

**Aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie
und Toxikologie der Universität zu Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. med. P. Dominiak

**Der Einfluss von Angiotensin II auf die
Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
bei leptinresistenten Zucker Ratten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Nora Schweitzer

aus Düren

Lübeck 2007

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2007

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.12.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
I. Einleitung	1
II. Methoden	10
1. Material	10
1.1. Chemikalien	10
1.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien	10
1.3. Software	12
2. Tiere	13
3. Methoden	13
3.1. Füllen der Minipumpen	13
3.2. Zeitplan	14
3.3. Gewichts- und Längenmessung und Berechnung des Body-Maß-Index	14
3.4. Pumpenimplantation	14
3.5. Blutzuckermessung	15
3.6. Katheterisierung	15
3.7. Katheterspülung	16
3.8. Blutdruck- und Blutzucker-Messung	16
3.9. CRH-Test	16
3.10. Organentnahme	17
3.11. Real time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)	18
3.12. photomertrische Glukosebestimmung	20
3.13. Glykogenbestimmung in der Leber	21
3.14. Radioimmunassays zur Bestimmung von Ang II, Corticosteron, ACTH, Aldosteron und Insulin	22
4. Statistik	22
5. Abkürzungen	24
III. Ergebnisse	25
1. Basale Werte	25
2. Die basale Aktivität der Stressachse	27
3. Die Reaktivität der HPA-Achse	29
4. Einfluss auf die Expression von Angiotensin Rezeptoren, CRH und POMC in Organen der HPA-Achse	34

IV. Diskussion.....	36
V. Zusammenfassung	45
VI. Referenzen	46
VII. Danksagung.....	56
VIII. Lebenslauf	57

I. Einleitung

Diabetes mellitus Typ 2 ist eine Erkrankung mit drastisch steigender Prävalenz. Besonders in den Wohlstandsländern wird Diabetes mellitus und das damit vergesellschaftete metabolische Syndrom (Symptomenkomplex mit Adipositas, arterieller Hypertonie, Dyslipoproteinämie und gestörtem Kohlenhydratstoffwechsel) zu einer Volkskrankheit. Global leiden 150 Millionen Menschen an Diabetes, bis zum Jahre 2025 wird sich die Zahl voraussichtlich verdoppeln (King et al., 1998). In Deutschland wird die Prävalenz auf 5-8% geschätzt. Typ 2 Diabetes führt zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität. (Balkau et al., 1997; Panzram and Zabel-Langhennig, 1981; Schneider et al., 1993). Typische Folgekrankheiten wie diabetische Retinopathie, diabetische Nephropathie und Polyneuropathie beruhen auf einer Mikro- und Makroangiopathie.

Risikofaktoren für Typ 2 Diabetes sind vor allem mangelnde körperliche Aktivität, hohes Alter, eine positive Familienanamnese und Stammfettsucht, die mit Insulinresistenz und reaktiver Hyperinsulinämie einhergeht und besonders als unabhängiger Risikofaktor zu betonen ist (Bonadonna and De Fronzo, 1991; Carey et al., 1997; Kissebah et al., 1982; Morris et al., 1989; Standl, 1995). Die Therapie des Typ 2 Diabetes beginnt mit einer gewichtsreduzierenden Diät und körperlicher Betätigung. Laut WHO (World Health Organisation) kommen aber 40% der Patienten nicht ohne orale Antidiabetika aus (Sulfonylharnstoffe, Glinide, Insulinsensitizer, Biguanide, Acarbose), weitere 40% der Patienten mit Typ 2 Diabetes sind insulinpflichtig.

Laut der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) beruht der Pathomechanismus des Typ 2 Diabetes im Wesentlichen auf 1.) einer gestörten Insulinsekretion und oder 2.) einer Insulinresistenz der Zielgewebe Skelettmuskel, Leber und Fettgewebe. Bei einem zu niedrigem Insulinspiegel oder bei mangelndem Ansprechen auf Insulin gelangt Glukose nicht ausreichend über insulinabhängige Glukosetransporter (GLUT4) in Muskel- und Fettzellen. Die Folge ist eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels. Nach der allgemeinen Lehrmeinung liegen die Störungen im Regelkreis β -Zelle des Pankreas, Muskelzelle und Fettgewebe.

Diese konventionelle Erklärung der Pathogenese lässt jedoch einige Fragen offen. So kann das metabolische Syndrom in seiner Gesamtheit, mit dem der Typ 2 Dia-

betes sehr häufig einhergeht, durch diesen Ansatz nur unzureichend erklärt werden. Will man versuchen, die Genese des metabolischen Syndroms als eigene Krankheit zu erklären, muss ein anderer Ansatz gewählt werden.

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass eine Dysregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) eine zentrale Rolle in der Pathogenese des metabolischen Syndroms spielt. Erhöhte Werte von ACTH und Glukokortikoiden, vermehrte Expression von CRH mRNA und eine verminderte negative Feedback-Sensitivität weisen auf eine Überaktivität der HPA-Achse im Rahmen des metabolischen Syndroms hin (Chan et al., 2001; Chan et al., 2002).

Im Hypothalamus synthetisieren Neuronen im Nucleus paraventricularis (PVN) CRH (Corticotropin Releasing Hormone) und Vasopressin. Darüber hinaus wird hier das sympathische Nervensystem (SNS) aktiviert, welches im Nebennierenmark die Sekretion von Katecholaminen, v.a. Adrenalin stimuliert und zu einer Hemmung der Glukoseaufnahme in die Zelle führt. CRH gelangt über das portale Gefäßsystem in die Adenohypophyse, in der es die Sekretion von ACTH (Adrenocorticotropin) bewirkt. ACTH wird von POMC-Zellen (Proopiomelanokortinzellen) synthetisiert. Diese Zellen sezernieren Proopiomelanokortin (POMC). Aus diesem Peptid wird ACTH enzymatisch abgespalten und gelangt in den Blutkreislauf (Mountjoy and Wong, 1997). In der Zona fasciculata der Nebennierenrinde (NNR) stimuliert es die Synthese und Sekretion von Glukokortikoiden (Cortisol beim Menschen bzw. Corticosteron bei der Ratte) (De Kloet et al., 1998). Glukokortikoide sind Stresshormone, die im Falle einer Kampf- oder Fluchtsituation und in Hungerperioden überlebenswichtige Glukose bereitstellen. Zu diesem Zweck werden andere Moleküle in Glukose umgebaut. Glukokortikoide wirken eiweißkatabol und antianabol. Besonders im Muskel werden Proteine zu Aminosäuren abgebaut, um daraus in der Leber Glukose zu synthetisieren. Die dafür nötigen Enzyme werden durch Glukokortikoide induziert. Der Aminosäuretransport in die Muskelzelle wird gehemmt und so Muskelproteine vermindert synthetisiert. Cortisol bzw. Corticosteron stimuliert die Spaltung von Triglyzeriden, so dass der Fettsäurespiegel im Plasma steigt. Die Glukoseaufnahme in die Fettzelle wird reduziert und die Insulinsekretion inhibiert.

Die Aktivierung der Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere führt zusammengefasst zu einer Erhöhung der Blutglukose (McMahon et al., 1988;Munck et al., 1984).

Wird die HPA-Achse dauerhaft überaktiviert, führt das zu Hypertriglyzeridämie, arterieller Hypertonie, Hyperglykämie, zentraler Adipositas, zu einer Insulinsekretionsstörung und Insulinresistenz und bietet deshalb eine plausible Erklärung für die Genese des metabolischen Syndroms mit allen seinen Komponenten.

Eine Überaktivierung der HPA-Achse konnte sowohl im diabetischen Tiermodell (Chan et al., 2001;Chan et al., 2002) als auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 bestätigt werden (Cameron et al., 1984;Coiro et al., 1995;Roy et al., 1990;Roy et al., 1991;Roy et al., 1993).

Auch eine Anreicherung von viszeralem Fett, also Adipositas, ist mit einer Dysfunktion der HPA-Achse mit erhöhten Cortisolspiegeln und einem gestörten Feedback Mechanismus assoziiert. (Bjorntorp and Rosmond, 2000;Dallman et al., 2006). Das in Adipozyten synthetisierte Peptidhormon Leptin spielt in der Regulation der Fettspeicherung eine herausragende Rolle, indem es die Nahrungsaufnahme hemmt und eine Erhöhung des Energieumsatzes vermittelt. Auf die HPA-Achse wirkt Leptin inhibierend. Die Ausschüttung von CRH aus isolierten Hypothalami wird unter dem Einfluss von Leptin reduziert, die durch Stress oder Fasten induzierte Exkretion von ACTH und Corticosteron abgeschwächt und sowohl die Synthese als auch die Exkretion von Cortisol in Nebennierenrindenzellen blockiert (Ahima et al., 1996;Bornstein et al., 1997;Heiman et al., 1997). Die Plasmakonzentration von Leptin und Corticosteron verhält sich reziprok zueinander (Ahima et al., 1996) und die Beziehung zwischen Fettgewebe und HPA-Achse ist bidirektional. In vielen Studien stellte sich heraus, dass der Leptinspiegel nach einer Stimulation mit Glukokortikoiden steigt (Dagogo-Jack et al., 1997;Kolaczynski et al., 1997;Larsson and Ahren, 1996;Masuzaki et al., 1997;Miell et al., 1996;Papasprou-Rao et al., 1997). Erwartungsgemäß ist der Leptingehalt in adrenaletomierten Ratten verringert und steigt nach Dexamethason-Gabe auf Normwerte an (Spinedi and Gaillard, 1998).

Im Falle einer Leptinresistenz oder Leptindefizienz fehlt die inhibierende Wirkung von Leptin auf die HPA-Achse. Die nach dem Erstbeschreiber benannte Zucker



Abb.1: OZR (rechts) vs. LZR (links)

Ratte (obese Zucker rat, OZR, siehe Abb.1) ist ein Tiermodell für Leptinresistenz mit einer Punktmutation im „fatty“ Allel (fa/fa), wodurch ein Aminosäureaustausch

in der extrazellulären Domäne des Leptinrezeptors stattfindet. OZR sind für diese Mutation homozygot, Lean Zucker Ratten

(LZR) heterozygot und damit phänotypisch normal (Phillips et al., 1996). Außer einer Adipositas gehören erhöhte Glukose- und Insulinspiegel im Sinne einer Glukosetoleranzstörung zu typischen Eigenschaften von OZR (Liu et al., 2002). Daher kann man ihren Zustand als „prädiabetisch“ einstufen. Die HPA-Achse dieser Ratten ist fehlreguliert. Zwar sind die Studienergebnisse dazu teilweise kontrovers, allgemein wird aber von einer Hyperaktivierung der Stress-Achse mit konsekutiven Hypercortisolismus bei OZR (Guillaume-Gentil et al., 1990;Havel et al., 1996;Livingstone et al., 2000;Mattsson et al., 2003;Pacak et al., 1995) und einer erhöhten Stresssensitivität mit einer Überexpression von CRH nach Stresstests ausgegangen (Guillaume-Gentil et al., 1990;Plotsky et al., 1992;Rivier and Vale, 1983;Walker et al., 1992). Zugrunde liegt wahrscheinlich eine veränderte negative-Feedback-Sensitivität und eine Nebennierenhypertrophie (Plotsky et al., 1992). In LZR findet man all diese pathologischen Veränderungen nicht.

Der Gewichtsverlust nach Adrenalectomie lässt einen engen Zusammenhang zwischen der HPA-Achse und Adipositas bei OZR vermuten (Bray et al., 1992). Nahrungsentzug verursacht bei OZR, nicht aber bei LZR, eine ausgeprägte Stressantwort, und geht mit einer Aktivierung von CRH Neuronen im parvozellulärem Teil des Nucleus paraventricularis, PVN, einher (Timofeeva and Richard, 1997;Timofeeva and Richard, 2001).

Ein weiteres Hormon, das die HPA-Achse beeinflusst, ist das Stresshormon Angiotensin II (Ang II). Vieles deutet darauf hin, dass Ang II eine wichtige Rolle in der Aktivierung der HPA-Achse und des SNS, folglich eine Sekretion von CRH, ACTH und Glukokortikoiden spielt.

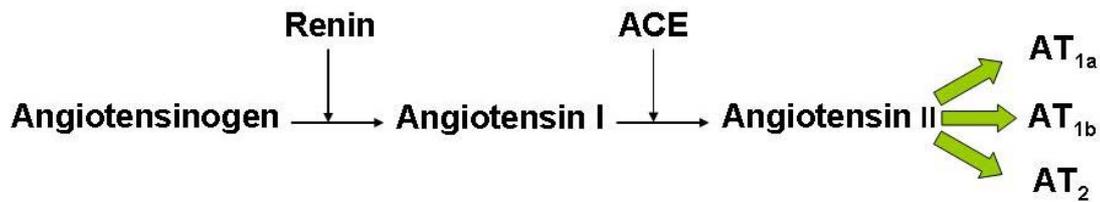


Abb.2: Die Synthese von Angiotensin II und die Stimulation der Angiotensin Rezeptoren AT1A, AT1B und AT2 in Nagetieren.

Ang II wird aus Angiotensin I synthetisiert. Dieser Vorgang kann durch ACE-Hemmer blockiert werden (siehe Abbildung 2). Als wirksames Peptid des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert Ang II vor allem den Flüssigkeitshaushalt und den Blutdruck. Es stimuliert die Freisetzung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde und von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark und dem sympathischen Nervensystem (Aguilera, 1993; Keller-Wood et al., 1986). Über eine Salz- und Wasserretention, direkte vasokonstriktorische Effekte und andere vasokonstringierende Substanzen wie Katecholamine, Vasopressin und Endothelin wirkt es hypertensiv und fördert die Artherosklerose (De Gasparo et al., 2000). Ang II stimuliert die Gewebeproliferation und Inflammation, verursacht oxidativen Stress und wirkt thrombogen (Lim et al., 2004).

Für die Wirkung von Ang II sind zwei Subtypen von Rezeptoren verantwortlich. Man unterscheidet den Typ1 Rezeptor, AT₁ vom Typ 2 Rezeptor, AT₂. Die Rolle des AT₁ Rezeptors ist gut untersucht. Er ist verantwortlich für die meisten der bekannten Wirkungen von Ang II beim Menschen (Timmermans et al., 1993), und die Blockade dieses Rezeptors wird therapeutisch in der antihypertensiven Therapie genutzt (De Gasparo et al., 2000). Für den AT₁ Rezeptor sind bei Nagetieren zwei Isoformen, AT_{1A} und AT_{1B}, identifiziert worden. Sie werden von zwei verschiedenen Genen kodiert und unterschiedlich reguliert, sind jedoch pharmakologisch nicht zu differenzieren (Elton et al., 1992; Inagami et al., 1994; Iwai et al., 1992; Sandberg et al., 1992). Der AT₂ Rezeptor wird nur in wenigen Organen, z.B. im Nebennierenmark und im Gehirn und besonders in fetalem Gewebe exprimiert (De Gasparo et al., 2000; Jöhren et al., 1995; Jöhren et al., 1996). Er scheint Wachstum, Apoptose und Vasodilatation zu regulieren. Im fetalen Gewebe wird über AT₂ die Proliferation gehemmt und die Differenzierung eingeleitet (Jöhren et al., 2004).

In der gesamten HPA-Achse lassen sich Ang II Rezeptoren nachweisen. Den AT_{1A} Rezeptor findet man bei Ratten vor allem im Hypothalamus und in der Nebenniere, der AT_{1B} Rezeptor wird vorrangig in der Hypophyse und in der Nebenniere exprimiert. AT₂ Rezeptoren werden in der Nebenniere exprimiert (De Gasparo et al., 2000; Heemskerk and Saavedra, 1995; Jöhren et al., 1995; Jöhren et al., 1996; Jöhren et al., 2003; Kissebah et al., 1982; Saavedra, 1999; Tsutsumi et al., 1991). Auch in anderen für eine Stressantwort wesentlichen Gehirnregionen wie die Eminentia mediana und das Subfornikalorgan (SFO), die zu den zirkumventrikulären Organen gehören, lassen sich Ang II Rezeptoren nachweisen (De Gasparo et al., 2000). AT₁ exprimierende Neurone im SFO projizieren in den PVN und den Nucleus supraopticus des Hypothalamus, um die Vasopressin- und CRH-Ausschüttung zu stimulieren (Oldfield et al., 1994).

In Stresssituationen wird die Expression von AT₁ Rezeptoren im CRH-produzierenden PVN des Hypothalamus und im SFO stimuliert (Aguilera et al., 1995a; Castren and Saavedra, 1988; Jezova et al., 1998; Leong et al., 2002; Saavedra, 1992; Saavedra, 1999). Ang II erhöht hier bei Stress die Synthese von CRH (Aguilera et al., 1995b; Sumitomo et al., 1991) und von Vasopressin (Saavedra, 1992). Glukokortikoide regulieren die Dichte der Ang II Rezeptoren im PVN (Aguilera et al., 1995a; Castren and Saavedra, 1988; Castren and Saavedra, 1989).

Leong et al. berichten von einer Zunahme der AT₁ Rezeptoren nach akutem Stress auch in der Hypophyse (Leong et al., 2002). Hier wird bei Stress die Ausschüttung von ACTH teils direkt durch Ang II, teils über CRH, erhöht (Antoni, 1993; Ganong and Murakami, 1987; Saavedra, 1992).

Die zirkulierende Ang II Konzentration wird durch Stress über eine Stimulation des SNS und konsekutiver Reninsekretion erhöht (Yang et al., 1993a; Yang et al., 1993b).

Eine Inhibition des RAAS durch peripher verabreichtes Candesartan konnte über eine Blockade der peripheren und zentralen Ang II Rezeptoren eine Stimulation der HPA-Achse und des SNS während Isolationsstress weitestgehend verhindern (Armando et al., 2001; Nishimura et al., 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei arterieller Hypertonie eine chronische Behandlung mit Candesartan oder Ramipril die CRH induzierte Stimulation der ACTH- und Corticosteronsekreti-

on blutdruckunabhängig vermindert und die CRH mRNA Level im Hypothalamus senkt (Raasch et al., 2006a). Diese Ergebnisse unterstreichen die außerordentlich wichtige Rolle von Ang II als Aktivator der Stressachse und die daraus resultierenden Wirkungen einer Inhibition des RAAS mit ACE-Hemmern oder ARBs.

In der Therapie des metabolischen Syndroms werden ACE-Hemmer (Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer, z.B. Captopril, Lisinopril, Ramipril) und Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten (Sartane, z.B. Losartan, Candesartan) als Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) erfolgreich zur Senkung des pathologisch erhöhten Blutdruckes eingesetzt. Große klinische Studien (CAPP, RENAAAL, ABCD, UKPDS, FACTET) zeigen, dass ACE-Hemmer mikro- und makrovaskuläre Komplikationen infolge eines Diabetes reduzieren (Pahor et al., 2000). Außerdem offenbarten Studien wie HOPE; CAPPP; SOLVD, ALLHAT, dass unter der Therapie mit ACE-Hemmern die Inzidenz von Typ 2 Diabetes bis zu 25% gegenüber anderen blutdrucksenkenden Medikamenten oder Placebos sinkt (2002;Vermees et al., 2003;Yusuf et al., 2001). Weitere Studien dazu laufen (NAVIGATOR, TRANSCEND, ONTARGET) (Gerstein et al., 2004;Teo et al., 2004;Tsujii, 2005). Ebenso verringern Ang II Rezeptor Antagonisten (ARB) das Neuauftreten von Diabetes (LIFE,VALUE, CHARM) (Julius et al., 2004;Lindholm et al., 2002;Pfeffer et al., 2003;Yusuf et al., 2005).

Der Grund für diesen Effekt ist ein viel diskutiertes Thema. Die Ursache wird unter anderem in einer durchblutungsfördernden Wirkung, in einer Bradykinin vermittelten Steigerung der Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel oder eine Steigerung der Insulinsensitivität, die z.T. über eine Aktivierung von PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) erreicht wird, vermutet (Schupp et al., 2004). Bisher konnte jedoch keine der diskutierten Hypothesen als Ursache der antidiabetogenen Wirkung von ACE-Hemmern und ARBs verifiziert werden. Wir gehen davon aus, dass die angeführten Hypothesen nicht ausreichend erklären, wieso diese Antihypertensiva die Entstehung von Diabetes verhindern können. In dieser Studie wollen wir deshalb den Einfluss des RAAS auf den Glukosehaushalt weiter untersuchen.

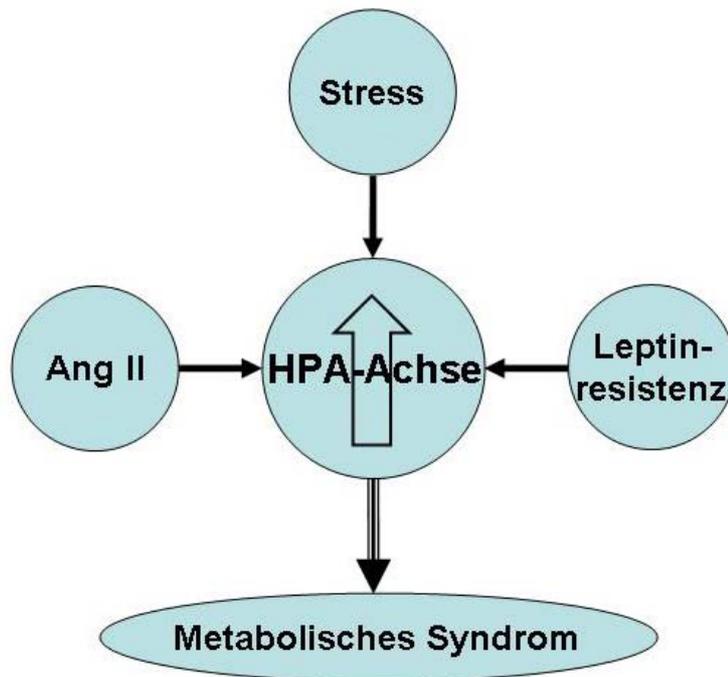


Abb.3: Vereinfachte grafische Darstellung der Hypothese. Über eine Überaktivierung der HPA-Achse, getriggert durch Angiotensin II (Ang II), Leptinresistenz und Stress, kommt es zu Hyperglykämie und Ausprägung eines metabolischen Syndroms.

Wir stellen fest (siehe Abb.3):

1. Eine gesteigerte HPA-Achsen Aktivität resultiert in erhöhten Plasmaglukosewerten.
2. Beim metabolischen Syndrom und beim Typ 2 Diabetes lässt sich eine erhöhte Aktivität der HPA-Achse nachweisen (Chan et al., 2001; Chan et al., 2002).
3. Ratten mit Leptinresistenz weisen ebenfalls eine erhöhte Aktivität der HPA-Achse auf.
4. An der Aktivierung der HPA-Achse ist Ang II wesentlich beteiligt, indem es als Stresshormon die CRH- und ACTH- Sekretion steigert. Im Hypothalamus, in der Hypophyse und in der Nebenniere finden sich Ang II Rezeptoren (Heems-kerk and Saavedra, 1995; Jöhren et al., 1995; Jöhren et al., 1996; Jöhren et al., 2003; Saavedra, 1999; Tsutsumi et al., 1991), deren Expression durch Stress stimuliert wird (Aguilera et al., 1995a; Castren and Saavedra, 1988; Jezova et al., 1998; Saavedra, 1992; Saavedra, 1999).

Darauf basierend schlagen wir vor, dass Ang II über eine Aktivierung der HPA-Achse in den Glukosehaushalt eingreift und so ein chronisches Überangebot von Ang II zu erhöhten Zuckerwerten im Blut führen kann. ACE-Hemmer und ARBs könnten demnach über eine verminderte Aktivierung der Stressachse durch Ang II antidiabetogen wirken. Besonders bei Ratten mit einem Leptinrezeptordefekt, bei denen die HPA-Achse fehlreguliert ist, müsste der Glukosehaushalt durch Ang II zu beeinflussen sein. Wir vermuten eine synergistische Wirkung von Ang II und Leptinresistenz.

In dieser Studie stellen wir deshalb folgende Frage:

Kann eine chronische Erhöhung des Ang II-Spiegels in leptinresistenten Ratten über eine Aktivierung der HPA-Achse den Glukosehaushalt stimulieren?

Die Aktivität der HPA-Achse soll unter Ruhebedingungen und unter Belastung mit CRH untersucht werden.

Um die Wirkung von Ang II auf den Stress- und Glukosehaushalt näher zu betrachten, haben wir OZR und LZR Ang II bzw. NaCl als Kontrolle über osmotische Minipumpen dauerhaft appliziert. Die Auswirkungen einer zweiwöchigen Ang II Exposition wurden über die Erstellung eines hämodynamischen Profils und die basalen Werte der Stresshormone dargestellt.

Der Einfluss von Ang II auf die Reaktivität der HPA-Achse im Stress wurde in einem CRH-Test untersucht. Die Expression von CRH und POMC ebenso wie die Verteilung der Ang II Rezeptoren in der HPA-Achse wurden anschließend mit qPCR ermittelt.

II. Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien

Material	Firma/Model
Anästhetika	Brevimytal Natrium® (Wirkstoff: Methohexital), Pentobarbital
Isotone Natrium Chlorid-Lösung 0,9%	Braun
CRH	Ferring
RNA-Isolation Kit	Nucleo Spin®, Macherey-Nagel, Düren
RT-PCR-Kit	Promega Reverse Transcription System
Real time PCR Kit	Sybr Green I Reaction System, Eurogentec SA
Primer	Invitrogen
Glucose (HK) Assay Reagent	SIGMA
Insulin	Rat Insulin RIA Kit, Linco Research ImmuChem™ Double Antibody, MP
Aldosteron, ACTH, Corticosteron	Biomedicals
Weitere Laborchemikalien	SIGMA, MERCK

1.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blutzuckermessgerät	Glucometer Elite XL, Bayer
Blutzucker-Sticks	Ascensia® Elite Sensor
Spritzen, steril	BD Plastipak™, 1 ml B.Braun Injekt-F, 1 ml
Kanülen, steril	BD Microlane™ 3, Nr.1, Nr.16, Nr.20
Cups	Sarstedt, Eppendorf, Gilson, 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml
Tubes	Falcon, 50 ml
Nahtmaterial	5.0 Polypropylen
Pumpen	alzet® osmotic pump model 2ML4 2.5 µl per hour, 28 days

Katheter	(1) Portex Fine Bore Polyethylene Tubing REF 800/100/100; ID: 0,28 mm, AD: 0,61 mm (2) Portex Fine Bore Polyethylene Tubing REF 800/100/200, ID: 0,58 mm, AD: 0,96 mm 5,5 cm von Katheter (1) (proximaler Teil) zusammengeschweißt mit 25 cm von Katheter (2) (distaler Teil), heparinisiert. Markierung bei 3,5 cm ab dem distalen Ende
Pipettenspitzen	Greiner bio one
Operationsbesteck	FST, Heidelberg
Operationstisch	Werkstatt Physiologie München, beheizbar
Pipetten-Spitzen	Greiner bio-one filtertip DNase-free, RNase free
Filterpapier	Whatman® 1CHR
Druckaufnehmer Statham P23Db	Hellige
Zentrifugen	Minifuge RF, Heraeus SEPATECH Eppendorf Centrifuge 5415D Jouan C412
Pipetten	Eppendorf Reference Finnpipette®, Labsystems
Multipipette	Eppendorf
Waagen	Sartorius BP210D Sartorius MC1, Laboratory LC220S Tierwaage QS 16: Sartorius
Absaugpumpe	Eppendorf 4151
Multitube Vortexer	SMI Model 2601
Gamma-Counter	1282 Compugamma CS, LKG Wallac
Real time PCR-Maschine	ABI PRISM 7000 Sequence Detection System
Kryostat	Leica CM 3050 Kryostat

Homogenisator	ULTRA-TURRAX T8 IKA®-Werke, Werner Hassa-GmbH Lübeck
Photometer	BIO RAD Smart Spec™ 3000 Pharmacia LKB Novaspec II
Thermocycler	Biometra® T Gradient
Potter	B.Braun
Vortexer	IKAMAG® RCT IKA-COMBIMAG RCT
PH-Meter	WTW pH531
Inkubator	Biometra

1.3. Software

Laboreigene Software zur Erfassung und Auswertung der hämodynamischen Parameter	Prof. Dr. med. Dendorfer
Statistik und Grafiken	Prism® 4.0
Auswertung der qPCR	ABI PRISM 7000 SDS Software

2. Tiere

Für die Versuche wurden 22 männliche adipöse Zucker-Ratten (OZR) sowie 21 schlanke Zucker Ratten (LZR) der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) gewählt (siehe Abb.1). Die Tiere waren bei der Ankunft 60-65 Tage alt und wogen im Mittel 385 g bzw. 292 g. Sie wurden in Standardkäfigen der Größe 3 (n = 3-5) bei Raumtemperatur (20°C) in einem festen Tag (15.⁰⁰-3.⁰⁰)-Nacht (3.⁰⁰-15.⁰⁰)-Rhythmus gehalten. Die Ratten erhielten ad libidum Wasser und Altronin Standard-Nahrung. Nach 12-13 Tagen der Eingewöhnung wurde mit den Versuchen begonnen. Durch einen regelmäßigen Umgang mit den Ratten bis zum CRH-Test wurde ihnen die Möglichkeit gegeben, sich an die Untersucher zu gewöhnen. Die durchgeführten Versuche wurden am 15.01.2004 vom Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Tier-Protokoll-Nr.:9/1m/04).

3. Methoden

3.1. Füllen der Minipumpen

Osmotische Minipumpen der Firma Alzet® wurden mit Ang II oder mit steriler isotonischer Kochsalzlösung gefüllt und 4-6 Stunden in Bechergläsern mit steriler isotonischer NaCl-Lösung gequollen. Unmittelbar danach wurden die Pumpen eingesetzt. Ang II sollte in einer Dosis von 5 ng/min in den Körper der Ratte gelangen. Da die Pumpe 2,54 µl/h fördert, ergab sich daraus (unter Berücksichtigung eines Korrekturfaktors von 1,204) eine Menge von 298,345 µg Ang II in sterilem Aqua dest. pro Pumpe. Die Pumpen fassten ein Volumen von 2,098 ml, so dass ca. 2,1 ml Ang II Lösung bzw. Kochsalzlösung eingefüllt wurden. Um die Füllmenge zu kontrollieren, wurde jede Pumpe vor und nach dem Füllen gewogen.

3.2. Zeitplan

Tab.1: Versuchsablauf

Tag 1 Ankunft der Tiere

Tag 6 Gewicht

Tag 13 Pumpenimplantation und Blutglukose-Messung, Gewicht

Tag 20 Blutglukose-Messung, Gewicht

Tag 27 Katheterisierung, Gewicht

Tag 28 Blutdruck- und Blutglukose-Messung

Tag 30 CRH-Test, Gewicht

Tag 31 Organentnahme

3.3. Gewichts- und Längenmessung und Berechnung des Body-Maß-Index

Die Ratten wurden einmal pro Woche und vor dem CRH-Test gewogen. Die Körperlänge von der Nasenspitze bis zur Schwanzwurzel wurde im betäubten Zustand unmittelbar vor der Katheterimplantation gemessen und der Body-Maß-Index (BMI) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Gewicht (kg)}}{\text{Länge}^2 (\text{m}^2)}$$

3.4. Pumpenimplantation

Die osmotischen Minipumpen wurden 12-13 Tage nach der Ankunft der Tiere implantiert, wobei in jeder Sitzung Ratten aus allen 4 Gruppen (OZR mit Ang II-Pumpe, OZR mit NaCl-Pumpe, LZR mit Ang II-Pumpe, LZR mit NaCl-Pumpe) operiert wurden. Vor dem Einsetzen wurden die Pumpen erneut gewogen.

Die Tiere wurden mit 0,8-1,1 µl/g Körpergewicht Brevimytal Natrium® intraperitoneal (Wirkstoff: Methohexital, 500 mg + 500 ml Aqua dest. steril) narkotisiert. Im betäubten Zustand wurden sie rasiert und der Blutzucker gemessen (Methode siehe unten). Nach Hautinzision und subkutaner Untertunnelung wurde die Pumpe jeweils in Höhe der unteren Brustwirbelsäule paravertebral implantiert, der anschließende Wundverschluss erfolgte mit einem Baumwollfaden.

3.5. Blutzuckermessung

Eine Woche nach der Pumpenimplantation wurde in Kurznarkose mit Äther der Blutzucker der Ratten erneut gemessen. Mit einer Kanüle wurde eine Schwanzvene punktiert und der entstehende Blutropfen wurde zur Blutzuckermessung mit dem Blutzuckermessgerät Glucometer Elite XL genutzt.

3.6. Katheterisierung

14 Tage nach dem Einsetzen der Pumpen wurden die Tiere katheterisiert. Der Katheter wurde in die rechte Arteria femoralis gelegt. Als Narkotikum wurde wegen der längeren Halbwertszeit Pentobarbital verwendet. Es wurden ca. 1,1 µl/g Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

Nach Rasur und Fixierung mit Klebeband wurde der Schnitt zur Katheterisierung in der rechten Leistenbeuge gesetzt und der Gefäßstrang mit Vena femoralis, Arteria femoralis und Nervus femoralis stumpf freipräpariert. Die Arterie wurde isoliert und mit einem Baumwollfaden eine Ligatur vorgelegt. Die Arterie wurde inzidiert und der proximale Teil (der dünne Teil) des Katheters eingeführt. Hierbei war der Katheter an eine Heparin-Spritze angeschlossen und mit Heparin gefüllt. Die Lage und Durchlässigkeit des Katheters wurde durch Aspiration geprüft. Nach Sicherstellung der korrekten Lage wurde der Katheter mit einem Baumwollfaden fixiert. Mit einem nächsten Schritt wurde die sichere Fixierung des Katheters an der Ratte vorbereitet. Als Austrittsstelle des Katheters diente eine Inzision am Nacken der Ratte, weil hier die Gefahr gering ist, dass die Ratte den Katheter mit ihren Pfoten erreicht. Mit Hilfe einer stumpfen Nadel wurde nun der Katheter durch einen links dorsalen subkutanen Tunnel durch die Inzision am Nacken hindurch aus dem Körper der Ratte geführt. Auf Höhe der Markierung wurde der Katheter mit einem Baumwollfaden an der Haut der Ratte fixiert und so gleichzeitig der Hautschnitt geschlossen. Der Katheter wurde mit 100 µl steriler isotonischer Kochsalzlösung gespült, auf eine geeignete Länge gekürzt und mit einem Nagel verschlossen. Die Leistenregion wurde mit einer Subkutannaht und einer Hautnaht mit einem 5.0 Polypropylen-Faden geschlossen. Anschließend wurden die Wunden mit Iod-Lösung desinfiziert.

3.7. Katheterspülung

Um einer vorzeitigem Verstopfung der Katheter vorzubeugen, wurden die Katheter mindestens zweimal täglich (in der Regel morgens und abends) mit Heparin (5 ml auf 100 ml NaCl) gespült.

3.8. Blutdruck- und Blutzucker-Messung

Am Tag nach der Katheterisierung wurde ein hämodynamisches Profil erstellt. Hierzu wurden die Tiere über einen Zeitraum von ca. 8 Minuten unter Ruhebedingungen über den Katheter an einen Druckaufnehmer angeschlossen. Darüber wurden der Blutdruck und die Herzfrequenz registriert. Anschließend wurde arterielles Blut aus dem Katheter zur Blutzucker-Messung und 1 ml zur Eigenbluttransfusion am Tag des CRH-Testes gewonnen. Dem Blut wurde 50 µl GSH-EDTA zugesetzt und bei 5000 Upm und 4°C 5 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde für die Analyse der basalen ACTH-, Corticosteron-, Insulin- und Aldosteron-Werte tiefgefroren und die Zellen mit 500 µl steriler isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und bei 4°C aufbewahrt.

3.9. CRH-Test

Im CRH-Test wurde den Versuchstieren über einen Katheter 100 µg/kg CRH injiziert und über 4 Stunden im Abstand von 15 Minuten Blut entnommen, um den Verlauf der Blutglukose und der unten genannten Hormone im Sinne einer Reaktion auf endokrinen Stress zu verfolgen.

Vorbereitung:

Der CRH-Test fand zwei Tage nach der Katheterisierung statt. Morgens wurden alle Katheter mit 350 µl Heparin (5 ml auf 100 ml NaCl) gespült und alle Ratten gewogen, um die CRH-Dosis von 100 µg/kg optimal einstellen zu können. Die Katheter der Ratten wurden für eine einfachere Handhabung und zur Stressminimierung für die Ratte mit einem zusätzlichen Katheter um ca. 6 cm verlängert. Jede Ratte wurde in einen eigenen Käfig (25 cm x 22 cm x 20 cm) mit Streu gesetzt. Der CRH-Test begann immer um 11.⁰⁰ Uhr, um Tageszeit-abhängige Fluktuationen im Hormonhaushalt zu vermeiden. Um 11.⁰⁰ Uhr ist bei dem gewählten Tag-

Nacht-Rhythmus die zur der Zeit abnehmende Corticosteronsekretion bereits sehr niedrig.

Eine erste Blutentnahme von 50-100 µl arteriellem Blut aus dem Katheter erfolgte vor Injektion des CRH in denselbigen. Ab diesem Zeitpunkt wurde jeder Ratte 4 Stunden lang im 15-Minuten-Rhythmus 100 µl Blut aus dem Katheter genommen (insgesamt 17 Blutproben) und der Blutzuckergehalt bestimmt. Dies erfolgte in den ersten drei Stunden im abgedunkelten Raum, in der letzten bei Licht. Nach 120 Minuten wurde jeder Ratte die am Vortag abgenommenen und in 500 µl NaCl re-suspendierten Erythrozyten reinfundiert. Auf diese Weise konnten Stressreaktionen aufgrund eines Blutverlustes vermieden werden. Die Katheter wurden nach jeder Blutentnahme mit 200 µl NaCl gespült, nach jeder dritten Blutentnahme wurde statt mit NaCl mit 350 µl Heparin gespült. Das Blut wurde in 1,5 ml Cups mit vorgelegtem EDTA (10 µl) auf Eis gelagert und rasch bei 14000 Upm und 4°C 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma wurde so vom Zellbestand getrennt und bei -80°C tiefgefroren.

3.10. Organentnahme

Am darauf folgenden Tag wurde den Ratten nochmals Blut aus dem Katheter entnommen.

Im Einzelnen war dies

- 100 µl EDTA-Blut zur Corticosteron-Bestimmung,
- 0,5 ml Blut für eine ACE-Gehalt Bestimmung,
- 2 ml auf 40 µl Bestatin (1 mM in H₂O) und 100 µl EDTA zur Bestimmung von Angiotensin II im Plasma und
- 4 ml auf 200 µl EDTA.

Die Blutproben wurden bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert, der Plasma-Anteil abpipettiert und bei -80°C tiefgefroren.

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Tiere dekapitiert. Es wurden folgende Organe entnommen:

- Gehirn (Hypophyse einzeln)
- Herz (linker und rechter Ventrikel getrennt)
- Leber
- eine Niere

- beide Nebennieren
- ein Stück Skelettmuskel.

Außerdem wurde die Pumpe entfernt. Beide Ventrikel, die Leber, die Niere und die Pumpe wurden gewogen. Das Gehirn und die Hypophyse wurden in Isobutan schockgefroren und bis zur endgültigen Lagerung bei -20° auf Trockeneis zwischengelagert. Alle anderen Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sämtliche Organe wurden dauerhaft bei -80°C aufbewahrt.

3.11. Real time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Die Unterschiede in der Expression von $\text{AT}_{1\text{A}}$ -, $\text{AT}_{1\text{B}}$ - und AT_{2} - Rezeptoren, von CRH im Hypothalamus und POMC in der Hypophyse wurden mit Hilfe der qPCR untersucht. Nötige Schritte waren deshalb die Isolierung von RNA aus den Geweben und die darauf folgende Synthese von cDNA mittels reverser Transkriptions-PCR.

RNA-Isolierung

Die Hypothalami wurden bei -10°C nach Palkovits und Brownstein (Palkovits and Brownstein, 1988) isoliert. Auf Höhe des Chiasma Opticum (bei $900\ \mu\text{m}$) wurde ein koronarer Schnitt gesetzt, bei $4800\ \mu\text{m}$ hinter den Corpora mamilaria ein zweiter. Die entstandene Scheibe wurde auf ihre posteriore Seite gelegt. Es wurden medial der Amygdala und unterhalb der Commissura anterior weitere Schnitte gesetzt und so der Hypothalamus isoliert.

Zur RNA-Isolierung wurde das Nucleo Spin® Kit von Macherey-Nagel verwendet. Alle Organe wurden in $350\ \mu\text{l}$ RA1 Puffer und $3,5\ \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol homogenisiert. Das Nebennieren- und Hypophysen- Homogenat wurde mit Hilfe der im Kit vorhandenen NucleoSpin Filter units in ein 2ml Auffang-Gefäß filtriert und bei $13.200\ \text{Upm}$ 1 Minute zentrifugiert. Der Filter wurde verworfen. Dem Homogenat der Hypothalami wurde $350\ \mu\text{l}$ Chloroform zugesetzt, es wurde bei $13.200\ \text{Upm}$ 1 Minute zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in ein neues Cup überführt. Es wurde weiter nach Anleitung des Kits verfahren. $5\ \mu\text{l}$ der gewonnenen RNA wurden 1:20 mit nuklease-freiem Wasser verdünnt ($5\ \mu\text{l}$ RNA + $95\ \mu\text{l}$ Wasser) und die Konzentration am Photometer bei einer Wellenlänge von $260\ \text{nm}$, $280\ \text{nm}$ und 320

nm gemessen. Im Anschluss erfolgte die Messung die Konzentration der Probe unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors. Die RNA wurde bei -80°C tiefgefroren.

Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Für die cDNA-Synthese wurde das Reverse Transcription System Kit von Promega benutzt. Für jeden Ansatz wurde 1 µg RNA verwendet. Die gefrorene RNA wurde auf Eis aufgetaut und geschüttelt. Die RNA wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 9,75 µl aufgefüllt. Der Heizdeckel des Thermo Cyclers wurde auf 110°C vorgeheizt. Die Probe wurde dann 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wurde die Probe auf Eis gesetzt und 10,25 µl des Reverse Transkriptase Reaktions-Gemisch hinzugefügt. Das Reaktions-Gemisch bestand im Einzelnen aus 4 µl 25 mM MgCl, 2 µl Reverse Transkriptase Puffer (10x), 2 µl 10 mM dNTP-Mix, 0,5 µl Rekombinanter RNasin® Ribonuklease Inhibitor (40 units/µl), 0,75 µl Reverse Transkriptase (20 units/µl) und 1 µl Oligo(dT)15 Primer (0,5 µg/µl) pro Ansatz. Die Proben wurden bei 15 Minuten 42°C, 5 Minuten bei 99°C und weitere 5 Minuten bei 2°C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Durchführung der qPCR

Für die Real Time PCR wurde das Sybr Green I Reaction System von Eurogentec SA mit Sybr Green als fluoreszierendes Agens verwendet. 2 µl cDNA wurde mit 23 µl Reaktionsmix (2,5 µl Puffer, 1 µl 5 mM dNTP mix, 1,63 µl 50 mM MgCl₂, 0,13 µl Hot GoldStar Enzyme, 10pmol/µl Vorwärtsprimer, 10 pmol/µl Rückwärtsprimer, 0,75 µl Sybr Green (1/2000) und 15,50 µl nukleasefreies Wasser pro 2 µl cDNA) versetzt.

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

Temperatur	Dauer	Zyklen
50°C	2 min	1
Denaturierung 95°C	10 min	1
Denaturierung 95°C	15 sec	40
Annealing und Extension 60°C	1 min	

Primersequenzen (5' → 3')

	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
r β -Actin	TGTTGCCCTAGACTTCGAGCA	ATGCCACAGGATTCCATACCC
r AT _{1A}	ACAAAGGTTCTTGCCCTTT	TCAAACCTCCAGTGGACCTC
r AT _{1B}	TTCAACCTCCAGCAATCCTT	CCCAAATCCATACAGCCACT
r AT ₂	TGTCCTCATTGCCAACATTT	TCAAGACTTGGTCACGGGTA
r CRH	AAAGGGGAAAGGCAAAGAAA	GTTTAGGGGCGCTCTCTTCT
r POMC	GAAGGTGTACCCCAATGTCTG	CTTCTCGGAGGTCATGAAGC

Auswertung

Für die cDNA jeder einzelnen Probe wurde zunächst in einer Doppelbestimmung β -Actin gemessen (Primer-Sequenz siehe Tab. 3). Mit Hilfe einer Standardkurve konnte die mRNA-Kopienanzahl ermittelt werden. Die Standardkurve wurde bei jeder Messung durch Doppelbestimmungen einer Standardreihe mit bekannter Templatemenge neu ermittelt, ebenso wurden jeweils 2 Proben mit Wasser zur Erkennung von Kontaminationen mitgeführt. Nach der Doppelbestimmung von AT_{1A}, AT_{1B}, AT₂, CRH und POMC aus den entsprechenden Proben wurde die mittlere Kopienanzahl relativ zur β -Actin-Kopienanzahl berechnet.

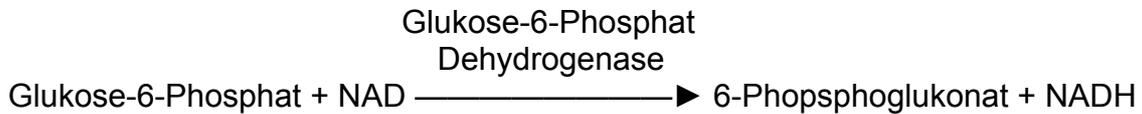
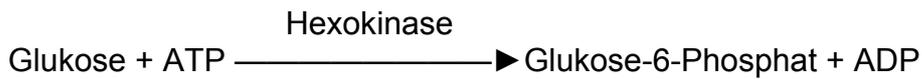
3.12. photomertrische Glukosebestimmung

Die Rattenlebern und -nieren wurden nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff zermörsert. Zur Glukosemessung wurde das gefrorene Pulver jeweils 1:5 in 50 mM Phosphatpuffer, pH7,4, (Na₂HPO₄) verdünnt und 30 Sekunden Glas auf Glas bei 500 Upm mit 6 Stößen gepottert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt. Die Proben wurden bei 4°C und 14000 Upm 5 Minuten zentrifugiert.

Zur Messung des Glukosegehalts in der Leber wurde der klare Überstand mit Hilfe eines Blutzuckermessgeräts (s.o.) gemessen.

Zur Messung der Glukose in der Niere wurden 25 μ l des Überstands mit 1000 μ l SIGMA® Glucose (HK) Assay Reagent versetzt (enthält 1,5 mM NAD, 1,0 mM ATP, 1,0 U/ml Hexokinase und 1 U/ml Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase), 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 340 nm photometrisch gemessen.

Prinzip der Methode:



Glukose wird in einer vom Enzym Hexokinase katalysierten Reaktion phosphoryliert. Das entstandene Glukose-6-Phosphat wird in Gegenwart von NAD zu 6-Phosphoglukonat oxidiert, dabei entsteht eine äquimolare Menge von NADH, was die Absorption bei 340 nm proportional zur Glukosekonzentration steigert.

3.13. Glykogenbestimmung in der Leber

Die Methodik erfolgte nach Chan und Passoneau (Chan and Exton, 1976; Passonneau and Lauderdale, 1974). Die Lebern wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert. 200 mg des Pulvers wurden nach Zusatz von 1000 µl Homogenisationspuffer (0,03 N HCL) bei 600 Upm mit 8 Stößen 30 Sekunden gepottert und auf Eis gestellt. Die Proben wurden 5 Minuten auf einem Heizblock (93°C) gekocht und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. 100 µl jedes Ansatzes wurde auf ein 2,5 x 2,5 cm großes Filterpapier aufgetragen. Dieses wurde sofort einmal 15 Minuten und anschließend dreimal 40 Minuten in 66% Ethanol gewaschen. Das Filterpapier wurde nach einem Tauchbad in Aceton 1 Minute trocken geföhnt. Das Papier wurde in 4 Teile geteilt und in einem Szintillationsgefäß mit 400 µl 200 mM Na-Acetat-Puffer (Natrium-Acetat-Trihydrat ad aqua dest., mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt) und 1,6 ml Amyloglucosidase (0,2mg) 90 Minuten in einem 37°C warmen Schüttel-Wärme-Bad inkubiert. Nach einer Abkühlungsphase wurde 1 ml des Ansatzes kurz zentrifugiert. 200 µl des klaren Überstands wurden mit 1000 µl Reagenz Glukose(HK) Assay Reagenz versetzt und zur Glukosebestimmung am Photometer (siehe Abschnitt 3.12.) verwendet.

3.14. Radioimmunassays zur Bestimmung von Ang II, Corticosteron, ACTH, Aldosteron und Insulin

Nach der Blutentnahme wurden EDTA-Blut für die Messung von Corticosteron, ACTH, Aldosteron und Insulin bei 4°C und 14000 Upm 10 Minuten zentrifugiert und das Plasma bei -80°C aufbewahrt.

Die Plasmakonzentrationen von Insulin wurde mit einem ¹²⁵I Radioimmunassay-Kit von Linco Research gemessen. Das Plasma der adipösen Zucker Ratten wurde 1:21 mit dem im Kit vorhandenen Assay-Puffer verdünnt, das Plasma der Lean Zucker Ratten wurde nicht verdünnt. Es wurde nach der Anleitung aus dem Kit verfahren.

Die Plasmakonzentrationen von Corticosteron, ACTH und Aldosteron wurden mit ¹²⁵I Radioimmunassay-Kits (MP Biomedicals) gemessen. Für die Messung von Aldosteron wurde 100 µl Serum zweimal mit 2 ml Ethylazetat/Hexan (3:2) extrahiert, die organische Phase im Vakuum abgedampft und der getrocknete Rückstand in 1ml RIA Puffer rekonstituiert. Davon wurde 250 µl für den Assay benutzt. Für die Bestimmung von Corticosteron wurde 100µl Serum wurde 1:200 mit RIA-Puffer verdünnt, davon wurde 100 µl für den Assay verwendet. Für ACTH wurde 100 µl unverdünntes Serum verwendet.

Für die Bestimmung von Ang II im Plasma wurden 2 ml des gewonnenen Bluts mit 40 µl Bestatin (1 mM in H₂O) und 100 µl EDTA versetzt, bei 4°C und 14000 Upm 10 Minuten zentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C tiefgefroren. Pro Ansatz wurde 1 ml Plasma mit 4 ml 98% Ethanol extrahiert, dieser abgedampft und mit 1 ml Assay-Puffer rekonstituiert. 400 µl wurden für die Detektion im Gamma-Counter verwendet.

Anschließend wurde nach der Anleitung der Kits verfahren.

4. Statistik

In den Abbildungen wurden die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern verwendet. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe von Prism® nach ANOVA (zweiseitig) und Bonferroni durchgeführt. Als signifikant gelten Ergebnisse, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ beträgt. Werte außerhalb von 4 Standardabweichungen wurden mit dem Ausreißertest nach Grubb (www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm) ermittelt und von den Berechnun-

gen ausgeschlossen. Die Berechnung der AUC (Area under the curve) zur Quantifizierung des Effekts über die Zeit während des CRH-Tests wurde für jedes Individuum anhand der Delta-Werte und ebenfalls mit Prism® durchgeführt.

5. Abkürzungen

Ang II	Angiotensin II
ACTH	Adrenocorticotropin
ARB	Angiotensin-Rezeptor-Antagonist
AT _{1A}	Angiotensin II Rezeptor Typ 1A
AT _{1B}	Angiotensin II Rezeptor Typ 1B
AT ₂	Angiotensin II Rezeptor Typ 2
AUC	Area under the curve
BMI	Body Mass Index
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal = Hypothalamus - Hypophyse – Nebennierenrinde
LH	Lateraler Hypothalamus
LHPA	Limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal = Limbisches System - Hypothalamus - Hypophyse - Nebennierenrinde
LZR	Lean Zucker Rat
OZR	Obese Zucker Rat
POMC	Proopiomelanokortin
PVN	Nucleus paraventricularis
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SFO	Subfornikalorgan
SNS	sympathisches Nervensystem
VMH	Ventromedialer Hypothalamus

III. Ergebnisse

1. Basale Werte

Nach zwei Wochen Behandlung mit Ang II bzw. Kochsalzlösung wurden keine Unterschiede in Gewicht oder BMI innerhalb der Phänotypen beobachtet (Abb.4a-b). OZR waren bei gleicher Größe, d.h. bei gleichem Wachstum, mit durchschnittlich 505 g allerdings 1,5mal schwerer als LZR (345 g), was sich im BMI widerspiegelte (9,8 vs. 6,74) (Abb.4a-c).

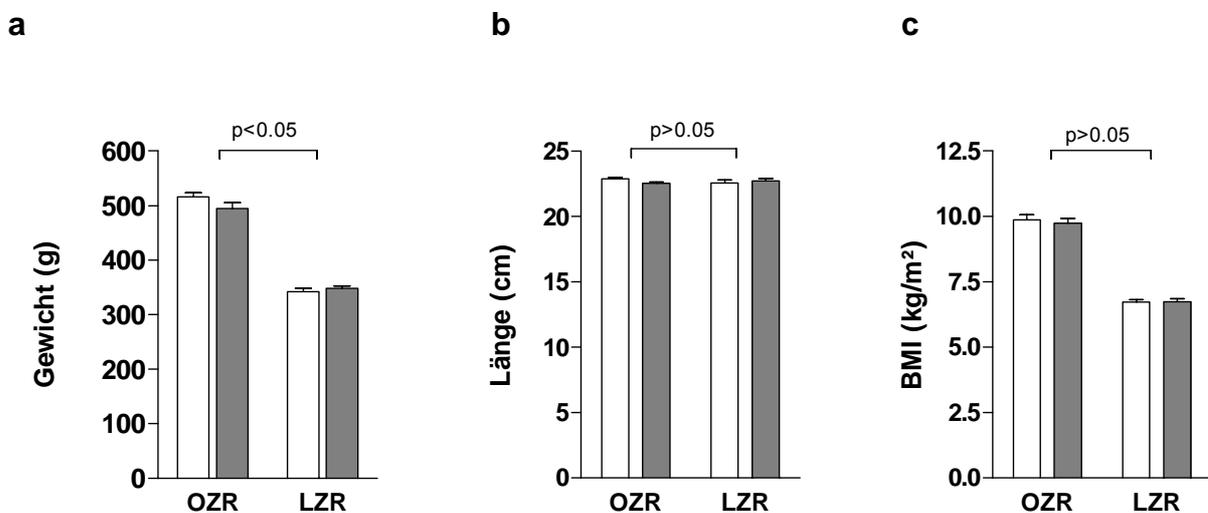


Abb.4a-c: Körpergewicht (4a), Körperlänge (4b) und BMI (4c) nach 2-wöchiger Behandlung mit Angiotensin II oder Kochsalzlösung. Leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II; MW \pm SEM; n = 9-10;

Erwartungsgemäß waren die Ang II Spiegel im Blut der mit Ang II behandelten Ratten signifikant höher (Abb. 5). Bei den OZR ergaben sich ca. doppelt so hohe Werte für Ang II vs. NaCl (10,3 pmol/l vs. 5,4 pmol/l). LZR mit Ang II hatten 1,2fach erhöhte Werte gegenüber der Kontrolle (15,1 pmol/l vs. 12,1 pmol/l).

Interessanterweise hatten unbehandelte LZR 2,3fach höhere Ang II Spiegel als unbehandelte OZR. Die Aldosteron Konzentration im Plasma der LZR war 1,3fach höher als die der OZR. Ang II hatte bei keinem der beiden Phänotypen einen sichtbaren Effekt auf die Aldosteronkonzentration.

Die chronische Gabe von Ang II hatte ebenso keinen sichtbaren Effekt auf Blutdruck und Herzfrequenz der Ratten (Abb. 6a und 6b). Ebenso wenig wurde das

Gewicht des linken Ventrikels gegenüber der Kochsalzkontrolle beeinflusst (Abb. 6c). In Abb. 6 ist das ungünstigere kardiale Profil der OZR gegenüber der LZR deutlich erkennbar: Sie zeigten signifikant höhere systolische Drücke und ein höheres Herzgewicht. LZR hatten mit durchschnittlich 417/min eine höhere Herzfrequenz als OZR mit durchschnittlich 380/min.

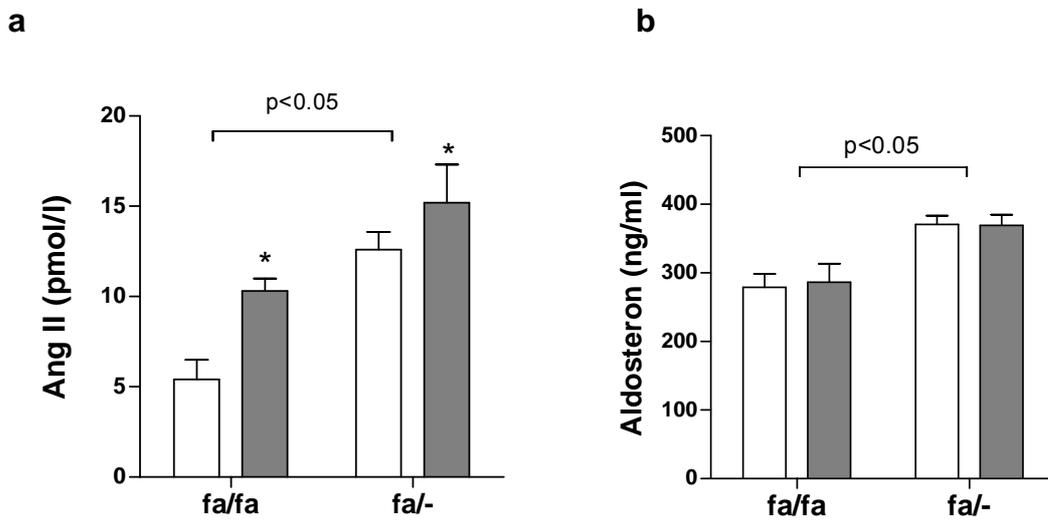


Abb.5: (a) Angiotensin II und (b) Aldosteron nach einer zweiwöchigen Behandlung; leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II; MW \pm SEM n = 9-10

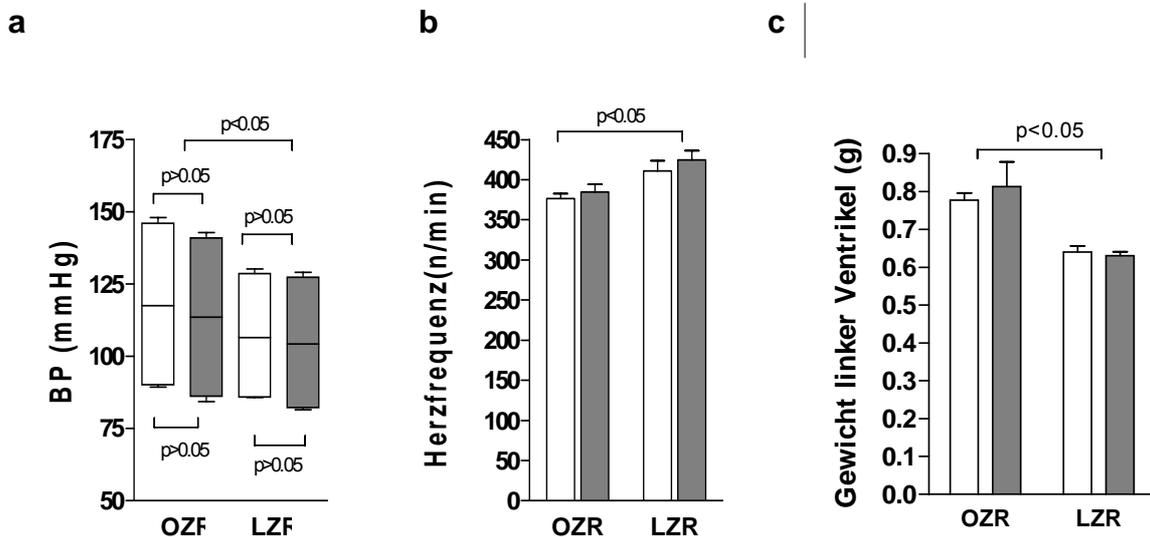


Abb.6a-c: Der Einfluss von Ang II auf das kardiovaskuläre System nach 2-wöchiger Behandlung. Leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II; MW \pm SEM; n = 9-10;
 2a: Der systolische und der diastolische Blutdruck (BP). 2b: Die Herzfrequenz. 2c: Das linksventrikuläre Gewicht.

2. Die basale Aktivität der Stressachse

Zur Beurteilung der basalen Aktivität der Stressachse (HPA-Achse) wurde ACTH und Corticosteron, das dem Cortisol des Menschen entspricht, im Plasma gemessen. Die mittels RIA gemessenen Werte zeigten höhere ACTH-Plasmakonzentrationen bei LZR als bei OZR (Abb.7a). Innerhalb der LZR gab es keinen signifikanten Unterschied. Die tendenziell niedrigere ACTH-Konzentration im Plasma der mit Ang II behandelten OZR vs. Kochsalzkontrolle ist statistisch nicht signifikant. Die Plasmakonzentration von Corticosteron zeigte keine Veränderung bei mit Ang II behandelten vs. nicht behandelte Ratten, LZR hatten analog zu den leicht höheren ACTH-Werten höhere Corticosteron-Konzentrationen als OZR (Abb.7b).

Die HPA-Achse von LZR scheint auf einem höheren Niveau aktiv zu sein als die von OZR.

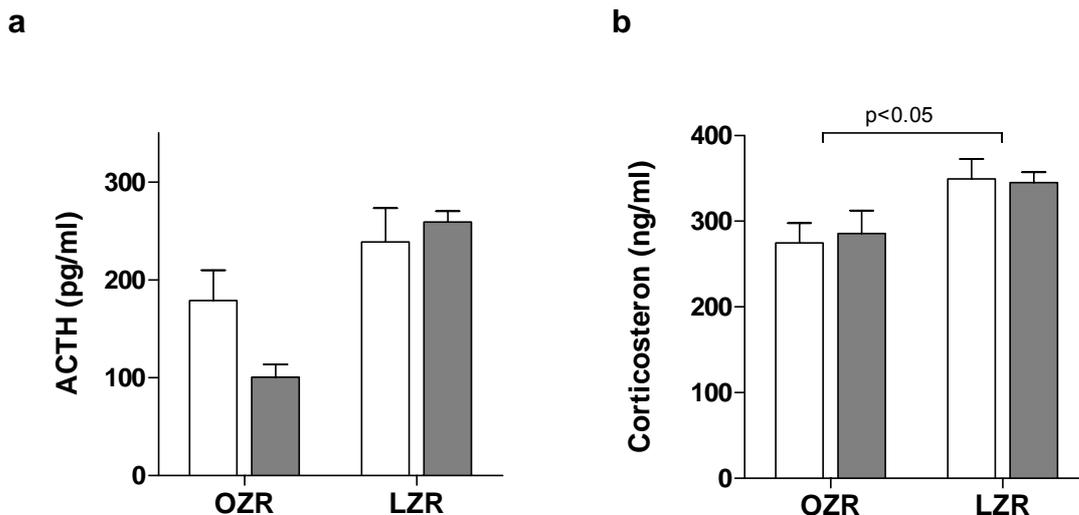


Abb.7a-b: Die basale Aktivität der Stress-Achse nach zweiwöchiger Behandlung mit Ang II (gefüllte Säulen) bzw. NaCl (leere Säulen); MW \pm SEM; n = 9-10
a: basales Plasma-ACTH b: basales Plasma-Corticosteron

Der mittlere Glukosespiegel der OZR war vor Beginn der Ang II-Applikation signifikant höher als der der LZR (134 mg/dl vs. 113 mg/dl). Zwischen den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen bestand jeweils kein Unterschied (Abb.8a). Nach zwei Wochen hatten mit Ang II behandelte OZR signifikant höhere Glukosewerte als die Kontrollgruppe. Hierbei ist allerdings zu bemerken, dass es nicht zu einem signifikanten Unterschied in den Glukosewerten im Vergleich zu der Ausgangssi-

tuation kam. Die Insulinkonzentration im Plasma zeigte weder bei den behandelten OZR noch bei den behandelten LZR Unterschiede zu den Kontrollratten. Allerdings wiesen OZR insgesamt höhere Insulinwerte als LZR auf (Abb.9).

Weder in der Leber noch in der Niere ließen sich nach zweiwöchiger Behandlung Unterschiede im Glukosegehalt nachweisen. Das gilt sowohl für behandelte vs. nicht behandelte Tiere als auch für OZR vs. LZR. OZR speicherten signifikant mehr Glykogen als LZR. Mit Ang II behandelte Tiere speicherten nicht signifikant mehr Glykogen als die Kontrollgruppe (Tab. 2).

Insgesamt wurde bei den adipösen Zucker Ratten eine diabetogene Stoffwechsellage mit leicht erhöhten Glukosewerten und einer leichten Hyperinsulinämie beobachtet.

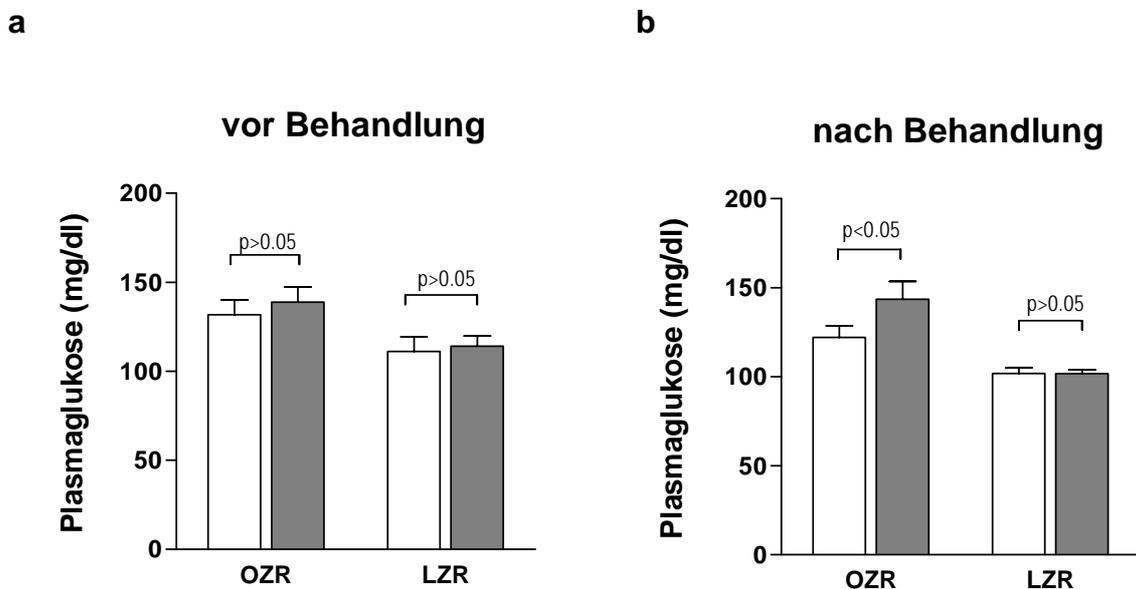


Abb.8a-b: Basale Plasmaglukose vor (8a) und nach (8b) zweiwöchiger Behandlung mit Ang II bzw. Kochsalzlösung. Leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II; MW ± SEM; n = 9-10

Tab. 2: Glukose und Glykogen (mg/g) nach zweiwöchiger Behandlung.
N=9-10, MW ± SEM

	OZR		LZR	
	Ang II	NaCl	Ang II	NaCl
Glukose in der Leber	8,7±0,5	8,7±0,5	9,1±0,5	9,4±0,3
Glukose in der Niere	56,7±1,6	53,9±1,5	55,3±1,7	54,3±1,6
Glykogen in der Leber	33,3±1,5	28,9±2,2	19,0±1,4	16,7±1,9

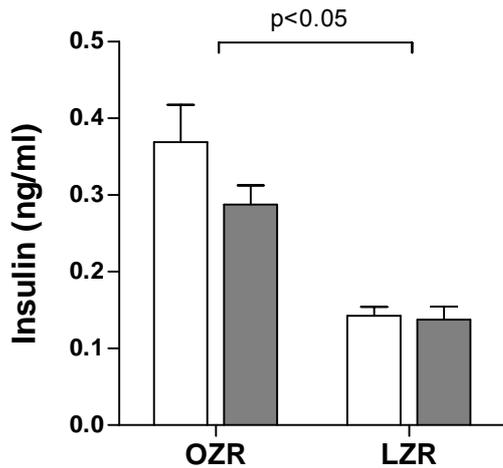


Abb.9: Insulin nach zweiwöchiger Behandlung. Leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II; MW \pm SEM; n = 9-10

3. Die Reaktivität der HPA-Achse

Mit dem CRH-Test wurde die Reaktivität der HPA-Achse nach chronischer Ang II Applikation untersucht. Der zeitliche Verlauf von ACTH im CRH-Test zeigte nahezu parallele Kurven der 4 Versuchsgruppen (Abb.10). 45-90 Minuten nach Applikation von CRH kam es nach einem steilen Anstieg zu einem Peak, der bei den LZR höher gelegen ist als bei den OZR. Danach fielen die Werte schnell ab, nach 135-180 Minuten lagen sie wieder am Ausgangspunkt. Nach 195-240 Minuten waren die Werte nochmals gesunken.

Infolge der Aktivierung der Stressachse durch CRH und dem Anstieg von ACTH im Plasma stieg die Corticosteronkonzentration steil an, um dann relativ konstant zu bleiben. Die höchsten Werte wurden bei den OZR mit Ang II-Pumpe gemessen. Auch nach 240 Minuten befanden sich die Werte auf ähnlich hohem Niveau, wobei die Werte der LZR schneller zu sinken schienen (Abb. 11a). Die Freisetzung von Corticosteron der Ang II behandelten OZR war signifikant höher als die der adipösen Kontrollen. Bei den LZR ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abb. 11b).

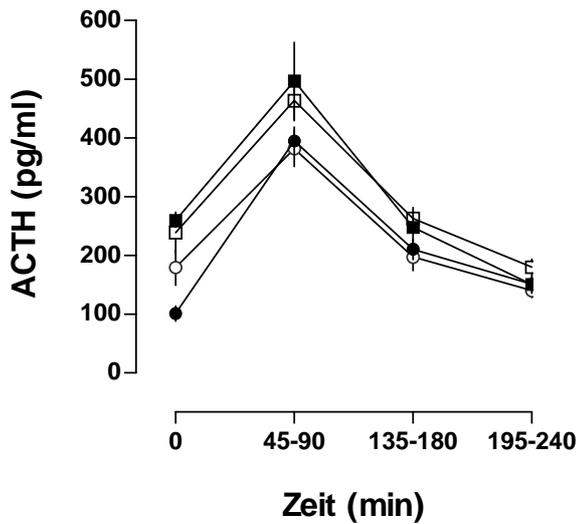


Abb. 10: ACTH im CRH-Test. ●,○ : OZR, ■,□: LZR; □,○: NaCl, ●,■: Ang II; MW ± SEM; n = 9-10; leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II

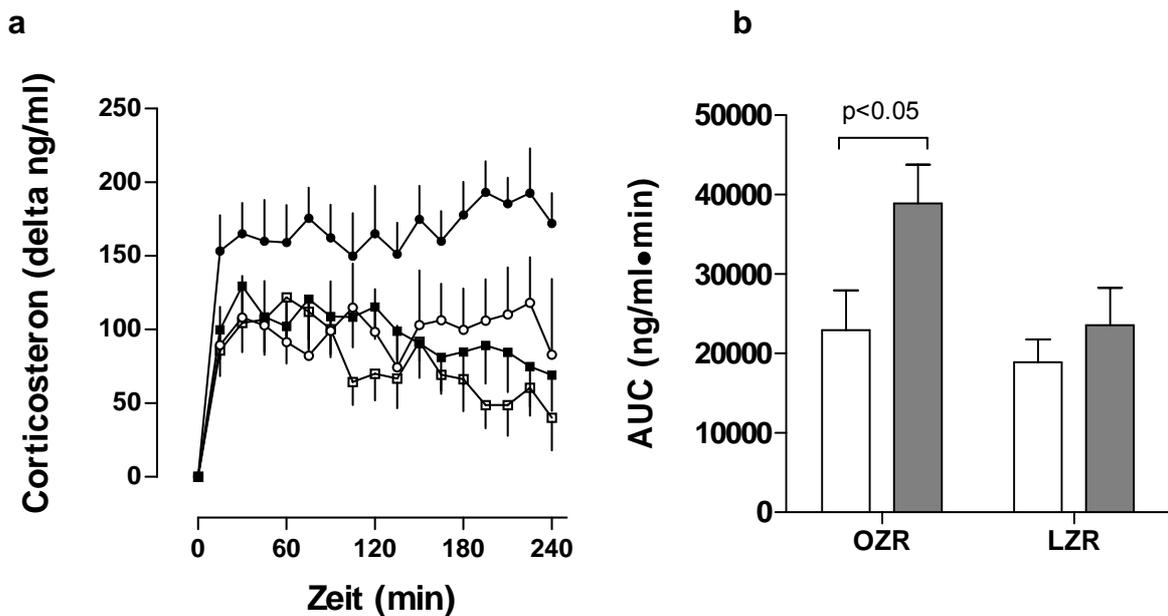


Abb. 11a -b: Corticosteron im CRH-Test: zeitlicher Verlauf (a) und AUC (b)

●,○ : OZR, ■,□: LZR; □,○: NaCl, ●,■: Ang II; leere Säulen: NaCl, Gefüllte Säulen: Ang II
MW ± SEM; n = 9-10;

Die Glukosekonzentration im Plasma stieg unmittelbar nach Applikation von CRH steil an, erreichte nach 75-90 Minuten ihr Maximum und fiel dann ebenso schnell wieder ab. Die Ausgangswerte waren nach ca. 180 Minuten erreicht. Zwischen 90 und 150 Minuten nach CRH-Applikation waren die Glukosewerte der OZR mit Ang

II-Pumpe vs. NaCl-Pumpe signifikant höher. Zwischen 60 und 150 Minuten nach CRH-Gabe waren die Glukosewerte der LZR mit Ang II-Behandlung signifikant niedriger als die der Kontrolle (Abb. 12). Die Kurven beider mit Kochsalz behandelten Gruppen liegen stets sehr nah beieinander. Maximal erreichten OZR mit Ang II Werte von 389 mg/dl, mit NaCl behandelte OZR 354 mg/dl, LZR mit Ang II 290 mg/dl und mit NaCl behandelte LZR 360 mg/dl. Der Zeitpunkt der maximalen Glukoseausschüttung stimmte bei allen Gruppen überein.

Die größte Steigerung der Glukosekonzentration von 278 mg/dl konnte bei den mit Ang II behandelten OZR gemessen werden. Sie war signifikant höher als bei den kontrollbehandelten OZR (225 mg/dl). Im Gegensatz dazu wurde bei LZR in der Kontrollgruppe größere Spannweiten der Glukosekonzentration gemessen als bei den Ratten mit Ang II (262 mg/dl vs. 201 mg/dl, Abb.13b). Die dazu gehörige Auswertung über die AUC zeigte analoge Ergebnisse: Die AUC-Werte der adipösen Ang II-Zucker-Ratten waren gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant erhöht, bei den LZR verhielt es sich genau umgekehrt (Abb.13c).

Die basalen Insulinwerte waren in allen Gruppen ähnlich (OZR: 0,33 ng/ml, LZR: 0,14 ng/ml). Während Insulin im CRH-Test in LZR nur marginal anstieg, kam es bei OZR zu einem sehr deutlichem Anstieg (Abb.14a, b). Zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe stellte sich jeweils kein Unterschied heraus.

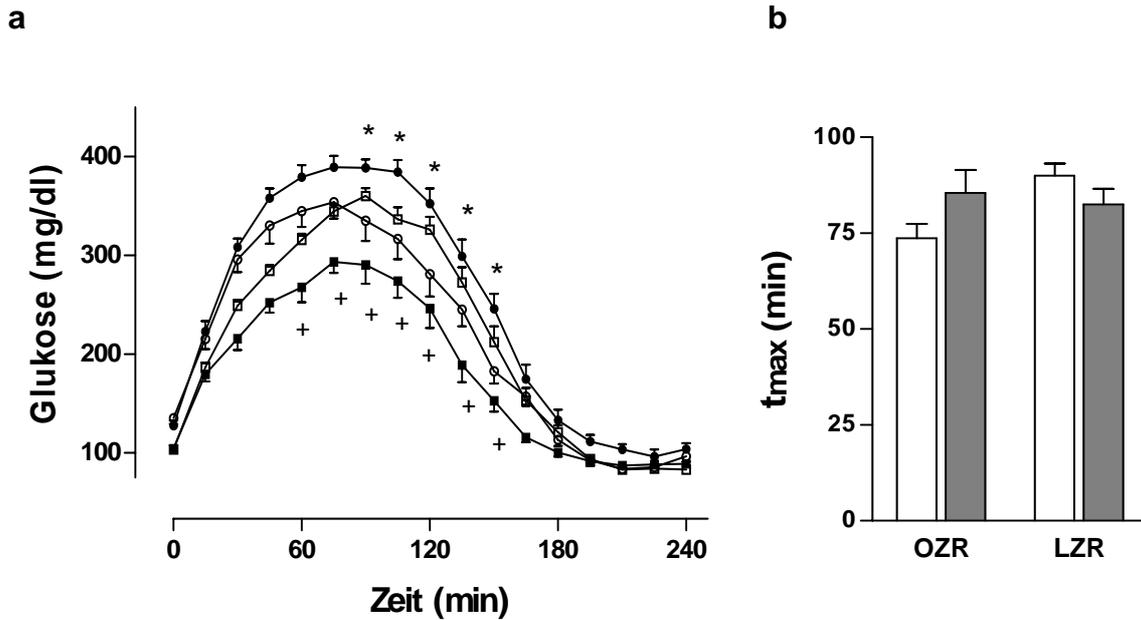


Abb.12: Zeitlicher Verlauf der Plasmaglukosekonzentration im CRH-Test (a) und Zeitpunkt der maximalen Konzentration (b)

●, ○: OZR, ■, □: LZR; □, ○: NaCl, ●, ■: Ang II; leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II

MW ± SEM, n=9-10; * p<0.05 OZR Ang II vs. OZR NaCl; + p<0.05 LZR Ang II vs. LZR NaCl

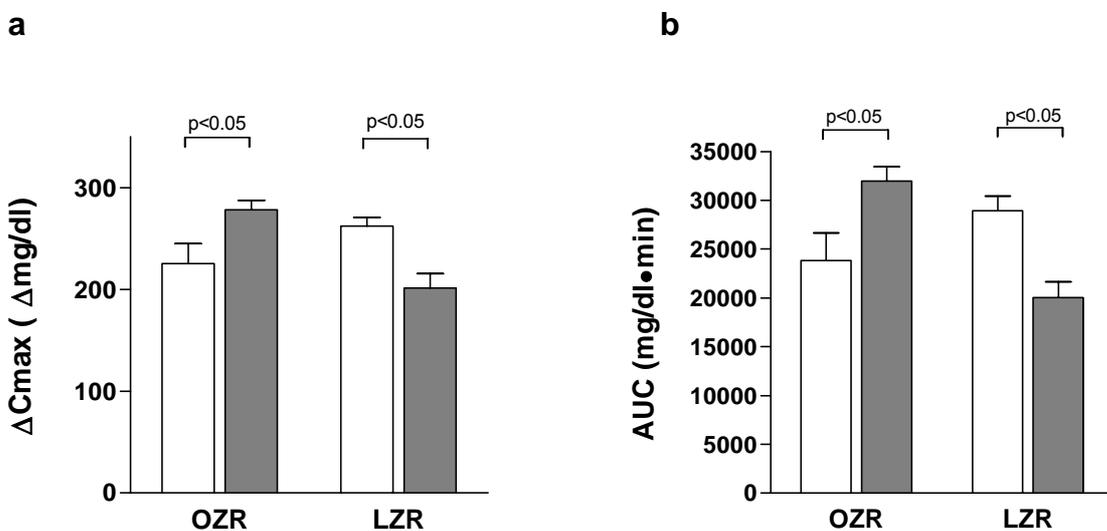


Abb.13a-b Plasmaglukose im CRH-Test. a: die maximal erreichte Konzentrationssteigerung (Maximale Konzentration minus Ausgangskonzentration). b: AUC (Area under the curve)

leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II; MW ± SEM; n = 9-10

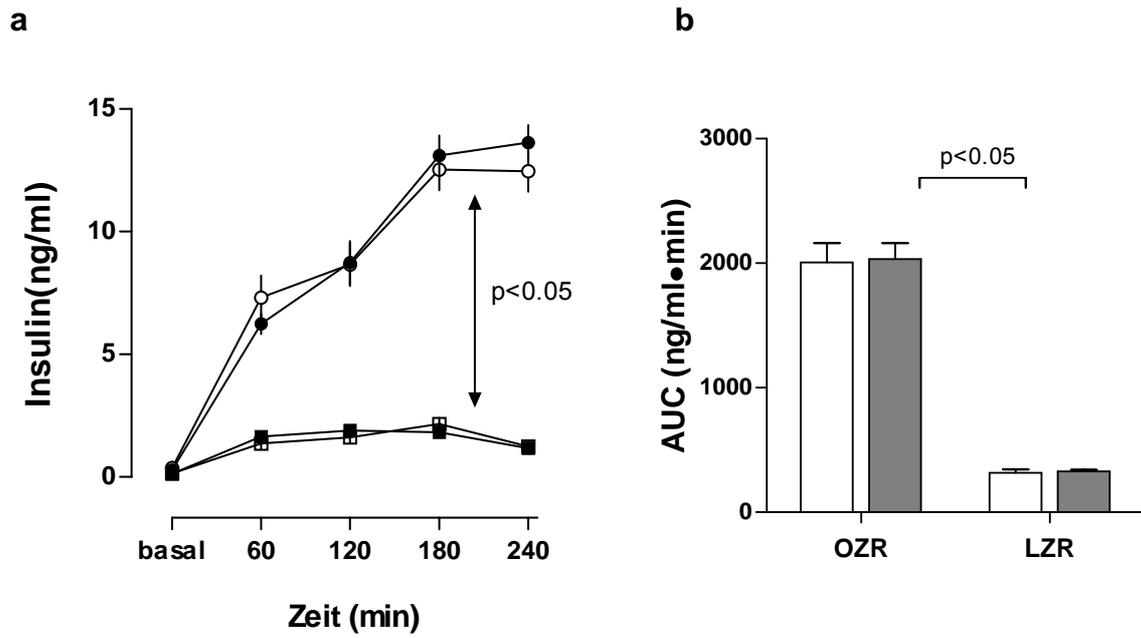


Abb.14a-b: Insulinkonzentration im Zeitverlauf (a) und die AUC (b)

●,○ : OZR, ■,□: LZR; □,○: NaCl, ●,■: Ang II; leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II

MW ± SEM; n = 9-10

4. Einfluss auf die Expression von Angiotensin Rezeptoren, CRH und POMC in Organen der HPA-Achse

Die mittels qPCR ermittelte Expression von CRH im Hypothalamus und von POMC in der Hypophyse ist in Abb.15a und b dargestellt. Das Expressionslevel der CRH mRNA im Hypothalamus war bei den vier Gruppen in etwa gleich. Bei LZR fanden sich signifikant höhere Level an POMC mRNA als bei OZR.

Ebenfalls mit qPCR wurde die Expression von Ang II-Rezeptoren in der HPA-Achse untersucht. Hierbei wurde zwischen OZR und LZR kein Unterschied festgestellt. Unter Ang II-Therapie waren die AT_{1A}-Rezeptor-mRNA-Level im Hypothalamus der OZR signifikant höher. LZR zeigten zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede in der Expression von AT_{1A} (Abb.16a). In der Hypophyse waren die AT_{1A}-Level bei allen Gruppen ähnlich (Abb.16c).

In der Nebenniere war die Expression von AT_{1A}-Rezeptoren bei OZR signifikant höher als bei LZR (Abb.16e).

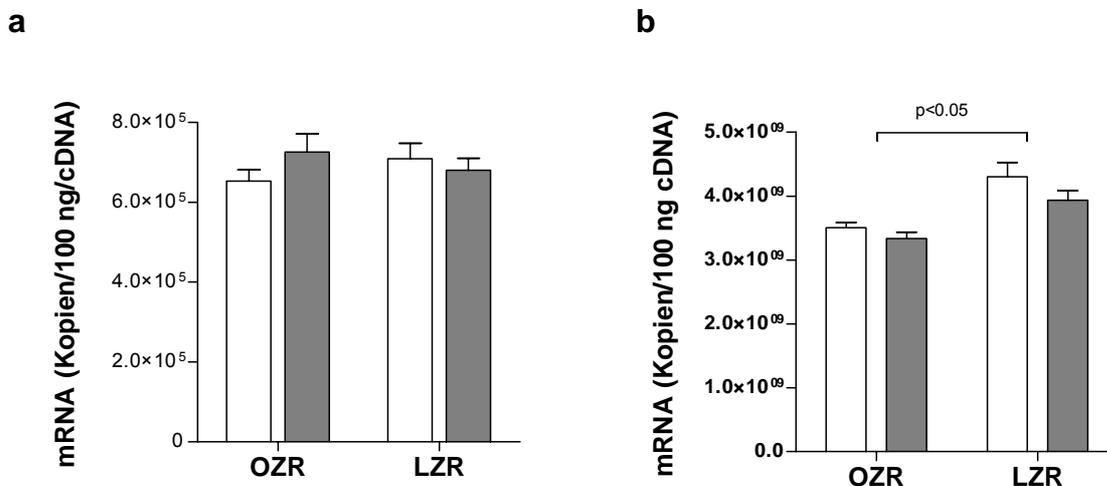
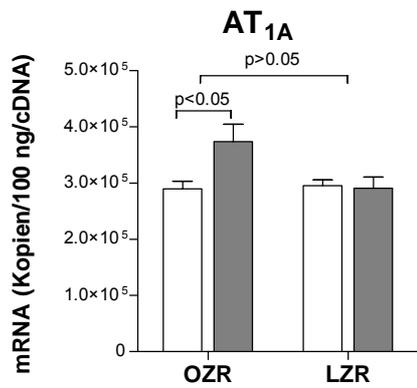


Abb. 15a-b: Einfluss einer zweiwöchigen Ang II Exposition auf die Expression von CRH im Hypothalamus (a) und von POMC in der Hypophyse (b)

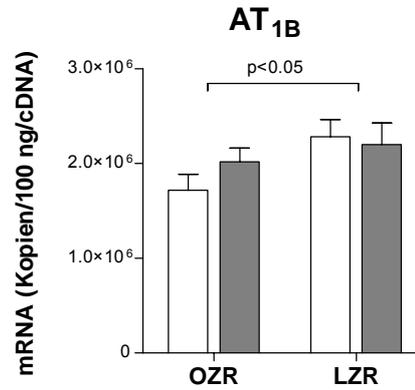
leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II; MW ± SEM; n = 9-10

AT₁ Rezeptoren im Hypothalamus

a

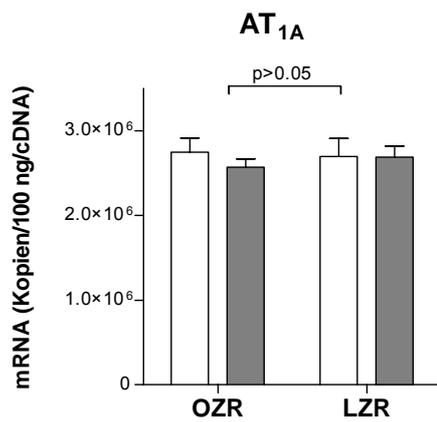


b

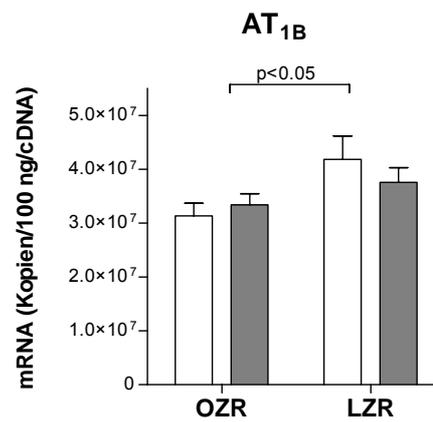


AT₁ Rezeptoren in der Hypophyse

c

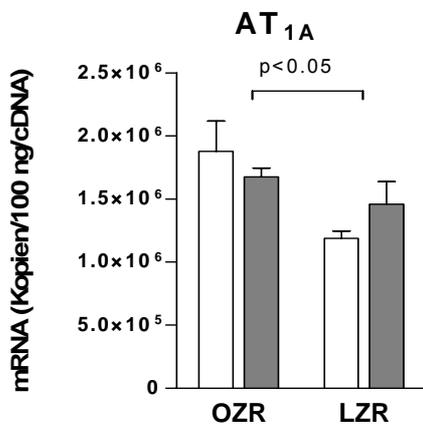


d



AT₁ Rezeptoren in der Nebenniere<

e



f

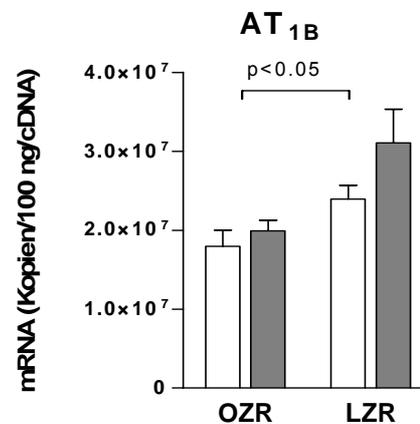


Abb. 16 a-f: Angiotensin II-Rezeptoren in der HPA-Achse nach zweiwöchiger ang II Exposition
leere Säulen: NaCl, gefüllte Säulen: Ang II; MW ± SEM; n = 9-10

IV. Diskussion

In dieser Studie wurde erstmals die Auswirkung von Ang II auf die Reaktivität der HPA-Achse und den Glukosehaushalt von leptinresistenten Zucker Ratten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Ratten mit Leptinresistenz, die unter chronischer Ang II Exposition stehen, auf endokrinen Stress mit einer gesteigerten Ausschüttung von Corticosteron und Glukose reagieren.

Für unsere Studie benutzten wir leptinresistente Zucker Ratten, weil sie ein geeignetes Tiermodell für das metabolische Syndrom darstellen und ihre HPA-Achse fehlreguliert ist. Zu ihren Eigenschaften zählen Adipositas, der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines Typ 2 Diabetes, eine gestörte Glukosetoleranz (Liu et al., 2002) und eine Hyperinsulinämie. Ebenso werden OZR in der Literatur als Tiere mit einer basalen Überaktivierung der HPA-Achse beschrieben (Bray et al., 1992; Dallman et al., 2006). Über eine Blutdruckerhöhung bei OZR vs. LZR finden sich in der Literatur keine einheitlichen Angaben (Alonso-Galicia et al., 1996; Kurtz et al., 1989; O'Donnell et al., 1985; Zemel et al., 1990). Die in dieser Studie verwendeten OZR waren adipös, hatten eine milde Blutdruckerhöhung und ebenso leicht erhöhte Glukosespiegel (Abb.4, 6,8). Eine für OZR charakteristische Hyperinsulinämie konnte bei den hier getesteten Ratten nicht gefunden werden. Die Insulinkonzentration der OZR im Alter von 13,5 Wochen war im Mittel mit 0,37 ng/ml vs. 0,14 ng/ml bei LZR nur unwesentlich höher (Abb.9). Dagegen zeigten Liu et al., dass OZR im Alter von 15 Wochen Insulinkonzentrationen von über 2,5 ng/ml aufweisen und LZR Konzentrationen von unter 0,5 ng/ml (Liu et al., 2002). Auch die beschriebene basale Überaktivierung der HPA-Achse von OZR konnte hier nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, die Bestimmung der Stresshormone zeigte, dass die HPA-Achse der LZR auf einem höheren Niveau aktiv war als die der OZR. ACTH und auch Corticosteron waren im Plasma der LZR signifikant höher (Abb.7). Bei gleicher CRH-Expression im Hypothalamus fiel eine signifikant höhere Expression von POMC in der Hypophyse der LZR auf (Abb.15), was die Analyse der basalen Plasmakonzentration von ACTH bestätigt. In bisherigen Studien wurde einheitlich ein erhöhter basaler Corticosteronspiegel bei OZR vs. LZR gemessen (Guillaume-Gentil et al., 1990; Havel et al., 1996; Livingstone et al., 2000; Pacak et al., 1995; Plotsky et al., 1992). Die Eigenschaften der in dieser Stu-

die getesteten Ratten waren also grundlegend verschieden zu denen, die in der Literatur beschrieben werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es weltweit drei verschiedene Zucker Ratten Stämme gibt, die nach der Separation in ihren Merkmalen nicht mehr übereinstimmen. Die Variabilität innerhalb der verschiedenen Stämme wurde bereits von Diaz-Silva et al. festgestellt (Diaz-Silva et al., 2004).

Da gerade die oben genannten Eigenschaften wesentlich für die Formulierung unserer Hypothese waren, kann unsere Fragestellung mit den hier verwendeten Versuchstieren leider nur unzulänglich beantwortet werden.

Der in der Literatur beschriebene Hypercortisolismus bei leptinresistenten Zucker Ratten fand sich in unserem Versuch möglicherweise auch deshalb nicht bestätigt, weil die Ratten in einem anderen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten wurden als in vielen Studien. Bei OZR ist die zirkadiane Rhythmik der Corticosteronsekretion aufgehoben, während sie bei LZR intakt ist (Fletcher et al., 1986; Martin et al., 1978; Walker et al., 1992). Daraus ergeben sich tageszeitabhängig Differenzen im Größenunterschied der Sekretion von Corticosteron bei den beiden Phänotypen.

Bezüglich der anderen Hormone im HPA-System gibt es keine einheitliche Aussagen. CRH und ACTH zeigten auch in anderen Studien ähnliche oder sogar niedrigere Konzentrationen bei OZR (Pacak et al., 1995; Plotsky et al., 1992).

Wurde die Stressachse durch CRH stimuliert, war zwar die Freisetzung von ACTH und Corticosteron bei OZR nicht signifikant gegenüber den schlanken Ratten verändert, was mit den Ergebnissen von Plotsky et al übereinstimmt, von OZR wurde aber mehr Glukose freigesetzt als von LZR (Abb.13). In anderen Studien wurde die Reaktion auf Stress von OZR teils als höher (Guillaume-Gentil et al., 1990; Mattsson et al., 2003; Pacak et al., 1995), teils als gleich oder niedriger (Plotsky et al., 1992) bewertet.

Die Insulinwerte im zeitlichen Verlauf des CRH-Tests demonstrieren die Insulinresistenz der OZR. Die Insulinwerte stiegen stark an, ohne nach 4 Stunden ihr Maximum erreicht zu haben. Dagegen war die Insulinausschüttung der LZR eher diskret (Abb.14).

Betrachtet man die Verteilung der Angiotensin Rezeptoren in der HPA-Achse bei OZR vs. LZR, fällt der bei LZR höher exprimierte AT_{1B} Rezeptor in Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere auf (Abb.16).

Eine zweiwöchige Behandlung mit niedrig dosiertem Ang II (5 ng/min) führte zu zweifach erhöhten Ang II Spiegeln bei OZR und zu 1,2fach erhöhten Ang II Spiegeln bei LZR (Abb.5). Wachstum und Gewicht der Ratten wurden dadurch nicht beeinflusst (Abb.4). Die von uns gewählte Dosis hatte auch auf Aldosteron und Blutdruck beider Phänotypen keinen Einfluss (Abb.5 und 6). Besonders letzteres zeigt, dass die Ang II Konzentration sehr niedrig gewählt war, da Ang II physiologischerweise zu einem Aldosteronanstieg und zu einer Blutdruckerhöhung führt. Weder das Herzgewicht noch die Herzfrequenz veränderten sich unter der Ang II-Exposition, ebenfalls ein Zeichen der niedrigen Ang II Konzentration. Sämtliche Effekte, die sich in unserem Versuch herausstellten, sind demnach als blutdruckunabhängig zu bewerten.

Die basale Aktivität der HPA-Achse von adipösen und schlanken Zucker Ratten wurde durch die chronische Verabreichung von Ang II vs. NaCl nicht beeinflusst. Dies gilt für die basale Konzentration von ACTH und Corticosteron im Plasma (Abb.7). Dementsprechend waren die basalen Plasmaglukosewerte unverändert (Abb.8). Dies steht im Gegensatz zu Studienergebnissen, die zeigen, dass Glukose im Plasma nach einer Ang II-Infusion steigt (Coimbra et al., 1999; Machado et al., 1998; Mihessen-Neto et al., 1996; Rao, 1994). Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass Ang II in einer ausgeglichenen Stoffwechsellage die Glukosekonzentration akut, also bei Bolusgaben, steigert, nicht aber bei kontinuierlicher, niedrig dosierter Applikation. Auf die Insulinsekretion, den Glukosegehalt von Niere und Leber und die Glykogenspeicherung in der Leber hatte Ang II ebenfalls keinen Einfluss (Tab.2). Chronisch und peripher appliziertes Ang II in der vorliegenden Konzentration ist demnach - in den hier verwendeten Versuchstieren - nicht in der Lage, maßgeblich in die basale Regulation der HPA-Achse und des Glukosehaushalts einzugreifen.

Anders, wenn die HPA-Achse durch CRH-Applikation stimuliert wurde. Im CRH-Test wurde die Wirkung von Ang II auf die aktivierte Stressachse deutlich. Mit Ang II behandelte OZR reagierten dort mit einer erhöhten Stressantwort. Ohne eine signifikante Steigerung der ACTH Sekretion gegenüber der Kontrollgruppe kam es zu einer erhöhten Sekretion von Corticosteron (Abb.10, 11). Gleichzeitig waren die Glukosewerte während des CRH-Tests 60 Minuten lang signifikant gegenüber den anderen Gruppen erhöht (Abb.12). Die AUC, die in Abb.13b die Mobili-

sierung von Glukose über die Zeit anzeigt, war signifikant erhöht gegenüber den nicht behandelten OZR. Hier wird also gezeigt, dass Leptinresistenz unter Einfluss von Ang II zu einer ACTH-unabhängigen Sensitivierung der HPA-Achse führt, was letztlich in einer erhöhten Glukosekonzentration im Plasma resultiert. Der isolierte Anstieg von Corticosteron und Glukose spricht für eine Wirkung auf Ebene der Nebenniere. Dazu passend weisen OZR signifikant höhere AT_{1A} Rezeptor mRNA Level in der Nebenniere auf als schlanke Zucker Ratten (Abb.16). Der AT_{1A} Rezeptor vermittelt die Corticosteronantwort.

Die unterschiedlichen Auswirkungen von Ang II auf den basalen und auf den durch endokrinen Stress stimulierten Hormonhaushalt stimmen mit den Resultaten aus anderen Studien unserer Arbeitsgruppe überein: Eine chronische Behandlung von SHR-Ratten (spontan hypertensive Ratten) mit Candesartan oder Ramipril veränderte zwar nicht die basale Konzentration von ACTH und Corticosteron, nach endokrinem Stress fanden sich allerdings erniedrigte Werte von ACTH und Corticosteron gegenüber der Kontrolle (Raasch et al., 2006b).

Interessanterweise werden bei LZR unter Belastung mit CRH andere Tendenzen sichtbar: Zwar gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Sekretion von ACTH und Corticosteron zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, die Glukosespiegel sind aber tendenziell niedriger bei LZR mit Ang II. Das gilt sowohl für die Spitzenwerte als auch für die insgesamt freigesetzte Glukosemenge. Die Glukosekonzentration im Plasma der Kontroll-Gruppe war während eines Zeitraums von 90 Minuten signifikant höher als die der mit Ang II behandelten LZR (Abb. 12). Anscheinend können Ang II behandelte LZR die Glukoseausschüttung wegen der fehlenden Insulinresistenz besser regulieren als OZR. Die Kurven der beiden mit Kochsalz behandelte Gruppen lagen die ganze Zeit sehr nah beieinander.

Nach der CRH-Applikation wurden die mRNA-Level von CRH im Hypothalamus und von POMC in der Hypophyse der verschiedenen Gruppen verglichen (Abb.15). Es fanden sich in allen Gruppen ähnliche Werte. Es ist demnach fraglich, inwieweit die Dosis von 5 ng/min peripher appliziertes Ang II Auswirkungen auf den zentralen Teil der HPA-Achse hat. Studien haben gezeigt, dass icv. appliziertes Ang II die CRH-Expression im Hypothalamus stimuliert (Aguilera et al., 1995a; Sumitomo et al., 1991).

Die Analyse der Ang II Rezeptoren zeigte signifikant höhere AT_{1A} Rezeptor-mRNA-Level im Hypothalamus von mit Ang II behandelten OZR als in der Kontrollgruppe, möglicherweise als Indiz für die Sensibilisierung der Stressachse durch Ang II bei prädiabetischer Stoffwechsellage (Abb.16).

Die Frage, ob Ang II über eine Aktivierung der HPA-Achse bei leptinresistenten Ratten in den Glukosehaushalt eingreift, kann mit den hier erzielten Ergebnissen nur teilweise beantwortet werden. Der basale Hormonstatus wurde mit der verwendeten Ang II-Dosis bei keinem der beiden Phänotypen verändert. Ein manifester Diabetes mellitus wurde nicht induziert.

Die Ergebnisse des CRH-Tests weisen allerdings 1.) auf eine Beteiligung von Ang II in der Regulation der Stress-Achse und damit verbunden in der Regulation des Glukosehaushaltes und 2.) auf die synergistische Wirkung von Leptinresistenz und Ang II hin. Unter normalen Umständen scheinen OZR trotz Insulinresistenz in der Lage zu sein, angemessen auf eine Stressexposition zu reagieren, wohingegen sie unter dem Einfluss von Ang II die Mobilisation von Glukose weitaus weniger gut kontrollieren können und es zu einer höheren Sekretion von ACTH, Corticosteron und Glukose kommt. Möglicherweise kann Ang II, indem es über eine Regulation der peripheren Stressachse in den Glukosehaushalt eingreift, den Weg zur Entstehung eines Typ 2 Diabetes bahnen. Für diese diabetogene Auswirkung von Ang II auf den Stress- und Glukosehaushalt ist anscheinend die Leptinresistenz der OZR Ratte von essentieller Bedeutung, da LZR nicht vermehrt Glukose freisetzen, wenn sie mit Ang II behandelt wurden. Ang II sensibilisiert demnach die Stress-Achse von OZR und macht sie so reagibler. Bemerkenswert ist, dass dieser Effekt hier bereits in einer Dosis deutlich wird, die den basalen Hormonhaushalt z.B. im Sinne einer physiologischen Blutdruckerhöhung oder einer Aldosteronausschüttung nicht beeinflusst.

Es stellt sich die Frage, ob die Zeit, in der die Ratten dieser chronischen Ang II-Erhöhung ausgesetzt waren, ausreicht, um einen Diabetes mellitus zu induzieren. Beim Menschen ist der Typ 2 Diabetes eine Krankheit, die sich über einen langen Zeitraum entwickelt. Daher scheint es plausibel, anzunehmen, dass die Versuchszeit für die Pathogenese einer manifesten Störung im Glukosehaushalt zu kurz war. Deshalb sollte in weiteren Studien die Reaktion auf eine längere Expositions-

dauer oder eine höhere Dosis Ang II untersucht werden sowie ein valides Tiermodell verwendet werden. Es muss zudem geprüft werden, ob zentral verabreichtes Ang II in der Lage ist, schon in die Homöostase des basalen Glukosespiegels einzugreifen. Denn Ang II wird nicht nur im Blutkreislauf hergestellt sondern auch lokal in vielen Organen z.B. im Gehirn, in der Niere, in den Blutgefäßen und im Herzen (Ganten et al., 1989;Phillips, 1987). Dem lokalen RAAS im Gehirn kommt eine besondere Rolle zu, weil im Blut zirkulierendes Ang II nicht liquorgängig ist (Harding et al., 1988;Volicer and Loew, 1971). Viele der Wirkungen von Ang II auf das Gehirn werden über Ang II Rezeptoren auf Neuronen der zirkumventrikulären Organe (SFO, Eminentia mediana, Nucleus arcuatus, organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), area postrema) vermittelt, da hier die Blut-Hirn-Schranke fehlt. AT₁ exprimierende Neurone im SFO projizieren in den PVN und den Nucleus supraopticus des Hypothalamus, um die Vasopressin- und ACTH-Ausschüttung zu stimulieren (Oldfield et al., 1994), in den Nucleus opticus medianus, um das Durstgefühl anzuregen (Cunningham and Johnson, 1991). Innerhalb der Blut-Hirn-Schranke wirkt lokal im Gehirn synthetisiertes Ang II an den zentralen Rezeptoren. Daher ist es durchaus möglich, dass eine zentral applizierte Ang II Dosis die HPA-Achse auf höherer Ebene und damit nachhaltig zu beeinflussen vermag.

Über welchen Mechanismus ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Antagonisten die Inzidenz von Diabetes verringern, bleibt noch unklar. Mit unserer Studie konnten wir zeigen, dass Ang II in die Glukosehomöostase involviert ist, indem es die Stress-Achse aktiviert. Vor allem leptinresistente Ratten, also Ratten mit dem wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Typ 2 Diabetes - Adipositas - konnten die Glukoseausschüttung im CRH-Test nicht angemessen kontrollieren, wenn sie unter vermehrtem Einfluss von Ang II standen. Wenn die Bildung von Ang II oder die Wirkung von Ang II mittels Rezeptorblockade gehemmt ist, wird die Aktivierung der HPA-Achse bei einem Stresssignal wahrscheinlich nicht in einem solchen Maße zur Glukoseausschüttung führen, wie wir es bei OZR mit Ang II-Pumpe im CRH-Test gesehen haben. Da in Patienten mit Typ 2 Diabetes die HPA-Achse hochreguliert ist (Chan et al., 2001;Chan et al., 2002), könnte dieser Effekt große Auswirkungen haben.

Zurzeit werden folgende Hypothesen über die antidiabetogene Wirkung von ACE-Hemmern und ARB diskutiert:

- Ein durch ACE-Hemmer erhöhter Kaliumspiegel oder eine bessere Durchblutung der Inselzellen im endokrinen Pankreas als ursächlicher Mechanismus (Carlsson et al., 1998), dabei könnte besonders das lokale RAAS im Pankreas eine Rolle spielen. (Tahmasebi et al., 1999). So zeigte Tikellis et al., dass ZDF-Ratten (Zucker diabetic fatty-Ratten) eine erhöhte intrainsuläre Expression von Komponenten des RAAS aufweisen. Dies war assoziiert mit fibrotischen Veränderungen, Apoptosevorgängen und oxidativem Stress - pathologische Veränderungen, die durch Behandlung mit ARBs oder ACE-Hemmern verringert wurden. Gleichzeitig verbesserte sich die erste-Phase-Insulinsekretion. (Tikellis et al., 2004). Allerdings ist die endokrine Funktion des Pankreas, also die Insulinsekretion, beim Typ 2 Diabetes anfangs nicht gestört, im Gegenteil, eine Glukosetoleranzstörung und ein Typ 2 Diabetes ist zumindest zu Beginn mit einer Hyperinsulinämie vergesellschaftet, sodass eine verbesserte Insulinsekretion keinen Effekt auf die Pathogenese eines Diabetes mellitus Typ 2 haben dürfte.
- Eine Bradykinin vermittelte NO Synthese führt zu einer erhöhten insulinabhängigen Glukoseaufnahme im Skelettmuskel und beeinflusst so den Glukosetoffwechsel günstig. (Arbin et al., 2001;Chow et al., 1995;Fogari et al., 1998;Henriksen et al., 1999;Henriksen and Jacob, 1995;Shiuchi et al., 2002;Vuorinen-Markkola and Yki-Jarvinen, 1995;Wang et al., 2003). Hiermit ist aber nur die antidiabetische Wirkung von ACE-Hemmern gemeint, da nur sie die Konzentration von Bradykinin über eine Hemmung des Abbaus steigern. Für ARBs konnte dementsprechend auf dieser Ebene kein insulinsensitivierender Effekt gezeigt werden (Chow et al., 1995;Fogari et al., 1998;Wang et al., 2003). Die Verbesserung der Insulinsensitivität könnte auch auf eine Sympatholyse zurückgeführt werden (Grassi et al., 2003;Moan et al., 1995)
- ACE-Hemmer könnten auch in Leber und Fettzellen die Insulinresistenz mindern, was in einer verminderten hepatischen Glukoneogenese resultieren würde (Torlone et al., 1991). Im Fettgewebe werden alle Komponenten des RAAS synthetisiert und bei Adipositas ist das RAAS hochreguliert. Von reifen Adipozyten produziertes Ang II hemmt das Ausreifen von Fettzellvorläufern, was zu einer geringeren Anzahl von insulinsensitiven Fettzellen führt (Janke et al., 2002). Die Hemmung des RAAS könnte über eine stimulierte Ausdifferenzierung der Adipozyten zu einer besseren Insulinsensitivität führen (Janke et al.,

2002;Sharma et al., 2002). Signifikante Effekte konnten in der *in vitro* Studie von Janke et al. allerdings nur mit dem ARB Irbesartan, nicht aber mit dem ACE-Hemmer Captopril erreicht werden. Der insulinsensitivierende Effekt der Adipozytendifferenzierung wird z.T. über eine Aktivierung des PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ) durch ARBS erreicht (Schupp et al., 2004). Die Aktivierung des PPAR γ wurde allerdings hauptsächlich für Telmisartan in niedrigen Dosierungen beschrieben, die intrinsische Aktivität von Irbesartan liegt in mittleren Dosisbereichen, wohingegen der ARB Losartan nur in sehr hohen, nicht therapeutischen Dosen intrinsisch wirkt und Candesartan keine Affinität zu PPAR γ hat. Gerade aber Candesartan und Losartan wurden in der CHARM- und LIFE-Studie ein antidiabetischer Effekt bescheinigt (Lindholm et al., 2002;Yusuf et al., 2005). Die insulinsensitivierende Wirkung von Telmisartan konnte in *in vivo*-Versuchen in Nagetieren nicht bestätigt werden (Erbe et al., 2006). Gegen die Hypothese spricht außerdem, dass der ACE-Hemmer Captopril die Adipozytendifferenzierung nicht aktivieren konnte (Janke et al., 2002).

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist als ein Symptom der Krankheit „metabolisches Syndrom“ aufzufassen und seine Pathogenese deshalb der Pathogenese dieser Krankheit unterzuordnen. ACE-Hemmer verbessern die Glukosesituation im Rahmen der Therapie des metabolischen Syndroms. Die verminderte Neuenstehung eines Diabetes um 25% muss unserer Meinung nach mehr als nur lokale und auf ein Organ/Gewebe beschränkte Ursachen haben, zumal eine Bestätigung der klinischen Relevanz der bisher herausgearbeiteten positiven Effekte von ACE-Hemmern/ARBs noch ausbleibt und die meisten Effekte entweder für ACE-Hemmer oder für ARBs gelten, aber nicht für beide Stoffklassen. Manche Effekte werden sogar nur von einzelnen ausgewählten Wirkstoffen vermittelt. Wir postulieren, dass der antidiabetogene Effekt der ACE-Hemmern/ARBs globaler stattfindet, auf ein System, dass auf sämtliche Ursprungsorte, die zur Genese des metabolischen Syndroms gehören, Einfluss hat. Die HPA-Achse beeinflusst sämtliche Aspekte des metabolischen Syndroms. Eine Überaktivierung der HPA-Achse und des SNS führt zu Hypertriglyzeridämie, arterieller Hypertonie, Hyperglykämie, zentraler Adipositas, zu Insulinsekretionsstörungen und Insulinresistenz. Das RAAS, das von ACE/ARB gehemmt wird, trägt - jedenfalls in Stresssituationen -

zu einer Aktivierung der Stressachse bei, so dass nach Hemmung des RAAS durch Candesartan eine Aktivierung der HPA-Achse bei Stress nicht messbar ist. Indem ACE/ARBs die Aktivierung der Stressachse durch Ang II hemmen, könnten sie die pathologischen Veränderungen, die eine chronisch stimulierte HPA-Achse mit sich zieht, und somit das metabolische Syndrom und als Teil davon den Diabetes mellitus Typ 2 erfolgreich verhindern.

Mit dieser Studie ist also ein wertvoller Anfang gesetzt worden, dem weitere Untersuchungen folgen müssen, um die Frage nach der diabetogenen Wirkung von Ang II zu beantworten.

V. Zusammenfassung

In neuen Studien hat sich ein Rückgang der Neuentstehung von Diabetes mellitus Typ 2 unter der Therapie mit ACE-Hemmern und Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten (ARBs) herausgestellt, wobei die Ursache für diesen antidiabetischen Effekt noch unklar bleibt. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), das durch ACE-Hemmer und ARBs inhibiert wird, wirkt unter anderem stimulierend auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse). Diese wird bei Stress aktiviert und führt zu einer Cortisol- und Glukose-Erhöhung im Plasma. Sowohl Diabetes mellitus als auch eine Leptinresistenz sind mit einer erhöhten HPA-Achsen-Aktivität assoziiert.

Um den Einfluss von Angiotensin II (Ang II) auf die HPA-Achse und den Glukosehaushalt unter prädisponierenden Bedingungen zu untersuchen, haben wir leptinresistenten Zucker Ratten (OZR, homozygot für den Leptinrezeptordefekt) und schlanken Zucker Ratten (LZR, heterozygot für den Leptinrezeptordefekt), als stoffwechsellnormale Kontrolle, Ang II vs. NaCl dauerhaft über periphere osmotische Minipumpen appliziert. Wir haben den Effekt von Ang II auf die HPA-Achse sowohl auf den basalen Hormonstatus als auch unter Stimulation im CRH-Test analysiert. Es wurden die Glukosespiegel bestimmt und die Konzentrationen von Ang II, Aldosteron, ACTH, Corticosteron und Insulin mittels Radio Immune Assay quantifiziert. Anschließend haben wir die Expression von CRH, POMC und der Ang II Rezeptoren in der HPA-Achse mittels qPCR untersucht. OZR zeigten unter Ang II vs. NaCl eine erhöhte Aktivität der HPA-Achse. Dies manifestierte sich in einer erhöhten ACTH- und Corticosteron-Ausschüttung und erhöhten Glukosewerten. Weiterhin konnten wir Veränderungen bei OZR vs. LZR im Sinne eines metabolischen Syndroms mit höheren Blutdruck- und konsekutiv Glukosewerten und einer Hyperinsulinämie während des CRH-Tests feststellen. Im basalen Hormon- und Glukosehaushalt wurden in der hier verwendeten applizierten Dosis von Ang II keine Veränderungen festgestellt. Es wird also deutlich, dass es bei Ratten mit einem Risikoprofil für das metabolische Syndrom unter Ang II zu Stoffwechselentgleisungen kommen kann, wenn ein luxierendes Ereignis, hier die Belastung mit CRH, hinzukommt. Ang II greift über eine Aktivierung der HPA-Achse in den Glukosehaushalt ein, und es ist vorstellbar, dass ACE-Hemmer/ARBs über die Hemmung des RAAS auf diese Weise den Glukosehaushalt günstig beeinflussen.

VI. Referenzen

2002, Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT): JAMA, v. 288, p. 2981-2997.

Aguilera,G, 1993, Factors controlling steroid biosynthesis in the zona glomerulosa of the adrenal: J.Steroid Biochem.Mol.Biol., v. 45, p. 147-151.

Aguilera,G, A Kiss, X Luo, 1995a, Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration: J.Neuroendocrinol., v. 7, p. 775-783.

Aguilera,G, W S Young, A Kiss, A Bathia, 1995b, Direct regulation of hypothalamic corticotropin-releasing-hormone neurons by angiotensin II: Neuroendocrinology, v. 61, p. 437-444.

Ahima,RS, D Prabakaran, C Mantzoros, D Qu, B Lowell, E Maratos-Flier, J S Flier, 1996, Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting: Nature, v. 382, p. 250-252.

Alonso-Galicia,M, M W Brands, D H Zappe, J E Hall, 1996, Hypertension in obese Zucker rats. Role of angiotensin II and adrenergic activity: Hypertension, v. 28, p. 1047-1054.

Antoni,FA, 1993, Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age: Front Neuroendocrinol., v. 14, p. 76-122.

Arbin,V, N Claperon, M C Fournie-Zaluski, B P Roques, J Peyroux, 2001, Acute effect of the dual angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase 24-11 inhibitor mixanpril on insulin sensitivity in obese Zucker rat: Br.J.Pharmacol., v. 133, p. 495-502.

Armando,I, A Carranza, Y Nishimura, K L Hoe, M Barontini, J A Terron, A Falcon-Neri, T Ito, A V Juorio, J M Saavedra, 2001, Peripheral administration of an angiotensin II AT(1) receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation Stress: Endocrinology, v. 142, p. 3880-3889.

Balkau,B, M Pyorala, M Shipley, A Forhan, J Jarrett, E Eschwege, K Pyorala, 1997, Non-cardiovascular disease mortality and diabetes mellitus: Lancet, v. 350, p. 1680.

Bjorntorp,P, R Rosmond, 2000, Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity: Int.J.Obes.Relat Metab Disord., v. 24 Suppl 2, p. S80-S85.

Bonadonna,RC, R A De Fronzo, 1991, Glucose metabolism in obesity and type 2 diabetes: Diabete Metab, v. 17, p. 112-135.

Bornstein,SR, K Uhlmann, A Haidan, M Ehrhart-Bornstein, W A Scherbaum, 1997, Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly: Diabetes, v. 46, p. 1235-1238.

Bray,GA, J S Stern, T W Castonguay, 1992, Effect of adrenalectomy and high-fat diet on the fatty Zucker rat: *Am.J.Physiol*, v. 262, p. E32-E39.

Cameron,OG, Z Kronfol, J F Greden, B J Carroll, 1984, Hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity in patients with diabetes mellitus: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 41, p. 1090-1095.

Carey,VJ, E E Walters, G A Colditz, C G Solomon, W C Willett, B A Rosner, F E Speizer, J E Manson, 1997, Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study: *Am.J.Epidemiol.*, v. 145, p. 614-619.

Carlsson,PO, C Berne, L Jansson, 1998, Angiotensin II and the endocrine pancreas: effects on islet blood flow and insulin secretion in rats: *Diabetologia*, v. 41, p. 127-133.

Castren,E, J M Saavedra, 1988, Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus and subfornical organ: *Endocrinology*, v. 122, p. 370-372.

Castren,E, J M Saavedra, 1989, Angiotensin II receptors in paraventricular nucleus, subfornical organ, and pituitary gland of hypophysectomized, adrenalectomized, and vasopressin-deficient rats: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 86, p. 725-729.

Chan,O, S Chan, K Inouye, M Vranic, S G Matthews, 2001, Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment: *Endocrinology*, v. 142, p. 4872-4879.

Chan,O, K Inouye, M Vranic, S G Matthews, 2002, Hyperactivation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in streptozotocin-diabetes is associated with reduced stress responsiveness and decreased pituitary and adrenal sensitivity: *Endocrinology*, v. 143, p. 1761-1768.

Chan,TM, J H Exton, 1976, A rapid method for the determination of glycogen content and radioactivity in small quantities of tissue or isolated hepatocytes: *Anal.Biochem.*, v. 71, p. 96-105.

Chow,L, M De Gasparo, N Levens, 1995, Improved glucose metabolism following blockade of angiotensin converting enzyme but not angiotensin AT1 receptors: *Eur.J.Pharmacol.*, v. 282, p. 77-86.

Coimbra,CC, M A Garofalo, D R Foscolo, A R Xavier, R H Migliorini, 1999, Gluconeogenesis activation after intravenous angiotensin II in freely moving rats: *Peptides*, v. 20, p. 823-827.

Coiro,V, R Volpi, L Capretti, G Speroni, P Caffarra, A Scaglioni, L Malvezzi, A Castelli, G Caffarri, G Rossi, ., 1995, Low-dose ovine corticotropin-releasing hormone stimulation test in diabetes mellitus with or without neuropathy: *Metabolism*, v. 44, p. 538-542.

Cunningham,JT, A K Johnson, 1991, The effects of central norepinephrine infusions on drinking behavior induced by angiotensin after 6-hydroxydopamine injection

tions into the anteroventral region of the third ventricle (AV3V): *Brain Res.*, v. 558, p. 112-116.

Dagogo-Jack, S, G Selke, A K Melson, J W Newcomer, 1997, Robust leptin secretory responses to dexamethasone in obese subjects: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 82, p. 3230-3233.

Dallman, MF, N C Pecoraro, S E la Fleur, J P Warne, A B Ginsberg, S F Akana, K C Laugero, H Houshyar, A M Strack, S Bhatnagar, M E Bell, 2006, Glucocorticoids, chronic stress, and obesity: *Prog.Brain Res.*, v. 153, p. 75-105.

De Gasparo, M, K J Catt, T Inagami, J W Wright, T Unger, 2000, International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors: *Pharmacol.Rev.*, v. 52, p. 415-472.

De Kloet, ER, E Vreugdenhil, M S Oitzl, M Joels, 1998, Brain corticosteroid receptor balance in health and disease: *Endocr.Rev.*, v. 19, p. 269-301.

Diaz-Silva, M, M M Grasa, M Blay, J A Fernandez-Lopez, X Remesar, M Alemany, 2004, Strain variability in Zucker rats affects their response to oral oleoyl-estrone: *Diabetes Nutr.Metab*, v. 17, p. 315-322.

Elton, TS, C C Stephan, G R Taylor, M G Kimball, M M Martin, J N Durand, S Oparil, 1992, Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 184, p. 1067-1073.

Erbe, DV, K Gartrell, Y L Zhang, V Suri, S J Kirincich, S Will, M Perreault, S Wang, J F Tobin, 2006, Molecular activation of PPAR γ by angiotensin II type 1-receptor antagonists: *Vascul.Pharmacol.*, v. 45, p. 154-162.

Fletcher, JM, P Haggarty, K W Wahle, P J Reeds, 1986, Hormonal studies of young lean and obese Zucker rats: *Horm.Metab Res.*, v. 18, p. 290-295.

Fogari, R, A Zoppi, L Corradi, P Lazzari, A Mugellini, P Lusardi, 1998, Comparative effects of lisinopril and losartan on insulin sensitivity in the treatment of non diabetic hypertensive patients: *Br.J.Clin.Pharmacol.*, v. 46, p. 467-471.

Ganong, WF, K Murakami, 1987, The role of angiotensin II in the regulation of ACTH secretion: *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, v. 512, p. 176-186.

Ganten, D, J Mullins, K Lindpaintner, 1989, The tissue renin-angiotensin system: a target for angiotensin-converting enzyme inhibitors: *J.Hum.Hypertens.*, v. 3 Suppl 1, p. 63-70.

Gerstein, HC, S Yusuf, R Holman, J Bosch, J Pogue, 2004, Rationale, design and recruitment characteristics of a large, simple international trial of diabetes prevention: the DREAM trial: *Diabetologia*, v. 47, p. 1519-1527.

Grassi, G, G Seravalle, R Dell'Oro, F Q Trevano, M Bombelli, F Scopelliti, A Facchini, G Mancia, 2003, Comparative effects of candesartan and hydrochlorothiazide on blood pressure, insulin sensitivity, and sympathetic drive in obese hypertensive individuals: results of the CROSS study: *J.Hypertens.*, v. 21, p. 1761-1769.

Guillaume-Gentil,C, F Rohner-Jeanrenaud, F Abramo, G E Bestetti, G L Rossi, B Jeanrenaud, 1990, Abnormal regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the genetically obese fa/fa rat: *Endocrinology*, v. 126, p. 1873-1879.

Harding,JW, M J Sullivan, J M Hanesworth, L L Cushing, J W Wright, 1988, Inability of [¹²⁵I]Sar1, Ile⁸-angiotensin II to move between the blood and cerebrospinal fluid compartments: *J.Neurochem.*, v. 50, p. 554-557.

Havel,PJ, B L Busch, D L Curry, P R Johnson, M F Dallman, J S Stern, 1996, Predominately glucocorticoid agonist actions of RU-486 in young specific-pathogen-free Zucker rats: *Am.J.Physiol.*, v. 271, p. R710-R717.

Heemskerk,FM, J M Saavedra, 1995, Quantitative autoradiography of angiotensin II AT₂ receptors with [¹²⁵I]CGP 42112: *Brain Res.*, v. 677, p. 29-38.

Heiman,ML, R S Ahima, L S Craft, B Schoner, T W Stephens, J S Flier, 1997, Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress: *Endocrinology*, v. 138, p. 3859-3863.

Henriksen,EJ, S Jacob, 1995, Effects of captopril on glucose transport activity in skeletal muscle of obese Zucker rats: *Metabolism*, v. 44, p. 267-272.

Henriksen,EJ, S Jacob, T R Kinnick, E B Youngblood, M B Schmit, G J Dietze, 1999, ACE inhibition and glucose transport in insulinresistant muscle: roles of bradykinin and nitric oxide: *Am.J.Physiol.*, v. 277, p. R332-R336.

Inagami,T, D F Guo, Y Kitami, 1994, Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview: *J.Hypertens.Suppl*, v. 12, p. S83-S94.

Iwai,N, T Inagami, N Ohmichi, Y Nakamura, Y Saeki, M Kinoshita, 1992, Differential regulation of rat AT_{1a} and AT_{1b} receptor mRNA: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 188, p. 298-303.

Janke,J, S Engeli, K Gorzelniak, F C Luft, A M Sharma, 2002, Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors: *Diabetes*, v. 51, p. 1699-1707.

Jezova,D, T Ochedalski, A Kiss, G Aguilera, 1998, Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress: *J.Neuroendocrinol.*, v. 10, p. 67-72.

Johren,O, A Dendorfer, P Dominiak, 2004, Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors: *Cardiovasc.Res.*, v. 62, p. 460-467.

Johren,O, C Golsch, A Dendorfer, F Qadri, W Hauser, P Dominiak, 2003, Differential expression of AT₁ receptors in the pituitary and adrenal gland of SHR and WKY: *Hypertension*, v. 41, p. 984-990.

Johren,O, T Inagami, J M Saavedra, 1995, AT_{1A}, AT_{1B}, and AT₂ angiotensin II receptor subtype gene expression in rat brain: *Neuroreport*, v. 6, p. 2549-2552.

Johren,O, T Inagami, J M Saavedra, 1996, Localization of AT₂ angiotensin II receptor gene expression in rat brain by in situ hybridization histochemistry: *Brain Res.Mol.Brain Res.*, v. 37, p. 192-200.

Julius,S, S E Kjeldsen, M Weber, H R Brunner, S Ekman, L Hansson, T Hua, J Laragh, G T McInnes, L Mitchell, F Plat, A Schork, B Smith, A Zanchetti, 2004, Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial: *Lancet*, v. 363, p. 2022-2031.

Keller-Wood,M, B Kimura, J Shinsako, M I Phillips, 1986, Interaction between CRF and angiotensin II in control of ACTH and adrenal steroids: *Am.J.Physiol.*, v. 250, p. R396-R402.

King,H, R E Aubert, W H Herman, 1998, Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections: *Diabetes Care*, v. 21, p. 1414-1431.

Kissebah,AH, N Vydelingum, R Murray, D J Evans, A J Hartz, R K Kalkhoff, P W Adams, 1982, Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity: *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, v. 54, p. 254-260.

Kolaczynski,JW, B J Goldstein, R V Considine, 1997, Dexamethasone, OB gene, and leptin in humans; effect of exogenous hyperinsulinemia: *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, v. 82, p. 3895-3897.

Kurtz,TW, R C Morris, H A Pershadsingh, 1989, The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension: *Hypertension*, v. 13, p. 896-901.

Larsson,H, B Ahren, 1996, Short-term dexamethasone treatment increases plasma leptin independently of changes in insulin sensitivity in healthy women: *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, v. 81, p. 4428-4432.

Leong,DS, J A Terron, A Falcon-Neri, I Armando, T Ito, O Johren, L H Tonelli, K L Hoe, J M Saavedra, 2002, Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT₁(A), AT₁(B) and AT₂ receptors: *Neuroendocrinology*, v. 75, p. 227-240.

Lim,HS, R J MacFadyen, G Y Lip, 2004, Diabetes mellitus, the renin-angiotensin-aldosterone system, and the heart: *Arch.Intern.Med.*, v. 164, p. 1737-1748.

Lindholm,LH, H Ibsen, K Borch-Johnsen, M H Olsen, K Wachtell, B Dahlöf, R B Devereux, G Beevers, U de Faire, F Fyhrquist, S Julius, S E Kjeldsen, K Kristianson, O Lederballe-Pedersen, M S Nieminen, P Omvik, S Oparil, H Wedel, P Aurup, J M Edelman, S Snapinn, 2002, Risk of new-onset diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study: *J.Hypertens.*, v. 20, p. 1879-1886.

Liu,RH, M Mizuta, T Kurose, S Matsukura, 2002, Early events involved in the development of insulin resistance in Zucker fatty rat: *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, v. 26, p. 318-326.

Livingstone,DE, G C Jones, K Smith, P M Jamieson, R Andrew, C J Kenyon, B R Walker, 2000, Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats: *Endocrinology*, v. 141, p. 560-563.

Machado,LJ, U Marubayashi, A M Reis, C C Coimbra, 1998, The hyperglycemia induced by angiotensin II in rats is mediated by AT1 receptors: *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 31, p. 1349-1352.

Martin,RJ, P J Wangsness, J H Gahagan, 1978, Diurnal changes in serum metabolites and hormones in lean and obese Zucker rats: *Horm.Metab Res.*, v. 10, p. 187-192.

Masuzaki,H, Y Ogawa, K Hosoda, T Miyawaki, I Hanaoka, J Hiraoka, A Yasuno, H Nishimura, Y Yoshimasa, S Nishi, K Nakao, 1997, Glucocorticoid regulation of leptin synthesis and secretion in humans: elevated plasma leptin levels in Cushing's syndrome: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 82, p. 2542-2547.

Mattsson,C, M Lai, J Noble, E McKinney, J L Yau, J R Seckl, B R Walker, 2003, Obese Zucker rats have reduced mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in hippocampus-implications for dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obesity: *Endocrinology*, v. 144, p. 2997-3003.

McMahon,M, J Gerich, R Rizza, 1988, Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism: *Diabetes Metab Rev.*, v. 4, p. 17-30.

Miell,JP, P Englaro, W F Blum, 1996, Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects: *Horm.Metab Res.*, v. 28, p. 704-707.

Mihessen-Neto,I, A M Reis, U Marubayashi, C C Coimbra, 1996, Effect of sympathoadrenal blockade on the hyperglycemic action of angiotensin II: *Neuropeptides*, v. 30, p. 303-308.

Moan,A, A HoiEGgen, G Nordby, I K Eide, S E Kjeldsen, 1995, Effects of losartan on insulin sensitivity in severe hypertension: connections through sympathetic nervous system activity?: *J.Hum.Hypertens.*, v. 9 Suppl 5, p. S45-S50.

Morris,RD, D L Rimm, A J Hartz, R K Kalkhoff, A A Rimm, 1989, Obesity and heredity in the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus in 32,662 adult white women: *Am.J.Epidemiol.*, v. 130, p. 112-121.

Mountjoy,KG, J Wong, 1997, Obesity, diabetes and functions for proopiomelanocortin-derived peptides: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 128, p. 171-177.

Munck,A, P M Guyre, N J Holbrook, 1984, Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions: *Endocr.Rev.*, v. 5, p. 25-44.

Nishimura,Y, T Ito, K Hoe, J M Saavedra, 2000, Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT(1) receptor antagonist candesartan blocks brain AT(1) receptors: *Brain Res.*, v. 871, p. 29-38.

- O'Donnell,MP, B L Kasiske, M P Cleary, W F Keane, 1985, Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat. II. Micropuncture studies: *J.Lab Clin.Med.*, v. 106, p. 605-610.
- Oldfield,BJ, E Badoer, D K Hards, M J McKinley, 1994, Fos production in retrogradely labelled neurons of the lamina terminalis following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II: *Neuroscience*, v. 60, p. 255-262.
- Pacak,K, R McCarty, M Palkovits, G Cizza, I J Kopin, D S Goldstein, G P Chrousos, 1995, Decreased central and peripheral catecholaminergic activation in obese Zucker rats: *Endocrinology*, v. 136, p. 4360-4367.
- Pahor,M, B M Psaty, M H Alderman, W B Applegate, J D Williamson, C D Furberg, 2000, Therapeutic benefits of ACE inhibitors and other antihypertensive drugs in patients with type 2 diabetes: *Diabetes Care*, v. 23, p. 888-892.
- Palkovits,M, M J Brownstein, 1988, *Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain*, New York, Elsevier.
- Panzram,G, R Zabel-Langhennig, 1981, Prognosis of diabetes mellitus in a geographically defined population: *Diabetologia*, v. 20, p. 587-591.
- Papaspyrou-Rao,S, S H Schneider, R N Petersen, S K Fried, 1997, Dexamethasone increases leptin expression in humans in vivo: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 82, p. 1635-1637.
- Passonneau,JV, V R Lauderdale, 1974, A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues: *Anal.Biochem.*, v. 60, p. 405-412.
- Pfeffer,MA, K Swedberg, C B Granger, P Held, J J McMurray, E L Michelson, B Olofsson, J Ostergren, S Yusuf, S Pocock, 2003, Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme: *Lancet*, v. 362, p. 759-766.
- Phillips,MI, 1987, Functions of angiotensin in the central nervous system: *Annu.Rev.Physiol*, v. 49, p. 413-435.
- Phillips,MS, Q Liu, H A Hammond, V Dugan, P J Hey, C J Caskey, J F Hess, 1996, Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat: *Nat.Genet.*, v. 13, p. 18-19.
- Plotsky,PM, K V Thiruvikraman, A G Watts, R L Hauger, 1992, Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the Zucker obese rat: *Endocrinology*, v. 130, p. 1931-1941.
- Raasch,W, C Wittmershaus, A Dendorfer, I Voges, F Pahlke, C Dodt, P Dominiak, O Johren, 2006b, Angiotensin II inhibition reduces stress sensitivity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in SHR: *Endocrinology*.
- Raasch,W, C Wittmershaus, A Dendorfer, I Voges, F Pahlke, C Dodt, P Dominiak, O Johren, 2006a, Angiotensin II inhibition reduces stress sensitivity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in SHR: *Endocrinology*.

- Rao,RH, 1994, Effects of angiotensin II on insulin sensitivity and fasting glucose metabolism in rats: *Am.J.Hypertens.*, v. 7, p. 655-660.
- Rivier,C, W Vale, 1983, Effect of angiotensin II on ACTH release in vivo: role of corticotropin-releasing factor: *Regul.Pept.*, v. 7, p. 253-258.
- Roy,M, B Collier, A Roy, 1990, Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation among diabetic outpatients: *Psychiatry Res.*, v. 31, p. 31-37.
- Roy,M, B Collier, A Roy, 1991, Dysregulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and duration of diabetes: *J.Diabet.Complications*, v. 5, p. 218-220.
- Roy,MS, A Roy, W T Gallucci, B Collier, K Young, T C Kamilaris, G P Chrousos, 1993, The ovine corticotropin-releasing hormone-stimulation test in type I diabetic patients and controls: suggestion of mild chronic hypercortisolism: *Metabolism*, v. 42, p. 696-700.
- Saavedra,JM, 1992, Brain and pituitary angiotensin: *Endocr.Rev.*, v. 13, p. 329-380.
- Saavedra,JM, 1999, Emerging features of brain angiotensin receptors: *Regul.Pept.*, v. 85, p. 31-45.
- Sandberg,K, H Ji, A J Clark, H Shapira, K J Catt, 1992, Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype: *J.Biol.Chem.*, v. 267, p. 9455-9458.
- Schneider,H, M Lischinski, E Jutzi, 1993, Survival time after onset of diabetes: 29-year follow-up mortality study in a diabetes cohort from a rural district: *Diabete Metab*, v. 19, p. 152-158.
- Schupp,M, J Janke, R Clasen, T Unger, U Kintscher, 2004, Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity: *Circulation*, v. 109, p. 2054-2057.
- Sharma,AM, J Janke, K Gorzelniak, S Engeli, F C Luft, 2002, Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells: *Hypertension*, v. 40, p. 609-611.
- Shiuchi,T, T X Cui, L Wu, H Nakagami, Y Takeda-Matsubara, M Iwai, M Horiuchi, 2002, ACE inhibitor improves insulin resistance in diabetic mouse via bradykinin and NO: *Hypertension*, v. 40, p. 329-334.
- Spinedi,E, R C Gaillard, 1998, A regulatory loop between the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and circulating leptin: a physiological role of ACTH: *Endocrinology*, v. 139, p. 4016-4020.
- Standl,E, 1995, Hyperinsulinemia and atherosclerosis: *Clin.Invest Med.*, v. 18, p. 261-266.
- Sumitomo,T, T Suda, Y Nakano, F Tozawa, M Yamada, H Demura, 1991, Angiotensin II increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus: *Endocrinology*, v. 128, p. 2248-2252.

Tahmasebi,M, J R Puddefoot, E R Inwang, G P Vinson, 1999, The tissue renin-angiotensin system in human pancreas: *J.Endocrinol.*, v. 161, p. 317-322.

Teo,K, S Yusuf, P Sleight, C Anderson, F Mookadam, B Ramos, L Hilbrich, J Pogue, H Schumacher, 2004, Rationale, design, and baseline characteristics of 2 large, simple, randomized trials evaluating telmisartan, ramipril, and their combination in high-risk patients: the Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial/Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE Intolerant Subjects with Cardiovascular Disease (ONTARGET/TRANSCEND) trials: *Am.Heart J.*, v. 148, p. 52-61.

Tikellis,C, P J Wookey, R Candido, S Andrikopoulos, M C Thomas, M E Cooper, 2004, Improved islet morphology after blockade of the renin-angiotensin system in the ZDF rat: *Diabetes*, v. 53, p. 989-997.

Timmermans,PB, P C Wong, A T Chiu, W F Herblin, P Benfield, D J Carini, R J Lee, R R Wexler, J A Saye, R D Smith, 1993, Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists: *Pharmacol.Rev.*, v. 45, p. 205-251.

Timofeeva,E, D Richard, 1997, Functional activation of CRH neurons and expression of the genes encoding CRH and its receptors in food-deprived lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats: *Neuroendocrinology*, v. 66, p. 327-340.

Timofeeva,E, D Richard, 2001, Activation of the central nervous system in obese Zucker rats during food deprivation: *J.Comp Neurol.*, v. 441, p. 71-89.

Torlone,E, A M Rambotti, G Perriello, G Botta, F Santeusano, P Brunetti, G B Bolli, 1991, ACE-inhibition increases hepatic and extrahepatic sensitivity to insulin in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and arterial hypertension: *Diabetologia*, v. 34, p. 119-125.

Tsujii,S, 2005, [NAVIGATOR trial (nateglinide)]: *Nippon Rinsho*, v. 63 Suppl 2, p. 483-487.

Tsutsumi,K, C Stromberg, M Viswanathan, J M Saavedra, 1991, Angiotensin-II receptor subtypes in fetal tissue of the rat: autoradiography, guanine nucleotide sensitivity, and association with phosphoinositide hydrolysis: *Endocrinology*, v. 129, p. 1075-1082.

Vermes,E, A Ducharme, M G Bourassa, M Lessard, M White, J C Tardif, 2003, Enalapril reduces the incidence of diabetes in patients with chronic heart failure: insight from the Studies Of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD): *Circulation*, v. 107, p. 1291-1296.

Volicer,L, C G Loew, 1971, Penetration of angiotensin II into the brain: *Neuropharmacology*, v. 10, p. 631-636.

Vuorinen-Markkola,H, H Yki-Jarvinen, 1995, Antihypertensive therapy with enalapril improves glucose storage and insulin sensitivity in hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: *Metabolism*, v. 44, p. 85-89.

Walker,CD, K A Scribner, J S Stern, M F Dallman, 1992, Obese Zucker (fa/fa) rats exhibit normal target sensitivity to corticosterone and increased drive to adrenocorticotropin during the diurnal trough: *Endocrinology*, v. 131, p. 2629-2637.

Wang,CH, N Leung, N Lapointe, L Szeto, K D Uffelman, A Giacca, J L Rouleau, G F Lewis, 2003, Vasopeptidase inhibitor omapatrilat induces profound insulin sensitization and increases myocardial glucose uptake in Zucker fatty rats: Studies comparing a vasopeptidase inhibitor, angiotensin-converting enzyme inhibitor, and angiotensin II type I receptor blocker: *Circulation*, v. 107, p. 1923-1929.

Yang,G, Z X Xi, Y Wan, H Wang, G Bi, 1993a, Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress: *Biol.Signals*, v. 2, p. 166-172.

Yang,G, Z X Xi, Y Wan, H Wang, G Bi, D Liu, 1993b, [Changes of angiotensin II contents in rat plasma, brain, cardiovascular system and adrenal during stress]: *Sheng Li Xue.Bao.*, v. 45, p. 505-509.

Yusuf,S, H Gerstein, B Hoogwerf, J Pogue, J Bosch, B H Wolffenbuttel, B Zinman, 2001, Ramipril and the development of diabetes: *JAMA*, v. 286, p. 1882-1885.

Yusuf,S, J B Ostergren, H C Gerstein, M A Pfeffer, K Swedberg, C B Granger, B Olofsson, J Probstfield, J V McMurray, 2005, Effects of candesartan on the development of a new diagnosis of diabetes mellitus in patients with heart failure: *Circulation*, v. 112, p. 48-53.

Zemel,MB, J R Sowers, S Shehin, M F Walsh, J Levy, 1990, Impaired calcium metabolism associated with hypertension in Zucker obese rats: *Metabolism*, v. 39, p. 704-708.

VII. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. P. Dominiak für die Überlassung des Arbeitsplatzes am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Raasch, der das Thema für diese Dissertation bereitstellte und die Arbeit in der gesamten Zeit betreute.

Ferner danke ich den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie für die Einarbeitung in verschiedene Arbeitstechniken und für die Hilfe und Anregungen in der Ausführung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund J.-H. Klusmann und meiner Familie für die Geduld, Unterstützung und Aufmunterung von Beginn an bedanken.

VIII. Lebenslauf

Name Schweitzer
Vorname Nora
Geburtsdatum 24. Juli 1981
Geburtsort Düren, Germany
Adresse Kranckestr.8
30161 Hannover
Tel.: 0179/4543335
E-Mail: noraschweitzer@web.de
Familienstand ledig
Nationalität deutsch
Eltern Michael Schweitzer, Arzt für Allgemeinmedizin
Ruth Sommer, Anästhesistin
Geschwister Nina Schweitzer, 27, Studentin
Nicola Schweitzer, 21, Studentin



Schulische Ausbildung:

1987 – 1991 Grundschule Gürzenich in Düren
1991 - 2000 Gymnasium am Wirteltor, Düren
06/2000 Abitur, Durchschnittsnote: 1,9

Studium:

WS 00/01-SS 07 Medizin an der Universität zu Lübeck
09/2002 Ärztliche Vorprüfung (Physikum): gut
09/2003 1.Staatsexamen: sehr gut
03/2006 2.Staatsexamen: sehr gut
04/2007 3.Staatsexamen: sehr gut

Dissertation und wissenschaftliche Erfahrung:

Seit 04/2004 Thema: Die Auswirkungen von Angiotensin II auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bei leptinresistenten Zucker Ratten
Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. W. Raasch

Publikation:

- Müller H, Schweitzer N et al. Angiotensin II stimulates the reactivity of the pituitary-adrenal-axis in leptin resistant Zucker rats thereby influencing the glucose utilization; submitted at American Journal of Physiology

09/2004 - 10/2004 Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Stuart H. Orkin, M.D. (Children's Hospital Boston, Department Oncology/ Hematology, Harvard Medical School);
02/2005 - 04/2005

Publikation:

- Wu SM et al. Developmental Origin of a Bipotential Myocardial and Smooth Muscle Cell Precursor in the Mammalian Heart; Cell (2006)

Famulaturen:

03/2003 - 04/2003 Allgemeinarztpraxis M. Schweitzer
03/2004 - 04/2004 Gynäkologie (Raphaelsklinik, Münster)
02/2005 - 04/2005 Kardiologie (Massachusetts General Hospital, Boston)

Praktisches Jahr

04/2006-07/2006 Chirurgie FMI Spital Interlaken, Schweiz
08/2006-11/2006 Innere Medizin Erasmus Medical Center, Rotterdam, Niederlande
11/2006-03/2007 Gynäkologie Ostholsteinkliniken Eutin

Freizeit:

Jazz Dance, Modern Dance

Sprachen:

Deutsch, Englisch, Französisch, Niederländisch

Lübeck, den 19.06.2007