, 1997; Bubenik, 2008). Eine Einmaldosis von 5 mg Melatonin *per os* erzeugt im Vergleich zu den Basalwerten eine 25-mal höhere Melatoninkonzentration im Blut, beeinflusst dabei aber nicht die endogene Melatoninsynthese (Brown et al., 1985, 1997). Es existieren Berichte über einen variablen Melatoninplasmaspiegel nach unterschiedlich langen Applikationszeiten sowie der Verabreichung unterschiedlich hoher Melatondosen (Rasmussen et al., 1999, 2001; Fournillan et al., 2000; Wolden-Hanson et al., 2000; Prunet-Marcassus et al., 2003; Castillo et al., 2005; Kireev et al., 2008). Ferner ist eine individuelle Variabilität der Melatoninplasmaspiegel nach Melatoningaben relativ ausgeprägt (Di et al., 1997). Während der kurzfristige Gebrauch nahezu ohne Folgen zu sein scheint, wurde ein chronischer Konsum bislang noch nicht systematisch untersucht. Das Melatonin kann nichtenzymatisch intra- und extracellulär durch Oxidantien degradiert werden. Der hepatische Melatoninabbau geschieht in den Lebermikrosomen durch die Metabolisierung zu 6-Hydroxy-Melatonin (P450-Monooxygenasen, CYP1A2, CYP1A1 und CYP1B1), vorwiegend mit Sulfat konjugiert, bevor die Metabolite renal ausgeschieden werden. Gewebe neuralen Ursprungs wie Retina und Epiphyse sind mit Melatonin-spezifischen Diacetylasen ausgestattet. Melatoninabbau kann auch über den Kynurenamin-Pathway (Mayo et al., 2005) oder *via* Myeloperoxidaseaktivität erfolgen (Hardeland et al., 2006).

## 2 Ziele der Arbeit:

Die bisherigen *in vitro* erfassten Melatoninrezeptor-vermittelten Effekte auf die pankreatische  $\beta$ -Zelle sollen unter diabetischer sowie nichtdiabetischer Stoffwechsellage im Tierversuch untersucht werden. Besonders bei einer Melatoninapplikation *in vivo* könnte es zu Änderungen der Rhythmik des peripheren circadianen Oscillators in der  $\beta$ -Zelle kommen und somit die hormonelle Homöostase, die typisch für den jeweiligen Versuchstierstamm ist, betreffen. Vermutete Melatoninbedingte Veränderungen des Verhaltens, des Wachstums, des  $MT_1$ -/ $MT_2$ -Rezeptor-, Insulin- und Insulinrezeptor-Status sollten untersucht werden, um die möglichen Wirkungen und Nebenwirkungen einer chronischen Applikation von Melatonin im natürlich komplexen Organismus zu erfassen. Im Einzelnen werden folgende Ziele verfolgt:

- Ermittlung der Langzeit-Melatonineinwirkung *in vivo* auf die diabetesassoziierte Hyperinsulinämie der GK-Ratte sowie auf die normale Insulinplasmakonzentration der nichtdiabetischen Wistar-Ratte.
- Untersuchungen der Insulinrezeptortranskripte in Pinealorganen von Wistar- und GK-Ratten nach chronischer Melatoninapplikation.
- Molekularbiologische Untersuchung der chronischen Melatonineffekte auf die Expression von Inselhormon- und Melatoninrezeptor-Transkripten sowie auf die mRNA-Expression von Parametern des Glukosesensorkomplexes im Pankreas von diabetischen sowie metabolisch gesunden Wistar-Ratten.
- Anwendung einer effizienten Technik zur minimalinvasiven Melatoninapplikation (*via* Trinkwasser).
- Auswirkungen der Melatoninlangzeitapplikation *in vivo* auf die Blutglukose in der Mitte der Dunkelperiode bei Wistar- und GK-Ratten.
- Erfassung von Veränderungen im Trinkverhalten, Futterkonsum und Körpergewicht nach chronischen Melatoningaben unter Berücksichtigung einer möglichen Aversion oder Vorliebe gegenüber Melatonin im Trinkwasser bei Wistar- und GK-Ratten.

- Charakterisierung der GK-Ratte der Halleschen Kolonie in der jungen Adoleszenz. Es soll untersucht werden, wie fortgeschritten die biologischen Veränderungen der Inselstruktur und Expressionsveränderungen pankreatischer und pinealer Transkripte bei der GK-Ratte im Alter von vier Monaten sind.
- Gibt es Hinweise auf morphologische Alterationen in der pankreatischen Insel nach chronischer Melatoninanwendung? Zu untersuchen ist, wie die einzelnen hormonproduzierenden Zellen der Insel bei einer vier Monate alten GK-Ratte im Vergleich zu einer gleichaltrigen Wistar-Ratte verteilt sind. Hat der chronische Melatoninkonsum gegebenenfalls Auswirkungen auf die Morphologie der pankreatischen Insel?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchsbegleitende Untersuchungen**

##### **3.1.1 Experimentelles Design**

Das Experiment wurde mit insgesamt 64 männlichen Ratten durchgeführt. Von 32 Wistar-Ratten (2. Auszuchtgeneration aus dem eigenem Hause, ursprünglich von der Firma Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland, erworben) im Alter von 55 Tagen mit einem mittleren Gewicht von  $241,3 \pm 2,26$  g wurden 16 Versuchstiere mit Melatonin behandelt und 16 bildeten die Kontrollgruppe. Von 32 GK-Ratten (GK/Hal, 3. Inzuchtgeneration aus dem ZMG der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, ursprünglich von Europe, Lille Skensved, Dänemark bezogen), welche zum Versuchsbeginn 54 bis 55 Tage alt waren und ein mittleres Gewicht von  $233,6 \pm 2,22$  g aufwiesen, wurden ebenfalls 16 Tiere mit Melatonin behandelt und 16 Tiere bildeten die Kontrollgruppe. Die Versuchstiere wurden paarweise in Käfigen untergebracht. Die Wistar- und die GOTO-KAKIZAKI-Ratten hatten während des Versuches untereinander keinen Kontakt, die jeweiligen Tierboxen waren getrennt und alle benutzten Gegenstände verblieben in den jeweiligen Räumen und wurden dort auch gereinigt. Die Lufttemperatur betrug  $22,5 \pm 1,5$  °C und die relative Luftfeuchtigkeit 62-73%. Das Licht-/Dunkelverhältnis folgte einem starren Schema von L:D=12:12 h, Licht an: 5:30 MEZ. Ein Standardfutter (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) sowie Trinkwasser waren für die Tiere *ad libitum* verfügbar. Während der 12-stündigen Lichtzeit erhielten die Tiere Leitungswasser ohne Zusätze und innerhalb der 12-stündigen Dunkelzeit wurde das Trinkwasser mit Melatonin versetzt. Dies geschah in

einer Menge, dass die Aufnahme der Tiere pro Kilogramm Körpergewicht 2,5 mg je Nacht betrug. Um die Lösungen korrekt einzustellen, wurden versuchsbegleitende Tests durchgeführt. In diesen galt es festzustellen, wie hoch die Trinkmenge war, um gewichts- sowie trinkmengenadaptiert Melatonin im Trinkwasser lösen zu können. Bevor Melatonin in das Trinkwasser gegeben wurde, wurde dies in einer minimalen Menge Ethanol gelöst (100 µl Ethanol für die Anlösung von 2,5 mg 100% Melatonin-Trockenpulver) und anschließend in das Trinkwasser gegeben. Sowohl die Melatonin-behandelten Versuchstiere als auch die Kontrolltiere wurden nach 64-66 Tagen chronischer Melatoninapplikation in der Mitte der Dunkelperiode durch Herzventrikelpunktion unter tiefer Narkose (Isofluran, Baxter Deutschland GmbH, DEUTSCHLAND) getötet. Die Glukosekonzentration wurde aus dem Blut der Schwanzspitzenvene bestimmt, wobei der erste Tropfen verworfen wurde. Simultan zur Blutentnahme aus dem rechten Herzventrikel mittels einer heparinisierten Spritze (Liquemin®N, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) wurden die Epiphysen nach der Öffnung der Schädelkalotte präpariert. Die gewonnenen Epiphysen wurden in 2 ml-Eppendorfgefäße gegeben, mit EDTA-versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um danach bei - 80°C gelagert zu werden. Die mittlere Menge von 6 ml zentralem Vollblut wurde in heparinisierte Reagenzgläser umgefüllt und zehn min bei 700 × g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (Plasma) in 2 ml-Eppendorfgefäße aliquotiert und bei - 80°C gelagert. Die Bauchspeicheldrüsen wurden sorgfältig stumpf präpariert und im Konservierungsreagenz *RNA-later* (Ambion Inc., Austin, TX, USA) bis zur RNA-Extraktion bei - 20°C aufbewahrt.

### **3.1.2 Trinkmenge**

Die Trinkvolumina beider Versuchstiere eines Käfigs während der Dunkelperiode wurden durch Subtraktion der zur Nacht bereitgestellten Trinkmenge von den morgendlich ermittelten Restvolumina gewonnen. Das Trinkvolumen pro Tier wurde näherungsweise durch Division des Gesamttrinkvolumens mit dem Faktor 2 ermittelt. Auf diese Weise wurde das Trinkvolumen während der Dunkelperiode von der ersten bis zehnten Woche bestimmt. Zusätzlich wurde von der sechsten bis zehnten Woche analog das Trinkvolumen während der Hellperiode gemessen. Die kumulative Trinklösungsaufnahme über den Versuchszeitraum ergab sich als Mittelwert der mittleren wöchentlichen Trinklösungsaufnahmen von der ersten bis einschließlich neunten Melatoninapplikationswoche.

### **3.1.3 Futtermenge**

Der Futterkonsum beider Versuchstiere in einem Käfig während der Dunkelperiode ergab sich mittels Subtraktion der morgendlichen Mengen von der zur Nacht bereitgestellten Futtermenge. Analog ergab sich der Konsum während der Lichtphase. Die Futtermengen wurden drei- bis siebenmal pro Woche im Zeitraum von Anfang der vierten bis Ende der neunten Substitutionswoche bestimmt. Die kumulative Futteraufnahme der jeweiligen Tiergruppe besteht aus dem Mittelwert der täglichen Futteraufnahme für den Zeitraum der vierten bis zum Ende der neunten Melatoninapplikationswoche (Versuchsterminierung). Die Tiertötung nach der neunwöchigen Substitution wurde unter postprandialen Bedingungen ausgeführt, da eine Futterrestriktion zu kurzfristigen Veränderungen des Verhaltens und der daran geknüpften metabolischen Parametern führen kann. Die täglichen Futtermengen wurden durch Rückwiegen über den gesamten Versuchszeitraum bestimmt.

### **3.1.4 Gewicht**

Das Körpergewicht der einzelnen Ratten wurde wöchentlich über den gesamten Versuchszeitraum bestimmt und dokumentiert.

### **3.1.5 Melatoninapplikation *per os***

Das Melatonin wurde in 99,8%-igen unvergälltem Ethanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEUTSCHLAND) angelöst (25 mg Melatonin in 1 ml Ethanol) und dann ins Trinkwasser gegeben (Lee et al., 2003; Poeggeler et al., 2002). Bei der Herstellung einer Melatoninlösung wurde die spätere Endkonzentration von Ethanol nach dem Prinzip des minimalen Einsatzes von Ethanol kalkuliert (endgültige Trinklösungsalkoholkonzentration 0,1 Vol % bis zur vierten, bzw. 0,2 Vol % ab der fünften Applikationswoche). Das oberste Ziel war dabei, eine möglichst genaue Applikationsmenge von Melatonin zu gewährleisten. Anhand von mittleren Körpergewichten und Trinkmengen wurde die Melatoninindosis wöchentlich für die jeweils kommende Woche gewichts- und trinkmengenadaptiert neu kalkuliert und frisch zubereitet. Die Stammlösung wurde in gläsernen, luftdichten und lichtundurchlässigen Reagenzgläsern bei 4°C für höchstens sieben Tage aufbewahrt, da Melatonin lichtempfindlich ist und unter besonderen Umständen degradieren kann (Daya et al., 2001; Brömme et al., 2008). Jeweils 100 bzw. 200 µl Stammlösung wurden pro Käfig und Nacht unmittelbar vor Beginn der Dunkelperiode in die Trinkflaschen mit 100 ml Leitungswasser pipettiert und gut vermischt. Das Gewicht der Trinklösung wurde direkt vor bzw. nach dem Wechsel der Flaschen jeweils zu Beginn und Ende der Lichtzeit bestimmt und dokumentiert. Die Trinkflaschen wurden jeden Tag in einer

Spülmaschine ausgekocht. Um mögliche Kontaminationen auszuschließen, wurden die eingesetzten Trinkflaschen während des ganzen Experiments, bezüglich der Versuchsgruppenzugehörigkeit, streng separat behandelt. Die mittlere Melatoninkonzentration im Trinkwasser wurde retrospektiv für die abgelaufene Wochen mithilfe der Software Microsoft Excel berechnet (Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Unterschleißheim, Deutschland). Für die Melatoninapplikation wurde die minimalinvasive Melatoningabe *per os* und eine pharmakologische Melatoninindosis von 2,5 mg/kg KG gewählt. Die Dosisfindung orientierte sich an bereits publizierten Daten zu enteral verabreichten Dosen bzw. den korrespondierenden Melatoninplasmakonzentrationen (Slotten et al., 1999; Rasmussen et al., 2003; Reyes-Toso et al., 2006). Im Rahmen eigener Untersuchungen lag die tatsächlich aufgenommene mittlere Melatoninmenge über den gesamten Substitutionszeitraum bei den Melatonin-behandelten Wistar-Ratten ( $2,44 \pm 0,08$  mg Melatonin/kg KG/Dunkelperiode) sowie bei den Melatonin-behandelten GK-Ratten ( $2,41 \pm 0,1$  mg Melatonin/kg KG/Dunkelperiode) relativ nah an der Zieldosis von 2,5 mg Melatonin/kg KG/Dunkelperiode, was einer Endkonzentration von ca. 30 µg Melatonin/ml Trinkwasser entspricht (siehe auch :Carpentieri et al., 2006).

## **3.2 Blut- und Plasmawerte**

### **3.2.1 Blutglukose**

Vor der Punktion des rechten Herzventrikels zwecks Gewinnung von ca. 6 bis 8 ml zentralvenösen Blutes wurde aus dem peripheren Blut nach Schwanzvenendisektion der Blutzucker bestimmt. Dazu wurden ein für die Humandiagnostik allgemein gebräuchliches Blutzuckermessgerät und –Messstreifen benutzt (MediSense®Precision®Xtra und Medisense®Precision®Plus, Abbott Diagnostika, Wiesbaden, Deutschland).

### **3.2.2 Melatonin-Radioimmunoassay**

Für die direkte quantitative Bestimmung von Melatonin im Rattenplasma wurde ein kommerzieller Melatonin-Radioimmunoassay-Kit (Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Nordhorn, Deutschland) verwendet. Diesen Kit zeichnet eine hohe Sensitivität von minimal 8,9 pg/ml sowie ein relativ geringer inter- sowie intra-Assay-Koeffizient aus. Wichtig war auch die hohe Melatoninnachweisbreite, da mit einem unphysiologisch sehr hohen Anstieg von Melatonin bei den Melatonin-behandelten Tieren zu rechnen war. Der Ablauf richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Als radioaktiver Tracer wurde  $^{125}\text{I}$ -Melatonin verwendet. Für jeden Assay-Ansatz wurden 50 µl

Serumprobe verwendet. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur (nach Zugabe des Präzipitierungsreagenz) wurde das Gemisch bei 3200 Upm und 4°C für 20 min zentrifugiert, danach wurde der Überstand sorgfältig dekantiert. Die von den Proben und Standards stammende Radioaktivität wurde in einem  $\gamma$ -Counter (Multigamma LB2111, Berthold Technologies GMBH & CO KG, Bad Wildbad, Deutschland) bestimmt und einer parallel generierten Standardkurve zugeordnet.

### **3.2.3 Insulin-Radioimmunoassay**

Die Insulinbestimmung aus dem Plasma erfolgte mittels eines kommerziellen Festphasen-Radioimmunoassays nach Angaben des Herstellers (Coat-A-Count®-Kit, TKIN 873; Diagnostic Products Corporation Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland). Die entsprechenden Standards und Kontrollen wurden in demselben Durchgang mitgeführt. Jeweils 200  $\mu$ l der Plasmaproben wurden direkt auf den Boden des Polypropylen-Röhrchens pipettiert. Der Inhalt wurde unverzüglich mit jeweils 1000  $\mu$ l Tracer (<sup>125</sup>iodiniertes Insulin) gut gemischt und 24 h bei 15° C inkubiert. Nach Dekantieren des Röhrchens und Ausklopfen auf Fließpapier erfolgte die Bestimmung der Radioktivität mithilfe eines  $\gamma$ -Counters (DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland). Die Insulinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden dann anhand einer Standardkurve ermittelt. Die gemessenen Konzentrationen lagen im Messbereich dieses Kits.

### **3.3 Molekularbiologische Untersuchungen**

Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der Transkripte folgender Gene: Insulin, Glukagon, Insulinrezeptor, MT<sub>1</sub>-Rezeptor, MT<sub>2</sub>-Rezeptor, GLUT2 sowie der Glucokinase wurden Pankreata von jeweils zwölf Melatonin-behandelten Wistar- bzw. GK-Ratten sowie jeweils zwölf Kontrolltieren genutzt. Die RNA wurde nach der Trizol®-Methode (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) aus Pankreata extrahiert (Mühlbauer et al., 2004). Der Erfolg der RNA-Extraktion wurde quantitativ und qualitativ mittels photometrischer RNA-Konzentrationsbestimmung (SPECORD S100, Analytik Jena AG, Jena, DEUTSCHLAND) geprüft. Dies erfolgte nach dem Prinzip der Absorption von Purin- bzw. Pyrimidin-Nukleotiden bei 260 nm und der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA auf einem 1,3%-igen denaturierenden Formaldehyd-Agarose Gel. Ein Maß für die pankreatische-RNA-Qualität waren zwei charakteristische Banden der ribosomalen 28 S- und 18 S-rRNA, die sich nach Färbung mit Ethidiumbromid im UV-Licht darstellen ließen. Die im Rohextrakt verbliebene DNA wurde durch DNase 1 (DNA-free™-Kit, Ambion Inc., Austin, TX, USA) verdaut. Dem schloss sich die reverse

Transkription, gemäß der Instruktion des Herstellers (Promega Reverse Transkription Kit, Promega Inc., Madison, WI, USA) an.

**Tab. 1:** Zusammenstellung der verwendeten Primer und resultierende Ampliconlängen.

Ziel-mRNA/-Gewebe	Amplicon [bp]	Nukleotidsequenz vorwärts Nukleotidsequenz rückwärts
Insulinrezeptor/Pineal	209	5'-TCAGAACCCGATGACCCTAC-3' 5'-GGGATGCACTTGTTGTTGTTG-3'
AA-NAT/Pineal	143	5'-GAAGGGAGACAGCAGTTC-3' 5'-GTCCTGGTCTTGCCTTTG-3'
MT <sub>1</sub> -Rezeptor/Pankreas	101	5'-CAACCTGCAAACCGGAACTC-3' 5'-GGAAAACCACCAGGGCAAT-3'
MT <sub>2</sub> -Rezeptor/Pankreas	169	5'-CATCCACTTCCTCCTTCCAA-3' 5'-TATGGCGAAAACCACAAACA-3'
Insulin/Pankreas	149	5'-TCTTCTACACACCCATGTCCC-3' 5'-GGTGCAGCACTGATCCAC-3'
Glukagon/Pankreas	245	5'-ACCTAGACTCCCGCCGTG-3' 5'-ATGTCTGCGCCAAGTTC-3'
GLUT2/Pankreas	183	5'-TGGGTTCCCTCCAGTTCG-3' 5'-AGGCGTCTGGTGTCTGATG-3'
Glucokinase/Pankreas	187	5'-AAGCACAAGAACTGCCCTGG-3' 5'-TTGCCACCACATCCATCTCAAAG-3'

Pro Reaktionsansatz wurde 1 µg Gesamt-RNA verwendet. Von der gewonnenen cDNA wurden jeweils 4 µl für einen RT-PCR-Lauf genutzt. In jedem 100 µl-Reaktionsgefäß wurden unmittelbar vor Einsatz in den Rotor-Cycler (Rotor-Gene™ 6000, Corbett Research Inc, Mortlake, Australien) pro 20 µl Ansatz 4 µl cDNA-Probe (entspricht 40 ng), 10 µl Reaktionsgemisch enthaltend die Taq-DNA-Polymerase (Promega Inc., Madison, WI, USA), 0,5 µl eines spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimers (Tab.1),

0,25 µl Eva Green (Biotum, Hayward, Californien, USA) sowie 4,5 µl nukleasefreies Wasser (Promega Inc., Madison, WI, USA), alles jeweils in einem entsprechenden „Master“-Mix, gemischt. Die PCR-Bedingungen folgten einem bereits publizierten Thermoprofil (Peschke et al., 2007). Mithilfe von Corbett Research Software wurden die Fluoreszenz-Intensitäten der einzelnen Proben pro Durchgang bei einem sorgfältig gewählten Schwellenwert verglichen. Es wurde stets ein Ct-Wert aus dem logarithmischen Bereich der Amplifikationskurve gewählt. Zur Normalisierung der Proben wurde die Expression der RNA-Polymerase II (RP11) heran gezogen (Radonic et al., 2004). Die Quantifizierung der Expressionsstärke wurde nach dem Prinzip der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode ermittelt (Mühlbauer et al., 2004). Die Kontrollproben mit nukleasefreiem Wasser anstelle von cDNA („non-template control“) wurden bei jedem PCR-Lauf mitgeführt.

### **3.4 Morphologische Untersuchungen**

#### **3.4.1 Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin**

In Paraffin eingebettete 5 µm dicke Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, zweimal 5 min in Xylol (XYLOL ISOMERE >98%, rein, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe behandelt (Isopropanol [100%], Ethanol [96; 80; 70; 60%]) und mit *Aqua tridestillata* gewaschen, bevor sie in ein Hämalaunbad für 10 min zur Kernfärbung eingestellt wurden. Nach sieben min des sog. „Bläuens“ in *Aqua tridestillata* wurden sie für 5 min im 0,04%-igen Eosinbad mäßig überfärbt. Einem einminütigen Waschschrift in *Aqua tridestillata* folgte eine Differenzierung für jeweils 5 min in einer aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol [80; 96%]). Der Eindeckung mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt) ging eine Behandlung in Isopropanol und Xylol für jeweils 5 min voraus. Durch die Färbung erscheinen die Zellkerne blau, alle anderen Strukturen zeigen sich in verschiedenen Abstufungen rot.

#### **3.4.2 Immunhistochemie**

Die entnommenen Pankreata wurden für ca. 48 h mit 4 %igem Paraformaldehyd in 0,1 M PBS (pH 7,4) bei 4 °C fixiert. Einer Entwässerung über eine aufsteigende alkoholische Reihe sowie Isopropanol, Methylbenzoat und Toluol schloss sich die Einbettung in Paraffin und die Herstellung von 5 µm dicken Paraffinschnitten an. Die Schnitte wurden zuerst durch Einstellen der Objektträger in einem Wärmeschrank (61°C) für etwa 3 h entparaffiniert, gefolgt von einer zweifachen Behandlung in Xylol und einer jeweils einmaligen Spülung in der absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol [100%], Ethanol [96; 80; 70; 60%]). Es folgten zwei 30-minütige Waschschriffe in *Aqua*

*tridestillata* und phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Die unspezifischen Antikörperbindungsstellen wurden in den Schnitten durch eine einstündige Inkubation mit einem mit PBT (0.3% Triton X-100; Calbiochem, San Diego, California, USA; in PBS) versetzten 5%-igen Ziege- bzw. Esel-Normalserum (ZNS bzw. ENS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) blockiert. Die Primärantikörper (Tab. 2) wurden im entsprechenden Normalserum verdünnt, es folgte die Inkubation der Schnitte bei 4°C für ca. 24 h. Der Cyanin-3-konjugierte Sekundärantikörper (Esel-Anti-Ziege bzw. Ziege-Anti-Kaninchen, Dianova, Hamburg, Deutschland) wurde in einer Endkonzentration von 20 µg/ml genutzt. Nach 16 bis 24 h wurden durch wiederholte PBS-Spülungen nichtgebundene Antikörper entfernt. Es folgten eine kurze Spülung in *Aqua tridestillata*, Trocknung und Eindecken in Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Die wiederholten unabhängigen Beurteilungen der immunmarkierten Schnitte wurden im Blindversuch vorgenommen. Zur Beurteilung der Intensität Fluoreszenz-positiver Strukturen wurden analog zur steigenden Intensität Symbole von – bis +++ für die entsprechende Abstufung genutzt.

Die weitere Auswertung und Dokumentation der immunmarkierten Schnitte erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (DMRBE, Leica, Wetzlar, Deutschland), das mit einem Argon-Helium-Neon Laser ausgestattet war. Mit einem Ölimmersionsobjektiv und verschiedenen Zoomfaktoren wurden Bildserien aus 30 bis 35 Einzelbildern (z-Serie) in Scanabständen von jeweils ca. 0,2 µm bei einer jeweiligen Scanschichtdicke von ca. 6,2 µm und einem Scanbereich von 250 x 250 µm aufgenommen. Diese wurden dann zu einem Gesamtbild (512 x 512 Pixel) mit Hilfe der Software Scanware (Leica, Wetzlar, Deutschland) nach dem Prinzip der Maximalprojektion kombiniert. Die Scanware-Einstellungen, wie z. B. Laserspannung, wurden für die jeweilige Immunmarkierung für alle Präparate konstant gehalten, um eine unmittelbare Vergleichbarkeit der Immunreaktion der einzelnen Schnitte zu ermöglichen.

**Tab. 2:** Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper.

<b>Antigen</b>	<b>Wirtsspezies</b>	<b>Antikörpertyp, verwendete Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
MT <sub>1</sub> -Rezeptor, C-Terminus- naher Peptid von der Ratte	Ziege	Polyklonal (MEL-1A-R, R-18), 1:5 oder 1:10	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
MT <sub>2</sub> -Rezeptor, synthetisches Peptid	Kaninchen	Polyklonal (MT2; synthetisch), 1:100	GeneTex, Inc. (bezogen über Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland)
Pankreatisches Insulin vom Schwein	Meerschwein	Polyklonal (Anti-Insulin), 1:100	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Glukagon vom Menschen	Kaninchen	Polyklonal (Anti-Glukagon), 1:100	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Synthetisches zyklisches Somatostatin	Kaninchen	Polyklonal (Anti-human Somatostatin), 1:300	DAKO, Carpinteria, CA, USA
GLUT2, Peptid von der Ratte	Kaninchen	Polyklonal (Glut2, AB1342), 1:100	Chemicon, Hofheim, Deutschland

### **3.5 Statistische Auswertung und grafische Darstellung**

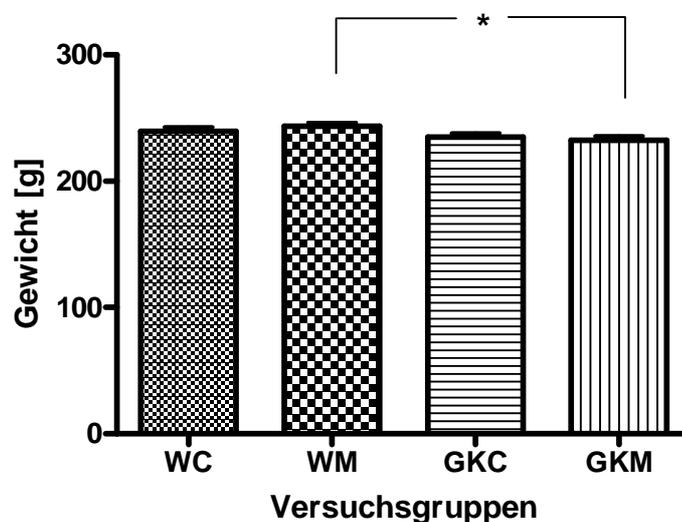
Die aufgeführten Werte der Ergebnisse entsprechen den jeweiligen Mittelwerten und den zugehörigen Standardmessfehlern (*standard error of the mean* [SEM]). Die statistische Auswertung sowie die Arbeit mit den Rohwerten erfolgten mit der Software GraphPadPrism 4.00 (San Diego, CA, USA). Die Signifikanzen wurden mit dem ANOVA- bzw. MANN-WHITNEY-U-Test geprüft. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden die beobachteten Unterschiede als statistisch signifikant bezeichnet und mit \* gekennzeichnet. Signifikanzen mit  $p < 0,01$  sind mit \*\*, diejenigen mit  $p < 0,001$  mit \*\*\* versehen.

## **4 Ergebnisse**

## 4.1 Merkmale der Wistar- und GK-Ratten zu Versuchsbeginn

### 4.1.1 Gewicht zu Versuchsbeginn

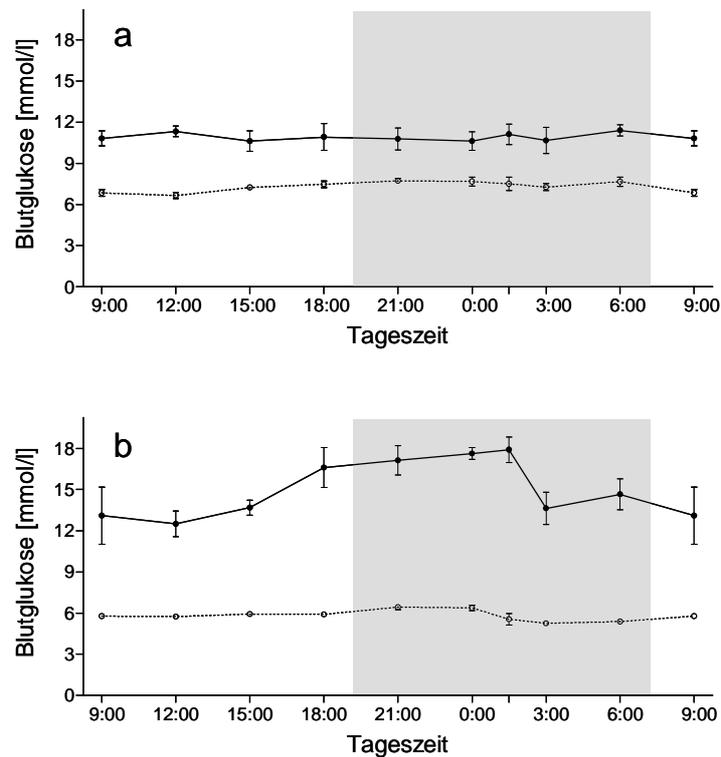
Die mittleren Körpergewichte von Wistar- und GK-Ratten waren zu Versuchsbeginn statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Der Vergleich der mittleren Körpergewichte der ca. acht Wochen alten Versuchstiere ließ ein erniedrigtes Körpergewicht der GK-Ratten (GKM) gegenüber dem Gewicht der Wistar-Ratten (WM) erkennen ( $p < 0,05$ ; Abb. 1). Diese Situation änderte sich in der dritten Behandlungswoche (Abb. 5).



**Abb. 1:** Mittelwerte  $\pm$  SEM des Körpergewichtes von acht Wochen alten unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $239,3 \pm 3,27$  g;  $n = 16$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $243,3 \pm 3,14$  g;  $n = 16$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $234,8 \pm 3,17$  g;  $n = 16$ ) sowie Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $232,4 \pm 3,18$  g;  $n = 16$ ).

### 4.1.2 Blutglukose zu Versuchsbeginn

Die Abb. 2 verdeutlicht eine ausgeprägte Hyperglykämie des GK-Stammes im Vergleich zum metabolisch unauffälligen, normoglykämischen Wistar-Stamm. Im Alter von 6 sowie von 42 Wochen war die Hyperglykämie der diabetischen Versuchstiere statistisch signifikant (im Alter von 6 sowie von 42 Wochen:  $p < 0,001$ ). Weiterhin stellte sich ein fortschreitender Blutzuckeranstieg der 42 Wochen alten GK-Ratten in der ersten Hälfte der Dunkelperiode heraus. Tagsüber war die zusätzliche nächtliche hyperglykämische Blutglukoseentgleisung rückläufig, die Blutglukose blieb dennoch auf einem hyperglykämischen Niveau im Vergleich zu den Glukosekonzentrationen der normoglykämischen Wistar-Versuchsgruppe.



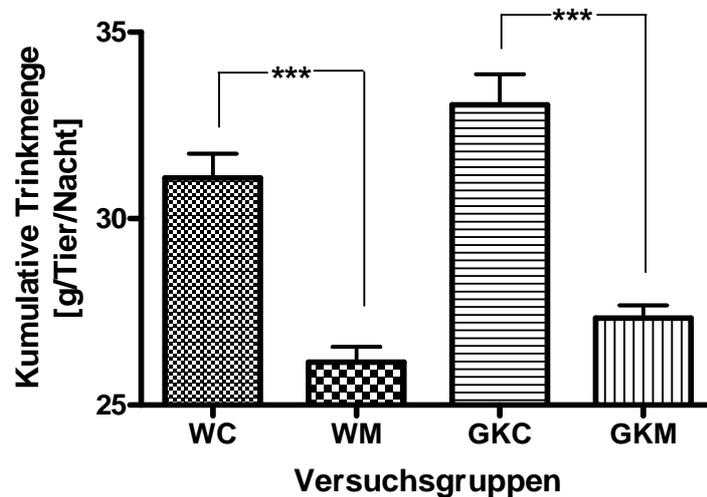
**Abb. 2:** Blutglukose-Tagesprofile von Wistar- (gebrochene Linie) und GK-Ratten (durchgezogene Linie) verschiedenen Alters, (oben, a: 6 Wochen; unten, b: 42 Wochen) jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM,  $4 \leq n \leq 12$  (Grafik übernommen von zurückliegenden Untersuchungen der Halleschen GK- und Wistar-Kolonie [Frese, Thomas, 2009; Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Halle]).

## 4.2 Versuchsbegleitende Befunde

Es wurde beobachtet, dass die lokomotorische Aktivität der GK-Ratten im Vergleich zu den Wistar-Ratten verringert war. Bei den Versuchstieren, denen jede Nacht Melatonin im Trinkwasser verabreicht wurde, manifestierten sich keinerlei akut auftretende oder chronisch einschleichende Verhaltensunterschiede (kein aggressives Verhalten, keine Apathie) oder Veränderungen im äußerlichen Aussehen (Fellfarbe, Fellqualität, kein übermäßiges Nasenlaufen, keine Augensekretion) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen.

### 4.2.1 Wasseraufnahme

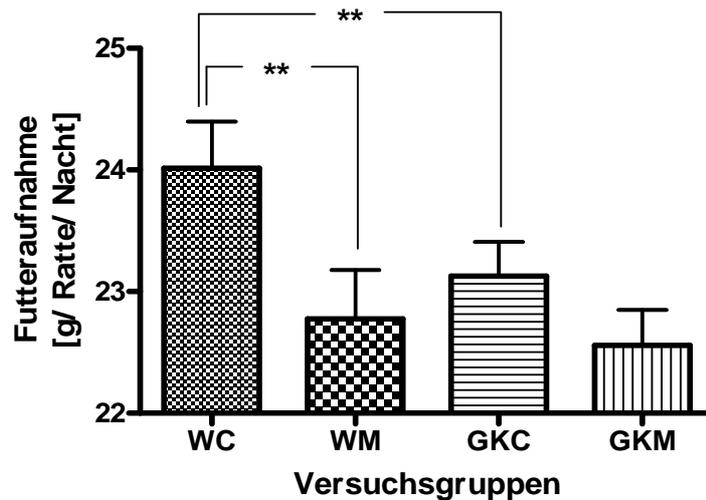
Die Aufnahme der Flüssigkeitsmenge der Melatonin-behandelten Versuchstiere war bei den Wistar- sowie GK-Ratten im Vergleich zu den Kontrollen statistisch signifikant erniedrigt ( $p < 0,001$ ). Die Trinkmengen der diabetischen Tiere der Behandlungs- bzw. der Kontrollgruppe waren gegenüber den jeweiligen Wistar-Versuchsgruppen leicht erhöht (Abb. 3).



**Abb. 3:** Mittelwerte  $\pm$  SEM der wöchentlichen Trinkmengen [Gramm pro Tier und Nacht] von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $31,09 \pm 0,65$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $26,15 \pm 0,41$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $33,05 \pm 0,82$ ) sowie Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $27,33 \pm 0,34$ ) über den gesamten Applikationszeitraum von neun Wochen ( $n = 9$ ).

#### 4.2.2 Futteraufnahme

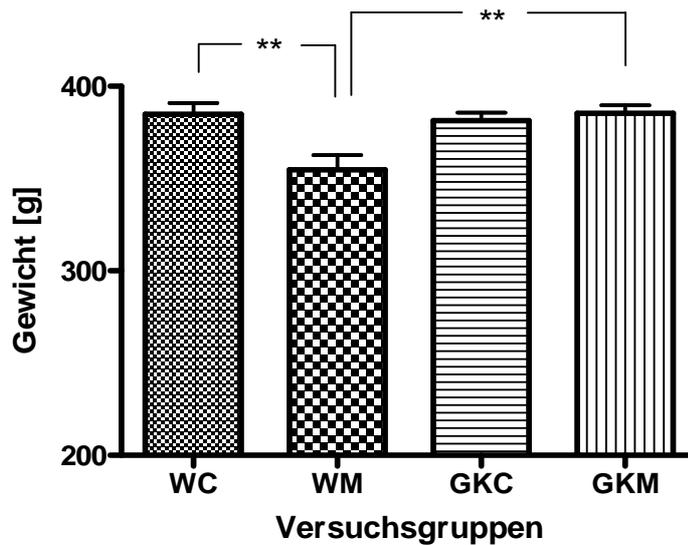
Nach regelmäßiger neunwöchiger Melatoninapplikation während der Nachtperiode (12 h) zeichnete sich eine geringere nächtliche Futteraufnahme der Wistar- sowie GK-Versuchstiere ab. Der Unterschied bei den metabolisch unauffälligen Melatonin-behandelten Wistar-Ratten erwies sich im Vergleich zu den unbehandelten Wistar-Ratten als statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ). Weiterhin konnte eine markante Absenkung der nächtlichen Futteraufnahme der unbehandelten GK-Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Wistar-Ratten festgestellt werden ( $p < 0,01$ ; Abb. 4).



**Abb. 4:** Mittelwerte  $\pm$  SEM der Futtermittelaufnahme [Gramm pro Ratte und Nacht über 37 Nachtperioden] von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $24,02 \pm 0,38$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $22,78 \pm 0,40$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $23,09 \pm 0,27$ ) sowie Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $22,54 \pm 0,28$ ). Die Futtermittelaufnahme war bei den GK-Ratten im Vergleich zu den Wistar-Ratten erniedrigt ( $p < 0,01$ ), ebenso bewirkte die Melatoninapplikation bei den Wistar-Ratten eine Reduktion der Futtermittelaufnahme ( $p < 0,01$ ).

#### 4.2.3 Gewichtsentwicklung

Die mittleren Gewichte der unbehandelten GK-Ratten zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Wistar-Ratten im Alter von vier Monaten keinen statistisch signifikanten Unterschied. Bei beiden Gruppen wurde eine kontinuierliche Gewichtszunahme während der frühen Adoleszenz bis zum vierten Monat beobachtet. Die Melatoninapplikation verursachte jedoch eine statistisch signifikante Reduktion des Körpergewichts der Wistar-Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Wistar-Ratten im Alter von vier Monaten ( $p < 0,01$ ). Das mittlere, wöchentlich erfasste Körpergewicht der Melatonin-behandelten Wistar-Ratten lag von der dritten bis zur zehnten Melatoninapplikationswoche signifikant unter dem mittleren Gewicht der Wistar-Kontrollen ( $p < 0,01$ ; Abb.5). Ab der siebten Behandlungswoche manifestierte sich ein reduziertes Körpergewicht der Melatonin-behandelten Wistar-Ratten sogar gegenüber den Melatonin-behandelten GK-Ratten ( $p < 0,01$ ). Unter laufender Melatoninbehandlung setzte eine signifikante Körpergewichtsabnahme bei Melatonin-behandelten Wistar-Jungtieren im Alter von 69 Tagen nach der ersten Applikationswoche ein ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 5:** Die mittleren Tiergewichte  $\pm$  SEM von Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $354,8 \pm 7,95$  g;  $n = 16$ ) waren im Vergleich zu den von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $384,8 \pm 6,14$  g;  $n = 16$ ) sowie Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $385,3 \pm 4,37$  g) statistisch signifikant verringert ( $p < 0,01$ ). Der Mittelwert der Körpergewichte  $\pm$  SEM von unbehandelten GK-Ratten (GKC) betrug  $381,4 \pm 4,34$  g.

### 4.3 Untersuchungen nach Abschluss der Melatoninapplikation

#### 4.3.1 Melatoninplasmakonzentration und Epiphysen-AA-NAT-mRNA

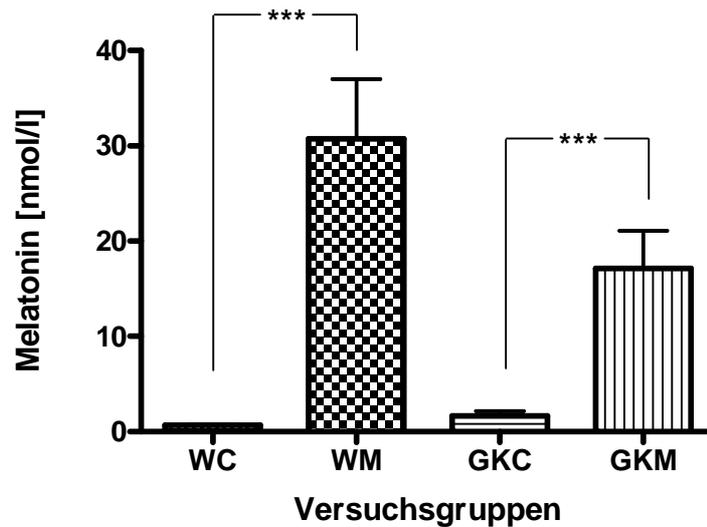
Nach Ablauf der neunwöchigen Melatoninapplikation *per os* (tägliche Dosis: 2,5 mg/kg KG), stellte sich im Plasma der Melatonin-behandelten Versuchstiere beider Gruppen (Wistar + GK) eine extrem hohe Melatoninkonzentration ein. Die mit Melatonin behandelten Wistar- bzw. GK-Ratten verfügten erwartungsgemäß über eine höhere Melatoninplasmakonzentration als die Wistar- und GK-Kontrollen ( $p < 0,001$ ). Durch chronische Melatoningaben während der Nacht (jeweils 12 h) baute sich bei den Wistar- bzw. GK-Ratten eine ca. 370-fach bzw. 11-fach erhöhte Melatoninplasmakonzentration im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen auf (Abb. 6). Im Einzelnen wurde eine hohe Variabilität der Melatoninplasmakonzentrationen der einzelnen Tiere der Melatonin-behandelten Versuchsgruppen registriert (Tab. 3).

Alle Pinealorgane wurden im Zeitraum zwischen 23:00 und 01:00 Uhr asserviert. Im AA-NAT-mRNA-Expressionsniveau der Pinealorgane war zwischen der pinealen AA-NAT-mRNA-Expression der unbehandelten Wistar-Ratten und der der unbehandelten GK-Ratten kein statistisch signifikanter Unterschied zu verzeichnen (Abb. 7). Die

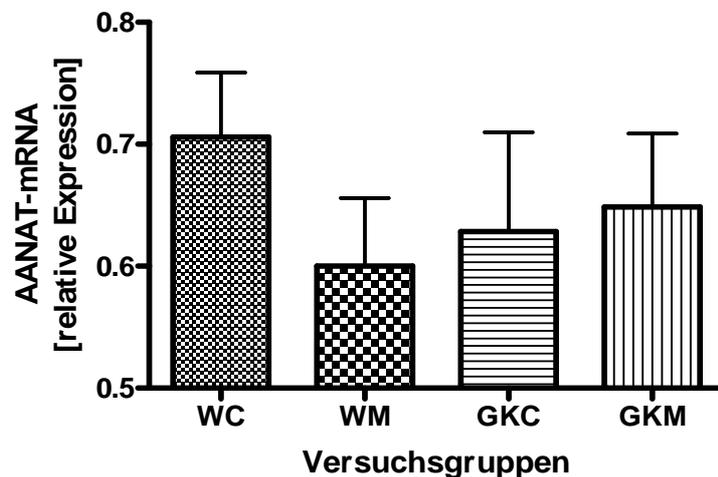
pineale AA-NAT-mRNA der jeweiligen behandelten Versuchstiergruppen (WM und GKM) war im Vergleich zu den Kontrollen (WC und GKC) ebenfalls nicht unterschiedlich stark exprimiert (Abb. 7).

**Tab. 3:** Mittelwerte der Absolutwerte aus Doppelbestimmungen der Melatoninplasmakonzentrationen von Wistar- und GK-Ratten in der Mitte der Dunkelperiode nach neunwöchiger Melatoninapplikation. Die Pfeile deuten jeweils die Höhe der Melatoninkonzentration über (↑) und unter (↓) dem Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe an.

Melatonin im Serum [pmol/l]			
Kontrolle		Melatoninapplikation	
WC	GKC	WM	GKM
1207,7 ↑	317,2 ↓	25264,1 ↓	17518,5
392,2 ↓	766,3 ↓	29265,4	18227,5 ↑
961,6 ↑	864,7 ↓	32215,3 ↑	2364,2 ↓
231,3 ↓	695,9 ↓	14730,4 ↓	2997,89 ↓
1052,0 ↑	333,4 ↓	36339,1 ↑	15952 ↓
335,7 ↓	3708,2 ↑	n.m ↑	25402,8 ↑
738,4 ↑	515,6 ↓	23809,1 ↓	3971,3 ↓
423,4 ↓	379,9 ↓	35784,0 ↑	1518,5 ↓
1868,1 ↑	1122,9 ↓	12999,2	15283,7 ↓
130,3 ↓	8430,1 ↑	3438,0 ↑	12290,7 ↓
961,7 ↑	984,2 ↓	n.m. ↑	6687,62 ↓
207,9 ↓	637,0 ↓	31536,5 ↑	38507,6 ↑
818,0 ↑	730,0 ↓	n.m. ↑	28394,4 ↑
930,8 ↑	1004,6 ↓	n.m. ↑	24675,6 ↑
552,6	1619,0	n.m. ↑	13309,6 ↓
n.m. ↓	3795,0 ↑	2873,3	12252,0 ↓



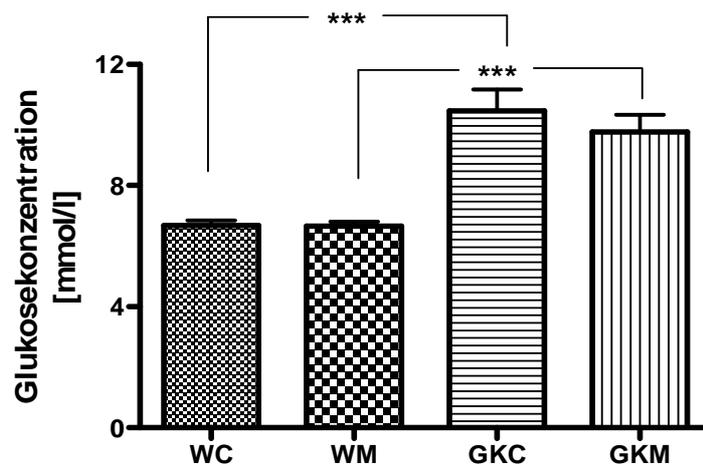
**Abb. 6:** In der Mitte der Dunkelperiode war die mittlere Melatoninplasmakonzentration  $\pm$  SEM von Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $30,74 \pm 6,29$  nmol/l;  $n = 16$ ) bzw. GK-Ratten (GKM;  $17,16 \pm 3,92$  nmol/l;  $n = 16$ ) im Vergleich zu unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $0,68 \pm 0,11$  nmol/l;  $n = 16$ ) bzw. unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $1,65 \pm 0,50$  nmol/l;  $n = 16$ ) nach neunwöchiger nächtlicher enteraler Melatoninapplikation signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 7:** Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen pinealen AA-NAT-mRNA-Expression von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $0,71 \pm 0,05$ ;  $n = 11$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $0,6 \pm 0,06$ ;  $n = 12$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $0,63 \pm 0,08$ ;  $n = 12$ ) sowie Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $0,65 \pm 0,06$ ;  $n = 12$ ).

### 4.3.2 Blutglukose

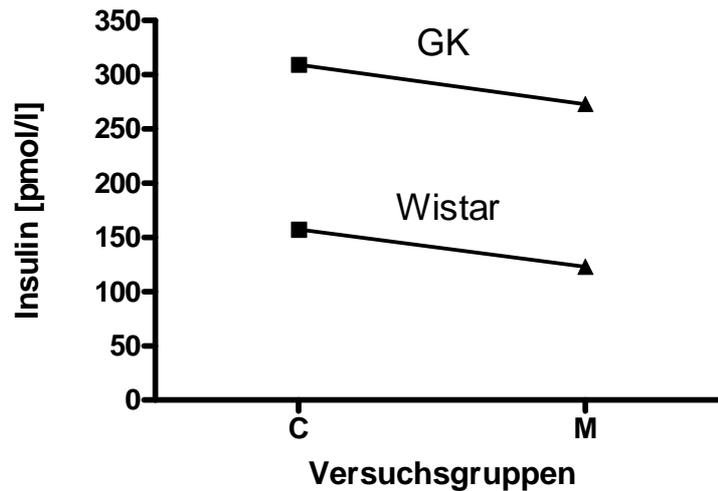
Die Melatoninapplikation hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Höhe der Blutglukosekonzentration. Es wurden keinerlei Unterschiede beim Vergleich der Blutzuckerkonzentration von Melatonin-behandelten Versuchstiergruppen und Kontrollen beobachtet. Bei den GK-Ratten (unbehandelt als auch mit Melatonin behandelt) war jedoch eine erhöhte Blutglukosekonzentration im Vergleich zu den Wistar-Ratten zu beobachten ( $p < 0,001$ ; Abb. 8).



**Abb. 8:** In der Mitte der Dunkelperiode bestimmte Mittelwerte  $\pm$  SEM der Blutglukose  $\pm$  von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $6,68 \pm 0,17$  mmol/l;  $n = 16$ ) bzw. Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $6,65 \pm 0,16$  mmol/l;  $n = 16$ ). Die Glukosekonzentrationen der WC bzw. WM lagen deutlich unter denen von unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $10,47 \pm 0,69$  mmol/l;  $n = 16$ ;  $p < 0,001$ ) bzw. Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $9,76 \pm 0,57$  mmol/l;  $n = 16$ ;  $p < 0,001$ ).

### 4.3.3 Insulin

Die neun Wochen lange Melatoninbehandlung während der Nacht für jeweils 12 h verursachte eine statistisch signifikante Senkung der Insulinkonzentration im Plasma aller Melatonin-behandelten Ratten (WM und GKM) im Vergleich zu allen unbehandelten Versuchstieren (WC und GKC;  $p < 0,05$ ). Die Insulinplasmakonzentration von vier Monate alten Melatonin-behandelten sowie unbehandelten diabetischen GK-Ratten war deutlich höher als die von gleichaltrigen Wistar-Ratten ( $p < 0,001$ ; Abb. 9).

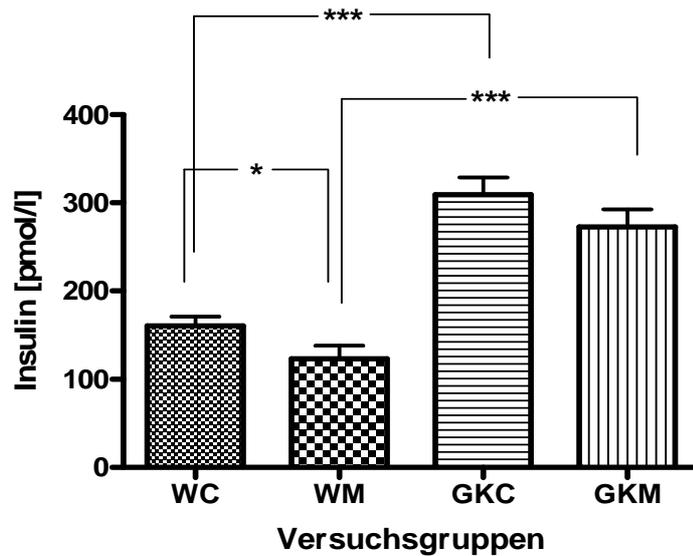


**Abb. 9:** In der Mitte der Dunkelperiode lagen die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Insulinplasmakonzentration von unbehandelten Wistar-Ratten und unbehandelten GK-Ratten (WC + GKC;  $233,4 \pm 75,9$  pmol/l) höher ( $p < 0,05$ ) als die von Melatonin-behandelten Wistar-Ratten sowie von Melatonin-behandelten GK-Ratten (WM + GKM;  $197,9 \pm 75,0$  pmol/l).

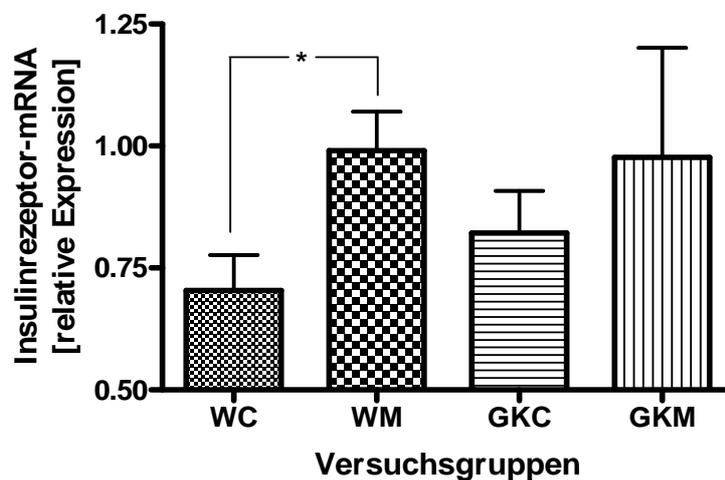
#### 4.3.4 Insulinplasmakonzentration und pineale Insulinrezeptor-mRNA

Die Melatoninapplikation verursachte eine statistisch signifikante Absenkung der Insulinkonzentration im Plasma bei den Melatonin-behandelten Wistar-Ratten ( $p < 0,05$ ). Der Trend zur Reduktion der Insulinplasmakonzentration konnte auch bei den Melatonin-behandelten GK-Ratten beobachtet werden, jedoch war diese tendenzielle Absenkung statistisch nicht signifikant ( $p = 0,23$ ). Die gegenüber den Melatonin-behandelten Wistar-Ratten bzw. Wistar-Kontrollen erhöhte mittlere Insulinplasmakonzentration der Melatonin-behandelten GK-Ratten bzw. GK-Kontrollen war charakteristisch für die Typ2-diabetischen GK-Ratten ( $p < 0,001$ , Abb. 10).

Die chronische Melatoninapplikation führte zur verstärkten Insulinrezeptor-mRNA-Expression in den Epiphysen von Wistar-Ratten im Vergleich zu der pinealen Insulinrezeptor-mRNA-Expression der unbehandelten Wistar-Ratten ( $p < 0,05$ ). Die scheinbare Erhöhung des relativen pinealen Insulinrezeptor-mRNA-Expressionsniveaus nach einer chronischen Melatoninapplikation erreichte bei den GK-Ratten keine statistische Signifikanz. Die statistische Analyse der Expressionsstärke der pinealen Insulinrezeptor-mRNA ergab keine Unterschiede zwischen den unbehandelten Wistar- und GK-Versuchsgruppen (Abb. 11).



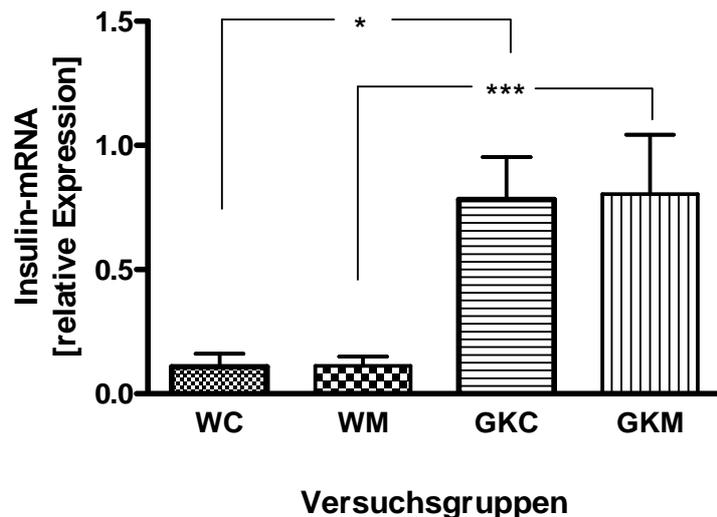
**Abb. 10:** Nach neun Wochen langer Melatoninapplikation in der Mitte der Dunkelperiode erfasste Mittelwerte  $\pm$  SEM der Insulinkonzentration im Plasma von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $160,5 \pm 10,99$  pmol/l,  $n = 16$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $123,30 \pm 10,89$  pmol/l;  $n = 16$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $309,30 \pm 19,55$  pmol/l;  $n = 16$ ) sowie Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $272,90 \pm 19,91$  pmol/l;  $n = 16$ ).



**Abb. 11:** In der Mitte der Dunkelperiode erfasste Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen pinealen Insulinrezeptor-mRNA-Expression von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $0,70 \pm 0,07$ ;  $n = 11$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $0,99 \pm 0,08$ ;  $n = 12$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $0,82 \pm 0,09$ ;  $n = 12$ ) sowie Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $0,98 \pm 0,22$ ;  $n = 12$ ).

#### 4.3.5 Insulin-mRNA im Pankreas

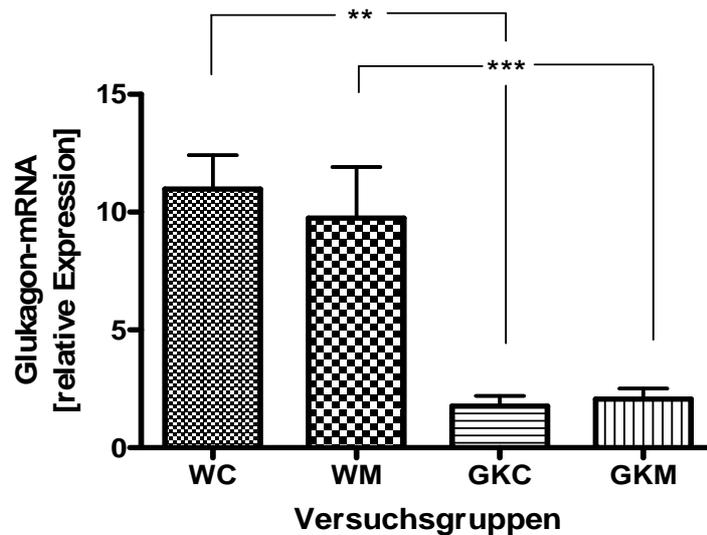
Das Insulin-mRNA-Expressionsniveau war in den Pankreata der vier Monate alten Melatonin-behandelten GK-Ratten bzw. GK-Kontrollen signifikant höher als in den entsprechenden Melatonin-behandelten Wistar-Ratten bzw. Wistar-Kontrollen ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,05$ ). Die chronische Melatoninanwendung hatte im Vergleich zu der Insulin-mRNA-Expression der unbehandelten Wistar- und GK-Ratten keinen erkennbaren auf die pankreatischen Insulintranskripte zu Folge (Abb. 12).



**Abb. 12:** In der Mitte der Dunkelperiode erfasste Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen pankreatischen Insulin-mRNA-Expression von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $0,11 \pm 0,05$ ;  $n = 4$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $0,11 \pm 0,04$ ;  $n = 6$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $0,78 \pm 0,17$ ;  $n = 6$ ) sowie Melatonin-behandelten GK-Ratten (GKM;  $0,80 \pm 0,24$ ;  $n = 9$ ).

#### 4.3.6 Glukagon-mRNA im Pankreas

Bei der pankreatischen Glukagon-mRNA-Expression (Abb. 13) zeigt sich eine umgekehrte Situation der Hormontranskripte im Vergleich zur mRNA-Expression von Insulin (vgl. 12). Die Glukagon-mRNA war in den Pankreata der vier Monate alten GK-Ratten schwächer exprimiert als in denen der Wistar-Ratten ( $p < 0,01$ ). Die erniedrigte Glukagon-mRNA-Expression bestätigte sich auch bei den Melatonin-behandelten GK-Ratten im Gegensatz zu den Melatonin-behandelten Wistar-Ratten ( $p < 0,001$ ). Die Melatoninapplikation führte zu keinerlei statistisch signifikanten Veränderungen der Glukagon-mRNA-Expressionsstärke in den pankreatischen Inseln von GK- und Wistar-Ratten (Abb. 13).



**Abb. 13:** In der Mitte der Dunkelperiode erfasste Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen Glukagon-mRNA von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $10,98 \pm 1,44$ ;  $n = 4$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $9,76 \pm 2,17$ ;  $n = 6$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $1,78 \pm 0,43$ ;  $n = 6$ ) sowie Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $2,07 \pm 0,45$ ;  $n = 10$ ).

#### 4.3.7 Morphologie der pankreatischen Inseln

Die lichtmikroskopische Auswertung der mit Hämalaun-Eosin gefärbten Pankreasschnitte ergab markante Unterschiede zwischen den mittleren und großen pankreatischen Inseln von Wistar- und GK-Ratten. Während die großen pankreatischen Inseln von Wistar-Ratten homogene Verteilung der endokrin aktiven Zellen um die Kapillaren aufwiesen, nahmen die großen pankreatischen Inseln von GK-Ratten bereits eine typische Seesternform an. Bei den kleinen Inseln gab es keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Tierlinien. Bei der immunhistochemischen Auswertung wurden deshalb nur die großen Inseln von GK- sowie Wistar-Ratten berücksichtigt. Die Wistar-typischen Inseln wiesen immer einen glatt ovalen Umriss auf. Zudem erschien die intrainsuläre Architektur der kleinen bis großen Inselpopulationen homogen. Der kompakte Zellverband der endokrin aktiven Zellen wurde regelmäßig von Kapillaren durchzogen. Bei den GK-Ratten zeigten die großen, manchmal auch die mittelgroßen, pankreatischen Inseln eine Auflockerung des Verbandes der sezernierenden Inselzellen. Die Inseln wurden von Bindegewebsstraßen durchzogen. Dabei entstand eine unregelmäßige Inselbegrenzung.

#### **4.3.8 Lokalisation der Inselhormone in den pankreatischen Inseln**

##### **A) Insulin- (Abb. 14 – Aa, Ab, Ac, Ad)**

Alle  $\beta$ -Zellen der pankreatischen Inseln lassen sich bei unbehandelten Wistar-Ratten mit dem Antikörper gleichmäßig markieren (Abb. 14 - Aa), wobei in einzelnen  $\beta$ -Zellen homogen verteilte, feine Granula der Insulinimmunmarkierung bei stärkeren Vergrößerungen sichtbar werden.

Die immunmarkierten  $\beta$ -Zellen der Melatonin-behandelten Wistar-Ratten sind ebenfalls homogen in der gesamten oval erscheinenden pankreatischen Insel verteilt. Die intrazelluläre Insulinimmunmarkierung ist gleichfalls homogen. In der überwiegenden Anzahl der Melatonin-behandelten Wistar-Ratten äußert sich der Melatonineinfluss in Form abgeschwächter Fluoreszenzmarkierung (Abb. 14 - Ab).

Bei den unbehandelten GK-Ratten gibt es in der pankreatischen Insel zusätzlich ausgedehnte fluoreszenzfreie Areale zwischen den markierten Zellen (Abb. 14 - Ac).

Die Melatonin-behandelten GK-Ratten weisen eine stammspezifische  $\beta$ -Zellverteilung mit ausgedehnten fluoreszenzfreien Arealen zwischen den markierten Zellen auf. Außerdem fällt eine Abschwächung der Immunmarkierung im Gegensatz zu den GK-Kontrollen auf, die auf die Melatoninapplikation zurückzuführen sein könnte (Abb. 14 - Ad). Diese Veränderung zeigte sich bei der Mehrzahl der behandelten GK-Ratten, die immunhistochemisch untersucht worden waren.

##### **B) Glukagon (Abb. 14 – Ba, Bb, Bc, Bd)**

Die immunmarkierten  $\alpha$ -Zellen waren regelrecht peripher in den pankreatischen Inseln unbehandelter Wistar-Ratten angeordnet (Abb. 14 - Ba). Es gab keine Melatonineffekte auf die Fluoreszenzintensität und/oder Verteilung der  $\alpha$ -Zellen beim Vergleich von Melatonin-behandelten und unbehandelten Wistar-Ratten (Abb. 14 - Bb, Ba).

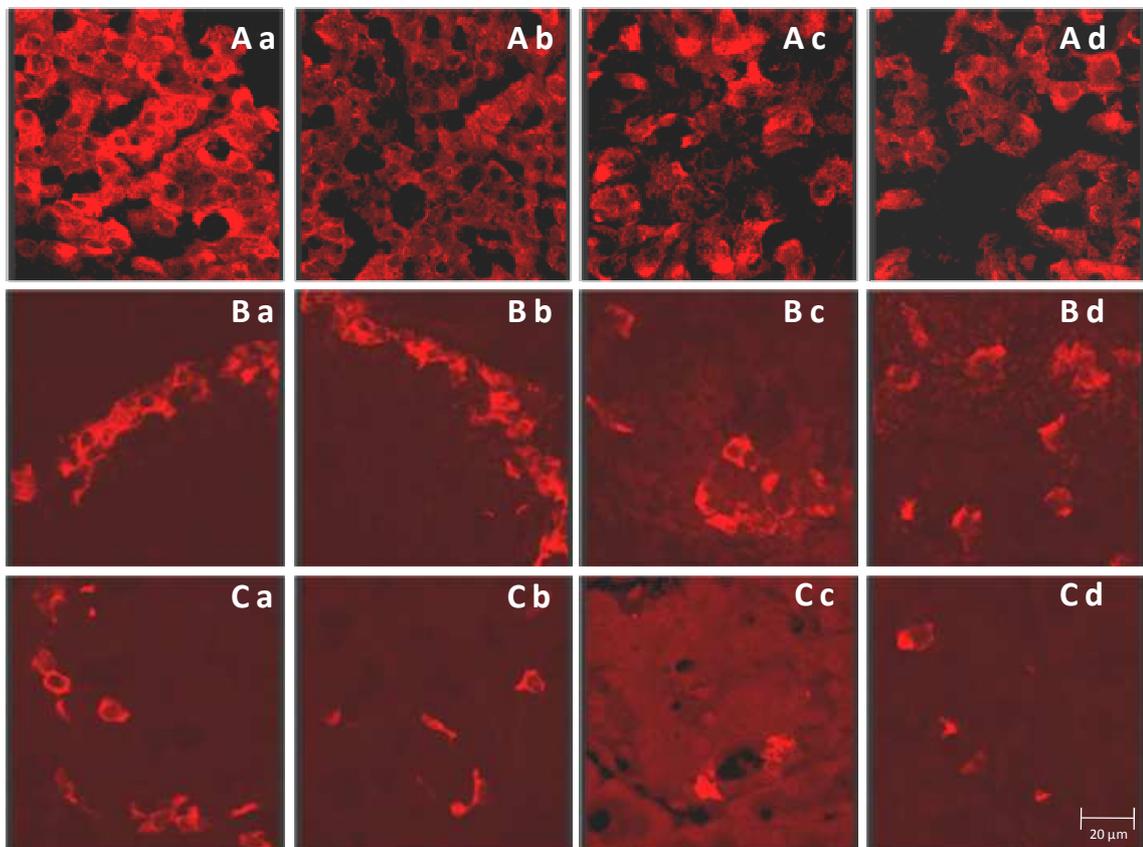
Im Kontrast zum unbehandelten Wistarstamm zeigten die unbehandelten GK-Ratten eine abweichende Anordnung der Glukagon-positiven Zellen (Abb. 14 - Bc). Die  $\alpha$ -Zellen lagen diffus in den pankreatischen Inseln verstreut. Die Glukagon-Immunmarkierung der pankreatischen Inseln Melatonin-behandelter GK-Ratten ergab keine Unterschiede zu den unbehandelten GK-Ratten (Abb. 14 - Bc, Bd).

### C) Somatostatin (Abb. 14 – Ca, Cb, Cc, Cd)

Die fluoreszenzmarkierten  $\delta$ -Zellen waren sowohl bei den unbehandelten als auch bei den Melatonin-behandelten Wistar-Ratten eher am Rande der Inseln lokalisiert (Abb. 14 - Ca, Cb).

Demgegenüber waren die immunmarkierten  $\delta$ -Zellen der unbehandelten sowie der Melatonin-behandelten GK-Ratten diffus in der Insel angeordnet (Abb. 14 - Cc, Cd).

Eine Melatoninauswirkung auf die Verteilung und/oder Fluoreszenzintensität der Somatostatin-positiven Zellen war bei beiden Stämmen nicht zu erkennen.

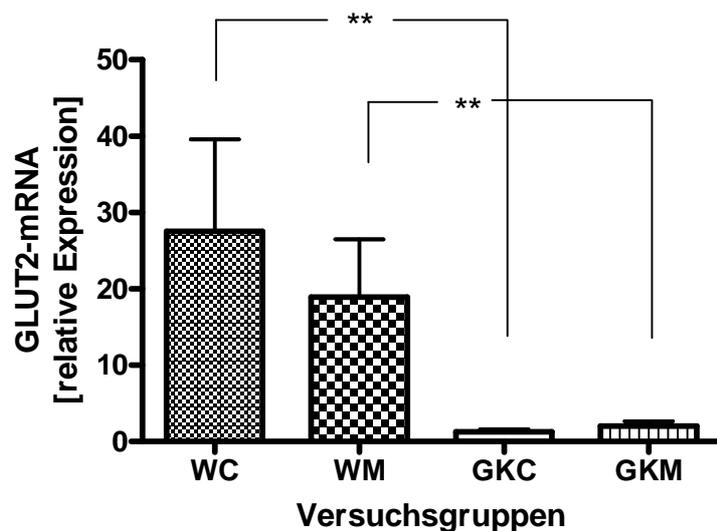


**Abb. 14:** Immunfluoreszenzdarstellung von Insulin (Aa-Ad), Glukagon (Ba-Bd) und Somatostatin (Ca-Cd) in den pankreatischen Inseln von unbehandelten Wistar-Ratten (Aa, Ba, Ca), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (Ab, Bb, Cb), unbehandelten GK-Ratten (Ac, Bc, Cc) und Melatonin-behandelten GK-Ratten (Ad, Bd, Cd) in der Mitte der Dunkelperiode. Die Immunmarkierung war spezifisch und trat nur in den Inseln auf, das exokrine Gewebe blieb unmarkiert.

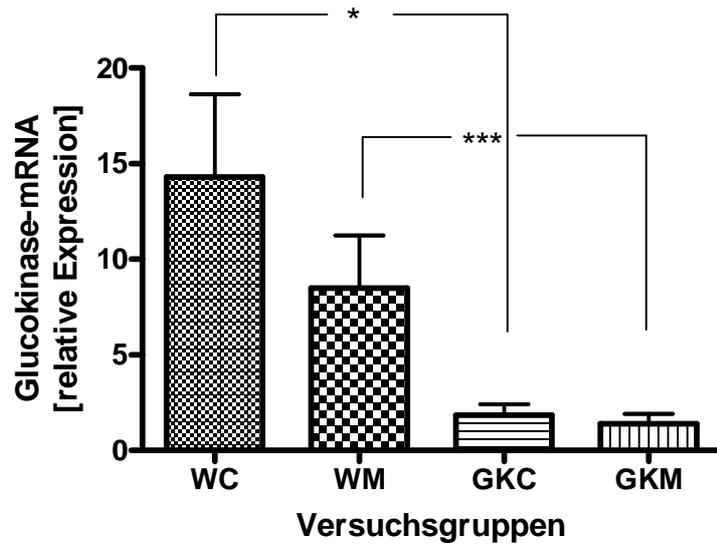
#### 4.3.9 Glukosesensorkomplex im Pankreas

Die mittlere Expression der pankreatischen GLUT2-mRNA der Melatonin-behandelten GK-Ratten und GK-Kontrollen war im Vergleich zu den Melatonin-behandelten Wistar-Ratten bzw. Wistar-Kontrollen schwächer entwickelt ( $p < 0,01$ ). Die Melatoninbehandlung ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der pankreatischen GLUT2-mRNA-Expressionshöhe bei Wistar- und GK-Ratten (Abb. 15).

Die mittlere pankreatische Glucokinase-mRNA-Expression der Melatonin-behandelten GK-Ratten bzw. GK-Kontrollen war im Vergleich zu den Melatonin-behandelten Wistar-Ratten bzw. Wistar-Kontrollen geringer entwickelt ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ). Die Melatoninapplikation führte zu keinerlei statistisch signifikanten Unterschieden bezüglich der pankreatischen Glucokinase-mRNA-Expressionsstärke von Wistar- und GK-Ratten (Abb. 16).



**Abb. 15:** In der Mitte der Dunkelperiode erfasste Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen pankreatischen GLUT2-mRNA-Expression von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $27,53 \pm 12,04$ ;  $n = 7$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $18,9 \pm 7,59$ ;  $n = 6$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC  $1,26 \pm 0,33$ ;  $n = 6$ ) sowie Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $2,03 \pm 0,62$ ;  $n = 8$ ).



**Abb. 16:** In der Mitte der Dunkelperiode erfasste Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen pankreatischen Glucokinase-mRNA-Expression von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $14,32 \pm 4,30$ ;  $n = 9$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $8,49 \pm 2,76$ ;  $n = 6$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC;  $1,84 \pm 0,56$ ;  $n = 5$ ) sowie Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $1,40 \pm 0,51$ ;  $n = 8$ ).

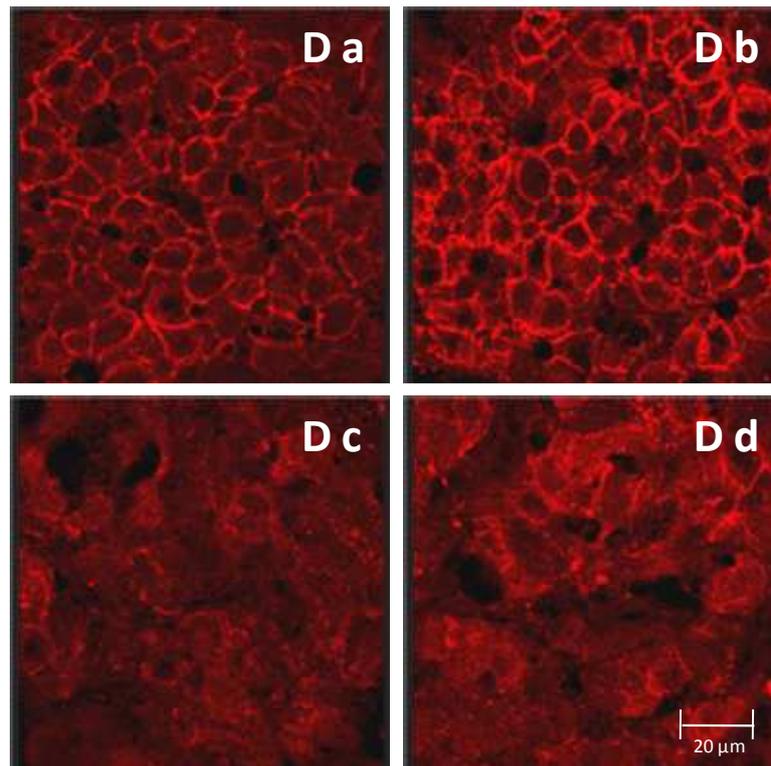
#### 4.3.10 Immunhistochemische Untersuchung des Glucosetransporter 2 (GLUT2) in den pankreatischen Inseln

Die Immunmarkierung war bei allen unbehandelten Wistar-Ratten in der Insel ausgeprägt und erstreckte sich nahezu lückenlos über die gesamte Insel. Es zeichnete sich ein charakteristisches „brillenförmiges“ Muster ab, entsprechend der membranständigen Lokalisation des Transporters (Abb. 17 - Da).

Dieses GLUT2-Immunmarkierungsmuster war in den pankreatischen Inseln der Melatonin-behandelten Wistar-Ratten ebenfalls ausgeprägt. Zudem fiel die Immunmarkierung in den Inseln bei einigen der Melatonin-behandelten Wistar-Ratten kräftiger aus als bei den unbehandelten Wistar-Ratten (Abb. 17 - Db).

Die immunmarkierten Inselzellen unbehandelter GK-Ratten wiesen cytosolische Immunfluoreszenz, entsprechend der fortgeschrittenen Membrandissoziation des Transporters auf (Abb. 17 - Dc).

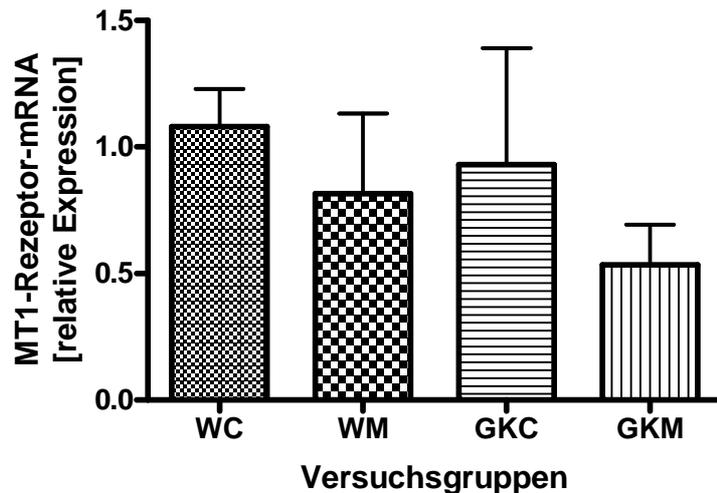
Der Nachweis von GLUT2-Immunmarkierungsverteilung in den pankreatischen Inseln Melatonin-behandelter GK-Ratten fiel ähnlich aus wie bei den unbehandelten GK-Ratten (Abb. 17 – Dd, Dc). Aber auch hier konnte, vergleichbar zu den Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (Abb. 17 - Db), eine verstärkte GLUT2-Immunfluoreszenzintensität in den pankreatischen Inseln Melatonin-behandelter GK-Ratten (Abb. 17 - Dd) im Gegensatz zu den pankreatischen Inseln unbehandelter GK-Ratten (Abb. 17 - Dc) festgestellt werden.



**Abb. 17:** Immunfluoreszenzdarstellung von GLUT2 in den pankreatischen Inseln von unbehandelten Wistar-Ratten (Da), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (Db), unbehandelten GK-Ratten (Dc) sowie Melatonin-behandelten GK-Ratten (Dd) in der Mitte der Dunkelperiode. Die Immunmarkierung trat nur in den Inseln auf, das exokrine Gewebe blieb unmarkiert.

#### 4.3.11 MT<sub>1</sub>-Rezeptor-mRNA im Pankreas

Bei 17 Wochen alten Versuchstieren fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expressionstärke der MT<sub>1</sub>-mRNA in den Pankreata der diabetischen GK-Ratten im Vergleich zu den metabolisch unauffälligen Wistar-Ratten. Keiner der beiden Stämme zeigte eine statistisch signifikante Veränderung der relativen MT<sub>1</sub>-mRNA-Expressionhöhe nach chronischer Melatoninapplikation (Abb. 18).



**Abb. 18:** Mittelwerte  $\pm$  SEM der relativen  $MT_1$ -Rezeptor-mRNA-Expression im Pankreas von unbehandelten Wistar-Ratten (WC;  $1,08 \pm 0,15$ ;  $n = 4$ ), Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (WM;  $0,82 \pm 0,32$ ;  $n = 5$ ), unbehandelten GK-Ratten (GKC);  $0,93 \pm 0,46$ ;  $n = 5$ ) und Melatonin-behandelten Ratten (GKM;  $0,53 \pm 0,16$ ;  $n = 7$ ).

#### 4.3.12 Immunhistochemische Untersuchung des $MT_1$ -Rezeptors in den pankreatischen Inseln

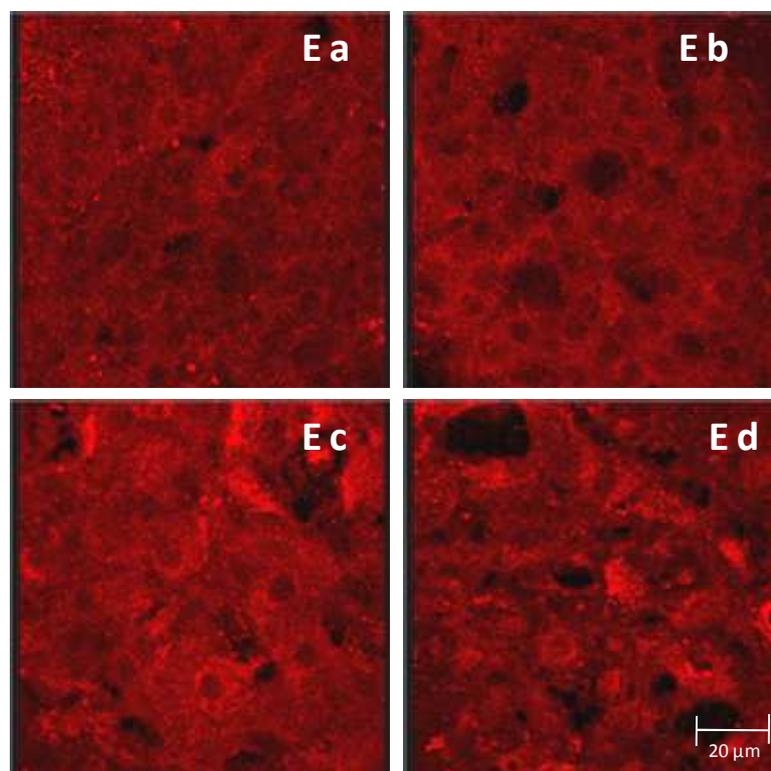
Das exokrine pankreatische Gewebe von unbehandelten, ebenso wie von Melatonin-behandelten Wistar-Ratten blieb generell unmarkiert. Die Immunreaktion in der Insel erstreckte sich bevorzugt auf das Cytosol der Zellen, wobei die Zellkerne weitgehend unmarkiert blieben. Durch eine detaillierte Analyse mittels Konfokalmikroskopie wurde eine cytoplasmatische Feingranulierung sichtbar (Abb. 19 - Ea, Eb).

Eine Auswirkung von Melatonin auf die Immunfluoreszenzintensität der  $MT_1$ -Rezeptor-positiven Strukturen in den pankreatischen Inseln der Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (Abb. 19 - Eb) war beim Vergleich zu den unbehandelten Wistar-Ratten (Abb. 19 - Ea) nicht zu erkennen.

Die Immunfluoreszenz-positiven Signale waren bei allen unbehandelten, ebenso wie bei den Melatonin-behandelten Wistar-Ratten (Abb. 19 - Ea, Eb) im Vergleich zu den unbehandelten sowie Melatonin-behandelten GK-Ratten (Abb. 19 - Ec, Ed) homogen in den Inseln verteilt. Im Vergleich zum Wistar-Stamm (Abb. 19 - Ea, Eb) war eine kräftigere  $MT_1$ -Rezeptor-Immunmarkierung der meisten pankreatischen Inseln des GK-Stammes nachweisbar (Abb. 19 - Ec, Ed). Auch hier war das exokrine Gewebe nicht immunreaktiv. Weiterhin stellte sich bei allen unbehandelten als auch Melatonin-behandelten GK-Ratten eine deutliche Umverteilung der  $MT_1$ -Rezeptor-

Immunmarkierung dar. Dabei fiel im Unterschied zu den Inseln der Wistar-Ratten eine verstärkte Immunfluoreszenzakkumulierung in einzelnen Inselzellen auf (Abb. 19 - Ec, Ed). Die Umriss einzelner Zellen traten dadurch deutlich hervor und es konnten immunmarkierte und nichtmarkierte Zellen unterschieden werden.

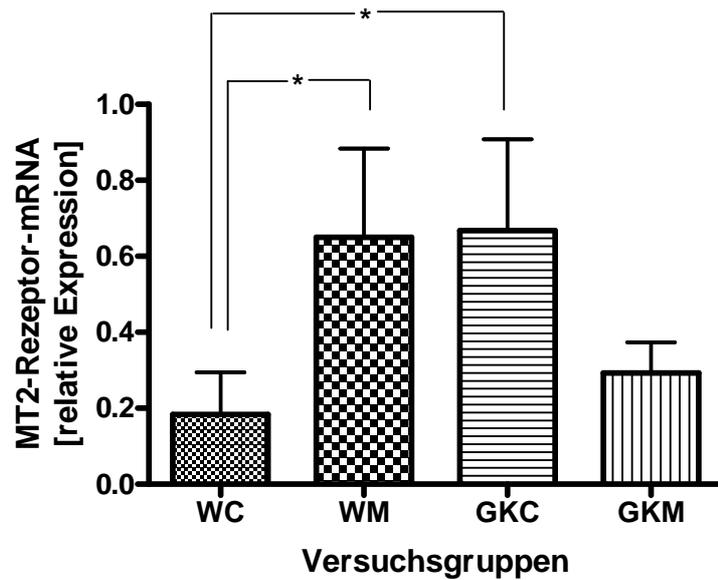
Ein Effekt von Melatonin auf die MT<sub>1</sub>-Rezeptor-immunreaktiven Strukturen in den pankreatischen Inseln von unbehandelten sowie Melatonin-behandelten GK-Ratten wurde nicht nachgewiesen.



**Abb. 19:** Immunfluoreszenzdarstellung der MT<sub>1</sub>-Rezeptoren (Ea-Ed) in den pankreatischen Inseln unbehandelter Wistar-Ratten (Ea), Melatonin-behandelter Wistar-Ratten (Eb), unbehandelter GK-Ratten (Ec) sowie Melatonin-behandelter GK-Ratten (Ed) in der Mitte der Dunkelperiode. Die pankreatischen Inseln der GK-Ratten wurden aufgrund starker Fluoreszenz unter einer niedrigeren Spannung mit dem Laser Scanning Konfokalmikroskop aufgenommen. Die Immunmarkierung trat nur auf Inseln auf, das exokrine Gewebe blieb unmarkiert.

#### 4.3.13 MT<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA im Pankreas

Die MT<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA-Expression war bei Melatonin-behandelten Wistar-Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Wistar-Kontrollen erhöht (p < 0,05), ebenso war das MT<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA-Expressionsniveau des GK-Stammes im Vergleich zu Wistar-Kontrollen statistisch signifikant erhöht (p < 0,05). Die perorale Melatoninapplikation suppressierte die pankreatische MT<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA-Expression bei den GK-Ratten (Abb. 20).



**Abb. 20:** Mittelwerte ± SEM der relativen MT<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA-Expression im Pankreas unbehandelter Wistar-Ratten (WC; 0,18 ± 0,11; n = 4), Melatonin-behandelter Wistar-Ratten (WM; 0,65 ± 0,23; n = 5), unbehandelter GK-Ratten (GKC; 0,67 ± 0,24; n = 5) und Melatonin-behandelter Ratten (GKM; 0,29 ± 0,08; n = 7).

Eine Substanzapplikation im Tierversuch ist für die Vorhersagbarkeit von Reaktionen beim Menschen auf neue Wirkstoffe hilfreich. Das „Schlafhormon“ Melatonin erfreut sich aufgrund seiner sogenannten pleiotropen Effekte in Fach- und Laienkreisen einer vielseitigen Anwendung. In Deutschland ist es jedoch erst seit April 2008 als „Einschlafmittel“ für über 55 Jahre alte Menschen mit einer primären Insomnie zugelassen. Jedoch können die erwünschten Wirkungseffekte von vielfältigen unerwünschten Nebenwirkungen begleitet werden. Bisher liegen jedoch keine klinischen Studien vor, welche möglichen Nebeneffekte einer chronischen Melatoninanwendung systematisch getestet haben.

Die durch eine chronische Melatoninapplikation *via* Trinkwasser erreichten supraphysiologischen (pharmakologischen) Melatoninplasmakonzentrationen in der Mitte der Dunkelperiode bildeten die Grundlage zur *in vivo*-Prüfung der bekannten Melatoninrezeptor-vermittelten Insulinsekretions-hemmenden Wirkung *in vitro*. Im Rahmen der chronischen Melatoninapplikation im „Ganztiermodell“ *via* Trinkwasser wurden alle Befunde in der Mitte der Dunkelperiode erhoben, da dieser Zeitpunkt am repräsentativsten für die untersuchten Parameter ist. Dies wird aus deren 24-Stundenprofilen erkennbar (Peschke et al., 2006b; Frese et al., 2007). Zudem nehmen die Ratten während der Dunkelperiode, ihrer Aktivitätsphase, ihre Nahrung auf. Somit wurde die physiologische Situation der stimulierten Insulinsekretion genutzt.

### **Insulin**

Das bereits etablierte Tiermodell des T2DM, die GK-Ratte, ist dem menschlichen T2DM besonders ähnlich (Portha et al., 2008) und war deswegen bei der Fragestellung der Melatoninauswirkung auf Insulinplasmakonzentrationen *in vivo* besonders geeignet. Die metabolisch unauffällige Wistar-Ratte stellt insofern eine exzellente Kontrolle dar, da ihr Erbgut die Grundlage für die Züchtung der GK-Ratte war (Portha et al., 2008). Bei GK-Ratten ebenso wie beim Menschen gehen hohe Insulinplasmaspiegel mit erniedrigten Melatoninkonzentrationen im Plasma einher, während beim experimentell induzierten Typ1 *Diabetes* (T1DM) bei der Ratte eine genau umgekehrte Hormonspiegelsituation zu finden ist (Peschke, 2008). Durch Melatoninapplikation *via* Trinkwasser über neun Wochen, immer zur Nacht für insgesamt 12 h, konnten die Effekte der chronischen Melatonineinwirkung unter anderem auf das Pankreas und das Pinealorgan der Typ2-diabetischen GK-Ratten analysiert werden. Es wurde eine ungewöhnliche Konstellation herbeigeführt, die *intra vitam* nicht beobachtet wird: Die Kombination diabetischer Hyperinsulinämie und exogen verursachter Melatoninüberschuss (Abb. 6, 9, 10).

Während des Lebens einer GK-Ratte treten unterschiedliche Insulinspiegel auf. Im prädiabetischen Stadium (bis zur dritten Lebenswoche) wird ein Insulinmangel beobachtet, der in langsam ansteigende Insulinspiegel bis hin zur Hyperinsulinämie übergeht (Peschke et al., 2006b; Frese et al., 2007). Die sich bereits im jungen Erwachsenenalter von vier Monaten manifestierende Hyperinsulinämie bei GK-Ratten der Halleschen Kolonie, im Vergleich zu gleichaltrigen Wistar-Ratten (Abb. 9, 10), ist Ausdruck der sich entwickelnden metabolischen Störung der GK-Ratten. Dazu passt das immunhistochemische Bild mit beginnender lückenhafter Verteilung von Insulin-immunmarkierten Inselstrukturen (Abb. 14, Ac). Dieser Befund ist vereinbar mit einem typischen, sich anschließenden  $\beta$ -Zellverlust (Movassat et al., 2007). Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Insulin-immunmarkierten Zellen ist bei der Mehrzahl der unbehandelten männlichen GK-Ratten im vierten Lebensmonat nicht wesentlich unterschiedlich im Vergleich zu den Insulin-positiven Zellen gleichaltriger Wistar-Ratten (Abb. 14, Aa). Im Gegensatz dazu wird bei einer GK-Ratte, welche im Alter von sechs Wochen normale Insulinkonzentrationen aufweist, eine schwächere Fluoreszenzintensität der Insulin-immunmarkierten Strukturen in der pankreatischen Insel beobachtet (Frese et al., 2007). Die Beschreibungen verschiedener GK-Kolonien variieren bezüglich des Alters bei der Manifestation der Hyperinsulinämie und der prozentualen Anzahl an  $\beta$ -Zellen in den pankreatischen Inseln (Ostenson und Efendic, 2007). Während sich bei zwei Monate alten GK-Ratten der Pariser Kolonie keine erhöhte Insulinkonzentration im Plasma im Vergleich zu gleichaltrigen Wistar-Ratten erkennen ließen (Tourrel et al., 2002), ist eine Hyperinsulinämie bei zwei bis drei Monate alten GK-Ratten der Pariser Kolonie sowie einer schwedischen und einer japanischen Kolonie bereits manifest (Sener et al., 1993; Plachot und Portha, 2001; Satoh et al., 2005). Die Hyperinsulinämie der GK-Ratten der Halleschen Kolonie war im Alter von 42 Wochen deutlich ausgeprägt (Frese et al., 2007). Durch die eigenen Untersuchungen, die bereits bei 16 Wochen alten GK-Ratten durchgeführt wurden, konnte gesichert werden, dass die GK-Ratten bereits in diesem frühen Alter hyperinsulinämisch waren (Abb. 9, 10).

Seit 1997 ist bekannt, dass das Melatonin die spezifisch sowie unspezifisch stimulierte Insulinsekretion hemmt (Peschke et al., 1997, 1998, 2000, 2002). Diese Feststellung wurde mehrfach bestätigt (Kemp et al., 2002; Picinato et al., 2002b). Des Weiteren wurden die entsprechenden intracellulären Mechanismen aufgeklärt (Peschke et al., 2000, 2002, 2006a; Kemp et al., 2002; Picinato et al., 2002a,b). Es ist heute bekannt, dass die  $\beta$ -Zelle über Melatoninrezeptoren verfügt und dass sie über mehrere Signalkaskaden die Insulinsekretion (Hemmung sowie Förderung) modulieren.

Allerdings überwiegt beim Zusammenspiel beider Melatoninrezeptoren eine Senkung der Insulinsekretion (Peschke, 2008). Die Ergebnisse der chronischen Auswirkung von Melatonin auf die Typ2-diabetische GK-Ratte sind zur Ergänzung der Vorkenntnisse unverzichtbar. Analog zu der hemmenden Wirkung von Melatonin auf die Insulinsekretion nach Stimulation (z. B. durch Glukose) wurde die Stimulation der Insulinsekretion *intra vitam* im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen lediglich durch die nächtliche Futteraufnahme möglich. Bisher wurde keine ähnliche Untersuchung bei der GK-Ratte vorgenommen und damit tragen die Ergebnisse zusätzlich zum Verständnis der Pathophysiologie der GK-Ratte nach einer Intervention bei.

Es gibt zurückliegende Berichte über eine Insulinsenkung durch chronische Melatoninapplikation *in vivo*. Im Rahmen einer Melatoninapplikation durch das Trinkwasser wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen eine Senkung der Insulinplasmakonzentrationen gezeigt (Bailey et al., 1974; Das, 1999, 2005; Rasmussen et al., 1999, 2001; Wolden-Hanson et al., 2000; Nishida, 2002, 2005; Rios-Lugo et al., 2010). Auch die diabetischen Otsuka Long-Evans Tokushima-Fatty Ratten (OLETF) wurden in eine Melatoninlangzeitbehandlung einbezogen, welche ebenfalls zur Reduktion der Insulinplasmaspiegel führte (Nishida et al., 2002). Diese *in vivo* Befunde unterstützen die Beobachtung, dass Melatonin die Insulinsekretion *in vitro* senkt (Peschke et al., 2000, 2002; Kemp et al., 2002; Ramracheya et al., 2008; Lyssenko et al., 2009). Im Gegensatz dazu belegen Literaturbefunde, dass keinerlei Veränderung des Insulinspiegels nach einer kurzen, dreiwöchigen, hochdosierten Melatoninapplikation *per os*, vor Beginn der Dunkelperiode, bei lipidreich gefütterten Ratten, auftrat (Prunet-Marcassus et al., 2003), sondern erst nach über 70 Tage andauernder Melatoninapplikation bei Rattenmännchen mittleren Alters auftritt (Rasmussen et al., 1999). Somit zeigen die eigenen Ergebnisse nach einer Melatoninapplikation von ca. 65 Tagen, also zu einem relativ frühen Zeitpunkt, einen Insulin-senkenden Effekt nach chronischen Melatoningaben im Ganztiermodell bei der metabolisch unauffälligen Wistar-, sowie bei der diabetischen GK-Ratte (Abb. 9, 10). Damit korreliert eine Abschwächung der Immunfluoreszenz der Insulin-positiven  $\beta$ -Zellen in den pankreatischen Inseln ausschließlich bei den mit Melatonin behandelten Wistar- sowie GK-Ratten (Abb. 14, Ab, Ad). Im Rahmen der untersuchten Parameter nach chronischer Melatoninapplikation gibt es keine Hinweise für eine schädigende Wirkung auf metabolisch gesunde bzw. diabetische Ratten. Vielmehr könnte bei der Typ2-diabetischen Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und erhöhte pankreatische Melatoninrezeptorexpression eine Melatonin-induzierte Senkung des

Insulinplasmaspiegels günstige Effekte auf die Insulinresistenz haben. Die Insulinsensitivität fördernde Wirkung von Melatonin und Melatoninagonisten wurde unlängst beschrieben (Ha et al., 2006; She et al., 2009). Es ist ferner bekannt, dass Melatonin die futterinduzierte Insulinantwort bei Ratten verstärkt (la Fleur et al., 2001). Eine einzige Studie postuliert eine verminderte Insulinsensitivität nach einer Melatoninapplikation, allerdings bei älteren Frauen und teilweise unter einer laufenden Hormonersatztherapie (Cagnacci et al., 2001). Die Unbedenklichkeit der Senkung der Insulinkonzentration bei der metabolisch unauffälligen Wistar-Ratte ist fraglich. Aber junge GK-Ratten, bei denen sich verhältnismäßig hohe Insulinplasmaspiegel entwickelten, können theoretisch von der Insulin-senkenden Wirkung des Melatonin profitieren. Melatonin kann demzufolge eine Schutzfunktion vor einer fortschreitenden, langfristig ungezügelt und somit einer toxischen Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und progredienten sekretorischen Insuffizienz der pankreatischen  $\beta$ -Zellen bewirken.

### **Nebenbefunde**

Bei den sechs Wochen alten GK-Ratten fällt eine erhöhte Blutglukosekonzentration im Vergleich zu den Wistar-Kontrollen auf (Abb. 2). Dies entspricht den bislang publizierten Befunden bei gleichaltrigen GK- und Wistar-Ratten (Takita et al., 2004). Auf die Bestimmung von BZ-Werten vor und während der Melatoninapplikation wurde bewusst verzichtet, um die Tiere nicht zu alterieren. Eine Vorsichtsmaßnahme, die bei chronobiologischen Experimenten wichtig ist. Es standen jedoch bereits zuvor erhobene Vergleichswerte zur Verfügung (Abb. 2). Die männlichen GK-Tiere der Halleschen Kolonie wiesen im Alter von sechs Wochen eine Hyperglykämie auf. In allen bisher untersuchten Altersstadien der eigenen Zucht waren Wistar-Ratten normoglykämisch (Frese et al., 2007). Die Glukoseverwertung hängt von der regelrechten Funktion des pankreatischen Glukosesensors ab, bestehend aus GLUT2 und Glucokinase. Als Ausdruck des chronischen diabetischen Status mit  $\beta$ -Zellbelastung bei Hyperglykämie und Insulinresistenz wird die Glucokinaseaktivität gesenkt. Bei GK-Ratten im 4. Lebensmonat koinzidierte eine Downregulierung der GLUT2-mRNA-Expression (Abb. 17) mit der Verlagerung des nichtfunktionsfähigen GLUT2-Proteins ins Cytoplasma (Abb. 20) und einer reduzierten Glucokinase-mRNA-Expression (Abb. 18). Dies steht im Einklang mit den bereits publizierten Daten zur altersassoziierten Abnahme der GLUT2-mRNA-Expression der hyperinsulinämischen GK-Ratte (Frese et al., 2007). Melatonin konnte die charakteristischen diabetogenen Veränderungen bezüglich der Transkription des pankreatischen Glukosesensorkomplexes nicht beeinflussen. Dies entspricht der Beobachtung, dass das Melatonin, ohne die Glukoseoxidation zu beeinflussen, die  $\beta$ -Zellsyntheseleistung moduliert

(Picinato et al., 2002b). Ein Einfluss von Melatonin auf Menge und intracelluläre bzw. intransuläre Verteilung des GLUT2 war konfokalmikroskopisch und anhand der mRNA-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Wistar- und GK-Ratten nicht feststellbar. In Anbetracht der Insulinspiegelsenkung nach Melatoninapplikation verläuft die Langzeitregulation der GLUT2-mRNA-Expression und vermutlich auch seiner Funktion Melatonin-unabhängig. Immunhistochemisch konnte eine Tierlinienspezifische Verteilung des GLUT2-Proteins in den pankreatischen Inseln der 17 Wochen alten Wistar- und GK-Ratten dargestellt werden (Abb. 20). Die Feinstruktur war bei den Kontrolltieren sowie bei den Melatonin-behandelten Versuchstieren beider Stämme vergleichbar (Frese et al., 2007). Konkret wurde ein „brillenförmiges“ Muster bei den 17 Wochen alten Wistar-Ratten und eine Tendenz zur diffusen Anreicherung der GLUT2-Immunmarkierung im Zellplasma bei gleichaltrigen GK-Ratten bestätigt. Die Effekte chronischer Melatoninbehandlung könnten effektiv genug sein um a) durch ein *feedback* den *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) im Sinne einer circadianen Rhythmuskontrolle (la Fleur et al., 2001) und b) durch Einfluss auf die basale Glukosekontrolle (La Fleur et al., 1999) die Blutglukose zu beeinflussen. Da eine Infusion von Melatonin oder auch Melatonin mit 2-Desoxy-D-Glukose in den Hirnventrikel bei der Ratte zum Glukoseabfall führt, erkennen die Autoren dem SCN eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase zu (Shima et al., 1997). Die Meinungen über die Wirkung von Melatonin auf die Blutglukosekonzentration widersprechen sich dennoch erheblich. Einige Autoren beschreiben eine fehlende Reaktion der Blutglukose auf die akute bzw. chronische Melatoningabe bei der Ratte, andere beschreiben einen Blutglukose-senkenden oder gar -fördernden Effekt (Peschke, 2008). Bei vier Monate alten hyperglykämischen GK- und normoglykämischen Wistar-Ratten findet keine Veränderung der Blutglukose nach chronischer Melatoninapplikation statt (Abb. 8). Studien, die bezüglich des Versuchssettings die meisten Gemeinsamkeiten untereinander und mit dem beschriebenen Versuchsdesign haben, stehen in Einklang mit den vorgestellten Ergebnissen (Wolden-Hanson et al., 2000; Markova et al., 2004). Das Melatonin interagiert bei Beeinflussung der  $\beta$ -Zelle nicht mit der Glukose (Picinato et al., 2002b). Dies bestätigen auch die Befunde zur Glukagon-, Glucokinase- und GLUT2-mRNA-Expression nach chronischer Melatoninapplikation *per os* (Abb. 8, 13, 14B, 15, 16 und 17). Darüber hinaus bleibt die Blutglukosekonzentration auch im Modell des chronischen Melatoninentzugs, aufgrund des Fehlens von MT<sub>1</sub>-, MT<sub>2</sub> oder beider Melatoninrezeptoren in *knockout*-Mausmodellen, im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Mühlbauer et al., 2009). Zu vermuten ist, dass nicht die langfristigen, jedoch die akuten Melatoningaben zu Blutglukose-Schwankungen führen können.

## **Die Melatoninapplikation über neun Wochen verursacht bei den Versuchstieren zahlreiche Nebeneffekte:**

1. GK-Ratten besitzen im Alter von sechs als auch von 42 Wochen ein niedrigeres Körpergewicht als Wistar-Ratten gleichen Alters (Frese et al., 2007). Vor der Melatoninapplikation waren acht Wochen alten GK-Ratten leichter als die gleichaltrigen Wistar-Ratten (Abb. 1). Die Ergebnisse entsprechen mithin bisherigen publizierten Ergebnissen (Frese et al., 2007; Movassat et al., 2008). Im gesamten Zeitraum der Melatoninapplikation wuchsen die jungen mit Melatonin behandelten GK-Ratten im Rahmen der stammspezifischen Entwicklung adäquat heran. Die Gewichtszunahme unterschied sich unter laufender Melatoninbehandlung im Vergleich zu den GK-Kontrollen statistisch nicht signifikant. Nach Melatoninapplikation im Trinkwasser setzte eine Körpergewichtsabnahme bei Wistar-Ratten bereits im Alter von 69 Tagen ein, also schon nach der zweiten Applikationswoche. Die Körpergewichte von Melatonin-behandelten Wistar-Ratten blieben bis zur neunten Applikationswoche im Gegensatz zu den unbehandelten Wistar-Ratten erniedrigt (Abb. 5). Die Gewichtsreduktion blieb bei den diabetischen hyperinsulinämischen Melatonin-behandelten GK-Ratten aus (Abb. 5). Zu prüfen wäre, ob eine Melatonin-induzierte Beeinflussung des Gewichts der GK-Ratte höheren Alters oder aber beim Einsatz höherer Melatindosen auftritt. Eine Melatonin-induzierte Körpergewichtssenkung wurde bereits bei verschiedenen Rattenmodellen ausführlich und differenziert untersucht (Prunet-Marcassus et al., 2003; Puchalski et al., 2003). Melatoninapplikation senkte das Körpergewicht männlicher Ratten und baute viscerale Fettmassen adipöser und älter werdender männlichen Ratten ab, bei weiblichen Tieren bewirkte Melatonin eher das Gegenteil (Markova et al., 2003). Das Gesamtkörpergewicht wurde aber bei beiden Geschlechtern von Sprague-Dawley-Ratten gesenkt (Bojkova et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Rasmussen (Rasmussen et al., 2001) diskutierte dabei, ob sich diese Phänomene über eine Zunahme der peripheren Insulinsensitivität nach chronischer Melatoninbehandlung erklären lassen (Wolden-Hanson et al., 2000). Dieser Auffassung haben sich weitere Autoren angeschlossen (la Fleur et al., 2001; Markova et al., 2003). Schließlich ist eine verstärkte periphere Insulinwirksamkeit nach Melatoninapplikation bekannt. Da das Melatonin auch die Gewichtszunahme von metabolisch unauffälligen, sehr jungen Ratten im Wachstumsalter senkt (Abb. 5), wäre zu vermuten, dass nicht nur die Adipositas unterschiedlichen Ursprungs eine Voraussetzung für eine Melatonin-induzierte Gewichtssenkung ist, sondern dass die GK-Ratten bestimmte Kompensationsmechanismen besitzen, die sie vor Gewichtssenkung durch Melatonin schützen.

**2.** Einzelhaltung bei sozial lebenden Tieren wie der Ratte bedeutet Stress. Einzeln gehaltene Ratten zeigen Verhaltensauffälligkeiten, welche sich z. B. in einer Vorliebe zu hypercalorischem Futter, Abnahme der Trinkmenge und Gewichtszunahme im Vergleich zu sozial lebenden, in Gruppen gehaltenen, Tieren äußert (Scalera, 1992). Da in der vorliegenden Untersuchung die vom Kohlenhydratstoffwechsel abhängigen Parameter untersucht werden sollten, wurden die Tiere in Gruppen gehalten. Damit wurde der Notwendigkeit genüge getan, sozial lebende Tiere auch im Experiment artentsprechend zu halten. Dennoch traten einige Verhaltensauffälligkeiten bezüglich der Nahrungsaufnahme auf. Die Ursachen der Abweichungen bezüglich der Futtermengen lagen a) in den stammspezifischen Verhaltensweisen und b) in der chronischen Applikation von Melatonin:

**a)** Bekannterweise nehmen die nachtaktiven Ratten während der Dunkelperiode ca. 80 bis 90% der täglichen Nahrungsmengen zu sich. Die diabetischen unbehandelten GK-Versuchstiere verhielten sich während der Nacht hypophag (Abb. 3, 4), während des Tages jedoch im Vergleich zu den unbehandelten Wistar-Ratten hyperphag. Daraus ist zu schließen, dass die GK-Ratten während der Lichtperiode, normalerweise einer Ruhephase der Ratten, nicht nur größere Mengen Futter konsumierten, sondern auch während der Hellperiode aktiver und während der Dunkelperiode weniger aktiv waren. Auch beim Menschen koinzidieren Schlafverhaltensstörungen mit erhöhter Diabetesprävalenz und Insulinresistenz (Turek et al., 2005; Mulder et al., 2009). Das gestörte Futter-Konsumverhalten der GK-Ratte gegenüber der metabolisch unauffälligen Wistar-Ratte ist ein Hinweis auf eine Desynchronisierung des circadianen Rhythmus der GK-Ratte. Sie geht also beim Typ2-diabetischen Menschen, einschliesslich eigener Beobachtungen bei der Typ2-diabetischen Ratte, mit Komorbiditäten wie Insulinresistenz und Hyperglykämie einher.

**b)** Die mit 30 µg Melatonin/ml behandelten Versuchstiere, Wistar- wie GK-Ratten, konsumierten während der Dunkelperiode (12 h) geringere Mengen an Pelletfutter und Trinklösung als die jeweiligen unbehandelten Kontrollen (Abb. 3, 4). Hingegen unterschied sich die über 24 h gemessene Futterraufnahme der mit Melatonin behandelten Ratten nicht von der der unbehandelten Tiere (Wolden-Hanson et al., 2000). Die Futterraufnahme-senkende Bedeutung von Melatonin ist also abhängig von der eingesetzten Dosis. Die aufgenommene Futtermenge der Melatonin-behandelten Wistar-Ratten war niedriger als die der Unbehandelten (Abb. 4). Dies spricht gegen die Ergebnisse anderer Autoren, die nach Melatoningabe keine Änderung im Futterkonsum registrierten (Puchalski et al., 2003; Rios-Lugo et al., 2010). Die für die Melatonin-induzierte Reduktion der Futterraufnahme verantwortlichen Mechanismen sind noch nicht genau bekannt. Eine naheliegende Ursache könnte in den

Verschiebungen der Monoaminhomöostase im Gehirn (Chuang et al., 1993) und/oder der veränderten Hormonausschüttung aus dem Endokrinium (Zellen der pankreatischen Insel, Thyreocyten usw.) liegen. Es wird über eine verbesserte, Melatonin-induzierte Leptinsensitivität und die darauf abgestimmte Futteraufnahme spekuliert (Wolden-Hanson et al., 2000).

Um Versuchstiere nicht durch desynchronisierende Reize bei der Melatoninapplikation zu alterieren, erfolgte die Melatoninverabreichung minimalinvasiv, mit dem Trinkwasser (Slotten et al., 1999). Aus der Literatur geht hervor, dass Melatonin im Trinkwasser (0,2 - 0,4 µg Melatonin/ml) das Trinkverhalten nicht beeinflusst (Wolden-Hanson et al., 2000), obwohl Ratten im Allgemeinen äußerst sensibel auf Gerüche und Aromata reagieren (Scalera et al., 1979). Die eigenen Versuchsergebnisse belegen, dass Melatonin im Trinkwasser (30 µg Melatonin/ml) zu einer verminderten individuellen Wasseraufnahme der behandelten Versuchstiere führt (Abb. 3). Daraus folgt, dass eine Aversion gegen eine Behandlung mit Melatonin bereits bei einer niedrigen Dosis von 2,5 mg/kg KG (entspricht 30 µg Melatonin/ml Trinkwasser) auftritt. Nach der bisherigen Datenlage wird eine Abneigung gegen die enteralen Melatoningaben ab einer Dosis von 50 mg/kg KG beschrieben (Jahnke et al., 1999). Trotz Erreichens eines Vielfachen der physiologischen Melatoninplasmakonzentration hatten die Melatonin-behandelten GK-Ratten nicht die extrem hohen Konzentrationen der Melatonin-behandelten Wistar-Ratten erreicht. Darüber hinaus fielen individuell deutlich variable Melatoninkonzentrationen in beiden Tierlinien auf. Vermutlich sind die Wistar-Ratten die besseren Responder im Vergleich zu den GK-Ratten hinsichtlich der Melatoningaben, basierend auf unterschiedlichen Metabolisierungsraten des exogen verabreichten Melatonins der einzelnen Stämme. Die chronische Melatoninapplikation *per os* führte bei den Wistar- wie bei den GK-Ratten zu supraphysiologisch hohen systemischen Melatoninkonzentrationen im Plasma (Abb. 6), ohne dabei die AA-NAT-mRNA-Expression zu beeinflussen (Abb. 7). Die bekannterweise hochregulierte AA-NAT-mRNA-Expression der sechs Wochen alten GK-Ratten im Vergleich zu den Wistar-Ratten (Peschke et al., 2006b), konnte bei der vier Monate alten unbehandelten GK-Ratten in der Mitte der Dunkelperiode nicht bestätigt werden (Abb. 7).

**3.** Aus der *Cauda pancreatis* stammende Inseln, die im Rahmen dieser Studie vorrangig immunocytochemisch untersucht worden waren, bestehen bei der Ratte zu 66% aus  $\beta$ -Zellen, zu 28% aus  $\alpha$ -Zellen und zu 4% aus  $\delta$ -Zellen. Den Rest bilden pankreatisches Polypeptid- und Ghrelin-positive Zellen (Suckale und Solimena, 2008). Mit Einschränkung der Vergleichbarkeit unserer 4 Monate alten Wistar-Ratten zu 30 Monate alten Wistar-Ratten (Ogneva und Nikolov, 1999) kann dennoch eine

Übereinstimmung der Lokalisation von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Zellen in den pankreatischen Inseln bestätigt werden (Abb. 14). Die einzeln verstreuten Glukagon- sowie Somatostatin-immunmarkierten Zellen in den pankreatischen Inseln entsprechen der bekannten Fibrosierung und Veränderung der Inselarchitektur der GK-Ratten (Homo-Delarche et al., 2006). Die morphologischen Veränderungen der GK-Ratten gingen mit einer Aufregulierung der pankreatischen Glukagon-mRNA-Expression einher und weisen somit auf Abweichungen der parakrinen und endokrinen Sekretionsvorgänge in diabetischen GK-Inseln hin (Abb. 13). Aufgrund von Melatonin-induzierter, cAMP-abhängiger Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren wäre eine Veränderung der Expression des Glukagon- sowie Somatostatin-Gens bei Melatonin-behandelten Versuchstieren durchaus zu erwarten, da beide CREB/CRE-gesteuerte Gene sind (Vallejo et al., 2007). Im Gegensatz dazu fanden bei Melatonin-behandelten GK- und Wistar-Ratten weder Veränderungen der Glukagon- bzw. Somatostatin-Immunreaktivität (Abb. 14) noch der mRNA-Expression von Glukagon- (Abb. 13) und der Somatostatin-mRNA-Expression statt (Peschke et al., 2010).

4. Zu berücksichtigen ist ebenfalls die Tatsache, dass das exogene Melatonin eine Reihe von komplexen prätranskriptionellen Effekten, die u. a. cAMP *response element* (CRE)-abhängig sind, auslösen kann. Denn nach der Melatoninrezeptor-vermittelten Senkung des intrazellulären cAMP (Peschke et al., 2002, 2006a), können weitere, dem cAMP nachgeschaltete, intracelluläre Prozesse ausgelöst werden. Neueren Untersuchungen zur Folge hat Melatonin auch Einfluss auf eine Melatoninrezeptor-vermittelte Glukagonsekretionssteigerung in menschlichen pankreatischen Inseln (Ramracheya et al., 2008).

### **Melatoninrezeptoren**

Im Zeitraum von 23:00 Uhr bis 1:00 Uhr liegen die Melatoninplasmakonzentrationen sowie die Expressionsstärke des Schlüsselenzyms der Melatoninsynthese (AA-NAT-mRNA) von GK- sowie Wistar-Ratten auf ungefähr gleichem Niveau (Abb. 7). Die Melatoninplasmakonzentration von Ratten erreicht ihr Maximum wenig später ebenso wie die Differenzen der Melatoninplasmakonzentrationen von GK- im Vergleich zu Wistar-Ratten. Zudem ist die pineale AA-NAT-mRNA bekannterweise bei GK-Ratten im Vergleich zu Wistar-Ratten kompensatorisch erhöht, während das Enzym nachts eine Aktivitätsverminderung bei den Melatonin-ärmeren diabetischen GK-Ratten zeigt (Peschke et al., 2006b). Die endogene Melatoninproduktion in der Epiphyse wird durch exogen zugeführtes Melatonin nicht beeinflusst (Abb. 7).

Bei hyperinsulinämischen GK-Ratten mit erniedrigten Melatoninspiegeln und bei Typ2-diabetischen Patienten ist die pankreatische mRNA von beiden

Melatoninrezeptorsubtypen verstärkt exprimiert in Vergleich zu Wistar-Ratten bzw. stoffwechselgesunden Patienten (Peschke et al., 2006b; Peschke et al., 2007; Peschke, 2008). Bei der Analyse der Lokalisation der MT<sub>1</sub>-Rezeptor-positiven Strukturen und der Expressionsstärke seiner mRNA ist die Tageszeit zu berücksichtigen. Im Zeitraum von 23:00 Uhr bis 1:00 Uhr liegt die pankreatische MT<sub>1</sub>-Rezeptor-mRNA-Expressionsstärke von GK- sowie Wistar-Ratten auf ungefähr gleichem Niveau (Abb. 18). Auf der Proteinebene sind die MT<sub>1</sub>-Rezeptoren in den Pankreata von diabetischen GK-Ratten immunhistochemisch stärker ausgeprägt als die von Wistar-Ratten (Abb. 19; Ea, Ec; Peschke et al., 2007). Eine ähnliche Situation wurde bei Typ2-diabetischen Patienten beschrieben (Peschke et al., 2007). Zusätzlich zeigen die immunhistochemischen Befunde, dass in der Mitte der Dunkelperiode ein Teil des MT<sub>1</sub>-Rezeptors bei vier Monate alten GK- und Wistar-Ratten im Cytosol zu finden ist (Abb. 19). Eine cytosolische Lokalisation des pankreatischen MT<sub>1</sub>-Rezeptors (Abb. 19 Ea-d) entspricht einer Internalisation des MT<sub>1</sub>-Rezeptors und somit einem passageren Verlust der MT<sub>1</sub>-Rezeptor-Funktion (Gerdin et al., 2004a). Die Menge der inaktiven immunmarkierten pankreatischen MT<sub>1</sub>-Rezeptoren war in den teilweise fibrosierten pankreatischen Inseln der vier Monate alten GK-Ratte denen von Wistar-Ratten überlegen (Abb. 19 Ea-d). Die enterale Melatoninapplikation verursachte keine erwartete Suppression pankreatischer MT<sub>1</sub>-Rezeptor-mRNA-Expression (Abb. 18). Die Applikation von Melatonin über neun Wochen *per os* hatte eine signifikante Expressionsverstärkung der pankreatischen MT<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA bei Wistar-Ratten zur Folge, nicht jedoch bei den diabetischen GK-Ratten (Abb. 20). Eine Erklärung ist derzeit noch nicht möglich. Die divergierenden Tendenzen der mRNA-Expression des pankreatischen MT<sub>1</sub>- und des MT<sub>2</sub>-Rezeptor bei Wistar- und GK-Ratten könnten auf einer den Diabetes begleitende Störung der Melatonintransduktion oder auf einer Melatoninresistenz beruhen. Bei den Melatonin-behandelten Wistar-Ratten war die Insulinsenkung im Plasma stärker ausgeprägt als bei den Melatonin-behandelten GK-Ratten. Sicher spielt dabei die inadäquate postprandiale Insulinausschüttung der GK-Ratte im Vergleich zur unauffälligen postprandialen Insulinantwort der Wistar-Ratten eine Rolle (Ostenson und Efendic, 2007).

In Anbetracht der Senkung des Insulinspiegels (Abb. 9, 10) und Veränderung im MT<sub>2</sub>-Rezeptor-mRNA-Expressionsniveau, existiert insbesondere bei den Wistar-Ratten in der Dunkelperiode eine deutlich ausgeprägte, spezifische Reaktion der  $\beta$ -Zelle auf die chronische Melatoninapplikation. Diese Befunde sind im Kontext mit der kürzlich beschriebenen erhöhten Inzidenz diabetestypischer Merkmale im Zusammenhang mit bestimmten *single-nucleotide* Polymorphismen des MT<sub>2</sub>-Rezeptor-Gens zu sehen

(Lyssenko et al., 2009; Prokopenko et al., 2009; Staiger et al., 2008). In diesem Zusammenhang kam es zu Spekulationen über eine bald mögliche therapeutische Anwendung von Melatoninrezeptor-Antagonisten. Dadurch sollte der nächtliche, vermeintlich diabetogene, Melatonineinfluss auf die  $\beta$ -Zellen beim T2DM verhindert werden (Diabetes Deutschland-News zitiert in Peschke et al., 2009). Bislang fehlen jedoch *in vivo* Belege der tatsächlichen funktionellen Relevanz, um zu beweisen, dass ein mutierter  $MT_2$ -Rezeptor entsprechende abnormale Funktion bietet. Gegen die Anwendung von Melatoninrezeptor-Antagonisten sprechen die eigenen Befunde am „Ganziermodell“, welche auf eine Senkung der toxischen Hyperinsulinämie beim T2DM hinweisen (Abb. 10,11). Für die Therapie des T2DM, im hyperinsulinämischen Stadium, bedarf es geradezu einer Applikation von Melatonin oder von Melatoninmimetika, um eine Senkung einer Hyperinsulinämie zu erzielen.

### **Insulinrezeptor**

Nach chronischer Einwirkung von exogenem Melatonin entwickelte sich eine außergewöhnliche Konstellation bei den GK-Tieren, nämlich eine gleichzeitig erhöhte Insulin- und Melatoninkonzentration im Plasma (Abb. 6, 9, 10). Eine erhöhte Expression der pinealen Insulinrezeptor-mRNA bei verminderten Insulinkonzentration infolge Melatoninapplikation ist bereits bekannt (Peschke et al. 2008). Die transkriptionelle Aufregulierung des pinealen Insulinrezeptors von Wistar-Ratten nach chronischer enteraler Melatoninapplikation (Abb.11) ist eine Folge der stark verminderten Insulinkonzentration der Wistar-Ratten (Abb. 9, 10). In Übereinstimmung dazu ist nach einer längeren Insulineinwirkung auf Fettzellen eine reziproke Beziehung der Insulinrezeptor-Bindungskapazität zur Insulinkonzentration zu erwarten (Ronnelt et al., 1982). Erwartungsgemäß findet sich auf der transkriptionellen Ebene eine pineale Insulinrezeptor-mRNA-Downregulierung bei den hyperinsulinämischen Ratten wieder (Abb. 11). Denn während der erniedrigten Insulinplasmakonzentration (Hellphase) ist die pineale Insulinrezeptor-mRNA-Expression von Wistar- sowie GK-Ratten deutlich erhöht, fällt aber nach Erhöhung der Insulinplasmakonzentration in der Dunkelphase signifikant auf das Insulinrezeptor-mRNA-Expressionsniveau der GK-Ratten ab (Peschke et al., 2006b).

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der chronische Einfluss von Melatonin sowohl auf 16 stoffwechselgesunde als auch 16 Typ2-diabetische Ratten untersucht. Die Melatoninapplikation erfolgte durch das Trinkwasser (2,5 mg/kg KG), immer zur Dunkelperiode. Dies führte nach 64 Tagen zu einem statistisch signifikanten Melatoninanstieg im Plasma. Die exogene Melatoninapplikation führte interessanterweise zu keinerlei Änderungen der pankreatischen  $MT_1$ -mRNA-Expressionsstärke sowohl von stoffwechselgesunden Wistar- als auch Typ2-diabetischen GK-Ratten. Im Gegensatz dazu zeigten die Melatonin-behandelten Wistar-Ratten im Vergleich zu den Kontrollen ein erhöhtes pankreatisches  $MT_2$ -mRNA-Expressionsniveau. Zudem war die  $MT_2$ -mRNA-Expression von unbehandelten GK-Ratten im Vergleich zu den Wistar-Ratten erhöht. Die endogene Melatoninbiosynthese in der Epiphyse blieb anhand der unveränderten pinealen AA-NAT-mRNA-Expression nach chronischer enteraler Melatoninapplikation unbeeinflusst. Versuchsbegleitend wurde u. a. eine Reduktion der Futteraufnahme sowie des Körpergewichts von Melatonin-behandelten Wistar-, nicht jedoch von GK-Ratten, registriert. Der Einfluss von Melatonin auf die Glukosespiegel ist eher marginal, die Melatoninbehandlung hatte keine wesentliche Auswirkung auf die Blutglukosekonzentration der normoglykämischen Wistar- sowie der hyperglykämischen GK-Ratten. Auch die mittels PCR bestimmten Glukagon-, GLUT2- und Glucokinase-mRNA-Expressionsstärken in den Pankreata von Wistar- und GK-Ratten wiesen nach der Melatoninapplikation keine quantitativen Unterschiede auf. Die chronische enterale Melatoninapplikation hat einen nachhaltigen Einfluss auf die Insulinsekretion, indem das Melatonin die Insulinsekretion rezeptorvermittelt hemmt. Die Senkung der Insulinkonzentration im Plasma nach Melatoninapplikation wurde mittels RIA mit geringen quantitativen Unterschieden sowohl bei normoinsulinämischen Wistar- als auch bei hyperinsulinämischen GK-Ratten festgestellt. Begleitend wurde eine Aufregulierung der Insulinrezeptor-mRNA-Expression in den Epiphysen von Melatonin-behandelten Wistar-Ratten gefunden. Die Senkung der Insulinspiegel nach chronischer Melatoninapplikation sowohl von Wistar- als auch von GK-Ratten ging mit einer abgeschwächten Immunfluoreszenzsignalgebung immunpositiver Insulinmarkierung in den pankreatischen Inseln einher. Die Ergebnisse bestätigen die aus der Literatur bekannten Antagonismen zwischen Melatonin und Insulin bei der Wistar- und erstmalig bei der Typ2-diabetischen GK-Ratte. Es spricht viel dafür, dass Melatonin eine Schutzfunktion für die pankreatische  $\beta$ -Zelle darstellt, da Melatonin hyperinsulinämische Entgleisungen, wie sie typischerweise bei T2DM vorkommen, reduziert.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Halim SM, Guenifi A, Efendic S, Ostenson CG. 1993. Both somatostatin and insulin responses to glucose are impaired in the perfused pancreas of the spontaneously noninsulin-dependent diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats. *Acta Physiol Scand* 148(2):219-226.
- Abdel-Halim SM, Guenifi A, Luthman H, Grill V, Efendic S, Ostenson CG. 1994. Impact of diabetic inheritance on glucose tolerance and insulin secretion in spontaneously diabetic GK-Wistar rats. *Diabetes* 43(2):281-288.
- Agez L, Laurent V, Guerrero HY, Pevet P, Masson-Pevet M, Gauer F. 2009. Endogenous melatonin provides an effective circadian message to both the suprachiasmatic nuclei and the pars tuberalis of the rat. *J Pineal Res* 46(1):95-105.
- Ahmad T, Ohlsson C, Saaf M, Ostenson CG, Kricbergs A. 2003. Skeletal changes in type-2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Endocrinol* 178(1):111-116.
- Anderson RA, Lincoln GA, Wu FC. 1993. Melatonin potentiates testosterone-induced suppression of luteinizing hormone secretion in normal men. *Hum Reprod* 8(11):1819-1822.
- Arushanian EB, Baida OA, Mastiagin SS. 2006. [Effect of melatonin on memory, individual time perception, and anxiety in young people of different chronotype groups]. *Eksp Klin Farmakol* 69(1):21-23.
- Axelrod J, Wurtman RJ. 1966. The formation, metabolism and some actions of melatonin, a pineal gland substance. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 43:200-211.
- Bach AG, Wolgast S, Mühlbauer E, Peschke E. 2005. Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca<sup>2+</sup> release from INS1 insulinoma cells. *J Pineal Res* 39(3):316-323.
- Bailey CJ, Atkins TW, Matty AJ. 1974. Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. *Horm Res* 5(1):21-28.
- Beck-Nielsen H, Pedersen O. 1978. Diurnal variation in insulin binding to human monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 47(2):385-390.
- Berga SL, Loucks TL, Cameron JL. 2001. Endocrine and chronobiological effects of fasting in women. *Fertil Steril* 75(5):926-932.
- Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X. 1996. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1):E246-252.
- Bogdan A, Bouchareb B, Touitou Y. 2001. Ramadan fasting alters endocrine and neuroendocrine circadian patterns. Meal-time as a synchronizer in humans? *Life Sci* 68(14):1607-1615.
- Bojkova B, Orendas P, Friedmanova L, Kassayova M, Datelinka I, Ahlersova E, Ahlers I. 2008. Prolonged melatonin administration in 6-month-old Sprague-Dawley rats: metabolic alterations. *Acta Physiol Hung* 95(1):65-76.
- Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proenca C, Sparso T, Holmkvist J, Marchand M, Delplanque J, Lobbens S, Rocheleau G, Durand E, De Graeve F, Chevre JC, Borch-Johnsen K, Hartikainen AL, Ruukonen A, Tichet J, Marre M, Weill J, Heude B, Tauber M, Lemaire K, Schuit F, Elliott P, Jorgensen T, Charpentier G, Hadjadj S, Cauchi S, Vaxillaire M, Sladek R, Visvikis-Siest S, Balkau B, Levy-Marchal C, Pattou F, Meyre D, Blakemore AI, Jarvelin MR, Walley AJ, Hansen T, Dina C, Pedersen O, Froguel P. 2009. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 41(1):89-94.
- Bromme HJ, Peschke E, Israel G. 2008. Photo-degradation of melatonin: influence of argon, hydrogenperoxide, and ethanol. *J Pineal Res* 44(4):366-372.

- Brown EN, Choe Y, Shanahan TL, Czeisler CA. 1997. A mathematical model of diurnal variations in human plasma melatonin levels. *Am J Physiol* 272(3 Pt 1):E506-516.
- Brown GM, Seggie J, Grotta LJ. 1985. Serum melatonin response to melatonin administration in the Syrian hamster. *Neuroendocrinology* 41(1):31-35.
- Bubenik GA. 2008. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 2:33-51.
- Buijs RM, Scheer FA, Kreier F, Yi C, Bos N, Goncharuk VD, Kalsbeek A. 2006. Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog Brain Res* 153:341-360.
- Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. 2003. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol* 177(1):17-26.
- Burgess HJ, Fogg LF. 2008. Individual differences in the amount and timing of salivary melatonin secretion. *PLoS ONE* 3(8):e3055.
- Cagnacci A, Arangino S, Renzi A, Paoletti AM, Melis GB, Cagnacci P, Volpe A. 2001. Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54(3):339-346.
- Calderari S, Gangnerau MN, Thibault M, Meile MJ, Kassis N, Alvarez C, Portha B, Serradas P. 2007. Defective IGF2 and IGF1R protein production in embryonic pancreas precedes beta cell mass anomaly in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 50(7):1463-71.
- Carpentieri AR, Pujolras MA, Chiesa JJ, Noguera AD, Cambras T. 2006. Effect of melatonin and diazepam on the dissociated circadian rhythm in rats. *J Pineal Res* 40(4):318-325.
- Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA. 2005. Effect of melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats. *J Pineal Res* 38(4):240-246.
- Cavallo A, Ritschel WA. 1996. Pharmacokinetics of melatonin in human sexual maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 81(5):1882-1886.
- Challet E, Pevet P, Vivien-Roels B, Malan A. 1997. Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* 12(1):65-79.
- Champney TH, Steger RW, Christie DS, Reiter RJ. 1985. Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster. *Brain Res* 338(1):25-32.
- Chik CL, Li B, Karpinski E, Ho AK. 1997. Insulin and insulin-like growth factor-I inhibit the L-type calcium channel current in rat pinealocytes. *Endocrinology* 138(5):2033-2042.
- Chikama T, Wakuta M, Liu Y, Nishida T. 2007. Deviated mechanism of wound healing in diabetic corneas. *Cornea* 26(9 Suppl 1):S75-81.
- Chuang JI, Chen SS, Lin MT. 1993. Melatonin decreases brain serotonin release, arterial pressure and heart rate in rats. *Pharmacology* 47(2):91-97.
- Cowen PJ, Bevan JS, Gosden B, Elliott SA. 1985. Treatment with beta-adrenoceptor blockers reduces plasma melatonin concentration. *Br J Clin Pharmacol* 19(2):258-260.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14(23):2950-2961.
- Danel T, Touitou Y. 2006. Alcohol consumption does not affect melatonin circadian synchronization in healthy men. *Alcohol Alcohol* 41(4):386-390.
- Das UN. 1999. GLUT-4, tumour necrosis factor, essential fatty acids and daf-genes and their role in glucose homeostasis, insulin resistance, non-insulin dependent diabetes mellitus, and longevity. *J Assoc Physicians India* 47(4):431-435.

- Das UN. 2005. A defect in the activity of Delta6 and Delta5 desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72(5):343-350.
- Daya S, Walker RB, Glass BD, Anoopkumar-Dukie S. 2001. The effect of variations in pH and temperature on stability of melatonin in aqueous solution. *J Pineal Res* 31(2):155-158.
- DeMuro RL, Nafziger AN, Blask DE, Menhinick AM, Bertino JS, Jr. 2000. The absolute bioavailability of oral melatonin. *J Clin Pharmacol* 40(7):781-784.
- Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, Velidedeoglu E, Desai NM, Koeberlein B, Wolf B, Barker CF, Naji A, Matschinsky FM, Markmann JF. 2004. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53(3):624-632.
- Depres-Brummer P, Metzger G, Morin D, Urien S, Touitou Y, Tillement JP, Claustrat B, Levi F. 1996. Pharmacokinetically guided melatonin scheduling in rats with circadian system suppression. *Eur J Pharmacol* 312(2):171-178.
- Desrois M, Sidell RJ, Gauguier D, Davey CL, Radda GK, Clarke K. 2004. Gender differences in hypertrophy, insulin resistance and ischemic injury in the aging type 2 diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 37(2):547-555.
- Di WL, Kadva A, Johnston A, Silman R. 1997. Variable bioavailability of oral melatonin. *N Engl J Med* 336(14):1028-1029.
- Dobretsov M, Romanovsky D, Stimers JR. 2007. Early diabetic neuropathy: triggers and mechanisms. *World J Gastroenterol* 13(2):175-191.
- Dos Santos ML, Aragon FF, Padovani CR, Pimenta WP. 2006. Daytime variations in glucose tolerance in people with impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract* 74(3):257-262.
- Ebelt H, Peschke D, Bromme HJ, Morke W, Blume R, Peschke E. 2000. Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta-cells in vitro. *J Pineal Res* 28(2):65-72.
- Emens JS, Lewy AJ, Lefler BJ, Sack RL. 2005. Relative coordination to unknown "weak zeitgebers" in free-running blind individuals. *J Biol Rhythms* 20(2):159-167.
- Fabis M, Pruszyńska E, Mackowiak P. 2002. In vivo and in situ action of melatonin on insulin secretion and some metabolic implications in the rat. *Pancreas* 25(2):166-169.
- Ferreira FM, Seica R, Santos MS, Palmeira CM. 1999. Age-related alterations in liver mitochondrial bioenergetics of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Acta Diabetol* 36(4):173-177.
- Feuers RJ, Hunter JD, Tsai TH, Cardoso SS, Scheving LE. 1990. Circadian stage dependent 125I-insulin binding in the liver and epididymal fat of the mouse. *Prog Clin Biol Res* 341A:529-534.
- Fourtillan JB, Brisson AM, Gobin P, Ingrand I, Decourt JP, Girault J. 2000. Bioavailability of melatonin in humans after day-time administration of D(7) melatonin. *Biopharm Drug Dispos* 21(1):15-22.
- Frese T, Bazwinsky I, Mühlbauer E, Peschke E. 2007. Circadian and age-dependent expression patterns of GLUT2 and glucokinase in the pancreatic beta-cell of diabetic and nondiabetic rats. *Horm Metab Res* 39(8):567-574.
- Frese, T. 2009. Melatonin und Insulin bei diabetischen und stoffwechselfgesunden Ratten – Evidenzen für Wechselwirkungen zwischen Pinealocyten und pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten.
- Gaisano HY, Ostenson CG, Sheu L, Wheeler MB, Efendic S. 2002. Abnormal expression of pancreatic islet exocytotic soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors in Goto-Kakizaki rats is partially restored by phlorizin treatment and accentuated by high glucose treatment. *Endocrinology* 143(11):4218-4226.

- Gauer F, Masson-Pevet M, Skene DJ, Vivien-Roels B, Pevet P. 1993. Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei; evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology* 57(1):120-126.
- Gerdin MJ, Masana MI, Dubocovich ML. 2004a. Melatonin-mediated regulation of human MT(1) melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 67(11):2023-2030.
- Gerdin MJ, Masana MI, Rivera-Bermudez MA, Hudson RL, Earnest DJ, Gillette MU, Dubocovich ML. 2004b. Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *Faseb J* 18(14):1646-1656.
- Ghanaat-Pour H, Huang Z, Lehtihet M, Sjöholm A. 2007. Global expression profiling of glucose-regulated genes in pancreatic islets of spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Mol Endocrinol* 39(2):135-150.
- Giroix MH, Saulnier C, Portha B. 1999a. Decreased pancreatic islet response to L-leucine in the spontaneously diabetic GK rat: enzymatic, metabolic and secretory data. *Diabetologia* 42(8):965-977.
- Giroix MH, Scruel O, Ladriere L, Sener A, Portha B, Malaisse WJ. 1999b. Metabolic and secretory interactions between D-glucose and D-fructose in islets from GK rats. *Endocrinology* 140(12):5556-5565.
- Goel N. 2005. Late-night presentation of an auditory stimulus phase delays human circadian rhythms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(1):R209-216.
- Goodner CJ, Koerker DJ, Stagner JI, Samols E. 1991. In vitro pancreatic hormonal pulses are less regular and more frequent than in vivo. *Am J Physiol* 260(3 Pt 1):E422-429.
- Goto Y, Kakizaki M. 1981. The spontaneous-diabetes rat: a model of noninsulin dependent diabetes mellitus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*; 57:381-4.
- Guardiola-Lemaitre B. 1997. Toxicology of melatonin. *J Biol Rhythms* 12(6):697-706.
- Guenifi A, Abdel-Halim SM, Hoog A, Falkmer S, Ostenson CG. 1995. Preserved beta-cell density in the endocrine pancreas of young, spontaneously diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Pancreas* 10(2):148-153.
- Gutierrez CI, Urbina M, Obregon F, Glykys J, Lima L. 2003. Characterization of tryptophan high affinity transport system in pinealocytes of the rat. Day-night modulation. *Amino Acids* 25(1):95-105.
- Ha E, Yim SV, Chung JH, Yoon KS, Kang I, Cho YH, Baik HH. 2006. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. *J Pineal Res* 41(1):67-72.
- Hajak G, Rodenbeck A, Adler L, Huether G, Bandelow B, Herrendorf G, Staedt J, Ruther E. 1996. Nocturnal melatonin secretion and sleep after doxepin administration in chronic primary insomnia. *Pharmacopsychiatry* 29(5):187-192.
- Hardeland R. 2008. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 65(13):2001-2018.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. 2006. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38(3):313-316.
- Hartter S, Grozinger M, Weigmann H, Roschke J, Hiemke C. 2000. Increased bioavailability of oral melatonin after fluvoxamine coadministration. *Clin Pharmacol Ther* 67(1):1-6.
- Haus E. 2007. Chronobiology in the endocrine system. *Adv Drug Deliv Rev* 59(9-10):985-1014.
- Homo-Delarche F, Calderari S, Irminger JC, Gangnerau MN, Coulaud J, Rickenbach K, Dolz M, Halban P, Portha B, Serradas P. 2006. Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. *Diabetes* 55(6):1625-1633.

- Howarth FC, Qureshi MA. 2008. Myofilament sensitivity to Ca(2+) in ventricular myocytes from the Goto-Kakizaki diabetic rat. *Mol Cell Biochem* 315(1-2):69-74.
- Huang Z, Jansson L, Sjöholm A. 2008. Gender-specific regulation of pancreatic islet blood flow, insulin levels, and glycemia in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Clin Sci (Lond)* 115:35-42.
- Hughes SJ, Faehling M, Thorneley CW, Proks P, Ashcroft FM, Smith PA. 1998. Electrophysiological and metabolic characterization of single beta-cells and islets from diabetic GK rats. *Diabetes* 47(1):73-81.
- Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C. 1999. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 50(2):271-279.
- Jurado J, Ybarra J, Romeo JH, Pou JM. 2009. Clinical screening and diagnosis of diabetic polyneuropathy: the North Catalonia Diabetes Study. *Eur J Clin Invest* 39(3):183-189.
- Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C, Buijs RM. 2004. Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci* 24(35):7604-7613.
- Kedziora-Kornatowska K, Szewczyk-Golec K, Kozakiewicz M, Pawluk H, Czuczejko J, Kornatowski T, Bartosz G, Kedziora J. 2009. Melatonin improves oxidative stress parameters measured in the blood of elderly type 2 diabetic patients. *J Pineal Res* 46(3):333-337.
- Kemp DM, Ubeda M, Habener JF. 2002. Identification and functional characterization of melatonin Mel 1a receptors in pancreatic beta cells: potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of cAMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 191(2):157-166.
- Kireev RA, Tresguerres AC, Garcia C, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA. 2008. Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage. *J Pineal Res* 45(4):394-402.
- Knudsen EC, Seljeflot I, Abdelnoor M, Eritsland J, Mangschau A, Arnesen H, Andersen GO. 2009. Abnormal glucose regulation in patients with acute ST- elevation myocardial infarction-a cohort study on 224 patients. *Cardiovasc Diabetol* 8:6.
- Krauchi K, Cajochen C, Werth E, Wirz-Justice A. 2002. Alteration of internal circadian phase relationships after morning versus evening carbohydrate-rich meals in humans. *J Biol Rhythms* 17(4):364-376.
- La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. 1999. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* 11(8):643-652.
- La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. 2001a. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes* 50(6):1237-1243.
- La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, van der Vliet J, Buijs RM. 2001b. Role for the pineal and melatonin in glucose homeostasis: pinealectomy increases night-time glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* 13(12):1025-1032.
- Lee KS, Lee WS, Suh SI, Kim SP, Lee SR, Ryoo YW, Kim BC. 2003. Melatonin reduces ultraviolet-B induced cell damages and polyamine levels in human skin fibroblasts in culture. *Exp Mol Med* 35(4):263-268.
- Lenzen S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51(2):216-226.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y et al. 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80:2587.
- Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. 1959. Structure of melatonin. *J Am Chem Soc* 81:6084-6092.

- Li XM, Beau J, Delagrangre P, Mocaer E, Levi F. 2004. Circadian rhythm entrainment with melatonin, melatonin receptor antagonist S22153 or their combination in mice exposed to constant light. *J Pineal Res* 37(3):176-184.
- Lopez A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lopez LC, Acuna-Castroviejo D. 2009. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 46(2):188-198.
- Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spegel P, Bugliani M, Saxena R, Fex M, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Nilsson P, Kuusisto J, Tuomilehto J, Boehnke M, Altshuler D, Sundler F, Eriksson JG, Jackson AU, Laakso M, Marchetti P, Watanabe RM, Mulder H, Groop L. 2009. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet* 41(1):82-88.
- Masana MI, Witt-Enderby PA, Dubocovich ML. 2003. Melatonin differentially modulates the expression and function of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors upon prolonged withdrawal. *Biochem Pharmacol* 65(5):731-739.
- Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, Reiter RJ. 2005. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 165(1-2):139-149.
- Mejean L, Bicakova-Rocher A, Kolopp M, Villaume C, Levi F, Debry G, Reinberg A, Drouin P. 1988. Circadian and ultradian rhythms in blood glucose and plasma insulin of healthy adults. *Chronobiol Int* 5(3):227-236.
- Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX. 1993. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 53(4):373-382.
- Mistlberger RE, Skene DJ. 2005. Nonphotic entrainment in humans? *J Biol Rhythms* 20(4):339-352.
- Mizukami H, Wada R, Koyama M, Takeo T, Suga S, Wakui M, Yagihashi S. 2008. Augmented beta cell loss and mitochondrial abnormalities in sucrose-fed GK rats. *Virchows Arch*.
- Moore RY. 1993. Organization of the primate circadian system. *J Biol Rhythms* 8 Suppl:S3-9.
- Moreira T, Cebers G, Pickering C, Ostenson CG, Efendic S, Liljequist S. 2007a. Diabetic Goto-Kakizaki rats display pronounced hyperglycemia and longer-lasting cognitive impairments following ischemia induced by cortical compression. *Neuroscience* 144(4):1169-1185.
- Moreira T, Malec E, Ostenson CG, Efendic S, Liljequist S. 2007b. Diabetic type II Goto-Kakizaki rats show progressively decreasing exploratory activity and learning impairments in fixed and progressive ratios of a lever-press task. *Behav Brain Res* 180(1):28-41.
- Morin D, Simon N, Depres-Brummer P, Levi F, Tillement JP, Urien S. 1997. Melatonin high-affinity binding to alpha-1-acid glycoprotein in human serum. *Pharmacology* 54(5):271-275.
- Movassat J, Bailbe D, Lubrano-Berthelie C, Picarel-Blanchot F, Bertin E, Mourot J, Portha B. 2008. Follow-up of GK rats during prediabetes highlights increased insulin action and fat deposition despite low insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(1):E168-175.
- Movassat J, Calderari S, Fernandez E, Martin MA, Escriva F, Plachot C, Gangnerau MN, Serradas P, Alvarez C, Portha B. 2007. Type 2 diabetes - a matter of failing beta-cell neogenesis? Clues from the GK rat model. *Diabetes Obes Metab* 9 Suppl 2:187-195.
- Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E. 2009. Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse organs regulating blood

- glucose. *Eur J Pharmacol* 606(1-3):61-71. Mühlbauer E und Peschke E. Uhrengene und ihre Bedeutung für die pankreatische Insel. In: Peschke E (Hrsg): *Endokrinologie II, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Verlag der Sächsischen Akademie zu Leipzig, In Kommission bei Hirzel S Stuttgart/Leipzig, 2005, S. 33-45.
- Mühlbauer E und Peschke E. 2007a. Funktionelle Beziehungen zwischen Melatonin und Insulin- Untersuchungsergebnisse an stoffwechselgesunden und diabetischen Ratten. In: Peschke E (Hrsg): *Endokrinologie II, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Verlag der Sächsischen Akademie zu Leipzig, In Kommission bei Hirzel S Stuttgart/Leipzig, S. 103-118.
- Mühlbauer E, Peschke E. 2007b. Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. *J Pineal Res* 42(1):105-106.
- Mühlbauer E, Wolgast S, Finckh U, Peschke D, Peschke E. 2004. Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett* 564(1-2):91-96.
- Mulder H, Nagorny CL, Lyssenko V, Groop L. 2009. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia* 52(7):1240-1249.
- Munoz-Hoyos A, Fernandez-Garcia JM, Molina-Carballo A, Macias M, Escames G, Ruiz-Cosano C, Acuna-Castroviejo D. 2000. Effect of clonidine on plasma ACTH, cortisol and melatonin in children. *J Pineal Res* 29(1):48-53.
- Nishida S. 2005. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine* 27(2):131-136.
- Nishida S, Sato R, Murai I, Nakagawa S. 2003. Effect of pinealectomy on plasma levels of insulin and leptin and on hepatic lipids in type 2 diabetic rats. *J Pineal Res* 35(4):251-256.
- Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S. 2002. Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity. *J Pineal Res* 32(1):26-33.
- Obersteiner H. 1888. *Anleitung zum Studium des Baues der nervösen Centralorgane im gesunden und kranken Zustande*. Deuticke, Leipzig.
- Ogneva VK, Nikolov BA. 1999. Immunohistochemical investigation of the hyperplastic islets of Langerhans from Zucker and Wistar rats. *Bulgarian Academy of Sciences, Experimental Pathology and Parasitology* (2).
- Ostenson CG, Chen J, Sheu L, Gaisano HY. 2007. Effects of palmitate on insulin secretion and exocytotic proteins in islets of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Pancreas* 34(3):359-363.
- Ostenson CG, Efendic S. 2007. Islet gene expression and function in type 2 diabetes; studies in the Goto-Kakizaki rat and humans. *Diabetes Obes Metab* 9 Suppl 2:180-186.
- Palazidou E, Papadopoulos A, Ratcliff H, Dawling S, Checkley SA. 1992. Noradrenaline uptake inhibition increases melatonin secretion, a measure of noradrenergic neurotransmission, in depressed patients. *Psychol Med* 22(2):309-315.
- Paulose JK, Peters JL, Karaganis SP, Cassone VM. 2009. Pineal melatonin acts as a circadian zeitgeber and growth factor in chick astrocytes. *J Pineal Res*.
- Paulus YM, Gariano RF. 2009. Diabetic retinopathy: a growing concern in an aging population. *Geriatrics* 64(2):16-20.
- Perreau-Lenz S, Pevet P, Buijs RM, Kalsbeek A. 2004. The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiol Int* 21(1):1-25.
- Peschke E. 2008. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res* 44(1):26-40.

- Peschke E. Über den phylogenetischen Funktionswandel des Pinealorgans und seine Bedeutung für die Insulinsekretion bei Mammalia. 2004. Sitzungsbericht der Sächs. Akad. Wiss, Math.-nat. Kl., Band 129, Heft 3. S. Hirzel, Stuttgart/Leipzig.
- Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E. 2006a. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. *J Pineal Res* 40(2):184-191.
- Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D. 2000. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* 28(3):156-164.
- Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Mühlbauer E. 2006b. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 40(2):135-143.
- Peschke E, Mühlbauer E, Musshoff U, Csernus VJ, Chankiewitz E, Peschke D. 2002. Receptor (MT(1)) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* 33(2):63-71.
- Peschke E, Peschke D. 1998. Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41(9):1085-1092.
- Peschke E, Peschke D, Hammer T, Csernus V. 1997. Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J Pineal Res* 23(3):156-163.
- Peschke E, Schucht H, Mühlbauer E. 2010. Long-term enteral administration of melatonin reduces plasma insulin and increases expression of pineal insulin receptors in both Wistar and type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Pineal Res* 49:373-381.
- Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer E. 2007. Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res* 42(4):350-358.
- Peschke E, Stumpf I und Mühlbauer E. Rezeptorvermittelte Einflüsse von Melatonin auf die second messenger cAMP, cGMP und IP3 pankreatischer  $\beta$ -Zellen sowie Insulin-Melatonin-Interaktionen. In: Peschke E (Hrsg): *Endokrinologie IV, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Verlag der Sächsischen Akademie zu Leipzig, In Kommission bei Hirzel S Stuttgart/Leipzig, 2009, S. 45-62.
- Peschke E, Wolgast S, Bazwinsky I, Ponicke K, Mühlbauer E. 2008. Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. *J Pineal Res* 45(4):439-448. Mühlbauer E und Peschke E. Uhrengene und ihre Bedeutung für die pankreatische Insel. In: Peschke E (Hrsg): *Endokrinologie II, Vorträge im Rahmen des Projekts „Zeitstrukturen endokriner Systeme“*. Verlag der Sächsischen Akademie zu Leipzig, In Kommission bei Hirzel S Stuttgart/Leipzig, 2005, S. 33-45.
- Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J. 2002a. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res* 33(3):172-177.
- Picinato MC, Haber EP, Cipolla-Neto J, Curi R, de Oliveira Carvalho CR, Carpinelli AR. 2002b. Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 33(3):156-160.
- Plachot C, Portha B. 2001. Impaired pancreatic duct-cell growth in focal areas of regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Histochem J* 33(3):141-147.
- Poeggeler B, Thuermann S, Dose A, Schoenke M, Burkhardt S, Hardeland R. 2002. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J Pineal Res* 33(1):20-30.

- Poitout V, Robertson RP. 2002. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143(2):339-342.
- Portha B. 2005. Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes Metab Res Rev* 21(6):495-504.
- Portha B, Lacraz G, Kergoat M, Homo-Delarche F, Giroix MH, Bailbe D, Gangnerau MN, Dolz M, Turrel-Cuzin C, Movassat J. 2008. The GK rat beta-cell: A prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes? *Mol Cell Endocrinol*.
- Prasai MJ, George JT, Scott EM. 2008. Molecular clocks, type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diab Vasc Dis Res* 5(2):89-95.
- Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, Loos RJ, Manning AK, Jackson AU, Aulchenko Y, Potter SC, Erdos MR, Sanna S, Hottenga JJ, Wheeler E, Kaakinen M, Lyssenko V, Chen WM, Ahmadi K, Beckmann JS, Bergman RN, Bochud M, Bonnycastle LL, Buchanan TA, Cao A, Cervino A, Coin L, Collins FS, Crisponi L, de Geus EJ, Dehghan A, Deloukas P, Doney AS, Elliott P, Freimer N, Gateva V, Herder C, Hofman A, Hughes TE, Hunt S, Illig T, Inouye M, Isomaa B, Johnson T, Kong A, Krestyaninova M, Kuusisto J, Laakso M, Lim N, Lindblad U, Lindgren CM, McCann OT, Mohlke KL, Morris AD, Naitza S, Orru M, Palmer CN, Pouta A, Randall J, Rathmann W, Saramies J, Scheet P, Scott LJ, Scuteri A, Sharp S, Sijbrands E, Smit JH, Song K, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Tuomi T, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Voight BF, Waterworth D, Wichmann HE, Willemsen G, Witteman JC, Yuan X, Zhao JH, Zeggini E, Schlessinger D, Sandhu M, Boomsma DI, Uda M, Spector TD, Penninx BW, Altshuler D, Vollenweider P, Jarvelin MR, Lakatta E, Waeber G, Fox CS, Peltonen L, Groop LC, Mooser V, Cupples LA, Thorsteinsdottir U, Boehnke M, Barroso I, Van Duijn C, Dupuis J, Watanabe RM, Stefansson K, McCarthy MI, Wareham NJ, Meigs JB, Abecasis GR. 2009. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet* 41(1):77-81.
- Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangue P, Renard P, Casteilla L, Penicaud L. 2003. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology* 144(12):5347-5352.
- Puchalski SS, Green JN, Rasmussen DD. 2003. Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age. *Endocrine* 21(2):163-167.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313(4):856-862.
- Radziuk J, Pye S. 2006. Diurnal rhythm in endogenous glucose production is a major contributor to fasting hyperglycaemia in type 2 diabetes. Suprachiasmatic deficit or limit cycle behaviour? *Diabetologia* 49(7):1619-1628.
- Rajaratnam SM, Redman JR. 1997. Effects of daily melatonin administration on circadian activity rhythms in the diurnal Indian palm squirrel (*Funambulus pennanti*). *J Biol Rhythms* 12(4):339-347.
- Rakovac I, Plank J, Jeitler K, Beck P, Seereiner S, Mrak P, Bauer B, Pieber TR. 2009. [Health status of type 2 diabetics in Austria - perspective of a quality improvement initiative.]. *Wien Med Wochenschr* 159(5-6):126-133.
- Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE, Brereton H, Sugden D, Huang GC, Amiel SA, Jones PM, Persaud SJ. 2008. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res* 44(3):273-279.
- Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM, Matsumoto AM. 1999. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140(2):1009-1012.

- Rasmussen DD, Mitton DR, Larsen SA, Yellon SM. 2001. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J Pineal Res* 31(1):89-94.
- Redlin U, Mrosovsky N. 1997. Exercise and human circadian rhythms: what we know and what we need to know. *Chronobiol Int* 14(2):221-229.
- Report of a WHO/IDF consultation. 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia.
- Reppert SM. 1997. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms* 12(6):528-531.
- Reppert SM, Weaver DR. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901):935-941.
- Reppert SM, Weaver DR, Godson C. 1996. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17(3):100-102.
- Reyes-Toso CF, Rebagliati IR, Ricci CR, Linares LM, Albornoz LE, Cardinali DP, Zaninovich A. 2006. Effect of melatonin treatment on oxygen consumption by rat liver mitochondria. *Amino Acids* 31(3):299-302.
- Rich SS, Onengut-Gumuscu S, Concannon P. 2009. Recent progress in the genetics of diabetes. *Horm Res* 71 Suppl 1:17-23.
- Rios-Lugo MJ, Cano P, Jimenez-Ortega V, Fernandez-Mateos MP, Scacchi PA, Cardinali DP, Esquifino AI. Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *J Pineal Res*.
- Rivero A, Mora C, Muros M, Garcia J, Herrera H, Navarro-Gonzalez JF. 2009. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 116(6):479-492.
- Robeva R, Kirilov G, Tomova A, Kumanov P. 2008. Melatonin-insulin interactions in patients with metabolic syndrome. *J Pineal Res* 44(1):52-56.
- Roky R, Houti I, Moussamih S, Qotbi S, Aadil N. 2004. Physiological and chronobiological changes during Ramadan intermittent fasting. *Ann Nutr Metab* 48(4):296-303.
- Ronnett GV, Knutson VP, Lane MD. 1982. Insulin-induced down-regulation of insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered rate of receptor inactivation. *J Biol Chem* 257(8):4285-4291.
- Satoh K, Keimatsu N, Kanda M, Kasai T, Takaguri A, Sun F, Ichihara K. 2005. HMG-CoA reductase inhibitors do not improve glucose intolerance in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biol Pharm Bull* 28(11):2092-2095.
- Scalera G., Di Bella L, Rossi MT, Tarozzi G. 1979. Preference changes following dehydration. Sour, bitter, and sweet preferences. *Boll Soc Ital Biol Sper* 55(23):2444-2448.
- Scalera. 1992. Taste preferences, body weight gain, food and fluid intake in singly or group-housed rats. *Physiol Behav* 52(5): 935-943.
- Schomerus C, Korf HW. 2005. Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann N Y Acad Sci* 1057:372-383.
- Sena CM, Barosa C, Nunes E, Seica R, Jones JG. 2007. Sources of endogenous glucose production in the Goto-Kakizaki diabetic rat. *Diabetes Metab* 33(4):296-302.
- Sener A, Malaisse-Lagae F, Ostenson CG, Malaisse WJ. 1993. Metabolism of endogenous nutrients in islets of Goto-Kakizaki (GK) rats. *Biochem J* 296 (Pt 2):329-334.
- She M, Deng X, Guo Z, Laudon M, Hu Z, Liao D, Hu X, Luo Y, Shen Q, Su Z, Yin W. 2009. NEU-P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats. *Pharmacol Res* 59(4):248-253.
- Shima T, Chun SJ, Niijima A, Bizot-Espiard JG, Guardiola-Lemaitre B, Hosokawa M, Nagai K. 1997. Melatonin suppresses hyperglycemia caused by

- intracerebroventricular injection of 2-deoxy-D-glucose in rats. *Neurosci Lett* 226(2):119-122.
- Simonneaux V, Ribelayga C. 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55(2):325-395.
- Slotten HA, Pitrosky B, Pevet P. 1999. Influence of the mode of daily melatonin administration on entrainment of rat circadian rhythms. *J Biol Rhythms* 14(5):347-353.
- Sparso T, Bonnefond A, Andersson E, Bouatia-Naji N, Holmkvist J, Wegner L, Grarup N, Gjesing AP, Banasik K, Cavalcanti-Proenca C, Marchand M, Vaxillaire M, Charpentier G, Jarvelin MR, Tichet J, Balkau B, Marre M, Levy-Marcha C, Faerch K, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Madsbad S, Poulsen P, Vaag A, Dina C, Hansen T, Pedersen O, Froguel P. 2009. The G-allele of intronic rs10830963 in MTNR1B confers increased risk of impaired fasting glycemia and type 2 diabetes through an impaired glucose-stimulated insulin release: studies involving 19,605 Europeans. *Diabetes*.
- Srinivasan K, Ramarao P. 2007. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 125(3):451-472.
- Staiger H, Machicao F, Schafer SA, Kirchhoff K, Kantartzis K, Guthoff M, Silbernagel G, Stefan N, Haring HU, Fritsche A. 2008. Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS ONE* 3(12):e3962.
- Starka L, Duskova M, Racz B, Simunkova K, Hill M, Kancheva R. 2008. Melatonin negatively correlates with C-peptide after food intake. *Physiol Res* 57 Suppl 1:S187-192.
- Stehle JH, von Gall C, Schomerus C, Korf HW. 2001. Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms* 16(4):312-325.
- Stephan FK, Zucker I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(6):1583-1586.
- Stumpf I, Bazwinsky I, Peschke E. 2009. Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 46(2):140-147.
- Stumpf I, Mühlbauer E, Peschke E. 2008. Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 45(3):318-327.
- Suckale J, Solimena M. 2008. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci* 13:7156-7171.
- Takita S, Wakamoto Y, Kunitsugu I, Sugiyama S, Okuda M, Houbara T. 2004. Altered tissue concentration of minerals in spontaneous diabetic rats (Goto-Kakizaki rats). *J Toxicol Sci* 29(3):195-199.
- Tannenbaum MG, Reiter RJ, Vaughan MK, Troiani ME, Gonzalez-Brito A. 1988. Effects of short-term cold exposure on pineal biosynthetic function in rats. *Cryobiology* 25(3):227-232.
- Tourrel 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 beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes* 51(5):1443-1452.
- Tsuura Y, Ishida H, Okamoto Y, Kato S, Sakamoto K, Horie M, Ikeda H, Okada Y, Seino Y. 1993. Glucose sensitivity of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels is impaired in beta-cells of the GK rat. A new genetic model of NIDDM. *Diabetes* 42(10):1446-1453.
- Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. 2005. Obesity

- and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308(5724):1043-1045.
- Tutuncu NB, Batur MK, Yildirim A, Tutuncu T, Deger A, Koray Z, Erbas B, Kabakci G, Aksoyek S, Erbas T. 2005. Melatonin levels decrease in type 2 diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy. *J Pineal Res* 39(1):43-49.
- Vallejo M, Gosse ME, Beckman W, Habener JF. 1995. Impaired cyclic AMP-dependent phosphorylation renders CREB a repressor of C/EBP-induced transcription of the somatostatin gene in an insulinoma cell line. *Mol Cell Biol* 15(1):415-424.
- Van Someren EJ, Riemersma-Van Der Lek RF. 2007. Live to the rhythm, slave to the rhythm. *Sleep Med Rev* 11(6):465-484.
- Vasicek CA, Malpoux B, Fleming PA, Bennett NC. 2005. Melatonin secretion in the Mashona mole-rat, *Cryptomys darlingi*--influence of light on rhythmicity. *Physiol Behav* 83(5):689-697.
- Vitte PA, Harthe C, Lestage P, Claustrat B, Bobillier P. 1988. Plasma, cerebrospinal fluid, and brain distribution of <sup>14</sup>C-melatonin in rat: a biochemical and autoradiographic study. *J Pineal Res* 5(5):437-453.
- von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. 2002. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309(1):151-162.
- Wakabayashi H, Shimada K, Satoh T. 1991. Effects of diazepam administration on melatonin synthesis in the rat pineal gland in vivo. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 39(10):2674-2676.
- Wallis RH, Collins SC, Kaisaki PJ, Argoud K, Wilder SP, Wallace KJ, Ria M, Ktorza A, Rorsman P, Bihoreau MT, Gauguier D. 2008. Pathophysiological, genetic and gene expression features of a novel rodent model of the cardio-metabolic syndrome. *PLoS ONE* 3(8):e2962.
- Warwar N, Efendic S, Ostenson CG, Haber EP, Cerasi E, Neshier R. 2006. Dynamics of glucose-induced localization of PKC isoenzymes in pancreatic beta-cells: diabetes-related changes in the GK rat. *Diabetes* 55(3):590-599.
- Weckbach S, Findeisen HM, Schoenberg SO, Kramer H, Stark R, Clevert DA, Reiser MF, Parhofer KG. 2009. Systemic cardiovascular complications in patients with long-standing diabetes mellitus: comprehensive assessment with whole-body magnetic resonance imaging/magnetic resonance angiography. *Invest Radiol* 44(4):242-250.
- Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML. 1998. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 139(7):3064-3071.
- Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD. 2000. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology* 141(2):487-497.
- Yeleswaram K, McLaughlin LG, Knipe JO, Schabdach D. 1997. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. *J Pineal Res* 22(1):45-51.

## 8 Thesen

1. In den zurückliegenden 15 Jahren wurde ein enger Zusammenhang zwischen Melatonin und Insulin festgestellt.
2. Die vorliegende Arbeit dient dem Ziel, den Einfluss von Melatonin sowohl auf stoffwechselgesunde als auch auf Typ2-diabetische Ratten zu untersuchen.
3. Zu diesem Zweck wurden 16 stoffwechselgesunde Wistar- und 16 Typ2-diabetische GK-Ratten einer enteralen Melatoninapplikation (64 Tage) durch das Trinkwasser unterzogen.
4. Die Versuchstiere wurden unter einem starren Lichtregime gehalten (L:D = 12:12, Licht an: 5:30 MEZ), die Melatoninapplikation mit dem Trinkwasser erfolgte immer während der Dunkelzeit.
5. Versuchsbegleitend wurden folgende Merkmale erfasst: Trinkmengen, Futtermengen und das Körpergewicht.
6. Nach der Tiertötung in der Mitte der Dunkelperiode wurden zeitgleich Epiphysen, Pankreata sowie das Blutplasma asserviert.
7. Die Blutglukosekonzentration wurde mit einem Biosensor-Glukosemeter bestimmt.
8. Im Plasma wurde mittels RIA die Insulin- und die Melatoninkonzentration bestimmt.
9. In den Pankreata wurden folgende Merkmale mittels PCR bestimmt: MT<sub>1</sub>-, MT<sub>2</sub>-, Insulin-, Glukagon-, Glucokinase-mRNA-Expression; und weitere mittels Immunhistochemie zur Darstellung gebracht: Insulin, Glukagon, Somatostatin, GLUT2.
10. In den Epiphysen wurden folgende Merkmale mittels PCR bestimmt: Insulinrezeptor-, AA-NAT-mRNA-Expression.

11. Nach der Melatoninbehandlung wurden erniedrigte Trinkmengen von Wistar- sowie von GK-Ratten während der Dunkelzeit registriert. Die Futteraufnahme war bei den GK-Ratten ( $23,09 \pm 0,27$  g) im Vergleich zu den Wistar-Ratten ( $24,02 \pm 0,38$  g) erniedrigt ( $p < 0,01$ ). Die Melatoninapplikation bewirkte eine Reduktion der Futteraufnahme von Wistar-Ratten ( $p < 0,01$ ;  $22,78 \pm 0,40$  g), nicht jedoch von GK-Ratten ( $22,54 \pm 0,28$ ). Auch die Körpergewichte von stoffwechselgesunden Wistar-Ratten (Kontrollen:  $384,8 \pm 6,14$  g; Melatonin-behandelt:  $354,8 \pm 7,95$  g), nicht jedoch der Typ2-diabetischen GK-Ratten (Kontrollen:  $23,09 \pm 0,27$  g; Melatonin-behandelt:  $385,3 \pm 4,37$  g) wurden durch die Melatoninapplikation statistisch signifikant gesenkt ( $p < 0,01$ ).
12. Erwartungsgemäß wiesen die normoglykämischen Wistar-Ratten Glukosewerte von  $6,68 \pm 0,17$  mmol/l und die Typ2-diabetischen GK-Ratten von  $10,47 \pm 0,69$  mmol/l auf. Die Melatoninbehandlung hatte keine wesentliche Auswirkung auf die Glukosekonzentrationen im Blut von Wistar-Ratten ( $6,65 \pm 0,16$  mmol/l) und von GK-Ratten ( $9,76 \pm 0,57$  mmol/l).
13. Folgende Ergebnisse wurden im Plasma erzielt: Die Melatoninkonzentration der melatoninbehandelten Wistar- ( $30,74 \pm 6,29$  nmol/l) und GK-Ratten ( $17,16 \pm 3,92$  nmol/l) überstieg diejenige von den Wistar-Kontrollen ( $0,68 \pm 0,11$  nmol/l) bzw. GK-Kontrollen ( $1,65 \pm 0,50$  nmol/l) ca. 370-fach bzw. 11-fach. Es wurde festgestellt, dass die GK-Ratte der Halleschen Kolonie im Alter von ca. 120 Tagen eine Hyperinsulinämie aufweist ( $309,30 \pm 19,55$  pmol/l) während die Wistar-Ratte normoinsulinämisch bleibt ( $160,5 \pm 10,99$  pmol/l). Die chronische Melatoninapplikation hatte eine Senkung der Insulinspiegel im Plasma der metabolisch unauffälligen Wistar-Ratten ( $123,30 \pm 10,89$  pmol/l) sowie der hyperinsulinämischen GK-Ratten ( $272,90 \pm 19,91$  pmol/l) zu Folge.

14. Die Pankreasuntersuchung erbrachte folgende Ergebnisse:

- a. Das pankreatische Insulin-mRNA-Expressionsniveau von unbehandelten bzw. Melatonin-behandelten GK-Ratten lag deutlich über dem von unbehandelten bzw. Melatonin-behandelten Wistar-Ratten,  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ .
- b. Demgegenüber war die mRNA-Expression von Glukagon in den pankreatischen Inseln von unbehandelten bzw. Melatonin-behandelten GK-Ratten gegenüber der von unbehandelten bzw. Melatonin-behandelten Wistar-Ratten herabreguliert,  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ .
- c. Weiterhin wurden anhand immunhistochemischer Aufarbeitung der Pankreata die unterschiedlichen Verteilungsmuster der untersuchten Inselhormone dargestellt.
- d. Der Glukosesensorkomplex von Wistar- sowie GK-Ratten bleibt von der chronischen Melatoninapplikation unbeeinflusst, denn es zeigt sich ein erhöhtes pankreatisches GLUT2- sowie Glucokinase-mRNA-Expressionsniveau von unbehandelten bzw. Melatonin-behandelten Wistar-Ratten gegenüber den unbehandelten bzw. Melatonin-behandelten GK-Ratten.
- e. Während die pankreatische  $MT_1$ -mRNA-Expression keine wesentlichen quantitativen Unterschiede unter den Versuchsgruppen zeigt, ist die pankreatische  $MT_2$ -mRNA-Expression von Kontroll-GK-Ratten im Vergleich zu den Kontroll-Wistar-Ratten heraufreguliert ( $p < 0,05$ ). Die Melatoninapplikation führte zur Hochregulierung der pankreatischen  $MT_2$ -mRNA-Expression von Wistar-Ratten ( $p < 0,05$ ).

15. Die Untersuchung der Epiphysen erbrachte folgende Ergebnisse:

- a. Die endogene Melatoninbiosynthese wird von einer chronischen exogenen enteralen Melatoninapplikation mit dem Trinkwasser nicht beeinflusst, da sich keine quantitativen Alterationen der pinealen AA-NAT-mRNA-Expression, des Schlüsselenzyms der Melatoninsynthese, zeigen.
- b. In Anbetracht der Insulinrezeptor-mRNA-Expression in der Epiphyse sowie einer herabregulierten Insulinrezeptor-mRNA-Expression von Melatonin-behandelten Wistar-Ratten nach chronischer Melatoninapplikation ist die Existenz einer Rückkopplung von Insulin am Pinealorgan anzunehmen.

16. Im Ergebnis der einzelnen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Melatonin im Tierversuch einen nachhaltigen Einfluss auf die Insulinsekretion hat, indem es die Insulinsekretion hemmt. Dieser Befund wurde mit geringen quantitativen Unterschieden sowohl bei normoglykämischen Wistar-Ratten als auch bei Typ2 diabetischen GK-Ratten festgestellt.
17. Der geschilderte Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion wird durch Melatoninrezeptoren mediiert, über die das Pankreas verfügt.
18. Der Einfluss von Melatonin auf die Glukosespiegel ist eher marginal, hier wurden keine statistisch signifikanten Änderungen der Blutglukose nach der Melatoninapplikation gefunden.
19. Insgesamt kann durch die vorliegende Arbeit festgestellt werden, dass aus der Literatur bekannte Antagonismen zwischen Melatonin und Insulin auch *intra vitam* bei der Wistar-Ratte, und erstmalig bei der Typ2-diabetischen GK-Ratte, bestätigt werden konnten. Auch wenn Erklärungsversuche für die funktionelle Bedeutung dieser Melatonin-Insulin-Antagonismen bislang nur präliminären Charakters sein können, spricht viel dafür, dass Melatonin eine Schutzfunktion für die pankreatische  $\beta$ -Zelle darstellt, da Melatonin hyperinsulinämische Entgleisungen, wie sie typischerweise bei T2DM vorkommen, reduziert.

## **Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne Hilfe Dritter erfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen wissentlich direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle an der Saale, 6.1.2011

Helena Schucht

## Lebenslauf von Helena Schucht

geb. Šůcha, am 14.11.1983 in Rokycany/Tschechische Republik.

**Ausbildung:** 1995-2003: Gymnasium in Rokycany, Tschechische Republik  
2003: Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg (MLU)  
2005: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2009 Hammerexamen

**Famulaturen:** Innere Medizin/ Pulmologie

- Diakoniekrankenhaus  
Halle/ Saale, Deutschland

Innere Medizin/ Kardiologie

- Praxis Dr.med. Hahnemann  
Halle/ Saale, Deutschland

Pathologie

- MLU  
Halle/ Saale, Deutschland

Augenheilkunde

- Praxis Dr. med. Schobeß  
Halle/ Saale, Deutschland
- Praxis Prof. Dr. med. Werry  
Celle, Deutschland
- Klinik für Augenheilkunde,  
MLU, Halle/ Saale, Deutschland

**Praktisches Jahr:** August 2008 bis Juli 2009

- 1. Terial: Innere Medizin im  
Kantonspital Zug, Zug, Schweiz
- 2. Terial: Chirurgie im  
Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara,  
Halle/Saale, Deutschland
- 3. Terial: Augenheilkunde an der  
MLU, Halle/ Saale, Deutschland

**Ärztliche Tätigkeit:** Seit Januar 2010 Weiterbildung zur Fachärztin für Innere  
Medizin, akademisches Lehrkrankenhaus der MLU Halle-  
Wittenberg, Paul Gerhardt Diakonie Krankenhaus, Lutherstadt  
Wittenberg.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Realisierung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. Elmar Peschke für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung aller zur Durchführung meiner Promotion erforderlichen Daten, materiellen Voraussetzungen und die stets umfangreiche und persönliche Unterstützung bei der Bearbeitung der Aufgabenstellungen.

Ich danke Herrn Dr. Eckhard Mühlbauer (Leiter der Arbeitsgruppe „Zeitstrukturen endokriner Systeme“ der Sächsischen Akademie zu Leipzig), der stets zu einem fruchtbaren Gedankenaustausch bereit war und mir die Arbeit durch konstruktive Hinweise erleichterte.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus auch bei allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. Peschke für ihre unkomplizierte Hilfe bei fachlichen und organisatorischen Problemen. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Ivonne Bazwinsky-Wutschke für die Unterstützung bei der Bearbeitung der immunhistochemischen Fragestellungen. Dr. Liudmila Litvak, Frau Candy Rothgänger und Annika Jordan danke ich für die technische Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen.

Ohne die ausdauernde und vielseitige Unterstützung meiner Familie wäre die Umsetzung dieser Arbeit kaum möglich gewesen.