

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

Einfluss der AT1-Blockade auf die Aufnahme von
Cafeteriadiät und auf die diätinduzierte Adipositas
nach chronischem Stress

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

vorgelegt von
Viktorija Gustaityte
aus Klaipeda, Litauen

Lübeck 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Inge Derad
Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.12.2019

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Fettgewebe und Leptinresistenz.....	3
1.2. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HPA-Achse)	4
1.3. Sozioökonomische und therapeutische Aspekte der Adipositas	6
1.4. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	7
1.5. AT1R-Blocker (ARB).....	9
1.6. HPA-Achse und RAAS Interaktion.....	11
1.7. Fragestellung	14
2. Materialien und Methoden.....	15
2.1. Tiere.....	15
2.2. Fütterungsregime.....	15
2.3. Versuchsteil 1	16
2.4. Versuchsteil 2	17
2.5. Immobilisationsstresstest (IMS).....	18
2.6. Applikation von Medikamenten.....	19
2.7. Blutentnahme über die Schwanzvenen	19
2.8. Tötung und Organpräparation	20
2.9. Messung der Glukosekonzentration im Blut	21
2.10. Kalorimetrie.....	21
2.11. Radioimmunoassay	22
2.12. Präparation der Hypothalami	22
2.13. mRNA-Extraktion und -Quantifizierung.....	23
2.14. cDNA-Synthese	23
2.15. Quantitative real-time PCR (qPCR)	23
2.16. Statistische Methoden	25
3. Ergebnisse	27

3.1. Einfluss der CD-Diät auf chronischen Stress.....	27
3.1.1. Gewicht	27
3.1.2. Energieaufnahme.....	27
3.1.3. Hormonantwort.....	28
3.2. Einfluss von TEL auf die diätinduzierte Adipositas	31
3.3. Einfluss von TEL auf die Stressantwort.....	36
3.3.1. Stressreaktion nach kurzzeitiger TEL-Therapie	36
3.3.2. Stressbedingte Energieaufnahme nach TEL-Therapie	37
3.3.3. Energieaufnahme und Stressantwort nach langzeitiger TEL-Therapie	40
3.3.4. HPA-Achse.....	42
4. Diskussion	45
4.1. Einfluss der CD-Diät auf chronischen Stress.....	45
4.2. Einfluss von Stress auf die Energieaufnahme	48
4.3. Allgemeine TEL-Effekte	50
4.4. TEL-Einfluss auf chronischen Stress.....	51
4.5. Stressbedingte Energieaufnahme nach TEL-Therapie.....	53
5. Limitationen	55
6. Zusammenfassung.....	57
7. Literaturverzeichnis	58
8. Anlagen	76
8.1. Abbildungsverzeichnis	76
8.2. Tabellenverzeichnis	76
8.3. Tiere.....	77
8.4. Substanzen und erworbene Lösungen	77
8.5. Rezepturen von Lösungen.....	78
8.6. Erworbene Versuchskits	78
8.6.1. RIA-Kits	78
8.6.2. Kits zur Bestimmung der Gen-Expression	78

8.7. Verbrauchsmaterialien	78
8.8. Geräte	79
8.8.1. Laborgeräte	79
8.8.2. Waagen	80
8.8.3. Zentrifugen	80
8.8.4. Geräte zur indirekten Kalorimetrie	80
8.8.5. Geräte zur Bestimmung der Gen-Expression	80
8.8.6. Geräte für RIA-Versuche	81
8.8.7. Software	81
8.9. Abkürzungsverzeichnis	81
9. Danksagung	85
10. Curriculum Vitae	86
11. Veröffentlichung	87

1. Einleitung

Heutzutage wird Übergewicht als eine weltweite Epidemie bewertet. Nach Schätzungen der WHO sind weltweit ca. 39% der Erwachsenen übergewichtig (World Health Organisation, 2016). In Deutschland haben aktuell 43% der Männer und 29% der Frauen ein erhöhtes Körpergewicht (Body-Mass-Index (BMI) ≥ 25 kg/m²), ca. 18% der Erwachsenen sind adipös (BMI ≥ 30 kg/m²) (Schienkiewitz et al., 2017). Laut statistischer Prognosen wird die Anzahl der adipösen Erwachsenen in den nächsten Jahren weiter steigen (Westphal and Doblhammer, 2014). Kinder und Jugendliche sind ebenfalls von einer übermäßigen Gewichtszunahme betroffen. Aktuell sind 15% der deutschen Minderjährigen übergewichtig, 6% sind adipös (Schienkiewitz et al., 2018).

Adipositas ist ein Krankheitsbild mit einer multifaktoriellen Genese. In Adoptionsstudien korreliert der BMI von Adoptivkindern stärker mit dem Gewicht der leiblichen Eltern als mit dem BMI der Adoptiveltern (Stunkard et al., 1986; Silventoinen et al., 2009). Dies spricht für eine genetische Prädisposition. An einem Tiermodell konnte im Jahr 1994 ein ob-Gen für Leptinresistenz identifiziert werden. Mäuse, die nicht über das ob-Gen verfügen, sind hyperphag und adipös, was nach einer Leptingabe reversibel ist (Zhang et al., 1994). Inzwischen sind zahlreiche weitere Gene bekannt, die, mono- oder polygen vererbt, das Körpergewicht beeinflussen (Rankinen et al., 2006). Zu den neusten Erkenntnissen zählen neben dem Leptindefekt beispielsweise auch die Mutationen des Leptinrezeptors (LEPR) sowie des Melanocortin-4-Rezeptors (MC4R), welche in den klinischen Studien bereits im Kleinkindesalter zu einer Adipositas führten (Kleinendorst et al., 2019, Kohlsdorf et al., 2018). Entscheidend in der Adipositasentstehung ist jedoch das Zusammenspiel zwischen den erblichen Faktoren und den Umwelteinflüssen (Qi and Cho, 2008). Es ist etabliert, dass ein Überschuss an energiereichen Lebensmitteln in Verbindung mit einem bewegungsarmen Lebensstil zu einem Missverhältnis von Energieaufnahme und -verbrauch führt. Auf lange Sicht führt diese positive Energiebilanz zu Übergewicht (Qi and Cho, 2008; Lehrke and Laessle, 2009, p. 13).

Fettleibigkeit ist ein wichtiger, unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse (Hubert et al., 1983). Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer ko-

ronaren Herzkrankheit ist bei Übergewicht um 18% und bei Adipositas um 49% erhöht (Bogers et al., 2007). Es ist ein funktioneller beziehungsweise kausaler Zusammenhang zwischen dem BMI und der arteriellen Hypertonie bekannt (Brown et al., 2000). Die Erhöhung des BMI um einen Punkt steigert das totale Schlaganfallrisiko bei Männern um 6% (Kurth et al., 2002). Neben den aufgeführten kardiovaskulären Erkrankungen ist Adipositas an der Pathogenese von Schlafapnoe, Arthritis, Pankreatitis, Gallenblasen- und Tumorerkrankungen sowie Depressionen beteiligt (Pi-Sunyer, 2009). Weiterhin erhöht übermäßiges Körpergewicht die Wahrscheinlichkeit an Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) zu erkranken, wobei der abdominalen Adipositas eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (Sung et al., 2012). Im Gegensatz dazu führt eine Gewichtsabnahme zur Risikoreduktion für T2DM (Wannamethee, 2005). Im Vergleich zum Normalgewicht steigt das Mortalitätsrisiko bei Adipositas um 18% an (Flegal et al., 2013; Pischon et al., 2008). Adipositas tritt gehäuft gleichzeitig mit bestimmten metabolischen Fehlsteuerungen auf. Ein Cluster aus Adipositas, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Hypertonus, Glukoseintoleranz und veränderten Blutfettwerten hat Reaven im Jahr 1988 als "Syndrom X" (Reaven, 1988) und die WHO im Jahr 1998 als Metabolisches Syndrom (MetS) beschrieben (Alberti und Zimmet, 1998). Das MetS ist eine Gruppe von Risikofaktoren, deren gemeinsames Auftreten die Wahrscheinlichkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen und den T2DM beschreibt (Cho, 2011). Die viszerale Fettzunahme wird zunehmend als zentrales Element in der MetS-Charakterisierung betrachtet (Kassi et al., 2011). Die Internationale Diabetes Federation (IDF) hat im Jahr 2005 die viszerale Adipositas als ein obligates Kriterium für die Diagnose vorgeschlagen (Alberti et al., 2005). Aktuell wird MetS diagnostiziert, wenn drei oder mehr der folgenden Parameter vorhanden sind: Adipositas als erhöhter Taillenumfang (entsprechend der länderspezifischen Definitionen), erhöhte Triglyceride (≥ 150 mg/dl), erniedrigtes HDL (Männer: <40 mg/dl, Frauen: <50 mg/dl), erhöhter arterieller Blutdruck ($\geq 130/85$ mmHg) und erhöhter Nüchternblutzucker (≥ 100 mg/dl) (Alberti et al., 2009).

1.1. Fettgewebe und Leptinresistenz

In der Literatur wird dem Fettgewebe eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Adipositas und der metabolischen Dysfunktion zugewiesen (Kim und Moustaid-Moussa, 2000; Bays et al., 2008). Das Fettgewebe ist ein aktives Organ, welches als ein Netzwerk aus endokrinen, parakrinen und autokrinen Signalwegen funktioniert. Zusätzlich als Speicherort der Triglyzeride wirkend, produzieren Adipozyten eine Reihe biologisch aktiver Moleküle, sogenannte Adipokine, die eine vielfältige Funktion in der Energiehomöostase besitzen (Kim and Moustaid-Moussa, 2000; Mohamed-Ali et al., 1998). Ein anhaltender Kalorienüberschuss resultiert in einer Adipozytenhyperthrophie und -dysfunktion, was Bays als "adiposopathy" beschreibt (Bays et al., 2008). Die Konzentration des protektiven Hormons Adiponektin ist im adipösen Fettgewebe vermindert (Arita et al., 1999). Proinflammatorische Adipokine wie Resistin, Vaspin oder Visfatin werden vermehrt ausgeschüttet (Antuna-Puente et al., 2008). Die Anzahl der Makrophagen ist erhöht und korreliert positiv mit der Adipozytengröße und dem BMI (Bastard et al., 2006; Weisberg et al., 2003). Im Fettbewebe der ernährungsbedingt adipösen Ratten findet ein Shift von protektiv wirkenden Makrophagen zu den "alternativen", proinflammatorischen Makrophagen statt. Eine gleichzeitig erhöhte Konzentration der entzündungsfördernden Cytokine wie TNF- α oder IL-6 bei den adipösen Individuen weist auf Makrophagen als eine potentielle Produktionsquelle hin (Lumeng et al., 2007; Ritchie und Connell, 2007). Die Freisetzung von Adipokinen durch Adipozyten und Makrophagen ist mit einer Entzündung im Fettgewebe und im Weiteren mit einer Insulinresistenz assoziiert. Dies kann zum adipositasinduzierten T2DM führen (Antuna-Puente et al., 2008).

Leptinresistenz

Leptin zählt zu den pro-inflammatorischen Adipokinen und wird hauptsächlich im weißen Fettgewebe produziert (Ahima und Flier, 2000; Mantzoros and Moschos, 1998). Zirkulierendes Leptin kann bei gesunden Individuen mit einem normalen Körpergewicht die Bluthirnschranke passieren und sich an die hypothalamischen Rezeptoren des Gehirns binden. Es wirkt als Sättigungssignal indem es die Produktion der appetithemmenden (anorexigenen) Hormone fördert und die Ausschüttung der appetitfördernden (orexigenen) Peptide hemmt (Banks et al., 1996;

Jéquier, 2002). Über einen adrenergen Mechanismus aktiviert eine intravenöse Leptingabe die Thermogenese im braunen Fettgewebe (Haynes et al., 1997). Bei übergewichtigen Individuen scheinen die beschriebenen Effekte des Leptins nicht zu funktionieren. Es besteht eine positive Korrelation zwischen dem Körpergewicht und der Leptinkonzentration im Plasma. So entwickelten Mäuse, die mit einer hochkalorischen Diät gefüttert wurden, trotz eines hohen Leptinspiegels eine Hyperphagie und eine Adipositas (Considine et al., 1996; El-Haschimi et al., 2000; Valle et al., 2003; Van Heek et al., 1997). Das Ausbleiben einer Hypophagie nach einer Leptinsekretion oder -applikation wird als Leptinresistenz bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen Sammelbegriff, der mehrere pathologische Veränderungen umfasst (Myers et al. 2010; Pan et al. 2014). Diskutierte Erklärungen für das Auftreten von Leptinresistenz sind ein verminderter Transport in das Gehirn, eine Herunterregulation der Leptinrezeptoren und eine Abschwächung der Signalkaskade, die durch Leptin ausgelöst wird (Myers et al., 2008; Sainz et al. 2015). Die Entstehung der Leptinresistenz ist jedoch bisher nicht abschließend geklärt.

1.2. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HPA-Achse)

Die komplexe Beziehung zwischen dem Essverhalten, dem metabolischen Status und den emotionalen Faktoren stellt den stressabhängigen Mechanismus als einen weiteren Mitspieler in der Adipositaspathophysiologie dar (Block et al., 2009; Ekman, 1992; Harding et al., 2014; Lehrke and Laessle, 2009, p. 23; Macht, 2008).

Die Glukortikoidsekretion in der Nebennierenrinde ist eine endokrine Reaktion auf Stress, welche durch das hypothalamische Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) nach Freisetzung von Adrenocorticotropin (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen hervorgerufen wird (Kyrou et al., 2006; Pasquali, 2012). Der Hauptvertreter der Glukokortikoide beim Menschen ist das Cortisol, bei Nagern das Corticosteron (Sun et al., 2013).

Der Glukokortikoideffekt auf die Nahrungsaufnahme wird kontrovers diskutiert. Einerseits zeigen Daten, dass mindestens 30% der Männer und Frauen weniger essen, wenn sie gestresst sind (Stone und Brownell, 1994; Epel et al., 2004). Andererseits konnten tierexperimentelle Studien eine appetitanregende Wirkung der

Glukokortikoide zeigen. Versuchstiere, die nach einer Adrenalektomie (ADX) saccharosereiche Getränke zur Auswahl bekommen, trinken weniger Saccharose als die scheinoperierten Kontrollen (Bell et al., 2000). Der Saccharosekonsum nach der ADX steigt proportional zur Corticosteronkonzentration, was nach einer peripheren nicht aber nach einer intrazerebralen Corticosterongabe beobachtet wurde (Bell et al., 2000; Bhatnagar et al., 2000; Laugero et al., 2002). Nach chronischer Stresshormongabe kam es neben einem appetitsteigernden Effekt teilweise auch zu einer erhöhten Laufradaktivität (Leshner, 1971) oder einer erhöhten Kokain-selbstapplikation (Goeders, 1997) bei den ADX-Ratten. Diese Beobachtung weist auf einen allgemeinen antriebssteigernden Effekt der Glukokortikoide hin.

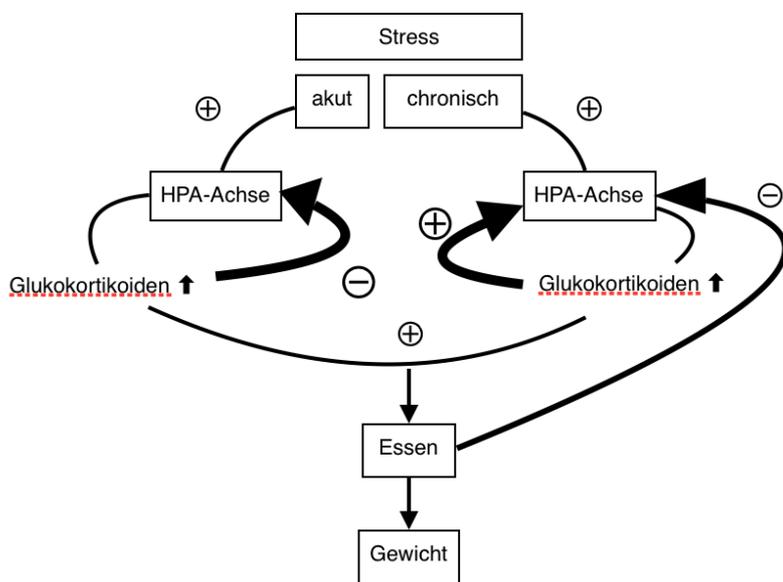


Abb. 1: Stressmodell nach Dallmann und Pecoraro.

Basierend auf der tierexperimentellen Forschung hat die Arbeitsgruppe Dallman ein erweitertes Stressmodell vorgestellt (Abb.1). Nach dieser Hypothese unterscheidet man zwischen einer akuten und einer chronischen Stressantwort. Während einer akuten Stressreaktion sorgen Glukokortikoide für eine erhöhte Kalorienaufnahme. Zusätzlich stimulieren sie die Glukoneogenese in der Leber, die Lipolyse und die Proteolyse und sind damit für die Bereitstellung der Energieträger während der physiologischen Flucht- oder Kampfreaktion verantwortlich. Nach einem initialen Glukokortikoidanstieg in einer akuten Stresssituation hemmen diese eine weitere HPA-Achsenstimulation. Ein chronischer Glukokortikoidanstieg

wirkt hingegen im Gehirn rein exzitatorisch und ist mit einer Appetit- sowie Antriebssteigerung vergesellschaftet. Die Individuen nehmen jedoch unter chronischer Stressexposition ab, was teilweise mit einer anorexigenen CRH-Eigenschaft erklärt werden kann. Pecoraro aus der Arbeitsgruppe Dallman konnte zeigen, dass es nach einem chronischen Stress in Anwesenheit von Schmalz- und zuckerhaltiger Nahrung zu einer erhöhten Futteraufnahme und Gewichtszunahme kommt, während die Corticosteron- und ACTH-Konzentrationen sinken. Diese Veränderungen wirken dem stressinduzierten Gewichtsverlust entgegen und können die Adipositasentstehung begünstigen (Keller-Wood und Dallman, 1984; Dallman et al., 2003 und 2004; Di et al., 2003; Kyrou et al., 2006; Mizoguchi et al., 2003; Pecoraro et al., 2004; Sapolsky et al., 2000). Im Widerspruch zur Theorie der Arbeitsgruppe Dallman stehen Literaturerkenntnisse über eine reduzierte Futteraufnahme nach chronischem Stress trotz eines vielfältigen Angebots an hochkalorischer Nahrung (hoher Fettgehalt, hoher Kohlenhydratanteil, eine Kekse-/Schokoriegelauswahl). Diese Kenntnisse verkomplizieren die Beziehung zwischen Stress und Fressverhalten (Zeeni et al., 2013).

1.3. Sozioökonomische und therapeutische Aspekte der Adipositas

Die Therapiekosten für Adipositas betragen in Deutschland jährlich ca. 86 Millionen Euro. Eine Lebensstiländerung oder eine bariatrische Chirurgie erweisen sich häufig als nicht ausreichend effektive Behandlungsmethoden zur Gewichtsreduktion. Die medikamentöse Behandlung (Orlistat, Liraglutid, Lorcaserin, Phentermin/Topiramate, Naltrexone/Bupropion) führt ebenfalls nur zu einem Gewichtsverlust von maximal 5-10%. In mehreren Fällen steigt das Gewicht nach der Behandlung erneut an, was als "Jo-Jo-Effekt" bezeichnet wird. Hinzu kommen adipositasassoziierte Erkrankungen die das deutsche Gesundheitssystem mit mehr als 10 Milliarden Euro pro Jahr belasten (Mehta et al., 2017; Knoll and Hauner, 2008; Pilitsi et. al., 2018; Stöckli and Keller, 2003). Eine Untersuchung von Erwachsenen in den USA hat gezeigt, dass etwa 20% der Übergewichtigen und etwa 60% der Adipösen vollständig die Kriterien des MetS erfüllen (Park et al., 2003). Daraus

ergibt sich die Notwendigkeit der Suche nach einem Behandlungsverfahren, das alle metabolischen Fehlsteuerungen umfasst.

1.4. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Es ist bekannt, dass Adipositas mit einer RAAS-Aktivierung einhergeht (Boustany, 2004). Engeli konnte im Jahr 2005 in einer Studie zeigen, dass ein Gewichtsverlust eine positive Auswirkung auf die Blutdrucksenkung bei adipösen Frauen hat. Zusätzlich war die RAAS-Aktivität nach einem Gewichtsverlust von 5% deutlich reduziert (Engeli et al., 2005). In diesem Zusammenhang wird in den folgenden Abschnitten RAAS und dessen Hemmung mit AT1-Rezeptorblockern (ARB) als möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung von Adipositas und MetS vorgestellt.

RAAS ist eine Enzymkaskade deren Spaltprodukte physiologische Wirkungen in der Blutdruckregulation und der Flüssigkeitshomöostase zeigen (Lavoie and Sigmund, 2003). Angiotensinogen (AGT) ist das erste Substrat in dieser Kaskade. Renin aus der Niere spaltet AGT in Angiotensin I (Ang I). Mit Hilfe des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE), welches im Gefäßendothel der Lunge vorkommt, wird Ang I weiter in Angiotensin II (Ang II) umgewandelt.

Ang II ist das Hauptpeptid des RAAS. Zu seinen vielfältigen Funktionen zählen klassischerweise Vasokonstriktion, Aldosteron- und Vasopressinsekretion, Salzreabsorption und die Aktivierung des sympathischen Nervensystems (de Gasparo et al., 2000; Lavoie und Sigmund, 2003). Die Konzentration des Ang II und der anderen RAAS-Komponenten im Blut adipöser Frauen war höher als bei den schlanken Kontrollen (Harte et al., 2005). Im Gegensatz dazu führte die Ang II-Infusion über mehrere Tage in mehreren Studien zur Gewichtsreduktion (Brink et al., 1996; Cassis et al., 2002; Kalupahana und Moustaid-Moussa, 2012). Die Arbeitsgruppe Raasch konnte an adipösen Ratten ebenfalls den gewichtreduzierenden Effekt des Ang II zeigen (Müller-Fielitz et al., 2012b; Müller-Fielitz und Raasch, 2013; Winkler et al., 2018).

Ang II entfaltet seine Funktion über zwei Rezeptoren (AT1R und AT2R) (Miyazaki et al., 1996). Die meisten Ang II-Wirkungen werden dem AT1R zugeschrieben (de Gasparo et al., 2000; Miyazaki et al., 1996). Während Menschen nur über ein

AT1-Gen verfügen, besitzen Nager zwei Gene, die für die Kodierung der AT1R-Subtypen AT1A und AT1B zuständig sind (Bergsma et al., 1992, Elton et al., 1992; Sasamura et al., 1992; Yoshida et al., 1992). In der Aminosäuresequenz sind AT1A und AT1B zu 95% identisch und eine pharmakologische Differenzierung zwischen den beiden Subtypen ist nicht möglich (Chiu et al., 1993).

Neben dem systemischen RAAS existiert im Fettgewebe ein lokales RAAS mit all seinen Einzelkomponenten (Boustany, 2004). Ang II reguliert das Wachstum und die Differenzierung von Adipozyten im Fettgewebe (Janke et al., 2002; Saint-Marc et al., 2001). Kalupahana behauptet, dass systemisches und lokales Ang II einen unterschiedlichen Effekt haben könnten (Kalupahana and Moustaid-Moussa, 2012). Einige Studien konnten eine lipolysehemmende und triglycerid- sowie fettsäureproduktionsteigernde Wirkung des Ang II auf das Fettgewebe nachweisen (Goossens et al., 2007; Jones et al., 1997). Mäuse, die genetisch bedingt nicht über das Ang II-Vorläuferprotein AGT im Fettgewebe verfügen oder einen Ang II-Rezeptordefekt haben, zeigen neben Hypotension und einem gesteigerten Energieverbrauch eine verstärkte lokomotorische sowie sympathische Aktivität und bleiben schlank. Daher lässt sich ein adipogener Ang II-Effekt auf die Fettgewebsmasse vermuten (Kouyama et al., 2005; Massiera et al., 2001).

Lange Zeit galt Ang II als einziges biologisch aktives Endprodukt des RAAS. Inzwischen sind weitere Moleküle (Ang1-7, Ang1-9, Ang IV, AngA etc.) bekannt, die aus Ang II und seinen Vorstufen gespaltet werden (Ribeiro-Oliveira et al., 2008; Kalupahana and Moustaid-Moussa, 2012). So spricht man heute fast nicht mehr von einer RAAS-Kaskade unter dominanter Beteiligung der ACE/Ang II/AT1R-Achse, sondern von einem Netzwerk aus ganz unterschiedlichen Angiotensinen (Huber, Schuster und Raasch, 2017). Hierbei steht Ang1-7 aktuell im Mittelpunkt der RAAS-Forschung. Am Mas-Rezeptor gebunden zeigt das Heptapeptid Ang1-7 verschiedene Auswirkungen auf das kardiovaskuläre und renale System. Hier ist die ACE2/Ang1-7/Mas-Achse antagonistisch bezüglich der ACE/Ang II/AT1R-Achse zu verstehen. Neben kardiovaskulären Effekten sind in der Zwischenzeit auch metabolische Effekte sowie eine Auswirkung auf den Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus beschrieben (Santos, 2017; Santos und Andrade, 2014). Darauf basierend wurde von der Arbeitsgruppe Raasch und anderen wiederholt die gewichtsregulierende Eigenschaft des Ang1-7 diskutiert:

- Ein genetischer Defekt des Mas-Rezeptors erhöht die viszerale Fettmasse um 50% (Santos et al., 2008).
- Die Ratten mit einer genetisch bedingten Ang1-7-Überexpression bleiben trotz hochkalorischer Nahrung schlank (Blanke et al., 2015; Schuchard et al., 2015).
- Die periphere Applikation von Ang1-7 führt zur Gewichtsabnahme und einer Reduktion der Fettgewebssmasse (Andrade et al., 2014; Oliveira Andrade et al., 2014). Intrazerebroventrikuläre Ang1-7-Gabe hingegen reduzierte die Gewichtszunahme und die Energiezufuhr nur in geringem Maße und lediglich nach hoher, nicht aber nach kleiner Dosis (Winkler et al. 2018).

1.5. AT1R-Blocker (ARB)

Die Arbeitsgruppe Raasch konnte wiederholt zeigen, dass eine ARB-Therapie trotz eines gleichzeitigen Angebots einer hochkalorischen Diät, zusammengesetzt aus verschiedenen Schokoriegeln und Keksen (Cafeteria Diät=CD), zur Verbesserung der Insulinsensitivität sowie des Lipidstoffwechsels führt und unabhängig von der antihypertensiven Wirkung eine Gewichtsreduktion induziert. Der antiadipöse Effekt ist dosisabhängig und wird ausschließlich bei einer hohen Dosis des ARBs beobachtet (Miesel et al., 2012; Müller-Fielitz et al., 2011, 2012a, 2014, 2015; Raasch et al., 2006). Ein Gewichtsverlust unter ARB wurde auch in klinischen Studien beschrieben (Kintscher et al., 2007). Telmisartan (TEL) ist der ARB mit der höchsten Rezeptoraffinität, Halbwertszeit und Lipophilie (Burnier and Maillard, 2001; Kakuta et al., 2005; Michel et al., 2013). Unter TEL ist die diätinduzierte Gewichtszunahme geringer als unter dem ACE-Hemmer Ramipril als auch unter Ramipril und TEL kombiniert, was gegen einen generellen Effekt der RAAS-Hemmung spricht (Miesel et al., 2012). Warum es zu einem Gewichtsverlust unter ARB kommt, ist bis heute nicht vollständig erforscht. Folgend werden einige Hypothesen geschildert:

- Tierexperimentelle Studien deuten auf eine veränderte Nahrungspräferenz unter ARB hin. Wenn die Ratten zwischen Standarddiät (Chow) und CD frei wählen durften, bevorzugten sie CD und wogen am Ende der Studie mehr als die Chow-Kontrollen. Während einer gleichzeitigen TEL-Behandlung

kam es zu einem Gewichtsverlust, welcher mit einem reduzierten CD-Verbrauch einherging, der Chow-Konsum stieg hingegen an (Miesel et al., 2012; Müller-Fielitz et al., 2015). Im Gegensatz dazu führte ARB in einigen Studien mit ausschließlich Chow-Diät nicht zu einer Gewichtsreduktion (Li et al., 2006; Smith et al., 2014)

- TEL führt zur Reduktion der orexigenen Hormone im Hypothalamus (Müller - Fielitz et al., 2015).
- Ein leptinabhängiger Mechanismus könnte ebenfalls einen Einfluss auf den Gewichtsverlust haben. Diese Hypothese entstammt den folgenden Ergebnissen der Arbeitsgruppe Raasch: 1) Das Gewicht der adipösen Zucker-ratten mit einem Defekt des Leptinrezeptors blieb nach ARB unverändert (Müller-Fielitz et al., 2011); 2) Die Leptinsensitivität blieb bei Ratten trotz CD-Diät unter gleichzeitiger TEL-Behandlung erhalten (Müller-Fielitz et al., 2014, 2015); 3) Der Leptintransport durch die Bluthirnschranke war bei den Mäusen mit einer diätinduzierten Adipositas gestört. Wurden hingegen die adipösen Mäuse gleichzeitig mit ARB behandelt, blieb der Leptintransport durch die Bluthirnschranke erhalten (Schuster et al., 2018).
- Die TEL-Therapie ist mit einem höheren Energieverbrauch assoziiert, während die lokomotorische Aktivität unverändert bleibt (Sugimoto et al., 2006). Unter TEL, nicht aber unter Amlodipin oder unter TEL mit Amlodipin kombiniert ist der RER (Respiratorischer Quotient) bei einer persistierenden Hyperphagie erniedrigt. Dies spricht für eine erhöhte Fettoxidation (Müller-Fielitz et al., 2014).
- TEL reduziert die viszerale und subkutane Fettmasse. Die Adipozytengröße, nicht aber deren Anzahl ist nach ARB verändert (Chujo et al., 2007; Fujita et al., 2007; Miesel et al., 2012; Müller-Fielitz et al., 2012a; Sugimoto et al., 2006; Zorad et al., 2006). Sharma geht von einer normalisierten Adipokinsekretion aus, die zur verbesserten Insulinsensitivität und Gewichtsabnahme führen kann (Sharma et al., 2002): Adiponektin-mRNA steigt, proinflammatorisch wirkende TNF α und IL-6 werden nach ARB in geringerem Umfang produziert (Takagi et al., 2013; Yamada et al., 2008). Möglicherweise spielen hier die Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren- γ (PPAR γ) eine Rolle, weil ARB die Differenzierung der Adipozyten über einen PPAR γ -Weg beeinflussen (Janke et al., 2006). Gegen einen Zusam-

menhang zwischen den Veränderungen im Fettgewebe unter TEL und dem PPAR γ -Mechanismus sprechen Studien, welche eine ausbleibende Wirkung der TEL-Therapie auf die Expression des PPAR γ -Gens im viszeralen Fettgewebe zeigten (Müller-Fielitz et al., 2012a; Schuster et al. 2018). Zudem spricht gegen einen solchen PPAR γ -stimulierenden Effekt, dass PPAR γ -Aktivatoren wie z.B. Gliflozine typischerweise zu einem Anstieg des Körpergewichts, der Futterraufnahme, der Fettmenge, sowie der Adipozytengröße führen (de Souza et al., 2001; Larsen et al. 2003).

- Ein AT1R-unabhängiger Mechanismus wird ebenfalls diskutiert. Die Mäuse, welche genetisch bedingt nicht über einen AT1R verfügen, blieben nach ARB schlank (Rong et al., 2000). In diesem Zusammenhang kann Ang1-7 eine Rolle spielen, weil eine Ang1-7 Überexpression ohne eine diät-induzierte Adipositas einherging. Zudem konnte der Gewichtsverlust in einem Rattenversuch nach ARB teilweise durch den Mas-Antagonist A779 aufgehoben werden (Schuchard et al., 2015). Überraschenderweise war jedoch der antiadipöse ARB-Effekt bei Mäusen mit einem Defekt des Mas-Rezeptors verstärkt (Dapper et al., 2019).

1.6. HPA-Achse und RAAS Interaktion

RAAS steht in enger Verbindung mit der HPA-Achse. Die ATR sind in allen Organen der HPA-Achse zu finden, wobei gewebespezifische Unterschiede in der Expression bekannt sind (de Gasparo et al., 2000). Die AT1R-Expression wird im PVN des Hypothalamus, in der Hypophyse, im Nebennierenmark und in der -rinde nach Stress hochreguliert (Aguilera et al., 1995; Armando et al., 2007, Bali und Jaggi, 2013, Leong et al., 2002; Saavedra und Benicky, 2007). Abhängig von Stressdauer und -art steigt der Spiegel des zirkulierenden Ang II bis auf das Neunfache im Vergleich zu den Kontrollen an, indem die Reninausschüttung über eine sympathische Aktivierung gefördert wird (Yang et al., 1993, 1996; Pavel et al., 2008). Eine hohe Ang II-Konzentration nach einer Ang II-Infusion oder Stress geht einher mit der Freisetzung des CRH, des ACTH und der Glukokortikoide (Rivier und Vale, 1983; Saavedra und Benicky, 2007; Sumitomo et al., 1991).

Die Interaktion zwischen RAAS und der HPA-Achse ist sowohl in den tierexperimentellen als auch in den klinischen Studien mit metabolischen Veränderungen assoziiert:

- Ang II führte über einen HPA-Achse-abhängigen Mechanismus zu einer gestörten Glukosekontrolle, welche nach ARB verbessert wurde (Miesel et al., 2012, Müller-Fielitz und Raasch, 2013, Müller et al., 2007, Pavlatou et al., 2008).
- Nach chronischer Ang II-Behandlung wurde ein Gewichtsverlust mit gleichzeitig erhöhten Corticosteronspiegeln und einer gesteigerten Stressantwort beobachtet (Muller-Fielitz et al., 2012b, Muller-Fielitz and Raasch, 2013, Ortiz et al., 2010). Die Ang II induzierten Veränderungen wurden durch die Losartantherapie verhindert, was auf einen AT1-abhängigen Mechanismus der Gewichtskontrolle und der Stressantwort hindeutet (Ortiz et al., 2010).
- Eine ARB-Therapie hat wiederholt eine hemmende Wirkung auf die HPA-Achse gezeigt (Saavedra et al., 2005; Raasch et al., 2006; Armando et al., 2007; Miesel et al., 2012). Dieser Effekt ist unabhängig von der Blutdruckreduktion, da sowohl Candesartan als auch Ramipril nicht aber der Calciumkanalblocker Mibefradil neben der Blutdrucksenkung eine Stresshormonreduktion nach einer CRH-Infusion gezeigt haben (Raasch et al., 2006).

Müller aus der Arbeitsgruppe Raasch führte während einer der Studien einen forcierten Schwimmtest durch (Abb. 2, Müller-Fielitz et al., 2012a). Hierfür wurden die Ratten initial sechs Wochen lang mit CD oder Chow gefüttert. Die CD-Ratten erhielten zusätzlich eine Therapie mit TEL (8mg/kg/Tag), einem anderen ARB Candesartan (CAND, 10 mg/kg/Tag) oder mit einem Placebo (Vehikel=VEH). Nach der sechswöchigen Behandlung wurden die Ratten für sieben Minuten in ein Wasserbad (Durchmesser 35 cm, Wassertiefe 20 cm, Wassertemperatur 15°) platziert. Die Blutentnahmen vor dem Schwimmtest, sowie 0, 30 und 90 Minuten danach, dienten zur Bestimmung der Stresshormone. Das Experiment zeigte, dass Stress zu einer erhöhten Aufnahme von Chow und CD in der VEH-Gruppe führte. Eine CAND-Therapie hatte keinen größeren Effekt auf die Futteraufnahme nach dem Stress. Eine TEL-Behandlung führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der verzehrten CD-Menge. Gleichzeitig war die Stressantwort nach ARB im Vergleich zu den VEH-Gruppen reduziert. Die Ergebnisse von Müller sind

nicht publiziert, sie stimmen jedoch mit einer anderen Studie der Arbeitsgruppe überein, welche eine Hemmung der HPA-Achse nach einem forcierten Stresstest unter ARB zeigte (Miesel et al. 2012).

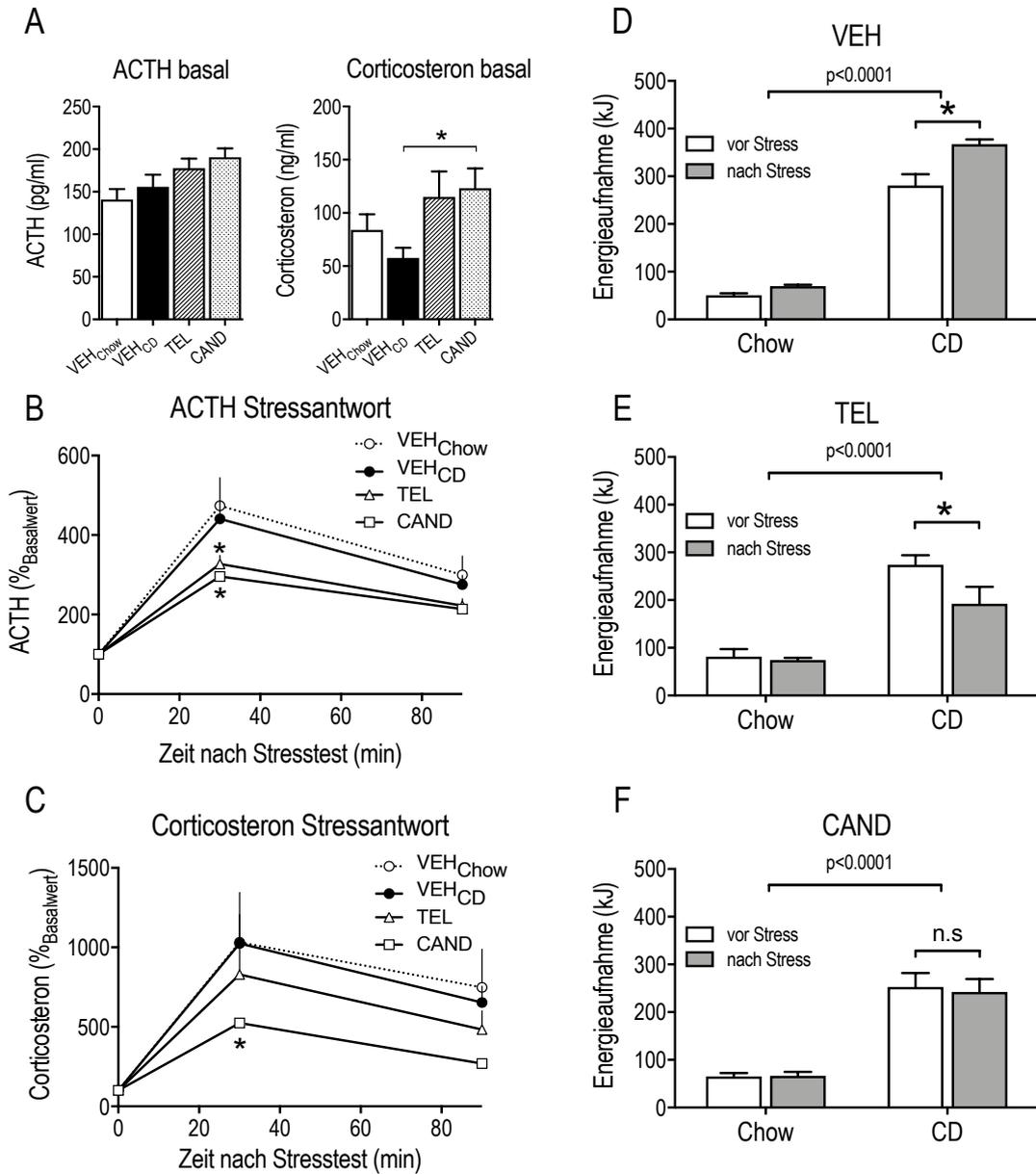


Abb. 2: A) Basale ACTH- und Corticosteronspiegel, Mittelwert \pm SEM, $n=12-14$, $* < 0.05$ VEH_{CD} vs. CAND; B und C) ACTH und Corticosteron-Antwort 0, 30, 60 und 90 Minuten nach Stresstest; D) Gesamte Energieaufnahme vor und nach dem Stresstest in Chow- und CD-Gruppen nach VEH-Therapie; E) Energieaufnahme von Chow und CD in TEL-Gruppe vor und nach Stresstest; F) Energieaufnahme von Chow und CD in CAND-Gruppe vor und nach Stresstest. Mittelwert \pm SEM, $n=12-14$, $* < 0.05$ vs. VEH_{Chow} vor Stress.

1.7. Fragestellung

Zusammenfassend gibt es Hinweise, dass Stress durch eine gesteigerte Aufnahme hochkalorischer Nahrung kompensiert wird. Zusätzlich wird in der Literatur ein gewichts- und HPA-Achse-modulierender Effekt der hochkalorischen Nahrung diskutiert. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe Raasch zeigen, dass eine Blockade der AT1-Rezeptoren zur Hemmung der HPA-Achse nach einem akuten Stresstest führen kann. Daher stellte sich die Frage, ob ARB eine Reduktion des chronischen Stresses und der kompensatorischen Nahrungsaufnahme bewirken kann (Abb. 3). Die Heterogenität der bisher vorhandenen Studienmodelle schränkt die Möglichkeit der Ergebnisinterpretation ein. Die Zielsetzung der folgenden Dissertation ist somit die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen ARB und chronischem Stress in einem Studienmodell. Insbesondere sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Führt chronischer Stress zu einer veränderten CD-Präferenz?
- Wird die HPA-Achse durch das CD-Futter während des chronischen Stresses moduliert?
- Kann ARB den chronischen Stress reduzieren, wenn die Tiere gleichzeitig mit CD behandelt werden?
- Werden Körpergewicht, Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch durch Telmisartan beeinflusst?
- Bestehen Abhängigkeiten zwischen Behandlungsdauer mit Telmisartan, Nahrungsaufnahme und wiederholtem Stress?

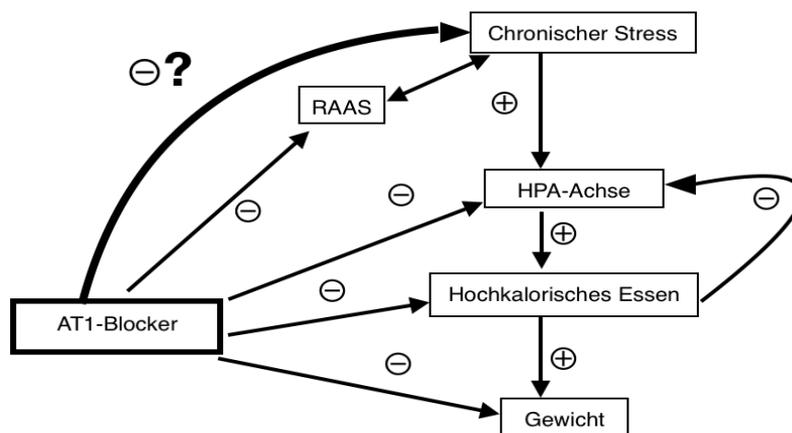


Abb. 3: Interaktion zwischen chronischem Stress, HPA-Achse, RAAS, AT1-Blocker, hochkalorischem Essen und Gewicht.

2. Materialien und Methoden

2.1. Tiere

Die durchgeführten Tierexperimente entsprachen den NIH-Richtlinien für den Umgang mit Labortieren und deren Verwendung. Die Genehmigung erfolgte zuvor durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (Tierversuchsantrag Nr. 9/2g/11, genehmigt am 02/12/2011). Für die Versuche wurden ausschließlich männliche normotensive Sprague Dawley-Ratten (SD) vom Züchter Janvier aus Frankreich verwendet. Dieser Entscheid basierte auf den Literaturangaben, dass weibliche Geschlechtshormone RAAS beeinflussen können (Fischer et al., 2002). Das Bestellgewicht von 200g wurde vorher festgelegt. Die Lieferung erfolgte mindestens zwei Wochen vor dem Versuchsbeginn. Die Tiere wurden zu zweit in den Käfigen der Größe IV gehalten (Länge: 59 cm, Breite: 26 cm, Höhe: 18 cm). Der Aufenthaltsraum der Ratten hatte eine konstante Temperatur von 20°C, eine Luftfeuchtigkeit von 50% und einen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Dunkelphase begann um 14 Uhr, die Lichtphase um 2 Uhr.

2.2. Fütterungsregime

Während der Studie hatten die Versuchstiere einen freien Zugang zu Leitungswasser und Futter. Die Futteraufnahme wurde je nach Versuchsteil täglich oder wöchentlich bestimmt. Alle Tiere erhielten Maintenance 1324® (Firma Altromin, 11.7 kJ/g) als Standarddiät (Chow). Manchen Versuchsgruppen wurde zusätzlich eine hochkalorische Diät (Cafeteriadiät (CD), 20.8 kJ/g) angeboten, welche durch Miesel aus der Arbeitsgruppe Raasch 2010 unter deren eigenen Laborbedingungen etabliert wurde (Miesel et al., 2010). CD setzte sich aus sechs Schokoriegelsorten und Keksen zusammen. Die Sorten wurden täglich ausgetauscht. Am Anfang der Studie wurde die initiale Gier auf die hochkalorische Nahrung reduziert. Dazu wurde den CD-Gruppen für kurze Zeit (3-5 Tage) neben der Chow-Diät das gesamte Riegelsortiment angeboten.

2.3. Versuchsteil 1

Im ersten Studienteil wurde der Einfluss eines chronischen Stresses auf die Fut-
 teraufnahme untersucht. Hierzu wurde ein Immobilisationsstresstest (IMS) an fünf
 aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Insgesamt wurden vier Tiergruppen
 gebildet (Gruppengröße n=10, Abb.4). Die Randomisierung erfolgte anhand des
 vergleichbaren Körpergewichts ($349 \pm 3g$) zwei Tage vor Versuchsbeginn (Tag -2).
 An den Tagen 5-7 wurden die Ratten an das CD-Futter gewöhnt. Nach einem Tag
 CD-Pause folgte für die weiteren fünf Tage der IMS. Nach der vierstündigen Im-
 mobilisation hatten die gestressten Tiere einen freien Zugang entweder zur Chow-
 Diät oder durften zwischen Chow- und CD-Diät wählen. Zur Kontrolle dienten die
 nicht gestressten Ratten mit einem der beiden Fütterungsregime. Nach der been-
 deten Stressphase wurde eine Messung der Futtermittelaufnahme über weitere drei
 Tage durchgeführt.

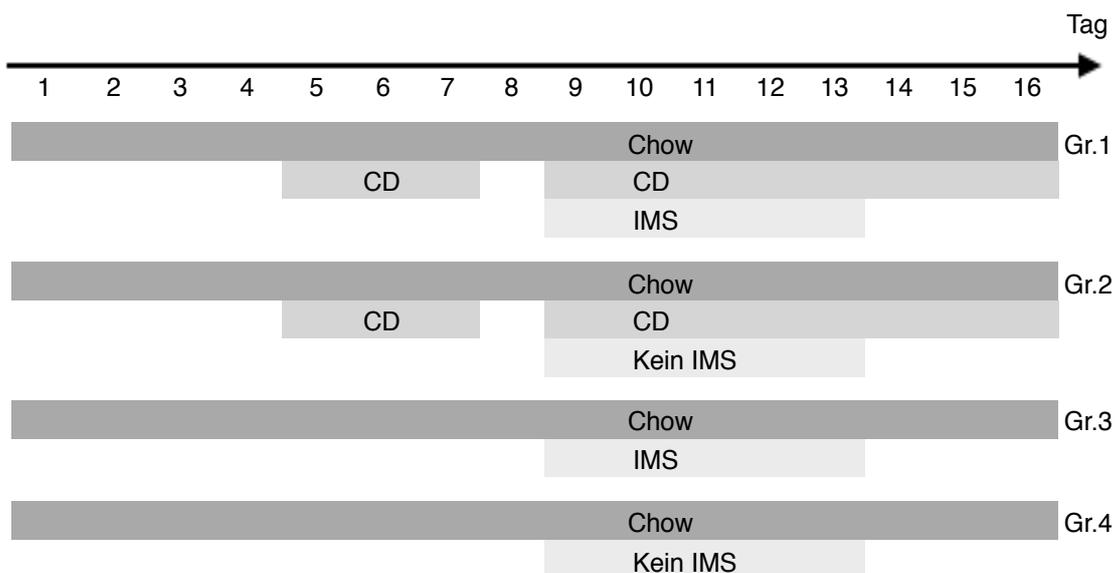


Abb. 4: Protokoll des ersten Studienteils, Gruppengröße n=10.

Die Blutentnahmen erfolgten vor und während des vierstündigen IMS. Um die
 Stressreaktion durch den Umgebungswechsel und den Schmerzreiz während der
 Asservierung einer Blutprobe zu vermeiden, führten wir bei der nicht gestressten
 Kontrolle die Blutentnahme lediglich am Tag 9 vor dem IMS Beginn durch. In den
 gewonnenen Blutproben wurden ACTH und Corticosteron bestimmt.

Die Futtermittelaufnahme wurde täglich und die Gewichtszunahme wöchentlich registriert. Während des gesamten Versuchsteils wurden die Tiere einzeln in den Käfigen Größe III (Länge: 42 cm, Breite: 26 cm, Höhe: 18 cm) gehalten.

2.4. Versuchsteil 2

In diesem Studienteil wurde der Einfluss des chronischen Stresses auf die Futtermittelaufnahme unter der chronischen ARB-Therapie untersucht (Abb 5). 56 SD-Ratten mit einem gleichem Initialgewicht (201 ± 7 g) wurden dabei 89 Tage oral mit TEL oder einem Placebo behandelt. Zur Bestimmung der Stresshormone (ACTH und Corticosteron) wurde an zwei verschiedenen Zeitpunkten ein IMS durchgeführt.

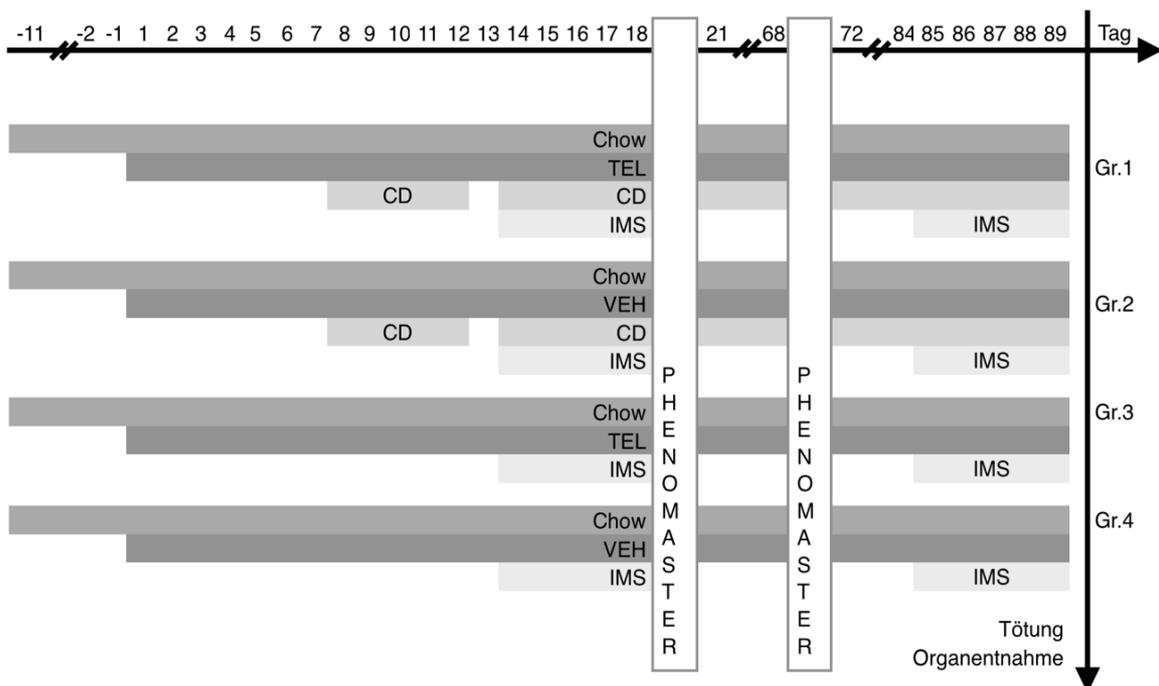


Abb. 5: Protokoll des ersten Studienteils, Gruppengröße $n=10$.

Nach einer Eingewöhnungszeit von acht Tagen wurden die Ratten drei Tage vor Versuchsbeginn (Tag -3) anhand des vergleichbaren Körpergewichts in vier Gruppen randomisiert (Gruppengröße $n=12-14$). Als Versuchsbeginn wurde der erste Schlundtag festgelegt (Tag 1). Die Verum Gruppen bekamen täglich eine TEL-Suspension (8 mg/kg Körpergewicht), welche aus TEL-Pulver, Gummi Arabicum und Leitungswasser hergestellt wurde. Die Kontrollgruppen erhielten ein Placebo

(=Vehikel (VEH)) aus Gummi Arabicum und Leitungswasser. Um die korrekte Medikamentendosis zu applizieren, wurden die Tiere jeden Tag gewogen. Die Hälfte der Tiere bekam dazu Chow-, die anderen eine Chow- und eine CD-Diät zur Auswahl. Die Gewöhnung an CD erfolgte an den Tagen 8 bis 12. Nach einem Tag CD-Pause, folgte an den Tagen 14 bis 18 der erste IMS. Anschließend wurden die Tiere für drei Tage mit einem Kalorimetriesystem untersucht (Phenomaster®). In den nächsten neun Wochen folgte eine weitere Behandlung mit TEL oder VEH und einer der Diäten. Vor dem zweiten IMS wurden die Tiere wiederholt mit dem Phenomaster®-System untersucht. Die zweite IMS-Phase erfolgte an den Tagen 85 bis 89. Vor dem Testbeginn am Tag 85 wurde eine Blutzuckermessung durchgeführt. Unmittelbar nach dem letzten IMS-Versuch (Tag 89) wurden die Tiere getötet. Die entnommenen Organe und das Carotidenblut wurden bis zu weiteren Analysen entsprechend thermisch gelagert.

Die Stresshormone wurden aus den Proben des ersten und des letzten Tages der beiden Immobilisationsversuche bestimmt. Für die Basalwertbestimmung folgten weitere Blutentnahmen: vor der medikamentösen Behandlung (Tag -3), vor Beginn der CD-Diät (Tag 8) und vor dem ersten IMS (Tag 12). Während der ganzen Studienzeit hatten alle Gruppen stets freien Zugang zu Leitungswasser und Futter. Außerhalb der IMS-Phasen wurde das Futter wöchentlich ausgewogen. Zur genauen Bestimmung der Futteraufnahme wurden die Tiere während der IMS-Phasen einzeln in den Käfigen Größe III gehalten (Länge: 42 cm, Breite: 26 cm, Höhe: 18 cm) und das Futter täglich ausgewogen. Die Trennung der Tiere in die separaten Käfige erfolgte eine Woche vor dem IMS.

2.5. Immobilisationsstresstest (IMS)

Um den chronischen Stress unter den Laborbedingungen zu induzieren, wurde ähnlich der Arbeitsgruppe Pecoraro (Pecoraro et al., 2004) ein Immobilisationsstresstest durchgeführt. Dazu verwendeten wir mit Klappen verschließbare Plastikrohre (Tab. 1), welche eine Öffnung für die venöse Blutentnahme aus dem Schwanz hatten. Mehrere kleine Löcher sicherten die ausreichende Luftzufuhr vorn. Eine Bewegung oder Drehung im Rohr war nicht möglich.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Plastikrohre

Rohre	Maß (mm) (Durchmesser x Länge)	Tiergewicht (g)
Klein	47 x 160	< 350
Mittel	70 x 170	350-700
Groß	70 x 220	> 700

An fünf aufeinander folgenden Tagen wurden die IMS- Gruppen (≤ 8 Tiere) nach der basalen Blutentnahme ins Rattenversuchslabor überführt und in den Röhren für vier Stunden immobilisiert. Zu den Zeitpunkten 30, 60, 120, 180, 240 min erfolgte eine Blutentnahme über die Schwanzvene. Dazu wurde der, für die basale Blutentnahme gemachte Schnitt, mittels sauberer Tücher wiedereröffnet. Um die Habituation an den Stress zu vermeiden, wurden die Rohre am Tag 5 auf einen Schüttler gestellt und horizontal bewegt (Distanz 2 cm, Frequenz 30 Hz). Die täglichen Versuche wurden zur gleichen Zeit durchgeführt. Der Beginn zwischen 9.00-9.30 Uhr sicherte, dass alle Tiere vor Beginn der Dunkelphase um 14 Uhr wieder in den Rattenaufenthaltsraum zurückgebracht wurden.

2.6. Applikation von Medikamenten

Die orale Applikation wurde täglich zur selben Zeit durchgeführt. Zur Verabreichung diente eine mit der 1 ml Spritze verbundenen Metallsonde (separate Sonden für TEL und VEH). Die Ratten wurden mit der Hand am Kiefer gefasst, angehoben und auf dem Stamm der schlundenden Person fixiert. Die leicht gebogene Metallsonde wurde dann seitlich in den Mund eingeführt und vorsichtig in den Ösophagus vorgeschoben.

2.7. Blutentnahme über die Schwanzvenen

Zur Gewinnung der Blutproben über die Schwanzvene wurde eine etablierte Methode angewandt. Die Ratten wurden mit einem Handtuch bedeckt und der Stamm leicht mit zwei Händen fixiert. Die Bedeckung diente als Abschirmung vor akusti-

schen und optischen Reizen, welche als zusätzliche Stressoren betrachtet werden können. Um die Schwanzvene zu öffnen, setzte die zweite Person einen minimalen Schnitt mit einer Rasierklinge ca. 1 cm vom distalen Ende des Schwanzes. Danach wurde der Schwanz mehrmals sanft von proximal nach caudal ausgestrichen. Die so gebildeten Blutropfen wurden in einer mit EDTA-beschichteten Küvette aufgesogen. Eine Blutentnahme dauerte 30-90 Sekunden. Die gesammelten Proben wurden sofort ins Eisbad gestellt und anschließend 5 min bei 4°C und 10000g zentrifugiert. Danach wurde das Blutplasma abpipettiert und in einem Kühlschrank bei -20°C gelagert.

2.8. Tötung und Organpräparation

Die Tiere wurden mit einer Guillotine getötet. Direkt nach der Dekapitation wurde das Carotidenblut für die biochemischen Analysen aufgefangen, indem der Rumpf des Tiers über einen Polypropylentrichter gehalten wurde. Die verwendeten Reagenzgefäße wurden zuvor mit den verschiedenen Stabilisatoren versetzt (Tab. 2). Anschließend wurden die Proben leicht geschwenkt und ins Eisbad gestellt. Das Blut wurde 10 Minuten bei 1500g und 4°C zentrifugiert, um das Plasma für die ACTH-, Corticosteron-, Leptin- und Ang II-Bestimmung zu gewinnen. Die Proben wurden dann in einem Kühlschrank bei -20°C gelagert.

Tab. 2: Verwendete Stabilisatoren

Untersucher Parameter	Stabilisator	Stabilisatormenge	Blutmenge
Angiotensin-II	Bestatin (1mM)	40µl	2ml
	EDTA-Lsg. (0,24M)	200µl	
ACTH			
Corticosteron Leptin	EDTA-Lsg. (0,24M)	200µl	2ml

Unmittelbar nach der Dekapitation und der Blutasservierung erfolgte die Organpräparation (Femur, Niere, Nebenniere, Herz, Gehirn). Das Gewicht der beiden Nieren, Nebennieren und des linken Ventrikels wurde mit einer Feinwaage be-

stimmt. Die Länge des freigelegten Femurs wurde mittels einer Schieblehre gemessen. Nach der Entnahme wurden die Präparate in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine Ausnahme bildete das Gehirn, das in 2-Methylbutan eingefroren wurde. Anschließend wurden alle Proben bei -80°C gelagert.

2.9. Messung der Glukosekonzentration im Blut

Die Glukosekonzentration wurde aus dem Schwanzvenenblut bestimmt. Der für die Messung benötigte Vollbluttropfen wurde wie oben beschrieben gewonnen und auf den Teststreifen (Ascensia Elite ® Sensor, Bayer HealthCare) aufgetragen. Die Bestimmung der Glukosekonzentration erfolgte mit einem Blutzuckergerät (Elite XL ®, Bayer HealthCare).

2.10. Kalorimetrie

Für die Erfassung der genauen metabolischen Parameter wurde ein Kalorimetriesystem eingesetzt (Phenomaster®). Dafür wurden die Tiere einzeln in den speziellen Käfigen für drei Tage von der Umgebung isoliert. Mittels Sensoren wurde die Wasser- und Futteraufnahme registriert. Nach dem Auswiegen des verbrauchten Futters wurde der Energieverbrauch (EE) kalkuliert. Aus der gemessenen Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidabgabe in demselben Zeitraum konnte automatisch der Respirationsquotient (RER) berechnet werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Kohlenhydratverbrennung mit einer niedrigeren Sauerstoffaufnahme als die Fettverbrennung einhergeht, erlaubt RER eine indirekte Aussage über den herrschenden Metabolismus. Außerdem wurde mit Hilfe der Infrarotsensoren das spontane Bewegungsverhalten untersucht. Während der Untersuchung hatten die Tiere jederzeit eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und einen freien Zugang zu Futter und Wasser. Der Raum hatte einen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Dunkelphase begann um 14 Uhr und die Hellphase um 2 Uhr.

2.11. Radioimmunoassay

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Konkurrenz zwischen dem radioaktivmarkierten und dem in der Probe enthaltenem Antigen um eine Bindungsstelle an einem spezifischen Antikörper. Gemessen wird der radioaktive Zerfall der entstandenen Komplexe. Eine größere Menge des zu bestimmenden Hormons bewirkt, dass weniger radioaktive Antigene mit dem spezifischen Antikörper einen Komplex bilden können. Die gemessene Radioaktivität verhält sich somit reziprok zur Antigenkonzentration in der Probe.

Zur Bestimmung der ACTH-, Corticosteron-, Leptin- und Ang II-Konzentration im Blutplasma wurde ¹²⁵I-RIA-Kits für Ratten und Mäuse verwendet. Die Arbeitsschritte entsprachen dabei der Anleitung. Abweichend von der Gebrauchsanweisung wurden die Analysen für die ACTH- und Corticosteron-Bestimmung aufgrund einer kleineren Plasmamenge mit reduzierten Ansätzen (ACTH 50µL, Corticosteron 50µL in einer 1:200 Verdünnung) verwendet. Aus der Schwanzvene oder nach der Dekapitation gewonnene Blutproben wurden mit dem radioaktivmarkierten Antigen und spezifischen Antikörpern versetzt. Nach der Inkubation wurden die entstandenen Komplexe von den ungebundenen Antigenen befreit. Dazu diente eine Präzipitationslösung mit einem zweiten Antikörper. Die gebildeten Doppelantikörper-Antigen-Komplexe wurden mit Hilfe der Zentrifugation von den freien Antigenen getrennt. Der Antigenüberstand wurde mittels einer Membranpumpe entfernt. Anschließend wurde der radioaktive Zerfall mit einem Gammacounter gemessen.

2.12. Präparation der Hypothalami

Die Präparation der Hypothalami erfolgte nach der Methode von Palkovits und Brownstein (Palkovits 1988). Initial wurden die bei -80°C gelagerten Gehirne für eine Stunde im Gefriermikrotom bei -12°C temperiert um die Schneidfähigkeit zu erhalten. Anschließend wurden die Hypothalami mittels anatomischer Pinzette und Skalpell (Mikrotomklingen, Leica) unter Verwendung einer stereotaktischen Datenbank (Paxinos, 1998) vom Hirn gelöst. Dazu wurde ein Koronarschnitt rostral des Chiasma Optimum gesetzt. Ein weiterer Koronarschnitt sorgte für die Trennung der Corpora mamillaria. Die entstandenen Scheiben wurden auf die Schnittfläche gelegt, um das ventral liegende Gewebe samt der Commissura anterior mit-

tels Sagittalschnitte zu entfernen. Im letzten Schritt erfolgte die Entfernung der Amygdalae. Die getrennten Hypothalami wurden bei -80°C gelagert.

2.13. mRNA-Extraktion und -Quantifizierung

Die entsprechenden Gewebeproben wurden nach einer Stickstoffkühlung zu feinem Pulver zermörsert, mit einer Mischung aus PBS-Puffer (pH 7.4) sowie Lysispuffer (Nucleic Acid Purification Lysis Solution, Applied Biosystems, UK) versetzt und anschließend eine Minute mit einem Ultra-Turax (IKA-Werke, Deutschland) homogenisiert. 500µl des entstandenen Homogenats wurde mit 10µl Proteinase K (Applied Biosystems, UK) verdaut. Das restliche Homogenat wurde bei -80°C gelagert. Mit Hilfe der ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation erfolgte die mRNA-Extraktion nach einem standardisierten Protokoll für Gewebe (Applied Biosystems, USA). Im Anschluss wurde der mRNA-Gehalt am NanoDrop-Gerät (Thermo Scientific, USA) gemessen.

2.14. cDNA-Synthese

Um den mRNA-Level des CRH, des Melanin konzentrierenden Hormons (MCH) sowie AT1A-, AT1B- und ACTH (Melanocortin 2, MC2)-Rezeptoren mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion zu bestimmen wurde die mRNA in die komplementäre DNA (cDNA) mittels eines kommerziell erhältlichen cDNA-Synthese-Kits nach Herstellerangaben umgeschrieben (Cloned AMV First-Strand Kit, Invitrogen, Kanada). Hierbei wurde zuerst ein Oligo-Desoxythymidin (dT)-Primer an die RNA angelagert. Folgend hybridisierte die Avian-Myeloblastosis-Virus-Reverse-Transkriptase (AMV-Reverse-Transkriptase) als RNA-Transkriptase den komplementären cDNA Strang aus den zugesetzten Nukleotiden. Abschließend wurde die doppelsträngige cDNA durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert.

2.15. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Für die cDNA-Bestimmung wurden das ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) und ein kommerziell erhältlicher Kit („Platinum

SYBR GREEN I qPCR Super-Mix-UDG with ROX“, Invitrogen, Kanada) verwendet. Die Temperaturprotokolle wurden vom Hersteller mitgeliefert. Zu dem Kit musste zusätzlich DEPS-Wasser und ein jeweiliger Primer (Invitrogen, Kanada, Tab. 3) zugesetzt werden. Die Probenzusammensetzung war wie folgt:

„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

Alle Proben wurden bis zur Verwendung unter Lichtschutz auf Eis gelagert. Für die Versuche wurde eine 96-Well-Platte mit 23µl eines Supermix und mit einer 2µl cDNA-Probe oder 2µl des jeweiligen Standards aufgetragen. Als Standard wird eine Versuchsreihe mit einer bekannten cDNA-Konzentration bezeichnet. Der Konzentrationsunterschied in der Standreihe betrug Faktor 10.

Tab. 3: Nukleotidsequenz der eingesetzten Primer

Primer	Ausrichtung	Sequenz
AT1A	Sense	5´ - TCA AAC TCC CAG TGG ACC TC -3´
	Antisense	5´ - CTC ACC GAA GCC TCT CTC AC -3´
AT1B	Sense	5´ - TTC AAC CTC CAG CAA TCC TT -3´
	Antisense	5´ - CCC AAA TCC ATA CAG CCA CT -3´
MC2	Sense	5´ - CAG TTT GGC CAT TTC CGA CA -3´
	Antisense	5´ - AAC TGC CAC GAG GCT TGA GAT -3´
CRH	Sense	5´ - AAA GGG GAA AGG CAA AGA AA -3´
	Antisense	5´ - GTT TAG GGG CGC TCT CTT CT -3´
MCH	Sense	5´ - CAT TTT ACT TTC GGC CTC CA -3´
	Antisense	5´ - TGG AGC CTG TGT TCT TTG TG -3´

Die Bestimmung der cDNA erfolgte nach einer etablierten Methode mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR, Higuchi et al., 1993). Die Primersequenz wurde zuvor mit dem Programm „Primerexpress“ (Invitrogen, Kanada) bestimmt. Nach jedem Amplifikationsszyklus wurde ein Photo mit einer CCD-Kamera bei einer UV-Wellenlänge von 520 nm aufgezeichnet. Die Zugabe des Fluores-

zenzfarbstoffs SYBR® GREEN I (Invitrogen, Kanada) ermöglichte die genaue Quantifizierung der amplifizierten dDNA. Die Intensität der Fluoreszenz nahm mit einer zunehmenden Kopienanzahl zu. Die Auswertung erfolgte über die sogenannte Schwellenwertmethode. Hierbei wurde gemessen, nach wie vielen Zyklen ein zuvor definierter Fluoreszenzschwellenwert überschritten wurde. Anhand der mitgeführten Standardreihe konnte die anfängliche cDNA-Menge zurückgerechnet werden.

Vor dem Versuchsbeginn wurde die Gelelektrophorese für die Primeroptimierung angewandt. Die Überprüfung der Reinheit der einzelnen Proben und Primer erfolgte mittels einer Schmelzkurvenanalyse nach 40 qPCR-Zyklen.

2.16. Statistische Methoden

Alle Berechnungen und statische Analysen sowie die Erstellung der Abbildungen wurden mit der GraphPad®-Software durchgeführt. In den Tabellen und Diagrammen wurden die Daten als Mittelwerte und Standardfehler (SEM) dargestellt. Die Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn die Nullhypothese mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% verworfen werden konnte. Das Signifikanzniveau wurde somit bei $p < 0.05$ festgelegt.

Aufgrund des unterschiedlichen Energieanteils im Chow- (11.7 kJ/g) und CD-Futter (20.8 kJ/g) wurde die Energieaufnahme (in kJ) für jedes einzelne Tier abhängig von der verzehrten Chow- und CD-Menge ausgerechnet.

Im zweiten Studienteil wurden alle Tiere gestresst. Als entsprechende Kontrollen wurden die gemittelten Futterraufnahmen an den Tagen 8 bis 11 vor dem ersten IMS, sowie die an vier Tagen vor dem zweiten IMS verwendet.

Um die stressinduzierte Änderung der ACTH- und Corticosteronkonzentrationen während der einzelnen IMS-Tage zu quantifizieren wurden die Flächen unter den Kurven (AUCs) für jedes einzelne Tier berechnet.

Vor der statistischen Analyse wurden die Datensätze auf die Ausreißer geprüft und auf die Gaußsche Verteilung getestet, indem die D'Agostino- und Pearson-Tests durchgeführt wurden. Im Fall einer Gaußschen-Verteilung und einer Variable erfolgte eine One-Way-Anova Analyse. Um die Auswirkung von zwei oder mehr Variablen bei einer Gaußsche-Verteilung zu untersuchen wurde eine Two-Way-

Anova Analyse angewandt. Anschließend wurde ein Bonferonni-Test als ein Post-hoc-Test durchgeführt. Die Daten mit nicht normalverteilten Datensätzen oder einer Varianzinhomogenität wurden mit einem Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss mit dem Dunns-Test als Post-hoc Test analysiert. Die Korrelationsanalysen wurden mit dem Two-Tail-Pearson-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss der CD-Diät auf chronischen Stress

3.1.1. Gewicht

Das initiale Körpergewicht war in allen Gruppen gleich (349 g). Die nicht gestressten Kontrolltiere zeigten während der Studie eine kontinuierliche Gewichtszunahme. In den Stressgruppen war der Gewichtsanstieg während der IMS-Phase geringer. Die CD-Tiere nahmen während IMS mehr zu als die Chow-Kontrollen. Das finale Gewicht war in den CD-Gruppen höher (Abb. 6).

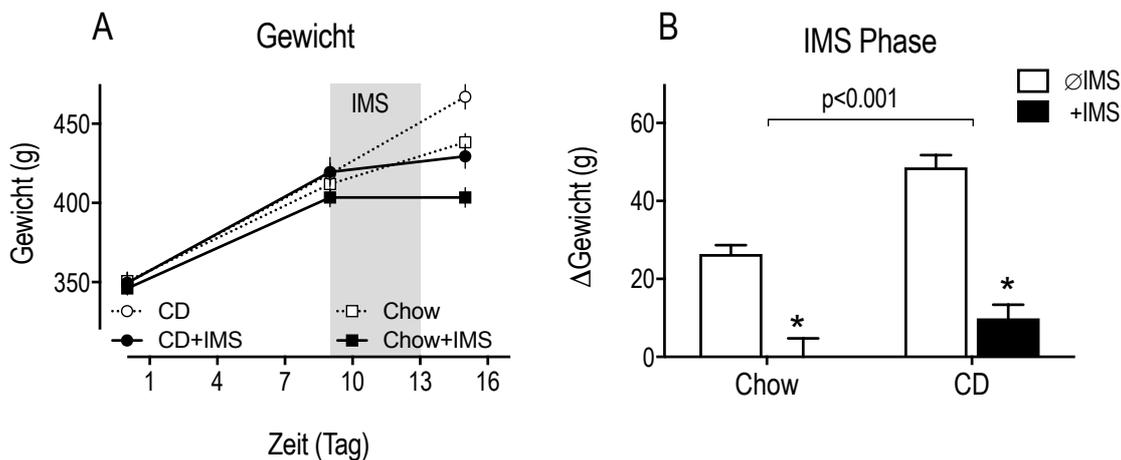


Abb. 6: A) Körpergewicht; B) Gewichtsveränderung (Tag 9-13) während IMS (in Δ g), Mittelwert \pm SEM, $n=10$, * < 0.05 IMS vs. Kontrolle.

3.1.2. Energieaufnahme

Initial gab es keine Gruppenunterschiede in der Energieaufnahme. Die Chow-Gruppen zeigten bis zur IMS-Woche und danach einen konstanten Futterverbrauch (Abb. 7A). Bei den CD-gefütterten Ratten erhöhte sich die Futteraufnahme während der CD- Gewöhnungszeit an den Tagen 5 bis 7 und blieb nach der CD-Pause am Tag 8 bis zum Ende des Versuchs den Chow-Gruppen gegenüber erhöht (Abb. 7A, C, D). Eine Berechnung des prozentuellen CD-Anteils an der gesamten Futteraufnahme ergab weder in der Ruhephase noch im Stress Unterschiede zwischen der Stress- und der Kontrollgruppe ($p=0.2$, Abb. 7B). Während

des IMS (Tag 9-13) wurde bei allen gestressten Tieren ein signifikanter Abfall der kumulativen Energieaufnahme unabhängig von der Fütterungsregime den Kontrollen gegenüber beobachtet (Abb. 7D).

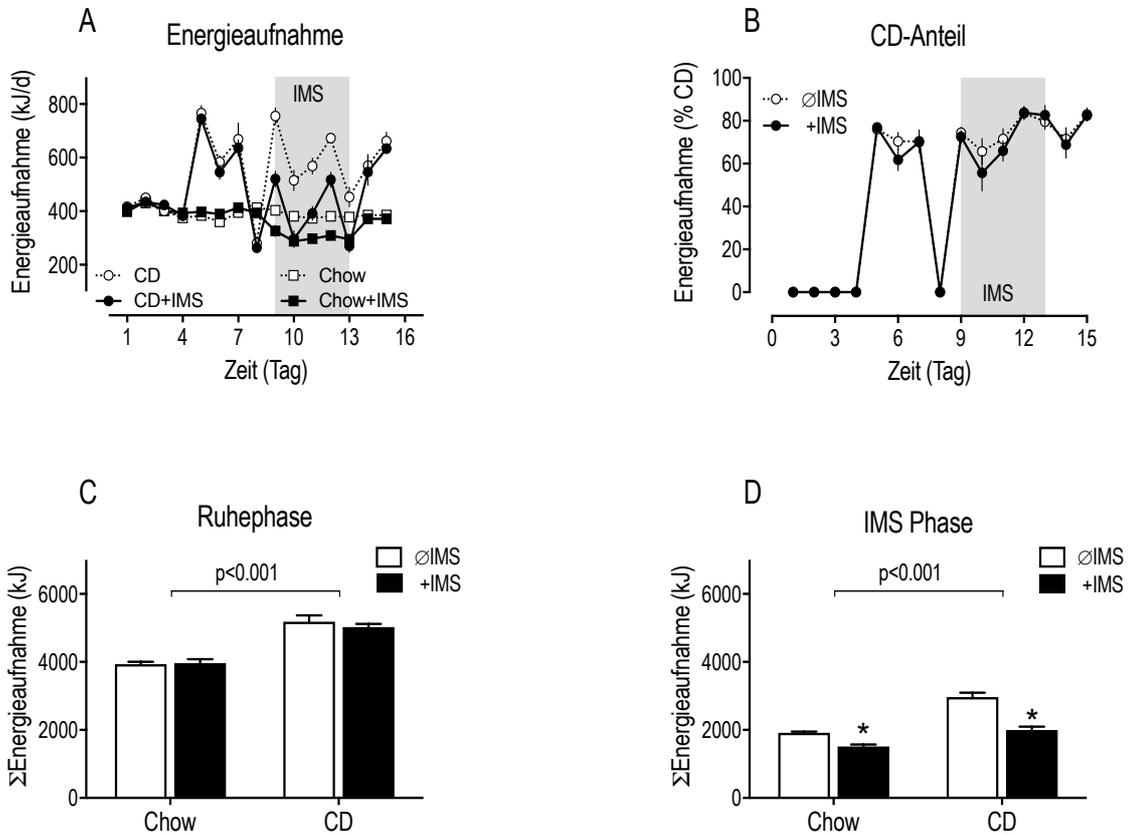


Abb. 7: Energieaufnahme während der Studie (A), prozentueller CD-Anteil an der Futtermittelaufnahme (B), kumulative Energieaufnahme in Ruhephase (C) und während IMS (D), $* < 0.05$ Stress vs. Kontrolle, Mittelwert \pm SEM, $n=10$, $* < 0.05$ vs. nicht gestresster Kontrolle.

3.1.3. Hormonantwort

Vor dem IMS-Beginn gab es keine Unterschiede in der basalen ACTH- und Corticosteronkonzentration zwischen den beiden Gruppen (Tab. 4). An allen Versuchstagen stieg der Hormonspiegel in beiden Gruppen während der ersten IMS-Stunde rasch an und fiel innerhalb der nächsten drei Stunden auf die basalen Werte zurück (Abb. 8). Die täglich bestimmte maximale ACTH-Konzentration zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die maximale Corticosteronkonzentration war in der Chow- verglichen mit der CD-Gruppe am Tag 1 (749 ± 35 vs.

529±44 ng/mL, $p=0.0018$) und Tag 5 (762 ± 50 vs. 557 ± 55 ng/mL, $p=0.012$) höher.

Tab. 4: Basale ACTH- und Corticosteronspiegel am Tag 9 vor IMS. Mittelwert±SEM (n=10)

	Chow		CD		p^{IMS}	$p^{Diät}$
	Kontrolle	+IMS	Kontrolle	+IMS		
ACTH (pg/ml)	60±6	73±8	70±7	62±7	0.315	0.788
Corticosteron (ng/ml)	54±15	85±13	64±14	66±21	0.747	0.944

Aus den Hormonkonzentration-Zeit-Kurven wurden AUCs zur Quantifizierung der Hormonantwort während der IMS-Phase berechnet. Daraus wird deutlich, dass die initiale Hormonantwort am Tag 1 am höchsten ist, in den folgenden 3 Tagen abnimmt und am Tag 5 nach zusätzlichem Schütteln erneut ansteigt. Die Corticosteron-AUC in der CD-Gruppe ergab am Tag 1 eine tendenziell und am Tag 5 eine signifikant reduzierte Antwort verglichen mit der Chow-Kontrolle. Bezüglich der ACTH-Antwort zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 8, Reihen 1-2; Tab. 5). Die AUC-Analyse zeigte mit einer Ausnahme am Tag 4 eine Korrelation zwischen ACTH und Corticosteron. Die abnehmende Steilheit der Regressionsgeraden bis zum Tag 4 sowie eine Erholung am Tag 5 deuten auf einen adrenalen Mechanismus hin (Abb. 8, Reihe 3; Tab. 5). Die Energieaufnahme korrelierte mit der Corticosteron-AUC am Tag 1 negativ und am Tag 5 positiv. An den Tagen 2-4 gab es keinen Zusammenhang zwischen der Corticosteronantwort und dem täglichen Futterkonsum (Abb. 8, Reihe 4).

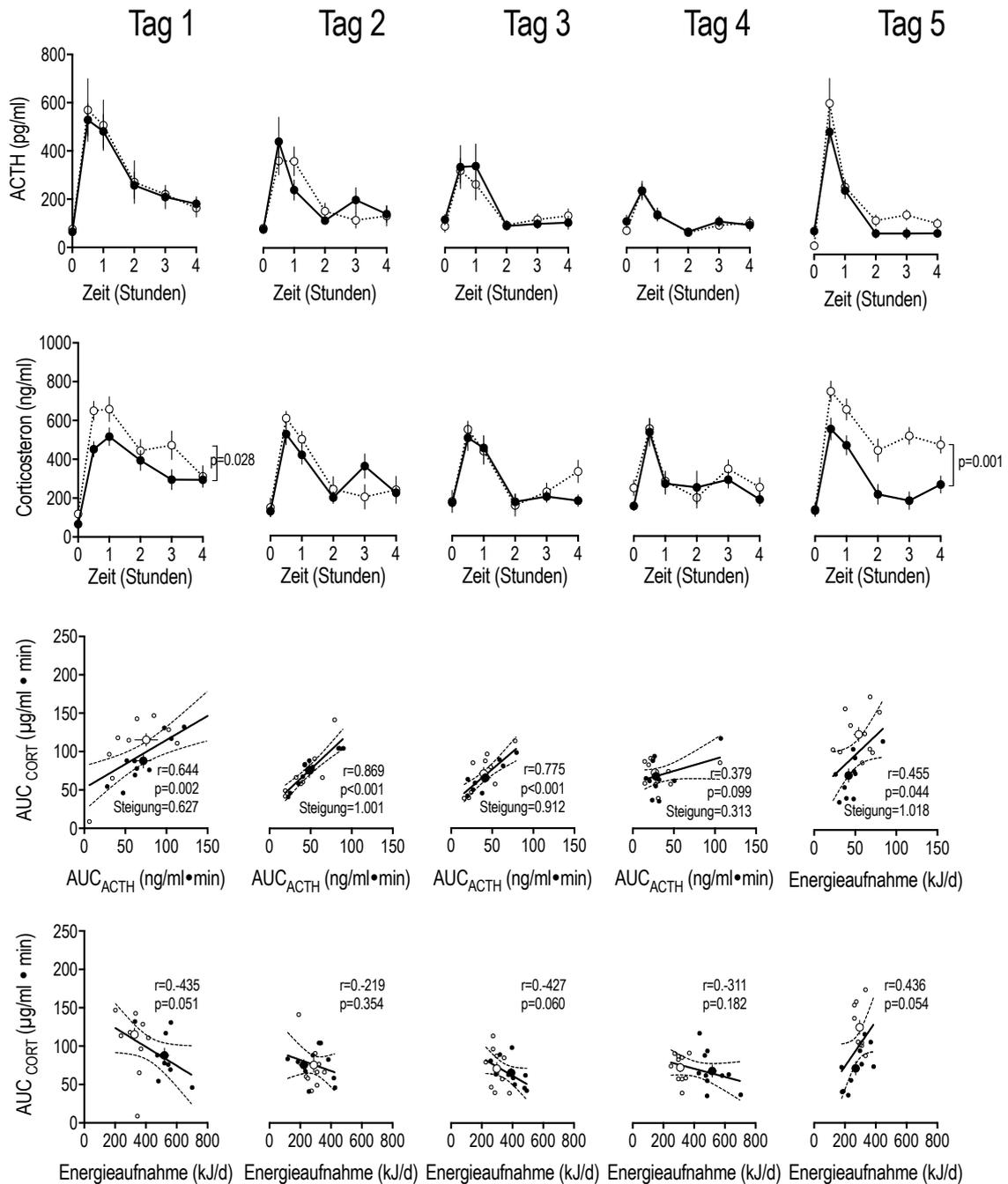


Abb. 8: ACTH- und Corticosteronverlauf unter Chow (○) und CD (●) während des 5-tägigen IMS (Reihen 1-2). Korrelation und lineare Regression zwischen ACTH- und Corticosteronantwort (Reihe 3). Korrelation und lineare Regression zwischen Corticosteronantwort und Energieaufnahme (Reihe 4). Größere Symbole auf Reihen 3-4 stellen Mittelwerte dar. Mittelwert±SEM (n=10).

Tab. 5: AUC der ACTH und Corticosteron Konzentrations-Zeit-Kurven während IMS, Mittelwert±SEM (n=10); * p<0.05 vs. Tag 1; † p<0.05 vs. Chow.

Tag	ACTH (ng/ml•min)		Corticosteron (µg/ml•min)	
	Chow	CD	Chow	CD
1	75±13	72±9	115±8	88±9
2	49±7	48±7*	76±9 *	76±7
3	40±6 *	42±6 *	71±8 *	66±6
4	27±4 *	28±3 *	73±6 *	68±8
5	54±6	42±3 *	125±9	71±9†

3.2. Einfluss von TEL auf die diätinduzierte Adipositas

Initial gab es keine Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen (207g). Während der ganzen Studie nahmen alle Tiere kontinuierlich zu. Eine Ausnahme bildeten die Wochen 2 und 12, während derer der IMS stattgefunden hat. Wie im 1. Versuchsteil haben alle Gruppen auch während des IMS an Gewicht verloren. In der ersten Versuchswoche war die Gewichtszunahme in allen Gruppen ähnlich. Ab der CD-Einführung am Tag 8 stieg das Gewicht in den CD-Gruppen stärker an. Somit wogen die CD-Tiere am Ende der Studie mehr als die Chow-Kontrollen. TEL reduzierte die Gewichtszunahme in allen Gruppen. Das Gewicht nach TEL+CD war vergleichbar mit dem Gewicht nach Chow+VEH (Abb. 9).

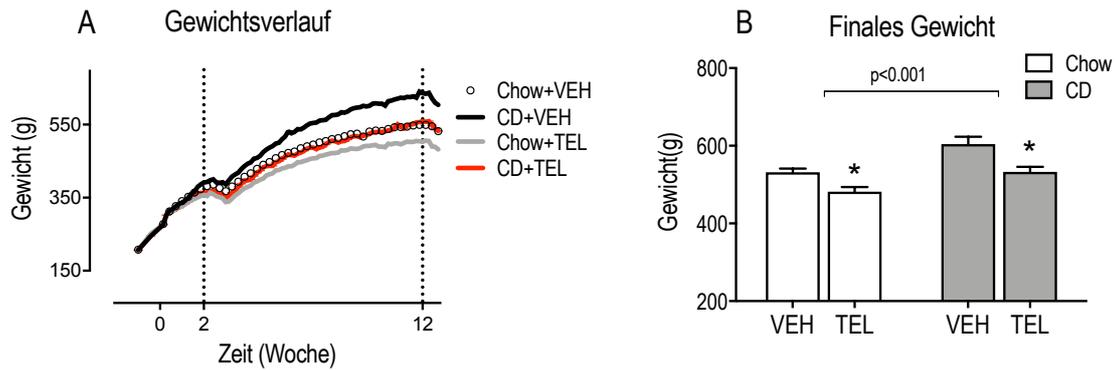


Abb. 9: Gewichtsverlauf (A) und finales Gewicht (B) von CD und/oder Chow gefütterten Ratten, die mit TEL (8 mg/kg/Tag) bzw. mit VEH behandelt wurden. Beginn des IMS (Woche 2 und 12) mit gepunkteter Linie markiert (...), * $p < 0.05$ TEL vs. VEH, Mittelwert \pm SEM ($n = 11-14$).

Das Gewicht des linken Ventrikels war unter der TEL-Behandlung in den Chow- und CD-Gruppen signifikant größer. Eine Messung des Nebennieren- und Nierengewichts sowie der Femurlänge ergab keine Unterschiede zwischen TEL- und VEH-Therapie. Die Diät hatte keinen Einfluss auf das Organwachstum (Tab. 6).

Tab. 6: Organgewichte bzw. -größe in Abhängigkeit der Diät und der TEL-Behandlung am Ende der Studie nach unterschiedlicher Diät und Therapie. Mittelwert \pm SEM ($n = 11-14$), * $p < 0.05$ Chow vs. VEH

Organ	Chow		CD		$p^{\text{Diät}}$	p^{Therapie}
	VEH	TEL	VEH	TEL		
Femur (mm)	40.6 \pm 0.2	40.6 \pm 0.16	40.5 \pm 0.2	40.3 \pm 0.2	0.878	0.183
Linker Ventrikel (mg)	918 \pm 19	798 \pm 23*	1008 \pm 43	852 \pm 25*	0.013	<0.0001
Nieren (mg)	1549 \pm 25	1435 \pm 26	1536 \pm 27	1522 \pm 19	0.140	0.14
Nebennieren (mg)	30.8 \pm 1.1	30.7 \pm 1.0	29.9 \pm 0.9	28.8 \pm 1.2	0.203	0.6

Die kumulative Nahrungsaufnahme und die Blutglukosekonzentration waren unter CD- im Vergleich zur Chow-Diät erhöht. Eine gleichzeitige TEL-Behandlung bewirkte eine signifikante Reduktion der Futtermittelaufnahme unabhängig von der Diät (Abb. 10A, B). Mittels einer 2-Weg-Anova konnte ein TEL-Gruppeneffekt auf die Blutglukose-Konzentration gezeigt werden ($p=0.014$, Abb. 10B). Der Leptinspiegel war in den CD-Gruppen deutlich höher als bei den Chow-Kontrollen. Unter TEL war die Leptin-Plasmakonzentration in den CD-gefütterten Tieren normal (Abb. 10C). Zwischen Energieaufnahme und Leptinkonzentration wurde in der Analyse eine Korrelation beobachtet: Nach CD kam es zu einer höheren Energieaufnahme sowie Leptinkonzentration und somit zu einer Rechtsverschiebung der Werte im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Umgekehrt bewirkte TEL eine Linksverschiebung der energieaufnahmebezogenen Leptinkonzentration in den CD-Gruppen (Abb. 10D). Diese Ergebnisse deuten auf eine Leptinresistenzentwicklung unter CD und eine protektive TEL Wirkung hin (Abb. 10D).

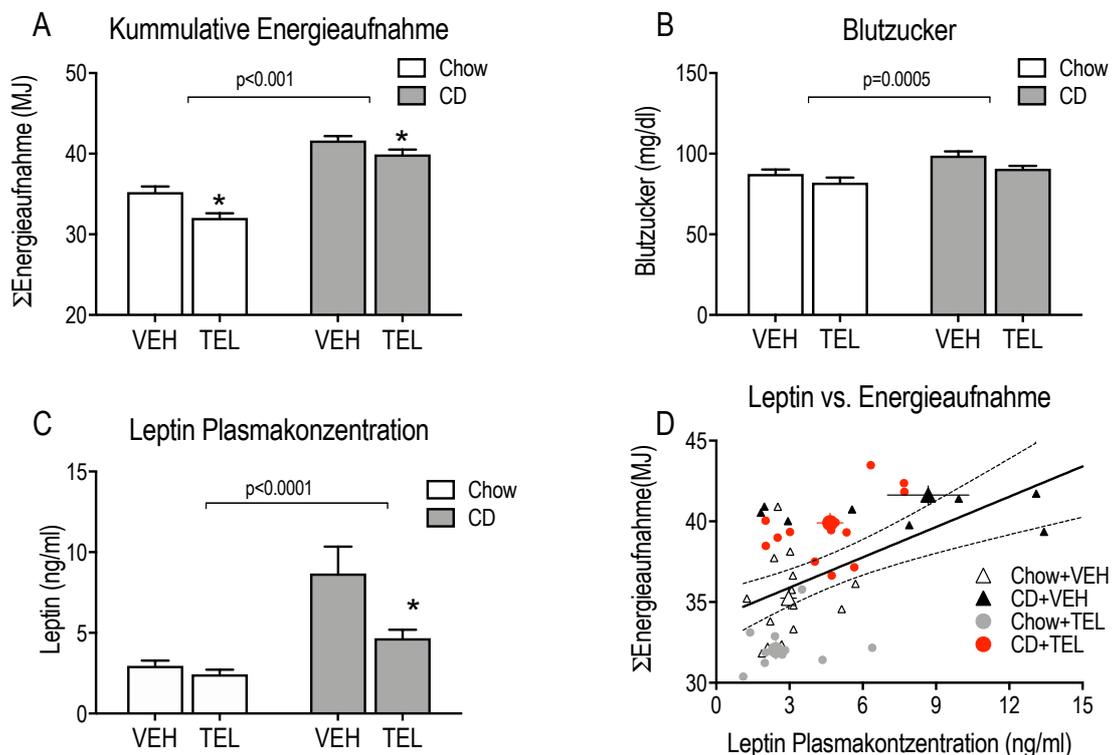


Abb. 10: Kumulative Energieaufnahme (A), Blutzucker (B), Leptin Plasmakonzentration (C), sowie Korrelation zwischen Leptin und Energieaufnahme (D) von Chow- bzw. CD gefütterten Ratten unter TEL (8 mg/kg/Tag) bzw. VEH-Behandlung. Mittelwert \pm SEM ($n=12-14$), * $p<0.05$ vs. entsprechende VEH-Kontrolle.

Unmittelbar nach IMS wurde der Energieverbrauch durch die indirekte Kalorimetrie und die Lokomotion mittels Infrarotsensoren über 3 Tage ermittelt. Die CD-Gruppen wiesen im Vergleich zu den Chow-Kontrollen einen signifikant höheren Energieverbrauch sowie eine stärkere Lokomotion auf. Die TEL-Therapie zeigte keinen Einfluss auf die Lokomotion und den Energieverbrauch (Abb. 11A, B).

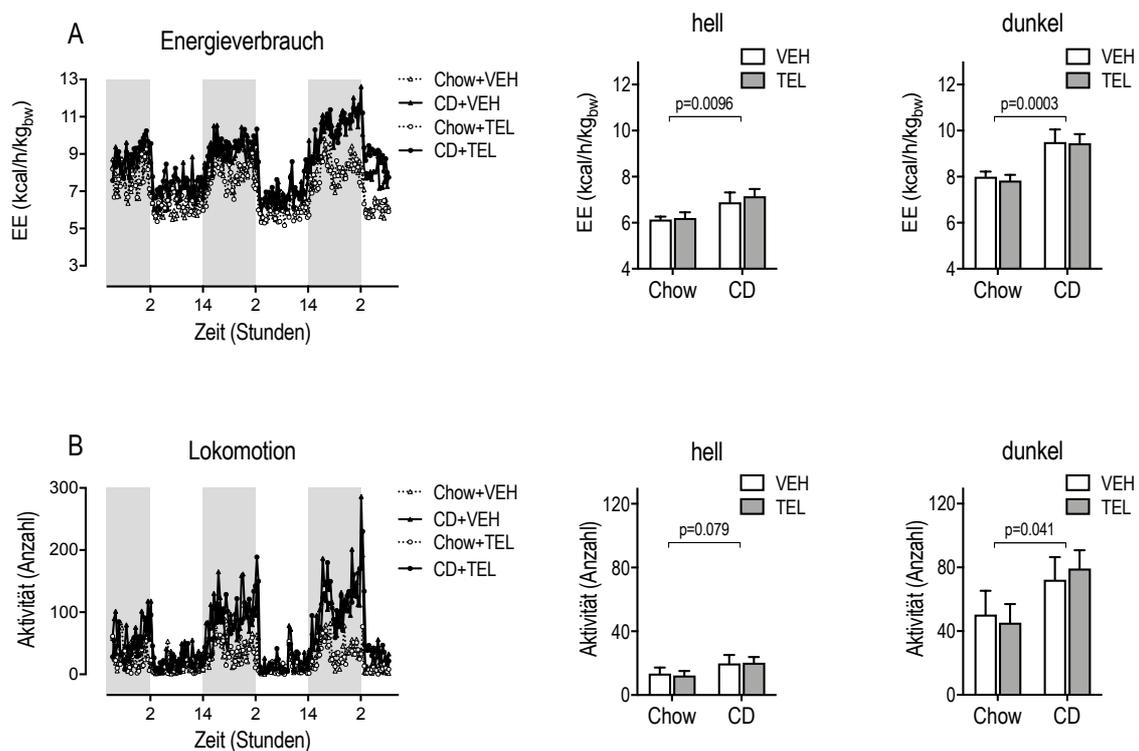


Abb. 11: Energieverbrauch (A) und Lokomotion (B) nach 1. IMS. Graue Schattierungen in zeitabhängigen Spalten bilden Dunkelphasen ab. Mittelwert±SEM (n=12-14), * p<0.05 vs. Kontrollen.

Der langzeitige Therapieeffekt wurde erneut in der Woche 10 mittels des Kalorimetriesystems untersucht. Während der Dunkelphasen war der Energieverbrauch, der RER und die Beweglichkeit der Tiere größer als während der Hellphasen (Abb. 12A-C). Der kumulative Energieverbrauch war unter CD-Diät erhöht. Die TEL-Behandlung führte zu einem signifikanten Anstieg des kumulativen Energieverbrauchs in den CD-gefütterten Tieren gegenüber den Chow-Kontrollen (Abb. 12A). Lokomotion und RER blieben unter TEL unverändert. Während der Lichtphase waren unter CD-Fütterung RERs und Lokomotion vermindert, die Lokomotion in der Dunkelperiode jedoch erhöht (Abb. 12B-C).

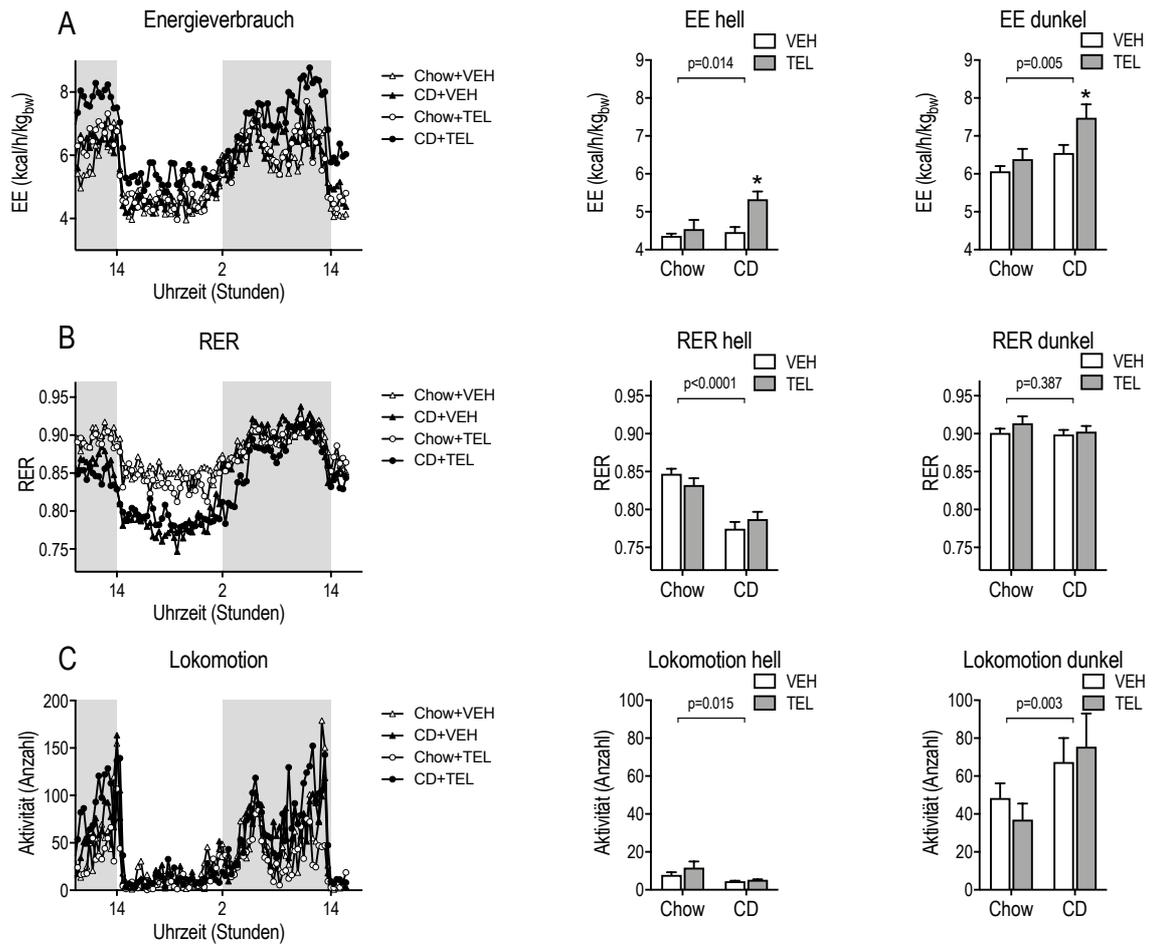


Abb. 12: Energieverbrauch (EE) (A), RER (B), Lokomotion (C). Mittelwert \pm SEM (n=12-14), * p<0.05 vs. Kontrollen.

3.3. Einfluss von TEL auf die Stressantwort

3.3.1. Stressreaktion nach kurzzeitiger TEL-Therapie

Die basalen Stresshormonspiegel waren vor dem IMS (Tag 14) in allen Gruppen vergleichbar. Die TEL-Therapie zeigte keine Auswirkung auf die basalen ACTH- und Corticosteronwerte (Tab. 7).

Tab. 7: Basale ACTH- und Corticosteronspiegel nach unterschiedlicher Behandlung und Diät am Tag 14 vor dem ersten IMS. Mittelwert \pm SEM (n=11-14)

	Chow		CD		$p^{\text{Diät}}$	p^{Therapie}
	VEH	TEL	VEH	TEL		
ACTH (pg/ml)	77 \pm 17	76 \pm 13	54 \pm 6	76 \pm 17	0.504	0.502
Corticosteron (ng/ml)	93 \pm 18	122 \pm 24	104 \pm 24	173 \pm 40	0.264	0.078

Verglichen mit dem ersten Studienteil wurde eine ähnliche Hormonantwort auf Stress beobachtet: 1) Anstieg während der ersten Stunde, 2) Abfall während der folgenden drei Stunden, 3) kontinuierliche Reduktion vom Tag 1 bis 4, 4) erneuter Anstieg am Tag 5 nach einem zusätzlichem Schütteln. Die TEL-Behandlung hatte während der ersten IMS-Phase keinen Einfluss auf die Stresshormonkonzentration (Abb. 13A-D). Lediglich am Tag 1 war der Corticosteronspiegel in der Chow+TEL-Gruppe erhöht (Abb. 8C). Die ACTH-Antwort war am Tag 1 vom Futterregime unabhängig, die Corticosteron-Konzentration war in der CD-Gruppe erhöht (Abb. 8A, C). Am Tag 5 hingegen war unter CD-Fütterung die ACTH- und Corticosteronantwort gegenüber den Chow-Kontrollen vermindert (Abb. 13B, D).

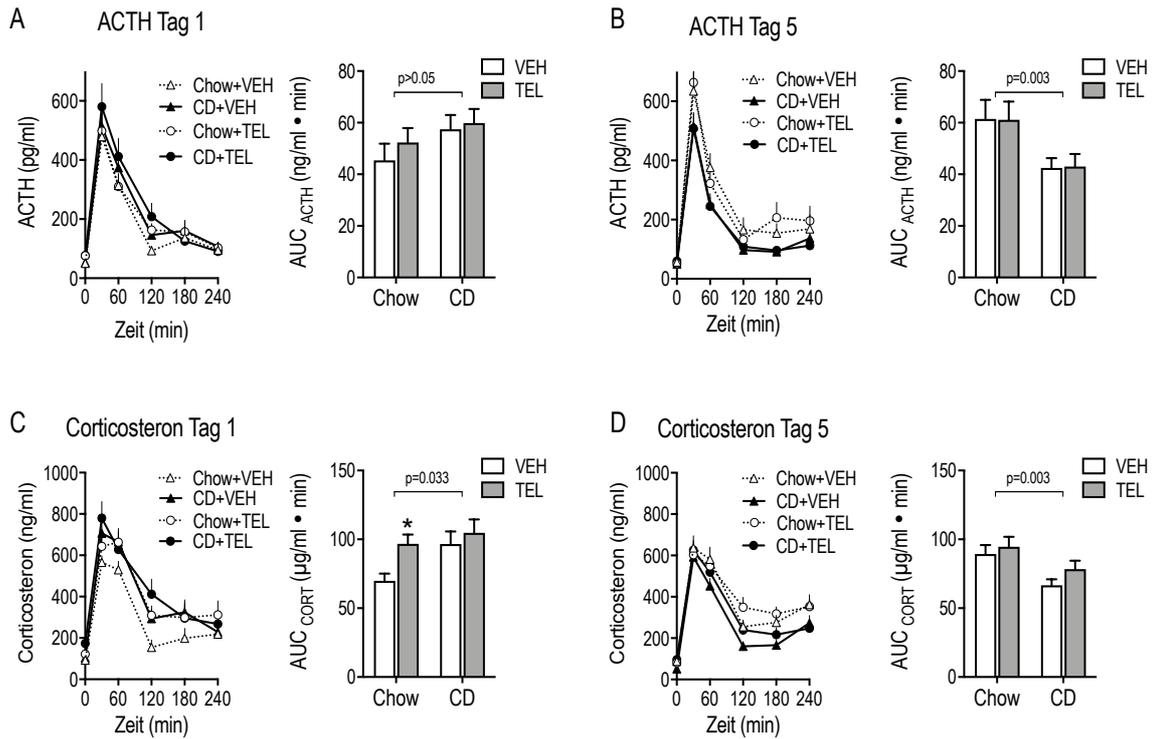


Abb. 13: ACTH- (A, B) und Corticosteron-Antwort (C, D) während 1. IMS am Tag 1 und 5. Mittelwert \pm SEM (n=12-14), * p<0.05 vs. Kontrollen.

3.3.2. Stressbedingte Energieaufnahme nach TEL-Therapie

Die kumulative Energieaufnahme war nach dem 1. Stresstag in der Chow-Gruppe sowohl nach VEH- als auch nach TEL reduziert (Abb. 14, 15A). In den CD-Gruppen blieb die Energieaufnahme im Vergleich zu den Werten vor IMS unverändert. Der prozentuelle Anteil an Keksen/Schokoriegeln war jedoch in der CD-Gruppe unter VEH-Behandlung nicht aber unter TEL nach dem Stress erhöht (Abb. 15B, C). Die Energieaufnahme nach TEL war sowohl in der Chow- als auch CD-Gruppe im Vergleich zu den VEH-Kontrollen reduziert. Die errechnete Interaktion zwischen der TEL-Behandlung und der Futterdiät mit den p-Werten >0.05 sowohl in der Chow- als auch CD-Gruppe spricht jedoch gegen einen TEL-Effekt auf das stress-induzierte Fressverhalten (Abb. 14, 15A, B). Während der nächsten drei Tage fiel die stressinduzierte Nahrungsaufnahme in den CD-Gruppen ab, die Chow-Gruppen zeigten eine konstante Futterraufnahme (Abb. 14).

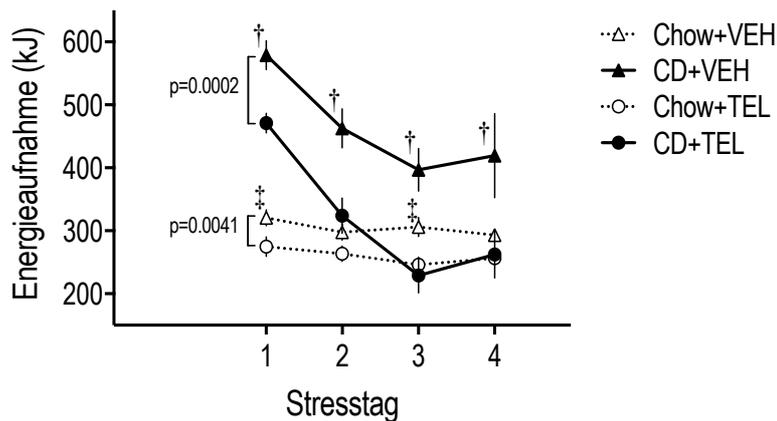


Abb. 14: Energieaufnahme während 1. IMS (Tag 1-4). Mittelwert \pm SEM (n=12-14).
 † $p < 0.05$ vs. CD+TEL, ‡ $p < 0.05$ vs. Chow+TEL.

An Tag 5 wurde das Fressverhalten mittels Phenomaster-Systems beobachtet. Dabei war die Futtermittelaufnahme in der CD- höher als in der Chow-Gruppe. Während der ersten dunklen Phase unmittelbar nach IMS bewirkte die TEL-Therapie in der Chow-Gruppe eine tendenzielle und in der CD-Gruppe eine signifikante Reduktion der Futtermittelaufnahme (Abb. 15D, E). Die Menge an Keksen/Schokoriegeln war unter TEL reduziert, der reine Chow-Verbrauch blieb nach dem Stress unverändert (Abb. 15F). Während der folgenden 48 Stunden stieg die Futtermittelaufnahme in allen Gruppen an (Abb. 15D).

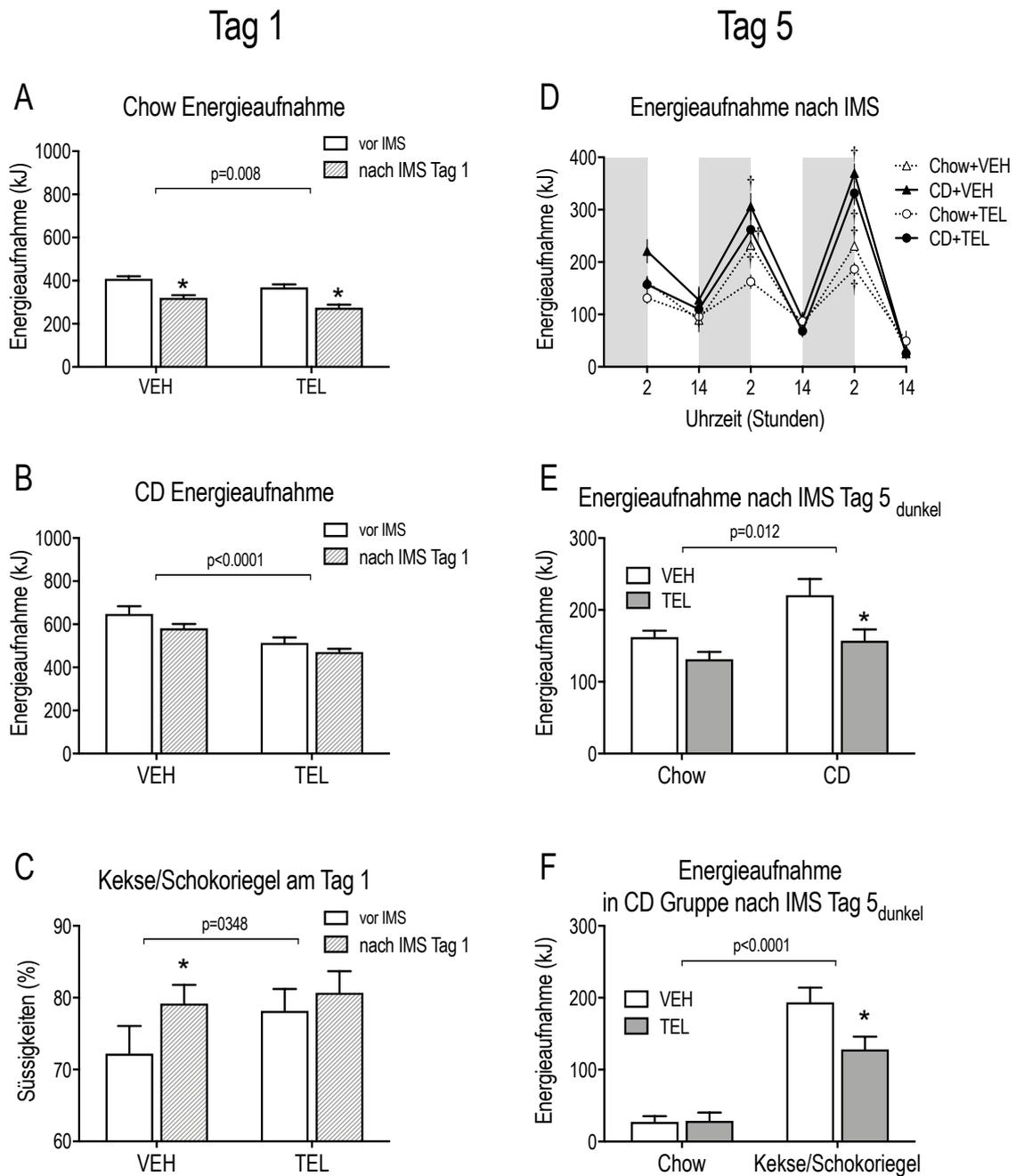


Abb. 15: Stressbedingte Energieaufnahme während 1. IMS am Tag 1 (A-C) und 5 in der ersten dunklen Phase (D-F). Mittelwert \pm SEM (n=12-14), * p < 0.05 vs. Kontrollen. † p < 0.05 vs. initialem Wert am Ende der dunklen Phase nach 1. IMS.

3.3.3. Energieaufnahme und Stressantwort nach langzeitiger TEL-Therapie

Die basale Plasmakonzentration von Corticosteron war vor dem 2. IMS (Woche 12) in den CD-gefütterten Ratten im Vergleich zu den Chow-Kontrollen erniedrigt, während kein Diäteinfluss auf ACTH beobachtet wurde. Die TEL-Therapie hatte keine Auswirkung auf die basalen Stresshormonspiegel (Tab. 8).

Tab. 8: Basale ACTH- und Corticosteronspiegel nach Chow- oder CD-Fütterung und Langzeittherapie mit TEL in Woche 10 vor 2. IMS. Mittelwert±SEM (n=11-14).

	Chow		CD		$p^{\text{Diät}}$	p^{Therapie}
	VEH	TEL	VEH	TEL		
ACTH (pg/ml)	60±6	74±9	59±6	57±3	0.315	0.788
Corticosteron (ng/ml)	161±14	168±19	110±21	67±9	<0.0001	0.276

Die stressinduzierte ACTH-Antwort war in der Chow- und der CD-Gruppe an den Tagen 1 und 5 ähnlich stark (Abb. 16A-B). Die Corticosteronkonzentration war unter der CD-Diät am Tag 1 tendenziell und am Tag 5 signifikant den Chow-Kontrollen gegenüber reduziert (Abb. 16C-D). Vergleichbar mit dem 1. IMS hatte TEL keine Auswirkung auf die Stresshormone (Abb. 16A-D). Eine Korrelationsanalyse ergab einen Zusammenhang zwischen Leptin und der basalen Corticosteronkonzentration sowie -antwort nach IMS (Abb. 17).

Der Futterverbrauch war abweichend zum 1. IMS in allen Gruppen nach dem IMS am Tag 1 und Tag 5 kleiner. Unabhängig von der Diät zeigte sich die Energieaufnahme unter TEL am Tag 5 und nicht am Tag 1 im Vergleich zu den VEH-Kontrollen reduziert (Abb. 16E-H). Der Genuss an Keksen/Schokolriegeln, gemessen als der prozentuelle CD-Anteil an der gesamten Futtermenge, war am Tag 1 in der TEL- und der VEH-Gruppe ähnlich stark. Am Tag 5 zeigte sich ein signifikanter Abfall der verzehrten Süßigkeiten unter TEL ($p=0.0049$ vs. vor IMS, Abb. 16I-J).

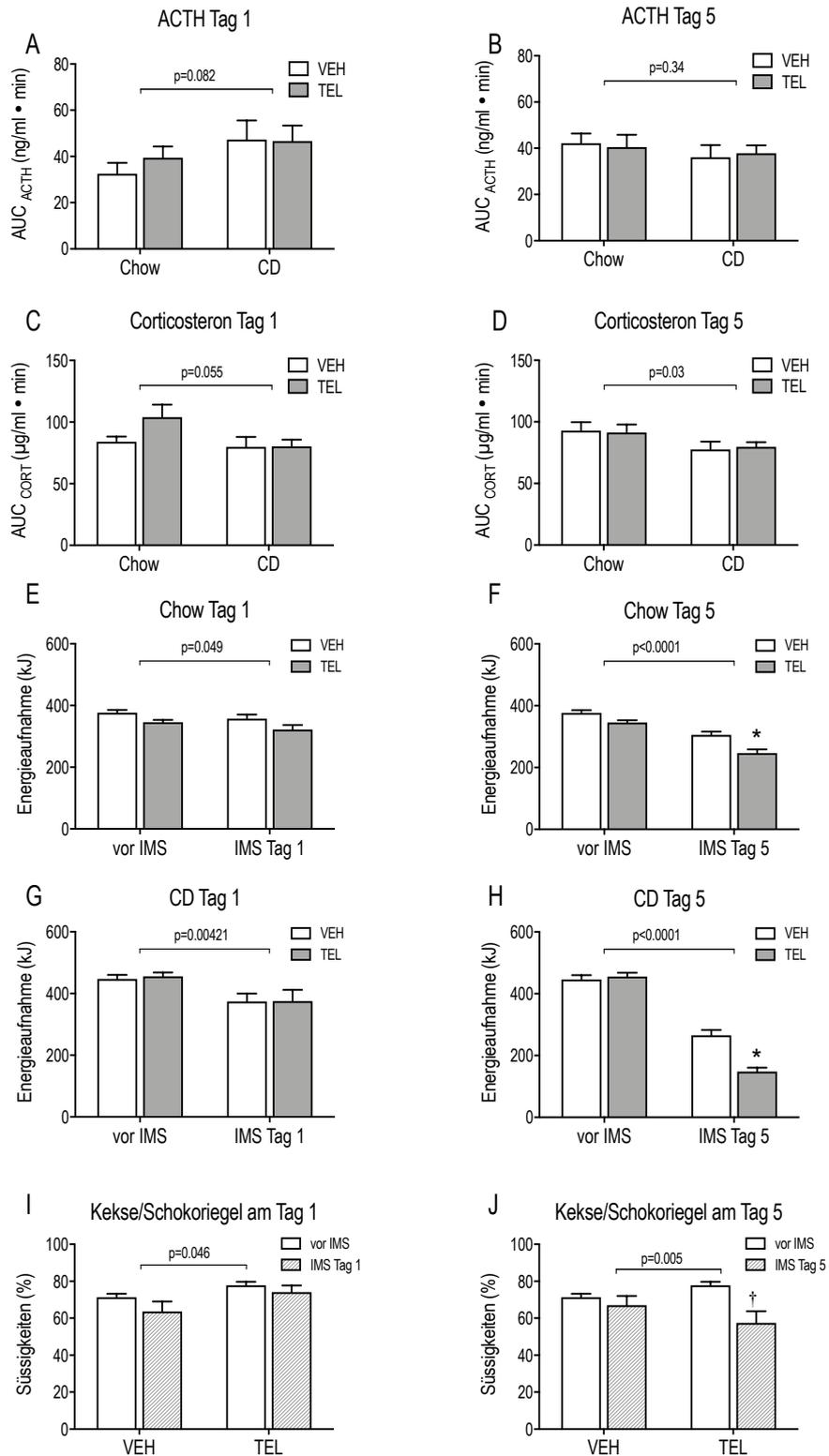


Abb. 16: ACTH- (A,B) und Corticosteronantwort (C,D), Energieaufnahme (E-H) und prozentueller Anteil an Kekse/Schokoriegel (I,J) vor und nach 2. IMS an den Tagen 1 und 5. Mittelwert \pm SEM (n=12-14), * p<0.05 vs. VEH-Kontrollen, † p<0.05 vs. vor IMS.

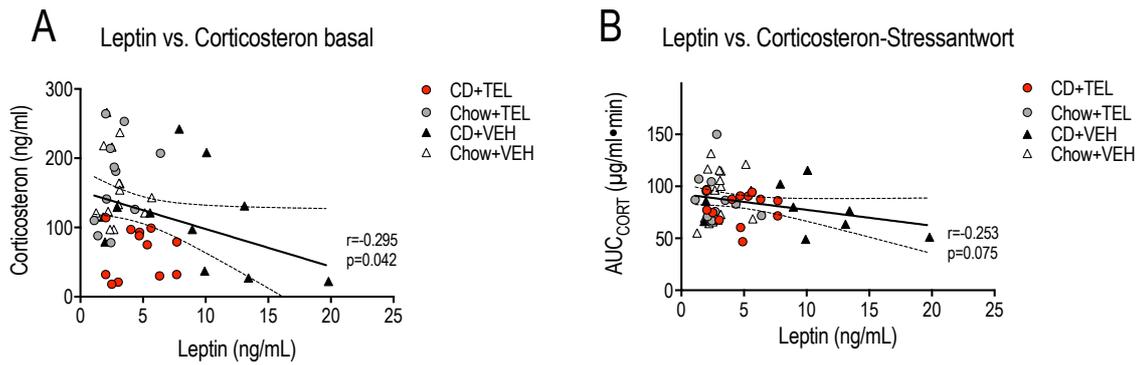


Abb. 17: Korrelation zwischen Leptin und basalem Corticosteron sowie Corticosteron-Antwort nach 2. IMS unter CD+TEL (●), CD+VEH (○), Chow+TEL (▲), Chow+VEH (△).

3.3.4.HPA-Achse

Um die TEL-Auswirkung auf die HPA-Achse zu untersuchen, wurde die AT-Rezeptorenexpression in den Organen der HPA-Achse bestimmt. Die Menge der AT1-Rezeptoren in Hypophyse und Hypothalamus war von der medikamentösen Therapie und dem Fütterungsregime unabhängig. TEL führte zu einer signifikanten Reduktion der AT1A- und AT1B-Rezeptoren in der Nebenniere. Die CD-Diät zeigte in der Nebenniere keinen zusätzlichen Effekt auf die AT1-Rezeptorenexpression (Abb. 18).

Nach TEL war die MC2-Rezeptorenexpression in der Nebenniere unabhängig von der Nahrung reduziert. Die MCH-mRNA-Menge im Hypothalamus war in allen Gruppen vergleichbar während die CRH mRNA unter Chow+TEL und CD+VEH im Vergleich zur Chow+VEH Kontrolle erhöht war. Die CD-Diät führte zu einer signifikant größeren CRH-mRNA-Menge im Hypothalamus (Tab. 9). Ang II war nach TEL deutlich erhöht, die Futterdiät hatte keinen Einfluss auf die Ang II-Konzentration (Tab. 10).

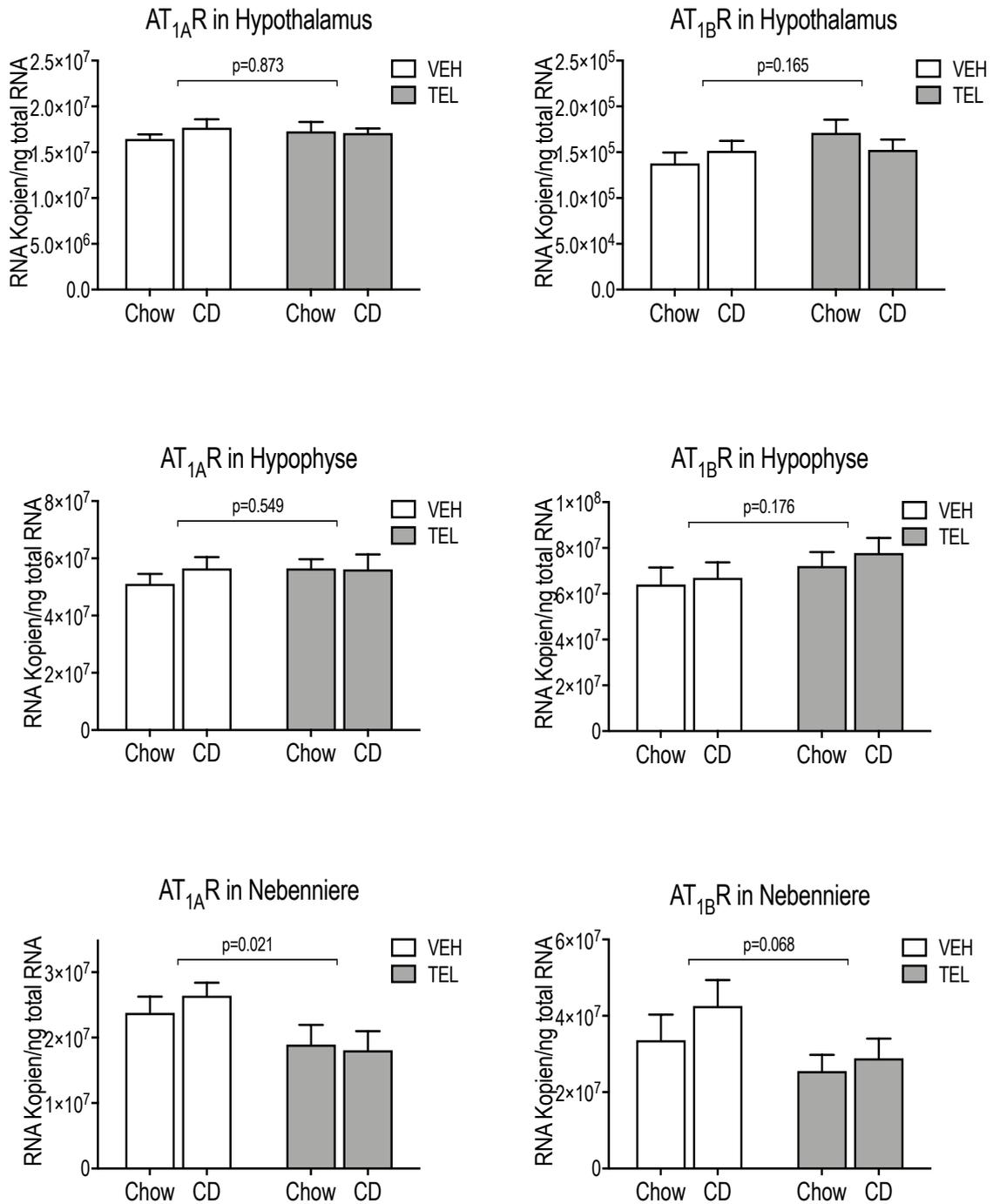


Abb. 18: AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor mRNA in der HPA-Achse. Mittelwert ± SEM (n=11-14).

Tab. 9: mRNA-Spiegel entlang der HPA-Achse, Mittelwert \pm SEM (n=11-14), * $p < 0.05$ Chow+VEH

mRNA Spiegel (RNA Kopien/ng total RNA)	Chow		CD		$p^{\text{Diät}}$	p^{Therapie}
	VEH	TEL	VEH	TEL		
Adrenaler MC2R ($\times 10^7$)	13.3 \pm 2.3	9.5 \pm 1.5	15.4 \pm 2.4	9.7 \pm 2.0	0.235	0.035
Hypothalamus MCH ($\times 10^4$)	13.8 \pm 1.2	17.1 \pm 1.4	15.1 \pm 1.1	15.3 \pm 1.1	0.839	0.165
Hypothalamus CRH ($\times 10^5$)	60.9 \pm 3.6	75.0 \pm 4.7*	79.8 \pm 4.5*	76.4 \pm 2.8	0.013	0.177

Tab. 10: Ang II-Konzentration am Ende der Studie. Mittelwert \pm SEM (n=11-14). 2-Weg-ANOVA für Diät und TEL-Therapie; $p < 0.05$ VEH vs. TEL

	Chow		CD		$F^{\text{Diät}} (p^{\text{Diät}})$	$F^{\text{TEL}} (p^{\text{TEL}})$
	VEH	TEL	VEH	TEL		
Ang II (pmol/l)	16.4 \pm 4.3	147 \pm 22 ^a	21.6 \pm 10.1	124 \pm 21 ^a	0.315 (0.577)	51.2 (<0.0001)

4. Diskussion

Ein Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses einer hochkalorischen Diät auf das Fressverhalten und auf die Stresshormonantwort unter chronischen Stressbedingungen. Sekundär sollte geklärt werden, welchen Einfluss TEL nach einer Kurzzeit- und einer Langzeittherapie auf die Stresshormonantwort und auf das stressinduzierte Fressverhalten hat. Insbesondere stand die Frage im Vordergrund, ob die Veränderungen im Fressverhalten nach einer TEL-Behandlung zu einer Stressreduktion über einen HPA-Achsen-abhängigen Mechanismus führen können.

4.1. Einfluss der CD-Diät auf chronischen Stress

Um den Einfluss einer hochkalorischen Diät auf die Stresshormone und das stressinduzierte Fressverhalten zu untersuchen, führten wir basierend auf der Arbeit von Pecoraro (Pecoraro et al., 2004) einen IMS an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durch. Um die anfängliche Gier auf das hochkalorische Essen zu stillen, wurde die hochkalorische Diät in beiden Studien bereits wenige Tage vor dem IMS-Beginn eingeführt. Pecoraro benutzte als hochkalorische Diät Schmalz und eine Saccharoselösung. In unserer Studie verwendeten wir eine CD-Diät, die aus täglich alternierenden Keksen/Schokoriegeln zusammengesetzt war. Die CD-Diät wurde von Miesel unter eigenen Laborbedingungen etabliert (Miesel et al. 2010) und seitdem in den tierexperimentellen Arbeiten der Arbeitsgruppe Raasch als hochkalorische Diät verwendet.

Unsere Studie zeigte ähnlich dem Ergebnis der Arbeit von Pecoraro, dass ein wiederholter Stresstest zu einer Reduktion der ACTH- und Corticosteron-Antwort an den Tagen 1-4 führt (Pecoraro et al., 2004). Nach zusätzlichem Schütteln am Tag 5 wurde eine Rekonstitution der stressinduzierten ACTH- und Corticosteron-Konzentration beobachtet. Dies führte zu Werten vergleichbar mit jenen am Tag 1 (Abb. 8, Tab. 5). Trotz ähnlichem Aufbau führten beide Studien teilweise aber auch zu unterschiedlichen Ergebnissen:

- Die CD-Therapie hatte sowohl nach Kurzzeit- als auch nach Langzeitbehandlung keinen Einfluss auf die basalen ACTH-Werte (Tab. 5, 7, 8). Am IMS Tag 1 wurden zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der ACTH-Antwort zwischen den Gruppen beobachtet. Der ACTH-Spiegel variierte in der CD-Gruppe am IMS Tag 5 von teilweise reduziert nach kurzer CD-Therapie bis unverändert am Ende der Studie, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert (Tab. 5, Abb. 8, 13A-B, 15A-B). Pecoraro hingegen präsentierte eine signifikante ACTH-Reduktion nach Saccharose und Schmalz an den Tagen 1 und 3.
- Die Corticosteronkonzentration war am Tag 1 in der CD-Gruppe reduziert (Tab. 5, Abb.8, 13C, 16C) während Pecoraro eine unveränderte Corticosteronantwort im Vergleich zu den Chow-Kontrollen zeigte. Übereinstimmend mit Pecoraro war die Corticosteronantwort am Tag 5 nach hochkalorischer Diät sowohl zu Beginn als auch am Ende der Studie nach wiederholtem IMS reduziert (Tab. 5, Abb. 8, 13D, 16D). Zudem waren die basalen Corticosteronwerte nach chronischer CD-Fütterung kleiner als bei den Chow-Kontrollen (Tab. 8).
- Pecoraro zeigte am Ende der Studie eine Reduktion der CRH-mRNA-Konzentration, wenn die Tiere mit der hochkalorischen Diät behandelt wurden. Die Veränderungen wurden jedoch lediglich in der Kontrollgruppe ohne Stresstest nachgewiesen. In den Stressgruppen bewirkte die Diät keine Unterschiede in der CRH-Produktion (Pecoraro et al., 2004). Nach kurzzeitiger CD-Therapie und IMS führten wir keine CRH-Analyse durch. Die CRH-mRN-Konzentration war nach chronischem IMS und CD überraschenderweise erhöht (Tab. 9).

Trotz der genannten Unterschiede deuten unsere Ergebnisse im Einklang mit Pecoraro auf einen HPA-abhängigen Mechanismus und ein negatives Feedback auf die HPA-Achse durch die hochkalorische Diät während der chronischen Stressbelastung hin. Diese Hypothese wird durch den Nachweis einer Korrelation zwischen ACTH- und Corticosteronantwort, sowie zwischen Corticosteronantwort und der Futteraufnahme verstärkt (Abb. 8). Warum es sowohl Pecoraro als auch uns nicht gelungen ist, eine erwartete Hemmung auf alle HPA-Achsenebenen eindeutig nachzuweisen, ist unklar.

Pecoraro erklärte diskrepante Ergebnisse bezüglich der CRH-, ACTH- und Corticosteronantwort mit einer HPA-Achsendysregulation durch Anwendung der heterotypen Stressarten. Zudem wurde eine Gewöhnungsreaktion an Stress diskutiert (Pecoraro et al., 2004). Übereinstimmend mit Pecoraro wurde chronischer Stress in der Literatur mit einer reduzierten Neuronenfähigkeit zum Aufbau transkriptioneller Antworten assoziiert, was wahrscheinlich durch Vasopressin vermittelt wird und von der Corticosteronkonzentration abhängig ist (Pinnock und Herbert, 2001). Widersprüchlich zu Pecoraro und im Einklang mit unseren Daten, war chronischer Stress wiederholt in der Lage über eine Reihe konvergenter Mechanismen die PVN-Neuronen anzutreiben und die Produktion von Arginin-Vasopressin (Herman und Tasker, 2016) und CRH (Levin et al., 2000; Herman und Tasker, 2016; Makino et al., 1995) zu verstärken und somit die HPA-Achsenreaktion aufrechtzuerhalten. In diesem Zusammenhang war die hormonelle Antwort in beiden Studien möglicherweise durch die wiederholte Stressexposition und die unterschiedliche CD-Behandlungsdauer beeinflusst: während die Hirnuntersuchung in Pecoraros Studie nach ca. 2 Wochen erfolgte, wurden die Hirnproben in unserer Studie nach insgesamt 12 Wochen entnommen und die Tiere zweimalig mit IMS exponiert.

Trotz nachgewiesener höherer CRH-mRNA-Menge scheint eine vermehrte Aktivierung der HPA-Achse durch CRH nach einer Langzeit-CD-Behandlung weniger wahrscheinlich zu sein (Tab. 6), da die Stresshormonwerte im Rahmen des 2. IMS sowohl basal als auch nach dem Stress mit den Chow-Kontrollen vergleichbar oder reduziert waren (Tab. 8, Abb. 16). Zudem blieb die Menge der AT1A- und AT1B- sowie der MC2-Rezeptoren in der Nebenniere (Abb. 18, Tab. 9), welche eine große Rolle für die ACTH-induzierte Corticosteronproduktion spielt (Boston und Cone, 1996), trotz erhöhter CRH-mRNA-Konzentration unverändert.

Möglicherweise könnten nicht die Glukokortikoide selbst, sondern ein peripheres metabolisches Signal eine Auswirkung auf die HPA-Achse haben (Laugero et al., 2001, Pecoraro et al., 2004). Ein hoher Leptinspiegel, aufgrund einer Leptin- oder Leptinrezeptorresistenz, ging in den tierexperimentellen Studien neben Adipositas mit einem Hypercortisolismus, sowie mit einer erhöhten Stresssensitivität einher (Cohen et al., 2001, Müller et al., 2007). Unsere CD-Tiere entwickelten eine Adipositas (Abb. 11, 15), die Leptinkonzentration war in der CD-Gruppe erhöht (Abb. 10), die stressinduzierte Corticosteronantwort hingegen war nach CD geringer als

nach Chow (Tab. 5, Abb. 8, 13, 16). Aufgrund einer negativen Korrelation zwischen Corticosteron- und Leptinkonzentration (Abb. 17) und einer bekannten, HPA-Achse hemmenden Wirkung durch einen adrenergen sowie orexigenen Mechanismus (Ahima et al., 1996, Bornstein et al., 1997, Heiman et al., 1997, Clark et al., 2008, Bonnavion et al., 2015), kommt ein Leptin-abhängiger Signalweg als weiterer Mechanismus zur Linderung der Stressreaktion in Frage.

4.2. Einfluss von Stress auf die Energieaufnahme

In Übereinstimmung mit den bereits publizierten Ergebnissen anderer Autoren (Armario et al., 1984 und 1990, Diane et al., 2008, Marti et al., 1994, Meerlo et al., 1996) war die stressgetriggerte Energieaufnahme reduziert, wenn die Tiere mit Chow gefüttert wurden (Abb. 14, 15). Eine negative Korrelation zwischen Corticosteronantwort und Energieaufnahme legte ebenfalls die stressbedingte Abnahme der verzehrten Futtermenge nach IMS Tag 1 nahe (Abb. 8). Am Tag 5 hingegen wurde die Korrelation zwischen Corticosteronantwort und Energieaufnahme positiv (Abb. 8). Im Einklang mit der Theorie von Dallmann über eine veränderte Präferenz für kalorien- und fettreiche Nahrung während einer Stresssituation waren die gesamte Futtermenge sowie der Anteil an Keksen/Schokoriegeln in den CD-Gruppen erhöht (Abb. 15E-F, Dallmann et al., 2004). Aufgrund der gleichzeitigen Reduktion der ACTH- und Corticosteronantwort ist der Verzehr einer hochkalorischen Diät als ein Mechanismus für Stresskompensation nach CD-Behandlung möglich (Pecoraro et al., 2004).

Die Ergebnisse aus dem ersten Studienteil sowie jene nach chronischer CD-Behandlung während des 2. IMS im zweiten Studienteil wichen teilweise von der Theorie von Dallmann und Pecoraro ab. Sie zeigten wie die Arbeitsgruppe Zeeni eine Reduktion der Futteraufnahme nach chronischem Stress unabhängig von der Diät (hochkalorisch (HC), fettreich (HF), CD) (Abb. 7, Abb. 16, Zeeni et al., 2013). In den genannten Abschnitten unserer Studie war die Futterzusammensetzung bezüglich der Chow- und CD-Menge in der Stresssituation unverändert (Abb. 7, Abb. 16). Zeeni präsentierte hingegen eine CD-Reduktion während des Stress-tests. Der prozentuale Anteil einer schwachen Saccharoselösung (1%) am gesamten Flüssigkeitsverzehr war in der CD-, jedoch nicht in der HC- oder HF- Gruppe

erhöht. Möglicherweise ist die erhaltene Saccharosepräferenz in der CD-Gruppe als Zeichen einer persistierenden Hedonie während der Stressphase zu interpretieren (Zeeni et al. 2013). Verstärkt wird diese Hypothese durch unsere Beobachtung, dass der CD-Anteil trotz einer mehrtätigen Stressbelastung durchgehend mehr als 60% der gesamten Nahrungsaufnahme betrug (Abb. 7B, 15C+F, 16I-J). Die Präferenz für eine hochkalorische Diät wurde auch nach einem Fußschockstress beobachtet, die Chow-Aufnahme hingegen war geringer (Ortolani et al., 2011). Es wird davon ausgegangen, dass weniger die Suche nach einer Belohnung, sondern eher ein erhöhtes Verlangen nach schmackhaftem Essen während einer chronischen Stressexposition zu einer Hyperphagie führt (Willner et al., 1998).

Die aufgeführten Erkenntnisse der eigenen und die der anderen Arbeitsgruppen stehen im Konflikt mit der „Anhedonie-Hypothese“, welche chronischen Stress als appetitreduzierenden Faktor beschreibt. Danach wird die Aufmerksamkeitszuwendung für den belohnenden Stimuli während einer Stresssituation gehemmt (Willner et al., 1992). Übereinstimmend mit dieser Hypothese konnte eine Reduktion der Nahrungsaufnahme wiederholt in tierexperimentellen Arbeiten gezeigt werden (Sahin Ozkartal et al. 2018, Page et al., 2016, Willner et al., 1992). Die widersprüchlichen Ergebnisse in den Studien sind zumindest teilweise mit den unterschiedlichen Diätregimen zu erklären. Die Heterogenität der hochkalorischen Diäten umfasste eine Kekse-/Schokoriegelauswahl (Zeeni et al. 2013), Schmalz und Saccharoselösung (Pecoraro et al., 2004, Page et al., 2016, Willner et al., 1992 und 1998, Ozkartal et al. 2018, Zeeni et al. 2013) sowie eine HF- und HC-Diät, welche einen Einfluss auf Geschmack und Stoffwechsel haben könnten (Zeeni et al. 2013). Möglicherweise ist zusätzlich der Zuckergehalt im Futter von Bedeutung, weil die Ratten eine Lösung mit einer mittleren Saccharosekonzentration den Lösungen mit niedrigeren und höheren Konzentrationen nach chronischem mildem Stress bevorzugten (Willner et al., 1998). In einer anderen Arbeit verzehrten die Ratten während einer dreiwöchigen Stressphase weniger HF, Schokolade und Erdnussbutter. Die Menge der verzehrten Kekse blieb im Vergleich zu den initialen Ausgangswerten in der Ruhephase jedoch unverändert. Wahrscheinlich spielte hier die Textur der Kekse und nicht aber der Zuckergehalt für den Geschmack eine übergeordnete Rolle, da die Kekse weniger süß waren als die anderen Diätarten (Zeeni et al. 2013). Darüber hinaus wird vermutet, dass der Typ des

Stressors und seine Dauer die Nahrungsaufnahme auf verschiedene Weise beeinflussen könnte (Ortolani et al., 2011). Zudem sind Geschlechtsunterschiede in der Literatur beschrieben, da männliche Ratten mehr Schokolade nach Stressexposition verzehrten als die Weibchen (Krolow et al., 2010). Die Geschlechtsunterschiede sind jedoch hier wahrscheinlich weniger von Bedeutung, weil sowohl durch uns als auch durch andere Gruppen fast ausschließlich männliche Ratten verwendet wurden (Pecoraro et al., 2004, Willner et. al, 1992 und 1998, Ozkartal et al. 2018, Zeeni et al. 2013). Lediglich in einer der Studien wurden die Ratten der beiden Geschlechter untersucht (Page et al., 2016).

4.3. Allgemeine TEL-Effekte

Chronische TEL-Behandlung führte zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme und zu einem erhöhten Energieverbrauch. Zudem zeigte TEL einen positiven Einfluss auf den Blutglukosespiegel, verbesserte die Leptinsensitivität und ging mit einer erhöhten Ang II-Konzentration einher. Somit war das Endgewicht der TEL-Ratten trotz CD-Diät vergleichbar mit dem Gewicht der Chow/VEH-Kontrollen (Abb. 10-12, Tab. 10). Die beobachteten metabolischen Veränderungen stehen im Einklang mit den früheren Studien der eigenen Arbeitsgruppe (Miesel et al., 2012; Müller-Fielitz et al., 2011, 2012a, 2014, 2015; Schuchard et al., 2015; Schuster et al., 2018; Winkler et al., 2016).

Neben der reduzierten Futterraufnahme ist das geringere, finale Gewicht möglicherweise durch die Veränderungen im Fettgewebe nach der TEL-Therapie zu erklären. Sowohl durch die eigene Arbeitsgruppe als auch durch andere wurde wiederholt eine antiadipöse TEL-Wirkung auf die Adipozytengröße und die Fettgewebsmasse beschrieben (Chujo et al., 2007; Fujita et al., 2007; Müller-Fielitz et al., 2012; Sugimoto et al., 2006; Zorad et al., 2006). In einer Arbeit von Müller-Fielitz aus der eigenen Arbeitsgruppe wurde eine erhöhte Fettverbrennung und Lipolyse durch TEL vermutet, was in einer RER-Reduktion resultiert. In unserer Studie war RER in den CD-Gruppen während der Lichtphasen kleiner. Die TEL-induzierte RER-Reduktion blieb im Gegensatz zu Müller-Fielitz aus, was eine Fettverbrennung und Lipolyse durch TEL in Frage stellt (Abb. 15, Müller-Fielitz et al., 2014). Eine erhöhte Aktivität der Tiere scheint für das Wachstum und die Metabolik weni-

ger von Bedeutung zu sein, da TEL keinen Einfluss auf die Lokomotion hatte (Abb. 12, 15). In der Literatur wird die Lokomotion nach TEL sowohl erhöht (Schuchard et al., 2015) als auch unverändert (Müller-Fielitz et al., 2014; Sugimoto et al., 2006) beschrieben.

Im Gegensatz zu unseren früheren Ergebnissen, welche ein reduziertes Organwachstum nach TEL zeigten, blieb die Organgröße, abgesehen vom linken Ventrikel, durch TEL unverändert (Tab. 6). Die Reduktion des linken Ventrikels nach TEL wurde sowohl in den klinischen als auch in den tierexperimentellen Arbeiten beschrieben, was mit einer Blutdruckreduktion einherging (Misra et al., 2013; Müller-Fielitz et al., 2014; Schuchard et al., 2015)

Trotz gewisser Abweichungen war der antiadipöse TEL-Effekt im Einklang mit unseren früheren Studien deutlich ersichtlich, was wiederholt die Robustheit und die gute Eignung des von uns verwendeten Tiermodells für die Forschung im Bereich der Adipositas und des metabolischen Syndroms zeigt. In den folgenden Abschnitten werden allgemeine TEL-Effekte deswegen nicht erneut diskutiert und der Schwerpunkt stattdessen auf die TEL-Wirkung im Zusammenhang mit chronischem Stress gelegt.

4.4. TEL-Einfluss auf chronischen Stress

Nach zweiwöchiger Behandlung gab es keine Unterschiede in den basalen ACTH- und den Corticosteronwerten zwischen der TEL- und der VEH-Gruppe vor dem 1. IMS (Tab. 7). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die eine unveränderte Konzentration der Stresshormone bei variierender Therapiedauer (3, 5, 12 Wochen), Diät (Chow oder CD) oder Rattenstamm (spontanhypertensive (SHR) oder Wistar-Ratten) unter TEL-Therapie zeigen konnten (Raasch et al. 2006, Miesel et al., 2012, Müller-Fielitz et al., 2012, Wincewicz et al., 2016). Eine chronische TEL-Therapie führte zu einer Reduktion der basalen Corticosteronwerte (Tab. 8). Andere Arbeiten zeigten sowohl reduzierte als auch erhöhte Stresshormonkonzentrationen nach ARB (Seltzer et al. 2004, Sanchez-Lemus et al. 2012). Es ist möglich, dass die Heterogenität der Ergebnisse bei den unterschiedlichen Tierstämmen im Zusammenhang mit der zirkadianen Rhythmik der Stresshormone steht. Im Gegensatz zu Menschen zeigen SD-Ratten die höchste Kon-

zentration der Stresshormone um 16 Uhr und die tiefsten Werte um 6 Uhr (Bertani et al., 2010). In einer weiteren Studie haben SHR- und Wistar-Ratten einen stammspezifischen zirkadianen Rhythmus bewiesen, welcher von der Lichtintensität abhängig war (Rosenwasser, 1992). Zudem sind der Umgebungswechsel für die Blutentnahme und die Blutentnahme selbst als zusätzliche Stressoren zu betrachten, welche unterschiedliche ACTH- und Corticosteronwerte zumindest teilweise erklären könnten.

Die Mengen der AT1- und MCH2-Rezeptoren waren in der Nebenniere nach zwölfwöchiger TEL-Therapie reduziert (Tab. 9). Übereinstimmend wird in der Literatur eine HPA-Achsenhemmung durch ARB nach CRH-Injektion, forciertem Schwimmtest, Inflammationsstress sowie nach akuter und chronischer Immobilisation (Raasch et al. 2006, Miesel et al. 2012, Müller-Fielitz et al. 2012, Wincewicz et al. 2016) beschrieben. Entgegen unseren Erwartungen blieb die Hemmung der stressinduzierenden ACTH- und Corticosteron-Antwort in den TEL-Gruppen sowohl nach einem kurzen als auch nach einem langen Behandlungszeitraum aus (Abb. 13, 16, 18). Nachfolgend werden mögliche Ursachen für die fehlende Stressreduktion nach TEL diskutiert:

- Die mangelnde TEL-Wirkung auf die Stressachse könnte möglicherweise durch den leptinabhängigen Mechanismus erklärt werden, da die Langzeittherapie mit TEL mit einer normalisierten Leptinkonzentration einherging (Abb. 10C). Diese Annahme widerspricht jedoch unserer vorherigen Diskussion (siehe oben) und den Literaturangaben, wonach Leptin eine HPA-hemmende Wirkung hat (Ahima et al., 1996, Bernstein et al., 1997, Heiman et al. 1997, Clark et al., 2008, Bonnavion et al., 2015).
- Zudem könnte ein TEL-Therapieversagen in SD-Ratten von Bedeutung sein. Jöhren hat eine höhere AT1A-Rezeptormenge in der Hypophyse der SHR-Ratten im Vergleich zu den normotensiven WKY-Ratten gezeigt. Die Ang II-Infusion erhöhte in dieser Studie den ACTH- und Corticosteronspiegel lediglich bei den SHR-Ratten, was für eine tierspezifische Rezeptorexpression und Stressanfälligkeit spricht (Jöhren et al., 2003).
- Eine reduzierte Permeabilität der Bluthirnschranken für Leptin und Glukose wurde in klinischen und tierexperimentellen Studien an den adipösen Individuen beschrieben (Banks et al., 1999, Wardzinski et al., 2018). Möglicherweise war die Bluthirnschranken-Permeabilität für TEL durch die CD-Diät

beeinflusst, da CD zu einer signifikant höheren CRH-Menge im Hypothalamus sowohl in der VEH- als auch in der TEL-Gruppe führte (Tab. 9). Gegen diesen Effekt spricht jedoch die Tatsache, dass die CRH-Menge nach TEL/Chow-Behandlung ähnlich hoch war wie in den CD-Gruppen (Tab. 9).

- Ein isolierter, peripherer Mechanismus in der Nebenniere ist ebenfalls zu betrachten, da lediglich die AT1- und MCH2-Produktion in der Nebenniere nach chronischer TEL-Therapie reduziert war. Die Menge der AT1-Rezeptoren in Hypothalamus und Hypophyse wurde nicht vom Diät- und Therapieregime beeinflusst (Abb. 18, Tab. 9). Ang II könnte hier eine Rolle spielen, weil die Ang II-Konzentration nach TEL höher war (Tab. 10) und hohe Ang II-Spiegel mit erhöhter Corticosteronantwort über einen nebennierenabhängigen Mechanismus in einer Studie assoziiert werden konnten, während die ACTH-Produktion unverändert blieb (Müller et al., 2007). Interessanterweise konnten Ang II-induzierte Veränderungen der HPA-Achse durch Losartan verhindert werden (Ortiz et al., 2010). Möglicherweise ist dies kein allgemeiner ARB-Effekt, sondern eine isolierte Eigenschaft des Losartans.
- Ob ein Ang1-7-abhängiger Mechanismus zu einer verminderten HPA-Regulation nach TEL führen könnte, ist nicht bekannt, aber möglich, da erstens die Ang1-7-Konzentration nach TEL steigt (Igase et al. 2005, Ishiyama et al. 2004) und zweitens ein hoher Ang1-7-Spiegel mit einer Reduktion der Ang II-induzierten Ausschüttung von Corticosteron über den Mas-Rezeptor-abhängigen Mechanismus assoziiert wird (Zhu et al. 2014).

4.5. Stressbedingte Energieaufnahme nach TEL-Therapie

Die Chow-Aufnahme war sowohl nach einer kurzzeitigen als auch nach einer langzeitigen TEL-Therapie kleiner. Übereinstimmend mit bereits publizierten Ergebnissen der Arbeitsgruppe bewirkte eine kurzzeitige TEL-Therapie eine Reduktion der stressbedingten Aufnahme der Kekse/Schokoriegel jedoch lediglich am IMS Tag 5 (Abb. 15, Miesel et al., 2012, Müller-Fielitz et al., 2012a). Die chronische TEL-Therapie führte während des 2. IMS sowohl in der Chow-, als auch in der CD-Gruppe zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme. Zudem war der Anteil

der Kekse/Schokoriegel an der gesamten Futteraufnahme in der CD-Gruppe nach TEL geringer. Allerdings waren diese Effekte schwach und wurden lediglich am letzten IMS-Tag beobachtet (Abb. 16). Das Wachstum war während des IMS ebenfalls nicht von TEL beeinflusst, weil die Tiere sowohl nach VEH-, als auch nach TEL unabhängig von der Diät während der beiden IMS-Phasen abgenommen haben (Abb. 9). Gegen einen gewichtsregulierenden TEL-Effekt im Stress sprechen zusätzlich der fehlende Anstieg des Energieverbrauchs, sowie die unveränderte Lokomotion nach IMS, verglichen mit den VEH-Kontrollen (Abb. 11). Literaturangaben bezüglich des TEL-Einflusses auf das stressinduzierte Fress- und Gewichtsverhalten sind rar. In der Studie von Wincewicz wurde nach chronischer Immobilisation eine abgeschwächte Corticosteronstressantwort unter TEL beobachtet. Gleichzeitig war die Gewichtsabnahme unter TEL kleiner (Wincewicz et al. 2016), was im Gegensatz zu unseren Ergebnissen auf eine TEL-induzierte Stresskompensation durch die erhöhte Futteraufnahme hindeutet und somit die Gewichtszunahme erklären könnte. Die Arbeitsgruppe Wincewicz hat die Futteraufnahme der Tiere jedoch nicht gemessen. Des Weiteren erschweren die Studiendesigns mit unterschiedlicher Tierart (SD- vs. Wistar-Ratten), IMS-Dauer (5 vs. 1 Tag) und TEL-Dosis (8 vs. 1mg/kg/Tag) die Interpretation der Ergebnisse.

5. Limitationen

Die tierexperimentelle Forschung ist essenziell für die Weiterentwicklung der medikamentösen Therapien in der Humanmedizin. Trotz eines strukturierten Designs sind den tierexperimentellen Studien Grenzen gesetzt, welche eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf ein Patientenkollektiv erschweren. Folgend werden die möglichen Limitationen unserer Studie geschildert:

- Mittels einer RER-Messung in der indirekten Kalorimetrie ist ein Rückschluss auf die Fettverbrennung möglich. In den früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Raasch zeigte sich RER nach TEL sowohl als reduziert (Müller-Fielitz et al., 2014) als auch unverändert (Schuchard et al., 2015). Die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise mit dem Messprinzip der indirekten Kalorimetrie zu erklären, welcher auf die Quantifizierung des oxidativen Verbrauchs durch die Messung von O₂ und CO₂ beruht. Eine Messung der Wärmeabgabe als Ausdruck des gesamten Energieverbrauchs ist hierbei nicht möglich, weshalb die variierenden Studienergebnisse kritisch zu betrachten sind. Eine genauere Erfassung der Wärmeabgabe könnte durch die direkte Kalorimetrie erfolgen, wobei es zurzeit noch keine kommerziellen Systeme dafür gibt. Die Messung der Wärmeabstrahlung mittels der Wärmebildkamera wäre theoretisch möglich, es ist aufgrund der ausgeprägten Behaarung der Ratten jedoch weniger praktikabel und bisher nicht etabliert.
- Die TEL-Therapie erfolgte in einer Dosierung (8 mg/kg/Tag), welche die zugelassene Konzentration für die Patienten von maximal 80mg/Tag überschreitet. Dennoch führte die Hochdosis des ARB Valsartans (320mg/Tag) in einer Studie mit den hypertensiven und diabetischen Patienten zur Reduktion des Blutdrucks und des LDL-Spiegels, ohne eines Risikoanstiegs für die unerwünschten Wirkungen (Kintscher et al., 2010). Somit ist auch eine TEL-Applikation in der höchsten Dosierung bei Patienten denkbar.
- Die Durchführung der Studie erfolgte in einem präventiven Ansatz, da die TEL-Behandlung gleichzeitig mit der CD-Diät begonnen wurde. Die Arbeitsgruppe Raasch hat in den früheren Arbeiten jedoch auch ein kuratives Studiendesign verwendet. In einer Studie führte TEL nach einer 19-

wöchigen CD-Diät zu einer Reduktion des Körpergewichts, der leptin-induzierten Energieaufnahme und des abdominalen Fettgewebes. Zudem kam es nach der TEL-Therapie zu den normalisierten Plasmaspiegeln der Triglyceride, der freien Fettsäuren und des LDL-Cholesterins sowie zu einer Wiederherstellung der Leptinsensitivität und der physiologischen Glukoseutilisation (Müller-Fielitz et al., 2014). Daraus schließen wir, dass auch unsere Ergebnisse in einem kurativen Ansatz erzielt werden könnten.

- Der prozentuelle CD-Anteil an der gesamten Futtermenge war während des IMS im ersten Studienteil, sowie während des IMS am Ende des zweiten Versuchsteils im Vergleich zu den nicht gestressten Kontrolltieren, sowie den Werten in Ruhe unverändert. Die Ergebnisse im zweiten Studienteil präsentierten hingegen eine höhere CD-Aufnahme während des 1. IMS, trotz der unveränderten Futterzusammensetzung und Laborbedingungen. Diese Diskrepanz ist möglicherweise mit dem leicht abweichenden Design in den beiden Studienabschnitten zu erklären, da im zweiten Studienteil keine Kontrollgruppen mit den nicht gestressten Tieren gebildet wurden. Die erfasste Futteraufnahme an vier Tagen vor der ersten und der zweiten IMS-Phase dienten als Ruhekontrolle. Dieser Entscheidung beruhte auf den Ergebnissen von Pecoraro (Pecoraro et al., 2004) mit einer konstanten Futteraufnahme vor und während des IMS in den Kontrollgruppen, welche nicht mit IMS exponiert wurden.

Trotz des Nachweises einer reduzierten Nahrungsaufnahme durch TEL im Vergleich zu den VEH-Kontrollen kam es während des IMS sowohl nach einer kurzzeitigen als auch nach einer langzeitigen TEL-Behandlung nicht zu einer HPA-Achsenhemmung. Eine Reduktion der kompensatorischen Nahrungsaufnahme im Stress konnte somit nicht mit dem HPA-achsenmodulierenden Effekt der ARB-Therapie erklärt werden. In der Zukunft werden weitere Studien über die Möglichkeiten der Appetit- und Stressregulation durchgeführt werden müssen, um eine bessere Prävention und eine effektivere Behandlung der Adipositas zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Chronischer Stress wird mit einer gesteigerten Aufnahme hochkalorischer Nahrung assoziiert. Der Mechanismus der Stresskompensation ist nicht ganz verstanden, es wird eine Modulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) durch hochkalorische Nahrung im Stress vermutet. Vor dem Hintergrund, dass die AT1-Blocker (ARB) antiadipös wirken und die HPA-Achse modulieren können, trafen wir die Annahme, dass ARB eine Reduktion des chronischen Stresses und der kompensatorischen Nahrungsaufnahme bewirken können.

In dem ersten Versuchssteil wurden SD-Ratten mit Standard- (Chow) oder hochkalorischer Diät (CD) behandelt. An fünf aufeinanderfolgenden Tagen erfolgte ein Immobilisationsstresstest (IMS) über 4 Stunden pro Tag mit einem zusätzlichen Schütteln am Tag 5. In dem zweiten Versuchssteil wurden die Tiere zusätzlich mit Telmisartan (TEL, 8mg/kg/Tag) oder Vehikel (=Kontrolle) behandelt. IMS wurde nach 2 Wochen und erneut nach 3 Monaten TEL-Therapie durchgeführt. Zur Quantifizierung der Stressantwort wurden Hirn- und regelmäßige Blutproben verwendet. Neben manueller Gewichts- und Futterkontrolle diente indirekte Kalorimetrie zur Messung der Energieaufnahme und des -verbrauchs.

Zu den wichtigsten Erkenntnissen der Studie zählt eine reduzierte Corticosteronantwort während der chronischen Stressexposition sowohl nach kurzer, als auch nach langer CD-Behandlung, was teilweise mit erhöhter Nahrungsaufnahme einherging. TEL bewirkte eine Reduktion der Nahrungsaufnahme und des CD-Anteils an der gesamten Futteraufnahme unter chronischen Stressbedingungen. Dieser Effekt war von der Therapiedauer abhängig und nach einer kurzen Behandlung stärker zu beobachten. Unabhängig von der Therapiedauer hatte TEL keinen Einfluss auf die Stressreduktion.

Wir schließen aus unseren Ergebnissen, dass eine erhöhte Aufnahme der hochkalorischen Diät zur Stresskompensation führen kann. Eine Reduktion der kompensatorischen Nahrungsaufnahme im Stress beruht, wenn überhaupt, nur zu einem geringen Anteil auf dem HPA-Achsen-modulierenden Effekt der ARB-Therapie.

7. Literaturverzeichnis

Aguilera, G., Kiss, A., Luo, X. (1995). Increased Expression of Type 1 Angiotensin II Receptors in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus following Stress and Glucocorticoid Administration. *Journal of Neuroendocrinology* 7: 775–783.

Ahima, R.S., Flier, J.S. (2000). Leptin. *Annual Review of Physiology* 62: 413–437.

Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., Flier, J.S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250–252.

Alberti, K.G.M.M., Eckel, R., Grundy, S., Zimmet, P., Cleeman, J.I., Donato, K., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M., Smith, S. C., Jr. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120: 1640–1645.

Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P. (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. *Diabetic Medicine* 15: 539–553.

Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P., Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *The Lancet* 366: 1059–1062.

Andrade, J.M.O., Lemos, F. de O., Fonseca Pires, S. da, Millán, R.D.S., Sousa, F.B. de, Guimarães, A.L.S., Qureshi, M., Feltenberger, J. D., de Paula, A. M., Neto, J. T., Lopes, M. T., Andrade, H. M., Santos, R. A., Santos, S. H. (2014). Proteomic white adipose tissue analysis of obese mice fed with a high-fat diet and treated with oral angiotensin-(1–7). *Peptides* 60: 56–62.

Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S., Bastard, J.-P. (2008). Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 34: 2–11.

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

- Armando, I., Volpi, S., Aguilera, G., Saavedra, J.M. (2007). Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents the hypothalamic corticotropin- releasing factor response to isolation stress. *Brain Res* 1142: 92–99.
- Armario, A., Castellanos, J.M., Balasch, J. (1984). Effect of Crowding on Emotional Reactivity in Male Rats. *NEN* 39: 330–333.
- Armario, A., Marti, J., Gil, M. (1990). The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* 15: 341–347.
- Bali, A., Jaggi, A.S. (2013). Angiotensin as stress mediator: Role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. *Pharmacological Research* 76: 49–57.
- Banks, W.A., DiPalma, C.R., Farrell, C.L. (1999). Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity☆. *Peptides* 20: 1341–1345.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., Maness, L.M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17: 305–311.
- Bastard, J.-P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., Feve, B. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network* 17: 4–12.
- Bays, H.E., González-Campoy, J.M., Henry, R.R., Bergman, D.A., Kitabchi, A.E., Schorr, A.B., Rodbard, H.W. (2008). Is adiposopathy (sick fat) an endocrine disease? *Int J Clin Pract* 62: 1474–1483.
- Bell, M.E., Bhatnagar, S., Liang, J., Soriano, L., Nagy, T.R., Dallman, M.F. (2000). Voluntary sucrose ingestion, like corticosterone replacement, prevents the metabolic deficits of adrenalectomy. *Journal of Neuroendocrinology* 12: 461–470.
- Bergsma, D.J., Ellis, C., Kumar, C., Nuthulaganti, P., Kersten, H., Elshourbagy, N., Griffin, E., Stadel, J.M., Aiyar, N. (1992). Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 989–995.
- Bertani, S., Carboni, L., Criado, A., Michielin, F., Mangiarini, L., Vicentini, E. (2010). Circadian Profile of Peripheral Hormone Levels in Sprague-Dawley Rats and in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). *In Vivo* 24: 827–836.

- Bhatnagar, S., Bell, M.E., Liang, J., Soriano, L., Nagy, T.R., Dallman, M.F. (2000). Corticosterone facilitates saccharin intake in adrenalectomized rats: does corticosterone increase stimulus salience? *Journal of Neuroendocrinology* 12: 453–460.
- Blanke, K., Schlegel, F., Raasch, W., Bader, M., Dähnert, I., Dhein, S., Salameh, A. (2015). Effect of Angiotensin(1-7) on Heart Function in an Experimental Rat Model of Obesity. *Frontiers in Physiology* 6:(165):392.
- Block, J.P., He, Y., Zaslavsky, A.M., Ding, L., Ayanian, J.Z. (2009). Psychosocial Stress and Change in Weight Among US Adults. *American Journal of Epidemiology* 170: 181–192.
- Bogers, R.P., Bemelmans, W.J.E., Hoogenveen, R.T., Boshuizen, H.C., Woodward, M., Knekt, P., van Dam, R.M., Hu, F.B., Visscher, T.L., Menotti, A., Thorpe, R.J., Jr., Jamrozik, K., Calling, S., Strand, B.H., Shipley, M.J. (2007). Association of overweight with increased risk of coronary heart disease partly independent of blood pressure and cholesterol levels: a meta-analysis of 21 cohort studies including more than 300 000 persons. *Arch. Intern. Med.* 167: 1720–1728.
- Bonnavion, P., Jackson, A.C., Carter, M.E., and Lecea, L. de (2015). Antagonistic interplay between hypocretin and leptin in the lateral hypothalamus regulates stress responses. *Nature Communications* 6: 6266.
- Bornstein, S.R., Uhlmann, K., Haidan, A., Ehrhart-Bornstein, M., Scherbaum, W.A. (1997). Evidence for a Novel Peripheral Action of Leptin as a Metabolic Signal to the Adrenal Gland: Leptin Inhibits Cortisol Release Directly. *Diabetes* 46: 1235–1238.
- Boston, B.A., Cone, R.D. (1996). Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* 137: 2043–2050.
- Boustany, C.M. (2004). Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287: 943–949.
- Brink, M., Wellen, J., Delafontaine, P. (1996). Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *J Clin Invest* 97: 2509–2516.
- Brown, C.D., Higgins, M., Donato, K.A., Rohde, F.C., Garrison, R., Obarzanek, E., Ernst, N.D., Horan, M. (2000). Body Mass Index and the Prevalence of Hypertension and Dyslipidemia. *Obesity Research* 8: 605–619.

Burnier, M., Maillard, M. (2001). The comparative pharmacology of angiotensin II receptor antagonists. *Blood Press Suppl* 1: 6–11.

Cassis, L., Helton, M., English, V., Burke, G. (2002). Angiotensin II regulates oxygen consumption. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282: R445–R453.

Chiu, A.T., Dunscomb, J., Kosierowski, J., Burton, C.R., Santomenna, L.D., Corjay, M.H., Benfield, P. (1993). The ligand binding signatures of the rat AT1A, AT1B and the human AT1 receptors are essentially identical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 440–449.

Cho, L.W. (2011). Metabolic syndrome. *Singapore Med J* 52: 779–785.

Chujo, D., Yagi, K., Asano, A., Muramoto, H., Sakai, S., Ohnishi, A., Shintaku-Kubota, M., Mabuchi, H., Yamagishi, M., Kobayashi, J. (2007). Telmisartan treatment decreases visceral fat accumulation and improves serum levels of adiponectin and vascular inflammation markers in Japanese hypertensive patients. *Hypertens. Res.* 30: 1205–1210.

Clark, K.A., Shin, A.C., Sirivelu, M.P., MohanKumar, S.M.J., and MohanKumar, P.S. (2008). Systemic administration of leptin decreases plasma corticosterone levels: Role of hypothalamic norepinephrine. *Brain Research* 1195: 89–95.

Cohen, P., Zhao, C., Cai, X., Montez, J.M., Rohani, S.C., Feinstein, P., Mombaerts, P., Friedman, J.M. (2001). Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J. Clin. Invest.* 108: 1113–1121.

Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohanesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334: 292–295.

Dallman, M.F., Fleur, S.E. la, Pecoraro, N.C., Gomez, F., Houshyar, H., Akana, S.F. (2004). Mini-review: Glucocorticoids—Food Intake, Abdominal Obesity, and Wealthy Nations in 2004. *Endocrinology* 145: 2633–2638.

Dallman, M.F., Pecoraro, N., Akana, S.F., La Fleur, S.E., Gomez, F., Houshyar, H., Bell, M.E., Bhatnagar, S., Laugero, K.D., Manalo, S. (2003). Chronic stress and obesity: a new view of “comfort food”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 11696–11701.

Dapper, C., Schuster, F., Stölting, I., Vogt, F., Castro e Souza, L.A., Alenina, N., Bader, M., Raasch, W. (2019). The antiobese effect of AT1 receptor blockade is augmented in mice lacking Mas. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (akzeptiert).

Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K.C., and Tasker, J.G. (2003). Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J. Neurosci.* 23: 4850–4857.

Diane, A., Victoriano, M., Fromentin, G., Tome, D., Larue-Achagiotis, C. (2008). Acute stress modifies food choice in Wistar male and female rats. *Appetite* 50: 397–407.

Ekman, P. (1992). Are there basic emotions? *Psychol Rev* 99: 550–553.

El-Haschimi, K., Pierroz, D.D., Hileman, S.M., Bjørbæk, C., Flier, J.S. (2000). Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 105: 1827–1832.

Elton, T.S., Stephan, C.C., Taylor, G.R., Kimball, M.G., Martin, M.M., Durand, J.N., Oparil, S. (1992). Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184: 1067–1073.

Engeli, S., Negrel, R., and Sharma, A.M. (2000). Physiology and Pathophysiology of the Adipose Tissue Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 35: 1270–1277.

Epel, E., Jimenez, S., Brownell, K., Stroud, L., Stoney, C., and Niaura, R. (2004). Are Stress Eaters at Risk for the Metabolic Syndrome? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1032: 208–210.

Fischer, M. (2002). Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* 53: 672–677.

Flegal, K.M., Kit, B.K., Orpana, H., Graubard, B.I. (2013). Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 309: 71–82.

Fujita, K., Yoneda, M., Wada, K., Mawatari, H., Takahashi, H., Kirikoshi, H., Inamori, M., Nozaki, Y., Maeyama, S., Saito, S., Iwasaki, T., Terauchi, Y, Nakajima A. (2007). Telmisartan, An Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker, Controls Progress of Nonalcoholic Steatohepatitis in Rats. *Dig Dis Sci* 52: 3455–3464.

Gasparo, M. de, Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52: 415–472.

Goeders, N.E. (1997). A neuroendocrine role in cocaine reinforcement. *Psychoneuroendocrinology* 22: 237–259.

Goossens, G.H., Blaak, E.E., Arner, P., Saris, W.H.M., Baak, M.A. van (2007). Angiotensin II: a hormone that affects lipid metabolism in adipose tissue. *International Journal of Obesity* 31: 382–384.

Harding, J.L., Backholer, K., Williams, E.D., Peeters, A., Cameron, A.J., Hare, M.J., Shaw, J.E., Magliano, D.J. (2014). Psychosocial stress is positively associated with body mass index gain over 5 years: evidence from the longitudinal AusDiab study. *Obesity (Silver Spring)* 22: 277–286.

Harte, A., McTernan, P., Chetty, R., Coppack, S., Katz, J., Smith, S., Kumar, S. (2005). Insulin-Mediated Upregulation of the Renin Angiotensin System in Human Subcutaneous Adipocytes Is Reduced by Rosiglitazone. *Circulation* 111: 1954–1961.

Haynes, W.G., Morgan, D.A., Walsh, S.A., Mark, A.L., Sivitz, W.I. (1997). Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *Journal of Clinical Investigation* 100: 270–278.

Heiman, M.L., Ahima, R.S., Craft, L.S., Schoner, B., Stephens, T.W., Flier, J.S. (1997). Leptin Inhibition of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Response to Stress. *Endocrinology* 138: 3859–3863.

Herman, J.P., and Tasker, J.G. (2016). Paraventricular Hypothalamic Mechanisms of Chronic Stress Adaptation. *Frontiers in Endocrinology* 7:137.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 11: 1026–1030.

Huber, G., Schuster, F., Raasch, W. (2017). Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Pharmacol. Res.* 125: 72–90.

Hubert, H.B., Feinleib, M., McNamara, P.M., Castelli, W.P. (1983). Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 67: 968–977.

Igase, M., Strawn, W.B., Gallagher, P.E., Geary, R.L., Ferrario, C.M. (2005). Angiotensin II AT₁ receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1–7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289: H1013–H1019.

Ishiyama, Y., Gallagher, P.E., Averill, D.B., Tallant, E.A., Brosnihan, K.B., Ferrario, C.M. (2004). Upregulation of Angiotensin-Converting Enzyme 2 After Myocardial Infarction by Blockade of Angiotensin II Receptors. *Hypertension* 43: 970–976.

Janke, J., Engeli, S., Gorzelniak, K., Luft, F.C., Sharma, A.M. (2002). Mature Adipocytes Inhibit In Vitro Differentiation of Human Preadipocytes via Angiotensin Type 1 Receptors. *Diabetes* 51: 1699–1707.

Janke, J., Schupp, M., Engeli, S., Gorzelniak, K., Boschmann, M., Sauma, L., Nystrom, F.H., Jordan, J., Luft, F.C., Sharma, A.M. (2006). Angiotensin type 1 receptor antagonists induce human in-vitro adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. *Journal of Hypertension* 24: 1809–1816.

Jéquier, E. (2002). Leptin Signaling, Adiposity, and Energy Balance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 967: 379–388.

Jöhren, O., Golsch, C., Dendorfer, A., Qadri, F., Häuser, W., Dominiak, P. (2003). Differential Expression of AT₁ Receptors in the Pituitary and Adrenal Gland of SHR and WKY. *Hypertension* 41: 984–990.

Jones, B.H., Standridge, M.K., Moustaid, N. (1997). Angiotensin II Increases Lipogenesis in 3T3-L1 and Human Adipose Cells 1. *Endocrinology* 138: 1512–1519.

Kakuta, H., Sudoh, K., Sasamata, M., Yamagishi, S. (2005). Telmisartan has the strongest binding affinity to angiotensin II type 1 receptor: comparison with other angiotensin II type 1 receptor blockers. *Int J Clin Pharmacol Res* 25: 41–46.

Kalupahana, N.S., Moustaid-Moussa, N. (2012). The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obesity Reviews* 13: 136–149.

Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., Chrousos, G. (2011). Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Medicine* 9: 48.

Keller-Wood, M.E., Dallman, M.F. (1984). Corticosteroid Inhibition of ACTH Secretion. *Endocrine Reviews* 5: 1–24.

Kim, S., Moustaid-Moussa, N. (2000). Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J. Nutr.* 130: 3110S-3115S.

Kintscher, U., Bramlage, P., Paar, W.D., Thoenes, M., Unger, T. (2007). Irbesartan for the treatment of hypertension in patients with the metabolic syndrome: A sub analysis of the Treat to Target post authorization survey. Prospective observational, two armed study in 14,200 patients. *Cardiovascular Diabetology* 6: 12.

Kintscher, U., Marx, N., Martus, P., Stoppelhaar, M., Schimkus, J., Schneider, A., Walcher, D., Kümmel, A., Winkler, R., Kappert, K., Dörrfel, Y., Scholze, J., Unger, T. (2010). Effect of high-dose valsartan on inflammatory and lipid parameters in patients with Type 2 diabetes and hypertension. *Diabetes Research and Clinical Practice* 89: 209–215.

Kleinendorst, L., Haelst, M.M. van, Akker, E.L.T. van den (2017). Young girl with severe early-onset obesity and hyperphagia. *BMJ Case Rep* 2017.

Knoll, K.-P., Hauner, H. (2008). Kosten der Adipositas in der Bundesrepublik Deutschland. *Adipositas - Ursachen, Folgeerkrankungen, Therapie* 02: 204–210.

Kohlsdorf, K., Nunziata, A., Funcke, J.-B., Brandt, S., Schnurbein, J. von, Vollbach, H., Lennerz, B., Fritsch, M., Greber-Platzer, S., Fröhlich-Reiterer, E., Luedeke, M., Borck, G., Debatin, K.-M., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch M. (2018). Early childhood BMI trajectories in monogenic obesity due to leptin, leptin receptor, and melanocortin 4 receptor deficiency. *International Journal of Obesity* 42: 1602.

Kouyama, R., Suganami, T., Nishida, J., Tanaka, M., Toyoda, T., Kiso, M., Chiwata, T., Miyamoto, Y., Yoshimasa, Y., Fukamizu, A., Horiuchi, M., Hirata, Y., Ogawa, Y. (2005). Attenuation of Diet-Induced Weight Gain and Adiposity through Increased Energy Expenditure in Mice Lacking Angiotensin II Type 1a Receptor. *Endocrinology* 146: 3481–3489.

Krolow, R., Noschang, C.G., Arcego, D., Andreazza, A.C., Peres, W., Gonçalves, C.A., Dalmaz, C. (2010). Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner. *Appetite* 55: 108–116.

Kurth, T., Gaziano, J.M., Berger, K., Kase, C.S., Rexrode, K.M., Cook, N.R., Buring, J.E., Manson, J.E. (2002). Body mass index and the risk of stroke in men. *Arch. Intern. Med.* 162: 2557–2562.

Kyrou, I., Chrousos, G.P., Tsigos, C. (2006). Stress, Visceral Obesity, and Metabolic Complications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1083: 77–110.

- Larsen, P.J., Jensen, P.B., Sorensen, R.V., Larsen, L.K., Vrang, N., Wulff, E.M., Wassermann, K. (2003). Differential Influences of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and - on Food Intake and Energy Homeostasis. *Diabetes* 52: 2249–2259.
- Laugero, K.D., Bell, M.E., Bhatnagar, S., Soriano, L., Dallman, M.F. (2001). Sucrose Ingestion Normalizes Central Expression of Corticotropin-Releasing-Factor Messenger Ribonucleic Acid and Energy Balance in Adrenalectomized Rats: A Glucocorticoid-Metabolic-Brain Axis? 1. *Endocrinology* 142: 2796–2804.
- Laugero, K.D., Gomez, F., Manalo, S., Dallman, M.F. (2002). Corticosterone Infused Intracerebroventricularly Inhibits Energy Storage and Stimulates the Hypothalamo-Pituitary Axis in Adrenalectomized Rats Drinking Sucrose. *Endocrinology* 143: 4552–4562.
- Lavoie, J.L., Sigmund, C.D. (2003). Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System- An Endocrine and Paracrine System. *Endocrinology* 144: 2179–2183.
- Lehrke, S., Laessle, R.G. (2009). *Adipositas im Kindes- und Jugendalter: Basiswissen und Therapie*. Springer-Verlag, S. 19.
- Leong, D.S., Terrón, J.A., Falcón-Neri, A., Armando, I., Ito, T., Jöhren, O., Tonelli, L.H., Hoe, K.L., Saavedra, J.M. (2002). Restraint Stress Modulates Brain, Pituitary and Adrenal Expression of Angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) Receptors. *Neuroendocrinology* 75: 227–240.
- Leshner, A.I. (1971). The adrenals and the regulatory nature of running wheel activity. *Physiology & Behavior* 6: 551–558.
- Levin, B.E., Richard, D., Michel, C., Servatius, R. (2000). Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279: R1357–R1364.
- Li, Y.-Q., Ji, H., Zhang, Y.-H., Ding, D.-Y., Ye, X.-L. (2006). Metabolic effects of telmisartan in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 373: 264–270.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation* 117: 175–184.
- Macht, M. (2008). How emotions affect eating: A five-way model. *Appetite* 50: 1–11.

- Makino, S., Smith, M.A., Gold, P.W. Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *136*: 11.
- Mantzoros, C.S., Moschos, S.J. (1998). Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. *Clinical Endocrinology* 49: 551–567.
- Martí, O., Martí, J., Armario, A. (1994). Effects of chronic stress on food intake in rats: Influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology & Behavior* 55: 747–753.
- Massiera, F., Seydoux, J., Geloën, A., Quignard-Boulange, A., Turban, S., Saint-Marc, P., Fukami-zu, A., Negrel, R., Ailhaud, G., Teboul, M. (2001). Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology* 142: 5220–5225.
- Meerlo, P., De Boer, S.F., Koolhaas, J.M., Daan, S., Van Den Hoofdakker, R.H. (1996). Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats. *Physiology & Behavior* 59: 735–739.
- Mehta, A., Marso, S.P., Neeland, I.J. (2016). Liraglutide for weight management: a critical review of the evidence. *Obes Sci Pract* 3: 3–14.
- Michel, M.C., Foster, C., Brunner, H.R., Liu, L. (2013). A Systematic Comparison of the Properties of Clinically Used Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonists. *Pharmacological Reviews* 65: 809–848.
- Miesel, A., Müller, H., Thermann, M., Heidbreder, M., Dominiak, P., Raasch, W. (2010). Overfeeding-Induced Obesity in Spontaneously Hypertensive Rats: An Animal Model of the Human Metabolic Syndrome. *Annals of Nutrition and Metabolism* 56: 127–142.
- Miesel, A., Müller-Fielitz, H., Jöhren, O., Vogt, F.M., Raasch, W. (2012). Double blockade of angiotensin II (AT1)-receptors and ACE does not improve weight gain and glucose homeostasis better than single-drug treatments in obese rats: Metabolic outcome after telmisartan. *British Journal of Pharmacology* 165: 2721–2735.
- Misra, K.H. (2013). Effect of Telmisartan on the Regression of the Left Ventricular Hypertrophy in the Patients of Essential Hypertension. *J Clin Diagn Res* 7:1352-1355.
- Miyazaki, H., Ohnishi, J., Shibata, T. (1996). Angiotensin II Receptor Subtypes: Their Distribution Signaling Pathways, and Physiological Functions. *Zoological Science* 13: 641–646.

Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., Tabira, T. (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119: 887–897.

Mohamed-Ali, V., Pinkney, J.H., Coppack, S.W. (1998). Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *International Journal of Obesity* 22: 1145–1158.

Müller, H., Schweitzer, N., Jöhren, O., Dominiak, P., Raasch, W. (2007). Angiotensin II stimulates the reactivity of the pituitary-adrenal axis in leptin-resistant Zucker rats, thereby influencing the glucose utilization. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 293: E802–E810.

Müller-Fielitz, H., Hübel, N., Mildner, M., Vogt, F.M., Barkhausen, J., Raasch, W. (2014). Chronic blockade of angiotensin AT₁ receptors improves cardinal symptoms of metabolic syndrome in diet-induced obesity in rats. *British Journal of Pharmacology* 171: 746–760.

Müller-Fielitz, H., Landolt, J., Heidbreder, M., Werth, S., Vogt, F.M., Jöhren, O., Raasch, W. (2012a). Improved Insulin Sensitivity after Long-Term Treatment with AT₁ Blockers Is Not Associated with PPAR γ Target Gene Regulation. *Endocrinology* 153: 1103–1115.

Müller-Fielitz, H., Lau, M., Geißler, C., Werner, L., Winkler, M., Raasch, W. (2015). Preventing leptin resistance by blocking angiotensin II AT₁ receptors in diet-induced obese rats. *British Journal of Pharmacology* 172: 857–868.

Müller-Fielitz, H., Lau, M., Jöhren, O., Stellmacher, F., Schwaninger, M., Raasch, W. (2012b). Blood pressure response to angiotensin II is enhanced in obese Zucker rats and is attributed to an aldosterone-dependent mechanism: Obesity hypertension and aldosterone. *British Journal of Pharmacology* 166: 2417–2429.

Müller-Fielitz, H., Markert, A., Wittmershaus, C., Pahlke, F., Jöhren, O., Raasch, W. (2011). Weight loss and hypophagia after high-dose AT₁-blockade is only observed after high dosing and depends on regular leptin signalling but not blood pressure. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 383: 373–384.

Müller-Fielitz, H., Raasch, W. (2013). Angiotensin II Impairs Glucose Utilization in Obese Zucker Rats by Increasing HPA Activity via an Adrenal-dependent Mechanism. *Hormone and Metabolic Research* 45: 173–180.

- Myers, M.G., Cowley, M.A., Münzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 70: 537–556.
- Myers, M.G., Leibel, R.L., Seeley, R.J., Schwartz, M.W. (2010). Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol. Metab.* 21: 643–651.
- Oliveira Andrade, J.M., Paraíso, A.F., Garcia, Z.M., Ferreira, A.V.M., Sinisterra, R.D.M., Sousa, F.B., Guimarães, A.L., de Paula, A.M., Campagnole-Santos, M.J., dos Santos, R.A., Santos, S.H. (2014). Cross talk between angiotensin-(1–7)/Mas axis and sirtuins in adipose tissue and metabolism of high-fat feed mice. *Peptides* 55: 158–165.
- Ortiz, R.M., Kobori, H., Conte, D., Navar, L.G. (2010). Angiotensin II-induced reduction in body mass is Ang II receptor mediated in association with elevated corticosterone. *Growth Horm. IGF Res.* 20: 282–288.
- Ortolani, D., Oyama, L.M., Ferrari, E.M., Melo, L.L., Spadari-Bratfisch, R.C. (2011). Effects of comfort food on food intake, anxiety-like behavior and the stress response in rats. *Physiology & Behavior* 103: 487–492.
- Page, G.G., Opp, M.R., Kozachik, S.L. (2016). Sex differences in sleep, anhedonia, and HPA axis activity in a rat model of chronic social defeat. *Neurobiology of Stress* 3: 105–113.
- Palkovits, M., Brownstein, M.J. (1988). *Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain* (New York: Elsevier).
- Pan, H., Guo, J., Su, Z. (2014). Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiol. Behav.* 130: 157–169.
- Park, Y.-W., Zhu, S., Palaniappan, L., Heshka, S., Carnethon, M.R., Heymsfield, S.B. (2003). The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch. Intern. Med.* 163: 427–436.
- Pasquali, R. (2012). The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and sex hormones in chronic stress and obesity: pathophysiological and clinical aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1264: 20–35.
- Pavel, J., Benicky, J., Murakami, Y., Sanchez-Lemus, E., Saavedra, J.M. (2008). Peripherally Administered Angiotensin II AT₁ Receptor Antagonists Are Anti-stress Compounds in Vivo. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148: 360–366.

Pavlatou, M.G., Mastorakos, G., Lekakis, I., Liatis, S., Vamvakou, G., Zoumakis, E., Papassotiriou, I., Rabavilas, A.D., Katsilambros, N., Chrousos, G.P. (2008). Chronic administration of an angiotensin II receptor antagonist resets the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and improves the affect of patients with diabetes mellitus type 2: Preliminary results. *Stress* 11: 62–72.

Paxinos, G., Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic Press).

Pecoraro, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., Dallman, M.F. (2004). Chronic Stress Promotes Palatable Feeding, which Reduces Signs of Stress: Feedforward and Feedback Effects of Chronic Stress. *Endocrinology* 145: 3754–3762.

Pilitsi, E., Farr, O.M., Polyzos, S.A., Perakakis, N., Nolen-Doerr, E., Papathanasiou, A.-E., Mantzoros, C.S. (2019). Pharmacotherapy of obesity: Available medications and drugs under investigation. *Metabolism - Clinical and Experimental* 92: 170–192.

Pinnock, S.B., Herbert, J. (2001). Corticosterone differentially modulates expression of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following either acute or repeated restraint stress: Corticosterone differentially modulates CRF and AVP. *European Journal of Neuroscience* 13: 576–584.

Pischon, T., Boeing, H., Hoffmann, K., Bergmann, M., Schulze, M.B., Overvad, K., et al. (2008). General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *New England Journal of Medicine* 359: 2105–2120.

Pi-Sunyer, X. (2009). The Medical Risks of Obesity. *Postgrad Med* 121: 21–33.

Qi, L., Cho, Y.A. (2008). Gene-environment interaction and obesity. *Nutr Rev* 66: 684–694.

Raasch, W., Wittmershaus, C., Dendorfer, A., Voges, I., Pahlke, F., Dodt, C., Dominiak, P., Jöhren, O. (2006). Angiotensin II Inhibition Reduces Stress Sensitivity of Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in Spontaneously Hypertensive Rats. *Endocrinology* 147: 3539–3546.

Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y.C., Weisnagel, S.J., Argyropoulos, G., Walts, B., Pérusse L., Bouchard C. (2006). The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* 14: 529–644.

Reaven, G.M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595–1607.

Ribeiro-Oliveira, A., Nogueira, A.I., Pereira, R.M., Boas, W.W.V., Santos, R.A.S. dos, Silva, A.C.S. (2008). The renin–angiotensin system and diabetes: an update. *Vascular Health and Risk Management* 4: 787.

Ritchie, S.A., Connell, J.M.C. (2007). The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 17: 319–326.

Rivier, C., Vale, W. (1983). Effect of angiotensin II on ACTH release in vivo: role of corticotropin-releasing factor. *Regulatory Peptides* 7: 253–258.

Rong, X., Li, Y., Ebihara, K., Zhao, M., Naowaboot, J., Kusakabe, T., Kuwahara, K., Murray, M., Nakao, K. (2010). Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia* 53: 1727–1731.

Rosenwasser, A.M. (1993). Circadian drinking rhythms in SHR and WKY rats: Effects of increasing light intensity. *Physiology & Behavior* 53: 1035–1041.

Saavedra, J.M., Ando, H., Armando, I., Baiardi, G., Bregonzio, C., Juorio, A., Macova, M. (2005). Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regul. Pept.* 128: 227–238.

Saavedra, J.M., Benicky, J. (2007). Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress* 10: 185–193.

Sahin Ozkartal, C., Aricioglu, F., Tuzun, E., Kucukali, C.İ. (2018). Chronic mild stress-induced anhedonia in rats is coupled with the upregulation of inflammasome sensors: a possible involvement of NLRP1. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology* 28: 236–244.

Saint-Marc, P., Kozak, L.P., Ailhaud, G., Darimont, C., Negrel, R. (2001). Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology* 142: 487–492.

Sáinz, N., Barrenetxe, J., Moreno-Aliaga, M.J., Martínez, J.A. (2015). Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metab. Clin. Exp.* 64: 35–46.

Sánchez-Lemus, E., Honda, M., Saavedra, J.M. (2012). Angiotensin II AT1 receptor blocker candesartan prevents the fast up-regulation of cerebrocortical benzodiazepine-1 receptors induced by acute inflammatory and restraint stress. *Behavioural Brain Research* 232: 84–92.

Santos, R.A.S., Sampaio, W.O., Alzamora, A.C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., Campagnole-Santos, M.J. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol. Rev.* 98: 505–553.

Santos, S.H.S., Andrade, J.M.O. (2014). Angiotensin 1-7: a peptide for preventing and treating metabolic syndrome. *Peptides* 59: 34–41.

Santos, S.H.S., Fernandes, L.R., Mario, É.G., Ferreira, A.V.M., Pôrto, L.C.J., Alvarez-Leite, J.I., Botion, L.M., Bader, M., Alenina, N., Santos, R.A.S. (2008). Mas Deficiency in FVB/N Mice Produces Marked Changes in Lipid and Glycemic Metabolism. *Diabetes* 57: 340–347.

Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions 1. *Endocrine Reviews* 21: 55–89.

Sasamura, H., Hein, L., Krieger, J.E., Pratt, R.E., Kobilka, B.K., Dzau, V.J. (1992). Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 253–259.

Schienkiewitz, A., Brettschneider, A.-C., Damerow, S., Schaffrath Rosario, A. (2018). Übergewicht und Adipositas im Kindes- und Jugendalter in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends. *Journal of Health Monitoring* 3: 16–23.

Schienkiewitz, A., Mensink, G.B.M., Kuhnert, R., Lange, C. (2017). Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 2: 21–28.

Schuchard, J., Winkler, M., Stölting, I., Schuster, F., Vogt, F.M., Barkhausen, J., Thorns, C., Santos, R.A., Bader, M., Raasch, W. (2015). Lack of weight gain after angiotensin AT₁ receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1-7)/Mas-dependent pathway: Ang(1-7) and weight loss after AT₁ blockade. *British Journal of Pharmacology* 172: 3764–3778.

Schuster, F., Huber, G., Stölting, I., Wing, E.E., Saar, K., Hübner, N., Banks, W.A., Raasch, W. (2018). Telmisartan prevents diet-induced obesity and preserves leptin transport across the blood-brain barrier in high-fat diet-fed mice. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 470: 1673–1689.

Seltzer, A., Bregonzio, C., Armando, I., Baiardi, G., Saavedra, J.M. (2004). Oral administration of an AT₁ receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain Research* 1028: 9–18.

Sharma, A.M., Janke, J., Gorzelniak, K., Engeli, S., Luft, F.C. (2002). Angiotensin Blockade Prevents Type 2 Diabetes by Formation of Fat Cells. *Hypertension* 40: 609–611.

Silventoinen, K., Rokholm, B., Kaprio, J., Sørensen, T.I.A. (2009). The genetic and environmental influences on childhood obesity: a systematic review of twin and adoption studies. *Int J Obes* 34: 29–40.

Smith, P.M., Hindmarch, C.C.T., Murphy, D., and Ferguson, A.V. (2014). AT1 receptor blockade alters nutritional and biometric development in obesity-resistant and obesity-prone rats submitted to a high fat diet. *Frontiers in Psychology* 5:832.

Souza, C.J. de, Eckhardt, M., Gagen, K., Dong, M., Chen, W., Laurent, D., Burkey, B.F. (2001). Effects of Pioglitazone on Adipose Tissue Remodeling Within the Setting of Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 50: 1863–1871.

Stöckli, R., Keller, U. (2003). Wirksamkeit therapeutischer Interventionen bei Adipositas. *Praxis* 92: 1999–2006.

Stone, A.A., Brownell, K.D. (1994). The stress-eating paradox: Multiple daily measurements in adult males and females. *Psychology & Health* 9: 425–436.

Stunkard, A.J., Sørensen, T.I.A., Hanis, C., Teasdale, T.W., Chakraborty, R., Schull, W.J., Schulsinger, F. (1986). An Adoption Study of Human Obesity. *New England Journal of Medicine* 314: 193–198.

Sugimoto, K., Qi, N.R., Kazdova, L., Pravenec, M., Ogihara, T., Kurtz, T.W. (2006). Telmisartan but not Valsartan increases caloric expenditure and protects against weight gain and hepatic steatosis. *Hypertension* 47: 1003–1009.

Sumitomo, T., Suda, T., Nakano, Y., Tozawa, F., Yamada, M., Demura, H. (1991). Angiotensin II Increases the Corticotropin-Releasing Factor Messenger Ribonucleic Acid Level in the Rat Hypothalamus. *Endocrinology* 128: 2248–2252.

Sun, X., Luo, W., Tan, X., Li, Q., Zhao, Y., Zhong, W., Sun, X., Brouwer, C., Zhou, Z. (2013). Increased plasma corticosterone contributes to the development of alcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305: G849–G861.

Sung, K.-C., Jeong, W.-S., Wild, S.H., Byrne, C.D. (2012). Combined Influence of Insulin Resistance, Overweight/Obesity, and Fatty Liver as Risk Factors for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 35: 717–722.

- Takagi, H., Mizuno, Y., Yamamoto, H., Goto, S., Umemoto, T. (2013). Effects of telmisartan therapy on interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertens. Res.* 36: 368–373.
- Valle, M., Gascón, F., Martos, R., Bermudo, F., Ceballos, P., Suanes, A. (2003). Relationship between high plasma leptin concentrations and metabolic syndrome in obese pre-pubertal children. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 13–18.
- Van Heek, M., Compton, D.S., France, C.F., Tedesco, R.P., Fawzi, A.B., Graziano, M.P., Sybertz, E.J., Strader, C.D., Davis, H.R.Jr. (1997). Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99: 385–390.
- Wannamethee, S.G., Shaper, A.G., Walker, M. (2005). Overweight and obesity and weight change in middle aged men: impact on cardiovascular disease and diabetes. *J Epidemiol Community Health* 59: 134–139.
- Wardzinski, E.K., Kistenmacher, A., Melchert, U.H., Jauch-Chara, K., Oltmanns, K.M. (2018). Impaired brain energy gain upon a glucose load in obesity. *Metabolism* 85: 90–96.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 112: 1796–1808.
- Westphal, C., Doblhammer, G. (2014). Projections of Trends in Overweight in the Elderly Population in Germany until 2030 and International Comparison. *Obesity Facts* 7: 57–68.
- Willner, P., Benton, D., Brown, E., Cheeta, S., Davies, G., Morgan, J., Morgan, M. (1998). Depression increases craving for sweet rewards in animal and human models of depression and craving. *Psychopharmacology* 136: 272-283.
- Willner, P., Muscat, R., Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 16: 525–534.
- Wincewicz, D., Juchniewicz, A., Waszkiewicz, N., Braszko, J.J. (2016). Angiotensin II type 1 receptor blockade by telmisartan prevents stress-induced impairment of memory via HPA axis deactivation and up-regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 148: 108–118.

Winkler, M., Bader, M., Schuster, F., Stölting, I., Binder, S., Raasch, W. (2018). Development of obesity can be prevented in rats by chronic icv infusions of AngII but less by Ang(1–7). *European Journal of Physiology* 470: 867–881.

World Health Organisation (2018), unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (abgerufen am 25.04.2019).

Yamada, S., Ano, N., Toda, K., Kitaoka, A., Shiono, K., Inoue, G., Atsuda, K., Irie, J. (2008). Telmisartan but Not Candesartan Affects Adiponectin Expression In Vivo and In Vitro. *Hypertens Res* 31: 601–606.

Yang, G., Wan, Y., Zhu, Y. (1996). Angiotensin II- An Important Stress Hormone. *Neurosignals* 5: 1–8.

Yang, G., Xi, Z.-X., Wan, Y., Wang, H., Bi, G. (1993). Changes in Circulating and Tissue Angiotensin II during Acute and Chronic Stress. *Neurosignals* 2: 166–172.

Yoshida, H., Kakuchi, J., Guo, D.F., Furuta, H., Iwai, N., Meer-de Jong, R. van der, Inagami, T., Ichikawa, I. (1992). Analysis of the evolution of angiotensin II type 1 receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine and human). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 1042–1049.

Zeeni, N., Daher, C., Fromentin, G., Tome, D., Darcel, N., Chaumontet, C. (2013). A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress* 16: 211–219.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425–432.

Zhu, D., Tong, Q., Liu, W., Tian, M., Xie, W., Ji, L., Shi, J. (2014). Angiotensin (1-7) protects against stress-induced gastric lesions in rats. *Biochem. Pharmacol.* 87: 467–476.

Zorad, S., Dou, J., Benicky, J., Hutanu, D., Tybitanclova, K., Zhou, J., Saavedra, J.M. (2006). Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *Eur. J. Pharmacol.* 552: 112–122.

8. Anlagen

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stressmodell nach Dallmann und Pecoraro.....	5
Abb. 2: Stresshormonspiegel und Futteraufnahme in Ruhe und nach Stress.....	13
Abb. 3: Interaktion zwischen Stress, HPA-Achse, RAAS, ARB, Essen u. Gewicht.....	14
Abb. 4: Protokoll Studienteil 1	16
Abb. 5: Protokoll Studienteil 2	17
Abb. 6: Gewichtsveränderung (Studienteil 1).....	27
Abb. 7: Energieaufnahme (Studienteil 1).....	28
Abb. 8: Stresshormonantwort und -korrelation mit Futteraufnahme (Studienteil 1).....	30
Abb. 9: Gewichtsverlauf und finales Gewicht (Studienteil 2).....	32
Abb. 10: Energieaufnahme, Blutzucker, Leptinkonzentration und Korrelation zwischen Leptin und Energieaufnahme (Studienteil 2).....	33
Abb. 11: Energieverbrauch und Lokomotion (Studienteil 2, 1. IMS).....	34
Abb. 12: Energieverbrauch, RER und Lokomotion nach TEL-Langzeittherapie	35
Abb. 13: Stresshormonantwort (Studienteil 2, 1. IMS)	37
Abb. 14: Energieaufnahme nach Stress an Tag 1-4 (Studienteil 2, 1. IMS).....	38
Abb. 15: Stressbedingte Energieaufnahme (Studienteil 2, 1. IMS).....	39
Abb. 16: Stresshormonantwort und Energieaufnahme (Studienteil 2, 2. IMS).....	41
Abb. 17: Korrelation zwischen Leptin und Corticosteronantwort im Stress.....	42
Abb. 18: AT1A- und AT1B-Rezeptor mRNA-Menge	43

8.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Plastikrohre.....	19
Tab. 2: Verwendete Stabilisatoren	20
Tab. 3: Nukleotidsequenz der eingesetzten Primer.....	24
Tab. 4: Basale Stresshormonspiegel (Studienteil 1)	29
Tab. 5: Stresshormonantwort (Studienteil 1).....	31
Tab. 6: Organgewichte und -größe (Studienteil 2)	31
Tab. 7: Basale Stresshormonspiegel vor IMS (Studienteil 2).....	36

Tab. 8: Basale Stresshormonspiegel nach Langzeittherapie mit TEL.....	40
Tab. 9: mRNA-Spiegel der MC2-, MCH- und CRH-Rezeptoren.....	44
Tab. 10: Ang II Konzentration.....	44

8.3. Tiere

Sprague Dawley-Ratten (SD) vom Züchter Janvier, Frankreich

Tierversuchsantrag Nr. 9/2g/11, genehmigt durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein am 02/12/2011

8.4. Substanzen und erworbene Lösungen

10 X TAE-Puffer	Invitrogen (Kanada)
2-Methylbutan	Sigma (Deutschland)
Bestatin	Sigma (Deutschland)
Diethylpyrocarbinat (DEPC)	Sigma (Deutschland)
EDTA	Merck (Deutschland)
Elutions-Puffer	Applied Biosystems (UK)
Ethanol p.A. 98%	J. T. Baker (Holland)
Flüssiger Stickstoff	Lokaler Lieferant
Gummi Arabicum	Roth (Deutschland)
Kochsalz-Lösung 0,9%; steril	Berlin-Chemie (Deutschland)
Nucleic Acid Purification Lysis Solution	Applied Biosystems (UK)
PBS Puffer	UKSH Campus Apotheke, Lübeck (Deutschland)
PCR-Primer	Invitrogen (Deutschland)
Proteinase K	Applied Biosystems (UK)
RNA Purification Wash Solution I	Applied Biosystems (UK)
RNA Purification Wash Solution II	Applied Biosystems (UK)
Telmisartan	Boehringer-Ingelheim (Deutschland)
Trockeneis	UKSH Campus Apotheke, Lübeck (Deutschland)

8.5. Rezepturen von Lösungen

Bestatin-Lösung (1 mM)	0,2 ml Bestatin-Lösung (5 mg/ml) ad 2,9 ml Aqua dest.
Bestatin-Lösung (5 mg/ml)	5 mg Bestatin ad 1 ml Aqua dest.
DEPC-Wasser	500 µl DEPC ad 500 ml Aqua dest. nach 24 h sterilisiert
EDTA-Lösung pH 6-7	900 mg Na-EDTA ad 10 ml Aqua dest. NaOH zur pH-Wert- Einstellung
Lysis-Puffer	5 ml Nucleic Acid Purification Lysis Solution ad 10 ml PBS-Wasser
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

8.6. Erworbene Versuchskits

8.6.1. RIA-Kits

ACTH, human; Cat. # 07-106102	MP-Biomedical (Deutschland)
Angiotensin II; Cat. # RB320	Euro-Diagnostica AB (Schweden)
Corticosterone, rat & mouse; Cat. # 07-120003	MP-Biomedical (Deutschland)
Leptin, rat; Cat. # RL-83K	Millipore (USA)

8.6.2. Kits zur Bestimmung der Genexpression

Reverse Transcription System	Promega (USA)
PlatinumR SYBR Green qPCR SuperMix- UDG with ROX	Invitrogen (Kanada)
Sybr Green I Reaction System	Eurogentec SA (Deutschland)

8.7. Verbrauchsmaterialien

96-Well Optical Reaction Plate	Applied Biosystems (UK)
--------------------------------	-------------------------

Baumwollgeschirrhandtücher	Wäscherei UKSH (Deutschland)
Einmalspritzen Discardit™ II 1 ml, 2 ml	BD (Deutschland)
Filtertips 10, 100, 1000	Greiner bio one (Deutschland)
Filtersysteme für die Nucleic Acid	Applied Biosystems (UK)
Prep Station ABI PRISM 6100	
Glukoseteststreifen für Ascensia	Bayer (Deutschland)
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse	Altromin (Deutschland)
Kanülen BD Microlance™ 3 26G 1/2 0,45x13	BD (Deutschland)
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt (Deutschland)
Klingen Microtome blades	Leica (Deutschland)
Mikrovetten CB 300	Sarstedt (Deutschland)
Nitril-Handschuhe	Nitra Tex Ansell (Deutschland)
Pipettierball	Labsolute (Deutschland)
Pipetten, diverse	Eppendorf (Deutschland)
Pipettenspitzen 20, 200, 1000 µl	Eppendorf (Deutschland)
PP-test tubes 15 ml, 50 ml CellstarR	Greiner (Deutschland)
Rasierklingen	Wilkinson Sword (Deutschland)
RIA-Röhrchen 4.5 ml	Greiner (Deutschland)
Save Lock Tubes (0,2, 0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf (Deutschland)
Schokoriegel, verschiedene	Diverse
Tupfer Pure-Zellin	Paul Hartmann AG (Deutschland)
Vinyl-Einmalhandschuhe	Meditrade (Deutschland)
Wägepapier	Neolab (Deutschland)

8.8. Geräte

8.8.1. Laborgeräte

Autoklav	Dargatz (Deutschland)
Blutzuckermessgerät Ascensia ELITE XL	Bayer (Deutschland)
Eismaschine Scotsman AF 10	Scotsman (Deutschland)
Gefriermikrotom CM 3050	Leica (Deutschland)
Gefrierschrank (-80°C)	Colora (Deutschland)
Gefriertruhen (-20°C)	Bosch (Deutschland)
Guillotine	Harvard Apparatus CO. Inc. Millis. Mass (USA)
Käfige Größe III (42x26x18 cm) und	EHRET Labor- und Pharmatechnik

IV (59x 26x18 cm) mit Edelstahldeckel inkl. Klemmrahmenverschluss	(Deutschland)
Knopfsonde	Acufirm (Deutschland)
Kühlschränke (2-8°C)	Bosch (Deutschland)
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Janke & Kunkel GmbH & Co.KG (Deutschland)
pH-Meter WTW ph 531	WTW Weilheim (Deutschland)
Plastikrohre (47x160 mm, 70x170 mm, 70x220mm)	Material Baumarkt (Deutschland), Herstellung UKSH (Deutschland)
Polypropylen-Trichter	Roth (Deutschland)
Rührfische	Bohlende, Lauda-Königshofen (Deutschland)
Schieblehre	Roth (Deutschland)
Schüttel-/Schwenkgerät REAX 2	Heidolph (Deutschland)
Schütteltisch SM	Edmund Bühler (Deutschland)
Stoppuhr	Junghans (Deutschland)
Ultra-Turrax 78	IKA-Werke (Deutschland)
Verschiedene Laborglasgeräte	Schott (Deutschland)
Vortex REAX 2000	Heidolph (Deutschland)

8.8.2. Waagen

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

8.8.3. Zentrifugen

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

8.8.4. Geräte zur indirekten Kalorimetrie

Phenomaster Home Cage System	TSE Systems (Deutschland)
------------------------------	---------------------------

8.8.5. Geräte zur Bestimmung der Gen-Expression

RNA-Isolierung: 6100 Nucleic Acid Prep Station	Applied Biosystems (USA)
PCR-Gerät: ABI PRISM 7000 Sequence	Applied Biosystems (USA)

Detection System

Cycler für cDNA-Herstellung

Biometra (USA)

NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer

Thermo Scientific (USA)

8.8.6. Geräte für RIA-Versuche

Gamma-Counter: Compugamma 1282 CS

Wallac (USA)

Membranpumpe UVS 400 A

Savant (Deutschland)

Minifuge RF

Heraeus sepatech (Deutschland)

8.8.7. Software

Excel

Microsoft (USA)

Graph Pad Prism Version 5.0

GraphPad Software (USA)

8.9. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent; Teile von 100
Σ	kumulativ
Δ	Differenz; „delta“
°C	Grad Celsius
®	Eingetragene Waren- oder Dienstleistungsmarke; „registered trade mark“
Abb.	Abbildung
ACE (2)	Angiotensin-Converting Enzym (2)
ACTH	Adrenocorticotropin
ADX	Adrenalektomie
AGT	Angiotensinogen
AIM	Allgemeine Innere Medizin
Ang (I, II, IV, 1-7, 1-9)	Angiotensin (I, II, IV, 1-7, 1-9)
ARB	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker
AT1(R)	Typ-1-Angiotensin-II-(Rezeptor)
AT1A/B	Typ-1-Angiotensin-II-Rezeptor A/B
AT2R	Typ-2-Angiotensin-II-Rezeptor
AUC	Fläche unter der Kurve; „area under the curve“
AVM	Avian-Myeloblastosis-Virus
BMI	Body-Mass-Index

bw	Körpergewicht, „body weight“
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAND	Candesartan
CCD	charged-coupled device
CD	Cafeteria-Diät
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Chow	Standardfutter
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CORT	Corticosteron
CRH	Corticotropin-releasing-Hormon
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dT	Desoxythymidin
EE	Energieverbrauch; „energy expenditure“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
F	Gesamtsignifikanz
g	Gramm (Gewicht) oder Erbeschleunigung (Zentrifuge)
h	Stunde
HC	hochkalorisch; „high-calorie“
HDL	high-density Lipoprotein
HF	fettreich; „high-fat“
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
Hz	Hertz
IDF	Internationale Diabetes Federation
IL-6	Interleukin 6
IMS	Immobilisationsstresstest
kcal	Kilokalorien
kg	Kilogramm
kJ	Kilojoule
l	Liter

LDL	low-density Lipoprotein
LEPR	Leptinrezeptor
Lsg.	Lösung
m ²	Quadratmeter
Mas	Ang1-7 Rezeptor
MC2(R)	Melanocortin 2-(Rezeptor)
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
MCH	melanin concentrating hormone
MetS	Metabolisches Syndrom
mg	Milligramm
min	Minute
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der Stichproben
n.s.	nicht signifikant
Na	Natrium
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NIH	National Institutes of Health
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
O ₂	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.A.	Analysenrein
PBS-Puffer	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
pH	der negative Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Pikomol
PPAR γ	peroxisome proliferator activated receptor gamma
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
r	Pearson's r

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RER	respiratory exchange rate, respiratorische Gasaustauschrates
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	Farbstoff bestehend aus Glycin-Konjugat von 5-Carboxy-X-rhodamin und Succinimidylester
SD	Sprague Dawley
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SHR	spontan hypertensive Ratte
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEL	Behandlungsgruppe mit Hochdosis Telmisartan
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trishydroxymethylamonium-Methan
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
u.	und
VEH	Vehikel=Placebo
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

9. Danksagung

Ich danke dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. med. M. Schwaninger für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch, für die hervorragende Betreuung. Seine umfassende Unterstützung, die wertvollen Vorschläge sowie die konstruktive Kritik haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus danke ich Ines Stölting. Sie stand als medizinisch-technische Assistentin bei der Durchführung und Auswertung der Experimente als kompetente und motivierte Unterstützung stets an meiner Seite. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei der ehemaligen Mitdoktorandin Frau Dr. Martina Winkler für ihre Hilfsbereitschaft und den äußerst angenehmen Umgang bedanken. Zudem danke ich allen Mitarbeitern, Doktoranden und Studenten des Instituts für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund für die mentale Unterstützung während der Promotionszeit.

10. Curriculum Vitae

Viktorija Gustaityte

geboren am 29. März 1989

in Klaipeda (Litauen)



Allgemeine Hochschulreife

07/2008 Ažuolynas-Gymnasium Klaipeda, Litauen

Studium

10/2008-12/2014 Humanmedizinstudium an der Universität zu Lübeck

Beruf

04/2015-03/2016 Assistenzärztin für Allgemeine Innere Medizin (AIM) in
der Luzerner Höhenklinik Montana

05/2016-06/2019 Assistenzärztin für AIM im Luzerner Kantonsspital

ab 07/2019 Assistenzärztin für AIM im Ärztezentrum Medici Zell

Promotion

10/2011-06/2019 Promotion am Institut für experimentelle und klinische
Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch

11. Veröffentlichung

Wissenschaftliche Publikation

Gustaityte, V., Winkler, M., Stölting, I., Raasch, W. (2018). Influence of AT1 blockers on obesity and stress induced eating of cafeteria diet. *J. Endocrinol J Endocrinol.* 2018 Oct 1. pii: JOE-18-0477.R1. doi: 10.1530/JOE-18-0477 (E-pub).

Kurzvortrag

Gustaityte V., Müller-Fielitz H., Raasch W. The intake of palatable food after stress is reduced when rats were treated with an AT1-blocker, 37. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga in Berlin (5-7. Dezember 2012).

Poster

Gustaityte V., Müller-Fielitz H., Piehl M., Stölting I., Raasch W. A decreased intake of palatable high calorie food due to a reduced HPA drive does only minor contribute to the antiobese potency of AT1-blockers, Jahrestagung der DGPT 2013 in Halle (Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (201) 3 (Suppl 1), S29 (P110).