

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

Metabolische Konsequenzen einer kombinierten AT₁-Rezeptor- und
Angiotensin-Converting-Enzym-Blockade bei adipösen, hypertensiven
und insulinresistenten Ratten

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

vorgelegt von
Anja Miesel

aus
Bad Oldesloe

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Morten Schütt
3. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. W. Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	12
2.1	Studienprotokolle	12
2.1.1	Tiere	12
2.1.2	Studienprotokoll: Etablierung des Tiermodells	12
2.1.3	Studienprotokoll: Einfluss der RAAS-Blockade auf Symptome des Metabolischen Syndroms	14
2.2	Blutabnahme und operative Verfahren	16
2.2.1	Stabilisatoren und Gerinnungshemmer	16
2.2.2	Blutabnahme über die Schwanzvene	16
2.2.3	Bestimmung der Blutzuckerkonzentration	17
2.2.4	Implantation venöser und arterieller Femoralis-Katheter	17
2.2.5	Blutabnahme über den arteriellen Femoralis-Katheter	18
2.3	Funktionstests	18
2.3.1	Plethysmographische Blutdruckmessung (Tail-Cuff-Methode)	18
2.3.2	Messung der passiven Aktivität	19
2.3.3	Oraler Glukosetoleranztest	19
2.3.4	Insulintoleranztest	20
2.3.5	Schwimmttest	20
2.3.6	Magnetresonanztomographie	20
2.3.7	Bestimmung von Körperumfang und –länge	21
2.4	Dekapitation und Organpräparation	22
2.5	Analytische Methoden	23
2.5.1	Radioimmunoassay	23
2.5.2	Bestimmung der Katecholamin-Plasmakonzentration	23
2.5.3	Präparation des Hypothalamus	24
2.5.4	Pulverisieren von Gewebeproben	24
2.5.5	mRNA-Isolierung	25
2.5.6	mRNA-Quantifizierung mit RiboGreen®	25
2.5.7	cDNA-Synthese	25

2.5.8	Prinzip der quantitativen RT-PCR	26
2.5.9	Durchführung der quantitativen RT-PCR	26
2.5.10	Immunoblot (Western Blot)	28
2.5.11	Bestimmung des Glukosegehalts der Leber	28
2.5.12	Bestimmung des Glykogengehalts der Leber	28
2.6	Statistik und graphische Darstellung	29
3	Ergebnisse: Etablierung des Tiermodells	31
3.1	Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit von Rattenstamm und Diät	31
3.2	Energiehaushalt	32
3.3	Adipozytokine	34
3.4	Glukosemetabolismus	35
3.5	Oraler Glukosetoleranztest	35
3.6	Insulintoleranztest	36
3.7	Insulinrezeptoren in Muskel- und Fettgewebe	37
3.8	Blutfette	37
3.9	Nahrungsaufnahme regulierende Peptide	37
3.10	Noradrenalinplasmaspiegel	38
3.11	Blutdruck und Herzfrequenz	38
4	Ergebnisse: Einfluss der Blockade des RAAS auf Symptome des Metabolischen Syndroms	40
4.1	Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit von der Medikation	40
4.2	Adipozytokine	43
4.3	Energieaufnahme	45
4.4	Aktivität	48
4.5	Hämodynamik	48
4.6	Glukosemetabolismus	50
4.7	HPA-Achse und Stresshormone	54
5	Diskussion	57
5.1	Etablierung des Tiermodells	57
5.2	RAAS-Blockade und Hämodynamik	62
5.3	RAAS-Blockade und Regulation des Körpergewichts	64

5.4	RAAS-Blockade und Diabetes	67
5.5	RAAS-Blockade und HPA-Achse	70
5.6	Vergleich zwischen Monotherapie und Kombinationstherapie	72
6	Zusammenfassung	74
7	Literaturverzeichnis	75
8	Anhang	88
8.1	Materialien und Geräte	88
8.2	Abkürzungsverzeichnis	96
9	Publikationsliste	101
10	Danksagung	102
11	Lebenslauf	103

1 Einleitung

Das gleichzeitige Auftreten mehrerer kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie z.B. arterieller Hypertonus, erhöhte Plasmaglukose, Adipositas und erhöhte Blutfettwerte, wurde 1988 erstmals von Reaven als „Syndrom X“ beschrieben und wird heutzutage unter dem weit verbreiteten Begriff des „Metabolischen Syndroms“ zusammengefasst (Reaven 1988). Wurde in der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 1998 noch die Insulinresistenz als wichtigster Faktor des Syndroms angesehen, so ist laut der aktuellen Definition der Internationalen Diabetes Föderation (IDF) von 2005 die zentrale Adipositas, gemessen als erhöhter Taillenumfang, das obligate Hauptkriterium. Darüber hinaus müssen zwei von vier Nebenkriterien erfüllt sein: erhöhter Nüchternblutzucker bzw. vorbestehender Diabetes, arterieller Hypertonus, erhöhte Plasmatriglyzeride und vermindertes HDL-Cholesterin (IDF 2005). Je mehr dieser Symptome parallel vorliegen, desto höher ist die kardiovaskuläre Morbiditäts- und folglich die Mortalitätsrate (Hu et al. 2004).

Durch die unterschiedlichen Definitionen des Metabolischen Syndroms und je nach untersuchter Population schwanken die Angaben der Prävalenz (Cornier et al. 2008). Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass in den meisten Ländern weltweit zwischen 20 und 30% der erwachsenen Bevölkerung am Metabolischen Syndrom erkrankt sind (Grundy 2008) und damit ein dreifach erhöhtes Risiko haben, einen Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall zu erleiden und ein sogar fünffach erhöhtes Risiko einen manifesten Typ-2-Diabetes zu entwickeln (Stern et al. 2004). Typ-2-Diabetes ist die häufigste metabolische Erkrankung weltweit (Goldstein 2003) und die Prävalenz dieser Erkrankung steigt sowohl in den Industriestaaten als auch in den Entwicklungsländern rapide an (Wild et al. 2004; Yach et al. 2006). So hat sich die Anzahl der an Diabetes erkrankten Patienten in den USA von 1980 bis 2007 verdreifacht (Centers for Disease Control and Prevention 2009). Durch die Behandlung und Prävention des Typ-2-Diabetes und seiner Komorbiditäten wie beispielsweise Retino-, Nephro-, Polyneuro- und Mikroangiopathien werden 2010 weltweit schätzungsweise Kosten von mindestens 376 Milliarden US Dollar entstehen. Dies entspricht in etwa 11,6% der Gesamtausgaben für das Gesundheitswesen (Unwin et al. 2010). Das

Metabolische Syndrom, die Erkrankung Diabetes mellitus Typ 2 und die damit verbundenen Komorbiditäten, wozu auch kardiovaskuläre Erkrankungen gehören, haben sich also weltweit zu einem epidemiologischen und auch gesundheitsökonomischen Problem entwickelt, so dass vor allem in der Prävention dieses Krankheits-Clusters Handlungsbedarf besteht.

Die Ätiologie des Metabolischen Syndroms ist weitestgehend unklar, aber die Interaktion von Adipositas, geringer körperlicher Aktivität und diätetischer, soziokultureller sowie genetischer Faktoren ist vermutlich von zentraler Bedeutung (Reaven 1988; Laws et al. 1993; Liese et al. 1998). Auch bei der multifaktoriellen Ätiologie des Typ-2-Diabetes spielen diese Faktoren eine große Rolle, was das häufige gleichzeitige Auftreten beider Erkrankungen erklärt (Hu et al. 2006; Meisinger et al. 2006; Schienkiewitz et al. 2006; Frayling 2007; Teran-Garcia et al. 2007; Qi et al. 2008).

Als zentraler Mechanismus der Pathogenese des Typ-2-Diabetes wird die Insulinresistenz in Muskel-, Fett- und Lebergewebe angesehen, also das verminderte Ansprechen der Zellen auf normal hohe, zirkulierende Insulinmengen (Petersen et al. 2002). In der Phase des Prädiabetes kommt es als Reaktion auf die Insulinresistenz in den β -Zellen des Pankreas zunächst zu einer Hypersekretion von Insulin, woraus eine Hyperinsulinämie resultiert. Nach Jahren bzw. Jahrzehnten kommt es zur Erschöpfung der Insulinsekretion, dem so genannten Sekundärversagen, und damit zur Insulinabhängigkeit. Insulin führt über die Translokation von Glukosetransportern, vorrangig des Typs GLUT 4, in die Zellmembran zur Aufnahme von Glukose in die Zelle und bewirkt dadurch die Senkung des Blutzuckers. Bewegungsmangel führt zu einem Abfall der insulinabhängigen Glukoseaufnahme in die Zelle. Umgekehrt führt Bewegung zu einer vermehrten Transkription des GLUT-4-Gens und damit zu einer verbesserten Insulinsensitivität der Zelle (MacLean et al. 2002). Adipositas geht mit einer permanent erhöhten Konzentration freier Fettsäuren im Plasma einher. Eine dauerhafte Überernährung führt zur Steigerung der Insulinsekretion mit nachfolgender Verminderung der peripheren Insulinrezeptoren. Adipositas und Überernährung gelten somit als wichtige Ursache für die Entwicklung einer Insulinresistenz. Als mögliche Mechanismen werden die Hemmung der Glukosetransportaktivität, die vermehrte Deckung des Energiebedarfs durch die

Verwertung von Lipiden und die Hemmung der Glykogensynthese diskutiert (Felber et al. 2002). Umgekehrt kann durch Gewichtsreduktion die Insulinsensitivität verbessert (Petersen et al. 2005) und dadurch die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes verzögert oder sogar verhindert werden (Khaodhiar et al. 2009), so dass die Normalisierung des Körpergewichts dringend in die Behandlung bzw. die Prävention des Diabetes mit einbezogen werden sollte.

Übergewicht beruht auf einer Zunahme an Fettgewebe, welches neben der Speicherung von Energie, der thermischen Isolation und der Polsterung anderer Organe auch als endokrines Organ fungiert und Adipozytokine sezerniert, unter anderem Leptin, Adiponektin und Resistin. Diese Hormone spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Fettstoffwechsels und der Nahrungsaufnahme.

So bindet das Leptin nach Überwinden der Blut-Hirn-Schranke an Rezeptoren im Hypothalamus und unterdrückt dort die Produktion der appetitstimulierenden Neuropeptide AgRP (Agouti-Related Protein) und NPY (Neuropeptid Y) und fördert die Produktion der appetitzügelnden Transmitterstoffe POMC (Proopiomelanocortin) und CART (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript). Weitere Leptinrezeptoren sind auch in peripheren Geweben nachgewiesen worden, unter anderem in Adipozyten, β -Zellen des Pankreas, Hepatozyten und Skelettmuskelzellen und auch in der Nebenniere. Neben der Verminderung des Hungergefühls bewirkt Leptin eine Steigerung des Energieverbrauchs durch Stimulation des sympathischen Nervensystems, was zu einer Erhöhung des Blutdrucks, der Herzfrequenz sowie der Thermogenese durch Entkopplung der Zellatmung von der ATP-Synthese führt (zur Übersicht siehe Margetic et al. 2002; Correia et al. 2006). Sowohl in adipösen Tiermodellen als auch bei übergewichtigen Patienten konnten erhöhte Plasmaleptinspiegel und eine vermehrte mRNA-Expression von Leptin in Adipozyten nachgewiesen werden. Die Höhe des Plasmaleptins korrelierte dabei stark mit dem BMI der Probanden (Frederich et al. 1995; Maffei et al. 1995; Considine et al. 1996). Für das hohe Körpergewicht trotz erhöhter Leptinspiegel wird die Leptinresistenz verantwortlich gemacht, wobei die Mechanismen, die vor allem bei Adipösen und Diabetikern zur Leptinresistenz führen, noch nicht geklärt sind. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre eine veränderte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für das Hormon, denn bei Adipösen konnte eine gegenüber dem Plasma verminderte

Konzentration des Leptins im Liquor nachgewiesen werden (Schwartz et al. 1996). Jedoch ist diese Theorie umstritten, da andere zentrale Mechanismen wie die renale sympathische Aktivierung trotz Leptinresistenz erhalten bleiben, so dass auch von einer selektiven Leptinresistenz gesprochen wird (Correia et al. 2002; Mark et al. 2002). Auch eine Beeinflussung der Stressachse durch Leptin konnte beobachtet werden, denn Leptin hemmt die durch einen Stressreiz ausgelöste Freisetzung von ACTH und Corticosteron (Ahima et al. 1996; Bornstein 1997; Heiman et al. 1997).

Das Peptidhormon Adiponektin wird vermehrt in Hungerphasen ausgeschüttet und verstärkt die Wirkung von Insulin, indem es durch Verminderung der hepatischen Glukoneogenese und der Lipolyse die Glukoseaufnahme in die Zelle und die Fettsäureoxidation steigert (Yamauchi et al. 2002; Wu et al. 2003). Bei Gewichtsabnahme steigen die Adiponektinspiegel, bei fettreicher Nahrungsaufnahme sinken sie dagegen und bei adipösen Patienten sowie bei Diabetikern lässt sich eine signifikante Verminderung sowohl der Adiponektinplasmaspiegel als auch der mRNA-Expression im Fettgewebe nachweisen (Hu et al. 1996; Hotta et al. 2000). In Adiponektin-Knockout-Experimenten konnte die Entstehung einer Insulinresistenz unter Fütterung einer hochkalorischen Diät gezeigt werden, welche durch exogene Adiponektinzufuhr reversibel war (Maeda et al. 2002). Glitazone sind Medikamente, die in der Diabetes-Therapie eingesetzt werden und über die Stimulation des Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor vom Typ γ (PPAR γ) insulinsensitivierend wirken. Auch sie führen zu einem Anstieg des Plasmaadiponektins. Neben der insulinsensitivierenden Wirkung wird dem Adiponektin auch ein antiinflammatorischer und antiatherogener Effekt nachgesagt, so dass sich hier potentiell neue therapeutische Optionen in der Therapie von Typ-2-Diabetes, Metabolischem Syndrom sowie kardiovaskulärer Risikofaktoren und Begleiterkrankungen zeigen (Diez et al. 2003).

Neben der Adipositas zählt der arterielle Hypertonus zu den zentralen Faktoren des Metabolischen Syndroms. Der Blutdruck wird u.a. über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert, welches eine Hormonkaskade darstellt. Am Anfang dieser Kaskade steht die Biosynthese von Renin im juxtaglomerulären Apparat der Niere. Renin spaltet von Angiotensinogen das

Peptid Angiotensin-I ab, welches durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) weiter in den aktiven Metaboliten Angiotensin-II gespalten wird. Die Wirkungen von Angiotensin-II sind sehr vielfältig und bestehen hauptsächlich in der Regulation von Blutdruck und Wasserhaushalt. Dies erfolgt einerseits durch direkte Vasokonstriktion, Regulation von Durst und Trinkmenge, Rückresorption von Natrium in der Niere, Feedback-Hemmung der Renin-Expression und Stimulation der Aldosteronsekretion aus der Nebenniere. Andererseits wird der Sympathikus durch Angiotensin-II aktiviert, was zu einer Steigerung des Herzzeitvolumens und durch Vasokonstriktion zur Erhöhung des peripheren Widerstandes führt. Aber auch die Differenzierung von Fettzellen wird durch Angiotensin-II beeinflusst (Fyhrquist und Saijonmaa 2008), ferner ist es als vaskulärer und kardialer Wachstumsfaktor bekannt (Daemen MJ et al., 1991; Griffin SA et al., 1991; Sandoshima JI et al., 1993). Galt Angiotensin-II lange als einziger aktiver Metabolit des RAAS, so konnten in den letzten Jahren auch für weitere Komponenten und Spaltprodukte des RAAS physiologische Wirkungen nachgewiesen werden (zur Übersicht Ribeiro-Oliveira et al. 2008). Angiotensin-II vermittelt seine Effekte über den Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor (AT₁-Rezeptor), ein Transmembranrezeptor mit sieben Domänen, der zur Superfamilie der G-gekoppelten Rezeptoren gehört (Sandberg 1994, Griendling et al. 1996). Im Gegensatz zum Menschen konnten in Ratten und Mäusen zwei unterschiedliche Varianten des AT₁-Rezeptors beschrieben werden: Der AT_{1A}- und der AT_{1B}-Rezeptor. Diese beiden Rezeptoren unterscheiden sich in nur 18 Aminosäuren und werden von zwei unterschiedlichen Genen codiert (Elton et al. 1992, Iwai und Inagami 1992, Kakar et al. 1992, Sasamura et al. 1992). Diese Rezeptorvarianten können pharmakologisch nicht unterschieden werden, übernehmen aber aufgrund ihrer gewebsspezifischen Expression unterschiedliche physiologische Funktionen (Burson et al. 1994, Jöhren et al. 2003). Neben dem gut beschriebenen AT₁-Rezeptor existiert noch der Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptor (AT₂-Rezeptor), dessen Expression hauptsächlich in Stressphasen wie z.B. bei großen Verletzungen hochreguliert ist. Er vermittelt antiproliferative und die Zelldifferenzierung fördernde Effekte und sorgt für eine Senkung des Blutdrucks (Unger et al. 2000).

Da viele Patienten sowohl an Adipositas als auch an arteriellem Hypertonus leiden, liegt ein Zusammenhang zwischen den beiden Erkrankungen nahe. Und tatsächlich zeigt sich eine wechselseitige Beeinflussung von Körpergewicht und Blutdruck z.B. in der Hochregulation des RAAS in Individuen mit erhöhtem Fettanteil (Giacchetti et al. 2000; Van Harmelen et al. 2000). Im Gegenzug konnte durch Gewichtsreduktion, also in Abhängigkeit von der Fettmasse, die Hochregulation des RAAS wieder vermindert und somit der Blutdruck gesenkt werden (Engeli et al. 2005). Der Aktivierung des RAAS wird somit eine entscheidende Beteiligung an der Adipositas-induzierten Hypertonie zugeschrieben (Aneja et al. 2004).

Die Blockade des RAAS ist eine sehr häufig eingesetzte Methode, um den Blutdruck zu senken. Häufig verwendete Medikamente sind dabei die Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE-Hemmer), die über die Hemmung des Enzyms, die Umwandlung von Angiotensin-I in Angiotensin-II verhindern und dadurch die Angiotensin-II-Plasmakonzentration senken. Eine weitere häufig angewandte Methode ist die Blockade des AT₁-Rezeptors durch AT₁-Rezeptor-Antagonisten, die die Bindung von Angiotensin-II an einen seiner Rezeptoren verhindern. In letzter Zeit wurden diverse klinische Studien durchgeführt, um mögliche metabolische Effekte der Antihypertensiva aufzudecken, so unter anderem die Studien STOP Hypertension-2 (Lisinopril bzw. Enalapril vs. β -Blocker bzw. Diuretikum), CAPP (Captopril vs. Thiazid bzw. β -Blocker), ALLHAT (Lisinopril vs. Chlorthalidon bzw. Amlodipin), HOPE (Ramipril vs. Placebo), VALUE (Valsartan vs. Amlodipin), LIFE (Losartan vs. Atenolol), SCOPE (Candesartan vs. Placebo), ALPINE (Candesartan vs. Placebo), CHARM (Candesartan vs. Placebo) und SOLVD (Enalapril vs. Placebo). Dabei zeigten diese Studien eindeutig, dass die Blockade des RAAS sowohl durch ACE-Hemmer als auch durch AT₁-Rezeptor-Antagonisten anderen Antihypertensiva bezüglich der Risikoreduktion für Typ-2-Diabetes bei Patienten mit arteriellem Hypertonus oder Herzinsuffizienz überlegen ist. Elliott et al. ermittelten diesbezüglich die niedrigste Diabetes-Inzidenz für AT₁-Blocker und ACE-Hemmer, gefolgt von Calciumkanalblockern und Placebo, β -Blockern und Diuretika (Elliott et al. 2007). In einer Metaanalyse der o.g. klinischen Studien wurde eine mittlere Risikoreduktion für die Inzidenz des Typ-2-Diabetes von rund 22% nach RAAS-

Blockade ermittelt (Scheen 2004). Mehrere Mechanismen, über die die Inzidenz des Typ-2-Diabetes durch die RAAS-Blockade gesenkt wird, werden zurzeit diskutiert, so auch einige Angiotensin-II-abhängige Mechanismen. Hierzu zählen zum Beispiel die Steigerung des Blutflusses in Muskelgewebe und Pankreas, die Verbesserung der Adipozytenausreifung und die Hemmung des Sympathikus. Auch eine Verbesserung des Insulinsignalweges (Tyrosin-Kinase, IRS-1, PI3-Kinase, GLUT4) steht zur Diskussion (Scheen 2004). Besonderes Interesse gilt dem PPAR- γ -Rezeptor, dessen Aktivität Angiotensin-II-unabhängig durch einige AT₁-Rezeptor-Antagonisten, insbesondere Telmisartan, erhöht wird (Schupp et al. 2004). Dieser Rezeptor ist die Zielstruktur einiger in der Diabetes-Therapie eingesetzter Medikamente, die durch seine Aktivierung die Insulinsensitivität und somit den Glukosemetabolismus verbessern. Nicht alle AT₁-Rezeptor-Antagonisten weisen eine hohe Affinität zu diesem Rezeptor auf, so ist beispielsweise der K_i-Wert von Candesartan 200-fach niedriger als der von Telmisartan (Marshall et al. 2006). Da Candesartan trotz der niedrigen Affinität eindeutig vorteilhafte metabolische Effekte zeigt und auch die ACE-Hemmer die Inzidenz für Typ-2-Diabetes senken, ist die Aktivierung des PPAR- γ -Rezeptors als alleiniger Wirkmechanismus jedoch unwahrscheinlich.

In den vergangenen Jahren konnten das Metabolische Syndrom und die Anreicherung von viszeralem Fettgewebe auch mit einer Steigerung der Stresssensitivität in Verbindung gebracht werden (Bjorntorp et al. 2000; Dallman et al. 2006) und auch bei Diabetikern wurde eine erhöhte Stresssensitivität nachgewiesen (Roy et al. 1990; Bruehl et al. 2007). Die Erhöhung des Blutzuckers in Stresssituationen ist Folge der Glukokortikoid-Ausschüttung, sie dient der Bereitstellung von Energie in kritischen Situationen und ist somit physiologisch. Die Blutzuckererhöhung durch Glukokortikoide erfolgt dabei über verschiedene Mechanismen, so zum Beispiel durch Glykogenolyse und Glukoneogenese in der Leber, Proteolyse von Muskelgewebe und auch durch Lipolyse (Munck et al. 1984). Die Glukokortikoide sind das Endprodukt der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, im Folgenden nach der anglo-amerikanischen Terminologie als HPA-Achse abgekürzt. Die HPA-Achse wird durch Stressreize aktiviert, woraufhin Neurone des Nucleus paraventricularis im Hypothalamus das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) freisetzen. Über das Portalvenensystem

gelangt dieses in die Adenohypophyse und sorgt dort für die Freisetzung von Adrenocorticotropin (ACTH), welches wiederum in der Nebennierenrinde die Ausschüttung von Glukokortikoiden stimuliert (Aguilera 1994). Nagetieren fehlt die 17 α -Hydroxylase, so dass diese im Gegensatz zum Menschen kein Kortisol produzieren sondern nur Corticosteron (Le Goascogne et al. 1991; Ishimura et al. 1997). Beide Hormone aber vermitteln ihre Funktionen über zytoplasmatische Rezeptoren, die nach Translokation in den Zellkern über Bindung an die DNA die Transkription bestimmter Proteine und Enzyme aktivieren. Mögliche Nebenwirkungen einer Langzeittherapie mit Glukokortikoiden, aber auch Folge einer chronischen Aktivierung der HPA-Achse sind Stammfettsucht, Hypertriglyceridämie, Hyperglykämie, Insulinresistenz und Hypertonie (Chrousos 2000; Warne 2009). Die Übereinstimmung dieser Symptome mit denen des Metabolischen Syndroms lässt eine Beteiligung der HPA-Achse an der Entwicklung und Unterhaltung des Typ-2-Diabetes aber auch kardiovaskulärer Erkrankungen vermuten (Surwit et al. 1992; Rozanski et al. 1999; Chan et al. 2002).

In den Organen der HPA-Achse konnten sowohl AT₁- als auch AT₂-Rezeptoren (Burson et al. 1994; Gasc et al. 1994; Llorens-Cortes et al. 1994; Jöhren et al. 1995; Jöhren et al. 1996) und deren Regulation unter Stress (Castren et al. 1988; Aguilera et al. 1995; Leong et al. 2002) nachgewiesen werden, so dass eine Beeinflussung der Stressantwort durch das RAAS wahrscheinlich ist. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Angiotensin-II zu einer HPA-Achsenhyperreaktivität führt und die Synthese und Freisetzung von CRH und ACTH fördert (Rivier et al. 1983; Sumitomo et al. 1991; Jezova et al. 1998). Darüber hinaus konnte in Studien der Arbeitsgruppe an Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) die Suppression der HPA-Achsen-Hyperreaktivität sowohl durch die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril als auch mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten Candesartan nachgewiesen werden. Unter Candesartan zeigte sich gleichzeitig eine gesteigerte Insulinsekretion und folglich eine verbesserte Glukosehomöostase (Raasch et al. 2006). In Übereinstimmung damit war die Reaktivität der Stressachse bei leptinresistenten Zucker-Ratten unter Angiotensin-II gesteigert und in dessen Folge die Glukoseutilisation vermindert (Müller et al. 2007). Diese Beobachtungen lassen sich eher auf einen Nebennieren abhängigen

und weniger auf einen zentralen Mechanismus zurückführen (Müller et al. 2010). Dies bestätigt die Hypothese, dass eine verminderte Reaktivität der HPA-Achse zur Prävention des Typ-2-Diabetes beiträgt (Rosmond et al. 2000) und lässt vermuten, dass die antidiabetische Wirkung einer RAAS-Blockade auf die Suppression der HPA-Achse zurückzuführen ist. Auf Basis dieser Erkenntnisse ergeben sich somit interessante, neue Ansätze zur Erklärung der positiven metabolischen Auswirkungen einer RAAS-Blockade.

Das gleichzeitige Auftreten von Hypertonus, Typ-2-Diabetes und Adipositas erfordert eine Therapie aller drei Symptome. Somit ist zusätzlich zur antihypertensiven und antidiabetischen Wirkung eine Gewichtsreduktion unter RAAS-Blockade wünschenswert. Da bei adipösen Patienten im Fettgewebe ein aktiviertes RAAS gefunden wurde (Giacchetti et al. 2000) und die Reduktion des Körpergewichts zu einer verminderten RAAS-Aktivität (Engeli et al. 2005) und einer verbesserten Insulinsensitivität führt (Petersen et al. 2005), ist auch ein Effekt auf das Körpergewicht durch die Blockade des RAAS nahe liegend. Diese Hypothese stützt sich auch auf die Erkenntnisse von Benson et al., die bei Ratten unter Telmisartan im Vergleich zu Placebo behandelten aber auch im Vergleich zu Losartan behandelten Tieren einen geringeren Gewichtsanstieg sahen (Benson et al. 2004).

Die synergistische Wirkung von AT_1 -Rezeptor-Antagonisten und ACE-Hemmern auf die Blutdrucksenkung ist bekannt und wird in der Klinik häufig durch die Kombination beider Medikamente genutzt. In der ONTARGET Studie wurde untersucht, ob der AT_1 -Rezeptor-Antagonist Telmisartan und der ACE-Hemmer Ramipril darüber hinaus synergistische Effekte auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität von Patienten haben (Yusuf et al. 2008). Trotz der fundierten Kenntnisse über die metabolischen Vorteile sowohl von AT_1 -Rezeptor-Antagonisten als auch von ACE-Hemmern ist jedoch wenig darüber bekannt, ob die Kombination beider Antihypertensiva die metabolischen Effekte steigern kann. Darum war das Ziel dieser Dissertationsarbeit die Beantwortung der Frage, ob die Kombination von Telmisartan und Ramipril synergistische metabolische Vorteile gegenüber den entsprechenden Monotherapien bietet.

Insbesondere sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. Kann durch die Therapie mit Telmisartan, Ramipril und der Kombination aus beiden Medikamenten ein diätinduzierter Gewichtsanstieg verhindert werden?
2. Basiert das niedrigere Körpergewicht auf einem geringeren Körperfettvolumen?
3. Steht die Gewichtsabnahme in Verbindung mit einer reduzierten Energieaufnahmen und einer gesteigerten physischen Aktivität?
4. Wird durch die Therapie mit Telmisartan, Ramipril und der Kombination beider Medikamente der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes vorgebeugt bzw. die Glukosehomöostase verbessert?
5. Sind die metabolischen Veränderungen mit einer verminderten HPA-Achsen-Reaktivität assoziiert?

Um diesen Fragen experimentell nachgehen zu können, wurde ein geeignetes Tiermodell benötigt. Für die Untersuchung von Pathogenese, Therapie und Prävention des Metabolischen Syndroms stehen bereits zahlreiche Tiermodelle zur Verfügung. Jedoch weisen die meisten Tiermodelle nicht gleichzeitig alle Symptome des Metabolischen Syndroms auf, sondern leiden beispielsweise nur an Hypertonie wie die SHR oder die Stroke-Prone SHR (Swislocki et al. 1993; Strahorn et al. 2005; Shimamoto et al. 2006) oder weisen einen Typ-2-Diabetes auf, wie die Spontan Diabetische Torii Ratte (Shinohara et al. 2000), die Goto-Kakizaki Ratte (Goto et al. 1976) oder die Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty Ratte (Kawano et al. 1992). Jedoch fehlt all diesen Tiermodellen das Kardinalsymptom des Metabolischen Syndroms, um die Kriterien für dieses zu erfüllen, nämlich die Adipositas. Andere Tiermodelle sind zwar adipös und weisen zusätzlich metabolische und kardiovaskuläre Veränderungen auf, jedoch basiert die Pathogenese hauptsächlich auf Mutationen im Leptin- oder Leptinrezeptor-Gen, so zum Beispiel bei der ob/ob oder db/db Maus (Coleman 1982; Chua et al. 1996), der Zucker Ratte (Zucker 1965), der Zucker Diabetic Fatty Ratte (ZDF) (Clark et al. 1983), der hypertensiven Koletsky Ratte (Ernsberger et al. 1999), der

Wistar Fatty Ratte (Ikeda et al. 1981), der SHRSP Fatty (fa/fa) Ratte (Hiraoka-Yamamoto et al. 2004), der SDT.Lepr(fa) Ratte (Masuyama et al. 2005) und der ZSF1 Ratte (Tofovic et al. 2000). Obwohl diese genetisch veränderten Ratten allesamt adipös sind, imitieren sie die Situation des Patienten mit Metabolischem Syndrom doch nur eingeschränkt. Die Symptome Hyperphagie, Hyperleptinämie und Adipositas basieren beim Metabolischen Syndrom nämlich vor allem auf Überernährung und geringem Energieverbrauch und nicht auf genetischen Defekten, auch wenn bei einem geringen Prozentsatz Genmutationen auf Ebene des Leptins als Ursache vorkommen (Carlsson et al. 1997; Montague et al. 1997). Es liegt also nahe, dass auch in dem idealen Tiermodell des Metabolischen Syndroms, die Symptome und zwar insbesondere die Adipositas Folge einer Überernährung, also einer hochkalorischen Diät sein sollten. Ein häufig verwendetes Tiermodell ist die Sprague-Dawley (SD) Ratte unter einer Hoch-Fruktose-Diät, welches die meisten Symptome aufweist, jedoch individuell sehr unterschiedlich auf die Diät reagiert, sodass innerhalb einer Population große Schwankungen zum Beispiel im Körpergewicht vorkommen (Farley et al. 2003). Ein weiterer Nachteil dieser Diät ist die Tatsache, dass die Tiere gezwungen werden, sich von dem hochkalorischen Futter zu ernähren. Die Möglichkeit, zwischen herkömmlichem und hochkalorischem Futter zu wählen, entspricht eher der Situation der Verführung, in der der Mensch sich befindet (Rolls et al. 2002; Kral et al. 2004).

Da bisher kein Tiermodell beschrieben worden ist, welches all diese Kriterien erfüllt, musste in der ersten Studie zunächst ein geeignetes Modell entwickelt werden. Dazu wurden diverse Rattenstämme unter unterschiedlichen Diäten charakterisiert. Im zweiten Teil der Untersuchungen standen dann die Veränderungen von metabolischen Parametern unter einer Dauertherapie mit Telmisartan, Ramipril und der Kombination aus beiden Medikamenten im Vordergrund.

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Substanzen, Lösungen, Materialien und Geräte sind im Anhang aufgelistet.

2.1 Studienprotokolle

2.1.1 Tiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague Dawley Ratten, Spontan Hypertensive Ratten, Fischer-Ratten und Wistar-Kyoto-Ratten verwendet, die von Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden. Die Tiere wurden zu zweit in Käfigen (LxBxH: 42 x 26 x 15 cm) in einem Raum mit Tag-Nacht-Zyklus bei einer Temperatur von 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% untergebracht. Die Lichtperiode begann um 14 Uhr, die Dunkelperiode um 2 Uhr. Die Tierversuche wurden nach Genehmigung durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein entsprechend den NIH-Richtlinien für den Umgang und die Verwendung von Labortieren durchgeführt (Tierversuchsantrag Nr.: 9/1v/07).

2.1.2 Studienprotokoll: Etablierung des Tiermodells

Um ein geeignetes Tiermodell zu etablieren wurden männliche Ratten unterschiedlicher Stämme (Sprague Dawley Ratten (SD), Spontan Hypertensive Ratten (SHR), Fischer-Ratten (Fischer)) mit verschiedenen Diäten gefüttert. Bei Ankunft hatten die Tiere ein Körpergewicht von ca. 200 g. Nach einer Eingewöhnungszeit von sechs Tagen wurden die Tiere nach Gewicht, Blutdruck und Basalblutglukose randomisiert und erhielten je nach Gruppe eine spezielle Diät, die Kontrolltiere bekamen stets die Norm-Diät (Altromin, Lage). Die Norm-Diät (ND) und die Formula-Diät (Formula) bestanden aus Pellets, die Cafeteria-Diät (Cafe) setzte sich aus täglich wechselnden Schokoriegeln und der Norm-Diät als frei wählbare Alternative zusammen. Alle Tiere hatten stets freien Zugang zu Futter und Leitungswasser. Nur die SHR unter Formula-Diät erhielten nach fünf Wochen 66%ige Glukoselösung (Glu) anstatt Leitungswasser. Einen Überblick über den Nährstoffgehalt der Diäten und die Gruppenkonstellation geben die Tabellen 1 und 2.

Tabelle 1: Übersicht über den Nährstoffgehalt der Diäten der Studie zur Tiermodelletablierung
 ND: Norm-Diät; Cafeteria: Cafeteria-Diät; Formula: Formula-Diät

Diät	Kohlenhydrate	Fett	Kaloriengehalt	Hersteller
ND	6% Disaccharide, 30% Polysaccharide	4%	11,7 kJ/g	Altromin, Lage
Formula	26% Disaccharide, 25% Polysaccharide	15%	16,4 kJ/g	Altromin, Lage
Cafeteria	66 ± 5 % KH	22 ± 1 %	19,7 ± 0,4 kJ/g	Diverse

Tabelle 2: Übersicht über die Gruppenkonstellation der Studie zur Tiermodelletablierung
 ND: Norm-Diät; Cafeteria: Cafeteria-Diät; Formula: Formula-Diät; Glu: 66%ige Glukoselösung

Gruppe	SHR _{Formula+Glu}	SD _{Formula}	Fischer _{Formula}	SHR _{Cafe}	SD _{Cafe}
Diät	Formula, nach 5 Wo. zusätzlich Schweineschmalz	Formula	Formula	Cafeteria+ND	Cafeteria+ND
Flüssigkeit	Wasser, nach 5 Wo. 66%ige Glukoselösung	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser

Während der gesamten Studienzeit wurden die Tiere fünf Tage pro Woche gewogen sowie die Futter- und Wasseraufnahme bestimmt (Waage: Sartorius). In regelmäßigen Abständen erfolgten Blutzuckerbestimmungen (BZ), Blutabnahmen für die Hormonbestimmungen und Blutdruckmessungen (SBP). Zwei Wochen vor Ende der Studie wurde die passive Aktivität der Tiere mittels Infrarot-System (InfraMot System, TSE) gemessen. Ein oraler Glukosetoleranztest (OGTT) und ein Insulintoleranztest (ITT) wurden zur Charakterisierung der Glukosehomöostase durchgeführt. Um arterielles Blut für die Katecholaminbestimmung im Plasma zu gewinnen, wurde den Ratten ein Katheter in die A. femoralis implantiert (2.2.4). In der 13. Woche wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und die Organe entnommen. Eine Übersicht über den Studienablauf zeigt Abbildung 1.

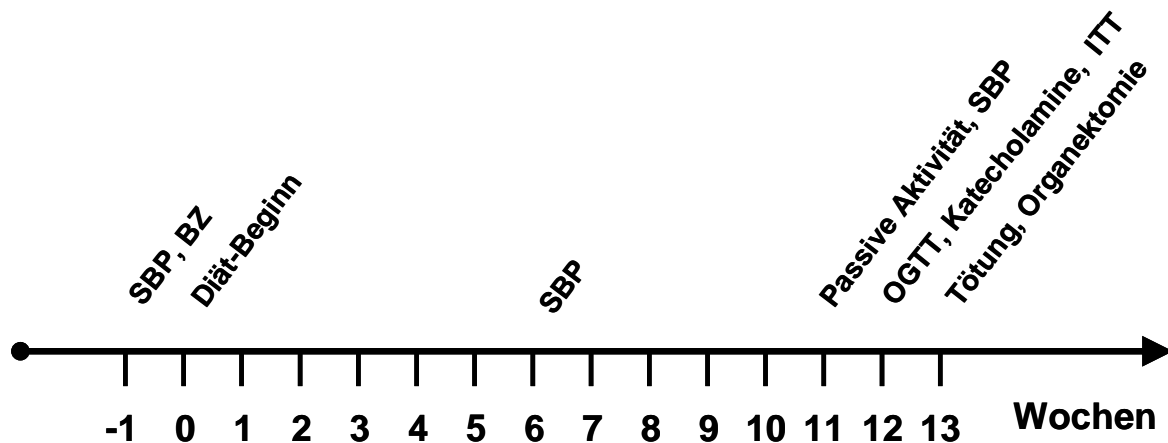


Abb. 1: Zeitlicher Ablauf der Tiermodelletablierung; SBP: Systolischer Blutdruck, BZ: Blutzucker, OGTT: Oraler Glukosetoleranztest, ITT: Insulintoleranztest

2.1.3 Studienprotokoll: Einfluss der RAAS-Blockade auf Symptome des Metabolischen Syndroms

In dieser Studie wurden männliche SHR unter Cafeteria-Diät (2.1.2) mit verschiedenen Blutdruck senkenden Medikamenten behandelt. Als Kontrollen dienten SHR unter Cafeteria-Diät ohne medikamentöse Behandlung. Zusätzlich wurden normotensive WKY-Ratten unter Norm-Diät (2.1.2) als Vergleichsgruppe mitgeführt. Bei Ankunft hatten die Tiere ein Gewicht von ca. 200 g. Nach einer Eingewöhnungszeit von neun Tagen wurden die Tiere nach Gewicht, Blutdruck und Basalblutglukose randomisiert. Die medikamentöse Therapie begann noch am Tag der Gruppenzuordnung, mit der Diät wurde erst drei Tage später begonnen. Die SHR wurden für zwölf Wochen entweder mit dem ACE-Hemmer Ramipril (RAM, 4 mg/kg_{KG} pro Tag), mit dem AT₁-Blocker Telmisartan (TEL, 8 mg/kg_{KG} pro Tag) oder mit der Kombination aus beiden Wirkstoffen (TEL+RAM 8+4 mg/kg_{KG} pro Tag) behandelt (Herstellung der Schlundlösungen siehe Anhang). Die Medikamente wurden den Tieren täglich zur selben Tageszeit gewichtsadaptiert über eine Schlundsonde (G18) oral verabreicht. Die Kontrolltiere (SHR unter Cafeteria-Diät) und die WKY-Ratten erhielten auf dieselbe Weise ein identisches Volumen Wasser (1ml/kg_{KG}). Aufgrund der verschiedenen Rattenstämme, deren Fütterung und deren medikamentösen Behandlung ergaben sich für diese Studie die in Tabelle 3 dargestellten Gruppen.

Tabelle 3: Übersicht Gruppenkonstellation der Studie: Einfluss der RAAS-Blockade auf die Symptome des Metabolischen Syndroms; ND: Norm-Diät

Gruppe	KON	RAM	TEL	TEL+RAM	WKY
Diät	Cafeteria + ND	Cafeteria + ND	Cafeteria + ND	Cafeteria + ND	ND
Medikation	Wasser	Ramipril	Telmisartan	Telmisartan + Ramipril	Wasser

Während der gesamten Studienzeit wurden die Tiere täglich gewogen, fünf Tage pro Woche wurde die Futter- und Wasseraufnahme bestimmt. In regelmäßigen Abständen erfolgten Blutzuckerbestimmungen, Blutabnahmen für die Bestimmung verschiedener Hormonkonzentrationen und Blutdruckmessungen. Zur Halbzeit und zum Ende der Studie wurden Versuchsreihen zur Charakterisierung von Glukosehomöostase, Aktivität, Hämodynamik und Stressverarbeitung durchgeführt. In Woche zwölf wurde per Magnetresonanztomographie (MRT) der Fettanteil der Tiere gemessen. In der 13. Woche wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und die Organe entnommen. Eine Übersicht über den Studienablauf zeigt Abbildung 2.

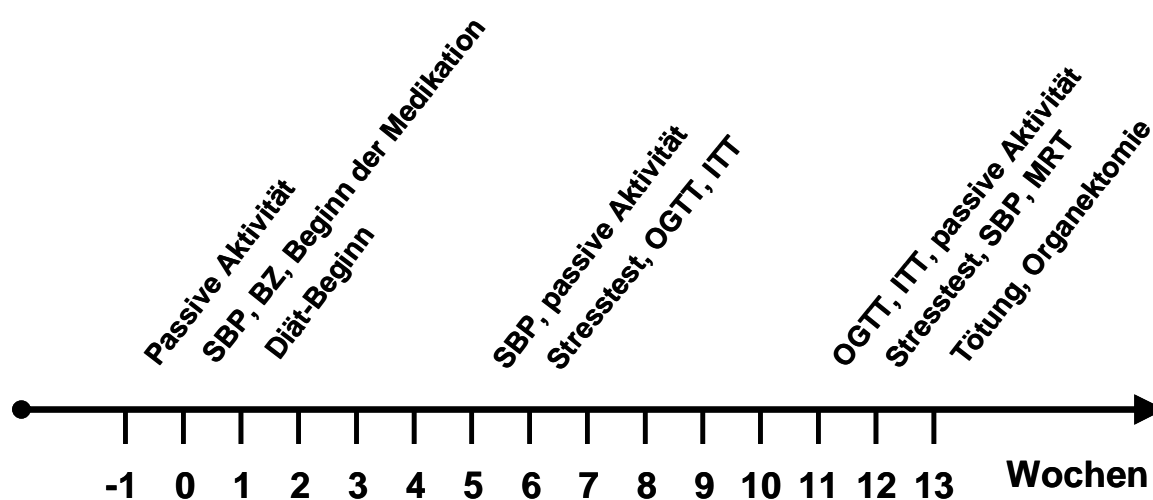


Abb. 2: Zeitlicher Ablauf der Studie: Einfluss der RAAS-Blockade auf die Symptome des Metabolischen Syndroms; SBP: Systolischer Blutdruck, BZ: Blutzucker, OGTT: Orale Glukosetoleranztest, ITT: Insulintoleranztest, MRT: Magnetresonanztomographie

2.2 Blutabnahme und operative Verfahren

2.2.1 Stabilisatoren und Gerinnungshemmer

Je nach Hormon, dessen Konzentration bestimmt werden sollte, wurden die Blutproben mit unterschiedlichen Stabilisatoren versetzt (Tab. 4).

Tabelle 4: Verwendete Stabilisatoren für Blutproben

Hormon	Stabilisator	Endkonz.
ACTH, Corticosteron, Insulin, Adiponektin, Leptin	Na-EDTA-Lsg. (0,24 M)	12,1 mM
Angiotensin-II	Bestatin (1 mM) Na-EDTA-Lsg. (0,24 M)	20 µM 12,1 mM
Katecholamine	GSH (0,2 M) Na-EDTA-Lsg. (0,24 M)	10 mM 12,1 mM

Bis zur Zentrifugation wurden die Proben mit Gerinnungshemmer im Eisbad, diejenigen ohne Gerinnungshemmer bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Gerinnung, gelagert. Nach der Zentrifugation (4°C; 14000 U/min; 5 min) wurden Serum bzw. Plasma bei -80°C tief gefroren.

2.2.2 Blutabnahme über die Schwanzvene

Hierbei handelt sich um eine minimalinvasive Methode, bei der durch Anritzen der Schwanzvene tropfenweise Blut gewonnen wird. Zur Blutabnahme fixierte eine Person mithilfe eines Tuches die Ratte, eine zweite Person ritzte mit einer handelsüblichen Rasierklinge eine der Schwanzvenen an und strich dann von proximal nach kaudal mit zwei Fingern am Schwanz entlang, sodass sich an der Wunde Blutstropfen bildeten. Die Blutstropfen wurden mit einer EDTA-beschichteten Microvetten (CB 300, Sarstedt) aufgefangen und die Proben im Eisbad gelagert. Die Basalblutabnahmen und Basalblutzuckerbestimmungen während der Studie zur Tiermodelletablierung erfolgten stets um 14 Uhr, diejenigen während der Studie zur RAAS-Blockade um 8 Uhr. Eine Blutabnahme dauerte pro Tier ca. 30 Sekunden.

2.2.3 Bestimmung der Blutzuckerkonzentration

Der Blutzucker wurde in allen Versuchen aus Vollblut bestimmt. Hierzu wurde mit der unter 2.2.2 beschriebenen Methode ein Blutstropfen gewonnen und mittels eines Blutzuckermessgerätes (Glucometer Elite[®], Bayer HealthCare; Teststreifen: Ascensia Elite[®] Sensor, Bayer HealthCare) die Glukosekonzentration bestimmt.

2.2.4 Implantation venöser und arterieller Femoralis-Katheter

Zunächst wurden die Tiere durch intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (40,8 mg/kg_{KG}) narkotisiert. Bei nicht ausreichender Narkosetiefe wurde zusätzlich Diethylether per inhalationem gegeben. Nacken und Leistenregion wurden mit einem handelsüblichen Elektrorasierer geschoren. Dann wurden die Tiere in Rückenlage auf einem elektrischen Heiztisch (Eberle, Typ 52102) fixiert. In der linken Leiste wurde ein 1,5 cm langer Hautschnitt gesetzt, durch den das Gefäß-Nerven-Bündel, bestehend aus A. femoralis, V. femoralis und N. femoralis, stumpf präpariert wurde.

Um die V. femoralis wurde proximal ein Baumwollfaden gelegt und der Blutfluss durch Straffung des Fadens vorübergehend unterbrochen. Durch Anlegen eines zweiten Fadens 5 mm weiter distal wurde eine reversible Blutstauung erzeugt. In dem Bereich der Stauung wurde dann mit einer Gefäßschere die V. femoralis angeschnitten und unter Zuhilfenahme eines Gefäßspreizers ein mit Heparin-Lösung (250 I.E./ml) gefüllter Polyethylenschlauch (Länge: 26 cm; AD: 0,96 mm; ID: 0,58 mm) eingeführt und bis in die V. cava vorgeschoben. Mit den Baumwollfäden wurde der Katheter an der V. femoralis fixiert.

Um die A. femoralis wurden die Baumwollfäden in umgekehrter Reihenfolge gelegt, so dass auch hier eine Blutstauung erzeugt wurde. Ansonsten wurde wie oben beschrieben verfahren. Aufgrund des geringen Gefäßdurchmessers wurde ein vorher angefertigter Arterienkatheter verwendet, der aus zwei unterschiedlich dicken (AD: 0,96 mm, Länge: 26 cm und AD: 0,61 mm, Länge: 3 cm), zusammengeschweißten Polyethylenschläuchen bestand.

In Bauchlage wurde dann im Nacken ein 5 mm langer Schnitt gesetzt. Die Katheter wurden mit Hilfe eines Führungsstabes und eines Schlauches subkutan bis in den Nacken gezogen und hier mit zwei Hautnähten fixiert. Nach dem Kürzen auf 3 cm Länge wurden Arterien- und Venenkatheter farbig markiert und mit

stumpfen Eisennägeln verschlossen. In Rückenlage wurde die Leistenwunde mit einer Subkutan- und einer Hautnaht verschlossen und mit Betaisodona[®]-Lösung desinfiziert.

Um die Thrombosierung der Katheter zu verhindern, wurden diese an den Folgetagen zweimal täglich mit je 300 µl Heparin-Lösung (250 I.E./ml) gespült. Nach der Katheteroperation wurden die Tiere in Einzelkäfigen aus Plexiglas (LxBxH: 25 x 22 x 20 cm) gehalten.

2.2.5 Blutabnahme über den arteriellen Femoralis-Katheter

Da diese Methode innerhalb einer Minute durchgeführt wurde und die Tiere durch das tägliche Spülen der Katheter bereits an den Vorgang gewöhnt waren, war sie mit wenig Stress für das Tier verbunden. So war es möglich die basalen Plasmaspiegel der Katecholamine zu bestimmen. Zur Blutabnahme wurde auf den Katheter eine Spritze (Volumen 1 ml) aufgesetzt und das Blut aufgezogen, um dann in ein Reagiergefäß mit GSH-Lsg. gefüllt zu werden. Die ersten 300 µl wurden verworfen, um einen Verdünnungsfehler mit der Katheterspülflüssigkeit zu vermeiden. Nach der Blutabnahme wurde der Katheter erneut mit Heparin-Lösung (250 I.E./ml) gespült.

2.3 Funktionstests

2.3.1 Plethysmographische Blutdruckmessung (Tail-Cuff-Methode)

Diese Methode diente der nichtinvasiven Bestimmung des systolischen Blutdrucks und wurde nach Raasch et al. durchgeführt (Raasch et al. 2006). Die Ratte wurde hierzu mittels einer Röhre fixiert und durch Inhalation eines Lachgas-Sauerstoffgemisches (Sauerstoff 2 l/min und Distickstoffoxid 0,5 l/min) beruhigt. Auf den Schwanz der Ratte wurde proximal eine aufblasbare Blutdruckmanschette und caudal ein ringförmiger Piezokristall aufgezogen. Durch Infrarotlicht und einen Heiztisch wurde die Durchblutung im Schwanz gesteigert. Der Piezokristall registrierte die pulsbedingten Druckschwankungen am Schwanz der Ratte und wandelte diese in ein elektrisches Signal um, welches durch einen Verstärker

(Bloodpressure Monitor 8002 Dual Channel, TSE) registriert und durch einen Zweiphasenschreiber graphisch dargestellt wurde.

Zunächst wurde eine gleich bleibende Herzfrequenz eingestellt, dann die Blutdruckmanschette auf einen Druck von 320 mmHg aufgepumpt, sodass der Puls der Ratte unterbrochen wurde. Durch graphische Fällung eines Lots zwischen Basislinie und Druckkurve konnte später die Höhe des zur Pulsunterbrechung notwendigen Manschettendrucks und somit der systolische Blutdruck bestimmt werden. Zuvor waren die Apparate mit einem Gauss'schen Manometer kalibriert worden, hierbei entsprach 1 cm gleich 63,33 mmHg. Die Herzfrequenz wurde durch den Bloodpressure Monitor registriert. An jedem Tier wurden mindestens fünf Messungen durchgeführt und hieraus der Mittelwert gebildet.

2.3.2 Messung der passiven Aktivität

Die passive Aktivität der Tiere, d.h. in ihren Käfigen unter alltäglichen Bedingungen, wurde mittels Infrarotmethode unter Verwendung eines InfraMot-Systems (TSE, Bad Homburg) bestimmt. Dazu wurde ein Infrarotsensor über dem Käfig montiert, der die Fläche des Käfigs in 16 Quadranten unterteilt. Der Sensor registriert die Körperwärme der Tiere, so dass dieses System auch im Dunkeln angewendet werden kann. Gemessen wird die Häufigkeit des Quadrantenwechsels, wobei ein Wechsel einem „Count“ entspricht. Die passive Aktivität wurde über 24 Stunden am Wochenende gemessen, sodass möglichst wenige Artefakte durch Störung der Tiere durch Personal registriert wurden.

2.3.3 Oraler Glukosetoleranztest

Am Vortag wurden die Ratten in den Versuchsraum gebracht und 16 Stunden vor Versuchsbeginn wurde ihnen das Futter entzogen. Am Versuchstag wurde ihnen zwei Stunden vor Versuchsbeginn über die Schwanzvene Blut entnommen (2.2.2), um die Basalspiegel von Glukose und Insulin zu bestimmen. Anschließend wurde den Tieren gewichtsadaptiert (1 g/kg_{KG}) Glukose als 50%-ige Glukoselösung oral über eine Schlundsonde verabreicht und das Trinkwasser entzogen. Dann wurde

über vier Stunden in regelmäßigen Abständen der Blutzucker bestimmt sowie Blut zur Insulinspiegelbestimmung abgenommen.

2.3.4 Insulintoleranztest

Zunächst wurde wie in 2.3.3 beschrieben verfahren. Zwei Stunden nach der Basalblutabnahme wurde den Tieren gewichtsadaptiert (0,4 IE/kg_{KG}) Insulin intraperitoneal injiziert. Über 45 Minuten wurde daraufhin in regelmäßigen Abständen der Blutzucker bestimmt. Nach 15 Minuten erfolgte eine Blutentnahme über die Schwanzvene (2.2.2), um den Insulinplasmaspiegel zu bestimmen. So konnte überprüft werden, ob die Tiere nach der gewichtsadaptierten Insulingabe gleich hohe Insulinplasmaspiegel aufwiesen.

2.3.5 Schwimmtest

Um die Reaktion der Tiere auf einen Stressreiz zu untersuchen, wurde ein „Forced-Swimming-Test“ (FST) durchgeführt. Zunächst wurde den Tieren 24 Stunden zuvor über die Schwanzvene Blut abgenommen (2.2.2), um die Basalwerte der Stresshormone ACTH und Corticosteron sowie den Blutzucker zu bestimmen.

Der Schwimmtest wurde durchgeführt, indem die Ratten für je sieben Minuten in ein Becken mit 14°C kaltem Wasser gesetzt wurden. Das Wasserbecken war ausreichend groß gewählt (LxBxH: 35 x 35 x 48,5 cm, Wassertiefe 25 cm), sodass die Ratten gezwungen waren zu schwimmen, sie konnten sich weder am Boden abstützen noch am Rand festhalten. 30 und 90 Minuten nach Beginn der Schwimmperiode wurde den Tieren über die Schwanzvene Blut zur Bestimmung der Hormonkonzentration von Corticosteron und ACTH und zur Blutzuckerbestimmung abgenommen.

2.3.6 Magnetresonanztomographie

Zur Durchführung der Magnetresonanztomographie wurden die Tiere durch gewichtsadaptierte, intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (75 mg/kg_{KG}) betäubt. Die Tiere wurden in Rückenlage fixiert durch das MRT-Gerät (Philips, Achieva, 1.5

Tesla, 8-Kanal SENSE Kniespule) gefahren. Die Aufnahmen wurden in der Transversalebene mit einer Schichtdicke von 2 mm und einer Matrix von 320 x 320 Pixel erstellt.

Zur Auswertung der Bilder wurden die Programme IQ-View (<http://www.k-pacs.de/>) und ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) verwendet. Zur Ermittlung des subkutanen Fettvolumens (Abb. 3) wurde bei acht definierten Schnittbildern zwischen Hüftkopf und Nebennieren die Fläche der beidseitigen, subkutanen Fettpolster umfahren, sodass die Anzahl der Pixel innerhalb dieser Fläche bestimmt wurde. Über einen Faktor ($1 \text{ cm}^2 = 31 \times 31 \text{ Pixel}$) und durch Multiplikation mit der Schichtdicke (2 mm) konnte das Volumen der einzelnen Fettpolster berechnet werden. Zur Ermittlung des Gesamtfettvolumens wurde von allen Schnittbildern zwischen Hüftkopf und Nebennieren ein Histogramm der Signalintensität der Pixel erstellt. Jeder Pixel mit einer Signalintensität über 80 wurde als dem Fettgewebe zugehörig definiert. Die Anzahl dieser Pixel wurde ebenfalls wie oben beschrieben in Volumen umgerechnet. Zur Bestimmung des viszeralen (Abb. 3), also intraabdominell gelegenen Fettvolumens wurde von der Gesamtzahl der im Fettgewebe liegenden Pixel die Anzahl der im subkutanen Fettgewebe liegenden Pixel subtrahiert. Es handelt sich bei dieser Größe also um einen rechnerischen Wert.

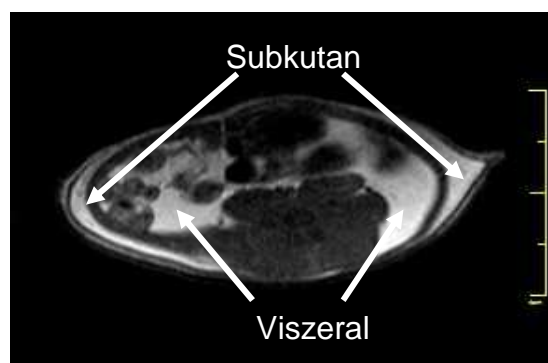


Abb. 3: Subkutanen und viszerales Fettvolumen im MRT-Querschnittsbild

2.3.7 Bestimmung von Körperumfang und -länge

Die Tiere der Studie zur Etablierung des Tiermodells wurden unter der Narkose, die sie aufgrund der Katheteroperation in Woche zwölf erhielten, vermessen. Um

die Tiere der medikamentösen Studie zu vermessen wurde die Narkose, die für die Durchführung der Magnetresonanztomographie in Woche zwölf nötig war, genutzt. Die Tiere wurden auf einen Tisch gelegt und die Länge von der Schnauze bis zur Schwanzwurzel mit einem Lineal bestimmt. Der Körperumfang wurde mit einem Maßband zwischen Hüfte und unterster Rippe gemessen.

Der Body-Mass-Index (BMI) wurde nach folgender Formel errechnet:

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht [kg]}}{\text{Körperlänge [m}^2\text{]}}$$

2.4 Dekapitation und Organpräparation

Die Tiere wurden mithilfe einer Guillotine durch Dekapitation getötet. Unmittelbar danach wurde der Rumpf des toten Tieres über einen Polypropylenrichter gehalten und so die Blutstropfen aus den Karotiden aufgefangen. Auf diese Weise wurden zunächst 2 ml Blut für die Bestimmung von Angiotensin-II gewonnen, damit die Werte nicht durch eine Aktivierung des RAAS verfälscht werden konnten. Für die Bestimmung von weiteren Hormonen wurden 4 ml Blut für EDTA-stabilisiertes Plasma und 2 ml für die Bestimmung der Katecholamine gewonnen (Tab. 4). Dann wurden die Organe (Gehirn, Herz, Leber, Niere, Nebenniere, Fettgewebe und Muskelgewebe) entnommen, mit einer Feinwaage gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Herz wurde zuvor in 0,9-prozentiger Kochsalzlösung ausgewaschen, in den linken und den rechten Ventrikel geteilt und diese separat gewogen. Muskelgewebe wurde stets vom rechten Oberschenkel der Tiere entnommen. Es wurden zwei unterschiedliche Arten von Fettgewebe konserviert: Teile des Omentum majus (omentales Fett) und zwischen den Organen gelegenes Fett (viszerales Fett). Das Gehirn wurde durch Eintauchen in trockeneisgekühltes 2-Methylbutan gefroren. Der rechte Femur wurde frei präpariert und die Länge mit einer Schublehre gemessen. Durch Punktion der Blase konnte Urin zur Bestimmung der Harnglukose gewonnen werden (Glucometer Elite[®], Bayer HealthCare; Teststreifen: Ascensia Elite[®] Sensor, Bayer HealthCare). Alle Organe wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Radioimmunoassay

Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Konkurrenz zwischen einem radioaktiv markierten Antigen (Tracer) und dem in der Probe enthaltenen, zu messenden Antigen um eine definierte Anzahl spezifischer Antikörper. Je höher die Konzentration des zu bestimmenden Antigens ist, umso niedriger ist die Wahrscheinlichkeit, dass das radioaktiv markierte Antigen an den hinzu gegebenen Antikörper bindet, und umso geringer ist also auch die radioaktive Strahlung. Konzentration des zu bestimmenden Antigens und radioaktive Strahlung verhalten sich somit reziprok zueinander.

Der Probe, bestehend aus Analyt, Tracer und spezifischem Antikörper, wurde nach einer Inkubationszeit ein zweiter Antikörper hinzu gegeben, der mit den vorhandenen Antigen-Antikörper-Komplexen einen weiteren Komplex bildete, so dass dieser durch Zentrifugation von den freien Antigenen getrennt werden konnte. Der Überstand mit dem freien Antigen wurde mit Hilfe einer Membranpumpe (Eppendorf 4151) abgesaugt. Die vom Tracer ausgehende Radioaktivität wurde mit einem Gammacounter (1282 Compugamma CS, LKB, Wallac) gemessen.

Die Konzentration der Hormone ACTH, Corticosteron, Angiotensin-II, Aldosteron, Insulin, C-Peptid, Glukagon, Adiponektin und Leptin wurde mit kommerziell erhältlichen ¹²⁵I-RIA-Kits (Anlage) bestimmt. Die Bestimmung erfolgte gemäß der Anleitung des entsprechenden Assays, jedoch aufgrund geringer Probenvolumina mit halbierten Ansätzen. Die Linearität über die niedrigeren Probenvolumina wurde in Vorversuchen bestätigt.

2.5.2 Bestimmung der Katecholamin-Plasmakonzentration

Die Katecholaminkonzentration im Plasma wurde über eine Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC-ED) mit anschließender elektrochemischer Detektion (Oxidationspotential 0,51 V gegen Ag/AgCl-Elektrode) bestimmt (Raasch et al. 2002).

Zur Extraktion der Katecholamine wurden 1,2 ml GSH-EDTA-stabilisiertes Plasma (Tab. 4) in einem Kartuschensystem mit 500 µl Tris-Puffer, 50 µl GSH-Lösung (50

mM) und 50 µl internem Standard versetzt und mit 20 mg Aluminiumoxid unter stetigem Schütteln 30 Minuten inkubiert. Dann wurde der flüssige Teil der Suspension über ein Vakuum abgesaugt und der Rückstand dreimal mit Tris-Wasser (2 ml) gewaschen und anschließend zentrifugiert (5 min, 6000 U/min). Die Katecholamine wurden durch Zugabe von 0,1 M Perchlorsäure (30 min, 4°C) ausgewaschen und somit vom Aluminiumoxid getrennt. Durch Zentrifugation wurde das Eluat in die Injektionsgefäße überführt, wovon 70 µl in die HPLC-Anlage injiziert wurden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach externer und interner Standardisierung mit 3,4-Dihydroxybenzylamin durch Auswertung der Fläche der entsprechenden Peaks.

2.5.3 Präparation des Hypothalamus

Der Hypothalamus wurde anhand stereotaktischer Daten von Palkovits und Brownstein mit einer festen Schnittfolge aus dem Gehirn präpariert. Hierzu wurden die bei -80°C gelagerten Gehirne in einem Gefriermikrotom (Leica, CM) für eine Stunde auf -12°C temperiert, um eine schneidfähige Konsistenz des Gewebes zu erhalten. Mit einer speziellen histologischen Klinge (Microtome blade) wurde der erste Schnitt 1 mm rostral des Chiasma opticum gesetzt, mit dem zweiten wurden die Corpora mamillaria abgetrennt. Die so entstandene Schnittfläche wurde auf die Seite gelegt und das ventral des Hypothalamus liegende Gewebe, einschließlich der Commissura anterior, mit einem dritten Schnitt entfernt. Zuletzt wurden die lateral gelegen Amygdala mit zwei weiteren Schnitten abgetrennt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde der Hypothalamus erneut bei -80°C gelagert.

2.5.4 Pulverisieren von Gewebeproben

Zur weiteren Verarbeitung wurden Hypothalamus, Leber, Fett- und Muskelgewebe unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit einem Mörser pulverisiert und in einem sterilen Eppendorfgefäß erneut bei -80°C tief gefroren.

2.5.5 mRNA-Isolierung

Um die mRNA aus dem Hypothalamus zu extrahieren wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (Applied Biosystems, UK). Zur Reinigung der RNA wurden mehrere Waschschriffe nach einem standardisierten Schema durchgeführt. Die Gewebeprouben wurden mit Proteinase K verdaut. Hierzu wurde das pulverisierte Hypothalamusgewebe mit 1000 µl Lysispuffer (Nucleic Acid Purification Lysis Solution, Applied Biosystems, UK) und 10 µl Proteinase K (Apilt Biosystem) versetzt.

2.5.6 mRNA-Quantifizierung mit RiboGreen®

Mit dieser Methode wurde die in der Probe enthaltene Gesamtmenge an mRNA bestimmt, so dass später die Anzahl der DNA-Kopien ins Verhältnis zur RNA-Menge gesetzt werden konnte. Verwendet wurde das kommerziell erhältliche Quant-iT™-RiboGreen®-RNA-Assay-Kit, dessen Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen® hochspezifisch an Nukleinsäuren bindet. Die einzelnen Schritte wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Da Ribogreen® im gebundenen Zustand ein Absorptionsmaximum von 500 nm besitzt, wurde die Messung bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm im Fluometric-imaging-plate-reader durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden durch Subtraktion des Blank-Wertes und gegebenenfalls mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert. Die RNA-Konzentration wurde anhand einer Eichkurve aus fünf Punkten zwischen 1 und 50 ng/ml bestimmt.

2.5.7 cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription der mRNA in die komplementäre cDNA wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Cloned AMV First-Strand Kit, Invitrogen) verwendet. Als Startsequenz diente ein 20 Basenpaar großer Oligo-(dT)-Primer, der sich an den Poly-(A)-Strang am 3'-Ende der RNA anlagerte. Als RNA-abhängige DNA-Polymerase fungierte die AMV-Reverse-Transkriptase (AMV: Avian Myeloblastosis Virus). Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

2.5.8 Prinzip der quantitativen RT-PCR

1993 wurde von Higuchi et al. eine Methode entwickelt, mit der die DNA nicht nur wie bei der herkömmlichen PCR identifiziert und densitrometrisch halbquantifiziert, sondern auch die Anzahl der vorliegenden Kopien bestimmt werden kann. Dies wird durch die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR[®] GREEN I) ermöglicht, der unter der Bindung an dsDNA fluoresziert. Je mehr DNA-Kopien vorliegen, desto mehr Farbstoff bindet und desto stärker ist folglich die Fluoreszenz. Nach jedem Temperaturzyklus wird mit Hilfe einer CCD-Kamera unter UV-Licht ein Foto erstellt und die Fluoreszenz über die Schwellenwertmethode quantifiziert. Hierbei wird die Anzahl der Zyklen (Threshold Cycle; C_T) gemessen, bis ein zuvor berechneter Fluoreszenzschwellenwert (0,3) überschritten wird. Über eine mitgeführte DNA-Standardreihe mit bekannter Kopienzahl und deren Korrelationsgeraden kann dann die ursprüngliche cDNA-Menge berechnet werden.

2.5.9 Durchführung der quantitativen RT-PCR

Für die PCR-Analytik wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with ROX, Invitrogen). Die Durchführung erfolgte in Doppelbestimmung bei absolutem Substrat- und Enzymüberschuss. Zu dem verwendeten SuperMix wurden die entsprechenden Primer (Tab. 6), DEPC-Wasser und die cDNA-Probe in eine 96 Well-Platte nach dem in Tabelle 5 dargestellten Schema hinzupipettiert.

Tabelle 5: Pipettierschema für die quantitative RT-PCR

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
cDNA-Probe bzw. Standardverdünnung	2 µl/Probe

Zur Durchführung der PCR wurde das ABI PRISM 7000 Sequence Detection System von Applied Biosystems verwendet, die entsprechenden Temperaturprotokolle wurden nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung des Farbstoffes SYBR[®] Green I erfolgte bei einer Wellenlänge von 520 nm.

Zur Quantifizierung der DNA-Kopien wurde ein PCR-Produkt vom gleichen Primerpaar mit bekannter Kopienzahl als Standard mitgeführt. Die Standardreihe umfasste fünf Konzentrationen von 10^3 bis 10^7 Kopien dsDNA/ Well.

Um die Spezifität der Primer sowie die Reinheit der Proben zu überprüfen wurde nach 40 Zyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Exemplarisch wurden Agarose-Gelelektrophoresen der PCR-Produkte hergestellt, um einen weiteren Nachweis für die Spezifität der Primer zu erbringen.

Tabelle 6: Nukleotidsequenzen der qRT-PCR-Primer

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

2.5.10 Immunoblot (Western Blot)

Diese Methode wurde verwendet um die Konzentration der Insulin-Rezeptor- β -Untereinheit (IR β) im viszeralen Fett und im Skelettmuskel zu bestimmen. Zur Proteinextraktion aus den Gewebeproben wurde ein modifizierter Homogenisierungspuffer verwendet, der aus folgenden Komponenten bestand: 10mM Tris (pH 8), 1mM EDTA, 400 mM NaCl, 0,1% Igepal CA-630, 1 mM DTT, 1mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin (alles Sigma). Die Proteinkonzentrationen wurden nach Lowry (Merck, Haar) bestimmt. Von den verschiedenen Proben wurde die gleiche Menge Protein auf ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Millipore, Eschborn) transferiert. Der Proteintransfer wurde durch Anfärben mit Coomassie Blue, die gleichmäßige Proteinverteilung durch Inkubation der Membranen mit β -Tubulin-Antikörpern (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), überprüft. Zur Identifikation der Zielproteine wurde ein für IR β spezifischer Primärantikörper (Santa Cruz) hinzu gegeben, als Sekundärantikörper dienten die entsprechenden Peroxidase-gebundenen Antimaus- oder Antikaninchen-Antikörper (Dako, Hamburg). Die Proteinbanden wurden durch Chemilumineszenz (West Dura Substrat, Fisher Scientific, Schwerte) mit Hilfe einer hochauflösenden CCD-Kamera (ChemiDoc System und Quantity One Software, Bio-Rad, München) detektiert.

2.5.11 Bestimmung des Glukosegehalts der Leber

Es wurden 200 mg pulverisiertes Lebergewebe mit Phosphatpuffer im Verhältnis 1:5 im Potter (Braun, Melsungen) homogenisiert. Nach der Zentrifugation (4°C, 7000 U, 5 min) wurde die Glukosekonzentration des Überstands mit dem Glucometer gemessen.

2.5.12 Bestimmung des Glykogengehalts der Leber

Es wurden 200 mg pulverisiertes Lebergewebe mit 0,03 N HCl-Puffer im Verhältnis 1:6 gemischt und mit Hilfe des Potters nach der Methode von Passoneau und Lauderdale (1974) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat bei 95°C im Heizblock gekocht, die Abkühlung erfolgte für zehn Minuten bei Raumtemperatur. 100 μ l der Probe wurden auf Filterpapier

(2,5 x 2,5 cm) aufgetragen und vier Mal (für 15, 40, 40 und 40 min) in 66%igem Alkohol gewaschen. Das Filterpapier wurde in Aceton getaucht, nach dem Trocknen in vier Teile geschnitten und in einem Szintillationsgefäß mit 400 µl Na-Acetatpuffer und 1,6 ml Amyloglycosidase (200 µg) bei 37°C für 90 Minuten im Schüttel-Wärme-Bad inkubiert. Nach dem Abkühlen und Zentrifugieren (4°C, 7000 U, 1 min) wurden 200 µl der Probe mit 1000 µl Glucose-Assay-Reagenz (Sigma[®], München) und weitere 200 µl mit 1000 µl aqua dest. (Blank) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Glukosegehalt photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt (Pharmacia LKB, Novaspec II). Zur Standardisierung wurden Glykogenlösungen bekannter Konzentrationen verwendet, mit denen analog verfahren wurde.

2.6 Statistik und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung, die Datenverarbeitung und die graphische Darstellung erfolgten mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 4[®].

Abbildungen und Tabellen zeigen arithmetische Mittelwerte (MW) ± Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Unter Verwendung des Grubb's outlier Tests (www.graphpad.com) wurden Werte von der statistischen Analyse ausgeschlossen, wenn diese außerhalb der vierten Standardabweichung lagen. Zur Quantifizierung der Hormon- und Blutzuckerschwankungen über den Beobachtungszeitraum während des OGTT wurde für jedes Tier die Fläche unter der Kurve (AUC) basierend auf den Deltawerten berechnet. Für die Berechnung des maximalen Anstiegs der Plasmaglukose bzw. des Plasmainsulins (C_{Max}) wurde Differenz zwischen Ausgangskonzentration und der höchsten im Test erreichten Konzentration gebildet. Für den ITT wurden die Plasmaglukosekonzentrationen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten logarithmisch dargestellt und aus der Steigung der Geraden die Halbwertszeit der Plasmaglukose abgeleitet. Der HOMA-Index wurde nach folgender Formel berechnet:

$$HOMA = \frac{Insulin [ng/ml] \times Glukose [mg/dl]}{405}$$

Zur Berechnung statistischer Signifikanzen wurde bei einem Versuchsdesign mit einer unabhängigen Variablen eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) verwendet, bei einem Versuchsdesign mit zwei unabhängigen Variablen eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way-ANOVA). Anschließend wurde ein Post-Hoc-Test nach Bonferroni durchgeführt. Wurden nur zwei normal verteilte Gruppen untersucht, wurde der Student'sche t-Test für ungepaarte Werte zur statistischen Auswertung herangezogen. Lag eine Varianzheterogenität zwischen den verschiedenen Gruppen vor, wurden die Daten unter Anwendung des Wilcoxon-Tests auf Signifikanz geprüft.

Vor Beginn der Studien wurde das Signifikanzniveau bei $\alpha = 0,05$ festgelegt. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurde die Nullhypothese verworfen und der Unterschied als statistisch signifikant angegeben.

3 Ergebnisse: Etablierung des Tiermodells

3.1 Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit von Rattenstamm und Diät

Zu Behandlungsbeginn unterschied sich das Körpergewicht von hochkalorisch gefütterten Tieren und entsprechenden Kontrollen nicht. Nach einer Fütterungsdauer von elf Wochen war bei beiden Rattenstämmen unter Cafeteria-Diät ein deutlicher Gewichtsanstieg zu verzeichnen. So wies SHR_{Cafe} ein Gewicht von 401 ± 11 g auf, die Kontrollen wogen dagegen nur 344 ± 10 g (Abb. 4A). SD_{Cafe} wogen 537 ± 16 g, die Kontrollen hierzu nur 487 ± 12 g. Auf Fütterung mit der Formula-Diät reagierten die Tiere unterschiedlich. So zeigte sich bei den Fischer-Ratten ein leichter Gewichtsanstieg (Fischer_{Formula}: 371 ± 11 g; Kontrollen: 339 ± 5 g). Die SD-Ratten nahmen unter dieser Diät sogar weniger Gewicht zu als die entsprechenden Kontrollen unter Norm-Diät (SD_{Formula}: 444 ± 11 g; Kontrollen: 500 ± 25 g). Das Gewicht der SHR unter Formula-Diät stieg erst signifikant an, nachdem sie eine hochkonzentrierte (66%) Glukoselösung anstatt Wasser zu trinken und zusätzlich zum hochkalorischen Futter Schweineschmalz angeboten bekamen (Abb. 4B). Da die Gewichtsdivergenz zur Kontrollgruppe nur dezent war und das sirupartige Getränk mit einer reduzierten Trinkmenge einherging, wurde ein solches Fütterungsregime nicht weiter verfolgt.

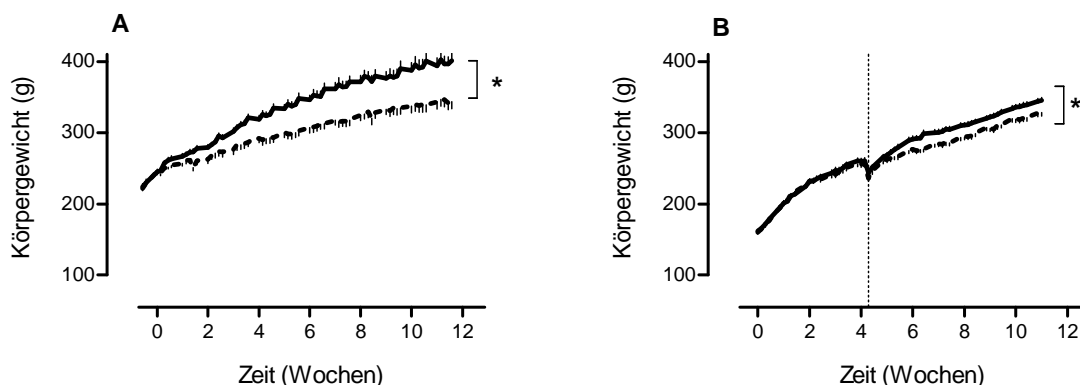


Abb. 4: Entwicklung des Körpergewichts von SHR unter Fütterung mit Cafeteria-Diät (**A**); Entwicklung des Körpergewichts von SHR unter Fütterung mit Formula-Diät (**B**). Die vertikale gepunktete Linie markiert die Umstellung von Wasser auf 66%iger Glukose-Lösung und die zusätzliche Gabe von Schweineschmalz nach 30 Tagen. Die Kontrollen erhielten jeweils Norm-Diät. Kontrollen (.....); Cafeteria-Diät bzw. Formula-Diät (—); MW \pm SEM; *: $p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrolle; $n = 6$ (A) bzw. $n = 10$ (B)

Das gegenüber den Kontrollen veränderte Körpergewicht spiegelte sich auch in einem gleichermaßen veränderten Body-Mass-Index wider (Abb. 5).

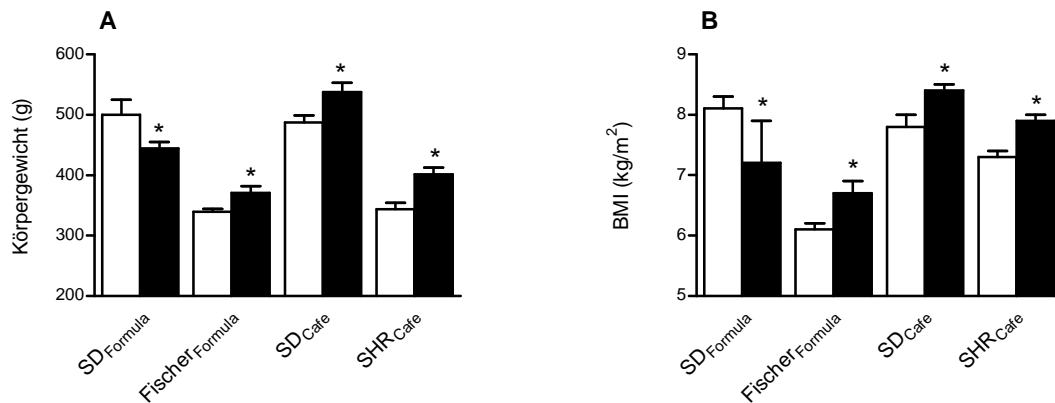


Abb. 5: Körpergewicht (A) und Body-Mass-Index (B) der verschiedenen Rattenstämme unter hochkalorischer Diät (geschlossene Balken) und unter Norm-Diät (offene Balken) nach elfwöchiger Fütterungsdauer; MW \pm SEM; *: $p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrolle; $n = 6$

3.2 Energiehaushalt

Insgesamt fiel auf, dass bei allen Tieren unter hochkalorischer Diät die Energieaufnahme von Tag zu Tag schwankte. Dieser Effekt war bei den Ratten unter Cafeteria-Diät ausgeprägter als bei denen unter Formula-Diät (in Abb. 6A exemplarisch dargestellt für SHR_{Cafe}). Die jeweiligen Kontrollen zeigten dagegen eine weitaus gleichmäßigere Energieaufnahme. Bezogen aufs Körpergewicht haben sowohl SHR als auch SD-Ratte unter Cafeteria-Diät über den gesamten Behandlungszeitraum von 12 Wochen signifikant mehr Energie zu sich genommen als die entsprechenden Kontrollen. Die SHR_{Cafe} nahmen dabei kontinuierlich über den gesamten Behandlungszeitraum mehr Energie zu sich als die Kontrollen (Abb. 6A), bei SD_{Cafe} war dies nur in den ersten Wochen der Fall, danach unterschied sich die Energieaufnahme nicht mehr von der Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Die Energieaufnahme der Tiere unter Formula-Diät war dagegen im Vergleich zu den Kontrollen nicht erhöht (Abb. 6B). Der Anteil des Normdiätfutters an der Gesamtenergieaufnahme innerhalb von 12 Wochen betrug bei SHR_{Cafe} 13,4%.

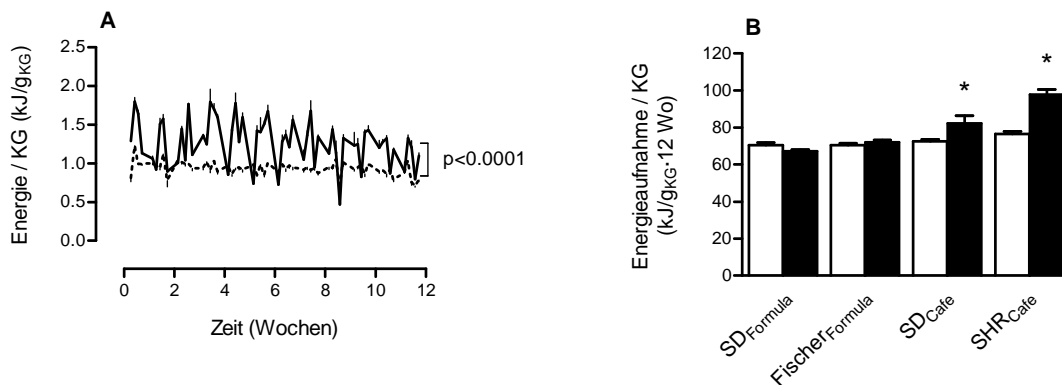


Abb. 6: Fluktuierende Energieaufnahme über 12 Wochen bezogen auf das Körpergewicht (KG) bei SHR unter Cafeteria-Diät (—) und unter Norm-Diät (---) (**A**); Kumulative Energieaufnahme über 12 Wochen bei verschiedenen Rattenstämmen unter hochkalorischer Diät (geschlossene Balken) und unter Norm-Diät (offene Balken) (**B**); MW \pm SEM; *: p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle; n=6

Die körperliche Aktivität der Tiere wurde über 24 Stunden in ihrer gewohnten Käfigumgebung gemessen, indem die Häufigkeit der Quadrantenwechsel bestimmt wurde. In Abbildung 7A ist exemplarisch die Aktivität von SHR_{Cafe} über 24 Stunden dargestellt. Es zeigte sich, dass alle Tiere in der Dunkelphase zwischen vierzehn und zwei Uhr (grau unterlegt) aktiver waren, als in der Lichtphase. Je ein Bewegungs-Peak konnte kurz vor Beginn und während der Lichtphase registriert werden. Nach elfwöchiger Behandlungsdauer bewegte sich SHR_{Cafe} signifikant mehr als die Kontrollgruppe (Abb. 7A). Eine vermehrte Aktivität konnte auch bei Fischer_{Formula} gemessen werden. Bei den SD-Ratten zeigten sich dagegen weder unter Formula- noch unter Cafeteria-Diät Unterschiede in der Aktivität (Abb. 7B).

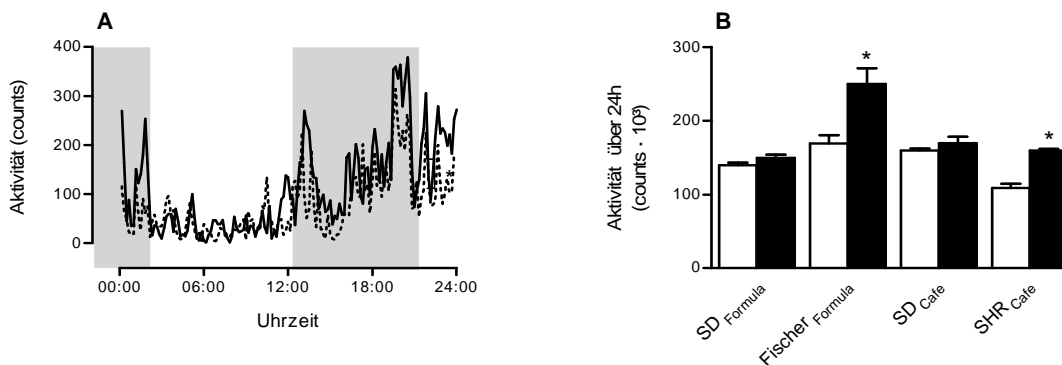


Abb. 7: Körperliche Aktivität über 24 Stunden von SHR nach elfwöchiger Fütterung mit Cafeteria-Diät (—) oder Norm-Diät (---) (**A**); Vergleich der Aktivität (kumulativ über 24 h) verschiedener Rattenstämmen unter hochkalorischer Diät (geschlossene Balken) oder unter Norm-Diät (offene Balken) nach 11 Wochen Behandlungsdauer (**B**); MW \pm SEM; *: p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle; n=6

3.3 Adipozytokine

SHR_{Cafe} zeigte bereits nach kurzer Fütterungszeit einen Anstieg der Plasmaleptinspiegel gegenüber der Kontrolle (Abb 8A). Bei Studienende war der auf das Körpergewicht normierte Plasmaleptinspiegel von SHR_{Cafe} und SD_{Cafe} im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren erhöht. Lediglich bei den SD_{Formula} war dieser Effekt nicht zu beobachten (Abb. 8B). Auch die Plasmaadiponektinspiegel stiegen bei SHR_{Cafe} bereits nach kurzer Behandlungszeit an (Abb. 8C). Die normierten Adiponektinspiegel von SHR_{Cafe} und SD_{Cafe} waren gegenüber den entsprechenden Kontrollen in Woche zwölf ebenfalls erhöht (Abb. 8D).

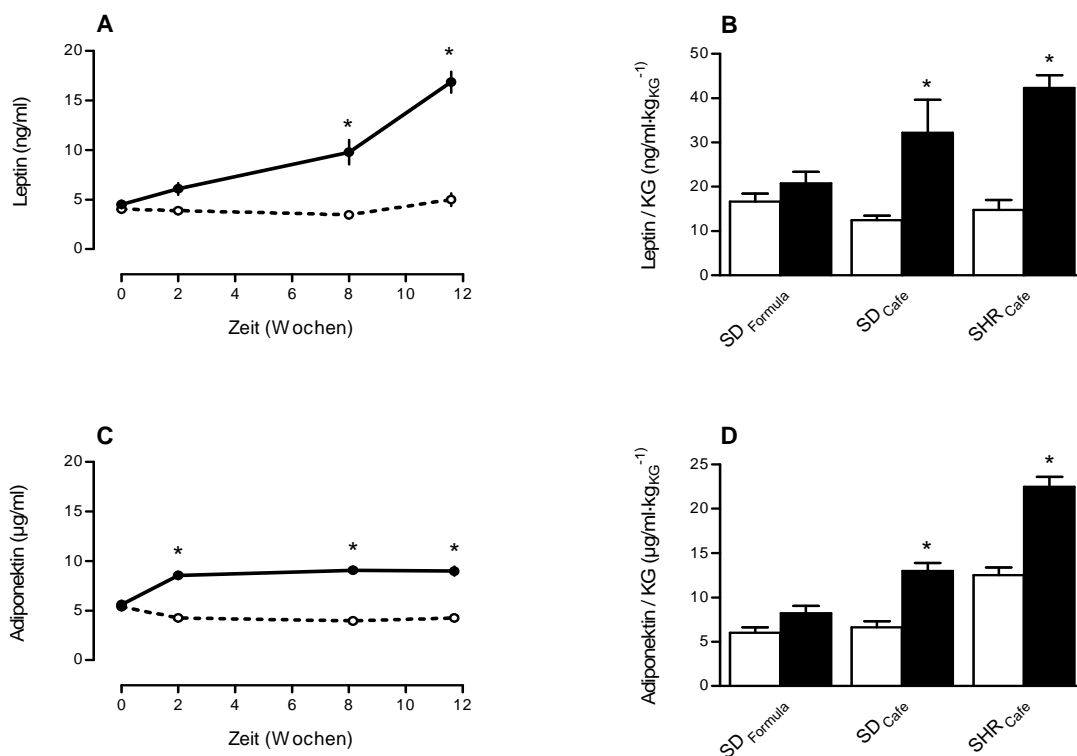


Abb. 8: Leptinspiegel von SHR unter Cafeteria-Diät (—) oder Norm-Diät (----) im Verlauf (A); Leptinspiegel von verschiedenen Rattenstämmen unter hochkalorischer (geschlossene Balken) und unter Norm-Diät (offene Balken) nach 11 bzw. 12 Wochen Behandlungsdauer (B); Adiponektinspiegel von SHR unter Cafeteria-Diät (—) oder unter Norm-Diät (----) im Verlauf (C); Adiponektinspiegel von verschiedenen Rattenstämmen unter hochkalorischer (geschlossene Balken) und unter Norm-Diät (offene Balken) nach 11 bzw. 12 Wochen Behandlungsdauer (D); MW ± SEM; *: $p < 0,05$ vs. entsprechende Kontrolle; $n = 6$

3.4 Glukosemetabolismus

Zum Zeitpunkt der Probengewinnung waren die Tiere nicht nüchtern. Während sich der Blutzucker zu Beginn der Behandlung zwischen den hochkalorisch gefütterten Tieren und den Kontrollen nicht unterschied, zeigte sich zum Zeitpunkt der Tötung bei SHR_{Cafe}, SD_{Cafe} und Fischer_{Formula} gegenüber den entsprechenden Kontrollen eine Erhöhung des Blutzuckers. Entsprechend der Blutzuckererhöhung war bei diesen Tieren eine gesteigerte Glukosurie zu beobachten. Darüber hinaus wiesen diese Tiere erhöhte Insulin- und Glukagonplasmaspiegel, eine gesteigerte Konzentration des C-Peptids im Plasma und einen gesteigerten Glykogengehalt in der Leber auf. Der HOMA-Index (1.6) war dagegen nur bei SHR_{Cafe} und SD_{Cafe} erhöht (Tab. 7).

Tabelle 7: Basale Parameter des Glukosemetabolismus von verschiedenen Rattenstämmen unter hochkalorischer (HD) und unter Norm-Diät (ND) zum Zeitpunkt der Tötung; nicht nüchtern; MW ± SEM; *: p<0,05 vs. entsprechende Kontrolle; n=6

	SD _{Formula}		Fischer _{Formula}		SD _{Cafe}		SHR _{Cafe}	
	ND	HD	ND	HD	ND	HD	ND	HD
Glukose (mg/dl)	90±2	85±1	89±3	97±3*	83±1	93±2*	77±1	87±2*
Glukosurie (mg/dl)	123±13	126±12			96±5	183±17*	93±9	134±13*
Insulin (ng/ml)	3,7±0,8	3,4±0,3	3,5±0,3	5,6±0,8*	2,3±0,3	3,6±0,7*	3,3±0,4	5,5±0,4*
HOMA I. (ng/mg)	1,3±0,3	1,2±0,1	1,0±0,2	1,1±0,1	1,9±0,4	7,1±1,7*	1,3±0,1	2,6±0,2*
Glukagon (pg/ml)	95±9	87±11	134±16	158±50*			95±2	60±6*
C-Peptid (nmol/l)	1,4±0,1	1,3±0,1	1,0±0,1	1,6±0,1*	1,4±0,1	1,5±0,1	1,6±0,1	1,9±0,1*
Glykogen (mg/g)	7,3±0,4	7,2±0,9	2,5±0,2	4,0±0,6*	7,9±0,4	7,4±0,4	6,6±0,3	14,5±1*

3.5 Oraler Glukosetoleranztest

Im Glukosetoleranztest (2.3.3) war bei SHR_{Cafe} die maximale Glukosekonzentration niedriger als bei den Kontrollen. Darüber hinaus wurde die maximale Glukosekonzentration im Vergleich zur Kontrolle später erreicht (Abb. 9A). Die Insulinkurve hierzu zeigte bei SHR_{Cafe} einen verzögerten zweiten Peak. Der Insulinspiegel blieb dann im Vergleich zu den Kontrollen bis zum Ende des Versuches, also vier Stunden nach Insulingabe, erhöht (Abb. 9B).

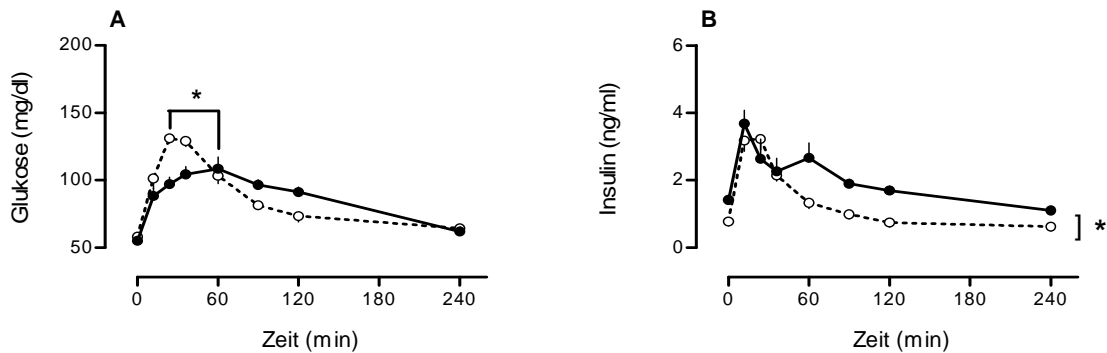


Abb. 9: Oraler Glukosetoleranztest nach 12 Wochen Behandlungsdauer: Zeitlicher Verlauf von Plasmaglukose (**A**) und Plasmainsulin (**B**) bei SHR unter Cafeteria-Diät (—) oder Norm-Diät (---) nach Gabe von 1 g/kg_{KG} Glukose; MW ± SEM; *: p<0,05 vs. Kontrolle; n=6

3.6 Insulintoleranztest

Zu Versuchsbeginn (2.3.4) unterschied sich die Plasmaglukose von SHR_{Cafe} und der entsprechenden Kontrolle nicht. Die Halbwertszeit der Plasmaglukose nach der Insulingabe war bei SHR_{Cafe} im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert (Abb. 10). Die Plasmainsulinspiegel zeigten 15 Minuten nach der i.p.-Injektion keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (SHR_{Cafe}: 4,2±0,6 ng/ml; Kontrolle: 3,9±0,6 ng/ml; n=6; p=0,68).

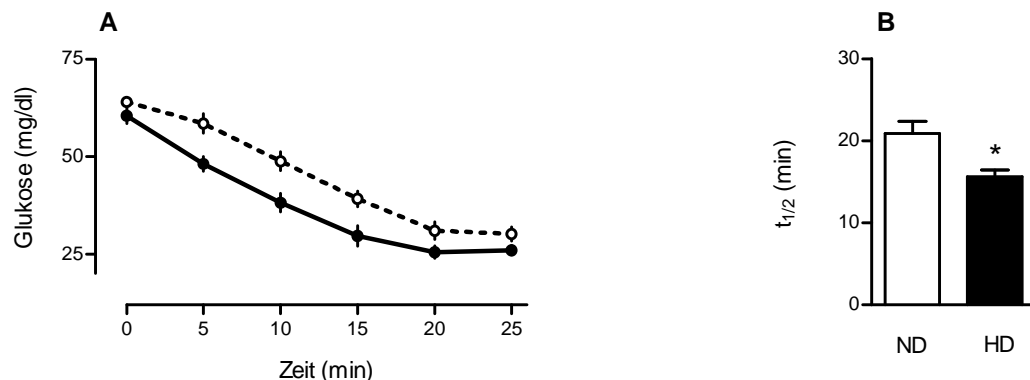


Abb. 10: Insulintoleranztest nach 12 Wochen Behandlungsdauer: Zeitlicher Verlauf (**A**) und Halbwertszeit (**B**) der Plasmaglukose bei SHR unter Cafeteria-Diät (—) oder Norm-Diät (---) nach Gabe von 0,4 IE/kg_{KG} Insulin; ND: Norm-Diät, HD: Hochkalorische Diät; MW ± SEM; *: p<0,05 vs. Kontrolle; n=6

3.7 Insulinrezeptoren in Muskel- und Fettgewebe

Bei SHR_{Cafe} wurde die Proteinexpression von IR β und dem Housekeeping-Gen Tubulin weder im viszeralen Fettgewebe noch im Skelettmuskel durch die Fütterung der Cafeteria-Diät beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

3.8 Blutfette

Die Plasmatriglyzeride stiegen bei SHR_{Cafe} im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle signifikant an (SHR_{Cafe}: 0,748 \pm 0,045 mmol/l; Kontrolle: 0,548 \pm 0,018 mmol/l; n=6; p=0,002), wohingegen sich die Plasmacholesterinspiegel nicht unterschieden (SHR_{Cafe}: 2,063 \pm 0,059 mmol/l; Kontrolle: 1,975 \pm 0,0374 mmol/l; n=6; p=0,238).

3.9 Nahrungsaufnahme regulierende Peptide

Die hypothalamischen mRNA-Levels der Peptide CART und MCH waren bei SHR_{Cafe} gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Prepro-Orexin zeigte bei SHR_{Cafe} im Vergleich zur Kontrolle eine tendenzielle aber nicht signifikante Erhöhung des mRNA-Levels. Die übrigen orexigenen und anorexigenen Peptide und das Housekeeping-Gen GAPDH blieben unverändert (Tab. 8).

Tabelle 8: mRNA-Levels (Kopien/ng mRNA) orexigener (CART, CRH) und anorexigener (Prepro-Orexin, NPY, MCH, AgRP) Peptide im Hypothalamus von SHR nach zwölfwöchiger Fütterung mit Cafeteria- bzw. Norm-Diät; MW \pm SEM; *: p<0,05 vs. Kontrolle (SHR unter Norm-Diät); n.s.: nicht signifikant; n=11-12

	Norm-Diät	Cafeteria-Diät	
CART	214100 \pm 19570	281900 \pm 26370	*
CRH	111400 \pm 7584	119400 \pm 7451	n.s.
Prepro-Orexin	1337000 \pm 114200	1747000 \pm 168500	n.s.
NPY	313400 \pm 32490	288500 \pm 28730	n.s.
MCH	3042000 \pm 277400	4144000 \pm 365900	*
AgRP	323000 \pm 42680	312400 \pm 37850	n.s.
GAPDH	9653000 \pm 825200	10610000 \pm 778600	n.s.

3.10 Noradrenalinplasmaspiegel

Nach elfwöchiger Fütterung von SHR mit der Cafeteria-Diät war der Noradrenalinpiegel gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (SHR_{Cafe}: 546±78 pg/ml; Kontrolle: 320±21 pg/ml; n=6; p = 0,0047).

3.11 Blutdruck und Herzfrequenz

Vor Beginn der Studie unterschieden sich Blutdruck und Herzfrequenz von SHR bzw. SD-Ratten unter Cafeteria-Diät und entsprechenden Kontrollen nicht signifikant. Der Blutdruck der als hypertensiv geltenden SHR lag aber deutlich über jenem der SD-Ratten. In den ersten zwei Wochen konnte sowohl bei SHR_{Cafe} als auch bei der zugehörigen Kontrolle ein Blutdruckanstieg registriert werden (Abb. 11A). In den darauf folgenden Wochen stieg der Blutdruck von SHR_{Cafe} weiter an, während jener der Kontrolle leicht abfiel, so dass SHR_{Cafe} bei Studienende einen signifikant höheren Blutdruck aufwies. Der Blutdruck der SD-Ratten stieg über den Studienzeitraum an, die Fütterung der Cafeteria-Diät zeigte dabei keinen Effekt (Abb. 11C).

Die Herzfrequenz stieg sowohl bei SHR_{Cafe} als auch bei SD_{Cafe} im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle bereits nach wenigen Wochen an und blieb bis zum Studienende signifikant erhöht (Abb. 11B und 11D).

Bei SHR_{Cafe} ging der durch die Diät erhöhte systolische Blutdruck mit einem erhöhten Herzgewicht einher (SHR_{Cafe}: 1,3±0,1 g; Kontrolle: 1,0±0,1 g; p<0,05). Das Gewicht von Leber (SHR_{Cafe}: 13,9±0,7 g; Kontrolle: 13,3±0,6 g; n.s.) und Niere (SHR_{Cafe}: 1,13±0,04 g; Kontrolle: 1,08±0,02 g; n.s.) zeigte sich bei diesen Tieren durch die Cafeteria-Diät dagegen unverändert.

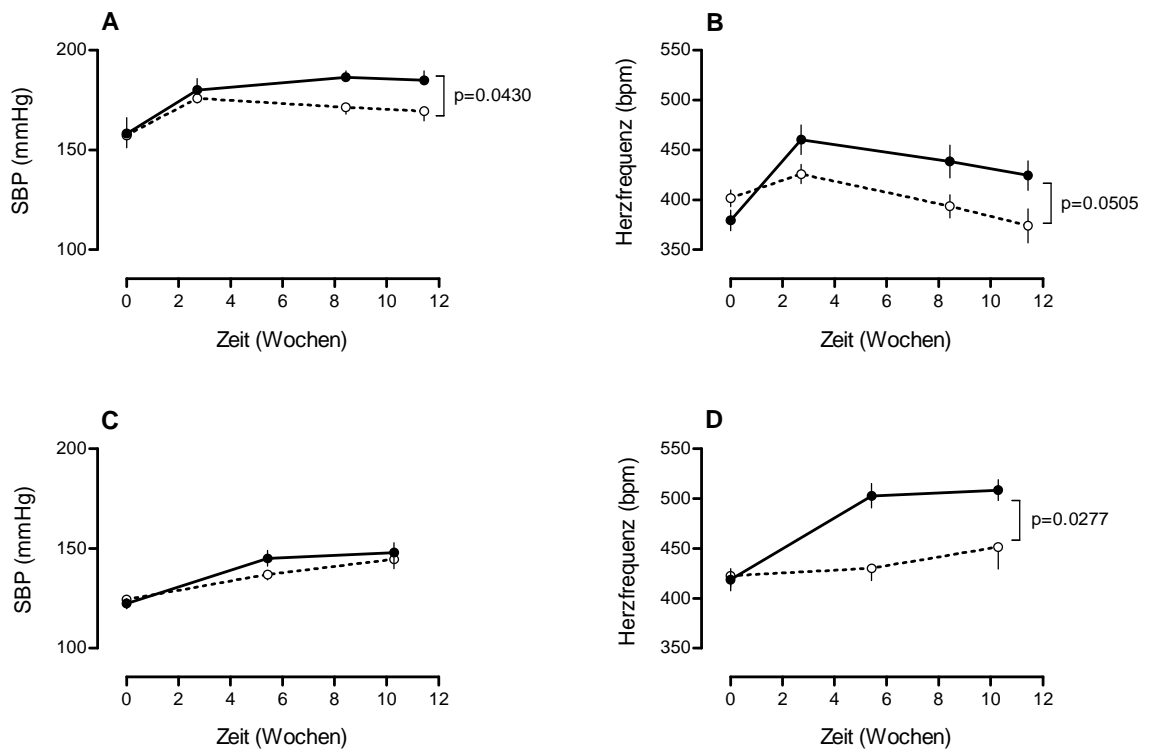


Abb. 11: Systolischer Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) von SHR unter Cafeteria-Diät (—) und unter Norm-Diät (----); Systolischer Blutdruck (C) und Herzfrequenz (D) von SD-Ratten unter Cafeteria-Diät (—) und unter Norm-Diät (----); MW \pm SEM; n=6

4 Ergebnisse: Einfluss der Blockade des RAAS auf Symptome des Metabolischen Syndroms

4.1 Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit von der Medikation

Bei Ankunft der Tiere waren alle Ratten gleich schwer. Allerdings war der Gewichtsanstieg der WKY-Ratten in der Eingewöhnungswoche wesentlich größer als der der SHR, so dass diese zu Versuchsbeginn ein höheres Körpergewicht aufwiesen als die SHR. Diese Gewichtsdiﬀerenz glich sich im Verlauf aus, so dass WKY und KON am Ende der Studie (Tag 89) gleich schwer waren (Abb. 12A und 12B). Die Gewichtsentwicklung von KON und RAM verlief parallel, so dass der Gewichtsunterschied bei Studienende nicht signifikant war. Das Körpergewicht von TEL und TEL+RAM stagnierte mit Beginn der medikamentösen Behandlung in den ersten sechs Wochen. In den darauf folgenden sechs Wochen stieg das Körpergewicht dieser beiden Gruppen zwar an, jedoch blieb bis Studienende ein deutlicher Gewichtsunterschied gegenüber KON. Die Gewichtsdiﬀerenz zwischen KON und TEL bzw. TEL+RAM betrug an Tag 89 66 bzw. 69 g. Die gleichzeitige Gewichtsabnahme der Tiere in Woche sechs ist auf die durchgeführten Funktionstests zurückzuführen, die z.T. mit Fasten verbunden waren.

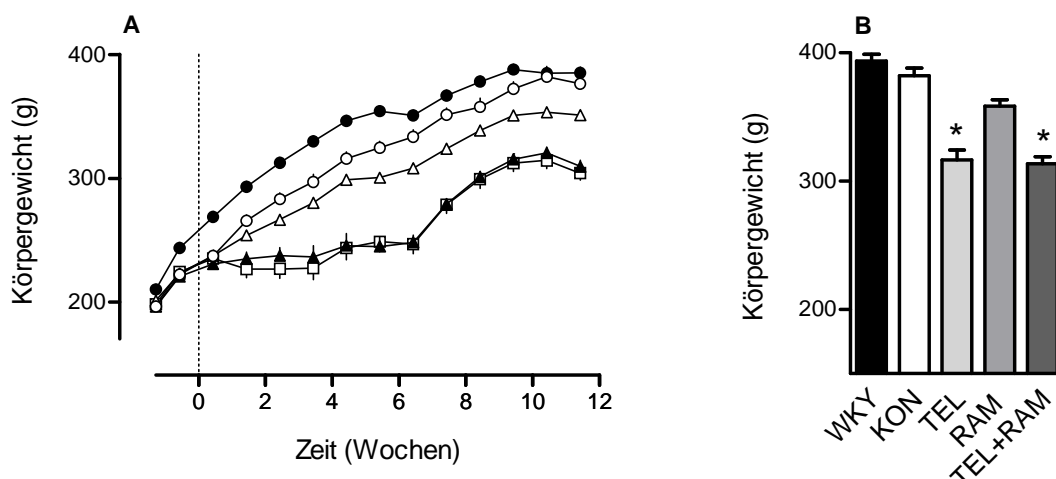


Abb. 12: Einfluss von Telmisartan (▲), Ramipril (△), Telmisartan+Ramipril (□) auf das Körpergewicht von SHR unter Cafeteria-Diät im Vergleich zu Kontrollen (○) und WKY-Ratten (●) im Verlauf (A) und an Behandlungstag 89 (B); MW ± SEM; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; $n = 10-15$

Obwohl das Körpergewicht von KON und WKY sich am Ende der Studie nicht unterschied, waren Körper- und Femurlänge bei WKY vergrößert (Tab. 9). Letztere stellt einen sensiblen Parameter für das Knochenwachstum dar. Das Nierengewicht von WKY war im Vergleich zu KON erhöht, nicht jedoch das Gewicht der Leber. Das niedrigere Körpergewicht von TEL und TEL+RAM ging mit einem gegenüber KON erniedrigten Body-Mass-Index einher. Nicht nur der Körperumfang dieser Tiere war geringer sondern auch Körper- und Femurlänge. Während das Gewicht der Niere sich bei den unterschiedlich behandelten SHR nicht unterschied, war das Gewicht der Leber von TEL und TEL+RAM gegenüber KON vermindert.

Tabelle 9: Einfluss von Telmisartan (TEL), Ramipril (RAM), Telmisartan+Ramipril (TEL+RAM) auf Wachstumsparameter von Cafeteria-Diät gefütterten SHR im Vergleich zu Kontrollen (KON) und WKY-Ratten (WKY) zum Zeitpunkt der Tötung in Woche 13; MW \pm SEM; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; †: $p < 0,05$ vs. TEL bzw. TEL+RAM; n=10-15

	WKY	KON	TEL	RAM	TEL+RAM
BMI (kg/m ²)	7,70 \pm 0,11	8,10 \pm 0,16	7,34 \pm 0,14*	7,80 \pm 0,16 [†]	7,11 \pm 0,17*
Bauchumfang (cm)	18,7 \pm 0,2	18,6 \pm 0,2	17,1 \pm 0,2*	17,9 \pm 0,2 [†]	16,5 \pm 0,2*
Gewichtszunahme (g)	138 \pm 4	155 \pm 4	90 \pm 4*	126 \pm 4* [†]	78 \pm 5*
Körperlänge (cm)	22,6 \pm 0,1*	21,8 \pm 0,1	20,9 \pm 0,1	21,5 \pm 0,2	20,9 \pm 0,3
Femurlänge (mm)	38,8 \pm 0,1*	36,7 \pm 0,1	35,5 \pm 0,1*	36,4 \pm 0,1 [†]	35,6 \pm 0,1*
Nebenniere (mg)	21,1 \pm 0,5*	22,4 \pm 0,6	23,7 \pm 0,6	22,3 \pm 0,6	23,2 \pm 0,5
Leber (g)	11,9 \pm 0,2	11,5 \pm 0,2	9,9 \pm 0,4*	11,4 \pm 0,4	8,9 \pm 0,2*

Um zu demonstrieren, dass das niedrigere Körpergewicht von TEL bzw. TEL+RAM auf eine geringere Fettmasse zurückzuführen ist, wurde diese durch Verwendung der Magnet-Resonanz-Tomographie erfasst. In Abbildung 13A sind repräsentativ die 3D-Bilder der Ratten, die mit ihrem Körpergewicht dem Mittelwert der jeweiligen Gruppe am nächsten lagen, dargestellt. Vor allem bei TEL und TEL+RAM ist eine deutlich reduzierte Gesamtfettmasse zu erkennen. Um diesen subjektiven Eindruck zu quantifizieren wurden von allen Tieren definierte Schnittbilder nach subkutaner und viszeraler Fettmasse getrennt ausgewertet (2.3.6). KON wies im Vergleich zu WKY ein deutlich erhöhtes viszerales

Fettvolumen auf, sie unterschieden sich jedoch nicht im subkutanen Fettgewebe (Abb. 13B und 13C). Unter der Behandlung mit TEL, RAM und TEL+RAM war das viszerale Fettvolumen signifikant geringer als bei KON. Ein geringeres subkutanes Fettvolumen konnte dagegen nur bei TEL und TEL+RAM registriert werden, nicht jedoch bei RAM. Sowohl viszerales (Pearson $r=0,636$; $p<0,0001$) als auch subkutanes Fettvolumen (Pearson $r=0,69$; $p<0,0001$) korrelierten mit dem Körpergewicht der Tiere, wobei KON das höchste Level von Körpergewicht und Fettvolumina aufwies, TEL und TEL+RAM dagegen das niedrigste (Abb. 14).

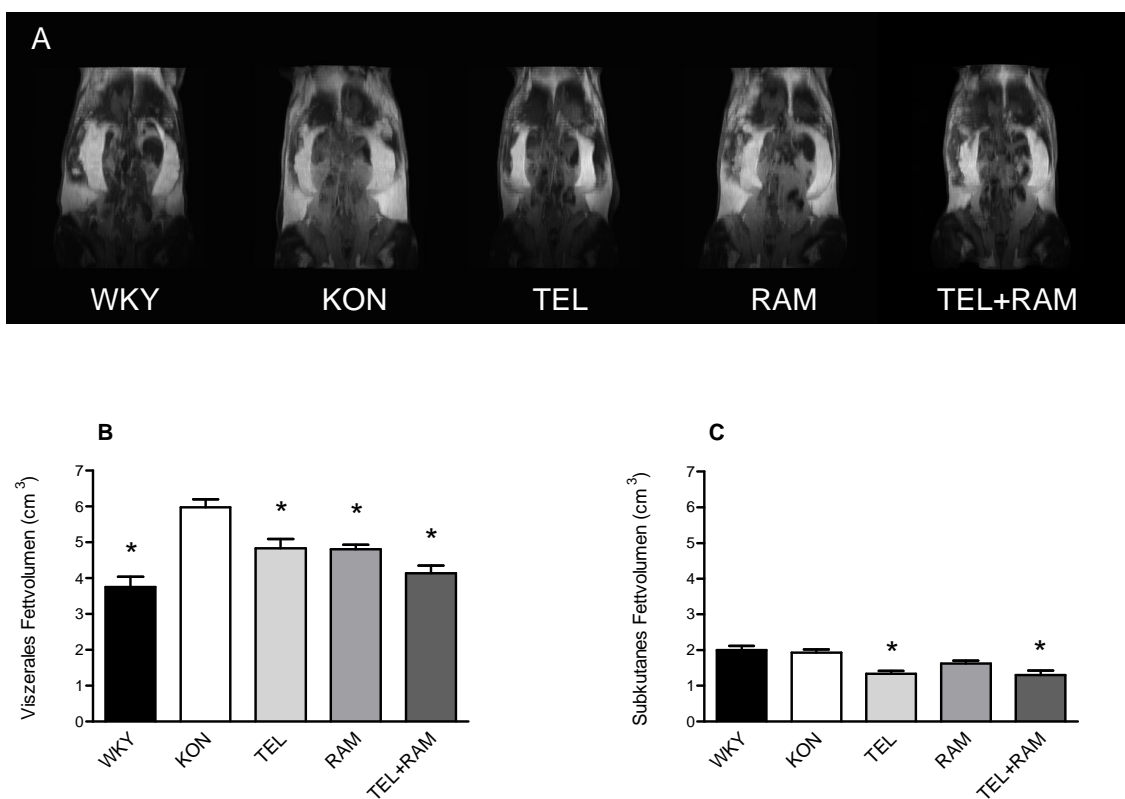


Abb. 13: Repräsentative Darstellung der MRT-Bilder der Tiere, die mit ihrem Körpergewicht dem Mittelwert der jeweiligen Gruppe am nächsten lagen (**A**). Einfluss von Telmisartan (TEL), Ramipril (RAM), Telmisartan+Ramipril (TEL+RAM) auf das viszerale (**B**) und subkutane (**C**) Fettvolumen bei Cafeteria-Diät gefütterten SHR im Vergleich zu Kontrollen (KON) und WKY-Ratten (WKY); MW \pm SEM; *: $p<0,05$ vs. Kontrolle; $n=10-15$

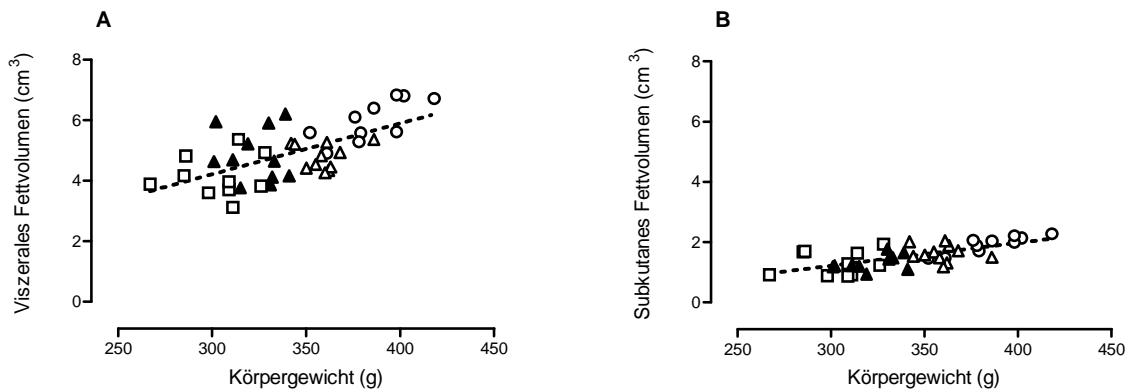


Abb. 14: Korrelation zwischen Körpergewicht und viszeralem (A) und subkutanem (B) Fettvolumen bei SHR unter Cafeteria-Diät behandelt mit Telmisartan (▲), Ramipril (Δ) bzw. Telmisartan+Ramipril (□) im Vergleich zu Kontrollen (○) und WKY-Ratten (●); MW ± SEM; n=10-15

4.2 Adipozytokine

Vor Behandlungsbeginn waren die Plasmaleptin- und die Adiponektinspiegel der SHR etwa doppelt so hoch wie die der WKY-Ratten (Abb. 15A und 15C). Bei beiden Rattenstämmen nahm die Plasmaleptinkonzentration über den Behandlungszeitraum zu. Bei TEL und TEL+RAM blieb die Plasmaleptinkonzentration jedoch für die ersten sieben Wochen auf Ausgangsniveau und stieg erst danach an (Abb. 15A). Nach etwa neun Wochen Behandlungsdauer unterschieden sich die Leptinspiegel von KON, RAM und TEL nicht mehr, die Leptinspiegel von TEL+RAM und WKY waren dagegen immer noch signifikant vermindert. Entsprechend lag die AUC der Leptinkurve von TEL+RAM und TEL deutlich unter der AUC von KON und RAM (Abb. 15B).

Die Kontrollen und RAM erreichten die höchsten Adiponektinspiegel nach zwei Wochen. Dagegen stiegen die Adiponektinspiegel bei TEL und TEL+RAM über das Niveau von KON hinaus weiter an (Abb. 15C). In der Analyse der AUC der Plasmaadiponektinspiegel zeigte sich kein Unterschied zwischen KON und TEL bzw. TEL+RAM. Die Plasmaspiegel dieser drei Gruppen waren aber gegenüber denen von RAM und WKY erhöht (Abb. 15D).

Bei Studienende korrelierten die Leptinspiegel der verschiedenen Gruppen mit dem entsprechenden Gesamtfettvolumen (Pearson $r=0,572$; $p<0,0001$). KON wies bei größtem Fettvolumen die höchsten Plasmaleptinspiegel auf (Abb. 16).

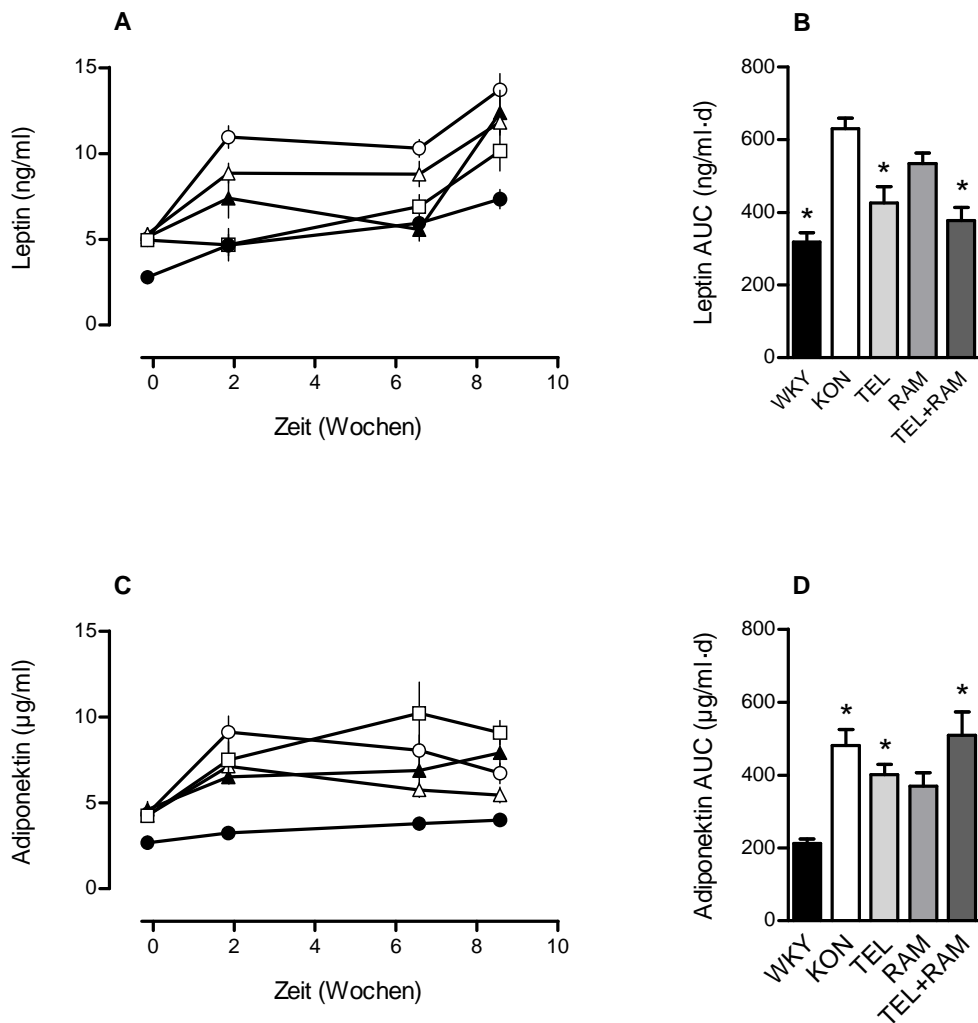


Abb. 15: Einfluss von Telmisartan (▲), Ramipril (△), Telmisartan+Ramipril (□) auf die Plasmaspiegel von Leptin von SHR unter Cafeteria-Diät im Vergleich zu Kontrollen (○) und WKY-Ratten (●), zeitlicher Verlauf (A) und AUC (B); MW ± SEM; *: p<0,05 vs. Kontrolle; n=10-15; Einfluss der Medikation auf die Plasmaspiegel von Adiponektin, zeitlicher Verlauf (C) und AUC (D); MW ± SEM; *: p<0,05 vs. WKY; n=10-15

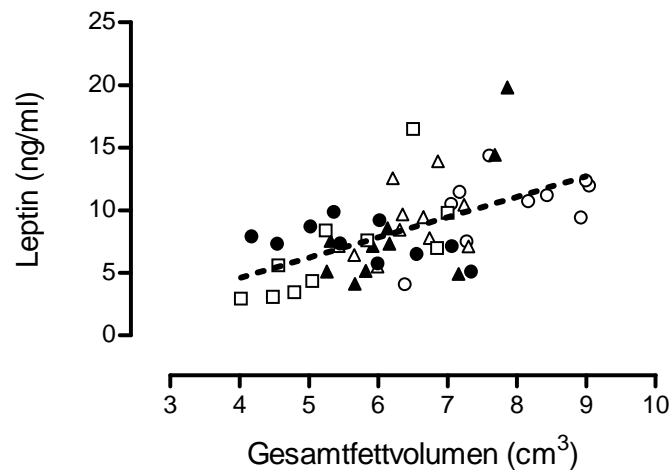


Abb. 16: Korrelation zwischen Plasmaleptinspiegel und Gesamtfettvolumen (viszerales + subkutanes Fettvolumen) bei SHR unter Cafeteria-Diät behandelt mit Telmisartan (▲), Ramipril (△) bzw. Telmisartan+Ramipril (□) im Vergleich zu Kontrollen (○) und WKY-Ratten (●); MW ± SEM; n=10-15

4.3 Energieaufnahme

Vor Behandlungsbeginn war die Energieaufnahme der Tiere bezogen auf das Körpergewicht gleich hoch. Mit Beginn der Cafeteria-Diät stieg die Energieaufnahme von KON in der ersten Woche deutlich an, um dann über den restlichen Behandlungszeitraum kontinuierlich abzunehmen (Pearson $r = -0,970$; $p < 0,0001$), jedoch nicht unterhalb des Ausgangsniveaus. Auch die wöchentliche Energieaufnahme von WKY und RAM fiel über den Behandlungszeitraum ab (WKY: Pearson $r = -0,923$, $p = 0,0001$; RAM: Pearson $r = -0,922$, $p = 0,0004$). Die Energieaufnahme von WKY war dabei über den gesamten Behandlungszeitraum gegenüber KON reduziert. Die Energieaufnahme von RAM war dagegen nur in den ersten drei Behandlungswochen geringer als bei KON, danach konnte kein Unterschied mehr beobachtet werden. In den ersten zwei Wochen nahmen TEL und TEL+RAM zwar deutlich weniger Energie auf als KON, nach fünf Wochen überstieg die Energieaufnahme jedoch deutlich das Niveau von KON und blieb bis Studienende signifikant erhöht (Abb. 17A). Die Gesamtenergieaufnahme war im Vergleich zu KON bei TEL (9,2%) und TEL+RAM (8,8%) erhöht. Dies ist auf den vermehrten Verzehr von Norm-Diätfutter zurückzuführen, da die Aufnahme der Schokoriegel unverändert war. Der Verzehr von Schokoriegeln war dagegen bei

RAM deutlich reduziert, sodass trotz erhöhter Aufnahme von Norm-Diät-Futter die Gesamtenergieaufnahme im Vergleich zu KON signifikant vermindert war (-8,1%; Abb. 17B).

Der Plasma leptinspiegel der WKY-Ratten korrelierte negativ mit der Energieaufnahme, bei den SHR wurde dagegen unabhängig von der Medikation eine positive Korrelation beobachtet (Abb. 18).

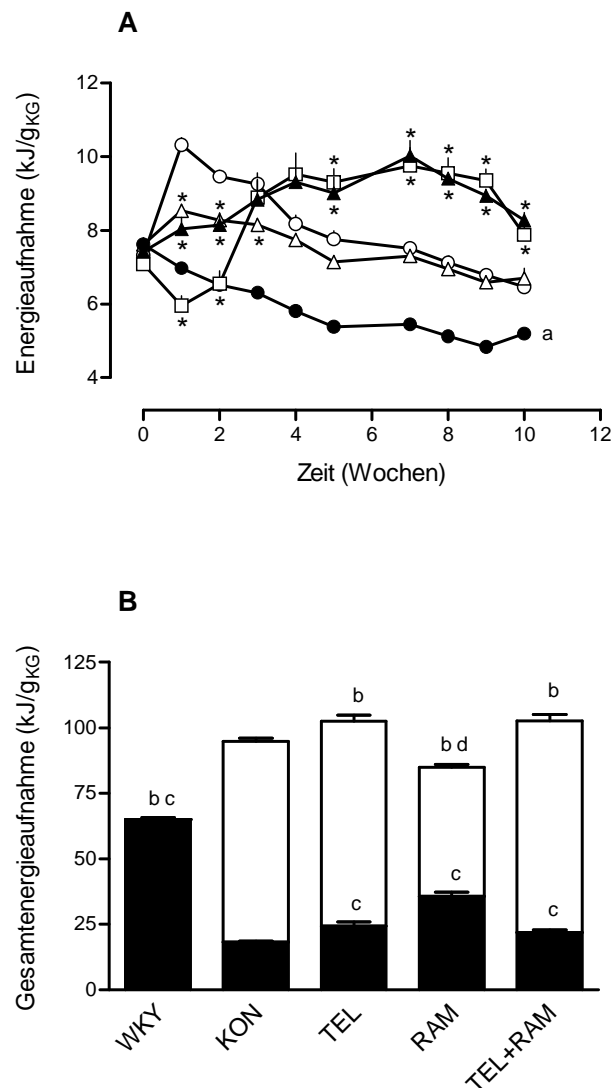


Abb. 17: (A) Einfluss von Telmisartan (▲), Ramipril (Δ) und Telmisartan+Ramipril (□) auf die wöchentliche gewichtsnormierte Energieaufnahme von SHR unter Cafeteria-Diät im Vergleich zu Kontrollen (○) und WKY-Ratten (●); MW ± SEM; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; a: $p < 0,05$ vs. Kontrolle zu jedem Zeitpunkt außer Woche 0; n=10-15;

(B) Einfluss der Medikation auf die Gesamtenergieaufnahme über 13 Wochen von SHR unter Cafeteria-Diät im Vergleich zu Kontrollen und WKY-Ratten unterteilt in Energieaufnahme über Schokoriegel (offene Balken) und über Norm-Diät (geschlossene Balken); MW ± SEM; b: Gesamtenergieaufnahme $p < 0,05$ vs. Kontrolle; c: Energieaufnahme über Norm-Diät $p < 0,05$ vs. Kontrolle; d: Energieaufnahme über Schokoriegel $p < 0,05$ vs. Kontrolle; n=10-15

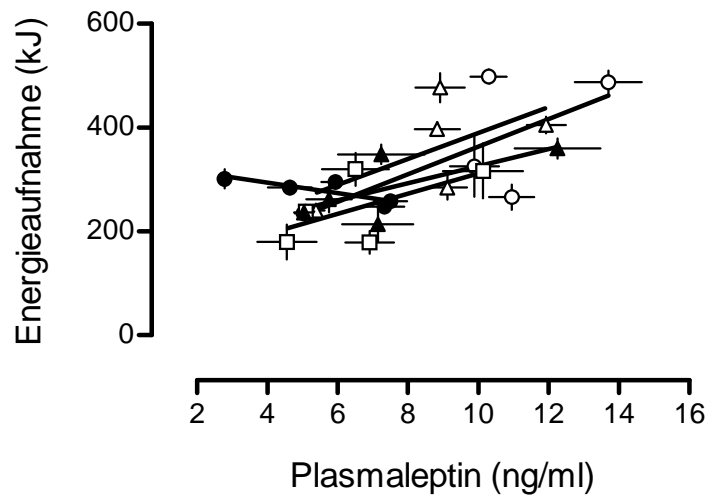


Abb. 18: Korrelation zwischen Plasmaleptin und entsprechender Energieaufnahme zu Beginn der Studie und an Tag 13, 46 und 60 bei SHR unter Cafeteria-Diät behandelt mit Telmisartan (\blacktriangle), Ramipril (\triangle) und Telmisartan+Ramipril (\square) im Vergleich zu Kontrollen (\circ) und WKY-Ratten (\bullet); MW \pm SEM; n=10-15

Gegenüber WKY waren die mRNA-Level (Kopien/ ng mRNA) der hypothalamischen Peptide MCH und CRH sowohl bei KON als auch bei RAM, TEL und TEL+RAM gleichermaßen erhöht. Darüber hinaus waren bei TEL die mRNA-Level von AgRP und CART erhöht. Bei TEL+RAM war dagegen die mRNA-Menge von AgRP erhöht, nicht jedoch die von CART (Tab. 10).

Tabelle 10: Einfluss von Telmisartan, Ramipril, Telmisartan+Ramipril auf mRNA-Level (Kopien/ ng mRNA) orexigener und anorexigener Peptide von Cafeteria-Diät gefütterten SHR im Vergleich zu Kontrollen und WKY-Ratten am Ende des Behandlungszeitraumes; MW \pm SEM; †: p<0,05 vs. WKY; n=10-15

	WKY	KON	TEL	RAM	TEL+RAM
PPO	1,4 \pm 0,1x10 ⁶	1,5 \pm 0,1x10 ⁶	1,5 \pm 0,1x10 ⁶	1,4 \pm 0,1x10 ⁶	1,3 \pm 0,1x10 ⁶
NPY	1,8 \pm 0,2x10 ⁵	2,1 \pm 0,2x10 ⁵	2,4 \pm 0,2x10 ⁵	2,2 \pm 0,2x10 ⁵	2,2 \pm 0,2x10 ⁵
MCH	3,4 \pm 0,1x10 ⁶	4,7 \pm 0,1x10 ⁶ †	4,9 \pm 0,1x10 ⁶ †	4,1 \pm 0,1x10 ⁶ †	3,8 \pm 0,1x10 ⁶
AgRP	1,3 \pm 0,1x10 ⁶	1,7 \pm 0,1x10 ⁶	2,1 \pm 0,1x10 ⁶ †	2,0 \pm 0,1x10 ⁶ †	1,6 \pm 0,1x10 ⁶
CART	7,0 \pm 0,4x10 ⁵	9,2 \pm 0,4x10 ⁵	9,5 \pm 0,4x10 ⁵ †	8,4 \pm 0,4x10 ⁵	7,6 \pm 0,4x10 ⁵
CRH	7,0 \pm 0,4x10 ⁵	9,3 \pm 0,4x10 ⁵ †	9,7 \pm 0,4x10 ⁵ †	8,5 \pm 0,4x10 ⁵ †	8,7 \pm 0,4x10 ⁵ †

4.4 Aktivität

Die Aktivität der Tiere wurde in den Wochen fünf und elf mithilfe der Infrarottechnik (InfraMot System TSE) über 24 Stunden gemessen. Summiert man alle „Counts“ auf und betrachtet die kumulative Aktivität in 24 Stunden, zeigt sich sowohl nach fünf als auch nach elf Wochen bei WKY eine deutlich geringere Aktivität als bei KON. In Woche fünf bewegten sich TEL und TEL+RAM etwas weniger als KON, zwischen RAM und KON konnte jedoch kein Unterschied beobachtet werden. In Woche elf dagegen war die Aktivität von KON, RAM, TEL und TEL+RAM gleich hoch (Abb. 19). Die Aktivität von KON war in Woche elf geringer als in Woche fünf. Die Unterschiede in der Aktivität zwischen den verschiedenen Gruppen wurden vor allem in der Dunkelphase gemessen (Daten nicht gezeigt).

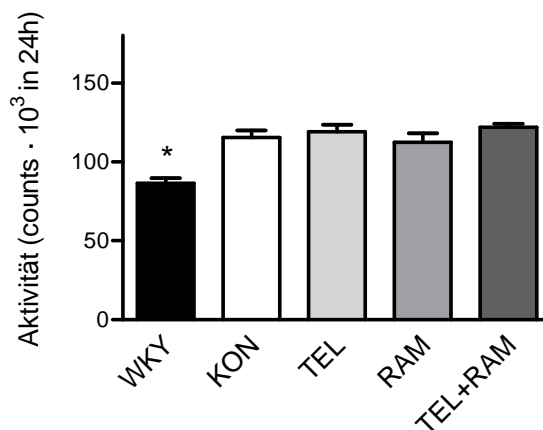


Abb. 19: Einfluss von Telmisartan (TEL), Ramipril (RAM) und Telmisartan+Ramipril (TEL+RAM) auf die Homecage-Aktivität von SHR unter Cafeteria-Diät im Vergleich zu Kontrollen (KON) und WKY-Ratten (WKY) in Woche 11; MW ± SEM; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; $n = 10-15$

4.5 Hämodynamik

Vor Beginn der medikamentösen und diätetischen Behandlung war der Blutdruck der SHR gleich hoch, die WKY-Ratten wiesen einen niedrigeren Blutdruck auf, der über die gesamte Studiendauer konstant blieb. Der Blutdruck der Kontrollen stieg unter Cafeteria-Diät zeitabhängig an. Bei TEL, RAM oder TEL+RAM wurde dieser Blutdruckanstieg durch die Medikation nicht nur verhindert, sondern der Blutdruck deutlich unter Ausgangsniveau gesenkt. Telmisartan senkte den Blutdruck auf hypotensive Werte (103 ± 3 mmHg), wobei durch die zusätzliche Gabe von Ramipril

der Blutdruck nicht noch weiter gesenkt werden konnte (103 ± 2 mmHg). Die Therapie mit Ramipril allein war dagegen weniger potent (143 ± 2 mmHg; Abb. 20A).

Zu Beginn der Studie wiesen die WKY-Ratten gegenüber den SHR eine etwas erhöhte Herzfrequenz auf. Während KON im Verlauf einen Frequenzanstieg zeigte, sank die Herzfrequenz von WKY unter Ausgangsniveau ab. TEL, RAM und TEL+RAM zeigten dagegen über die gesamte Studiendauer eine konstante Herzfrequenz, zwischen den Medikationen gab es dabei keinen Unterschied in der Höhe der Herzfrequenz (Abb. 20B).

Der linke Herzventrikel von KON zeigte eine deutliche Hypertrophie im Vergleich zu WKY (Abb. 21A). Durch die Gabe von Ramipril konnte eine Hypertrophie verhindert werden. Bei TEL und TEL+RAM war das Gewicht des linken Ventrikels gegenüber WKY sogar vermindert, die zusätzliche Gabe von Ramipril brachte im Vergleich zur Monotherapie mit Telmisartan jedoch keinen additiven Effekt. Eine positive Korrelation konnte zwischen Blutdruck und linksventrikulärem Gewicht beobachtet werden (Pearson $r = 0,9177$; $p < 0,0001$; Abb. 21B).

Die Plasmaspiegel von Angiotensin-II und Aldosteron waren bei KON, WKY und RAM etwa gleich hoch. Im Vergleich dazu waren die Angiotensin-II-Spiegel bei TEL etwa zehnfach und bei TEL+RAM etwa dreifach erhöht. Die Aldosteronspiegel dagegen waren bei TEL und TEL+RAM vermindert, wobei die zusätzliche Gabe von Ramipril keinen additiven Effekt zeigte (Tab. 12, Seite 54).

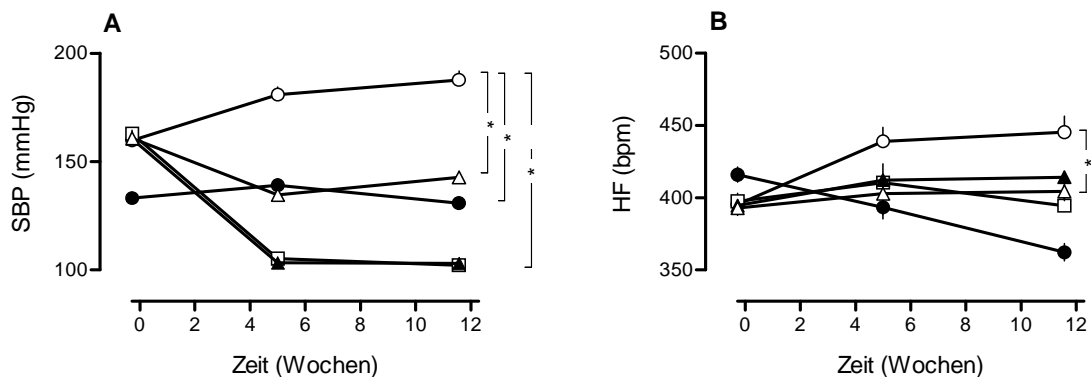


Abb. 20: Einfluss von Telmisartan (▲), Ramipril (△) und Telmisartan+Ramipril (□) auf systolischen Blutdruck (SBP) und Herzfrequenz (HF) von SHR unter Cafeteria-Diät im Vergleich zu Kontrollen (○) und WKY-Ratten (●); MW \pm SEM; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; $n = 10-15$

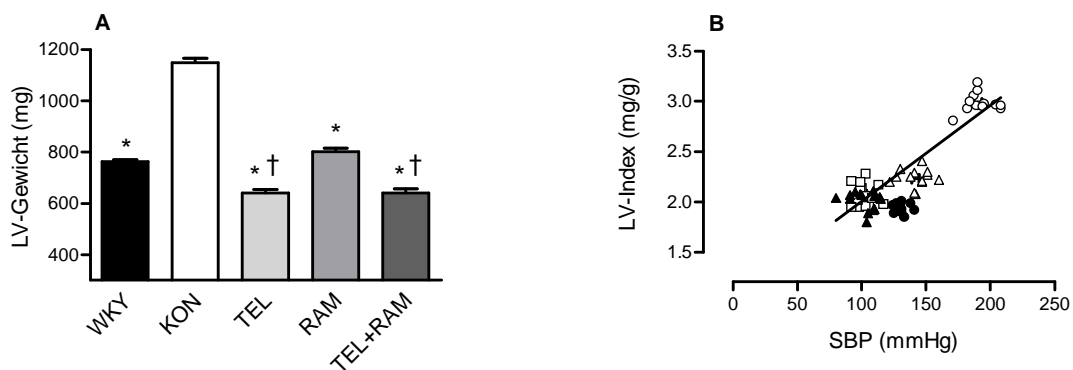


Abb. 21: Linksventrikuläres Gewicht (LV-Gewicht) und Korrelation von linksventrikulärem Index (LV-Index) und systolischem Blutdruck (SBP) bei SHR unter Cafeteria-Diät unter Einfluss von Telmisartan (▲), Ramipril (△) und Telmisartan+Ramipril (□) im Vergleich zu Kontrollen (○) und WKY-Ratten (●); MW ± SEM; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; †: $p < 0,05$ vs. WKY; $n = 10-15$

4.6 Glukosemetabolismus

Vor der medikamentösen Behandlung waren die basalen Glukose- und Insulinwerte in allen Gruppen gleich hoch. Gegenüber WKY waren nach sechs Wochen Behandlungsdauer der Blutzucker und die Insulinplasmakonzentration (beides nüchtern gemessen) von KON erhöht. Im Vergleich zu KON war der Nüchternblutzucker bei TEL und TEL+RAM erhöht, die Behandlung mit Ramipril zeigte dagegen keinen Effekt. Die Insulinplasmakonzentration wurde durch die medikamentöse Behandlung nicht beeinflusst (Tab. 11).

Der HOMA-Index ist ein Parameter zur Quantifizierung einer Insulinresistenz und basiert auf nüchtern gemessenen Insulin- und Glukosewerten. Nach zwölf Wochen Behandlungsdauer lag nur der HOMA-Index von WKY im Normbereich (< 2). Der HOMA-Index von KON, TEL, RAM und TEL+RAM war gegenüber WKY erhöht, die Medikation zeigte dabei jedoch keinen signifikanten Einfluss (Tab. 11).

Die Glukagonspiegel von WKY und KON unterschieden sich nicht. Die Behandlung mit Telmisartan und Telmisartan+Ramipril führte zu einer Erhöhung der Glukagonspiegel, die Behandlung mit Ramipril blieb dagegen ohne Effekt. Im Glykogengehalt der Leber zeigten sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Tab. 11).

Um die Veränderungen im Glukosestoffwechsel besser beurteilen zu können, wurden in Woche sechs und zwölf ein oraler Glukosetoleranztest und ein Insulintoleranztest durchgeführt. Nach sechs Wochen Behandlungsdauer lag bei beiden Tests der basale Nüchternblutzucker von TEL und TEL+RAM über dem der anderen Tiere. Die Glukose- und die Insulinantwort auf die Glukosegabe waren bei KON im Vergleich zu WKY verstärkt, denn sowohl der maximale Anstieg der Glukose- und Insulinplasmaspiegel ($C_{\max}\text{Glu}$; $C_{\max}\text{Ins}$) als auch die AUCs der entsprechenden Plasmakonzentrationskurven waren erhöht. RAM zeigte gegenüber KON eine noch gesteigerte Glukoseantwort, denn die AUC der Glukosekurve war erhöht. Die AUC der Insulinkurve und $C_{\max}\text{Ins}$ wurden dagegen nicht durch Ramipril beeinflusst. Gegenüber KON waren die AUC der Glukosekurve und $C_{\max}\text{Glu}$ bei TEL und TEL+RAM zwar nicht verändert, jedoch waren die AUC der Insulinkurve und $C_{\max}\text{Ins}$ durch diese Medikamente signifikant reduziert (Abb. 22 und Tab. 11). Vergleichbare Ergebnisse wurden im OGTT nach zwölf Wochen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Im Insulintoleranztest nach sechswöchiger Behandlung war die Reaktion auf die Insulingabe von TEL und TEL+RAM gesteigert, denn die Halbwertszeit der Plasmaglukose und die minimale Glukosekonzentration (C_{\min}) waren gegenüber KON vermindert. Zwischen RAM und KON konnten hingegen keine Unterschiede registriert werden. Fünfzehn Minuten nach der Insulininjektion wurden die Plasmainsulinspiegel der Tiere bestimmt, um sicher zu gehen, dass diese gleich hoch waren. Die Insulinspiegel von KON ($6,6\pm 0,5$ ng/ml), TEL ($7,3\pm 0,6$ ng/ml), RAM ($5,7\pm 0,6$ ng/ml) und TEL+RAM ($7,5\pm 0,6$ ng/ml) unterschieden sich nicht. Jedoch war der Insulinspiegel von WKY gegenüber den anderen Tieren vermindert ($3,0\pm 0,3$ ng/ml) und gleichzeitig die Halbwertszeit der Plasmaglukose erhöht (Abb. 23). Der nach zwölf Wochen Behandlungsdauer durchgeführte Insulintoleranztest lieferte ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 11: Metabolische Parameter von SHR unter Cafeteria-Diät nach zwölfwöchiger Behandlung mit Telmisartan (TEL), Ramipril (RAM) oder der Kombination Telmisartan+Ramipril (TEL+RAM) im Vergleich zu Kontrollen (KON) und WKY-Ratten (WKY); C_{\max} Glu und C_{\max} Ins: Maximaler Anstieg der Glukose- bzw. Insulinplasmakonzentration im OGTT; nü.: nüchtern; MW \pm SEM; *: $p < 0,05$ vs. KON; †: $p < 0,05$ vs. WKY; $n = 10-15$

	WKY	KON	TEL	RAM	TEL+RAM
Glukose nü. (mg/dl)	56 \pm 1*	60 \pm 1	74 \pm 2*	59 \pm 1	68 \pm 2*
Insulin nü. (ng/ml)	0,46 \pm 0,07*	1,21 \pm 0,11	0,91 \pm 0,12	0,89 \pm 0,08	0,87 \pm 0,07
HOMA-Index (ng/mg)	1,7 \pm 0,2	6,7 \pm 1,2 †	8,7 \pm 0,9 †	5,8 \pm 1,0 †	7,5 \pm 1,3 †
Glykogen Leber (mg/g _{KG})	40,2 \pm 1,5	32,8 \pm 3,3	33,7 \pm 2,6	35,4 \pm 2,4	34,9 \pm 2,9
Glukagon (pg/ml)	150 \pm 15	110 \pm 6	212 \pm 19*	136 \pm 6	185 \pm 13*
C_{\max} Glu (mg/dl)	46 \pm 2*	60 \pm 3	66 \pm 4	59 \pm 6	64 \pm 6
C_{\max} Ins (ng/ml)	3,7 \pm 0,6*	5,8 \pm 0,6	2,8 \pm 0,4*	4,7 \pm 0,4	2,7 \pm 0,4*

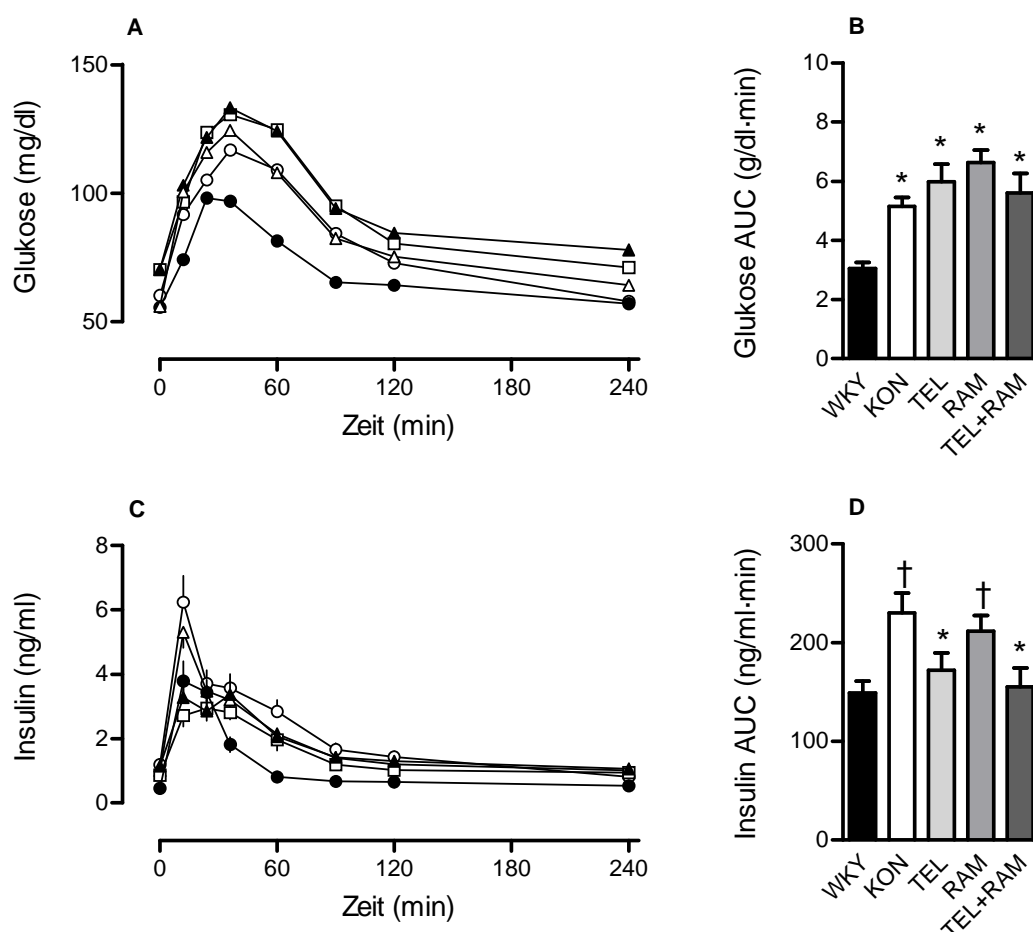


Abb. 22: Orale Glukosetoleranztest nach 6 Wochen Behandlungsdauer: Einfluss von Telmisartan (\blacktriangle), Ramipril (\triangle) und Telmisartan+Ramipril (\square) auf den Plasmaglukosespiegel (**A+B**) und den Plasmainsulinspiegel (**C+D**) von SHR unter Cafeteria-Diät im Vergleich zu Kontrollen (\circ) und WKY-Ratten (\bullet), zeitlicher Verlauf und AUC; MW \pm SEM; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; †: $p < 0,05$ vs. WKY; $n = 10-15$

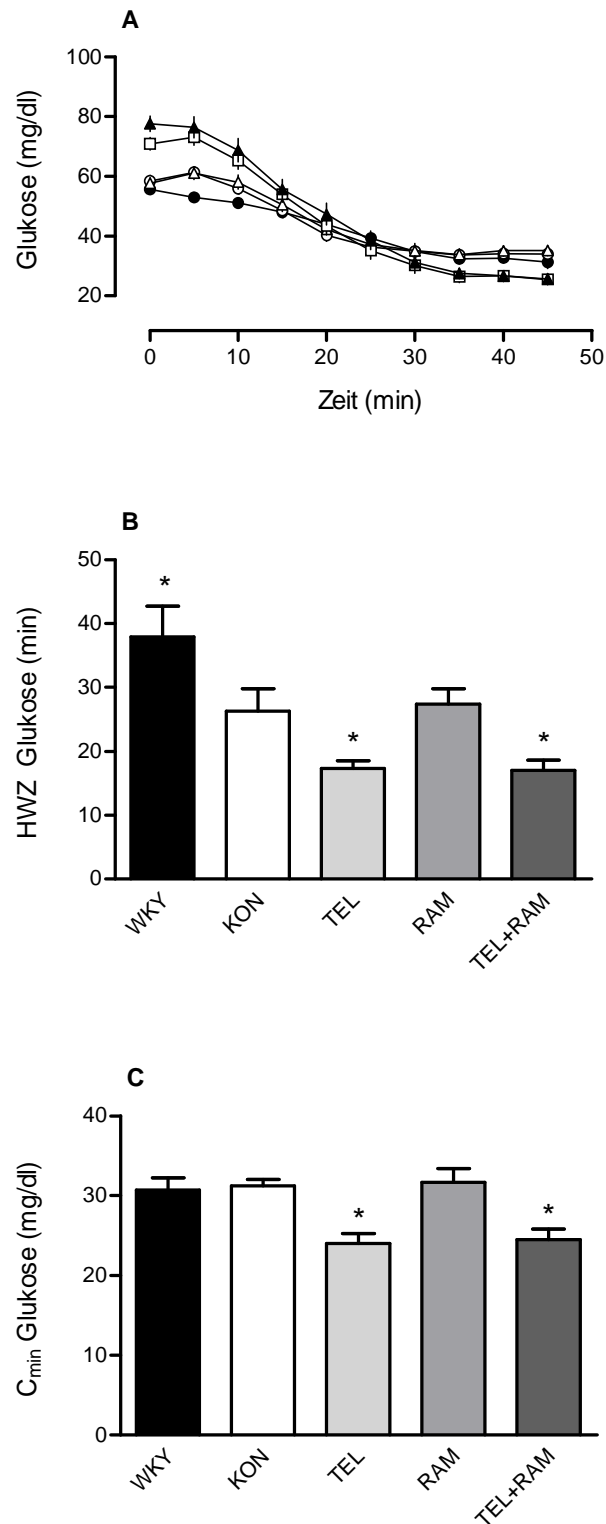


Abb. 23: Insulintoleranztest nach 6 Wochen Behandlungsdauer: Einfluss von Telmisartan (▲), Ramipril (△) und Telmisartan+Ramipril (□) auf den Plasmaglukosespiegel im Vergleich zu Kontrollen (○) und WKY-Ratten (●); (A) zeitlicher Verlauf, (B) Halbwertszeit (HWZ) der Plasmaglukose, (C) minimale Glukosekonzentration (C_{\min} Glukose); MW \pm SEM; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle; $n=10-15$

4.7 HPA-Achse und Stresshormone

Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron unterschieden sich weder zu Beginn noch am Ende der Studie (Tab. 12). Die Nebennieren der verschieden behandelten SHR waren am Ende der Studie gleich schwer. Lediglich die WKY-Ratten zeigten gegenüber den Kontrollen eine leichte Verminderung des Nebennierengewichts (Tab. 9, Seite 41).

Tabelle 12: Endokrine Parameter von SHR unter Cafeteria-Diät nach zwölfwöchiger Behandlung mit Telmisartan (TEL), Ramipril (RAM) oder der Kombination Telmisartan+Ramipril (TEL+RAM) im Vergleich zu Kontrollen (KON) und WKY-Ratten (WKY); MW \pm SEM; *: $p < 0,05$ vs. KON; †: $p < 0,05$ vs. TEL; n=10-15

	WKY	KON	TEL	RAM	TEL+RAM
ACTH (pg/ml)	159 \pm 6	195 \pm 17	251 \pm 21	185 \pm 14	210 \pm 22
Corticosteron (ng/ml)	95 \pm 13	117 \pm 19	104 \pm 14	97 \pm 14	85 \pm 13
Angiotensin-II (pmol/l)	21,4 \pm 1,7	21,7 \pm 1,6	206,7 \pm 15,5*	32,8 \pm 2,8	60,2 \pm 4,8* †
Aldosteron (pg/ml)	5,4 \pm 0,9	6,3 \pm 0,8	2,7 \pm 0,3*	6,3 \pm 1,3	2,6 \pm 0,5*

Um die Reaktivität der HPA-Achse näher zu charakterisieren, wurde ein „Forced Swimming Test“ durchgeführt (2.3.5). Vor dem Test sowie 30 bzw. 90 Minuten danach wurde den Tieren Blut zur Bestimmung der Plasmakonzentration von ACTH und Corticosteron abgenommen. Vor dem Stressreiz gab es zwischen den Gruppen keine Unterschiede in der Plasmakonzentration von ACTH und Corticosteron (Abb. 24 und 25). Die Stressreaktivität von KON war im Vergleich zu WKY gesteigert, da sowohl ACTH-Spiegel als auch Corticosteronspiegel 30 Minuten nach dem Stressreiz erhöht waren. Die ACTH-Spiegel von KON und WKY waren 90 Minuten nach dem Stressreiz wieder auf Ausgangsniveau abgesunken, die Corticosteronspiegel waren hingegen noch erhöht (Abb. 24). Bei TEL, RAM und TEL+RAM war die Stressreaktivität gegenüber KON vermindert. So waren die ACTH-Spiegel 30 Minuten und die Corticosteronspiegel 90 Minuten nach dem Stressreiz im Vergleich zu KON vermindert. Nach 90 Minuten waren bei allen Gruppen die ACTH-Spiegel wieder auf Ausgangsniveau abgesunken, die

Corticosteronspiegel blieben dagegen erhöht. 30 Minuten nach dem Stressreiz kam es bei KON zu einem Anstieg der Plasmaglukose. Durch die Gabe von Telmisartan und Telmisartan+Ramipril, nicht aber durch Ramipril allein, konnte der stressinduzierte Glukoseanstieg verhindert werden. Nach 90 Minuten sank bei allen Tieren die Plasmaglukose unterhalb des Ausgangswertes (Abb. 25).

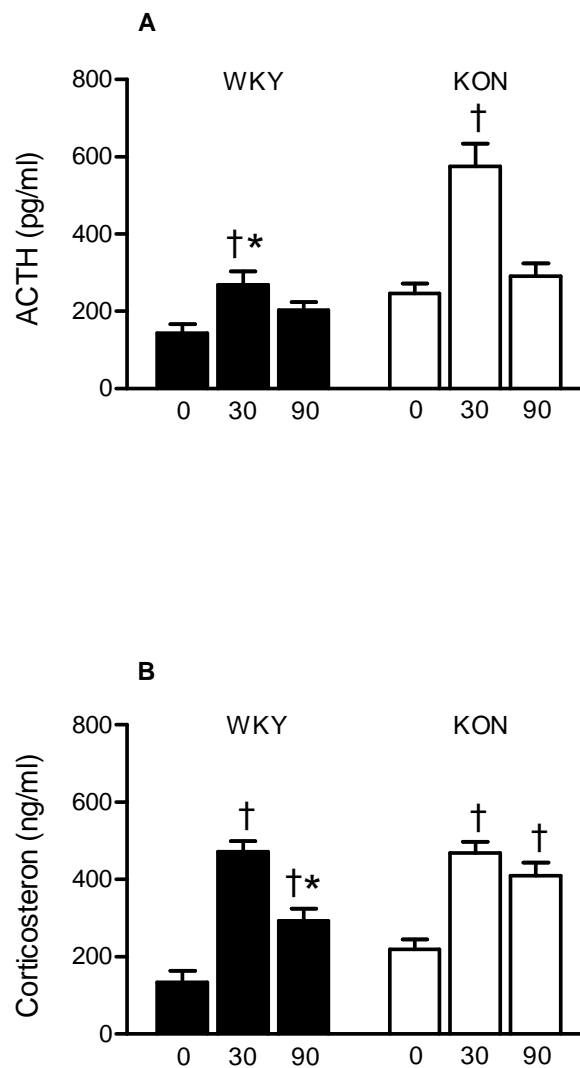


Abb. 24: Schwimmtest nach 12 Wochen Behandlungsdauer: Vergleich der Plasmaspiegel von ACTH (**A**) und Corticosteron (**B**) von Kontrollen (KON) und WKY-Ratten (WKY) vor einem Stressreiz (0) und 30 bzw. 90 Minuten danach; MW \pm SEM; n=10-15; *: p<0,05 vs. Kontrolle; †: p<0,05 vs. Wert vor dem Stressreiz

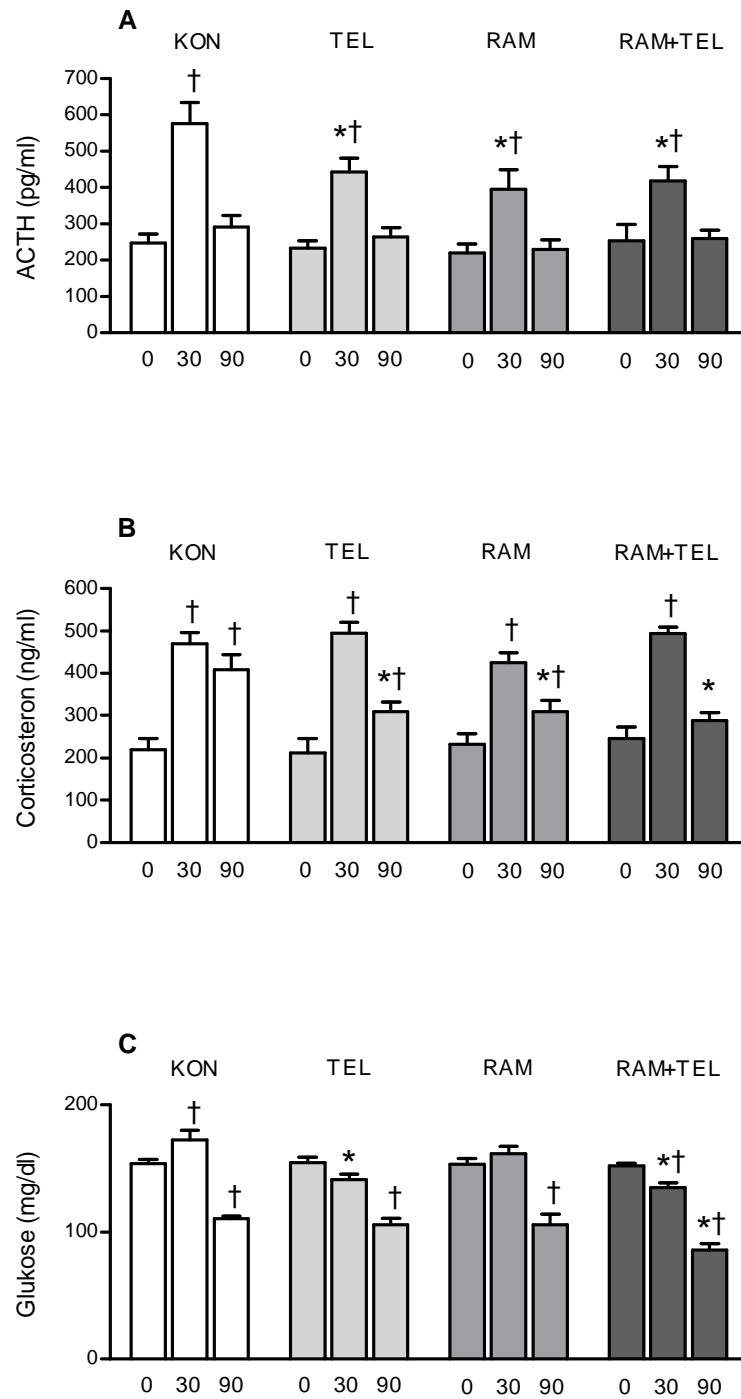


Abb. 25: Schwimmtest nach 12 Wochen Behandlungsdauer: Einfluss von Telmisartan (TEL), Ramipril (RAM) und Telmisartan+Ramipril (TEL+RAM) auf die Plasmaspiegel von ACTH (**A**), Corticosteron (**B**) und Glukose (**C**) vor einem Stressreiz (0) und 30 bzw. 90 Minuten danach im Vergleich zur Kontrolle (KON); MW \pm SEM; n=10-15; *: p<0,05 vs. Kontrolle; †: p<0,05 vs. Wert vor dem Stressreiz

5 Diskussion

5.1 Etablierung des Tiermodells

Um die metabolischen Effekte einer RAAS-Blockade so patientennah wie möglich untersuchen zu können, war die Entwicklung eines Tiermodells, das die Symptome des Metabolischen Syndroms vereint, von großer Bedeutung. Adipositas, Störungen des Glukose- und Fettstoffwechsels sowie Hypertonie sollten dabei nicht auf genetischen Defekten (Zucker 1965; Ikeda et al. 1981; Coleman 1982; Clark et al. 1983; Chua et al. 1996; Ernsberger et al. 1999; Tofovic et al. 2000; Hiraoka-Yamamoto et al. 2004; Masuyama et al. 2005) oder der Gabe des Zytostatikums Streptozotocin (van Zwieten 1999) beruhen, sondern durch die Ernährung bedingt bzw. verstärkt sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener hochkalorischer Diäten auf diverse Rattenstämme untersucht und es gelang, ein solches Tiermodell, nämlich die Spontan Hypertensive Ratte unter Cafeteria-Diät, zu etablieren.

In der neuesten Definition des Metabolischen Syndroms wird die Adipositas als obligates Hauptkriterium genannt (IDF 2005), so dass dieses auch von dem Tiermodell erfüllt werden sollte. In dieser Arbeit gelang dies durch Fütterung der Cafeteria-Diät: Sowohl SHR als auch SD-Ratte verzeichneten einen deutlichen Gewichtsanstieg. Auch die Fischer-Ratte unter Formula-Diät entwickelte einen Gewichtsanstieg, jedoch in weitaus geringerem Maße. Dagegen zeigte die SD-Ratte unter derselben Diät sogar eine Abnahme des Körpergewichts (Abb. 5), obwohl sie als besonders empfänglich für die Entwicklung einer Adipositas unter hochkalorischer Diät gilt (Farley et al. 2003). In einer Studie von Sato et al. nahmen SHR unter einer zucker- und fettreichen Diät in Pelletform zu (Sato et al. 1995). Dies konnte jedoch in dieser Arbeit wie auch von anderen Autoren (Rattigan et al. 1986) nicht bestätigt werden. So zeigte sich bei SHR_{Formula} zunächst keine Gewichtsveränderung, erst unter zusätzlicher Gabe einer 66%igen Glukoselösung und Schweineschmalz konnte ein Gewichtsanstieg erreicht werden (Abb. 4). Dieses Ergebnis bestätigt die Idee, dass die Gabe von Kohlenhydraten in Form einer Lösung wesentlich effektiver zu einer Adipositas führt als die Gabe in fester Form (Sclafani 1987). Eine Gewichtszunahme aufgrund vermehrten

Längenwachstums wurde durch Bestimmung des Body-Mass-Index (BMI) ausgeschlossen, denn dieser setzt das Gewicht ins Verhältnis zur Größe und war bei allen Gruppen parallel zum Körpergewicht verändert (Abb. 5). Betrachtet man die Kalorienaufnahme im Verhältnis zum Körpergewicht, wird deutlich, dass diese nur unter Cafeteria-Diät erhöht war (Abb. 6), obwohl der Energiegehalt von Cafeteria-Diät und Formula-Diät ähnlich ist. Dies belegt, dass sowohl der Geschmack als auch die tägliche Abwechslung für den gesteigerten Appetit und folglich die übermäßige Nahrungsaufnahme von Bedeutung sind. Der Vorteil der hier verwendeten Cafeteria-Diät besteht darüber hinaus in der Freiheit, zwischen zwei Futterangeboten wählen zu können. Im Gegensatz zu den meisten anderen publizierten Fütterungsvorschlägen, in denen Ratten nur mit Schokoriegeln gefüttert wurden (Groubet et al. 2003; Bayol et al. 2005; Chaves et al. 2006; Garcia-Diaz et al. 2007; Chen et al. 2008), waren die Tiere im Rahmen der hier vorgestellten Cafeteria-Diät in der Lage zwischen Norm-Diät, das alle für Nagetiere wichtigen Stoffe enthält, und Schokoriegeln frei zu wählen. So nahmen die Tiere über den gesamten Studienzeitraum immer noch 13,4% der Energie über das Norm-Diätfutter zu sich (Abb. 6). Mit dieser Methode wird demnach die Situation der Verführung, in der der Mensch sich befindet, besser imitiert (Rolls et al. 2002; Kral et al. 2004).

Ein potenter Regulator von Nahrungsaufnahme, Energieverbrauch und Blutdruck ist das Peptidhormon Leptin, welches proportional zum Körperfettgehalt in die Blutbahn sezerniert wird (Schwartz et al. 2000). Periphere und zentrale Gabe von Leptin stimulieren die mRNA Expression des hypothalamischen Peptides CART, was wiederum zu einer verminderten Nahrungsaufnahme führt (Kristensen et al. 1998; Choi et al. 2004). In dieser Arbeit wurden unter der Cafeteria-Diät mit steigendem Körpergewicht erhöhte Plasmaleptinspiegel (Abb. 8) und eine gesteigerte mRNA Expression von CART (Tab. 8) gemessen. Allerdings führte dies nicht zu einer Verminderung sondern vielmehr zu einer Steigerung der Kalorienaufnahme, die über den gesamten Zeitraum trotz Hyperleptinämie erhalten blieb (Abb. 6). Die trotz erhöhten Leptinspiegels gesteigerte Nahrungsaufnahme spricht somit für die Entwicklung einer Leptinresistenz dieser Tiere, welche durch die fehlende Restriktion der Nahrungsaufnahme durch das

Leptin gekennzeichnet ist (Enriori et al. 2006; Shimizu et al. 2007). Der gleichzeitige Anstieg der Plasmatriglyzeride (3.8) bekräftigt diese Annahme, da den Triglyzeriden eine Rolle bei der Induktion einer Leptinresistenz an der Blut-Hirn-Schranke zugeschrieben wird (Banks et al. 2004). Die Hypertriglyzeridämie gehört laut IDF 2005 ebenfalls zu den Nebenkriterien des Metabolischen Syndroms, womit ein weiteres Kriterium erfüllt ist.

Die trotz Hyperleptinämie weiterhin bestehende Hyperphagie dieser Ratten könnte auch mit der vermehrten mRNA Expression des Melanin-Concentrating Hormons (MCH) in Zusammenhang stehen (Tab. 8). Dies wurde auch von Elliot et al bei Ratten unter hochkalorischer Diät beobachtet (2004). Auch der Energiehaushalt wird durch MCH beeinflusst. So führt die Gabe bzw. die Überexpression von MCH zu einer Zunahme der Nahrungsaufnahme und folglich des Körpergewichts. Das Körpergewicht von MCH-Knockout-Tieren dagegen war reduziert (Qu et al. 1996; Ludwig et al. 2001).

Es ist generell bekannt und akzeptiert, dass reduzierte körperliche Aktivität in Verbindung mit einem bequemen Lebensstil zu Gewichtszunahme und Fettleibigkeit führt (Tou et al. 2002). Gleichzeitig korreliert ein erhöhtes Körpergewicht negativ mit der körperlichen Aktivität (Yen et al. 1972; Ardevol et al. 1998; Tou et al. 2002). Bei SD_{Cafe} war jedoch trotz erhöhten Körpergewichts die physische Aktivität nicht verändert (Abb. 5 und 7). Dies stimmt mit anderen Berichten überein, in denen die Fütterung von SD-Ratten mit zucker- und fettreichen Diäten keinen Effekt auf die Bewegung zeigte (Brownlow et al. 1996). Die übergewichtigen SHR_{Cafe} wiesen hingegen sogar eine Steigerung der Aktivität auf (Abb. 7). Die Ursache hierfür könnte in der Hyperleptinämie von SHR_{Cafe} liegen (Abb. 8), denn neben der Regulation der Nahrungsaufnahme hat das Leptin noch eine weitere Funktion, nämlich die Steigerung des Energieverbrauchs. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Leptin sowohl über einen erhöhten Sauerstoffverbrauch und eine erhöhte Körpertemperatur als auch über eine gesteigerte körperliche Aktivität zu gesteigertem Energieverbrauch und Gewichtsverlust führt (Pelleymounter et al. 1995). Ob die gesteigerte Aktivität von SHR_{Cafe} trotz der im Zusammenhang mit der gesteigerten Nahrungsaufnahme vermuteten Leptinresistenz durch die Hyperleptinämie bedingt ist, bleibt fraglich,

zumal Leptin nach Überwinden der Blut-Hirn-Schranke über einen zentralen Mechanismus zu einer Aktivitätssteigerung führt (Choi et al. 2008).

Laut Definition gehört ein erhöhter Blutdruck zu den vier Nebenkriterien des Metabolischen Syndroms (IDF 2005), von denen mindestens zwei erfüllt sein müssen. Durch Fütterung der SHR mit der Cafeteria-Diät stieg der ohnehin schon deutlich erhöhte Blutdruck um weitere 15 mmHg und auch die Herzfrequenz wurde erhöht (Abb. 11). Darüber hinaus war als Zeichen der kardialen Hypertrophie das Herzgewicht der hochkalorisch gefütterten Tiere erhöht (3.11), was die negativen Langzeitauswirkungen des zu hohen Blutdrucks eindrucksvoll demonstriert. Weder Leber noch Niere zeigten einen Effekt der Diät auf das Organgewicht (3.11), so dass davon ausgegangen werden kann, dass das erhöhte Herzgewicht durch den Blutdruck und nicht durch das erhöhte Körpergewicht bedingt ist. Eine mögliche Ursache für Blutdruck- und Pulsanstieg könnten die unter der Diät erhöhten Plasmaleptinspiegel sein, denn auch von anderen Autoren konnte bereits gezeigt werden, dass die dauerhafte Infusion bzw. die transgene Überexpression von Leptin Blutdruck und Herzfrequenz steigern (Shek et al. 1998; Aizawa-Abe et al. 2000). Diese Überlegungen stehen auf den ersten Blick im Widerspruch zu der weiter oben postulierten Leptinresistenz. Es ist allerdings gezeigt worden, dass Leptin - trotz der Resistenz auf Ebene der Nahrungsaufnahme - immer noch in der Lage ist, den Blutdruck zu erhöhen. So ist der erhöhte Blutdruck in übergewichtigen Mäusen einer „selektiven“ Leptinresistenz zugeschrieben worden. Die renale Sympathikusantwort auf die Gabe von Leptin war in diesen Tieren erhalten, während jene im lumbalen und braunen Fettgewebe vermindert war (Rahmouni et al. 2005). Eine enge Verbindung besteht zwischen der renalen Sympathikusaktivität und der Plasmakonzentration von Noradrenalin (Dendorfer et al. 2002), so dass die Noradrenalinplasmakonzentration einen Surrogatparameter für die renale Sympathikusaktivität darstellt. Der Anstieg von Noradrenalin im Plasma von SHR_{Cafe} (3.10) weist somit auf eine durch Leptin stimulierte renale Sympathikusaktivität hin, welche unter anderem über eine erhöhte Reninausschüttung zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt (DiBona 2004). Eine weitere Erklärung für den Blutdruckanstieg mag das erhöhte Körpergewicht von SHR_{Cafe}

(Abb. 4) sein. Denn Gewichtszunahme in Verbindung mit einer Aktivierung des Sympathischen Nervensystems ist als Mechanismus für eine Blutdruckerhöhung bekannt (Masuo et al. 2000). Ein weiterer Mechanismus, der zu einer Blutdruckerhöhung durch Gewichtszunahme führt, ist die Aktivierung des RAAS im Fettgewebe. Denn im viszeralen Fettgewebe adipöser Patienten konnte eine erhöhte mRNA-Expression von Angiotensinogen nachgewiesen werden (Giacchetti et al. 2000). Eine Gewichtsabnahme wiederum führt über eine Reduktion der RAAS-Aktivität in Fettgewebe und Plasma zu einer Senkung des Blutdrucks (Engeli et al. 2005).

Ein gestörter Glukosestoffwechsel gehört ebenso zu den Kardinalsymptomen des Metabolischen Syndroms wie die Insulinresistenz (IDF 2005). Um den Glukosemetabolismus von SHR_{Cafe} zu evaluieren, wurden diverse Parameter erhoben. Erhöhte Blutzuckerspiegel bei wiederholten Messungen, der vermehrte Glykogengehalt in der Leber und eine verstärkte Glukosurie sprechen für eine dauerhafte Verschlechterung der Glukosehomöostase (Tab. 7). Die unter Cafeteria-Diät erhöhten Insulin- und C-Peptidspiegel sind Ausdruck einer vermehrten Insulinsekretion, wie sie im Vorstadium eines manifesten Typ-2-Diabetes auftritt. So kommt es in der Entwicklung eines Diabetes in den Anfangsstadien zunächst zu einer Hypersekretion von Insulin, woraufhin beim manifesten Diabetes die Synthesekapazitäten der Betazellen des Pankreas erschöpft sind und die Insulinsekretion abnimmt. Über die Zeit ergibt sich also ein umgekehrt U-förmiger Verlauf der Insulinsekretion (Tripathy et al. 2000). Auch der HOMA-Index, ein Parameter, der in der Klinik häufig zur Qualifizierung einer Insulinresistenz verwendet wird (Davies et al. 2000; Hanefeld et al. 2003; Snehalatha et al. 2003), war unter der Cafeteria-Diät erhöht (Tab. 7). Bei einer verminderten Glukosetoleranz kommt es laut Definition der WHO zwei Stunden nach einem Glukosereiz (OGTT) zu einer gesteigerten späten Insulinsekretion (Schnell et al. 2009). Das Stadium der verminderten Glukosetoleranz konnte bei SHR_{Cafe} im OGTT nachgewiesen werden. So kam es nach Glukoseapplikation über mehrere Stunden zu einer erhöhten Insulinsekretion bei gleichzeitig erhöhtem Glukosespiegel (Abb. 9). Aufgrund dieser Zeichen einer veränderten Glukosehomöostase und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass

Insulinresistenz und Veränderungen der Insulinsekretion lange vor Manifestation eines Typ-2-Diabetes auftreten (Gerich 1999; Garber 2000), kann davon ausgegangen werden, dass die Cafeteria-Diät in SHR einen Prädiabetes induziert. Zusammenfassend ist es gelungen, ein Tiermodell zu entwickeln, das viele Symptome des Metabolischen Syndroms aufweist. Dies wurde durch Überernährung und nicht durch Veränderungen des Genoms erreicht. Aufgrund ihres ausgeprägten Hypertonus und ihrer Neigung zur Insulinresistenz ist die SHR bisher bereits als Modell für das Metabolische Syndrom verwendet worden, jedoch ohne das Kardinalsymptom des Syndroms zu erfüllen, nämlich die Adipositas (Strahorn et al. 2005; Shimamoto et al. 2006). Zum ersten Mal war es also möglich, das vollständige Bild des Metabolischen Syndroms in der SHR zu provozieren. Dieses Tiermodell ist besonders geeignet für patientennahe, experimentelle Studien, die die pathophysiologischen Zusammenhänge und die pharmakologische Therapie des Metabolischen Syndroms weiter erforschen, und wurde darum für die Durchführung der pharmakologischen Studie in dieser Arbeit verwendet.

5.2 RAAS-Blockade und Hämodynamik

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die zuvor etablierte SHR unter Cafeteria-Diät mit dem AT₁-Blocker Telmisartan und dem ACE-Hemmer Ramipril bzw. mit der Kombination beider Medikamente behandelt. Die antihypertensive Wirksamkeit von Telmisartan war zwar höher als die von Ramipril (Abb. 10), allerdings ist zu bemerken, dass eine Steigerung der Ramipril-Dosis kaum eine weitere Blutdrucksenkung bewirkt hätte, da die Dosis von 4 mg/kg_{KG} in vorangegangenen Versuchen an SHR bereits maximale blutdrucksenkende Effekte zeigte (Raasch et al. 2004). Ramipril senkte den Blutdruck auf das Niveau der WKY-Ratte, die als normotensive Kontrolle zur SHR gilt (Bagby et al. 1979). Unter Telmisartan bzw. Telmisartan+Ramipril wurden sogar noch niedrigere Blutdruckwerte erzielt, was die Überlegenheit von Telmisartan im Vergleich zu Ramipril, wie auch bereits in der ONTARGET-Studie beobachtet (Yusuf et al. 2008), zeigt. In Übereinstimmung mit früheren Erkenntnissen der Arbeitsgruppe (Raasch et al. 2002; Raasch et al. 2004) konnte hier gezeigt werden, dass die Blutdrucksenkung positiv mit der

Ventrikelhypertrophie korreliert (Abb. 21), was noch einmal deutlich die Effektivität der Blutdrucksenkung unterstreicht.

In Abhängigkeit von der Cafeteria-Diät war die Herzfrequenz erhöht (Abb. 11). Diese Steigerung konnte sowohl durch Telmisartan als auch durch Ramipril verhindert werden (Abb. 20), was möglicherweise Folge einer verminderten Sympathikusaktivität ist (Raasch et al. 2001; Dendorfer et al. 2002; Raasch et al. 2002; Raasch et al. 2004; Dendorfer et al. 2005; Raasch et al. 2005). Der Befund, dass die Fütterung der Cafeteria-Diät zu erhöhten Noradrenalinspiegeln und gleichsam zu einer Steigerung der Herzfrequenz führte (3.10 und Abb. 11), spricht ebenfalls für diese Hypothese. Auch die unter Telmisartan und Telmisartan+Ramipril erniedrigten Leptinspiegel (Abb. 15) können zur Blutdrucksenkung beigetragen haben, denn unter erhöhten Leptinspiegeln konnten eine Steigerung der Sympathikusaktivität (Haynes et al. 1997) und eine Erhöhung von Blutdruck und Herzfrequenz (Shek et al. 1998; Aizawa-Abe et al. 2000) beobachtet werden.

Unter der Behandlung mit Telmisartan stieg der Angiotensin-II-Plasmaspiegel bedingt durch den Renin-Feedbackmechanismus (Schunkert et al. 1992) deutlich an (Tab. 12). Durch die zusätzliche Gabe von Ramipril konnte dieser Mechanismus fast vollständig unterdrückt werden. Trotz unterschiedlich hoher Angiotensin-II-Spiegel waren die Aldosteronspiegel von TEL und TEL+RAM gleichermaßen vermindert. Da Aldosteron positiv mit dem Körpergewicht korreliert (Lamounier-Zepter et al. 2005; Krug et al. 2008), sind die niedrigen Aldosteronspiegel vermutlich auf das im gleichen Maße reduzierte Körpergewicht von TEL und TEL+RAM zurückzuführen und stehen weniger im Zusammenhang mit Angiotensin-II. Der Befund, dass bei KON und RAM das erhöhte Körpergewicht mit erhöhten Aldosteronspiegeln einherging (Tab. 12), untermauert diese Hypothese.

Durch Ramipril wurde die Angiotensin-II-Plasmakonzentration trotz Blockade des Angiotensin-Converting-Enzyms nicht vermindert. Dieser Effekt wurde in der Arbeitsgruppe (Raasch et al. 2006) und auch von anderen (Juillerat et al. 1990; Azizi et al. 1995; Aihara et al. 1999) wiederholt beobachtet und kann auf alternative Synthesewege zurückgeführt werden.

5.3 RAAS-Blockade und Regulation des Körpergewichts

Das Körpergewicht war bei RAM im Vergleich zu KON leicht reduziert (Abb. 12), was mit einem verminderten Verzehr von Cafeteria-Diät bei gleichzeitig doppeltem Verzehr von Norm-Diät verbunden war (Abb. 17). Damit konnten andere Ergebnisse bestätigt werden, die auch eine geringere Energieaufnahme nach ACE-Blockade zeigten, jedoch ohne die Form der Energieaufnahme näher zu spezifizieren (Velkoska et al.; Weisinger et al. 2009). Obwohl das Körpergewicht unter Ramipril nur tendenziell reduziert war, konnte ein signifikant geringeres viszerales Fettvolumen ermittelt werden (Abb. 13). Unsere Ergebnisse bestätigen somit andere Arbeiten, in denen durch Gabe eines ACE-Hemmers bei Ratten ein Rückgang der Fettmasse registriert werden konnte (Carter et al. 2004), dagegen aber kein Effekt auf das Körpergewicht von übergewichtigen Patienten beobachtet wurde (Fogari et al. 2005).

Das verminderte Körpergewicht bei TEL bzw. TEL+RAM ging gleichsam mit einem reduzierten BMI sowie einem reduzierten Bauchumfang einher (Abb. 12 und Tab 9) und deutet demzufolge auf eine Verminderung der Fettmasse hin. Diese Vermutung konnte mithilfe der MRT-Darstellung bestätigt werden, in der sich eine erhebliche Reduktion vor allem des viszeralen aber auch des subkutanen Fettvolumens zeigte (Abb. 13). Subkutanes und viszerales Fettvolumen korrelierten dabei positiv mit dem Körpergewicht der Tiere. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Telmisartan bzw. Telmisartan+Ramipril zu einer Reduktion von Körpergewicht, Gewichtszunahme und von subkutanem und viszeralem Fettvolumen führt, und damit frühere Ergebnisse, die eine Gewichtsreduktion durch AT₁-Blockade bei Ratten und Mäusen mit diätinduzierter Adipositas zeigten, bestätigt werden (Benson et al. 2004; Schupp et al. 2005; Sugimoto et al. 2006; Zanchi et al. 2007). Die klinische Relevanz dieser Beobachtung hat große Bedeutung, da ein großer Körperfettanteil ein erhöhtes Risiko für Dyslipidämie (Kissebah et al. 1976), Hypertonie (Cassano et al. 1990; Seidell et al. 1991) und Typ-2-Diabetes (Chan et al. 1994; Carey et al. 1997) birgt und somit in engem Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom steht (Bjorntorp 1991). Ein geringerer Körperfettanteil reduziert im Gegenzug das Risiko metabolischer Komplikationen (Snijder et al. 2004). In vielen klinischen Studien (Seidell et al. 1990; Cefalu et al. 1995; Kuk et al. 2006) korreliert ein

verschlechtertes metabolisches Profil mit einer gesteigerten viszeralen Fettmasse. Während die Cafeteria-Diät in dieser Studie bei KON zu einer Zunahme des metabolisch ungünstigen viszeralen Fettvolumens führte, konnte dies durch die Blockade des RAAS mithilfe von Telmisartan bzw. Ramipril erfolgreich verhindert werden, so dass eine vor metabolischen Komplikationen schützende Wirkung dieser Medikamente vermutet werden kann.

Im Gegensatz zu der hier vorgestellten Arbeit konnten Li et al. nach vierwöchiger Behandlung von SHR mit 10 mg/d Telmisartan keine Gewichtsreduktion erzielen (Li et al. 2006). Allerdings waren diese Tiere nicht mit einer hochkalorischen Diät gefüttert worden, so dass demzufolge die gewichtsreduzierende Wirkung Telmisartans diätabhängig zu sein scheint. Da Telmisartan und andere AT₁-Blocker bei adipösen Zucker-Ratten nicht zu einer Körpergewichtsreduktion führten (Kajioka et al. 2007; Madala Halagappa et al. 2008; Munoz et al. 2009; Sebekova et al. 2009), kann davon ausgegangen werden, dass die gewichtsreduzierende Wirkung dieser Medikamente von einer intakten Leptinfunktion abhängig ist.

Die Energieaufnahme von TEL und TEL+RAM war zeitabhängig verändert. In den ersten zwei Wochen lag sie unter der Energieaufnahme von KON, stieg dann aber kontinuierlich an, so dass sie bis zum Ende der Studie die Energieaufnahme von KON überstieg (Abb. 17). Solch eine vorübergehende Reduktion der Energieaufnahme wurde auch bei WKY-Ratten unter Norm-Diät beobachtet, die dauerhaft mit Candesartan behandelt wurden (Zorad et al. 2006). Die initiale Hypophagie von TEL kann einem intakten Leptinsignalweg zugeschrieben werden, da der Plasmaleptinspiegel dieser Tiere in den ersten zwei Wochen anstieg, wenn auch in geringerem Maße als bei KON (Abb. 15). Diese Erklärung mag jedoch nicht für TEL+RAM gelten, da hier der Plasmaleptinspiegel in den ersten zwei Wochen nicht über den Ausgangswert hinaus anstieg und gleichzeitig die Energieaufnahme sogar niedriger war als bei TEL (Abb. 15 und 17). Ob der Mechanismus dieses initialen Leptinanstiegs unter Telmisartan auf das gegenregulatorisch erhöhte Angiotensin-II zurückzuführen ist, muss in weitergehenden Untersuchungen gezeigt werden, da Angiotensin-II die Sekretion von Leptin aus den Adipozyten fördert (Kim et al. 2002; Skurk et al. 2005). Der zeitabhängige Anstieg der Energieaufnahme bei TEL und TEL+RAM kann trotz des schlanken Phänotyps und der gegenüber KON reduzierten Plasmaleptinspiegel auf eine zunehmende Leptinresistenz

zurückgeführt werden. Diese Vermutung basiert auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen, und zwar 1.) dass die Energieaufnahme bei TEL und TEL+RAM mit dem Leptinspiegel positiv korrelierte, 2.) die Gesamtenergieaufnahme dieser Ratten die von KON sogar überstieg und 3.) die Expression der hypothalamischen orexigen Peptide gegenüber WKY erhöht war, sich aber von KON nicht unterschied (Abb. 18, Abb. 17 und Tab. 10).

Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen zeigten andere Arbeitsgruppen, dass die Gesamtenergieaufnahme durch die Gabe von Telmisartan nahezu unverändert blieb, so dass andere Mechanismen für die gewichtsreduzierende Wirkung von Telmisartan verantwortlich sein müssen (He et al. 2010; Benson et al. 2004; Schupp et al. 2005; Sugimoto et al. 2006; Zanchi et al. 2007). In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass Telmisartan unabhängig von der Energieaufnahme über die Aktivierung PPAR δ -abhängiger Signalwege vor Gewichtszunahme schützt (He et al. 2010). He et al. zeigten dabei, dass die durch hochkalorische Fütterung bedingte Gewichtszunahme durch die Behandlung von PPAR δ -Knockout-Mäusen mit Telmisartan im Gegensatz zum Wildtyp nicht verhindert werden konnte.

Die Konstellation des niedrigen Körpergewichts und gegenüber KON gesteigerten Gesamtenergieaufnahme suggeriert einen erhöhten Energieverbrauch unter Telmisartan und Telmisartan+Ramipril. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten erhöhte Adiponektinspiegel sein, denn Qi et al. zeigten, dass Adiponektin bei unveränderter Nahrungsaufnahme über eine Steigerung des Energieverbrauches zu einer Gewichtsabnahme führt (Qi et al. 2004). Die Adiponektinspiegel von TEL und TEL+RAM waren zwar nicht signifikant erhöht, aber im Gegensatz zu KON und RAM stiegen sie kontinuierlich an und überstiegen diese sogar am Ende der Studie (Abb. 15). Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, in denen gezeigt werden konnte, dass Angiotensin-II die Adiponektinkonzentration zwar vermindert, eine chronische AT $_1$ -Blockade aber eine Erhöhung von Adiponektin sowohl über einen AT $_2$ -abhängigen Mechanismus als auch durch Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors bewirkt (Clasen et al. 2005; Ran et al. 2006; Zorad et al. 2006). Um eine Steigerung des Energieverbrauches nachweisen zu können, wurde in dieser Arbeit die physische Aktivität in bekannter Umgebung mittels eines Infrarotsystems gemessen. Die Aktivität von TEL, RAM und TEL+RAM war zwar im

Vergleich zu WKY gesteigert, unterschied sich jedoch nicht von KON (Abb. 19). Die physische Aktivität blieb auch in anderen Studien durch Telmisartan unverändert (Sugimoto et al. 2006), so dass ein möglicherweise erhöhter Energieverbrauch nicht ausreichend durch eine gesteigerte physische Aktivität abgebildet werden kann. In diesem Zusammenhang wurde in vorherigen Arbeiten ein gesteigerter Kalorienverbrauch unter der Behandlung mit Telmisartan beschrieben (Araki et al. 2006; Sugimoto et al. 2006).

5.4 RAAS-Blockade und Diabetes

Während in dieser Studie unter Telmisartan die Nüchternglukosespiegel bei unveränderten Insulinspiegeln erhöht waren (Tab. 11), wurde in anderen Studien eine Senkung oder zumindest eine Stabilität des Nüchternblutzuckers bei Diabetikern und Ratten unter Telmisartan beobachtet (Younis et al.; Sugimoto et al. 2006; Derosa et al. 2007; Mori et al. 2007; Shimabukuro et al. 2007; Usui et al. 2007; Younis et al. 2007; Zanchi et al. 2007; Makita et al. 2008). Darüber hinaus sind unveränderte oder sogar reduzierte Nüchterninsulinspiegel unter Telmisartan beschrieben worden (Younis et al.; Sugimoto et al. 2006; Derosa et al. 2007; Mori et al. 2007; Shimabukuro et al. 2007; Usui et al. 2007; Younis et al. 2007; Zanchi et al. 2007; Makita et al. 2008). Ein möglicher Grund für den erhöhten Nüchternblutzucker mögen die bei TEL und TEL+RAM deutlich erhöhten Glukagonspiegel gewesen sein, denn Glukagon fördert den Abbau der Glykogenspeicher in der Leber.

Im OGTT war die Glukoseantwort bei TEL und TEL+RAM gegenüber KON nicht verändert (Abb. 22), was im Hinblick auf die Monotherapie mit AT₁-Blockern auch von anderen Arbeitsgruppen bereits beschrieben worden ist (Li et al. 2006; Shimabukuro et al. 2007). Andere Autoren beobachteten dagegen unter Telmisartan eine verminderte Glukoseantwort im OGTT (Schupp et al. 2005; Vitale et al. 2005; Nagel et al. 2006; Zanchi et al. 2007; Sanchez et al. 2008; Rong et al. 2009). Als Ursache für die unterschiedlichen Glukoseantworten unter Telmisartan im OGTT kann über die Verwendung unterschiedlicher Tiermodelle und Behandlungsregimes spekuliert werden, denn die o.g. Studien unterscheiden sich in Rattenstamm (SHR vs. Zucker), Telmisartandosis (5 vs. 8 mg/kg) und

Therapiedauer (vier vs. sechs Wochen) von der hier beschriebenen Studie. Zanchi et al. demonstrierten, dass bei adipösen Zucker-Ratten unter Telmisartan die Glukoseantwort im OGTT reduziert und gleichzeitig die Insulinantwort gesteigert war, und führten dies auf eine verbesserte β -Zellfunktion des Pankreas zurück (Zanchi et al. 2007). Im Gegensatz dazu wurde in der hier vorgestellten Arbeit gezeigt, dass sowohl TEL als auch TEL+RAM für das Halten der Glukosespiegel auf Kontrollniveau signifikant weniger Insulin sezernieren mussten (Abb. 22), was mehr auf eine Verbesserung der Insulinsensitivität als der Insulinsekretion hindeutet. Auch die geringere Halbwertszeit der Plasmaglukose und die niedrigere minimale Glukosekonzentration im ITT (Abb. 23) sprechen eindeutig für eine gesteigerte Insulinsensitivität unter Telmisartan und Telmisartan+Ramipril. Die hier demonstrierte Verbesserung von Insulinsensitivität und somit auch der Glukoseutilisation durch AT_1 -Rezeptor-Antagonisten stimmt mit den Ergebnissen vieler anderer Studien sowohl am Tiermodell (Henriksen et al. 2001; Okada et al. 2004; Shimabukuro et al. 2007; Rong et al. 2009) als auch am Patienten (Dahlof et al. 2002; Julius et al. 2004; Scheen 2004) überein.

Mehrere Mechanismen werden als Ursache für die Steigerung der Insulinsensitivität durch AT_1 -Blocker diskutiert. So konnte beobachtet werden, dass in adipösen Zuckerratten die Behandlung mit Irbesartan zu einer Verbesserung der Glukosetoleranz durch vermehrte insulinvermittelte Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel, einhergehend mit einer erhöhten Proteinexpression von GLUT4-Transportern, führt (Henriksen et al. 2001). In diesem Zusammenhang wurde für Irbesartan eine Steigerung der Insulinsensitivität in adipösen Ratten über eine Verbesserung des Insulinsignalweges (Insulinrezeptor/ Insulinrezeptor-Substrat-1 / Phosphatidylinositol-3-Kinase / Akt / Glukosetransporter-4) beschrieben (Munoz et al. 2009).

Ob auch ACE-Hemmer die Wirkung von Insulin verbessern und die Inzidenz des Typ-2-Diabetes in hypertensiven Patienten senken (Hansson et al. 1999; Yusuf et al. 2001; Bernobich et al. 2002; Siragy 2003) oder aber sie keinen Effekt auf die Insulinsensitivität haben (Ludvik et al. 1991; Sanchez et al. 2008), wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Daten dieser Studie bestätigen letzteres, denn weder im OGTT noch im ITT zeigte die Behandlung mit Ramipril einen Effekt (Abb. 22 und 23).

Die Fähigkeit Telmisartans, im Gegensatz zu Ramipril die Insulinsensitivität zu verbessern, mag auch auf eine Aktivierung der PPAR- γ -Rezeptor vermittelten Effekte zurückgeführt werden (Schupp et al. 2004; Schupp et al. 2005). Jedoch besitzen nicht alle AT₁-Rezeptor-Antagonisten eine Affinität zum PPAR- γ -Rezeptor geschweige denn die Potenz, diesen zu modulieren (Marshall et al. 2006). Einige Autoren sind sogar der Meinung, dass nur Telmisartan bei oraler Gabe ausreichend hohe Plasmaspiegel erreicht, um diesen Rezeptor zu aktivieren (Benson et al. 2004). Jedoch scheinen auch eine Reihe anderer AT₁-Rezeptor-Antagonisten, die eine weitaus geringere Aktivität am PPAR- γ -Rezeptor zeigen, sich positiv auf den Glukosemetabolismus und den Fettstoffwechsel auszuwirken. So konnten Furuhashi et al. an Hypertonikern zeigen, dass die Behandlung mit Candesartan und Temocapril zu einer Erhöhung der Adiponektinspiegel und einer Verbesserung der Insulinsensitivität führt (Furuhashi et al. 2003). Okada et al. beobachteten eine Verbesserung der Insulinresistenz und des Triglyzeridmetabolismus bei Fruktose-gefütterten Ratten (Okada et al. 2004). Auch diverse klinische Studien haben demonstriert, dass AT₁-Rezeptor-Antagonisten mit geringem Agonismus am PPAR- γ -Rezeptor (Losartan, Candesartan, Valsartan) die Inzidenz des Typ-2-Diabetes verringern können (Scheen 2004). Eine mögliche Erklärung für diese klinischen Effekte trotz niedrigem Aktivierungspotential mag eine Akkumulation der Wirkstoffe im Fettgewebe unter Langzeitbehandlung sein, die zu ausreichend hohen Konzentrationen für eine Aktivierung von PPAR- γ mit resultierender Insulinsensitivierung in den Fettzellen führt (Clasen et al. 2005).

In vielen Studien dienten erhöhte Adiponektinspiegel als Surrogatparameter für eine PPAR- γ -Aktivierung (Clasen et al. 2005; Derosa et al. 2007; Mori et al. 2007; Shimabukuro et al. 2007; Younis et al. 2007; Makita et al. 2008), wobei diesem Hormon selbst eine insulinsensitivierende Wirkung zugeschrieben wird (Ziemke et al.; Yamauchi et al. 2001; Maeda et al. 2002). Dagegen wurde von anderen Autoren beschrieben, dass bei Ratten und Patienten Adiponektin unter der Behandlung mit Telmisartan trotz reduzierten Körpergewichts und verbesserter Insulinsensitivität nicht erhöht war (Clasen et al. 2005; Benndorf et al. 2006; Nagel et al. 2006; Usui et al. 2007; Kamari et al. 2008). Mit diesen Befunden übereinstimmend konnte in dieser Arbeit bei TEL bzw. TEL+RAM erst gegen

Studienende eine Adiponektinerhöhung nachgewiesen werden (Abb. 15), die verbesserte Insulinsensitivität dagegen bereits nach sechs Wochen Behandlungsdauer (Abb. 23). Die Frage, welcher andere PPAR- γ -unabhängige Mechanismus für die metabolischen Effekte verantwortlich ist, bleibt also zu klären.

5.5 RAAS-Blockade und HPA-Achse

Als ein möglicher Mechanismus wurde in dieser Arbeit die Aktivität der HPA-Achse untersucht. In vielen Arbeiten wurde bisher eine Verbindung zwischen RAAS, Stress, der Aktivität der HPA-Achse und auch Diabetes beschrieben. So konnte eine Hyperreaktivität der HPA-Achse bei Ratten und Patienten mit Diabetes beobachtet werden (Cameron et al. 1984; Roy et al. 1993; Jöhren et al. 2007). Darüber hinaus wird vermutet, dass Stress und die Dysregulation der HPA-Achse an der Entstehung bzw. an der Aufrechterhaltung des Typ-2-Diabetes beteiligt sind (Roy et al. 1990; Surwit et al. 1992; Rosmond et al. 2000; Chan et al. 2002). Außerdem konnte die Expression von AT₁- und AT₂-Rezeptoren in den Organen der HPA-Achse nachgewiesen werden sowie deren Regulation durch Stress (Castren et al. 1988; Aguilera et al. 1995; Armando et al. 2001; Leong et al. 2002). Darüber hinaus wurde die durch Angiotensin-II-Stimulation bedingte Hyperreaktivität der HPA-Achse als Auslöser eines verschlechterten Glukosemetabolismus in adipösen Zuckerratten angesehen (Müller et al. 2007), was die Verbindung zwischen Angiotensin-II, HPA-Achse und Glukosestoffwechsel bestätigt.

In dieser Studie blieben zwar die basalen Stresshormonspiegel und auch das Gewicht der Nebennieren durch die Hemmung des RAAS unbeeinflusst (Tab. 9 und 12), jedoch war die Corticosteronantwort auf einen Stressreiz bei TEL, RAM und TEL+RAM vermindert (Abb. 25). Damit konnten frühere Erkenntnisse der Arbeitsgruppe, die eine Reduktion der HPA-Achsen-Aktivität sowohl nach AT₁-Blockade als auch nach ACE-Inhibition zeigten, bestätigt werden (Raasch et al. 2006). Die Demaskierung von Veränderungen der HPA-Achsen-Reaktivität erst unter den extremen Bedingungen eines Stresstests scheint von klinischer Relevanz zu sein, denn dieses Phänomen konnte auch an hypertensiven

Patienten beobachtet werden (Nyklicek et al. 2005). Parallel zu der verminderten Corticosteronantwort war auch die ACTH-Freisetzung im Stresstest unter RAAS-Blockade reduziert (Abb. 25), was einen Hypophysen-abhängigen Mechanismus vermuten lässt. Dies stimmt mit den Arbeiten anderer Autoren überein, die einen fördernden Einfluss von Angiotensin-II auf die ACTH-Freisetzung nach einem CRH-Stimulus beschrieben (Abou-Samra et al. 1986; Keller-Wood et al. 1986). Für solche zentralen Aktionen des oral oder i.v. verabreichten Telmisartans ist die Überschreitung der Blut-Hirn-Schranke notwendig, was durch die Messung der Telmisartankonzentration im Liquor und durch den Nachweis der Antagonisierung zentraler Angiotensin-II-Effekte bestätigt worden ist (Gohlke et al. 2001).

Der bei KON 30 Minuten nach dem Stressreiz auftretende Glukoseanstieg konnte durch die Gabe von Telmisartan und Telmisartan+Ramipril erfolgreich unterdrückt werden, jedoch nicht durch die Gabe von Ramipril allein (Abb. 25). Damit konnte die antidiabetische Potenz Telmisartans, die auch schon in vorherigen Versuchen beobachtet wurde (Raasch et al. 2006), bestätigt werden. Die Abmilderung von Stressreaktionen mit daraus resultierender Hypoglykämie ist somit als PPAR- γ -unabhängiger Mechanismus für die Verbesserung der Glukosehomöostase durch AT₁-Rezeptor-Antagonisten wahrscheinlich und von anderen bereits beschrieben worden (Uresin et al. 2004; Pavlatou et al. 2008).

Eine gesteigerte HPA-Achse wird nicht nur mit einer verschlechterten Glukosehomöostase in Verbindung gebracht, sondern auch mit dem Vollbild des Metabolischen Syndroms. So konnte in Patienten, die unter diesem Syndrom leiden, eine erhöhte stressbezogene Cortisolsekretion im Speichel nachgewiesen werden (Bjorntorp et al. 2000). Pasquali et al. sehen sowohl die Dysregulation der HPA-Achse als auch periphere Veränderungen des Cortisolmetabolismus an der Pathophysiologie der Adipositas beteiligt (Pasquali et al. 2006). Rosmond et al. stellten basal und auch auf einen Stressreiz hin erhöhte Cortisolspiegel bei Patienten mit erhöhtem BMI und damit einhergehenden erhöhten Leptinspiegeln fest (Rosmond et al. 2000). Ähnliche Zusammenhänge konnten auch in der hier vorgestellten Studie gesehen werden, denn die unter der Medikation geringere Reaktivität der HPA-Achse auf einen Stressreiz ging mit einem niedrigeren Körpergewicht bzw. BMI und reduzierten basalen Leptinspiegeln bei TEL und TEL+RAM einher. Jedoch waren Körpergewicht und basale Leptinspiegel bei RAM

trotz verminderter HPA-Achsen-Reaktivität im Stresstest nicht signifikant reduziert, so dass eine supprimierte HPA-Achsen-Reaktivität vermutlich nicht der ausschlaggebende Mechanismus zur Gewichtsreduktion ist. Auffällig ist, dass im Gegensatz zu dieser Arbeit in einer früheren Studie der Arbeitsgruppe die Gabe von Candesartan-Cilexetil bei SHR zwar eine Supprimierung der HPA-Achse jedoch keinen verminderten Gewichtsanstieg bewirkte (Raasch et al. 2006), so dass sich eine verminderte HPA-Achsen-Reaktivität möglicherweise nur auf eine diätinduzierte Gewichtszunahme auswirkt.

5.6 Vergleich zwischen Monotherapie und Kombinationstherapie

Kombinationstherapien mit mehreren Antihypertensiva spielen heutzutage eine große Rolle in der Therapie des arteriellen Hypertonus. Die gleichzeitige Gabe eines AT₁-Rezeptor-Antagonisten und eines ACE-Hemmers ist dabei eine in der Praxis häufig verwendete Kombination. Auch in der klinischen Studie ONTARGET spielte die Frage, ob die Kombination von Telmisartan und Ramipril im Vergleich zur Monotherapie Vorteile bietet, eine zentrale Rolle. In der hier vorgestellten Studie konnte gezeigt werden, dass die Potenz Telmisartans, Übergewicht zu verhindern und die Glukosehomöostase zu verbessern, die Potenz von Ramipril weit übersteigt. Beide RAAS-Inhibitoren waren dabei so dosiert, dass sie maximale antihypertensive Effekte erzielten. Die Kombinationstherapie mit AT₁-Blockade und ACE-Inhibition zeigte im Vergleich zur Monotherapie mit Telmisartan kaum zusätzliche Effekte auf jegliche Parameter für Hämodynamik, Körpergewicht und Stoffwechsel. Die Dosierung war auch hier auf einen maximalen Blutdruck senkenden Effekt ausgelegt und führte zu ähnlichen Blutdruckwerten wie die Therapie mit Telmisartan allein. Folglich bringt der Einsatz einer Kombinationstherapie keine Vorteile für die Verhinderung von Adipositas und Prädiabetes in Cafeteria-Diät gefütterten SHR. In der Klinik birgt jede Kombination von Medikamenten ein erhöhtes Risiko für Nebenwirkungen, was auch in der klinischen Studie ONTARGET beobachtet worden ist. Die Patientengruppe, die mit Telmisartan und Ramipril behandelt wurde, wies eine höhere Nebenwirkungsrate auf, so unter anderem renale Dysfunktion, Synkopen und hypotensive Ereignisse, ohne einen kardiovaskulären Gewinn zu verzeichnen (Yusuf et al. 2008).

Angeichts der erhöhten Gefahr für Nebenwirkungen und des fehlenden Benefits wäre eine Monotherapie also der Kombinationstherapie vorzuziehen. Für Patienten, die über den arteriellen Hypertonus hinaus am Vollbild des Metabolischen Syndroms leiden, wäre aufgrund der in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse die Therapie mit Telmisartan der mit Ramipril vorzuziehen.

Die wichtigsten Ergebnisse und Diskussionspunkte der Studie „Einfluss der RAAS-Blockade auf Symptome des Metabolischen Syndroms“ sind in Abbildung 26 schematisch zusammengefasst.

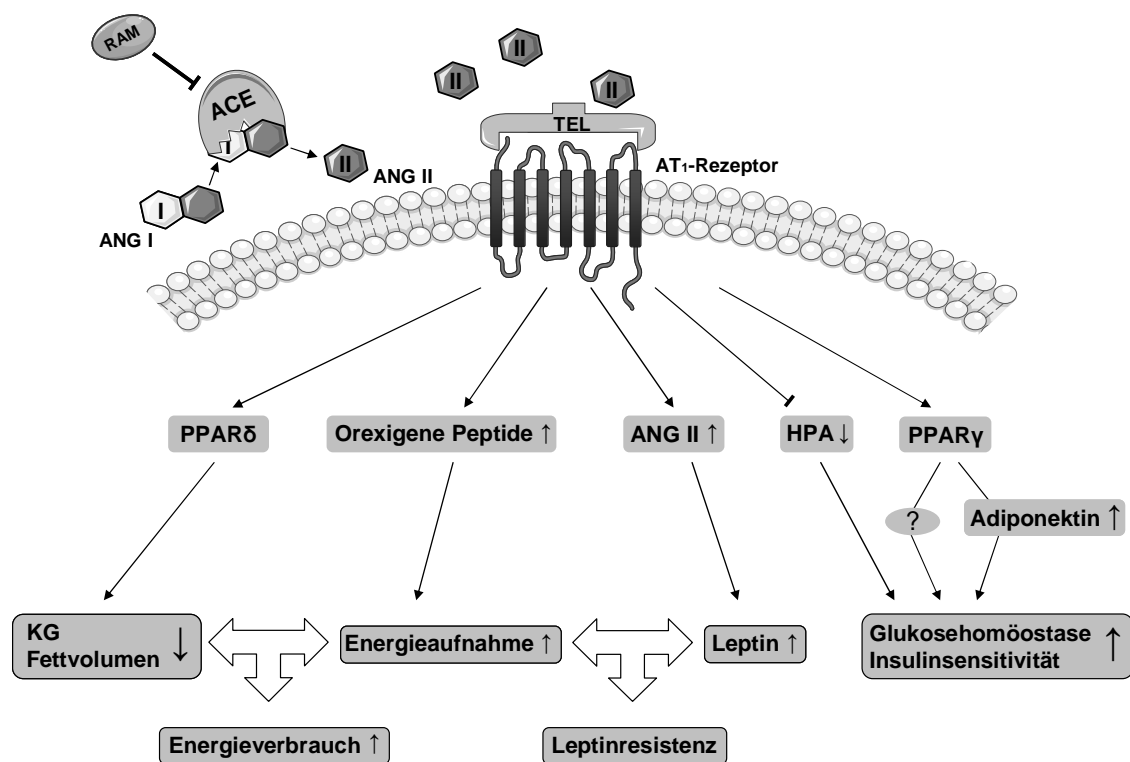


Abb. 26: Einfluss der RAAS-Blockade auf die Symptome des Metabolischen Syndroms. Die zwölfwöchige Behandlung von Cafeteria-Diät-gefütterten SHR mit Telmisartan bzw. Telmisartan+Ramipril führte zu einer verminderten Körpergewichtszunahme bei gleichzeitig erhöhter Energieaufnahme. Dies lässt eine Steigerung des Energieverbrauchs vermuten. Die trotz erhöhter Leptinspiegel gesteigerte Energieaufnahme spricht für die Entwicklung einer Leptinresistenz. Die im Stresstest nachgewiesene Suppression der HPA-Achse mag als PPAR γ -unabhängiger Mechanismus zur Verbesserung der Glukosehomöostase und der Insulinsensitivität beitragen. ACE: Angiotensin-Converting-Enzym; ANG I/II: Angiotensin-I bzw. -II; HPA: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenen-Achse, KG: Körpergewicht; PPAR γ/δ : Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor vom Typ γ bzw. δ ; RAM: Ramipril; TEL: Telmisartan

6 Zusammenfassung

Die Morbidität und Mortalität des Metabolischen Syndroms mit den Symptomen Bluthochdruck, Adipositas, Insulinresistenz und Hyperlipidämie ist stetig steigend, so dass dieses Krankheits-Cluster auch vermehrt von gesundheitsökonomischem Interesse ist. In der Behandlung des arteriellen Hypertonus erlangen Kombinationstherapien zunehmend an Bedeutung, jedoch ist wenig über synergistische metabolische Effekte der gleichzeitigen Therapie mit AT₁-Blockern und ACE-Hemmern bekannt. Um dies näher zu untersuchen wurde zunächst ein geeignetes Tiermodell, nämlich die Spontan Hypertensive Ratte unter Cafeteria-Diät, entwickelt. In einer zweiten Studie wurde dieses Tiermodell mit dem AT₁-Blocker Telmisartan, dem ACE-Hemmer Ramipril oder der Kombination aus beiden Medikamenten behandelt.

Durch Telmisartan und die Kombination wurde der Blutdruck auf hypotensive Werte gesenkt. Die Behandlung mit Ramipril war dagegen weniger potent. Obwohl die Energieaufnahme unter Telmisartan und der Kombination gegenüber Ramipril und den Kontrollen gesteigert war, waren Körpergewichtszunahme, Fettvolumen und Leptinplasmaspiegel geringer. Im oralen Glukosetoleranztest war die benötigte Insulinkonzentration, um den Glukoseplasmaspiegel auf Kontrollniveau zu halten, unter Telmisartan und der Kombination reduziert, nicht jedoch unter Ramipril. Im Insulintoleranztest war die Insulinsensitivität durch Telmisartan und die Kombination gleichermaßen verbessert. Als Antwort auf einen Stressreiz stiegen bei den Kontrollen ACTH, Corticosteron und Glukose an. Diese Stressreaktionen wurden durch Telmisartan und die Kombination abgeschwächt.

Zusammenfassend war die Behandlung mit Telmisartan im Vergleich zu Ramipril eindeutig wirksamer, einen diätinduzierten Gewichtsanstieg zu verhindern und metabolische Parameter zu verbessern. Dagegen war die Kombinationsbehandlung mit Telmisartan und Ramipril bezüglich Körpergewichtsregulation und Glukosehomöostase nicht effektiver als Telmisartan allein. Die unter Telmisartan und der Kombination gleichermaßen verminderte Stress- und Glukoseantwort auf einen Stressreiz unterstützt die Hypothese, dass die verbesserte Glukosehomöostase unter AT₁-Blockade zumindest teilweise auf die Normalisierung der HPA-Achse zurückzuführen ist.

7 Literaturverzeichnis

- Abou-Samra, A. B., K. J. Catt, et al. (1986). "Involvement of protein kinase C in the regulation of adrenocorticotropin release from rat anterior pituitary cells." Endocrinology **118**(1): 212-7.
- Aguilera, G. (1994). "Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress." Front Neuroendocrinol **15**(4): 321-50.
- Aguilera, G., A. Kiss, et al. (1995). "Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration." J Neuroendocrinol **7**(10): 775-83.
- Ahima, R. S., D. Prabakaran, et al. (1996). "Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting." Nature **382**(6588): 250-2.
- Aihara, H., H. Ogawa, et al. (1999). "Intrarenal angiotensin converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats." Eur J Pharmacol **373**(1): 35-40.
- Aizawa-Abe, M., Y. Ogawa, et al. (2000). "Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension." J Clin Invest **105**(9): 1243-52.
- Alberti, K. G. and P. Z. Zimmet (1998). "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." Diabet Med **15**(7): 539-53.
- Aneja, A., F. El-Atat, et al. (2004). "Hypertension and obesity." Recent Prog Horm Res **59**: 169-205.
- Araki, K., T. Masaki, et al. (2006). "Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice." Hypertension **48**(1): 51-7.
- Ardevol, A., C. Adan, et al. (1998). "Hind leg heat balance in obese Zucker rats during exercise." Pflugers Arch **435**(4): 454-64.
- Armando, I., A. Carranza, et al. (2001). "Peripheral administration of an angiotensin II AT(1) receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation Stress." Endocrinology **142**(9): 3880-9.
- Azizi, M., G. Chatellier, et al. (1995). "Additive effects of combined angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II antagonism on blood pressure and renin release in sodium-depleted normotensives." Circulation **92**(4): 825-34.
- Bagby, S. P., W. J. McDonald, et al. (1979). "Serial renin-angiotensin studies in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. Transition from normal- to high-renin status during the established phase of spontaneous hypertension." Hypertension **1**(4): 347-54.
- Banks, W. A., A. B. Coon, et al. (2004). "Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier." Diabetes **53**(5): 1253-60.
- Bayol, S. A., B. H. Simbi, et al. (2005). "A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning." J Physiol **567**(Pt 3): 951-61.

- Benndorf, R. A., T. Rudolph, et al. (2006). "Telmisartan improves insulin sensitivity in nondiabetic patients with essential hypertension." Metabolism **55**(9): 1159-64.
- Benson, S. C., H. A. Pershadsingh, et al. (2004). "Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity." Hypertension **43**(5): 993-1002.
- Bernobich, E., L. de Angelis, et al. (2002). "The role of the angiotensin system in cardiac glucose homeostasis: therapeutic implications." Drugs **62**(9): 1295-314.
- Bjorntorp, P. (1991). "Metabolic implications of body fat distribution." Diabetes Care **14**(12): 1132-43.
- Bjorntorp, P. and R. Rosmond (2000). "The metabolic syndrome--a neuroendocrine disorder?" Br J Nutr **83 Suppl 1**: S49-57.
- Bjorntorp, P. and R. Rosmond (2000). "Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity." Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 2**: S80-5.
- Bornstein, S. R. (1997). "Is leptin a stress related peptide?" Nat Med **3**(9): 937.
- Brownlow, B. S., A. Petro, et al. (1996). "The role of motor activity in diet-induced obesity in C57BL/6J mice." Physiol Behav **60**(1): 37-41.
- Bruehl, H., M. Rueger, et al. (2007). "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and memory impairments in type 2 diabetes." J Clin Endocrinol Metab **92**(7): 2439-45.
- Burson, J. M., G. Aguilera, et al. (1994). "Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse." Am J Physiol **267**(2 Pt 1): E260-7.
- Cameron, O. G., Z. Kronfol, et al. (1984). "Hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity in patients with diabetes mellitus." Arch Gen Psychiatry **41**(11): 1090-5.
- Carey, V. J., E. E. Walters, et al. (1997). "Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study." Am J Epidemiol **145**(7): 614-9.
- Carlsson, B., K. Lindell, et al. (1997). "Obese (ob) gene defects are rare in human obesity." Obes Res **5**(1): 30-5.
- Carter, C. S., M. Cesari, et al. (2004). "Angiotensin-converting enzyme inhibition, body composition, and physical performance in aged rats." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **59**(5): 416-23.
- Cassano, P. A., M. R. Segal, et al. (1990). "Body fat distribution, blood pressure, and hypertension. A prospective cohort study of men in the normative aging study." Ann Epidemiol **1**(1): 33-48.
- Castren, E. and J. M. Saavedra (1988). "Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus and subfornical organ." Endocrinology **122**(1): 370-2.
- Cefalu, W. T., Z. Q. Wang, et al. (1995). "Contribution of visceral fat mass to the insulin resistance of aging." Metabolism **44**(7): 954-9.
- Chan, J. M., E. B. Rimm, et al. (1994). "Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men." Diabetes Care **17**(9): 961-9.

- Chan, O., K. Inouye, et al. (2002). "Hyperactivation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in streptozotocin-diabetes is associated with reduced stress responsiveness and decreased pituitary and adrenal sensitivity." Endocrinology **143**(5): 1761-8.
- Chaves, V. E., D. Frasson, et al. (2006). "Glyceroneogenesis is reduced and glucose uptake is increased in adipose tissue from cafeteria diet-fed rats independently of tissue sympathetic innervation." J Nutr **136**(10): 2475-80.
- Chen, H., D. Simar, et al. (2008). "Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism." Endocrinology **149**(11): 5348-56.
- Choi, Y. H., M. A. Della-Fera, et al. (2004). "CART peptide: central mediator of leptin-induced adipose tissue apoptosis?" Regul Pept **121**(1-3): 155-62.
- Choi, Y. H., C. Li, et al. (2008). "ICV leptin effects on spontaneous physical activity and feeding behavior in rats." Behav Brain Res **188**(1): 100-8.
- Chrousos, G. P. (2000). "The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes." Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 2**: S50-5.
- Chua, S. C., Jr., D. W. White, et al. (1996). "Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr)." Diabetes **45**(8): 1141-3.
- Clark, J. B., C. J. Palmer, et al. (1983). "The diabetic Zucker fatty rat." Proc Soc Exp Biol Med **173**(1): 68-75.
- Clasen, R., M. Schupp, et al. (2005). "PPARgamma-activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin." Hypertension **46**(1): 137-43.
- Coleman, D. L. (1982). "Diabetes-obesity syndromes in mice." Diabetes **31**(Suppl 1 Pt 2): 1-6.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." N Engl J Med **334**(5): 292-5.
- Cornier, M. A., D. Dabelea, et al. (2008). "The metabolic syndrome." Endocr Rev **29**(7): 777-822.
- Correia, M. L., W. G. Haynes, et al. (2002). "The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice." Diabetes **51**(2): 439-42.
- Correia, M. L. and K. Rahmouni (2006). "Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome." Diabetes Obes Metab **8**(6): 603-10.
- Dahlof, B., R. B. Devereux, et al. (2002). "Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol." Lancet **359**(9311): 995-1003.
- Dallman, M. F., N. C. Pecoraro, et al. (2006). "Glucocorticoids, chronic stress, and obesity." Prog Brain Res **153**: 75-105.
- Davies, M. J., N. T. Raymond, et al. (2000). "Impaired glucose tolerance and fasting hyperglycaemia have different characteristics." Diabet Med **17**(6): 433-40.
- Dendorfer, A., A. Thornagel, et al. (2002). "Angiotensin II induces catecholamine release by direct ganglionic excitation." Hypertension **40**(3): 348-54.
- Dendorfer, A., P. Dominiak, et al. (2005). "Peripheral sympatholytic actions of four AT1 antagonists: are they relevant for long-term antihypertensive efficacy?" J Hypertens **23**(10): 1861-7.

- Derosa, G., E. Fogari, et al. (2007). "Metabolic effects of telmisartan and irbesartan in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome treated with rosiglitazone." J Clin Pharm Ther **32**(3): 261-8.
- DiBona, G. F. (2004). "The sympathetic nervous system and hypertension: recent developments." Hypertension **43**(2): 147-50.
- Diez, J. J. and P. Iglesias (2003). "The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease." Eur J Endocrinol **148**(3): 293-300.
- Elliott, J. C., J. A. Harrold, et al. (2004). "Increases in melanin-concentrating hormone and MCH receptor levels in the hypothalamus of dietary-obese rats." Brain Res Mol Brain Res **128**(2): 150-9.
- Elliott, W. J. and P. M. Meyer (2007). "Incident diabetes in clinical trials of antihypertensive drugs: a network meta-analysis." Lancet **369**(9557): 201-7.
- Engeli, S., J. Bohnke, et al. (2005). "Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system." Hypertension **45**(3): 356-62.
- Enriori, P. J., A. E. Evans, et al. (2006). "Leptin resistance and obesity." Obesity (Silver Spring) **14 Suppl 5**: 254S-258S.
- Ernsberger, P., R. J. Koletsky, et al. (1999). "Molecular pathology in the obese spontaneous hypertensive Koletsky rat: a model of syndrome X." Ann N Y Acad Sci **892**: 272-88.
- Farley, C., J. A. Cook, et al. (2003). "Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats." Obes Res **11**(7): 845-51.
- Felber, J. P. and A. Golay (2002). "Pathways from obesity to diabetes." Int J Obes Relat Metab Disord **26 Suppl 2**: S39-45.
- Fogari, R., G. Derosa, et al. (2005). "Comparison of the effects of valsartan and felodipine on plasma leptin and insulin sensitivity in hypertensive obese patients." Hypertens Res **28**(3): 209-14.
- Frayling, T. M. (2007). "Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology." Nat Rev Genet **8**(9): 657-62.
- Frederich, R. C., B. Lollmann, et al. (1995). "Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity." J Clin Invest **96**(3): 1658-63.
- Furuhashi, M., N. Ura, et al. (2003). "Blockade of the renin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension." Hypertension **42**(1): 76-81.
- Garber, A. J. (2000). "The importance of early insulin secretion and its impact on glycaemic regulation." Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 3**: S32-7.
- Garcia-Diaz, D., J. Campion, et al. (2007). "Adiposity dependent apelin gene expression: relationships with oxidative and inflammation markers." Mol Cell Biochem **305**(1-2): 87-94.
- Gasc, J. M., S. Shanmugam, et al. (1994). "Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study." Hypertension **24**(5): 531-7.
- Gerich, J. E. (1999). "Is insulin resistance the principal cause of type 2 diabetes?" Diabetes Obes Metab **1**(5): 257-63.

- Giacchetti, G., E. Faloi, et al. (2000). "Gene expression of angiotensinogen in adipose tissue of obese patients." Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 2**: S142-3.
- Gohlke, P., S. Weiss, et al. (2001). "AT1 receptor antagonist telmisartan administered peripherally inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats." J Pharmacol Exp Ther **298**(1): 62-70.
- Goldstein, B. J. (2003). "Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus." Rev Cardiovasc Med **4 Suppl 6**: S3-10.
- Goto, Y., M. Kakizaki, et al. (1976). "Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding." Tohoku J Exp Med **119**(1): 85-90.
- Groubet, R., V. Pallet, et al. (2003). "Hyperlipidic diets induce early alterations of the vitamin A signalling pathway in rat colonic mucosa." Endocr Regul **37**(3): 137-44.
- Grundey, S. M. (2008). "Metabolic syndrome pandemic." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(4): 629-36.
- Hanefeld, M., C. Koehler, et al. (2003). "Insulin secretion and insulin sensitivity pattern is different in isolated impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose: the risk factor in Impaired Glucose Tolerance for Atherosclerosis and Diabetes study." Diabetes Care **26**(3): 868-74.
- Hansson, L., L. H. Lindholm, et al. (1999). "Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial." Lancet **353**(9153): 611-6.
- Haynes, W. G., D. A. Morgan, et al. (1997). "Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin." J Clin Invest **100**(2): 270-8.
- He, H., D. Yang, et al. "Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta-dependent pathways." Hypertension **55**(4): 869-79.
- Heiman, M. L., R. S. Ahima, et al. (1997). "Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress." Endocrinology **138**(9): 3859-63.
- Henriksen, E. J., S. Jacob, et al. (2001). "Selective angiotensin II receptor antagonist reduces insulin resistance in obese Zucker rats." Hypertension **38**(4): 884-90.
- Hiraoka-Yamamoto, J., Y. Nara, et al. (2004). "Establishment of a new animal model of metabolic syndrome: SHRSP fatty (fa/fa) rats." Clin Exp Pharmacol Physiol **31**(1-2): 107-9.
- Hotta, K., T. Funahashi, et al. (2000). "Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(6): 1595-9.
- Hu, E., P. Liang, et al. (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." J Biol Chem **271**(18): 10697-703.
- Hu, G., Q. Qiao, et al. (2004). "Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women." Arch Intern Med **164**(10): 1066-76.
- Hu, G., T. A. Lakka, et al. (2006). "Lifestyle management in the metabolic syndrome." Metab Syndr Relat Disord **4**(4): 270-86.

- Ikedo, H., A. Shino, et al. (1981). "A new genetically obese-hyperglycemic rat (Wistar fatty)." Diabetes **30**(12): 1045-50.
- Ishimura, K. and H. Fujita (1997). "Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes." Microsc Res Tech **36**(6): 445-53.
- Jezova, D., T. Ochedalski, et al. (1998). "Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress." J Neuroendocrinol **10**(1): 67-72.
- Jöhren, O., T. Inagami, et al. (1995). "AT1A, AT1B, and AT2 angiotensin II receptor subtype gene expression in rat brain." Neuroreport **6**(18): 2549-52.
- 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**(1 Pt 1): E104-12.
- Jöhren, O., A. Dendorfer, et al. (2007). "Gene expression of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the limbic system is related to type-2 like diabetes in leptin-resistant rats." Brain Res **1184**: 160-7.
- Juillerat, L., J. Nussberger, et al. (1990). "Determinants of angiotensin II generation during converting enzyme inhibition." Hypertension **16**(5): 564-72.
- Julius, S., S. E. Kjeldsen, et al. (2004). "Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial." Lancet **363**(9426): 2022-31.
- Kajioka, T., K. Miura, et al. (2007). "Potential utility of combination therapy with nateglinide and telmisartan for metabolic derangements in Zucker Fatty rats." Horm Metab Res **39**(12): 889-93.
- Kamari, Y., A. Harari, et al. (2008). "Effect of telmisartan, angiotensin II receptor antagonist, on metabolic profile in fructose-induced hypertensive, hyperinsulinemic, hyperlipidemic rats." Hypertens Res **31**(1): 135-40.
- Kawano, K., T. Hirashima, et al. (1992). "Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain." Diabetes **41**(11): 1422-8.
- Keller-Wood, M., B. Kimura, et al. (1986). "Interaction between CRF and angiotensin II in control of ACTH and adrenal steroids." Am J Physiol **250**(3 Pt 2): R396-402.
- Khaodhiar, L., S. Cummings, et al. (2009). "Treating diabetes and prediabetes by focusing on obesity management." Curr Diab Rep **9**(5): 348-54.
- Kim, S., J. Whelan, et al. (2002). "Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism." J Nutr **132**(6): 1135-40.
- Kissebah, A. H., S. Alfarsi, et al. (1976). "Role of insulin resistance in adipose tissue and liver in the pathogenesis of endogenous hypertriglyceridaemia in man." Diabetologia **12**(6): 563-71.
- Kral, T. V., L. S. Roe, et al. (2004). "Combined effects of energy density and portion size on energy intake in women." Am J Clin Nutr **79**(6): 962-8.
- Kristensen, P., M. E. Judge, et al. (1998). "Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin." Nature **393**(6680): 72-6.

- Krug, A. W. and M. Ehrhart-Bornstein (2008). "Aldosterone and metabolic syndrome: is increased aldosterone in metabolic syndrome patients an additional risk factor?" Hypertension **51**(5): 1252-8.
- Kuk, J. L., P. T. Katzmarzyk, et al. (2006). "Visceral fat is an independent predictor of all-cause mortality in men." Obesity (Silver Spring) **14**(2): 336-41.
- Lamounier-Zepter, V., M. Ehrhart-Bornstein, et al. (2005). "Mineralocorticoid-stimulating activity of adipose tissue." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(4): 567-75.
- Laws, A. and G. M. Reaven (1993). "Insulin resistance and risk factors for coronary heart disease." Baillieres Clin Endocrinol Metab **7**(4): 1063-78.
- Le Goascogne, C., N. Sananes, et al. (1991). "Immunoreactive cytochrome P-450(17 alpha) in rat and guinea-pig gonads, adrenal glands and brain." J Reprod Fertil **93**(2): 609-22.
- Leong, D. S., J. A. Terron, et al. (2002). "Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors." Neuroendocrinology **75**(4): 227-40.
- Li, Y. Q., H. Ji, et al. (2006). "Metabolic effects of telmisartan in spontaneously hypertensive rats." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **373**(4): 264-70.
- Liese, A. D., E. J. Mayer-Davis, et al. (1998). "Development of the multiple metabolic syndrome: an epidemiologic perspective." Epidemiol Rev **20**(2): 157-72.
- Llorens-Cortes, C., B. Greenberg, et al. (1994). "Tissular expression and regulation of type 1 angiotensin II receptor subtypes by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis." Hypertension **24**(5): 538-48.
- Ludvik, B., E. Kueenburg, et al. (1991). "The effects of ramipril on glucose tolerance, insulin secretion, and insulin sensitivity in patients with hypertension." J Cardiovasc Pharmacol **18** **Suppl 2**: S157-9.
- Ludwig, D. S., N. A. Tritos, et al. (2001). "Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance." J Clin Invest **107**(3): 379-86.
- MacLean, P. S., D. Zheng, et al. (2002). "Exercise-induced transcription of the muscle glucose transporter (GLUT 4) gene." Biochem Biophys Res Commun **292**(2): 409-14.
- Madala Halagappa, V. K., S. Tiwari, et al. (2008). "Chronic candesartan alters expression and activity of NKCC2, NCC, and ENaC in the obese Zucker rat." Am J Physiol Renal Physiol **294**(5): F1222-31.
- Maeda, N., I. Shimomura, et al. (2002). "Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30." Nat Med **8**(7): 731-7.
- Maffei, M., H. Fei, et al. (1995). "Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6957-60.
- Makita, S., A. Abiko, et al. (2008). "Effects of telmisartan on adiponectin levels and body weight in hypertensive patients with glucose intolerance." Metabolism **57**(10): 1473-8.
- Margetic, S., C. Gazzola, et al. (2002). "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(11): 1407-33.
- Mark, A. L., M. L. Correia, et al. (2002). "Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications." J Hypertens **20**(7): 1245-50.

- Marshall, T. G., R. E. Lee, et al. (2006). "Common angiotensin receptor blockers may directly modulate the immune system via VDR, PPAR and CCR2b." Theor Biol Med Model **3**: 1.
- Masuo, K., H. Mikami, et al. (2000). "Weight gain-induced blood pressure elevation." Hypertension **35**(5): 1135-40.
- Masuyama, T., Y. Katsuda, et al. (2005). "A novel model of obesity-related diabetes: introgression of the *Lepr*(fa) allele of the Zucker fatty rat into nonobese Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats." Exp Anim **54**(1): 13-20.
- Meisinger, C., A. Doring, et al. (2006). "Body fat distribution and risk of type 2 diabetes in the general population: are there differences between men and women? The MONICA/KORA Augsburg cohort study." Am J Clin Nutr **84**(3): 483-9.
- Montague, C. T., I. S. Farooqi, et al. (1997). "Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans." Nature **387**(6636): 903-8.
- Mori, Y., Y. Itoh, et al. (2007). "Telmisartan improves lipid metabolism and adiponectin production but does not affect glycemic control in hypertensive patients with type 2 diabetes." Adv Ther **24**(1): 146-53.
- Müller, H., J. Kröger, et al. "Stress sensitivity is increased in transgenic rats with low brain angiotensinogen." J Endocrinol **204**(1): 85-92.
- Müller, H., N. Schweitzer, et al. (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**(3): E802-10.
- Munck, A., P. M. Guyre, et al. (1984). "Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions." Endocr Rev **5**(1): 25-44.
- Munoz, M. C., J. F. Giani, et al. (2009). "Long-term treatment with an angiotensin II receptor blocker decreases adipocyte size and improves insulin signaling in obese Zucker rats." J Hypertens **27**(12): 2409-20.
- Nagel, J. M., A. B. Tietz, et al. (2006). "The effect of telmisartan on glucose and lipid metabolism in nondiabetic, insulin-resistant subjects." Metabolism **55**(9): 1149-54.
- Nyklicek, I., J. A. Bosch, et al. (2005). "A generalized physiological hyperreactivity to acute stressors in hypertensives." Biol Psychol **70**(1): 44-51.
- Okada, K., T. Hirano, et al. (2004). "Olmesartan medoxomil, an angiotensin II receptor blocker ameliorates insulin resistance and decreases triglyceride production in fructose-fed rats." Hypertens Res **27**(4): 293-9.
- Pasquali, R., V. Vicennati, et al. (2006). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome." Ann N Y Acad Sci **1083**: 111-28.
- Pavlatou, M. G., G. Mastorakos, et al. (2008). "Chronic administration of an angiotensin II receptor antagonist resets the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and improves the affect of patients with diabetes mellitus type 2: preliminary results." Stress **11**(1): 62-72.
- Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, et al. (1995). "Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice." Science **269**(5223): 540-3.
- Petersen, K. F. and G. I. Shulman (2002). "Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus." Am J Cardiol **90**(5A): 11G-18G.

- Petersen, K. F., S. Dufour, et al. (2005). "Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes." Diabetes **54**(3): 603-8.
- Qi, L., F. B. Hu, et al. (2008). "Genes, environment, and interactions in prevention of type 2 diabetes: a focus on physical activity and lifestyle changes." Curr Mol Med **8**(6): 519-32.
- Qi, Y., N. Takahashi, et al. (2004). "Adiponectin acts in the brain to decrease body weight." Nat Med **10**(5): 524-9.
- Qu, D., D. S. Ludwig, et al. (1996). "A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour." Nature **380**(6571): 243-7.
- Raasch, W., S. Betge, et al. (2001). "Angiotensin converting enzyme inhibition improves cardiac neuronal uptake of noradrenaline in spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **19**(10): 1827-33.
- Raasch, W., T. Bartels, et al. (2002). "Angiotensin I-converting enzyme inhibition increases cardiac catecholamine content and reduces monoamine oxidase activity via an angiotensin type 1 receptor-mediated mechanism." J Pharmacol Exp Ther **300**(2): 428-34.
- Raasch, W., T. Bartels, et al. (2002). "Regression of ventricular and vascular hypertrophy: are there differences between structurally different angiotensin-converting enzyme inhibitors?" J Hypertens **20**(12): 2495-504.
- Raasch, W., P. Dominiak, et al. (2004). "Reduction of vascular noradrenaline sensitivity by AT1 antagonists depends on functional sympathetic innervation." Hypertension **44**(3): 346-51.
- Raasch, W., O. Jöhren, et al. (2004). "Combined blockade of AT1-receptors and ACE synergistically potentiates antihypertensive effects in SHR." J Hypertens **22**(3): 611-8.
- Raasch, W., P. Dominiak, et al. (2005). "Angiotensin I-converting enzyme-dependent and neutral endopeptidase-dependent generation and degradation of angiotensin II contrarily modulate noradrenaline release: implications for vasopeptidase-inhibitor therapy?" J Hypertens **23**(8): 1597-604.
- Raasch, W., C. Wittmershaus, et al. (2006). "Angiotensin II inhibition reduces stress sensitivity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats." Endocrinology **147**(7): 3539-46.
- Rahmouni, K., D. A. Morgan, et al. (2005). "Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension." Diabetes **54**(7): 2012-8.
- Ran, J., T. Hirano, et al. (2006). "Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance." Metabolism **55**(4): 478-88.
- Rattigan, S., P. R. Howe, et al. (1986). "The effect of a high-fat diet and sucrose drinking option on the development of obesity in spontaneously hypertensive rats." Br J Nutr **56**(1): 73-80.
- Reaven, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." Diabetes **37**(12): 1595-607.
- Rivier, C. and W. Vale (1983). "Effect of angiotensin II on ACTH release in vivo: role of corticotropin-releasing factor." Regul Pept **7**(3): 253-8.
- Rolls, B. J., E. L. Morris, et al. (2002). "Portion size of food affects energy intake in normal-weight and overweight men and women." Am J Clin Nutr **76**(6): 1207-13.

- Rong, X., Y. Li, et al. (2009). "An adipose tissue-independent insulin-sensitizing action of telmisartan: a study in lipodystrophic mice." J Pharmacol Exp Ther **331**(3): 1096-103.
- Rosmond, R. and P. Bjorntorp (2000). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity as a predictor of cardiovascular disease, type 2 diabetes and stroke." J Intern Med **247**(2): 188-97.
- Rosmond, R., Y. C. Chagnon, et al. (2000). "A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Obes Res **8**(3): 211-8.
- Roy, M., B. Collier, et al. (1990). "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation among diabetic outpatients." Psychiatry Res **31**(1): 31-7.
- Roy, M. S., A. Roy, et al. (1993). "The ovine corticotropin-releasing hormone-stimulation test in type I diabetic patients and controls: suggestion of mild chronic hypercortisolism." Metabolism **42**(6): 696-700.
- Rozanski, A., J. A. Blumenthal, et al. (1999). "Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy." Circulation **99**(16): 2192-217.
- Sanchez, R. A., L. D. Masnatta, et al. (2008). "Telmisartan improves insulin resistance in high renin nonmodulating salt-sensitive hypertensives." J Hypertens **26**(12): 2393-8.
- Scheen, A. J. (2004). "Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 1. A meta-analysis of randomised clinical trials." Diabetes Metab **30**(6): 487-96.
- Scheen, A. J. (2004). "Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms." Diabetes Metab **30**(6): 498-505.
- Scheen, A. J. (2004). "Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system." Drugs **64**(22): 2537-65.
- Schienkiewitz, A., M. B. Schulze, et al. (2006). "Body mass index history and risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study." Am J Clin Nutr **84**(2): 427-33.
- Schnell, O., W. Otter, et al. (2009). "The Munich Myocardial Infarction Registry: translating the European Society of Cardiology (ESC) and European Association for the Study of Diabetes (EASD) guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular disease into clinical practice." Diabetes Care **32** Suppl 2: S326-30.
- Schunkert, H., J. R. Ingelfinger, et al. (1992). "Reciprocal feedback regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expressions by angiotensin II." Am J Physiol **263**(5 Pt 1): E863-9.
- Schupp, M., J. Janke, et al. (2004). "Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity." Circulation **109**(17): 2054-7.
- Schupp, M., M. Clemenz, et al. (2005). "Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity." Diabetes **54**(12): 3442-52.
- Schwartz, M. W., E. Peskind, et al. (1996). "Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans." Nat Med **2**(5): 589-93.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature **404**(6778): 661-71.

- Sclafani, A. (1987). "Carbohydrate taste, appetite, and obesity: an overview." Neurosci Biobehav Rev **11**(2): 131-53.
- Sebekova, K., M. Lill, et al. (2009). "Functional and partial morphological regression of established renal injury in the obese Zucker rat by blockade of the renin-angiotensin system." Am J Nephrol **29**(3): 164-70.
- Seidell, J. C., P. Bjorntorp, et al. (1990). "Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels." Metabolism **39**(9): 897-901.
- Seidell, J. C., M. Cigolini, et al. (1991). "Body fat distribution in relation to serum lipids and blood pressure in 38-year-old European men: the European fat distribution study." Atherosclerosis **86**(2-3): 251-60.
- Shek, E. W., M. W. Brands, et al. (1998). "Chronic leptin infusion increases arterial pressure." Hypertension **31**(1 Pt 2): 409-14.
- Shimabukuro, M., H. Tanaka, et al. (2007). "Effects of telmisartan on fat distribution in individuals with the metabolic syndrome." J Hypertens **25**(4): 841-8.
- Shimamoto, K. and N. Ura (2006). "Mechanisms of insulin resistance in hypertensive rats." Clin Exp Hypertens **28**(6): 543-52.
- Shimizu, H., I. S. Oh, et al. (2007). "Leptin resistance and obesity." Endocr J **54**(1): 17-26.
- Shinohara, M., T. Masuyama, et al. (2000). "A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications." Int J Exp Diabetes Res **1**(2): 89-100.
- Siragy, H. M. (2003). "Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitors or calcium channel blocker vs diuretic. The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT)." Curr Hypertens Rep **5**(4): 293-4.
- Skurk, T., V. van Harmelen, et al. (2005). "Angiotensin II promotes leptin production in cultured human fat cells by an ERK1/2-dependent pathway." Obes Res **13**(6): 969-73.
- Snehalatha, C., A. Ramachandran, et al. (2003). "Insulin secretion and action show differences in impaired fasting glucose and in impaired glucose tolerance in Asian Indians." Diabetes Metab Res Rev **19**(4): 329-32.
- Snijder, M. B., J. M. Dekker, et al. (2004). "Trunk fat and leg fat have independent and opposite associations with fasting and postload glucose levels: the Hoorn study." Diabetes Care **27**(2): 372-7.
- Stern, M. P., K. Williams, et al. (2004). "Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease?" Diabetes Care **27**(11): 2676-81.
- Strahorn, P., D. Graham, et al. (2005). "Genetic determinants of metabolic syndrome components in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat." J Hypertens **23**(12): 2179-86.
- Sugimoto, K., N. R. Qi, et al. (2006). "Telmisartan but not valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis." Hypertension **47**(5): 1003-9.
- Sumitomo, T., T. Suda, et al. (1991). "Angiotensin II increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus." Endocrinology **128**(5): 2248-52.

- Surwit, R. S., M. S. Schneider, et al. (1992). "Stress and diabetes mellitus." Diabetes Care **15**(10): 1413-22.
- Swislocki, A. and A. Tsuzuki (1993). "Insulin resistance and hypertension: glucose intolerance, hyperinsulinemia, and elevated free fatty acids in the lean spontaneously hypertensive rat." Am J Med Sci **306**(5): 282-6.
- Teran-Garcia, M. and C. Bouchard (2007). "Genetics of the metabolic syndrome." Appl Physiol Nutr Metab **32**(1): 89-114.
- Tofovic, S. P., H. Kusaka, et al. (2000). "Renal function and structure in diabetic, hypertensive, obese ZDFxSHHF-hybrid rats." Ren Fail **22**(4): 387-406.
- Tou, J. C. and C. E. Wade (2002). "Determinants affecting physical activity levels in animal models." Exp Biol Med (Maywood) **227**(8): 587-600.
- Tripathy, D., M. Carlsson, et al. (2000). "Insulin secretion and insulin sensitivity in relation to glucose tolerance: lessons from the Botnia Study." Diabetes **49**(6): 975-80.
- Unger, T. and S. Sandmann (2000). "Angiotensin receptor blocker selectivity at the AT1- and AT2-receptors: conceptual and clinical effects." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **1**(2 Suppl): S6-9.
- Unwin, N., D. Gan, et al. "The IDF Diabetes Atlas: providing evidence, raising awareness and promoting action." Diabetes Res Clin Pract **87**(1): 2-3.
- Uresin, Y., B. Erbas, et al. (2004). "Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **5**(2): 93-6.
- Usui, I., S. Fujisaka, et al. (2007). "Telmisartan reduced blood pressure and HOMA-IR with increasing plasma leptin level in hypertensive and type 2 diabetic patients." Diabetes Res Clin Pract **77**(2): 210-4.
- Van Harmelen, V., P. Ariapart, et al. (2000). "Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity." Obes Res **8**(4): 337-41.
- van Zwieten, P. A. (1999). "Diabetes and hypertension: experimental models for pharmacological studies." Clin Exp Hypertens **21**(1-2): 1-16.
- Velkoska, E., F. J. Warner, et al. "Metabolic effects of low dose angiotensin converting enzyme inhibitor in dietary obesity in the rat." Nutr Metab Cardiovasc Dis **20**(1): 49-55.
- Vitale, C., G. Mercurio, et al. (2005). "Metabolic effect of telmisartan and losartan in hypertensive patients with metabolic syndrome." Cardiovasc Diabetol **4**: 6.
- Warne, J. P. (2009). "Shaping the stress response: interplay of palatable food choices, glucocorticoids, insulin and abdominal obesity." Mol Cell Endocrinol **300**(1-2): 137-46.
- Weisinger, R. S., T. K. Stanley, et al. (2009). "Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet." Physiol Behav **98**(1-2): 192-7.
- Wild, S., G. Roglic, et al. (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." Diabetes Care **27**(5): 1047-53.
- Wu, X., H. Motoshima, et al. (2003). "Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes." Diabetes **52**(6): 1355-63.

- Yach, D., D. Stuckler, et al. (2006). "Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes." Nat Med **12**(1): 62-6.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity." Nat Med **7**(8): 941-6.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nat Med **8**(11): 1288-95.
- Yen, T. T. and J. M. Acton (1972). "Locomotor activity of various types of genetically obese mice." Proc Soc Exp Biol Med **140**(2): 647-50.
- Younis, F., N. Stern, et al. "Telmisartan ameliorates hyperglycemia and metabolic profile in nonobese Cohen-Rosenthal diabetic hypertensive rats via peroxisome proliferator activator receptor-gamma activation." Metabolism.
- Younis, F., N. Kariv, et al. (2007). "Telmisartan in the treatment of Cohen-Rosenthal Diabetic Hypertensive rats: the benefit of PPAR-gamma agonism." Clin Exp Hypertens **29**(6): 419-26.
- Yusuf, S., H. Gerstein, et al. (2001). "Ramipril and the development of diabetes." Jama **286**(15): 1882-5.
- Yusuf, S., K. K. Teo, et al. (2008). "Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events." N Engl J Med **358**(15): 1547-59.
- Zanchi, A., A. G. Dulloo, et al. (2007). "Telmisartan prevents the glitazone-induced weight gain without interfering with its insulin-sensitizing properties." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(1): E91-5.
- Ziemke, F. and C. S. Mantzoros "Adiponectin in insulin resistance: lessons from translational research." Am J Clin Nutr **91**(1): 258S-261S.
- Zorad, S., J. T. Dou, et al. (2006). "Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma." Eur J Pharmacol **552**(1-3): 112-22.
- Zucker, L. M. (1965). "Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia." Ann N Y Acad Sci **131**(1): 447-58.

8 Anhang

8.1 Materialien und Geräte

Substanzen und Lösungen

10 X TAE-Puffer	Invitrogen (Canada)
1-Octanesulfonic Säure	Sigma (Deutschland)
2-Methylbutan	Sigma (Deutschland)
3,4-Dihydroxybenzylamin	Sigma (Deutschland)
3-Hydroxythyramin	Sigma (Deutschland)
Abz-Gly-OH	Bachem Biochemica (Deutschland)
Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH	Bachem Biochemica (Deutschland)
Agarose NEEO	Carl Roth (Deutschland)
Aluminiumoxid	Sigma (Deutschland)
Antikörper anti-IRβ	Santa Cruz Biotechnology (Deutschland)
Antikörper anti-Maus	GE Healthcare (UK)
Bestatin	Sigma (Deutschland)
Betaisodona-Lösung®	Mundipharma (Deutschland)
BSA (Rinderserum, proteasefrei)	Sigma (Deutschland)
Cell Lysis Buffer (10X)	Cell Signaling Technology (Deutschland)
Citronensäure Monohydrat	Merck (Deutschland)
Deoxyepinephrin	Sigma (Deutschland)
Diethylether	Carl Roth (Deutschland);
Diethylpyrocarbinat (DEPC)	Sigma (Deutschland)
Di-Natrium-Hydrogenphosphat	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)
Ethidiumbromid	BioRad Laboratories (Canada)
Ethylacetat	J. T. Baker (Holland)
Femto Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrat	Thermo Scientific (USA)
Flüssiger Stickstoff	Lokaler Lieferant
Folin-Reagenz	Merck (Deutschland)
Gel-Marker DNA Molekular Weight Marker 14 0,25µg/µl (50µg=1A260 U)	Roche (Schweiz)

Glukose-Lösung 50%; 100ml	Delta Select (Deutschland)
Glycerol	Gibco BRL (Deutschland)
Heparin-Lösung (Liquemin® N; 25000 I.E./5ml)	Hoffmann-La Roche (Schweiz)
Hexan	Sigma (Deutschland)
Insulin Insuman Rapid	Aventis (Deutschland)
Kaleidoscope Prestained Standards	BioRad Laboratories (USA)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Deutschland)
Kochsalz-Lösung 0,9%; steril	Berlin-Chemie (Deutschland)
Kochsalz-Lösung zum Spülen	Delta Select (Deutschland)
L-Glutation (GSH)	Serva (Deutschland)
Magermilchpulver	Fluka Chemie (Schweiz)
Methanol	J. T. Baker (Holland)
Na-Acetat	Merck (Deutschland)
Natriumcarbonat	Merck (Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Deutschland)
Natrium-Di-Hydrogenphosphat	Merck (Deutschland)
Natrium-Kalium-Tartrat	Merck (Deutschland)
Na-EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	Invitrogen (Kanada)
Natriumhydroxid	Merck (Deutschland)
Noradrenalin (Norephrin)	Sigma (Deutschland)
Nucleic Acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems (UK)
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Invitrogen (Deutschland)
NuPAGE® Sample Reducing Agent	Invitrogen (Deutschland)
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen (Deutschland)
NuPAGE® MES SDS Rnning Buffer	Invitrogen (Deutschland)
NuPAGE® Transfer Buffer	Invitrogen (Deutschland)
PBS Puffer	UK-SH Apotheke Lübeck (Deutschland)
PCR-Primer	Invitrogen (Deutschland)
Pentobarbital-Na-Lösung (98mg/1,8 ml)	UK-SH Apotheke Lübeck (Deutschland)
Perchlorsäure	Merck (Deutschland)
Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol	Invitrogen (Kanada)
Proteinase K	Applied Biosystems (UK)
RNA Purifikation Wash Solution I	Applied Biosystems (UK)
RNA Purifikation Wash Solution II	Applied Biosystems (UK)
Ramipril	Boehringer Ingelheim (Deutschland)
Salzsäure; HCl (konzentriert)	Merck (Deutschland)

Sauerstoff (in Flaschen)	Lokaler Gas-Lieferant
Stickstoffstrom	Hausleitung
Telmisartan	Böhringer Ingelheim (Deutschland)
Tris-Lösung (1 M; pH 7,4)	Invitrogen (Kanada)
Trockeneis	UK-SH Apotheke Lübeck (Deutschland)
Tween	ICN Biomedicals (USA)
Xylen-Cyanol	BioRad Laboratories (Kanada)

Rezepturen von Lösungen und Puffern

Bestatin-Lösung (1mM)	0,2 ml Bestatin-Lösung (5mg/ml) ad 2,9 ml Aquadest.
Bestatin-Lösung (5mg/ml)	5 mg Bestatin ad 1ml Aqua dest.
Blockierlösung (Milchpuffer)	50 ml PBS-Tween-Waschpuffer 2,5 g Magermilchpulver
DEPC-Wasser	500 µl DEPC ad 500 ml Aqua dest. nach 24 h sterilisiert
EDTA-Lösung pH 6-7	900 mg Na-EDTA ad 10ml Aqua dest. NaOH zur pH-Wert-Einstellung
Eluent (Katecholamin-Bestimmung)	2,7 g Citronensäure Monohydrat 1,7 g NaH ₂ PO ₄ 1,7 g Na-Acetat 150 mg 1-Octanesulfonic Säure 300 mg Na-EDTA 30 ml Methanol 1000 ml Aqua dest. pH 5,6
GSH-EDTA-Lösung pH 6-7	900 mg Na-EDTA 600 mg GSH (L-Glutation) ad 10ml Aqua dest. NaOH zur pH-Wert Einstellung
Heparin Lösung (250 I.E./ml)	5 ml Heparin-Lösung (25000 I.E./5ml) ad 100 ml NaCl-Lösung ad injectabilia
Lade-Puffer für die Gel-Elektrophorese	600 µl Glycerol 200 µl 2,5% Xylen-Cyanol-Lösung 1200µl DEPC-Wasser
Lysis-Puffer	5 ml Nucleic Acid Purification Lysis Solution ad 10 ml DEPC-Wasser
PBS-Tween-Waschpuffer	11,5 g Na ₂ HPO ₄ (80 mM) 2,96 g NaH ₂ PO ₄ (20 mM) 5,84 g NaCl (100 mM) 1 ml Tween 20 ad 1000 ml Aqua dest.

	pH 7,5
Proteinbestimmung (Western Blot)	1mg/ml BSA Stammlösung (1:3)-Folin-Reagenz Lowry-Mix (49 ml Na ₂ CO ₃ 2% + 0,5 ml Na-K-Tartrat (100mM) 2% + 0,5 ml CuSO ₄ (40 mM) 1%)
Untersuchung auf Proteinfreiheit	Färbelösung: 0,5 g Coomassie Blue 800 ml Methanol 140 ml Eisessig ad 2 l Aqua dest. Entfärbelösung: 70 ml Eisessig 430 ml Methanol ad 500 ml Aqua dest.
Ramipril Schlundlösung	40 mg Ramipril 0,1 N NaOH Einstellung auf pH 9 ad 10 ml Aqua dest.
TAE-Puffer	100ml 10 X TAE-Puffer ad 1000 ml Aqua dest.
TE-Puffer pH 7,4	100 µl 1M Tris-Puffer pH 7,4 20 µl 0,5M EDTA-Lösung pH 8 ad 10 ml DEPC-Wasser
Telmisartan Schlundlösung	80 mg Telmisartan 1 ml 0,1 N NaOH-Lsg, HCl zur Einstellung auf pH 9 ad 10 ml Aqua dest.
Tris-Puffer (HPLC)	Trisaminomethanhydrochlorid 1,5 M EDTA 68 mM Glutathion 3,6 M
Xylen-Cyanol-Lösung 2,5%	91 mg Xylen-Cyanol ad 2 ml DEPC-Wasser

RIA-Kits

ACTH	MP Biomedicals, Kat.Nr.: 07106101
Adiponektin	Linco, Kat.Nr.: MADP 60HK
Aldosteron	MP Biomedicals, Kat.Nr. 07108202
Angiotensin-II	Euro-Diagnostica, Kat.Nr.: RB 320
Corticosteron	MP Biomedicals, Kat.Nr. 07120102
Glukagon	Linco, Kat.Nr.: GL 32K
Insulin	Linco, Kat.Nr.: RI 13K
Leptin	Linco, Kat.Nr.: RL 83K
C-Peptid	Linco, Kat.Nr.: RCP 21K

Kits zur Bestimmung der Genexpression

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

Verbrauchsmaterialien

2/0 Faden Dagrofil [®]	B/Braun (Deutschland)
5-0 Faden Mopyten [®] monofil blau	Resorba (Deutschland)
96-Well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems (UK)
Blotpapier (58cm x 68cm x 0,34mm)	Whatman Biometra (Deutschland)
Drahtstifte 0,8 x 11 mm	Stabilit (Deutschland)
Durapora [™] 3M	Health Care (Deutschland)
Einmalspritzen Discardit [™] II 1ml und 2 ml	BD (Deutschland)
Filterpapier (Durchmesser 110 mm)	Schleicher & Schuell (Deutschland)
Filter Tips 10,100,1000	Greiner bio one (Deutschland)
Filtersysteme für die ABI PRISAM 61000 Nucleic Acid PrepStation	Applied Biosystems (UK)
Formula-Diät Futter	Altromin (Deutschland)
Gelloader Tips	Eppendorf (Deutschland)
Glukoseteststreifen für Ascensia	Bayer (Deutschland)
Kanülen BD Microlance [™] 3 20GX1½“-Nr1 0,9X40	BD (Deutschland)
Kanülen BD Microlance [™] 3 23GX1“-Nr16 0,6X25	BD (Deutschland)
Kanülen BD Microlance [™] 3 26GX½“ 0,45X13	BD (Deutschland)
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt (Deutschland)
Klingen Microtome blades	Leica (Deutschland)
Microvetten CB 300	Sarstedt (Deutschland)
Multiply PCR Plate 96 Well	Sarstedt (Deutschland)
Nahtklammern (Michel Suture Clips)	FST (Deutschland)
Nitril-Handschuhe, Nitra Tex	Ansell (Deutschland)
Norm-Diät Haltungsfutter für Ratten	Altromin (Deutschland)
NuPage [®] 4-12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen (Deutschland)
Parafilm	American National Can [™] (USA)
PE-Schläuche	Portex Fine Bore Polyethylene (UK)
PP-test tubes 15 ml, 50 ml Cellstar [®]	Greiner bio one (Deutschland)

PVDF Blot-Membranen Immobilon	Millipore (Deutschland)
Rasierklingen	Wilkinson Sword (Deutschland)
RIA Röhrchen	Greiner (Deutschland)
Save Lock Tubes (2; 1,5; 0,5 und 0,2 ml)	Eppendorf (Deutschland)
Schlauchfolie zum Einschweißen	Hassa (Deutschland)
Schokoriegel, verschiedene	Diverse
Tupfer Pure-Zellin	Paul Hartmann AG (Deutschland)
Vinyl-Einmalhandschuhe	Meditrade (Deutschland)
Wägebapier	Neolab
Watteträger	NOBA Verbandmittel (Deutschland)

Laborgeräte

Adsorbex SPU Sample Prereration Unit	Merck (Deutschland)
Autoklav	Dargatz (Deutschland)
Blutzuckermessgerät Ascensia ELITE XL	Bayer (Deutschland)
Eismaschine Scotsman AF 10	Scotsman (Deutschland)
Feinwaage BP 210 D	Sartorius (Deutschland)
Gefriermikrotom CM 3050	Leica (Deutschland)
Gefrierschrank (-80°C)	Colora (Deutschland)
Gefriertruhen (-20°C)	Bosch (Deutschland)
Guillotine	Harvard Apparatus CO. Inc. Millis. Mass (USA)
Homogenisator, Typ 853202	B. Braun (Deutschland)
Kühlschränke (2-8°C)	Bosch (Deutschland)
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Janke & Kunkel (Deutschland)
Mischgerät (IKAMAG RCT)	IKA-Werke (Deutschland)
Mischgerät, Typ WT 17	Whatman Biometra (Deutschland)
pH-Meter WTW ph 531	WTW (Deutschland)
Photometer (LKB Ultrospec plus)	Amersham Pharmacia Biotech (Deutschland)
Pipetus-Akku	Hirschmann (Deutschland)
Plexiglas-Käfige (25 · 20 · 22 cm)	Werkstatt UK-SH (Deutschland)
Rasierer Moser Styling II	TSE (Deutschland)
Rührfische	Bohlende (Deutschland)
Schüttel/Schwenkgerät REAX 2	Heidolph (Deutschland)
Stoppuhr	Junghans (Deutschland)
Thermoblock Schnipptherm	Schutron (Deutschland)
Tierwaage	Sartorius (Deutschland)

Tischzentrifuge (EPS 6015402)	Eppendorf (Deutschland)
Tischzentrifuge MIKRO 200R	Hettich (Deutschland)
Tischzentrifuge PCR-Labor	Eppendorf (Deutschland)
Ultra-Tourax 78	IKA-Werke (Deutschland)
Vakuum-Verdampfer	Savant (Deutschland)
Vortex REAX 2000	Heidolph (Deutschland)
Waage MC1 Laboratory LC220S	Sartorius (Deutschland)
Zentrifuge PCR-Labor	Jouan (Deutschland)

HPLC-Anlage

Autosampler 717 plus	Walters (USA)
HPLC-Säule: 3,9x150 mm Column, Nova PakC18	Walters (USA)
Walters Detektor M460	Walters (USA)
c-R4AX Chromatopac	Shimadzu (Deutschland)

Geräte zur Blutdruckmessung und Aktivitätsmessung

Blood pressure monitor 8002 dual,	TSE (Deutschland)
InfraMot System	TSE (Deutschland)
Piezoelemente	TSE (Deutschland)
Registrierteil 130 T mit Termopapier	Recomed (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 Cyler für cDNA-Herstellung	Biometra (USA)

Geräte zur Gel-Elektrophorese

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

Geräte für RIA

Gamma-Counter: Compugamma 1282 CS Wallac (USA)

Membranpumpe UVS 400 A Savant (Deutschland)

Minifuge RF Heraeus sepatech (Deutschland)

Geräte für Western Blot

Invitrogen Fertigsystem: Invitrogen (Deutschland)

Mini Cell

Blot Modul

Power Supply

8.2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
®	geschützter Warenname
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AD	Außendurchmesser
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
AgRP	Agouti-Related Protein
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
AT ₁ -Rezeptor	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor
AT ₂ -Rezeptor	Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptor
AT ₁ -Blocker	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker
AUC	Fläche unter der Kurve; „Area under the curve“
A.	Arteria
BMI	Body-Mass-Index
bpm	„beats per minute“; Schläge pro Minute
BZ	Blutzucker
bzw.	beziehungsweise
CART	Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript
ca.	circa
CCD	Charge-coupled Device
cDNA	complementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
C _{max}	maximaler Konzentrationsanstieg; Differenz zwischen Basalwert und Maximal-Wert
C _{max} Glu	maximaler Anstieg der Plasmaglukosekonzentration
C _{max} Ins	maximaler Anstieg der Plasmainsulinkonzentration
C _{min}	minimale Konzentration
C-Peptid	Connecting Peptid

CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CT	Schwellenwertzyklus; „treshold cycle“
d	Tag; „day“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
Fischer _{Formula}	Fischer-Ratte unter Formula-Diät
FST	„forced-swimming-test“
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung im Zusammenhang mit Zentrifugation
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT 4	Glukosetransporter 4
G-Protein	Guanin-Nukleotid bindendes Protein
GSH	Glutathion
h	Stunde; „hour“
HCl	Salzsäure
HD	Hochkalorische Diät
HDL-Cholesterin	High Density Lipoprotein Cholesterin
HF	Herzfrequenz
HOMA-Index	Homeostasis Model Assessment Index
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HPLC-ED	High Pressure Liquid Chromatography and Electrochemical Detection
HWZ	Halbwertszeit
I.	Index
ID	Innendurchmesser
IDF	„International Diabetes Federation“
I.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
IRS-1	Insulin Receptor Substrate 1
IR β	Insulinrezeptor β
ITT	Insulintoleranztest
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm

KG	Körpergewicht
KH	Kohlenhydrate
K_i	Inhibitionskonstante
kJ	Kilo Joule
Komm.	kommissarisch
kum.	kumulativ
l	Liter
LxBxH	Länge x Breite x Höhe
Lsg.	Lösung
LV	Linksventrikulär
M	Molar
mA	Milliamper
MCH	Melanin-Concentrating Hormon
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	Normalität
N.	Nervus
Na	Natrium
ND	Norm-Diät
NIH-Richtlinien	Richtlinien der National Institutes of Health, USA
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NN	Nebennieren
NPY	Neuropeptid Y
Nr.	Nummer
nü.	nüchtern
n.s.	nicht signifikant
o.g.	oben genannt
OGTT	oraler Glukosetoleranztest
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Kettenreaktion; „Polymerase chain reaction“
PE	Polyethylen

pg	Picogramm
PI-3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
pmol	Picomol
p.o.	per os
POMC	Proopiomelanocortin
PP	Polypropylen
PPAR γ/δ	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor vom Typ γ bzw. δ
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction
r	Pearson'scher Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RAM	SHR-Ratte unter Cafeteria-Diät behandelt mit 4 mg/kg _{KG} Ramipril pro Tag
RIA	Radio Immuno Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Blutdruck
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SBP	systolischer Blutdruck
s.c.	subkutan
SD _{Cafe}	SD-Ratte unter Cafeteria-Diät
SD _{Formula}	SD-Ratte unter Formula-Diät
SD-Ratte	Sprague Dawley Ratte
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SHR	Spontan Hypertensive Ratte
SHR _{Cafe}	SHR unter Cafeteria-Diät
SHR _{Formula+Glu}	SHR unter Formula-Diät mit Glukoselösung anstatt Wasser
Tab.	Tabelle
TEL	SHR unter Cafeteria-Diät behandelt mit 8 mg/kg _{KG} Telmisartan pro Tag
TEL+RAM	SHR-Ratte unter Cafeteria-Diät behandelt mit 8 mg/kg _{KG} Telmisartan und 4 mg/kg _{KG} Ramipril pro Tag
Tris	Trishydroxymethylamoniummethan
TM	Unregistered Trademark
t _{1/2}	Halbwertszeit
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen in der Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
V.	Vena

vs.	versus; im Vergleich zu
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation
WKY-Ratte	Wistar-Kyoto-Ratte unter Norm-Diät
Wo.	Woche
z.B.	zum Beispiel
ZDF-Ratte	Zucker Diabetic Fatty Ratte
z.T.	zum Teil

9 Publikationsliste

Poster

Miesel, A., H. Müller, P. Dominiak, and W. Raasch. 2008. Glucose utilization, body weight and blood pressure are differentially regulated in various rat strains after high caloric feeding regimes. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 377:59-59.

Raasch, W., **A. Miesel**, H. Müller, P. Dominiak. 2009. In rats with metabolic syndrome weight gain and glucose homeostasis were improved similarly by the AT₁-antagonist telmisartan and by the combination of telmisartan with the ACE-Inhibitor ramipril after normalizing blood pressure. 33. Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V.

Kurzvorträge

Miesel, A., H. Müller, P. Dominiak, and W. Raasch. 2009. Blood pressure normalizing doses of an AT₁-blocker improve glucose utilisation and reduce weight gain in rats with metabolic syndrome as potent as the combination AT₁-blocker/ACE-inhibitor. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 379 Supp.1 35-35.

Publikationen

Miesel, A., H. Müller, et al. "Overfeeding-Induced Obesity in Spontaneously Hypertensive Rats: An Animal Model of the Human Metabolic Syndrome." *Ann Nutr Metab* 56(2): 127-142.

Miesel, A., H. Müller, et al. "Compared to either blocking AT₁-receptors or the Angiotensin-converting enzyme the double blockade does not superiorly improve weight gain and glucose homeostasis in rats with metabolic syndrom." Submitted.

Preise und Auszeichnungen

Erhalt des Posterpreises 2008 im Rahmen der Veranstaltung Uni im Dialog für das Poster „Supersize me – Der Weg zu einem patientennahen Tiermodell“

Förderung durch das Stipendium „Exzellenzmedizin“ der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck von Oktober 2007 bis März 2009, Gesamtförderungshöhe 10.500 €

10 Danksagung

Ich danke dem ehemaligen Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. med. Peter. Dominiak und dem zurzeit kommissarischen Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. med. Werner Solbach für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie der Universität Lübeck.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch, dessen hervorragende Betreuung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit und zur Erlangung des Stipendiums beigetragen hat. Nicht nur in wissenschaftlichen Belangen stand er mir stets mit wertvollen Ratschlägen und viel Engagement beiseite, sondern auch das eine oder andere gesellschaftliche Thema fand Eingang in unsere anregenden Diskussionen.

Weiterhin danke ich ganz besonders Herrn Dr. rer. hum. biol. Helge Müller-Fielitz, der mich sorgfältig in die experimentellen Methoden eingearbeitet hat, mir viele Tipps für die Datenverarbeitung und das Schreiben der Dissertation gegeben hat und mir über die Jahre ein sehr guter Freund geworden ist.

Ich danke Herrn PD Dr. rer. nat. Olaf Jöhren für die Beratung bei der Durchführung der RT-PCR. Herrn Dr. med. Marc Heidbreder und Frau Cornelia Magnussen danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Western Blots.

Frau Annette Kaiser danke ich für die Einarbeitung in die Labor- und Analysetechniken und für die Unterstützung bei der Durchführung dieser.

Den Mitarbeitern der Klinik für Radiologie des UKSH Campus Lübeck danke ich für die Bereitstellung der MRT und für die Unterstützung bei der Auswertung der MRT-Bilder.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern, Doktoranden und Studenten des Instituts für Pharmakologie für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit, insbesondere Margot Thermann und Stefan Werth.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Dr. med. Volker Schmidt, der mich für die Durchführung dieser aufwendigen, experimentellen Doktorarbeit motivierte.

Mein großer Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben. Meiner Mutter möchte ich für die ausgezeichnete, kulinarische Verköstigung und die emotionale Unterstützung während besonders stressiger Zeiten danken.

11 Lebenslauf

Anja Miesel

Geboren am 19.03.1985

In Bad Oldesloe

Nationalität: Deutsch

Schulbildung

1991 – 1995	Matthias-Claudius-Schule, Grundschule, Reinfeld
1995 – 2004	Theodeor-Mommsen-Schule, Gymnasium, Bad Oldesloe
06/2004	Allgemeine Hochschulreife

Studium

2004 – 2010	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09/2006	I. Ärztliche Prüfung
11/2010	II. Ärztliche Prüfung und Approbation als Ärztin

Dissertation

02/2007	Beginn der experimentellen Arbeiten
10/2007-03/2009	Förderung durch das Stipendium „Exzellenzmedizin“ der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck

Berufliche Tätigkeit

01/2011	Assistenzärztin in der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Lübeck
---------	--