

Aus dem Institut für experimentelle und klinische
Pharmakologie und Toxikologie der
Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Markus Schwaninger

Eine chronische Blockade von
Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptoren verbessert die
Kardinalsymptome des Metabolischen Syndroms
bei der Diät-induzierten adipösen Ratte

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Nils Hübel
aus Bad Oldesloe

Lübeck 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Raasch
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Klein
3. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Höcherl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.10.2014

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	2
1.2	Insulinresistenz	4
1.3	Adipositas	5
1.4	Fragestellung	10
2	Methoden	12
2.1	Dosisfindungsstudie	12
2.2	Hauptstudie	12
2.2.1	Versuchsprotokoll.....	12
2.2.2	Vorbehandlungsphase (Woche 1-19).....	13
2.2.3	Behandlungsphase (Woche 20-37).....	14
2.3	Medikamentenherstellung und Applikation	15
2.4	Gewinnung von biologischem Material	16
2.4.1	Blutentnahme über den Schwanz	16
2.4.2	Tötung und Blutentnahme nach Dekapitation	16
2.4.3	Organpräparation	17
2.5	Funktionstests	17
2.5.1	Nicht-invasive Blutdruckmessung (Tail-Cuff-Methode)	17
2.5.2	Oraler Glukose-Toleranz-Test.....	18
2.5.3	Insulin-Toleranz-Test (ITT).....	19
2.5.4	Leptinresistenz-Test.....	19
2.5.5	Indirekte Kalorimetrie	20
2.5.6	Magnetresonanztomographie	21
2.6	Analytische Methoden	22
2.6.1	Radioimmunoassay (RIA)	22
2.6.3	mRNA-Extraktion aus dem Hypothalamus.....	23
2.6.4	mRNA-Messung mit RiboGreen.....	23
2.6.5	cDNA-Synthese	24
2.6.6	Quantitative real-time PCR (qPCR).....	24
2.6.7	Probenaufbereitung für Western Blot	26

2.6.8	Proteinbestimmung nach LOWRY	27
2.6.9	Proteinanalyse mittels Western Blot.....	27
2.7	Statistische Methoden	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Dosisfindungsstudie	30
3.2	Hauptstudie	31
3.2.1	Blutdruck, Herzfrequenz und linksventrikulärer Index	31
3.2.2	AngII-Plasmakonzentrationen	33
3.2.3	Körpergewichtsentwicklung und Fettvolumen	33
3.2.4	Energie- und Wasseraufnahme	36
3.2.5	Glukosestoffwechsel	38
3.2.6	Fettstoffwechsel	41
3.2.7	Energieverbrauch nach Behandlung	42
3.2.8	Leptin und Adiponektin.....	45
3.2.9	Leptinsensitivität nach Behandlung.....	46
4	Diskussion.....	50
4.1	Telmisartan und Körpergewicht	50
4.2	Telmisartan und Leptinresistenz	53
4.3	Telmisartan und Glukosestoffwechsel	59
4.4	Fazit.....	61
4.5	Limitationen	61
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis	64
7	Anlagen.....	77
7.1	Anhang	77
7.2	Abbildungsverzeichnis	80
7.3	Tabellenverzeichnis.....	80
7.4	Substanzen und erworbene Lösungen	81
7.5	Rezepturen von Lösungen.....	82
7.6	Käuflich erworbene Versuchskits.....	83
7.6.1	RIA-Kits.....	83

7.6.2 Kits zur Bestimmung der Gen-Expression	83
7.7 Verbrauchsmaterialien.....	84
7.8 Geräte.....	85
7.9 Abkürzungsverzeichnis.....	86
8 Danksagung.....	93
9 Lebenslauf	94
10 Veröffentlichungen	95
10.1 Publikationen	95
10.2 Poster und Vorträge.....	95
10.3 Preise und Auszeichnungen	95

1 Einleitung

Das Metabolische Syndrom (MetS) subsummiert eine Reihe von zusammenhängenden Risikofaktoren für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ II (T2DM). Hierzu zählen vor allem Übergewicht, Bluthochdruck, Fett- sowie Glukosestoffwechselstörungen, aber auch chronische proinflammatorische und prothrombotische Zustände, nicht-alkoholische Fettleber und das Schlafapnoe-Syndrom (Kassi et al. 2011). Der Begriff MetS wurde das erste Mal 1998 von einer Diabetesfachgruppe der WHO geprägt und geht auf Reaven zurück, der schon 1988 wesentliche Faktoren unter dem „Syndrom X“ zusammenfasste, jedoch die Insulinresistenz in den Vordergrund stellte (Reaven 1988). Im weiteren Verlauf wurde abdominales Übergewicht als wesentliche Ursache der Insulinresistenz in den Mittelpunkt gerückt (Phillips and Prins 2008). Weltweit unterschieden sich die diagnostischen Kriterien des MetS, sodass sich internationale Gesundheitsorganisationen 2009 auf weitestgehend einheitliche Kriterien (Alberti et al. 2009) einigten. Beim Hüftumfang wurde zwar kein weltweiter Konsens erzielt, die Messung als Maß für Übergewicht aufgrund ihres hohen Stellenwertes aber beibehalten.

20-30% der Weltpopulation erfüllen die Kriterien des MetS, wobei die Tendenz infolge der älter werdenden Bevölkerung als steigend anzunehmen ist. Das hierbei einhergehende Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen entspricht dabei dem doppelten der Normalbevölkerung, bei T2DM geht man derweil von einer Verfünffachung aus (Grundy 2008). Allein die Behandlungskosten für Bluthochdruck-Patienten mit MetS in Deutschland wurden für das Jahr 2008 bereits auf über 24 Milliarden Euro beziffert und sollen bis 2020 auf jährlich 39 Milliarden Euro steigen (Scholze et al. 2010). Weltweit ist von erheblichen Belastungen der Gesundheitssysteme auszugehen, die in Zukunft noch deutlich größer ausfallen dürften.

1.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Aufgrund der zentralen Bedeutung in dieser Studie, erfolgt ein kurzer Überblick über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Prinzipiell hat es grundlegende Bedeutung in der Flüssigkeitshomöostase und genetische Untersuchungen legen nahe, dass es bereits vor über 500 Millionen Jahren diese Rolle spielte (Fournier et al. 2012). Klassischerweise wird das RAAS als eine schlanke endokrine Hormonkaskade angesehen: Renin stammt vom juxtaglomerulären Apparat der Nieren und spaltet Angiotensin I (AngI) von Angiotensinogen (Aogen) aus der Leber ab. Das inaktive AngI wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), was sich vor allem am pulmonalen Endothel befindet, in das aktive Angiotensin II (AngII) überführt (Ribeiro-Oliveira et al. 2008). AngII bindet an sieben-transmembranäre G-gekoppelte Rezeptoren, die in Typ-1-Angiotensin-Rezeptoren (AT₁-Rezeptor) und Typ-2-Angiotensin-Rezeptoren (AT₂-Rezeptoren) eingeteilt werden. Während der Mensch nur eine Form des AT₁-Rezeptors aufweist, besitzen Nager die Subtypen AT_{1A} und AT_{1B}, wobei ersterer das Äquivalent zum menschlichen AT₁-Rezeptor darstellt (Stegbauer and Coffman 2011). AngII ist ein wichtiger Regulator der Natrium- und Wasserhomöostase sowie des Blutdrucks, beeinflusst aber auch Zellwachstum und kardiovaskuläres Remodelling. Bekannte AT₁-vermittelte Effekte sind Vasokonstriktion, Auslösen von Durstempfinden, Vasopressin- und Aldosteronsekretion sowie Zellwachstum. Hieraus leiten sich die positiven kardiovaskulären Effekte bei Blockierung des RAAS ab: Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren (ACE-Hemmer) und AT₁-Rezeptor-Blocker (ARB) gehören zur Standardtherapie bei Patienten mit Bluthochdruck, akutem Myokardinfarkt, chronischer Herzinsuffizienz und diabetischer Nephropathie (Ma et al. 2010). Die Eigenschaften von AT₂-Rezeptoren sind weniger untersucht, gelten allgemein hin jedoch als Gegenspieler der AT₁-Rezeptoren und führen zu einer Vasodilatation und Wachstumshemmung (Fyhrquist and Saijonmaa 2008).

Die Entdeckung weiterer Komponenten führte das RAAS weg von der schmalen Hormonkaskade zu einem breiteren komplexeren System: Metabolite von AngII mit biologischer Aktivität (Ang(1-7), Ang(1-9), etc.), weitere Rezeptoren (z.B. AT₄-Rezeptor, Mas-Rezeptor) sowie ACE-unabhängige AngI- und AngII-Abbauewege über den Chymase-Weg oder das Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2) kön-

nen hier jedoch nur aufgezählt werden (Paul et al. 2006, Ribeiro-Oliveira et al. 2008). Eine Übersicht der wichtigsten aktuellen RAAS-Komponenten zeigt Abbildung 1-1.

Eine wichtige und grundlegende Neuerung war zudem die Entdeckung eines lokalen RAAS, welches unabhängig vom systemischen RAAS exprimiert wird (Miyazaki and Takai 2006). In einer Vielzahl von Geweben konnte bereits ein lokales RAAS nachgewiesen werden, das über para-, auto- und intrakrine Signalgebung additive oder gar gegensätzliche Effekte zum systemischen RAAS hervorruft (Paul et al. 2006, Leung 2007). Die Entdeckung eines lokalen RAAS im Gehirn, Pankreas und vor allem im Fettgewebe hat maßgeblich zu der Erkenntnis beigetragen, dass das RAAS über seine lokalen Komponenten zusätzlich Einfluss auf die Glukose- und Energiehomöostase nimmt und über dessen Blockade via ACE-Hemmer sowie ARB positiv Einfluss genommen werden kann (de Kloet et al. 2010).

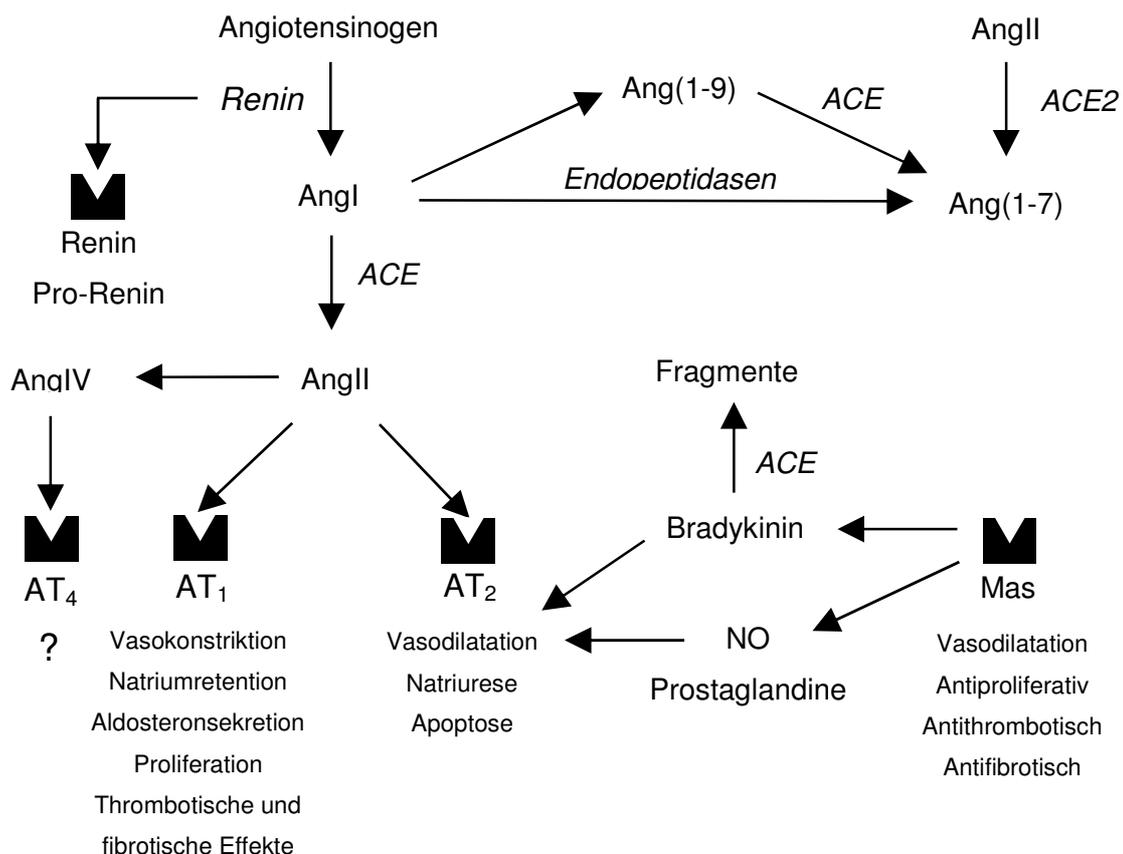


Abb. 1-1: Überblick über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (nach Ribeiro-Oliveira et al. 2008, modifiziert); Abkürzungen: Ang Angiotensin, ACE Angiotensin-Converting-Enzyme, AT Angiotensin-Rezeptor;  : Rezeptor.

1.2 Insulinresistenz

Nach Nahrungsaufnahme führen erhöhte Glukosespiegel zu einer Sekretion von Insulin aus den β -Zellen der Pankreasinseln. Über Insulinrezeptoren in Muskeln, Fett und Gehirn kommt es durch Aktivierung des PI3-Kinase-Weges zum vermehrten Einbau des Glukosetransporters Typ 4 (GLUT4) in die Zellmembranen, wodurch der Plasmaglukosespiegel gesenkt wird (Mohd-Radzman et al. 2013). Übergewicht führt zu einer Störung der Insulinfunktion, was eine vermehrte Glukosefreisetzung aus der Leber sowie eine verminderte Aufnahme von Glukose in der Peripherie nach sich zieht und reaktiv Insulin weiter erhöht. Umgekehrt führt Gewichtsverlust zu einer proportional verbesserten Insulinsensitivität (Weyer et al. 2000). Der genaue Mechanismus der Insulinresistenz ist bis heute nicht identifiziert, vielmehr werden eine Vielzahl von Faktoren verantwortlich gemacht, von denen viele in Verbindung mit Adipozyten stehen: Hohe Spiegel freier Fettsäuren, ein entzündliches Milieu infolge einer Makrophagenakkumulation sowie verminderte Sekretion von Adiponektin aus Adipozyten sind Folgen von Übergewicht und führen zu Insulinresistenz (Qatanani and Lazar 2007).

In einer Vielzahl von randomisierten klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass neben einer effektiven Blutdrucksenkung das Neuauftreten von T2DM durch die chronische Blockade des RAAS mittels ACE-Hemmern und ARB gesenkt werden konnte (Zhou et al. 2012). Die nephroprotektiven Eigenschaften und positiven Effekte auf den Glukosestoffwechsel machen sie bereits zu Blutdrucksenkern der ersten Wahl für Patienten mit T2DM (Mallat 2012). Im Gegensatz hierzu neigen andere medikamentöse Blutdrucksenker wie Betablocker oder Diuretika zu einer Verschlechterung der Insulinsensitivität (Padwal and Laupacis 2004). Für die Verbesserung des Glukosestoffwechsels unter RAAS-Blockierung bestehen verschiedene Erklärungsansätze. Dazu gehören eine Vasodilatation im Muskelgewebe mit konsekutiv erhöhtem Glukosetransport, eine Verbesserung der Signaltransduktion von Insulin, eine erhöhte Insulinsekretion der β -Zellen sowie eine verminderte Sympathikusaktivität (Scheen 2004, Zhou et al. 2012, Underwood and Adler 2013). Zusätzlich wurden unter ARB-Therapie antiinflammatorische Effekte in Fettgewebe und Pankreas nachgewiesen (Cole et al. 2010). Eine weitere Erklärung liegt in der direkten AngII-unabhängigen Aktivierung des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptors γ (PPAR γ) durch die ARB Telmisartan und

Irbesartan. Hierbei handelt es sich um intrazelluläre Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren Auswirkungen auf die Genexpression haben. PPAR γ wird vor allem in weißem Fettgewebe exprimiert und führt bei Aktivierung zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität (Schupp et al. 2005). Angesichts ebenfalls positiver Einflüsse von ACE-Hemmern und des ARB Candesartan, dass eine wesentlich niedrigere Affinität an PPAR γ aufweist (Marshall et al. 2006) sowie einer vorausgegangenen Untersuchung der Arbeitsgruppe, in der in Ratten unter Telmisartan-Behandlung keine Regulation von PPAR γ -Zielgenen beobachtet wurde (Müller-Fielitz et al. 2012a), wird dieser Mechanismus eher in Frage gestellt.

1.3 Adipositas

Übergewicht entsteht aus einer Dysbalance von Energieaufnahme und Energieverbrauch. Inzwischen werden zwei Formen unterschieden: Subkutane und viszerale (=intraabdominelle) Adipositas. Letztere gilt als weitaus gefährlicher und steht in engem Zusammenhang mit dem MetS (Matsuzawa 2008). In Studien mit Kindern und Erwachsenen konnte intraabdominelles Fett bereits als positiver Vorhersagewert für eine Reihe von Komponenten des MetS identifiziert werden (Nakao et al. 2012, Silveira et al. 2013). Seit Entdeckung des Leptins 1995 gilt das Fettgewebe nicht nur als reiner Energiespeicher, sondern auch als endokrines Organ, das eine Reihe von sogenannten Adipokinen sezerniert, die para-, auto- und endokrine Wirkung entfalten und hierüber deutliche Auswirkungen auf Energiehaushalt, Glukosestoffwechsel und Blutdruck hat. Leptin stellt neben Adiponektin das wichtigste Adipokin dar und sei kurz erläutert: Die periphere Leptinplasmakonzentration verhält sich proportional zur Fettmasse und reguliert zentral über die Expression von (an-)orexigenen Peptiden in hypothalamischen Kerngebieten die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch. Genauer führt Leptin zu einer Hochregulation der anorexigenen Peptide Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), corticotropin-releasing factor (CRF) und Melanozytenstimulierendes Hormon α (α -MSH), das aus Pro-opiomelanocortin (POMC) prozessiert wird. Orexigene Peptide wie Neuropeptid Y (NPY), Melanin-concentrating hormone (MCH) und Agouti-related peptide (AgRP) werden herunterreguliert. Es handelt sich um einen Regelkreis der Energiehomöostase, der jedoch nicht auf

kurzfristige Schwankungen, sondern auf langfristige Änderungen im Bereich von Tagen reagiert (Jequier 2002). Im Gegensatz zu Normalgewichtigen wurde bei Übergewichtigen trotz hoher Leptinspiegel und eines intakten Leptinsignalwegs keine Senkung der Nahrungszufuhr beobachtet, was das Konzept der Leptinresistenz etablierte (Ronti et al. 2006). Der genaue Mechanismus der Leptinresistenz ist bisher unklar, allerdings werden eine verminderte Permeabilität der Bluthirnschranke und eine veränderte zentrale Signaltransduktion von Leptin diskutiert (Banks and Farrell 2003, Sahu and Metlakunta 2005). Neuerdings wird zentralem Leptin ebenfalls eine wichtige Rolle in der peripheren Insulinsensitivität zugeschrieben: So konnte intracerebroventrikulär appliziertes Leptin die periphere Insulinsensitivität verbessern (Morton and Schwartz 2011).

Bei Zunahme der Fettdepots kommt es nicht nur zu einer erhöhten Sekretion von Leptin, sondern auch von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6), die neben weiteren proinflammatorischen Proteinen zu einem niederschwelligen chronischen Entzündungsgeschehen führen und vor allem die Insulinsensitivität beeinträchtigen (Ouchi et al. 2011). TNF α und IL-6 werden in diesem Zusammenhang auch mit einem negativen Einfluss auf den Blutdruck diskutiert, da sie die Sympathikusaktivität steigern (Smith and Minson 2012). Die erhöhte Adipokinsekretion basiert dabei in hohem Maße auf hypertrophierte dysregulierte Adipozyten (Skurk et al. 2007). Dieser pathologische Prozess wird von einer Akkumulation von Makrophagen im zunehmenden Fettgewebe unterstützt, die ihrerseits entzündungsfördernde Zytokine sezernieren (Weisberg et al. 2003, Ouchi et al. 2011). Im Gegensatz zu den meisten Adipokinen kommt es bei Übergewicht zu einer verringerten Sekretion von Adiponektin. Zusätzlich konnten erniedrigte Plasmakonzentrationen auch in Patienten mit Bluthochdruck, T2DM und koronarer Herzkrankheit (KHK) nachgewiesen werden, sodass Matsuzawa den Begriff „Hypoadiponektinämie“ als Krankheitsbild analog zum MetS einführte (Matsuzawa 2010). Bisher ist für Adiponektin vor allem eine Verbesserung der Insulinsensitivität sowie eine kardiovaskuläre Schutzfunktion, u.a. durch verminderte Entstehung von Arteriosklerose beschrieben (Shibata et al. 2009, Ziemke and Mantzoros 2010).

Wie bereits erwähnt existiert im weißen Fettgewebe ein lokales RAAS, das alle wesentlichen Komponenten (Renin, Aogen, AngI, ACE, AngII, AT₁- und AT₂-Rezeptoren) aufweist und neben der Leber als weitere Quelle für systemische AngII-Plasmakonzentrationen anzusehen ist (Paul et al. 2006). In Versuchen mit 3T3-L1 Adipozyten verursachte AngII eine erniedrigte Sekretion von Adiponektin (Ikeda et al. 2009), erhöhte jedoch jene von Leptin (Kim et al. 2002) und stimuliert darüber hinaus dosisabhängig die Produktion von TNF α und IL-6 in Makrophagen (Guo et al. 2011). In Konsequenz führte chronische AngII-Substitution über eine verringerte Nahrungsaufnahme zu einem Gewichtsverlust in Ratten (Brink et al. 1996). In einer weiteren Studie war dieser Effekt einer erhöhten Sympathikusaktivität und folglich gesteigerter Lipolyse geschuldet, die Nahrungsaufnahme blieb dabei allerdings unverändert (Cabassi et al. 2005). In vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Raasch konnte eine Gewichtssenkung durch AngII in schlanken Ratten bestätigt werden (Müller-Fielitz et al. 2012b). Bei übergewichtigen Tieren blieb dieser Effekt jedoch aus (Müller-Fielitz and Raasch 2013), was einen gewichtssenkenden Effekt von AngII bei vorbestehender Adipositas in Frage stellt. In der Tat kommt es bei Übergewicht zu einer Hochregulation des lokalen RAAS im Fettgewebe, was auch mit einer Aktivierung des systemischen RAAS einhergeht (Giacchetti et al. 2002, Boustany et al. 2004). Die Plasmaspiegel von Aogen und AngII korrelieren dabei positiv mit dem Körpergewicht (Engeli et al. 2005, Harte et al. 2005). Zusätzlich wurde bei übergewichtigen Frauen, die ihr Körpergewicht um ca. 5kg senkten, eine Normalisierung der Plasmakonzentrationen von Renin, Aogen, Aldosteron und der ACE-Aktivität beobachtet (Engeli et al. 2005). Entsprechend führte eine Blockierung des RAAS durch eine Behandlung mit ARB zu einem Gewichtsverlust bei Ratten (Kohya et al. 1995, Benson et al. 2004, Zorad et al. 2006, Zanchi et al. 2007, Müller-Fielitz et al. 2011, Miesel et al. 2012, Müller-Fielitz et al. 2012a) und Mäusen (Schupp et al. 2005, Rong et al. 2010). Andere Studien hingegen beobachteten keine Senkung des Körpergewichts unter ARB-Therapie (Tanabe et al. 2004, Lu et al. 2005, Raasch et al. 2006). Hier kamen allerdings niedrigere Dosierungen zum Einsatz (Candesartan: 1-2 vs. 10-30mg/kg_{Körpergewicht}). Telmisartan führte zwar mit einer vergleichsweise geringen Dosis (5-8mg/kg_{Körpergewicht}) zu einer Körpergewichtsre-

duktion, gilt aber als ARB mit der höchsten Lipophilie, dem größten Verteilungsvolumen und der stärksten AT₁-Rezeptoraffinität (Ohno et al. 2011)

Die Nahrungsaufnahme war unter AT₁-Blockade entweder unverändert (Benson et al. 2004, Schupp et al. 2006, Sugimoto et al. 2006, Zanchi et al. 2007, He et al. 2010) oder allenfalls über einen begrenzten Zeitraum erniedrigt (Zorad et al. 2006, Miesel et al. 2012, Müller-Fielitz et al. 2012a). Eine mögliche Erklärung für den Gewichtsverlust ergibt sich aus Studien, die unter AT₁-Blockierung einen erhöhten Energieverbrauch durch vermehrten Sauerstoffverbrauch und erhöhte Thermogenese durch Hochregulierung des Uncoupling Protein 1 (= Thermogenin, UCP-1) beobachten konnten (Araki et al. 2006, Sugimoto et al. 2006). Knockout-Mäuse ohne Expression von AT_{1A}-/AT_{1B}-Rezeptoren wiesen ebenfalls ein vermindertes Körpergewicht auf (Gembardt et al. 2008), was zusammen mit den Ergebnissen nach AT₁-Blockade für einen pharmakologischen Angriffspunkt zur Gewichtsreduktion durch ARB spricht.

Vor dem Hintergrund des Paradoxons, dass die Senkung des Körpergewichts sowohl nach AngII- als auch nach ARB-Behandlung beobachtet wurde, stellt sich die Frage nach genaueren Mechanismen dieser Gewichtsregulation. Grundsätzlich basiert die Gewichtssenkung auf einem intakten Leptinsignalweg, da ein Gewichtsverlust unter Hochdosistherapie mit Candesartan bei adipösen Zuckerratten nicht beobachtet wurde, die einen Defekt im Leptinrezeptor aufweisen (Müller-Fielitz et al. 2011). Ferner sind weitere Effekte durch ARB beschrieben: Erstens kommt es zu einer Verkleinerung der Adipozytengröße (Müller-Fielitz et al. 2012a), worunter auch eine Rückbildung der dysregulierten Adipokinsekretion beschrieben ist (Zorad et al. 2006). Zweitens ist die Sekretion proinflammatorischer Zytokine der akkumulierten Makrophagen im Fettgewebe erniedrigt (Cole et al. 2010, Guo et al. 2011). Drittens konnte eine Erniedrigung orexigener Neuropeptide im Hypothalamus nachgewiesen werden, die mit einer verringerten Energieaufnahme einhergingen (Müller-Fielitz et al. 2011, Noma et al. 2011). Viertens verhinderte Telmisartan eine Adipogenese und Gewichtszunahme über eine PPAR δ -Aktivierung, was in PPAR δ -Knockout-Mäusen nicht reproduziert werden konnte (He et al. 2010). Fünftens senkte Telmisartan die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) (Miesel et al. 2010), die bei

Adipositas als überaktiv angesehen wird (Lucassen and Cizza 2012). Sechstens kam es unter ARB-Behandlung über einen Feedback-Mechanismus nicht nur zu erhöhten AngII-Plasmaspiegeln, sondern auch zu einer Erhöhung von Ang(1-7), das zum Großteil von ACE2 produziert wird (Ferrario et al. 2005). Die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Captopril führte in einer weiteren Studie zu einer Gewichtssenkung und erhöhten Ang(1-7)-Plasmaspiegeln, wohingegen die Blockierung des Mas-Rezeptors, der Ang(1-7) bindet und als neuer Gegenspieler zum AT₁-Rezeptor gilt, die Gewichtsreduktion aufhob. Hieraus leiteten die Autoren einen teilweise Ang(1-7)-abhängigen Mechanismus ab (Oh et al. 2012).

Eine gewichtssenkende Wirkung durch ARB über eine direkte PPAR γ -Aktivierung wird ausgeschlossen, da PPAR γ -Agonisten (Glitazone) zu einer Zunahme von Körpergewicht, Fettmasse, Adipozytengröße und Energieaufnahme führten (de Souza et al. 2001, Larsen et al. 2003).

1.4 Fragestellung

In vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe um Raasch konnte unter AT₁-Blockade bereits eine deutliche Gewichtsreduktion nachgewiesen werden (Müller-Fielitz et al. 2011, Müller-Fielitz et al. 2012a, Lau 2012). Dieser Effekt wurde wie in anderen Studien nur unter Einsatz hoher Dosierungen beobachtet. Die Nahrungsaufnahme war hier nach kurzfristiger ARB-Behandlung (2-4 Wochen) zwar erniedrigt, bei längerer Behandlung (drei Monate) allerdings unverändert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Gewichtssenkung auf einem intakten Leptinsignalweg beruht, da adipöse Zuckerratten mit einem defekten Leptinrezeptor unter gleicher Behandlung kein Gewicht verloren (Müller-Fielitz et al. 2011). Eine weitere Untersuchung wies anschließend eine Verbesserung der Leptinsensitivität nach zweiwöchiger Telmisartan-Behandlung nach (Lau 2012). Analog zu anderen Studien handelte es sich jedoch bei allen vorherigen Untersuchungen um eine prophylaktische medikamentöse Intervention, was nicht der klinischen Situation der Patienten mit MetS entspricht. Daher lag das Hauptaugenmerk dieser Studie auf einer medikamentösen Intervention in Therapieform, die erst nach Auftreten der Risikofaktoren des MetS beginnt. Die wichtigsten zu klärenden Fragen lauten:

- Führt die chronische Behandlung mit dem ARB Telmisartan in einem therapeutischen Behandlungsregime zu einer Körpergewichtsreduktion?
- Wenn ja, ist die Körpergewichtssenkung a) dosisabhängig und b) blutdruckabhängig?
- Ist die Energieaufnahme unter der Telmisartan-Therapie vermindert?
- Ist der Energieverbrauch durch die medikamentöse Intervention erhöht?
- Ist die Leptinresistenz der adipösen Tiere durch die Telmisartan-Behandlung verbessert?
- Sind neben einer effektiven Blutdrucksenkung auch weiterhin positive Effekte auf den Glukosestoffwechsel nachweisbar?

Zur Klärung dieser Fragen wird die Studie in zwei Teile gegliedert und ein etabliertes Rattenmodell verwendet, welches die Entstehung und Risikokonstellation von Patienten mit MetS abbildet und nicht auf einem genetischen Defekt basiert. In einer Vielzahl von Studien bezüglich Übergewicht und MetS kommen Tiermodelle zur Anwendung, die auf einem nichtfunktionalen Leptinsignalweg beruhen (Fellmann et al. 2013) und somit nur sehr eingeschränkt die klinische Realität abbilden. Eine monogenetische Ursache für Übergewicht bei Menschen ist zwar in Einzelfällen beschrieben (Xia and Grant 2013), spiegelt aber nicht das pandemische Auftreten von Übergewicht als Teil des MetS wider, dass vor allem einer hohen kalorischen Nahrungszufuhr und wenig Bewegung geschuldet ist. Daher wurden in dieser Studie spontan hypertensive Ratten (SHR) eingesetzt, die frei zwischen einer hochkalorischen Diät aus diversen Schokoladenriegeln und Keksen (Cafeteria-Diät, CD) und einer gängigen Haltungsdiät wählen konnten. Die Fütterungsphase mit CD dauerte 19 Wochen, wodurch alle wesentlichen Risikofaktoren des MetS wie Adipositas, Bluthochdruck, Insulin- und Leptinresistenz sowie eine Triglyceriderhöhung induziert werden konnten (Miesel et al. 2010). Erst danach wurden die medikamentösen Interventionen angeschlossen, wobei die Fütterung unverändert fortgeführt wurde. Um eine mögliche Blutdruckabhängigkeit zu überprüfen, wurde neben Telmisartan in niedriger und hoher Dosierung Amlodipin, ein Calciumkanalblocker ohne bekannte gewichtssenkende Wirkung, mitgeführt. Durch eingangs erstellte Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) konnten für alle Medikamente Dosierungen mit equipotenter Blutdrucksenkung ermittelt werden (siehe 2.1). Am Ende der Behandlungsphase wurden mehrere Funktionstests durchgeführt, die näheren Aufschluss über den Glukosestoffwechsel, die Leptinsensitivität und den Energieverbrauch brachten (siehe 2.5).

2 Methoden

2.1 Dosisfindungsstudie

Um equipotente antihypertensive Effekte von Telmisartan, Amlodipin bzw. deren Kombination zu erzielen, wurden in einer Dosisfindungsstudie Dosis-Wirkungskurven (DWK) in Bezug auf die Blutdrucksenkung erstellt. Hierfür wurden je Therapieregime sechs Ratten mit spontanem Bluthochdruck (Spontaneous Hypertension, SHR; Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet und die Medikamente mittels Schlundsonde appliziert. Jede Dosierung wurde eine Woche lang verabreicht und anschließend der Blutdruck nicht-invasiv gemessen (siehe Abschnitt 2.4.1). Für Amlodipin wurden Dosierungen von 0,3, 1, 3, 10, 20 sowie 30 mg/kg_{Körpergewicht} überprüft, für Telmisartan die Dosierungen 0,1, 2 sowie 8 mg/kg_{Körpergewicht}). Bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe wurde in vergleichbaren Studien 8 mg/kg_{Körpergewicht} Telmisartan verwendet (Miesel et al. 2012, Müller-Fielitz et al. 2012a). Um Hoch- und Niedrigdosis von Telmisartan bei möglichst identischer Blutdrucksenkung vergleichen zu können, wurde in einer Kombinationstherapie Telmisartan fix mit 2 mg/kg_{Körpergewicht} dosiert und die Menge von Amlodipin bis zur equipotenten Blutdrucksenkung titriert.

2.2 Hauptstudie

2.2.1 Versuchsprotokoll

Die im Folgenden durchgeführten Tierexperimente wurden unter Einhaltung der „NIH-Guideline“ sowie den Richtlinien zum Umgang und der Verwendung von Versuchstieren nach Genehmigung durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein durchgeführt (Tierversuchsantragsnummer: V312-72241.122-22 (14-2/09), genehmigt am 08. April 2009). Alle Versuchstiere wurden für die gesamte Studiendauer in einem klimatisierten Raum bei konstanter Temperatur (20°C) und Luftfeuchtigkeit (50%) untergebracht. Es herrschte ein gleichbleibender Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils

zwölf Stunden, wobei die Lichtphase um 2 Uhr begann und um 14 Uhr in die Dunkelphase übergang. Alle Tiere der Hauptstudie waren acht Wochen alte männliche SHR. Fünf Tage vor Studienbeginn wurden die Tiere an ihre Umgebung habituiert. Am Ende dieser Zeit wurden die Tiere anhand ihres Körpergewichts in fünf Behandlungsgruppen randomisiert. Jeweils zwei Ratten waren in Standardkäfigen der Größe 4 (Länge: 59 cm, Breite: 38 cm, Höhe: 20 cm) untergebracht und erhielten grundsätzlich eine Haltungsdiät (Haltungsdiät für Ratten und Mäuse; Art.-Nr. 1320; Altromin) sowie Leitungswasser ad libidum. Die Funktionstests wurden zur Stressminimierung in Versuchsräumen mit sehr ähnlichen Umweltbedingungen durchgeführt.

Aus logistischen Gründen wurde die gesamte Studie (60 Ratten) auf fünf Gruppen (je 12 Ratten) mit jeweils einer Woche Abstand aufgeteilt, wobei auf eine gleichmäßige Gruppenzugehörigkeit der Therapiegruppen geachtet wurde. Alle Interventionen fanden entsprechend zeitversetzt statt, sodass alle Tiere dieselbe Studien-Zeitachse aufwiesen (Abb. 2-1).

2.2.2 Vorbehandlungsphase (Woche 1-19)

Um ein möglichst patientennahes Vollbild des MetS mit den Hauptsymptomen Adipositas, Bluthochdruck und Insulinresistenz zu induzieren, wurde neben der Haltungsdiät zusätzlich mit einer Cafeteria-Diät (CD) über einen Zeitraum von 19 Wochen gefüttert (Miesel et al. 2010). Die Tiere konnten frei zwischen beiden voneinander getrennten Nahrungsangeboten mit jeweils unterschiedlichen Nährstoffzusammensetzungen wählen (Tab. 2-1). Die unterschiedlichen kommerziell erhältlichen Keks- und Schokoriegel wurden täglich gewechselt. Eine schlanke Kontrollgruppe (KON_S) erhielt lediglich die Haltungsdiät.

Tab. 2-1: Nährstoffzusammensetzung und Energiegehalt der angebotenen Diäten.

	Haltungsdiät	Cafeteria-Diät
Brennwert	11,7 kJ/g	20,3 ± 0,5 kJ/g
Eiweiß	6 %	6,5 ± 0,7 %
Kohlenhydrate	36 %	60,1 ± 3,0 %
Fett	4 %	24,9 ± 2,2 %

Der Verbrauch von Haltungs- und Cafeteria-Diät, Wasser sowie das Körpergewicht wurden wöchentlich gemessen. Eine Blutentnahme über den Schwanz in der 18. Woche diente zur präinterventionellen Spiegelbestimmung von AngII, Glukose, Insulin, Leptin und Adiponektin (Abschnitt 2.4.1). Zusätzlich wurde der Glukosestoffwechsel durch eine weitere Blutentnahme am nachfolgenden Tag unter nüchternen Bedingungen (24h-Nahrungskarenz) genauer untersucht. In der 19. Woche fand zusätzlich eine nicht-invasive Blutdruckmessung statt, um den Blutdruck vor der Behandlung festzustellen (Abschnitt 2.5.1).

2.2.3 Behandlungsphase (Woche 20-37)

Nach der 19-wöchigen Fütterungsphase wurden die CD-gefütterten Ratten täglich mit Telmisartan (TEL; 8mg/kg_{Körpergewicht}), Amlodipin (AML; 10mg/kg_{Körpergewicht}) bzw. deren Kombination (T+A; 2+8mg/kg_{Körpergewicht}) unter Fortführung der CD-Fütterung therapiert. Es wurden zwei Kontrollgruppen ohne Medikamentengabe mitgeführt: Eine adipöse Kontrolle (KON_A) erhielt ebenfalls die Cafeteria-Diät, die schlanke Kontrolle (KON_S) nicht. Beide wurden mit der entsprechenden Menge Vehikel behandelt. Die Medikation wurde bis zum Ende der Studie durchgeführt und erfolgte stets körperlsgewichtsadaptiert, weswegen das Wiegen der Tiere nun täglich erfolgte. Die Wirkstoffdosierungen wurden in der Vorstudie anhand equipotenter Blutdrucksenkungen bestimmt (Abschnitt 2.1). Zu deren Sicherung fand in der 22. Woche eine erneute Blutdruckmessung statt. Weiterhin erfolgte in der 25. Woche eine zusätzliche Blutentnahme zur Bestimmung von AngII, Glukose, Insulin, Leptin und Adiponektin. Ab der 30. Woche wurden verschiedene Funktionstests durchgeführt. Die Kalorimetrie und der Leptinresistenz-Test (LRT) dienten vorrangig zur Überprüfung der Langzeitwirkung von ARB auf den Energiehaushalt (Abschnitt 2.5.4+5). Mittels oralem Glukose-Toleranz-Tests (OGTT) und Insulin-Toleranz Tests (ITT) wurde der Glukosestoffwechsel überprüft (Abschnitt 2.5.2+3). Zur genauen Quantifizierung sowie Differenzierung zwischen subkutanem und viszeralem Fett wurden alle Versuchstiere per MRT untersucht (Abschnitt 2.5.6). Eine weitere Blutdruckmessung in der 34. Woche verifizierte die Langzeitwirkung der eingesetzten Medikamente.

Nach erfolgreicher Durchführung aller Tests erfolgte schließlich die Tötung der Ratten durch Dekapitation in der 37. Woche. Im sofortigen Anschluss wurden eine Blutentnahme durch Ausbluten (siehe 2.4.2), die Organentnahme und eine Messung der Femurlänge durchgeführt (siehe 2.4.3).

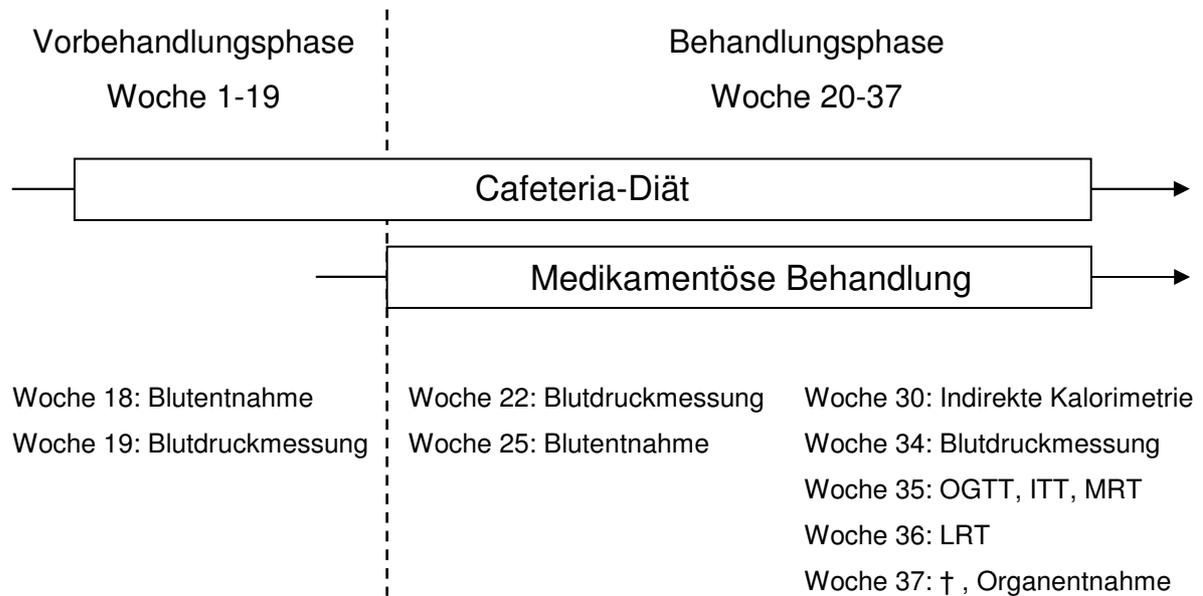


Abb. 2-1: Übersicht der zwei Hauptstudienabschnitte.

2.3 Medikamentenherstellung und Applikation

Telmisartan und Amlodipin wurden freundlicherweise von der Firma Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. (Ridgefield, USA) in Pulverform zur Verfügung gestellt. Aufgrund der Löslichkeitsprobleme von Telmisartan wurden beide Medikamente als Suspension appliziert und die Dosis pro $\text{kg}_{\text{Körpergewicht}}$ auf einen Milliliter normiert. Zur Herstellung der Arzneistoffsuspension wurde Gummi arabicum (1g auf 10ml Wasser) mit dem jeweiligen Medikamentenpulver in einer Reibschale gemischt und anschließend stufenweise in Wasser durch Verreibung suspendiert. Die so hergestellte Suspension wurde bei 4°C aufbewahrt, vor Applikation aufgeschüttelt und nicht länger als eine Woche verwendet.

Alle Tiere wurden zwei Wochen vor Behandlungsbeginn vorsichtig an die Medikamentenapplikation gewöhnt. Hierfür wurde stufenweise das Greifen der Tiere, das Hantieren mit der Schlundsonde im Mundraum und schlussendlich die Applikation mit Leitungswasser trainiert.

2.4 Gewinnung von biologischem Material

2.4.1 Blutentnahme über den Schwanz

Diese Methode ist einfach durchführbar, stressfrei für das Tier (Fluttart et al. 2000) und wurde bereits vielfach im eigenen Labor angewendet und weiterentwickelt (Raasch et al. 2006, Müller et al. 2007, Miesel et al. 2010, Müller et al. 2010, Müller-Fielitz et al. 2011, Miesel et al. 2012, Müller-Fielitz et al. 2012a). Hierfür wurde eine Ratte aus ihrem Käfig auf einen Tisch platziert, von einer zweiten Person mit einem Tuch bedeckt und leicht mit den Händen fixiert. Dann wurde mit einer Rasierklinge ein etwa ein Zentimeter vom Schwanzende entfernter querverlaufender Schnitt ausgeführt und das, unterstützt durch leichtes Ausstreichen des Schwanzes, austretende Blut in eine mit Kalium-EDTA beschichtete Mikrovette aufgesogen, welche sogleich in Eiswasser gekühlt wurde. Auf diese Weise konnten in weniger als zwei Minuten bis zu 300µl Vollblut gewonnen werden. Anschließend wurde das Blut mit 14000 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das gewonnene Plasma bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.4.2 Tötung und Blutentnahme nach Dekapitation

Alle Ratten wurden durch Dekapitation per Guillotine getötet. Im sofortigen Anschluss wurde eine bestimmte Menge des aus dem Tierkadaver austretenden Blutes mit Hilfe von Polypropylen-Trichtern in Reagiergefäße überführt, die entsprechende Stabilisatoren enthielten (Tab. 2-2).

Tab. 2-2: Blutstabilisatoren für die jeweiligen nachzuweisenden Substanzen.

Stabilisator	Endkonzentration	Bestimmung
Na-EDTA Lösung (0,24 M)	12,1 mM (4ml Blut)	Insulin, Glukagon, Leptin, Adiponektin
Bestatin (1 mM) / Na-EDTA Lösung (0,24 M)	20 µM / 12,1 mM (2ml Blut)	Angiotensin II

2.4.3 Organpräparation

Im Anschluss an die Blutentnahme nach Dekapitation wurden folgende Organe entnommen: Gehirn, Hypophyse, Herz, Leber, Nebennieren sowie weißes und braunes Fettgewebe. Die Hirnentnahme führte automatisch zu einer Abtrennung der Hypophyse aufgrund dessen fester Lokalisation in einer Duratasche. Das Herz wurde gewogen, wobei zu einem späteren Zeitpunkt die linke Herzkammer nochmals nach ihrer Präparation einzeln gewogen wurde. Das braune Fettgewebe wurde im Bereich des Nackens entnommen. Zusätzlich wurde der Femur präpariert und vermessen. Alle Organe bis auf das Gehirn wurden gewogen und in separaten 2ml-Reagiergefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gehirn wurde in mit Trockeneis gekühltem 2-Methylbutan zwei Minuten gekühlt. Anschließend wurden alle Organe bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.5 Funktionstests

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

Die im Folgenden beschriebene Blutdruckmessung erfolgte analog zu zahlreichen vorangegangenen Studien (Raasch et al. 2006, Miesel et al. 2010, Müller-Fielitz et al. 2011, Müller-Fielitz et al. 2012a, Müller-Fielitz et al. 2012b). Alle Messungen fanden in der aktiven Phase der Tiere zwischen 9 und 13 Uhr statt. Hierfür wurden die Ratten in einen abgedunkelten Versuchsraum überführt und konnten sich 30 Minuten an die neue Umgebung adaptieren. Zur Immobilisierung und Beruhigung führte man eine Ratte in eine an die Körpergröße angepasste starre Röhre, in die ein Sauerstoff-Distickstoffoxid-Gasgemisch (0,5 l/min O₂ + 2,0 l/min N₂O) eingeleitet wurde. Über den freiliegenden Schwanz konnte anschließend eine Druckmanschette und weiter kaudal ein Piezoelement geschoben werden. Ein Heiztisch und eine Infrarotlampe führten zu einer Hyperämie des Schwanzes. Ein Zweiphasenschreiber zeichnete mit Hilfe eines Verstärkers (Blood pressure Monitor 8002 Dual Channel, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) Pulssignal und Manschettendruck auf. Nachdem an einer gleichbleibenden basalen Herzfrequenz eine Beruhigung der Ratte abzulesen war, wurde die Manschette auf 320 mmHg

aufgepumpt und anschließend die Luft langsam abgelassen. Dieses Procedere wurde wiederholt bis mindestens vier sicher auswertbare Messungen vollzogen waren. Später fand eine graphische Auswertung der Aufzeichnungen statt, indem das Lot bei vollständiger Unterdrückung der Druckamplitude auf die Basislinie gefällt und vermessen wurde. Ein Zentimeter Lothöhe entsprach 63,3 mmHg, was aus einer vorherigen Kalibrierung mittels Gauss'schem Manometer resultierte.

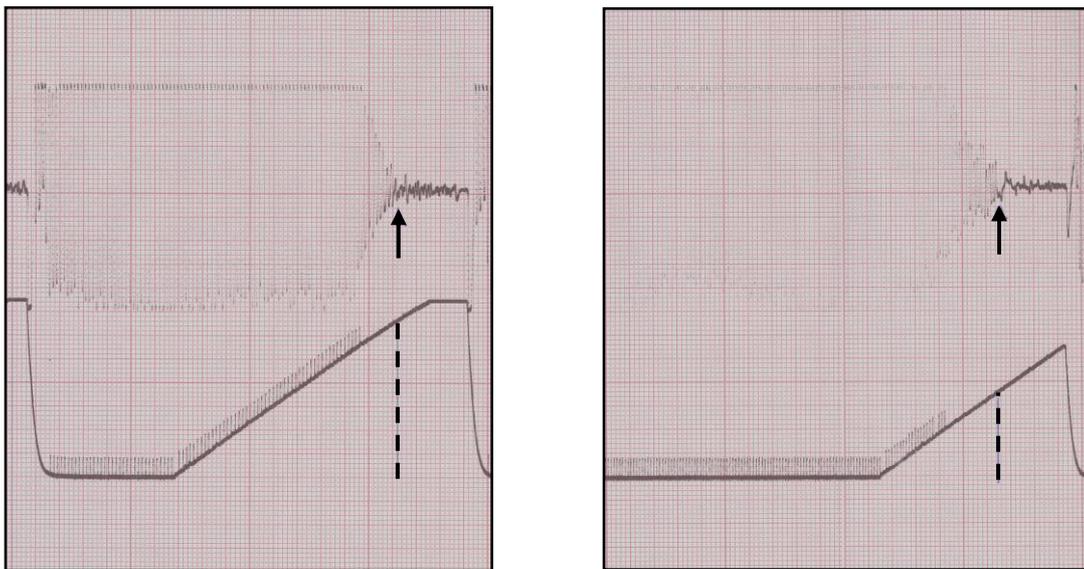


Abb. 2-2: Exemplarische Auswertung des Blutdrucks je einer Ratte aus der Gruppe KON_A (links) und TEL (rechts). Die Lothöhe (gestrichelte Linie) wurde bei nahezu vollständig unterdrückter Druckamplitude (Pfeil) ermittelt.

2.5.2 Orale Glukose-Toleranz-Test

Der OGTT wurde bereits in früheren Studien zur Charakterisierung des Glukosestoffwechsels in Ratten angewandt (Müller et al. 2007, Miesel et al. 2010, Miesel et al. 2012, Müller-Fielitz and Raasch 2012). Die Ratten wurden 24 Stunden zuvor nüchtern gesetzt und konnten sich 30 Minuten lang an den Versuchsraum gewöhnen, in dem der OGTT von 12-18 Uhr durchgeführt wurde. Alle Blutentnahmen erfolgten durch einen Schnitt am Schwanz (siehe 2.4.1) und dienten der Glukose- und Insulinbestimmung. Mittels Schlundsonde wurde $1\text{g/kg}_{\text{Körpergewicht}}$ Glukose (50%-ige Glukose-Lösung) appliziert und das Trinkwasser entzogen (Minute 0).

Vor Glukosegabe und nach 10, 20, 30, 60, 90, 120, 240 und 360 Minuten erfolgten die Blutentnahmen (200 μ l). Die Plasmaglukose wurde mit Hilfe des Glucometers Elite (Bayer HealthCare; Teststreifen: Ascensia Elite Sensor, Bayer HealthCare) bestimmt.

2.5.3 Insulin-Toleranz-Test (ITT)

Auch der ITT kam bereits zur Insulinsensitivitätstestung zur Anwendung (Miesel et al. 2010, Miesel et al. 2012, Müller-Fielitz et al. 2012a) und unterschied sich in den Rahmenbedingungen nicht vom OGTT (siehe 2.5.2). Nach einer basalen Blutentnahme wurden 0,6 IE/kg_{Körpergewicht} Insulin (Insuman Rapid, Aventis Pharma Deutschland GmbH) im Bereich der linken Hüfte (Minute 0) subkutan injiziert. Nach basaler Blutentnahme und Insulinapplikation erfolgten die weiteren Blutentnahmen (jeweils ein Tropfen Blut) zur Bestimmung der Plasmakonzentration in den Minuten 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 60, 90, 120, 180, 240, 360 und 420. Nach 24 Minuten wurde zusätzlich eine Mikrovette Blut zur Überprüfung der Insulin-Plasmakonzentration entnommen.

2.5.4 Leptinresistenz-Test

Der LRT wurde mit Hilfe des Phenomaster-Kalorimetrie-Systems (siehe 2.5.5) durchgeführt, um eine lückenlose Dokumentation der Nahrungsaufnahme während des Versuchs zu gewährleisten. Die subkutanen Leptinapplikationen wurden am ersten Tag um 8:00, 11:00, 14:00, 17:00 und 20:00 Uhr sowie am zweiten Tag um 8:00, 11:00 und 14:00 Uhr vorgenommen. Danach folgte ein 24-stündiger Beobachtungszeitraum. Grundsätzlich wurde bei allen Tieren mit Ausnahme der letzten Gabe (200 μ g/kg_{Körpergewicht}) eine Leptinkonzentration von 100 μ g/kg_{Körpergewicht} verwendet. Im gleichen Zug wurden Körpergewichtsmessungen und Blutentnahmen über den Schwanz durchgeführt, um die Plasmaleptinkonzentration zu bestimmen, wobei diese am zweiten Tag einmal um 8:00 Uhr erfolgte. Das beschriebene Versuchsprotokoll zur Leptinresistenz-Testung wurde bereits in einer Vorgängerstudie angewendet (Lau 2012, Müller-Fielitz et al. 2012).

Leptin (rekombinantes Rattenleptin; R&D Systems, Minneapolis, MN USA) wurde mit steril gefiltertem Tris-HCl-Puffer (20mM) auf die beschriebenen Dosierungen verdünnt und in den benötigten Tagesmengen (je 100µg/ml und 200µg/ml) bei -80°C gelagert. Vor jedem Versuchstag wurden diese in Eiswasser aufgetaut und zwischen den Applikationen bei 4°C zwischengelagert.

2.5.5 Indirekte Kalorimetrie

Die indirekte Kalorimetrie ist eine Methode zur Messung des Energieumsatzes. Hierfür verbleibt ein einzelnes Tier in seinem Messkäfig („homecage“). Die Sauerstoff- (O_2) und Kohlenstoffdioxidkonzentration (CO_2) in der eingeleiteten sowie ausströmenden Luft werden mittels in den Käfigdeckel eingebrachten Sensoren gemessen. Mit der Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs lässt sich ein mittelbares indirektes Maß für den Energieverbrauch ermitteln. Zusätzlich können anhand der respiratorischen Gasaustauschrate (RER; Quotient aus ausgeatmeten Kohlenstoffdioxid und eingeatmeten Sauerstoff), die weitestgehend dem respiratorischen Quotienten (RQ; Quotient aus produziertem Kohlenstoffdioxid und verbrauchtem Sauerstoff) auf Zellebene entspricht, Rückschlüsse auf die verstoffwechsellten Substrate gezogen werden: RQ Kohlenhydrate = 1, RQ Proteine = 0,8, RQ Fett = 0,7 (Schutz 1995).

Die indirekte Kalorimetrie wurde mit einem Phenomaster-System (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt, welches aus sechs Einzelkäfigen bestand. Ein identischer leerer Kontrollkäfig maß die im Versuchsaufbau herrschenden unbeeinflussten Gaskonzentrationen mit denen Sauerstoffverbrauch und Kohlenstoffdioxidproduktion berechnet werden konnten. Der eingeleitete Luftfluss (Sample Flow) betrug 250ml/min pro Käfig mit einer Sauerstoffkonzentration von $20,81 \pm 0,03$ % und einer Kohlenstoffdioxidkonzentration von $0,050 \pm 0,006$ %. Das System führte über den gesamten Versuch sequentielle dreiminütige Messungen der CO_2 - und O_2 -Konzentration durch. Daraus resultierte eine Gaskonzentrationsmessung jedes Käfigs (inkl. Kontrollkäfig) alle 21 Minuten. Über Federkraftmesser konnte parallel zu den O_2 - und CO_2 -Messungen der Verbrauch von Wasser, Haltungs- und Cafeteria-Diät bestimmt werden. Weiter wurde jegliche Art von Bewegung mittels Infrarotsensoren registriert sowie die Käfigtemperatur ge-

messen. Das gesamte System war in einem gesonderten Versuchsraum untergebracht. Die Tiere wurden in ihre Respirationskäfige überführt und 72 Stunden durchgängig überwacht, wobei die ersten 24 Stunden zur Gewöhnung von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Die tägliche Schlundung sowie das Auffüllen von Wasser und Nahrung wurden außerhalb der Gaskonzentrationsmessung durchgeführt, um jene möglichst wenig zu beeinflussen.

2.5.6 Magnetresonanztomographie

Zur Fettquantifizierung wurden Magnetresonanztomographien (MRT) durchgeführt (Philips Achieva; 1,5 Tesla, 8-Kanal Kniespule, transverse T1-gewichtete turbo spin-echo Sequenz; Bildaufnahme vom Diaphragma bis unterer Beckenboden, Schichtdicke 2mm, Bildgröße 320x320 px). Um Bewegungsartefakte zu minimieren, wurden die Tiere mit intraperitoneal appliziertem Pentobarbital sediert, anschließend Körperlänge und Hüftumfang gemessen und schließlich in Einzelkäfigen zum MRT transportiert. Das Pentobarbital wurde gewichtsadaptiert ($53,33 \text{ mg} / \text{kg}_{\text{Körpergewicht}}$) verabreicht, wobei $18,66 \text{ mg}$ (350 g Körpergewicht) nicht überschritten wurden. Jede Untersuchung nahm 15 Minuten in Anspruch, wonach die Ratten unter kontrollierten Bedingungen innerhalb weniger Stunden wieder ihr volles Bewusstsein erlangten. Dieses Procedere wurde bereits in vorangegangenen Studien erfolgreich durchgeführt (Miesel et al. 2010, Müller-Fielitz et al. 2011, Miesel et al. 2012).

Zur Quantifizierung des subkutanen und viszeralen Fettvolumens wurden die akquirierten DICOM-Einzelschichtbilder (60 pro Ratte) anhand eines MRT-Bildbetrachtungsprogramms (MRIcro Version 1.4 build 1) in eine einzige Bilddatei im HDR-Format überführt. Anschließend konnte die HDR-Datei durch ein spezielles Programm (vitom for windows) geöffnet werden. Dieses erlaubte die additive Markierung von Pixeln in einem Grauwertebereich innerhalb mehrerer Schichtbilder und errechnete anhand des Bildabstands das entsprechende Volumen. Die Markierung von in T1-gewichteten Sequenzen entsprechend hell dargestellten Fettdepots erfolgte vom Diaphragma bis zum Beckenboden auf Höhe der Hüftgelenke. Unter viszeralem Fettgewebe subsumierten sich alle Depots innerhalb der Bauchhöhle unterhalb der Bauchwandmuskulatur. Diese waren besonders in den Nie-

renlagern sowie im Bereich von Dick- und Dünndarm ausgeprägt. Subkutanes Fettgewebe fand sich vor allem im Bereich des Bauchs und oberhalb der Hüften (siehe Abb. 3-4D-H).

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Radioimmunoassay (RIA)

Radioimmunoassays beruhen auf der Antigen-Antikörper-Reaktion und können spezifisch kleinste Mengen Antigen nachweisen. Es konkurriert ein mengenmäßig bekanntes radioaktiv markiertes Antigen mit dem endogenen unmarkierten Antigen um in der Anzahl begrenzter spezifischer Antikörper. Je mehr unmarkiertes Antigen vorhanden ist, desto weniger binden die Antikörper an das radioaktiv markierte Antigen, sofern beide Antigene eine ähnliche Immunreaktivität aufweisen. Beide Antigene werden anschließend mit Hilfe der Doppel-Antikörper-Methode getrennt, bei der durch einen weiteren Antikörper Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplexe entstehen, die durch Zentrifugieren abgetrennt werden können. Der Überstand wurde mittels Membranpumpe (Eppendorf 4151) abgesaugt und die Radioaktivität des entstandenen Pellets anhand eines Gammacounters (1282 Compugamma CS, LKB, Wallac) gemessen. Die vorhandene Strahlung der verbliebenen radioaktiv markierten Antigene verhält sich umgekehrt proportional zum nachgewiesenen Antigen (indirekte Nachweismethode) und ließ sich mit Hilfe von Standardkurven berechnen.

Für die Bestimmung von Adiponektin, AngII, Glukagon, Insulin und Leptin wurden kommerziell erhältliche Kits (siehe Anlage) bezogen und nach deren Gebrauchsanweisung verwendet.

2.6.2 Präparation des Hypothalamus

Der isolierende Zuschnitt des Hypothalamus erfolgte nach der Methode von Palkovits und Brownstein (Palkovits and Brownstein 1988). Zunächst wurde das bei -80°C gelagerte Gehirn für 30 Minuten im -12°C kalten Gefriermikrotom (Leicam, CM) belassen, um eine schnittfähige Konsistenz zu erhalten. Anschließend wurde in fester Schnittrihenfolge mittels anatomischer Pinzette und speziellem Skalpell (Microtome blade) der Hypothalamus präpariert: Zunächst erfolgten Koronarschnitte rostral des Chiasma opticum und den Corpora mamillaria. Danach trennten beidseitige Sagitalschnitte das laterale Gewebe inklusive der Amygdala ab. Schließlich entfernte ein Transversalschnitt bis unter die Commissura anterior das restliche Hirngewebe vom Hypothalamus, der anschließend bei -80°C gelagert wurde.

2.6.3 mRNA-Extraktion aus dem Hypothalamus

Der Hypothalamus wurde als Ganzes unter Hinzunahme einer gleichmäßigen Mischung (1ml) aus PBS-Puffer (pH = 7,4) und Lysispuffer (Nucleic Acid Purification Lysis Solution, Applied Biosystems, UK) eine Minute lang mit einem Ultra-Turax (Ultraturax 78, Staufen) homogenisiert. Nun wurden 500 µl des entstandenen Homogenats nach einem standardisierten Schema für die mRNA-Extraktion verwendet, die mit Hilfe der ABI PRISAM 7000 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems) durchgeführt wurde. Das restliche Volumen wurde bei -80°C gelagert.

2.6.4 mRNA-Messung mit RiboGreen

Die extrahierte mRNA wurde mit dem Quant-iT-RiboGreen-RNA-Assay-Kit gemessen. Diese Methode basiert auf dem Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen, der nach spezifischer Bindung an Nukleinsäuren um ein Vielfaches heller leuchtet als ungebunden (Jones et al. 1998). Um Verfälschungen durch Bindung an DNA zu verhindern, beinhaltete das befolgte Herstellerprotokoll die Zugabe von DNAsen. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Fluometric-imaging-plate-readers (FLUOstar OPTIMA Basisgerät 2003-8143, BMG LABTECH) in einer 96-Well-Platte bei einer Anregungswellenlänge von 480nm und einer Emissionswellenlänge von 520nm,

wobei die gemessenen Werte durch Subtraktion der jeweiligen Leerwerte korrigiert wurden. Es wurde eine Eichkurve aus fünf Punkten zwischen Konzentrationen von 1 ng/ml und 50 ng/ml gebildet und die Proben soweit verdünnt, dass sie innerhalb dieser Standardkurve lagen und entsprechend ausgewertet werden konnten.

2.6.5 cDNA-Synthese

Um spezifische mRNA-Sequenzen genau zu quantifizieren, wurde sie zunächst in cDNA transformiert und anschließend die quantitative real-time PCR (qPCR) angewendet. Hierfür bildete zuerst eine virale RNA-abhängige DNA-Polymerase (Avian-Myeloblastosis-Virus-Reverse-Transkriptase) mittels unspezifischer Oligo-(dT)-Primer einen komplementären cDNA-Strang, der an die entsprechende mRNA-Sequenz hybridisiert war. Im weiteren Verlauf baute das Enzym RNase H die RNA-Stränge ab, damit DNA-abhängige DNA-Polymerasen den bestehenden DNA-Strang zu einer doppelsträngigen cDNA komplettierten. Die Herstellung der cDNA erfolgte nach Anleitung eines kommerziell erhältlichen cDNA-Synthese-Kits (Cloned AMV First-Strand Kit, Invitrogen, Karlsruhe) in einem Thermozykler (Tgradient, Biometra GmbH, Göttingen). Die hergestellte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.6.6 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die von Higuchi et al. entwickelte Methode basiert auf der Polymerase-Kettenreaktion und ermöglicht eine Quantifizierung der cDNA und indirekt der aufbereiteten mRNA (Higuchi et al. 1993). In der Weiterentwicklung bindet hierbei ein neuerer Fluoreszenzfarbstoff (SYBR GREEN I) an die sich in Zyklen vermehrende doppelsträngige DNA (dsDNA), dessen Intensitätszunahme von einer CCD-Kamera aufgezeichnet wird (Vitzthum et al. 1999). Zur Auswertung wird eine Standardreihe mitgeführt, die aus einem PCR-Produkt mit bekannter Kopienzahl besteht und die gleichen Primer (Tab. 2-3) benutzt. Der Zyklus, in dem ein definierter Fluoreszenzschwellenwert überschritten wird, der die exponentielle Amplifikationsphase der DNA detektiert, wird als Schwellenwertzyklus (Cycle Threshold, C_T) bezeichnet. Anhand der C_T -Werte und der bekannten Kopienzahlen der Stan-

standard-Reihen sowie der C_T -Werte der Probenreihen lassen sich unter Beachtung der zugrundeliegenden exponentiellen DNA-Amplifikation die absoluten Ausgangskopien ermitteln.

Die Bestimmung von AgRP, CART, CRF, MCH, NPY und POMC erfolgte mittels ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) und eines kommerziell erhältlichen Kits („Platinum SYBR GREEN I qPCR Super-Mix-UDG with ROX“, Invitrogen) unter Einhaltung der vorgeschriebenen Temperaturprotokolle. Die Fluoreszenzmessung des SYBR GREEN I wurde bei einer Wellenlänge von 520nm durchgeführt. Zum im Kit vorliegenden „Supermix“ mussten nur noch DEPC-Wasser und die jeweiligen Primer hinzugefügt werden:

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

Diese Mischung wurde bis zum weiteren Gebrauch unter Lichtschutz in Eis aufbewahrt. Auf einer 96-Well-Platte wurden jeweils 23µl Supermix mit 2µl cDNA-Probe bzw. 2µl des jeweiligen Standards zusammengebracht. Aufgrund der grundlegenden Bedeutung der Standardreihe für die cDNA-Messung, wurde diese in fünf Konzentrationsstufen (je 10^7 - 10^3 Kopien) in Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Überprüfung der Probenreinheit wurde nach 40 Zyklen eine Schmelzkurvenanalyse jedes PCR-Produkts vorgenommen. Die Primersequenzen wurden über das Programm „Primerexpress“ bestimmt und entsprechend kommerziell bezogen. Weiterhin wurden die Primer in Vorversuchen mittels Gelelektrophorese optimiert und das PCR-Produkt des besten Testergebnisses als jeweiliger PCR-Standard verwendet.

Tab. 2-3: Nukleotidsequenzen der eingesetzten Primer; Bezug von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland).

Primer	Ausrichtung	Sequenz
AgRP	Sense	5'-GCA-GAC-CGA-GCA-GAA-GAT-GT-3'
	Antisense	5'-CTT-GAA-GAA-GCG-GCA-GTA-GC-3'
CART	Sense	5'-ACT-GTC-CCC-GAG-GAA-CTT-CT-3'
	Antisense	5'-ATT-TTG-AAG-CAG-CAG-GGA-AA-3'
CRF	Sense	5'-AAA-GGG-GAA-AGG-CAA-AGA-AA-3'
	Antisense	5'-GTT-TAG-GGG-CGC-TCT-CTT-CT-3'
MCH	Sense	5'-CAT-TTT-ACT-TTC-GGC-CTC-CA-3'
	Antisense	5'-TGG-AGC-CTG-TGT-TCT-TTG-TG-3'
NPY	Sense	5'-TAA-CAA-ACG-AAT-GGG-GCT-GT-3'
	Antisense	5'-TGT-CTC-AGG-GCT-GGA-TCT-CT-3'
POMC	Sense	5'-GAA-GGT-GTA-CCC-CAA-TGT-CG-3'
	Antisense	5'-CTT-CTC-GGA-GGT-CAT-GAA-GC-3'
PPO	Sense	5'-GCC-GTC-TCT-AGG-AAC-TGT-TG-3'
	Antisense	5'-CGA-GGA-GAG-GGG-AAA-GTT-AG-3'

2.6.7 Probenaufbereitung für Western Blot

Unter Stickstoffkühlung wurde das braune Fettgewebe pulverisiert, gewogen und in Reagiergefäße überführt. Hinzufügen von Zell-Lyse-Puffer (CLB; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) in einem entsprechenden Verhältnis (1ml CLB auf 200 mg Gewebe) führte zur Zellauflösung, während das im Puffer bereits vorhandene Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; 1%) freiwerdende Proteasen inhibierte. Anschließend wurde das Gemisch mittels Ultraturax (Ultraturax 78, Staufen) eine Minute lang homogenisiert und mit 14000 U/min bei 4°C fünf Minuten lang zentrifugiert. Bei der entstandenen Dreischichtung aus Pellet, hydrophiler und lipophiler Phase wurde die mittlere Phase entnommen und für folgendes Prozedere zweigeteilt: Ermittlung des tatsächlichen Proteingehalts nach LOWRY (Abschnitt 2.6.8) und Proteinanalyse mittels Western Blot (Abschnitt 2.6.9). Für Letzteres wurden die Proben mit vierfach konzentriertem Lithiumdodecylsulfat (LDS)

versetzt und zwecks Proteindenaturierung zehn Minuten lang bei 70°C inkubiert. Nach erfolgter Proteinquantifizierung konnten diese Proben unter Verwendung von unkonzentriertem LDS-PAGE-Puffer auf 2 µg/µl Protein je Probe verdünnt werden.

2.6.8 Proteinbestimmung nach LOWRY

Die Methode basiert auf einer Komplexbildung zwischen Peptidbindungen und Kupferionen, welche über Zwischenreaktionen in der photometrischen Bestimmung von Molybdänblau endet, dessen Intensität sich proportional zur Proteinmenge verhält (Lowry et al. 1951). Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine Standardreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt, welches mit Hilfe von Natriumchlorid zu Konzentrationen von 20 µg/ml bis 200 µg/ml verdünnt wurde. Je 200 µl einer Probe bzw. eines Standards wurde mit 800µl LOWRY-Mix versetzt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde je 100µl Folin-Reagenz hinzugefügt und 30 Minuten gewartet bevor die photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 750 nm angeschlossen wurde. Aus den Extinktionen der Standardreihe ließ sich eine Eichkurve bilden, mit Hilfe derer der Proteingehalt in den Proben quantifiziert werden konnte.

2.6.9 Proteinanalyse mittels Western Blot

Dieses Verfahren beruht auf Southern, den Erfinder der Blotting-Technik, der erstmals DNA auftrennte (Southern 1975), und beinhaltet die Übertragung von Proteinen auf eine Membran sowie deren Nachweis mittels Immundetektion. Letzteres geschieht durch spezifische Bindung von Primärantikörpern an die gesuchten Proteine. Sekundärantikörper bilden Konjugate mit den Primärantikörpern und erlauben anhand ihrer gekoppelten Enzyme oder radioaktiven Substanzen quantitative Messungen. Zuvor werden die Proteine mittels Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (LDS-PAGE) der Größe nach getrennt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die zuvor denaturierten (Abschnitt 2.6.7) negativ geladenen Proteine durch ein Polyacrylamid-Gel, welches als Sieb fungiert: Je kleiner ein Protein, desto weiter wandert es. Ein weiterentwickeltes Verfahren verwendet zwecks besserer Proteintrennung Gradientengele mit an-

steigenden Acrylamidanteilen. Durch Anlegen einer senkrecht zum Polyacrylamid-Gel stehenden Spannung werden die Proteine auf eine Membran (Polyvinylidenfluorid) gezogen und verbleiben dort aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen („Blotting“). Das elektrophoretische Muster bleibt bestehen und die aufgetrennten Proteine können nun mit Hilfe der Immundetektion nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Elektrophorese wurde zwei Stunden lang bei einer konstanten Spannung von 200V durchgeführt. Das Gradientengel hatte einen Acrylamidanteil von vier bis zwölf Prozent. Den Proben wurde Dithiothreitol (0,5 M) im Verhältnis 1:10 hinzugefügt, um die Proteine zu stabilisieren bzw. vor Oxidation zu schützen. Von jeder Probe wurden 10µl auf das Sammelgel aufgetragen und gleichzeitig ein Proteinstandard als Größenmarker mitgeführt. Die Polyvinylidenfluorid-Membran wurde 30 Sekunden in Methanol eingelegt, danach mit Aqua bidest gespült und anschließend in MES-Puffer äquilibriert. Das „Blotting“ erfolgte über zwei Stunden bei einer Spannung von 30V in einer Blotkammer nach dem TankBlot-System. Vor der Immundetektion wurden die Membranen zwecks Aufsättigung unspezifischer Bindungsstellen zwei Stunden lang mit 5%igem Milchpuffer behandelt. Danach wurden die Membranen bei 4°C über Nacht luftdicht in Milchpufferlösung inkubiert, die Primärantikörper gegen Thermogenin (UCP-1) im Verhältnis 1:250 enthielt. Am Folgetag entfernte eine viermal zehnmündige Spülung mit PBS-Tween-Puffer überschüssige und unspezifisch gebundene Primärantikörper. Im Anschluss wurden die Membranen luftdicht für 90 Minuten mit einem Sekundärantikörper inkubiert und abermals gewaschen (siehe oben). Nun wurde Detektionsmittel (SuperSignal West Femto, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) in einer mit destilliertem Wasser verdünnten Lösung von 1:5 auf die Membranen verbracht. Dieses diente als Substrat für die an den Sekundärantikörpern gekoppelte Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP). Durch die Chemolumineszenzreaktion konnte die Helligkeit der verschiedenen Banden mittels CCD-Kamera aufgenommen und durch entsprechende Software quantifiziert werden (Chemi Doc System; Quantity One Software, Biorad, München). Um den Proteingehalt der Membranen vergleichen zu können, wurde ein erneuter Western Blot derselben durchgeführt. Hierfür entfernte das Agens Re-Blot Plus Mild (Millipore) die gebundenen Antikörper und es folgte ein Nachweis von β -Aktin, ein konstant exprimiertes Zellsubstrat.

2.7 Statistische Methoden

In den folgenden Abbildungen und Tabellen sind Mittelwerte (MW) und deren Standardfehler (SEM) verwendet worden. Anhand des Grubb's Tests (www.graphpad.com) wurden Werte außerhalb der vierten Standardabweichung identifiziert und von der Auswertung ausgeschlossen.

Die in der Vorstudie erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels nonlinearer Regression erstellt und in eine logarithmische (log) Dosis-Skala überführt. In Abschnitt 3.2.1 wurden systolischer Blutdruck und linksventrikuläres Gewicht miteinander korreliert. Die eingezeichnete Korrelationsgerade wurde anhand linearer Regression erstellt und beinhaltet die Werte aller Gruppen. Der lineare Zusammenhang beider Variablen wurde mit Pearson's r quantifiziert. Die im Anhang dargestellten Korrelationen bezüglich Adiponektin beinhalten Graphen, die auf nonlinearer Regression beruhen. Hier wurde KON_S nicht in die Berechnung von r einbezogen. Der HOMA-Index errechnete sich aus nüchternen Plasmawerten von Glukose und Insulin anhand folgender Formel: $\text{Insulin } (\mu\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}) \times \text{Glukose } (\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}) / 405$. In den Glukosestoffwechsel-Tests sowie im LRT wurde die Fläche unterhalb der Kurve (AUC) sowie die Maximalkonzentration (C_{max}) aus den Delta-Werten ermittelt. Im ITT wurde die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) von Glukose jedes einzelnen Tieres ermittelt: Durch logarithmische (ln) Transformation der Glukosekonzentrationen zwischen 6 und 42 min nach Insulinapplikation ließ sich die Steigung der ermittelten Geraden durch lineare Regression errechnen, was nachfolgend die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante (kel) darstellt: $T_{1/2} = \ln(2) / \text{kel}$.

Die statistische Signifikanz wurde beim Vergleich von zwei Gruppen durch den abhängigen T-Test ermittelt. Bei mehr als zwei Gruppen wurde diese erst durch ein- (Behandlung) oder zweifaktorielle (Behandlung über die Zeit) ANOVA-Tests und anschließend mittels „Dunnett's multiple comparison test“ bzw. „Bonferroni's post test“ genauer analysiert. Bei nicht gegebener Normalverteilung wurde mittels Wilcoxon Rangsummen Test getestet. Als statistisch signifikant wurden Werte angenommen, bei der die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ verworfen werden konnte (Signifikanzniveau: $p \leq 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Dosisfindungsstudie

Zur Vergleichbarkeit der eingesetzten Medikamente wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Telmisartan (TEL) senkte den systolischen Blutdruck von durchschnittlich 190 mmHg auf 114 mmHg, die Kombination aus Telmisartan und Amlodipin (T+A) von 185 mmHg auf minimal 109 mmHg. Die Amlodipin-Monotherapie (AML) führte zu einer sukzessiven Senkung auf minimal 130 mmHg (Abb. 3-1). Mittels nicht linearer Kurvenanpassung wurde durch Extrapolation eine equieffektive Blutdrucksenkung für folgende Dosierungen berechnet: 8 mg/kg_{Körpergewicht} TEL, 10 mg/kg_{Körpergewicht} AML, 2 + 8 mg/kg_{Körpergewicht} T+A.

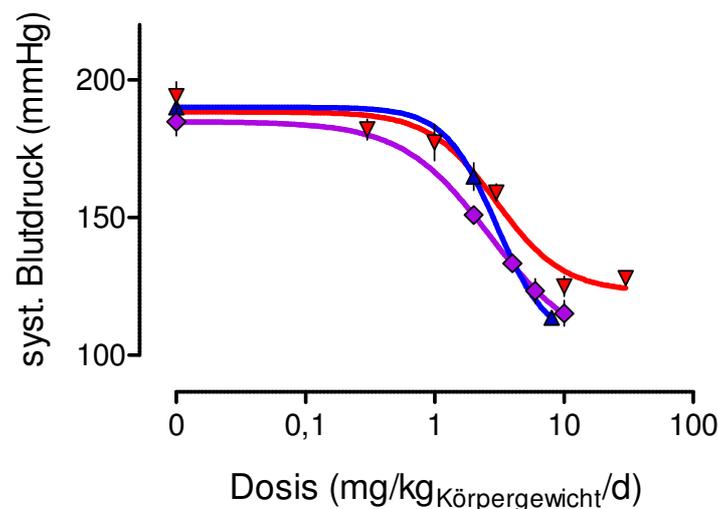


Abb. 3-1: Dosis-Wirkungs-Kurven nach antihypertensiver Behandlung mit Telmisartan, Amlodipin und deren Kombination. Jede Dosierung wurde eine Woche lang verabreicht und anschließend der systolische Blutdruck ermittelt; $MW \pm SEM$, $n=6$; ▲: TEL; ▼: AML; ◆: T+A.

3.2 Hauptstudie

3.2.1 Blutdruck, Herzfrequenz und linksventrikulärer Index

Vor Behandlungsbeginn wiesen alle Gruppen einen systolischen Blutdruck von etwa 200mmHg auf (Abb. 3-2A). In den Kontrollgruppen blieb der Blutdruck über die 15-wöchige Behandlungszeit hinweg konstant. Die Behandlung mit TEL und der Kombination T+A führte zu nahezu identischen Blutdruckabfällen auf normotensive Werte und blieb konstant (-82 ± 4 bzw. -85 ± 5 vs. -83 ± 4 bzw. -84 ± 6 mmHg). Die Blutdruckreduktion unter AML zeigte nach drei Wochen ebenfalls vergleichbare Werte zu TEL und T+A (-76 ± 4 mmHg), fiel nach 15 Wochen jedoch signifikant schwächer aus (-64 ± 5 mmHg; Abb. 3-2A).

Die Herzfrequenz (HF) blieb in der schlanken Kontrollgruppe stets am niedrigsten, wobei analog zu den übrigen Gruppen ein Anstieg über die Zeit zu beobachten war. In den drei Behandlungsgruppen kam es nach Therapiebeginn zu einer Tachykardie, die zumindest bei TEL und deutlicher bei AML zurückging (Abb. 3-2B). Eine mögliche Ursache stellt hierbei die physiologische Reaktion auf die drastische Blutdrucksenkung dar.

Der linksventrikuläre Index (LVI) ist der Quotient aus linksventrikulärem Gewicht (LVG) und Femurlänge, wodurch der individuelle Größenunterschied bei der Linksherzbeschreibung berücksichtigt wird. Im Vergleich zu den schlanken war der LVI der adipösen Kontrollen erhöht. Unter TEL war der LVI am niedrigsten und unterschied sich auch signifikant von dem der Kombination T+A, während die LVI-Reduktion unter AML schwächer ausgeprägt war (Abb. 3-2C). Die Femurlängen der Gruppen waren miteinander vergleichbar, einzig bei der schlanken Kontrollgruppe leicht vermindert (Tab. 3-1). Die Korrelation zwischen linksventrikulärem Gewicht und systolischem Blutdruck bestätigt einerseits den bereits bekannten Zusammenhang zwischen Blutdruck und ventrikulärer Hypertrophie. Andererseits zeigt sie aber auch, dass die Hypertrophieregression nicht nur blutdruckabhängig ist, da die hohe Telmisartan-Dosis einen stärkeren Effekt nach sich zog und die Hypertrophie der adipösen Kontrolltiere im Vergleich zu den schlanken Kontrollen gesteigert war. (Abb. 3-2D).

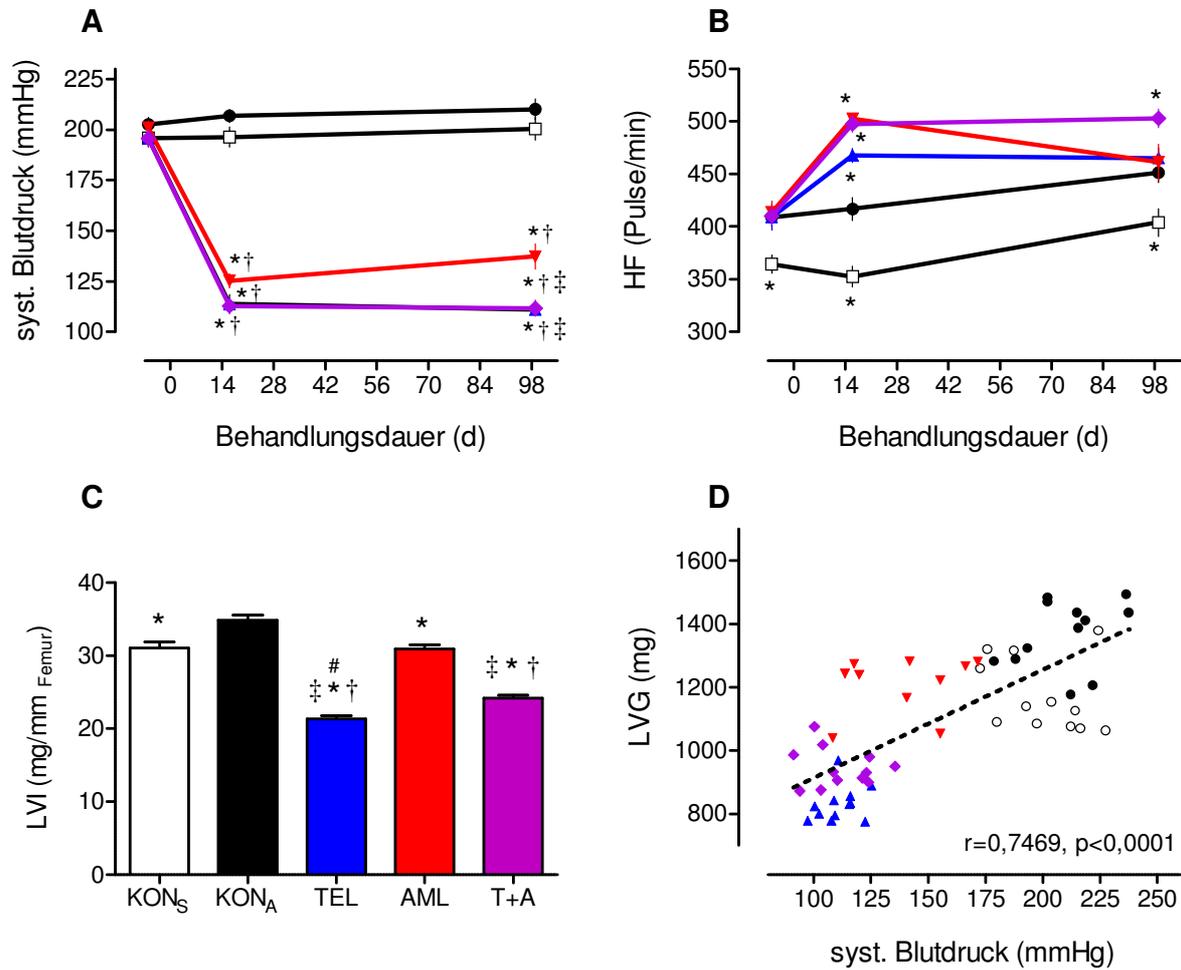


Abb. 3-2: Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz (HF) vor und während der Behandlung (A+B), linksventrikulärer Index (LVI) bei Studienende (C) und Korrelation zwischen linksventrikulärem Gewicht (LVG) und systolischem Blutdruck (D); $MW \pm SEM$, $n=10-12$, * $p<0,05$ vs. KON_A, † $p<0,05$ vs. KON_S, ‡ $p<0,05$ vs. AML, # $p<0,05$ vs. T+A; □ : KON_S, ● : KON_A, ▲ : TEL, ▼ : AML, ◆ : T+A.

3.2.2 AngII-Plasmakonzentrationen

Zwischen der schlanken und adipösen Kontrollgruppe bestand kein Unterschied in den AngII-Plasmakonzentrationen. Im Vergleich hierzu war AngII unter chronischer Applikation des AT₁-Rezeptorantagonisten Telmisartan um das 9- (Monotherapie) bzw. 7-fache (Kombinationstherapie) erhöht. Die Behandlung mit Amlodipin führte zu einer vergleichsweise schwächeren AngII-Erhöhung. (19 ± 3 pmol/l; Abb 3-3).

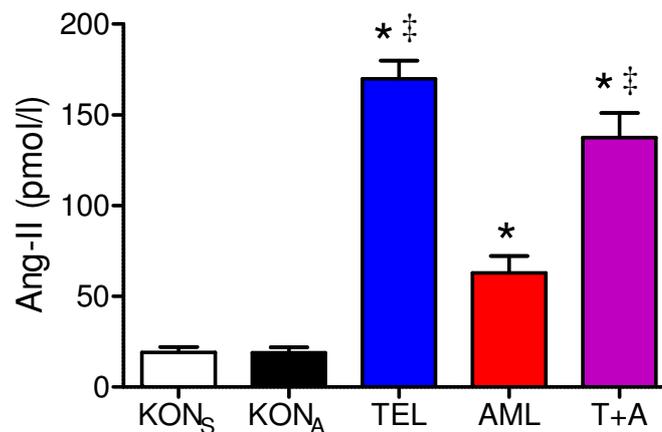


Abb. 3-3: AngII-Plasmaspiegel bei Studienende nach langfristiger Medikamentenapplikation; $MW \pm SEM$, $n=10-12$, * $p < 0,05$ vs. KON_A, ‡ $p < 0,05$ vs. AML.

3.2.3 Körpergewichtsentwicklung und Fettvolumen

Das Körpergewicht wurde vor Medikamenteneinsatz wöchentlich und während der Therapie täglich gemessen. Aus Übersichtsgründen wird das Körpergewicht über den gesamten Zeitverlauf der Studie wöchentlich dargestellt, wobei auf die Darstellung der letzten 3 Wochen verzichtet wurde, da es aufgrund der zahlreichen Funktionstests und den damit einhergehenden Fastenperioden zu versuchsbedingten Schwankungen kam (Abb. 3-4A). Bis zum Behandlungsbeginn entwickelte sich das Körpergewicht aller Therapiegruppen mit CD-Fütterung nahezu identisch und war zu Behandlungsbeginn (gestrichelte Linie, Tag 133) vergleichbar. Das Körpergewicht war hier im Vergleich zur schlanken Kontrollgruppe, die als einzige Gruppe lediglich Halterungsdiät erhielt, um ca. 20% erhöht. Zur Veranschaulichung der medikamentenbedingten Effekte wurde die Körpergewichtsdifferenz zwischen

Therapiebeginn und drei Wochen vor Therapieende berechnet (Abb. 3-4B): Bei AML und T+A entsprach die absolute Gewichtszunahme der übergewichtigen Kontrollgruppe (30 ± 4 vs. 26 ± 3 vs. 31 ± 4 g), was einer Erhöhung von ca. 7-8% entspricht. Die Telmisartan-behandelten Ratten zeigten mit ca. 2-3% einen geringeren Anstieg des Körpergewichts, der auf Niveau der schlanken Kontrollgruppe lag (10 ± 1 vs. 8 ± 5 g) Bei vier Tieren dieser Versuchsgruppe konnte sogar eine Gewichtsrückgang (1-19 g) beobachtet werden.

Mittels MRT konnte nicht nur die absolute Fettmasse quantifiziert, sondern auch zwischen subkutanem und viszeralem Fett differenziert werden. Analog zum Körpergewicht war die Fettmasse der schlanken Kontrolltiere deutlich gegenüber den anderen Gruppen vermindert. Die Behandlung mit Telmisartan führte zwar zu keiner signifikanten Reduktion der Gesamtfettmasse, im Vergleich zu KON_A jedoch ein um ca. 19% geringeres viszerales Fettvolumen (Abb. 3-4C). Die Effekte lassen sich anhand der exemplarischen MRT-Schichtaufnahmen gut nachvollziehen, bei der Fett in den T1-gewichteten Sequenzen entsprechend signalreich (hell) dargestellt wird (Abb. 3-4D-H). Die weiteren morphologischen Messungen wie BMI, Körperumfang, Körper- und Femurlänge zeigten ein analoges Bild: Die schlanke Kontrollgruppe wies durchweg die niedrigsten Werte auf, während die anderen Behandlungsgruppen vergleichbar waren. Lediglich Telmisartan-behandelte Tiere hatten gegenüber den übergewichtigen Kontrollen einen niedrigeren BMI bei vergleichbaren Längenparametern (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Body-Mass-Index (BMI; kg/m²), Körperumfang, Körperlänge und Femurlänge (mm) sowie viszerales und subkutanes Fett (cm)³ der einzelnen Behandlungsgruppen; MW±SEM, n=10-12, * p<0,05 vs. KON_A.

	KON _S	KON _A	TEL	AML	T+A
BMI	7,2 ± 0,1 *	8,4 ± 0,1	7,9 ± 0,1 *	8,1 ± 0,1	8,0 ± 0,1
Körperumfang	17,6 ± 0,1 *	18,7 ± 0,1	18,1 ± 0,2	18,6 ± 0,2	18,4 ± 0,3
Körperlänge	21,7 ± 0,2 *	22,3 ± 0,2	22,0 ± 0,1	22,2 ± 0,1	22,2 ± 0,1
Femurlänge	37,8 ± 0,4 *	39,2 ± 0,2	38,9 ± 0,3	39,1 ± 0,3	39,1 ± 0,2
Viszerales Fett	5,7 ± 0,7 *	23,7 ± 1,6	19,2 ± 2,1*	22,1 ± 2,2	23,6 ± 1,3
Subkutanes Fett	3,2 ± 0,3 *	7,8 ± 0,4	7,2 ± 0,7	7,3 ± 0,7	7,7 ± 0,5

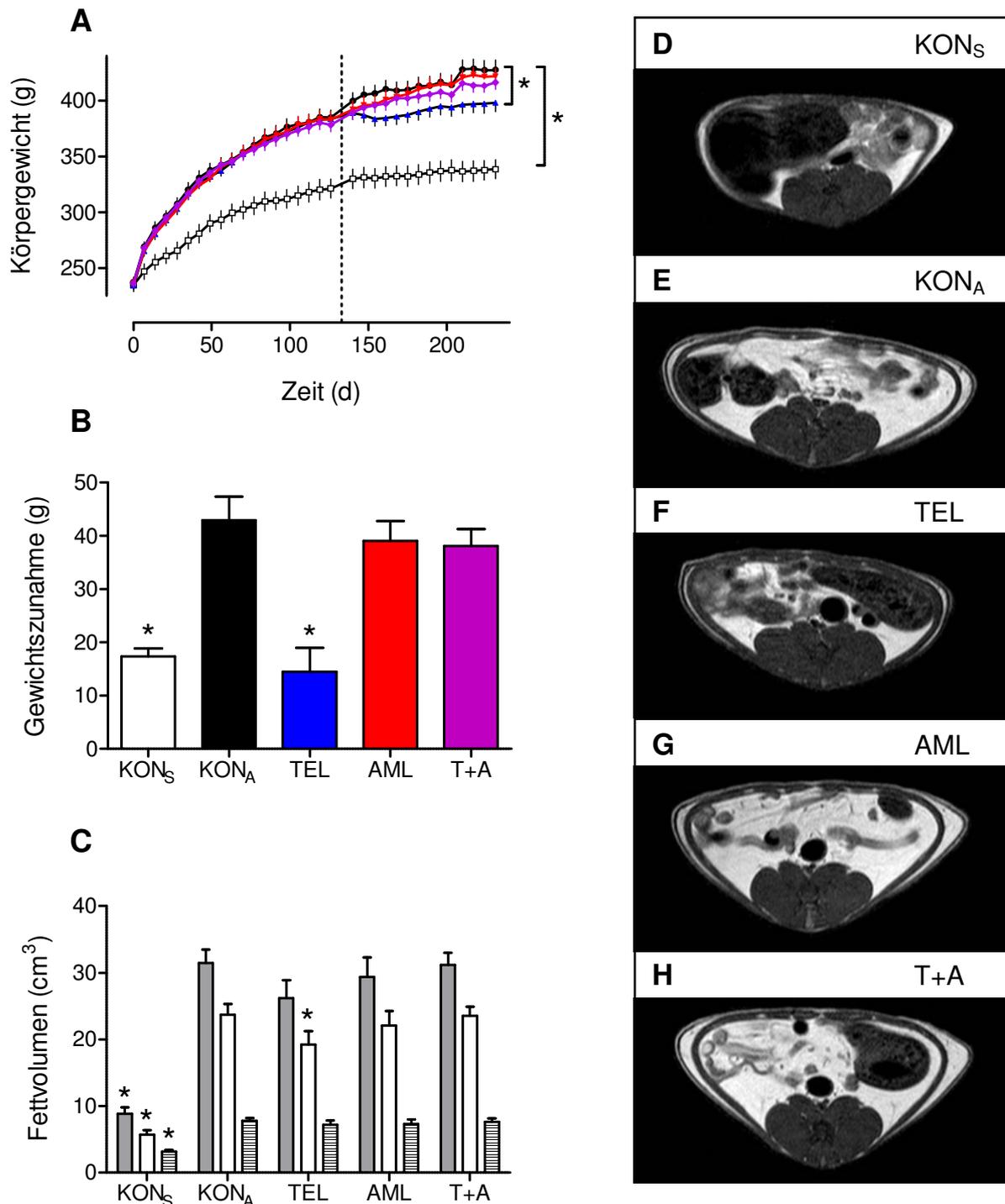


Abb. 3-4: Körpergewichtsentwicklung während der Studie (A), absolute Gewichtsänderung nach Therapiebeginn (B), via MRT ermitteltes Fettvolumen (C), abdominale MRT-Schichtbilder knapp unterhalb der Nieren (D-H); graue Balken: Gesamt-fett, helle Balken: viszerale Fettgewebe, gestrichelte Balken: subkutanes Fettgewebe; MW \pm SEM, n=11-12, * p<0,05 vs. KON_A; □ : KON_S , ● : KON_A , ▲ : TEL, ▼ : AML, ◆ : T+A.

3.2.4 Energie- und Wasseraufnahme

Die wöchentlich erfasste Energieaufnahme wurde auf das individuelle Körpergewicht bezogen und nahm bei allen Gruppen bis zum Behandlungsbeginn fortlaufend ab (Abb. 3-5A). Zusätzlich fällt auf, dass sich die Energieaufnahme über alle Gruppen mit dualer Diät vornehmlich aus der Cafeteria-Diät zu Ungunsten der Haltdiät rekrutierte (Abb. 3-5B). Mit Ausnahme der schlanken Kontrollgruppe, die keine hochkalorische Cafeteria-Diät erhielt und insgesamt ca. 23% weniger Energie aufnahm, wiesen alle Gruppen bis zur medikamentösen Intervention eine vergleichbare kumulative Energieaufnahme auf (Tab. 3-2). In der therapeutischen Phase kam es einzig unter Telmisartan zu einer Steigerung der Energieaufnahme, sodass die Gesamtenergieaufnahme während der Behandlung hier am Höchsten ausfiel (Abb. 3-5B).

Mit Ausnahme der schlanken Kontrollen war vor Behandlungsbeginn die körpergewichtsbezogene kumulative Wasseraufnahme zwischen den Gruppen vergleichbar (Abb. 3-5C). Unter Medikamentenapplikation erhöhte sich die Wasseraufnahme in allen Gruppen und war bei TEL am stärksten ausgeprägt, erreichte hier aber nicht das Niveau der schlanken Kontrollgruppe (Abb. 3-5D).

Tab. 3-2: Kumulative Energieaufnahme in $\text{kJ/g}_{\text{Körpergewicht}}$ und kumulative Wasseraufnahme in $\text{ml/g}_{\text{Körpergewicht}}$ vor und während der Behandlung sowie über die gesamte Studie bis Tag 203; $\text{MW} \pm \text{SEM}$, $n=10-12$, * $p < 0,05$ vs. KON_A .

	KON_S	KON_A	TEL	AML	T+A
Energieaufnahme (kJ/g_{KG})					
vor Behandlung	$115 \pm 3^*$	147 ± 3	152 ± 3	151 ± 3	147 ± 3
während Behandlung	$52 \pm 1^*$	65 ± 1	$73 \pm 2^*$	67 ± 1	67 ± 1
insgesamt	$168 \pm 4^*$	212 ± 4	226 ± 5	218 ± 4	214 ± 4
Wasseraufnahme (ml/g_{KG})					
vor Behandlung	$11,2 \pm 0,3^*$	$7,3 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,2$
während Behandlung	$5,0 \pm 0,2^*$	$2,9 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1^*$	$3,6 \pm 0,1^*$	$3,4 \pm 0,1^*$
insgesamt	$16,3 \pm 0,4^*$	$10,1 \pm 0,3$	$10,6 \pm 0,2$	$10,3 \pm 0,2$	$10,3 \pm 0,4$

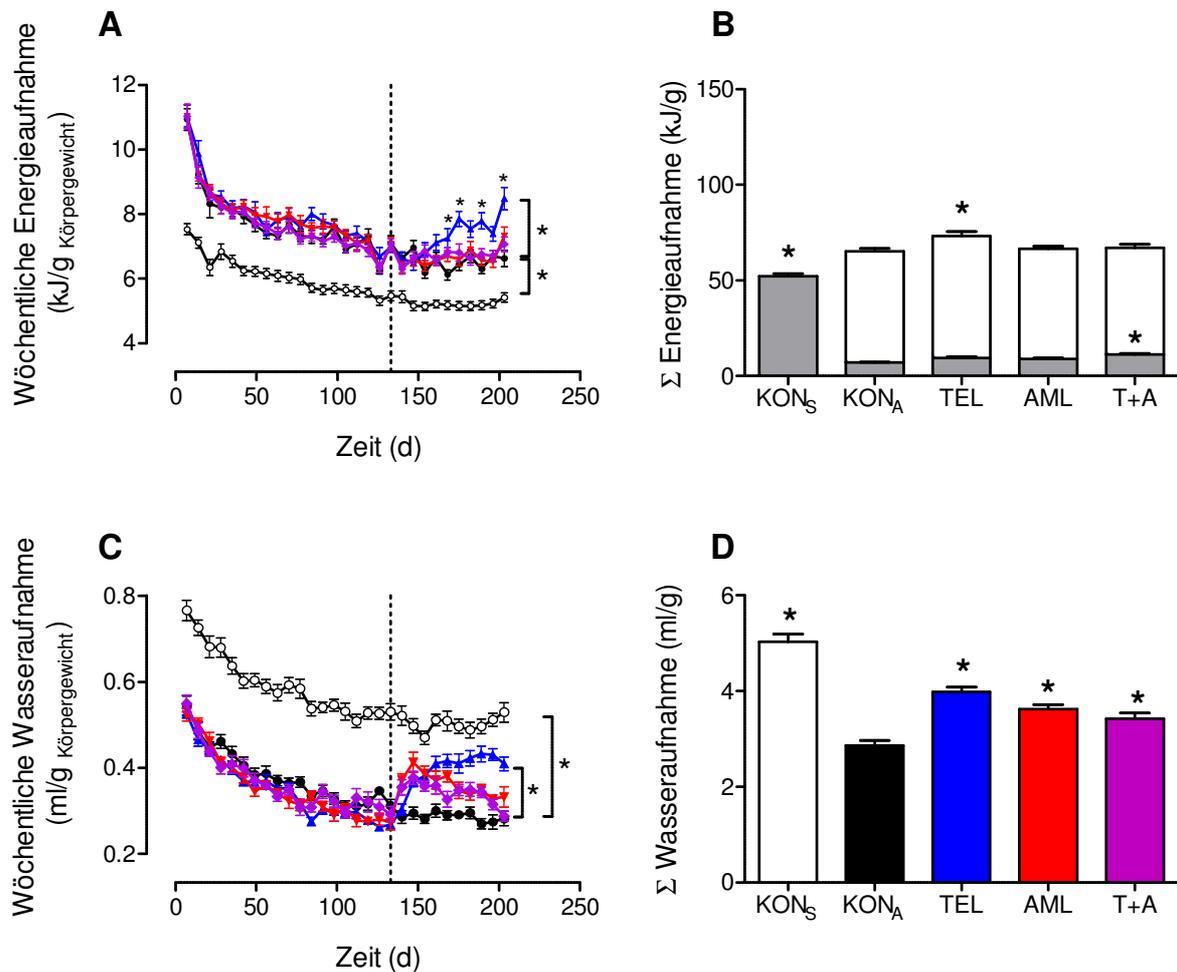


Abb. 3-5: Kumulative wöchentliche Energie- (A) und Wasseraufnahme (C) pro Körpergewicht über 203 Tage, gestrichelte Linie: Behandlungsbeginn (Tag 133); Gesamtenergie- (B) und Wasseraufnahme (D) während des Behandlungszeitraums bezogen auf das Körpergewicht; dunkle Balken: Haltungsdiät, helle Balken: Cafeteria-Diät, $MW \pm SEM$, $n=11-12$. * $p < 0,05$ vs. KON_A ; \square : KON_S , \bullet : KON_A , \blacktriangle : TEL, \blacktriangledown : AML, \blacklozenge : T+A.

3.2.5 Glukosestoffwechsel

Der Glukosestoffwechsel wurde anhand einfacher Glukose- und Insulinplasmakonzentrationen sowie mittels Funktionstests überprüft. Im Vergleich zur schlanken Kontrollgruppe hatten alle übrigen Gruppen höhere Glukose- und Insulinspiegel. Unter nüchternen Bedingungen war dieser Effekt bei TEL und T+A ebenfalls ausgeprägt. Der sich hieraus ergebende hohe HOMA-Index, den alle CD-gefütterten Gruppen aufwiesen, spricht für eine Insulinresistenz. Glukagon hingegen war zumindest bei TEL in Richtung von KON_S verändert (Tab. 3-3).

Im OGTT wies die adipöse Kontrollgruppe hohe Glukose- und Insulinspiegel im Vergleich zu KON_S auf, was die bereits vermutete Insulinresistenz bestätigt. Unter Telmisartan hingegen waren AUC und vor allem C_{max} von Glukose sowohl in Mono- als auch in Kombinationstherapie den schlanken Kontrollen ähnlich. Hierbei war Insulin ebenfalls auf Niveau von KON_S (AUC von TEL ausgenommen). AML wies zwar ebenfalls ein niedriges Insulin auf, zeigte aber die höchsten Glukosewerte (Abb. 3-6). Beide Telmisartan-Therapieschemata führten im ITT zu einer normalisierten Insulinsensitivität, die zu einer Glukosehalbwertszeit im Bereich der schlanken Kontrolltiere führte. Unter Amlodipin wurde eine ähnlich beeinträchtigte Insulinsensitivität wie bei KON_A beobachtet (Abb. 3-7).

Tab. 3-3: Glukose in mg/dl, Insulin in ng/ml, Glukagon in pg/l sowie HOMA-Index in $\mu\text{U/ml} \times \text{mg/dl}$. Blutentnahme an Tag 171 (nicht nüchtern) und Tag 249 (nüchtern); $\text{MW} \pm \text{SEM}$ (n=10-12), * $p < 0,05$ vs. KON_A.

	KON _S	KON _A	TEL	AML	T+A
Nicht nüchtern					
Glukose	89,8 ± 2,6*	107,6 ± 6,3	120,1 ± 2,3	117,3 ± 3,6	112,3 ± 2,7
Insulin	6,08 ± 0,5	5,95 ± 0,6	7,25 ± 0,6*	6,18 ± 0,6	7,18 ± 0,20*
Glukagon	239,6 ± 17,0*	122,2 ± 9,4	176,1 ± 17,8*	117,8 ± 10,7	154,4 ± 24,6
Nüchtern					
Glukose	51,2 ± 1,6	57,9 ± 2,7	66,5 ± 5,4*	60,5 ± 2,7	68,8 ± 4,1*
Insulin	0,21 ± 0,1*	0,89 ± 0,1	1,75 ± 0,35*	0,99 ± 0,2	1,61 ± 0,3*
Glukagon	96,1 ± 7,6*	67,0 ± 6,3	82,3 ± 6,9*	64,1 ± 6,8	66,6 ± 6,7
HOMA-Index	0,68 ± 0,26*	3,16 ± 0,60	7,94 ± 2,36*	3,74 ± 0,75	7,11 ± 1,6*

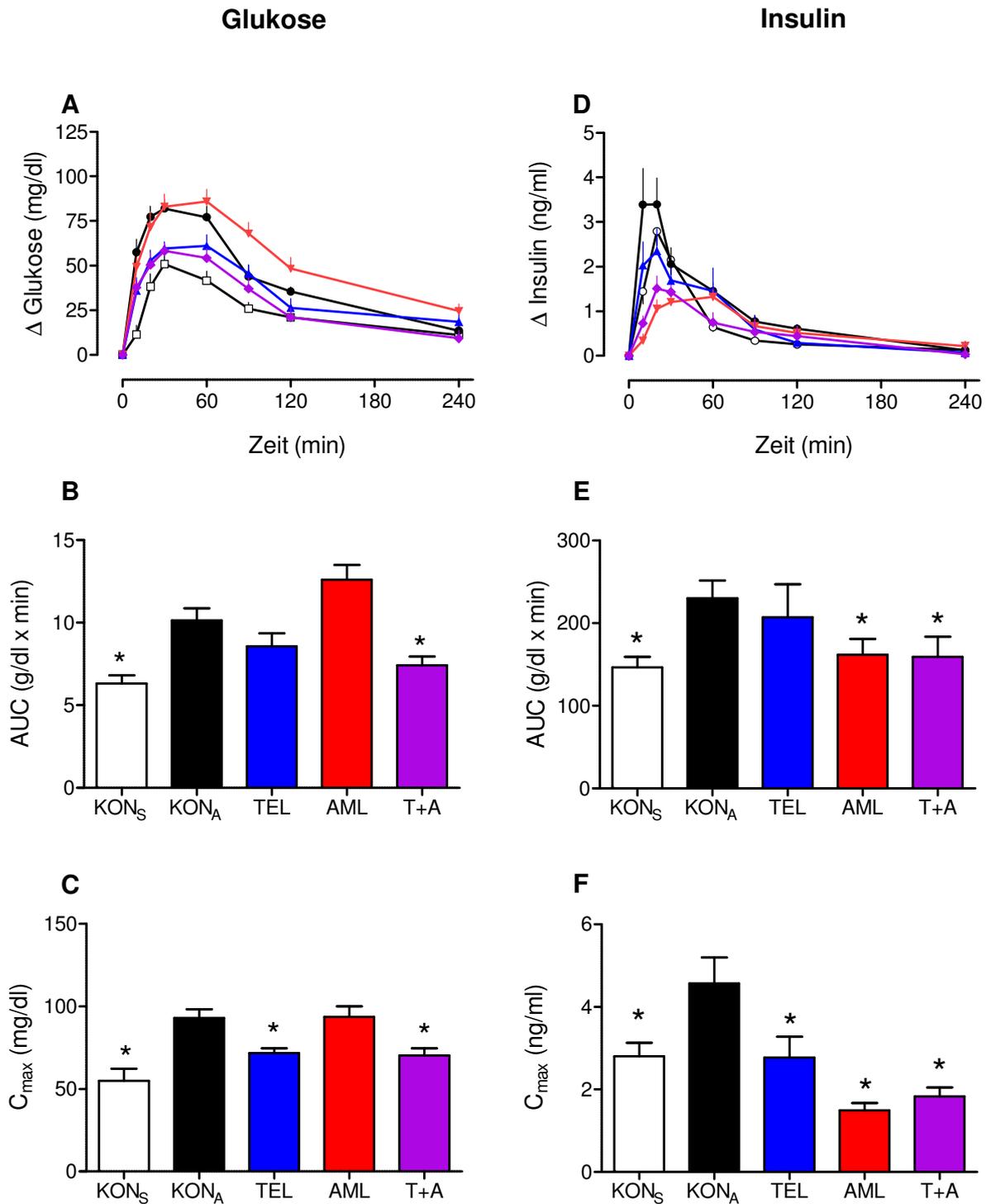


Abb. 3-6: Ermittelte Werte im Rahmen des oralen Glukose-Toleranz-Tests für Glukose (A-C) und Insulin (D-F) mit je Verlauf über die Zeit (A+D), AUC (B+E) und Maximalkonzentration (C+F); $MW \pm SEM$, $n=10-12$. * $p < 0,05$ vs. KON_A; \square : KON_S, \bullet : KON_A, \blacktriangle : TEL, \blacktriangledown : AML, \blacklozenge : T+A.

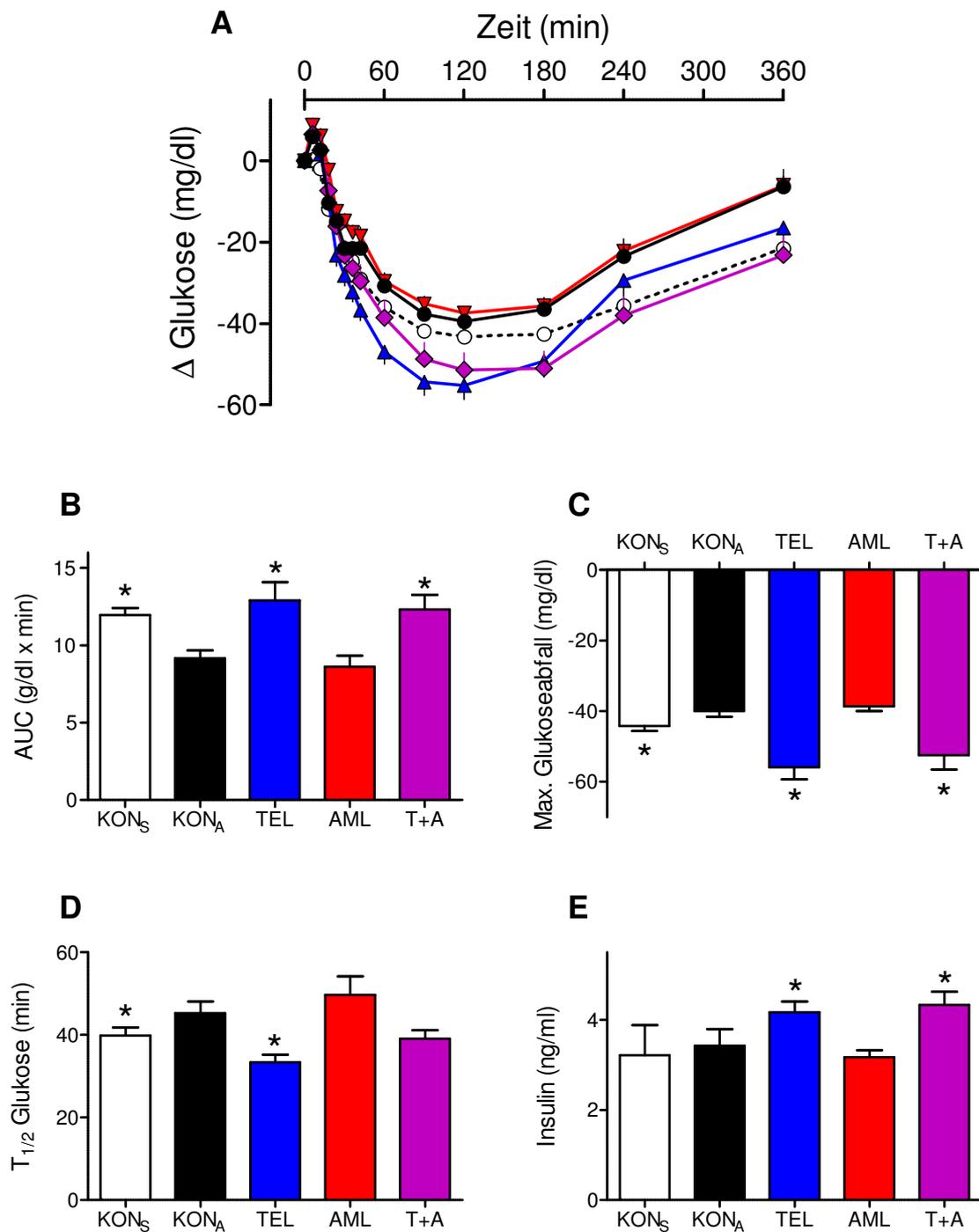


Abb. 3-7: Ermittelte Werte im Rahmen des Insulin-Toleranz-Tests für Glukose (A-D) und Insulin (E); Glukose über die Zeit (A), AUC (B), maximaler Glukoseabfall (C), errechnete Halbwertszeit für Glukose (D) sowie Insulinwerte 24 min nach s.c. Applikation (E); $MW \pm SEM$, $n=10-12$. * $p < 0,05$ vs. KON_A ; \square : KON_S , \bullet : KON_A , \blacktriangle : TEL, \blacktriangledown : AML, \blacklozenge : T+A.

3.2.6 Fettstoffwechsel

Um die Auswirkungen der Medikation auf den Fettstoffwechsel zu erfassen, wurden kurz vor und gegen Ende des Behandlungszeitraums (Tag 123 vs. Tag 240) die Plasmaspiegel von Triglyceriden, freien Fettsäuren, Gesamtcholesterol, High-Density Lipoprotein (HDL) und Low Density Lipoprotein (LDL) gemessen. Vor der Behandlung waren die aufgeführten Parameter über alle Gruppen vergleichbar, einzig die schlanke Kontrollgruppe ohne Cafeteria-Diät wies weniger Triglyceride und LDL auf. Nach der Behandlung waren hier zusätzlich freie Fettsäuren erniedrigt und HDL erhöht. Das Gesamtcholesterol war über alle Gruppen zu beiden Testzeiten ähnlich. Verglichen mit der adipösen Kontrolle kam es nur unter Telmisartan-Behandlung zu einem Abfall von Triglyceriden und freien Fettsäuren sowie zu einer Normalisierung von HDL. Das LDL blieb hier auf Niveau von KON_A (Tab. 3-4).

Tab. 3-4: Triglyceride, Freie Fettsäuren, Gesamtcholesterol, HDL und LDL. Alle Werte in mmol/l, Messung unter nüchternen Bedingungen; MW±SEM, n=11-12. * $p < 0,05$ vs. KON_A.

	KON _S	KON _A	TEL	AML	T+A
Triglyceride					
Tag 123	0,54 ± 0,03*	0,72 ± 0,03	0,76 ± 0,03	0,71 ± 0,03	0,75 ± 0,03
Tag 240	0,68 ± 0,02*	0,88 ± 0,05	0,73 ± 0,04*	0,80 ± 0,03	0,78 ± 0,03
Freie Fettsäuren					
Tag 123	1,05 ± 0,04	1,14 ± 0,04	1,06 ± 0,07	1,05 ± 0,09	1,15 ± 0,07
Tag 240	1,15 ± 0,06*	1,54 ± 0,06	1,33 ± 0,02*	1,55 ± 0,07	1,54 ± 0,07
Gesamtcholesterol					
Tag 123	2,16 ± 0,06	2,09 ± 0,04	2,20 ± 0,05	2,15 ± 0,05	2,14 ± 0,06
Tag 240	2,31 ± 0,15	2,28 ± 0,03	2,30 ± 0,09	2,45 ± 0,06	2,24 ± 0,05
HDL					
Tag 123	0,60 ± 0,02	0,56 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,58 ± 0,01
Tag 240	0,62 ± 0,02*	0,57 ± 0,01	0,62 ± 0,02*	0,62 ± 0,01	0,57 ± 0,01
LDL					
Tag 123	0,11 ± 0,00*	0,15 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00
Tag 240	0,14 ± 0,00*	0,19 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,17 ± 0,00

3.2.7 Energieverbrauch nach Behandlung

Zur Abschätzung des Energieverbrauchs nach zehnwöchiger medikamentöser Behandlung wurde eine indirekte Kalorimetrie durchgeführt. Gleichzeitig wurden die motorische Aktivität sowie die Nahrungsaufnahme bestimmt. Unterschiede hinsichtlich der motorischen Aktivität konnte vor allem in Abhängigkeit von der Diät beobachtet werden (Abb. 3-8A). Diese war in allen Gruppen mit Cafeteria-Diät gesteigert, wobei sich dieser Effekt insbesondere in der aktiven Dunkelphase darstellte, während die Aktivität während der Lichtphase in allen Gruppen gleich war (Abb. 3-8B).

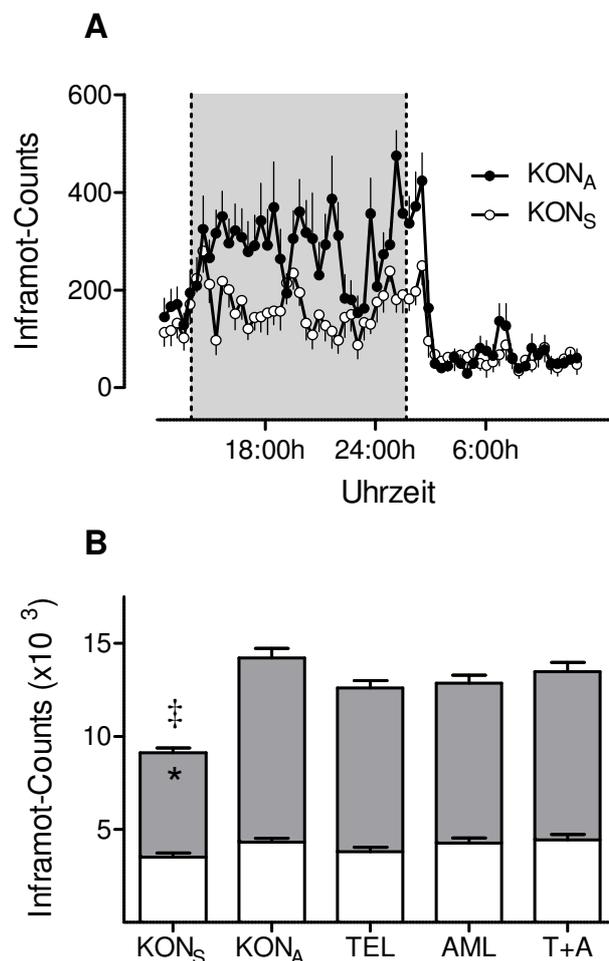


Abb. 3-8: Durch das Inframot-System gemessene Aktivität beider Kontrollgruppen über die Zeit (A) und Gesamtaktivität aller Gruppen innerhalb von 24 Stunden (B); helle Balken: Tagphase (inaktiv), dunkle Balken: Nachtphase (aktiv); $MW \pm SEM$, $n=11-12$. * $p < 0,05$ vs. KON_A (Nachtphase), ‡ $p < 0,05$ vs. KON_A (Gesamt).

Über den Zeitverlauf eines Tages unterschieden sich die respiratorischen Austauschraten (RER) der beiden Kontrollgruppen sowie die der von AML und T+A nicht voneinander (Abb. 3-10A+C). TEL zeigte im Vergleich zur übergewichtigen Kontrollgruppe sowohl in der Dunkel- wie auch der Lichtphase geringere RER-Werte und wies als einzige Gruppe teilweise deutliche Werte unter 0,8 auf (Abb. 3-10B). Entsprechend war der Mittelwert gegenüber den anderen Gruppen erniedrigt (TEL: $0,82 \pm 0,01$ vs. KON_S/KON_A : $0,87 \pm 0,01$ vs. $AML/T+A$: $0,86 \pm 0,01$; Abb. 3-9A). Beim Sauerstoffverbrauch (VO_2) gab es zwischen allen Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3-9B). Die kumulative Nahrungsaufnahme in dieser Zeitspanne war zwischen KON_A , TEL, AML und T+A ähnlich ($429,4 \pm 18,8$ vs. $442,8 \pm 51,5$ vs. $388,7 \pm 24,9$ kJ vs. $410,9 \pm 24,4$) und im Vergleich zu KON_S höher ($269,3 \pm 2,6$ kJ), blieb statistisch aber ohne Signifikanz (siehe Abb. 7-1 im Anhang). Die RER-Werte konnten in einer erneut durchgeführten indirekten Kalorimetrie im Rahmen des LRT bestätigt werden (siehe Abb. 7-2 im Anhang).

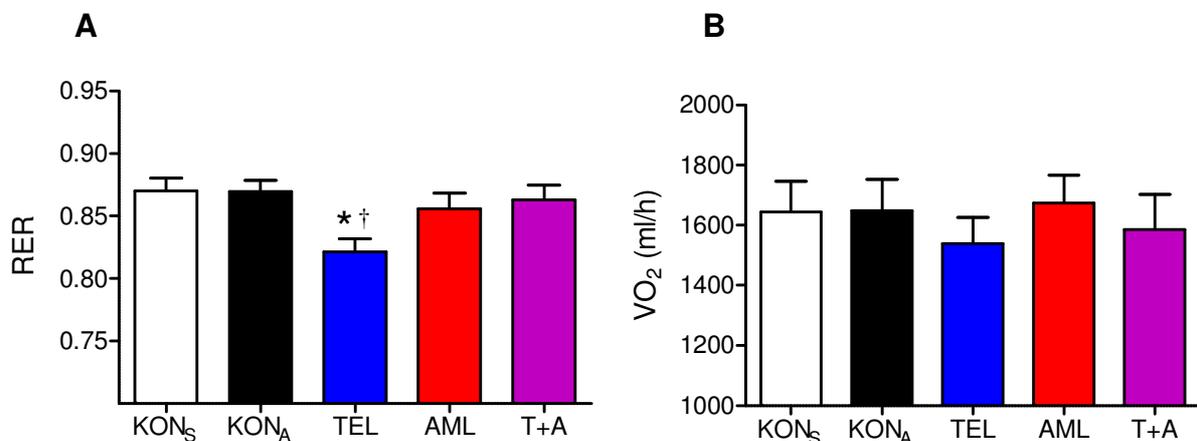


Abb. 3-9: Gemittelte respiratorische Austauschrate (A) und gemittelter Sauerstoffverbrauch (B) innerhalb von 24 Stunden; $MW \pm SEM$, $n=11-12$. * $p < 0,05$ vs. KON_A ; \square : KON_S , \bullet : KON_A , \blacktriangle : TEL, \blacktriangledown : AML, \blacklozenge : T+A.

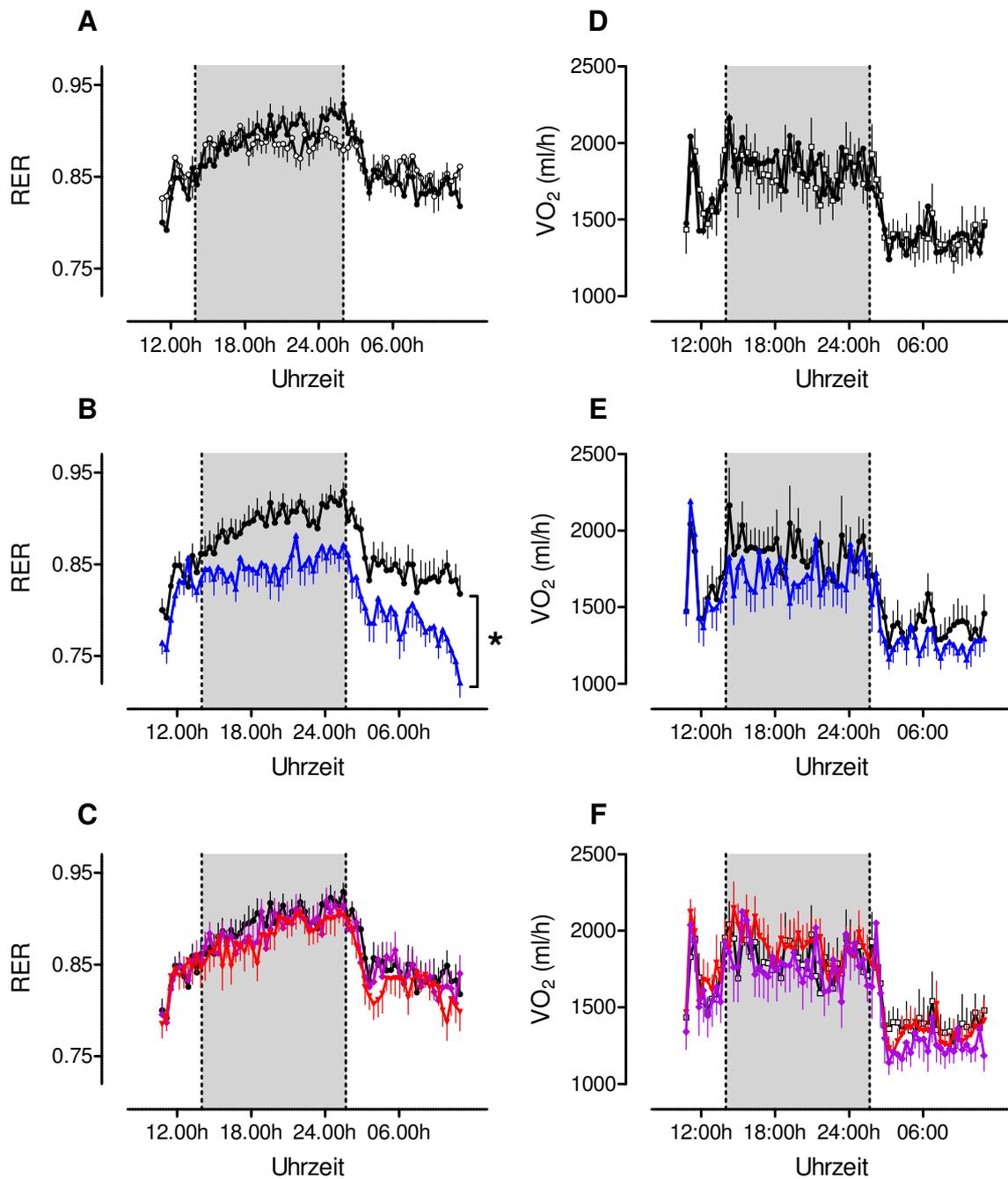


Abb. 3-10: RER und VO₂ im Verlauf von 24 Stunden: KON_S vs. KON_A (A+D), KON_A vs. TEL (B+E), KON_A vs. AML vs. T+A (C+F); MW±SEM, n=11-12. * $p < 0,05$ vs. KON_A; □ : KON_S, ● : KON_A, ▲ : TEL, ▼ : AML, ◆ : T+A.

Als einen weiteren Surrogatparameter für den Energieverbrauch wurde die Proteinexpression von UCP-1 in braunem Fett bestimmt. UCP-1 ist in der inneren Mitochondrienmembran von braunem Fettgewebe lokalisiert und trägt durch Kurzschluss der oxidativen Phosphorylierung und damit unter Energieverbrauch zur Wärmeentwicklung bei. Die Menge von UCP-1 korreliert hierdurch positiv mit dem Energieverbrauch. Im Vergleich zu den schlanken Kontrollen ($2863 \pm 268,8$ Intensität/mm²) war die Expression von UCP-1 in den adipösen Kontrollen und in den medikamentös behandelten Gruppen um 62-68% erhöht und untereinander vergleichbar (KON_A: $4630 \pm 409,5$ vs. TEL: $4648 \pm 238,4$ vs. AML: $4667 \pm 329,8$ vs. T+A: $4821 \pm 294,6$ Intensität/mm²).

3.2.8 Leptin und Adiponektin

Vor und nach medikamentöser Intervention wurden Blutentnahmen zur Quantifizierung der Leptin- und Adiponektinspiegel im Blut durchgeführt. Hierbei wies die schlanke Kontrollgruppe über alle Messpunkte hinweg niedrigere Werte von Leptin und Adiponektin auf. Unter Telmisartan in Mono- und Kombinationstherapie sowie unter Amlodipin am letzten Messpunkt war Adiponektin niedriger als im Vergleich zur adipösen Kontrolle (Tab. 3-5).

Tab. 3-5: Leptin- und Adiponektinplasmakonzentrationen in ng/ml bzw. µg/ml; Blutentnahmen an Tagen 122, 171, 249 und 255, Behandlungsbeginn an Tag 133; MW±SEM, n=9-12. * p<0,05 vs. KON_A.

	KON _S	KON _A	TEL	AML	T+A
Leptin in ng/ml					
Tag 122	7,41 ± 0,1*	11,33 ± 1,1	12,56 ± 0,8	11,48 ± 1,0	11,80 ± 0,8
Tag 171	7,23 ± 0,8*	14,28 ± 1,7	15,7 ± 1,7	13,32 ± 1,4	20,27 ± 1,6
Tag 249	6,31 ± 0,6*	16,58 ± 1,5	15,74 ± 2,2	16,26 ± 2,8	14,91 ± 1,6
Adiponektin in µg/ml					
Tag 122	5,08 ± 0,2*	7,53 ± 0,2	7,32 ± 0,3	7,43 ± 0,3	7,49 ± 0,4
Tag 171	4,18 ± 0,2*	6,92 ± 0,3	5,61 ± 0,3*	5,97 ± 0,4	5,71 ± 0,2*
Tag 255	3,78 ± 0,2*	6,43 ± 0,2	4,63 ± 0,3*	5,40 ± 0,3*	4,70 ± 0,2*

3.2.9 Leptinsensitivität nach Behandlung

Nach mehrfacher subkutaner Leptingabe wurde die Energieaufnahme untersucht, um Veränderungen der Leptinsensitivität nach langfristiger medikamentöser Behandlung zu ermitteln. Durch gleichzeitige Blutabnahme bei der Leptinapplikation konnte der Zeitverlauf der Plasmaleptinkonzentrationen ermittelt werden (Abb. 3-11A). Im Vergleich zu KON_A war C_{max} und die AUC bei KON_S signifikant vermindert. Unter Telmisartan kam es trotz körperrgewichtsangepasster Leptindosierung zu einer Verdoppelung der Leptinkonzentration. Unter der Kombination kam es zumindest zu einer leichten Steigerung von C_{max}, während Amlodipin allein keinen Effekt hatte (Abb. 3-11B+C)

In Antwort auf exogenes Leptin war die Nahrungsaufnahme bei KON_S um ca. 30% niedriger als bei KON_A (Abb. 3-12A+D). TEL wies ebenfalls eine niedrigere Nahrungsaufnahme im Vergleich zur adipösen Kontrolle auf (Abb. 3-12B+D). Bei AML und T+A wurde keine veränderte Nahrungsaufnahme nach Leptinapplikation beobachtet (Abb. 3-12C+D). Aufgrund der erneuten Durchführung einer indirekten Kalorimetrie während des LRT, konnten die Ergebnisse bezüglich RER erneut bestätigt werden (siehe Abb. 7-2 im Anhang).

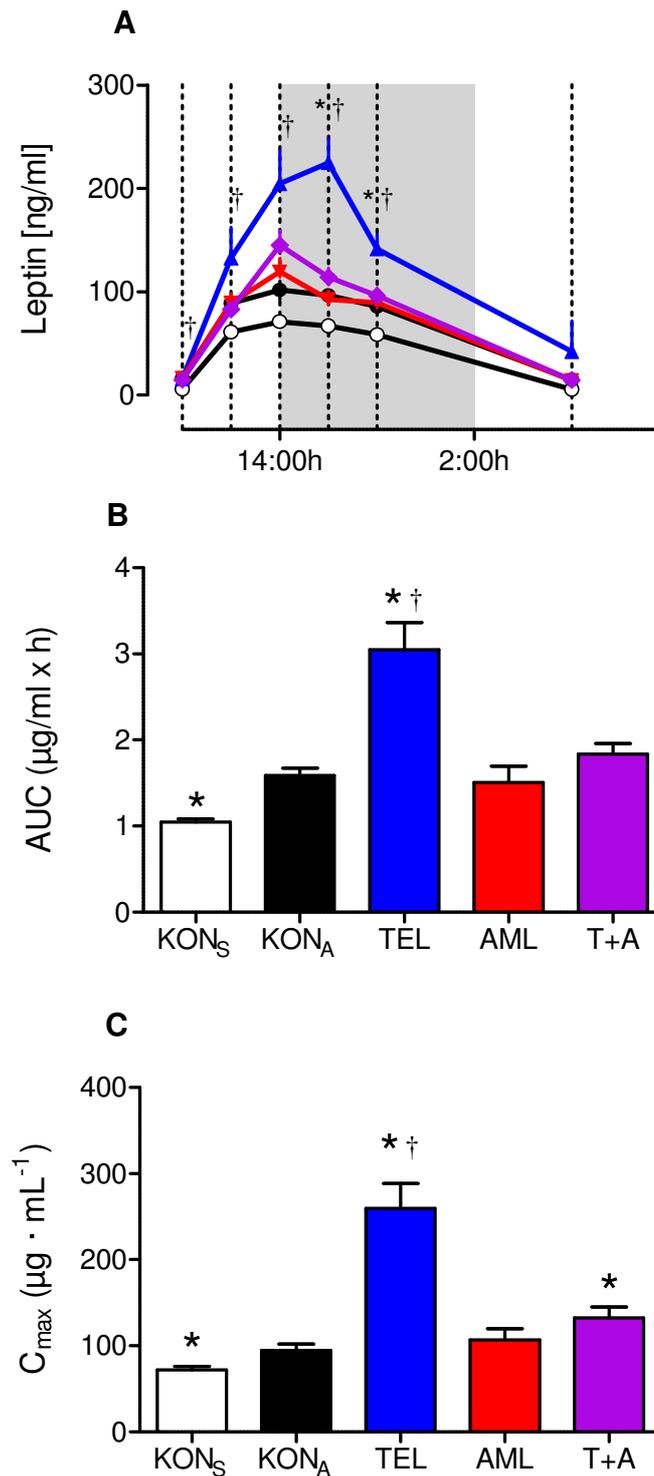


Abb. 3-11: Verlauf der Leptinplasmakonzentration während der ersten 24 Stunden des LRT (A), deren AUC- (B) sowie C_{max} -Werte (C); helle Balken: Tagphase (inaktiv), dunkle Balken: Nachtphase (aktiv), gepunktete Linien: Leptinapplikation s.c.; $MW \pm SEM$, $n=10-12$. * $p < 0,05$ vs. KON_A , † $p < 0,05$ vs. KON_S ; □ : KON_S , ● : KON_A , ▲ : TEL, ▼ : AML, ◆ : T+A.

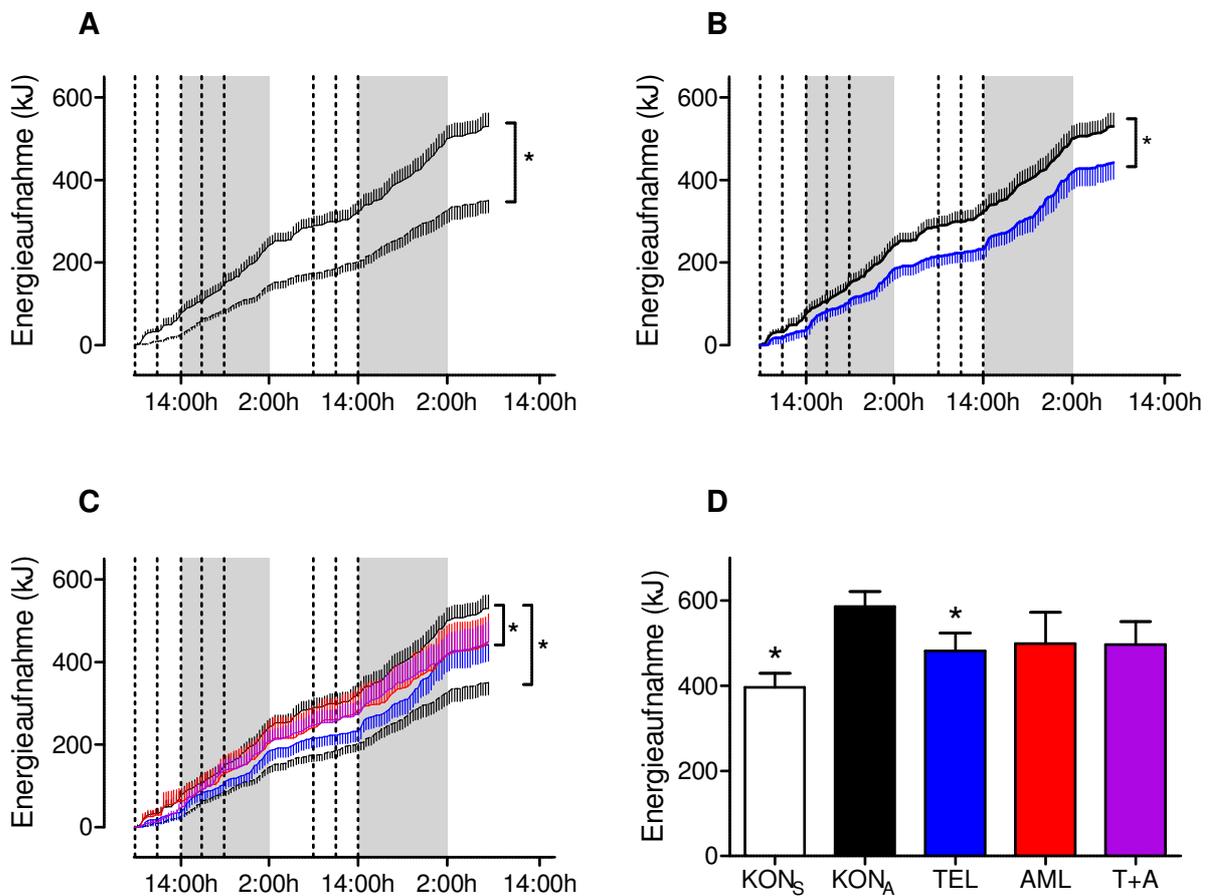


Abb. 3-12: Verlauf der Energieaufnahme ab erster bis 24 Stunden nach letzter Leptinapplikation von KON_S vs. KON_A (A), KON_A vs. TEL (B) und allen Behandlungsgruppen (C) sowie die kumulative Energieaufnahme über den entsprechenden Zeitraum (D); helle Balken: Tagphase (inaktiv), dunkle Balken: Nachtphase (aktiv), gepunktete Linien: Leptinapplikation s.c.; $MW \pm SEM$, $n=10-12$. * $p < 0,05$ vs. KON_A , † $p < 0,05$ vs. KON_S ; □ : KON_S , ● : KON_A , ▲ : TEL, ▼ : AML, ◆ : T+A.

3.2.10 Nahrungspeptide

Zur Überprüfung, ob die beobachteten Veränderungen der Energieauf- und -abnahme mit einer Regulation der Expression hypothalamischer orexigener sowie anorexigener Peptide einhergeht, wurden die mRNA dieser Peptide mittels qPCR quantifiziert. Um die unterschiedlichen Ausgangsmengen bei der DNA-Amplifikation zu berücksichtigen, wurden die spezifischen RNA-Kopien anhand der zuvor gemessenen jeweiligen Gesamt-RNA normiert. Insgesamt konnten keine wesentlichen Unterschiede bei der mRNA-Expression der untersuchten Nahrungspeptide beobachtet werden; mit der Ausnahme, dass die CART-Expression unter Amlodipin signifikant erniedrigt war (-16%). Expressionsdifferenzen von mehr als 30% ließen sich nicht feststellen (Tab. 3-6).

Tab. 3-6: RNA in 1.000 Kopien/ng, orexigene und anorexigene Peptide in 1.000 Kopien/ng_{RNA}; MW \pm SEM, n=11-12. * p<0,05 vs. KON_A.

	KON _S	KON _A	TEL	AML	T+A
RNA	84,8 \pm 4,9	93,6 \pm 6,5	100,6 \pm 6,9	97,7 \pm 6,9	86,2 \pm 4,9
Orexigen					
AgRP	28,6 \pm 3,0	22,7 \pm 2,3	19,2 \pm 2,5	20,3 \pm 3,5	24,5 \pm 2,3
MCH	790,6 \pm 35,2	745,8 \pm 50,5	647,8 \pm 51,3	608,6 \pm 64,9	716,6 \pm 43,2
NPY	430,4 \pm 26,3	352,9 \pm 27,3	300,2 \pm 29,4	306,9 \pm 43,7	350,0 \pm 24,0
PPO	466,3 \pm 31,2	461,0 \pm 36,3	396,1 \pm 46,0	369,8 \pm 49,4	419,8 \pm 42,4
Anorexigen					
CART	64,6 \pm 2,4	71,8 \pm 4,5	56,8 \pm 4,9	53,6 \pm 5,7*	59,7 \pm 4,4
CRF	11,7 \pm 0,8	11,9 \pm 0,8	10,7 \pm 1,3	9,7 \pm 1,2	11,1 \pm 0,8
POMC	130,8 \pm 13,5	150,2 \pm 19,7	131,8 \pm 19,8	109,8 \pm 20,4	157,6 \pm 17,6

4 Diskussion

Die durchgeführte Studie basierte auf einem etablierten Rattenmodell, welches die hauptsächlichsten Merkmale des Metabolischen Syndroms wie arterieller Hypertonus, Übergewicht sowie Glukose- und Fettstoffwechselstörung aufwies (Miesel et al. 2010, Müller-Fielitz et al. 2011). Im Gegensatz zu vorherigen Studien der Arbeitsgruppe Raasch (Miesel et al. 2012, Müller-Fielitz et al. 2012a), die eine prophylaktische Medikation beinhalteten, wurden die Medikamente erst nach 19-wöchiger Cafeteria-Diät appliziert, was die Realität im klinischen Alltag entsprechend näher abbildet. Diese 19-wöchige Fütterungsphase mit CD führte bei allen Ratten zu einer Adipositas, Hyperphagie, Insulin- und Leptinresistenz. Infolge der medikamentösen Therapie kam es nur unter Telmisartan zu einer Gewichtssenkung, wobei allerdings die Energieaufnahme nicht vermindert war. Zudem konnte die Leptinsensitivität, welche bei den CD-gefütterten, adipösen Tieren deutlich eingeschränkt war, durch Telmisartan zumindest teilweise rekonstituiert werden. Diese Effekte waren unabhängig von der Senkung des Blutdrucks und wurden einzig unter Hochdosis Telmisartan beobachtet.

4.1 Telmisartan und Körpergewicht

Alle Gruppen unter CD-Fütterung wiesen mit Erhöhung des Körpergewichts (Abb. 3-4) und der Leptinplasmaspiegel (Tab. 3-5) einen deutlichen adipösen Phänotyp auf. Nach Beginn der Medikation kam es im weiteren Verlauf bei allen Gruppen zu einer weiteren Gewichtserhöhung. Zwar war das Gewicht unter Telmisartan nicht wie in den vorausgegangenen Untersuchungen auf das Niveau der schlanken Kontrollgruppe vermindert (Müller-Fielitz et al. 2012a), aber es war signifikant niedriger als das der adipösen Kontrolltiere. Berücksichtigt man die absolute Gewichtszunahme während des Behandlungsintervalls war TEL sogar mit den schlanken Kontrollen vergleichbar (Abb. 3-4A+B), was den gewichtsregulierenden Effekt durch Telmisartan bestätigt. Ferner waren nach Telmisartan-Behandlung der BMI und das viszerale Fett niedriger als in den übrigen Gruppen mit Cafeteria-Diät, während sich die Längenparameter nicht unterschieden (Abb. 3-4C, Tab. 3-

1). Unter Behandlung mit Amlodipin und der Kombination traten diese Effekte nicht auf, was zwei Erkenntnissen untermauert: Erstens handelt es sich hierbei um blutdruckunabhängige Effekte, da jegliche medikamentöse Intervention eine vergleichbare Blutdrucksenkung herbeiführte, was die Ergebnisse aus vorangegangenen Studien nachhaltig bestätigt (Müller-Fielitz et al. 2011, Miesel et al. 2012). Zweitens kam es nur unter der Hochdosis von Telmisartan ($8\text{mg}/\text{kg}_{\text{Körpergewicht}}$) zu den aufgezeigten Ergebnissen, nicht aber unter der niedrigen Telmisartan-Dosis ($2\text{mg}/\text{kg}_{\text{Körpergewicht}}$) in der Kombinationstherapie (Müller-Fielitz et al. 2011). Eine Reihe weiterer Studien beobachtete eine Gewichtssenkung ebenfalls lediglich unter Einsatz hoher ARB-Dosierungen (siehe Ausführungen in Abschnitt 1.3).

Die massive Blutdrucksenkung (ca. -75mmHg) unter hochdosiertem Telmisartan machte die Mitführung einer Behandlungsgruppe mit vergleichbarer Blutdrucksenkung (AML) erforderlich, da damit einhergehende mögliche Veränderungen auf die Verfassung der Tiere empfindliche Auswirkungen auf die Nahrungsaufnahme hätte nehmen können. Aus der gleichen Überlegung heraus wurde die niedrige Dosierung Telmisartan um Amlodipin ergänzt (T+A). Im weiteren Verlauf werden nur die wichtigsten Ergebnisse diskutiert, die zumeist unter der Hochdosis Telmisartan beobachtet wurden.

Die Energieaufnahme war bei allen Gruppen mit Cafeteria-Diät erwartungsgemäß deutlich erhöht. Unter Telmisartan war diese in den letzten sechs Wochen sogar gegenüber KON_A erhöht, sodass sich hieraus keine Erklärung für die Gewichtssenkung unter Telmisartan ableiten lässt. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die unter ARB-Therapie nahezu keine Veränderung in der Energieaufnahme verzeichneten (Benson et al. 2004, Schupp et al. 2005, Sugimoto et al. 2006, Zanchi et al. 2007, He et al. 2010). In vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe war die Energieaufnahme hingegen erniedrigt bzw. temporär erniedrigt (Müller-Fielitz et al. 2011, Müller-Fielitz et al. 2012a). Die Beobachtungen betrafen jedoch vergleichsweise kürzere Zeiträume (drei bis vier Wochen) und die orale Medikation startete gleichzeitig mit der CD-Fütterung. Des Weiteren ergab sich auch kein Unterschied in der mittels Infrarotsensoren gemessenen Aktivität der Tiere zwischen den Gruppen. Einzig die schlanke Kontrollgruppe bewegte sich weniger (Abb. 3-8). Vorangegangene Untersuchungen fanden ebenfalls keinerlei veränderte motorische Aktivität nach Telmisartan-

Behandlung (Sugimoto et al. 2006, Müller-Fielitz et al. 2012a), sodass dies ebenso wenig eine Begründung für den Gewichtsverlust darstellt.

Aufgrund unbefriedigender Erklärungen für die gewichtssenkenden Effekte unter Telmisartan wurde die indirekte Kalorimetrie angewendet, die eine Methode zur Messung des Gesamtenergieverbrauchs eines Organismus darstellt (siehe auch 2.5.5). Der errechnete RER spiegelt als Mittelwert die gesamte Verstoffwechslung von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten wider, lässt aber qualitative Rückschlüsse vor allem im Vergleich zwischen den Gruppen zu. Der RER von AML, T+A sowie KON_A waren mit der schlanken Kontrollgruppe vergleichbar (Abb. 3-10), sodass hier die Dysbalance zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch infolge der Cafeteria-Diät für das Auftreten von Übergewicht ursächlich erscheint. Trotz vergleichbarer Energieaufnahme wies TEL in der aktiven (Nacht) und inaktiven (Tag) Phase durchgehend einen niedrigeren RER auf. Bei Mäusen, die prophylaktisch zwei Wochen lang mit Telmisartan behandelt wurden, konnte dieser Effekt ebenso nachgewiesen werden (Araki et al. 2006). Die erniedrigte RER weist einen erhöhten Anteil der Fettoxidation am Gesamtstoffwechsel nach und könnte ursächlich für die niedrigere Menge viszeralen Fetts bei den Telmisartan-behandelten Tieren sein (Abb. 3-4). Einen signifikant höheren Sauerstoffverbrauch infolge eines möglicherweise generell höheren Energieumsatzes nach Telmisartan-Behandlung wie in der Studie von Araki et al. wurde jedoch nicht gemessen (Araki et al. 2006) (Abb. 3-10). Bei AT_{1A}-Rezeptordefizienten Mäusen (Kouyama et al. 2005) und nach intrazerebraler ARB-Applikation (Leite et al. 2006) konnte außerdem eine Steigerung der Thermogenese festgestellt werden. Weiter fanden die Arbeitsgruppen um Araki und Kouyama erhöhte mRNA-Spiegel von UCP-1, ein Effektormolekül der Thermogenese in braunem Fettgewebe. In dieser Studie erfolgte die Messung von UCP-1 auf Proteinebene, zeigte allerdings keinerlei Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen mit Cafeteria-Diät (Abschnitt 3.2.7).

Trotz nicht gänzlich einheitlicher Ergebnisse unterstützt die vorliegende Studie einen Zusammenhang zwischen medikamentöser AT₁-Rezeptorblockade und erhöhtem Energieverbrauch. In dieser Studie scheint die erhöhte Fettoxidation ein wesentlicher Faktor der ARB-induzierten Gewichtssenkung auszumachen.

4.2 Telmisartan und Leptinresistenz

Aufgrund der immer wichtiger werdenden Rolle von Adiponektin in der Regulation des Energiehaushalts, werden die erfassten Adiponektinplasmakonzentrationen eingangs in Kürze behandelt und anschließend Leptin näher beleuchtet.

Allgemein steht die Menge von Adiponektin im Plasma im reziproken Verhältnis zur Fettmasse und stellt zusammenfassend den Gegenspieler von Leptin dar. Leere Fettspeicher gehen mit hohen Adiponektinspiegeln einher und stimulieren über Rezeptoren im Hypothalamus die Energieaufnahme und senken den Energieverbrauch (Kadowaki et al. 2008). In dieser Studie jedoch wiesen am Ende der Fütterungsphase alle Gruppen mit Cafeteria-Diät und entsprechend induziertem Übergewicht höhere Adiponektinspiegel auf als die schlanke Kontrollgruppe (Tab. 3-5). Müller-Fielitz konnte jüngst zeigen, dass die Fütterung von Ratten mit Cafeteria-Diät deutlich vergrößerte Fettzellen zur Folge hat (Müller-Fielitz et al. 2012a). Demzufolge und vor dem Hintergrund einer Adiponektinsekretion in Abhängigkeit der Adipozytengröße (Skurk et al. 2007) könnte hierin eine mögliche Erklärung liegen. Nach der Medikation erniedrigte sich Adiponektin bei TEL und T+A, im weiteren Verlauf auch unter Amlodipin (Tab. 3-5). Aufgrund der Tatsache, dass jegliche medikamentöse Behandlung die Adiponektinkonzentration unabhängig von der Entwicklung des Körpergewichts senkte (Abb. 3-4 und Tab. 3-5), müssen Ursachen als mögliche Mechanismen in Betracht gezogen werden, die unter allen Medikationsregimen zu beobachten waren. So führte sowohl Telmisartan wie auch Amlodipin und deren Kombination zu einer deutlichen Blutdrucksenkung (Abb. 3-2A) sowie zu einer Steigerung der AngII-Plasmakonzentration (Abb. 3-3). Es stellt sich also die Frage, ob erstens die Blutdrucksenkung und/oder zweitens veränderte AngII-Spiegel Einfluss auf die Adiponektinsekretion nehmen.

Zur ersten Hypothese: In dieser Studie besteht eine hohe Korrelation zwischen Blutdrucksenkung und niedrigen Plasmawerten von Adiponektin in adipösen Ratten (Korrelation siehe Abb. 6-3 im Anhang). Konträr hierzu fanden Delles et al. eine inverse Korrelation jener Parameter nach Behandlung von Patienten mit T2DM unter Telmisartan oder Ramipril: Unter antihypertensiver Behandlung kam es zu einer Steigerung von Adiponektin (Delles et al. 2008). Der dabei ermittelte Korrelationskoeffizient von -0,357 ist vergleichsweise niedrig und es bleibt unklar,

ob es sich um einen kausalen Zusammenhang handelt. Die angeführte These eines Adiponektinanstiegs infolge einer Telmisartan-induzierten PPAR γ -Aktivierung (Kintscher et al. 2008) kann in dieser Studie aufgrund einer fehlenden Erhöhung von Adiponektin nach Telmisartan-Gabe (Tab. 3-5) nicht bestätigt werden und böte darüber hinaus auch keine Erklärung für die Amlodipin-induzierte Adiponektin-Erhöpfung, da Amlodipin kein PPAR γ -Aktivator ist. Außerdem wurde von der Arbeitsgruppe Raasch jüngst gezeigt, dass Telmisartan in Ratten keinerlei PPAR γ -Zielgene reguliert, was generell den PPAR γ -assoziierten pleiotropen Effekt von Telmisartan in Frage stellt (Müller-Fielitz et al. 2012a).

Zur zweiten Hypothese eines AngII-abhängigen Einflusses auf Adiponektin: Die hohen AngII-Plasmakonzentrationen nach AT $_1$ -Rezeptor-Blockade beruhen auf einem Feedback-Mechanismus seitens AngII und resultieren aus einer erhöhten Plasminogenaktivität (Chen et al. 2010). Unter Amlodipin konnte in Hunden ebenfalls ein erhöhter AngII-Spiegel festgestellt werden, der von den Autoren auf eine erhöhte Sympathikusaktivität infolge der Blutdrucksenkung zurückgeführt wurde (Takahara et al. 2009). Verschiedene Studien sowohl in-vitro als auch in-vivo wiesen Adiponektin-senkende Effekte seitens AngII nach: So reduzierte AngII die Menge an mRNA von Adiponektin in 3T3-L1-Adipozyten (Ikeda et al. 2009) sowie das Plasmaadiponektin in Ratten (Li et al. 2013) und korreliert invers mit Adiponektin in Patienten (Xu et al. 2013). Dieser Zusammenhang findet sich auch in dieser Studie (siehe Abb. 7-3 im Anhang), doch scheint der Effekt AT $_1$ -Rezeptor-abhängig zu sein, da dieser in Mäusen ohne intakten AT $_2$ -Rezeptor beobachtet wurde (Iwai et al. 2009) und – anders als hier – nach AT $_1$ -Blockade nicht auftrat (Ikeda et al. 2009, Li et al. 2013). Umgekehrt führte ein selektiver AT $_2$ -Rezeptor-Agonist zu einer Steigerung von Adiponektin in Mäusen (Ohshima et al. 2012). Insgesamt sind Blutdrucksenkungen und hohe AngII-Spiegel zwar denkbare Erklärungsansätze für die beobachteten niedrigen Adiponektinplasmakonzentrationen in allen medikamentös intervenierten Gruppen, lassen sich aber nicht mit der derzeitigen Literatur in Einklang bringen.

Leptin wird von Fettgewebszellen sezerniert, steigt mit zunehmender Fettmasse und hat Einfluss auf den Energiehaushalt: Steigende Leptinplasmakonzentra-

tionen senken den Appetit und steigern den Energieverbrauch (Friedman 2009). Im Vergleich zu KON_S waren in den übrigen übergewichtigen Gruppen vor Behandlungsbeginn die Leptinspiegel bei anhaltend hoher Nahrungsaufnahme erhöht, womit eine Leptinresistenz vorliegt (Frederich et al. 1995). Unter medikamentöser Intervention mit Amlodipin, aber auch mit Telmisartan, waren die Plasmaleptinkonzentrationen weiterhin vergleichbar erhöht wie in der adipösen Kontrollgruppe, auch zum Trotz der verringerten Fettmasse unter Telmisartan (Abb. 3-5 und Tab. 3-5). Insbesondere die gleichsam erhöhten Leptinkonzentrationen unter Telmisartan stehen im Gegensatz zu anderen Studien, in denen der AT₁-Blocker allerdings prophylaktisch, also parallel zur hochkalorischen Diät, verabreicht wurde (Zorad et al. 2006, Müller-Fielitz et al. 2012a). Hier wurde ebenso gezeigt, dass die prophylaktische Gabe eines AT₁-Rezeptor-Blockers nicht nur das Körpergewicht verringerte, sondern auch zu einer fehlenden Zunahme der Adipozytengröße führte, was mit niedrigeren Leptinspiegeln einherging. Die positive Korrelation zwischen Adipozytengröße und Leptinsekretion wurde im Einzelnen bereits nachgewiesen (Skurk et al. 2007). Wahrscheinlich konnte aufgrund der langen Fütterungsphase vor medikamentöser Therapie und auch unter Telmisartan im weiteren Verlauf der Studie keine wesentliche Verkleinerung der Fettzellgröße erreicht werden, was vermindertes Plasmaleptin zur Folge hätte haben können. Im Widerspruch dazu erscheinen Befunde an stroke prone SHR (SHRSP; Ratten mit erhöhtem Blutdruck und erhöhtem Schlaganfallrisiko), wo unter niedriger Candesartan-Dosis (2mg/kg_{Körpergewicht}) gesteigertes Plasmaleptin beobachtet wurde (Takemori et al. 2013). Gleichwohl wird jedoch erwähnt, dass SHRSP mit zunehmendem Blutdruck unter Lipoatrophie leiden und dieser Effekt unter dem ARB bei gleichzeitiger Blutdrucksenkung rückläufig war und das Körpergewicht infolgedessen analog zu Leptin anstieg. SHRSP eignen sich in diesem Zusammenhang daher nicht für Untersuchungen von ARB bei Übergewicht.

Alle CD-gefütterten Gruppen, auch die Tiere unter Telmisartan Therapie, scheinen leptinresistent zu sein, da sowohl Plasmaleptin als auch die Energieaufnahme erhöht war (Frederich et al. 1995). Dies würde in einem gewissen Widerspruch zu den vorherigen Untersuchungen von Lau stehen (Lau 2012). Hier konnte funktionell bereits demonstriert werden, dass die Leptinsensitivität nach zweiwöchiger

Telmisartan-Behandlung trotz CD-Fütterung erhalten blieb, während die Kontrolltiere unter CD eine Leptinresistenz entwickelten. Diese funktionellen Daten zum Erhalt der Leptinsensitivität unter AT_1 -Blockade konnten auch in biochemisch/histologischen Immunfluoreszenzstudien durch die Arbeitsgruppe Raasch bestätigt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von STAT3 infolge der Cafeteria-Diät abnahm, unter zweiwöchiger Telmisartan-Behandlung aber erhalten blieb, was die Aktivierung des JAK/STAT3-Signalweg unter Telmisartan in Folge einer Leptinstimulation belegt (Geissler 2013). Es stellte sich in dieser Studie folglich also die weitergehende Frage, ob auch eine chronische Telmisartan-Therapie weiterhin Einfluss auf die Leptinsensitivität nehmen kann, obwohl die Behandlung zu einem Zeitpunkt initiiert wurde, zu dem die Tiere adipös und leptinresistent waren. Hierfür wurde ein LRT durchgeführt, um die Leptinfunktionalität darzustellen. Die subkutane Leptinzufuhr führte bereits in vielen Studien zu einer effektiven Senkung der Energieaufnahme (Pelleymounter et al. 1995, Halaas et al. 1997, Nishiyama et al. 1999, McAlister and Van Vugt 2004). In dieser Untersuchung war die applizierte Leptindosis gewichtsnormiert, was die niedrige Leptinplasmakonzentration der schlanken Kontrolltiere im Vergleich zu KON_A erklärt. Die Hochdosis Telmisartan führte bemerkenswerterweise zu einer Verdopplung von C_{max} bzw. AUC, welche sich aus den entsprechenden Plasmaleptinkonzentrations-Zeit-Kurven berechneten. AML- und T+A unterschieden sich währenddessen nicht von den adipösen Kontrollen. (Abb. 3-11B+C). In-vitro Versuche an 3T3-L1-Zellen und humanen Adipozyten lieferten jedoch gegenteilige Ergebnisse: Die Leptinsekretion aus 3T3-L1-Zellen war infolge von AngII-Inkubation AT_1 -Rezeptor-abhängig gesteigert (Kim et al. 2002, Skurk et al. 2005). Dies wurde an von Ratten isolierten Adipozyten bestätigt (Cassis et al. 2004). Wurden die Ratten allerdings vor Fettzellisolation einer chronischen AngII-Infusion unterzogen, kam es ab dem zweiten Tag zu einer Reduktion der Leptinplasmakonzentration. Da dieser Effekt unter medikamentöser Sympathikusblockierung ausblieb, wurde die These formuliert, dass eine Sympathikusaktivierung die lokalen AngII-Effekte überwiege und eine Erhöhung von Leptin unterbinde (Cassis et al. 2004). Tatsächlich wurden erhöhte Leptinplasmakonzentrationen unter Sympathikoinhibition festgestellt (Sivitz et al. 1999, Rayner and Trayhurn 2001), was in Zusammenschau mit den hemmenden Eigenschaften

der AT₁-Rezeptor-Blockade auf den Sympathikus (Dendorfer et al. 2002a, Dendorfer et al. 2002b, Raasch et al. 2004, Dendorfer et al. 2005, de Champlain et al. 2007) eine mögliche Erklärung für den Leptinanstieg darstellt. Allerdings fand sich in den eingangs erwähnten Leptinspiegeln (Tab. 3-5) keinerlei Unterschied in den medikamentösen Behandlungen, obwohl für Amlodipin eine Sympathikusaktivierung beschrieben ist (de Champlain et al. 2007). Da die Sympathikusblockierung jedoch die Leptin*produktion* betrifft (Rayner and Trayhurn 2001) und Leptin im LRT extern appliziert wurde, muss das Augenmerk eher auf die Elimination gelegt werden. Grundsätzlich spielen für die Leptinhomeostase die Bindung an einen löslichen Leptinrezeptor, der enzymatische Abbau durch Proteasen sowie die renale Elimination eine wichtige Rolle (Zeng et al. 1997, Hill et al. 1998, Lou et al. 2010). Der Megalin/LRP2-Rezeptor kommt unter anderem im proximalen Tubulus der Nieren vor und dient hier der Rückresorption von filtrierten Molekülen inklusive Leptin (Hama et al. 2004, Marzolo and Farfan 2011). Er wird PPAR γ -abhängig induziert (Cabezas et al. 2011), sodass mit Telmisartan als PPAR γ -Aktivator (Kintscher et al. 2008) eine Leptinerhöhung infolge vermehrter Leptinrückresorption immerhin vereinbar wäre. Wie bereits erwähnt, unterstützt die fehlende Erhöhung von Adiponektin (Tab. 3-5), ein Surrogatparameter für die PPAR γ -Aktivität (Hammarstedt et al. 2005), diese Hypothese jedoch nicht.

Im LRT war die Energieaufnahme von KON_A sowie von AML und T+A wie im Verlauf der gesamten Studie (Abb. 3-5A+B) deutlich höher als bei KON_S (Abb. 3-11), was eine Leptinresistenz bestätigt. Grundsätzlich wird zwischen einer peripheren und zentralen Leptinresistenz unterschieden (Van Heek et al. 1997). Erstere basiert maßgeblich auf einem sättigbaren Leptintransporter in der Bluthirnschranke, welcher durch hohe Triglyceridspiegel negativ beeinflusst wird (Banks et al. 1999, Banks and Farrell 2003). Die zentrale Leptinresistenz wird unter reduzierten Leptinrezeptoren oder einer verminderten Signaltransduktion des STAT3- und PI3-Kinase-Weges diskutiert (Scarpace and Tumer 2001, Sahu and Metlakunta 2005). Obwohl die Energieaufnahme unter Telmisartan im Verlauf der Studie mindestens so hoch wie bei KON_A war (Abb. 3-12E), fiel diese im LRT im Vergleich zu der adipösen Kontrolle nun niedriger aus. Obwohl die zentralen Leptinspiegel in dieser

Studie nicht erfasst wurden, spricht die Telmisartan-vermittelte Reduktion der Triglyceride (Tab. 3-4), in Einklang mit einer verminderten Energieaufnahme unter externer Leptingabe, zumindest für eine teilweise Wiederherstellung der peripheren Leptinsensitivität. Der genaue Mechanismus einer verbesserten Leptinpermeabilität über die Bluthirnschranke durch AT₁-Rezeptor-Blockade ist nach dem derzeitigen Wissensstand unklar. Dennoch gibt es einige interessante Ansätze: AngII reduziert AT₁-Rezeptor-abhängig die Permeabilität der Bluthirnschranke über Mobilisierung und Veränderung von Occludin, ein wichtiger Bestandteil der interzellulären Tight Junctions (Wosik et al. 2007). Weiter senkt AngII den Blutfluss im Plexus choroideus (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001), der nicht nur über AT₁-Rezeptoren (Jöhren and Saavedra 1996) verfügt, sondern gleichzeitig ein wichtiger Ort des Leptintransports in das ZNS darstellt (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001). AT₁-Rezeptor-Blocker könnten somit unselektiv die Permeabilität der Bluthirnschranke vergrößern oder über eine gesteigerte Durchblutung im Plexus choroideus den Leptintransport erhöhen. Darüber hinaus sind die bereits erwähnten Megalin/LRP-2-Rezeptoren auch im Plexus choroideus exprimiert und transportieren nachweislich Leptin über die Bluthirnschranke (Dietrich et al. 2008). Der angesprochene Telmisartan-vermittelte PPAR γ -Mechanismus bezüglich einer erhöhten Megalin-Expression und einem konsekutiv gesteigerten Leptintransports in das ZNS wäre denkbar, sieht sich aber erneut der fehlenden PPAR γ -Aktivierung gegenübergestellt (siehe oben).

Die Modulation des Essverhaltens seitens Leptin wird durch eine veränderte Expression (an-)orexigener Peptide im Hypothalamus verursacht (Jequier 2002). Hier konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden (Tab. 3-6). Die Messung der Peptide fand mit der Gehirnentnahme ganz am Ende der Studie statt, sodass von den vergleichbaren Leptinplasmakonzentrationen zwischen den CD-gefütterten Gruppen ausgegangen werden muss (Abb. 3-5, Tab. 3-5). Der LRT, der eine erhöhte Leptinsensitivität unter Telmisartan nachwies, wurde zehn Tage zuvor durchgeführt. Mögliche Änderung der (an-)orexigenen Peptide nach externer Leptinapplikation wurden daher hochwahrscheinlich nicht abgebildet.

4.3 Telmisartan und Glukosestoffwechsel

Lange vor Entdeckung der Leptinresistenz galt Übergewicht bereits als Risikofaktor für Insulinresistenz (Konner and Bruning 2012). Dabei hängen Leptin- und Insulinresistenz nicht nur aufgrund häufigen gemeinsamen Auftretens miteinander zusammen. Tatsächlich geht man von einem gemeinsamen adipoinsulinären Regelkreis aus, in dem Insulin zu Adipozytenvergrößerung führt und folglich steigende Leptinspiegel die Insulinsekretion hemmen (Kieffer and Habener 2000, Konner and Bruning 2012). In dieser Studie wiesen alle Gruppen mit Cafeteria-Diät nach Behandlungsbeginn nüchtern hohe Insulinplasmakonzentrationen im Vergleich zur schlanken Kontrollgruppe auf (Tab. 3-3). Dies ist nicht nur hinweisend für eine Insulinresistenz, sondern deutet unter Einbeziehung der gleichsam erhöhten Leptinkonzentrationen auf eine Dysbalance des adipoinsulinären Systems hin (Kieffer and Habener 2000).

In den funktionellen Tests bezüglich des Glukosestoffwechsels (OGTT und ITT) waren die Ergebnisse nach niedriger und hoher Telmisartan-Dosierung fast durchgängig vergleichbar mit denen der schlanken Kontrollgruppe: Die Glukoseverwertung war, erkennbar an einem niedrigeren Glukoseanstieg nach oraler Glukosesubstitution im Rahmen des OGTT, bei TEL und T+A deutlich besser als bei der adipösen Kontrolle (Abb. 3-6). Nach subkutaner Insulininjektion im ITT fiel der Glukoseabfall unter Telmisartan am Höchsten aus (Abb. 3-7), was bezeichnend für eine deutlich verbesserte Insulinsensitivität ist. Wie bereits mehrfach erwähnt soll Telmisartan zu einer Induktion von PPAR γ in weißem Fettgewebe führen und hierüber vor allem den Glukosestoffwechsel verbessern (Benson et al. 2004, Schupp et al. 2004, Clasen et al. 2005, Kintscher and Unger 2005, Schupp et al. 2005, Schupp et al. 2006, Kintscher et al. 2008). Erneut sieht sich diese These mit den hier nicht angestiegenen Adiponektinspiegeln unter Telmisartan sowie einer vorherigen Untersuchung konfrontiert, die keine Änderung der Expression von PPAR γ -Zielgenen nach Telmisartan-Behandlung feststellen konnte (Müller-Fielitz et al. 2012a). Hierbei handelte es sich nicht wie in vielen anderen Studien um Zellversuche mit Nachweis veränderter Gentranskription, sondern um Messungen der PPAR γ -Zielgene auf Proteinebene mittels Western Blot in Leber, Skelettmuskel und viszeralem Fett von Ratten. Ein weiterer Ansatz der verbesser-

ten Insulinsensitivität unter Telmisartan liegt in der teilweise gemeinsamen intrazellulären Signaltransduktion von Leptin und Insulin im Hypothalamus (Burgos-Ramos et al. 2011). In Leptinrezeptor-defizienten Mäusen konnte nach zentraler Leptinapplikation der Glukosestoffwechsel durch eine verbesserte zentrale Insulinsensitivität verbessert werden (Koch et al. 2010). Eine intakte zentrale Insulinsensitivität hat nachgewiesenermaßen einen deutlichen Einfluss auf die periphere Glukoseverwertung (Gelling et al. 2006). Dies stellt eine wichtige Verbindung zwischen Leptin- und Insulinresistenz dar. Die in Abschnitt 4.1.2 beschriebene Verbesserung der Leptinsensitivität durch Telmisartan könnte so positiven Einfluss auf die Insulinsensitivität nehmen. Allerdings bleibt fraglich, ob die eingeschränkte Erhöhung der Leptinsensitivität unter Telmisartan allein eine dermaßen große Verbesserung des Glukosestoffwechsels zur Folge haben kann.

Auffällig waren die nüchternen sowie nicht-nüchternen Insulinspiegel unter beiden Telmisartan-Dosierungen, die nicht nur über denen der schlanken Kontrolle lagen, sondern auch die Werte von KON_A überstiegen (Tab. 3-3). Dafür kommen mehrere Mechanismen in Frage: Erstens könnten nachgewiesene antiinflammatorische Effekte von AT_1 -Blockern, die schützende Eigenschaften auf Fettgewebe und Inseln des Pankreas haben (Cole et al. 2010), stellvertretend für eine hieraus resultierende Verbesserung des Glukosestoffwechsels unter ARB sein. Zweitens inhibieren gesättigte freie Fettsäuren die Biosynthese sowie Sekretion von Insulin und führen zu einer Apoptose von β -Zellen (Nolan et al. 2006). Die Senkung der freien Fettsäuren unter Telmisartan (Tab. 3-4) könnte hierdurch zu einem Anstieg des Insulins beigetragen haben, wobei dies nur für die Hochdosis gilt. Drittens hat das RAAS über die HPA-Achse eine Verbindung zum Glukosestoffwechsel. Es konnte nachgewiesen werden, dass AngII die HPA-Aktivität verstärkt und es hierdurch zu einer verschlechterten Glukoseverstoffwechslung aufgrund verminderter Insulinfunktion kommt (Raasch et al. 2006, Müller et al. 2007, Müller et al. 2010, Miesel et al. 2012, Müller-Fielitz and Raasch 2013). Tatsächlich ist länger bekannt, dass Glukokortikoide in-vitro und in-vivo zu einer Verminderung der Insulinsekretion führen (Barseghian and Levine 1980, Delaunay et al. 1997, Lambillotte et al. 1997, Davani et al. 2004). Umgekehrt kam es, wie in dieser Studie, unter AT_1 -Rezeptor-Blockade zu höheren Insulinspiegeln und einem verbesserten Glukosestoffwechsel (Raasch et al. 2006, Miesel et al. 2012).

4.4 Fazit

Grundlage der vorliegenden Studie bildete ein Rattenmodell, welches alle wesentlichen Symptome des MetS abbildete. Zusätzlich entsprach die medikamentöse Intervention, die erst nach vollständiger Ausprägung der Adipositas, Leptin- und Insulinresistenz begonnen wurde, der Situation von Patienten mit MetS im klinischen Alltag. Analog zu vorherigen Untersuchungen mit eher prophylaktischer Therapiestrategie konnten ebenso gewichtssenkende Effekte unter der Telmisartan-Therapie nachgewiesen werden, ohne dass es dabei zu einer verminderten Energieaufnahme kam. Vielmehr wurde mittels indirekter Kalorimetrie eine erhöhte Fettoxidation festgestellt, die in Einklang mit der beobachteten Reduzierung des viszeralen Fettgewebes steht. Zudem war die Leptinsensitivität unter Telmisartan verbessert: Nach subkutaner Leptingabe kam es im Vergleich zur adipösen Kontrolle zu einer Verminderung der Energieaufnahme. Der Glukosestoffwechsel war unter der Hochdosis und in geringerem Umfang ebenso durch die niedrige Telmisartan-Dosis verbessert, was vor allem auf eine erhöhte Insulinsensitivität zurückzuführen war. Insgesamt kam es nur unter hochdosierter Telmisartan-Behandlung blutdruckunabhängig zu einem Rückgang aller essentiellen Risikofaktoren des MetS.

4.5 Limitationen

Auch wenn durch das Design und die Ergebnisse klare Rückschlüsse möglich waren, gibt es Limitationen dieser experimentellen Studie, die zumindest für die direkte Übertragbarkeit auf den Patienten mit MetS einschränkend sein könnten:

1. Wie erwähnt konnte der antiadipöse Effekt nur unter Verwendung höchster Dosierungen erzielt werden, für die keine Zulassung gegeben ist. Somit bleibt die Verwendung solch hoher Dosen beim Patienten insbesondere vor dem Hintergrund möglicher Nebenwirkungen (z.B. Hypotonie) zu klären. Allerdings konnten ausgeprägte hypotone Zustände auch durch die Hochdosis von Telmisartan in unseren Experimenten nicht erzielt werden (Abb. 3.2A).
2. Als weitere Limitation sei angemerkt, dass die Senkung des Blutdrucks unter Amlodipin im Vergleich zu der Telmisartan-Hochdosis gegen Studienende et-

was geringer ausfiel. Dies könnte Zweifel an der Schlussfolgerung hegen, dass die Telmisartan-induzierte antiadipöse Wirkung unabhängig von der parallelen Blutdrucksenkung ist, da diese eben nicht equipotent zu der von Amlodipin war und Amlodipin zu keinem Gewichtsverlust führte. Allerdings wird diesem Unterschied von ca. 25 mmHg vor dem Hintergrund einer ausgeprägten Blutdruckreduktion von 100 mmHg weniger Relevanz zugemessen (Abb. 3.2A).

3. Der Rückschluss auf eine gesteigerte Fettverbrennung basiert auf Messungen mittels indirekter Kalorimetrie. Wir konnten hier insbesondere einen verminderten RER selektiv unter Telmisartan beobachten, was gut mit der verminderten Fettmasse in diesen Tieren korreliert. Allerdings sei hier kritisch angemerkt, dass der Energieverbrauch selbst nicht gesteigert war und auch UCP-1 nicht reguliert war. Die indirekte Kalorimetrie selbst ist in ihren Aussagen limitiert, da durch die Messung von CO₂ und O₂ nur der oxidative Energieverbrauch und weniger die Wärmeabgabe als Ausdruck des gesamten Energieverbrauchs berücksichtigt wird. Die Wärmeabgabe kann durch direkte Messungen erreicht werden. Allerdings sind kommerzielle Systeme nicht verfügbar, die Evaluierung eigens entwickelter Messstände notwendig und somit derartige Systeme für routinemäßige Messungen noch nicht geeignet. Von Vorteil der indirekten kalorimetrischen Methode, und das sei abschließend erwähnt, ist aber, dass diese Technik auch für den Patienten verfügbar und somit eine klinische Überprüfung unserer Ergebnisse möglich wäre.
4. Auch wenn durch diese Studie der antiadipöse Effekt durch AT₁-Blocker auch im kurativen Ansatz gezeigt werden konnten, bleiben Fragen nach dem Mechanismus noch ungeklärt. Dies war aber weniger Ziel dieser Arbeit und so wird Ziel zukünftiger Arbeiten der Arbeitsgruppe sein, sich dem Mechanismus auch vor dem Paradoxon einer Gewichtsreduktion nach AngII und AT₁-Blockade zu widmen. Diesbezüglich sei auf die einleitenden Bemerkungen auf den Seiten 8 und 9 verwiesen.

5 Zusammenfassung

Unter Anwendung von AT₁-Rezeptor-Blockern konnte in adipösen Maus- und Rattenmodellen eine Senkung des Körpergewichts beobachtet werden. Allerdings ist wenig über gewichtsregulierende Effekte bei bestehendem Übergewicht bekannt, da die medikamentösen Interventionen zumeist gleichzeitig mit der hochkalorischen Fütterung begann, was nicht der Situation der Patienten im klinischen Alltag entspricht. Aus diesem Grund wurden spontan hypertensive Ratten neben dem üblichen Haltungsfutter mit einer hochkalorischen Cafeteria-Diät (CD) gefüttert und erst in der 20. Woche mit folgenden Medikamenten täglich 18 Wochen lang behandelt, während die Fütterung beibehalten wurde: Telmisartan (8mg/kg_{Körpergewicht}), Amlodipin (10mg/kg_{Körpergewicht}) oder Telmisartan + Amlodipin (2+8mg/kg_{Körpergewicht}). Adipöse und schlanke Kontrollen, je mit und ohne Cafeteria-Diät, erhielten eine entsprechende Menge Vehikel. Infolge der Cafeteria-Diät kam es zu allen wesentlichen Risikofaktoren des MetS: Bluthochdruck, Übergewicht, Insulin- und Leptinresistenz. Nur Telmisartan reduzierte den CD-induzierten Gewichtsanstieg und die viszerale Fettmasse. Die Energieaufnahme war hierbei sogar leicht erhöht, während mittels indirekter Kalorimetrie ein erniedrigter RER nachgewiesen wurde, der auf eine erhöhte Fettoxidation hinweist. Im Leptinresistenz-Test war die Energieaufnahme nach subkutaner Leptinapplikation im Vergleich zur adipösen Kontrolle erniedrigt, was für eine teilweise Verbesserung der Leptinsensitivität spricht. Weiter kam es nur unter Telmisartan zu einer Senkung der Plasmaspiegel von Triglyceriden, freien Fettsäuren und LDL. Der Glukosestoffwechsel war vor allem unter Telmisartan, aber auch unter der Kombination Telmisartan + Amlodipin verbessert. Die Blutdruckreduktion war unter allen Behandlungsgruppen vergleichbar.

Insgesamt belegt die vorliegende Studie gewichtssenkende Effekte bei bestehender Adipositas unter therapeutischer Telmisartan-Behandlung bei Ratten. Diese wurden erst unter Anwendung hoher Dosierungen beobachtet und waren blutdruckunabhängig. Infolgedessen ergibt sich ein interessanter ganzheitlicher Ansatz zur medikamentösen Therapie des MetS.

6 Literaturverzeichnis

- Alberti, K. G., R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. James, C. M. Loria, and S. C. Smith, Jr. 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**:1640-1645.
- Araki, K., T. Masaki, I. Katsuragi, K. Tanaka, T. Kakuma, and H. Yoshimatsu. 2006. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice. *Hypertension* **48**:51-57.
- Banks, W. A., C. R. DiPalma, and C. L. Farrell. 1999. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* **20**:1341-1345.
- Banks, W. A. and C. L. Farrell. 2003. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**:E10-15.
- Barseghian, G. and R. Levine. 1980. Effect of corticosterone on insulin and glucagon secretion by the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology* **106**:547-552.
- Benson, S. C., H. A. Pershadsingh, C. I. Ho, A. Chittiboyina, P. Desai, M. Pravenec, N. Qi, J. Wang, M. A. Avery, and T. W. Kurtz. 2004. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension* **43**:993-1002.
- Boustany, C. M., K. Bharadwaj, A. Daugherty, D. R. Brown, D. C. Randall, and L. A. Cassis. 2004. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**:R943-949.
- Brink, M., J. Wellen, and P. Delafontaine. 1996. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *J Clin Invest* **97**:2509-2516.
- Burgos-Ramos, E., J. A. Chowen, E. Arilla-Ferreiro, S. Canelles, J. Argente, and V. Barrios. 2011. Chronic central leptin infusion modifies the response to acute central insulin injection by reducing the interaction of the insulin receptor with IRS2 and increasing its association with SOCS3. *J Neurochem* **117**:175-185.
- Cabassi, A., P. Coghi, P. Govoni, E. Barouhiel, E. Speroni, S. Cavazzini, A. M. Cantoni, R. Scandroglio, and E. Fiaccadori. 2005. Sympathetic modulation

- by carvedilol and losartan reduces angiotensin II-mediated lipolysis in subcutaneous and visceral fat. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:2888-2897.
- Cabezas, F., J. Lagos, C. Cespedes, C. P. Vio, M. Bronfman, and M. P. Marzolo. 2011. Megalin/LRP2 expression is induced by peroxisome proliferator-activated receptor -alpha and -gamma: implications for PPARs' roles in renal function. *PLoS One* **6**:e16794.
- Cassis, L. A., V. L. English, K. Bharadwaj, and C. M. Boustany. 2004. Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. *Endocrinology* **145**:169-174.
- Chen, L., S. M. Kim, C. Eisner, M. Oppermann, Y. Huang, D. Mizel, L. Li, M. Chen, M. L. Sequeira Lopez, L. S. Weinstein, R. A. Gomez, J. Schnermann, and J. P. Briggs. 2010. Stimulation of renin secretion by angiotensin II blockade is Gsalpha-dependent. *J Am Soc Nephrol* **21**:986-992.
- Chodobski, A. and J. Szmydynger-Chodobska. 2001. Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microsc Res Tech* **52**:65-82.
- Clasen, R., M. Schupp, A. Foryst-Ludwig, C. Sprang, M. Clemenz, M. Krikov, C. Thone-Reineke, T. Unger, and U. Kintscher. 2005. PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension* **46**:137-143.
- Cole, B. K., S. R. Keller, R. Wu, J. D. Carter, J. L. Nadler, and C. S. Nunemaker. 2010. Valsartan protects pancreatic islets and adipose tissue from the inflammatory and metabolic consequences of a high-fat diet in mice. *Hypertension* **55**:715-721.
- Davani, B., N. Portwood, G. Bryzgalova, M. K. Reimer, T. Heiden, C. G. Ostenson, S. Okret, B. Ahren, S. Efendic, and A. Khan. 2004. Aged transgenic mice with increased glucocorticoid sensitivity in pancreatic beta-cells develop diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 1**:S51-59.
- de Champlain, J., M. Karas, L. Assouline, R. Nadeau, A. R. LeBlanc, B. Dube, and P. Larochelle. 2007. Effects of valsartan or amlodipine alone or in combination on plasma catecholamine levels at rest and during standing in hypertensive patients. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **9**:168-178.
- de Kloet, A. D., E. G. Krause, and S. C. Woods. 2010. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* **100**:525-534.
- de Souza, C. J., M. Eckhardt, K. Gagen, M. Dong, W. Chen, D. Laurent, and B. F. Burkey. 2001. Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* **50**:1863-1871.
- Delaunay, F., A. Khan, A. Cintra, B. Davani, Z. C. Ling, A. Andersson, C. G. Ostenson, J. Gustafsson, S. Efendic, and S. Okret. 1997. Pancreatic beta

- cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J Clin Invest* **100**:2094-2098.
- Delles, C., U. Raff, A. Mimran, J. P. Fauvel, L. M. Ruilope, and R. E. Schmieder. 2008. Effects of telmisartan and ramipril on adiponectin and blood pressure in patients with type 2 diabetes. *Am J Hypertens* **21**:1330-1336.
- Dendorfer, A., P. Dominiak, K. Tempel, and W. Raasch. 2005. Peripheral sympatholytic actions of four AT1 antagonists: are they relevant for long-term antihypertensive efficacy? *J Hypertens* **23**:1861-1867.
- Dendorfer, A., W. Raasch, K. Tempel, and P. Dominiak. 2002a. Comparison of the vascular and antiadrenergic activities of four angiotensin II type 1 antagonists in the pithed rat. *J Hypertens* **20**:1151-1156.
- Dendorfer, A., A. Thornagel, W. Raasch, O. Grisk, K. Tempel, and P. Dominiak. 2002b. Angiotensin II induces catecholamine release by direct ganglionic excitation. *Hypertension* **40**:348-354.
- Dietrich, M. O., C. Spuch, D. Antequera, I. Rodal, J. G. de Yebenes, J. A. Molina, F. Bermejo, and E. Carro. 2008. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging* **29**:902-912.
- Engeli, S., J. Bohnke, K. Gorzelniak, J. Janke, P. Schling, M. Bader, F. C. Luft, and A. M. Sharma. 2005. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* **45**:356-362.
- Fellmann, L., A. R. Nascimento, E. Tibirica, and P. Bousquet. 2013. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacol Ther* **137**:331-340.
- Ferrario, C. M., J. Jessup, M. C. Chappell, D. B. Averill, K. B. Brosnihan, E. A. Tallant, D. I. Diz, and P. E. Gallagher. 2005. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation* **111**:2605-2610.
- Fluttert, M., S. Dalm, and M. S. Oitzl. 2000. A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. *Lab Anim* **34**:372-378.
- Fournier, D., F. C. Luft, M. Bader, D. Ganten, and M. A. Andrade-Navarro. 2012. Emergence and evolution of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Mol Med (Berl)* **90**:495-508.
- Frederich, R. C., A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B. B. Lowell, and J. S. Flier. 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* **1**:1311-1314.
- Friedman, J. M. 2009. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. *Am J Clin Nutr* **89**:973S-979S.

- Fyhrquist, F. and O. Saijonmaa. 2008. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* **264**:224-236.
- Geissler, C. 2013. Mechanistische Untersuchungen zum Einfluss von AT1-Antagonisten auf die Leptinsensitivität. Bachelorarbeit, Lübeck.
- Gelling, R. W., G. J. Morton, C. D. Morrison, K. D. Niswender, M. G. Myers, Jr., C. J. Rhodes, and M. W. Schwartz. 2006. Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes. *Cell Metab* **3**:67-73.
- Gembardt, F., S. Heringer-Walther, J. H. van Esch, A. Sterner-Kock, R. van Veghel, T. H. Le, I. M. Garrelds, T. M. Coffman, A. H. Danser, H. P. Schultheiss, and T. Walther. 2008. Cardiovascular phenotype of mice lacking all three subtypes of angiotensin II receptors. *FASEB J* **22**:3068-3077.
- Giacchetti, G., E. Faloi, B. Mariniello, C. Sardu, C. Gatti, M. A. Camilloni, M. Guerrieri, and F. Mantero. 2002. Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens* **15**:381-388.
- Grundy, S. M. 2008. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**:629-636.
- Guo, F., X. L. Chen, F. Wang, X. Liang, Y. X. Sun, and Y. J. Wang. 2011. Role of angiotensin II type 1 receptor in angiotensin II-induced cytokine production in macrophages. *J Interferon Cytokine Res* **31**:351-361.
- Halaas, J. L., C. Boozer, J. Blair-West, N. Fidahusein, D. A. Denton, and J. M. Friedman. 1997. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:8878-8883.
- Hama, H., A. Saito, T. Takeda, A. Tanuma, Y. Xie, K. Sato, J. J. Kazama, and F. Gejyo. 2004. Evidence indicating that renal tubular metabolism of leptin is mediated by megalin but not by the leptin receptors. *Endocrinology* **145**:3935-3940.
- Hammarstedt, A., C. X. Andersson, V. Rotter Sopasakis, and U. Smith. 2005. The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**:65-75.
- Harte, A., P. McTernan, R. Chetty, S. Coppack, J. Katz, S. Smith, and S. Kumar. 2005. Insulin-mediated upregulation of the renin angiotensin system in human subcutaneous adipocytes is reduced by rosiglitazone. *Circulation* **111**:1954-1961.
- He, H., D. Yang, L. Ma, Z. Luo, S. Ma, X. Feng, T. Cao, Z. Yan, D. Liu, M. Tepel, and Z. Zhu. 2010. Telmisartan prevents weight gain and obesity through

- activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways. *Hypertension* **55**:869-879.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**:1026-1030.
- Hill, R. A., S. Margetic, G. G. Pegg, and C. Gazzola. 1998. Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* **22**:765-770.
- Ikeda, T., K. Kajita, W. Zhiliang, T. Hanamoto, I. Mori, K. Fujioka, H. Okada, T. Fujikake, Y. Uno, H. Morita, I. Nagano, Y. Takahashi, and T. Ishizuka. 2009. Effects of phorbol ester-sensitive PKC (c/nPKC) activation on the production of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *IUBMB Life* **61**:644-650.
- Iwai, M., Y. Tomono, S. Inaba, H. Kanno, I. Senba, M. Mogi, and M. Horiuchi. 2009. AT2 receptor deficiency attenuates adipocyte differentiation and decreases adipocyte number in atherosclerotic mice. *Am J Hypertens* **22**:784-791.
- Jequier, E. 2002. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* **967**:379-388.
- Jöhren, O. and J. M. Saavedra. 1996. Expression of AT1A and AT1B angiotensin II receptor messenger RNA in forebrain of 2-wk-old rats. *Am J Physiol* **271**:E104-112.
- Jones, L. J., S. T. Yue, C. Y. Cheung, and V. L. Singer. 1998. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal Biochem* **265**:368-374.
- Kadowaki, T., T. Yamauchi, and N. Kubota. 2008. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett* **582**:74-80.
- Kassi, E., P. Pervanidou, G. Kaltsas, and G. Chrousos. 2011. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med* **9**:48.
- Kieffer, T. J. and J. F. Habener. 2000. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**:E1-E14.
- Kim, S., J. Whelan, K. Claycombe, D. B. Reath, and N. Moustaid-Moussa. 2002. Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism. *J Nutr* **132**:1135-1140.
- Kintscher, U., A. Foryst-Ludwig, and T. Unger. 2008. Inhibiting angiotensin type 1 receptors as a target for diabetes. *Expert Opin Ther Targets* **12**:1257-1263.

- Kintscher, U. and T. Unger. 2005. Vascular protection in diabetes: a pharmacological view of angiotensin II type 1 receptor blockers. *Acta Diabetol* **42 Suppl 1**:S26-32.
- Koch, C., R. A. Augustine, J. Steger, G. K. Ganjam, J. Benzler, C. Pracht, C. Lowe, M. W. Schwartz, P. R. Shepherd, G. M. Anderson, D. R. Grattan, and A. Tups. 2010. Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity. *J Neurosci* **30**:16180-16187.
- Kohya, T., H. Yokoshiki, N. Tohse, M. Kanno, H. Nakaya, H. Saito, and A. Kitabatake. 1995. Regression of left ventricular hypertrophy prevents ischemia-induced lethal arrhythmias. Beneficial effect of angiotensin II blockade. *Circ Res* **76**:892-899.
- Konner, A. C. and J. C. Bruning. 2012. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab* **16**:144-152.
- Kouyama, R., T. Suganami, J. Nishida, M. Tanaka, T. Toyoda, M. Kiso, T. Chiwata, Y. Miyamoto, Y. Yoshimasa, A. Fukamizu, M. Horiuchi, Y. Hirata, and Y. Ogawa. 2005. Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology* **146**:3481-3489.
- Lambillotte, C., P. Gilon, and J. C. Henquin. 1997. Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J Clin Invest* **99**:414-423.
- Larsen, P. J., P. B. Jensen, R. V. Sorensen, L. K. Larsen, N. Vrang, E. M. Wulff, and K. Wassermann. 2003. Differential influences of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and -alpha on food intake and energy homeostasis. *Diabetes* **52**:2249-2259.
- Lau, M. 2012. Prävention einer Leptinresistenz durch Blockade der Angiotensin II (AT1)-Rezeptoren im Rahmen einer Diät induzierten Adipositas bei Ratten. *Med. Diss., Lübeck*.
- Leite, L. H., A. C. Lacerda, U. Marubayashi, and C. C. Coimbra. 2006. Central angiotensin AT1-receptor blockade affects thermoregulation and running performance in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**:R603-607.
- Leung, P. S. 2007. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol* **580**:31-37.
- Li, L., Z. G. Zhang, H. Lei, C. Wang, L. P. Wu, J. Y. Wang, F. Y. Fu, W. G. Zhu, and L. L. Wu. 2013. Angiotensin II reduces cardiac AdipoR1 expression through AT1 receptor/ROS/ERK1/2/c-Myc pathway. *PLoS One* **8**:e49915.
- Lou, P. H., G. Yang, L. Huang, Y. Cui, T. Pourbahrami, G. K. Radda, C. Li, and W. Han. 2010. Reduced body weight and increased energy expenditure in

- transgenic mice over-expressing soluble leptin receptor. *PLoS One* **5**:e11669.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Lu, Q., Y. Z. Zhu, and P. T. Wong. 2005. Neuroprotective effects of candesartan against cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport* **16**:1963-1967.
- Lucassen, E. A. and G. Cizza. 2012. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Obesity, and Chronic Stress Exposure: Sleep and the HPA Axis in Obesity. *Curr Obes Rep* **1**:208-215.
- Ma, T. K., K. K. Kam, B. P. Yan, and Y. Y. Lam. 2010. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *Br J Pharmacol* **160**:1273-1292.
- Mallat, S. G. 2012. What is a preferred angiotensin II receptor blocker-based combination therapy for blood pressure control in hypertensive patients with diabetic and non-diabetic renal impairment? *Cardiovasc Diabetol* **11**:32.
- Marshall, T. G., R. E. Lee, and F. E. Marshall. 2006. Common angiotensin receptor blockers may directly modulate the immune system via VDR, PPAR and CCR2b. *Theor Biol Med Model* **3**:1.
- Marzolo, M. P. and P. Farfan. 2011. New insights into the roles of megalin/LRP2 and the regulation of its functional expression. *Biol Res* **44**:89-105.
- Matsuzawa, Y. 2008. The role of fat topology in the risk of disease. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 7**:S83-92.
- Matsuzawa, Y. 2010. Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**:131-141.
- McAlister, E. D. and D. A. Van Vugt. 2004. Effect of leptin administration versus re-feeding on hypothalamic neuropeptide gene expression in fasted male rats. *Can J Physiol Pharmacol* **82**:1128-1134.
- Miesel, A., H. Müller-Fielitz, O. Jöhren, F. M. Vogt, and W. Raasch. 2012. Double blockade of angiotensin II (AT(1))-receptors and ACE does not improve weight gain and glucose homeostasis better than single-drug treatments in obese rats. *Br J Pharmacol* **165**:2721-2735.
- Miesel, A., H. Müller, M. Thermann, M. Heidbreder, P. Dominiak, and W. Raasch. 2010. Overfeeding-induced obesity in spontaneously hypertensive rats: an animal model of the human metabolic syndrome. *Ann Nutr Metab* **56**:127-142.

- Miyazaki, M. and S. Takai. 2006. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. *J Pharmacol Sci* **100**:391-397.
- Mohd-Radzman, N. H., W. I. Ismail, Z. Adam, S. S. Jaapar, and A. Adam. 2013. Potential Roles of Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**:718049.
- Morton, G. J. and M. W. Schwartz. 2011. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev* **91**:389-411.
- Müller-Fielitz, H., J. Landolt, M. Heidbreder, S. Werth, F. M. Vogt, O. Jöhren, and W. Raasch. 2012a. Improved insulin sensitivity after long-term treatment with AT1 blockers is not associated with PPARgamma target gene regulation. *Endocrinology* **153**:1103-1115.
- Müller-Fielitz, H., M. Lau, O. Jöhren, F. Stellmacher, M. Schwaninger, and W. Raasch. 2012b. Blood pressure response to angiotensin II is enhanced in obese Zucker rats and is attributed to an aldosterone-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* **166**:2417-2429.
- Müller-Fielitz, H., A. Markert, C. Wittmershaus, F. Pahlke, O. Jöhren, and W. Raasch. 2011. Weight loss and hypophagia after high-dose AT1-blockade is only observed after high dosing and depends on regular leptin signalling but not blood pressure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **383**:373-384.
- Müller-Fielitz, H. and W. Raasch. 2012. Angiotensin II Impairs Glucose Utilization in Obese Zucker Rats by Increasing HPA Activity via an Adrenal-dependent Mechanism. *Horm Metab Res*.
- Müller-Fielitz, H. and W. Raasch. 2013. Angiotensin II impairs glucose utilization in obese Zucker rats by increasing HPA activity via an adrenal-dependent mechanism. *Horm Metab Res* **45**:173-180.
- Müller, H., J. Kröger, O. Jöhren, S. Szymczak, M. Bader, P. Dominiak, and W. Raasch. 2010. Stress sensitivity is increased in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *J Endocrinol* **204**:85-92.
- Müller, H., N. Schweitzer, O. Jöhren, P. Dominiak, and W. Raasch. 2007. Angiotensin II stimulates the reactivity of the pituitary-adrenal axis in leptin-resistant Zucker rats, thereby influencing the glucose utilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**:E802-810.
- Nakao, Y. M., T. Miyawaki, S. Yasuno, K. Nakao, S. Tanaka, M. Ida, M. Hirata, M. Kasahara, K. Hosoda, and K. Ueshima. 2012. Intra-abdominal fat area is a predictor for new onset of individual components of metabolic syndrome: MEtabolic syndRome and abdominalL ObesiTy (MERLOT study). *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **88**:454-461.

- Nishiyama, M., S. Makino, K. Asaba, and K. Hashimoto. 1999. Leptin effects on the expression of type-2 CRH receptor mRNA in the ventromedial hypothalamus in the rat. *J Neuroendocrinol* **11**:307-314.
- Nolan, C. J., M. S. Madiraju, V. Delghingaro-Augusto, M. L. Peyot, and M. Prentki. 2006. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* **55 Suppl 2**:S16-23.
- Noma, K., K. Toshinai, K. Koshinaka, and M. Nakazato. 2011. Telmisartan suppresses food intake in mice via the melanocortin pathway. *Obes Res Clin Pract* **5**:e79-e156.
- Oh, Y. B., J. H. Kim, B. M. Park, B. H. Park, and S. H. Kim. 2012. Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1-7). *Peptides* **37**:79-85.
- Ohno, K., Y. Amano, H. Kakuta, T. Niimi, S. Takakura, M. Orita, K. Miyata, H. Sakashita, M. Takeuchi, I. Komuro, J. Higaki, M. Horiuchi, S. Kim-Mitsuyama, Y. Mori, R. Morishita, and S. Yamagishi. 2011. Unique "delta lock" structure of telmisartan is involved in its strongest binding affinity to angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **404**:434-437.
- Ohshima, K., M. Mogi, F. Jing, J. Iwanami, K. Tsukuda, L. J. Min, A. Ogimoto, B. Dahlof, U. M. Steckelings, T. Unger, J. Higaki, and M. Horiuchi. 2012. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation ameliorates insulin resistance in type 2 diabetes mice with PPARgamma activation. *PLoS One* **7**:e48387.
- Ouchi, N., J. L. Parker, J. J. Lugus, and K. Walsh. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**:85-97.
- Padwal, R. and A. Laupacis. 2004. Antihypertensive therapy and incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* **27**:247-255.
- Palkovits, M. and M. J. Brownstein. 1988. Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier, New York.
- Paul, M., A. Poyan Mehr, and R. Kreutz. 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* **86**:747-803.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone, and F. Collins. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **269**:540-543.
- Phillips, L. K. and J. B. Prins. 2008. The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* **10**:156-164.
- Qatanani, M. and M. A. Lazar. 2007. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* **21**:1443-1455.

- Raasch, W., P. Dominiak, A. Ziegler, and A. Dendorfer. 2004. Reduction of vascular noradrenaline sensitivity by AT1 antagonists depends on functional sympathetic innervation. *Hypertension* **44**:346-351.
- Raasch, W., C. Wittmershaus, A. Dendorfer, I. Voges, F. Pahlke, C. Dodt, P. Dominiak, and O. Jöhren. 2006. Angiotensin II inhibition reduces stress sensitivity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* **147**:3539-3546.
- Rayner, D. V. and P. Trayhurn. 2001. Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J Mol Med (Berl)* **79**:8-20.
- Reaven, G. M. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**:1595-1607.
- Ribeiro-Oliveira, A., Jr., A. I. Nogueira, R. M. Pereira, W. W. Boas, R. A. Dos Santos, and A. C. Simoes e Silva. 2008. The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag* **4**:787-803.
- Rong, X., Y. Li, K. Ebihara, M. Zhao, J. Naowaboot, T. Kusakabe, K. Kuwahara, M. Murray, and K. Nakao. 2010. Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia*.
- Ronti, T., G. Lupattelli, and E. Mannarino. 2006. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* **64**:355-365.
- Sahu, A. and A. S. Metlakunta. 2005. Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase-phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway of leptin signalling is impaired following chronic central leptin infusion. *J Neuroendocrinol* **17**:720-726.
- Scarpace, P. J. and N. Tumer. 2001. Peripheral and hypothalamic leptin resistance with age-related obesity. *Physiol Behav* **74**:721-727.
- Scheen, A. J. 2004. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs* **64**:2537-2565.
- Scholze, J., E. Alegria, C. Ferri, S. Langham, W. Stevens, D. Jeffries, and K. Uhl-Hochgraeber. 2010. Epidemiological and economic burden of metabolic syndrome and its consequences in patients with hypertension in Germany, Spain and Italy; a prevalence-based model. *BMC Public Health* **10**:529.
- Schupp, M., M. Clemenz, R. Gineste, H. Witt, J. Janke, S. Helleboid, N. Hennuyer, P. Ruiz, T. Unger, B. Staels, and U. Kintscher. 2005. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes* **54**:3442-3452.

- Schupp, M., J. Janke, R. Clasen, T. Unger, and U. Kintscher. 2004. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation* **109**:2054-2057.
- Schupp, M., L. D. Lee, N. Frost, S. Umbreen, B. Schmidt, T. Unger, and U. Kintscher. 2006. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by losartan metabolites. *Hypertension* **47**:586-589.
- Schutz, Y. 1995. The basis of direct and indirect calorimetry and their potentials. *Diabetes Metab Rev* **11**:383-408.
- Shibata, R., N. Ouchi, and T. Murohara. 2009. Adiponectin and cardiovascular disease. *Circ J* **73**:608-614.
- Silveira, L. S., P. A. Monteiro, M. Antunes Bde, P. M. Seraphim, R. A. Fernandes, D. G. Christofaro, and I. F. Freitas Junior. 2013. Intra-abdominal fat is related to metabolic syndrome and non-alcoholic fat liver disease in obese youth. *BMC Pediatr* **13**:115.
- Sivitz, W. I., B. D. Fink, D. A. Morgan, J. M. Fox, P. A. Donohoue, and W. G. Haynes. 1999. Sympathetic inhibition, leptin, and uncoupling protein subtype expression in normal fasting rats. *Am J Physiol* **277**:E668-677.
- Skurk, T., C. Alberti-Huber, C. Herder, and H. Hauner. 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **92**:1023-1033.
- Skurk, T., V. van Harmelen, W. F. Blum, and H. Hauner. 2005. Angiotensin II promotes leptin production in cultured human fat cells by an ERK1/2-dependent pathway. *Obes Res* **13**:969-973.
- Smith, M. M. and C. T. Minson. 2012. Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity. *J Physiol* **590**:1787-1801.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**:503-517.
- Stegbauer, J. and T. M. Coffman. 2011. New insights into angiotensin receptor actions: from blood pressure to aging. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **20**:84-88.
- Sugimoto, K., N. R. Qi, L. Kazdova, M. Pravenec, T. Ogihara, and T. W. Kurtz. 2006. Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis. *Hypertension* **47**:1003-1009.
- Takahara, A., Y. Nakamura, H. Wagatsuma, S. Aritomi, A. Nakayama, Y. Satoh, Y. Akie, and A. Sugiyama. 2009. Long-term blockade of L/N-type Ca(2+) channels by cilnidipine ameliorates repolarization abnormality of the canine hypertrophied heart. *Br J Pharmacol* **158**:1366-1374.

- Takemori, K., T. Inoue, and H. Ito. 2013. Effects of angiotensin II type 1 receptor blocker and adiponectin on adipocyte dysfunction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lipids Health Dis* **12**:108.
- Tanabe, A., M. Naruse, Y. Hara, A. Sato, K. Tsuchiya, T. Nishikawa, T. Imaki, and K. Takano. 2004. Aldosterone antagonist facilitates the cardioprotective effects of angiotensin receptor blockers in hypertensive rats. *J Hypertens* **22**:1017-1023.
- Underwood, P. C. and G. K. Adler. 2013. The renin angiotensin aldosterone system and insulin resistance in humans. *Curr Hypertens Rep* **15**:59-70.
- Van Heek, M., D. S. Compton, C. F. France, R. P. Tedesco, A. B. Fawzi, M. P. Graziano, E. J. Sybertz, C. D. Strader, and H. R. Davis, Jr. 1997. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* **99**:385-390.
- Vitzthum, F., G. Geiger, H. Bisswanger, H. Brunner, and J. Bernhagen. 1999. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal Biochem* **276**:59-64.
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**:1796-1808.
- Weyer, C., K. Hanson, C. Bogardus, and R. E. Pratley. 2000. Long-term changes in insulin action and insulin secretion associated with gain, loss, regain and maintenance of body weight. *Diabetologia* **43**:36-46.
- Wosik, K., R. Cayrol, A. Dodelet-Devillers, F. Berthelet, M. Bernard, R. Moundjian, A. Bouthillier, T. L. Reudelhuber, and A. Prat. 2007. Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci* **27**:9032-9042.
- Xia, Q. and S. F. Grant. 2013. The genetics of human obesity. *Ann N Y Acad Sci* **1281**:178-190.
- Xu, Y. Z., X. Zhang, L. Wang, F. Zhang, Q. Qiu, M. L. Liu, G. R. Zhang, and X. L. Wu. 2013. An increased circulating angiotensin II concentration is associated with hypoadiponectinemia and postprandial hyperglycemia in men with nonalcoholic fatty liver disease. *Intern Med* **52**:855-861.
- Zanchi, A., A. G. Dulloo, C. Perregaux, J. P. Montani, and M. Burnier. 2007. Telmisartan prevents the glitazone-induced weight gain without interfering with its insulin-sensitizing properties. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**:E91-95.

- Zeng, J., B. W. Patterson, S. Klein, D. R. Martin, S. Dagogo-Jack, W. M. Kohrt, S. B. Miller, and M. Landt. 1997. Whole body leptin kinetics and renal metabolism in vivo. *Am J Physiol* **273**:E1102-1106.
- Zhou, M. S., I. H. Schulman, and Q. Zeng. 2012. Link between the renin-angiotensin system and insulin resistance: implications for cardiovascular disease. *Vasc Med* **17**:330-341.
- Ziemke, F. and C. S. Mantzoros. 2010. Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr* **91**:258S-261S.
- Zorad, S., J. T. Dou, J. Benicky, D. Hutanu, K. Tybitanclova, J. Zhou, and J. M. Saavedra. 2006. Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *Eur J Pharmacol* **552**:112-122.

7 Anlagen

7.1 Anhang

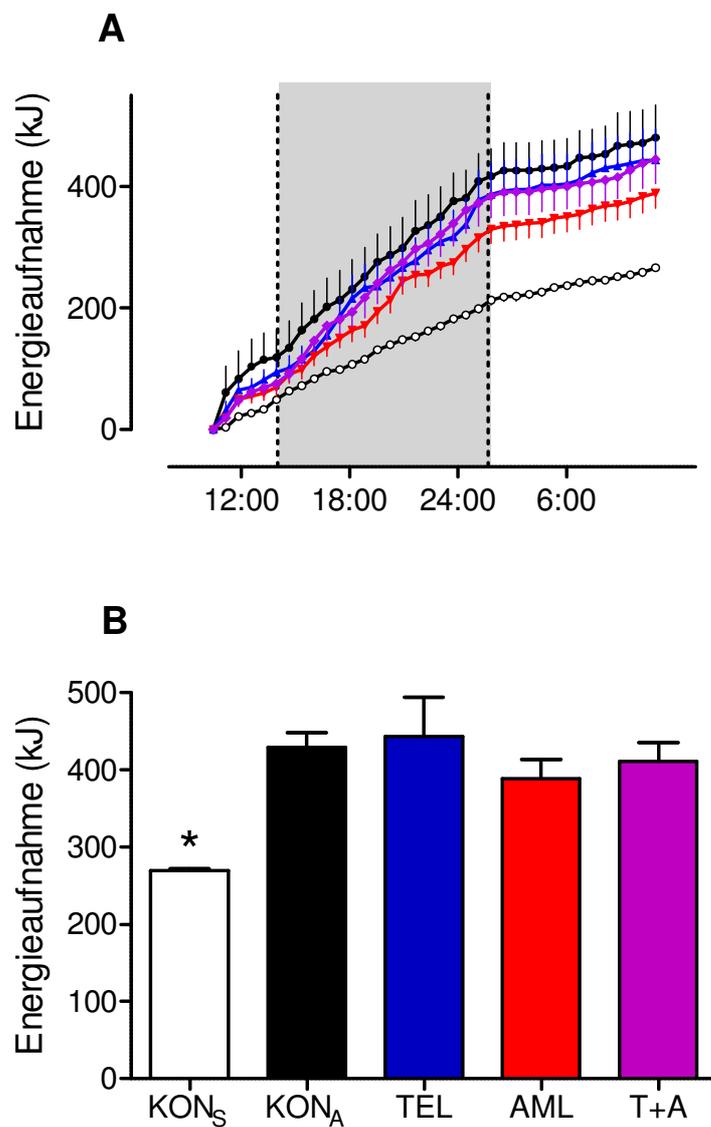


Abb. 7-1: Energieaufnahme im Verlauf (A) und Gesamtenergieaufnahme (B) während der indirekten Kalorimetrie; helle Balken: Tagphase (inaktiv), dunkle Balken: Nachtphase (aktiv); $MW \pm SEM$, $n=11-12$. * $p < 0.05$ vs. KON_A ; \square : KON_S , \bullet : KON_A , \blacktriangle : TEL, \blacktriangledown : AML, \blacklozenge : T+A.

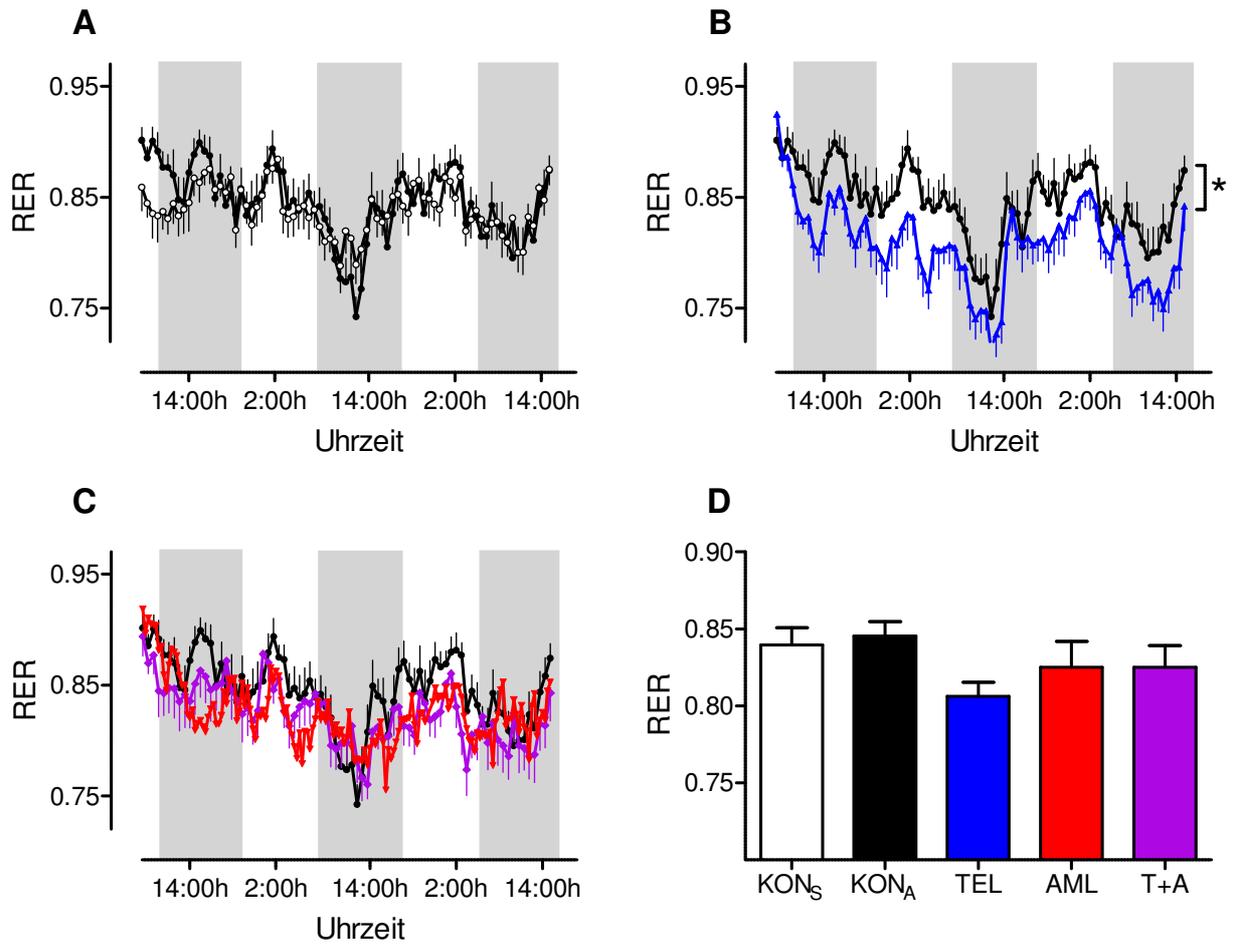


Abb. 7-2: RER im Verlauf des LRT; KON_S vs. KON_A (A), KON_A vs. TEL (B), KON_A vs. AML vs. T+A (C); gemittelte RERs über den in A-C abgebildeten Zeitraum (D); helle Balken: Tagphase (inaktiv), dunkle Balken: Nachtphase (aktiv). $MW \pm SEM$, $n=11-12$. * $p < 0.05$ vs. KON_A ; \square : KON_S , \bullet : KON_A , \blacktriangle : TEL, \blacktriangledown : AML, \blacklozenge : T+A.

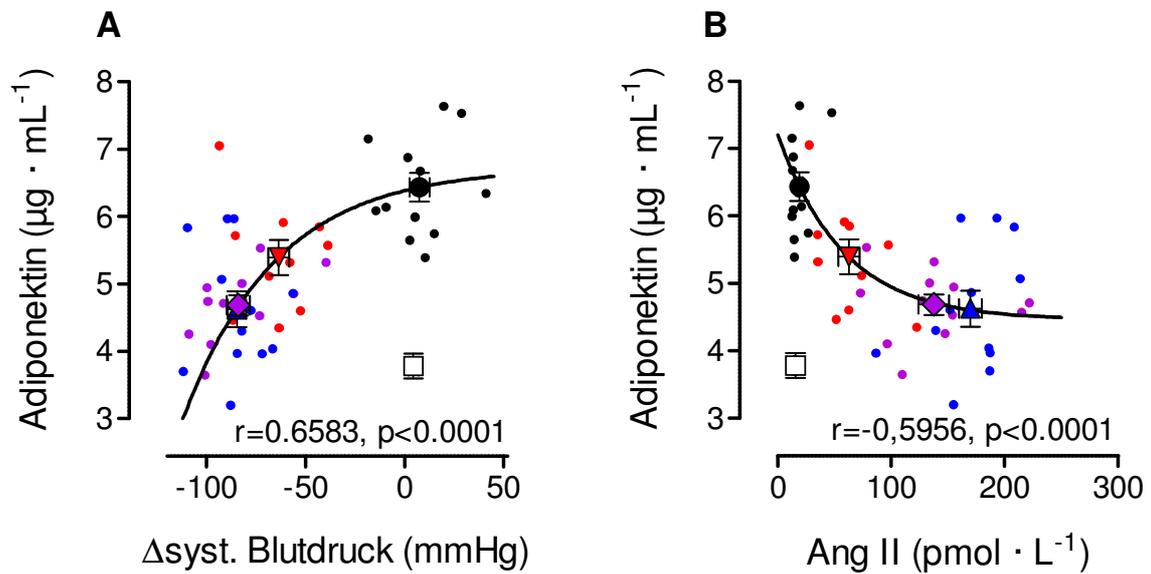


Abb. 7-3: Korrelation von Adiponektin und Senkung des systolischen Blutdrucks (A) sowie Adiponektin und Ang II (B). KON_S ist jeweils von der Berechnung von r ausgeschlossen worden; $\text{MW} \pm \text{SEM}$, $n=10-12$. \square : KON_S , \bullet : KON_A , \blacktriangle : TEL, \blacktriangledown : AML, \blacklozenge : T+A.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Überblick über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	3
Abb. 2-1: Übersicht der zwei Hauptstudienabschnitte	15
Abb. 2-2: Exemplarische Auswertung der noninvasiven Blutdruckmessung	18
Abb. 3-1: DWK der Dosisfindungsstudie	30
Abb. 3-2: Syst. Blutdruck, HF, LVI, Korrelation zwischen LVI und Blutdruck.....	32
Abb. 3-3: AngII-Plasmaspiegel nach langfristiger Medikamentenapplikation	33
Abb. 3-4: Körpergewichtsentwicklung, Fettvolumen, MRT-Schichtbilder	35
Abb. 3-5: Energie- und Wasseraufnahme	37
Abb. 3-6: Glukose und Insulin im Rahmen des OGTT	39
Abb. 3-7: Glukose und Insulin im Rahmen des ITT	40
Abb. 3-8: Ermittelte Bewegungsaktivität	42
Abb. 3-9: Gemittelte RER und VO ₂ im Rahmen der indirekten Kalorimetrie	43
Abb. 3-10: Verlauf von RER und VO ₂ im Rahmen der indirekten Kalorimetrie	44
Abb. 3-11: Verlauf, AUC und C _{max} von Leptin im LRT.....	47
Abb. 3-12: Energieaufnahme im Rahmen des LRT.....	48
Abb. 7-1: Energieaufnahme im Rahmen der indirekten Kalorimetrie.....	77
Abb. 7-2: RER im Rahmen des LRT	78
Abb. 7-3: Korrelation zwischen Adiponektin und Blutdruck/AngII	79

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Nährstoffzusammensetzung der angebotenen Diäten.	13
Tab. 2-2: Blutstabilisatoren für nachzuweisenden Substanzen	16
Tab. 2-3: Nukleotidsequenzen der eingesetzten Primer.....	26
Tab. 3-1: Morphologische Indices und viszerales/subkutanes Fett	34
Tab. 3-2: Kumulative Energie- und Wasseraufnahme	36
Tab. 3-3: Glukose, Insulin, Glukagon, HOMA-Index.....	38
Tab. 3-4: Triglyceride, Freie Fettsäuren, Gesamtcholesterol, HDL, LDL.....	41
Tab. 3-5: Leptin- und Adiponektinplasmakonzentrationen	45
Tab. 3-6: Orexigene und anorexigene Peptide.....	49

7.4 Substanzen und erworbene Lösungen

10 X TAE-Puffer	Invitrogen (Kanada)
2-Methylbutan	Sigma (Deutschland)
Agarose NEEO	Carl Roth (Deutschland)
Amlodipin	Boehringer-Ingelheim (Deutschland)
Anti-UCP-1 (C-17)	Santa Cruz (Deutschland)
Bestatin	Sigma (Deutschland)
Cell Lysis Buffer (CLB)	Cell Signalling (Deutschland)
Citronensäure Monohydrat	Merck (Deutschland)
Diethylpyrocarbinat (DEPC)	Sigma (Deutschland)
Di-Stickstoffoxid (in Flaschen)	Lokaler Gas-Lieferant
EDTA	Merck (Deutschland)
Elutions-Puffer	Applied Biosystems (UK)
Ethanol p.A. 98%	J. T. Baker (Holland)
Ethylacetat	J. T. Baker (Holland)
Flüssiger Stickstoff	Lokaler Lieferant
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck (Deutschland)
Gel-Marker DNA Molekular Weight	Roche (Schweiz)
Leptin (Ratte) 97%	R&D Systems (USA)
Glukose-Losung 50%; 100ml	Delta Select (Deutschland)
Immobilon Transfer Membranes	Millipore (Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (Deutschland)
Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat (40 mM)	Merck (Deutschland)
Kochsalz-Losung 0,9%; steril	Berlin-Chemie (Deutschland)
Kupfer (II)-Sulfat-Pentahydrat (100 mM)	Merck (Deutschland)
Methanol	J. T. Baker (Holland)
Na-Acetat	Merck (Deutschland)
Na-EDTA-Losung (0,5 M; pH 8,0)	Invitrogen (Kanada)
Natriumcarbonat (2% in NaOH)	Fluka (Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck (Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck (Deutschland)
Nucleic Acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems (UK)

NuPage Antioxidant	Invitrogen (Deutschland)
NuPage 4-12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen (Deutschland)
NuPage LDS Sample Buffer	Invitrogen (Deutschland)
NuPage MES SDS Running Buffer	Invitrogen (Deutschland)
NuPage Transfer Buffer	Invitrogen (Deutschland)
PBS Puffer	UK-SH Campus Apotheke, Lübeck (Deutschland)
PBS-Tween Puffer	Merck (Deutschland)
PCR-Primer	Invitrogen (Deutschland)
Pentobarbital-Na-Lösung (98 mg/1,8 ml)	UK-SH Campus Apotheke, Lübeck (Deutschland)
Precision Plus Protein Standard	BioRad (Deutschland)
Proteinase K	Applied Biosystems (UK)
Rabbit-Anti-Goat-Antikörper, HRP labeled	Dako (Deutschland)
RNA Purification Wash Solution I	Applied Biosystems (UK)
RNA Purification Wash Solution II	Applied Biosystems (UK)
Sauerstoff (in Flaschen)	Lokaler Gas-Lieferant
Skim milk powder (5%)	Fluka (Deutschland)
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrat	Thermo scientific (Deutschland)
Telmisartan	Boehringer-Ingelheim (Deutschland)
Tris-Lösung (1 M; pH 7,4)	Invitrogen (Kanada)
Trockeneis	UK-SH Campus Apotheke, Lübeck (Deutschland)
Xylen-Cyanol	BioRad Laboratories (Kanada)

7.5 Rezepturen von Lösungen

Bestatin-Lösung (1 mM)	0,2 ml Bestatin-Lösung (5 mg/ml) ad 2,9 ml Aqua dest.
Bestatin-Lösung (5 mg/ml)	5 mg Bestatin ad 1 ml Aqua dest.
DEPC-Wasser	500 µl DEPC ad 500 ml Aqua dest. nach 24 h sterilisiert

EDTA-Lösung pH 6-7	900 mg Na-EDTA ad 10 ml Aqua dest. NaOH zur pH-Wert-Einstellung
Lysis-Puffer	5 ml Nucleic Acid Purification Lysis Solution ad 10 ml DEPC-Wasser
PBC-Puffer Tween	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (65 mM), Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (22 mM), Natriumchlorid (10 mM), Tween-20 (1%)
Puffer A	8,9 g di-Natriumhydrogen-Phosphat ad 100 ml Aqua dest. pH 7,4
Puffer B	0,953 g Kaliumdihydrogen-q-phosphat, 1,246 g di-Natriumhydrogenphosphat, 1,753 g Natriumchlorid, pH 7
TE-Puffer pH 7,4	100 µl 1M Tris-Puffer pH 7,4 20 µl 0,5M EDTA-Lösung pH ad 10 ml DEPC-Wasser
Tris-Puffer pH 8	20 mM Tris ad Aqua injectabilia 5M NaOH zum Puffern

7.6 Käuflich erworbene Versuchskits

7.6.1 RIA-Kits

Adiponektin	Cat. # MADP-60HK	Millipore (USA)
Angiotensin II	Kat.Nr. RB320	Euro-Diagnostica AB (Schweden)
Glukagon	Cat. # GL-32K	Millipore (USA)
Insulin	Cat. # RI-13K	Millipore (USA)
Leptin	Cat. # RL-83K	Millipore (USA)

7.6.2 Kits zur Bestimmung der Gen-Expression

Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen (Kanada)
PlatinumR SYBRR Green qPCR SuperMix-	Invitrogen (Kanada)

UDG with ROX

Quant-iT™-RiboGreen™ -RNA-Assay-Kit

Invitrogen (Kanada)

Scybr Green I Reaction System

Eurogentec SA (Deutschland)

7.7 Verbrauchsmaterialien

96-Well Optical Reaction Plate

Applied Biosystems (UK)

Baumwoll-Geschirrhandtuch

Wäscherei UK-SH (Deutschland)

Einmalspritzen Discardit™ II 1 ml und 2 ml

BD (Deutschland)

Filter tips 10, 100, 1000

Greiner bio one (Deutschland)

Filtersysteme für die Nucleic Acid Prep Station

Applied Biosystems (UK)

ABI PRISM 6100

Glukoseteststreifen für Ascensia

Bayer (Deutschland)

Haltungsfutter für Ratten und Mäuse

Altromin (Deutschland)

Kanülen BD Microlance™ 3

BD (Deutschland)

26Gx1/2" 0,45x13

Kapillarspitzen

Biozym (Deutschland)

Klebefolie, optisch klar

Sarstedt (Deutschland)

Klingen Microtome blades

Leica (Deutschland)

Mikrovetten CB 300

Sarstedt (Deutschland)

Multiply PCR Plate 96 Well

Sarstedt (Deutschland)

Nitril-Handschuhe

Nitra Tex Ansell (Deutschland)

PP-test tubes 15 ml, 50 ml CellstarR

Greiner bio one (Deutschland)

Rasierklingen

Wilkinson Sword (Deutschland)

Röhrchen

Greiner (Deutschland)

Save Lock Tubes (0,2; 0,5; 1,5 und 2 ml)

Eppendorf (Deutschland)

Tupfer Pure-Zellin

Paul Hartmann AG (Deutschland)

Vinyl-Einmalhandschuhe

Meditrade (Deutschland)

Wägepapier

Neolab (Deutschland)

7.8 Geräte

Laborgeräte:

Adsorbex SPU Sample Preparation Unit	Merck (Deutschland)
Autoklav	Dargatz (Deutschland)
Blutzuckermessgerät Ascensia ELITE XL	Bayer (Deutschland)
Eismaschine Scotsman AF 10	Scotsman (Deutschland)
Gefriermikrotom CM 3050	Leica (Deutschland)
Gefrierschrank (-80°C)	Colora (Deutschland)
Gefriertruhen (-20°C)	Bosch (Deutschland)
Guillotine	Harvard Apparatus CO. Inc. Millis. Mass (USA)
Käfige Typ IV (380x200x590mm) mit Edelstahl- deckel inkl. Klemmrahmenverschluss	EHRET Labor- und Pharmatechnik (Deutschland)
Kühlschränke (2-8°C)	Bosch (Deutschland)
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Janke & Kunkel GmbH & Co.KG (Deutschland)
pH-Meter WTW ph 531	WTW Weilheim (Deutschland)
Plexiglas-Käfige (25 x 20 x 22 cm)	Werkstatt UK-SH (Deutschland)
Rührfische	Bohlende, Lauda-Königshofen (Deutschland)
Schüttel-/Schwenkgerät REAX 2	Heidolph (Deutschland)
Stoppuhr	Junghans (Deutschland)
Ultra-Tourax 78	IKA-Werke (Deutschland)
verschiedene Laborglasgeräte	
Vortex REAX 2000	Heidolph (Deutschland)
Waagen:	
Feinwaage BP 210 D	Sartorius (Deutschland)
Tierwaage	Sartorius (Deutschland)
Waage MC1 Laboratory LC220S	Sartorius (Deutschland)
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge MIKRO 200R	Hettich (Deutschland)

Zentrifuge PCR-Labor	Jouan (Deutschland)
Geräte zur Blutdruckmessung:	
Blood pressure monitor 8002 dual	TSE Systems (Deutschland)
Piezoelemente	TSE Systems (Deutschland)
Registrierteil 130 T mit Thermopapier	Recomed (Deutschland)
Geräte zur indirekten Kalorimetrie:	
Phenomaster Home Cage System	TSE Systems (Deutschland)
Geräte zur Bestimmung der Gen-Expression:	
RNA-Isolierung: 6100 Nucleic Acid Prep Station	Applied Biosystems (USA)
PCR-Gerät: ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems (USA)
FLUOstar OPTIMA Basisgerät 2003-8143	BMG LABTECH (Deutschland)
Cycler für cDNA-Herstellung	Biometra (USA)
Geräte zur Proteinbestimmung:	
Power Ease 500	Invitrogen (Deutschland)
XCell II Blot Modul	Invitrogen (Deutschland)
XCell II SureLock Mini	Invitrogen (Deutschland)
Gel Dokumentation System:	
Gel Doc 2000 Chemi Doc	Bio Rad (USA)
Geräte für RIA-Versuche:	
Gamma-Counter: Compugamma 1282 CS	Wallac (USA)
Membranpumpe UVS 400 A	Savant (Deutschland)
Minifuge RF	Heraeus sepatech (Deutschland)
Software:	
ABI Prism	Applied Biosystems (USA)
Excel	Microsoft (USA)
Graph Pad Prism Version 5.0	GraphPad Software (USA)
MRIcro	Chris Rorden, PhD (USA)
Quantity one	Bio Rad (Deutschland)

7.9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent; Teile von 100
Δ	Delta; Abweichung vom Ausgangswert
°C	Grad Celsius
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ACE (2)	Angiotensin-Converting Enzyme (2)
AgRP	Agouti-Related Peptide
AML	Behandlungsgruppe mit Amlodipin
AngI	Angiotensin I
AngII	Angiotensin II
Aogen	Angiotensinogen
ARB	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker
AT ₁ -Rezeptor	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptor
AT ₄ -Rezeptor	Typ-4-Angiotensin-II-Rezeptor
AUC	Fläche unter der Kurve; „Area under the curve“
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CART	cocaine and amphetamine related transcript
CCD	charged-coupled device
CD	Cafeteria-Diät
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLB	Cell Lysis Buffer, Lysepuffer
cm	Centimeter
cm ²	Quadratcentimeter
C _{max}	Maximale Konzentration
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

CRF	Corticotropin-releasing factor
C _T	Schwellenwertzyklus
d	Tag (day)
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dT	Desoxythymidin
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GLUT4	glucose transporter Type 4, Glukosetransporter Typ 4
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
h	Stunde (hour)
HCl	Salzsäure
HDL	High-density lipoprotein
HDR	High Dynamic Range
HF	Herzfrequenz
HOMA	Homeostasis Model Assessment
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
I.E.	Internationale Einheiten
IL-6	Interleukin 6
ITT	Insulin-Toleranz-Test
kcal	Kilokalorien

kel	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
kJ	Kilojoule
KON _A	Adipöse Kontrollgruppe
KON _S	Schlanke Kontrollgruppe
l	Liter
LDL	Low-density lipoprotein
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LDS-PAGE	Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel
ln	Logarithmus zur Basis e
log	Logarithmus zur Basis 10
LRP2	Low density lipoprotein-related protein 2 = Megalin
LRT	Leptinresistenz-Test
Lsg.	Lösung
LVG	Linksventrikuläres Gewicht
LVI	Linksventrikulärer Index
M	In Zusammenhang mit Konzentration: Molar
m ²	Quadratmeter
MCH	melanin concentrating hormone
MES-Puffer	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MetS	Metabolisches Syndrom
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Stichproben
n.s.	nicht signifikant
N ₂ O	Lachgas
Na	Natrium
NaH ₂ PO ₄	Natrium-Dihydrogen-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NIH	National Institutes of Health
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
O ₂	Sauerstoff
OGTT	Oraler Glukose-Toleranz-Test
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.o.	per os
PBS-Puffer	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Polyethylen
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POMC	Proopiomelanocortin
PP	Polypropylen
PPAR δ	peroxisome proliferator activated receptor delta
PPAR γ	peroxisome proliferator activated receptor gamma

PPO	PreProOrexin
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
r	Pearson's r
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RER	respiratory exchange rate, respiratorische Gasaustauschrates
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	Farbstoff bestehend aus Glycin-Konjugat von 5-Carboxy X-rhodamin und Succinimidylester
RQ	Respiratorischer Quotient
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
s.c.	subkutan
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SHR	Spontan hypertensive Ratte
SHRSP	Spontaneously Hypertensive Stroke Prone Rat
STAT3	signal transducer and acitvator of transcription 3
syst.	systolisch
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
T+A	Behandlungsgruppe mit Kombination Telmisartan und Amlodipin
T2DM	Typ-2-Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
TEL	Behandlungsgruppe mit Hochdosis Telmisartan
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trishydroxymethylamonium-Methan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen in der Minute
UCP-1	Uncoupling protein 1

UDG	Uracil DNA Glykosylase
V	Volt
v.a.	vor allem
VO ₂	Sauerstoffverbrauch
vs.	versus
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

8 Danksagung

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

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Raasch für die Vergabe dieses äußerst interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung sowie den äußerst unkomplizierten Kontakt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. J. Barkhausen für die Bereitstellung des MRT und Herrn PD Dr. med. F. Vogt für seine wertvolle technische Unterstützung bei der MRT-basierten Fettmassenbestimmung.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. H. Müller-Fielitz für die freundliche und unkomplizierte Einarbeitung bedanken. Bei Fragen oder Problemen war er stets ansprechbar und immer hilfsbereit.

Frau I. Stölting gilt ebenfalls mein außerordentlicher Dank, da sie als kompetente und erfahrene medizinisch technische Assistentin eine unverzichtbare Unterstützung nicht nur bei der labortechnischen Auswertung darstellte.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meinen Doktoranden-Kollegen Marten Obernolte und Martin Borlich, die allein als Personen eine Bereicherung nicht nur im Forschungsalltag waren.

9 Lebenslauf

Nils Hübel

geboren am 22. Februar 1986
in Bad Oldesloe

Ausbildung

07/2005	Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasium, Celle
11/2005 – 07/2006	Zivildienst beim DRK Celle
08/2006 – 05/2007	Rettungssanitäter beim DRK Celle
05/2007 – 03/2009	Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen, 1. Staatsexamen
04/2009 – 09/2013	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
10/2009	Beginn der Promotion unter Prof. Dr. Raasch am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität zu Lübeck
04/2010 – 09/2010	Forschungssemester zur Durchführung der experimentellen Studie im Rahmen der Doktorarbeit.
08/2012 – 06/2013	Praktisches Jahr: Sana Kliniken Ostholstein Eutin (Innere Medizin, Chirurgie) UK-SH Lübeck (Radiologie)
11/2013	2. Staatsexamen

10 Veröffentlichungen

10.1 Publikationen

Müller-Fielitz¹⁾, H., N. Hübel¹⁾, M. Mildner, F. M. Vogt, J. Barkhausen, and W. Raasch. 2014. Chronic blockade of angiotensin AT1 receptors improves cardinal symptoms of metabolic syndrome in diet-induced obesity in rats. Br J Pharmacol 171:746-760. ¹⁾ both authors contributed equally

10.2 Poster und Vorträge

N. Hübel, H. Müller-Fielitz, I. Stölting, W. Raasch. Cardinal symptoms of Metabolic Syndrome are improved in diet induced obese rats by chronic AT1-receptor blockade (78. Jahrestagung der DGPT, 19. bis 22. März 2012 in Dresden).

N. Hübel, H. Müller, W Raasch. Prevention of leptin resistance by AT1-blockade 35. Wissenschaftlicher Kongress der der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutschen Gesellschaft für Hypertonie und Prävention "Hypertonie Köln 2011", 25.11.2011 - 26.11.2011.

Poster für die Veranstaltung „Uni im Dialog“ der Universität zu Lübeck im Mai 2011 mit dem Titel „Schlemmen ohne Reue“.

10.3 Preise und Auszeichnungen

Einjähriges Promotionsstipendium im Rahmen der Initiative „Exzellenzmedizin“ der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck (2010/11).

Posterpreis im Rahmen der Veranstaltung „Uni im Dialog“.