

**Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Professor Dr. med. Hendrik Lehnert**

**Effekt des sympathischen Nervensystems
auf die endokrine Fettgewebefunktion:
Akute Sympathikusexzitation reduziert die Adiponektin-
Plasmaspiegel bei Menschen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Eike Tilman Wenzel

aus Lübeck

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Johannes Klein

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Andreas Böhle

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2010

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.11.2010

Meinen Eltern und Großmüttern

„Carpe viam, et susceptum perfice munus.“
(Vergil)

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen	V
Verzeichnis der Abbildungen	VI
Verzeichnis der Tabellen	VII
Publikationsliste.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 ADIPOSITAS ALS KERNKOMPONENTE DES METABOLISCHEN SYNDROMS: EPIDEMIOLOGIE EINER BEDROHLICHEN PANDEMIE	1
1.2 KLASSISCHE UND NEUE SICHTWEISEN DES FETTGEWEBES.....	3
1.3 IMPLIKATIONEN DES SYMPATHISCHEN NERVENSYSTEMS IN DER PATHOGENESE DES METABOLISCHEN SYNDROMS.....	5
1.4 STUDIENLAGE, FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	7
2 Material und Methoden.....	9
2.1 STUDIENABLAUF UND PROBANDENREKRUTIERUNG.....	9
2.1.1 Studienablauf	9
2.1.2 Probandenrekrutierung, Votum der Ethikkommission	9
2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien	10
2.2 STUDIENDESIGN UND PROTOKOLL.....	11
2.2.1 Experimentelles Setup	11
2.2.2 Versuchsprotokoll Kälte-stimulierte Gruppe	11
2.2.3 Versuchsprotokoll Kontrollgruppe.....	13
2.3 SNS-STIMULATION MITTELS KÄLTE-EXPOSITION.....	14
2.3.1 Materialien	14
2.3.2 Durchführung.....	14
2.4 MESSUNGEN.....	15
2.4.1 Anthropometrische Messungen.....	15
2.4.1.1 Materialien.....	15
2.4.1.2 Durchführung.....	15
2.4.2 Messung der Vitalparameter	15
2.4.2.1 Materialien.....	15

2.4.2.2	Durchführung.....	16
2.4.3	Messung des subjektiven Kälteempfindens und der Kälteintensität.....	16
2.5	BLUTUNTERSUCHUNGEN.....	17
2.5.1	Materialien.....	17
2.5.2	Blutprobengewinnung.....	17
2.5.3	Blutentnahme für die Bestimmung der Katecholamin- Konzentrationen	19
2.5.3.1	Materialien.....	19
2.5.3.2	Probengewinnung und Präanalytik.....	19
2.5.4	Präanalytik: Verarbeitung, Transport und Lagerung der Blutproben.....	20
2.5.4.1	Materialien.....	20
2.5.4.2	Durchführung.....	20
2.6	BESTIMMUNG DER ADIPOKIN-KONZENTRATIONEN	21
2.6.1	Materialien.....	22
2.6.2	Lagerung	22
2.6.3	Prinzip des ELISA	22
2.6.3.1	Amplifikationsprinzip des IL-6 HS ELISA.....	23
2.6.4	Durchführung.....	23
2.6.5	Berechnung der Konzentrationen aus der optischen Dichte	24
2.6.6	Intra- und interassay Präzision	25
2.7	GEWINNUNG SUBKUTANER ADIPOZYTEN MITTELS FETTGEWEBESBIOPSIEN.....	25
2.7.1	Materialien.....	25
2.7.2	Aufklärung	26
2.7.3	Durchführung.....	26
2.7.4	Ausbeute, Komplikationen und Nachsorge	27
2.7.5	Präanalytik: Probenverarbeitung, Transport und Lagerung.....	28
2.8	RNA-ISOLATION	29
2.8.1	Materialien.....	29
2.8.2	Prinzip	29
2.8.3	Durchführung.....	29

2.9	cDNA-SYNTHESE	31
2.9.1	Materialien.....	31
2.9.2	Durchführung.....	31
2.10	REAL TIME POLYMERASE-KETTEN-REAKTION	31
2.10.1	Materialien.....	31
2.10.2	Durchführung.....	32
2.11	DATENDOKUMENTATION, -VERARBEITUNG UND STATISTIK	34
3	Ergebnisse	35
3.1	ANTHROPOMETRISCHE DATEN, KLINISCHE CHARAKTERISTIKA UND LABORPARAMETER ZU VERSUCHSBEGINN	35
3.2	EFFEKT DER KÄLTE-EXPOSITION AUF DIE KÖRPERTEMPERATUR	36
3.3	EFFEKT DER KÄLTE-EXPOSITION AUF DAS INDIVIDUELLE KÄLTEEMPFINDEN	37
3.4	KARDIOVASKULÄRE ANTWORT AUF DEN KÄLTESTIMULUS.....	38
3.4.1	Systolischer und diastolischer Blutdruck	38
3.4.2	Herzfrequenz.....	39
3.5	EFFEKT DER KÄLTE-STIMULATION AUF DAS SYMPATHISCHE NERVENSYSTEM	40
3.5.1	Noradrenalin.....	40
3.5.2	Adrenalin	41
3.6	VERÄNDERUNGEN DES ADIPOKINPROFILS DURCH STIMU- LATION DES SYMPATHISCHEN NERVENSYSTEMS	41
3.6.1	Leptin	42
3.6.2	Adiponektin	43
3.6.3	Interleukin-6.....	45
3.6.4	Monozyten-chemoattraktives Protein-1	47
3.6.5	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	49
3.7	WEITERE ENDOKRINOLOGISCHE PARAMETER.....	50
4	Diskussion.....	53
4.1	METHODISCHE DISKUSSION.....	53
4.2	VERÄNDERUNGEN DER VITALPARAMETER	54

4.3	EFFEKT DER KÄLTE-EXPOSITION AUF DAS SYMPATHISCHE NERVENSYSTEM	56
4.4	ALTERATIONEN IM ADIPOKINPROFIL	57
4.4.1	Leptin	57
4.4.2	Interleukin-6.....	58
4.4.3	Monozyten-chemoattraktives Protein-1	60
4.4.4	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	60
4.4.5	Adiponektin.....	61
4.5	SCHLUSSBEMERKUNGEN	63
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis.....	66
7	Anhänge: Probenentnahmeplan.....	81
	Halbwertszeiten der Adipokine.....	82
8	Danksagungen	83
9	Curriculum vitae	84
10	Eidesstattliche Erklärung.....	86

Verzeichnis der Abkürzungen

ACTH	•	Adreno-Corticotropes Hormon (Corticotropin)
ATP III	•	<i>Adult Treatment Panel III</i>
11 β -HSD-1	•	11- <i>beta</i> -Hydroxysteroiddehydrogenase-1
BMI	•	<i>Body Mass Index</i>
CRP	•	C-reaktives Protein
CV	•	Variationskoeffizienten
DTT	•	1,4-Dithiotheitrol
EDTA	•	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	•	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
fT3	•	freies Trijodthyronin
fT4	•	freies Thyroxin
HDL	•	<i>High-Density-Lipoprotein</i>
HPRT	•	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HWZ	•	Halbwertszeit
IDF	•	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-6	•	Interleukin-6
LDL	•	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
MCP-1	•	Monozyten-chemoattraktives Protein-1
MONICA	•	<i>Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease</i>
NADH	•	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	•	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCEP	•	<i>National Cholesterol Education Program</i>
PCR	•	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PTT	•	Partielle Thromboplastinzeit
RIA	•	<i>Radioimmunoassay</i>
RNA	•	Ribonukleinsäure
SNS	•	Sympathisches Nervensystem
TSH	•	Thyreidea-stimulierendes Hormon (Thyreotropin)
UK S-H	•	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VEGF	•	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	•	<i>World Health Organization</i>

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1	• Endokrine Funktionen des Fettgewebes.....	5
Abbildung 2	• Versuchsaufbau.....	11
Abbildung 3	• SNS-Stimulation mittels Kälte-Exposition.....	14
Abbildung 4	• Blutprobengewinnung.....	18
Abbildung 5	• Abdominell-subkutane Fettgewebsbiopsie.....	27
Abbildung 6	• Aufreinigung der Fettgewebsbiopsate - RNA-Isolation.....	30
Abbildung 7	• Effekt der Kälte-Stimulation auf die Körpertemperatur.....	36
Abbildung 8	• Effekt der Kälte-Stimulation auf das individuelle Temperaturempfinden.....	37
Abbildung 9	• Effekt der Kälte-Stimulation auf den Blutdruck.....	38
Abbildung 10	• Effekt der Kälte-Stimulation auf die Herzfrequenz.....	39
Abbildung 11	• Effekt der Kälte-Stimulation auf die Noradrenalin- Plasmakonzentrationen.....	40
Abbildung 12	• Effekt der Kälte-Stimulation auf die Adrenalin- Plasmakonzentrationen.....	41
Abbildung 13	• Effekt der SNS-Stimulation auf die Leptin-Sekretion.....	42
Abbildung 14	• Effekt der SNS-Stimulation auf die Leptin-Genexpression.....	43
Abbildung 15	• Effekt der SNS-Stimulation auf die Adiponektin-Sekretion..	44
Abbildung 16	• Effekt der SNS-Stimulation auf die Adiponektin- Genexpression.....	45
Abbildung 17	• Effekt der SNS-Stimulation auf die IL-6-Sekretion.....	46
Abbildung 18	• Effekt der SNS-Stimulation auf die IL-6-Genexpression....	47
Abbildung 19	• Effekt der SNS-Stimulation auf die MCP-1-Sekretion.....	48
Abbildung 20	• Effekt der SNS-Stimulation auf die MCP-1-Genexpression.....	48
Abbildung 21	• Effekt der SNS-Stimulation auf die VEGF-Sekretion.....	49
Abbildung 22	• Effekt der SNS-Stimulation auf die VEGF-Genexpression.	50
Abbildung 23	• Effekt der SNS-Stimulation auf die CRP-Genexpression...	52

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	•	Definitionskriterien des metabolischen Syndroms.....	1
Tabelle 2	•	Klassifikation der Adipositas.....	2
Tabelle 3	•	Inter- und intrassay Präzision der durchgeführten ELISA.....	25
Tabelle 4	•	Anthropometrische Daten und Lipidprofil.....	35
Tabelle 5	•	Endokrinologische Parameter zu Versuchsbeginn und nach 120 Minuten.....	51
Tabelle 6	•	Probenentnahmeplan.....	81
Tabelle 7	•	Halbwertszeiten der untersuchten Adipokine.....	82

Publikationsliste

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen und Präsentationen hervorgegangen:

- März 2010 **Eike T. Wenzel***, **K. Alexander Iwen***, **Volker Ott***, **Nina Perwitz**, **Peter Wellhöner**, **Hendrik Lehnert**, **Christoph Dodt**, **Johannes Klein**: Cold-induced alteration of adipokine profile in humans. *Metabolism* (2010)
* = gleichberechtigte Erstautoren; eingereicht am 30.09.2009, akzeptiert am 17.03.2010
- Juni 2005 **Ott V, Wenzel ET, Perwitz N, Kraus D, Wellhoener JP, Fasshauer M, Dodt C, Klein J**: Acute Activation of the Sympathetic Nervous System Induces Expression and Secretion of Adipokines Implicated in Inflammation and Insulin Resistance in Humans.
Posterpräsentation, P3 – 196, 87th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego, USA (2005)
- Mai 2005 **Ott V, Wenzel ET, Perwitz N, Kraus D, Wellhoener JP, Fasshauer M, Dodt C, Klein J**: Akute Sympathikusexzitation induziert ein proinflammatorisches und Insulinresistenz begünstigendes Adipokin-Profil beim Menschen.
Vortrag auf dem Kongress der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Berlin; publiziert in Diabetes und Stoffwechsel 14, 45 (2005)

1 Einleitung

1.1 ADIPOSITAS ALS KERNKOMPONENTE DES METABOLISCHEN SYNDROMS: DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE EINER BEDROHLICHEN PANDEMIE

Unter dem metabolischen Syndrom - auch als tödliches Quartett, Reaven-Syndrom, Wohlstandssyndrom oder Syndrom X bekannt - wird das gemeinsame Auftreten von Übergewicht bzw. Adipositas, Insulinresistenz, Fettstoffwechselstörungen und Bluthochdruck verstanden. Eine allgemein akzeptierte Definition gibt es bislang nicht. Den verschiedenen Organisationen entsprechend orientiert sich die Klassifikation dieses Symptomkomplexes entweder an der Insulinresistenz (Insulinresistenzsyndrom, WHO-Klassifikation 1999) oder dem Vorhandensein einer charakteristischen Fettleibigkeit (Klassifikation der *International Diabetes Federation* und des *National Cholesterol Education Program on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults*). Abbildung 1 liefert einen Überblick über die unterschiedlichen Definitionskriterien.

	WHO ¹	IDF ²	NCEP-ATP-III ³
Hauptkriterien	• Diabetes mellitus • Gestörte Glukosetoleranz • Pathologischer Nüchternblutzucker bzw. Insulinresistenz	• Adipositas	• abdominelle Adipositas • Dyslipidämie • Bluthochdruck • Diabetes mellitus [mind. 3 Kriterien]
Nebenkriterien	• Bluthochdruck • Dyslipidämie • Viszerale Adipositas • Mikroalbuminurie [mind. 2 Kriterien]	• Diabetes mellitus • Dyslipidämie • Bluthochdruck [mind. 2 Kriterien]	

Tabelle 1: Definitionskriterien des metabolischen Syndroms. Abhängig von der jeweiligen Fachorganisation ist der Hauptrisikofaktor entweder die Insulinresistenz oder das Vorliegen einer bauchbetonten Adipositas. Definitionsgemäß müssen weiterhin noch die dargestellten Risikofaktoren bestehen: ¹ Blutdruck > 140/90 mmHg, Triglyzeride > 1,695 mmol/L und HDL ≤ 0,9 mmol/L bei ♂ bzw. ≤ 1,0 mmol/L bei ♀, Verhältnis von Taillen- zu Hüftumfang > 0,9 bei ♂ bzw. > 0,85 bei ♀ und/oder ein BMI > 30 kg/m², Albuminurie über ≥ 20 mg/min oder ein Verhältnis von Albumin zu Kreatinin ≥ 30 mg/g. ² Taillenumfang ≥ 94 cm bei ♂ bzw. ≥ 80 cm bei ♀, Nüchternblutzuckerwerte von > 110 mg/dl, Triglyzeride > 150 mg/dl und HDL-Cholesterin < 40 mg/dl bei ♂ bzw. < 50 mg/dl bei ♀, Blutdruck > 130/85. ³ Taillenumfang ≥ 102 cm bei ♂ bzw. ≥ 88 cm bei ♀; Triglyzeride > 150 mg/dL, HDL-Cholesterin < 40 mg/dL (♂) bzw. < 50 mg/dL (♀), Blutdruck ≥ 135/85 mmHg, Nüchternblutzucker von > 110 mg/d.

Einzelnen betrachtet ist jede Komponente des metabolischen Syndroms bereits ein Risiko für schwere kardiovaskuläre Erkrankungen; durch ein gemeinsames Auftreten wird dieses Risiko noch potenziert. Damit ist das metabolische Syndrom weltweit zu einem bedeutenden und bedrohlichen Gesundheitsproblem geworden und hat in den industrialisierten Ländern mittlerweile pandemische Ausmaße erreicht (Kopelmann, 2000). Vor allem die damit verbundenen kardiovaskulären Komplikationen, die Hauptrisikofaktoren für lebensbedrohliche Erkrankungen wie Herzinfarkte, Schlaganfälle und auch Krebserkrankungen darstellen, führen die Mortalitätsstatistiken der industrialisierten Welt an (Fasshauer *et al.*, 2004[a]).

Verbunden mit den sich ändernden Ernährungs- und Lebensgewohnheiten, die mit verminderter physischer Aktivität einhergehen, verzeichnen Adipositas und Übergewicht als zentrale Komponenten dieses Syndroms ebenfalls höchste Wachstumsraten (Boehm *et al.*, 2005).

Adipositas wird klassifiziert durch den Body Mass Index [BMI: Gewicht in (kg) durch das Quadrat der Körpergröße in (m^2)]. Dieser korreliert ebenso wie der Bauchumfang mit der Körperfettmasse. Die WHO hat Adipositas sowie das entsprechende Risiko für assoziierte Folgeerkrankungen folgendermaßen eingeteilt:

Adipositas-Grad	BMI (kg/m^2)	Risiko für Folgeerkrankungen
Normalgewicht	18 - 24,9	durchschnittlich
Übergewicht	25 - 29,9	leicht erhöht
Adipositas 1. Grades	30 - 34,9	erhöht
Adipositas 2. Grades	35 - 39,9	stark erhöht
Adipositas 3. Grades	> 40	sehr stark erhöht

Tabelle 2: Klassifikation der Adipositas. Hrsg. WHO Consultation on Obesity, Genf, Juni 1997

Die im Jahre 1997 erhobene MONICA-Studie der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ergab eine Prävalenz der Adipositas von 18% bis 24% in Deutschland (WHO Consultation on Obesity, Genf 1997). Aktuellere Studien beschreiben sogar, dass in Deutschland die Prävalenz bei Erwachsenen auf 25% (Männer) bzw. 23% (Frauen) und bei Kindern auf 6% gestiegen ist; alleine 46% der Männer und 31% der Frauen sind mit einem BMI > 25 kg/m^2 übergewichtig (Gellner und Domschke, 2008; Hauner *et al.*, 2008). Noch drastischere Zahlen berichtet die

International Association for study of Obesity (IASO); hier sind sogar 75% der deutschen Männer und 59% der deutschen Frauen im Jahre 2007 übergewichtig. Damit ist Deutschland führend in Europa (Prävalenzrate der Adipositas von 16%) und wird nur von den USA mit einer Prävalenzrate von 33% aller Erwachsenen übertroffen (Gellner und Domschke, 2008).

Die menschliche Körperform war schon immer die zentrale Komponente unseres Schönheitsideals, das sich im Laufe der Zeit beträchtlich gewandelt hat. Symbolisierten früher üppige Formen Fruchtbarkeit, Ursprünglichkeit und Vollkommenheit, gelten Übergewichtige heute als unattraktiv. Fettleibigkeit ist jedoch nicht nur ein ästhetisches Problem; vielmehr ist sie als zentrale Komponente des metabolischen Syndroms zu einem bedeutenden Gesundheitsproblem geworden. Nach jahrzehntelangem, kontinuierlichem Anstieg der Lebenserwartung in der industrialisierten Welt wächst nun eine Generation heran, deren Lebenserwartung durch Adipositas-assoziierte Erkrankungen geringer werden könnte als die der Eltern und Großeltern. Adams *et al.* beschreiben eine deutlich verkürzte Lebenserwartung durch Adipositas, was bei einer morbidem Adipositas (Adipositas Grad III) bis zu 20 Jahre bedeuten kann (Adams *et al.*, 2006).

Adipositas ist nicht nur von klinischer, sondern auch von größter ökonomischer Bedeutung (Wolf und Colditz, 1998; Anderson *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). So führen die assoziierten Komplikationen zu Ausgaben von etwa 5,7% des amerikanischen und 5% des deutschen Gesundheitswesens (Wolf und Colditz, 1998; Deutsche Adipositas Gesellschaft, 2010). Eine amerikanische Studie prophezeit, dass bei Fortschreiten der größten Pandemie der modernen Medizingeschichte (Perwitz *et al.*, 2004) bis zum Jahr 2030 86% der amerikanischen Bevölkerung adipös oder übergewichtig sein werden; bis 2048 könnten 100% betroffen sein. Dieser Trend würde zu einer Verdopplung der Gesundheitskosten pro Dekade führen (Wang *et al.*, 2008).

1.2 KLASSISCHE UND MODERNE SICHTWEISEN DES FETTGEWEBES

Das Fettgewebe ist ein komplexes und dynamisches Organ mit pleiotropen Funktionen in verschiedenen physiologischen Prozessen. Neben einer Kollagenmatrix sowie Blutgefäßen, Nerven-, Immun- und Stromazellen enthält es vor allen Dingen Adipozyten, die bioaktive Faktoren mit bedeutenden endokrinen

Funktionen exprimieren und sezernieren. 1994 wurde durch die Entdeckung von Leptin als erstem Fettgewebshormon die Sicht des Fettgewebes revolutioniert. Galt es bis dato hauptsächlich als passives Organ zur Speicherung bzw. Verbrennung von Energie in Form von Triglyzeriden, wurde zunehmend begriffen, dass es sich hierbei um ein hochaktives endokrines Organ und den Hauptregulator des Körpergewichts sowie der Energiehomöostase handelt (Kraus *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2006). Weiterhin hat das Fettgewebe wesentliche Einflüsse auf das Immunsystem sowie auf Hämostase und Atherosklerose. Es produziert eine Vielzahl von Hormonen und Zytokinen, bezeichnet als Adipokine, die zur Regulation von Kernkomponenten des metabolischen Syndroms wie Adipositas, Insulinresistenz bzw. Diabetes und Hypertonus beitragen (Fruhbeck *et al.*, 2001; Kershaw und Flier, 2004). Neben den efferenten Signalen exprimieren Adipozyten auch zahlreiche Rezeptoren, die eine Korrespondenz mit afferenten Signalen auch des zentralen Nervensystems erlauben (Kershaw und Flier, 2004). Einige dieser Adipokine besitzen positive metabolische Effekte. So führen beispielsweise Adiponektin zu einer Steigerung der Insulinsensitivität und Leptin mit seiner anorexigenen (appetithemmenden) Wirkung zu einer negativen Energiebilanz mit Gewichtsverlust (Gualillo *et al.*, 2007). Die Majorität der Adipokine, wie z.B. IL-6, MCP-1 und VEGF, die bei Adipositas in erhöhten Konzentrationen vorkommen, besitzt jedoch proinflammatorische, diabetogene und angiogene Wirkungen. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Pleiotropie dieses dynamischen Organs. Auf die einzelnen physiologischen Funktionen der untersuchten Adipokine wird im Diskussionsteil dieser Arbeit näher eingegangen.

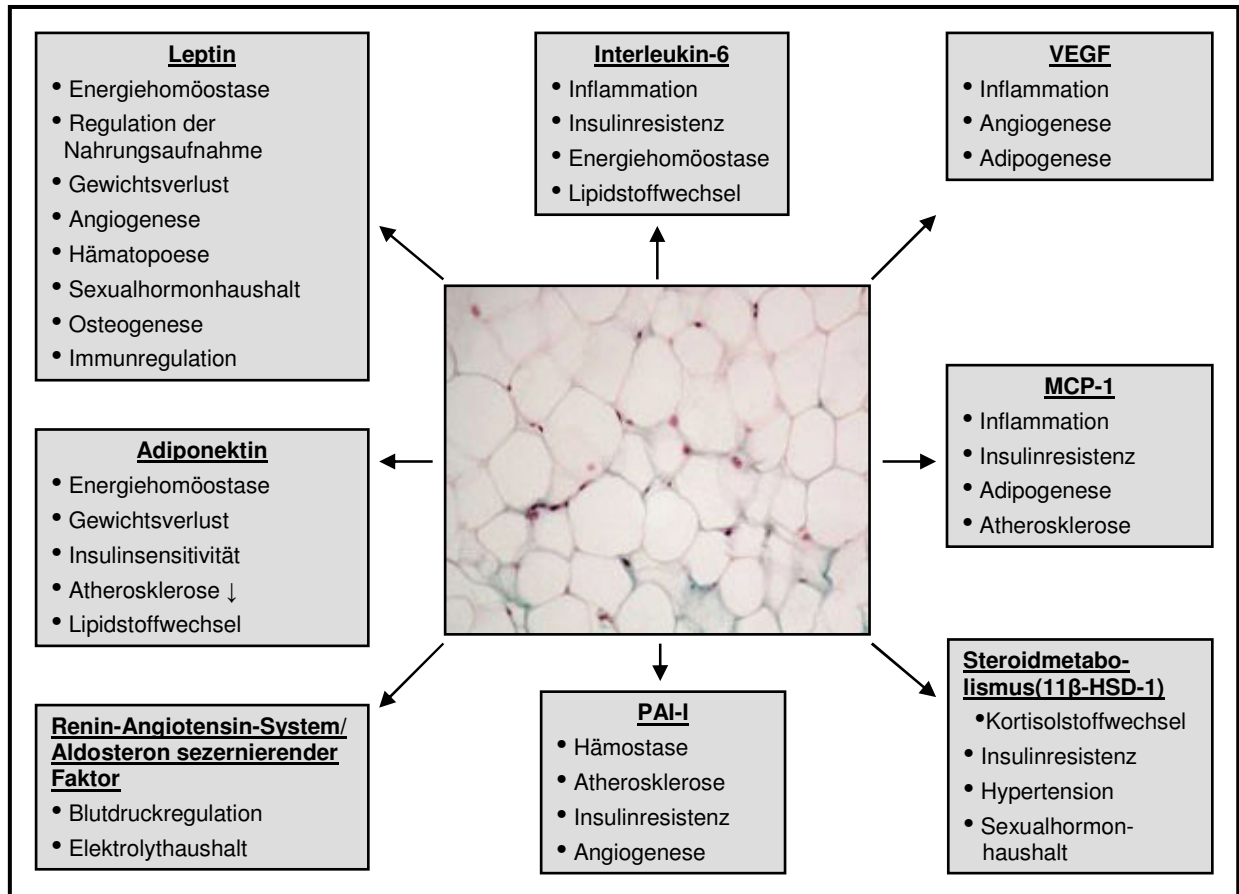


Abbildung 1: Adipokine und ihre physiologischen Funktionen. Die Produktion zahlreicher Faktoren, einschließlich des den Glukokortikoidstoffwechsel regulierenden Enzyms 11 β -HSD-1, indiziert pleiotrope Effekte des Fettgewebes in der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse wie Energie- und Glukosehomöostase, Insulinresistenz, Inflammation, Hämostase, Angio- und Adipogenese sowie im Wasser-/Salz- und Sexualhormonhaushalt.

1.3 IMPLIKATIONEN DES SYMPATHISCHEN NERVENSYSTEMS IN DER PATHOGENESE DES METABOLISCHEN SYNDROMS

Das SNS ist ein Teil des vegetativen Nervensystems, welches mit ergotropen Effekten die meisten Organe - u.a. auch das menschliche Fettgewebe - reguliert. Es gibt zunehmende Evidenz für Implikationen des SNS in der Pathogenese des metabolischen Syndroms (Young, 2006). So konnte bei Vorliegen von Adipositas und Insulinresistenz eine erhöhte SNS-Aktivität nachgewiesen werden (Grassi *et al.*, 2007). Seals und Tentolouris berichteten, dass Patienten mit metabolischem Syndrom durch eine chronische Sympathikusstimulation gekennzeichnet sind, die zu erhöhten Plasmaspiegeln von inflammatorischen Markern und einem adrenerg regulierten Insulinantagonismus führt (Seals *et al.*, 2004; Tentolouris *et al.*, 2006). Hierbei ist die SNS-Hyperaktivität als Konsequenz einer reduzierten SNS-Sensitivität mit einer verminderten Anzahl *beta*-adrenerger Rezeptoren im

Fettgewebe anzusehen (Muzzin *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1999; Rayner, 2001). Im Gegensatz dazu kann eine restriktive Kalorienzufuhr und ein damit verbundener Gewichtsverlust die SNS-Hyperaktivität normalisieren (Saris, 1995; Straznicky *et al.*, 2005).

Das Fettgewebe erhält eine Vielzahl von Afferenzen, beispielsweise auch durch das SNS (Lawrence und Coppack, 2000). Bereits vor dem Bekanntwerden der Interaktionen zwischen SNS und Fettgewebe konnten Studien eine direkte und dichte sympathoadrenerge Innervation des weißen Fettgewebes bei Ratten (Youngstrom und Bartness, 1995; Bowers *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005) und Menschen (Dodt *et al.*, 2000 und 2003; Romijn und Fliers, 2005) mit einer differentiellen Innervation der unterschiedlichen Fettdepots (Youngstrom und Bartness, 1995) nachweisen. Mittlerweile gibt es Evidenz für eine bidirektionale Kommunikation zwischen weißem Fettgewebe und dem zentralen Nervensystem – offensichtlich via SNS und sensorischer Innervation des Fettgewebes (Bartness *et al.*, 2010). Bei Ratten konnten sympathische Nervenbahnen identifiziert werden, die aus verschiedenen Gehirnarealen entstammen, das weiße Fettgewebe innervieren und so in der Regulation der Energiehomöostase involviert sind (Bamshad *et al.*, 1998). Anterograde transneuronale Untersuchungen wiesen zudem afferente, sensorische Bahnen im weißen Fettgewebe nach, die elektrophysiologisch auf eine erhöhte SNS-Aktivität im Fettgewebe reagieren (Bartness *et al.*, 2010). Andererseits scheint das Nebennierenmark - und somit Adrenalin als Transmitter - in der katecholaminergen Regulation des Fettgewebes eine geringere Bedeutung zu haben, verglichen mit dessen direkter sympathischer Innervation (Rayner, 2001[a]; Romijn und Fliers, 2005). Unabhängig davon hat die SNS-Innervation des Fettgewebes profunde Effekte auf die Biologie der Adipozyten, insbesondere auf die Fettmobilisation. So stimulieren beispielsweise Katecholamine die Lipolyse (Ryden *et al.*, 2007); eine sympathische Denervation des Fettgewebes führt dagegen zu einer Blockade der Lipolyse (Bartness *et al.*, 2010). Adipositas ist mit einer verminderten, katecholamininduzierten Lipolyse assoziiert (Langin *et al.*, 2005).

Angesichts der Interaktionen des SNS und des Fettgewebes in der Pathogenese des metabolischen Syndroms werden in der vorliegenden Arbeit anhand des Modells der akuten Sympathikusexzitation die klinischen, biochemischen und endokrinen Effekte auf der Ebene der alterierten Adipokin-Sekretion und

-Expression untersucht. Dabei geht es als *proof of principle* rein um die zugrunde liegenden Mechanismen, weshalb keine übergewichtigen Probanden gewählt wurden.

1.4 STUDIENLAGE, FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte einer Kälte-medierten Sympathikusstimulation auf eine Vielzahl relevanter Adipokine zu untersuchen. Dabei sollten als *proof of principle in vivo* Mechanismen aufgedeckt werden, die die Rolle des Fettgewebes in der Pathogenese des metabolischen Syndroms zu verstehen helfen.

Aufgrund der zuvor geschilderten Zusammenhänge standen folgende Fragen im Mittelpunkt der Untersuchungen:

- Reguliert das SNS die endokrine Fettgewebefunktion?
- Wenn ja, könnte die Art der Hormonantwort des Fettgewebes auf die SNS-Stimulation an der Ausbildung des metabolischen Syndroms und der assoziierten kardiovaskulären Komplikationen beteiligt sein?

In vorherigen - hauptsächlich tierexperimentellen - Studien konnte gezeigt werden, dass die endokrine Aktivität des Fettgewebes durch das SNS beeinflusst zu sein scheint. In diesen Studien wurden meistens synthetisch modifizierte anstelle von natürlich vorkommenden, endogenen Adipokinen analysiert. Bei Menschen ist die Datenlage insgesamt spärlich und teilweise kontrovers. Es ist wenig bekannt über die *in vivo* Mechanismen, die Aufschluss über die Regulation der endokrinen Adipozytenfunktionen durch das SNS geben. Bisherige humane Studien beschreiben Effekte einer akuten Sympathikusstimulation durch Applikation von *beta*-adrenergen Agonisten auf die Sekretion und Expression von Leptin (Donahoo *et al.*, 1997; Vicennati *et al.*, 2002; Ricci *et al.*, 2005; Goosens *et al.*, 2008) und IL-6 (Mohamed-Ali *et al.*, 2000 und 2001; Vicennati *et al.*, 2002; Goosens *et al.* 2008). Diese Studien konzentrierten sich jedoch auf einzelne Adipokine und wurden überwiegend ohne Kontrollbedingungen durchgeführt. Im Falle von Adiponektin liegt eine *in vivo* Studie bei Menschen vor, die den Effekt einer prolongierten Kälte-Stimulation auf die Sekretion untersucht (Wijers *et al.*, 2007).

Daten zu MCP-1 und VEGF fehlen gänzlich. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die Pleiotropie des Fettgewebes auf eine größere Anzahl relevanter Adipokine fokussiert, um diese *in vivo* Mechanismen zu erleuchten und die Rolle des Fettgewebes in der Pathogenese des metabolischen Syndroms besser zu verstehen: Leptin, Adiponektin, IL-6, MCP-1 und VEGF.

2 Material und Methoden

2.1 STUDIENABLAUF UND PROBANDENREKRUTIERUNG

2.1.1 Studienablauf

Nach dem Entwurf des Studiendesigns sowie der Erarbeitung und Beschaffung der erforderlichen Dokumente und Materialien (Datenbanken, Probenentnahmeplan, schriftliche Aufklärung, Kälte-Anzug) erfolgte im Rahmen der Vorbereitungsphase ein Probeversuch insbesondere zur Etablierung der Fettgewebsbiopsien, Probenverarbeitung sowie zur Ermittlung des erforderlichen Kältestimulus. Daraufhin wurde in Zusammenarbeit mit dem endokrinologischen Labor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, insbesondere die Probengewinnung zur Bestimmung der Plasma-Katecholamine modifiziert (siehe 2.5.3) und weiterhin Test-ELISAS mit den gewonnenen Blutproben durchgeführt.

Nach der Probandenrekrutierung und der zeitlichen Organisation der Versuchstage wurde der klinische Teil der vorliegenden Studie in zwei zeitlich getrennten Gruppen am UK S-H, Campus Lübeck, durchgeführt. Die Gruppe mit Kälte-Stimulation wurde von Juni bis August 2004 untersucht. Nach Durchführung der experimentellen Arbeiten (ELISA und PCR) und der statistischen Datenauswertung erfolgte die Durchführung der Kontrollversuchsreihe von September bis Oktober 2005.

2.1.2 Probandenrekrutierung, Votum der Ethikkommission

Für beide Gruppen wurden jeweils zehn männliche Probanden im Alter von 20 bis 32 Jahren eingeschlossen. Zwei Probanden aus der stimulierten Gruppe nahmen auch an den nachfolgenden Kontrollversuchen teil. Die Rekrutierung erfolgte in einem persönlichen Gespräch, in dem bei Interesse ausführlich die Ziele und Risiken der Studie sowie der Versuchsablauf erläutert und Ausschlusskriterien erfragt wurden. Die eigentliche mündliche Aufklärung mit der nachfolgenden schriftlichen Einwilligungserklärung fand im Rahmen der Versuchsvorbereitung mindestens 48 Stunden vor dem geplanten Versuchstag statt. Die Teilnehmer wussten, ob sie zu der stimulierten – bzw. Kontrollgruppe gehörten. Im Vorfeld

wurde eine Blutentnahme zur Erstellung eines kleinen Blutbildes sowie zum Ausschluss von Gerinnungsstörungen durchgeführt. Die Freiwilligen wurden instruiert, am Versuchsvortag ab 20.00 Uhr auf eine Nahrungsaufnahme sowie auf alkohol- und koffeinhaltige Getränke zu verzichten, da die Sekretion der Adipokine nach Nahrungsaufnahme beeinflusst wird (Orban *et al.*, 1999). Jeder Proband erhielt eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 150 Euro. Die Durchführung der Studie erfolgte entsprechend den Prinzipien der Deklaration von Helsinki; sie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck am 22.04.2003 genehmigt (Aktenzeichen 03-047).

2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

- $27 \text{ kg/m}^2 > \text{BMI} > 22 \text{ kg/m}^2$
- Alter zwischen 20 und 35 Jahren
- männliches Geschlecht
- mindestens siebentägiges medikamentenfreies Intervall vor der Biopsie
- Verständnis der mündlichen Aufklärung
- schriftliche Einwilligung

Ausschlusskriterien:

- Adipositas I, II, III
- Gewichtsreduktion $> 5 \text{ kg}$ in den 3 Monaten vor Probenentnahme
- Diät mit $< 1500 \text{ kcal/d}$ oder Fasten während des Monats vor Probenentnahme
- Arterieller Hypertonus
- Diabetes mellitus
- Dyslipidämie
- primäre und sekundäre Hypertonie
- bekannte Herzrhythmusstörungen
- chronische Medikamenteneinnahme
- insbesondere Einnahme von Antikoagulanzen
- bekannte Blutungsneigung
- Abnormalitäten im kleinen Blutbild und in der Blutgerinnung
- chronische hämatologische und gastrointestinale Erkrankungen
- bekannte Allergie gegen Lokalanästhetika

2.2 STUDIENDESIGN UND PROTOKOLL

2.2.1 Experimentelles Setup

Der Versuchsaufbau und -ablauf ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Einzelheiten insbesondere über den Bestimmungszeitpunkt der einzelnen Parameter sind dem Probenentnahmeplan im Anhang (Seite 81) zu entnehmen.

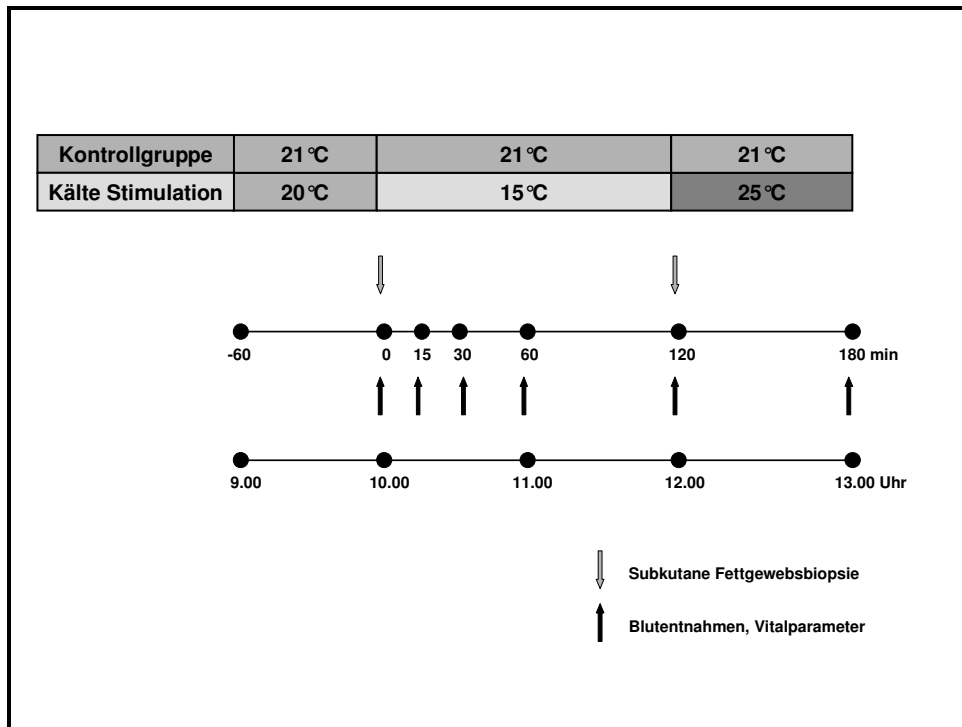


Abbildung 2: Versuchsaufbau. Akute Sympathikusexzitation mittels Kälte-Exposition (15 °C) für 120 Minuten. Anschließend 60-minütige Aufwärmphase bei 25 °C. In der Kontrollgruppe keine Kälte-Stimulation (durchschnittliche Raumtemperatur 21 °C). In beiden Gruppen fanden Blutentnahmen und Messungen der Vitalparameter zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten statt. Zur quantitativen mRNA-Expressionsanalyse wurden parallel zu Beginn und nach 120 Minuten subkutane Fettgewebsbiopsien durchgeführt. Alle Versuche begannen um 8.00 Uhr und waren - exklusive der Nachbereitungszeit - um 13.00 Uhr abgeschlossen.

2.2.2 Versuchsprotokoll Kälte-stimulierte Gruppe

Die Probanden kamen morgens um 08.00 Uhr nüchtern in das Versuchslabor. Die Experimentdauer betrug inklusive der Vorbereitungsphase insgesamt fünf Stunden, sodass alle Versuche um 13.00 Uhr abgeschlossen waren. Auf die exakte Einhaltung des Zeitplans wurde insbesondere im Hinblick auf die zirkadiane Rhythmik der untersuchten Fettgewebshormone und weiterer

Parameter geachtet. Die Nachbereitungszeit in Abwesenheit des Probanden betrug weitere zwei Stunden.

Die Versuche fanden in einem ruhigen und abgedunkelten Raum statt mit einer durchschnittlichen Umgebungstemperatur von 25°C.

Vor Versuchsbeginn wurden zunächst anthropometrische Messungen mit der Bestimmung folgender Parameter durchgeführt:

- Größe, Gewicht, BMI, Taillenumfang, Hüftumfang, Verhältnis Taillen- zu Hüftumfang und Körperfettanteil

Nach zunächst loser Anlage des Kälte-Anzugs erfolgten weitere Versuchsvorbereitungen in von nun an liegender Position in folgender Reihenfolge:

1. Applikation einer 17 G oder 18 G Venenverweilkanüle antecubital in Abhängigkeit von den vorliegenden Venenverhältnissen
2. langsame intravenöse Infusion von physiologischer Kochsalzlösung
3. Installation der Blutdruckmanschette
4. Platzierung der Mikrodialysenadel
5. Anbringen der Fettgewebsdurchblutungsmessung
6. 30-minütige Kalibration des Mikrodialysegerätes

Nach der insgesamt einstündigen Vorbereitungsphase und dem vollständigen Anlegen des Kälte-Anzugs erfolgte ohne Wasserzirkulation eine 60-minütige Mikrodialyse im subkutanen Fettgewebe vom Zeitpunkt -60 Minuten (09.00 Uhr) bis zum Zeitpunkt 0 Minuten (10.00 Uhr). Nachfolgend wurde zum Zeitpunkt 0 Minuten die Kälte-Stimulation initiiert. Wasser zirkulierte durch die Windungen des Anzugs, zunächst mit der Temperatur 15°C für 120 Minuten, später in einer sich anschließenden, 60-minütigen Aufwärmphase mit der Temperatur 25°C bis zum Zeitpunkt 180 Minuten (13.00 Uhr). Die Blutentnahmen sowie die Messung der Vitalparameter (Körpertemperatur, systolischer und diastolischer Blutdruck sowie Herzfrequenz) erfolgten zu den Messzeitpunkten 0, 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten.

Ferner wurden die Probanden zu den einzelnen Messzeitpunkten gebeten, ihr individuelles Temperaturempfinden mittels einer numerischen Analogskala einzuschätzen.

Blutproben wurden für die Konzentrationsbestimmung der im Probenentnahmeplan aufgelisteten laborchemischen Parameter und der Adipokine mittels ELISA entnommen.

Parallel erfolgten vor (Zeitpunkt 0 Minuten) und nach der Kälte-Stimulation (Zeitpunkt 120 Minuten) abdominell-subkutane Fettgewebsbiopsien zur Gewinnung subkutaner Adipozyten für die quantitative mRNA-Expressionsanalyse.

Die Reihenfolge der Messungen an den jeweiligen Messzeitpunkten wurde folgendermaßen standardisiert:

1. Messung der Vitalparameter
 - a. Körpertemperatur
 - b. Blutdruck und Herzfrequenz
2. Erhebung des subjektiven Kälteempfindens
3. Blutentnahmen
4. Subkutane Fettgewebsbiopsien

2.2.3 Versuchsprotokoll Kontrollgruppe

Probanden der Kontrollgruppe befanden sich während des Versuchs ebenfalls in dem Kälte-Anzug bei identischen Umgebungsbedingungen, allerdings ohne stimulierende Kühlwasserzirkulation. Die durchschnittliche Raumtemperatur betrug während der Kontrollexperimente 21 °C. Die Messung der Vitalparameter, Blutentnahmen und subkutanen Fettgewebsbiopsien wurden in identischer Art und Weise sowie zu den gleichen Zeitpunkten durchgeführt, wie unter 2.2.2 für die Gruppe mit Kälte-Stimulation beschrieben. Jedoch fand in den Kontrollexperimenten keine Fettgewebsmikrodialyse statt. Die hierfür benötigten Vorbereitungs- (30-minütige Kalibration) und Durchführungszeiten wurden ebenso wie der durch das Einstechen der Mikrodialysenadel verursachte Schmerzreiz simuliert. Hierfür wurde eine 18 G Venenverweilkanüle verwendet, die im fixierten Zustand - analog zu der Mikrodialysenadel - über die gesamte Versuchsdauer in der Regio abdominalis lateralis des Probanden belassen wurde.

2.3 SNS-STIMULATION MITTELS KÄLTE-EXPOSITION

2.3.1 Materialien

- Ganzkörper-Kälte-Anzug mit flexiblen Wasserwindungen
- Anschlussvorrichtung an
- eine Leitungswasserquelle versehen mit
- einem Thermostat (RS Components; Mörfelden-Walldorf, Deutschland)

2.3.2 Durchführung

Zur Kälte-induzierten Stimulation des SNS befanden sich die Probanden in einem eng anliegenden Ganzkörper-Kälte-Anzug. In diesen Anzug, der außer Gesicht, Hals und Füße alle weiteren Körperareale bedeckte, wurden flexible Schläuche mit einem Durchmesser von 1 cm eingenäht, durch die Leitungswasser als Kühlmedium floss. Ein Thermostat regulierte eine Temperaturstabilität von $\pm 0,1$ °C. Die Wasserwindungen hatten engen, aber nicht direkten Kontakt zur Körperoberfläche der bis auf die Unterhose entkleideten Probanden.



Abbildung 3: SNS-Stimulation mittels Kälte-Exposition. *Die Stimulation des SNS wurde durch Kälte-Exposition erreicht. Hierzu befanden sich die Probanden in einem Kälte-Anzug, durch dessen Windungen Wasser als Kühlmedium floss.*

2.4 MESSUNGEN

2.4.1 Anthropometrische Messungen

2.4.1.1 Materialien

- Maßband
- Bioelektrische Impedanzwaage (Tanita® BC-543 Innerscan; Sindelfingen, Deutschland)

2.4.1.2 Durchführung

Die Körpergröße wurde an den stehenden Probanden mit Hilfe eines Maßbandes ermittelt, das ebenfalls für die Bestimmung des Hüft- und Taillenumfanges verwendet wurde. Die Messung des maximalen Hüftumfanges erfolgte an den aufrecht stehenden Versuchspersonen bei angelegten Armen und zusammenstehenden Füßen. Der Taillenumfang wurde in Rückenlage bei leichter Expiration zwischen der palperten Crista iliaca und dem Unterrand der zwölften Rippe in der Linea axillaris media bestimmt.

Das Körpergewicht und der Fettanteil an der Gesamtkörpermasse wurden mittels einer geeichten bioelektrischen Impedanzwaage gemessen. Die bioelektrische Impedanzanalyse zur Bestimmung des Körperfettanteils beruht darauf, dass verschiedene Körpergewebe bei Durchfluss von Wechselstrom unterschiedliche elektrische Widerstände (Impedanz) aufbauen. Hierbei werden Resistenz (Ohmscher Widerstand, bestimmt durch den Wassergehalt der Gewebe) und Reaktanz (kapazitiver Widerstand der Zellmembranen) bestimmt. Die erhaltenen Werte für den prozentualen Körperfettanteil sind unabhängig von Gewicht und Größe.

2.4.2 Messung der Vitalparameter

2.4.2.1 Materialien

- Digitales Thermometer (Scheiber; Kreuzwertheim, Deutschland; Modell ACT 2000+)
- Blutdruck- und Herzfrequenzmessgerät (Welch Allyn OSZ 5 *Digital Blood Pressure* System; Jungingen, Deutschland)

2.4.2.2 Durchführung

Die Vitalparameter Körpertemperatur, systolischer und diastolischer Blutdruck sowie Herzfrequenz wurden zu den in der Abbildung 2 angegebenen Messzeitpunkten erhoben.

Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe eines elektronischen Thermometers mit einer Messgenauigkeit von $\pm 0,1^\circ\text{C}$ gemessen. Die Messung erfolgte sublingual bei geschlossenem Mund und normaler Atmung.

Die kardiovaskulären Parameter Blutdruck und Herzfrequenz wurden oszillografisch mittels eines elektronischen Monitorgerätes erhoben. Bei allen Versuchspersonen wurde eine Blutdruckmanschette entsprechend des Oberarmumfangs verwendet (in der Regel 14 cm), die an dem zur Venenverweilkanüle kontralateralen Oberarm installiert wurde.

2.4.3 Messung des subjektiven Kälteempfindens und der Kälteintensität

Zu den in Abbildung 2 aufgeführten Messzeitpunkten wurden die Probanden nach ihrem individuellen Temperaturempfinden gefragt. Zur Bestimmung der Kälteintensität wurden sie gebeten, dieses anhand einer numerischen Analogskala einzuschätzen. Hierbei handelte es sich um eine horizontale Linie, die durch die Zahlen 1 bis 10 unterteilt wurde. Die Endpunkte 1 und 10 stellten dabei die Extremzustände „sehr heiß“ und „eiskalt“ dar. Das subjektive Kälteempfinden sollte durch Ankreuzen der jeweiligen Zahl markiert werden. Die Werte wurden den folgenden Attributen zugeordnet:

10 = eiskalt, 9 = sehr kalt, 8 = kalt, 7 = sehr kühl, 6 = kühl,

5 = angenehm, 4 = mäßig warm, 3 = warm, 2 = sehr warm, 1 = heiß,

0 = sehr heiß

Das Auftreten von Zittern wurde mit Zeitangabe in den jeweiligen Versuchsprotokollen dokumentiert.

2.5 BLUTUNTERSUCHUNGEN

2.5.1 Materialien

- Stauschlauch
- Cutasept® F Haut-Antiseptikum (Bode; Hamburg, Deutschland)
- 17/18 G Venenverweilkanüle (Becton Dickinson; Madrid, Spanien)
- Fixierpflaster (3M Health Care, Neuss; Deutschland)
- Drei-Wege-Hahn mit Verlängerungsschlauch (Becton Dickinson; Madrid, Spanien)
- Multi-Adapter (Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland)
- 7,5 ml Serum Monovette® (Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland)
- 2,7 ml EDTA Monovette® (Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland)
- 2,6 ml Fluorid Monovette® (Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland)
- 3 ml Natriumcitrat Monovette® (Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland)
- 2,6 ml Lithium-Heparinat Monovette® (Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland)
- 2 ml Spritze (Becton Dickinson; Madrid, Spanien)
- 10 ml Spritze (Becton Dickinson; Madrid, Spanien)
- Transfusionssystem (Alaris Products; Rolle, Schweiz)
- NaCl 0,9% ad iniectionem (Berlin-Chemie; Berlin, Deutschland)

2.5.2 Blutprobengewinnung

Abhängig von den vorherrschenden Venenverhältnissen erfolgte im Rahmen der Versuchsvorbereitung beim liegenden Probanden die antecubitale Anlage einer 17 G bzw. 18 G Venenverweilkanüle für die nachfolgenden Blutentnahmen zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Zwischen der Anlage des Venenkatheters und der ersten Blutentnahme lag eine mindestens 60-minütige Ruhephase im Liegen. Das ist insofern von Bedeutung, als dass es bei direkter Blutentnahme und auch bei Veränderungen der Körperlage zu stress- (Angst, Schmerz) und orthostasebedingten Konzentrationsanstiegen zahlreicher Parameter kommt, insbesondere von Noradrenalin. Zur kontinuierlichen Substitution des entnommenen Blutvolumens von insgesamt 300 ml sowie zur Vermeidung der Koagulation innerhalb der Kanüle wurde der Versuchsperson intravenös 0,9%iges Natriumchlorid appliziert. Um eine Volumenverschiebung als mögliche Ursache für eine Sympathikusstimulation auszuschließen, wurde hierbei sorgfältig auf die

Einhaltung des maximalen Infusionsvolumens von 300 ml über die gesamte Versuchsdauer geachtet.

Vor und während der Blutentnahmen wurden zu langes Stauen und zu starkes Aspirieren vermieden. Vor dem Befüllen der Probenbehältnisse wurden mit Hilfe einer Spritze jeweils ca. 2 ml Blut aspiriert und verworfen, um Konzentrationsverfälschungen durch geronnene Blutbestandteile und infusionsbedingte Verdünnungseffekte zu vermeiden. Auf die vollständige Befüllung der Probenbehältnisse, insbesondere der Citrat-Röhrchen, wurde geachtet. Die befüllten EDTA-, Citrat-, Heparin- und Natriumfluorid-Röhrchen wurden zur Durchmischung mit dem an der Wand haftenden Antikoagulans mehrmals vorsichtig geschwenkt.

Die Zeitpunkte der Blutentnahmen sowie die Art und Anzahl der Probenbehältnisse für die einzelnen laborchemischen Parameter sind im Probenentnahmeplan im Anhang aufgelistet.



Abbildung 4: Gewinnung der Blutproben. Hierfür wurde der Reißverschluss des Kälte-Anzugs im Bereich der Ellenbeuge kurzfristig geöffnet. Um eine Sympathikusstimulation durch Volumenverluste zu vermeiden, wurde kontinuierlich mit physiologischer Kochsalzlösung substituiert.

2.5.3 Blutentnahme für die Bestimmung der Katecholamin-Konzentrationen

2.5.3.1 Materialien

- graduierte Polypropylen-Röhrchen mit Schraubverschluss (Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland)
- 2 ml Spritze (Becton Dickinson S.A.; Madrid, Spanien)
- 10 ml Spritze (Becton Dickinson S.A.; Madrid, Spanien)
- Pipette (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
- Katecholaminstabilisator
- Zentrifuge Multifuge 3 S-R (Heraeus; Osterode, Deutschland)
- Styropor-Kühlbox mit Trockeneis

2.5.3.2 Probengewinnung und Präanalytik

Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Materialgewinnung für die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Noradrenalin und Adrenalin in den Vorversuchen wird an dieser Stelle explizit auf die Probengewinnung und Präanalytik eingegangen. Die korrekte Entnahmetechnik sowie die Probenverarbeitung musste zunächst in Vorversuchen etabliert werden, da es nach den anfänglichen Blutentnahmen mit unmittelbar anschließender Zentrifugation *in vitro* zur Hämolyse und Koagulation im Serum gekommen ist, was zu der Unbrauchbarkeit der Proben führte. Daher wurde in Zusammenarbeit mit dem endokrinologischen Labor des UK S-H, Campus Lübeck, ein Katecholaminstabilisator eingeführt, dessen Zusatz diese Reaktionen verhinderte.

Der Stabilisator wurde bei -20 °C a 1000 µl portioniert. Nach Auftauen und mehrmaligem Schwenken wurden jeweils 100 µl Stabilisatoreagenz in vorgekühlte 10 ml Polypropylen-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die den Stabilisator enthaltenen Röhrchen bis zu der Blutentnahme wieder bei 8 °C gelagert. Zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten wurden 5 ml venöses Vollblut abgenommen und in die vorbereiteten Röhrchen mit Stabilisatorzusatz gegeben. Danach wurden die das Gemisch enthaltenen Röhrchen vorsichtig geschwenkt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen, bevor sie bei 4 °C und 4000 U/Min für 7 Minuten zentrifugiert wurden. Das so erhaltene Serum wurde in vorgekühlte Polypropylen-Röhrchen überführt und bis zur weiteren Analyse gekühlt.

2.5.4 Präanalytik: Verarbeitung, Transport und Lagerung der Blutproben

2.5.4.1 Materialien

- Zentrifuge Multifuge 3 S-R (Heraeus; Osterode, Deutschland)
- Pipette (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
- 1,5 ml Polypropylen Reaktionsgefäße (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)

2.5.4.2 Durchführung

Leptin, Adiponektin, IL-6, MCP-1, VEGF:

Für die Bestimmung der zirkulierenden Plasmakonzentrationen der Adipokine Leptin, Adiponektin, IL-6, MCP-1 und VEGF erfolgte unmittelbar nach der Probengewinnung die Zentrifugation bei 4°C und 4000 U/Min für 7 Minuten in der vorgekühlten Zentrifuge. Das so erhaltene Serum wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und zunächst bei -20°C in dem Versuchsraum zwischengelagert. Nach Versuchsende wurden die Proben für Adiponektin, IL-6, MCP-1 und VEGF im tiefgekühlten Zustand auf Trockeneis in einer Styropor-Kühlbox in das Labor transportiert und hier bis zu der endgültigen Analyse mittels ELISA bei -80°C deponiert. Die Leptin-Proben wurden ebenfalls auf Trockeneis zur finalen Konzentrationsbestimmung mittels RIA in das endokrinologische Labor gebracht. Während des Transports wurde jeweils auf die lückenlose Einhaltung der Kühlkette geachtet, um einen Verfall der nachzuweisenden Proteine durch Frier-Tau-Zyklen zu verhindern.

Die Proben der nachfolgend aufgeführten Parameter wurden zu den Messzeitpunkten 30, 60, 120 und 180 Minuten direkt nach der Abnahme und Verarbeitung in der beschriebenen Transportform zur weiteren Verarbeitung und Analyse in das endokrinologische -, hämatologische oder Zentrallabor gebracht. Wegen der kurzen Entnahmeintervalle zu Versuchsbeginn wurden die Proben der Messzeitpunkte 0 und 15 Minuten nach der im Folgenden beschriebenen Lagerung zusammen mit der Probe des dritten Messzeitpunktes nach 30 Minuten in das jeweilige Labor gebracht.

ACTH:

- Lagerung nach 0 und 15 Minuten: unzentrifugiert auf Trockeneis bei 8°C
- Transport: auf Trockeneis
- Bestimmungsort: endokrinologisches Labor UK S-H, Campus Lübeck

TSH, fT3, fT4, Insulin, Cortisol:

- Lagerung nach 0 und 15 Minuten: unzentrifugiert bei Raumtemperatur
- Transport: ungekühlt
- Bestimmungsort: endokrinologische Labor UK S-H, Campus Lübeck

Kleines Blutbild und Gerinnungsparameter (Quick, PTT, D-Dimere, Fibrinogen):

- Lagerung nach 0 und 15 Minuten: unzentrifugiert bei Raumtemperatur
- Transport: ungekühlt
- Bestimmungsort: hämatologisches Labor UK S-H, Campus Lübeck

CRP, Triglyzeride, HDL, LDL, GOT, GPT, G-GT, Creatinin, Harnsäure, Amylase, Lipase:

- Lagerung nach 0 und 15 Minuten: unzentrifugiert bei Raumtemperatur
- Transport: ungekühlt
- Bestimmungsort: Zentrallabor UK S-H, Campus Lübeck

Lakat, Glukose:

- Lagerung nach 0 und 15 Minuten: unzentrifugiert bei 8°C
- Transport: ungekühlt
- Bestimmungsort: Zentrallabor UK S-H, Campus Lübeck

2.6 BESTIMMUNG DER ADIPOKIN-KONZENTRATIONEN

Die zirkulierenden Plasmakonzentrationen von Adiponektin, IL-6, MCP-1 und VEGF wurden im experimentellen Teil dieser Arbeit mittels ELISA bestimmt. Die Leptin-Konzentrationen wurde mit Hilfe eines RIA ermittelt.

2.6.1 Materialien

- Human Adiponectin ELISA Kit (Bio Cat, # K1001-1; Heidelberg, Deutschland)
- Human High Sensitivity (HS) IL-6 ELISA Kit (R&D Systems, # HS600B; Nordenstadt, Deutschland)
- Human VEGF ELISA Kit (R&D Systems, # DVE00; Nordenstadt, Deutschland)
- Human MCP-1 ELISA Kit (R&D Systems, # DCP00; Nordenstadt, Deutschland)

Für die Durchführung entsprechend der Herstelleranweisungen wurden folgende Hilfsmaterialien benötigt:

- Mikrotiterplatter Lesegerät (Anthos Mikrosysteme, Software Anthos Lucy 3, Version 1.8.4)
- Pipette (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
- Multikanalpipette (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
- Destilliertes Wasser
- 500 ml und 1000 ml graduierte Messzylinder
- Magnet-Rührer L-71 (Labor-Brand; Deutschland)
- Schüttelgerät Vortex-Genie 2 (Scientific Industries; Bohemia, USA)
- Minizentrifuge Minispint plus (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge Biofuge Fresco/Rotor 3765 (Heraeus; Osterode, Deutschland)
- 1,5 ml Polypropylen Reaktionsgefäße (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
- Reagenzglas (Schott; Deutschland)

2.6.2 Lagerung

Die ungeöffneten Kits wurden bei 8°C gelagert.

2.6.3 Prinzip des *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Assays funktionieren nach der quantitativen *sandwich enzyme immunoassay* Technik. Hierbei wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit einem monoklonalen Antikörper vorbeschichtet, der spezifisch für das jeweilige zu untersuchende Antigen (Adipokin) ist.

Nachdem die mitgelieferte Standardlösung und die Serumproben in die beschichteten Vertiefungen pipettiert wurden, wurden die in der Probe vorhandenen Antigene (Adipokinmoleküle) nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip von den spezifischen, immobilisierten Antikörpern gebunden (1. Reaktion). Nach vorgeschriebener Inkubationszeit erfolgte das Auswaschen der restlichen, ungebundenen Substanzen. Danach wurde ein enzymmarkierter, polyklonaler Antikörper hinzugefügt, der wiederum spezifisch für das gesuchte Antigen ist (2. Reaktion). Nach erneuter Inkubation und einem weiteren Waschschriff, bei dem die ungebundenen Antikörper entfernt wurden, erfolgte die Zugabe der Substratlösung. Während einer kurzen Inkubationszeit mit Substratumsatz kam es zu einer Farbentwicklung, deren Intensität proportional zu der Menge an initial gebundenem Antigen war. Nach vorgeschriebener Zeit wurde die Farbentwicklung gestoppt und die Farbintensität (optische Dichte) innerhalb der angegebenen Zeit photometrisch gemessen.

2.6.3.1 Amplifikationsprinzip des IL-6 HS ELISA

IL-6 zirkuliert normalerweise in einer Konzentration von 1 pg/ml im Blut eines gesunden Menschen (Yamamura *et al.*, 1998). Bei der Verwendung des Human IL-6 Quantikine® ELISA Kits (R&D Systems, # D6050; Nordenstadt, Deutschland) waren geringe IL-6 Konzentrationen zum Teil nicht detektierbar. Daher wurde das *High Sensitivity Kit* verwendet, welches über ein Amplifikationssystem verfügt und so eine minimale detektierbare Konzentration (MDD) von 0,039 pg/ml messen kann.

2.6.4 Durchführung

Jeder ELISA wurde entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Adipokinabhängig ergaben sich Abweichungen bei Inkubationsdauer, Reagenz- und Probenmengen, Lesewellenlänge (VEGF, Adiponektin: 450 nm, IL-6: 492 nm) sowie Anzahl der Waschwiederholungen pro Waschschriff. Eine integrierte Wellenlängenkorrektur war nicht verfügbar. Eine manuelle Wellenlängenkorrektur wurde nicht durchgeführt.

2.6.5 Berechnung der Konzentrationen aus der optischen Dichte

Die Absorptionen der Standards und Proben wurden jeweils doppelt bestimmt. Für die Berechnung der Adipokinkonzentrationen wurde zunächst aus den Doppelwerten der arithmetische Mittelwert errechnet. Anschließend wurde der gemittelte Nullwert von den errechneten Mittelwerten der Standards und Proben subtrahiert. Aus den so erhaltenen Standardabsorptionswerten (y-Achse) und den vorgegeben Standardkonzentrationen (x-Achse) erfolgte die Erstellung einer Standardgerade.

Die Gleichung der Standardgerade lautete:

$$\ln(y) = m \cdot \ln(x) + b$$

y = Mittelwert der gemessenen Absorptionen

m = Steigung der Geraden

x = Standardkonzentration

b = Achsenabschnitt (Schnittpunkt mit der y-Achse)

Nach der Berechnung der Steigung, des Achsenabschnittes und Korrelationskoeffizienten r erfolgte anhand der Standardgeraden die Berechnung der Adipokinkonzentrationen aus den Mittelwerten der photometrisch gemessenen Absorptionen wie folgt:

$$\ln(x) = [\ln(y) - b] / m$$

$$x = e^{[\ln(y) - b] / m}$$

x = Adipokinkonzentration

y = Mittelwert aus den gemessenen Absorptionen

2.6.6 Intra- und interassay Präzision

Die Variationskoeffizienten (CV) als Maß der Präzision waren für die jeweiligen ELISA wie folgt:

Adipokin	intra-assay	inter-assay
Adiponektin	2,75	keine Angaben
IL-6	7,4	7,8
MCP-1	5,8	5,7
VEGF	5,4	7,3

Tabelle 3: Inter- und intrassay Präzision der durchgeführten ELISA. *Alle Angaben als Variationskoeffizient in %.*

2.7 GEWINNUNG SUBKUTANER ADIPOZYTEN MITTELS FETTGEWEBSBIOPSIEN

2.7.1 Materialien

- 10 ml Spritzen (Becton Dickinson S.A.; Madrid, Spanien)
- Kanüle 21 G (Becton Dickinson S.A.; Madrid, Spanien)
- Cutasept® F Haut-Antiseptikum (Bode; Hamburg, Deutschland)
- Lokalanästhetikum Scandicain® 2% (AstraZeneca; Wedel, Deutschland)
- sterile Mullkompressen BeeSana® 7,5 x 7,5 cm (Beese Medical; Barsbüttel, Deutschland)
- sterile Handschuhe Gammex PF (Ansell; Melaka, Malaysia)
- Einmalskalpell (Feather; Osaka, Japan)
- Pleura-Punktions-Nadel (Pleurofix; B Braun; Melsungen, Deutschland)
- Pflaster (Medipore™; Kattowitz, Polen)
- RNA-later™ (Qiagen; Hilden, Deutschland)
- 1,5 ml Polypropylen Reaktionsgefäße (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)

2.7.2 Aufklärung

Im Rahmen der mündlichen und schriftlichen Aufklärung wurden die Probanden über die Risiken und Nebenwirkungen insbesondere dieses Eingriffs informiert. Hierbei wurde auf das mögliche Auftreten von Blutungen, Nachblutungen, Infektionen, Schwellungen, Sensibilitätsstörungen und Wundheilungsstörungen eingegangen. Von den Probanden häufig erfragte kosmetische (Narbenbildungen), aber auch funktionelle Beeinträchtigungen waren nicht zu erwarten. Die Teilnehmer kannten das Studienprotokoll und wurden über die Zeitpunkte der Fettgewebsbiopsien informiert.

2.7.3 Durchführung

Zur quantitativen mRNA-Expressionsanalyse wurden abdominell-subkutane Fettgewebsbiopsien zu den Zeitpunkten 0 und 120 Minuten durchgeführt. Methodik und Technik basieren auf Literaturangaben (Kolaczynski *et al.*, 1994) und wurden in einem Vorversuch etabliert.

Nach sorgfältiger Hautdesinfektion der geplanten Entnahmestelle mittels Cutasept® F (Inhaltsstoffe: 2-Propanol und Benzalkoniumchlorid) erfolgte die Lokalanästhesie der geplanten Entnahmestelle in der Regio umbilicalis laterocaudal des Nabels. Hierfür wurden 5 ml 2%-iges Mepivacainhydrochlorid (Scandicain®) ohne Vasokonstriktorzusatz (Adrenalin) und Konservierungsstoffe in das Biopsieareal langsam und fächerförmig infiltriert. Die intravasale Injektion wurde durch initiales Aspirieren vermieden. Mepivacain ist ein Lokalanästhetikum vom Aminoamidtyp mit raschem Wirkungseintritt nach zwei bis vier Minuten und geringer vasodilatierender Wirkung und Toxizität. Zentralnervöse Nebenwirkungen wie Parästhesien perioral und im Bereich der Zunge, Hör- und Sehstörungen sowie Schwindelgefühl traten nicht auf. Kardiovaskuläre Nebenwirkungen waren bei der verwendeten Dosierung und den erwähnten Ausschlusskriterien nicht zu erwarten. Auf Adrenalinzusatz wurde wegen des möglichen Blutdruck- und Herzfrequenzanstiegs sowie der eventuellen, hypoperfusionsbedingten Wundheilungsstörung verzichtet. Weiterhin war das verwendete Lokalanästhetikum wegen des allergischen Potentials frei von Konservierungsstoffen. Eine Vorbehandlung des Biopsieareals mit Kochsalzlösung erfolgte nicht.

Vorbereitend wurde die Pleurapunktionskanüle an eine 10 ml Spritze konnektiert.

Nach der Verteilung und dem Wirkungseintritt des subkutan injizierten Lokalanästhetikums sowie der anschließenden Sensibilitätsüberprüfung erfolgte mit dem Stichskalpell eine zwei bis drei mm lange Inzision der Cutis. Blut wurde mit sterilen Tupfern aufgefangen. Nach erzeugtem Vakuum wurde die Pleurapunktionskanüle durch die Hautöffnung eingeführt. Mit fächerförmigen Spritzenbewegungen parallel der Hautspannungslinien wurden kleine Fettmengen aus dem subkutanen Fettgewebe der angehobenen Hautfalte herausgelöst. Schnelle Spritzenwechsel waren bei Blutaspiration mit nachfolgender Koagulation innerhalb der Spritze erforderlich. Abschließend wurde die Entnahmestelle desinfiziert, abgetrocknet und mit einem Pflaster bedeckt. Der Einsatz von Steristrips war bei der beschriebenen minimalen Inzision nicht erforderlich. Der Eingriff dauerte insgesamt fünf Minuten. Die zweite Biopsie nach 120 Minuten wurde in der beschriebenen Technik auf der kontralateralen Seite durchgeführt.



Abbildung 5: abdominell-subkutane Fettgewebsbiopsie. Zur Bestimmung der Adipokin-Genexpression wurden zu Beginn und nach 120 Minuten Adipozyten mittels subkutaner Fettgewebsbiopsien gewonnen. Nach gründlicher Desinfektion erfolgte hierfür in Lokalanästhesie zunächst eine Stichinzision mit Hilfe des Skalpells. Anschließend wurden durch fächerförmige Spritzenbewegungen kleine Fettmengen mobilisiert.

2.7.4 Ausbeute, Komplikationen und Nachsorge

Es konnte durchschnittlich ein Gramm Fettgewebe zuzüglich Bindegewebe und Blutkoagel entnommen werden. Ein Zusammenhang zwischen entnommener Fettmenge und BMI bestand nicht. Keine der 40 durchgeführten Biopsien wurde auf Verlangen der Probanden abgebrochen. Einige Probanden berichteten über einen brennenden Schmerz während und kurz nach der Infiltrationsanästhesie, der nach wenigen Minuten sistierte. Am Folgetag berichteten einige Probanden

über diskrete Schwellungen und Druckdolenzen im Bereich der Entnahmestelle. Bei zwei Probanden, bei denen es während der Biopsie zu einer vermehrten Blutaspiration durch die unvermeidliche Verletzung subkutan verlaufender Venen gekommen ist, entstanden unilateral circa fünf mal fünf cm durchmessende, tastbare Hämatome. Diese verkleinerten sich spontan innerhalb von vier Wochen ohne weitere Komplikationen. Eine persistierende kosmetische Beeinträchtigung in Form von Narben trat nicht auf.

2.7.5 Präanalytik: Probenverarbeitung, Transport und Lagerung

Im direkten Anschluss an einen Spritzenwechsel erfolgten die makroskopische Beurteilung, Mengenschätzung und Isolation des Fettgewebes von anderen Biopsiebestandteilen, wie Blut, Blutkoagel und Bindegewebe mittels Rührstab. Eine Koagulation in der Spritze stellte dabei durch die bei Bedarf vollzogenen Spritzenwechsel kein Problem dar. Erst nach der Feststellung einer für die mRNA-Expressionsanalyse ausreichenden Fettgewebsmenge erfolgte der Abschluss der Biopsie.

Nach Entnahme wurde die Fettgewebssprobe in mit RNA-Stabilisatorreagenz (RNAlater™) befüllte Reaktionsgefäße überführt. RNAlater™ ist eine Stabilisatorlösung, die das gewonnene Probenmaterial schnell permeiert, die einzelnen Zellen stabilisiert und die zelluläre RNA *in situ* vor ihrem Abbau schützt, ohne das Gewebe des Probenmaterials zu liquidieren. Für eine verlässliche RNA-Protektion wurde hierbei die von dem Hersteller vorgeschriebene Stabilisatormenge verwendet und das Material vollständig in das Stabilisatorengenz getränkt. Ferner erfolgte die Zerkleinerung von Fettgewebsstückchen, die breiter als 0,5 cm waren, um eine schnelle und vollständige Diffusion des Stabilisators in das Probeninnere zu erreichen. Zur Vermeidung eines vorzeitigen RNA-Abbaus wurde auf die Einhaltung einer möglichst kurzen Dauer von der Materialgewinnung bis zu der Überführung in das RNA-Stabilisatorreagenz geachtet. Die Proben wurden über Nacht bei 8°C in der Stabilisatorlösung inkubiert und nach anschließender Entfernung des Stabilisatorreagenz bis zu der RNA-Isolation in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.8 RNA-ISOLATION

2.8.1 Materialien

- RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland)
- QIAshredder (Qiagen; Hilden, Deutschland)
- Einwegskalpell (Feather; Osaka, Japan)
- Homogenisator Potter S (Braun; Melsungen, Deutschland)
- Analysenwaage (Sartorius; Göttingen, Deutschland)
- Schüttelgerät Vortex-Genie 2 (Scientific Industries; Bohemia, USA)

2.8.2 Prinzip

Das zur Isolation der Gesamt-RNA aus den Fettgewebsbiopsaten verwendete RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit basiert auf dem Prinzip der Gewebelyse durch Phenol/Guanidin und der Silicagelmembran-Aufreinigung der Gesamt-RNA. Das in dem Kit enthaltene Lysereagenz (QIAzol) ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin Thiocyanat, die die Lyse der Fettgewebsproben ermöglicht und RNasen inhibiert. Wegen der hohen Lyseeffizienz ist die Verwendung von größeren Probemengen (bis zu 100 mg Fettgewebe) und somit eine höhere Ausbeute an RNA möglich. Die Fettgewebsproben wurden in der QIAzol Lysereagenzlösung homogenisiert. Nach Zugabe von Chloroform erfolgte mittels Zentrifugation die Trennung des Homogenisates in eine organische und wässrige Phase. RNA befand sich in der oberen, wässrigen und farblosen Phase, während sich die DNA in der weißen Interphase und Proteine in der unteren, organischen und rotgefärbten Phase oder ebenfalls in der Interphase ansammelten.

Die obere, wässrige Phase mit der RNA wurde extrahiert. Es erfolgte die Zugabe von Ethanol, um adäquate Bedingungen für die Bindung der RNA zu erreichen. Die so bearbeitete Probe wurde auf die Säule gegeben, wo die Gesamt-RNA dann an die Silicagel-Membran gebunden und Phenol ausgewaschen wurde. Die isolierte RNA wurde anschließend in RNase-freiem Wasser eluiert.

2.8.3 Durchführung

Die Isolation der RNA aus den Fettgewebsproben mit Hilfe des RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit wurde den Herstelleranweisungen entsprechend durchgeführt. Abweichungen von dem Herstellerprotokoll ergaben sich bei der Homogenisation

des Probenmaterials sowie bei der Dauer der Zentrifugationsschritte. Um die Aufreinigung und Homogenisation der Probenlysate zu optimieren, wurde zusätzlich die Verwendung von QIAshredder eingeführt. Auf eine DNase-Digestion wurde verzichtet. Nach Angaben des Herstellers ist ein DNase-Verdau während der RNA-Aufreinigung nicht erforderlich, da die in dem verwendeten Kit eingesetzte Silica-Gel-Membran-Technologie die DNA zu einem großen Teil auch ohne DNase-Behandlung entfernt.

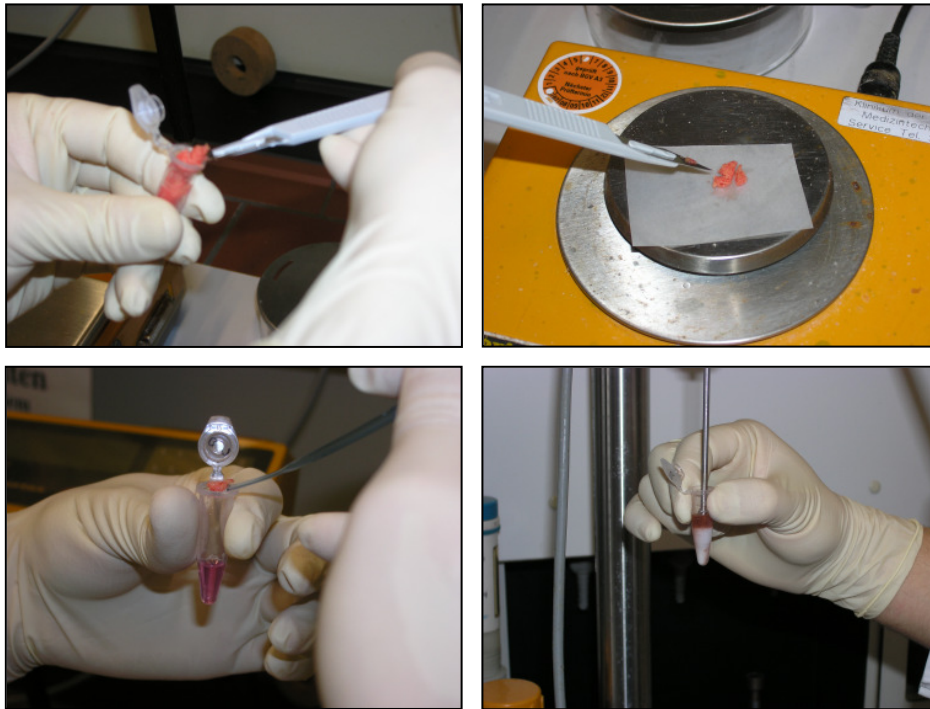


Abbildung 6: RNA-Isolation. Die tiefgefrorenen Fettgewebeproben wurden zunächst bis zu einem schneidefähigen Festzustand aufgetaut. Anschließend erfolgte das Schneiden und Wiegen einer Portion von 100 mg. Nun wurde die Fettgewebsportion mit Hilfe eines Ösenstabs in 300 ml Lysereagenz aufgenommen. Anschließend vollständige Zersetzung und Homogenisation des Probenmaterials mit Hilfe des Potter-Homogenisators in Anwesenheit der Lysereagenzlösung. Ein Überlaufen des Gemisches während der Homogenisation wurde vermieden.

2.9 cDNA-SYNTHESE

2.9.1 Materialien

Für die cDNA-Synthese wurden folgende Chemikalien und Materialien verwendet:

- Spektralphotometer (Milton Roy, USA)
- RNase freies Wasser (Sigma; Deisenhofen, Deutschland)
- RT Superscript II (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland)
- oligo dT Primer (Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Deutschland)
- RNase Inhibitor (Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Deutschland)
- dNTPs (Fermentas GmbH; St. Leon-Rot, Deutschland)

2.9.2 Durchführung

Zur Herstellung der cDNA wurden in der stimulierten Gruppe nach photometrischer Bestimmung der RNA-Quantität jeweils mindestens 1,65 µg isolierte RNA, in der Kontrollgruppe jeweils mindestens 1,2 µg RNA transkribiert.

Die ermittelte RNA-Menge wurde auf ein Volumen von 60 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und mit 8 µl Primer für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 32 µl des Transkriptase-Master-Mixes wurde die Probe für 60 Minuten bei 45°C inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 70°C erwärmt. Die c-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.10 *REAL TIME* POLYMERASE-KETTEN-REAKTION

2.10.1 Materialien

Für die Quantifizierung der cDNA mittels RT-PCR wurden folgende Enzyme und Puffer verwendet. Die Reaktionspuffer für alle Polymerasen wurden entsprechend der Herstellerempfehlung verwendet und vom jeweiligen Hersteller bezogen.

- Taq DNA Polymerase (Pepqab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland)
- SuperScript II RNase H⁻ (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland)
- Anti-RNase (Ambion Inc.; Austin, TX, USA)
- dNTPs (Fermentas GmbH; St. Leon-Rot, Deutschland)
- SYBR Green Mix (TaKaRa Bio Inc.; Otsu, Shiga, Japan)
- RT-PCR Grade Water (Ambion Inc.; Austin, TX, USA)

Die Temperaturen und Zeiten der im Folgenden beschriebenen, einzelnen Zyklen waren vom jeweiligen *Primer* abhängig:

- Leptin : 95 °C (30 sec), 55 °C (30 sec), 72 °C (30 sec)
- Adiponektin: 95 °C (30 sec), 55 °C (30 sec), 72 °C (1 min)
- IL-6: 95 °C (30 sec), 55 °C (30 sec), 72 °C (30 sec)
- VEGF: 95 °C (30 sec), 55 °C (1 min), 72 °C (1 min)
- MCP-1: 95 °C (30 sec), 55 °C (30 sec), 72 °C (30 sec)
- CRP: 95 °C (30 sec), 57 °C (1 min), 72 °C (1 min)

Die Amplifikationszyklen betrugen jeweils 40. Zu Beginn gab es eine einmalige Aktivierungsphase bei 95 °C, in der das Enzym aktiviert wurde. Anschließend begannen die Zyklen, wobei jeder Zyklus aus folgenden Phasen bestand:

- Denaturierung der DNA für eine halbe Minute bei 95 °C in Einzelstrang-DNA
- Abkühlung für eine halbe bzw. eine Minute auf 55 °C bzw. 57 °C (humCRP) zur Anlagerung des *Primers* an den denaturierten DNA-Einzelstrang
- DNA-Synthesephase in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) durch hitzestabile DNA-Polymerase von einer halben bzw. einer Minute bei 72 °C

Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz bestimmt.

Die *real time* RT-PCR wurde mit dem ABI PRISM® 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) durchgeführt. Dieses misst die Fluoreszenz eines in die neu synthetisierten DNA Doppelstränge interkalierenden Farbstoffes (SYBR Green). Die emittierte Fluoreszenz wird nach jedem PCR-Zyklus (Verdopplung der Menge an doppelsträngiger DNA) gemessen. Dieses Signal ist dabei direkt proportional zur Menge der gebildeten DNA und steigt wie auch die Menge an DNA exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Korreliert man nun den logarithmischen Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus und vergleicht mit Standards, ist eine direkte quantitative Aussage möglich. Anhand der Menge des PCR-Produktes kann man demnach auf die Menge der Matrizen-DNA schließen.

Die relative Quantifizierung erfolgte mit dem Programm *Relative Expression Software Tool* (REST®) (Pfaffl *et al.*, 2002). Hierzu wurden die Ergebnisse aus der quantifizierenden RT-PCR mittels der „delta delta ct Methode“ relativ zueinander bestimmt.

2.11 DATENDOKUMENTATION, -VERARBEITUNG UND STATISTIK

Alle Daten wurden anonymisiert gesammelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der *Software* SigmaStat® (Version 11.0; SPSS Science; Chicago, IL, USA). Die in den Tabellen 4 und 5 aufgeführten klinischen Charakteristika und laborchemischen Parameter sowie die relative Genexpression vor und nach 120 Minuten wurden mit Hilfe eines *paired t-test* analysiert. Für Intergruppenvergleiche der genannten Parameter zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde ein *unpaired t-test* verwendet. Bei allen anderen Daten [Parameter mit sechs Messzeitpunkten (Vitalparameter, Plasmakonzentrationen der Adipokine und Katecholamine)] erfolgte vor der Auswertung eine Basalkorrektur. Dazu wurde zunächst für jeden Probanden der jeweilige Nullwert von den Werten aller Messzeitpunkte subtrahiert. Anschließend wurde der Mittelwert aller Nullwerte (stimulierte Gruppe und Kontrollgruppe) errechnet. Dieser wurde dann jeweils für jeden Messzeitpunkt zu den errechneten Differenzen addiert. Die so errechneten Rohdaten wurden mittels eines zweifaktoriellen (Gruppe, Zeit) ANOVA (*Two Way Analysis of Variance*) statistisch ausgewertet. Wenn hier signifikante Haupteffekte gefunden wurden, erfolgten nachfolgend *post hoc t-tests*, um signifikante Unterschiede jeweils verglichen mit dem Nullwert zu isolieren. Die Freiheitsgrade wurden entsprechend der Greenhouse-Geisser-Korrektur angepasst. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant, ein p-Wert kleiner als 0,01 als hochsignifikant angesehen. Die grafische und tabellarische Darstellung aller Parameter erfolgte als Mittelwert $\pm$ Standardfehler. Bei einem Probenumfang von $n = 10$ pro Gruppe beträgt die Effektgröße der vorliegenden Studie $d > 1,4$ mit einer Wahrscheinlichkeit von 84%.

3 Ergebnisse

3.1 Anthropometrische Daten, klinische Charakteristika und Laborparameter zu Versuchsbeginn

Im Rahmen der Versuchsvorbereitung bzw. zu Versuchsbeginn wurden anthropometrische Daten, klinische Charakteristika und Laborparameter erhoben, welche mit dem metabolischen Status assoziiert sind. Tabelle 4 fasst diese Werte zusammen. Zwischen beiden Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Parameter [Einheit]	Stimulierte Gruppe	Kontrollgruppe
Alter [Jahre]	24,8 ± 1,263	24,5 ± 0,934
Körpergewicht [kg]	83,54 ± 4,138	82,1 ± 3,443
Größe [cm]	181,65 ± 2,639	182,05 ± 3,268
BMI [kg/m ²]	25,164 ± 0,648	24,675 ± 0,463
Körperfettanteil [%]	19,5 ± 1,419	20,1 ± 0,897
Taillenumfang [cm]	83,07 ± 2,413	87,45 ± 1,667
Hüftumfang [cm]	98,63 ± 2,146	99,55 ± 1,322
<i>Waist to hip ratio</i>	0,841 ± 0,0193	0,865 ± 0,00678
Gesamtcholesterin [mmol/l]	4,114 ± 0,272	4,319 ± 0,166
HDL-Cholesterin [mmol/l]	1,471 ± 0,126	1,531 ± 0,0967
LDL-Cholesterin [mmol/l]	2,29 ± 0,206	2,369 ± 0,133
Triglyzeride [mmol/l]	0,886 ± 0,118	0,972 ± 0,136

Tabelle 4: Beiden Gruppen waren hinsichtlich anthropometrischer Daten und Lipidprofil vergleichbar.

Daten sind Mittelwerte ± Standardfehler. Anthropometrische Daten und das Lipidprofil wurden jeweils zu Versuchsbeginn bestimmt. Zwischen beiden Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

3.2 EFFEKT DER KÄLTE-EXPOSITION AUF DIE KÖRPERTEMPERATUR

Die Körpertemperatur der Probanden wurde zu den jeweiligen Messzeitpunkten sublingual bestimmt.

Die milde Kälte-Exposition resultierte nach einem initialen Anstieg in einer verglichen mit dem Basalwert statistisch signifikanten, kontinuierlichen Reduktion der Körpertemperatur um $0,2^{\circ}\text{C}$ ($0,5\%$, $p<0,05$) nach 120-minütiger Kälte-Stimulation. In der Erwärmungsphase wurde ein weiterer Abfall der Körpertemperatur mit einer maximalen Reduktion um $0,3^{\circ}\text{C}$ (1% , $p<0,01$) nach 180 Minuten beobachtet. In der Kontrollgruppe gab es keine signifikanten Temperaturveränderungen. Jedoch waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen zum Zeitpunkt 180 Minuten statistisch hochsignifikant ($p<0,01$).

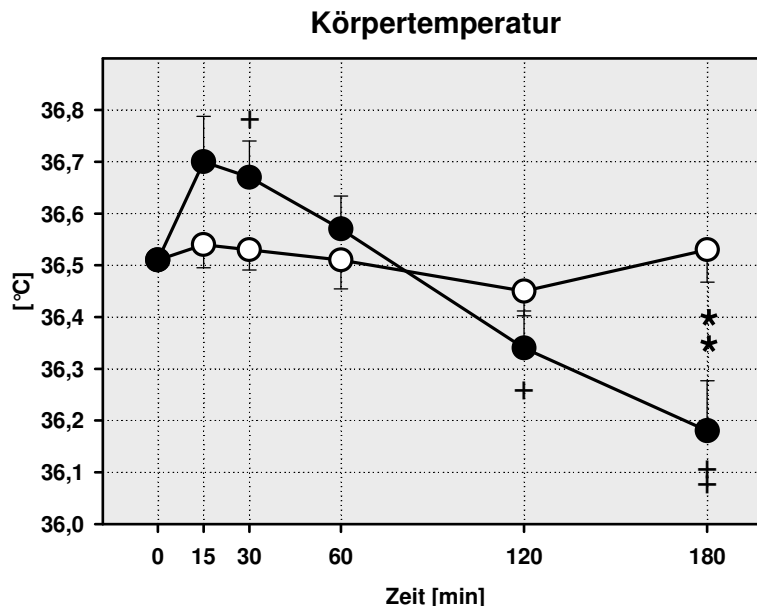


Abbildung 7: Die milde Kälte-Exposition resultierte in einem diskreten Rückgang der mittleren Körperkerntemperatur.

• bedeutet stimulierte Gruppe, ○ bedeutet Kontrollgruppe, + bedeutet $p<0,05$, † bedeutet $p<0,01$ innerhalb der stimulierten Gruppe, verglichen mit dem Basalwert. ** bedeutet $p<0,01$ zwischen beiden Gruppen zu einem bestimmten Messzeitpunkt. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Die Kälte-Exposition führte zu einer Reduktion der mittleren Körperkerntemperatur maximal um $0,33^{\circ}\text{C}$ (1%) nach 180 Minuten. In der Kontrollgruppe gab es keine signifikanten Veränderungen.

3.3 EFFEKT DER KÄLTE-EXPOSITION AUF DAS INDIVIDUELLE KÄLTEEMPFINDEN

Das individuelle Temperaturempfinden der Probanden wurde zu den jeweiligen Messzeitpunkten mit Hilfe einer numerischen Analogskala bestimmt.

Während der Kälte-Exposition stieg der Skalenwert kontinuierlich an und erreichte eine - verglichen mit dem Basalwert - hochsignifikante, maximale Elevation von 54% am der Ende der Stimulationsphase (t=120 Minuten; $p<0,01$). Nach der Erwärmungsphase kehrten die Durchschnittswerte auf das Ausgangsniveau zurück. Im Gegensatz dazu blieben in der Kontrollgruppe die Werte unverändert. Jedoch gab es während der Kälte-Exposition signifikante (t=15 Minuten; $p<0,05$) bzw. hochsignifikante (t=30, 60, 120 Minuten; $p<0,01$) Unterschiede zwischen beiden Gruppen, die im Laufe der Stimulation kontinuierlich zunahmen.

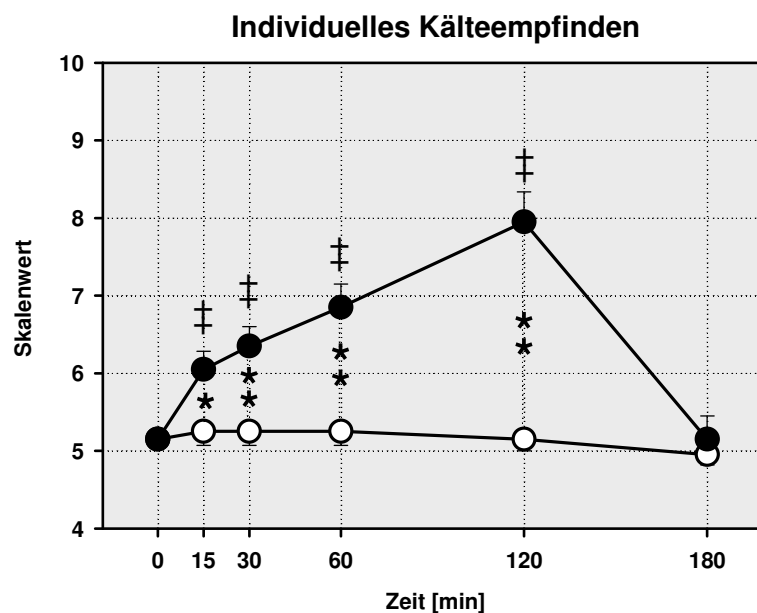


Abbildung 8: Die Kälte-Stimulation führte zu einem kontinuierlichen Anstieg des subjektiven Kälteempfindens der Probanden.

• bedeutet stimulierte Gruppe, ○ bedeutet Kontrollgruppe, ‡ bedeutet $p<0,01$ innerhalb der stimulierten Gruppe, verglichen mit Basalwert; * bedeutet $p<0,05$, ** bedeutet $p<0,01$ zwischen beiden Gruppen zu einem bestimmten Messzeitpunkt. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Das individuelle Kälteempfinden stieg während der Expositionsphase kontinuierlich an mit einem Maximum von 54% nach 120 Minuten und kehrte nach der Erwärmungsphase auf das Ausgangsniveau zurück.

3.4 KARDIOVASKULÄRE ANTWORT AUF DEN KÄLTESTIMULUS

Die kardiovaskulären Parameter Blutdruck und Herzfrequenz wurden zu den einzelnen Messzeitpunkten wie unter 2.4.2.2 beschrieben bestimmt (Abbildungen 9 und 10).

3.4.1 Systolischer und diastolischer Blutdruck

Während der Kälte-Stimulation stieg der diastolische Blutdruck kontinuierlich an. Verglichen mit dem Basalwert erreichte dieser Anstieg ein Maximum von 8 mmHg (11%) nach 120 Minuten. Es gab keine Veränderungen in der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikante Unterschiede zwischen stimulierten und Kontroll-Probanden. Die systolischen Blutdruckwerte beider Gruppen zeigten ähnliche Verläufe mit einem Maximum nach 120 Minuten in der stimulierten Gruppe.

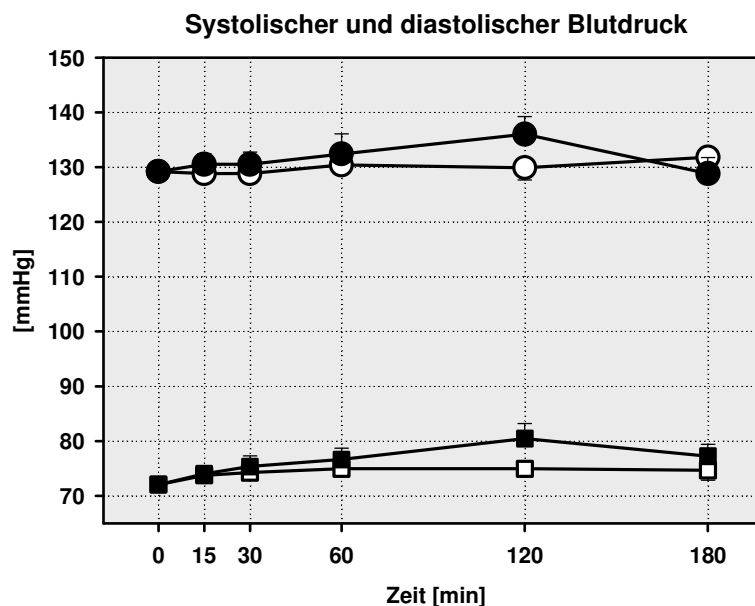


Abbildung 9: Systolischer und diastolischer Blutdruck nahmen während der Kälte-Stimulation kontinuierlich zu.

• bedeutet systolischer Blutdruck in der stimulierten Gruppe, ○ bedeutet systolischer Blutdruck in der Kontrollgruppe, ■ bedeutet diastolischer Blutdruck in der stimulierten Gruppe, □ bedeutet diastolischer Blutdruck in der Kontrollgruppe. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Der diastolische Blutdruck erhöhte sich um maximal 8 mmHg (12%) nach 120 Minuten Kälte-Stimulation. Ähnliche Veränderungen ergaben sich für den systolischen Blutdruck. Trotz der Konstanz der Kontroll-Blutdruckwerte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.4.2 Herzfrequenz

Verglichen mit dem Basalwert nahm die Herzfrequenz nach 15 Minuten um 6 Schläge pro Minute (9%, $p<0,01$) ab und erreichte eine maximale Reduktion um 8 Schläge pro Minute (14%, $p<0,05$) nach 180 Minuten. Während des Kontrollexperiments gab es keine signifikanten Veränderungen. Es ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen, beginnend zum Zeitpunkt 15 Minuten ($p<0,05$) mit einem Maximum nach 180 Minuten ($p<0,01$).

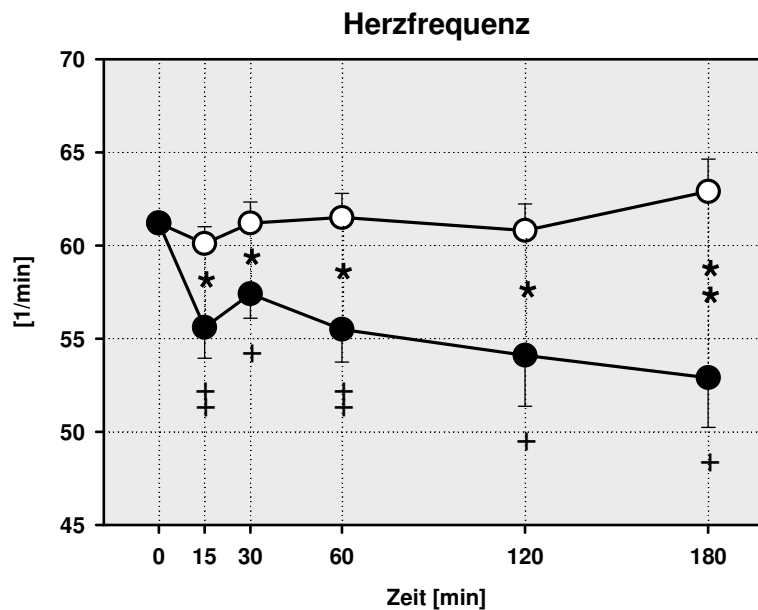


Abbildung 10: Kälte-Stimulation reduzierte die Herzfrequenz.

• bedeutet stimulierte Gruppe, ○ bedeutet Kontrollgruppe; + bedeutet $p<0,05$, † bedeutet $p<0,01$ innerhalb der stimulierten Gruppe, verglichen mit dem Basalwert; * bedeutet $p<0,05$, ** bedeutet $p<0,01$ zwischen beiden Gruppen zu einem bestimmten Messzeitpunkt. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Während der Kälte-Stimulation fiel die Herzfrequenz akut um 6 Schläge pro Minute (9%) nach 15 Minuten und sank in der Aufwärmphase weiter mit einer maximalen Reduktion um 8 Schläge pro Minute (14%) nach 180 Minuten.

3.5 EFFEKT DER KÄLTE-STIMULATION AUF DAS SYMPATHISCHE NERVENSYSTEM

Katecholamine sind als Transmitter essentielle Komponenten des Sympathischen Nervensystems. Die Plasmakonzentrationen von Noradrenalin und Adrenalin wurden zu den jeweiligen Messzeitpunkten erhoben (Abbildungen 11 und 12).

3.5.1 Noradrenalin

Die milde Kälte-Exposition induzierte einen verglichen mit dem Basalwert hochsignifikanten, 100%igen Anstieg der Noradrenalin-Plasmaspiegel nach 120 Minuten ($p < 0,01$). Verglichen mit der Kontrollgruppe war der Unterschied zu diesem Zeitpunkt ebenfalls signifikant ($p < 0,05$). In der Kontrollgruppe gab es im Verlauf keine signifikanten Konzentrationsveränderungen.

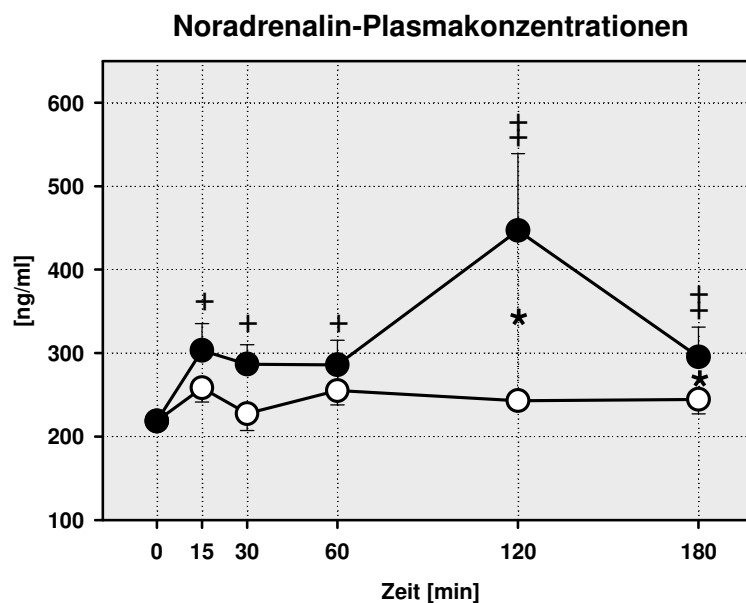


Abbildung 11: Kälte-Exposition verdoppelte die Noradrenalin-Plasmakonzentrationen.

• bedeutet stimulierte Gruppe, ○ bedeutet Kontrollgruppe; + bedeutet $p < 0,05$, ‡ bedeutet $p < 0,01$ innerhalb der stimulierten Gruppe, verglichen mit dem Basalwert; * bedeutet $p < 0,05$ zwischen beiden Gruppen zu einem bestimmten Messzeitpunkt. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Die robuste Sympathikusaktivierung zeigte sich in einer Verdopplung der Noradrenalinspiegel nach 120 Minuten.

3.5.2 Adrenalin

Im Gegensatz zu Noradrenalin ergaben sich im Verlauf des Experiments in beiden Gruppen keine signifikanten Veränderungen der Adrenalin-Plasmaspiegel. Die Kontrollspiegel waren verglichen mit den Konzentrationen in der stimulierten Gruppe höher, ohne dass diese Unterschiede statistische Signifikanz erreichten.

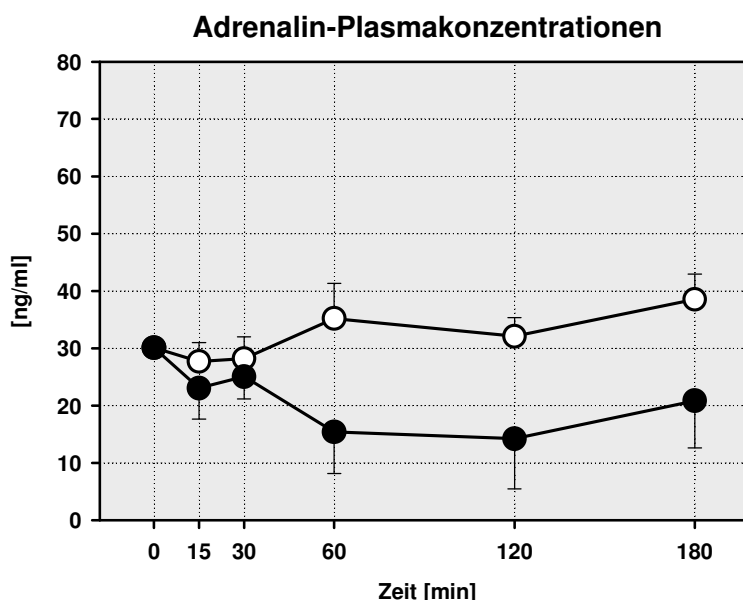


Abbildung 12: Kälte-Exposition hatte keine Effekte auf die Adrenalin-Plasmaspiegel.

● bedeutet stimulierte Gruppe, ○ bedeutet Kontrollgruppe. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler.

In beiden Gruppen ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Adrenalin-Plasmaspiegel.

3.6 VERÄNDERUNGEN DES ADIPOKINPROFILS DURCH STIMULATION DES SYMPATHISCHEN NERVENSYSTEMS

Zu den angegebenen Messzeitpunkten wurden durch die Bestimmung der Plasmakonzentrationen translationale Veränderungen folgender, an der Regulation zentraler Komponenten des metabolischen Syndroms beteiligter Adipokine bestimmt (Abbildungen 13, 15, 17, 19 und 21). Weiterhin wurden transkriptionale Veränderungen dieser Adipokine mittels abdominell-subkutaner Fettgewebsbiopsien zu Beginn und nach 120 Minuten gemessen (Abbildungen 14, 16, 18, 20 und 22).

3.6.1 Leptin

Leptin, das als prototypisches Adipokin gilt, ist u.a. ein zentraler Regulator der Energiehomöostase. Es induziert eine negative Energiebilanz, indem es die Synthese verschiedener Proteine im Hypothalamus so moduliert, dass es infolge zu einer Hemmung des Appetits und der Nahrungsaufnahme (anorexigene Wirkung) und auch zu einem gesteigerten Energieverbrauch kommt.

Die Kälte-Stimulation führte zu einem Rückgang der Leptin-Plasmaspiegel um 17% nach 120-minütiger Kälte-Stimulation (Abbildung 13). Die maximale Reduktion (18%) wurde nach weiteren 60 Minuten am Experimentende gemessen. Verglichen mit dem Basalwert war dieser Abfall signifikant ($t=120, 180 \text{ min}$, $p<0,01$). Jedoch ergaben sich zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. In der Kontrollgruppe nahmen die Leptinspiegel ebenfalls über die Versuchsdauer ab, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Die mRNA-Spiegel im subkutanen Fettgewebe blieben verglichen mit den Basal- und den Kontrollspiegeln unverändert (Abbildung 14).

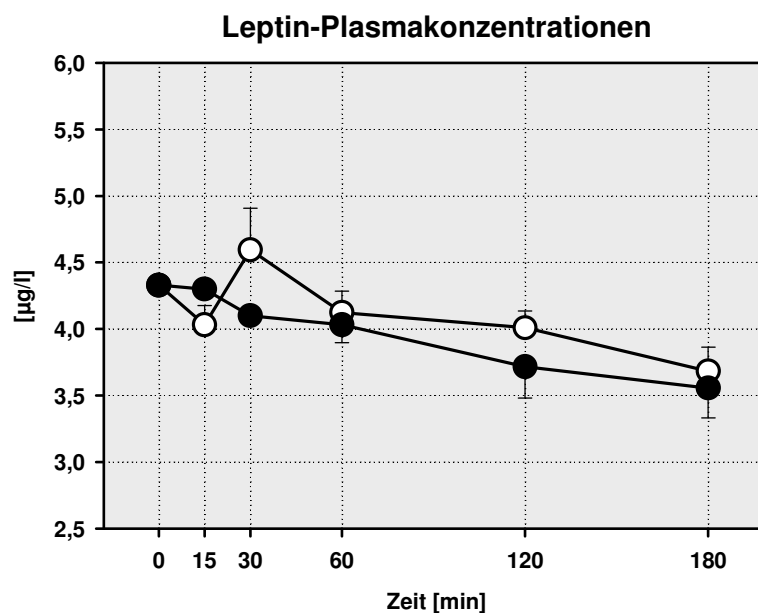


Abbildung 13: Kälte-induzierte Sympathikusstimulation reduzierte die Leptin-Sekretion.

● bedeutet stimulierte Gruppe, ○ bedeutet Kontrollgruppe. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. In der stimulierten Gruppe fielen die Leptinspiegel um maximal 18% nach 180 Minuten. Die Kontrollspiegel zeigten sich nach derselben Zeit ebenfalls erniedrigt (15%).

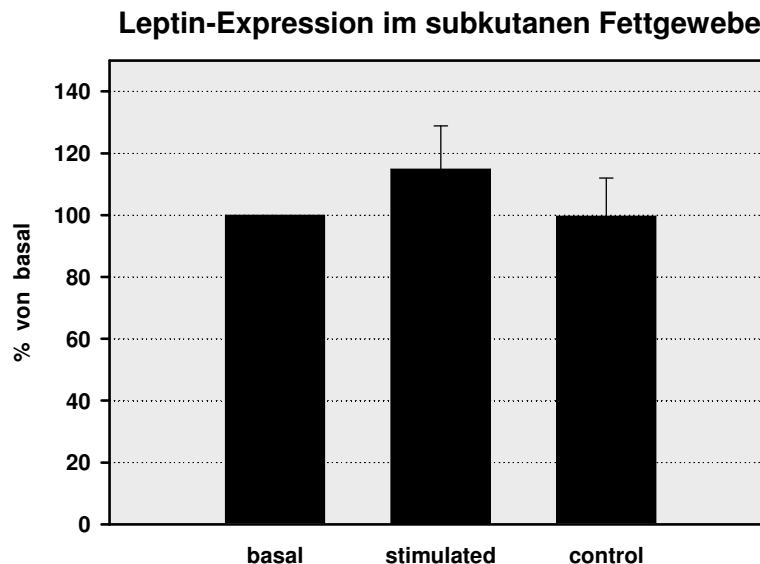


Abbildung 14: Akute Sympathikusstimulation hatte keinen Effekt auf die mRNA-Expression von Leptin im subkutanen Fettgewebe.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionsanalyse von Adiponektin im abdominell-subkutanen Fettgewebe in der stimulierten und Kontrollgruppe jeweils nach 120 Minuten verglichen mit dem Basalwert, der gleich 100% gesetzt wurde.

Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler.

Verglichen mit den Basalspiegeln und der Kontrollgruppe blieben die mRNA-Level nach zweistündiger Sympathikusstimulation unverändert.

3.6.2 Adiponektin

Adiponektin ist ein Adipozyten-spezifisches Hormon, das wie Leptin besonders im subkutanen Fettgewebe exprimiert wird. Es besitzt eine profunde, insulinsensitivierende Wirkung wahrscheinlich durch eine Verbesserung der hepatischen sowie muskulären Insulinwirkung und Veränderungen des Fettsäurestoffwechsels.

Unter Kälte-Stimulation waren die Adiponektin-Serumspiegel akut nach 30 Minuten im Vergleich zum Basalwert um 13% erniedrigt (Abbildung 15). Dieser Effekt hielt während der weiteren Kälte-Exposition an, sodass die maximale Reduktion 16% nach 60 Minuten ($p < 0,05$) und 15% nach 120 Minuten Kälte-Applikation betrug. Im Verlauf der Erwärmungsphase kam es dann zu einem Anstieg der Spiegel mit einer Annäherung an den Basalwert nach 180 Minuten. In der Kontrollgruppe konnte ein akuter und signifikanter Anstieg der Adiponektinspiegel beobachtet werden, der nach 15 Minuten begann, ein Maximum von 25% nach 30 Minuten ($p < 0,05$) aufwies und für weitere 30 Minuten (21% zum Zeitpunkt 60 Minuten) anhielt.

Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren signifikant zu den Zeitpunkten 30, 60 (beide $p < 0,01$) und 180 Minuten ($p < 0,05$). Auf posttranslationaler Ebene zeigten sich die mRNA-Spiegel beider Gruppen unverändert (Abbildung 16).

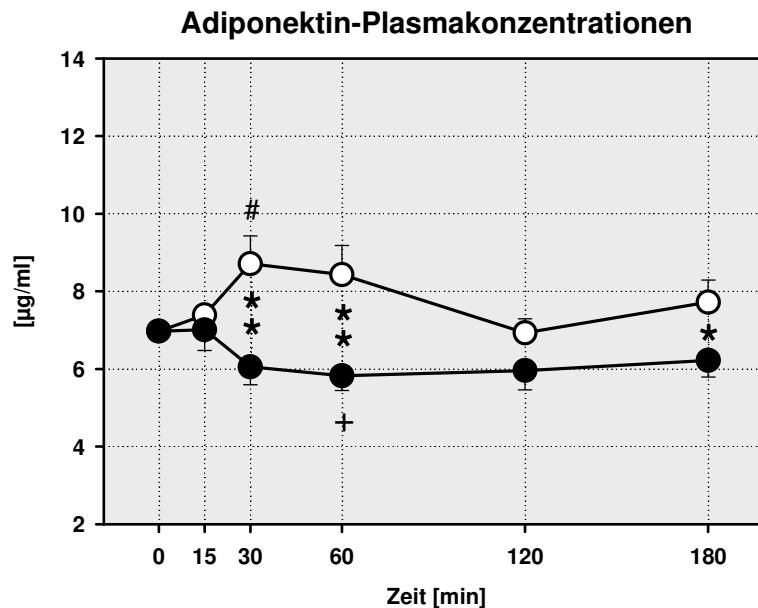


Abbildung 15: Kälte-induzierte Sympathikusstimulation reduzierte die Adiponektin-Sekretion.

● bedeutet stimulierte Gruppe, ○ bedeutet Kontrollgruppe; + bedeutet $p < 0,05$ innerhalb der stimulierten Gruppe, verglichen mit dem Basalwert; # bedeutet $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe, verglichen mit dem Basalwert; * bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,01$ zwischen beiden Gruppen zu einem bestimmten Messzeitpunkt. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Unter Kälte-Exposition zeigte sich ein akuter Abfall der Adiponektinspiegel um maximal 16% nach 60 Minuten. In der Kontrollgruppe waren die Spiegel dagegen maximal um 25% nach 30 Minuten erhöht.

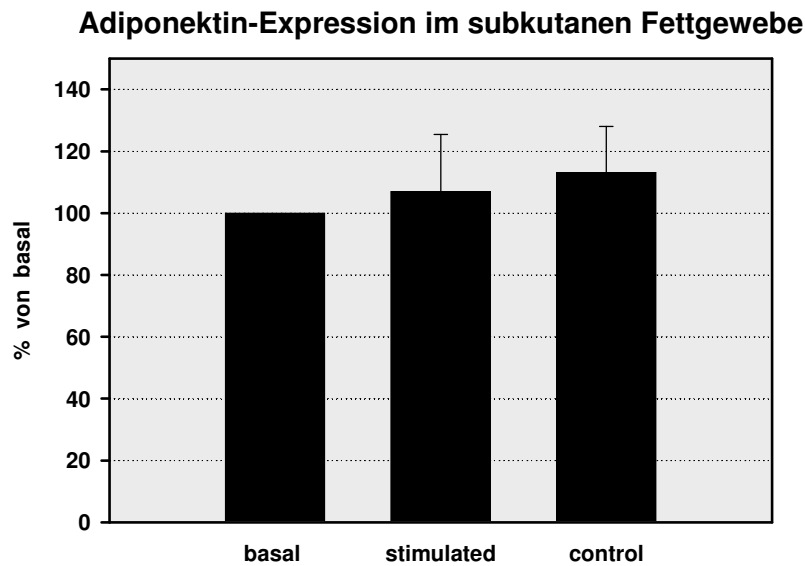


Abbildung 16: Akute Sympathikusstimulation hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Adiponektin im subkutanen Fettgewebe.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionsanalyse von Adiponektin im abdominell-subkutanen Fettgewebe in der stimulierten und Kontrollgruppe jeweils nach 120 Minuten verglichen mit dem Basalwert, der gleich 100% gesetzt wurde. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Verglichen mit den Basalspiegeln und der Kontrollgruppe zeigten sich die mRNA-Level nach zweistündiger Sympathikusstimulation unverändert.

3.6.3 Interleukin-6

IL-6 ist ein hauptsächlich proinflammatorisches Zytokin, dessen zirkulierende Blutspiegel zu circa 30 Prozent aus dem Fettgewebe stammen. Es besitzt durch Hemmung der Insulinsignalweiterleitung Insulinresistenz induzierende Effekte und ist bei Adipositas und Typ-2-Diabetes-mellitus in erhöhten Konzentrationen vorhanden.

Die Plasmakonzentrationen von IL-6 erhöhten sich unter Kälte-induzierter Sympathikusstimulation kontinuierlich (Abbildung 17). Nach 120-minütiger Stimulation betrug die durchschnittliche Erhöhung 240%. Das Maximum von 400% wurde nach 180 Minuten erreicht. In der Kontrollgruppe wurde ebenfalls zum Zeitpunkt 120 Minuten ein Anstieg der IL-6-Spiegel um 340% beobachtet, der für weitere 60 Minuten anhielt (260% zum Zeitpunkt 180 Minuten). Verglichen mit dem Basalwert waren die Anstiege in beiden Gruppen nach 120 Minuten hochsignifikant ($t=120, 180$ Minuten, $p<0,01$). Jedoch gab es zwischen den Gruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede, obwohl der Anstieg

der Kontrollspiegel - abgesehen von einem *Peak* bei 120 Minuten - weniger steil ausfiel.

Dem Sekretionsanstieg entsprechend zeigte sich auf transkriptionaler Ebene in beiden Gruppen nach 120 Minuten ein unspezifischer Trend zu verstärkter Expression verglichen mit dem Basalwert (46% in der stimulierten Gruppe, 63% in der Kontrollgruppe; Abbildung 18). Die unterschiedlich starke Erhöhung war statistisch nicht signifikant.

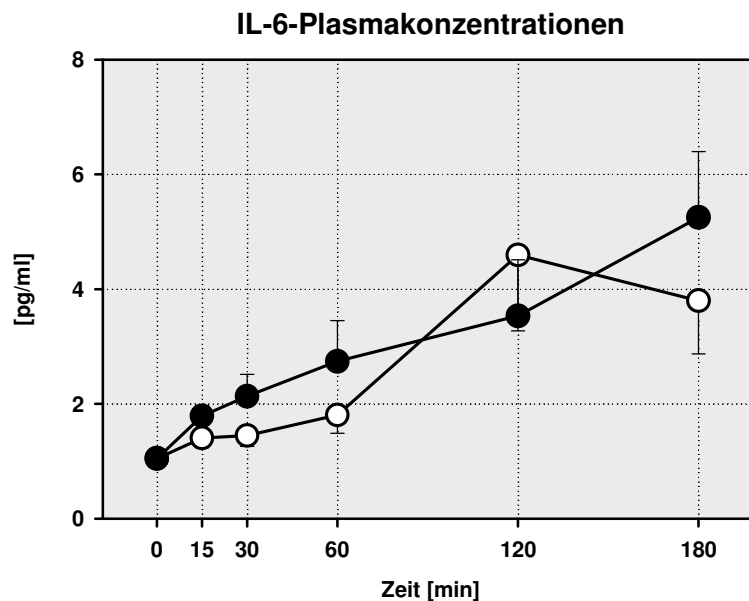


Abbildung 17: Kälte-induzierte Sympathikusstimulation verursachte einen unspezifischen Anstieg der IL-6-Plasmaspiegel in beiden Gruppen.

● bedeutet stimulierte Gruppe, ○ bedeutet Kontrollgruppe. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler.

Die IL-6-Plasmaspiegel stiegen in beiden Gruppen an. Unter Sympathikusstimulation betrug die maximale Erhöhung 400% nach 180 Minuten. Der Anstieg in der Kontrollgruppe hatte sein Maximum von 340% bei 120 Minuten. Zwischen beiden Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

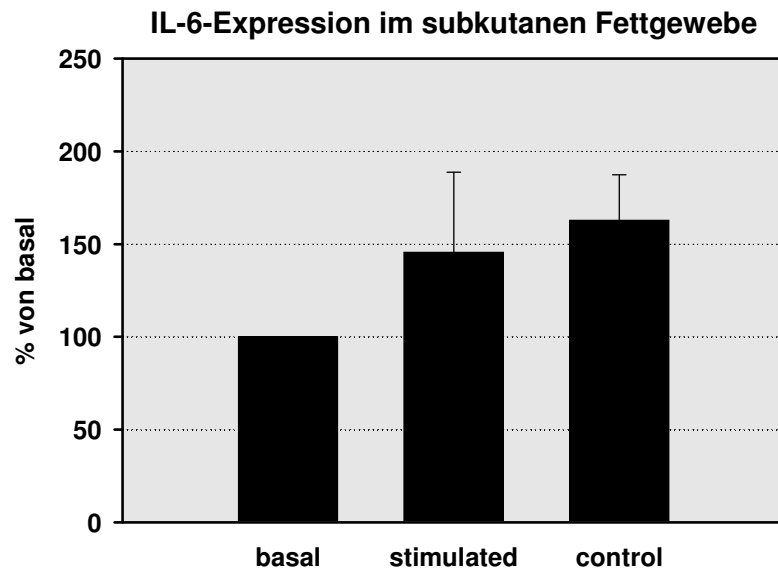


Abbildung 18: Akute Sympathikusstimulation führte zu einer unspezifischen Erhöhung der Genexpression von IL-6 im subkutanen Fettgewebe.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionsanalyse von IL-6 im abdominell-subkutanen Fettgewebe in der stimulierten und Kontrollgruppe jeweils nach 120 Minuten verglichen mit dem Basalwert, der gleich 100% gesetzt wurde. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Nach 120 Minuten zeigte sich in beiden Gruppen ein Trend zu verstärkter Expression (46% in der stimulierten Gruppe, 63% in der Kontrollgruppe). Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

3.6.4 Monozyten-chemoattraktives Protein-1

MCP-1 ist ein durch Adipozyten exprimiertes und sezerniertes Zytokin mit proinflammatorischer Wirkung, dessen Serumspiegel ebenfalls positiv mit dem BMI korrelieren. Es führt zu einer Infiltration des Fettgewebes durch Makrophagen als wichtige Inflammationsquelle.

Verglichen mit dem Basalwert und den Kontrollspiegeln zeigten die MCP-1-Plasmakonzentrationen in der stimulierten Gruppe einen akuten Anstieg mit einem Maximum von 53% nach 30 Minuten, der über die Dauer des Experiments anhielt (Abbildung 19). Dieser Effekt erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Trotz des Trends zu erhöhten Serumspiegeln unter Sympathikusstimulation gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Auf Transkriptionsebene waren die mRNA-Spiegel beider Gruppen nach 120 Minuten verglichen mit dem Ausgangswert tendenziell erhöht (32% in der stimulierten Gruppe, 67% in der Kontrollgruppe; Abbildung 20). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

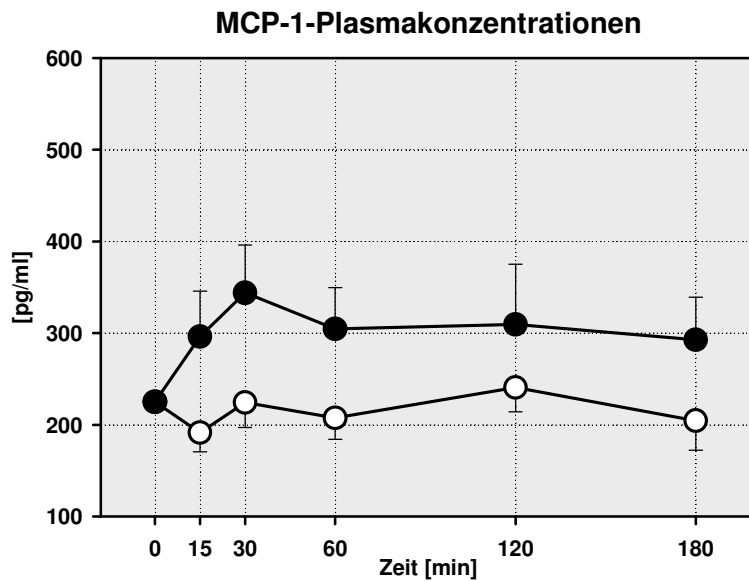


Abbildung 19: MCP-1-Plasmakonzentrationen tendierten zu akut erhöhten Werten unter Sympathikusstimulation.

● bedeutet stimulierte Gruppe, ○ bedeutet Kontrollgruppe. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Unter Sympathikusstimulation zeigten die MCP-1-Plasmaspiegel einen Trend zu akut erhöhten Werten (53% nach 30 Minuten). Dieser Effekt hielt verglichen mit dem Basalwert und den Kontrollkonzentrationen über die Dauer des Experiments an.

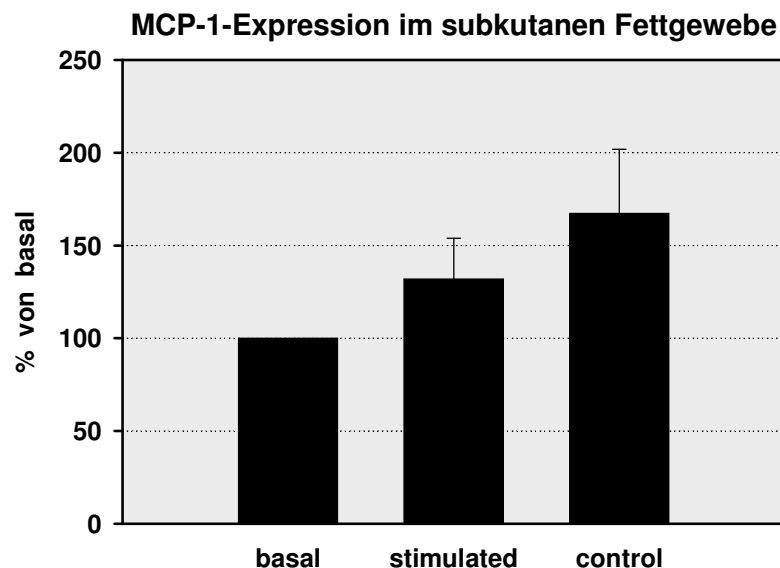


Abbildung 20: Akute Sympathikusexzitation bewirkte einen unspezifischen Trend zu verstärkter Genexpression von MCP-1 im subkutanen Fettgewebe.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionsanalyse von MCP-1 im abdominell-subkutanen Fettgewebe in der stimulierten und Kontrollgruppe jeweils nach 120 Minuten verglichen mit dem Basalwert, der gleich 100% gesetzt wurde. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Nach 120 Minuten zeigte sich in beiden Gruppen ein Trend zu verstärkter Expression (32% in der stimulierten Gruppe, 67% in der Kontrollgruppe). Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

3.6.5 Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF ist weiteres Inflammation-assoziiertes Adipokin, welches bei physiologischer und pathologischer Gefäßformation eine Rolle spielt. Die Plasmaspiegel dieses angiogenen Faktors und seiner Isoformen korrelieren positiv mit dem BMI. Es wird als zentraler Mediator der Angiogenese und Adipogenese angesehen - beides essentielle Prozesse für die Adipozytendifferenzierung in der Genese der Adipositas.

In dieser Studie konnten keine Effekte einer akuten Sympathikusaktivierung auf die VEGF-Sekretion nachgewiesen werden (Abbildung 21). In beiden Gruppen zeigte sich eine unspezifische Erhöhung der Plasmakonzentrationen (11% in der stimulierten Gruppe, 12% in der Kontrollgruppe) nach 30 Minuten ohne statistische Signifikanz. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen auf Sekretionsebene in der stimulierten Gruppe konnte ein Trend zu vermehrter VEGF-Genexpression (99%) nach zweistündiger Kälte-Stimulation beobachtet werden (Abbildung 22). Im Gegensatz dazu ergaben sich bei den mRNA-Kontrollspiegeln keine Veränderungen verglichen mit dem Ausgangswert. Trotz des Anstiegs in der stimulierten Gruppe waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen nicht signifikant.

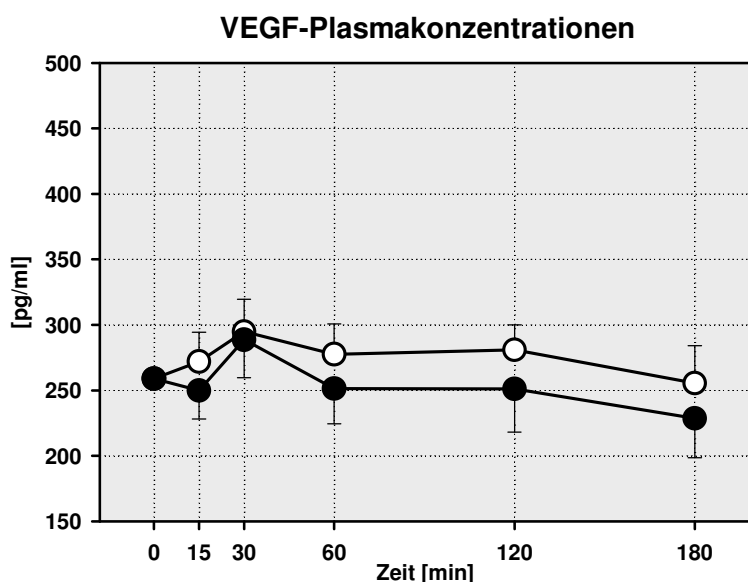


Abbildung 21: Akute Sympathikusstimulation bewirkte eine unspezifische Erhöhung VEGF-Sekretion nach 30 Minuten.

● bedeutet stimulierte Gruppe, ○ bedeutet Kontrollgruppe; Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Es zeigte sich eine akute, unspezifische Erhöhung der Plasmaspiegel in beiden Gruppen nach 30 Minuten.

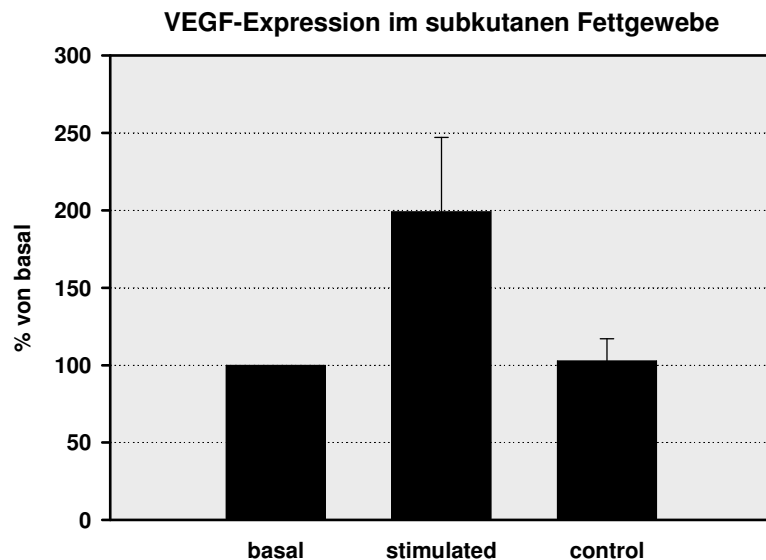


Abbildung 22: Akute Sympathikusstimulation führte zu verstärkter Genexpression von VEGF im subkutanen Fettgewebe.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionsanalyse von VEGF im abdominell-subkutanen Fettgewebe in der stimulierten und Kontrollgruppe jeweils nach 120 Minuten verglichen mit dem Basalwert, der gleich 100% gesetzt wurde. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Nach 120-minütiger Kälte-Stimulation wurde ein Trend zu verstärkter Expression (99%) gemessen. Dieser Effekt fehlte in der Kontrollgruppe. Trotz des Anstiegs bei den stimulierten Probanden gab es zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

3.7 WEITERE ENDOKRINOLOGISCHE PARAMETER

Weitere endokrinologische Parameter, die mit dem metabolischen Syndrom assoziiert sind, wurden in beiden Gruppen zu Versuchsbeginn und nach 120 Minuten bestimmt. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse zusammen.

Die Glukosekonzentrationen waren nach Kälte-Exposition um 6,6 mg/dl (7%, $p < 0,05$) erniedrigt. Reflektorisch kam es zu einer statistisch signifikanten Senkung der Insulin-Plasmaspiegel um 35% ($p < 0,05$) verglichen mit dem Ausgangswert. Dagegen wurden bei beiden Parametern in der Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen gefunden.

In beiden Gruppen blieben die Plasmaspiegel von Cortisol in Bezug auf den Ausgangswert unverändert.

Schilddrüsenfunktionstests ergaben eine signifikante Reduktion der Konzentrationen von Thyreotropin (TSH) nach 120 Minuten Kälte-Stimulation um 12% ($p < 0,05$), jedoch keine Veränderungen der Spiegel von freiem Trijodthyronin

(fT3) und freiem Thyroxin (fT4). In der Kontrollgruppe blieben die Konzentrationen von TSH, fT3 und fT4 verglichen mit dem Basalwert unverändert.

Die Plasmaspiegel des C-reaktiven Proteins (CRP) erhöhten sich unter Kälte-Applikation nicht signifikant, während in der Kontrollgruppe eine ebenfalls nicht signifikante Konzentrationsabnahme zu messen war. CRP-mRNA wurde außerdem im subkutanen Fettgewebe bestimmt, ohne relevante Expressionsveränderungen zu erhalten (Abbildung 24).

Parameter	Kälte-Stimulation		Kontrollgruppe	
	t = 0 min	t = 120 min	t = 0 min	t = 120 min
Glukose [mIU/l]	91,5 ± 1,945	84,9 ± 5,689*	96,7 ± 2,329	93,9 ± 1,991
Insulin [mIU/l]	5,346 ± 0,815	3,501 ± 0,364*	5,389 ± 0,584	4,238 ± 0,661
ACTH [ng/l]	22,07 ± 2,094	14,583 ± 2,071*	17,527 ± 2,434	22,12 ± 2,576*
Cortisol [µg/dl]	10,138 ± 1,182	9,538 ± 1,461	8,895 ± 1,214	8,616 ± 1,218
CRP [mg/l]	0,578 ± 0,091	0,7 ± 0,146	0,878 ± 0,26	0,667 ± 0,165
TSH [mIU/l]	1,673 ± 0,186	1,477 ± 0,192*	1,633 ± 0,135	1,623 ± 0,141
fT3 [pmol/l]	5,327 ± 0,172	5,280 ± 0,189	5,088 ± 0,218	5,057 ± 0,213
fT4 [pmol/l]	15,459 ± 0,272	15,649 ± 0,377	14,9 ± 0,581	14,98 ± 0,56

Tabelle 5: Kälte-induzierte Sympathikusexzitation reduzierte die Plasmakonzentrationen von Glukose, Insulin und TSH.

* bedeutet $p < 0,05$ innerhalb einer Gruppe, verglichen mit dem Basalwert. Daten sind Mittelwerte ± Standardfehler. Die Blutglukose-, Insulin-, ACTH- und TSH-Spiegel nahmen während der 120-minütigen Kälte-Exposition signifikant ab. Die CRP-Plasmaspiegel zeigten in der stimulierten Gruppe eine nicht signifikante Zunahme, während die Kontrollspiegel nach 120 Minuten abnahmen.

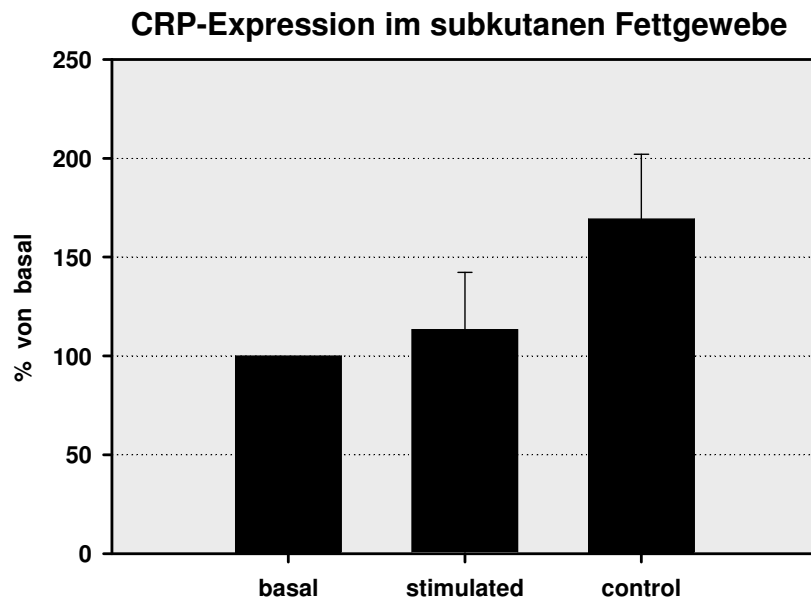


Abbildung 23: Kälte-induzierte Sympathikusstimulation hatte keinen Einfluss auf die CRP-Expression im subkutanen Fettgewebe.

Dargestellt ist die relative mRNA-Expressionsanalyse von CRP im abdominell-subkutanen Fettgewebe in der stimulierten und Kontrollgruppe jeweils nach 120 Minuten verglichen mit dem Basalwert, der gleich 100% gesetzt wurde. Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. Während es unter Kälte-Stimulation zu keiner Expressionsveränderung kam, konnte in der Kontrollgruppe ein Trend zu verstärkter Expression nach 120 Minuten nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Die akute, Kälte-mediierte Aktivierung des SNS verursachte einen signifikanten Anstieg der Plasmakonzentrationen von Noradrenalin sowie eine Abnahme der Herzfrequenz. Unter Kälte-Exposition kam es zu einer spezifischen Abnahme der Adiponektin-Plasmaspiegel sowie zu einem Trend zu akut verstärkter MCP-1-Sekretion. Weiterhin konnten unspezifische Veränderungen der Leptin- und IL-6-Plasmaspiegel bei Menschen festgestellt werden. Signifikante Alterationen der Adipokin-Genexpression im abdominell-subkutanen Fettgewebe konnten in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

Die Effekte einer akuten Sympathikusstimulation auf die *in vivo* Regulation der endokrinen Fettgewebefunktion beim Menschen sind bisher wenig erforscht. Bislang wurden in wenigen - hauptsächlich tierexperimentellen Studien - die Veränderungen einzelner Adipokine gemessen, ohne diese mit Kontrollgruppen zu vergleichen. Im Hinblick auf die Multifunktionalität des Fettgewebes wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte des SNS auf die Regulation verschiedener Adipokine untersucht, die mit dem metabolischen Syndrom und dessen kardiovaskulären Komplikationen assoziiert zu sein scheinen. Dabei sollen anhand des gewählten Modells der akuten Sympathikusstimulation als *proof of principle* Mechanismen der adrenergen Regulation der endokrinen Fettgewebsaktivität gefunden werden.

4.1 METHODISCHE DISKUSSION

In vorherigen Studien wurden hauptsächlich zwei Methoden verwendet, eine Sympathikusstimulation zu imitieren bzw. zu induzieren, um die akute Adipokin-Regulation zu untersuchen: die intravenöse Applikation von sympathomimetischen Aminen (Donahoo *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2002; Ricci *et al.*, 2005) sowie von Adrenalin (Couillard *et al.*, 2002) und Kälte-Exposition. Ein alternatives Verfahren zur SNS-Exzitation ist auch Fasten (Migliorini *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2002). Die Stimulation mittels Kälte wurde in vorherigen Untersuchungen z.B. in Kältekammern (Matsumoto *et al.* 1999, Ricci *et al.*, 2000, Puerta *et al.*, 2002, Imai *et al.*, 2006) oder durch *in vitro* Inkubationen bei niedrigen Temperaturen (Peino *et al.*, 2000; Zeyl *et al.*, 2004) und Kaltwasser-Immersionen (Zeyl *et al.*, 2004) erreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Stimulation des SNS eine zweistündige Kälte-Exposition gewählt. Erstmals wurde hierfür ein Ganzkörper-Kälte-Anzug verwendet. Hiermit konnten ein starker und kontinuierlicher Anstieg des subjektiven Kälteempfindens sowie eine signifikante Abnahme der Körpertemperatur erreicht werden.

Das SNS ist bekannt für seine regionalen Unterschiede, was Innervation und Aktivität anbetrifft. Beispielsweise würde eine erhöhte SNS-Aktivität im weißen Fettgewebe zu einem lokalen Anstieg von Noradrenalin als postganglionärem Transmitter führen. Die Plasmaspiegel von Noradrenalin würden jedoch nur bei einem Übertritt in die systemische Zirkulation unter Kälte-Exposition ansteigen (Rayner und Trayhurn, 2001; Romijn und Fliers, 2005; Lafontan 2008). Die unterschiedlichen Verfahren zur Stimulation des SNS haben Vor- und Nachteile. Es bleibt unklar, ob die systemische Applikation adrenerger Agonisten mit adäquaten lokalen Noradrenalin-Konzentrationen und entsprechenden Effekten korreliert. Dagegen erhöht Kälte-Exposition die globale SNS-Aktivität, was anhand der erhöhten Noradrenalin-Konzentrationen messbar ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Körpertemperatur sublingual gemessen. Aufgrund des Versuchsaufbaus mit einem eng anliegenden Kälte-Anzug ist die direkte Messung der Hauttemperatur nicht durchgeführt worden.

4.2 VERÄNDERUNGEN DER VITALPARAMETER

Als Zeichen der Validität der verwendeten Methodik führte der Kältestimulus zu einer diskreten Reduktion der Körperkerntemperatur sowie zu einem kontinuierlichen und starken Anstieg des individuellen Kälteempfindens mit dem Auftreten von Zittern bei zwei Probanden. Ähnliche Temperaturveränderungen ohne Erreichen des Ausgangsniveaus während der Erwärmungsphase wurden bereits in vorherigen Studien beobachtet (van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2002; Claessens-van Ooijen *et al.*, 2006). Die Erwärmungsphase führte in der vorliegenden Studie nicht zu einer Rückkehr der Körpertemperatur auf das Ausgangsniveau. Vielmehr wurde trotz der Normalisierung des subjektiven Kälteempfindens infolge des Sistierens des dermalen Kältestimulus ein weiterer signifikanter Abfall der Körpertemperatur während der Erwärmungsphase gesehen. Folglich war diese entweder nicht lang genug oder die Temperatur von 25 °C nicht ausreichend hoch.

Weiterhin muss eine zeitliche Latenz vermutet werden: die Länge der Sympathikusexzitation überdauerte scheinbar die Periode der Kälte-Stimulation, was auch anhand der Beobachtungen deutlich wird, dass die Noradrenalin-Konzentrationen (siehe Abschnitt 4.3) und die Herzfrequenz in der stimulierten Gruppe nach Kälte-Exposition signifikant erhöht bzw. erniedrigt blieben. Der Anstieg der Körpertemperatur innerhalb der ersten 30 Minuten scheint durch Thermogenese verursacht zu sein, bevor im Anschluss die Kälte-Exposition hoch genug war, die Körpertemperatur kontinuierlich zu reduzieren. Vallerand *et al.* zeigten ebenfalls einen Anstieg der Körpertemperatur nach Kälte-Exposition. Der maximale Anstieg wurde hier nach 40 Minuten gemessen, anschließend kam es zu einem kontinuierlichen Rückgang der Körpertemperatur, allerdings ohne eine Hypothermie zu erreichen. Der initiale Anstieg war nur bei rektaler Temperaturmessung signifikant, nicht dagegen bei Messung im Gehörgang (Vallerand *et al.*, 1992). Generell sind scheinbar Veränderungen der Körpertemperatur unter Kälte-Exposition stark von der Art der Messung (sublingual, rektal, axillär, dermal) und der Form der Kälte-Applikation abhängig. Weiterhin zeigten einige Studien auch individuelle Unterschiede der Körpertemperatur nach milder Kälte-Exposition (van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2002). Claessens-van Ooijen *et al.* bekräftigten mit ihren Beobachtungen das komplexe „Konzept einer dynamischen Regulation der Körpertemperatur“ (Claessens-van Ooijen *et al.* 2006).

Die Effekte einer Kälte-Exposition auf hämodynamische Parameter wurden bereits in vorherigen Studien untersucht. Die beobachteten kardiovaskulären Veränderungen mit erhöhten Blutdruckwerten und einem signifikanten Rückgang der Herzfrequenz sind ebenfalls charakteristisch für eine Kälte-medierte SNS-Exzitation und konform mit diesen Studien (Sramek *et al.*, 2000; Korhonen, 2006; Boussuges *et al.*, 2007), obgleich der Blutdruckanstieg in der vorliegenden Studie nicht signifikant war. Der Abfall der Herzfrequenz kann als baroreflektorische Reduktion der kardialen sympathischen Aktivität interpretiert werden. Eine adrenerg vermittelte Vasokonstriktion unter Kälte-Stimulation könnte zu den beobachteten kardiovaskulären Veränderungen beitragen (Deussen 2007, Rintamaki 2007). Jedoch werden die Reduktion der Herzfrequenz sowie der Blutdruckanstieg als Zeichen einer erhöhten Aktivität des SNS gedeutet, wenngleich die Mehrheit der Alterationen dieser hämodynamischen Parameter von der Art der Kälte-Exposition

abhängt. So wiesen Heindl *et al.* nach, dass bei unterschiedlichen Kältestimuli (Kaltluftinhalation, lokale Kälte-Applikation intranasal und -oral sowie kutan an Stirn und Hand) Muster und Ausmaß des Herzfrequenzabfalls bzw. Blutdruckanstiegs variieren (Heindl *et al.*, 2004). Unabhängig davon wurde postuliert, dass die Kälte-induzierten Veränderungen der kardiovaskulären Parameter über das SNS mediert werden, am ehesten über die Stimulation Kälte-sensitiver afferenter Bahnen.

4.3 EFFEKT DER KÄLTE-EXPOSITION AUF DAS SYMPATHISCHE NERVENSYSTEM

Als Indiz einer robusten Sympathikusaktivierung führte der diskrete Rückgang der Körpertemperatur zu einem zweifachen Anstieg der Plasmaspiegel von Noradrenalin, jedoch nicht von Adrenalin. Diese differenzierte Antwort des SNS mit dem beschriebenen Muster der Katecholamin-Konzentrationen ist ebenfalls typisch für die Stimulation mittels Kälte und wurde bereits in älteren Experimenten gesehen, die zwei- bis fünffache Anstiege der Noradrenalin-Plasmaspiegel nach Kälte-Exposition zeigten (Weeke und Gundersen, 1983, Hiramatsu *et al.*, 1984, Leppaluoto *et al.*, 1988, Ricci *et al.*, 2000; Sramek *et al.*, 2000, Wijers *et al.*, 2007). Leppaluoto veröffentlichte 2005 eine tabellarische Zusammenfassung der bis dahin diesbezüglich vorhandenen Daten (Leppaluoto *et al.*, 2005). In der großen Mehrheit dieser Studien blieben die Adrenalin-Plasmakonzentrationen unverändert. Dies und das in der vorliegenden Arbeit entsprechend gemessene Katecholaminmuster sprechen für eine Exzitation der postsynaptischen noradrenergen Sympathikusbahnen ohne signifikante Aktivierung des Nebennierenmarks durch den Kältereiz. In der Tat scheint das Nebennierenmark unempfindlich gegenüber einem Kältestimulus zu sein (Daly, 1992), welcher eher eine systemische Stimulation der lokalen adrenergen Nerven verursacht, nicht nur im weißen Fettgewebe. In diesem Zusammenhang wurde bereits eine geringere Bedeutung des Nebennierenmarkes in der katecholaminergen Regulation des weißen Fettgewebes beschrieben verglichen mit dessen direkter sympathischer Innervation (Rayner, 2001; Romijn und Fliers, 2005). Hierzu gaben bereits Studien über *Turnover*-Raten von Noradrenalin im murinen weißen Fettgewebe Evidenz dafür, dass die sympathische Aktivität im weißen Fettgewebe unter Kälte-Exposition gesteigert ist (Garofalo *et al.*, 1996). Neben der für Kältereize typischen differentiellen Sympathikusstimulation und dem beschriebenen Herzfrequenzabfall

zeigt das Muster der Noradrenalin-Plasmaspiegel in der Kontrollgruppe ohne Konzentrationserhöhung zum Zeitpunkt 120 Minuten, dass die SNS-Aktivierung Kälte-mediert und nicht im Sinne eines „Spritzeneffektes“ durch die Biopsien oder Blutentnahmen bedingt ist.

4.4 ALTERATIONEN IM ADIPOKINPROFIL

Das menschliche Fettgewebe ist ein komplexes, multifunktionales sowie endokrin und metabolisch hoch aktives Organ, welches eine Vielzahl bioaktiver Adipokine produziert, die eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Kernkomponenten des metabolischen Syndroms spielen. In der vorliegenden Arbeit bewirkte die akute Stimulation des SNS insbesondere auf Translationsebene Alterationen im Adipokinprofil.

4.4.1 Leptin

Leptin kann als prototypisches Adipokin angesehen werden. Es wird fast ausschließlich im weißen Fettgewebe produziert mit einer höheren Expression im subkutanen verglichen mit dem viszeralen Fettgewebe (Wajchenberg 2000; Fain *et al.*, 2004). Leptin induziert als wesentlicher Regulator der Energiehomöostase eine negative Energiebilanz über die Förderung des Sättigungsgefühles (anorexigene Wirkung) und die Steigerung des Energieverbrauches (Friedmann *et al.*, 1998; Kraus *et al.*, 2005).

Leptin ist hinsichtlich der Assoziationen zwischen SNS und Fettgewebe von besonderem Interesse. Unter den aktuell bekannten Adipokinen ist die sympathische Regulation der Sekretion und Expression im menschlichen Fettgewebe von Leptin bisher am besten untersucht. In vorherigen humanen Experimenten wurden Kälte-Exposition (Ricci *et al.*, 2000) sowie die Applikation von adrenergen Agonisten (Donahoo *et al.*, 1997; Couillard *et al.*, 2002; Ricci *et al.*, 2005; Goossens *et al.*, 2008) verwendet, um einen negativen Effekt des SNS auf die Sekretion von Leptin *in vivo* und *in vitro* zu demonstrieren, der mit Hilfe des *beta*-blockierenden Präparates Propanolol wieder aufgehoben werden konnte (Vicennati *et al.*, 2002). Andererseits scheint Leptin die SNS-Aktivität zu steigern (Haynes *et al.*, 1997). Diese beiden Beobachtungen haben zu der Postulation eines SNS-Leptin-Feedback-Mechanismus geführt. Interessanterweise wurde lediglich eine Studie (Donahoo *et al.*, 1997) unter Kontrollbedingungen mit Infusion von

Kochsalzlösung anstelle von Isoproterenol durchgeführt. Innerhalb dieser Kontrollgruppe wurde ein Trend zu verminderter Sekretion von Leptin beobachtet. Tierexperimentelle Studien zeigten ebenfalls einen Abfall der Plasmaspiegel nach SNS-Stimulation *in vivo* (Zeyl *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2005) und *in vitro* (Trayhurn *et al.*, 1996; Peino *et al.*, 2000; Moreno-Aliaga *et al.*, 2002; Puerta *et al.*, 2002; Zeyl *et al.*, 2004; Ricci *et al.*, 2005). Entsprechend konnte umgekehrt gezeigt werden, dass eine sympatho-adrenerge Blockade sowohl Sekretion als auch Expression von Leptin steigert im Sinne eines tonischen inhibitorischen Effektes des SNS auf die Leptin-Synthese (Rayner, 2001). In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigt die vorliegende Arbeit ebenfalls einen signifikanten Rückgang der Leptin-Konzentrationen. Dieser wurde jedoch in beiden Gruppen beobachtet und blieb ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, sodass dieser Effekt als unspezifisch zu interpretieren ist. Es ist verlockend, über unspezifische Effekte zu spekulieren, wenn zuvor lediglich eine Studie unter Kontrollbedingungen durchgeführt wurde.

Auf Transkriptionsebene ist die Datenlage spärlich und kontrovers. Eine Suppression der Leptin-Genexpression wurde in murinen weißen Adipozyten beobachtet nach Kälte-Exposition (Trayhurn *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1999; Puerta *et al.*, 2002) sowie nach Applikation von *beta*-adrenergen Agonisten bei Menschen (Ricci *et al.*, 1999) und Ratten (Moinat *et al.*, 1995; Trayhurn *et al.*, 1996; Giacobino, 1996; Mantzoros *et al.*, 1996; Moreno-Aliaga *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Übereinstimmend mit den Daten dieser Arbeit zeigten andere Studien keine Veränderungen der Leptin-mRNA-Spiegel im Fettgewebe nach Kälte-Stimulation (Moinat *et al.*, 1995; Peino *et al.*, 2000) und Behandlung mit *beta*-adrenergen Agonisten (Ricci *et al.*, 2005). Somit scheinen auch den vorliegenden Daten zur Folge hauptsächlich posttranslationale Mechanismen in der akuten Regulation von Leptin Bedeutung zu haben.

4.4.2 Interleukin-6

Adipositas ist durch einen milden, aber chronischen inflammatorischen Status gekennzeichnet (Schmidt und Duncan, 2003; Pi-Sunyer, 2006). In diesem Zusammenhang sahen aktuelle Studien das Fettgewebe als zentrale Quelle von proinflammatorischen Zytokinen und Akute-Phase-Proteinen an, wie z.B. IL-6,

MCP-1 und VEGF (Trayhurn und Wood, 2004; Trayhurn und Wood, 2005; Bastard *et al.*, 2006; Fain, 2006).

IL-6 ist ein Zytokin, welches Implikationen bei Übergewicht und Insulinresistenz hat (Kershaw und Flier, 2004). Es hemmt direkt die Insulinkaskade in murinen Hepatozyten und Adipozyten (Fasshauer und Paschke, 2003). Die zirkulierenden IL-6-Plasmaspiegel, von denen ein Drittel aus dem subkutanen Fettgewebe stammt (Fasshauer und Paschke, 2003), sowie die IL-6-Genexpression im Fettgewebe korrelieren positiv mit Übergewicht, verminderter Glukosetoleranz und Insulinresistenz (Fernandez-Real und Ricart, 2003). Sie gelten als Prädiktor für kardiometabolische Erkrankungen. Dagegen reduziert eine Gewichtsabnahme sowohl die Plasmaspiegel als auch die Genexpression von IL-6 (Fernandez-Real und Ricart, 2003; Ryan *et al.*, 2004; Bougoulia *et al.*, 2006). Studien zeigten, dass die periphere Administration von IL-6 eine Insulinresistenz und Hyperlipidämie bei Menschen und Ratten induziert (Fernandez-Real und Ricart, 2003). Weiterhin reduziert IL-6 die Adiponektin-Sekretion (Simons *et al.*, 2007).

Berichte über den direkten Effekt einer *beta*-adrenergen Stimulation auf die IL-6-Plasmakonzentrationen *in vivo* sind kontrovers. Vorherige Studien beschrieben einen Anstieg der Spiegel nach Administration von Isoproterenol bei Menschen (Mohamed-Ali *et al.*, 2000 und 2001; Vicennati *et al.*, 2002; Goosens *et al.*, 2008), wohingegen Goebel *et al.* keine Effekte nachweisen konnten (Goebel *et al.*, 2000). Auch konnten Mohamed-Ali *et al.* keine Veränderungen der IL-6-Spiegel nach Applikation von Noradrenalin nachweisen (Mohamed-Ali *et al.*, 2001).

Auf Transkriptionsebene konnten vorherige Studien einen Anstieg der IL-6-Expression nach Kälte-Stimulation in braunen Adipozyten (Burysek und Houstek, 1997) und Monozyten (Rhind *et al.*, 2001) nachweisen. Jedoch fehlen bisher Daten über Veränderungen der Genexpression im menschlichen weißen Fettgewebe nach SNS-Stimulation. Der in dieser Arbeit nachgewiesene Anstieg der IL-6-Plasmaspiegel und -Genexpression sollte als nicht-spezifisch interpretiert werden, da die Veränderungen in beiden Gruppen auftraten. Der Konzentrationsanstieg unter Kontrollbedingungen kann zum einen durch eine für IL-6 typische, biphasische circadiane Rhythmik mit kontinuierlich erhöhten Plasmakonzentrationen während des Vormittags erklärt werden. Zum anderen könnte hierfür die hohe Empfindlichkeit gegenüber Stress mit dem beobachteten

Phänomen erhöhter IL-6-Spiegel nach Blutentnahmen über Venenverweilkanülen ursächlich sein (Seiler *et al.* 1994; Vgontzas *et al.*, 2004).

4.4.3 Monozyten-chemoattraktives Protein-1

Übergewicht ist weiterhin mit erhöhten Konzentrationen von MCP-1 assoziiert, einem Chemokin, das in Adipozyten exprimiert und sezerniert wird und zu einer Infiltration des Fettgewebes mit Makrophagen als bedeutende Inflammationsquelle führt (Wellen und Hotamisligil, 2003; Kamei *et al.*, 2006; Kanda *et al.*, 2006). Studien über Übergewicht bei Ratten konnten zeigen, dass aktivierte Makrophagen *per se* proinflammatorische Faktoren sezernieren wie TNF-*alpha* und IL-6, sodass die MCP-1 mediierte Makrophagen-Infiltration zu dem chronischen, proinflammatorischen Status beim metabolischen Syndrom beizutragen scheint (Sartipy und Loskutoff, 2003; Takahashi *et al.*, 2003). Weiterhin ist bekannt, dass bei Mäusen die periphere Administration von MCP-1 zu einer Akkumulation von Monozyten in Kollateralarterien und zu einer Intimahyperplasie und Atherosklerose führt (van Royen *et al.*, 2003). Interessanterweise wird die MCP-1-Synthese auch durch IL-6 und weitere Hormone, die bekanntermaßen eine Insulinresistenz induzieren, stimuliert (Fasshauer *et al.*, 2004).

Effekte einer akuten SNS-Stimulation auf die MCP-1-Sekretion und -Expression wurden bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmalig ein Trend zu akut erhöhten Konzentrationen unter Sympathikusstimulation beobachtet werden, was im Sinne des *proof of principle* zu der Postulation eines proinflammatorischen Effekts einer akuten Sympathikusstimulation verführt. Eine statistische Signifikanz ist nicht auszuschließen, sodass es weiterer Untersuchungen bedarf.

4.4.4 Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF ist ein weiteres inflammationsassoziiertes Zytokin, welches in Adipozyten produziert wird und Implikationen in physiologischer und pathologischer Gefäßformation hat. Die Plasmakonzentrationen dieses angiogenen Faktors sind bei übergewichtigen Menschen erhöht (Miyazawa-Hoshimoto *et al.*, 2003; Silha *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie wird es als zentraler Mediator der Angiogenese und Adipogenese angesehen, beides essentielle Prozesse für die Differenzierung der Adipozyten bei Adipositas (Nishimura *et al.*, 2007). Die Datenlage über die

adrenerge Regulation von VEGF ist spärlich. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen konnte bisher lediglich in murinen braunen Adipozyten eine erhöhte Genexpression nach SNS-Stimulation nachgewiesen werden (Asano *et al.*, 1997; Tonello *et al.*, 1999; Fredriksson *et al.*, 2005). Erkenntnisse über Veränderungen auf Transkriptionsebene beim Menschen fehlen gänzlich, ebenso Daten über translationale Effekte. Den Daten der vorliegenden Arbeit zur Folge scheint VEGF nicht signifikant durch das SNS reguliert zu werden. Hinsichtlich des gemessenen Anstiegs der mRNA-Spiegel wäre ein Anstieg der Plasmaspiegel jedoch nach 180 Minuten denkbar.

4.4.5 Adiponektin

Adiponektin wird in hohem Maße und speziell in differenzierten Adipozyten exprimiert (Chandran *et al.*, 2003), wobei die Expression im subkutanen Fettgewebe höher ist als in viszeralen Fettdepots (Fain *et al.*, 2004). Die Adiponektin-Konzentrationen sind negativ korreliert mit Übergewicht und Insulinresistenz bei Ratten (Hu *et al.*, 1996) und Menschen (Arita *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; Weyer *et al.*, 2001; Okamoto *et al.*, 2002; Kershaw und Flier, 2004), so dass eine Hypoadiponektinämie als Prädiktor für die Entstehung von Diabetes angesehen wird (Spranger *et al.*, 2003). Es steigert die Insulinsensitivität in murinen Modellen für Übergewicht und Lipodystrophie (Yamauchi *et al.*, 2001), normalisiert die Plasmalipidspiegel und führt bei Mäusen mit Insulinresistenz zu einem Gewichtsverlust (Fruebis *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004). Weiterhin gibt es Evidenz für anti-inflammatorische und anti-atherogene Funktionen und daher für einen möglichen therapeutischen Einsatz von Adiponektin bei kardiometabolischen Erkrankungen (Okamoto *et al.*, 2002; Diez und Iglesias, 2003; Lihn *et al.*, 2005).

Bisher sind bei Menschen die direkten Effekte einer SNS-Stimulation auf die Adiponektin-Regulation wenig erforscht und kontrovers. In Wijers *et al.* Studie zur individuellen Thermogenese unter milder Kälte-Exposition (16°C) in einer Kältekammer blieben die Adiponektinspiegel *in vivo* nach 84 Stunden unverändert (Wijers *et al.*, 2007). Dagegen zeigten Imbeault *et al.* einen Anstieg der Adiponektin-Konzentrationen nach Kälte-Stimulation (Imbeault *et al.*, 2009). Jedoch wurde hier die Kälte-Exposition mit einer völlig anderen Intention eingesetzt, nämlich um Zittern und somit körperliche Aktivität zu induzieren. Diese führte in

einigen - aber nicht allen - vorherigen Studien zu einem Anstieg der Adiponektinspiegel (Simpson und Singh, 2008). Veränderungen der Adiponektin-Plasmaspiegel sind hierbei von Intensität und Dauer des Trainings abhängig (Bouassida *et al.*, 2008). Korrelierend mit Wijers *et al.* Beobachtungen konnten auch Goossens *et al.* keine Veränderungen der Adiponektin-Konzentration unter *beta*-adrenerger Stimulation nachweisen (Goossens *et al.*, 2008). Wakabayashi und Aso berichteten von einer relativen Sympathikusaktivierung in Assoziation mit niedrigen Serumkonzentrationen von Adiponektin bei Menschen mit Diabetes mellitus Typ 2 (Wakabayashi und Aso, 2004). Eine aktuelle Studie zeigte eine Assoziation hoher Adiponektin-Spiegel mit einem metabolisch gesunden Phänotyp bei übergewichtigen Probanden, was die zuvor genannten positiven Effekte dieses Adipokins unterstreicht (Aguilar-Salinas *et al.*, 2008). Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine signifikante Reduktion der Adiponektin-Konzentrationen infolge einer akuten SNS-Stimulation gezeigt werden.

Dagegen blieb auf Transkriptionsebene die Adiponektin-Genexpression unverändert, sodass der beobachtete Effekt akut und posttranskriptional zu sein scheint. *In vitro* Untersuchungen bei Ratten konnten eine Abnahme der Adiponektin-Serumspiegel und eine parallele Suppression der Expression im subkutanen Fettgewebe nach 24-stündiger Kälte-Stimulation nachweisen (Imai *et al.*, 2006). Die Kälte-induzierten Veränderungen waren hier auf beiden Ebenen (Transkription und Translation) durch SNS-inhibierende Substanzen reversibel. Zwei Arbeiten zeigten weiterhin eine Verminderung der Genexpression in mit *beta*-adrenergen Agonisten behandelten Adipozyten (Fasshauer *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu konnten Puerta *et al.* nach 18-stündiger Kälte-Exposition keine Veränderungen auf Translations- und Transkriptionsebene finden (Puerta *et al.*, 2002).

Die vorliegende Arbeit demonstriert erstmalig bei normgewichtigen Menschen einen klaren und negativen Effekt einer SNS-Aktivierung auf die Adiponektin-Sekretion unabhängig von der Genexpression und liefert somit Hinweise auf die einleitend gestellten Fragen: Das SNS scheint die endokrine Fettgewebefunktion differentiell zu regulieren. Seine Stimulation führt zu Alterationen des Adipokinprofils, z.B. zu reduzierten Plasmaspiegeln für Adiponektin. Es bleibt jedoch verlockend, eine direkte Verbindung zwischen dem SNS und alterierter Adipokin-Sekretion anzunehmen, da eine statistische Korrelation zwischen

Noradrenalin- und Adiponektinspiegeln in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden konnte.

Die genauen pathophysiologischen Konsequenzen reduzierter Adiponektinspiegel zu erklären, liegt außerhalb des Rahmens dieser Studie. Jedoch ist bekannt, dass Adiponektin eine insulinsensitive Wirkung besitzt und z.B. bei Mäusen die Plasmaglukosespiegel durch Inhibition des hepatischen Glukose-*Outputs* reduziert (Combs *et al.*, 2001). Somit kann spekuliert werden, dass ein chronischer negativer Effekt der Sympathikusstimulation auf die Adiponektin-Plasmakonzentrationen zu negativen metabolischen Veränderungen führt und so an Kernkomponenten des metabolischen Syndroms beteiligt zu sein scheint.

4.5 SCHLUSSBEMERKUNGEN

Zu diskutieren bleibt die Frage, ob die in dieser Studie gesehenen akuten Veränderungen Folge einer systemischen, Kälte-induzierten Sympathikus-aktivierung oder durch die lokale Hypothermie im Fettgewebe bedingt sind. Zwei der zitierten Studien postulieren, dass die Effekte direkt durch die Temperaturerniedrigung im Fettgewebe verursacht werden (Peino *et al.*, 2000; Zeyl *et al.*, 2004). Jedoch spricht das in dieser Arbeit gemessene Katecholamin-Muster für eine systemische SNS-Stimulation mit den konsekutiven Alterationen im Adipokin-Profil. Zweifelsfrei gibt es Evidenz dafür, dass Kälte-Exposition die globale SNS-Aktivität erhöht, was in erhöhten Noradrenalin-Spiegeln messbar ist (Rayner und Trayhurn, 2001; Romijn und Fliers, 2005; Lafontan 2008). Jedoch kann Kälte-Exposition *per se* Effekte verursachen, die nicht leicht von direkten Konsequenzen der Sympathikusexzitation zu differenzieren sind.

Eine subkutane Vasokonstriktion mit Inhibition des Blutflusses könnte die Sekretion sowie den Transport und somit die Plasmakonzentrationen der Adipokine beeinflussen. Der Effekt einer Kälte-induzierten Vasokonstriktion auf die Plasmaspiegel von Adipokinen und Zytokinen wurde bisher jedoch nicht im Detail untersucht. Insbesondere die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Muster der Leptin-, IL-6- und VEGF-Plasmaspiegel sprechen allerdings gegen einen systemischen Effekt. Diesbezüglich wären unterschiedliche Verläufe der Plasmakonzentrationen in der stimulierten Gruppe und der Kontrollgruppe zu erwarten gewesen, jedoch zeigten diese Adipokine korrespondierende Muster in beiden Gruppen.

Die kurze Stimulationsdauer könnte eine Erklärung für die weitgehend fehlenden Effekte auf Transkriptionsebene in dieser Studie sein. Diese Interpretation wird belegt durch eine Arbeit, in der Effekte auf die Adiponektin-Genexpression nur nach 24-stündiger Stimulation, nicht jedoch nach 12 Stunden Kälte-Stimulation detektierbar waren (Imai *et al.*, 2006). In der überwiegenden Majorität der tierexperimentellen Studien, die Effekte auf Transkriptionsebene sahen, wurde mit länger andauernden (ab 18 Stunden) und stärkeren (4 °C) Kältereizen stimuliert (Trayhurn *et al.*, 1995; Puerta *et al.*, 2002). Natürlich kommen aber auch andere Regulationsmechanismen in Betracht, wie beispielsweise präformierte, vesikelähnliche Pools in den weißen Adipozyten mit einer Sekretion bei akuter Sympathikusexzitation. Es bedarf weiterer Studien, um diese Regulationsmechanismen aufzuklären.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass bei Menschen eine akute, Kälte-medierte Stimulation des SNS die endokrine Fettgewebefunktion differentiell reguliert. Daran scheinen insbesondere non-genomische, posttranskriptionelle Mechanismen beteiligt zu sein, da Veränderungen der Adipokin-Genexpression nicht zu finden waren. Sie demonstriert eine neuartige Assoziation zwischen SNS-Stimulation und der Adipokin-Sekretion und liefert so weitere Evidenz für Interaktionen des SNS und der Fettzelle, die für die Pathogenese des metabolischen Syndroms und dessen kardiovaskulären Komplikationen bedeutsam zu sein scheinen.

Die vorliegende Studie ist ein Pilotprojekt, in dem bei Menschen die Zustände Inflammation und Insulinresistenz, die für das metabolische Syndrom charakteristisch sind, akut simuliert werden. Sie soll dienen als *proof of principle* für einen Transfer der akut beobachteten Effekte auf die Chronizität der durch die permanente SNS-Hyperaktivität induzierten, metabolischen Veränderungen beim metabolischen Syndrom mit Adipositas als zentraler Komponente.

Diese Arbeit zeigt dabei physiologische Zusammenhänge zwischen SNS und endokriner Fettgewebefunktion bei schlanken Probanden auf. Um pathophysiologische Konsequenzen für Patienten mit metabolischem Syndrom zu erleuchten, werden weitere Studien nötig sein.

5 Zusammenfassung

ZIELSETZUNG: Es gibt zunehmende Evidenz für Assoziationen zwischen erhöhter Aktivität des SNS und dem metabolischen Syndrom mit Übergewicht als zentraler Komponente. Das Fettgewebe wird durch das SNS dicht innerviert und sezerniert sogenannte Adipokine, welche die Kernkomponenten des metabolischen Syndroms mediierten. Bisher ist wenig bekannt über die direkten Effekte einer akuten Sympathikusstimulation auf die endokrine Aktivität des Fettgewebe *in vivo*. Die vorliegende Arbeit untersucht den akuten Effekt einer anhaltenden SNS-Stimulation auf die Adipokin-Plasmakonzentrationen sowie Genexpressionen im abdominell-subkutanen Fettgewebe bei Menschen.

FRAGESTELLUNG: Reguliert das SNS die endokrine Fettgewebefunktion? Könnte die Art der Hormonantwort des Fettgewebes auf die SNS-Stimulation an der Ausbildung des metabolischen Syndroms und der assoziierten kardiovaskulären Komplikationen beteiligt sein?

STUDIENDESIGN UND METHODIK: In zehn gesunden, normgewichtigen, männlichen Probanden wurde das SNS mit Hilfe eines zweistündigen Kältereizes stimuliert; eine Gruppe von zehn Freiwilligen diente als Kontrolle. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Vitalparameter erhoben, die Plasma-Adipokinkonzentrationen gemessen sowie abdominell-subkutane Fettgewebsbiopsien zur Bestimmung der Adipokin-Genexpressionen durchgeführt.

ERGEBNISSE: Die Kälte-Exposition resultierte in einem Anstieg des Kälteempfindens sowie einem Rückgang der Körpertemperatur und Herzfrequenz. Als Zeichen einer robusten Sympathikusaktivierung verdoppelten sich die Noradrenalinspiegel, jedoch nicht die von Adrenalin. Die Adiponektin-Plasmakonzentrationen nahmen unter SNS-Stimulation akut und signifikant ab. Dagegen tendierten die MCP-1-Konzentrationen zu einer akuten Erhöhung. Die Leptinspiegel waren erniedrigt und IL-6-Spiegel erhöht, jedoch in beiden Gruppen und daher unspezifisch. Konzentrationsveränderungen der VEGF-Spiegel waren nicht zu finden. Es gab keine signifikanten Veränderungen der Adipokin-Genexpression im abdominell-subkutanen Fettgewebe.

SCHLUSSFOLGERUNG: Die Kälte-Exposition führt zu einer robusten Sympathikusstimulation und beeinflusst die Sekretion der Adipokine differentiell. Die Adiponektin-Spiegel nehmen akut ab, während die MCP-1-Konzentrationen zu einer Erhöhung tendieren. Die beobachteten Veränderungen scheinen posttranskriptionell zu sein, da keine Veränderungen der Adipokin-Genexpression zu finden sind.

Adiponektin hat positive Implikationen in metabolischen und kardiovaskulären Funktionen. Seine Reduktion unter Sympathikusexzitation liefert einen neuartigen Link zwischen dem SNS und dem metabolischen Syndrom.

6 Literaturverzeichnis

Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF: Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 355, 763-78 (2006)

Aguilar-Salinas CA, Garcia EG, Robles L, Riano D, Ruiz-Gomez DG, Garcia-Ulloa AC, Melgarejo MA, Zamora M, Guillen-Pineda LE, Mehta R, Canizales-Quinteros S, Tusie Luna MT, Gomez-Perez FJ: High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 93(10), 4075-9 (2008)

Anderson LH, Martinson BC, Crain AL, Pronk NP, Whitebird RR, O'Connor PJ, Fine LJ: Health care charges associated with physical inactivity, overweight, and obesity. *Prev Chronic Dis* 2, 9 (2005)

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 79-83 (1999)

Asano A, Morimatsu M, Nikami H, Yoshida T, Saito M: Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis. *Biochem. J.* 328, 179-183 (1997)

Bamshad M, Aoki VT, Adkison MG, Warren WS, Bartness TJ: Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol* 275, 291-9 (1998)

Bartness TJ, Shrestha YB, Vaughan CH, Schwartz GJ, Song CK: Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Mol Cell Endocrinol* 318, 34-43 (2010)

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B: Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17, 4-12 (2006)

Boehm BO, Claudi-Boehm S, Yildirim S, Haenle MM, Hay B, Mason RA, Steinbach G, Koenig W, Kern P, Marz W, Kratzer W: Prevalence of the metabolic syndrome in southwest Germany. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 240, 122-8 (2005)

Bouassida A, Chamari K, Zaouali M, Feki Y, Zbidi A, Tabka Z: Review on leptin and adiponectin responses and adaptations to acute and chronic exercise. *Br J Sports Med* (2008)

Bougoulia M, Triantos A, Koliakos G: Plasma interleukin-6 levels, glutathione peroxidase and isoprostane in obese women before and after weight loss. Association with cardiovascular risk factors. *Hormones* (Athens) 5, 192-9 (2006)

Boussuges A, Molenat F, Grandfond A, Regnard J, Wolf JP, Galland F, Robinet C: Cardiovascular changes induced by cold water immersion during hyperbaric hyperoxic exposure. *Clin Physiol Funct Imaging* 27, 268-74 (2007)

Bowers RR, Festuccia WT, Song CK, Shi H, Migliorini RH, Bartness TJ: Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, 1167-75 (2004)

Burysek L, Houstek J: [beta]-Adrenergic stimulation of interleukin-1[alpha] and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Letters* 411, 83-86 (1997)

Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR: Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26, 2442-50 (2003)

Claessens-van Ooijen AM, Westerterp KR, Wouters L, Schoffelen PF, van Steenhoven AA, van Marken Lichtenbelt WD: Heat production and body temperature during cooling and rewarming in overweight and lean men. *Obesity* (Silver Spring) 14, 1914-20 (2006)

Collins S, Daniel KW, Rohlfes EM: Depressed expression of adipocyte beta-adrenergic receptors is a common feature of congenital and diet-induced obesity in rodents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 669-77 (1999)

Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108(12), 1875-81 (2001)

Couillard C, Mauriege P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Despres J-P: Plasma Leptin Response to an Epinephrine Infusion in Lean and Obese Women. *Obesity Res* 10, 6-13 (2002)

Daly PA, Young JB, Landsberg L: Effect of cold exposure and nutrient intake on sympathetic nervous system activity in rat kidney. *Am J Physiol* 263, 586-93 (1992)

Deussen A: Hyperthermia and hypothermia. Effects on the cardiovascular system. *Anaesthetist* 56, 907-11 (2007)

Diez JJ, Iglesias P: The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148, 293-300 (2003)

Dodt C, Lonnroth P, Fehm HL, Elam M: The subcutaneous lipolytic response to regional neural stimulation is reduced in obese women. *Diabetes* 49 (11), 1875-9 (2000)

Dodt C, Lonnroth P, Wellhoner JP, Fehm HL, Elam M: Sympathetic control of white adipose tissue in lean and obese humans. *Acta Physiologica Scandinavica* 177, 351-357 (2003)

Donahoo WT, Jensen DR, Yost TJ, Eckel RH: Isoproterenol and Somatostatin Decrease Plasma Leptin in Humans: A Novel Mechanism Regulating Leptin Secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4139-4143 (1997)

Eppler SM, Combs DL, Henry TD, Lopez JJ, Ellis SG, Yi JH, Annex BH, McCluskey ER, Zioncheck TF: A target-mediated model to describe the pharmacokinetics and hemodynamic effects of recombinant human vascular endothelial growth factor in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 72(1), 20-32 (2002)

Evans BA, Agar L, Summers RJ: The role of the sympathetic nervous system in the regulation of leptin synthesis in C57BL/6 mice. *FEBS Lett* 444, 149-54 (1999)

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW: Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-82 (2004)

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R: Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 507, 142-6 (2001)

Fasshauer M, Paschke R: Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 46, 1594-603 (2003)

Fasshauer M, Klein J, Blüher M, Paschke R: Adipokine: Mögliches Bindeglied zwischen Insulinresistenz und Adipositas, *Dtsch Arztebl* 101 [Heft 51 – 52], 3491 – 3495 (2004[a])

Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Paschke R: Monocyte chemoattractant protein 1 expression is stimulated by growth hormone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 317, 598-604 (2004)

Fernandez-Real JM, Ricart W: Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 24, 278-301 (2003)

Fredriksson JM, Nikami H, Nedergaard J: Cold-induced expression of the VEGF gene in brown adipose tissue is independent of thermogenic oxygen consumption. *FEBS Lett* 579, 5680-4 (2005)

Friedman JM, Halaas JL: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-70 (1998)

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA: The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280, 827-47 (2001)

Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA: The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, 827-47 (2001)

Garofalo MA, Kettelhut IC, Roselino JE, Migliorini RH: Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J Auton Nerv Syst* 60, 206-8 (1996)

Gellner R, Domschke W: Epidemiology of obesity. *Chirurg* 79, 807-10, 812-6, 818 (2008)

Giacobino JP: Role of the beta3-adrenoceptor in the control of leptin expression. *Horm Metab Res* 28: 633-7 (1996)

Goebel MU, Mills PJ, Irwin MR, Ziegler MG: Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α Production After Acute Psychological Stress, Exercise, and Infused Isoproterenol: Differential Effects and Pathways. *Psychosomatic Medicine* 62, 591–598 (2000)

Goossens GH, Jocken JW, van Baak MA, Jansen EH, Saris WH, Blaak EE: Short-term beta-adrenergic regulation of leptin, adiponectin and interleukin-6 secretion in vivo in lean and obese subjects. *Diabetes Obes Metab* 10(11), 1029-38 (2008)

Grassi G, Quarti-Trevano F, Seravalle G, Dell'Oro R: Cardiovascular risk and adrenergic overdrive in the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17, 473-81 (2007)

Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F: The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends Cardiovasc Med* 17(8), 275-83 (2007)

Halberg N, Schraw TD, Wang ZV, Kim JY, Yi J, Hamilton MP, Luby-Phelps K, Scherer PE: Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin. *Diabetes* 58(9), 1961-70 (2009)

Hauner H, Bramlage P, Losch C, Steinhagen-Thiessen E, Schunkert H, Wasem J, Jockel KH, Moebus S: Prevalence of obesity in primary care using different anthropometric measures - results of the German Metabolic and Cardiovascular Risk Project (GEMCAS). *BMC Public Health* 8, 282 (2008)

Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI: Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest.* 100(2), 270-8 (1997)

Heindl S, Struck J, Wellhoner P, Sayk F, Dodt C. Effect of facial cooling and cold air inhalation on sympathetic nerve activity in men. *Respir Physiol Neurobiol* 142(1), 69-80 (2004)

Hiramatsu K, Yamada T, Katakura M: Acute effects of cold on blood pressure, renin-angiotensin-aldosterone system, catecholamines and adrenal steroids in man. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 11, 171-9 (1984)

<http://www.adipositas-gesellschaft.de/index.php> (Tag des letzten Zugriffs: 10.05.2010)

Hu E, Liang P, Spiegelman BM: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271, 10697-703 (1996)

Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Ishihara H, Sasano H, Oka Y: Cold Exposure Suppresses Serum Adiponectin Levels through Sympathetic Nerve Activation in Mice. *Obesity* 14, 1132-1141 (2006)

Imbeault P, Depault I, Haman F: Cold exposure increases adiponectin levels in men. *Metabolism* 58, 552-9 (2009)

Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T: Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281, 26602-14 (2006)

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M: MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116, 1494-505 (2006)

Keller P, Keller C, Steensberg A, Robinson LE, Pedersen BK: Leptin gene expression and systemic levels in healthy men: effect of exercise, carbohydrate, interleukin-6, and epinephrine. *J Appl Physiol* 98, 1805-12 (2005)

Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-56 (2004)

Klein J, Perwitz N, Kraus D, Fasshauer M: Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends Endocrinol Metab* 17, 26-32 (2006)

Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M: Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 45(7), 984-7 (1996)

Kolaczynski JW, Morales LM, Moore JH Jr, Considine RV, Pietrzkowski Z, Noto PF, Colberg J, Caro JF: A new technique for biopsy of human abdominal fat under local anaesthesia with Lidocaine. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18, 161-6 (1994)

Kopelman PG: Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-43 (2000)

Korhonen I: Blood pressure and heart rate responses in men exposed to arm and leg cold pressor tests and whole-body cold exposure. *Int J Circumpolar Health* 65, 178-84 (2006)

Kraus D, Fasshauer M, Klein J: Neuropeptide And Peripheral Hormone Crosstalk With Adipocyte Function. *Adipocytes* 1, 95-120 (2005)

Lafontan M. Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes* 32 Suppl 7, 39-51 (2008)

Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryden M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N, van Harmelen V, Gross RW Holm C, Arner P: Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54, 3190-7 (2005)

Lawrence , Coppack: The Endocrine Function of the Fat Cell-Regulation by the Sympathetic Nervous System. *Hormone and Metabolic Research* 11/12, 453-467 (2000)

Leppaluoto J, Korhonen I, Huttunen P, Hassi J: Serum levels of thyroid and adrenal hormones, testosterone, TSH, LH, GH and prolactin in men after a 2-h stay in a cold room. *Acta Physiol Scand* 132, 543-8 (1988)

Leppaluoto J, Pääkkönen T, Korhonen I, Hassi J: Pituitary and autonomic responses to cold exposures in man. *Acta Physiol Scand* 184, 255-264 (2005)

Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B: Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev* 6, 13-21 (2005)

Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y: Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8, 731-7 (2002)

Mantzoros CS, Qu D, Frederich RC, Susulic VS, Lowell BB, Maratos-Flier E, Flier JS: Activation of beta(3) adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. *Diabetes* 45, 909-14 (1996)

Matsumoto T, Miyawaki T, Ue H, Kanda T, Zenji C, Moritani T: Autonomic responsiveness to acute cold exposure in obese and non-obese young women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 793-800 (1999)

Migliorini RH, Garofalo MA, Kettelhut IC: Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *Am J Physiol* 272, 656-61 (1997)

Miyazawa-Hoshimoto S, Takahashi K, Bujo H, Hashimoto N, Saito Y: Elevated serum vascular endothelial growth factor is associated with visceral fat accumulation in human obese subjects. *Diabetologia* 46, 1483-8 (2003)

Mohamed-Ali V, Bulmer K, Clarke D, Goodrick S, Coppack SW, Pinkney JH: beta-Adrenergic regulation of proinflammatory cytokines in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2, 154-5 (2000)

Mohamed-Ali V, Flower L, Sethi J, Hotamisligil G, Gray R, Humphries SE, York DA, Pinkney J: Beta-Adrenergic Regulation of IL-6 Release from Adipose Tissue: In Vivo and in Vitro Studies. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5864-5869 (2001)

Moinat M, Deng C, Muzzin P, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Dulloo AG, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA, Stanhope KL, Fernandez-Otero MP, Havel PJ: Effects of Trecadrine, a beta3-adrenergic agonist, on leptin secretion, glucose and lipid metabolism in isolated rat adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 912-9 (2002)

Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA, Stanhope KL, Fernandez-Otero MP, Havel PJ: Effects of Trecadrine, a beta3-adrenergic agonist, on leptin secretion, glucose and lipid metabolism in isolated rat adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 912-9 (2002)

Muzzin P, Revelli JP, Kuhne F, Gocayne JD, McCombie WR, Venter JC, Giacobino JP, Fraser CM: An adipose tissue-specific beta-adrenergic receptor. Molecular cloning and down-regulation in obesity. *J Biol Chem* 266, 24053-8 (1991)

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S: Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 56, 1517-26 (2007)

Ohtsuki K, Hayase M, Akashi K, Kapiwoda S, Strauss HW: Detection of monocyte chemoattractant protein-1 receptor expression in experimental atherosclerotic lesions: an autoradiographic study. *Circulation* 104(2), 203-8 (2001)

Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106, 2767-70 (2002)

Orban Z, Remaley AT, Sampson M, Trajanoski Z, Chrousos GP: The Differential Effect of Food Intake and beta-Adrenergic Stimulation on Adipose-Derived Hormones and Cytokines in Man. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2126-2133 (1999)

Peake PW, Kriketos AD, Campbell LV, Shen Y, Charlesworth JA: The Metabolism of isoforms of human adiponectin: studies in human subjects and in experimental animals. *Eur J Endocrinol* 153(3), 409-17 (2005)

Peino R, Pineiro V, Gualillo O, Menendez C, Brenlla J, Casabiell X, Dieguez C, Casanueva FF: Cold exposure inhibits leptin secretion in vitro by a direct and non-specific action on adipose tissue. *Eur J Endocrinol* 142, 195-9 (2000)

Perwitz N, Fasshauer M, Klein J: Die neue Sicht des Fettgewebes: Master Mind hinter Pathogenese und Therapie des Metabolischen Syndroms. *Focus Universität zu Lübeck* 21, Heft 1 (2004)

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time-PCR. *Nucleic Acids Res* 30, 36 (2002)

Pi-Sunyer FX: The relation of adipose tissue to cardiometabolic risk. *Clin Cornerstone* 8 Suppl 4, 14-23 (2006)

Puerta M, Abelenda M, Rocha M, Trayhurn P: Effect of acute cold exposure on the expression of the adiponectin, resistin and leptin genes in rat white and brown adipose tissues. *Horm Metab Res* 34, 629-34 (2002)

Rayner DV, Trayhurn P: Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J Mol Med* 79, 8-20 (2001)

Rayner DV: The sympathetic nervous system in white adipose tissue regulation. *Proc Nutr Soc* 60, 357-64 (2001[a])

Rhind SG, Castellani JW, Brenner IK, Shephard RJ, Zamecnik J, Montain SJ, Young AJ, Shek PN: Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, 66-75 (2001)

Ricci MR, Fried SK: Isoproterenol decreases leptin expression in adipose tissue of obese humans. *Obesity Res* 7, 233-240 (1999)

Ricci MR, Fried SK, Mittleman KD: Acute cold exposure decreases plasma leptin in women. *Metabolism* 49: 421-423 (2000)

Ricci MR, Lee M-J, Russell CD, Wang Y, Sullivan S, Schneider SH, Brolin RE, Fried SK: Isoproterenol decreases leptin release from rat and human adipose tissue through posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, 798-804 (2005)

Rintamaki H: Human responses to cold. *Alaska Med* 49, 29-31 (2007)

Romijn JA, Fliers E: Sympathetic and parasympathetic innervation of adipose tissue: metabolic implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8, 440-4 (2005)

Ryan AS, Nicklas BJ: Reductions in plasma cytokine levels with weight loss improve insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Care* 27, 1699-705 (2004)

Ryden M, Jocken J, van Harmelen V, Dicker A, Hoffstedt J, Wiren M, Blomqvist L, Mairal A, Langin D, Blaak E, Arner P: Comparative studies of the role of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, 1847-55 (2007)

Saris WH: Effects of energy restriction and exercise on the sympathetic nervous system. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19 Suppl 7, 17-23 (1995)

Sartipy P, Loskutoff DJ: Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7265-70 (2003)

Schmidt MI, Duncan BB: Diabetes: an inflammatory metabolic condition. *Clin Chem Lab Med* 41, 1120-30 (2003)

Seals DR, Bell C: Chronic Sympathetic Activation: Consequence and Cause of Age-Associated Obesity? *Diabetes* 53, 276-284 (2004)

Seiler W, Muller H, Hiemke C: Interleukin-6 in plasma collected with an indwelling cannula reflects local, not systemic, concentrations. *Clin Chem* 40(9), 1778-9 (1994)

Shi H, Song CK, Giordano A, Cinti S, Bartness J: Sensory or sympathetic white adipose tissue denervation differentially affects depot growth and cellularity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, 1028-1037 (2005)

Silha JV, Krsek M, Sucharda P, Murphy LJ: Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int J Obes (Lond)* 29: 1308-14 (2005)

Simons PJ, van den Pangaart PS, Aerts JM, Boon L: Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization. *J Endocrinol* 192, 289-99 (2007)

Simpson KA, Singh MA: Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. *Obesity* 16, 241-56 (2008)

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF: Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361, 226-8 (2003)

Sramek P, Simeckova M, Jansky L, Savlikova J, Vybiral S: Human physiological responses to immersion into water of different temperatures. *Eur J Appl Physiol* 81, 436-42 (2000)

Stouthard JM, Romijn JA, Van der Poll T, Endert E, Klein S, Bakker PJ, Veenhof, CH, Sauerwein HP: Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans. *Am J Physiol* 268, 813-9 (1995)

Straznicky NE, Lambert EA, Lambert GW, Masuo K, Esler MD, Nestel PJ: Effects of dietary weight loss on sympathetic activity and cardiac risk factors associated with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 5998-6005 (2005)

Sullivan PW, Ghushchyan V, Wyatt HR, Wu EQ, Hill JO: Productivity costs associated with cardiometabolic risk factor clusters in the United States. *Value Health* 10, 443-50 (2007)

Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H: Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem* 278, 46654-60 (2003)

Tentolouris N, Liatis S, Katsilambros N: Sympathetic system activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1083, 129-52 (2006)

Tonello C, Giordano A, Cozzi V, Cinti S, Stock MJ, Carruba MO, Nisoli E: Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats. *FEBS Lett* 442, 167-72 (1999)

Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV: Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J* 311, 729-33 (1995)

Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV, Hardie LJ: Rapid inhibition of ob gene expression and circulating leptin levels in lean mice by the beta 3-adrenoceptor agonists BRL 35135A and ZD2079. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 605-10 (1996)

Trayhurn P, Wood IS: Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92, 347-55 (2004)

Trayhurn P, Wood IS: Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans* 33, 1078-81 (2005)

Vallerand AL, Savourey G, Bittel JH: Determination of heat debt in the cold: partitioned calorimetry vs. conventional methods. *J Appl Physiol.* 72(4), 1380-5 (1992)

van Marken Lichtenbelt WD, Schrauwen P, van de Kerckhove S, Westerterp-Plantenga MS: Individual variation in body temperature and energy expenditure in response to mild cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, 1077-1083 (2002)

van Royen N, Hoefer I, Buschmann I, Kostin S, Voskuil M, Bode Ch, Schaper W, Piek JJ: Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits. *Cardiovas Res* 57, 81-92 (2003)

Vgontzas AN, Bixler EO, Lin H-M, Prolo P, Trakada G, Chrousos GP: IL-6 and Its Circadian Secretion in Humans. *Neuroimmunomodulation* 12, 131-140 (2005)

Vicennati V, Vottero A, Friedman C, Papanicolaou DA: Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 905-11 (2002)

Wajchenberg BL: Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21, 697-738 (2000)

Wakabayashi S, Aso Y: Adiponectin Concentrations in Sera From Patients With Type 2 Diabetes Are Negatively Associated With Sympathovagal Balance as Evaluated by Power Spectral Analysis of Heart Rate Variation. *Diabetes Care* 27, 2392 – 2397 (2004)

Wang Y, Beydoun MA, Liang L, Caballero B, Kumanyika SK: Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)* 16, 2323-30 (2008)

Weeke J, Gundersen HJ: The effect of heating and central cooling on serum TSH, GH, and norepinephrine in resting normal man. *Acta Physiol Scand* 117, 33-9 (1983)

Wellen KE, Hotamisligil GS: Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue, *J Clin Invest* 112, 1785-8 (2003)

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA: Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1930-5 (2001)

Wijers SL, Saris WH, van Marken Lichtenbelt WD: Individual thermogenic responses to mild cold and overfeeding are closely related. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4299-305 (2007)

Wolf AM, Colditz GA: Current estimates of the economic cost of obesity in the United States. *Obes Res* 6, 97-106 (1998)

Wong SL, DePaoli AM, Lee JH, Mantzoros CS. Leptin hormonal kinetics in the fed state: effects of adiposity, age, and gender on endogenous leptin production and clearance rates. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6), 2672-7 (2004)

Xu A, Yin S, Wong L, Chan KW, Lam KS: Adiponectin ameliorates dyslipidemia induced by the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir in mice. *Endocrinology* 145, 487-94 (2004)

Yamamura M, Yamada Y, Momita S, Kamihira S, Tomonaga M: Circulating interleukin-6 levels are elevated in adult T-cell leukaemia/lymphoma patients and correlate with adverse clinical features and survival. *Br J Haematol* 100, 129-34 (1998)

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941-6 (2001)

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM: Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3815-9 (2001)

Young JB: Developmental origins of obesity: a sympathoadrenal perspective. *Int J Obes* 30 Suppl 4, 41-9 (2006)

Youngstrom TG, Bartness TJ: Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 268, 744-751 (1995)

Zeyl A, Stocks JM, Taylor NA, Jenkins AB: Interactions between temperature and human leptin physiology in vivo and in vitro. *Eur J Appl Physiol* 92, 571-8 (2004)

Zhang Y, Matheny M, Zolotukhin S, Tumer N, Scarpace PJ: Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochim Biophys Acta* 1584, 115-22 (2002)

7 Anhang: Probenentnahmeplan

Material	Parameter	0 min	15	30	60	120	180	Monovette/Menge
Blut	Adrenalin	x	x	x	x	x	x	Polypropylen
	Noradrenalin	x	x	x	x	x	x	60 ml
	Adiponektin	x	x	x	x	x	x	Serum
	Leptin	x	x	x	x	x	x	
	MCP-1	x	x	x	x	x	x	
	IL-6	x	x	x	x	x	x	
	VEGF	x	x	x	x	x	x	120 ml
	kleines Blutbild	x				x		EDTA, 10 ml
	TSH, fT3, fT4	x				x		Serum
	Insulin	x				x		
	Cortisol	x				x		20 ml
	ACTH	x				x		EDTA, 10 ml
	Quick	x				x		Natriumcitrat
	PTT	x				x		
	D-Dimere	x				x		
	Fibrinogen	x				x		10 ml
	CRP	x				x		Lithiumheparinat
	Triglyceride, HDL, LDL	x				x		
	GOT, GPT, g-GT	x				x		
	Creatinin	x				x		
	Harnsäure	x				x		
	Amylase, Lipase	x				x		10 ml
	Free fatty acids	x				x		Fluorid
	Laktat, Glucose	x				x		10 ml
Gesamtprobenvolumen inklusive der verworfenen Blutmenge								250 ml
Fett	Adiponektin	x				x		
	Leptin	x				x		
	IL-6	x				x		
	MCP-1	x				x		
	VEGF	x				x		
	CRP	x				x		
Vitalparameter	Temperatur	x	x	x	x	x	x	
	Kälteempfinden	x	x	x	x	x	x	
	Herzfrequenz	x	x	x	x	x	x	
	Blutdruck	x	x	x	x	x	x	
	Körpergewicht	x						
	Körperlänge	x						
	Body-Mass-Index	x						
	Taillenumfang	x						
	Hüftumfang	x						
	waist to hip ratio	x						

Tabelle 6 liefert einen Überblick über die Bestimmungszeitpunkte der untersuchten Parameter sowie über das Gesamtprobenvolumen.

7 Anhang: Halbwertszeiten der Adipokine

Adipokin	HWZ	Kommentar	Referenz
Adiponektin	75 min	Fluoreszent markiertes rekombinantes Adiponektin untersucht bei Mäusen	Halberg <i>et al.</i> (2009)
Adiponektin	14,3 h	Humanes Adiponektin untersucht bei Kaninchen	Peake <i>et al.</i> (2005)
Leptin	3,4 h	Rekombinantes humanes Methionyl Leptin untersucht bei Menschen	Wong <i>et al.</i> (2004)
Leptin	25 min	Endogenes Leptin untersucht bei Menschen	Klein <i>et al.</i> (1996)
VEGF	33,7 min	Rekombinantes humanes VEGF untersucht bei Menschen nach intracoronarer infusion	Eppler <i>et al.</i> (2002)
MCP-1	~ 10 min	Radiomarkiertes MCP-1 untersucht bei Mäusen und Kaninchen	Ohtsuki <i>et al.</i> (2001)
IL-6	19,5 min	Rekombinantes humanes IL-6 untersucht bei Menschen	Stouthard <i>et al.</i> (1995)

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die bekannten Plasma-Halbwertszeiten der untersuchten Adipokine.

8 Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Johannes Klein für die Aufnahme in sein Forschungs-*Team*, die Überlassung des Themas der Dissertation sowie die optimale und engagierte Betreuung während der letzten sechs Jahre bedanken. Diese Dissertationsarbeit wäre ohne seine professionelle und stete Unterstützung nicht möglich gewesen. Ich bin dankbar, dass ich meine Daten auf nationalen und internationalen Kongressen präsentieren durfte.

Ich danke dem Direktor der Medizinischen Klinik I Herrn Professor Dr. med. Hendrik Lehnert sowie dessen Vorgänger, Herrn Professor Dr. med. Lorenz Fehm, für die Möglichkeit, in deren Klinik meine Forschungen durchführen zu dürfen.

Mein Dank gilt weiterhin den Herren Dres. med. Volker Ott und Daniel Kraus für Ihre nette und kompetente Unterstützung in den Anfängen dieser Arbeit sowie für deren unverzichtbare Hilfestellungen beim Erstellen der Präsentationen der ersten Ergebnisse im Rahmen der Kongresse in Berlin und San Diego im Jahre 2005.

Hervorzuheben ist weiterhin Herr Dr. med. Alexander Iwen, dem ich für seine stete Unterstützung bei der Optimierung der statistischen Auswertung und insbesondere der abschließenden Publikation recht herzlich danke.

Mein Dank gebührt ferner den Herren Professor Dr. med. Christoph Dodt und Dr. med. Jens Peter Wellhöner für die Durchführung der abdominell-subkutanen Fettgewebsbiopsien sowie für deren Anleitung für mein späteres, selbständiges Durchführen. Für die detaillierten und professionellen Hilfestellungen während meiner experimentellen Arbeiten im Forschungslabor sowie für die Durchsicht dieser Arbeit bin ich Frau Dr. rer. nat. Nina Perwitz und Frau Britta Meier sehr dankbar, ohne deren praktische Hilfe die Durchführung der Versuchstage ebenfalls nicht möglich gewesen wäre. In dieser Sache bin ich auch Frau Maren Drenkhahn dankbar, die mir insbesondere bei der Durchführung der IL-6-ELISA hilfreich zur Seite stand.

Selbstverständlich danke ich meinen Freunden und Bekannten, die sich als Probanden vertrauensvoll zur Teilnahme an dieser Studie entschlossen haben.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Bente Tils für ihr Verständnis, eigentlich freie Wochenenden und Urlaubstage für die letzten Züge dieser Arbeit zu opfern sowie für ihre liebevolle Unterstützung während dieser Zeit.

Mein großer und besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern Gabriele und Horst Wenzel sowie Großmüttern Anni Schweimer und Erika Wazlawczyk, die mir in allen Lebensabschnitten durch ihre bedingungs- und selbstlose Unterstützung und ihren Rückhalt sowie ihr Vertrauen eine ausgezeichnete Ausbildung und die Aussicht auf eine gute und erfolgreiche Zukunft ermöglicht haben.

9 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Eike Tilman Wenzel

Geburtsdatum: 04.09.1981

Geburtsort: Lübeck

Familienstand: ledig, keine Kinder



Schulbildung

1988 – 1992 Grundschule Timmendorfer Strand

1992 – 2001 Ostsee-Gymnasium Timmendorfer Strand

06/2001 Abitur

Hochschulbildung

10/2001 – 06/2008 Studium der Humanmedizin (Universität zu Lübeck)

2001 – 2003 Vorklinischer Abschnitt (Universität zu Lübeck)

2003 – 2006 Klinischer Abschnitt (Universität zu Lübeck)

2006 – 2007 Praktisches Jahr

August – Dezember Innere Medizin, Kardiologie, Angiologie, Diabetologie,
Rehabilitationsmedizin (Curschmann-Klinik
Timmendorfer Strand)

Dezember – März Wahltertial Hand-, Brust- und Plastische Chirurgie
(Klinikum Neustadt)

April – Juni Onkologische Chirurgie / Plastische Chirurgie
(*Sunnybrook Health Sciences Centre, University of
Toronto, Ontario, Kanada*)

Juni – Juli Gefäßchirurgie (UK S-H, Campus Lübeck)

06/2008 Staatsexamen und Approbation

Auslandsaufenthalte

März – April 2006 *Sir Charles Gairdner Hospital, University of Western Australia,
Perth, WA; Department of Plastic and Reconstructive Surgery*

April – Juni 2007 *Sunnybrook Health Sciences Centre, University of Toronto,
Ontario, Kanada; Department of Surgical Oncology/Plastic
Surgery*

Wissenschaftliche Tätigkeit und Präsentationen

2004 – 2010	Klinisch-experimentelle Forschungsarbeit zum Thema „Effekt des Sympathischen Nervensystems auf die endokrine Fettgewebefunktion“; AG Professor Dr. med. J. Klein, Universität zu Lübeck
04 – 09/2004	Klinische Versuchsreihe stimulierte Gruppe
05/2005	Vortrag der Daten der stimulierten Gruppe auf dem Kongress der Deutschen Diabetes Gesellschaft, Berlin
06/2005	Posterpräsentation der Daten der stimulierten Gruppe auf dem Kongress der <i>Endocrine Society</i> , San Diego, CA, USA
09 – 10/2005	Klinische Versuchsreihe Kontrollgruppe

Klinische Tätigkeit

10/2008 – 05/2010	basischirurgische Ausbildung („ <i>Common Trunk</i> “) in der Klinik für Allgemeine Chirurgie, UK S-H, Campus Lübeck
10/2008 – 09/2009	Gefäßchirurgie
10/2009 – 05/2010	chirurgische Intensivmedizin
seit 06/2010	Weiterbildung („ <i>Special Trunk</i> “) in der Sektion Plastische Chirurgie des UK S-H, Campus Lübeck

Zusatzkurse, -fortbildungen und -qualifikationen

WS 2005/06	Wahlfach „Hand- und Plastische Chirurgie“ (Universität zu Lübeck)
WS 2005/06	Kurs „Mikrochirurgie“ (Universität zu Lübeck, Klinik für Ophthalmologie)
SS 2006	Wahlfach „Hand- und Plastische Chirurgie“ (Universität zu Lübeck)
06/2009	<i>Basic Surgical Skills Course, Royal College of Surgeons</i> (<i>European Surgical Institute, Norderstedt</i>)

Sportliches und soziales Engagement

Eishockey:

1990 – 1996	Mannschaftskapitän im Jugendbereich
1997 – 2004	Professioneller Eishockeyspieler
2002 – 2008	Nachwuchsarbeit als lizenzierter Eishockeytrainer

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die verwendete Literatur ist komplett aufgelistet. Diese Arbeit wurde von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfasst und enthält - auch in Teilen - keine Kopien anderer Arbeiten.

Lübeck, den 11. Mai 2010

Eike Tilman Wenzel