Aus dem Insitut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Werner Solbach

Die Interaktion zwischen dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und deren funktionelle Konsequenz im Metabolischen Syndrom

> Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck - Aus der Medizinischen Fakultät -

> > vorgelegt von Helge Müller aus Kiel

Lübeck 2009

1. Berichterstatter:Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch2. Berichterstatter:Prof. Dr. med. Hendrik Lenert3. Berichterstatter:Prof. Dr. med. Jörg PetersTag der mündlichen Prüfung:16.12.2009zum Druck genehmigt.Lübeck, den 16.12.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach - Dekan der Medizinischen Fakultät - - Meiner Familie -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis1				
1	Einleitung	5		
2	Methoden	16		
2.1	Versuchsprotokolle	16		
2.1.1	Erster Studienteil	17		
2.1.2	Zweiter Studienteil	18		
2.1.3	Dritter Studienteil	19		
2.2	Applikation von Medikamenten bzw. Substanzen	20		
2.2.1	Subkutane Langzeitapplikation von Angiotensin-II	20		
2.3	Allgemeine Operationsmethoden	21		
2.3.1	Implantation osmotischer Minipumpen (2ML4; Alzet [®])	21		
2.3.2	Implantation chronischer Katheter	22		
2.3.3	Explantation osmotischer Minipumpen (2ML4; Alzet [®])	23		
2.3.4	Explantation der Nebennieren (Adrenalektomie)	23		
2.4	Gewinnung von biologischem Material	25		
2.4.1	Stabilisatoren und Gerinnungshemmer	25		
2.4.2	Blutentnahme über einen arteriellen Dauerkatheter	25		
2.4.3	Blutentnahme über den Schwanz			
2.4.4	Blutgewinnung über Dekaptation			
2.4.5	Tötung und Organpräparationen			
2.5	Funktionstests	27		
2.5.1	Blutdruckmessung über einen Arterienkatheter	27		
2.5.2	Nicht-invasive Blutdruckmessung (Tail-Cuff-Methode)			
2.5.3	CRH-Test und ACTH-Test			
2.5.4	"forced-Schwimm-Test" (FST)			
2.5.5	Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT)			
2.6	Analytische Methoden			
2.6.1	"Radio-Immuno-Assay" (RIA)			
2.6.2	ACE-Aktivitätsbestimmung	31		

	2.6.3	Katecholamin-Bestimmung	32
	2.6.4	Histologische Untersuchung der Dicke der Zona Glomerulosa	32
	2.6.5	Präparation des Hypothalamus	33
	2.6.6	mRNA-Extraktion aus Gewebeproben	33
	2.6.7	mRNA-Messung mit RiboGreen [®]	34
	2.6.8	cDNA-Synthese	35
	2.6.9	Quantitative "real-time-PCR"	36
	2.6.10	Gelelektrophorese	38
	2.7	Statistische Methoden	40
3		Ergebnisse	41
	3.1	Erster Studienteil	41
	3.1.1	Einfluss von Angiotensin-II auf das Körpergewicht	41
	3.1.2	Futter- und Wasseraufnahme unter Angiotensin-II	42
	3.1.3	Veränderung basaler Stoffwechsel-Parameter im Plasma	43
	3.1.4	Hämodynamik und linksventrikuläres Gewicht	44
	3.1.5	Veränderung basaler RAAS-Komponenten im Plasma	45
	3.1.6	Basale Stressparameter und Stress-Sensitivität	46
	3.1.7	Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT)	50
	3.1.8	Einfluss von Angiotensin-II auf die "mRNA-steady-state-	
		Konzentrationen" der HPA-Achse	52
	3.1.9	Einfluss der chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf die	
		Dicke der Zona Glomerulosa	54
	3.1.10	Einfluss der chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf die	
		"mRNA-steady-state-Konzentrationen" wichtiger Proteine der	
		Steroid-Biosynthese	56
	3.2	Zweiter Studienteil	59
	3.2.1	Körpergewicht, Körperlänge sowie Body-Mass-Index (BMI)	59
	3.2.2	Blutdruck und Herzfrequenz	60
	3.2.3	Angiotensin-II und Aldosteron	61
	3.2.4	Einfluss von Angiotensin-II auf die Energie- und Wasser-	
		Aufnahme	62

	3.2.5	Metabolische Veränderungen durch chronische Angiotensin-II-		
		Behandlung63		
	3.2.6	ACTH-Test64		
	3.2.7	Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT) 65		
;	3.3	Dritter Studienteil67		
	3.3.1	Körpergewicht		
	3.3.2	Energie- und Wasser-Aufnahme68		
	3.3.3	Einfluss von Angiotensin-II auf basale Plasmakonzentrationen		
		von Glukose, Insulin und Corticosteron70		
	3.3.4	Hämodynamische Charakterisierung und Veränderungen im		
		Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)72		
	3.3.5	Stressreaktivität im "forced-Schwimm-Test" (FST)73		
	3.3.6	Einfluss von Nahrungskarenz auf Glukose, Insulin und		
		Corticosteron74		
	3.3.7	Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT)76		
4		Diskussion		
	4.1	Tiermodell		
	4.2	Beeinflussung der HPA-Achsen-Reaktivität durch chronisch		
		erhöhtes Plasma-Angiotensin-II 82		
	4.3	Beeinflussung der Glukoseutilisation durch die gesteigerte		
		HPA-Achsen-Reaktivität85		
4	4.4	Regulation des Körpergewichts unter der chronischen		
		Angiotensin-II-Behandlung90		
	4.5	Aldosteron und Blutdruck92		
4	4.6	Ausblick		
5		Zusammenfassung97		
6		Literaturverzeichnis		
7		Anlagen 117		
	7.1	Abbildungsverzeichnis		
	7.1 7.2	Abbildungsverzeichnis		

	7.3	Substanzen und erworbene Lösungen	122
	7.4	Rezepturen von Lösungen und Puffern	124
	7.5	Erworbene Versuchs-Kits	126
	7.5.1	RIA-Kits	126
	7.5.2	Kits zur Bestimmung der Gen-Expression	126
	7.6	Verbrauchsmaterialien	126
	7.7	Geräte	128
	7.8	Abkürzungsverzeichnis	131
8	}	Danksagung	134
9)	Curriculum vitae	135
9 1	0	Curriculum vitae Veröffentlichungen	135 136
9 1	0 10.1	Curriculum vitae Veröffentlichungen Poster	135 136 136
9 1	0 10.1 10.2	Curriculum vitae Veröffentlichungen Poster Kurz-Vorträge	135 136 136 136
9 1	0 10.1 10.2 10.3	Curriculum vitae	135 136 136 136 137
9 1	0 10.1 10.2 10.3 10.4	Curriculum vitae	135 136 136 136 137 137
9 1	0 10.1 10.2 10.3 10.4 10.5	Curriculum vitae	 135 136 136 136 137 137 138

1 Einleitung

Die Erkrankung Diabetes mellitus Typ-2 stellt ein immer größer werdendes, weltweites Problem dar. Vor allem in den Industriestaaten, aber auch in den Schwellen-Ländern erhöht sich die Anzahl erkrankter Menschen zusehends. Nach Schätzungen der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) ist die weltweite Anzahl erkrankter Menschen von etwa 135 Millionen im Jahr 1995 auf etwa 217 Millionen Menschen im Jahr 2005 angestiegen und wird Schätzungen zufolge im Jahr 2030 auf über 366 Millionen ansteigen (Wild et al. 2004, Smyth und Heron 2006). In den USA leiden etwa 7% der Bevölkerung, also etwa 20,8 Millionen, an einem Diabetes. In Deutschland und den meisten europäischen Ländern ist die genaue Zahl der Erkrankten nicht bekannt. Nach der evidenzbasierten Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) von 2004 muss in Deutschland von einer Prävalenz von etwa 8% für den Typ-2-Diabetes ausgegangen werden und dies mit steigender Tendenz (Überblick siehe Giani 2004). Diese erschreckende Entwicklung stellt Deutschland vor ein großes gesundheitsökonomisches Problem. Durch eine adäquate Behandlung der Erkrankung sowie ihrer Begleit- und Folgeerscheinungen wie Retinopathien, Nephropathien und Polyneuropathien wurde das deutsche Gesundheitssystem allein im Jahr 2001 mit etwa 30,6 Milliarden Euro (ca. 14,2 % der Gesamt-Ausgaben) belastet (Köster et al. 2006). Aufgrund dieser hohen Belastung, aber vor allem durch die erhöhte Mortalität und Morbidität (Panzram und Zabel-Langhennig 1981, Balkau et al. 1997, Jagger et al. 2003) unter einem Typ-2-Diabetes ist eine effektive Prävention von entscheidender Bedeutung.

Die Ätiologie eines Typ-2-Diabetes ist multifaktoriell. Neben einer genetischen Prädisposition (Frayling 2007, Teran-Garcia und Bouchard 2007, Qi et al. 2008) spielen auch soziokulturelle und ernährungsbedingte Faktoren eine wichtige Rolle (Hu et al. 2006, Meisinger et al. 2006, Schienkiewitz et al. 2006). So kann die Umstellung auf eine fett- und kohlenhydratreiche Ernährung und die abnehmende körperliche Aktivität in den Schwellen-Ländern für den rapiden Zuwachs des Typ-2-Diabetes verantwortlich gemacht werden. Dieser Zuwachs geht mit einer enormen Zunahme des Körpergewichts, vor allem der abdominalen Adipositas

einher (Misra und Khurana 2008). Hinzu kommen Lipidstoffwechselstörungen, Bluthochdruck sowie ein gestörter Glukose-Stoffwechsel. Alle diese Symptome wurden schon 1988 von Reaven et al. unter dem Begriff "Syndrom X" zusammengefasst, erlangten allerdings erst 1998 durch die WHO unter dem Begriff Metabolisches Syndrom ihre internationale Anerkennung (Alberti und Zimmet 1998). Bis heute konnte sich jedoch nicht auf eine international gültige Definition Metabolischen Syndroms geeinigt werden, wodurch der Vergleich des epidemiologischer Studien und vor allem die Erstellung von Behandlungsleitlinien erschwert werden (Hanefeld et al. 2007, Moebus und Stang 2007). Stellte die WHO in ihrer Definition von 1998 noch die Insulinresistenz in das Zentrum ihrer Betrachtung, rückte wenig später die abdominale Adipositas als wesentlicher Faktor einer Insulinresistenz in den Mittelpunkt (Björntorp 1988, McGarry 1992, Boden et al. 1994). So wurde in den beiden neuesten Definitionen des Metabolischen Syndroms (IDF 2005 und AHA/NHLBI 2005) die Insulinresistenz als dem Syndrom nicht mehr zwingend zugehörig betrachtet (Grundy et al. 2005, IDF 2005) und die Adipositas als entscheidende Ursache für die Entstehung eines Typ-2-Diabetes angesehen.

Als Pathomechanismus für einen Typ-2-Diabetes wird vor allem eine durch Überernährung ausgelöste Insulinresistenz verantwortlich gemacht. Hierunter ist ein vermindertes Ansprechen von insulinsensiblem Gewebe wie Muskel- und Fettgewebe auf Insulin zu verstehen. In einer gesunden Zelle wird der hauptverantwortliche insulinabhängige Glukosetransporter (GLUT 4) durch Erhöhung der Insulin-Spiegel in die Zellmembranen transloziert und so der Glukose-Spiegel im Blut gesenkt. Durch genetische Prädisposition, zum Beispiel eine vermehrte Bildung bestimmter Unterformen der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP N1 sowie PTP 1B) (Goldstein 2001, Burdon et al. 2006), aber auch in überernährten Zellen wird der GLUT 4-Besatz unter einer Insulin-Stimulation reduziert, wodurch der Blutzuckerspiegel nicht mehr adäguat gesenkt werden kann. Zur Kompensation wird mehr Insulin ausgeschüttet und so der Insulingestört. Durch Erhöhung des Leistungsumsatzes und eine Regelkreis Gewichtsreduktion kann dieser Kreislauf unterbrochen und eine schon bestehende Insulinresistenz wieder gemindert werden. So stellt die Gewichtsreduktion einen der zentralen Angriffspunkte für die Behandlung beziehungsweise Prävention des

- 6 -

Einleitung

Typ-2-Diabetes dar. Nach Schätzungen der WHO könnte damit ein Großteil an oralen Antidiabetika eingespart werden, sodass die Gewichtsreduktion zwingend mit in die Behandlung eingehen sollte.

Auch andere Symptome des Metabolischen Syndroms, wie die Hypertonie lassen sich durch die Reduktion des Körpergewichts verbessern. Tuck et al. zeigten bereits 1981, dass eine Gewichtsreduktion mit einer Senkung des Blutdrucks als auch mit einer Reduktion der Renin-Aktivität im Plasma einhergeht. Renin steht am Anfang des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), welches eine Hormonkaskade darstellt. die durch die Biosynthese von Renin im juxtaglomerulären Apparat der Niere gestartet wird. Renin spaltet von Angiotensinogen ein inaktives Decapeptid, das Angiotensin-I, ab, welches durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) weiter in das wirksame Angiotensin-II gespalten wird. Neben den für das Angiotensin-II schon lange bekannten Wirkungen konnten in den letzten Jahren für weitere Komponenten und Spaltprodukte des RAAS physiologische Wirkungen nachgewiesen werden (zur Übersicht Ribeiro-Oliveira et al. 2008).

Die Wirkungen von Angiotensin-II sind sehr vielfältig und vor allem in der Regulation des Blutdrucks und der Flüssigkeitshomöostase zu finden. So gehören zu ihnen die Vasokonstriktion, die Rückresorption von Natrium in der Niere, die Regulation von Durst und Trinkverhalten, die Hemmung der Renin-Expression sowie die Stimulation der Aldosteron-Biosynthese, aber auch die Beeinflussung von Fettzelldifferenzierungen und die Regulation der sympathischen Nervenaktivität (Fyhrquist und Saijonmaa 2008). Alle diese Wirkungen werden über den Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor (AT₁-Rezeptor) vermittelt. AT₁-Rezeptoren sind sieben transmembranäre Rezeptoren, die über eine Gi- bzw. Ga-Kopplung ihre Wirkung vermitteln (Sandberg 1994, Griendling et al. 1996). In Ratten und Mäusen konnten im Gegensatz zum Menschen des Weiteren zwei unterschiedliche Varianten des AT₁-Rezeptors beschrieben werden: Der AT_{1A}- und der AT_{1B}-Rezeptor. Diese Rezeptoren unterscheiden sich nur in achtzehn Aminosäuren und weisen unterschiedliche Genloki auf (Elton et al. 1992, Iwai und Inagami 1992, Kakar et al. 1992, Sasamura et al. 1992). Diese Rezeptorvarianten können pharmakologisch nicht unterschieden werden, sind aber gewebsspezifisch in ihrer Expression reguliert und übernehmen so unterschiedliche physiologische

- 7 -

Funktionen (Burson et al. 1994, Jöhren et al. 2003). Neben den gut beschriebenen AT₁-Rezeptoren existiert noch der Typ-2–Angiotensin-II-Rezeptor (AT₂-Rezeptor), dessen physiologische Funktion noch nicht in Gänze geklärt ist. In adulten Ratten ist der AT₂-Rezeptor vor allem im Gehirn und im Nebennierenmark nachzuweisen (Jöhren et al. 1995, 1996). Durch die hohe Expression in fetalen Geweben wird ihm unter anderem eine Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen zugesprochen (Jöhren et al. 2004). Jones et al. konnten 1997 zeigen, dass es über einen AT₂-Rezeptor-vermittelten Mechanismus zu einem Anstieg der Triglycerid-Spiegel in 3T3-L1-Zellen sowie in humanen Adipozyten kommt. Dies steht im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die eine dominante bzw. ausschließliche Regulation über den AT₁-Rezeptor beschreiben konnten (Burson et al. 1994, Crandall et al. 1994). Trotz dieser Diskrepanz kommt dem RAAS eine wichtige, regulatorische Rolle im Lipidstoffwechsel zu, dabei ist die Interaktion zwischen RAAS und Fettgewebe bidirektional. So haben gesteigerte Fettmassen eine Hochregulation von RAAS-Komponenten im Fettgewebe zur Folge (Giacchetti et al. 2000, Van Harmelen et al. 2000), die sich durch eine Gewichtsreduktion, also Fettmassen-abhängig wieder reduzieren lassen (Engeli et al. 2005). Bedingt durch die Blutdruck steigernden Effekte eines aktivierten RAAS, wird diesem ein entscheidender Beitrag in der Adipositas induzierten Hypertonie zugesprochen (Aneja et al. 2004).

Die Hemmung des RAAS hat sich durch die Entwicklung potenter und selektiver Antagonisten in der medikamentösen Therapie der Hypertonie etabliert. Hierzu gehören vor allem die ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Blocker sowie seit neuestem die Reninhemmer und die Aldosteronrezeptorantagonisten. Vor allem die ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Blocker haben sich aufgrund ihrer nierenprotektiven Eigenschaften in der Behandlung von Patienten mit einem gestörten Glukosestoffwechsel gegenüber anderen Antihypertensiva durchgesetzt (Noda et al. 2001, Nagai et al. 2005, Barit und Cooper 2008, Berra und Miller 2009).

Überdies konnten für diese Medikamente positive, metabolische Eigenschaften nachgewiesen werden. So kommt es im Gegensatz zur Behandlung mit adrenergen Beta-1-Rezeptor-Blockern und Diuretika, die eine Insulinresistenz verstärken (Lind et al. 1994, Padwal und Laupacis 2004) und so einer

Verschlechterung des Glukosestoffwechsels Vorschub leisten, unter der RAAS-Blockade zu einer Insulin-Sensitivierung (Lindholm et al. 2002, Grassi et al. 2003). Die klinische Relevanz einer RAAS-Blockade für metabolische Veränderungen konnte in den letzten Jahren in vielen klinischen Studien nachgewiesen werden. So sind sowohl ACE-Hemmer als auch AT₁-Blocker in der Lage, das Neuauftreten eines Typ-2-Diabetes zu vermindern (Tab.1-1) (Scheen 2004, McGuire et al. 2008).

Die genauen Mechanismen, wie die Inzidenz eines Typ-2-Diabetes unter einer Blockade des RAAS vermindert wird, sind noch nicht geklärt. So befinden sich mehrere Angiotensin-II-abhängige Mechanismen wie zum Beispiel eine verbesserte Ausreifung von Adipozyten, eine Insulinsensitivierung Insulinsensibler Gewebe, ein verbesserter Blutfluss in Muskelgewebe und Pankreas

Studienname	Inzidenz eines Typ-2- Diabetes	Relative Reduktion der Inzidenz	Dauer (Jahre)	Anzahl der Patienten	Literatur
ACE-Hemmer					
CAPPP	Captopril 6,5 % vs. Beta-Blocker und/oder Thiazid 7,3 %	11 %	6,1	10413	Hansson et al. 1999
HOPE	Ramipril 3,6 % vs. Placebo 5,4%	22%	5,0	5730	Yusuf et al. 2000
ALLHAT	Chlorthalidon 11,6 % vs. Amlodipin 9,8 % vs. Lisinopril 8,1 %	31 % (C/L) 18 % (A/L)	4,9	14816	ALLHAT 2002
PEACE	Trandolapril 9,8 % vs. Placebo 11,3 %	17 %	4,8	829	Braunwald et al. 2004
DREAM	Ramipril 19,5 % vs. Placebo 18,1 %	19 %	3	6269	Bosch et al. 2006
AT ₁ -Blocker					
LIFE	Lorsartan 6 % vs. Atenolol 8 %	25 %	4,8	7998	Lindholm et al. 2002
CHARM	Candesartan 6,0 % vs. Placebo 7,4 %	19 %	3,1	5439	Yusuf et al. 2003
SCOPE	Candesartan 4,3 % vs. Placebo 5,3 %	18,9 %	3,7	4342	Lithell et al. 2003

Tabelle 1-1:Übersicht über klinische Studien, die die Beeinflussung der Inzidenz einesTyp-2-Diabetes unter ACE-Hemmung bzw. AT1-Blockade untersuchten

sowie eine Hemmung des Sympathikus in der Diskussion (zur Übersicht siehe Scheen 2004). Hinzu kommen Beobachtungen, dass einige AT₁-Rezeptor-Blocker, vor allem Telmisartan, unabhängig von Angiotensin-II den Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-γ (PPAR-γ) in seiner Aktivität erhöhen (Schupp et al. 2004). Ein PPAR-γ-abhängiger Mechanismus ist jedoch als alleiniger Mechanismus unwahrscheinlich, da damit sowohl die positiven klinischen Effekte der ACE-Hemmer als auch die des Candesartan nicht erklärt werden können. Candesartan weist einen 200-fach niedrigeren K_i-Wert als Telmisartan auf und ist daher ein wesentlich schlechterer Stimulator für PPAR-γ (Marshall et al. 2006).

Das Metabolische Syndrom und vor allem die Anreicherung von visceralem Fettgewebe konnten in den vergangenen Jahren eng mit einer Steigerung der Stresssensitivität in Verbindung gebracht werden (Björntorp und Rosmond 2000, Dallman et al. 2006). Durch die enge Verbundenheit von Adipositas und Diabetes konnte diese erhöhte Stresssensitivität auch bei Diabetikern nachgewiesen werden (Roy et al. 1990, 1991, Bruehl et al. 2007). Hinzu kommt eine verstärkte Erhöhung der Blutglukosespiegel durch Glukocorticoide (Feldman-Billard et al. neben 2006). Glukocorticoide stellen Katecholaminen die wichtigsten Stresshormone dar. In einer akuten Stresssituation besteht ihre Aufgabe darin, den Organismus vor zu starken Belastungen zu schützen und ihn in Alarmbereitschaft zu versetzen. Dazu gehören neben der Erhöhung des Blutdruckes und der verbesserten Durchblutung der Muskeln vor allem die Aufrechterhaltung des Glukosestoffwechsels und die Bereitstellung der akut benötigten Energie in Form von Glukose. Dies wird vor allem durch einen katabolischen Abbau von Energiespeichern wie der Glukoneogenese in der Leber, der Lipolyse von Fettspeichern und der Proteolyse von Muskelgewebe bewerkstelligt (Jones et al. 1993, Hasselgren 2000, Menconi et al. 2007).

Neben dem primären Effekt der Proteolyse und der Erhöhung der Glukoneogenese verstärken Glukocorticoide über einen sekundären Mechanismus die katabolen Katecholamin-Wirkungen (Allan und Titheradge 1984, Moriyama et al. 1997). Über diese Mechanismen sind Glukocorticoide in der Lage, die Blutglukose-Spiegel zu erhöhen (Munck et al. 1984, McMahon et al. 1988, Nicod et al. 2003, Pasternak et al. 2004, Lukins und Manninen 2005, Feldman-Billard et al. 2006, Hans et al. 2006, Kooij et al. 2006, Vogelzang et al. 2007).

- 10 -

Die Glukocorticoide stehen am Ende der sogenannten HPA-Achse, die ihren Namen über die beteiligten Organe Hypothalamus, Hypophyse (Piturity) sowie Nebennieren (Adrenals) erhält. Durch einen Stressreiz wird aus Neuronen des Nucleus paraventricularis, einer Region des Hypothalamus, das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) freigesetzt. Dieses gelangt über das Portalvenensystem die Adenohypophyse und vermittelt die in dort Freisetzung von Adrenocorticotropin (ACTH) (Aguilera 1994). ACTH wird durch die enzymatische Spaltung von Proopiomelanokortin (POMC) gebildet und in die Blutbahn sezerniert. In der Zona fasciculata der Nebennierenrinde stimuliert ACTH daraufhin die Ausschüttung von Glukocorticoiden (Harmer und Bicknell 2005). Nager sind durch das Fehlen des Cytochrom P450-17α nicht in der Lage, Cortisol zu bilden (Le Goascogne et al. 1991, Ishimura und Fujita 1997). Daher ist das Haupt-Glukocorticoid nicht wie beim Menschen das Cortisol, sondern das Corticosteron. Sowohl Cortisol als auch Corticosteron vermitteln ihre physiologischen Funktionen durch Bindung an zytoplasmatische Rezeptoren. Nach Translokation des Komplexes in den Kern wird über eine Bindung an die DNA die Transkription bestimmter Proteine und Enzyme gesteuert.

Durch eine chronische Aktivierung der HPA-Achse, aber auch durch die Langzeit-Behandlung mit Glukocorticoiden kommt es so zu zentralisierter Adipositas (Stammfettsucht), Hypertonie, Hyperglykämie, Insulinresistenz sowie Hypertriglyceridämie (Chrousos 2000, Warne 2008). Diese enge Verbundenheit von gesteigerter HPA-Achse und Metabolischem Syndrom legt den Schluss nahe, dass die HPA-Achse in der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes eine Rolle spielt.

Studien der eigenen Arbeitsgruppe konnten erstmalig 2006 den reduzierenden Effekt von ACE-Hemmern (Ramipril) als auch von AT₁-Blockern (Candesartan) auf die HPA-Achsen-Reaktivität in spontan-hypertensiven Ratten (SHR-Ratte) nachweisen. Diese Reduktion war mit einer verbesserten Glukoseutilisation assoziiert (Raasch et al. 2006). Pavlatou et al. (2007) konnten in einer kleinen Anzahl an Typ-2-Diabetes leidenden Patienten unter einer dreimonatigen Behandlung mit Candesartan eine Reduktion der Cortisol-Ausschüttung durch CRH-Stimulation nachweisen. Durch die von Raasch et al. und Pavlatou et al. beschriebene Reduktion der HPA-Achsen-Reaktivität unter einer AT₁-Blockade und die starke Assoziation dieser beiden Systeme mit dem Metabolischen

- 11 -

Einleitung

Syndrom ergibt sich ein neuer und interessanter Ansatzpunkt zur Erklärung der präventiven Wirkung einer RAAS-Blockade.

In den vergangenen Jahren konnten in allen Organen der HPA-Achse sowohl AT₁-, als auch AT₂-Rezeptoren nachgewiesen werden. Dabei sind bei der Ratte die AT_{1A}-Rezeptoren vorrangig in Hypothalamus und Nebennieren und die AT_{1B}-Rezeptoren vorwiegend in Hypophyse und Nebennieren exprimiert. Eine relativ starke Expression konnte für die AT₂-Rezeptoren in den Nebennieren nachgewiesen werden (Heemskerk und Saavedra 1995, Jöhren et al. 1995, 1996, Saavedra 1999, de Gasparo et al. 2000, Jöhren et al. 2003). Neben der Expression von AT-Rezeptoren im Hypothalamus ist diese in weiteren stressmodulierenden Regionen des Gehirns wie der Eminentia mediana und dem 2000). Aus Subfornikalorgan nachzuweisen (de Gasparo et al. dem Subfornikalorgan projizieren AT₁-Rezeptor exprimierende Neurone in den Hypothalamus, der nach Stimulation die Ausschüttung von CRH und Vasopressin stimuliert und so die HPA-Achse aktiviert (Oldfield et al. 1994). Durch einen Stressreiz kommt es sowohl im Subfornikalorgan, als auch im Hypothalamus zu einer Stimulation der AT1-Rezeptoren; dies ist unter anderem auf eine Rückkopplung mit Glukocorticoiden zurückzuführen (Castren und Saavedra 1988, 1989, Saavedra 1992, Aguilera et al. 1995a, Aguilera et al. 1995b, Aguilera et al. 1995c, Jezova et al. 1998, Saavedra 1999, Leong et al. 2002). Auch in der Hypophyse unterliegen die AT₁-Rezeptoren einer stressabhängigen Regulation (Leong et al. 2002). Das durch einen Stressreiz aktivierte sympathische Nervensystem stimuliert in der Niere die Expression von Renin, wodurch es parallel zu den Stressreaktionen zu einer Aktivierung des RAAS und so zur vermehrten Bildung von Angiotensin-II kommt (Yang et al. 1993). Angiotensin-II ist nunmehr in der Lage, sowohl die CRH-, als auch die ACTH-Freisetzung unter diesem Stressreiz zu verstärken (Ganong und Murakami 1987, Sumitomo et al. 1991, Saavedra 1992, Antoni 1993).

Ein weiterer Regulator der HPA-Achse, der auch in der Genese des Metabolischen Syndroms eine Rolle spielt, ist das Leptin. Leptin ist ein Peptidhormon, welches in Adipozyten gebildet wird und entscheidend an der Regulation der Fettspeicherung und der Energieaufnahme beteiligt ist. Durch die Zunahme der Fettmasse erhöhten sich die Spiegel an Leptin im Plasma und

- 12 -

reduzierten das Hungergefühl bei gleichzeitiger Steigerung SO des Energieumsatzes. Leptin inhibiert die durch einen Stressreiz ausgelöste Freisetzung von ACTH und Corticosteron (Ahima et al. 1996, Bornstein 1997, Bornstein et al. 1997, Heiman et al. 1997). Die Plasmaspiegel von Corticosteron sind dabei umgekehrt proportional zu den Leptin-Plasmaspiegeln (Ahima et al. 1996). Patienten, die unter dem Metabolischen Syndrom leiden, weisen meist eine verminderte Ansprechbarkeit gegenüber Leptin auf. Man spricht dann von einer erworbenen Leptinresistenz. Bei adipösen Ratten löst die intra-cerebralventriculäre-Gabe (icv-Gabe) von Leptin eine vergleichbare Reduktion der Nahrungsaufnahme wie in schlanken Tieren auf, während nach einer peripheren Gabe die Reduktion signifikant niedriger ist. Dies wird von den Autoren mit einer verminderten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Leptin durch eine hochkalorische Diät erklärt (Halaas et al. 1997, Van Heek et al. 1997). Diese Theorie ist aber umstritten, da einige zentrale Mechanismen, wie beispielsweise die Aktivierung des renalen, sympathischen Systems, nicht durch eine Leptinresistenz beeinflusst werden (Mark et al. 2002).

Basierend auf den Berichten, dass

- 1.) Angiotensin-II zu einer Hyperreaktivität der HPA-Achse führt;
- 2.) eine erhöhte HPA-Achsen-Reaktivität auch im Zeichen einer Leptinresistenz zu beobachten ist;
- 3.) eine Hyperreaktivität der HPA-Achse mit einer Verschlechterung der Glukoseutilisation einhergeht;

war Ziel dieser Dissertationsschrift zu untersuchen, ob die Reaktivität der HPA-Achse im Zeichen einer Leptinresistenz durch Angiotensin-II synergistisch verstärkt wird. Die Beantwortung dieser Frage ist insbesondere auch aus klinischer Sicht relevant, da bei Patienten mit Metabolischem Syndrom sowohl eine Resistenz des Leptin-Systems als auch ein stimuliertes RAAS aufweisen. Im Einzelnen sollten in dieser Arbeit daher folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Kommt es unter chronisch erhöhten Angiotensin-II-Plasmaspiegeln in leptinresistenten, adipösen Zucker-Ratten zu einer stimulierten Reaktivität der HPA-Achse gegenüber leptinsensitiven, schlanken Zuckerratten?
- 2) Wenn ja, ist die Effektivität von Angiotensin-II dosisabhängig?
- 3) Auf welche Mechanismen ist ein solcher Synergismus zurückzuführen?
- 4) Geht diese postulierte HPA-Achsen-Sensitivierung mit einer Verschlechterung des Glukosestoffwechsels einher?
- 5) Wandelt sich durch eine chronische Behandlung mit Angiotensin-II über diesen Mechanismus ein manifester Prädiabetes in einen Typ-2-Diabetes?

Um diesen Fragen experimentell nachzugehen, wurden insgesamt drei Studienteile an leptinresistenten, adipösen Zuckerratten durchgeführt, die in dem Kapitel Methoden näher beschrieben werden.

Durch den Verlust der regulatorischen Eigenschaften von Leptin durch eine Leptinresistenz oder -defizienz, kommt es zu einer ausgeprägten Entwicklung eines Metabolischen Syndroms. In den vergangenen Jahren konnten einige gezüchtet werden, die die typischen Eigenschaften eines Tiermodelle Metabolischen Syndroms aufweisen. Zu diesen gehören die db/db-Mäuse, die ob/ob-Mäuse und die fa/fa-Ratten. Alle diese Tiermodelle beruhen auf genetischen Mutationen, entweder im Leptin-Gen (ob/ob Maus) oder im Leptin-Rezeptor (db/db-Maus und fa/fa-Ratte) (Zucker und Zucker 1963, Zhang et al. 1994, Chua et al. 1996). In der fa/fa-Ratte, auch Zuckerratte genannt, kommt es durch eine Punktmutation im fatty-Allel zur Leptinresistenz. Nur in Tieren mit einer homozygoten Vererbung der Mutation kommt es zur Expression eines nicht funktionsfähigen Leptin-Rezeptors und der Ausbildung des Metabolischen Syndroms. Die heterozygoten Tiere sind phänotypisch unauffällig (Phillips et al. 1996). Phänotypisch zeigten sich bei homozygoten Ratten neben einer ausgeprägten Adipositas, erhöhte Glukose- und Insulinspiegel (Liu et al. 2002). Ein Einfluss des Leptin-Rezeptordefekts und die damit einhergehende Leptinresistenz auf die HPA-Achse werden kontrovers diskutiert. Es wird aber mehrheitlich von einer Hyperreaktivität der HPA-Achse ausgegangen, die sich in

einer erhöhten CRH-Expression und in erhöhten Corticosteron-Spiegeln nach einem Stressreiz zeigt (Rivier und Vale 1983, Guillaume-Gentil et al. 1990, Plotsky et al. 1992, Pacak et al. 1995, Havel et al. 1996, Livingstone et al. 2000, Mattsson et al. 2003). Diese adipösen Zuckerratten stellen somit ein gutes Tiermodell zur Beantwortung der gestellten Fragen da.

2 Methoden

2.1 Versuchsprotokolle

Die hier beschriebenen Tierexperimente wurden nach der "NIH-Guideline" und der entsprechenden Richtlinie zum Umgang und der Verwendung von Versuchstieren nach der Genehmigung durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein durchgeführt (Tab.2-1).

-	
Tierversuchsantrag	Genehmigungsdatum
9/1m/04	10. Mai 2004
9/10/05	23. März 2005
L9/1s/06	6. Oktober 2006
9/16/06	20. Juli 2006

 Tabelle 2-1:
 Tierversuchsantragsnummern und Genehmigungsdaten

Für alle Studienteile wurden die Ratten zur Habituation zwei bis drei Wochen vor Versuchsbeginn geliefert und in einem klimatisierten Raum bei einer konstanten Temperatur von 20 °C sowie einer Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. In diesem Raum herrschte ein Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden. Die Dunkelphase begann täglich um zwei Uhr und ging um 14 Uhr in die Lichtphase über. Je zwei bis vier Ratten wurden in Standardkäfigen der Größe 3 (Länge: 42 cm, Breite: 26 cm, Höhe: 15 cm) über die Behandlungsdauer gehalten und einige Zeit vor den Funktionstests in einen extra Versuchsraum überführt, in dem identische Umweltbedingungen gegeben waren. Sie erhielten eine Haltungsdiät (Haltungsdiät für Ratten und Mäuse; Art.-Nr.: 1320; Altromin) sowie Leitungswasser ad libidum.

2.1.1 Erster Studienteil

Zur Klärung der Frage, wie sich erhöhte Angiotensin-II-Spiegel auf die Verstoffwechselung der Glukose und die Reaktivität der HPA-Achse auswirken, wurden in diesem Studienteil elf Wochen alte, schlanke (Fa/?) und adipöse (fa/fa) Zuckerratten (Charles River; Sulzfeld; Deutschland) vier Wochen lang über subkutan (s.c.) implantierte, osmotische Minipumpen (2ML4; Alzet[®]) chronisch mit Angiotensin-II behandelt. Die Freisetzungsrate betrug ie nach Gruppenzugehörigkeit 0,9 μg/h Angiotensin-II, 9 μg/h Angiotensin-II, beziehungsweise 0,9 %-ige Kochsalz-Lösung. Die Ratten erhielten im Vorfeld eine dreiwöchige Eingewöhnungszeit, um sich an das Handling durch die Experimentatoren zu gewöhnen.

Am Tag vor Versuchsbeginn (Tag -1) wurden die schlanken und adipösen Ratten jeweils in drei Behandlungsgruppen mit einer Gruppengröße von acht bis zehn Tieren aufgeteilt. Am Tag 0 wurden die Ratten narkotisiert und die entsprechend vorbereiteten Pumpen s.c. eingesetzt (siehe 2.2.1 und 2.3.1). Nach einem Zeitraum von zwanzig Behandlungstagen wurden den Ratten Dauerkatheter in die Arteria und Vena femoralis implantiert (siehe 2.3.2). Ab diesem Zeitpunkt wurden sie bis zum Abschluss des Studienteils in Einzelkäfigen aus Plexiglas gehalten (Länge: 42 cm, Breite: 26 cm, Höhe: 15 cm) und zur Habituation in einen separaten Versuchsraum gebracht, in dem auch die sich anschließenden Funktionstests durchgeführt wurden. Über den Arterienkatheter wurde am Folgetag die hämodynamische Charakterisierung vorgenommen (siehe 2.5.1) und im Anschluss eine Blutprobe von 800 µl (Gerinnungshemmer: 3mM Na-EDTA-Lösung) zur Bestimmung von ACTH, Corticosteron, Insulin und Aldosteron entnommen (siehe 2.4.1. und 2.4.2). Die abzentrifugierten Blutkörperchen $(4^{\circ}C;$ 2000 U/min; 5 min) wurden nach Abnahme des Plasmas in 1 ml steriler Kochsalzlösung resuspendiert und bei 4 °C zwischengelagert.

Am 22. Behandlungstag wurde ein vierstündiger CRH-Test (siehe 2.5.3) durchgeführt, an dessen Ende jeder Ratte die individuelle Blutsuspension des Vortags i.v. infundiert bekam. Um 16 Uhr wurde das Futter aus den Käfigen entfernt, um die Ratten für den am Folgetag (Tag 23) stattfindenden oralen Glukose-Toleranz-Test (OGTT) nüchtern zu setzen (siehe 2.5.5).

Direkt vor der Tötung durch Dekapitation am Morgen des 24. Behandlungstages wurde den Ratten Blut zur Bestimmung von Angiotensin-II, Adiponektin, Leptin sowie der ACE-Aktivität über die Katheter entnommen (siehe 2.5.2). Nach der Tötung wurden die Organe Hirn, Hypophyse, Nebennieren, Herz, Niere, Muskel und Fett zur weiteren Analytik entnommen und konserviert (siehe 2.4.5.). Eine der beiden Nebennieren wurde in 4%-iger Formalin-Lösung für histologische Untersuchungen fixiert (siehe 2.6.4).

2.1.2 Zweiter Studienteil

Um der Frage nachzugehen, ob chronisch erhöhte Angiotensin-II-Spiegel einen manifesten Typ-2-Diabetes herbeiführen können, wurden für diesen Studienteil adipöse Zuckerratten chronisch über einen Zeitraum von 80 Tagen (drei aufeinander folgende 28-tägige Behandlungszyklen) mit Angiotensin-II über s.c. Alzet[®]) implantierte osmotische Minipumpen (2ML4; behandelt. Die Freisetzungsrate betrug je nach Gruppenzugehörigkeit 9 µg/h Angiotensin-II beziehungsweise 0,9 %-ige Kochsalz-Lösung. Die verwendeten Zuckerratten wurden so bestellt, dass sie zwei Wochen vor Behandlungsbeginn geliefert wurden und zum Versuchsbeginn ein vergleichbares Körpergewicht zu den adipösen Zuckerratten des ersten Studienteils aufwiesen.

In der Woche vor dem Behandlungsbeginn wurden der basale Blutdruck sowie die Herzfrequenz über die "Tail-Cuff-Methode" bestimmt (siehe 2.5.2). Die Ratten wurden in zwei gleich große Gruppen (n=10) aufgeteilt und bekamen am Folgetag die entsprechenden Pumpen implantiert (siehe 2.2.1 und 2.3.1). Die Minipumpen wurden an Tag 28 und Tag 56 nach Ablauf der gesicherten Freisetzung von 28 Tagen entfernt (siehe 2.3.3) und durch neue Pumpen ersetzt.

An Tag 76 wurde den Ratten ein Dauerkatheter in die Arteria sowie Vena femoralis gelegt (siehe 2.3.2). Unter der Nakose wurden Körperlänge und Hüftumfang verblindet erhoben. Danach wurden die Ratten in Einzelkäfigen aus Plexiglas gehalten (Höhe: 20 cm, Breite: 22 cm, Länge: 25 cm) und zur Habituation in einen separaten Versuchsraum gebracht. Nach einer Ruhephase von einem Tag wurde am 78. Behandlungstag ein ACTH-Test (siehe 2.5.3) und am 79. Behandlungstag ein OGTT nach 18-stündigem Fasten (siehe 2.5.5) angeschlossen. Die Tötung erfolgte am 80. Behandlungstag durch Dekapitation. Den Tieren wurde direkt vor der Tötung Blut zur Bestimmung von Angiotensin-II, Aldosteron, Adiponektin, Leptin sowie Insulin abgenommen. Nach der Tötung erfolgte die Entfernung und Asservierung verschiedener Organe zur weiteren Analytik (siehe 2.4.5).

Über den gesamten Behandlungszeitraum wurden in regelmäßigen Abständen Blutproben zur Insulin- und Glukose-Bestimmung über den Schwanz entnommen (siehe 2.4.3) sowie der Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt (siehe 2.5.2). Das Körpergewicht sowie die Futter- und Wasseraufnahme wurden täglich erfasst.

2.1.3 Dritter Studienteil

Im dritten Studienteil sollte die Rolle der Nebenniere auf die HPA-Achsen-Reaktivität und den Glukosestoffwechsel unter chronisch erhöhten Angiotensin-II-Plasmaspiegeln untersucht werden. Hierzu wurden adipöse Zuckerratten nach Entfernung der Nebennieren (Adrenalektomie; ADX) bzw. Scheinoperation (sham) 28 Tage über s.c. implantierte, osmotische Minipumpen (2ML4; Alzet[®]) chronisch mit Angiotensin-II (9 µg/h) behandelt. Kontrolltiere erhielten 0,9 %-ige Kochsalz-Lösung. Die verwendeten Zuckerratten wurden zwei Wochen vor Versuchsbeginn so bestellt, dass sie zum Versuchsbeginn im Körpergewicht vergleichbar mit den adipösen Zuckerratten des ersten Studienteils waren.

Am Tag vor der Adrenalektomie (Tag -1) wurden die adipösen Zuckerratten in vier Gruppen aufgeteilt mit einer Gruppenstärke von acht bis zwölf (sham-Kon: Kochsalz-Behandlung nach Scheinoperation; sham-Ang: Angiotensin-II-Behandlung nach Scheinoperation; ADX-Kon: Kochsalz-Behandlung nach Adrenalektomie; ADX-Ang: Angiotensin-II-Behandlung nach Adrenalektomie).

Zu Versuchsbeginn (Tag 0) wurde die Adrenalektomie bzw. die Scheinoperation durchgeführt (siehe 2.3.4) sowie die entsprechend befüllten Pumpen implantiert (siehe 2.2.1 und 2.3.1). Zusätzlich erfolgte bei den adrenalektomierten Ratten eine Corticosteron-Substitution über subkutan implantierte Pellets (Freigabe von 100 mg/21 Tage; Innovative Research of America (IRA), Sarasota, Florida). Die

scheinoperierten Ratten erhielten ein Plazebo-Pellet. Zur Substitution des Salzverlustes der adrenalektomierten Ratten wurde das Trinkwasser mit 0,9% Kochsalz versetzt. Zu festgelegten Zeitpunkten wurde den Ratten Blut entnommen, um Insulin, Corticosteron sowie Glukose zu bestimmen (siehe 2.4.2). Des Weiteren wurde die tägliche Wasser- bzw. Kochsalzlösungaufnahme, die Energieaufnahme sowie das Körpergewicht ermittelt.

Am Morgen des 21. Behandlungstages wurde ein "forced-Schwimm-Test" (siehe 2.5.4) durchgeführt und im Anschluss ein Austausch der Corticosteron- bzw. Plazebo-Pellets vorgenommen. Dieser Eingriff wurde unter einer inhalativen Kurznarkose mit Diethylether und einem kleinen Hautschnitt durchgeführt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Ratten in Einzelkäfigen aus Plexiglas gehalten (Höhe: 20 cm, Breite: 22 cm, Länge: 25 cm) und zur Habituation in einen separaten Versuchsraum gebracht. Am Tag 23 erfolgte eine hämodynamische Charakterisierung über die "Tail-Cuff-Methode" (siehe 2.5.2), an die sich am Folgetag (Tag 24) ein OGTT anschloss. Im Schwimmtest sowie im OGTT wurden die Blutproben über einen kleinen Schnitt am Schwanz gewonnen (siehe 2.4.3). Die Tötung erfolgte am 25. Behandlungstag durch Dekapitation. Das Blut zur Bestimmung von Angiotensin-II, Aldosteron, Adiponektin, Leptin und Insulin wurde nach der Dekapitation über das Ausbluten gewonnen (siehe 2.4.4). Nach der Tötung erfolge die Entfernung und Asservierung verschiedener Organe zur weiteren Analytik (siehe 2.4.5).

2.2 Applikation von Medikamenten bzw. Substanzen

2.2.1 Subkutane Langzeitapplikation von Angiotensin-II

Die chronische Behandlung mit Angiotensin-II wurde über osmotische Minipumpen (Modell 2ML4; Alzet[®]) sichergestellt. Diese Pumpen gewährleisteten eine Freisetzung von 2,5 µl/h über einen Zeitraum von 28 Tagen. Das genaue Freisetzungs- und Aufnahme-Volumen war chargenabhängig und wurde für jede Charge vom Hersteller angegeben.

Es wurde eine Angiotensin-II-Lösung aus steriler Kochsalzlösung und Angiotensin-II-Acetat hergestellt, deren Konzentration so gewählt wurde, dass die über eine Stunde abgegebene Flüssigkeitsmenge 0,9 bzw. 9 µg Angiotensin-II enthielt. Die Befüllung der osmotischen Minipumpen erfolgte gemäß der mitgelieferten Gebrauchsanweisung des Herstellers unter sterilen Bedingungen. Die osmotischen Minipumpen wurden nach dem Befüllen vier Stunden in steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung bei Raumtemperatur vorgequollen und im Anschluss den Ratten subkutan implantiert.

2.3 Allgemeine Operationsmethoden

2.3.1 Implantation osmotischer Minipumpen (2ML4; Alzet[®])

Die Ratten wurden kombiniert mit Pentobarbital (27 mg/kg_{KG} i.p.) und mit Diethylether narkotisiert. Es wurde ein etwa 3 X 3 cm großer Bereich in der hinteren rechten bzw. linken Flanke vom Fell befreit und ein ca. 2 cm langer, transversaler Hautschnitt gesetzt. Dieser Schnitt wurde etwa 1 cm vom Hüftknochen entfernt durchgeführt, um eine Irritation der Naht durch Bewegungen möglichst zu vermeiden. Mit einer stumpfen, leicht zur Seite gebogenen Schere wurde eine Tasche von etwa 2,5 cm Breite und 6 cm Länge zwischen Haut und Muskel in rostraler Richtung eröffnet. In diesen Kanal wurde dann die befüllte und vorgequollene Pumpe (2ML4; Alzet[®]) mit dem Austrittloch voran hinein geschoben und die Wunde mit vier bis fünf doppelten Knopfnähten bzw. Nahtklammern verschlossen. Als Nahtmaterial wurden ein 2/0 Faden (Dagrofil[®] USP 2/0, B.Braun, Melsungen) bzw. Nahtklammern (FST) verwendet. Nach dem Verschließen wurde die Wunde mit Betaisodonna[®]-Lösung desinfiziert. Postoperativ wurden die Ratten 24 Stunden in Einzelkäfigen gehalten.

2.3.2 Implantation chronischer Katheter

Die Ratten wurden mit Pentobarbital (40,8 mg/kg_{KG} i.p.) und bei eventuell unzureichender Narkosetiefe zusätzlich mit Diethylether narkotisiert. Nach Rasur des Nackenbereichs und der rechten Leistenregion wurden die Ratten zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf einem elektrischen Heiztisch (EBERLE, Typ 52102) in Rückenlage gebracht und die Hinterläufe fixiert. Längs der Leistenbeuge wurde ein ca. 1,5 cm langer Hautschnitt gesetzt. Anschließend wurde der Gefäßstrang aus Arteria femoralis (AF), Vena femoralis (VF) und Nervus femoralis stumpf auf einer Länge von circa 1 cm freipräpariert.

Nach Separierung der Vena femoralis wurde um diese proximal ein Baumwollfaden gelegt und durch Straffung das Gefäß reversibel verschlossen. Ca. 5 mm in distaler Richtung wurde mittels eines zweiten Fadens das Gefäß legiert, um so eine Blutstauung zu erzeugen. Mit einer Gefäßschere wurde in das Gefäß im Bereich der Stauung (ca. 1/3 der Gesamtstauungslänge von der distalen Ligatur entfernt) ein kleiner Schnitt gesetzt und ein mit Heparin-Lösung (250 I.E./ml) gefüllter Polyethylen-Schlauch (Länge: 26 cm; ID: 0,58 mm; AD: 0.96 mm) mit Hilfe eines Gefäßspreizers 3 cm bis in die Vena cava nach proximal eingeführt. Mit den proximal und distal liegenden Fäden wurde der Katheter am Gefäß fixiert.

Die Arteria femoralis wurde im Gegensatz zur Vena femoralis zuerst durch eine distale Ligatur verschlossen und danach proximal durch Straffung des Fadens gestaut. Auch hier wurde wie oben beschrieben ein Katheter implantiert. Aufgrund des geringen Innendurchmessers der Arterie wurde hierfür ein speziell angefertigter Arterienkatheter verwendet, der aus einem Polyethylen-Schlauch (Länge: 26 cm, ID: 0,58 mm, AD: 0.96 mm) sowie einem 3 cm langen angeschweißten Polyethylen-Schlauch (ID: 0,28 mm, AD: 0.61 mm) bestand.

Nach dem Einbinden der Katheter wurde das Tier in Bauchlage gebracht und ein ca. 5 mm breiter Hautschnitt im Nacken gesetzt. Mit Hilfe eines Metallstabes und eines Schlauches wurden die Katheter, die mit Drahtstiften verschlossen wurden, von der Leiste subkutan in den Nacken gezogen, im Nacken mit Baumwollfäden fixiert und auf ca. 3 cm Länge gekürzt.

Wieder in Rückenlage wurde zuerst das Unterhautfettgewebe und dann die Oberhaut mit drei bis vier doppelten Knopflochstichen zusammengenäht und mit Betaisodonna[®]-Lösung desinfiziert. An den Folgetagen wurden die Katheter morgens und abends mit je 300 µl Heparin-Lösung (250 I.E./ml) gespült. Die operierten Ratten wurden ab dem Tag der Katheterlegung einzeln in Versuchskäfigen aus Plexiglas mit den Maßen Höhe: 20 cm, Breite: 22 cm und Länge: 25 cm gehalten.

2.3.3 Explantation osmotischer Minipumpen (2ML4; Alzet[®])

Die Ratten wurden mit Pentobarbital (27 mg/kg_{KG} i.p.) vornarkotisiert und mit Diethylether in eine ausreichende Narkosetiefe gebracht. Die alte Operationsnaht wurde mit einem Einmalskalpell (Disposable Scalpel No. 11, Feather) auf ca. 1,5 cm eröffnet und die Pumpe durch Druck auf das entgegengesetzte Ende aus der Tasche entfernt. Die Tasche wurde mit sterilen Tupfern gereinigt und mit vier bis fünf doppelten Knopfnähten bzw. Nahtklammern verschlossen. Als Nahtmaterial wurden 2/0 Fäden (Dagrofil[®] USP 2/0, B.Braun, Melsungen) bzw. Nahtklammern (FST) verwendet. Danach wurde die Wunde mit Betaisodonna[®]-Lösung desinfiziert. Im Anschluss an die Operation wurden die Ratten 24 Stunden in Einzelkäfigen gehalten.

2.3.4 Explantation der Nebennieren (Adrenalektomie)

Die Ratten wurden mit Pentobarbital (40,8 mg/kg_{KG} i.p.) und gegebenenfalls zusätzlich mit Diethylether narkotisiert. Am Rücken wurde im Bereich zwischen Vorder- und Rückläufen das Fell entfernt. Die Entfernung der Nebennieren erfolgte in Anlehnung an (Waynforth und Flecknell 2004). Mit einer Schere wurde von den Schulterblättern ausgehend längs der Wirbelsäule in Richtung Schwanz ein Hautschnitt von etwa zwei bis drei Zentimeter Länge durchgeführt. Zu beiden Seiten wurde stumpf die Haut vom Muskel gelöst, bis dieser frei lag.

Etwa auf Höhe der Niere und drei bis fünf Millimeter kaudal vom Brustkorb entfernt, wurde auf der linken Seite ein Muskelschnitt parallel zur Wirbelsäule gesetzt. Dieser Schnitt wurde so klein wie möglich (max. 1 cm) gehalten. Mit einem kleinen Gewebespreizer (FST) wurde der Muskel aufgespreizt. Die im Weg liegenden Organe wurden vorsichtig mit einer stumpfen Pinzette oder Wattestäbchen zur Seite geschoben und im Fettgewebe wurde oberhalb der Niere die Nebenniere dargestellt. Mit einer Klemme wurde die Nebenniere vorsichtig fixiert und vorgezogen, um mit einer weiteren Klemme die Nebenniere zu hinterfassen. Mit einem Baumwollfaden wurden die Gefäße der Nebenniere abgebunden und die Nebenniere mit einer kleinen Schere herausgeschnitten. Der Muskel wurde mit vier bis fünf Knopflochstichen verschlossen. Als Nahtmaterial dienten 6/0 Fäden (Mopylen[®] 6/0, Resorba, Nürnberg).

Auf der rechten Seite wurde ähnlich vorgegangen. Hier musste der Muskelschnitt im Vergleich zur linken Seite jedoch in der frontalen Ebene etwa 0,5 cm nach dorsal verschoben werden. Da die rechte Nebenniere in direkter Nähe zur Pfortader zu finden war, musste hier besonders vorsichtig vorgegangen werden.

Den Tieren wurde im Rahmen dieser Operation ein Corticosteron-Pellet (Corticosterone Pellet 100 mg/21 Tage, Innovative Research of America (IRA), Sarasota, Florida) sowie die entsprechend befüllte Mini-Pumpe s.c. eingelegt, die Rückenwunde mit Nahtklammern verschlossen (FST) und mit Betaisodonna[®]-Lösung desinfiziert. Die Ratten wurden vier Tage in Einzelkäfigen gehalten.

Die scheinoperierten Ratten wurden der gleichen Operation unterzogen, in der die Nebennieren jedoch nicht entfernt wurden, um einen Einfluss durch Narkose und den operativen Eingriff auszuschließen.

2.4 Gewinnung von biologischem Material

2.4.1 Stabilisatoren und Gerinnungshemmer

Stabilisator	Endkonzentration	Zur Bestimmung von
Ohne Stabilisator (Serum)		ACE-Aktivität
Na-EDTA Lösung (0,24 M)	12,1 mM	ACTH, Adiponektin, Corticosteron, Insulin, Leptin
Bestatin (1 mM) / Na-EDTA Lösung (0,24 M)	20 µM / 12,1 mM	Angiotensin-II
GSH (0,2 M) / Na-EDTA Lösung (0,24 M)	10 mM / 12,1 mM	Katecholaminen

Tabelle 2-2: Verwendete Stabilisatoren und Gerinnungshemmer

Wurden mehrere Blutentnahmen zu unterschiedlichen Analysezwecken abgenommen, so wurde immer zuerst das Blut zur Angiotensin-II-Bestimmung entnommen. Nach der Abnahme wurden alle Proben außer den Serumproben bis zur Zentrifugation (4℃; 14000 U/min; 5 min.) auf Eis gelagert. Die Serumproben wurden bei Raumtemperatur (RT) bis zur vollständigen Gerinnung gelagert. Nach der Zentrifugation (RT; 14000 U/min; 5 min.) wurden Serum bzw. Plasma bei -80℃ eingefroren und gelagert.

2.4.2 Blutentnahme über einen arteriellen Dauerkatheter

Die Blutentnahme aus dem Arterienkatheter erfolgte entweder mittels einer Insulin-Spritze oder durch das direkte Befüllen eines Reagiergefäßes, in dem der Stabilisator vorgelegt war. Diese Blutentnahmetechnik ist für habituierte Ratten relativ stressfrei und fand daher vor allem in den Funktionstests (CRH- und ACTH-Test) sowie bei der Blutabnahme zur Bestimmung der Kathecholamine und bei der Tötung Verwendung. Die Katheter wurden nach Entnahme des Bluts mit 150 µl Heparin-Lösung (250 I.E./ml) gespült.

2.4.3 Blutentnahme über den Schwanz

Diese Methode der Blutentnahme stellt eine für das Tier sehr schonende Methode dar, um ohne einen Katheter kleinere Mengen an Blut zu gewinnen (Fluttert et al. 2000).

Hierzu wurde die Ratte aus dem Käfig genommen und auf den vorbereiteten Abnahmeplatz gesetzt. Eine zweite Person bedeckte die Ratte mit einem Tuch, so dass nur noch der Schwanz zu sehen war. Circa einen Zentimeter von der Schwanzspitze entfernt wurde mit einer Rasierklinge ein kleiner, quer verlaufender Schnitt gesetzt. Durch leichtes Ausstreichen des Schwanzes wurde das Blut direkt in eine Mikrovette aufgesogen. Auf diese Weise konnte bei jeder Abnahme bis zu 300µl Vollblut gewonnen werden. Die Mikrovetten sind mit einer Schicht aus Kalium-EDTA beschichtet, wodurch sich die Zugabe eines weiteren Gerinnungshemmers erübrigte. Das Blut wurde zur Gewinnung des Plasmas mit 14000 U/min bei 4 °C 5 min zentrifugiert.

Die Zeitdauer für eine solche Blutentnahme betrug deutlich unter 3 Minuten, wodurch ein methodenbedingter Anstieg der Stresshormone vermieden werden konnte (Gartner et al. 1980).

2.4.4 Blutgewinnung über Dekapitation

Direkt nach der Dekapitation wurde der Tierkadaver ausgeblutet. Das Blut wurde dabei mit Hilfe von Polypropylen-Trichtern in geeignete Reagiergefäße mit den entsprechenden Stabilisatoren überführt (Tab. 2-2).

2.4.5 Tötung und Organpräparationen

Bei Ratten mit einem Dauerkatheter wurde vor der Tötung Blut über den Arterienkatheter gewonnen und die Ratte dann direkt im Anschluss getötet. Bei Tieren ohne Katheter erfolgte die Tötung ohne vorherige Blutentnahme durch Dekapituation mit einer Guillotine. Im Anschluss wurden die Organe entnommen. Alle Organe bis auf Hirn und Hypophyse wurden auf einer Feinwaage gewogen und in einem 2 ml-Reagiergefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im ersten Studienteil wurde je eine der beiden entfernten Nebennieren für histologische Untersuchungen in 4%-iger Formalin-Lösung 24 Stunden fixiert. Das Gehirn und die Hypophyse wurden in mit Trockeneis gekühltem 2-Methylbutan vorsichtig gefroren. Alle Organe wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert. In allen Studienteilen wurden am Tag der Tötung 1 ml Blut für Serum, 2 ml Blut für Bestatin/EDTA- und 4 ml Blut für EDTA-stabilisiertes Plasma entnommen (Tab. 2-2). Nur im ersten Studienteil wurde über den Arterienkatheter 2 ml GSH-Plasma zur Bestimmung von Katecholaminen abgenommen.

2.5 Funktionstests

2.5.1 Blutdruckmessung über einen Arterienkatheter

Aufgrund der zirkadianen Rhythmik von Blutdruck und Herzfrequenz erfolgte die Messung ausschließlich zwischen 8 Uhr und 10 Uhr. In ihrem gewohnten Versuchskäfig wurden die Tiere mindestens 30 Minuten vor Messbeginn in den Mess-Raum gebracht, um ihnen eine Gewöhnung an die neue Umgebung zu ermöglichen. Nach dieser Eingewöhnungszeit wurden zwei Tiere mit dem Arterienkatheter an je einen Druckaufnehmer (Statham[®] P23Db) angeschlossen. Das Signal der Druckaufnehmer wurde mit einem Verstärker (Gould[®] Nicolet) verstärkt und die Daten mittels einer 16-Bit-Analog/Digital-Wandlerkarte an den Messrechner übertragen und gespeichert. Der Blutdruck wurde mit einer Abtastrate von 1000 Hertz gemessen. Die Messzeit betrug pro Tier ca. zehn Minuten. Die Auswertung des Blutdruckes und der Herzfrequenz erfolgte im Nachhinein mit dem Programm Bpview[®].

2.5.2 Nicht-invasive Blutdruckmessung (Tail-Cuff-Methode)

Die Blutdruckmessung wurde am wachen Tier nach Raasch et al. (2006b) durchgeführt. Um die Ratte in ihrer Bewegung einzuschränken wurde diese in einer an ihre Körpergröße angepassten Röhre immobilisiert, in die zur Beruhigung ein Gemisch aus 80 Teilen (2 I/min) Distickstoffoxid (N₂O) und 20 Teilen (0,5 I/min) Sauerstoff (O₂) eingeleitet wurde. Auf den Schwanz wurde eine Druckmanschette und kaudal von dieser ein Piezoelement geschoben. Über eine Infrarotlampe und einen Heiztisch wurde der Schwanz hyperämisiert. Der Verstärker (Blood-pressure Monitor 8002 Dual Channel, TSE) war mit einem Zweiphasenschreiber verbunden, der das Pulssignal sowie den Druck der Manschette aufzeichnete.

Nach Einstellen einer gleichbleibenden Herzfrequenz wurde die Druckmanschette langsam auf maximal 320 mmHg aufgepumpt und die Druckverlaufskurve sowie der Puls mit einem EKG-Schreiber aufgezeichnet. Der Blutdruck wurde im Nachhinein graphisch ermittelt. Hierzu wurde das Lot zwischen der Druckkurve und Basisline bestimmt, an der gerade kein Pulssignal mehr registriert werden konnte. Über diesen Abstand wurde der Druck berechnet, wobei 1 cm 63,33 mmHg entsprach. Im Vorfeld wurde extern mit einem Gauss'schen Manometer (0-280 mmHg) kalibriert. Mit jedem Tier wurden mindestens fünf konsekutive Messungen durchgeführt.

2.5.3 CRH-Test und ACTH-Test

Die katheterisierten Versuchstiere wurden nach der Operation (mindestens zwei Tage vor dem CRH-Test bzw. ACTH-Test) in den Versuchsraum gebracht und einzeln in ihren Versuchskäfigen gehalten. Am Versuchstag wurde anderthalb Stunden vor Versuchsbeginn gedämpftes Licht eingeschaltet und die Arterienkatheter wurden mit einem Polyethylen-Schlauch (Länge: 3 cm, ID: 0,58 mm, AD: 0,96 mm) verlängert, um eine stressfreie Blutentnahme zu gewährleisten. Als Verbindungsstück diente eine an beiden Enden entgratete Kanüle (Sterican[®] 0,60 X 25mm/23G X 1"/Gr.16, B.Braun, Melsungen).

30 Minuten und direkt vor der intravenösen Injektion von CRH bzw. ACTH wurden zwei basale Blutproben über den Arterienkatheter entnommen. Hierzu wurden ca. 120 μl Vollblut mit einem 1,5 ml Reagiergefäß (Reagiergefäß 1,5 ml, Sarstedt, Sarstedt) aufgefangen, in dem 10 μl EDTA-Lösung (3mM) vorgelegt waren. Die Blutprobe wurde kurz geschüttelt und bis zur Zentrifugation (4°C; 14000 U/min; 5 min) auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden CRH (10 μg/kg_{KG}; i.v.) bzw. ACTH (2 μg/kg_{KG}; i.v) über den venösen Katheter appliziert und anschließend mehrere Blutproben über 4 Stunden gewonnen. Nach jeder Abnahme wurde mit 200 μl 0,9%-iger Kochsalzlösung bzw. im Abstand von 60 Minuten mit Heparin-Lösung (250 I.E./ml) gespült. Bei jeder Blutentnahme wurde mit einem Tropfen Blut die Plasmaglukose gemessen. (Glucometer[®] Elite, Bayer HealthCare; Teststreifen: Ascensia Elite[®] Sensor, Bayer HealthCare). Aus dem gewonnenen Blut wurden die Stressparameter Corticosteron, ACTH sowie Glukose bestimmt.

2.5.4 "forced-Schwimm-Test" (FST)

Genau 24 Stunden vor dieser Untersuchung wurde über den Schwanz (siehe 2.4.3) EDTA-Plasma gewonnen und die basalen Stresshormone Corticosteron und ACTH sowie Glukose bestimmt. Am Versuchstag selbst wurden die Tiere zwei Stunden vor Versuchsbeginn in den Versuchsraum gebracht, um sie an die neue Umgebung zu gewöhnen.

Die Tiere wurden nacheinander in der Reihenfolge des Vortages in ein mit 15°Cwarmem Wasser gefülltes Becken (Höhe: 48,5 cm, Länge: 35 cm, Breite: 35 cm, Wassertiefe: 25 cm) gesetzt. Die Schwimmzeit betrug 10 Minuten. Nach dieser Zeit wurden die Tiere wieder aus dem Wasser geholt, abgetrocknet und in ihren Käfig zurückgesetzt. Aus nicht veröffentlichten Vorversuchen ist ein maximaler Corticosteronspiegel 30 Minuten nach Stressbeginn zu erwarten; aus diesem Grund wurde den Ratten 30 Minuten nach Einsetzen in das Wasser über den Schwanz Blut entnommen und aus diesem Corticosteron sowie ACTH bestimmt.

2.5.5 Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT)

Die Ratten wurden am Vortag in den Versuchsraum gebracht und 18 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt. Am Versuchstag wurde anderthalb Stunden vor Beginn des Versuches gedämpftes Licht eingeschaltet und den Tieren eine basale Blutprobe entnommen. Die Probenabnahme erfolgte entweder über den Arterienkatheter oder über einen Schnitt am Schwanz (siehe 2.4.3). Anschließend wurde den Tieren 1g / kg_{KG} Glukose in Form einer 50%-igen Glukose-Lösung mittels einer Schlundsonde verabreicht und das Trinkwasser entzogen. Über vier Stunden wurden Blutproben zur Plasmagewinnung entnommen. Bei jeder Blutentnahme wurde anhand eines Tropfen Blutes die Plasmaglukose gemessen (Glucometer[®] Elite, Bayer HealthCare; Teststreifen: Ascensia Elite[®] Sensor, Bayer HealthCare), aus den gewonnenen Blutproben wurden die Insulin- und Corticosteron-Spiegel bestimmt.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 "Radio-Immuno-Assay" (RIA)

Das Prinzip der "Radio-Immuno-Assays" beruht auf der Konkurrenz zwischen einem radioaktiv markierten Antigen (in den verwendeten RIA-Kits wurden ¹²⁵Imarkierte Antigene verwendet) und dem in der Probe enthaltenen, unmarkierten Antigen um eine begrenzte Anzahl spezifischer Antikörper. Aus dem Verhältnis zwischen markierten und unmarkierten Antigenen bestimmt sich die Menge an gebundener Radioaktivität. Nach einer Inkubationszeit verhält sich die Menge an markierten Antigen-Antikörper-Komplexen umgekehrt proportional zur Menge des zu bestimmenden unmarkierten Antigen-Antikörper-Komplexes. Durch die Bildung eines Doppelantikörper-Komplexes ist es möglich, die gebundenen Antigene von den ungebundenen abzutrennen. Hierzu wird ein weiterer Antikörper-Komplex bildet und über eine Zentrifugation abgetrennt werden kann. Die Entfernung des Überstandes wird mit Hilfe einer Membranpumpe (Eppendorf 4151) durchgeführt. Das so entstandene und vom Überstand befreite Pellet wird in einem Gamma-Counter (1282 Compugamma CS, LKB, Wallac) vermessen.

Zur Bestimmung von ACTH, Adiponektin, Angiotensin-II, Aldosteron, Corticosteron, Glukagon, Insulin und Leptin wurden kommerziell erhältliche RIA-Kits verwendet (siehe Anlage). Die Plasmaanalysen wurden gemäß der mit halbierten Ansätzen durchgeführt. Gebrauchsanweisung, aber Zur Bestimmung von Angiotensin-II wurde aufgrund geringer Probenvolumina die notwendige Plasmaproben-Extraktion in einem geviertelten Ansatz durchgeführt. Die Linearität über die geringeren Proben- bzw. Assayvolumina wurde in Vorversuchen verifiziert.

2.6.2 ACE-Aktivitätsbestimmung

Die ACE-Aktivitätsbestimmung aus Serum wurde nach Raasch et al. (2002a) durchgeführt. Hierzu wurden 50 µl durch Gerinnung gewonnenes Serum mit 100µl Puffer B verdünnt und fünf Minuten in einem 37℃ warmen Wasserbad vortemperiert.

Nach dieser Zeit wurden 50 µl Substrat zugegeben (In 50µl Substrat sind 25 nmol Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH, gelöst in Puffer B, enthalten) und 30 Minuten bei 37℃ inkubiert. Zum Abbruch der Reaktion wurden 100 µl 2N Perchlorsäure (Endkonzentration: 0,57 M) hinzugegeben und die Proben 15 Minuten auf Eis gestellt. Das Präzipitat wurde 30 Minuten bei 4°C und 14000 U/min zentrifugiert und 200 µl des Überstandes mit 500 µl Puffer A versetzt. Zur quantitativen Bestimmung wurde das Reaktionsprodukt Abz-Gly-OH aus 25 µl Probenvolumen mittels der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) mit einem Fluoreszenzdetektor bei 320/412 nm durchgeführt. Um den unspezifischen Abbau des Substrates zu quantifizieren, wurde ein Ansatz mit dem ACE-Hemmer Enalaprilat mitgeführt (Endkonzentration: 714 nM).

Die spezifische ACE-Aktivität ergibt sich aus der Differenz zwischen Gesamtabbau des Substrates und unspezifischem Abbau.

2.6.3 Katecholamin-Bestimmung

Die Katecholamin-Bestimmung im Plasma erfolgte über eine Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) mit anschließender elektrochemischer Detektion (Oxidationspotential 0,51 V gegen Ag/AgCI-Elektrode). Zunächst wurden die Katecholamine über Bindung an Aluminiumoxid zur Analyse aus dem Plasma extrahiert. Hierzu wurden 1,2 ml GSH-EDTA-stabilisiertes Plasma (siehe 2.4.1) in einem Kartuschensystem mit 500 µl Tris-Puffer, 50 µl GSH-Lösung (50 mM) und 50 µl internem Standard versetzt und mit 20 mg Aluminiumoxid unter stetigem Schütteln 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde der flüssige Teil der Suspension über ein Vakuum abgesaugt. Der Rückstand wurde dreimal mit Tris-Wasser (2 ml) gewaschen und anschließend zentrifugiert (5 min, 6000 U/min). Die Elution der Katecholamine vom Aluminiumoxid erfolgte nach Zugabe von 0,1 M Perchlorsäure (30 Minuten, 4°C). Durch Zentrifugation wurde das Eluat in Injektionsgefäße überführt. 70µl dieser Lösung wurden in die HPLC-Anlage injiziert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über externe und interne Standardisierung mit 3,4-Dihydroxybenzylamin Auswertung unter der entsprechenden "Peak"-Höhen.

2.6.4 Histologische Untersuchung der Dicke der Zona Glomerulosa

Die im ersten Studienteil über 24 Stunden in 4%-igem Formalin fixierten Nebennieren wurden in Paraffin eingebettet und in Schichten von 2 µm geschnitten. Anschließend erfolgte eine Haematoxylin/Eosin-Färbung für lichtmikroskopische Untersuchungen. Die Messungen wurden lichtmikroskopisch verblindet an einem Zeiss-Mikroskop (magnifiction 150) durchgeführt. Von den äquatorialen Schnitten der Nebennieren wurde die Dicke der Zona Glomerulosa in drei Bereichen bestimmt und gemittelt. Gemessen wurde dabei der Abstand zwischen der Kapsel und der Zona fasciculata.

2.6.5 Präparation des Hypothalamus

Die bei -80 °C gelagerten Hirne wurden in einem Gefriermikrotom (Leica, CM) mindestens eine Stunde auf -12 °C temperiert, um eine schneidfähige Konsistenz zu erhalten. Nach einer festgelegten Schnittreihenfolge wurde der Hypothalamus vom restlichen Gehirn abgetrennt. Die Präparation des Hypothalamus erfolgte nach der Methode von Palkovits und Brownstein unter Zuhilfenahme einer stereotaktischen Datenbank für Rattenhirne (The Rat Brain in steriotaxic coordinates, Paxinos und Watsen, 1998). Der erste Schnitt wurde etwa 1 mm rostral des Chiasma opticum geführt und mit dem zweiten die Corpora mamillaria abgetrennt. Die so entstandene Scheibe von etwa 5 mm Dicke wurde auf die Schnittfläche des zweiten Schnittes gelegt und das ventral vom Hypothalamus liegende Gewebe samt der Comissura anterior mit einem weiteren Schnitt entfernt. Zum Schluss wurden die übrigen Bereiche der Amygdala lateral vom Hypothalamus entfernt. Der heraus getrennte Hypothalamus wurde bei -80 °C gelagert.

2.6.6 mRNA-Extraktion aus Gewebeproben

Die entsprechende Gewebeprobe wurde unter Stickstoffkühlung in einem Mörser zu einem feinen Pulver zerkleinert, abgewogen und in ein sterilisiertes 2 ml Eppendorf-Reagiergefäß überführt. Bei der Aufarbeitung von Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere wurde das komplette Organ bzw. der Hirnschnitt ohne vorheriges Wiegen verwendet. Die Probe wurde mit einer Mischung aus Lysispuffer (Nucleic Acid Purification Lysis Solution, Applied Biosysthems, UK) und PBS-Puffer pH 7,4 im Mischungsverhältnis 1:1 versetzt und mit einem Ultra-Turax (Ultra-Turax 78, Staufen) eine Minute homogenisiert. 500 µl des Homogenats wurden mit Proteinase K verdaut (Apilt Biosystem). Das übrige Volumen des Homogenats wurde bei -80 °C eingefroren. Nach der Inkubationszeit erfolgte eine Entfettung sowie eine Abfällung störender Proteine durch Behandlung der Probe mit einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamyl-Alkohol (24:25:1). Hierzu wurde das Lysat zu gleichen Teilen mit der Phenol-
Chlorophorm-Mischung versetzt und nach 30 Sekunden vortexen eine Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Aus 450 µl des entstandenen Überstandes wurde mit Hilfe der ABI PRISAM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, UK) die RNA-Isolation nach dem Protokoll von Applied Biosystems für Gewebe durchgeführt. Die benötigten Wells des 96-Well-Filtersystems wurden mit 50 µl RNA-Purifikation-Wash-Solution-1 befeuchtet und die restlichen abgeklebt, um einen stabilen Unterdruck aufbauen zu können. Je 450 µl des Lysats wurden in die entsprechenden Wells überführt. Durch Anlegen eines Unterdrucks wurde das gereinigte Lysat durch den Membranfilter gesogen und mit der Solution-1 gewaschen. Es folgten drei weitere Waschschritte mit Solution-2. Nach der vollständigen Entfernung der Wash-Solution aus den Wells wurden die Proben mit dem Elutions-Puffer eluiert, in ein sterilisiertes 0,5 ml-Reagiergefäß überführt und bei -80 °C eingefroren.

Tabelle 2-3: Bedingungen des Proteinase K-Verdaues

Gewebe	Menge	Lysispuffer	Proteinase K	Inkubationszeit	Aufreinigung
Hypothalamus	komplett	1000µl	10µl	1h	Phenol/Chlor
Hypophyse	komplett	500µl	10µl	1h	Phenol/Chlor
Nebenniere	komplett	1000µl	10µl	1h	Phenol/Chlor

2.6.7 mRNA-Messung mit RiboGreen[®]

Mit dem kommerziell erhältlichen Quant-iT[™]-RiboGreen[®]-RNA-Assay-Kit wurde die Menge an extrahierter mRNA gemessen. Dieses Verfahren beruht auf einer hochspezifischen Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes RiboGreen[®] an Nukleinsäuren. Die RNA-Bestimmung wurde nach dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Bestimmung der RNA-Konzentrationen wurde eine Eichkurve aus fünf Punkten zwischen 1 ng/ml bis 50 ng/ml verwendet. Die Proben wurden so verdünnt, dass sie innerhalb der Standardkurve lagen. RiboGreen[®] besitzt im gebundenen Zustand ein Absorbtionsmaximum von etwa 500 nm und ein Emissionsmaximum von etwa 525 nm. Die Messung wurde in

einem "Fluometric-imaging-plate-reader" in einer 96-Well-Platte bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden durch Subtraktion des Blank-Wertes korrigiert, die Konzentration der RNA-Proben mit Hilfe der erhaltenen Standardkurve interpoliert und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert (GraphPad Prism 4.02).

2.6.8 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen cDNA-Synthese-Kits (Cloned AMV First-Strand Kit, Invitrogen) durchgeführt. Durch eine RNAabhängige DNA-Polymerase, die AMV (**A**vian **M**yeloblastosis **V**irus)-Reverse-Transkriptase, wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Als Startsequenz für die Reverse-Transkriptase diente ein 20 Basenpaare großer Oligo-(dT)-Primer, welcher sich an den poly-(A)-Strang am 3´-Ende der RNA anlagert.

Für einen Ansatz von 20 µl cDNA Lösung wurden 9 µl der extrahierten mRNA mit 2,5 mM dNTP und 0,75 mM Oligo (dT) auf 65 ℃ in einem Thermozykler (Biometra Tgradient, Whatman) erwärmt und fünf Minuten inkubiert. Bei 65 ℃ wurde die Primärstruktur der Nukleinsäuren denaturiert und so eine Anlagerung der Oligo-(dT)-Primer erleichtert. Im Anschluss wurden 4 µl 5 X DNA-Synthesepuffer, 5 mM DTT, 2 U RNaseOUT und 0,75 U Cloned AMV RT hinzugefügt und mit DEPC-Wasser auf das Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Nach kurzem Aufschütteln und leichter Zentrifugation (10 s, 1000 g) wurden die Proben wieder in den Thermozykler überführt und 60 min bei 50 ℃ inkubiert. Durch Erhitzen auf 85 ℃ für fünf Minuten wurde die DNA-Polymerase inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde mit DEPC-Wasser im Verhältnis 1 zu 1 verdünnt und bei -20 ℃ eingefroren.

2.6.9 Quantitative "real-time-PCR"

Theoretische Grundlagen

Die quantitative "real-time-PCR" (pPCR) ermöglicht eine direkte Quantifizierung der eingebrachten cDNA und so indirekt der vorhandenen mRNA. Dieses Verfahren beruht auf der althergebrachten PCR-Technik (Mühlhardt 2003, Kubista et al. 2006), in der ein dreistufiger Temperaturzyklus vielfach durchlaufen wird und es so zu einer Amplifizierung der cDNA kommt. Die Reaktionslösung wird im ersten Schritt auf 95°C erhitzt. Bei dieser Temperatur denaturiert die doppelsträngige DNA (dsDNA) und ermöglicht so nach dem Abkühlen auf 55 ℃ im zweiten Schritt die Hybridisierung der Templates der DNA mit den entsprechenden Primern. Primer sind Oligonukleotide (ca. 20 Basenpaare), die komplementär der gerade außerhalb des zu amplifizierenden DNA-Bereiches liegenden Basenfolge sind. Es wird mit zwei Primern gearbeitet: Einem so genannten "sense"- und einem "antisense"-Primer. Sie binden je an einem 3'-Ende der aufgespaltenen dsDNA. Diese Primerpaare liegen im optimalen Fall ca. 100 Basenpaare auseinander. Als letzter Schritt wird die Temperatur auf 72℃ erhöht. Dies ist das Temperatur-Optimum der verwendeten DNA-Polymerase. Diese beginnt nun die hybridisierten Primer vom 3'Ende ausgehend komplementär des DNA-Stranges zu verlängern. Durch die Wiederholung dieser Temperaturabfolge kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Mengen.

1993 wurde durch Higuchi et al. die quantitative "real-time-PCR" entwickelt. Diese bietet die Möglichkeit, direkt nach einem Temperaturzyklus die Menge an dsDNA zu quantifizieren. Dies wird über einen Fluoreszenz-Farbstoff bewerkstelligt, der nach der Bindung an die dsDNA eine Fluoreszenz aufweist. Über eine CCD-Kamera wird nach jedem Zyklus unter UV-Licht ein Foto gefertigt und die Emission quantifiziert. Der Farbstoff, der größtenteils Verwendung findet, ist das SYBR[®] GREEN I. Die Quantifizierung erfolgt über die sogenannte Schwellenwert-Methode. Hierbei wird gemessen, nach welcher Zyklenzahl (C_T) eine gewisse Fluoreszenz überschritten wird, und dann über eine mitgeführte Standardreihe die anfängliche cDND-Menge errechnet. Als Standard wird ein PCR-Produkt vom gleichen Primerpaar mit bekannter Kopienzahl verwendet. Die Abstände zwischen den Standardkonzentrationen betragen immer den Faktor 10. Legt man einen exponentiellen Zuwachs der dsDNA zugrunde, so beträgt im optimalen Fall der Abstand zwischen den Standardpunkten der Δ CT-Wert 3,3 Zyklen. Zur Quantifizierung der dsDNA ist es wichtig den Schwellenwert so zu wählen, dass sich dieser im exponentiellen Bereich der DNA-Synthese befindet. Trägt man die ermittelten C_T-Werte gegen den Zehner-Logarithmus der DNA-Konzentration (log C_{DNA}) auf, so ergibt sich im optimalen Fall eine Gerade mit einer Steigung von -3,3, aus der die anfängliche Kopienzahl der Proben aus den CT-Werten interpoliert werden kann.

Durchführung der PCR-Analytik

Die PCR-Analytik wurde im ersten Experiment mit dem "qPCR[™] Core Kit for SYBR[®] GREEN I" (Eurogentic) und in den folgenden Experimenten mit dem "Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with ROX" (invitrogen) durchgeführt.

Bei der Anwendung des "qPCR[™] Core Kit for SYBR[®] GREEN I" wurde ein Mastermix frisch angesetzt. Dieser bestand aus:

Puffer 10X	2,5 µl/Probe
dNTP-Mix, 5mM	1,0 µl/Probe
MgCl ₂ , 50mM	1,63 µl/Probe
HotGoldStar-Enzym	0,13 µl/Probe
SybrGreen	0,75 µl/Probe
Sense Primer (10 pmol/µl)	0,75 µl/Probe
Antisense Primer (10 pmol/µl)	0,75 µl/Probe
DEPC-Wasser	ad 23 µl/Probe

und wurde bis zum Gebrauch auf Eis und unter Lichtschutz gelagert.

Die Anwendung des "Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with ROX" ist mit einem etwas geringeren Pipettieraufwand verbunden, da hier schon ein sogenannter "Supermix" vorhanden ist, zu dem nur noch die Primer sowie DEPC-Wasser zupipettiert werden müssen. Dieser bestand aus:

SuperMix	12,5 μl/Probe
Sense Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl/Probe
Antisense Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl/Probe
DEPC-Wasser	ad 23 µl/Probe

und wurde bis zum Gebrauch auf Eis und unter Lichtschutz gelagert.

Die weitere Durchführung unterschied sich nicht zwischen den beiden Kits. In eine 96-Well-Platte wurden 23 µl vom entsprechenden "Mastermix" bzw. "Supermix" vorgelegt und 2 µl cDNA-Probe bzw. 2 µl der Standardverdünnung zupipettiert. Die Standardreihe bestand aus fünf Konzentrationen (von 10⁷ bis 10³ Kopien dsDNA/Well), die in Doppelbestimmung ermittelt wurden. Die Reaktion wurde im ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die entsprechenden Temperatur-Protokolle wurden nach Herstellervorgaben programmiert und durchgeführt. Die Messung der Fluoreszenz des SYBR[®] Green I erfolgte bei einer Wellenlänge von 520 nm.

Nach Ablauf von 40 Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse des Produktes durchgeführt und so die Spezifität der Primer sowie die Reinheit der Proben überprüft. Um einen weiteren Nachweis für die Spezifität der Primer zu erbringen, wurden exemplarisch Gelelektrophoresen der PCR-Produkte hergestellt (siehe 2.6.10).

2.6.10 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%-iges Agarosegel hergestellt. Hierzu wurden 6 g Agarose ad 300 ml TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht und so die Agarose gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 6 µl Ethidiumbromid zugegeben und durch Schwenken in der Agarose-Lösung verteilt. Diese Lösung wurde möglichst blasenfrei in eine Form gegossen und eine Stunde ausgehärtet. Das Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt und die Taschen mit 12,5 µl des PCR-Produktes bzw. 2,5 µl Marker bestückt. Die Proben

bzw. der Marker wurden vorher mit je 2,5 µl Ladepuffer gemischt. Mit einer Spannung von 220 V und 400 mA wurde für 30 Minuten die Elektrophorese durchgeführt und im Anschluss eine Fotografie unter UV-Beleuchtung aufgenommen und ausgewertet.

Primer	Ausrichtung	Sequenz
AT _{1A}	sense antisense	5´- TCA AAC TCC CAG TGG ACC TC -3´ 5´- CTC ACC GAA GCC TCT CTC AC -3´
AT _{1B}	sense antisense	5′- TTC AAC CTC CAG CAA TCC TT -3′ 5′- CCC AAA TCC ATA CAG CCA CT -3′
AT ₂	sense antisense	5′- TGT CCT CAT TGC CAA CAT TT -3′ 5′- TCA AGA CTT GGT CAC GGG TA -3′
CRH	sense antisense	5´- AAA GGG GAA AGG CAA AGA AA -3´ 5´- GTT TAG GGG CGC TCT CTT CT -3´
POMC	sense antisense	5´- GAA GGT GTA CCC CAA TGT CG -3´ 5´- CTT CTC GGA GGT CAT GAA GC -3´
MC2	sense antisense	5´- CAG TTT GGC CAT TTC CGA CA -3´ 5´- AAC TGC CAC GAG GCT TGA GAT -3´
StAR	sense antisense	5′- TTG CTG GCC CAC TTT TCT GT -3′ 5′- CGC GTT CCA TGT TGT TCT GTT -3′
CYP11B2	sense antisense	5′- ATC CTT TCA GCT GCA AGT CGG -3′ 5′- CCT TGG AAT TTG GCA CAC ACA -3′
CYP11B1	sense antisense	5´- ATC CTT TCA GCT GCA AGT CGG -3´ 5´- CCT TGG AAT TTG GCA CAC ACA -3´

Tabelle 2-4: Nukleotidsequenzen der qPCR

Die Primersequenzen wurden über das Programm "Primerexpress" und einen anschließenden "Blast" bestimmt und von der Firma Invitrogen (Karlsruhe; Deutschland) bezogen. Die Primer wurden auf das verwendete qPCR-Kit optimiert und über eine Gelelektrophorese überprüft.

2.7 Statistische Methoden

In den Grafiken wurden Mittelwerte (MW) mit dem entsprechenden Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Daten wurden von der Analyse ausgeschlossen, wenn diese außerhalb der vierfachen Standardabweichung lagen. Die Datensätze wurden unter Verwendung des "Grubb's outlier-Test" (www.graphpad.com). Zur integrativen getestet Darstellung von Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufen wurden individuell die Flächen unter der Kurve (AUC) unter der Berücksichtigung der entsprechenden Delta-Werte berechnet.

Die Berechnung statistischer Signifikanzen erfolgte in einem Versuchs-Design mit zwei Variablen über einen zweiseitigen ANOVA-Test und mit einem anschließenden "Bonferroni multiple comparison test". Falle Im einer Varianzeninhomogenität zwischen den in der Analyse betrachteten Gruppen wurden diese über einen Wilcoxontest auf Signifikanz getestet. Beim Vergleich von nur zwei Gruppen wurde der "Students t-Test" verwendet. Steigungen von Geraden wurden über eine lineare Regression für jedes Tier einzeln errechnet und über den Mittelwert statistisch ausgewertet. Für die Korrelationsanalysen wurde der 2-seitige Pearson-Test (GraphPad Prism[®]) mit einem Konfidenzintervall von 95 % verwendet.

Der Unterschied wird als statistisch signifikant angegeben, wenn die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen werden kann. Das Signifikanzniveau lag somit bei p < 0,05.

3 Ergebnisse

3.1 Erster Studienteil

In diesem Studienteil sollte der chronische Einfluss zweier Angiotensin-II-Konzentrationen auf die Glukoseutilisation und die Stressreaktivität der HPA-Achse in schlanken und adipösen Zuckerratten untersucht werden.

Die chronische Behandlung mit der niedrigen Angiotensin-II-Konzentration (0,9 μ g/h) erbrachte in allen beobachteten Parametern keine Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollen und wird aus Gründen der Verständlichkeit im Ergebnisteil nicht besprochen. Unter einer Angiotensin-II-Behandlung ist somit im Folgenden immer die hohe Angiotensin-II-Konzentration von 9 μ g/h zu verstehen.

3.1.1 Einfluss von Angiotensin-II auf das Körpergewicht

Zu Behandlungsbeginn (Tag 0) hatten adipöse Zuckerratten ein signifikant höheres Körpergewicht (348 \pm 52 g) als die schlanken Tiere (217 \pm 23 g). Nach der Randomisierung der Ratten ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich des Körpergewichts in den jeweiligen Behandlungsgruppen (Tab. 3-1).

	schlanke Zuckerratten			adipöse Zuckerratten		
Angiotensin-II	0 µg/h	0.9 μg/h	9 μg/h	0 µg/h	0.9 µg/h	9 µg/h
KG am Tag 0 der Behandlung [g]	215 ± 8	224 ± 7	213 ± 9	348 ± 13 ^b	342 ± 20 ^b	353 ± 17 ^b
KG am Tag 20 der Behandlung [g]	290 ± 8	297 ± 7	249 ± 7 ^a	466 ± 10 ^{<i>b</i>}	482 ± 19 ^b	390 ± 20 ^{a,b}
Gewichtszunahme Tag 7 und 20 [g/d]	3,62 ± 0,28	3,59 ± 0,18	4,38 ± 0,56	6,30 ±0,27 ^b	6,84 ± 0,34 ^b	3,94 ± 0,97 ^a

Tabelle 3-1: Einfluss einer chronischen Angiotensin-II-Infusion auf die Entwicklung des Körpergewichtes schlanker und adipöser Zuckerratten

^a: p < 0,05 vs. Kontrolle des gleichen Phänotyps; ^b: p < 0,05 vs. schlanker Phänotyp jeder Behandlung; n = 8-9; MW ± SEM



Abb. 1: Körpergewichtsentwicklung von schlanken (**A**) und adipösen (**B**) Zuckerratten unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung (Δ : 0 µg/h; O: 0,9 µg/h; \bullet : 9 µg/h AngII); *: p < 0,05; n=8-9; MW±SEM.

Angiotensin-II reduzierte nach Implantation der Minipumpen das Körpergewicht sowohl in schlanken als auch adipösen Zuckerratten (Abb. 1A und B; Tab. 3-1). Die größte Gewichtsreduktion erfolgte bei beiden Phänotypen binnen der ersten 7 Behandlungstage (Abb. 1A und B). Die tägliche Gewichtszunahme unter Angiotensin-II war ab dem 7. Behandlungstag in schlanken Ratten wieder normalisiert, während die adipösen Tiere weiterhin eine reduzierte Gewichtszunahme auf dem Niveau der schlanken Zuckerratten aufwiesen (Tab.3-1).

3.1.2 Futter- und Wasseraufnahme unter Angiotensin-II

Vom 18. bis zum 20. Behandlungstag wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden die Futter- sowie die Wasseraufnahme durch Differenzwägung ermittelt. Die adipösen Zuckerratten nahmen im Vergleich zu den schlanken Kontrollen über 24 Stunden etwa doppelt soviel Futter zu sich. Unter Angiotensin-II war nur in adipösen Zuckerratten die Futteraufnahme gegenüber den Kontrollen vermindert (Abb. 2A). Die Wasseraufnahme war in den adipösen Kontroll-Tieren im Vergleich zu den schlanken generell erhöht. Durch Angiotensin-II steigerte sich die Wasseraufnahme in schlanken Ratten signifikant, in adipösen jedoch nur tendenziell (Abb. 2B).



Abb. 2: Futteraufnahme (**A**) und Wasseraufnahme (**B**) unter chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: offene Balken; 0,9 μ g/h: gestreifte Balken; 9 μ g/h: geschlossene Balken) von schlanken und adipösen Zuckerratten zwischen dem 18. und 20. Behandlungstag; *: p < 0,05 vs. 0 μ g/h Ang-II gleichen Phänotyps; n = 8-9; MW ± SEM.

3.1.3 Veränderung basaler Stoffwechsel-Parameter im Plasma

In Folge der primären Leptinresistenz stiegen die Plasma-Leptin-Spiegel in den adipösen Zuckerratten reflektorisch um das ca. 13-fache an (2,7 ± 0,2 vs. 34,6 ± 1,4 pg/ml). Auch Adiponektin war leicht erhöht (Tab.3-2). Neben der Hyperphagie (Abb. 2A) entwickelten die adipösen Ratten einen Prädiabetes. Dieser äußerte sich in einer hochnormalen Plasmaglukose einhergehend mit stark erhöhten Insulinspiegeln (1,6 ± 0,3 vs. 22,4 ± 3,1 ng/ml). Angiotensin-II verringerte in diesen Ratten die Insulin- und Adiponektin-Spiegel. Die Adiponektinspiegel wurden hierbei auf das Niveau der schlanken Tiere abgesenkt. In schlanken Zuckerratten Angiotensin-II nur die Leptinspiegel (Tab einer reduzierte 3-2). Nach Nahrungskarenz waren sowohl die Glukose- als auch die Insulin-Plasmaspiegel in beiden Phänotypen reduziert. So war in den schlanken Kontrollen Glukose um ca. 27 % und Insulin um ca. 30% reduziert, in den adipösen Kontrollen Glukose sogar um 77% und Insulin um 40% vermindert. Bei den Angiotensin-II-behandelten, adipösen Ratten waren die Glukose (ca. 20%) und Insulin (ca. 54%) deutlich weniger reduziert. Der HOMA-Index unterschied sich nicht zwischen den schlanken Gruppen. Die adipösen Ratten wiesen einen etwa 20-fach höheren HOMA-Index auf. Dieser blieb infolge der Angiotensin-II-Behandlung aber im Vergleich zu den Kontrollen unverändert (Tab. 3-2).

	schla	anke Zuckerr	ratten	adipöse Zuckerratten		
Angiotensin-II	0 µg/h	0.9 μg/h	9 µg/h	0 μg/h	0.9 µg/h	9 µg/h
Glukose [mg/dl]	85 ± 4	80 ± 3	86 ± 4	127 ± 8 ^c	116 ± 5 °	105 ± 10 ^{a,c}
Insulin [ng/ml]	1,6 ± 0,3	1,3 ± 0,3	$1,2 \pm 0,1$	22,4 ± 3,1 ^c	30,1 ± 4,7 ^c	12,2 ± 2,3 ^{<i>a,b,c</i>}
Leptin [pg/ml]	$2,7 \pm 0,2$	$2,9\pm0,3$	$1,7 \pm 0,3^{a,b}$	34,6 ± 1,4 ^c	32,4 ± 2,5 ^c	32,6 ± 2,6 ^c
Adiponektin [µg/ml]	1,61 ± 0,09	1,79 ± 0,08	1,83 ± 0,15	2,51 ± 0,17 ^c	2,89 ± 0,11 ^c	1,98 ± 0,13 ^{a,b}
Plasma Noradrenalin (pg/ml)	790 ± 180	676 ± 63	1171 ± 111	590 ± 36	660 ± 79	2633 ± 668 ^{<i>a,b,c</i>}
nüchterne Glukose [mg/dl]	60 ± 2	60 ± 2	59 ± 2	77 ± 3 ^c	76 ± 2 ^c	85± 7 ^c
nüchternes Insulin [pg/ml]	0,51 ± 0,10	0,43 ± 0,05	0,41 ± 0,06	6,90 ± 0,4 ^c	9,13 ± 1,66 ^c	5,48 ± 0,74 ^{<i>b,c</i>}
HOMA-INDEX	1,8 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	31,5 ± 2,5 [¢]	40,3 ± 6,9 ^c	28,0 ± 4,5 ^{<i>b,c</i>}

Tabelle 3-2: Einfluss einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf metabolische bzw.

 endokrinologische Parameter in schlanken und adipösen Zuckerratten

^a: p < 0,05 vs. Kontrolle des gleichen Phänotyps; ^b: p < 0,05 vs. 0,9 μ g/h gleichen Phänotyp; ^c: p < 0,05 vs. jeder Gruppe des schlanken Phänotyps; n = 8-9; MW ± SEM

3.1.4 Hämodynamik und linksventrikuläres Gewicht

Über chronisch implantierte Arterienkatheter wurden der mittlere arterielle Blutdruck sowie die Herzfrequenz bestimmt.

Die schlanken und adipösen Kontrollen hatten einen gleichen Blutdruck. In Folge der Angiotensin-II-Behandlung reagierten beide Phänotypen mit einer deutlichen Blutdrucksteigerung. Dieser Anstieg betrug in den adipösen Ratten 83 mmHg und war somit signifikant höher als in schlanken, die eine Blutdrucksteigerung von 32 mmHg aufwiesen (Abb. 3A).

Die Herzfrequenz der adipösen Kontrollen war mit 337 \pm 3 min⁻¹ im Vergleich zu den schlanken Kontrollen mit 398 \pm 22 min⁻¹ signifikant niedriger. Angiotensin-II führte selektiv in adipösen Ratten zu einer Frequenzsteigerung (Abb. 3B).

Das linksventrikuläre Gewicht war in adipösen Kontrollen signifikant höher (682 ± 12 mg) als in den schlanken (545 ± 12mg) Zuckerratten. Der Angiotensin-IIinduzierte Blutdruckanstieg führte nur in den adipösen Ratten zu einer signifikanten Zunahme im linksventrikulären Gewicht (Abb. 3C).



Abb. 3: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP; **A**) und Herzfrequenz (HF; **B**) nach 21 Tagen und das linksventrikuläre Gewicht (LVG; **C**) nach 24 Tagen chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 µg/h: offene Balken; 0,9 µg/h: gestreifte Balken; 9 µg/h: geschlossene Balken) von schlanken und adipösen Zuckerratten; *: p < 0,05 vs. 0 µg/h Ang-II gleichen Phänotyps; †: p < 0,05 adipös vs. schlank unter 0 µg/h Ang-II; n = 8-9; MW ± SEM.

3.1.5 Veränderung basaler RAAS-Komponenten im Plasma

Durch die starre Infusionsrate der osmotischen Minipumpen war keine körpergewichtsadaptierte Behandlung mit Angiotensin-II (Ang-II) möglich. Der zeitabhängige Anstieg des Körpergewichts während des Behandlungszeitraumes führte zu einer kontinuierlichen Reduktion der körpergewichtsbezogenen Infusionsrate. Unter der Dosierung von 0,9 µg/h Angiotensin-II senkte sich die körpergewichtsbezogene Infusionsrate in schlanken Zuckerratten von 67 ± 2 auf 54 ± 1 ng/(kg•min) und in adipösen von 45 ± 4 auf 33 ± 1 ng/(kg•min). Unter der hohen Angiotensin-II-Dosierung von 9 µg/h ergab sich eine Absenkung von 708 ± 31 auf 676 ± 18 ng/(kg•min) in schlanken und von 436 ± 28 auf 434 ± 24 ng/(kg•min) in den adipösen Ratten.

Durch die starken Gewichtsunterschiede beider Phänotypen die war körpergewichtsbezogene Infusionsrate in den adipösen Tieren immer signifikant niedriger als in gleich behandelten schlanken Ratten. Trotz dieser Unterschiede war die Angiotensin-II-Plasmakonzentration bei adipösen und schlanken Ratten gleich (79 ± 28 vs. 92 ± 24 pmol/ml; Abb. 4A). Parallel zu den erhöhten Angiotensin-II-Konzentrationen stiegen die Plasma-Aldosteron-Konzentrationen an. Die Aldosteronspiegel waren in adipösen Ratten signifikant um das Dreifache gegenüber den schlanken Ratten gesteigert (Abb. 4B). Die niedrige Angiotensin-II-Behandlung hatte weder auf die Angiotensin-II- noch auf die Aldosteron-Spiegel einen steigernden Effekt (Abb. 4A und B).



Abb. 4: Plasmakonzentration von Angiotensin-II (**A**) und Aldosteron (**B**) nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: offene Balken; 0,9 μ g/h: gestreifte Balken; 9 μ g/h: geschlossene Balken) von schlanken und adipösen Zuckerratten; *: p < 0,05 vs. 0 μ g/h Ang-II gleichen Phänotyps; n.s.: nicht signifikant; n = 8-9; MW ± SEM.

Schlanke Zuckerratten wiesen eine generell gesteigerte ACE-Aktivität im Plasma auf. Die Angiotensin-II-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die ACE-Aktivität in adipösen und schlanken Zuckerratten (schlank: 0 µg/h Ang-II: 10,2 ± 0,4; 0,9 µg/h Ang-II: 9,1 ± 0,2; 9 µg/h Ang-II: 11,0 ± 0,5 nmol/(h•ml); adipös: 0 µg/h Ang-II: 8,6 ± 0,3; 0,9 µg/h Ang-II: 8,5 ± 0,3; 9 µg/h Ang-II: 8,7 ± 0,5 nmol/(h•ml)).

3.1.6 Basale Stressparameter und Stress-Sensitivität

Am 22. Behandlungstag wurden im Vorfeld des CRH-Tests basale Blutproben entnommen und aus diesen die Plasmaspiegel von ACTH und Corticosteron bestimmt. Weder in Abhängigkeit des Phänotyps noch der Angiotensin-II-Behandlung waren Unterschiede in den basalen ACTH- bzw. Corticosteron-Plasmakonzentrationen zu beobachten (Tabelle 3-3).

Nach der i.v.-Gabe von 10 μ g/kg_{KG} CRH reagierten die adipösen und schlanken Kontrollen mit einem schnellen Anstieg der ACTH-Spiegel. Diese stiegen um den Faktor 5 an und fielen innerhalb von 4 Stunden wieder auf die Ausgangswerte zurück. T_{max} (20 ± 2,5 min vs. 21 ± 2,7 min) als auch C_{max} (611 ± 40 vs. 573 ± 40 pg/ml) unterschieden sich nicht.

Die zweiseitige ANOVA-Analyse der Plasmakonzentrationskurven wies einen signifikanten Gruppeneffekt sowohl für die Zeit als auch für den Phänotyp aus und

Ergebnisse

war mit signifikant höheren ACTH-Spiegeln in adipösen Zuckerratten ab der 120. Minute verbunden (Abb. 5A).

In Folge der physiologischen Wirkung von ACTH reagierten die Ratten mit einem Anstieg an Corticosteron. Die Corticosteron-Plasma-Verläufe von schlanken und adipösen Ratten unterschieden sich nicht im t_{max} (53 ± 9 vs. 70 ± 9 min) bzw. C_{max} (313 ± 34 vs. 372 ± 35 ng/ml). Die Auswertung mit der zweiseitigen ANOVA ergab ebenfalls einen signifikanten Gruppeneffekt für Phänotyp und Zeit. Die folgende Postanalyse wies den adipösen Ratten ab der 90. Minute signifikant höhere Corticosteron-Plasmaspiegel zu. Diese blieben bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 240 Minuten bestehen (Abb. 5B).

Keine der beiden Angiotensin-II-Dosierungen beeinflusste nach CRH-Stimulation die ACTH-Freisetzung in adipösen oder schlanken Zuckerratten (Abb. 6A und B).

Unter der hohen Angiotensin-II-Dosis wurde die Corticosteron-Antwort selektiv in den adipösen Zuckerratten gesteigert (Abb. 6C und D). Hierbei waren sowohl C_{max} (376 ± 33 vs. 514 ± 42 ng/ml) als auch AUC_{Corticosteron} (20813 ± 4449 vs. 50640 ± 10588 ng•ml⁻¹•min; Abb. 7A) signifikant erhöht.

Die Plasma-Glukose-Konzentrationen waren infolge der CRH-Stimulation in adipösen und schlanken Kontrollratten innerhalb der ersten 30 Minuten erhöht und sanken im weiteren Verlauf wieder auf basale Werte ab. Unter Angiotensin-II waren die Glukose-Konzentrationen in adipösen Ratten signifikant gegenüber den Kochsalz-behandelten Kontrollen gesteigert. Sowohl C_{max} als auch AUC_{Glukose} (Abb. 6D und 7B) waren erhöht.

	schlanke Zuckerratten			adipöse Zuckerratten		
Angiotensin-II	0 μg/h	0.9 μg/h	9 µg/h	 0 µg/h	0.9 μg/h	9 μg/h
ACTH (pg/ml)	155±30	148±28	113±8	126±21	107±18	92±23
Corticosteron (ng/ml)	188±28	187±20	243±33	163±25	175±34	223±30

Tabelle 3-3: Einfluss von Angiotensin-II auf die basalen Plasmaspiegel von ACTH und

 Corticosteron in schlanken und adipösen Zuckerratten

n = 8-9; MW ± SEM



Abb. 5: Reaktivität der HPA-Achse bei schlanken und adipösen Zuckerratten. Dargestellt sind die Veränderungen der ACTH- (**A**) bzw. Corticosteron- (**B**) Spiegel in schlanken (\bigcirc) und adipösen (\bigcirc) Kochsalz-behandelten Zuckerratten nach Stimulation mit CRH (10 $\mu g/kg_{KG} i.v$); * p < 0,05 schlank vs. adipös; n = 8-9; MW ± SEM.

Neben dem initialen Anstieg konnte ein zweites t_{max} bei ca. 130 Minuten beobachtet werden. Dieser zweite "Peak" in den Glukose-Spiegeln war in seinem t_{max} etwa 30 Minuten nach dem t_{max} der Corticosteron-Kurve (130 ± 13min vs. 95 ± 12min) zu beobachten. In schlanken Ratten war keine der Angiotensin-II-Behandlungen mit einer Veränderung in der Plasma-Glukose nach CRH-Stimulation verbunden (Abb. 6E). Der Quotient aus AUC_{Glukose} und AUC_{Coticosteron} war in allen Gruppen identisch (Abb. 7C).

Nach der CRH-Stimulation blieben unter Kontrollbedingungen die Insulinspiegel trotz erhöhter Plasma-Glukose unverändert. Angiotensin-II senkte über den gesamten Beobachtungszeitraum des CRH-Testes die Insulin-Spiegel in den adipösen Zuckerratten. In schlanken Tieren ergab sich keine signifikante Reduktion der Insulinspiegel (Abb. 6G und H).



Abb. 6: Konzentration-Zeit-Kurven von Plasma ACTH (**A**, **B**), Corticosteron (**C**, **D**), Δ Glukose (**E**, **F**) und Insulin (**G**, **H**) nach akuter CRH-Gabe (10 µg/kg_{KG} i.v.), nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 µg/h: Δ ; 0,9 µg/h: Θ ; 9 µg/h: \bullet); *: p < 0,05 9 µg/h Ang-II vs. 0 µg/h Ang-II; n = 8-9; MW ± SEM.



Abb. 7: AUC der Konzentration-Zeit-Kurven von Corticosteron (**A**), Glukose (**B**) und dem Quotienten aus AUC_{Glukose} und AUC_{Corticosteron} (**C**) nach CRH-Gabe (10 $\mu g/kg_{KG}$ i.v.) unter chronischer Angiotensin-II Behandlung (0 $\mu g/h$: offene Balken; 0,9 $\mu g/h$: gestreifte Balken; 9 $\mu g/h$: geschlossene Balken) von schlanken und adipösen Zuckerratten; *: p < 0,05 vs. 0 $\mu g/h$ Ang-II gleichen Phänotyps; n = 8-9; MW ± SEM.

3.1.7 Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT)

Nach 18-stündigem Fasten reduzierten sich die Plasmaspiegel von Glukose und Insulin im Vergleich zu den Basalwerten (wie von Duclos et al. 2005, Doyon et al. 2007 beschrieben). Nach der oralen Gabe von 1 g/kg_{KG} Glukose erhöhten sich die Glukose-Spiegel in den Kontrollen der schlanken und adipösen Zuckerratten auf etwa 150 mg/dl und erreichten innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 240 Minuten wieder ihre Ausgangswerte. Der durchschnittliche maximale Anstieg (ΔC_{max}) der Plasma-Glukose-Spiegel war in schlanken und adipösen Kontrollratten gleich (89 ± 4 vs.87 ± 7 mg/dl). Auch t_{max} (11 ± 1 vs. 15 ± 1 min) und AUC (7,8 ± 0,8 vs. 10,1 \pm 2,1 g·dl⁻¹·min) unterschieden sich nicht zwischen beiden Kontrollgruppen (Abb. 8A und B). Nach dem Überschreiten des C_{max}-Wertes reduzierten sich die Glukose-Spiegel signifikant schneller in den schlanken als in den adipösen Kontrollratten, wodurch sich ein signifikant schnelleres Abfallen auf basale Wert ergab. Als Maßstab für diese schnellere Reduktion in den schlanken Tieren wurde die Steigung zwischen C_{max} und dem Zeitpunkt nach Erreichen des Ausgangswertes berechnet. Sie betrug -7,2 \pm 0,8 μ g•ml⁻¹•min⁻¹ in den schlanken und $-3.9 \pm 1.1 \mu g \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$ in den adipösen Kontrollen (Abb. 8A und B). Nur die hohe Angiotensin-II-Dosierung steigerte in adipösen Ratten die Plasma-

Nur die hohe Angiotensin-II-Dosierung steigerte in adipösen Ratten die Plasma-Glukose im Vergleich zur Kochsalz-Behandlung. Hierbei waren sowohl die ΔC_{max} (87 ± 7 vs. 145 ± 12 mg/dl) als auch die AUC (8,5 ± 1,3 vs 21,5 ± 5,1 g•dl⁻¹•min; p < 0,05) erhöht. Die t_{max} waren durch Angiotensin-II unbeeinflusst.

Auch in den schlanken Zuckerratten war unter Angiotensin-II die Glukose-Antwort auf die Glukosebelastung erhöht. Diese Steigerung war jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt als in den adipösen Ratten. Nur die Glukose-Konzentrationen 20 bzw. 30 Minuten nach oraler Glukosegabe waren zur Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 8A und B).



Abb. 8: Konzentration-Zeit-Kurven von Glukose (**A**, **B**), Insulin (**C**, **D**) und Corticosteron (**E**, **F**) unter Glukose-Belastung (1 g/kg_{KG} p.o.), nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: Δ ; 0,9 μ g/h: O; 9 μ g/h: \bullet) von Zuckerratten; * p < 0,05 9 μ g/h Ang-II vs. 0 μ g/h Ang-II; n = 8-9; MW ± SEM.

Diese gesteigerten Glukose-Konzentrationen waren mit einer reduzierten Insulinausschüttung nach 10 Minuten assoziiert $(4,3 \pm 0,5 \text{ vs. } 2,3 \pm 0,9 \text{ ng/ml})$. In adipösen Ratten war eine Reduktion der Insulin-Spiegel unter der Angiotensin-II-Behandlung nur tendenziell zu beobachten (Abb. 8C und D).

Sowohl in schlanken als auch in adipösen Zuckerratten wurde nach der Glukosebelastung eine Corticosteron-Antwort stimuliert. Die Corticosteron-Plasma-Verläufe waren bei schlanken und adipösen Kontrollen nicht unterschiedlich. Weder die AUC noch C_{max} waren durch den Phänotyp beeinflusst. Allerdings konnten hinsichtlich t_{max} eine signifikante Rechtsverschiebung und ein retardierter Rückgang auf das Ausgangsniveau beobachtet werden. Unter Angiotensin-II wurde selektiv in adipösen Tieren eine gesteigerte Corticosteron-Konzentration beobachtet. Wie schon bei Betrachtung der Glukose- und Insulin-Plasmakonzentrationen erkennbar, war die niedrige Angiotensin-II-Behandlung ohne einen Effekt auf die Corticosteron-Freisetzung (Abb. 8E und F).

3.1.8 Einfluss von Angiotensin-II auf die "mRNA-steady-state-Konzentrationen" der HPA-Achse

In den Organen der HPA-Achse wurden die "mRNA-steady-state-Konzentrationen" der AT-Rezeptoren mittels qPCR bestimmt. Angiotensin-II beeinflusste die "mRNA steady-state-Konzentrationen" der AT_{1A}-, AT_{1B}- und AT₂-Rezeptoren nicht im Hypothalamus. Allerdings war die Expression von AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptoren in den adipösen Ratten im Vergleich zu den schlanken Ratten erhöht (Abb. 9). Für die Hypophyse ergab sich ein ähnliches Bild: Auch hier waren Expressionsunterschiede der AT₁-Rezeptoren zwischen schlanken und adipösen Zuckerratten vorhanden. Die Angiotensin-II-Behandlung wirkte sich nicht auf die "mRNA-steady-state-Konzentrationen" der AT-Rezeptoren aus (Abb. 9).





Die adrenalen AT_{1A^-} , AT_{1B^-} und AT_{2^-} ,mRNA-steady-state-Konzentrationen" unterschieden sich nicht zwischen schlanken und adipösen Kontrollen, wurden jedoch zum Teil durch Angiotensin-II in ihrer Expression beeinflusst. So wurden die AT_{1A} -Rezeptoren in den schlanken und adipösen Zuckerratten gegenläufig reguliert. In den schlanken Ratten waren die "mRNA-steady-state-Konzentrationen" signifikant um ca. 26 % reduziert, während in den adipösen Ratten ein Anstieg von ca. 24 % zu beobachten war (Abb. 9).

Die "mRNA-steady-state-Konzentrationen" der AT_{1B}-Rezeptoren waren in der Nebenniere von adipösen Ratten unter Angiotensin-II um 130% erhöht. In schlanken Ratten blieb die Angiotensin-II-Behandlung ohne Effekt auf die adrenalen AT_{1B}-"mRNA steady-state-Konzentrationen" (Abb. 9).

Die AT₂-"mRNA-steady-state-Konzentrationen" wurden adrenal durch Angiotensin-II nicht beeinflusst (Abb. 9).

3.1.9 Einfluss der chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf die Dicke der Zona Glomerulosa

Schlanke und adipöse Kontrollen unterschieden sich nicht in der Dicke ihrer Zona Glomerulosa. Unter der chronischen Behandlung mit Angiotensin-II kam es in den adipösen Zuckerratten selektiv zu einer Hypertrophie der Zona Glomerulosa. Diese Zunahme war sowohl gegenüber den entsprechenden Kontrollen als auch gegenüber den schlanken, mit Angiotensin-II-behandelten Ratten signifikant erhöht (Abb. 10).



Abb. 10: Exemplarische Äquatorialschnitte mit Haematoxylin/Eosin gefärbter Nebennieren (**A**) zur Dickenbestimmung der Zona Glomerulosa (ZG) und deren statistische Auswertung (**B**) für schlanke und adipöse Zuckerratten unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung (offene Balken: 0 µg/h Angiotensin-II; geschlossene Balken: 9 µg/h Angiotensin-II); *: p < 0,05 vs. 0 µg/h Ang-II gleichen Phänotyps; †: p < 0,05 vs. schlankem Phänotyp unter Angiotensin-II-Behandlung; n = 8-9; MW ± SEM.

3.1.10 Einfluss der chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf die "mRNA-steady-state-Konzentrationen" wichtiger Proteine der Steroid-Biosynthese

Um Hinweise zu erhalten, ob eine chronische Angiotensin-II-Behandlung mit Veränderungen in der Expression wichtiger Faktoren der Steroid-Bioynthese einhergeht, wurden die "mRNA-steady-state-Konzentrationen" von CRH im Hypothalamus, von POMC in der Hypophyse sowie MC2-Rezeptor, StAR, CYP11B1 und CYP11B2 in den Nebennieren bestimmt (Abb. 11, 12 und 13).

Die CRH-mRNA wurde in ihrer Expression weder durch den Phänotyp noch durch Angiotensin-II beeinflusst (Abb. 11). POMC war in der Hypophyse von adipösen Zuckerratten durch Angiotensin-II selektiv zu den Kontrollen um ca. 42% reduziert. Der Phänotyp selbst hatte keinen Einfluss auf die Expression (Abb. 11).

ACTH vermittelt die Steroid-Biosynthese über den MC2-Rezeptor. Im Rahmen der Steroid-Biosynthese nimmt StAR als mitochondrialer Cholesterol-Transporter eine bedeutende, geschwindigkeitsbestimmende Rolle ein.



Abb. 11: "mRNA-steady-state-Konzentrationen" von CRH im Hypothalamus und von POMC in der Hypophyse nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 µg/h: offene Balken; 0,9 µg/h: gestreifte Balken; 9 µg/h: geschlossene Balken) von schlanken und adipösen Zuckerratten; *: p < 0,05 vs. 0 µg/h Ang-II gleichen Phänotyps; n = 8-9; MW ± SEM.



Abb. 12: Adrenale "mRNA-steady-state-Konzentrationen" von MC2-Rezeptor und StAR nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: offene Balken; 0,9 μ g/h: gestreifte Balken; 9 μ g/h: geschlossene Balken) von schlanken und adipösen Zuckerratten; *: p < 0,05 vs. 0 μ g/h Ang-II gleichen Phänotyps; †: p < 0,05 adipös vs. schlank unter 0 μ g/h Ang-II; n = 8-9; MW ± SEM.

Die MC2-Rezeptor-mRNA war bei adipösen Kontrollratten um ca. 33 % niedriger als bei schlanken Kontrollen und wurde selektiv in schlanken Ratten durch Angiotensin-II reduziert. In den adipösen Ratten war unter Angiotensin-II lediglich ein Trend zu erhöhten MC2-Rezeptor-"mRNA-steady-state-Konzentrationen" zu beobachten. (Abb. 12). Die StAR-"mRNA-steady-state-Konzentration" war in den adipösen Ratten generell höher, wurde aber weder in schlanken noch in adipösen Ratten durch Angiotensin-II beeinflusst (Abb. 12).

Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym für die Corticosteron- bzw. Aldosteron-Synthese ist die 11ß-Hydroxylase-1 (CYP11B1) bzw. die Aldosteronsynthetase (CYP11B2). Zwischen den adipösen und schlanken Kontrollen waren weder die CYP11B1- noch die CYP11B2-"mRNA-steady-state-Konzentrationen" unterschiedlich. Unter Angiotensin-II waren die "mRNA-steady-state-Konzentrationen" von CYP11B1 (54%) und CYP11B2 (30%) selektiv in adipösen Zuckerratten gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb. 13). In den schlanken Ratten wurden die CYP11B1- und CYP11B2-"mRNA-steady-state-Konzentrationen" in der Tendenz reduziert.



Abb. 13: "mRNA-steady-state-Konzentrationen" von CYP11B1 und CYP11B2 nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: offene Balken; 0,9 μ g/h: gestreifte Balken; 9 μ g/h: geschlossene Balken) von schlanken und adipösen Zuckerratten; *: p < 0,05 vs. 0 μ g/h Ang-II; n = 8-9; MW ± SEM.

3.2 Zweiter Studienteil

Ziel dieses Studienteils war es zu untersuchen, ob die chronische Behandlung mit Angiotensin-II über 3 Monate in prädiabetischen Zuckerratten in der Lage ist, eine Manifestation eines Typ-2-Diabetes herbeizuführen, und ob der HPA-Achse hierbei eine dominante Rolle zukommt. Es wurden hierfür ausschließlich adipöse Zuckerratten und die hohe Angiotensin-II-Dosis (9 µg/h) verwendet.

3.2.1 Körpergewicht, Körperlänge sowie Body-Mass-Index (BMI)

Vor der Behandlung waren keine Unterschiede im Körpergewicht beider Gruppen zu beobachten (248 \pm 3 vs. 246 \pm 3 g). Wie schon im ersten Studienteil beobachtet, führte die chronische Angiotensin-II-Behandlung zu einer Reduktion des Körpergewichts innerhalb der ersten 7 Tage und verursachte so eine Parallel-Verschiebung der Körpergewichtskurve im Vergleich zur Kontrolle.



Abb. 14: Körpergewichtsentwicklung von adipösen Zuckerratten unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: O bzw. 9 μ g/h: \bullet); gepunktete Linien: Implantation bzw. Austausch der Minipumpen; n = 9; MW±SEM.

Angiotensin-II	0 μg/h	9 μg/h	T - test
KG [g]	595 ± 15	506 ± 17	p < 0,05
Körperlänge [cm]	$20,3 \pm 0,3$	20,1 ± 0,3	n.s.
BMI [kg/m²]	$14,44 \pm 0,36$	12,51 ± 0,36	p < 0,05
			$n s \cdot n > 0.05 \cdot n = 8.9 \cdot MW + SEM$

Tabelle 3-4: Körpergewicht (KG), Körperlänge sowie BMI nach 76-tägiger Angiotensin-II-Behandlung

n.s.: p > 0,05; n = 8-9; MW ± SEM

Ab den Tagen 28 und 56 kam es bedingt durch den Pumpenwechsel zu einem transienten Rückgang des Körpergewichts, der binnen einer Woche wieder kompensiert wurde. Dies war in den Kontrollen weit weniger zu beobachten, obwohl sie derselben Operation und Narkose ausgesetzt waren. Gegen Ende der Behandlungsdauer näherte sich der Gewichtszuwachs in beiden Gruppen einem Plateau mit Maximal-Werten von 595 ± 15 g in den Kontrollen und 506 ± 17 g unter der Angiotensin-II-Behandlung an (Abb. 14).

Am Tag 76 wurden Körpergewicht und Körperlänge bestimmt und daraus der BMI berechnet (Tab. 3-4). Da die Körperlänge durch die Angiotensin-II-Behandlung nicht beeinflusst wurde, ergab sich unter Angiotensin-II-Behandlung durch die Reduktion des Körpergewichtes ein signifikant erniedrigter BMI.

3.2.2 **Blutdruck und Herzfrequenz**

Unter der Angiotesin-II-Behandlung erhöhte sich der systolische Blutdruck von 120 \pm 1,4 auf 160 \pm 7,8 mmHg und blieb über den gesamten Zeitraum auf diesem Niveau (Abb. 15A). In den ersten vier Wochen erhöhte sich die Herzfrequenz unter Angiotensin-II um etwa 30 Schläge/Minute, reduzierte sich im weiteren Verlauf jedoch wieder auf das Kontrollniveau (Abb. 15B). Weder der Blutdruck noch die Herzfrequenz waren zeitabhängig in den Kontrollen verändert.



Abb. 15: Systolischer Blutdruck (**A**; SAP) und Herzfrequenz (**B**) von adipösen Zuckerratten unter einer zwölfwöchigen Angiotensin-II-Behandlung (0 µg/h: O bzw. 9 µg/h: ●); *: p < 0.05 Basalwert; †: p < 0.05 0 µg/h Ang II zum selben Zeitpunkt; n = 9; MW±SEM.

3.2.3 Angiotensin-II und Aldosteron

Durch die chronische Angiotensin-II-Behandlung war die Angiotensin-II-Plasmakonzentration gegenüber den Kontrollen um ca. das 3-fache gesteigert (Abb. 16A). Infolge dessen erhöhte sich auch Aldosteron (118 ± 20 vs. 506 ± 135 16B). Der funktionelle Zusammenhang zwischen Aldosteronpg/ml; Abb. Freisetzung und Angiotensin-II-Konzentration ergibt sich aus der Korrelationsanalyse (Kontrollen: Pearson r = 0,809, p = 0,0151; Angiotensin-II: Pearson r = 0.956, p < 0.0001; Abb. 16C).



Abb. 16: Plasmakonzentration von Angiotensin-II (**A**), Aldosteron (**B**) und deren Korrelation (**C**) in adipösen Zuckerratten nach einer zwölfwöchigen Behandlung mit Angiotensin-II ($0 \mu g/h$: O bzw. $9 \mu g/h$: \bullet) über s.c.-implantierte Pumpen; n = 8-9; p < 0,05 vs. $0 \mu g/h$ Ang-II; MW±SEM.



Abb. 17: Futteraufnahme (**A**) und Wasseraufnahme (**B**) in adipösen Zuckerratten unter chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: O bzw. 9 μ g/h: \bullet); die gestrichelten Linien am Tag 0, 28 und 56 indizieren die Implantation bzw. den Wechsel der Pumpen; *: p < 0.05 vs. Ausgangswert Tag 0; \dagger : p < 0.05 vs. 0 μ g/h Ang zum selben Zeitpunkt; n = 8-9; MW±SEM.

3.2.4 Einfluss von Angiotensin-II auf die Energie- und Wasser-Aufnahme

Die Futter-Wasseraufnahme und wurde über den gesamten Behandlungszeitraum von 72 Tagen täglich ermittelt. Vor Implantation der ersten Pumpe waren Futter- (445 \pm 5 vs. 441 \pm 11 kJ/d) bzw. Wasser-Aufnahme (38 \pm 0,4 vs. 38 ± 1 ml/d) in beiden Gruppen gleich. Unmittelbar nach Beginn der ersten Behandlungsperiode war die Futteraufnahme unter Angiotensin-II während der ersten neun Tage unter den Ausgangswert reduziert, während die Futteraufnahme der Kontrollen nur am 1. postoperativen Tag reduziert war. Die Futteraufnahme Behandlungsgruppen zwischen den nur in den ersten war neun Behandlungstagen signifikant unterschiedlich (Abb. 17A). Die Pumpenwechsel wiederum in einer verminderten Futteraufnahme. resultierten Allerdings normalisierte sich die Futteraufnahme bei den Angiotensin-II behandelten Tieren wesentlich schneller als nach der ersten Implantation (9 Tage vs. 5 Tage vs. 5 Tage). Die Gesamt-Futteraufnahme war nach integrativer Analyse (AUC) unter der ersten Pumpe reduziert (13076 ± 111,5 vs. 9640 ± 526,6 kJ) und unterschied sich für die nachfolgenden Pumpen nicht mehr (2. Pumpe: 11561 ± 177,6 vs. 10921 ± 253,2 kJ; 3. Pumpe: 4951 ± 143,5 vs. 4528 ± 215,3 kJ).

Die Wasseraufnahme war durch Angiotensin-II gesteigert (Abb. 17B). Sie erhöhte sich über den gesamten Behandlungszeitraum kontinuierlich und war ab der dritten Behandlungsperiode signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle. Wie schon bei der Futteraufnahme kam es infolge der Pumpenwechsel auch zu einer Reduktion der Wasseraufnahme (Abb. 17B).

3.2.5 Metabolische Veränderungen durch chronische Angiotensin-II-Behandlung

Die Plasmakonzentrationen von Glukose und Insulin wurden im Abstand von zwei Wochen bestimmt. Angiotensin-II beeinflusste beide Parameter (Abb. 18A und B). So senkte Angiotensin-II die Glukosespiegel zu jedem beobachteten Zeitpunkt signifikant unter den Basalwert, was sich in einer verringerten AUC_{Glukose} (-26%) widerspiegelt (114,7 ± 11,9 vs. 84,4 ± 3,5 g•I⁻¹•d; Abb. 18A).

Die Insulinspiegel waren unter Angiotensin-II in den ersten neun Wochen nur tendenziell und erst in der elften Woche signifikant gegenüber dem Basalwert reduziert. Die AUC_{Insulin} war um 38% reduziert ($3,9 \pm 0,4$ vs. $2,4 \pm 0,3$ µg•ml⁻¹•d; Abb. 18B). Im Gegensatz dazu waren Nüchternglukose und Nüchterninsulin und somit auch der HOMA-Index durch die Angiotensin-II-Behandlung unbeeinflust (Tab. 3-5). Leptin war unter Angiotensin-II unverändert, während die Plasmakonzentrationen von Adiponektin reduziert waren (Tab 3-5).



Abb. 18: Plasmakonzentration-Zeit-Kurven von Glukose (**A**) und Insulin (**B**) in adipösen Zuckerratten unter einer zwölfwöchigen Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: O bzw. 9 μ g/h: •); *: p < 0,05 vs. Basal; n = 8-9; MW±SEM.

Angiotensin-II	0 μg/h	9 μg/h	t - test
Leptin [pg/ml]	30,8 ± 3,3	38,6 ± 6,5	n.s.
Adiponektin [µg/ml]	2,18 ± 0,14	1,72 ± 0,15	p < 0,05
Glukose nüchtern [mg/dl]	86,9 ± 4,5	88,5 ± 5,6	n.s.
Insulin nüchtern [ng/ml]	10,1 ± 2,0	8,0 ± 1,4	n.s.
НОМА	52 ± 11	49 ± 10	n.s.

Tabelle 3-5:	Einfluss einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf metabolische und
	endokrinologische Parameter.

Leptin und Adiponektin wurden aus biologischem Material vom Tag 80 bestimmt; nüchterne Glukose- und Insulin-Konzentrationen aus Basalwerten des OGTT (Tag 79); t-test: Angabe der Signifikanz zwischen Kontrolle und Angiotensin-II-Behandlung; n.s. = nicht signifikant; n = 8-9; MW±SEM.

3.2.6 ACTH-Test

Im Einklang zum ersten Studienteil wurde zur Bestimmung der Reaktivität der HPA-Achse in diesem Versuchsteil ein ACTH-Test durchgeführt. Vor ACTH-Stimulation waren zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede in den Corticosteron-Plasmaspiegeln zu beobachten. Nach der Gabe von 2 mg/kg_{KG} ACTH reagierten beide Gruppen mit einem signifikanten Corticosteron-Anstieg. Im Vergleich zu den Kontrollen war unter Angiotensin-II der maximale Anstieg an Corticosteron um ca. 80 ng/ml erhöht, p = 0,0148. Auch die AUC_{Corticosteron} war unter Angiotensin-II um ca. 45 % von 18,8 ± 1,5 auf 27,2 ± 2,5 mg•ml⁻¹•min, p = 0,0130 gesteigert (Abb. 19A). t_{max} blieb unter Angiotensin-II unbeeinflusst. Trotz der gesteigerten Corticosteron-Antwort blieb die Glukose-Antwort auf ACTH unbeeinflusst (Abb. 19B).



Abb. 19: ACTH-induzierte Corticosteron- (**A**) und Glukose- (**B**) Antwort in adipösen Zuckerratten nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: O bzw. 9 μ g/h: •); *: p < 0,05 vs. Zeitpunkt 0; n = 9; MW±SEM.

3.2.7 Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT)

Zur Charakterisierung der Glukoseutilisation nach 3-monatiger Angiotensin-II-Behandlung wurde ein OGTT durchgeführt. Nach Gabe von 1g/kgKG Glukose waren keine Unterschiede in den Glukose- bzw. Insulin-Verläufen zwischen beiden Gruppen zu erkennen. Somit waren hinsichtlich der Glukose weder tmax (23,4 ± 3,2 vs. 23,4 ± 6,4 min), noch die maximale Konzentrations-Zunahme (117 \pm 17 vs. 129 \pm 24 mg/dl) noch die AUC_{Glukose} (113 \pm 22 vs. 133 \pm 38 g·l⁻¹·min) unterschiedlich. Angiotensin-II behandelte Ratten waren im Gegensatz zu den Kontrollen in den Glukose-Konzentrationen nach 120 Minuten noch signifikant gegenüber dem Basalwert erhöht. Hinsichtlich Insulin waren weder t_{max} (17,9 ± 2,0 vs. 17,9 ± 2,9 min), die maximale Konzentrations-Zunahme (21 ± 3 vs. 18 ± 5 ng/ml) noch die AUC_{Insulin} (1,5 ± 0,3 vs. 1,4 ± 0,3 μ g•ml⁻¹•min) unterschiedlich (Abb. 20A und B). Die Glukosebelastung führte zu einer Corticosteron-Ausschüttung, die unter Angiotensin-II gesteigert wurde. In allen drei beschreibenden Kurvenparametern t_{max} (28,9 ± 2,0 vs. 37 ± 5,3 min), ΔC_{max} (223,9 \pm 21,8 vs. 301,3 \pm 27,1 µg/ml) und AUC (18,8 \pm 1,0 vs. 51,1 \pm 4,1 mg•ml⁻¹•min) ergaben sich signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe. Des Weiteren waren die Corticosteronkonzentrationen gegenüber den Basalwerten längere Zeit erhöht (33 min vs. 90 min; Abb. 20C)



Abb. 20: Plasmakonzentration-Zeit-Kurven von Glukose (**A**), Insulin (**B**) und Corticosteron (**C**) nach oraler Glukosebelastung ($1g/kg_{KG}$) von adipösen Zuckerratten unter chronischer Angiotensin-II-Behandlung ($0 \mu g/h$: $0 bzw. 9 \mu g/h$: \bullet); *: p < 0.05 vs. Zeitpunkt 0; n = 8-9; $MW\pm SEM$.

3.3 Dritter Studienteil

In diesem Studienteil sollte die Bedeutung der Nebenniere auf die veränderte Glukoseutilisation unter einer 4-wöchigen Angiotensin-II-Behandlung untersucht werden. Hierzu wurden adipöse Zuckerratten adrenalektomiert bzw. scheinoperiert und chronisch mit Angiotensin-II (9 μg/h) behandelt.

3.3.1 Körpergewicht

Initial war das Körpergewicht zwischen allen Gruppen gleich (Tab. 3-6; Abb. 21). Am Tag 21 nach Entfernung der Nebenniere war unter der Kontrollbehandlung im Vergleich zu den entsprechenden scheinoperierten Kontrollen das Körpergewicht um 41 g vermindert. In Übereinstimmung zum zweiten Studienteil war das Körpergewicht bei scheinoperierten Ratten unter Angiotensin-II binnen 3 Wochen um 78 g reduziert. Auch in den adrenalektomierten Ratten war dieser Effekt zu beobachten (-52 g nach 3 Wochen). In der Summe war die Gewichtsabnahme durch Adrenalektomie und Angiotensin-II-Gabe nicht höher als in Angiotensin-IIbehandelten, scheinoperierten Ratten. So war das Körpergewicht unter Angiotensin-II zwischen den scheinoperierten und den adrenalektomierten Ratten nach 3 Wochen nicht unterschiedlich (Tab. 3-6; Abb. 21).

Die beobachteten Gewichtsunterschiede sind fast ausschließlich auf die Gewichtsveränderungen der ersten Behandlungswoche zurückzuführen, da sich ab dem 7. Tag der Behandlung in allen Gruppen eine gleiche Gewichtszunahme pro Tag zeigte (Tab. 3-6; Abb. 21).



Abb. 21: Körpergewichtsentwicklung von adipösen Zuckerratten mit intakten (Dreiecke; sham) bzw. entfernten Nebennieren (Kreise; ADX) unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: offene Symbole bzw. 9 μ g/h: geschlossene Symbole); *: p < 0,05 zwischen geklammerten Gruppen; n = 9-12; MW±SEM

3.3.2 Energie- und Wasser-Aufnahme

Die Energieaufnahme über 24 Stunden war vor Behandlungsbeginn in allen Gruppen gleich und betrug pro Ratte etwa 448 kJ pro Tag. Die Energieaufnahme reduzierte sich in Folge der Operation in allen Gruppen signifikant. Die mit Kochsalz behandelten Kontrolltiere reduzierten ihre Futteraufnahme für zwei Tage unter den Ausgangswert, während die mit Angiotensin-II behandelten

	sh	am	ADX		zweiseitige ANOVA		
Angiotensin-II	0 µg/h	9 μg/h	0 µg/h	9 μg/h	ADX	Ang-II	
KG am Tag 0 der Behandlung [g]	323 ± 15	329 ± 10	322 ± 7	330 ± 7	n.s.	n.s.	
KG am Tag 21 der Behandlung [g]	463 ± 11	385 ± 17 ^a	412 ± 9 ^b	360 ± 10 ^a	P < 0,05	P < 0,05	
Gewichtszunahme ab Tag 7 [g/d]	5,8 ± 0,5	4,0 ± 0,8	5,2 ± 0,4	5,1 ± 0,5	n.s.	n.s.	

Tabelle 3-6: Einfluss chronischer Angiotensin-II-Behandlung auf das Körpergewicht (KG) von scheinoperierten (sham) und adrenalektomierten (ADX) adipösen Zuckerratten zu Behandlungsbeginn (Tag 0) und nach 21 Tagen.

zweiseitige ANOVA der Gruppeneffekte: ADX: Effekte der Adrenalektomie; Ang-II: Effekt der Angiotensin-II-Behandlung; n.s. = p > 0,05; Post Test: ^a: p < 0,05 vs. korrespondierender Kontrolle; ^b: p < 0,05 vs. korrespondierender sham-Gruppe; n = 9-12; MW ± SEM;



Abb. 22: Futter- (**A**) und Wasser-Aufnahme (**C**) über 17 Tage von adipösen Zuckerratten mit intakten (Dreiecke; sham) bzw. entfernten Nebennieren (Kreise; ADX) unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: offene Symbole bzw. 9 μ g/h: geschlossene Symbole) und der zugehörigen AUC (Energie: **B**, Wasser: **D**); *: p < 0,05 vs. 0 μ g/h Ang-II; n = 9-12; MW±SEM.

Tiere ca. 10 Tage lang eine reduzierte Energieaufnahme aufwiesen. Auch die gesamte Futteraufnahme über die Zeit (=AUC) war unter Angiotensin-II reduziert und zwar gleichsam zwischen scheinoperierten und adrenalektomierten Ratten (Abb. 22A und B).

Die tägliche Wasseraufnahme war initial in allen Gruppen gleich (ca. 38 ml/d). Nach Behandlungsbeginn erhöhte sich die Wasseraufnahme in den adrenalektomierten Ratten und erreichte nach neun Tagen eine signifikante Steigerung um ca. 56%. Demzufolge war auch die gesamte Wasseraufnahme über die Zeit erhöht (Abb. 22D). Die Wasseraufnahme der scheinoperierten Ratten blieb unbeeinflusst. Angiotensin-II hatte weder in adrenalektomierten noch in scheinoperierten Ratten einen Effekt auf die Wasseraufnahme.
3.3.3 Einfluss von Angiotensin-II auf basale Plasmakonzentrationen von Glukose, Insulin und Corticosteron

Zu Behandlungsbeginn waren die basalen Glukose- und Insulin-Konzentrationen in allen Gruppen gleich. Die scheinoperierten bzw. adrenalektomierten Kontrollen wiesen über den Beobachtungszeitraum gleich bleibende Plasma-Glukose-Konzentrationen auf, während die Angiotensin-II-Behandlung eine Abnahme herbeiführte. So war die Glukose-Konzentration unter Angiotensin-II zu jedem Zeitpunkt nach Behandlungsbeginn signifikant niedriger als der Ausgangswert. Dies spiegelte sich auch in der AUC_{Glukose} wider, in der sich ein signifikanter Gruppeneffekt für Angiotensin-II ergab (Abb. 23A und B).

Die Reduktion der Glukose unter Angiotensin-II war in adrenalektomierten als auch in scheinoperierten Zuckerratten mit einer Reduktion basaler Insulin-Konzentrationen assoziiert. Somit war auch die AUC_{Insulin} selektiv durch die Angiotensin-II-Behandlung reduziert (Abb. 23C und D).

Die Corticosteron-Substitution wurde durch regelmäßige Bestimmung der Plasmakonzentrationen überprüft. Ziel der Substitution war es, das Plasma-Corticosteron der adrenalektomierten Ratten vergleichbar zu den scheinoperierten Ratten einzustellen. Über den gesamten Beobachtungszeitraum waren die Corticosteron-Plasmakonzentrationen in allen Gruppen gleich (ca.140 \pm 20 ng/ml) und durch die AUC_{Corticosteron} bestätigt (Abb. 23E und F).



Abb. 23: Plasmakonzentrationen von Glukose (A), Insulin (C) und Corticosteron (E) in adipösen Zuckerratten mit intakten (Dreiecke; sham) bzw. entfernten Nebennieren (Kreise; ADX) unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung (0 µg/h: offene bzw. 9 µg/h: geschlossene Symbole) und der zugehörigen AUC (Glukose: **B**, Insulin: **D**; Corticosteron: **F**); *: p < 0,05 vs. 0 µg/h Ang-II; †: p < 0,05 Gruppeneffekt von Angiotensin-II; n = 9-12; MW±SEM.

	sł	nam	A	DX	Zweiseitige ANOVA		
Angiotensin-II	0 μg/h	9 μg/h	0 μg/h	9 μg/h	ADX	Ang II	
SAP [mmHg]	118 ± 2	177 ± 4 ^a	120 ± 3	158 ± 7 ^{a,b}	n.s.	p < 0,05	
HF [1/min]	407 ± 13	427 ± 14	416 ± 14	385 ± 24	n.s.	n.s.	
LV [mg]	694 ± 23	770 ± 22 ^a	664 ± 14	703 ± 26	p < 0,05	p < 0,05	
Ang II [pmol/l]	37,3 ± 7,4	100,3 ± 20,2 ^a	28,3 ± 2,7	119,2 ± 17,8 ^a	n.s.	p < 0,05	
Aldosteron [pg/ml]	97 ± 17	661 ± 139 ª	n.d.	n.d.			
ACE Aktivität [nmol/h/ml]	57 ± 2	61 ± 2	56 ± 1	57 ± 3	n.s.	n.s.	

Tabelle 3-7:	Einflus	s eir	ner chronisci	hen A	Angioter	nsin	-II-Behand	llung auf die H	lämo	dynamik
	sowie	auf	Parameter	des	RAAS	in	adipösen	Zuckerratten	mit	intakten
	(sham)) bzw	v. entfernten	(AD)	K) Nebe	nni	eren			

Zweiseitige ANOVA der Gruppeneffekte: ADX: Effekte der Adrenalektomie; Ang II: Effekt der Ang-II-Behandlung; n.d. = nicht detektierbar; n.s = p > 0,05; Post hoc Test: ^a: p<0,05 vs. korrespondierender Kontrolle; ^b: p < 0,05 vs. korrespondierender sham-Gruppe; n = 9-12; MW ± SEM

3.3.4 Hämodynamische Charakterisierung und Veränderungen im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Der Blutdruck, die Herzfrequenz und das linksventrikuläre Gewicht unterschieden sich in scheinoperierten und adrenalektomierten Kontrollratten nicht voneinander (Tab. 3-7).

Nach chronischer Angiotensin-II-Gabe war der Blutdruck sowohl in scheinoperierten als auch in adrenalektomierten Ratten gesteigert. Dieser Blutdruckeffekt war in der scheinoperierten Gruppe signifikant stärker ausgeprägt als in adrenalektomierten Ratten (+ 19 mmHg). Die Herzfrequenz blieb durch Angiotensin-II unbeeinflusst. In Folge der Angiotensin-II induzierten Steigerung des Blutruckes war das linksventrikuläre Gewicht der scheinoperierten, nicht jedoch der adrenalektomierten Ratten erhöht (Tab. 3-7).

Die Angiotensin-II-Plasmakonzentrationen waren unter Angiotensin-II gleichermaßen in scheinoperierten und adrenalektomierten Ratten erhöht. In der Konsequenz war in den scheinoperierten, nicht aber in den adrenalektomierten Raten Aldosteron um den Faktor 6,8 gesteigert. In den adrenalektomierten Tieren

waren die gemessenen Aldosteronkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des angewandten Aldosteron-RIA (Tab. 3-7). Die ACE-Aktivität im Plasma wurde weder durch Angiotensin-II noch durch die Adrenalektomie beeinflusst (Tab. 3-7).

3.3.5 Stressreaktivität im "forced-Schwimm-Test" (FST)

Basal waren die ACTH-Plasmakonzentrationen in den verschiedenen Gruppen gleich (sham-Kon: 175 \pm 20 pg/ml; sham-Ang: 399 \pm 105 pg/ml; ADX-Kon: 346 \pm 126 pg/ml; ADX-Ang: 290 \pm 62 pg/ml), nach Stress-Applikation jedoch deutlich gesteigert. Die Stress-induzierte ACTH-Konzentration war allerdings in den adrenalektomierten Ratten erhöht (sham-Kon: 674 \pm 55 pg/ml; sham-Ang: 794 \pm 98 pg/ml; ADX-Kon: 869 \pm 123 pg/ml; ADX-Ang: 1083 \pm 139 pg/ml). Die ACTH-Freisetzung wurde aber weder in den scheinoperierten noch in den adrenalektomierten Zuckerratten durch Angiotensin-II beeinflusst (Abb. 24A).

Die basalen Corticosteron-Konzentrationen unterschieden sich nicht zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (sham-Kon: 124 ± 19 ng/ml; sham-Ang: 156 ± 23 ng/ml; ADX-Kon: 92 ± 16 ng/ml; ADX-Ang: 105 ± 9 ng/ml). Nach Stress-Applikation war Corticosteron selektiv in den scheinoperierten Ratten um etwa das vierfache erhöht, während es bei den adrenalektomierten Tieren zu keinem Anstieg kam. Angiotensin-II hatte auf die Corticosteron-Freisetzung keinen Einfluss (Abb. 24B).



Abb. 24: Plasmakonzentrationen von ACTH (**A**) und Corticosteron (**B**) vor (weiße Balken) und 30 Minuten nach einem "forced-Schwimm-Test" (graue Balken) von scheinoperierten (sham) und adrenalektomierten (ADX) adipösen Zuckerratten unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung (0 µg/h: KON; 9 µg/h: ANG); *: p < 0.05 Basal vs. Stress; angegebene p-Werte geben den Gruppeneffekt der Adrenalektomie an; n = 9-12; MW±SEM.

3.3.6 Einfluss von Nahrungskarenz auf Glukose, Insulin und Corticosteron

Infolge der 18-stündigen Nahrungskarenz war die basale Plasmaglukose in allen Gruppen auf ca. 75 mg/dl vermindert und war unbeeinflusst durch Angiotensin-II und Adrenalektomie (Abb. 25A). Die Plasma-Insulinkonzentrationen waren unter der Nahrungskarenz in allen Tieren reduziert. In scheinoperierten Ratten waren gefasteten Insulinkonzentrationen signifikant niedriger die als in den adrenalektomierten Ratten. Der in gefütterten Ratten beobachtete reduzierende Effekt von Angiotensin-II auf die Insulinkonzentration war durch die Nahrungskarenz in scheinoperierten als auch in adrenalektomierten Ratten vollständig aufgehoben (Abb. 25B).

Das Fasten führte in scheinoperierten Ratten zusätzlich zu einer gesteigerten Plasmacorticosteron-Konzentration, die unter Angiotensin-II gegenüber den scheinoperierten Kontrollen signifikant gesteigert war. Die adrenalektomierten Ratten waren in ihren Corticosteron-Konzentrationen unverändert (Abb. 25C).



Abb. 25: Plasmakonzentrationen von Glukose (A), Insulin (B) und Corticosteron unter gefütterten (weiße Balken) bzw. gefasteten (schwarze Balken) Bedingungen von scheinoperierten (sham) und adrenalektomierten (ADX) adipösen Zuckerratten unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung (0 µg/h: KON; 9 µg/h: ANG); *: p < 0.05 vs. entsprechender Kontrolle; †: p < 0.05 sham vs. ADX gleicher Behandlung; n = 9-12; MW±SEM.



Abb. 26: Plasmakonzentration-Zeit-Kurven von Glukose (**A**) und Insulin (**B**) nach Glukose-Belastung (1g/kg_{KG} p.o.) scheinoperierter (Dreiecke) und adrenalektomierter (Kreise) Zuckerratten unter Angiotensin-II-Behandlung (0 μ g/h: offene bzw. 9 μ g/h: geschlossene Symbole); *: p < 0,05 vs. 0 μ g/h Ang-II der entsprechenden Kontrolle; n = 9-12; MW±SEM.

3.3.7 Oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT)

Nach oraler Glukosebelastung (1g/kg_{KG}) war nach 20 Minuten die Plasmaglukose in allen Gruppen über den Ausgangswert erhöht und fiel innerhalb von vier Stunden wieder auf basale Werte ab (Abb. 26A). Unter der Kontroll-Behandlung waren t_{max}, die maximale Konzentrationszunahme (ΔC_{max}) sowie die AUC_{Glukose} in scheinoperierten und adrenalektomierten Ratten nicht unterschiedlich.

In scheinoperierten Ratten war unter Angiotensin-II die $AUC_{Glukose}$ signifikant gegenüber der entsprechenden Kontrolle erhöht, während t_{max} und der maximale Konzentrationsanstieg unverändert blieben (Tab. 3-8; Abb. 26A).

Dem gegenüber führte die Angiotensin-II-Behandlung in adrenalektomierten Ratten zu einer signifikanten Verminderung des maximalen Konzentrationsanstiegs der Glukose im Vergleich zu den Kontrollen. Die AUC_{Glukose} war nur tendenziell (p = 0,0582) gegenüber der entsprechenden Kontrolle erniedrigt. In der statistischen Betrachtung der adrenalektomierten Ratten mittels eines t-Tests war unter Angiotensin-II die AUC_{Glukose} signifikant reduziert (p = 0,0084). T_{max} war unverändert (Tab. 3-8; Abb. 26A).

	Sham		A	X	zweiseitige ANOVA		
Angiotensin-II	0 μg/h	9 µg/h	0 μg/h	9 μg/h	ADX	Ang II	
Glukose (Abb.26A)							
AUC _{Glukose} [g•dl⁻¹•min]	$5,0 \pm 0,4$	9,2 ± 1,3 ^a	$5,5 \pm 0,9$	2,3 ± 0,3 ^b	p < 0,05	n.s.	
ΔC _{max} [mg/dl]	55 ± 5	75 ± 10	58 ± 3	28 ± 3 ^{<i>a,b</i>}	p < 0,05	n.s.	
t _{max} [min]	32 ± 6	48 ± 7	29 ± 6	24 ± 4 ^b	p < 0,05	n.s.	
Insulin (Abb. 26B)							
AUC _{Insulin} [ng•ml ⁻¹ •min]	2,20 ± 0,19	1,54 ± 0,22	4,58 ± 0,80 ^b	3,26 ± 0,41 ^b	p < 0,05	p < 0,05	
ΔC _{max} [ng/ml]	15,1 ± 2,4	7,3 ± 0,8 ^a	24,3 ± 3,2	22,1 ± 3,2 ^b	p < 0,05	n.s.	
t _{max} [min]	25 ± 5,7	24 ± 4	20 ± 0	20 ± 0	n.s.	n.s.	

Tabelle 3-8:	Abgeleitete	Parameter	aus d	den	Glukose-	und	Insulin-Zeit-Verläufen	nach
	Glukose-Be	lastung (sie)					

AUC: Fläche unter der Kurve, ΔC_{max} : maximaler Anstieg, t_{max} : Zeitpunkt der maximalen Konzentration; ^a: p<0,05 vs. korrespondierender sham-Gruppe; n = 9-12; MW ± SEM

Infolge der Glukose-Belastung stieg Insulin transient in allen vier Gruppen an, wobei die Insulin-Antwort der adrenalektomierten Ratten gegenüber scheinoperierten erhöht war. Insofern war unter Angiotensin-II als auch unter Kontroll-Bedingungen die AUC_{Insulin} im Vergleich zu den entsprechenden scheinoperierten Kontrollen verdoppelt. In den scheinoperierten Ratten ging die Angiotensin-II-induzierte Glukoseerhöhung mit einer Verminderung von Insulin einher (Abb 26 B; Tab 3-8).

Die Cortiosteron-Plasmakonzentrationen waren unter der Glukosebelastung in scheinoperierten Ratten gesteigert und sanken über den Beobachtungszeitraum wieder auf basale Spiegel ab. Unter der Angiotensin-II-Behandlung war die Corticosteronfreisetzung signifikant gegenüber den Kontrollratten gesteigert und resultierte in einer Steigerung von C_{max} und AUC_{Corticosteron}. In den adrenalektomierten Ratten war Corticosteron unverändert (Abb. 27A und B).



Abb. 27: Plasma-Corticosteron unter Glukose-Belastung ($1g/kg_{KG}$ p.o.; **A**) und $AUC_{Corticosteron}$ (**B**) in scheinoperierten (Dreiecke) und adrenalektomierten (Kreise) Zuckerratten unter chronischer Angiotensin-II-Behandlung (0 µg/h: offene bzw. 9 µg/h: geschlossene Symbole); *: p < 0,05 vs. 0 µg/h Ang-II der entsprechenden Kontrolle; n = 9-12; MW±SEM.

Ziel der hier präsentierten Studien war es, den Einfluss chronisch erhöhter Angiotensin-II-Plasmaspiegel auf die Reaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) näher zu charakterisieren und deren Bedeutung auf den Glukosestoffwechsel in prädiabetischen Ratten aufzuklären. Des Weiteren galt es zu untersuchen, ob aufgrund chronisch erhöhter Angiotensin-II-Spiegel aus einem mit dem Metabolischen Syndrom einhergehenden Prädiabetes ein Typ-2-Diabetes entsteht.

Die nur im ersten Studienteil eingesetzte, niedrige Angiotensin-II-Konzentration von 0,9 μg/h regulierte weder Körpergewicht, Futteraufnahme noch andere basale Parameter in beiden Phänotypen (Abb. 1 und 2; Tab.3-2). Diese niedrige Angiotensin-II-Dosierung von unter 70 ng/(kg•min) wird als Blutdruck-ineffektive Dosierung beschrieben (Simon et al. 1995). Sie fand Verwendung, um mögliche Effekte dieser Blutdruck unbeeinflussenden Angiotensin-II-Dosis nachzuweisen. Die chronische Behandlung mit dieser niedrigen Dosierung war weder in der Lage, die Plasma-Angiotensin-II-Spiegel noch die Aldosteron-Spiegel zu erhöhen (Abb. 4B). Auch alle anderen von uns betrachteten Parameter blieben unbeeinflusst. Aus diesem Grund wurde diese Konzentration in den weiteren Versuchen (Studienteil 2 und 3) nicht mehr eingesetzt und wird auch im weiteren Verlauf der Diskussion nicht weiter erörtert. Unter einer Angiotensin-II-Behandlung ist im Folgenden also immer die hohe Dosierung von 9 μg/h Angiotensin-II zu verstehen.

4.1 Tiermodell

Das Metabolische Syndrom stellt mit seinen Symptomen abdominale Adipositas, Glukose- und Lipid-Stoffwechselstörungen sowie Hypertonie einen komplexen Zusammenschluss unterschiedlicher, pathophysiologisch relevanter Symptome dar. Diese Symptome weisen häufig eine Vergesellschaftung mit einer hyperreaktiven HPA-Achse auf (Björntorp und Rosmond 2000, Reaven 2006, Moebus und Stang 2007). Im Fokus dieser Arbeit stand die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen dem Renin-Angiotensin-II-Aldosteron-System (RAAS) und der HPA-Achse im Rahmen einer Adipositas. Ein in der experimentellen Forschung zum Metabolischem Syndrom häufig verwendetes Rattenmodell ist die SHR-OB oder Koletsky-Ratte (Koletsky et al. 2003). Diese ist ein Hybrid aus der SHR und der Zuckerratte (Russell und Proctor 2006). Für die spontan hypertensiven Ratten (SHR-Ratten), einem Modell für die isolierte Hypertonie, wurde bereits nachgewiesen, dass die HPA-Achse aufgrund eines stimulierten RAAS hyperaktiv ist (Jöhren et al. 2003, Raasch et al. 2006). Wir hingegen verwendeten die Zuckerratte und imitierten die Stimulation des RAAS durch chronische Gabe von Angiotensin-II.

Die Zuckerratte ist nicht nur leptinresistent, hyperphag und adipös, sondern weist auch eine gestörte Glukosetoleranz sowie eine Hyperinsulinämie auf (Zucker und Zucker 1963, Liu et al. 2002). Im Gegensatz zu Koletsky-, SHROB-, SHR/N-cpbzw. LA/N-cp-Ratten, die einen deutlich erhöhten Blutdruck aufweisen, gilt die Zuckerratte als eher normotensiv. Hierzu ist die Datenlage jedoch diskrepant. In den von uns verwendeten Zuckerratten waren in Übereinstimmung mit anderen Studien keine Blutdruckunterschiede zwischen dem adipösen und dem schlanken Phänotyp darstellbar (Abb. 3; Levin et al. 1984, Barringer und Bunag 1989, Maher et al. 1995, Turner und White 1996, Toblli et al. 2003). Nichtsdestotrotz konnten andere Arbeiten erhöhte Blutdrücke der adipösen gegenüber der schlanken Zuckerratte nachweisen (Kurtz et al. 1989, Zemel et al. 1990, Alonso-Galicia et al. 1996, Overton et al. 2001). Im Schnitt betrug diese Erhöhung jedoch nur 6-10 mmHg und befand sich so meist im hochnormalen Bereich.

Trotz des gleichen genetischen Hintergrundes wurden in unterschiedlichen Zuchtlinien adipöser Zuckerratten Unterschiede hinsichtlich der phänotypischen Ausprägungen nachgewiesen (Diaz-silva et al. 2004). Um einen konstanten Phänotyp in allen Studienteilen gewährleisten zu können, wurden alle Zuckerratten aus der gleichen Zuchtlinie bezogen (Carles River; Zucht: USA). So konnte sichergestellt werden, dass die basalen Spiegel an Leptin und Adiponektin sowie die nüchternen Insulin- und Glukose-Spiegel in allen Studienteilen vergleichbar waren (Tab. 3-2 und 3-5; Abb. 25). Zudem waren die basalen Corticosteron- und ACTH-Konzentrationen nicht unterschiedlich in den

- 80 -

verschiedenen Kollektiven (Tab. 3-3, Abb. 19 und 24). Eine leichte Erhöhung der ungefasteten Glukose- bzw. Insulin-Konzentrationen im zweiten Studienteil lässt auf eine fortgeschrittenere Insulinresistenz dieser Zuckerratten im Vergleich zu den anderen Studienteilen schließen (Abb. 18).

Die adipösen Zuckerratten waren gegenüber den schlanken Zuckerratten HPA-Achsen-hyperreaktiv. So war nach Injektion von CRH in der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraumes sowohl die ACTH-, als auch die Corticosteron-Freisetzung adipöser Zuckerratten signifikant gegenüber den schlanken Zuckerratten erhöht (Abb. 5). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der von Plotsky et al. 1992 beschriebenen HPA-Achsen-Reaktion adipöser Zuckerratten nach CRH-Stimulation. Diese Hyperreaktivität spiegelte sich jedoch nicht, wie von anderen Autoren beschrieben, in der Erhöhung von basalen, unstimulierten ACTH- und Corticosteron-Konzentrationen wieder (Plotsky et al. 1992, Pacak et al. 1995, Livingstone et al. 2000; Tab. 3-3).

Die Wahl des Abnahmezeitpunktes scheint für diese Diskrepanz eine wichtige Rolle spielen. Wie auch beim Menschen unterliegen zu die Plasmakonzentrationen der Stresshormone bei der Ratte einer zirkadianen Rhythmik, die jedoch im Gegensatz zum Menschen um zwölf Stunden verschoben ist (Kalsbeek et al. 1996, Watts et al. 2004, Jozsa et al. 2005). Die von uns durchgeführten basalen Blutentnahmen erfolgten 4 bis 6 Stunden vor Beginn der Licht-Phase. In den diskrepanten Studien erfolgte die Bestimmung jedoch erst nach dem Beginn der Licht-Phase. In mehreren Arbeiten konnte für die adipöse Zuckerratte eine Veränderung in der zirkadianen Rhythmik von Corticosteron nachgewiesen werden. Die maximalen Corticosteron-Plasmakonzentrationen zwischen schlanken und adipösen Zuckerratten sind zwar vergleichbar, die minimalen Corticosteron-Konzentrationen sind jedoch zu Beginn der Licht-Phase in adipösen Zuckerratten signifikant höher als in schlanken Zuckerratten (Martin et al. 1978, Fletcher et al. 1986). Im Einklang mit unseren Daten waren die Corticosteron-Konzentrationen in der Arbeit von Martin et al. 1978 sechs Stunden vor Beginn der Licht-Phase zwischen schlanken und adipösen Zuckerratten gleich und wiesen erst im weiteren Verlauf einen signifikanten Unterschied auf (Tab. 3-3).

Zusammengefasst sei hier nochmals unterstrichen, dass die adipöse Zuckerratte ein adipöses, normotensives Rattenmodell darstellt, einhergehend mit einer stimulierten HPA-Reaktivität, und somit grundlegende und notwendige Eigenschaften zur Beantwortung unserer Fragestellungen der unterschiedlichen Studienteile in sich vereint.

4.2 Beeinflussung der HPA-Achsen-Reaktivität durch chronisch erhöhtes Plasma-Angiotensin-II

Die hier präsentierten Daten weisen dem Angiotensin-II im Rahmen des Metabolischen Syndroms eine entscheidende Bedeutung in der Modulation der HPA-Achsen-Reaktivität zu. In allen Studienteilen war durch die chronische Angiotensin-II-Behandlung selektiv in adipösen Zuckerratten eine HPA-Achsen Hyperreaktivität nachzuweisen (Abb. 6, 19 und 25). Diese spiegelte sich in der gesteigerten Freisetzung von Corticosteron gegenüber den Kontrollen wieder. Dies war sowohl nach endogener HPA-Achsen-Stimulation (CRH-Test und ACTH-Test, Abb. 6 und 19) als auch unter dem Stress einer Nahrungskarenz (Abb. 25) zu beobachten. Die 30 Minuten nach erzwungenem Schwimmen ermittelten Corticosteron-Konzentrationen waren nicht durch Angiotensin-II gesteigert und somit diskrepant zu den anderen Ergebnissen (Abb. 24). Nachfolgende Tests in anderen tierexperimentellen Studien weisen darauf hin, dass sich im Schwimmtest Unterschiede im Plasma-Corticosteron-Freisetzung unter Angiotensin-II in diesem Versuch durch die einmalige Abnahme maskiert sein (Abb. 25).

Für die Angiotensin-II-induzierte Steigerung der HPA-Achsen-Reaktiviät scheint also die Leptinresistenz essentiell zu sein, da selektiv in den adipösen Zuckerratten diese Reaktivitätssteigerung zu beobachten war (Abb. 6). Somit kann von einem Synergismus zwischen einer Leptinresistenz und Angiotensin-II auf die HPA-Achsen-Reaktivität ausgegangen werden. Diese postulierte Abhängigkeit der Interaktion von RAAS und HPA-Achse von einer Leptinresistenz konnte schon für andere isolierte Symptome des Metabolischen Syndroms beschrieben werden. So kommt es nur in Verbindung mit einer Hypertonie in spontan hypertensiven Ratten (SHR-Ratten) zur Beeinflussung der HPA-Achsen-Reaktivität durch das RAAS (Jöhren et al. 2003, Raasch et al. 2006). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die HPA-Achsen-Sensitivität entscheidend durch einen Bluthochdruck gesteigert wird und dies auf einen Angiotensin-II vermittelten Effekt zurückzuführen ist.

In den hier gezeigten Versuchen ging die Angiotensin-II-induzierte Steigerung der Corticosteron-Freisetzung nicht mit einer gleichsam gesteigerten Ausschüttung von ACTH einher (Abb. 6A bis D). Diese selektive Erhöhung der Corticosteron-Freisetzung weist auf eine gesteigerte Reaktivität der Nebenniere auf ACTH und somit auf einen Nebennieren-abhängigen Mechanismus hin. Um der Frage einer gesteigerten Sensitivität der Nebenniere auf ACTH nachzugehen, wurde ein ACTH-Stimulations-Test durchgeführt. Nach intravenöser Gabe von ACTH erhöhte sich die Corticosteron-Feisetzung in chronisch mit Angiotensin-II behandelten Zuckerraten, was eindrucksvoll die Sensitivierung der Nebenniere demonstriert (Abb. 19A).

Es stellt sich dem zufolge die weitergehende Frage, über welche Mechanismen Angiotensin-II in der Lage ist, die ACTH-induzierte Corticosteron-Freisetzung aus den Nebennieren zu verstärken. Angiotensin-II ist als Modulator der HPA-Achse beschrieben. Für diese Modulation kommt der Expression von AT-Rezeptoren und deren unterschiedlichen Regulation in den Organen der HPA-Achse eine entscheidende Rolle zu (Castren und Saavedra 1988, Aguilera et al. 1995, Leong et al. 2002, Jöhren et al. 2003). Unter der chronischen Angiotensin-II-Behandlung die mRNA-Konzentrationen der AT₁-Rezeptoren selektiv in den waren Nebennieren erhöht, was auf eine gesteigerte Expression der AT₁-Rezeptoren hindeutet (Abb. 9). Für die Modulation der Corticosteron-Freisetzung werden vor allem die AT_{1A}-Rezeptoren verantwortlich gemacht, während die AT_{1B}-Rezeptoren, die ausschließlich in der Zona Glumerulosa exprimiert werden, die Aldosteron-Synthese vermitteln (Naruse et al. 1998). Die AT_{1A}-Rezeptoren waren in den adipösen Zuckerratten unter der chronischen Angiotensin-II-Gabe erhöht (Abb. 9). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden, die eine Hochregulation von

- 83 -

AT₁-Rezeptoren durch Angiotensin-II in den Nebennieren nachweisen konnten (Hauger et al. 1978, Harrison-Bernard et al. 1999).

Zusätzlich waren in den Angiotensin-II behandelten, adipösen Zuckerratten die MC2-Rezeptor-mRNA-Konzentrationen in den Nebennieren tendenziell erhöht (Abb. 12). Der MC2-Rezeptor stellt einen selektiven ACTH-Rezeptor dar, der die ACTH-induzierte Corticosteron-Synthese vermittelt (Boston und Cone 1996). Die gleichsinnige Regulation von AT₁- und MC2-Rezeptoren konnte auch in menschlichen Nebennierentumoren nachgewiesen werden (Schubert et al. 2001). Im Gegensatz zu den adipösen Zuckerratten weisen die schlanken Zuckerratten eine gleichzeitige "down"-Regulation der AT_{1A}- und MC2-Rezeptoren in den Nebennieren auf. Diese verminderte Expression kann somit für die unveränderte ACTH-Sensitivität der Nebenniere unter der Angiotensin-II-Behandlung in schlanken Zuckerratten verantwortlich gemacht werden. Dieser Regelkreis scheint in den leptinresistenten Zuckerratten aufgehoben zu sein, so dass eine chronische Angiotensin-II-Behandlung zur beobachteten Sensitivierung der Nebenniere gegenüber ACTH führt. Angiotensin-II korrelierte jedoch in früheren Arbeiten mit den mRNA-Spiegeln des MC2-Rezeptors positiv in menschlichen Nebennierenrinden-Zellen (Lebrethon et al. 1994) und steht somit in Diskrepanz verminderten MC2-Rezeptor-mRNA-Konzentrationen zu in schlanken Zuckerratten. Ob die gesteigerte ACTH-Sensitivität der adipösen Ratten auf eine unterdrückte Gegenregulation zurückzuführen ist, konnte anhand dieses Studiendesigns nicht geklärt werden.

Neben den AT₁- und MC2-Rezeptoren spielen weitere Proteine eine wichtige Rolle für die basale, aber vor allem für die akute Regulation der Steroid-Biosyntese. Corticosteron sowie Aldosteron unterliegen einer direkten und bedarfsbezogenen Synthese ohne Speicherung (Trost und Müller 1976), wodurch die Synthese bei kurzfristig erhöhtem Bedarf sehr schnell reguliert werden muss. Daher unterliegen die geschwindigkeitsbestimmenden Proteine einer schnellen Regulation auf mRNA- sowie Protein-Ebene (Clark et al. 1995, Peters et al. 1998, Rucinski et al. 2008). Zu diesen gehören das Steroidogenic-Akute-Regulatory-Protein (StAR) sowie das CYP11B1 bzw. CYP11B2. StAR als Mitochondrien-membranständiger Cholesterol-Transporter ist für die Bereitstellung des Cholesterols als Ausgangsverbindung der Steroid-Biosynthese verantwortlich und steht am Anfang einer mehrstufigen Enzymkaskade, an deren Ende über CYP11B1 Corticosteron bzw. über CYP11B2 Aldosteron gebildet wird. Sowohl StAR als auch CYP11B1 bzw. CYP11B2 werden unter anderem durch ACTH und Angiotensin-II reguliert (Kakiki et al. 1997, Rainey 1999, Bassett et al. 2002, Ye et al. 2003, Bassett et al. 2004). Die CYP11B1- als auch die CYP11B2-mRNA-Konzentrationen waren selektiv in adipösen Zuckerratten gesteigert, während sich die Konzentrationen in den schlanken Zuckerratten tendenziell reduzierten (Abb. 13), was sich funktionell auf die gesteigerte Corticosteron-Freisetzung ausgewirkt haben könnte.

Die basalen mRNA-Spiegel von StAR wurden weder in adipösen noch in schlanken Zuckerratten durch die chronische Angiotensin-II-Behandlung in der mRNA-Expression beeinflusst. Jedoch wiesen leptinresistente Zuckerratten eine generell erhöhte StAR-Expression auf (Abb. 12B). Leptin ist in der Lage, die StAR-Expression unter einer akuten Stimulation mit ACTH zu reduzieren (Cherradi et al. 2001, Salzmann et al. 2004) und weist so auf einen wichtigen regulierenden Effekt des Leptins hinsichtlich der StAR-Expression hin. Die über den Leptin-Rezeptordefekt hervorgerufene Unfähigkeit des Leptins, in adipösen Zuckerratten stAR zu reduzieren, kann somit die generell erhöhte StAR-Expression erklären, aber auch ein Anhaltspunkt für die gesteigerte ACTH-Aktivität an den Nebennieren sein. Inwieweit die Leptinresistenz auf die akute Regulation der StAR-Expression Einfluss nimmt, muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

4.3 Beeinflussung der Glukoseutilisation durch die gesteigerte HPA-Achsen-Reaktivität

Die selektiv in den adipösen Zuckerratten nachweisbare gesteigerte HPA-Achsen-Reaktivität unter der 4-wöchigen Angiotensin-II-Behandlung ging mit einer verschlechterten Glukoseutilisation einher. So war im CRH-Test die Plasmaglukose parallel zu den gesteigerten Corticosteron-Konzentrationen erhöht und wies einen deutlich biphasischen Verlauf auf. Der zweite "Peak" ist mit seinem Maximum deutlich vom maximalen Corticosteron-Plasmaspiegel zu differenzieren

und muss hauptsächlich für die Erhöhung der Plasmaglukose in der integrativen Auswertung (AUC) verantwortlich gemacht werden (Abb. 6C-F und 7).

Glukocorticoide stellen effektive Stimulatoren der Glukoneogenese dar und übernehmen so eine wichtige Rolle in der Glukosehomöostase unter einem Stressreiz (Exton 1979). Unter einer erhöhten Corticosteron-Plasmakonzentration werden in der Leber wichtige Enzyme für die Glukoneogenese wie die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), die Glukose-6-Phosphatase und die Fruktose-2,6-Bisphosphatase in der Expression gesteigert. Hinzu kommt eine verminderte Aufnahme von Glukose in Muskel- und Fettzellen. Diese eher langsam ablaufenden Vorgänge können somit für den zweiten "Peak" im Glukoseverlauf verantwortlich sein. Durch die zeitliche Abfolge des Corticosteron-Anstiegs und den zweiten Anstieg der Plasmaglukose im CRH-Test wird diese Annahme gestützt (Abb. 6D und F). Darüber hinaus ist der Quotient aus AUC_{Corticosteron} und AUC_{Glukose} sowohl vom Phänotyp als auch von der Angiotensin-II-Behandlung unabhängig. Diese Unabhängigkeit spricht für einen direkten Einfluss der gesteigerten Corticosteron-Freisetzung auf die Plasma-Glukose (Abb. 7). In Übereinstimmung konnte hiermit in SHR-Ratten gezeigt werden, dass nach AT₁-Blockade nicht nur die CRH-induzierte Corticosteron-Freisetzung, sondern auch der CRH-induzierte Plasmaglukose-Anstieg vermindert war (Raasch et al. 2006).

Die nur auf die adipösen Zuckerratten beschränkten Einflüsse von Angiotensin-II auf den stressbezogenen Glukosestoffwechsel lassen den Schluss zu, dass eine chronisch erhöhte RAAS-Aktivität erst im Zusammenspiel mit weiteren pathologischen Veränderungen im Rahmen des Metabolischen Syndroms zu einer Stoffwechselentgleisung führt. Dies bestätigt Berichte, die in ZDF-Ratten (Zucker-Diabetes-fatty-Rats) unter einer AT₁-Blockade eine Reduktion der Glukose-Spiegel unter einer Glukosebelastung nachweisen (Tikellis et al. 2004).

Zur näheren Charakterisierung der Glukosehomöostase wurde nach der 4wöchigen Angiotensin-II-Behandlung ein oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT) durchgeführt. In Folge der Angiotensin-II-Behandlung war in adipösen Zuckerratten die Glukose-Antwort auf die Glukosebelastung gesteigert (Abb. 8 und 26). Schlanke Zuckerratten wiesen nur kleine Effekte unter der chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf (Abb. 8). Dies steht im Widerspruch zu Versuchen, in denen bei gesunden Probanden unter einer akuten Angiotensin-II-Gabe erhöhte Glukose-Antworten nachgewiesen werden konnten (Fliser et al. 1997). Die erhöhte Glukose-Antwort der Angiotensin-II-behandelten, adipösen Zuckerratten im OGTT gingen mit einer gesteigerten Corticosteron-Freisetzung einher (Abb. 8F und 27). Dies deutet auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Glukose und Corticosteron unter einer Glukose-Belastung hin und findet Bestätigung in Arbeiten von Reynolds et al. (2001, 2003).

Zur weiteren Aufklärung der funktionelen Bedeutung der Nebennieren an der HPA-Hyperreaktivität und der damit verbundenen Störung der Glukose-Versuche Homöostase wurden nach Adrenalektomie durchgeführt. In Ubereinstimmung mit unserer Hypothese führte eine bilaterale Adrenalektomie unter Angiotensin-II-Behandlung zu einer normalen Glukoseutilisation bei ausbleibender Corticosteron-Freisetzung. Gegenüber den Kochsalz-behandelten Zuckerratten kam es sogar zu einer tendenziellen Reduktion der maximalen Glukose-Konzentrationen (Abb. 26). Somit konnte eindrucksvoll die Abhängigkeit des verschlechterten Glukose-Stoffwechsels von der Angiotensin-II-stimulierten HPA-Achsen-Reaktivität nachgewiesen werden.

Neben der postulierten Glukoneogenese scheint die Corticosteron-abhängige Insulin-Sekretion entscheidend an der Beeinflussung der Plasmaglukose beteiligt zu sein. Glukocorticoide konnten schon früher als potente Inhibitoren der Insulinsekretion beschrieben werden. Sowohl in vitro als auch in vivo kommt es unter Erhöhung von Glukocorticoiden zu einer verminderten Insulin-Freisetzung nach Glukose-Stimulus (Barseghian und Levine 1980, Barseghian et al. 1982, Odio und Brodish 1990, Lambillotte et al. 1997). In Übereinstimmung damit waren sowohl im CRH-Test als auch im OGTT einhergehend mit der erhöhten Corticosteron-Freisetzung in Angiotensin-II-behandelten, adipösen Zuckerratten die Insulin-Antworten reduziert (Abb. 6, 8 und 26). Diskrepant zu diesen Ergebnissen sind Befunde von Freedman et al., die reduzierte Insulinwerte in Corticosteron-defizienten, adipösen Zuckerratten zeigten. Allerdings normalisierten sich die Insulin-Konzentrationen durch eine Corticosteron-Substitution wieder (Freedman et al. 1986). So waren im Einklang mit Freedman et al. in unseren Versuchen an adrenalektomierten Ratten unter der Substitution

- 87 -

mit Corticosteron keine Unterschiede in den basalen Corticosteron-, Insulin- oder Glukose-Plasmakonzentrationen zwischen den Kochsalz-behandelten, scheinoperierten und Kochsalz-behandelten, adrenalektomierten Zuckerratten nachzuweisen (Abb. 23). Erst nach Stimulation der Corticosteron-Freisetzung durch z.B. Stress stellten sich Unterschiede ein. In Übereinstimmung mit der Literatur erhöhten sich die Corticosteron-Konzentrationen in adipösen. scheinoperierten Zuckerratten unter einem Futterentzug (Timofeeva und Richard 1997; Makimura et al. 2003). Angiotensin-II wirkte auch hier in den scheinoperierten Zuckerratten stimulierend auf die Corticosteron-Freisetzung (Abb. 25). Dies war jedoch nur in der Tendenz mit einer reduzierten nüchternen Insulin-Konzentration verbunden. Der in adrenalektomierten Zuckerratten ausbleibende inhibierende Effekt erhöhter Corticosteron-Konzentrationen war mit einer Verdoppelung der Nüchtern-Insulin-Spiegel verbunden und unterstreicht somit nochmals die Bedeutung von Corticosteron auf die Insulin-Freisetzung (Abb. 25). Auch nach der Glukose-Belastung blieben im OGTT die Insulinspiegel gegenüber den scheinoperierten Zuckerratten erhöht. Unter der chronischen Angiotensin-II-Behandlung waren die Insulin-Spiegel von adrenalektomierten Zuckerratten gegenüber der Kochsalz-Behandlung nicht signifikant reduziert (Abb. 26). Dies weist auf eine eher untergeordnete Rolle direkter Angiotensin-II-Effekte im OGTT bei Ratten mit chronischer Angiotensin-II-Behandlung hin. Im Gegensatz zu unseren Daten konnten Chu et al. (2006) eine deutlich reduzierte Insulin-Freisetzung aus isoliertem Pankreas nach einer allerdings akuten Gabe von Angiotensin-II nachweisen. Dies findet Bestätigung in Arbeiten von Lau et al. (2004) und Ramracheya et al. (2006). Dass eine Angiotensin-II-vermittelte reduzierte Insulin-Freisetzung unter der akuten Gabe von Angiotensin-II durchaus bedeutsam sein kann, konnten eigene Vorversuche zeigen (Daten nicht dargestellt). In diesen waren die Plasma-Glukose-Konzentrationen in Ratten nach akuter Gabe von Angiotensin-II transient erhöht und reduzierten sich binnen 30 Minuten wieder auf das Ausgangsniveau.

So scheint es für die Wirksamkeit von Angiotensin-II hinsichtlich der Glukosehomöostase von erheblicher Wichtigkeit zu sein, ob Angiotensin-II chronisch oder akut gegeben wird. Dieser Zusammenhang scheint insbesondere bei der Beobachtung der basalen Werte relevant zu sein. In allen adipösen

- 88 -

Zuckerratten waren nach der chronischen Angiotensin-II-Behandlung die basalen Insulin-Konzentrationen vermindert. Entgegen der Erwartungen aus den akuten Versuchen ging diese Reduktion nicht mit einer gesteigerten Plasma-Glukose einher. Vielmehr waren auch die basalen Glukose-Konzentrationen signifikant reduziert (Abb. 22).

Für Angiotensin-II ist bekannt, dass es in Fettzellen den Insulin-induzierten Einbau des Glukosetransporters 4 (GLUT 4) aus dem Zytoplasma in die Zellmembran erhöht und damit die Aufnahme von Glukose in die Fettzelle steigert (Juan et al. 2005). Somit ist Angiotensin-II Insulin-sensitivierend wirksam. Die konstant über 3 Monate reduzierten basalen Glukose- und Insulin-Plasmakonzentrationen wiesen unter der chronischen Angiotensin-II-Gabe auch auf eine Insulinsensitivierung der adipösen Zuckerratten hin (Abb. 18). Die Ergebnisse des OGTT in adrenalektomierten, Angiotensin-II-behandelten Zuckerratten unterstützen diese These. In diesen Ratten war unter der statistischen Auswertung mittels einer 2seitigen ANOVA sowohl Glukose als auch Insulin gegenüber den adrenalektomierten Kontrollen tendenziell reduziert. Unter einseitiger statistischer Berechnung mittels eines t-Tests innerhalb des adipösen Kollektivs erwies sich dieser Effekt auch als statistisch signifikant (Abb. 26). So kann man aus diesen Daten schließen, dass die basal gesteigerte Insulinsensitivität für die basal reduzierten Insulin- und Glukose-Konzentrationen verantwortlich gemacht werden kann. Diese wird jedoch nach der Stimulation der Corticosteron-Freisetzung durch die Angiotensin-II-induzierte HPA-Achsen-Hyperreaktivität maskiert.

Unter der 3-monatigen Angiotensin-II-Behandlung adipöser Zuckerratten konnte keine Verschlechterung der Glukose- bzw. Insulin-Antwort im OGTT mehr nachgewiesen werden, während die Angiotensin-II-induzierte Steigerung der Corticosteron-Freisetzung bestehen blieb (Abb. 20). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der OGTTs nach vier-wöchiger Angiotensin-II-Behandlung. Der dort in Übereinstimmung mit Raynolds et al. (2001 und 2003) beobachtete Zusammenhang zwischen den Glukose- und Corticosteron-Antworten nach Glukose-Belastung war nach drei-monatiger Angiotensin-II-Behandlung somit aufgehoben. Bestärkt wird dieses Ergebnis durch die unveränderten Glukose-Verläufe nach ACTH-Stimulation. Auch in diesem Test

war trotz gesteigerter Corticosteron-Freisetzung unter Angiotensin-II-Behandlung keine Beeinflussung der Glukose-Antwort zu beobachten (Abb. 19).

Somit muss eine physiologische Adaption an die Corticosteron-induzierte Verschlechterung der Glukose-Verstoffwechselung postuliert werden. Aufgrund dieser Befunde sowie der unveränderten Adiponektin-, Leptin- als auch der konstant reduzierten, basalen Glukose- und Insulin-Spiegel nach drei monatiger Angiotensin-II-Behandlung (Tab. 3-5) konnte die Hypothese, dass eine Angiotensin-II-induzierte HPA-Achsen-Sensitivierung allein einen prädiabetischen Zustand in einen Typ2-Diabetes umzuwandeln vermag, nicht bestätigt werden. Somit müssen für die Entstehung eines Diabetes weitere Faktoren, wie z.B. ein chronischer Stressreiz oder Bluthochdruck hinzukommen.

4.4 Regulation des Körpergewichts unter der chronischen Angiotensin-II-Behandlung

Die von uns beobachtete Insulinsensitivierung durch Angiotensin-II ist verbunden mit einer deutlichen Reduktion des Körpergewichts. Durch die chronische Gabe von Angotensin-II wurde das Körpergewicht in allen Studienteilen reduziert (Abb. 1, 14 und 21). Es ist bekannt, dass eine Reduktion des Körpergewichts mit einer verbesserten Insulin-Sensitivität einhergeht (Petersen et al. 2005, Viljanen et al. 2009). Somit kann die basal beobachtete, verbesserte Insulin-Sensitivität unter der Angiotensin-II-Behandlung möglicherweise der Gewichtsreduktion zugeschrieben werden.

Die Gewichtsreduktion war mit einer reduzierten Nahrungsaufnahme der adipösen Zuckerratten verbunden (Abb. 2A, 17A und 22A). Für die schlanken Zuckerratten war kein Einfluss von Angiotensin-II auf die Futteraufnahme nachweisbar. Da in adipösen Zuckerratten die Reduktion der Futteraufnahme direkt zu Beginn der Angiotensin-II-Behandlung einsetzte und sich im weiteren Verlauf wieder normalisierte, kann von einer schnelleren Adaption der schlanken Ratten ausgegangen werden. Weitere Hinweise auf eine Adaption bestehen zum einen im Nachlassen des futterreduzierenden Effekts nach einem Pumpenwechsel (Abb.

17A) und zum anderen in der Normalisierung der durchschnittlichen Gewichtszunahme nach etwa 7 Tagen (Tab. 3-1 und 3-6).

Die vermutete, schnellere Adaption des Fressverhaltens schlanker Zuckerratten auf den Angiotensin-II-Stimulus kann auf eine Reduktion der Plasma-Leptin-Konzentration zurückzuführen sein. Leptin als wichtiges Zytokin des Fettgewebes ist ein starker Regulator der Nahrungsaufnahme. Eine Erniedrigung der Leptin-Konzentration bedingt eine gesteigerte Nahrungsaufnahme. Während sich in adipösen Zuckerratten die Leptin-Konzentrationen nicht durch Angiotensin-II veränderten, reduzierte die Angiotensin-II-Behandlung die Leptin-Konzentrationen in schlanken Zuckerratten (Tab. 3-2). Im Einklang mit unseren Daten wiesen schlanke Ratten, die chronisch mit vergleichbaren Dosen an Angiotensin-II behandelt wurden, ebenfalls eine Reduktion der Leptin-Spiegel auf (Cassis et al. Umkehrschluss ist die AT₁-Blockade 1998). Im mit erhöhten Leptin-Konzentrationen verbunden (Clasen et al. 2005, Chujo et al. 2007). In adipösen Zuckerratten scheint die reflektorische Erhöhung der Leptin-Konzentrationen aufgrund der Leptinresistenz eine Erniedrigung von Leptin zu maskieren.

Schlanke Zuckerratten sind somit im Gegensatz zu den leptinresistenten adipösen Zuckerratten in der Lage, ihre Futteraufnahme über eine Angiotensin-II-induzierte Reduktion der Leptin-Konzentrationen schneller zu normalisieren und so einer Erniedrigung des Körpergewichtes entgegenzuwirken. Hierfür spricht die tendenziell erhöhte Gewichtszunahme von schlanken Zuckerratten unter Angiotensin-II (Tab. 3-1).

Für die chronische Angiotensin-II-Behandlung ist im Einklang mit unseren Daten bekannt, dass es zur Reduktion des Körpergewichtes kommt (Beck et al. 1985, Kabour et al. 1995, Li et al. 1998). Die genauen Mechanismen sind noch nicht in Gänze geklärt. Der Großteil des Gewichtsverlustes scheint jedoch über eine AT₁-Rezeptor vermittelte Reduktion der Nahrungsaufnahme bedingt zu sein (Brink et al. 1996, Cassis et al. 1998, Cassis et al. 2002). Cassis et al. konnten 1998 zusätzlich eine erhöhte Hauttemperatur von chronisch mit Angiotensin-II behandelten Ratten nachweisen, was eine stärkere Energie-Abgabe durch Wärme impliziert. Bestärkt werden diese Daten durch eine Stimulation der UCP1-mRNA-Spiegel im braunen Fettgewebe nach einer icv-Gabe von Angiotensin-II (Matthias et al. 2000, Porter und Potratz 2004). UCP1 gilt als Marker für den Energieumsatz im braunen Fettgewebe. Angiotensin-II ist als Aktivator des symphathischen Nervensystems beschrieben und ist so in der Lage, die Noradrenalin-induzierte UCP1-Expression im braunen Fettgewebe zu stimulieren (English und Cassis 1999, Porter et al. 2003, Porter und Potratz 2004). Einhergehend waren in adipösen Zuckerratten die Noradrenalin-Spiegel signifikant und in den schlanken Zuckerratten nur in der Tendenz unter der chronischen Angiotensin-II-Behandlung erhöht (Tab. 3-2). Diskrepant zu den erhöhten Noradrenalin-Spiegeln konnten Henegar et al. (1995) keine Stimulation des Plasma-Notradrenalins nach Gabe von Angiotensin-II nachweisen. Sicher scheint jedoch, dass die Beeinflussung des Körpergewichtes hauptsächlich auf einen AT₁-Rezeptor vermittelten Effekt zurückzuführen ist. (Brink et al. 1996, Cassis et al. 1998). Eine zusätzlich Beeinflussung der Nahrungsreduktion durch einen gesteigerten Blutdruck konnte in diesen Arbeiten ausgeschlossen werden (Brink et al. 1996, Cassis et al. 1998).

4.5 Aldosteron und Blutdruck

Wie eingangs schon beschrieben, waren die Blutdrücke der schlanken und adipösen Zuckerratten gleich. Durch die chronische Angiotensin-II-Behandlung waren die Angiotensin-II-Plasmakonzentrationen in schlanken und adipösen Zuckerratten erhöht (Abb. 3), was auf eine vergleichbare, Fettmassenunabhängige Aufnahme des Angiotensin-II in beiden Phänotypen schließen lässt (Abb. 4A), zumal das Blutvolumen zwischen schlanken und adipösen Zuckerratten nicht unterschiedlich ist (Schreihofer et al. 2005). Die Plasma-Konzentration von Literatur Angiotensin-II entsprach dabei den in der beschriebenen Plasmakonzentrationen für vergleichbare Behandlungen und befindet sich im Rahmen pathophysiologisch relevanter Konzentrationen (Staroukine et al. 1984, Pedersen et al. 1986, Cassis et al. 1998). Überraschenderweise war der Angiotensin-II-induzierte Blutdruckanstieg trotz der vergleichbaren Plasmakonzentration an Angiotensin-II in adipösen Zuckerratten um etwa 50 mmHg höher als in den schlanken Zuckerratten (Abb. 3A). In der Konsequenz war auch das linksventrikuläre Gewicht in den adipösen Zuckerratten unter der

Angiotensin-II-Behandlung erhöht (Abb. 3C). Diese Beobachtung bestätigt Ergebnisse, die eine gesteigerte Sensitivität der adipösen Zuckerratte gegenüber Bolus-Gaben von Angiotensin-II, aber auch gegenüber AT₁-Blockern aufweisen (Alonso-Galicia et al. 1996). Als Mechanismen werden vor allem eine vermehrte Natrium- und Wasserretention der adipösen Zuckerratte genannt (Becker et al. 2003, Hakam und Hussain 2005, Shah und Hussain 2006).

Der unter Angiotensin-II gesteigerte Blutdruck in adipösen Zuckerratten war einhergehend mit gesteigerten Aldosteron-Plasmakonzentrationen, was eine bedeutende Beteiligung von Aldosteron an der Blutdruckregulation nahe legt. Die adipösen Zuckerratten reagierten trotz vergleichbarer Angiotensin-II-Plasmakonzentrationen mit etwa 6-fach gesteigerten Aldosteron-Konzentrationen gegenüber den schlanken Ratten (Abb. 4). Für Aldosteron ist bekannt, dass es unter anderem über die gesteigerte Rückresorption von Natrium und Wasser den Blutdruck erhöht. Dass die Angiotensin-II-induzierte Aldosteron-Freisetzung an der gesteigerten Blutdruckantwort entscheidend beteiligt ist, konnte in den adrenalektomierten Zuckerratten gezeigt werden. So normalisierten sich in adrenalektomierten adipösen Zuckerratten sowohl die Blutdruckantwort als auch das linksventrikuläre Gewicht auf chronischen Angiotensin-II-Stimulus hin (Tab. 3-7). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte an adipösen Zuckerratten unter einer Hoch-Salz-Diät eine gesteigerte Blutdruckantwort nach Aldosteron-Infusion nachgewiesen werden (Riazi et al. 2006). Allerdings war diese gesteigerte Blutdruckantwort nicht per se auf unterschiedliche Aldosteronspiegel zurückzuführen. Riazi et al. diskutieren als verantwortlichen Mechanismus eine erhöhte Aldosteronsensitivität, nämlich eine gesteigerte Expression des Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporters und des epithelialen Natrium-Kanals in der Nierenrinde (Riazi et al. 2006). Zusätzlich zu dieser beobachteten Sensitivierung der Nierenrinde in adipösen Zuckerratten kommt also ein potenzierender Faktor durch die von uns beobachtete Aldosteron-Konzentrations-Erhöhung hinzu.

Adipöse Patienten reagieren auf eine Angiotensin-II-Infusion in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen mit einer gesteigerten Aldosteron-Antwort (Bentley-Lewis et al. 2007). Diese Daten und die enge Korrelation zwischen Körpergewicht und Plasma-Aldosteron-Konzentration weisen auf eine gesteigerte Synthese von Aldosteron in adipösen Individuen hin (Lamounier-Zepter et al. 2005, Krug und

- 93 -

Ehrhart-Bornstein 2008). Angiotensin-II stimuliert über einen AT₁-Rezeptor vermittelten Mechanismus die Synthese von Aldosteron in der Zona Glumerulosa der Nebenniere (Brown et al. 1979, Hilbers et al. 1999, Ye et al. 2003, Bassett et al. 2004). In Ratten sind sowohl AT_{1A}- als auch AT_{1B}-Rezeptoren an der Aldosteron-Synthese beteiligt (Naruse et al. 1998). Durch die chronische Angiotensin-II-Behandlung adipöser Zuckerratten waren die AT_{1A}-Rezeptoren der Nebennieren leicht und die AT_{1B}-Rezeptoren deutlich in den mRNA-Konzentrationen erhöht (Abb. 9). In schlanken Zuckerratten waren die AT_{1A}-Rezeptoren in Übereinstimmung mit Literaturberichten herabreguliert (Ishihata et al. 1998). Die doch deutliche Erhöhung der AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Konzentrationen in den Angiotensin-II-behandelten, adipösen Zuckerratten kann selektive Hypertrophie der Zona Glumerulosa dieser Ratten auf die zurückzuführen sein (Abb. 10), da der AT_{1B}-Rezeptor selektive in der Zona Glumerulosa exprimirt wird (Gasc et al. 1994, Jöhren et al. 2003). Eine enge Korrelation zwischen AT_{1B}-Rezeptor und Aldosteron-Konzentration weist dem AT_{1B}-Rezeptor hier die entscheidende Rolle zu. Im Widerspruch dazu war in AT_{1B}-Rezeptor-defizienten Mäusen kein Unterschied im Aldosteron oder Blutdruck gegenüber dem Wildtyp nachzuweisen (Chen et al. 1997), da AT_{1A}-Rezeptoren die AT_{1B}-rezeptorabhängige Regulation der Aldosteron-Freisetzung übernehmen.

Die Synthese-Kapazität der Nebennieren für Aldosteron ist vor allem über die Transkription von StAR und der Aldosteronsynthase (CYP11B2) reguliert (Bird et al. 1993, Kakiki et al. 1997, Peters et al. 1998, Rainey 1999, Bassett et al. 2002, Ye et al. 2003, Bassett et al. 2004). Angiotensin-II führte in adipösen Zuckerratten zu einer erhöhten Konzentration an CYP11B2-mRNA, während die StAR-mRNA unbeeinflusst blieb (Abb. 12 und 13). StAR scheint somit eine untergeordnete Rolle in der basalen Aldosteron-Synthese zu spielen und bestärkt damit von Nogueira et al. (2007) postulierte Unterschiede zwischen der akuten und der chronischen Stimulation von Steroiden. Die akute Synthese der Steroide ist demnach vor allem über die StAR-regulierte Bereitstellung von Cholesterol reguliert, während bei chronisch erhöhter Synthese eher die steroidbildenden Enzyme die größere Bedeutung einnehmen (Bassett et al. 2004).

Diese Ergebnisse weisen somit dem Aldosteron eine zentrale Bedeutung in der Blutdruckregulation adipöser Individuen zu, so dass eine Hypertonie-Therapie mit Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten aber auch AT-Blockern für adipöse Patienten von Vorteil wäre, zumal eine Adipositas mit einer gesteigerten Aktivität des RAAS-Systems im Fettgewebe einhergeht (Giacchetti et al. 2000, Boustany et al. 2004, Engeli et al. 2005). Gestützt wird diese Vermutung zum einen durch eine Minderung der Adipositas-induzierten Hypertonie in Hunden mit einer diätinduzierten Adipositas (de Paula et al. 2004), sowie zum anderen durch den Rückgang der Adipositas-assoziierten Hypertonie in Ratten unter einer Telmisartan-Behandlung (Boustany et al. 2005). Welcher Fettgewebs-assoziierter Faktor schlussendlich die erhöhten Aldosteron-Werte bedingt, ist bis dato ungeklärt und ist Gegenstand andauernder Versuche.

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, wie entscheidend das RAAS in die Regulation hormoneller und metabolischer Veränderungen im Rahmen einer Leptinresistenz involviert ist. Die selektive, Angiotensin-II bedingte Stress-Sensitivität in den leptinresistenten Zuckerratten und die damit verbundene Verschlechterung der Glukoseutilisation kann somit einen weiteren Ansatz für die protektive Wirkung einer RAAS-Blockade in der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes darstellen, zumal eine selektive Reduktion der Corticosteron-Freisetzung unter AT₁-Blockade in hypertensiven Ratten und diabetischen Patienten nachgewiesen werden konnte (Raasch et al. 2006, Pavlatou et al. 2008).

Der Vorteil des in dieser Arbeit gewählten Tiermodells war die nachgewiesene, reproduzierbare Leptinresistenz. Diese beruht allerdings auf einem genetischen Defekt im Leptin-Rezeptor, ist also aus Patientensicht von untergeordneter Bedeutung. So muss Ziel weiterführender Studien sein, nachzuprüfen, ob die von uns gezeigten Interaktionen zwischen RAAS, HPA-Achse und Glukoseutilisation auch in einem pathophysiologisch relevanten Tiermodell reproduzierbar sind und ob diese Interaktionen auch therapeutisch relevant sind. Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe durch Fütterungsversuche mit einer hochkalorischen Cafeteria-Diät ein Ratten-Modell entwickelt, das leptinresistent, insulinresistent, hyperphag, adipös, hyperlipidämisch und hypertensiv ist, also alle Symptome des Metabolischen Syndroms besitzt (Miesel et al. 2009; in revision). Diese Ratte gleicht also vielmehr dem klinisch auffälligen Patienten und die beobachteten pathophysiologischen Symptome sind weniger auf genetische Ursachen als vielmehr auf das Ungleichgewicht zwischen Kalorienaufnahme und Energieverbrauch zurückzuführen.

Basierend auf diesem Tiermodell haben wir bereits weiterführende Therapiestudien mit zwei unterschiedlichen AT₁-Antagonisten durchgeführt mit der Fragestellung:

- Wird in diesem Tiermodell durch die chronische Gabe von AT₁-Antagonisten nicht nur der Blutdruck effektiv gesenkt sondern auch die Insulinresistenz verbessert und welche Rolle spielt hierbei die Interaktion zwischen RAAS und HPA-Achse?
- 2.) Kann durch die chronische Gabe von AT₁-Antagonisten die Nahrungsaufnahme und die Gewichtsentwicklung beeinflusst werden?
- 3.) Welche Rolle spielt hierbei die PPARγ-agonistische Eigenschaft von bestimmten AT₁-Antagonisten?

Da diese Versuche bis dato noch nicht beendet sind, fanden die Ergebnisse keinen Eingang in die vorgelegte Dissertationsschrift. Allerdings bestätigen die bisher erhobenen Daten die Befunde der hier vorgestellten Studien, da durch die therapeutische Gabe von AT₁-Antagonisten der Blutdruck normalisiert, die Insulinresistenz verbessert, die Stresssensitivität vermindert und das Körpergewicht normalisiert wurde, obwohl die Kalorienzufuhr erhöht blieb.

5 Zusammenfassung

Das Metabolische Syndrom mit den Symptomen Bluthochdruck, Adipositas, Insulinresistenz und Hyperlipädimie ist mit einer gesteigerten Reaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse als auch mit einem gesteigerten Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) vergesellschaftet. So wird diskutiert, dass die Modulation der HPA-Achsen-Reaktivität durch das RAAS funktionell für die Regulation der Glukosehomöostase relevant ist. Daher galt es zu untersuchen, ob adipöse Ratten unter chronisch erhöhtem Angiotensin-II (ANG) eine gesteigerte HPA-Achsen-Reaktivität aufweisen und ob diese Hyperreaktivität für eine verschlechterte Glukosehomöostase verantwortlich gemacht werden kann.

Als Tiermodell dienten adipöse Zuckerratten, die chronisch mit ANG behandelt wurden. Funktionell wurden die Tiere hinsichtlich Blutdruck, Stressreaktivität (mittels CRH-, ACTH-, Schwimmtest und Nahrungsentzug) und Glukoseutilisation (mittels oralem Glukose-Toleranz-Test, OGTT) charakterisiert. Die Bedeutung der Nebennieren (NN) für die Interaktion des RAAS mit der HPA-Achse und deren Auswirkung auf die Glukosehomöostase wurde an adrenalektomierten Ratten untersucht.

Die Reaktivität der HPA-Achse war per se in adipösen Ratten erhöht und zudem durch ANG selektiv in diesen Tieren gesteigert. Die ANG-stimulierte HPA-Achsen-Reaktivität in adipösen Ratten war funktionell auf einen adrenalen Mechanismus zurückzuführen, da zum einen die gesteigerte Corticosteron-Antwort im CRH-Test von ACTH-unabhängig war und zum anderen die Corticosteron-Antwort im ACTH-Test erhöht wurde. Mechanistisch war dies mit einer erhöhten adrenalen Expression von AT_{1A}-Rezeptoren assoziiert. Die HPA-Achsen-Hyperreaktivität ging mit einer verschlechterten Glukoseutilisation einher. Das Ausbleiben von Stressreaktionen und die gleichzeitig normalisierte Glukoseutilisation im OGTT adrenalektomierter Ratten unterstreicht die Bedeutung der Nebennieren für die HPA-Achsen-regulierte Glukosehomöostase unter ANG. Zudem war die Blutdruckantwort adipöser Ratten auf ANG deutlich erhöht. Da nicht nur Plasma-Aldosteron selektiv in den ANG behandelten adipösen Ratten gesteigert war, sondern auch die Zona Glumerulosa hypertrophiert und die adrenale Expression von Aldosteron-Synthase und AT_{1B}-Rezeptoren erhöht war, ist zu vermuten, dass dieser Blutdruckanstieg durch Aldosteron bedingt ist.

Wir schließen aus den Ergebnissen dieser Arbeit, dass die ANG-stimulierte Hyperreaktivität der HPA-Achse eine pathophysiologische Bedeutung in der Ausbildung einer gestörten Glukosehomöostase besitzt, was umgekehrt die protektive Wirkung von AT₁-Blockern hinsichtlich der Entstehung eines Typ-2-Diabetes erklären könnte. Zudem folgern wir, dass dem Aldostron eine bedeutsame Rolle im Adipositas-induzierten Bluthochdruck zukommt.

6 Literaturverzeichnis

- Aguilera, G. 1994. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. Front Neuroendocrinol **15**:321-350.
- Aguilera, G., A. Kiss, and X. Luo. 1995a. Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration. J Neuroendocrinol **7**:775-783.
- Aguilera, G., A. Kiss, X. Luo, and B. S. Akbasak. 1995b. The renin angiotensin system and the stress response. Ann N Y Acad Sci **771**:173-186.
- Aguilera, G., W. S. Young, A. Kiss, and A. Bathia. 1995c. Direct regulation of hypothalamic corticotropin-releasing-hormone neurons by angiotensin II. Neuroendocrinology **61**:437-444.
- Ahima, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier, and J. S. Flier. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature **382**:250-252.
- Alberti, K. G., and P. Z. Zimmet. 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and dann complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 15:539-553.
- Allan, E. H., and M. A. Titheradge. 1984. Effect of treatment of rats with dexamethasone in vivo on gluconeogenesis and metabolite compartmentation in subsequently isolated hepatocytes. Biochem J 219:117-123.
- ALLHAT. 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 **288**:2981-2997.
- Alonso-Galicia, M., M. W. Brands, D. H. Zappe, and J. E. Hall. 1996. Hypertension in obese Zucker rats. Role of angiotensin II and adrenergic activity. Hypertension 28:1047-1054.
- Aneja, A., F. El-Atat, S. I. McFarlane, and J. R. Sowers. 2004. Hypertension and obesity. Recent Prog Horm Res **59**:169-205.
- Antoni, F. A. 1993. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. Front Neuroendocrinol **14**:76-122.

- Balkau, B., M. Pyorala, M. Shipley, A. Forhan, J. Jarrett, E. Eschwege, and K. Pyorala. 1997. Non-cardiovascular disease mortality and diabetes mellitus. Lancet **350**:1680.
- Barit, D., and M. E. Cooper. 2008. Diabetic patients and kidney protection: an attainable target. J Hypertens Suppl **26**:S3-7.
- Barringer, D. L., and R. D. Bunag. 1989. Uneven blunting of chronotropic baroreflexes in obese Zucker rats. Am J Physiol **256**:H417-421.
- Barseghian, G., and R. Levine. 1980. Effect of corticosterone on insulin and glucagon secretion by the isolated perfused rat pancreas. Endocrinology **106**:547-552.
- Barseghian, G., R. Levine, and P. Epps. 1982. Direct effect of cortisol and cortisone on insulin and glucagon secretion. Endocrinology **111**:1648-1651.
- Bassett, M. H., P. C. White, and W. E. Rainey. 2004. The regulation of aldosterone synthase expression. Mol Cell Endocrinol **217**:67-74.
- Bassett, M. H., Y. Zhang, C. Clyne, P. C. White, and W. E. Rainey. 2002. Differential regulation of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. J Mol Endocrinol **28**:125-135.
- Beck, A., B. Grasmugg, E. Singer, S. Bacher, and G. Raberger. 1985. Angiotensin-induced hypertension in conscious dogs: biochemical parameters and baroreceptor reflex. Cardiovasc Res **19**:721-726.
- Becker, M., D. Umrani, M. F. Lokhandwala, and T. Hussain. 2003. Increased renal angiotensin II AT1 receptor function in obese Zucker rat. Clin Exp Hypertens **25**:35-47.
- Bentley-Lewis, R., G. K. Adler, T. Perlstein, E. W. Seely, P. N. Hopkins, G. H. Williams, and R. Garg. 2007. Body mass index predicts aldosterone production in normotensive adults on a high-salt diet. J Clin Endocrinol Metab 92:4472-4475.
- Berra, K., and N. H. Miller. 2009. Inhibiting the renin-angiotensin system: why and in which patients. J Am Acad Nurse Pract **21**:66-75.
- Bird, I. M., N. A. Hanley, R. A. Word, J. M. Mathis, J. L. McCarthy, J. I. Mason, and W. E. Rainey. 1993. Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. Endocrinology 133:1555-1561.
- Björntorp, P. 1988. Abdominal obesity and the development of noninsulindependent diabetes mellitus. Diabetes Metab Rev **4**:615-622.
- Björntorp, P., and R. Rosmond. 2000a. The metabolic syndrome--a neuroendocrine disorder? Br J Nutr **83 Suppl 1**:S49-57.

- Björntorp, P., and R. Rosmond. 2000b. Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 2**:S80-85.
- Boden, G., X. Chen, J. Ruiz, J. V. White, and L. Rossetti. 1994. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. J Clin Invest **93**:2438-2446.

Bornstein, S. R. 1997. Is leptin a stress related peptide? Nat Med 3:937.

- Bornstein, S. R., K. Uhlmann, A. Haidan, M. Ehrhart-Bornstein, and 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 **46**:1235-1238.
- Bosch, J., S. Yusuf, H. C. Gerstein, J. Pogue, P. Sheridan, G. Dagenais, R. Diaz, A. Avezum, F. Lanas, J. Probstfield, G. Fodor, and R. R. Holman. 2006. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. N Engl J Med 355:1551-1562.
- Boston, B. A., and R. D. Cone. 1996. Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. Endocrinology **137**:2043-2050.
- Boustany, C. M., K. Bharadwaj, A. Daugherty, D. R. Brown, D. C. Randall, and L. A. Cassis. 2004. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287:R943-949.
- Boustany, C. M., D. R. Brown, D. C. Randall, and L. A. Cassis. 2005. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with dietinduced obesity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **289**:R181-186.
- Braunwald, E., M. J. Domanski, S. E. Fowler, N. L. Geller, B. J. Gersh, J. Hsia, M. A. Pfeffer, M. M. Rice, Y. D. Rosenberg, and J. L. Rouleau. 2004. Angiotensin-converting-enzyme inhibition in stable coronary artery disease. N Engl J Med **351**:2058-2068.
- Brink, M., J. Wellen, and P. Delafontaine. 1996. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. J Clin Invest **97**:2509-2516.
- Brown, J. J., J. Casals-Stenzel, A. M. Cumming, D. L. Davies, R. Fraser, A. F. Lever, J. J. Morton, P. F. Semple, M. Tree, and J. I. Robertson. 1979. Angiotensin II, aldosterone and arterial pressure: a quantitative approach. Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. Hypertension 1:159-179.
- Bruehl, H., M. Rueger, I. Dziobek, V. Sweat, A. Tirsi, E. Javier, A. Arentoft, O. T. Wolf, and A. Convit. 2007. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and memory impairments in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 92:2439-2445.

- Burdon, K. P., J. L. Bento, C. D. Langefeld, J. K. Campbell, J. J. Carr, L. M. Wagenknecht, D. M. Herrington, B. I. Freedman, S. S. Rich, and D. W. Bowden. 2006. Association of protein tyrosine phosphatase-N1 polymorphisms with coronary calcified plaque in the Diabetes Heart Study. Diabetes 55:651-658.
- Burson, J. M., G. Aguilera, K. W. Gross, and C. D. Sigmund. 1994. Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. Am J Physiol **267**:E260-267.
- Cassis, L., M. Helton, V. English, and G. Burke. 2002. Angiotensin II regulates oxygen consumption. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **282**:R445-453.
- Cassis, L. A., D. E. Marshall, M. J. Fettinger, B. Rosenbluth, and R. A. Lodder. 1998. Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight. Am J Physiol **274**:E867-876.
- Castren, E., and J. M. Saavedra. 1988. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus and subfornical organ. Endocrinology **122**:370-372.
- Castren, E., and 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 **86**:725-729.
- Chen, X., W. Li, H. Yoshida, S. Tsuchida, H. Nishimura, F. Takemoto, S. Okubo, A. Fogo, T. Matsusaka, and I. Ichikawa. 1997. Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. Am J Physiol 272:F299-304.
- Cherradi, N., A. M. Capponi, R. C. Gaillard, and F. P. Pralong. 2001. Decreased expression of steroidogenic acute regulatory protein: a novel mechanism participating in the leptin-induced inhibition of glucocorticoid biosynthesis. Endocrinology **142**:3302-3308.
- Chrousos, G. P. 2000. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 2**:S50-55.
- Chu, K. Y., T. Lau, P. O. Carlsson, and P. S. Leung. 2006. Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. Diabetes **55**:367-374.
- Chua, S. C., Jr., W. K. Chung, X. S. Wu-Peng, Y. Zhang, S. M. Liu, L. Tartaglia, and R. L. Leibel. 1996. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. Science **271**:994-996.

- Chujo, D., K. Yagi, A. Asano, H. Muramoto, S. Sakai, A. Ohnishi, M. Shintaku-Kubota, H. Mabuchi, M. Yamagishi, and J. Kobayashi. 2007. Telmisartan treatment decreases visceral fat accumulation and improves serum levels of adiponectin and vascular inflammation markers in Japanese hypertensive patients. Hypertens Res **30**:1205-1210.
- Clark, B. J., V. Pezzi, D. M. Stocco, and W. E. Rainey. 1995. The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K+ in H295R adrenocortical cells. Mol Cell Endocrinol **115**:215-219.
- Clasen, R., M. Schupp, A. Foryst-Ludwig, C. Sprang, M. Clemenz, M. Krikov, C. Thone-Reineke, T. Unger, and U. Kintscher. 2005. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. Hypertension 46:137-143.
- Crandall, D. L., H. E. Herzlinger, B. D. Saunders, D. C. Armellino, and J. G. Kral. 1994. Distribution of angiotensin II receptors in rat and human adipocytes. J Lipid Res **35**:1378-1385.
- Dallman, M. F., 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, and M. E. Bell. 2006. Glucocorticoids, chronic stress, and obesity. Prog Brain Res 153:75-105.
- de Gasparo, M., K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright, and T. Unger. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacol Rev **52**:415-472.
- de Paula, R. B., A. A. da Silva, and J. E. Hall. 2004. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. Hypertension **43**:41-47.
- Doyon, C., P. Samson, J. Lalonde, and D. Richard. 2007. Effects of the CRF1 receptor antagonist SSR125543 on energy balance and food deprivation-induced neuronal activation in obese Zucker rats. J Endocrinol **193**:11-19.
- Duclos, M., E. Timofeeva, C. Michel, and D. Richard. 2005. Corticosteronedependent metabolic and neuroendocrine abnormalities in obese Zucker rats in relation to feeding. Am J Physiol Endocrinol Metab **288**:E254-266.
- Elton, T. S., C. C. Stephan, G. R. Taylor, M. G. Kimball, M. M. Martin, J. N. Durand, and S. Oparil. 1992. Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. Biochem Biophys Res Commun 184:1067-1073.
- Engeli, S., J. Bohnke, K. Gorzelniak, J. Janke, P. Schling, M. Bader, F. C. Luft, and A. M. Sharma. 2005. Weight loss and the renin-angiotensinaldosterone system. Hypertension 45:356-362.
- English, V., and L. Cassis. 1999. Facilitation of sympathetic neurotransmission contributes to angiotensin regulation of body weight. J Neural Transm **106**:631-644.

- Exton, J. H. 1979. Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids. Monogr Endocrinol **12**:535-546.
- Feldman-Billard, S., L. Du Pasquier-Fediaevsky, and E. Heron. 2006. Hyperglycemia after repeated periocular dexamethasone injections in patients with diabetes. Ophthalmology **113**:1720-1723.
- Fletcher, J. M., P. Haggarty, K. W. Wahle, and P. J. Reeds. 1986. Hormonal studies of young lean and obese Zucker rats. Horm Metab Res **18**:290-295.
- Fliser, D., F. Schaefer, D. Schmid, J. D. Veldhuis, and E. Ritz. 1997. Angiotensin II affects basal, pulsatile, and glucose-stimulated insulin secretion in humans. Hypertension **30**:1156-1161.
- Fluttert, M., S. Dalm, and M. S. Oitzl. 2000. A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. Lab Anim **34**:372-378.
- Frayling, T. M. 2007. Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. Nat Rev Genet **8**:657-662.
- Freedman, M. R., B. A. Horwitz, and J. S. Stern. 1986. Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. Am J Physiol 250:R595-607.
- Fyhrquist, F., and O. Saijonmaa. 2008. Renin-angiotensin system revisited. J Intern Med **264**:224-236.
- Ganong, W. F., and K. Murakami. 1987. The role of angiotensin II in the regulation of ACTH secretion. Ann N Y Acad Sci **512**:176-186.
- Gartner, K., D. Buttner, K. Dohler, R. Friedel, J. Lindena, and I. Trautschold. 1980. Stress response of rats to handling and experimental procedures. Lab Anim 14:267-274.
- Gasc, J. M., S. Shanmugam, M. Sibony, and P. Corvol. 1994. Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. Hypertension **24**:531-537.
- Giacchetti, G., E. Faloia, C. Sardu, M. A. Camilloni, B. Mariniello, C. Gatti, G. G. Garrapa, M. Guerrieri, and F. Mantero. 2000. Gene expression of angiotensinogen in adipose tissue of obese patients. Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 2**:S142-143.
- Giani, G., H. U. Janka, H. Hauner, E. Standl, A. Schiel, W. Rathmann, and J. Rosenbauer. 2004. Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. Evidenzbasierte Leitlinie DDG-Aktualisierung 05/2004. 2 edition. Scherbaum, W. A., Kiess, W.

- Goldstein, B. J. 2001. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus, obesity and related states of insulin resistance. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord **1**:265-275.
- Grassi, G., G. Seravalle, R. Dell'Oro, F. Q. Trevano, M. Bombelli, F. Scopelliti, A. Facchini, and 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 **21**:1761-1769.
- Griendling, K. K., B. Lassegue, and R. W. Alexander. 1996. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**:281-306.
- Grundy, S. M., J. I. Cleeman, S. R. Daniels, K. A. Donato, R. H. Eckel, B. A. Franklin, D. J. Gordon, R. M. Krauss, P. J. Savage, S. C. Smith, Jr., J. A. Spertus, and F. Costa. 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Circulation **112**:2735-2752.
- Guillaume-Gentil, C., F. Rohner-Jeanrenaud, F. Abramo, G. E. Bestetti, G. L. Rossi, and B. Jeanrenaud. 1990. Abnormal regulation of the hypothalamopituitary-adrenal axis in the genetically obese fa/fa rat. Endocrinology **126**:1873-1879.
- Hakam, A. C., and T. Hussain. 2005. Renal angiotensin II type-2 receptors are upregulated and mediate the candesartan-induced natriuresis/diuresis in obese Zucker rats. Hypertension **45**:270-275.
- Halaas, J. L., C. Boozer, J. Blair-West, N. Fidahusein, D. A. Denton, and J. M. Friedman. 1997. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. Proc Natl Acad Sci U S A 94:8878-8883.
- Hanefeld, M., F. Schaper, and A. Ceriello. 2007. [History and definition(s) of metabolic syndrome]. Internist (Berl) **48**:117-125.
- Hans, P., A. Vanthuyne, P. Y. Dewandre, J. F. Brichant, and V. Bonhomme. 2006. Blood glucose concentration profile after 10 mg dexamethasone in nondiabetic and type 2 diabetic patients undergoing abdominal surgery. Br J Anaesth 97:164-170.
- Hansson, L., L. H. Lindholm, L. Niskanen, J. Lanke, T. Hedner, A. Niklason, K. Luomanmaki, B. Dahlof, U. de Faire, C. Morlin, B. E. Karlberg, P. O. Wester, and J. E. Bjorck. 1999. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. Lancet **353**:611-616.

- Harmer, S. C., and A. B. Bicknell. 2005. Role of gamma-MSH peptides in the regulation of adrenal steroidogenesis. Peptides **26**:1944-1951.
- Harrison-Bernard, L. M., S. S. El-Dahr, D. F. O'Leary, and L. G. Navar. 1999. Regulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA and protein in angiotensin II-induced hypertension. Hypertension **33**:340-346.
- Hasselgren, P. O. 2000. Catabolic response to stress and injury: implications for regulation. World J Surg **24**:1452-1459.
- Hauger, R., G. Aguilera, and K. Catt. 1978. Angiotensin II regulates dann receptor sites in the adrenal glomerulosa zone. Nature **271**:176-178.
- Havel, P. J., B. L. Busch, D. L. Curry, P. R. Johnson, M. F. Dallman, and J. S. Stern. 1996. Predominately glucocorticoid agonist actions of RU-486 in young specific-pathogen-free Zucker rats. Am J Physiol 271:R710-717.
- Heemskerk, F. M., and J. M. Saavedra. 1995. Quantitative autoradiography of angiotensin II AT2 receptors with [125I]CGP 42112. Brain Res **677**:29-38.
- Heiman, M. L., R. S. Ahima, L. S. Craft, B. Schoner, T. W. Stephens, and J. S. Flier. 1997. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. Endocrinology **138**:3859-3863.
- Henegar, J. R., G. L. Brower, A. Kabour, and J. S. Janicki. 1995. Catecholamine response to chronic ANG II infusion and dann role in myocyte and coronary vascular damage. Am J Physiol 269:H1564-1569.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DANN amplification reactions. Biotechnology (N Y) **11**:1026-1030.
- Hilbers, U., J. Peters, S. R. Bornstein, F. M. Correa, O. Johren, J. M. Saavedra, and M. Ehrhart-Bornstein. 1999. Local renin-angiotensin system is involved in K+-induced aldosterone secretion from human adrenocortical NCI-H295 cells. Hypertension **33**:1025-1030.
- Hu, G., T. A. Lakka, H. M. Lakka, and J. Tuomilehto. 2006. Lifestyle management in the metabolic syndrome. Metab Syndr Relat Disord **4**:270-286.
- IDF, I. d. F. 2005. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrom. (<u>http://www.idf.org</u>).
- Ishihata, A., S. Uno, D. F. Guo, Y. Katano, and T. Inagami. 1998. Inhibition of the expression of the gene for the angiotensin AT1 receptor by angiotensin II in the rat adrenal gland. Eur J Pharmacol **350**:129-139.
- Ishimura, K., and H. Fujita. 1997. Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes. Microsc Res Tech 36:445-453.
- Iwai, N., and T. Inagami. 1992. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. FEBS Lett **298**:257-260.
- Jagger, C., E. Goyder, M. Clarke, N. Brouard, and A. Arthur. 2003. Active life expectancy in people with and without diabetes. J Public Health Med **25**:42-46.
- Jezova, D., T. Ochedalski, A. Kiss, and G. Aguilera. 1998. Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. J Neuroendocrinol **10**:67-72.
- Jöhren, O., A. Dendorfer, and P. Dominiak. 2004. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. Cardiovasc Res **62**:460-467.
- Jöhren, O., C. Golsch, A. Dendorfer, F. Qadri, W. Hauser, and P. Dominiak. 2003. Differential expression of AT1 receptors in the pituitary and adrenal gland of SHR and WKY. Hypertension **41**:984-990.
- Jöhren, O., T. Inagami, and J. M. Saavedra. 1995. AT1A, AT1B, and AT2 angiotensin II receptor subtype gene expression in rat brain. Neuroreport **6**:2549-2552.
- Jöhren, O., T. Inagami, and 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 **37**:192-200.
- Jones, B. H., M. K. Standridge, and N. Moustaid. 1997. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. Endocrinology **138**:1512-1519.
- Jones, C. G., S. K. Hothi, and M. A. Titheradge. 1993. Effect of dexamethasone on gluconeogenesis, pyruvate kinase, pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase flux in isolated hepatocytes. Biochem J **289 (Pt 3)**:821-828.
- Jozsa, R., A. Olah, G. Cornelissen, V. Csernus, K. Otsuka, M. Zeman, G. Nagy, J. Kaszaki, K. Stebelova, N. Csokas, W. Pan, M. Herold, E. E. Bakken, and F. Halberg. 2005. Circadian and extracircadian exploration during daytime hours of circulating corticosterone and other endocrine chronomes. Biomed Pharmacother **59 Suppl 1**:S109-116.
- Juan, C. C., Y. Chien, L. Y. Wu, W. M. Yang, C. L. Chang, Y. H. Lai, P. H. Ho, C. F. Kwok, and L. T. Ho. 2005. Angiotensin II enhances insulin sensitivity in vitro and in vivo. Endocrinology **146**:2246-2254.
- Kabour, A., J. R. Henegar, V. R. Devineni, and J. S. Janicki. 1995. Prevention of angiotensin II induced myocyte necrosis and coronary vascular damage by lisinopril and losartan in the rat. Cardiovasc Res **29**:543-548.

- Kakar, S. S., J. C. Sellers, D. C. Devor, L. C. Musgrove, and J. D. Neill. 1992. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. Biochem Biophys Res Commun **183**:1090-1096.
- Kakiki, M., K. Morohashi, M. Nomura, T. Omura, and T. Horie. 1997. Regulation of aldosterone synthase cytochrome P450 (CYP11B2) and 11 betahydroxylase cytochrome P450 (CYP11B1) expression in rat adrenal zona glomerulosa cells by low sodium diet and angiotensin II receptor antagonists. Biol Pharm Bull **20**:962-968.
- Kalsbeek, A., J. J. van Heerikhuize, J. Wortel, and R. M. Buijs. 1996. A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. J Neurosci **16**:5555-5565.
- Koletsky, R. J., R. A. Velliquette, and P. Ernsberger. 2003. The role of I(1)imidazoline receptors and alpha(2)-adrenergic receptors in the modulation of glucose and lipid metabolism in the SHROB model of metabolic syndrome X. Ann N Y Acad Sci **1009**:251-261.
- Kooij, F. O., J. E. Kal, P. C. Hans, and V. L. Bonhomme. 2006. Blood glucose concentration profile after 10 mg dexamethasone in non-diabetic and type 2 diabetic patients. Br J Anaesth **97**:896-897.
- Köster, I., L. von Ferber, P. Ihle, I. Schubert, and H. Hauner. 2006. The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany--the CoDiM study. Diabetologia **49**:1498-1504.
- Krug, A. W., and M. Ehrhart-Bornstein. 2008. Aldosterone and metabolic syndrome: is increased aldosterone in metabolic syndrome patients an additional risk factor? Hypertension **51**:1252-1258.
- Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoback, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg, and N. Zoric. 2006. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 27:95-125.
- Kurtz, T. W., R. C. Morris, and H. A. Pershadsingh. 1989. The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. Hypertension **13**:896-901.
- Lambillotte, C., P. Gilon, and J. C. Henquin. 1997. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. J Clin Invest **99**:414-423.
- Lamounier-Zepter, V., M. Ehrhart-Bornstein, and S. R. Bornstein. 2005. Mineralocorticoid-stimulating activity of adipose tissue. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**:567-575.

- Le Goascogne, C., N. Sananes, M. Gouezou, S. Takemori, S. Kominami, E. E. Baulieu, and P. Robel. 1991. Immunoreactive cytochrome P-450(17 alpha) in rat and guinea-pig gonads, adrenal glands and brain. J Reprod Fertil **93**:609-622.
- Lebrethon, M. C., D. Naville, M. Begeot, and J. M. Saez. 1994. Regulation of corticotropin receptor number and messenger RNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin II. J Clin Invest 93:1828-1833.
- Leong, D. S., J. A. Terron, A. Falcon-Neri, I. Armando, T. Ito, O. Johren, L. H. Tonelli, K. L. Hoe, and J. M. Saavedra. 2002. Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors. Neuroendocrinology **75**:227-240.
- Levin, B. E., S. Stoddard-Apter, and A. C. Sullivan. 1984. Central activation and peripheral function of sympatho-adrenal and cardiovascular systems in the Zucker rat. Physiol Behav **32**:295-299.
- Li, J. S., R. M. Touyz, and E. L. Schiffrin. 1998. Effects of AT1 and AT2 angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. Hypertension **31**:487-492.
- Lind, L., T. Pollare, C. Berne, and H. Lithell. 1994. Long-term metabolic effects of antihypertensive drugs. Am Heart J **128**:1177-1183.
- Lindholm, L. H., H. Ibsen, B. Dahlof, R. B. Devereux, G. Beevers, U. de Faire, F. Fyhrquist, S. Julius, S. E. Kjeldsen, K. Kristiansson, O. Lederballe-Pedersen, M. S. Nieminen, P. Omvik, S. Oparil, H. Wedel, P. Aurup, J. Edelman, and S. Snapinn. 2002. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. Lancet 359:1004-1010.
- Lithell, H., L. Hansson, I. Skoog, D. Elmfeldt, A. Hofman, B. Olofsson, P. Trenkwalder, and A. Zanchetti. 2003. The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. J Hypertens **21**:875-886.
- Liu, R. H., M. Mizuta, T. Kurose, and S. Matsukura. 2002. Early events involved in the development of insulin resistance in Zucker fatty rat. Int J Obes Relat Metab Disord **26**:318-326.
- Livingstone, D. E., G. C. Jones, K. Smith, P. M. Jamieson, R. Andrew, C. J. Kenyon, and B. R. Walker. 2000. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. Endocrinology 141:560-563.
- Lukins, M. B., and P. H. Manninen. 2005. Hyperglycemia in patients administered dexamethasone for craniotomy. Anesth Analg **100**:1129-1133.

- Maher, M. A., W. J. Banz, and M. B. Zemel. 1995. Variations of blood pressures in lean Zucker rats fed low or high fat diets. J Nutr **125**:2618-2622.
- Makimura, H., T. M. Mizuno, F. Isoda, J. Beasley, J. H. Silverstein, and C. V. Mobbs. 2003. Role of glucocorticoids in mediating effects of fasting and diabetes on hypothalamic gene expression. BMC Physiol **3**:5.
- Mark, A. L., M. L. Correia, K. Rahmouni, and W. G. Haynes. 2002. Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications. J Hypertens **20**:1245-1250.
- Marshall, T. G., R. E. Lee, and F. E. Marshall. 2006. Common angiotensin receptor blockers may directly modulate the immune system via VDR, PPAR and CCR2b. Theor Biol Med Model **3**:1.
- Martin, R. J., P. J. Wangsness, and J. H. Gahagan. 1978. Diurnal changes in serum metabolites and hormones in lean and obese Zucker rats. Horm Metab Res **10**:187-192.
- Matthias, A., K. B. Ohlson, J. M. Fredriksson, A. Jacobsson, J. Nedergaard, and B. Cannon. 2000. Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty scid-induced thermogenesis. J Biol Chem 275:25073-25081.
- Mattsson, C., M. Lai, J. Noble, E. McKinney, J. L. Yau, J. R. Seckl, and 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-pituitaryadrenal axis in obesity. Endocrinology 144:2997-3003.
- McGarry, J. D. 1992. What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. Science **258**:766-770.
- McGuire, D. K., J. R. Winterfield, J. A. Rytlewski, and E. Ferrannini. 2008. Blocking the renin-angiotensin-aldosterone system to prevent diabetes mellitus. Diab Vasc Dis Res **5**:59-66.
- McMahon, M., J. Gerich, and R. Rizza. 1988. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. Diabetes Metab Rev **4**:17-30.
- Meisinger, C., A. Doring, B. Thorand, M. Heier, and H. Lowel. 2006. Body fat distribution and risk of type 2 diabetes in the general population: are there differences between men and women? The MONICA/KORA Augsburg cohort study. Am J Clin Nutr 84:483-489.
- Menconi, M., M. Fareed, P. O'Neal, V. Poylin, W. dann, and P. O. Hasselgren. 2007. Role of glucocorticoids in the molecular regulation of muscle wasting. Crit Care Med **35**:S602-608.
- Misra, A., and L. Khurana. 2008. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. J Clin Endocrinol Metab **93**:S9-30.

- Moebus, S., and A. Stang. 2007. [The metabolic syndrome -- a controversial diagnostic concept]. Herz **32**:529-540.
- Moriyama, M., Y. Nakanishi, S. Tsuyama, Y. Kannan, M. Ohta, and T. Sugano. 1997. Change from beta- to alpha-adrenergic glycogenolysis induced by corticosteroids in female rat liver. Am J Physiol **273**:R153-160.
- Mühlhardt, C. 2003. Molekularbiologie/Genomics. 4 edition. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Munck, A., P. M. Guyre, and N. J. Holbrook. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocr Rev 5:25-44.
- Nagai, Y., L. Yao, H. Kobori, K. Miyata, Y. Ozawa, A. Miyatake, T. Yukimura, T. Shokoji, S. Kimura, H. Kiyomoto, M. Kohno, Y. Abe, and A. Nishiyama. 2005. Temporary angiotensin II blockade at the prediabetic stage attenuates the development of renal injury in type 2 diabetic rats. J Am Soc Nephrol **16**:703-711.
- Naruse, M., A. Tanabe, T. Sugaya, K. Naruse, T. Yoshimoto, T. Seki, T. Imaki, R. Demura, K. Murakami, and H. Demura. 1998. Deferential roles of angiotensin receptor subtypes in adrenocortical function in mice. Life Sci 63:1593-1598.
- Nicod, N., V. Giusti, C. Besse, and L. Tappy. 2003. Metabolic adaptations to dexamethasone-induced insulin resistance in healthy volunteers. Obes Res **11**:625-631.
- Noda, M., T. Matsuo, H. Nagano-Tsuge, M. Ohta, M. Sekiguchi, Y. Shibouta, T. Naka, and Y. Imura. 2001. Involvement of angiotensin II in progression of renal injury in rats with genetic non-insulin-dependent diabetes mellitus (Wistar fatty rats). Jpn J Pharmacol 85:416-422.
- Nogueira, E. F., C. A. Vargas, M. Otis, N. Gallo-Payet, W. B. Bollag, and W. E. Rainey. 2007. Angiotensin-II acute regulation of rapid response genes in human, bovine, and rat adrenocortical cells. J Mol Endocrinol **39**:365-374.
- Odio, M. R., and A. Brodish. 1990. Glucoregulatory responses of adult and aged rats after exposure to chronic stress. Exp Gerontol **25**:159-172.
- Oldfield, B. J., E. Badoer, D. K. Hards, and 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 **60**:255-262.
- Overton, J. M., T. D. Williams, J. B. Chambers, and M. E. Rashotte. 2001. Cardiovascular and metabolic responses to fasting and thermoneutrality are conserved in obese Zucker rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 280:R1007-1015.

- Pacak, K., R. McCarty, M. Palkovits, G. Cizza, I. J. Kopin, D. S. Goldstein, and G. P. Chrousos. 1995a. Decreased central and peripheral catecholaminergic activation in obese Zucker rats. Endocrinology **136**:4360-4367.
- Pacak, K., M. Palkovits, I. J. Kopin, and D. S. Goldstein. 1995b. Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. Front Neuroendocrinol **16**:89-150.
- Padwal, R., and A. Laupacis. 2004. Antihypertensive therapy and incidence of type 2 diabetes: a systematic review. Diabetes Care **27**:247-255.
- Palkovitz, M., and M. Brownstein. 1988. Maps and guides to microdissection of the rat brain. Elsevier, New York.
- Panzram, G., and R. Zabel-Langhennig. 1981. Prognosis of diabetes mellitus in a geographically defined population. Diabetologia **20**:587-591.
- Pasternak, J. J., D. G. McGregor, and W. L. Lanier. 2004. Effect of single-dose dexamethasone on blood glucose concentration in patients undergoing craniotomy. J Neurosurg Anesthesiol **16**:122-125.
- Pavlatou, M. G., G. Mastorakos, I. Lekakis, S. Liatis, G. Vamvakou, E. Zoumakis, I. Papassotiriou, A. D. Rabavilas, N. Katsilambros, and G. P. Chrousos. 2008. Chronic administration of an angiotensin II receptor antagonist resets the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and improves the affect of patients with diabetes mellitus type 2: preliminary results. Stress 11:62-72.
- Paxinos, G., and C. Watson. 1998. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press.
- Pedersen, E. B., H. Danielsen, T. Jensen, M. Madsen, S. S. Sorensen, and O. O. Thomsen. 1986. Angiotensin II, aldosterone and arginine vasopressin in plasma in congestive heart failure. Eur J Clin Invest 16:56-60.
- Peters, B., S. Clausmeyer, N. Obermuller, A. Woyth, B. Kranzlin, N. Gretz, and J. Peters. 1998. Specific regulation of StAR expression in the rat adrenal zona glomerulosa. An in situ hybridization study. J Histochem Cytochem 46:1215-1221.
- Petersen, K. F., S. Dufour, D. Befroy, M. Lehrke, R. E. Hendler, and G. I. Shulman. 2005. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. Diabetes 54:603-608.
- Phillips, M. S., Q. Liu, H. A. Hammond, V. Dugan, P. J. Hey, C. J. Caskey, and J. F. Hess. 1996. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. Nat Genet 13:18-19.

- Plotsky, P. M., K. V. Thrivikraman, A. G. Watts, and R. L. Hauger. 1992. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the Zucker obese rat. Endocrinology **130**:1931-1941.
- Porter, J. P., J. M. Anderson, R. J. Robison, and A. C. Phillips. 2003. Effect of central angiotensin II on body weight gain in young rats. Brain Res **959**:20-28.
- Porter, J. P., and K. R. Potratz. 2004. Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**:R422-428.
- Qi, L., F. B. Hu, and G. Hu. 2008. Genes, environment, and interactions in prevention of type 2 diabetes: a focus on physical activity and lifestyle changes. Curr Mol Med 8:519-532.
- Raasch, W., T. Bartels, A. Gieselberg, A. Dendorfer, and P. Dominiak. 2002a. Angiotensin I-converting enzyme inhibition increases cardiac catecholamine content and reduces monoamine oxidase activity via an angiotensin type 1 receptor-mediated mechanism. J Pharmacol Exp Ther **300**:428-434.
- Raasch, W., T. Bartels, C. Schwartz, W. Häuser, H. Rütten, and P. Dominiak. 2002b. Regression of ventricular and vascular hypertrophy: are there differences between structurally different angiotensin-converting enzyme inhibitors? J Hypertens 20:2495-2504.
- Raasch, W., C. Wittmershaus, A. Dendorfer, I. Voges, F. Pahlke, C. Dodt, P. Dominiak, and O. Jöhren. 2006. Angiotensin II inhibition reduces stress sensitivity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats. Endocrinology 147:3539-3546.
- Rainey, W. E. 1999. Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase. Mol Cell Endocrinol **151**:151-160.
- Reaven, G. M. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes **37**:1595-1607.
- Reaven, G. M. 2006. The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary? Am J Clin Nutr **83**:1237-1247.
- Reynolds, R. M., H. E. Syddall, B. R. Walker, P. J. Wood, and D. I. Phillips. 2003. Predicting cardiovascular risk factors from plasma cortisol measured during oral glucose tolerance tests. Metabolism 52:524-527.
- Reynolds, R. M., B. R. Walker, H. E. Syddall, C. B. Whorwood, P. J. Wood, and D. I. Phillips. 2001. Elevated plasma cortisol in glucose-intolerant men: differences in responses to glucose and habituation to venepuncture. J Clin Endocrinol Metab 86:1149-1153.

- Riazi, S., O. Khan, X. Hu, and C. A. Ecelbarger. 2006. Aldosterone infusion with high-NaCl diet increases blood pressure in obese but not lean Zucker rats. Am J Physiol Renal Physiol 291:F597-605.
- Ribeiro-Oliveira, A., Jr., A. I. Nogueira, R. M. Pereira, W. W. Boas, R. A. Dos Santos, and A. C. Simoes e Silva. 2008. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. Vasc Health Risk Manag **4**:787-803.
- Rivier, C., and W. Vale. 1983. Effect of angiotensin II on ACTH release in vivo: role of corticotropin-releasing factor. Regul Pept **7**:253-258.
- Roy, M., B. Collier, and A. Roy. 1990. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation among diabetic outpatients. Psychiatry Res **31**:31-37.
- Roy, M., B. Collier, and A. Roy. 1991. Dysregulation of the hypothalamo-pituitaryadrenal axis and duration of diabetes. J Diabet Complications **5**:218-220.
- Rucinski, M., C. Tortorella, A. Ziolkowska, M. Nowak, G. G. Nussdorfer, and L. K. Malendowicz. 2008. Steroidogenic acute regulatory protein gene expression, steroid-hormone secretion and proliferative activity of adrenocortical cells in the presence of proteasome inhibitors: in vivo studies on the regenerating rat adrenal cortex. Int J Mol Med **21**:593-597.
- Russell, J. C., and S. D. Proctor. 2006. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. Cardiovasc Pathol **15**:318-330.

Saavedra, J. M. 1992. Brain and pituitary angiotensin. Endocr Rev 13:329-380.

- Saavedra, J. M. 1999. Emerging features of brain angiotensin receptors. Regul Pept **85**:31-45.
- Salzmann, C., M. Otis, H. Long, C. Roberge, N. Gallo-Payet, and C. D. Walker. 2004. Inhibition of steroidogenic response to adrenocorticotropin by leptin: implications for the adrenal response to maternal separation in neonatal rats. Endocrinology **145**:1810-1822.
- Sandberg, K. 1994. Structural analysis and regulation of angiotensin II receptors. Trends Endocrinol Metab **5**:28-35.
- Sasamura, H., L. Hein, J. E. Krieger, R. E. Pratt, B. K. Kobilka, and V. J. Dzau. 1992. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. Biochem Biophys Res Commun 185:253-259.
- Scheen, A. J. 2004. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms. Diabetes Metab **30**:498-505.

- Schienkiewitz, A., M. B. Schulze, K. Hoffmann, A. Kroke, and H. Boeing. 2006. Body mass index history and risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. Am J Clin Nutr 84:427-433.
- Schreihofer, A. M., C. D. Hair, and D. W. Stepp. 2005. Reduced plasma volume and mesenteric vascular reactivity in obese Zucker rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288:R253-261.
- Schubert, B., M. Fassnacht, F. Beuschlein, S. Zenkert, B. Allolio, and M. Reincke. 2001. Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. Clin Endocrinol (Oxf) 54:627-632.
- Schupp, M., J. Janke, R. Clasen, T. Unger, and U. Kintscher. 2004. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptorgamma activity. Circulation **109**:2054-2057.
- Shah, S., and T. Hussain. 2006. Enhanced angiotensin II-induced activation of Na+, K+-ATPase in the proximal tubules of obese Zucker rats. Clin Exp Hypertens 28:29-40.
- Simon, G., G. Abraham, and G. Cserep. 1995. Pressor and subpressor angiotensin II administration. Two experimental models of hypertension. Am J Hypertens 8:645-650.
- Smyth, S., and A. Heron. 2006. Diabetes and obesity: the twin epidemics. Nat Med **12**:75-80.
- Staroukine, M., J. Devriendt, P. Decoodt, and A. Verniory. 1984. Relationships between plasma epinephrine, norepinephrine, dopamine and angiotensin II concentrations, renin activity, hemodynamic state and prognosis in acute heart failure. Acta Cardiol **39**:131-138.
- Sumitomo, T., T. Suda, Y. Nakano, F. Tozawa, M. Yamada, and H. Demura. 1991. Angiotensin II increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. Endocrinology **128**:2248-2252.
- Teran-Garcia, M., and C. Bouchard. 2007. Genetics of the metabolic syndrome. Appl Physiol Nutr Metab **32**:89-114.
- Tikellis, C., P. J. Wookey, R. Candido, S. Andrikopoulos, M. C. Thomas, and M. E. Cooper. 2004. Improved islet morphology after blockade of the reninangiotensin system in the ZDF rat. Diabetes **53**:989-997.
- Timofeeva, E., and 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 **66**:327-340.

- Toblli, J. E., G. DeRosa, C. Rivas, G. Cao, P. Piorno, P. Pagano, and P. Forcada. 2003. Cardiovascular protective role of a low-dose antihypertensive combination in obese Zucker rats. J Hypertens **21**:611-620.
- Trost, B. N., and J. Muller. 1976. Uptake and metabolism of serotonin by rat adrenal tissue in vitro. Acta Endocrinol (Copenh) 82:353-365.
- Tuck, M. L., J. Sowers, L. Dornfeld, G. Kledzik, and M. Maxwell. 1981. The effect of weight reduction on blood pressure, plasma renin activity, and plasma aldosterone levels in obese patients. N Engl J Med **304**:930-933.
- Turner, N. C., and P. White. 1996. Effects of streptozotocin-induced diabetes on vascular reactivity in genetically hyperinsulinaemic obese Zucker rats. J Cardiovasc Pharmacol **27**:884-890.
- Van Harmelen, V., P. Ariapart, J. Hoffstedt, I. Lundkvist, S. Bringman, and P. Arner. 2000. Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. Obes Res 8:337-341.
- Van Heek, M., D. S. Compton, C. F. France, R. P. Tedesco, A. B. Fawzi, M. P. Graziano, E. J. Sybertz, C. D. Strader, and H. R. Davis, Jr. 1997. Dietinduced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. J Clin Invest **99**:385-390.
- Viljanen, A. P., P. lozzo, R. Borra, M. Kankaanpaa, A. Karmi, R. Lautamaki, M. Jarvisalo, R. Parkkola, T. Ronnemaa, L. Guiducci, T. Lehtimaki, O. T. Raitakari, A. Mari, and P. Nuutila. 2009. Effect of weight loss on liver free fatty acid uptake and hepatic insulin resistance. J Clin Endocrinol Metab 94:50-55.
- Vogelzang, M., M. Hoekstra, J. T. Drost, M. Janse, I. C. van der Horst, P. W. Boonstra, F. Zijlstra, B. G. Loef, and M. W. Nijsten. 2007. The impact of a reduced dose of dexamethasone on glucose control after coronary artery bypass surgery. Cardiovasc Diabetol 6:39.
- Warne, J. P. 2008. Shaping the stress response: Interplay of palatable food choices, glucocorticoids, insulin and abdominal obesity. Mol Cell Endocrinol.
- Watts, A. G., S. Tanimura, and G. Sanchez-Watts. 2004. Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin gene transcription in the hypothalamic paraventricular nucleus of unstressed rats: daily rhythms and their interactions with corticosterone. Endocrinology **145**:529-540.
- Waynforth, H. B., and P. A. Flecknell. 2004. Experimental and surgical technique in the rat. second edition edition. Academic Press.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree, and H. King. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 27:1047-1053.

- Yang, G., Z. X. Xi, Y. Wan, H. Wang, and G. Bi. 1993. Changes in circulating and tissue angiotensin II during acute and chronic stress. Biol Signals 2:166-172.
- Ye, P., C. J. Kenyon, S. M. MacKenzie, J. R. Seckl, R. Fraser, J. M. Connell, and E. Davies. 2003. Regulation of aldosterone synthase gene expression in the rat adrenal gland and central nervous system by sodium and angiotensin II. Endocrinology **144**:3321-3328.
- Yusuf, S., M. A. Pfeffer, K. Swedberg, C. B. Granger, P. Held, J. J. McMurray, E. L. Michelson, B. Olofsson, and J. Ostergren. 2003. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. Lancet **362**:777-781.
- Yusuf, S., P. Sleight, J. Pogue, J. Bosch, R. Davies, and G. Dagenais. 2000. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. N Engl J Med **342**:145-153.
- Zemel, M. B., J. R. Sowers, S. Shehin, M. F. Walsh, and J. Levy. 1990. Impaired calcium metabolism associated with hypertension in Zucker obese rats. Metabolism **39**:704-708.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature **372**:425-432.
- Zucker, T. F., and L. M. Zucker. 1963. Fat accretion and growth in the rat. J Nutr **80**:6-19.

7 Anlagen

7.1 Abbildungsverzeichnis

42	Körpergewichtsentwicklung von schlanken (A) und adipösen (B) Zuckerratten unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung	Abb. 1:
43	Futteraufnahme (A) und Wasseraufnahme (B) unter chronischer Angiotensin-II-Behandlung von schlanken und adipösen Zuckerratten zwischen dem 18. und 20. Behandlungstag	Abb. 2:
45	Mittlerer arterieller Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) nach 21 Tagen und das linksventrikuläre Gewicht (C) nach 24 Tagen chronischer Angiotensin-II-Behandlung von schlanken und adipösen Zuckerratten	Abb. 3:
46	Plasmakonzentration von Angiotensin-II (A) und Aldosteron (B) nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung von schlanken und adipösen Zuckerratten	Abb. 4:
48	Reaktivität der HPA-Achse bei schlanken und adipösen Zuckerratten. Dargestellt sind die Veränderungen der ACTH- (A) bzw. Corticosteron- (B) Spiegel in schlanken und adipösen Kochsalz-behandelten Zuckerratten nach Stimulation mit CRH (10 µg/kg _{KG} i.v.)	Abb. 5:
49	Konzentration-Zeit-Kurven von Plasma ACTH (A, B), Corticosteron (C, D), Glukose (E, F) und Insulin (G, H) nach akuter CRH-Gabe (10 µg/kg _{KG} i.v.) nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung	Abb. 6:
50	AUC der Konzentration-Zeit-Kurven von Corticosteron (A), Glukose (B) und dem Quotienten aus AUC _{Glukose} und AUC _{Corticosteron} (C) nach CRH-Gabe (10 μg/kg _{KG} i.v.) unter chronischer Angiotensin-II Behandlung von schlanken und adipösen Zuckerratten	Abb. 7:
51	Konzentration-Zeit-Kurven von Glukose (A, B), Insulin (C, D) und Corticosteron (E, F) unter Glukose-Belastung (1 g/kg _{KG} p.o.) nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung von Zuckerratten	Abb. 8:

Abb. 9:	"mRNA-steady-state-Konzentrationen" der AT-Rezeptoren in den Organen der HPA-Achse nach chronischer Angiotensin-II- Behandlung von schlanken und adipösen Zuckerratten
Abb. 10:	Exemplarische Äquatorialschnitte mit Haematoxylin/Eosin gefärbter Nebennieren (A) zur Dickenbestimmung der Zona Glomerulosa und deren statistische Auswertung (B) für schlanke und adipöse Zuckerratten unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung
Abb. 11:	"mRNA-steady-state-Konzentrationen" von CRH im Hypothalamus und von POMC in der Hypophyse nach chronischer Angiotensin-II- Behandlung von schlanken und adipösen Zuckerratten
Abb. 12:	Adrenale "mRNA-steady-state-Konzentrationen" von MC2-Rezeptor und StAR nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung von schlanken und adipösen Zuckerratten
Abb. 13:	"mRNA-steady-state-Konzentrationen" von CYP11B1 und CYP11B2 nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung von schlanken und adipösen Zuckerratten
Abb. 14:	Körpergewichtsentwicklung von adipösen Zuckerratten unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung59
Abb. 15:	Systolischer Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) von adipösen Zuckerratten unter einer zwölfwöchigen Angiotensin-II-Behandlung61
Abb. 16:	Plasmakonzentration von Angiotensin-II (A), Aldosteron (B) und deren Korrelation (C) in adipösen Zuckerratten nach einer zwölfwöchigen Behandlung mit Angiotensin-II über s.cimplantierte Pumpen
Abb. 17:	Futteraufnahme (A) und Wasseraufnahme (B) in adipösen Zuckerratten unter chronischer Angiotensin-II-Behandlung; die gestrichelten Linien am Tag 0, 28 und 56 indizieren die Implantation bzw. den Wechsel der Pumpen
Abb. 18:	Plasmakonzentration-Zeit-Kurven von Glukose (A) und Insulin (B) in adipösen Zuckerratten unter einer zwölfwöchigen Angiotensin-II- Behandlung

Abb. 19:	ACTH-induzierte Corticosteron- (A) und Glukose- (B) Antwort in adipösen Zuckerratten nach chronischer Angiotensin-II-Behandlung65
Abb. 20:	Plasmakonzentration-Zeit-Kurven von Glukose (A), Insulin (B) und Corticosteron (C) nach oraler Glukosebelastung (1g/kg _{KG}) von adipösen Zuckerratten unter chronischer Angiotensin-II-Behandlung
Abb. 21:	Körpergewichtsentwicklung von adipösen Zuckerratten mit intakten (sham) bzw. entfernten Nebennieren (ADX) unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung
Abb. 22:	Futter- (A) und Wasser-Aufnahme (C) über 17 Tage von adipösen Zuckerratten mit intakten (sham) bzw. entfernten Nebennieren (ADX) unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung und der zugehörigen AUC (B und D)
Abb. 23:	Plasmakonzentrationen von Glukose (A), Insulin (C) und Corticosteron (E) in adipösen Zuckerratten mit intakten (sham) bzw. entfernten Nebennieren (ADX) unter einer chronischen Angiotensin- II-Behandlung und der zugehörigen AUC (B, D und F)
Abb. 24:	Plasmakonzentrationen von ACTH (A) und Corticosteron (B) vor und 30 Minuten nach einem "forced-Schwimm-Test" von scheinoperierten (sham) und adrenalektomierten (ADX) adipösen Zuckerratten unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung
Abb. 25:	Plasmakonzentrationen von Glukose (A), Insulin (B) und Corticosteron unter gefütterten bzw. gefasteten Bedingungen von scheinoperierten (sham) und adrenalektomierten (ADX) adipösen Zuckerratten unter einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung
Abb. 26:	Plasmakonzentration-Zeit-Kurven von Glukose (A) und Insulin (B) nach Glukose-Belastung (1g/kg _{KG} p.o.) scheinoperierter und adrenalektomierter Zuckerratten unter Angiotensin-II-Behandlung
Abb. 27:	Plasma-Corticosteron unter Glukose-Belastung (1g/kg _{KG} p.o.; A) und AUC _{Corticosteron} (B) in scheinoperierten und adrenalektomierten Zuckerratten unter chronischer Angiotensin-II-Behandlung

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1:	Übersicht über klinische Studien, die die Beeinflussung der Inzidenz eines Typ-2-Diabetes unter einer ACE-Hemmung bzw. AT ₁ - Blockade untersuchten
Tab. 2-1:	Tierversuchsantragsnummern und Genehmigungsdaten
Tab. 2-2:	Verwendete Stabilisatoren und Gerinnungshemmer25
Tab. 2-3:	Bedingungen des Proteinase-K-Verdaues
Tab. 2-4:	Nukleotidsequenzen der qPCR
Tab. 3-1:	Einfluss einer chronischen Angiotensin-II-Infusion auf die Entwicklung des Körpergewichtes schlanker und adipöser Zuckerratten
Tab. 3-2:	Einfluss einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf metabolische bzw. endokrinologische Parameter in schlanken und adipösen Zuckerratten
Tab. 3-3:	Einfluss von Angiotensin-II auf die basalen Plasmaspiegel von ACTH und Corticosteron in schlanken und adipösen Zuckerratten
Tab. 3-4:	Körpergewicht (KG), Körperlänge sowie BMI nach 76-tägiger Angiotensin-II-Behandlung60
Tab. 3-5:	Einfluss einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf metabolische und endokrinologische Parameter
Tab. 3-6:	Einfluss der chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf das Körpergewicht (KG) von adipösen Zuckerratten mit intakten (sham) bzw. entfernten (ADX) Nebennieren zu Behandlungsbeginn (Tag 0) und nach 21 Tagen Behandlung

Tab. 3-7:	Einfluss einer chronischen Angiotensin-II-Behandlung auf die Hämodynamik sowie auf wichtige basale RAAS-Komponenten bzw. Aktivitäten in adipösen Zuckerratten mit intakten (sham) bzw. entfernten (ADX) Nebennieren	72
Tab. 3-8:	Abgeleitete Parameter aus den Glukose- und Insulin-Zeit-Verläufen nach Glukose-Belastung	77

7.3 Substanzen und erworbene Lösungen

10 X TAE-Puffer	Invitrogen (Canada)
1-Octanesulfonic Säure	Sigma (Deutschland)
2-Methylbutan	Sigma (Deutschland)
3,4-Dihydroxybenzylamin	Sigma (Deutschland)
3-Hydroxythyramin	Sigma (Deutschland)
Abz-Gly-OH	Bachem Biochemica, Heidelberg (Deutschland)
Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH	Bachem Biochemica, Heidelberg (Deutschland)
ACTH	Sigma (Deutschland)
Adrenalin ((-)-Ephedrin)	Sigma (Deutschland)
Agarose NEEO	Carl Roth (Deutschland)
Aluminiumoxid	Sigma (Deutschland)
Angiotensin-II	Bachem Biochemica
Bestatin	Sigma (Deutschland)
Betaisodona-Lösung [®]	Mundipharma (Deutschland)
Citronensäure Monohydrat	Merk (Deutschland)
Corticosteron-Pellet 100 mg/21 Tage	Innovative Research of America (USA)
CRH	Ferring, Arzneimittel GmbH
Deoxyepinephrin	Sigma (Deutschland)
Diethylether	Carl Roth (Deutschland); J. T. Baker, (Holland)
Diethylpyrocarbinat (DEPC)	Sigma (Deutschland)
Di-Stickstoffoxid (in Flaschen)	Lokaler Gas-Lieferant
EDTA	Merck (Deutschland)
Elutions-Puffer	Applied Biosystems (UK)
Enalaprilat	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Ethanol p.A. 98%	J. T. Baker (Holland)
Ethidiumbromid	BioRad Laboratories (Canada)

Ethylacetat	J. T. Baker (Holland)
Flüssiger Stickstoff	Lokaler Lieferant
Gel-Marker DNA Molekular Weight Marker 14 0,25µg/µl (50µg=1A260 U)	Roche (Schweiz)
Glukose-Lösung 50%; 100ml	Delta Select (Deutschland)
Glycerol	Gibco BRL (Deutschland)
Heparin-Lösung (Liquemin [®] N; 25000 I.E./5ml)	Hoffmann-La Roche (Schweiz)
Hexan	Sigma (Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat ($KH_2PO_{4)}$	Merk (Deutschland)
Kochsalz-Lösung 0,9%; steril	Berlin-Chemie (Deutschland)
Kochsalz-Lösung zum Spülen	Delta Select (Deutschland)
L-Glutation (GSH)	Serva (Deutschland)
Methanol	J. T. Baker (Holland)
Na-Acetat	Merk (Deutschland)
Na-EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	Invitrogen (Kanada)
Natriumchlorid	Merck (Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄₎	Merk (Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck (Deutschland)
Noradrenalin (Norephrin)	Sigma (Deutschland)
Nucleic Acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems (UK)
PBS Puffer	UK-SH Campus Apotheke Lübeck (Deutschland)
PCR-Primer	Invitrogen (Deutschland)
Pentobarbital-Na-Lösung (98mg/1,8 ml)	UK-SH Campus Apotheke Lübeck (Deutschland)
Perchlorsäure	Merk (Deutschland)
Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol	Invitrogen (Kanada)
Proteinase K	Applied Biosystems (UK)
RNA Purifikation Wash Solution I	Applied Biosystems (UK)
RNA Purifikation Wash Solution II	Applied Biosystems (UK)
Salzsäure; HCI (konzentriert)	Merck (Deutschland)
Sauerstoff (in Flaschen)	Lokaler Gas-Lieferant
Stickstoffstrom	Hausleitung

Anlagen

Tris-Lösung (1 M; pH 7,4)

Trockeneis

Xylen-Cyanol

Invitrogen (Kanada)

UK-SH Campus Apotheke Lübeck (Deutschland)

BioRad Laboratories (Canada)

7.4 Rezepturen von Lösungen und Puffern

Angiotensin –II-Lösung (0,9 μg/h)	10,708 mg Angiotensin-II ad 25 ml Aqua ad injectabilia
Angiotensin-II-Lösung (9 μg/h)	107,08 mg Angiotensin-II ad 25 ml Aqua injectabilia
Bestatin-Lösung (1mM)	0,2 ml Bestatin-Lösung (5mg/ml) ad 2,9 ml Aquadest.
Bestatin-Lösung (5mg/ml)	5 mg Bestatin ad 1ml Aqua dest.
DEPC-Wasser	500 μl DEPC ad 500 ml Aqua dest. nach 24 h sterilisiert
EDTA-Lösung pH 6-7	900 mg Na-EDTA ad 10ml Aqua dest. NaOH zur pH-Wert-Einstellung
Eluent (ACE-Aktivitätsbestimmung)	2,4 g NaH ₂ PO ₄ 62,5 ml Methanol ad 1000 ml Aqua dest. pH 7,4

Eluent (Katecholamin-Bestimmung)	 2,7 g Citronensäure Monohydrat 1,7 g NaH₂PO₄ 1,7 g Na-acetat 150 mg 1-Octanesulfonic Säure 300 mg Na-EDTA 30 ml Methanol 1000 ml Aqua dest. pH 5,6
GSH-EDTA-Lösung pH 6-7	900 mg Na-EDTA 600 mg GSH (L-Glutation) ad 10ml Aqua dest. NaOH zur pH-Wert Einstellung
Heparin Lösung (250 I.E./ml)	5 ml Heparin-Lösung (25000 I.E./5ml) ad 100 ml NaCl-Lösung ad injectabilia
Lade-Puffer für die Gel- Elektrophorese	600 μl Glycerol 200 μl 2,5% Xylen-Cyanol-Lösung 1200μl DEPC-Wasser
Lysis-Puffer	5 ml Nucleic Acid Purification Lysis Solution ad 10 ml DEPC-Wasser
Puffer A	8,9 g di-Natriumhydrogenphophat ad 100 ml Aqua dest. pH 7,4
Puffer B:	0,953 g Kaliumdihydrogenphosphat 1,246 g di-Natriumhydrogenphophat 1,753 g Natriumchlorid pH 7,4
TAE-Puffer	100ml 10 X TAE-Puffer ad 1000 ml Aqua dest.
TE-Puffer pH 7,4	100 μl 1M Tris-Puffer pH 7,4 20 μl 0,5M EDTA-Lösung pH 8 ad 10 ml DEPC-Wasser
Xylen-Cyanol-Lösung 2,5%	91 mg Xylen-Cyanol ad 2 ml DEPC-Wasser

7.5 Erworbene Versuchs-Kits

7.5.1 RIA-Kits

ACTH	MP Biomedicals	Kat.Nr.: 07106101
Adiponektin	Linco	Cat. # MADP 60HK
Aldosteron	MP Biomedicals	Kat.Nr. 07108202
Angiotensin-II	Euro-Diagnostica	Kat.Nr.: RB 320
Corticosteron	MP Biomedicals	Kat.Nr. 07120102
Glukagon	Linco	Cat. # GL 32K
Insulin	Linco	Cat. # RI 13K
Leptin	Linco	Cal. # RL 83K

7.5.2 Kits zur Bestimmung der Gen-Expression

Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen (Kanada)
Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix- UDG with ROX	Invitrogen (Kanada)
Quant-iT [™] -RiboGreen [®] -RNA-Assay-Kit	Invitrogen (Kanada)
Scybr Green I Reaction System	Eurogentec SA (Deutschland)

7.6 Verbrauchsmaterialien

2/0 Faden Dagrofil [®]	B/Braun (Deutschland)
5-0 Faden Mopyten [®] monofil blau	Resorba (Deutschland)
6-0 Faden Mopyten [®] monofil blau	Resorba (Deutschland)
96-Well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems (UK)
Baumwoll Geschirrhandtuch	Wäscherei UK-SH (Deutschland)
Disposable Scalpel Gr: 10 und 11	Feather (Japan)
Drahtstifte 0,8 X 11 mm	Stabilit (Deutschland)
Durapora [™]	3M Health Care (Deutschland)
Einmalspritzen Discardit TM II 1ml und 2 ml	BD (Deutschland)
Filter tips 10,100,1000	Greiner bio one (Deutschland)
Filtersysteme für die ABI PRISAM 61000 Nucleic Acid PrepStation	Applied Biosystems (UK)

Glukoseteststreifen für Ascensia	Bayer (Deutschland)
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse	Altromin (Deutschland)
Isolierband (rot und blau)	Bauhaus (Deutschland)
Kanülen BD Microlance [™] 3 20GX1½"-Nr1 0,9X40	BD (Deutschland)
Kanülen BD Microlance [™] 3 23GX1"-Nr16 0,6X25	BD (Deutschland)
Kanülen BD Microlance [™] 3 26GX½" 0,45X13	BD (Deutschland)
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt (Deutschland)
Klingen Microtome blades	Leica (Deutschland)
Mikrovetten CB 300	Sarstedt (Deutschland)
Multiply PCR Plate 96 Well	Sarstedt (Deutschland)
Nahtklammern (Michel Suture Clips)	FST (Deutschland)
Nitril-Handschuhe, Nitra Tex	Ansell (Deutschland)
Osmotische Minipumpen (2ML4)	Alzet [®] (USA)
Parafilm	American National Can^{TM} (USA)
PE-Schlauch ID: 0,28 mm; AD: 0,61 mm	Portex Fine Bore Polyethylene Tubing REF 800/100/100; (UK)
PE-Schlauch ID: 0,58 mm; AD: 0,96 mm	Portex Fine Bore Polyethylene Tubing REF 800/100/200; (UK)
PP-test tubes 15 ml, 50 ml Cellstar®,	Greiner bio one (Deutschland)
Rasierklingen	Wilkinson Sword (Deutschland)
RIA Röhrchen	Greiner (Deutschland)
Save Lock Tubes (2; 1,5; 0,5 und 0,2 ml)	Eppendorf (Deutschland)
Tupfer Pure-Zellin	Paul Hartmann AG (Deutschland)
Vinyl-Einmalhandschuhe	Meditrade (Deutschland)
Wägepapier	Neolab
Watteträger	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG (Deutschland)

7.7 Geräte

Laborgeräte:

Adsorbex SPU Sample Prereration Unit Autoklav Blutzuckermessgerät Ascensia ELITE XL Eismaschine Scotsman AF 10 Gefriermikrotom CM 3050 Gefrierschrank (-80 ℃) Gefriertruhen (-20 ℃) Guillotine Kühlschränke (2-8℃) Magnetrührer IKA-Combimag RCT pH-Meter WTW ph 531 Plexiglas-Käfige $(25 \times 20 \times 22 \text{ cm})$ Rasierer Moser Styling II Rührfische Schüttel/Schwenkgerät REAX 2 Stoppuhr Ultra-Tourax 78 Vakuum-Verdampfer verschiedene Laborglasgeräte Vortex REAX 2000

Waagen:

Feinwaage BP 210 D	Sartorius (Deutschland)
Tierwaage	Sartorius (Deutschland)
Waage MC1 Laboratory LC220S	Sartorius (Deutschland)

Dargatz (Deutschland)

ELITE XL Bayer (Deutschland)

Scotsman (Deutschland)

Leica (Deutschland)

Colora (Deutschland)

Bosch (Deutschland)

Harvard Apparatus CO. Inc. Millis. Mass (USA)

Bosch (Deutschland)

Janke & Kunkel Gmbh & Co.KG (Deutschland)

WTW Weilheim (Deutschland)

Werkstatt UK-SH (Deutschland)

TSE (Deutschland)

Bohlende, Lauda-Königshofen (Deutschland)

Heidolph (Deutschland)

Junghans (Deutschland)

IKA-Werke (Deutschland)

Savant (Deutschland)

Heidolph (Deutschland)

Zentifugen:

Tischzentrifuge MIKRO 200R	Hettich (Deutschland)
Tischzentrifuge PCR-Labor	Eppendorf (Deutschland)
Zentrifuge PCR-Labor	Jouan (Deutschland)

HPLC-Anlage (ACE-Aktivitätsbestimmung):

L-6220 Intelligent Pump Merck	Hitachi Merck (Deutschland)
SIL 9-A Auto Injektor	Shimadzu (Deutschland)
HPLC-Säule: 3,9×150 mm Column, Nova Pak C18	Waters (USA)
RF-551 Spectofluoroetric Detector	Shimadzu (Deutschland)
D-2500 Chromato-Integrator mit Thermopapier	Hitachi Merck (Deutschland)

HPLC-Anlage (Katecholamin-Bestimmung):

Autosampler 717 plus	Walters (USA)
HPLC-Säule: 3,9×150 mm Column, Nova Pak C18	Walters (USA)
Walters Detektor M460	Walters (USA)
c-R4AX Chromatopac	Shimadzu (Deutschland)

Geräte zur Blutdruckmessung:

Messung über den Schwanz:

Blood pressure monitor 8002 dual,	TSE (Deutschland)
Piezoelemente	TSE (Deutschland)
Registrierteil 130 T mit Termopapier	Recomed (Deutschland)

Messung über Katheter:

Druckaufnehmer Stratham P23Db	Hellige (Deutschland)
DC Amplifier	Gould (Deutschland)
Pressure Processor	Gould (Deutschland)
PC mit AD-Wandler zur Datenaufnahme	

Geräte zur Bestimmung der Gen-Expression:

RNA-Isolierung: 6100 Nucleic Acid Prep Station	Applied Biosystems (USA)
PCR-Gerät: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems (USA)
FLUOstar OPTIMA Basisgerät 2003-8143	BMG LABTECH
Cycler für cDNA-Herstellung	Biometra (USA)

Geräte zur Gel-Elektrophorese:

Elektrophoresegerät Sub-Cell GT	BioRad (USA)
Power Pac 300	BioRad (USA)
Mikrowelle (zum Aufkochen von Aggarose)	Cortina (Deutschland)

Geräte für RIA-Versuche:

Gamma-Counter: Compugamma 1282 CS	Wallac (USA)
Membranpumpe UVS 400 A	Savant (Deutschland)
Minifuge RF	Heraeus sepatech (Deutschland)

7.8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent; Teile von 100
®	"Registered in U.S. Patent and Trademark Office"; geschützter Warenname
\mathfrak{O}	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μm	Mikrometer
3T3-L1	Fettzelllinie
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AD	Außendurchmesser
ADX	adrenalektomiert
AF	Arteria femoralis
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
Ang	Angiotensin-II
AT₁-Rezeptor	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptor
AUC	Fläche unter der Kurve; "Area under the curve"
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
	CITA
CCD	Charge-coupled Device
CCD cDNA	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure
CCD cDNA cm	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter
CCD cDNA cm C _{max}	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter maximale Konzentration
CCD cDNA cm C _{max} CRH	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter maximale Konzentration Corticotropin-Releasing-Hormone
CCD cDNA cm C _{max} CRH C _T	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter maximale Konzentration Corticotropin-Releasing-Hormone Schwellenwertzyklus
CCD cDNA cm C _{max} CRH C _T CYP11B1	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter maximale Konzentration Corticotropin-Releasing-Hormone Schwellenwertzyklus 11β-Hydroxylase
CCD cDNA cm C _{max} CRH C _T CYP11B1 CYP11B2	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter maximale Konzentration Corticotropin-Releasing-Hormone Schwellenwertzyklus 11β-Hydroxylase Aldosteron-Synthase
CCD cDNA cm C _{max} CRH C _T CYP11B1 CYP11B2 d	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter maximale Konzentration Corticotropin-Releasing-Hormone Schwellenwertzyklus 11β-Hydroxylase Aldosteron-Synthase Tag; "day"
CCD cDNA cm C _{max} CRH C _T CYP11B1 CYP11B2 d DEPC	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter maximale Konzentration Corticotropin-Releasing-Hormone Schwellenwertzyklus 11β-Hydroxylase Aldosteron-Synthase Tag; "day" Diethylpyrocarbonat
CCD cDNA cm C _{max} CRH C _T CYP11B1 CYP11B2 d DEPC dest.	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter maximale Konzentration Corticotropin-Releasing-Hormone Schwellenwertzyklus 11β-Hydroxylase Aldosteron-Synthase Tag; "day" Diethylpyrocarbonat destilliert
CCD cDNA cm C _{max} CRH C _T CYP11B1 CYP11B2 d DEPC dest. DNA	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter maximale Konzentration Corticotropin-Releasing-Hormone Schwellenwertzyklus 11β-Hydroxylase Aldosteron-Synthase Tag; "day" Diethylpyrocarbonat destilliert Desoxyribonukleinsäure
CCD cDNA cm C _{max} CRH C _T CYP11B1 CYP11B2 d DEPC dest. DNA dsDNA	Charge-coupled Device complementäre Desoxyribonukleinsäure Zentimeter maximale Konzentration Corticotropin-Releasing-Hormone Schwellenwertzyklus 11β-Hydroxylase Aldosteron-Synthase Tag; "day" Diethylpyrocarbonat destilliert Desoxyribonukleinsäure doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
CCD cDNA cm C _{max} CRH C _T CYP11B1 CYP11B2 d DEPC dest. DNA dsDNA DTT	Charge-coupled Devicecomplementäre DesoxyribonukleinsäureZentimetermaximale KonzentrationCorticotropin-Releasing-HormoneSchwellenwertzyklus11β-HydroxylaseAldosteron-SynthaseTag; "day"DiethylpyrocarbonatdestilliertDesoxyribonukleinsäuredoppelsträngige DesoxyribonukleinsäureDithiothreitol
CCD cDNA cm C _{max} CRH C _T CYP11B1 CYP11B2 d DEPC dest. DNA dsDNA DTT EDTA	Charge-coupled Devicecomplementäre DesoxyribonukleinsäureZentimetermaximale KonzentrationCorticotropin-Releasing-HormoneSchwellenwertzyklus11β-HydroxylaseAldosteron-SynthaseTag; "day"DiethylpyrocarbonatdestilliertDesoxyribonukleinsäuredoppelsträngige DesoxyribonukleinsäureDithiothreitolEthylendiamintetraessigsäure

g	Gramm
${f g}$ (im Zusammenhang mit Zentrifugationen)	Erdbeschleunigung
Gi	Inhibitorischer G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanin-Nukleotid bindendes Protein
Gq	G-Protein gekoppelter Rezeptor mit Phospholipase C als Effektor
GSH	Glutathion
h	Stunde; "hour"
HCI	Salzsäure
HF	Herzfrequenz
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren- Achse
HPLC	High pressure liquid chromatography
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intra-peretoneal
i.v.	intra-venös
icv	intracerebroventriculär
ID	Innendurchmesser
IDF	"International Diabetes Federation"
J-125	Jod ¹²⁵
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
K _i	Inhibitionskonstante
kJ	Kilo Joule
I	Liter
Lsg.	Lösung
LVG	Linksventrikuläres Gewicht
М	Molar
mA	Milliampher
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MC2-R	ACTH-Rezeptor
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Stichproben

Ν	Normalität
n.s.	nicht signifikant
n.d.	nicht detektierbar
Na	Natrium
NaH ₂ PO ₄	Natrium-Dihydrogen-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NN	Nebennieren
р	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.o.	per os
PCR	Polymerase Kettenreaktion; "Polymerase chain reaction"
PE	Polyethylen
pmol	Picomol
POMC	Proopiomelanocortin
PP	Polypropylen
PTP 1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
PTP N1	Protein-Tyrosin-Phosphatase N1
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RIA	Radio Immuno Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sekunden
S.C.	subkutan
SBP	systolischer Blutdruck
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sham	zum Schein operiert
SHR	Spontan hypertensive Ratte
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
Tab.	Tabelle
t _{max}	Zeitpunkt des Maximums
Tris	Trishydroxymethylamoniummethan
U/min	Umdrehungen in der Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen/Volumen
VF	Vena femoralis
VS.	versus; im Vergleich zu
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation
ΔC_{max}	Differenz zwischen Basalwert und Maximal- Wert

8 Danksagung

Ich danke dem ehemaligen Instituts-Direktor Herrn Prof. Dr. med. P. Dominiak und dem zurzeit kommissarischen Instituts-Direktor Herrn Prof. Dr. med. W. Solbach für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie der Universität zu Lübeck.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Raasch für die hervorragende Betreuung und Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit, für seine offene und konstruktive Kritik sowie für so manchen guten Ratschlag.

Herrn PD Dr. O. Jöhren möchte ich für die Beratung bei der Durchführung der "real-time-PCR" danken.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. K. Paulus und Frau Dr. rer. nat. C. Schulz für das Demonstrieren und Lehren der Adrenalektomie.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. med. F. Stellmacher (ehemals beschäftigt am Institut für Phathologie der Universität zu Lübeck) für seine Hilfe im Rahmen der histologischen Untersuchungen.

Danke an Frau A. Kaiser für die sehr gute Einarbeitung in die Labor-, Analyse- und Operationstechniken und für ihre Unterstützung bei deren Durchführung.

Allen Mitarbeitern, Doktoranden und Studenten des Instituts danke ich für die kollegiale und sehr nette Zusammenarbeit, insbesondere Frau G. Vierke und Frau C. Eichholz für die Unterstützung während des experimentellen Teils der Arbeit, den Doktoranden Frau A. Miesel und Herrn S. Werth, für die tolle Zusammenarbeit, die große Diskussionsbereitschaft und so manche willkommene Ablenkung.

Ich danke meinen Eltern, ohne die ich nie soweit gekommen wäre.

Darüber hinaus danke ich besonders meiner Lebensgefährtin Britta Fielitz für die mentale und liebevolle Unterstützung außerhalb des Labors.

9 Curriculum vitae

Name: Vorname: Geburtstag: Geburtsort: Nationalität: Familienstand: Müller Helge 21. November 1978 Kiel deutsch ledig



Schulbildung:

1985-1989	Grundschule in Kiel
1989-1995	Realschule in Kiel
Mai 1995	Realschulabschluss
1995-1998	Technisches Fachgymnasium in Kiel
Juni 1998	Abitur

Studium:

WS 1999 / 2000	Beginn des Pharmaziestudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Juli 2001	I. Staatsexamen
November 2003	II. Staatsexamen
Januar 2004-Dezember 2004	Praktisches Jahr im Städtischen Krankenhaus Kiel sowie in der Esmarch-Apotheke, Kiel
Februar 2005	III. Staatsexamen und Erhalt der Approbation als Apotheker

Beruflicher Werdegang:

Seit April 2005

Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck, gleichzeitiger Beginn der Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. rer nat. W. Raasch

10 Veröffentlichungen

10.1 Poster

- H. Müller, P. Dominiak, and W. Raasch. 2009. Long term treatment with angiotensin II does not induce alterations in glucose utilisation in obese Zucker rates. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 379 Supp.1 35-35.
- Miesel, A., H. Müller, P. Dominiak, and W. Raasch. 2008. Glucose utilization, body weight and blood pressure are differentially regulated in various rat strains after high caloric feeding regimes. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 377:59-59.
- Müller, H., O. Jöhren, F. Stellmacher, P. Dominiak, and W. Raasch. 2008. The blood pressure response to angiotensin II is enhanced in obesity and is attributed to an aldosterone-dependent mechanism. Journal of Hypertension **26**:S525-S525.
- Müller, H., J. Kröger, O. Jöhren, M. Bader, P. Dominiak, and W. Raasch. 2008. The stress sensitivy is increased in the brain specific angiotensinogen deficient transgenic rat. Journal of Hypertension **26**:S84-S84.
- Raasch, W., J. Kröger, H. Müller, O. Jöhren, M. Bader, and P. Dominiak. 2007. The stress sensitivy is increased in the brain specific angiotensinogen deficient transgenic rat. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 375:47-47.

10.2 Kurz-Vorträge

- Miesel, A., H. Müller, P. Dominiak, and W. Raasch. 2009. Blood pressure normalizing doses of an AT₁-blocker improve glucose utilisation and reduce weight gain in rats with metabolic syndrome as potent as the combination AT₁-blocker/ACE-inhibitor. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology **379 Supp.1 35-35**.
- Müller, H., P. Dominiak, and W. Raasch. 2008. The glucose utilization is impaired by angiotensin II in leptin resistant Zucker rats due to an adrenal mechanism. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 377:39-39.

- Müller, H., O. Jöhren, P. Dominiak, and W. Raasch. 2007. The angiotensin Ilinduced blood pressure response is increased in adipose sugar rats and based on a aldosterone-dependent mechanism. Deutsche Medizinische Wochenschrift **132**:S3-S3.
- Müller, H., O. Jöhren, P. Dominiak, and W. Raasch. 2007. Enhanced alosterone and blood pressure response to angiotensin II in obese zucker rats. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology **375**:46-47.
- Müller, H., N. Schweitzer, O. Jöhren, M. Wuttke, P. Dominiak, and W. Raasch. 2006. The angiotensin II induced increase of plasma glucose during OGTT in prediabetic zucker rats is associated with a stimulation of hypothalamuspituitary-adrenal axis reactivity. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 372:68-68.

10.3 Vorträge

Müller, H., W.Raasch. 2009. Die Interaktion des RAAS mit der HPA-Achse und deren Bedeutung für das Metabolische Syndrom. Vortrag im Rahmen des LUCIE - Luebeck University Club of Integrative Endocrinology.

10.4 Publikationen

- Müller, H., N. Schweitzer, O. Jöhren, P. Dominiak, and W. Raasch. 2007. Angiotensin II stimulates the reactivity of the pituitary-adrenal axis in leptinresistant Zucker rats, thereby influencing the glucose utilization. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 293:E802-E810.
- Müller, H., O. Jöhren, F. Stellmacher; P. Dominiak, and W. Raasch. 2009. Blood pressure response to Angiotensin-II is enhanced in obese Zucker rats and is attributed to an aldosterone-dependent mechanisam. Journal of Hypertension; in revision.
- Miesel, A.; **H. Müller**, M.; Thermann, M. Heidbreder, P. Dominiak, and W. Raasch. 2009. Overfeeding-induced obesity in spontaneosly hypertensive rates: a patient-releated animal model for metabolic syndrome. Annals of Nutrition and Metabolisam ; **in revision**.

Müller, H., J. Kröger, O. Jöhren, S. Szymczak, M. Bader, P. Dominiak, and W. Raasch. 2009. Stress sensitivity is increased in transgenic rats with low brain angiotensinogen; **submitted**

10.5 Preise und Auszeichnungen

- Young investigator Auszeichnung 2007 der Hochdruckliga, im Rahmen der Liga-Tagung in Bochum 2007. Ausgezeichnet wurde der Kurzvortrag: The angiotensin II-induced blood pressure response is increased in adipose sugar of rats and based on a aldosteronedependent mechanism.
- Posterpreis 2007 im Rahmen der Veranstaltung Uni im Dialog.
 Ausgezeichnet wurde das Poster mit dem Titel: Einfluss von Stress auf die Entstehung eines Typ-2 Diabetes bei Adipositas.