

Silke Anja Schäfer
Dr. med.

Die Effekte von K-111, einem Antidiabetikum, auf Leberperoxisomen der Cynomolgus Affen

Geboren am 26.03.1977 in Karlsruhe
Staatsexamen am 11.05.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Prof. Dr. med H. Dariush Fahimi

In der Arbeit wurden die durch K-111 ausgelösten Veränderungen der Leber an Cynomolgus Affen untersucht, insbesondere im Hinblick auf Veränderungen der Peroxisomen und ihrer Proteine. Bereits die qualitative Analyse der DAB-gefärbten Schnitte (zur Darstellung der Katalase-Aktivität) wies auf eine Peroxisomenproliferation hin. Dies wurde in morphometrischen Untersuchungen an immunzytochemischen Präparaten, die mit einem Antikörper gegen Katalase inkubiert und mit IgG-Gold-Silber gefärbt wurden, bestätigt. Diese zeigten eine moderate, jedoch statistisch signifikante dosisabhängige Proliferation der Peroxisomen in männlichen und weiblichen Cynomolgus-Affen. Die Dosis-abhängigkeit war bei den männlichen Tieren noch etwas deutlicher ausgeprägt als bei den weiblichen Tieren. Die Tiere der 20 mg/kg/Tag Nachbehandlungsstudie zeigten vier Wochen nach Absetzung der Behandlung in beiden Geschlechtern einen Rückgang der peroxisomalen Volumendichte. Im Vergleich zu den Kontrolltiergruppen blieb der peroxisomale Volumenanteil jedoch noch deutlich erhöht. Insgesamt belegen unsere morphologischen und morphometrischen Untersuchungen eine deutliche Proliferation der Leberperoxisomen bei den Cynomolgus-Affen, die mit K-111 behandelt wurden.

Diese morphologischen Ergebnisse wurden in biochemischen Studien, die an Leberhomogenaten der gleichen Tiere mittels Immuno- (Western-) blotting durchgeführt wurden, klar bestätigt. Eine dosisabhängige Steigerung des multifunktionellen Proteins (Hydratase-Dehydrogenase-Isomerase) um 500 % bei den männlichen und um 300 % bei den weiblichen Tieren konnte festgestellt werden. Die Acyl-CoA Oxidase war sowohl bei männlichen Tieren wie auch bei den weiblichen Tieren um etwa 200 % gesteigert. Interessanterweise war Katalase in allen behandelten Affen kaum oder nur sehr geringfügig verändert. Eine Analyse des nukleären Transkriptionsfaktors PPAR α mittels Immunoblotting ergab ähnlich wie bei Katalase keine bedeutenden Veränderungen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. In der Nachbeobachtungsstudie wurde festgestellt, dass vier Wochen nach Absetzung der Behandlung mit der höchsten Dosis von K-111 die Proteinmenge der untersuchten β -Oxidationsenzyme zwar wieder rückgängig war, jedoch noch deutlich oberhalb der Werte der Kontrolltiere lag. Dies entspricht den Ergebnissen der morphometrischen Analyse.

Zur Darstellung des Verteilungsverhaltens der einzelnen Proteine innerhalb der Leberläppchen wurden darüber hinaus immunhistochemische Studien an Paraffinschnitten durchgeführt. Dabei konnte interessanterweise in den mit K-111 behandelten Tieren eine veränderte zonale Läppchenverteilung für Katalase, PPAR α , AOX, am deutlichsten ausgeprägt für PH nachgewiesen werden. Während in den Kontrolltiergruppen sowohl für Katalase wie auch für PPAR α ein einheitliches Expressionsmuster vorhanden war, zeigten die behandelten Tiere ein zonal heterogenes Expressionsmuster mit vornehmlich stärkerer zytoplasmatischer Antigenexpression im perizentralen Bereich der Leberläppchen. Dieses zonal heterogene Verteilungsmuster war interessanterweise in den Tieren der 5 und 10 mg/kg/Tag Versuchstiergruppen am deutlichsten ausgeprägt. Außerdem war es bei den

weiblichen Tieren deutlich stärker nachweisbar als bei den männlichen Tieren; nach der vierwöchigen Nachbeobachtungsstudie war es bemerkenswerterweise nicht mehr nachweisbar.

Anhand von DAB-gefärbten Gewebeschnitten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit K-111 eine dosisabhängige Aktivitätsumverteilung der Katalase stattfand, insofern die Nuklei der Hepatozyten mit zunehmender Dosierung eine abnehmende Katalasekernaktivität aufwiesen. Am deutlichsten ausgeprägt war dies in der 20 mg/kg/Tag Versuchstiergruppe, wo nur noch eine sehr geringe DAB-Positivität der Kerne nachweisbar war. Diese durch K-111 induzierte Katalaseaktivitätsumverteilung war nach Absetzen der Behandlung wieder vollständig reversibel und bei den Tieren der Nachbeobachtungsstudie nicht mehr auffindbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben einen Einblick in das Toxizitätsprofil von K-111 bei nicht humanen Primaten, insbesondere im Hinblick auf peroxisomale Veränderungen. Es konnte gezeigt werden, dass K-111 als Peroxisomenproliferator wirksam ist, was schon an Hand von Studien an Nagern vermutet wurde. Ebenso konnte eine Induktion peroxisomaler Proteine bestätigt werden. Sowohl die Peroxisomenproliferation als auch die Proteininduktion zeigten eine eindeutige Dosisabhängigkeit und waren deutlich geringer ausgeprägt, als dies für K-111 an Nagern beschrieben wurde. In Anbetracht der sehr niedrigen therapeutischen effektiven Dosis von K-111, im Vergleich zu den Fibraten, wird K-111 höchstwahrscheinlich in klinischen Studien keine Gefährdung im Zusammenhang mit Peroxisomenproliferation darstellen.