

Aus dem Institut für experimentelle und klinische
Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. P. Dominiak

**Die Reduktion des Körpergewichts nach chronischer
AT₁-Blockade ist assoziiert mit Hypophagie und einer
„Downregulation“ orexigener Peptide im Hypothalamus**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Antonie Markert

aus Hildesheim

Lübeck 2007

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Achim Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2008

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.12.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Adipositas und das Metabolische Syndrom	1
1.2 Gewichtsregulation allgemein	2
1.3 Gewichtsregulation im Hypothalamus	3
1.4 Zirkulierende Parameter	7
1.5 Renin-Angiotensin-System	10
1.6 AT ₁ -Rezeptor-Antagonisten	13
1.7 Fragestellung	13
2. Methoden	15
2.1 Behandlung der Tiere	15
2.2 Analytische Methoden	17
2.2.1 Radio-Immuno-Assays	17
2.2.2 Elisa	20
2.2.3 Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion	20
2.3 Statistische Methoden	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Körpergewicht	26
3.2 Hämodynamik und Parameter des Renin-Angiotensin-Systems	30
3.3 Zirkulierende metabolische und endokrinologische Parameter	34
3.4 Neuropeptide im Hypothalamus	39

4. Diskussion	44
5. Zusammenfassung	55
6. Literaturverzeichnis	56
7. Anhang	74
7.1 Abkürzungsverzeichnis	74
7.2 Material	75
7.3 Erklärung über die Genehmigung der Tierversuche	81
8. Danksagungen	82
9. Lebenslauf	83
10. Publikationen	84

1. Einleitung

1.1 Adipositas und das Metabolische Syndrom

Die Prävalenz der Adipositas bei Erwachsenen und auch bei Kindern erhöht sich in den Industrieländern seit den letzten drei Dekaden dramatisch. In Deutschland ist besonders die Zahl adipöser Patienten mit einem Body-Mass-Index (BMI) ≥ 30 in den letzten zwanzig Jahren stark angestiegen. 2003 waren 70 % der Männer und 50 % der Frauen übergewichtig (BMI ≥ 25) oder adipös (BMI ≥ 30) [Mensink et al., 2005].

Fettleibige Patienten haben ein deutlich erhöhtes Mortalitätsrisiko [Bray und Gray, 1988], in den Vereinigten Staaten beispielsweise versterben 300 000 Menschen pro Jahr aufgrund einer Adipositas [Sharma und Chetty, 2005]. Übergewicht beschleunigt den Alterungsprozess. Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Bluthochdruck, Herz- und Gehirnfarkte treten bei Adipositas vermehrt auf. Hiermit vergrößert sich das Risiko an einer Demenz zu erkranken. Fast 60 % der adipösen Patienten entwickeln einen Hypertonus [Sharma et al., 2001]. Bei ihnen ist die Blutdruckeinstellung deutlich schwieriger als bei Normalgewichtigen. Fettleibige Menschen haben einen erhöhten Sympthotonus und ein stimuliertes Renin-Angiotensin-System (RAS) [Engeli und Sharma, 2000]. Außerdem ist Adipositas der größte Risikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 [Bray, 2003], der BMI korreliert positiv mit dem relativen Risiko von Diabetes mellitus bei Männern [Chan et al., 1994] und Frauen [Colditz et al., 1995]. Zusätzlich treten Krebserkrankungen vermehrt auf. Eine Fettleber kann zu hepatischer Dysfunktion und Fibrose führen, Lungenerkrankungen sind häufiger und schwerer, Osteoarthritis, Komplikationen während und nach Operationen, Fertilitäts-, Schwangerschafts- und Geburtsprobleme sind neben Depressionen und Suiziden häufig mit Adipositas assoziiert. Die soziale Akzeptanz und die Lebensqualität sind bei diesen Patienten stark eingeschränkt. [Roth et al., 2004].

Die Therapie der Adipositas ist sehr schwierig. Diät und Bewegung haben kurzzeitig gute Effekte, auf lange Sicht sind jedoch nur wenige Betroffene mit dieser Therapie erfolgreich. Medikamente zur Gewichtsreduktion sind umstritten [Padwal et al., 2004]. Als Alternative bleibt ein operativer Eingriff, der die Magenverkleinerung oder Malabsorption zum Ziel hat [Steinbrook, 2004]. Ein wichtiger Baustein der Therapie ist die medikamentöse Behandlung der Begleit- und Folgeerkrankungen wie Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus und Depression [Roth et al., 2004].

Eng mit der Adipositas verknüpft ist das Metabolische Syndrom, das durch Insulinresistenz charakterisiert ist [NCEP, 2001; Grundy et al., 2004]. Hier besteht eine Konstellation von atherogenen Risikofaktoren wie Dyslipidämie, Hypertonie, Hyperglykämie und erhöhten proinflammatorischen und prothrombotischen Faktoren [Prasad und Quyyumi, 2004]. Dadurch kann das Auftreten einer linksventrikulären Hypertrophie, Herzinsuffizienz und eines Diabetes mellitus Typ 2 induziert werden [Sharma und Chetty, 2005]. Die Wahrscheinlichkeit, ein Metabolisches Syndrom zu entwickeln, steigt mit höherem Alter, höherem Body-Mass-Index, in der Postmenopause, durch Rauchen sowie durch Bewegungsmangel. Viszerale Adipositas ist der Hauptrisikofaktor zur Entwicklung eines Metabolischen Syndroms [Bosello und Zamboni, 2000]. In den USA liegt die Prävalenz bei 20 % der erwachsenen Bevölkerung [Park et al., 2003]. In einer neueren Untersuchung in Deutschland wurde bei 40 % der erwachsenen Bevölkerung eine gestörte Glukosetoleranz oder Diabetes mellitus Typ 2 festgestellt [Regitz-Zagrosek et al., 2006]. Die Behandlung der beiden Krankheitsbilder und ihrer Komplikationen wird durch die hohe und noch steigende Prävalenz und Komplexität eine große medizinische Herausforderung in den nächsten Jahrzehnten sein und belastet das Gesundheitssystem schon heute erheblich. Die zugrunde liegenden Störungen können bisher nicht befriedigend therapiert werden. Die Gewichtsregulation und der Stoffwechsel stellen daher ein wichtiges Forschungsgebiet dar. Da die Behandlung eines Hypertonus mit RAS-Hemmern bei Adipositas und dem Metabolischen Syndrom heute zum Standard gehört, ist der Einfluss dieser Medikamente auf den Metabolismus von besonderem Interesse und soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.2 Gewichtsregulation allgemein

Die Aufrechterhaltung des Körpergewichts setzt eine Balance zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch voraus. Wird dieses Gleichgewicht gestört, setzen zahlreiche hormonelle Kompensationsmechanismen ein. Wenn die Kalorienaufnahme den Energieverbrauch dauerhaft übersteigt, entsteht Adipositas. Auch bei normalgewichtigen Menschen wird der Alterungsprozess häufig von einer deutlichen Erhöhung der Körpermasse begleitet [Rossner, 2001]. Wenn die Fettreserven des Körpers bedroht sind, z.B. während Fastenzeiten, werden Regulationsmechanismen in Gang gesetzt, die die Wiederauffüllung der Fettspeicher fördern. Diese setzen auch bei der Behandlung von Adipositas ein und erschweren die Therapie [Pasman et al., 1999]. Wie an der hohen und wachsenden Prävalenz der Adipositas weltweit zu sehen ist [Kopelman, 2000], sind die

Mechanismen, die bei Gewichtsverlust gegensteuern, effektiver als jene, die die Gewichtszunahme inhibieren. Der anabole Stoffwechsel stimuliert die Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme und senkt den Energieverbrauch. Im Gegensatz dazu vermindert eine katabole Stoffwechsellage das Körpergewicht, hier ist der Energieverbrauch erhöht [Schwartz et al., 2000].

1.3 Gewichtsregulation im Hypothalamus

Das Körpergewicht wird entscheidend von Neuropeptiden des Hypothalamus bestimmt, die im Nucleus arcuatus (ARC), im lateralen Hypothalamus (LHA) und im Nucleus paraventricularis (PVN) exprimiert werden (Abb.1). Sie fördern entweder die Gewichtszunahme (Orexigene) oder wirken der Gewichtszunahme entgegen (Anorexigene) (Tabelle 1).

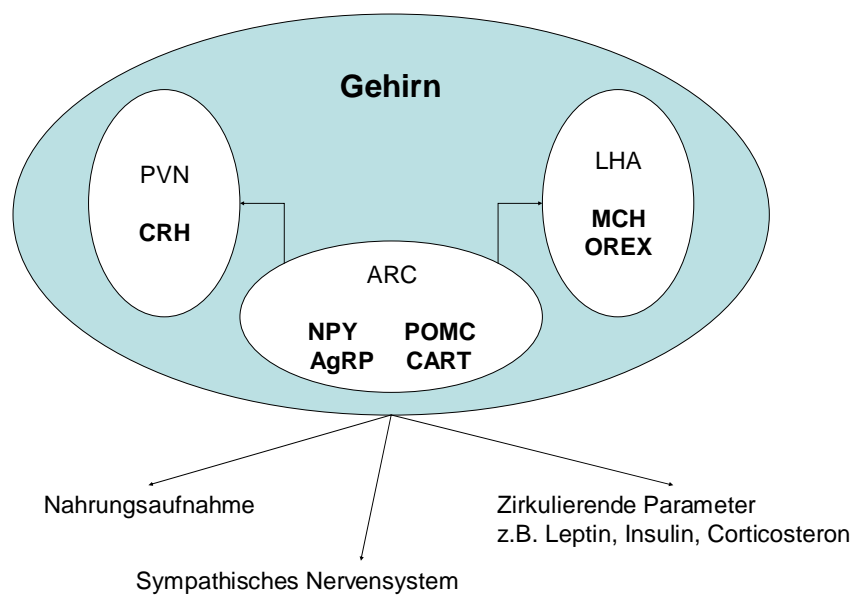


Abb. 1: Anatomische Verteilung der Neuropeptide im Gehirn und deren periphere Wirkungen

PVN: Nucleus paraventricularis

CRH: Corticotropin-Releasing-Hormon

ARC: Nucleus arcuatus

NPY: Neuropeptid Y

AgRP: Agouti-Related-Protein

POMC: Prepro-Opiomelanocortin

CART: Cocain-Amphetamin-Reguliertes-Transkript

LHA: Lateraler Hypothalamus

MCH: Melanin-Concentrating-Hormon

OREX: Orexin-A

Tabelle 1: Wirkung der Neuropeptide

Orexigen wirkende Peptide	Anorexigen wirkende Peptide
Neuropeptid Y (NPY)	Prepro-Opiomelanocortin (POMC)
Agouti-Related-Protein (AgRP)	Cocain-Amphetamin-Reguliertes-
Melanin-Concentrating-Hormon (MCH)	Transkript (CART)
Orexin-A (OREX)	Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)

Die orexigenen Peptide Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-Related-Protein (AgRP) aus dem Nucleus arcuatus im Hypothalamus fördern den anabolen Weg [Broberger et al., 1998; Hahn et al., 1998]. NPY vermindert den Energieverbrauch [Korner und Aronne, 2003], beide Peptide stimulieren die Nahrungsaufnahme. NPY bindet an den NPY-Rezeptor, AgRP wirkt als inverser Agonist der neuronalen Melanocortin-Rezeptoren (MC3- und MC4-Rezeptor) [Schwartz et al., 2003].

Den katabolen Stoffwechsel vermitteln die anorexigenen Neuropeptide des Nucleus arcuatus. Hierzu gehört das α -Melanozyten-Stimulations-Hormon (α -MSH), das aus dem Peptid Prepro-Opiomelanocortin (POMC) abgespalten wird. Viele POMC-exprimierende Neurone sezernieren ebenfalls das Cocain-Amphetamin-Regulierte-Transkript (CART) [Elmqvist et al., 1999], ein Peptid, das ebenso wie α -MSH die Nahrungsaufnahme inhibiert. α -MSH bindet agonistisch an die MC3- und MC4-Rezeptoren.

Die NPY/AgRP- und POMC/CART-exprimierenden Neurone projizieren in benachbarte Areale des Hypothalamus, die die Nahrungsaufnahme und autonome Funktionen kontrollieren, wie den Nucleus paraventricularis und den lateralen Hypothalamus [Schwartz et al., 2003]. Da chemische oder elektrische Zerstörung des Nucleus arcuatus zu Adipositas führt [Bergen et al., 1998], scheint der katabole Output des Nucleus arcuatus über den anabolen Output zu dominieren. Läsionen des Nucleus arcuatus vermindern außerdem die Fähigkeit von Leptin die Nahrungsaufnahme zu inhibieren [Tang-Christensen et al., 1999]. Ein intakter Nucleus arcuatus scheint für die Nahrungsregulation durch Leptin nötig zu sein.

Als regulatorische Antwort auf Gewichtsverlust wird der anabole Weg aktiviert, während der katabole gehemmt wird. Zum Beispiel erhöht sich beim Fasten oder Diabetes mellitus mit Insulinmangel die Expression von NPY- und AgRP-mRNA im Nucleus arcuatus, während die POMC- und CART-Expression vermindert ist. NPY- und AgRP-Neurone

haben eine tonische inhibitorische Kontrolle über POMC- und CART-Neurone. AgRP antagonisiert die Interaktion von α -MSH am MC4-Rezeptor und stimuliert dadurch das Essverhalten (Korner und Aronne, 2003). Vorübergehende Aktivierung von NPY- und AgRP-Neuronen führt also nicht nur zu einer Verstärkung der anabolen Signale, sondern inhibiert auch die katabolen Signale durch Antagonisierung der Melanocortin-Rezeptoren und Hemmung des neuronalen Outputs der katabolen Neurone. Im Gegensatz dazu ist die Reaktion auf Überfütterung nur einfach. Der katabole Weg wird aktiviert, während der anabole nicht beeinträchtigt wird. Werden Ratten über Magensonden überfüttert, so wird POMC erhöht exprimiert, während sich NPY und AgRP nur wenig ändern [Schwartz et al., 2003].

Signale des katabolen Weges, nicht des anabolen Weges sind nötig, um ein normales Körpergewicht aufrecht zu erhalten. Genetische Mutationen des POMC- oder Melanocortin-4-Rezeptors (MC4R) führen zu Hyperphagie und Adipositas [Huszar et al., 1997; Yaswen et al., 1999]. Ebenfalls führt eine Mutation im CART-Gen zu erhöhtem Körpergewicht [del Giudice et al., 2001; Yamada et al., 2002]. Andererseits haben Mäuse, die NPY-defizient sind, einen normalen Phänotyp und leiden nicht an Anorexie oder Gewichtsverlust [Erickson et al., 1996]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen erhöhen zentral verabreichte MC4R-Antagonisten die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht [Fan et al., 1997; Hagan et al., 2000; Kim et al., 2000], während ein NPY-Rezeptor-Antagonist keinen gewichtsabnehmenden Effekt hat [Zimanyi et al., 1998]. Sowohl NPY-defiziente [Erickson et al., 1996] als auch AgRP-defiziente [Qian et al., 2002] Mäuse zeigen eine Hyperphagie als Antwort auf einen Fastenzustand [Zimanyi et al., 1998].

Insgesamt ist der intakte katabole Weg für die Aufrechterhaltung des Körpergewichts wichtig. Die Läsion eines orexigenen Faktors hat keine offensichtlichen Auswirkungen auf das Gewicht, während schon die Störung eines Anorexigen meist zu Adipositas führt. Die beschriebenen Interaktionen bieten eine Erklärung, warum die Therapie zur Gewichtsreduktion so schwierig ist. Um effektiv zu sein, sollte die Behandlung bei mehreren orexigenen Faktoren gleichzeitig angreifen.

Ein weiteres Neuropeptid in der Stoffwechselregulation ist das Melanin-Concentrating-Hormone (MCH). Das zyklische 19-Aminosäuren-Polypeptid wird hauptsächlich von Neuronen des lateralen Hypothalamus und der Zona Incerta produziert, die in viele Regionen des Gehirns projizieren [Bittencourt et al., 1992]. MCH ist ebenfalls ein wichtiger Mediator in der Regulation der Energiebilanz und des Körpergewichts.

Tonischer Input von MCH-Neuronen scheint für die normale Kontrolle der Nahrungsaufnahme nötig zu sein, da die Gendelektion von MCH zu einem dünnen Phänotyp führt [Shimada et al., 1998]. MCH könnte eine entscheidende Rolle in der Weitergabe und Verarbeitung der Signale spielen, die ursprünglich von den hypothalamischen Neuronen der Gewichtsregulation im Nucleus arcuatus kommen [Kokkotou et al., 2001; Schwartz et al., 2003]. Diese Hypothese wird durch die reichhaltigen Verbindungen der NPY-, AgRP-, POMC-, CART-Neurone des Nucleus arcuatus zu den MCH-Neuronen im lateralen Hypothalamus unterstützt [Elias et al., 1998; Kokkotou et al., 2001].

MCH-Gen-defiziente Mäuse sind dünn, hypophag und haben eine erhöhte metabolische Rate [Shimada et al., 1998]. Im Gegensatz dazu sind Mäuse, die das MCH-Gen überexprimieren, empfänglich für Adipositas, haben eine erhöhte Leptinkonzentration, eingeschränkte Glukosetoleranz sowie eine Insulinresistenz [Ludwig et al., 2001]. Intrazerebroventrikuläre Applikation von MCH stimuliert die Nahrungsaufnahme [Qu et al., 1996; Sahu, 1998b; Rossi et al., 1999]. Die einmalige Gabe von MCH1-Rezeptor-Antagonisten schwächt bei Ratten die Stimulation der Nahrungsaufnahme durch MCH ab und vermindert den Konsum von schmackhaftem Futter. Chronische Gabe dieser Antagonisten führt zu einer deutlichen Reduktion des Körpergewichts bei Ratten mit nahrungsbedingter Adipositas. Die Expression der MCH-Neurone verändert sich sowohl bei Gewichtsverlust als auch bei Gewichtszunahme [Tritos und Maratos-Flier, 1999]. Während des Fastens ist die MCH-Expression erhöht und ebenfalls bei ob/ob-Mäusen, die einen Leptin-Synthese-Defekt aufweisen [Qu et al., 1996]. MCH interagiert mit peripheren Hormonen der Gewichtsregulation. Es erhöht die Synthese und Sekretion von Leptin in Adipozyten [Bradley et al., 2000].

Zusätzlich zu diesem Effekt auf den Stoffwechsel könnte MCH eine Rolle in der Stimmungsregulation spielen, da MCH-Rezeptor-Antagonisten einen antidepressiven und anxiolytischen Effekt haben [Borowsky et al., 2002].

Im lateralen Hypothalamus ebenfalls exprimiert wird das Neuropeptid Orexin-A bzw. Hypocretin-1 [Sakurai et al., 1998; de Lecea et al., 1998]. Die Orexin-exprimierenden Neurone haben wie die MCH-sezernierenden Zellen Projektionen in alle wesentlichen Gehirnareale mit Ausnahme des Cerebellums [Peyron et al., 1998; Nambu et al., 1999]. Orexin-A ist ebenfalls in die Nahrungsregulation involviert, zentral verabreicht stimuliert es die Kalorienaufnahme [Sakurai et al., 1998]. Orexin-Knockout-Mäuse zeigen dennoch

keine Gewichtsabnahme, stattdessen haben sie eine Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus, die der Narkolepsie ähnelt [Chemelli et al., 1999]. In einer anderen Studie führte die genetische Ablation der Orexinneurone zu erniedrigter physischer Aktivität und induzierte trotz Hypophagie eine late-onset Adipositas [Hara et al., 2001]. Axone der Orexin-Neurone stehen bei Ratten in Kontakt mit NPY- und POMC-Neuronen im Nucleus arcuatus und Mikroinjektionen von Orexin in den Nucleus arcuatus stimuliert ebenfalls die Nahrungsaufnahme [Muroya et al., 2004]. Auch AgRP-Neurone werden durch Orexin stimuliert [van den Top et al., 2004].

Vorwiegend in Neuronen des Nucleus paraventricularis wird das anorexigene Peptid CRH exprimiert. Die Zellen projizieren diffus von diesem Kern in andere Bereiche des Hypothalamus und beeinflussen das neuroendokrine System und die Energiehomöostase [Mezey et al., 1984; Liposits et al., 1985; Sakanaka et al., 1986; Arase et al., 1989]. Zentrale Gabe von CRH inhibiert die Nahrungsaufnahme, Injektion von CRH in den Nucleus paraventricularis oder eine Läsion dieses Kerns ruft Hypophagie bzw. Hyperphagie hervor [Arase et al., 1988; Krahn et al., 1988]. CRH-Signale sind zusätzlich wichtig für eine adäquate Reaktion des Körpers auf Stress [Bale et al., 2000; Coste et al., 2000].

1.4 Zirkulierende Parameter

Peripher nimmt Leptin in der Koordination zwischen dem anabolen und dem katabolen Stoffwechsel eine Schlüsselrolle ein. Das Hormon wird von Fettzellen freigesetzt und zirkuliert proportional zur Fettmasse des Körpers. Es unterdrückt Appetit und stimuliert das sympathische Nervensystem [Mark et al., 2002]. Das Hormon überwindet die Blut-Hirn-Schranke und bindet an Leptin-Rezeptoren im Hypothalamus. Es aktiviert Signale zur Verminderung der Nahrungsaufnahme und Erhöhung des Energieverbrauchs [Korner und Aronne, 2003]. Leptin-Rezeptor-defiziente Ratten (adipöse Zucker-Ratten) und Leptin-defiziente Mäuse (ob/ob-Mäuse) entwickeln eine Hyperphagie, Adipositas, periphere Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und Hyperlipidämie [Zucker, 1965; Ionescu et al., 1985; Kasiske et al., 1992; Gades et al., 1999]. Diese Tiere haben wie die meisten adipösen Patienten einen erhöhten Leptinspiegel und entwickeln eine primäre oder sekundäre Leptinresistenz. Leptin hat Effekte auf die Genexpression und Synthese von sowohl orexigenen als auch anorexigenen Peptiden im Hypothalamus. Im Nucleus arcuatus werden NPY und AgRP negativ, POMC und CART positiv reguliert [Mizuno et al., 1998;

Flier und Maratos-Flier, 1998; Elmquist et al., 1999; Korner und Aronne, 2003]. Leptin erhöht die Sekretion, Konzentration und mRNA-Expression von CRH im Nucleus paraventricularis [Huang et al., 1998], bei den Leptin-Rezeptor-defizienten Zucker-Ratten ist die Konzentration von CRH im Hypothalamus geringer [Plotsky et al., 1992; Richard et al., 1996]. Außerdem inhibiert Leptin wie auch Glukose die elektrische Aktivität von Orexin-Neuronen [Yamanaka et al., 2003]. Gibt man fastenden Mäusen Leptin, so erniedrigt sich die durch Fasten induzierte Erhöhung von hypothalamischen MCH und NPY wieder [Ahima et al., 1996]. Leptinverabreichung bei Leptin-Gen-defizienten ob/ob-Mäusen führt zu Erniedrigung der NPY-Expression im Hypothalamus [Stephens et al., 1995], ähnliche Effekte traten mit MCH auf [Kokkotou et al., 2001]. In anderen Studien dagegen erhöhte Leptin die Expression von MCH mRNA im Hypothalamus bei ob/ob-Mäusen [Huang et al., 1999].

Insulin ist ebenfalls in wichtige Stoffwechselforgänge involviert und wirkt zentral ähnlich wie Leptin. Intrazerebroventrikuläre Gabe von Insulin reduziert die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht [Air et al., 2002], intranasal über einen längeren Zeitraum appliziert verringert es das Körpergewicht von Männern, nicht aber von Frauen [Hallschmid et al., 2004]. Dagegen ruft Deletion des neuronalen Insulin-Rezeptors Hyperphagie, Adipositas und Insulinresistenz hervor [Obici et al., 2002]. Dennoch ist Insulin peripher ein anaboler Faktor, pharmakologische Level von Insulin sind mit Gewichtszunahme assoziiert [Air et al., 2002]. Plasma-Insulinkonzentrationen korrelieren mit Plasma-Leptinkonzentrationen bei Tieren und Menschen [Ahren et al., 1997; Havel, 1998]. Persistierende erhöhte Level von Insulin desensibilisieren die Zielzellen und führen zu generalisierter Insulinresistenz [Roth et al., 2004]. Leptin-Gen-defiziente ob/ob-Mäuse sind hyperinsulinäm und können einen Diabetes mellitus entwickeln [Joosten und van der Kroon, 1974; Muzzin et al., 1996]. Die Resistenz besteht auch bei Hyperleptinämie, wie der Agouti-Maus [Boston et al., 1997], bei Leptin-Rezeptor-defizienten Zuckerratten [Kemmer et al., 1979] und bei Diät-bedingter Adipositas [Frederich et al., 1995]. Tiere, die mit NPY behandelt wurden, entwickelten ebenfalls eine Insulinresistenz, sogar, wenn sie keine Adipositas bekamen [Sainsbury et al., 1997]. Hyperinsulinämie und Insulinresistenz sind beide in die Pathogenese von Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und Atherosklerose involviert [Prasad und Quyyumi, 2004].

Adiponectin ist wie Leptin ein vom Fettgewebe produziertes Protein mit einem erheblichen Einfluss auf die Insulinsensitivität. Adiponectin-mRNA wird in Adipozyten exprimiert und Adiponectin zirkuliert in hohen Konzentrationen in Nagern und Primaten. Im Gegensatz zu vielen anderen Adipokinen korreliert das Adiponectin invers zur Fettmasse im Körper [Gorzelnia et al., 2002] und ist damit bei Übergewicht und Insulinresistenz erniedrigt [Guerre-Millo, 2004]. Bei Rhesus-Affen sinkt die Plasma-Adiponectinkonzentration mit der Entwicklung von Insulinresistenz bei Übergewicht und im Alterungsprozess [Hotta et al., 2001]. Das Risiko, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken, ist bei Personen mit hohen Adiponectinspiegeln deutlich niedriger als bei Menschen mit geringen Adiponectinkonzentrationen im Plasma [Lindsay et al., 2002; Spranger et al., 2003]. Therapeutische Maßnahmen, die die Insulinsensitivität verbessern, wie Gewichtsverlust, Kalorienrestriktion usw. erhöhen die Adiponectin-Expression im Fettgewebe bzw. die im Plasma zirkulierenden Adiponectin-Level [Guerre-Millo, 2004]. Die Behandlung mit rekombinantem Adiponectin senkt den Blutzucker und verbessert die Insulinresistenz bei übergewichtigen und diabetischen Mäusen [Tsao et al., 2002; Berg et al., 2002]. Interessanterweise kann die Insulinresistenz bei lipoatropen Mäusen mit physiologischen Dosen von Adiponectin und Leptin vollständig aufgehoben werden, bei alleiniger Gabe von Adiponectin oder Leptin dagegen nur teilweise [Yamauchi et al., 2001]. Bei den Leptin-Gen-defizienten ob/ob-Mäusen verbessert Adiponectin wiederum die Insulinresistenz, jedoch nicht das Übergewicht [Yamauchi et al., 2003].

Corticosteron wird bei Stresszuständen von der Nebennierenrinde sezerniert. Dieser Prozess ist durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) reguliert. Die Verabreichung von CRH erhöht die Konzentration von zirkulierendem Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) und dieses wiederum die Menge des Corticosteron im Plasma innerhalb von 10 min [Stanley et al., 2004]. Ist zu wenig Corticosteron vorhanden, erhöht sich durch negatives „Feedback“ die hypothalamische CRH-Immunoreaktion und der ACTH-Gehalt der Hypophyse, wie z.B. nach Adrenalektomie [Moldow und Fischman, 1982; Gertz et al., 1987]. Gibt man Corticosteron dagegen in höheren Dosen, so wird das hypothalamische CRH inhibiert und es erniedrigt sich der ACTH-Gehalt der Hypophyse [Bagdy et al., 1990; Akana et al., 1992].

Hypertensive Patienten haben einen erhöhten Cortisol-Spiegel im Plasma [Filipovsky et al., 1996]. Corticosteron beeinflusst den Metabolismus und das Körpergewicht. Beim Cushing-Syndrom, das durch primären Hypercortisolismus entsteht, sind Adipositas und

das Metabolische Syndrom zu beobachten [Peeke und Chrousos, 1995] und sowohl bei Tieren als auch bei Menschen wird die Leptin-Produktion von Glucocorticoiden stimuliert [Dagogo-Jack et al., 1997].

Neben Leptin und Adiponectin sezernieren Adipozyten eine große Vielzahl weiterer Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren und anderer bioaktiver Mediatoren. Diese Adipokine haben zahlreiche Effekte auf die Vaskularisation und den Metabolismus [Guerre-Millo, 2002]. Erhöhte Level von Zytokinen, darunter auch Interleukin-6 (IL-6), zeigen die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 an [Pradhan et al., 2001]. Proinflammatorische Parameter, wie IL-6, TNF α und das C-reaktive Protein, sind bei übergewichtigen Probanden erhöht und korrelieren mit verschiedenen Markern der Adipozytenmenge [Kaiser und Schunkert, 2001; Cottam et al., 2004]. IL-6 ist neben dem Körpergewicht auch mit Insulinsensitivität verbunden, hier aber invers [Bastard et al., 2000; Bastard et al., 2002]. Bei gesunden Menschen stammt ungefähr 30% des zirkulierenden Interleukin-6 aus dem Fettgewebe [Mohamed-Ali et al., 1997]. IL-6-defiziente Mäuse entwickeln eine Adipositas mit Glukoseintoleranz, die durch IL-6-Administration teilweise rückgängig gemacht werden kann. Außerdem wird IL-6 in zentralen Kernen des Hypothalamus exprimiert, die das Körpergewicht regulieren. Intrazerebroventrikulär verabreichtes IL-6 erhöht im Gegensatz zu intraperitoneal gegebenem IL-6 den Energieverbrauch. Demnach hat IL-6 zentral deutliche gewichtsreduzierende Effekte bei Nagern [Wallenius et al., 2002]. In Versuchen mit Biopsien von humanem weißen Fettgewebe und in Adipozytenkulturen sind IL-6 und TNF α potente Inhibitoren der Adiponectin-Expression und -Sekretion [Bruun et al., 2003; Fasshauer et al., 2003]. Die von diesen Zytokinen induzierte Insulinresistenz könnte also teilweise auf Inhibition der Adiponectin-Sekretion zurückzuführen sein.

1.5 Renin- Angiotensin- System

Das in dieser Studie verwendete Medikament Candesartan, dessen Einfluss auf das Körpergewicht hier untersucht werden soll, greift in das Renin-Angiotensin-System (RAS) ein. Das RAS ist eine enzymatische Kaskade. Angiotensinogen wird in Angiotensin I (ANG I) umgewandelt, dieses zu Angiotensin II (ANG II). Renin und das Angiotensinogen-Conversions-Enzym (ACE) sind die Enzyme, die diesen Prozess primär katalysieren. Außerdem gibt es weitere alternative Wege. ANG II stimuliert die Freisetzung von Aldosteron. Zusätzlich zum endokrinen System kann parakrine

RAS-Aktivität in Fettgewebe, Gehirn, Niere, Herz und Blutgefäßen nachgewiesen werden. Die Effekte des ANG II werden hauptsächlich über den Angiotensin II-Rezeptor-Typ-1 (AT₁-Rezeptor) ausgeübt [Prasad und Quyyumi, 2004]. Neben dem AT₁-Rezeptor gibt es den Angiotensin II-Rezeptor-Typ-2 (AT₂-Rezeptor). Beide Rezeptoren gehören zu den G-Protein-Rezeptoren mit sieben Transmembranregionen, sie haben unterschiedliche Transduktionswege [Timmermans et al., 1993]. Der AT₁-Rezeptor ist in vielen Geweben und Organen vorhanden, wie in Herz, Blutgefäßen, Nieren, Gehirn und Fettgewebe, während der AT₂-Rezeptor hauptsächlich beim Fetus exprimiert wird und nach der Geburt nur noch eine niedrige Expression aufweist. Die meisten physiologischen und pathophysiologischen Effekte von ANG II scheinen über den AT₁-Rezeptor übertragen zu werden, der AT₂-Rezeptor spielt eine untergeordnete Rolle [Prasad und Quyyumi, 2004]. Bei Nagetieren gibt es zwei AT₁-Rezeptor-Subtypen, den AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor. Diese Rezeptoren werden von unterschiedlichen Genen kodiert, unterschiedlich exprimiert und reguliert, pharmakologisch können sie nicht unterschieden werden [Inagami et al., 1994]. Das RAS übt vielfältige Funktionen im Organismus aus. ANG II reguliert den Flüssigkeitshaushalt, den Tonus der Gefäßmuskulatur, den Blutdruck sowie kardiovaskuläre Strukturen [Timmermans et al., 1993; Fitzsimons, 1998]. Zentral appliziertes ANG II erhöht in Ratten den Blutdruck, die Trinkmenge und stimuliert die sympathoadrenerge Katecholaminsynthese [Seltzer et al., 2004]. AT_{1A}-Rezeptoren sind der dominante Subtyp im Gehirn von Nagetieren [Leong et al., 2002]. Die zentralen Effekte von Angiotensin II auf Blutdruck und Dehydratation werden vermutlich durch den AT_{1A}-Rezeptor weitergeleitet [Sanvitto et al., 1997; Davisson et al., 2000; Morris et al., 2001], die der Flüssigkeitsaufnahme durch den AT_{1B}-Rezeptor [Davisson et al., 2000].

Das RAS beeinflusst ebenfalls den Stoffwechsel. Sowohl ACE-Hemmer [ALLHAT, 2002] als auch AT₁-Rezeptor-Antagonisten [Dahlof et al., 2002; Julius et al., 2004] verbessern die Insulinsensitivität und damit das Risiko, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken. Ratten mit einer Überexpression des RAS im Gehirn und weiteren Geweben entwickeln schon im Alter von sechs Wochen eine Insulinresistenz [Henriksen und Jacob, 2003]. Auch bei Patienten mit dem Metabolischen Syndrom scheint das RAS aktiviert zu sein [Prasad und Quyyumi, 2004]. Gehirnareale mit RAS-Aktivität und AT₁-Rezeptor-Expression sind an der Insulin- und Leptinregulation, der Steuerung der Nahrungsaufnahme und des Metabolismus beteiligt [Ellacott und Cone, 2004; Niswender et al., 2004; Morton et al., 2005].

Auch auf das Körpergewicht hat das RAS Einfluss. Die Ergebnisse verschiedener Studien sind diesbezüglich allerdings widersprüchlich. In adipösen Patienten bzw. Ratten sind Parameter des RAS wie Angiotensinogen, Renin, Aldosteron und ACE im Fettgewebe erhöht [Hainault et al., 2002; Giacchetti et al., 2002; Boustany et al., 2004; Engeli et al., 2005]. Mit Gewichtsreduktion von adipösen Patientinnen kehren die Angiotensinogen-, Renin-, Aldosteron- und ACE-Level auf Normalwerte zurück und der Blutdruck verringert sich [Engeli et al., 2005]. Mäuse mit systemischen Angiotensinogenmangel haben ein erniedrigtes Körpergewicht [Massiera et al., 2001]. ASrAogen-Ratten mit geringem Angiotensinogenlevel im Gehirn wiegen deutlich weniger als Kontrollratten und haben eine geringere Masse viszerales Fett [Kasper et al., 2005]. Patienten mit Polymorphismen im Angiotensinogen-Gen zeigen Unterschiede im Gewicht [Chaves et al., 2002; Strazzullo et al., 2003]. Nach der Behandlung mit ACE-Hemmern und AT₁-Rezeptor-Antagonisten wird eine Gewichtsreduktion in Ratten und Patienten beobachtet [Enalapril in Hypertension Study Group (UK), 1984; McGrath et al., 1990; Campbell et al., 1995; Benson et al., 2004], die mit einer geringeren Fettmasse einhergeht [Carter et al., 2004]. Im Gegensatz zu diesen Studien wurden bereits 1979 in einer Arbeit erniedrigte ANG II-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit erhöhtem Körpergewicht beobachtet [Walker et al., 1979]. Im Anschluss zeigten weitere Studien eine Induktion von Gewichtsverlust und Reduzierung der weißen Fettmasse durch ANG II. Diese Effekte sind unabhängig vom Blutdruck und dem Applikationsort, peripher oder intrazerebroventrikulär, und werden durch AT₁-Rezeptoren vermittelt [Brink et al., 1996; Cassis et al., 1998; Harrison-Bernard et al., 1999; Porter und Potratz, 2004].

AT₁-Rezeptoren sind in hypothalamischen Arealen vorhanden, die auch in die Nahrungsaufnahme, das Sättigungsempfinden und die Regulation des Energiemetabolismus involviert sind [Ellacott und Cone, 2004; Niswender et al., 2004; Morton et al., 2005]. Mehrere Komponenten des RAS wie Angiotensinogen, ACE und AT₁-Rezeptoren sind im menschlichen Fettgewebe vorhanden. Das fettgewebsständige RAS wird von Hormonen und Ernährungsfaktoren reguliert und korreliert mit dem Ausmaß des Übergewichts [Massiera et al., 2001]. ANG II könnte im Fettgewebe die Durchblutung, das Wachstum und den Metabolismus modulieren [Goossens et al., 2003]. Ein hochreguliertes RAS im Fettgewebe könnte also zu lokalen und systemischen Effekten von adipösen Patienten führen und so zu Insulinresistenz und Hypertonus beitragen [Prasad und Quyyumi, 2004].

1.6 AT₁-Rezeptor-Antagonisten

Das Medikament Candesartan, das hier verwendet wurde, gehört zu den AT₁-Rezeptor-Antagonisten. Diese binden kompetitiv und selektiv an den AT₁-Rezeptor [Burnier, 2001], ihre Sicherheit und Effektivität wurde in zahlreichen Studien belegt [Cohn und Tognoni, 2001; Brenner et al., 2001; Parving et al., 2001; Lewis et al., 2001; Dahlof et al., 2002; Lindholm et al., 2002; Pfeffer et al., 2003]. Sie werden in der medizinischen Praxis heute routinemäßig als Antihypertensiva sowie zur Therapie der Herzinsuffizienz angewendet. Im Gegensatz zu einer Medikation mit ACE-Hemmern ist durch die AT₁-Rezeptor-Blockade auch die Wirkung von durch alternative ACE-unabhängige Wege produziertes ANG II gehemmt. Somit wird auch der „ACE-Escape-Effekt“, die langsame Anpassung des ANG II-Levels an Konzentrationen vor der Behandlung, umgangen. Ein weiterer Vorteil ist das Ausbleiben des von ACE-Hemmern oft hervorgerufenen Reizhustens [Sharma, 2004].

Das verwendete Medikament Candesartan senkt den Blutdruck bei Säugetieren und Menschen wirkungsvoll [McKelvie et al., 1999; Naruse et al., 2002; Seltzer et al., 2004; Raasch et al., 2004; Raasch et al., 2006]. Orale Vorbehandlung mit Candesartan inhibiert die Effekte von interventrikulär applizierten ANG II in Ratten [Seltzer et al., 2004]. Auch zur Behandlung des Metabolischen Syndroms scheinen AT₁-Rezeptor-Antagonisten geeignet zu sein. Kurz- und langfristige AT₁-Rezeptor-Blockade verhindert die Entwicklung von Hypertonie und Hyperinsulinämie, die mit erhöhter ANG II-Konzentration und AT₁-Rezeptordichte auftritt [Iyer et al., 1996; Iyer und Katovich, 1996]. In einem Mausmodell mit genetisch hervorgerufenem Metabolischen Syndrom verhindern AT₁-Rezeptor-Antagonisten die Entwicklung von Hyperinsulinämie, Hypertonie, Adipositas, kardialer Hypertrophie und Atherosklerose [Ortlepp et al., 2002]. Behandlung mit Valsartan, Losartan oder Candesartan reduziert die Inzidenz von Diabetes mellitus Typ 2 [Dahlof et al., 2002; Lindholm et al., 2002; Julius et al., 2004; Yusuf et al., 2005].

1.7 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen die Mechanismen der Gewichtsregulation in Zusammenhang mit dem Renin-Angiotensin-System näher untersucht werden. Der Schwerpunkt liegt auf der Frage, ob sich das Körpergewicht parallel zur Absenkung des Blutdrucks durch AT₁-Antagonisten vermindert, ab welcher Dosierung dies geschieht, wie sich die Nahrungsaufnahme in diesem Zusammenhang ändert und welche hormonellen und neuroendokrinen Veränderungen beobachtet werden können. Die meisten Studien, welche

die Zunahme bzw. die Abnahme des Körpergewichts in Abhängigkeit des RAS untersuchen, konzentrieren sich auf periphere Effekte, wie zum Beispiel Lipolyse, Reduktion der Fettmasse, Thermogenese oder die periphere sympathische Aktivität. Es gibt Studien zur zentralen Wirkung des RAS, in denen beispielsweise ANG chronisch intrazerebroventrikulär verabreicht wurde [Porter und Potratz, 2004] oder Angiotensinogen-defiziente Ratten verwendet wurden [Kasper et al., 2005]. Dennoch ist bisher wenig bekannt, wie sich eine Blockade des RAS auf orexigene und anorexigene hypothalamische Neuropeptide auswirkt.

Bereits in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe fiel auf, dass Candesartan in höheren Dosen über längere Zeiträume bei Ratten die Gewichtszunahme deutlich senkt. Dies gab den Anstoß zu dieser Arbeit, in der spontan hypertensive Ratten über vier Wochen mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Candesartan behandelt und Parameter wie Nahrungs- und Wasseraufnahme, Herzfrequenz, Blutdruck, Gewicht sowie Glukose bestimmt wurden. Anschließend wurden die „mRNA-steady-state“-Konzentrationen von AT_{1A}-, AT_{1B}-Rezeptoren sowie MCH, Orexin, CART, NPY, POMC, AgRP und CRH mittels Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) im Hypothalamus gemessen. Außerdem wurden die peripheren gewichtsregulierenden Hormone Insulin, Leptin, Adiponectin und IL-6 ermittelt.

2. Methoden

2.1 Behandlung der Tiere

Als Versuchstiere wurden männliche spontan hypertensive Ratten (SHR) der Firma Charles River, Sulzfeld verwendet. Die Tiere lebten in einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden, die Lichtanschaltung erfolgte um 14 Uhr. Die SHR waren zu dritt oder zu viert in Käfigen mit freiem Zugang zu Leitungswasser und Standardnahrung bei einer konstanten Temperatur von 24 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 % untergebracht. Die Tierversuche wurden entsprechend der Deklaration von Helsinki und den entsprechenden Richtlinien für den Umgang und die Verwendung von Labortieren nach Genehmigung durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein bewilligt (siehe Anhang).

60 dieser SHR wurden im Alter von 8-9 Wochen in vier Gruppen nach Körpergewicht randomisiert. Die Tiere bekamen über vier Wochen täglich zum gleichen Zeitpunkt morgens über eine Schlundsonde Candesartan-Cilexetil in Suspension mit destilliertem Wasser und Gummi-Arabicum (1µl/1g Körpergewicht) je nach Gruppe in den Konzentrationen von 2; 6; 16 mg/kg Körpergewicht. Der Kontrollgruppe wurde das gleiche Volumen einer Gummi-Arabicum-Suspension (1µl/1g Körpergewicht) gegeben. Zur Berechnung der zu gebenden Candesartandosis wurden die Tiere täglich gewogen. Am 19. Tag der Medikamentengabe wurden die Tiere isoliert, damit vom 20.- 21. Tag die Futteraufnahme in 24 Stunden über das Gewicht der Nahrung gemessen werden konnte. Am 21. Tag wurde den Ratten in Pentobarbital-Narkose (75 mg/kg Körpergewicht) ein Polyethylen-Katheter in die rechte Arteria femoralis eingesetzt und gleichzeitig 1 ml Blut abgenommen. Das Vollblut wurde mit 50 µl EDTA-Lösung (900 mg EDTA auf 10 ml destilliertem Wasser) versetzt, 5 min bei 3500 xg zentrifugiert und das Plasma abgenommen. In der Narkose wurde die Körperlänge gemessen (Nasenspitze zu Schwanzwurzel). Über den Katheter und NaCl-gefüllten Schlauch erfolgte dann am 22. Tag zwischen 9 und 11 Uhr randomisiert am wachen Tier in blutiger Messmethode eine Blutdruck- und Herzfrequenzbestimmung. Die Werte wurden für 5 min aufgenommen und ein Mittelwert in einem Zeitfenster von 20 s als repräsentativer Wert ermittelt [Raasch et al., 2006]. Anschließend wurden die Tiere wieder in die alten Käfige gesetzt. Am 30. Tag wurden die Ratten ohne Narkose mit einer Guillotine getötet. Der Blutzucker wurde mit Hilfe eines Glukose-Sensors bestimmt, der nach enzymatischer Glukoseoxidation amperometrisch die Konzentration misst (Ascensia ELITE XL, Bayer).

Weiteres Blut wurde abgenommen, von dem ein Teil mit EDTA (s.o.), ein anderer Teil zur Angiotensin-Bestimmung mit 12,1 mM EDTA und 20 μ M Bestatin versetzt und zentrifugiert wurde (s.o.). Das Gewicht des linken Ventrikels wurde gemessen.

Nachdem das Gehirn frei präpariert war, wurde es in 2-Methylbutan gefroren. Omentales Fettgewebe wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und alle Organe zunächst bei -20 °C und anschließend bei -80 °C tiefgefroren.

Isolierung des Hypothalamus

Der Hypothalamus wurde nach der Methode von Palkovitz und Brownstein entnommen. Die bei -80 °C gelagerten Gehirne wurden für 30 min bei -12 °C erwärmt. Mit anatomischer Pinzette und Skalpell wurde ein Koronarschnitt ca. 1 mm rostral des Chiasma opticums und ein weiterer Schnitt zur Abtrennung der Corpora mamillaria gesetzt. Von dem Stück mit Hypothalamus wurden die Amygdala lateral abgetrennt und das Gewebe ventral des Hypothalamus einschließlich der Commissura anterior entfernt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde der Hypothalamus erneut bei -80 °C gelagert.

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 Radio-Immuno-Assays

Die Bestimmung von Angiotensin, Aldosteron, Leptin, Insulin, Adiponectin und Corticosteron erfolgte mittels kommerziell erhältlicher Kits analog den Vorschriften. Das genaue Vorgehen sei deshalb hier nur in Kürze geschildert.

Angiotensin

Der Angiotensingehalt im Plasma (12,1 mM EDTA und 20 μ M Bestatin) vom Schlachttag wurde mit dem Euria-Angiotensin II Kit (Kat.Nr. RB 320) bestimmt.

250 μ l Plasmaprobe wurden mit 1 ml kaltem Ethanol geschüttelt, 15 min bei 4 °C und 2000 xg zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Für die Wiederfindungsrate wurde eine beliebige Plasmaprobe mit 50 μ l J-125-Angiotensin II gemischt und dann wie beschrieben behandelt. Die Flüssigkeit verdampfte über Nacht in einem Vakuum-Verdampfer. Anschließend wurden die Proben mit 250 μ l Assaypuffer rekonstituiert. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden 200 μ l der Wiederfindungsprobe abgenommen. Diese und 100 μ l J-125-Angiotensin II für die Gesamtaktivität wurden im γ -Counter 5 min gezählt. Die Wiederfindung (%) ist die Aktivität der Wiederfindungsprobe dividiert durch die Gesamtaktivität multipliziert mit Faktor 250, sie betrug 71,88 %.

Eine Verdünnungsreihe 1:2 des Standards wurde mit Assaypuffer hergestellt. 200 μ l Standard, Aliquot oder Kontrolle wurden mit 100 μ l Anti-Angiotensin II bei 4 °C 6 h inkubiert. 100 μ l des J-125-Angiotensin II wurden hinzugegeben, anschließend 20 h bei 4°C inkubiert. Dann wurden 50 μ l Trennreagenz dazu pipettiert, bei 4 °C 45 min inkubiert, geschüttelt, 15 min bei 1700 xg bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Proben im Gamma-Counter 5 min gezählt.

Aldosteron

Die Plasma-Aldosteronkonzentration des 21. Tages wurde mit Hilfe des Aldosterone DA Kit von MP Biomedicals (Kat.Nr. 07-108202) bestimmt.

100 μ l Plasma wurden mit 2 ml Ethylacetat:Hexan in dem Verhältnis 3:2 für 45 s in verschließbaren Glasröhrchen geschüttelt und dann für 20 min zur Phasentrennung bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Röhrchen wurden für 15 s in einer Mischung aus Methanol und Trockeneis gefroren, anschließend die flüssige organische Phase dekantiert und auf einem Wärmetisch bei 40 °C im Stickstoffstrom getrocknet. Die Rekonstituierung erfolgte mit 1 ml Steroid-Diluent, die Probeninkubation dauerte 30 min und wurde dreimal von einer Minute Schütteln unterbrochen. Die Proben lagerten für 20 h bei -20 °C.

250 µl Aliquot bzw. Standard wurden mit 50 µl Anti-Aldosteron und 50 µl J-125-Aldosteron gemischt, 60 min bei Raumtemperatur und anschließend 60 min im Wasserbad bei 4 °C inkubiert. 250 µl Präzipitationslösung der Temperatur von 37 °C erwirkten die Ausfällung. Die Proben wurden bei 1000 xg 20 min zentrifugiert, anschließend der Überstand abgesaugt und die Proben im Gamma-Counter 5 min ausgezählt. Zum Erhalt der Einheit pg/ml wurden die Werte mit 40 multipliziert.

Leptin

Die Leptin-Konzentrationen wurden mittels Radioimmunoassay unter Verwendung des Rat Leptin Ria Kit von Linco Research (Cat.#RL-83K) bestimmt.

Leptinbestimmung im Plasma:

Zu je 50 µl Pufferlösung wurde 50 µl EDTA-Plasma der Probe, Kontrolle oder Standard gegeben und 50 µl Ratten-Leptin-Antikörper hinzugegeben, anschließend geschüttelt und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 50 µl J-125-Ratten-Leptin-LabelHydratingPufferlösung dazu pipettiert und nochmals für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Am dritten Tag wurden die Proben mit 500 µl auf 4 °C gekühlter Präzipitationslösung versetzt, 20 min bei 4 °C inkubiert, 20 min bei 4 °C mit 2000-3000 xg zentrifugiert, abgesaugt und im Gamma-Counter jede Probe 5 min gezählt.

Leptinbestimmung im Fettgewebe:

Die tiefgefrorenen Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit einem Skalpell grob zerkleinert. Maximal 300 mg je Probe wurden auf der Feinwaage abgewogen und mit der vierfachen Menge eines Homogenisat-Puffers (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 250 mM Saccharose, 2,5 µl/ml Leupeptin, 3,5 µl/ml Aprotinin, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1% Triton, pH-Einstellung auf 7,4 mit HCl und NaOH) auf Eis aufgefüllt [Russell et al., 2001]. Die Proben wurden mit dem Tourax (Stufe 4) 30 s auf Eis homogenisiert und dann 60 min bei 4 °C bei 5000 xg zentrifugiert. Das Homogenisat wurde abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Der RIA zur Bestimmung der Leptin-Konzentration wurde wie oben

beschrieben durchgeführt. Anstatt EDTA-Plasma wurde ein Aliquot von 50 µl des Homogenisats verwendet.

Insulin

Die Bestimmung der Insulinkonzentration am 21. Tag im Plasma erfolgte mittels Radioimmunoassay, es wurde der Rat Insulin Ria Kit von Linco Research (Cat.#RI-13K) verwendet.

50 µl EDTA-Plasma der Probe bzw. 50 µl Kontrolle oder Standard wurde mit 50 µl J-125-Insulin-LabelHydratingPufferlösung versetzt. 50 µl Ratten-Insulin-Antikörper wurden zu der Probe hinzugegeben, geschüttelt und bei 4 °C für 24 h inkubiert. Dann wurden 500 µl der 4 °C kalten Präzipitationslösung hinzu pipettiert, erneut geschüttelt und bei 4 °C für 20 min inkubiert. Bei 2000-3000 xg wurde 20 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Proben wurden anschließend im Gamma-Counter je 5 min gezählt.

Adiponectin

Der Adiponectin-Gehalt des EDTA-Plasmas vom Schlachttag wurde mit dem Mouse Adiponectin Ria Kit (Cat.#MADP-60HK) bestimmt.

Zunächst wurde das Plasma mit Assaypuffer 1:500 in zwei Schritten verdünnt. Zu 50 µl Assaypuffer wurden 50 µl Standard, Kontrolle oder verdünnte Probe gegeben, 50 µl J-125-Adiponectin und danach 50 µl Adiponectin-Antikörper hinzugefügt und anschließend für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. 5 µl des Kaninchen-Trägers und 500 µl auf 4 °C gekühlte Präzipitationslösung wurden dazugegeben, geschüttelt und 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden bei 4 °C 20 min bei 2000-3000 xg zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Der Gamma-Counter maß die Aktivität der Proben für je 5 min.

Corticosteron

Das Corticosteron im Plasma wurde mittels Corticosteron 125-J-Ria Kit für Ratten und Mäuse (Kat.Nr. 07-120102) aus dem Blut vom Schlachttag bestimmt.

Die Plasmaproben wurden 1:200 mit Steroid-Diluent in zwei Schritten verdünnt. Zu 50 µl Standard bzw. verdünnte Probe wurde 100 µl J-125-Corticosteron gegeben und dann 100 µl Anti-Corticosteron hinzugefügt, geschüttelt und bei Raumtemperatur 2 h inkubiert.

Die Fällung wurde mit 250 µl Präzipitationslösung ausgelöst, anschließend die Proben geschüttelt und 15 min bei 1000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Proben im Gamma-Counter je 5 min gezählt.

2.2.2 Elisa

Der IL-6-Gehalt der ANG II-Plasma Proben wurde mit dem kommerziell erhältlichen Kit Rat IL-6 ELISA von Bender MedSystems GmbH, Wien (Kat.Nr. BMS625) analog den Vorschriften ermittelt.

Auf der Microwell-Platte wurde eine Verdünnungsreihe des Standards 1:2 mit Pufferlösung hergestellt, 100 µl je Standard, 100 µl der Proben und 100 µl Puffer als Blankoprobe wurden in der Platte mit 50 µl Biotin-Konjugat gemischt und die abgedeckte Platte 2 h auf einem Schwenker (200 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde mit Waschpuffer dreimal gewaschen und dann 100 µl Streptavidin-HRP hinzugefügt. Nach Abdecken inkubierte die Platte erneut für 1 Stunde auf dem Schwenker (200 rpm) bei Raumtemperatur. Nach dreimaligen Waschen mit dem Waschpuffer wurde 100 µl TMB Substratlösung (SubstrateSolution1:SubstrateSolution2; 1:1) hinzugefügt und die Platte 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion endete mit 100 µl Stop-Lösung und die Absorption wurde bei 450 nm im FLUOstar OPTIMA gemessen.

2.2.3 Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Neuropeptide des Hypothalamus wurden mittels Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) bestimmt. Aus dem homogenisierten Hypothalamus-Gewebe wurde die RNA extrahiert und cDNA hergestellt, damit anschließend die RT-PCR durchgeführt werden konnte. Es wurden kommerzielle Kits benutzt und nach Vorschrift vorgegangen (Isolation of Total RNA from Plant, Applied Biosystems; Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit, Invitrogen, Cat.No.: 12328-040; Scybr Green I Reaction System, Eurogentec SA, Cat.No.: ME-SN73-05).

Homogenisierung des Hypothalamus und RNA-Isolierung

PBS-Puffer und Lysis Solution wurden im Verhältnis 1:1 unter sterilen Bedingungen gemischt und der Hypothalamus in 1000 µl dieser Lösung mit dem Tourax homogenisiert.

Das homogenisierte Gewebe wurde mit 40 µl Proteinase K versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Vakuumgerät zur RNA-Isolierung (6100 Nucleic Acid Prep Station) wurde mit 50 µl Waschpuffer 1 in allen Probenöffnungen vorbereitet. 250 µl des homogenisierten Hypothalamus wurden dazugegeben und dann die Lösung mit Vakuum abgesaugt. Anschließend wurden erneut 500 µl Waschpuffer 1 hinzugefügt und abgesaugt. Dieser Waschvorgang wiederholte sich mit 400 µl Waschpuffer 1 und zweimal mit 300 µl Waschpuffer 2. Nachdem sämtlicher Waschpuffer entfernt war, wurden 150 µl Elution Solution hinzugeführt und darin die RNA gelöst. Nach Überführung in eine neue Platte wurde die Flüssigkeit abgenommen und bei -80°C gelagert. Die Reinheit der RNA wurde durch Messung des Absorptionskoeffizienten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm im Photometer und Berechnung des Quotienten belegt.

cDNA-Herstellung

RT-Pool:

5x RT Puffer	4 µl je Probe
DEPC Wasser	1 µl je Probe
DTT (0,1 M)	1 µl je Probe
RNaseOUT (40 units/ µl)	1 µl je Probe
Cloned AMV RT (15 units/ µl)	1 µl je Probe

Die cDNA-Herstellung erfolgte mit dem Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit von Invitrogen. Die Primer (Tabelle 2) wurden im Labor designed und validiert. Pro Probe wurden 1 µl Oligo (dT) Primer mit 2 µl cNTP Mix gemischt und 3 µl dieser Lösung zu 9 µl RNA pipettiert. Die RNA und Primer inkubierten 5 min bei 65 °C im Cycler. 8 µl des RT-Pools wurden zu jeder Probe gegeben und im Cycler für 60 min auf 50 °C und anschließend für 5 min auf 85 °C erhitzt. Die synthetisierte cDNA wurde 1:2 mit Nuclease-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 2: Nukleotid-Sequenzen der für die RT-PCR verwendeten Primer

Name	Orientation	Sequence
AT _{1A}	Sense	5'- TCA AAC TCC CAG TGG ACC TC -3'
	Antisense	5'- CTC ACC GAA GCC TCT CTC AC -3'
AT _{1B}	Sense	5'- TTC AAC CTC CAG CAA TCC TT -3'
	Antisense	5'- CCC AAA TCC ATA CAG CCA CT -3'
MCH	Sense	5'- CAT TTT ACT TTC GGC CTC CA -3'
	Antisense	5'- TGG AGC CTG TGT TCT TTG TG -3'
Prepro-Orexin	Sense	5'- GCC GTC TCT ACG AAC TGT TG -3'
	Antisense	5'- CGA GGA GAG GGG AAA GTT AG -3'
CART	Sense	5'- ACT GTC CCC GAG GAA CTT CT -3'
	Antisense	5'- ATT TTG AAG CAG CAG GGA AA -3'
NPY	Sense	5'-TAA CAA ACG AAT GGG GCT GT -3'
	Antisense	5'-TGT CTC AGG GCT GGA TCT CT -3
POMC	Sense	5'- GAA GGT GTA CCC CAA TGT CG -3'
	Antisense	5'- CTT CTC GGA GGT CAT GAA GC -3'
AgRP	Sense	5'- GCA GAC CGA GCA GAA GAT GT -3'
	Antisense	5'- CTT GAA GAA GCG GCA GTA GC -3'
CRH	Sense	5'- AAA GGG GAA AGG CAA AGA AA -3'
	Antisense	5'- GTT TAG GGG CGC TCT CTT CT -3'

RT-PCR:

Mit RT-PCR wurde der Gehalt von mRNA im Hypothalamus von AT_{1A}-Rezeptoren, AT_{1B}-Rezeptoren, MCH, Orexin, AgRP, CART, NPY, POMC, CRH gemessen. Um eine quantitative Aussage und Bewertung der PCR-Ergebnisse machen zu können, wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als interner Standard verwendet. Alle RT-PCR-Werte wurden durch die in der cDNA gemessenen RT-PCR-Werte der GAPDH Menge der jeweiligen Proben dividiert.

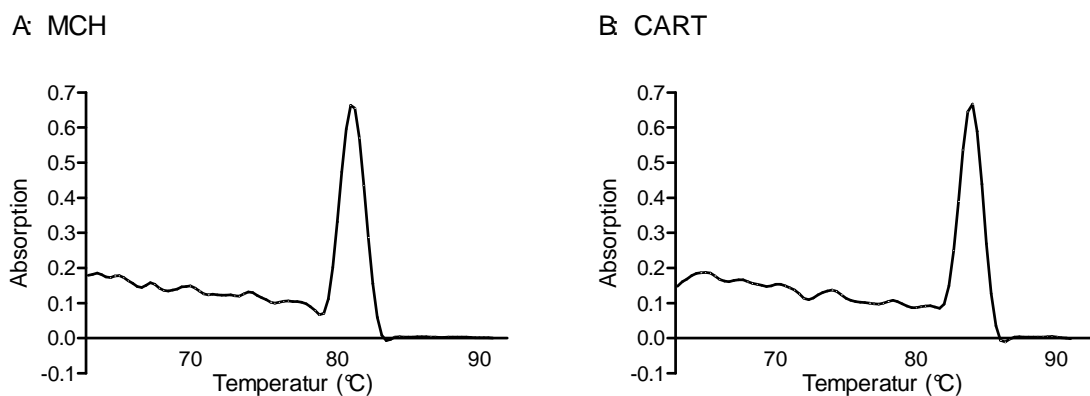
TE-Puffer:

1 M Tris pH 7,4	100 μ l
0,5 M EDTA pH 8,0	20 μ l
DEPC-Wasser	9880 μ l

PCR-Master Mix:

Puffer 10X	250 μ l
dNTP-Mix, 5mM	100 μ l
MgCl ₂ , 50mM	162,5 μ l
HotGoldStar Enzyme	12,5 μ l
SybrGreen	75 μ l
DEPC-Wasser	1550 μ l
Sense Primer (10 pmol/ μ l)	75 μ l bzw. 225 μ l bei NPY, MCH, POMC
Antisense Primer (10 pmol/ μ l)	75 μ l

Die Standardverdünnung erfolgte jeweils 1:10 mit TE-Puffer. 2 μ l cDNA der Proben bzw. 2 μ l cDNA der jeweiligen Standards wurden mit 22 μ l PCR-Master Mix in der PCR Platte gemischt und kurz abzentrifugiert. Die Reaktion lief im ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems ab, die Messung fand bei 520 nm statt. An den Schmelzkurven lässt sich die Reinheit der Proben überprüfen. In Abb. 2 sind sie für zwei Werte exemplarisch abgebildet.

**Abb. 2:**

A: Schmelzkurve eines Wertes von MCH, 16 mg/kg/d Candesartan

B: Schmelzkurve eines Wertes von CART, 16 mg/kg/d Candesartan

Gel

Ladepuffer:

Glycerol	600 μ l
DEPC-Wasser	1200 μ l
2,5% Xylen-Cyanol in DEPC	200 μ l

Um mit einer weiteren Methode die Reinheit der Proben zu belegen, wurden exemplarisch Gele angefertigt, in denen sich die DNA elektrophoretisch auftrennt (Abb. 3; Abb. 4). Ein 2 % Agarosegel (6 g Agarose auf 300 ml TAE-Puffer, nach Erhitzen Zugabe von 6 μ l Ethidiumbromid) bestückte man mit 2,5 μ l Marker und 12,5 μ l RT-PCR-Proben, die jeweils mit 2,5 μ l Ladepuffer gemischt worden waren, und legte eine Spannung von 220 V mit 400 mA für 30 min an. Die Bilder wurden unter UV-Licht aufgenommen.

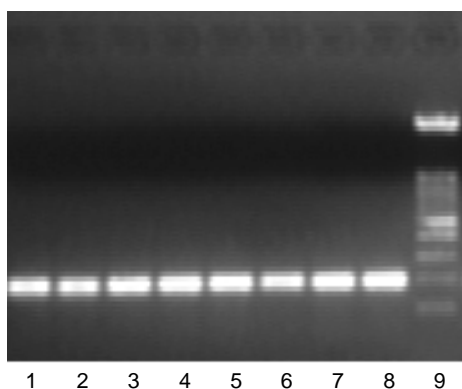


Abb. 3: Gel-Elektrophorese MCH; Proben 1-4: Behandlung mit 0 mg/kg/d Candesartan; Proben 5-8: Behandlung mit 2 mg/kg/d Candesartan; Probe 9: Marker

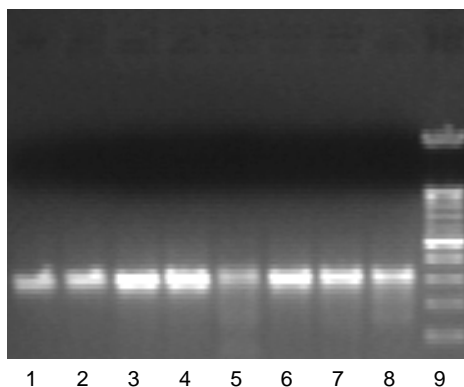


Abb. 4: Gel-Elektrophorese Orexin; Proben 1-4: Behandlung mit 0 mg/kg/d Candesartan; Proben 5-8: Behandlung mit 2 mg/kg/d Candesartan; Probe 9: Marker

2.3 Statistische Methoden

Aus den Einzelmesswerten wurden die arithmetischen Mittelwerte gebildet. Diese werden mit dem Standardfehler abgebildet.

Mit folgenden Tests wurde auf Signifikanz geprüft:

Bei Normalverteilung und homogenen Varianzen konnte der One-Way ANOVA angewendet werden. Als Posttest wurde der Dunnetttest zum Vergleich der Gruppen gegen die Kontrollgruppe bzw. der Bonferronis Multiple Comparison Test zum Vergleich aller Gruppen benutzt. Lag keine Normalverteilung vor oder waren die Varianzen inhomogen, so wurde der Wilcoxon-Test angewendet. Zum Vergleich der mRNA-Werte wurde der Bootstrap-Test mit 1 000 000 Replikationen und einem Konfidenzintervall von 95 % verwendet.

Für die Korrelationsanalysen wurde der Pearson-Test einseitig mit einem Konfidenzintervall von 95 % im GraphPad Prism-Programm angewendet.

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

3. Ergebnisse

3.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht der SH-Ratten der verschiedenen Gruppen unterschied sich zu Beginn der Versuche nicht (Abb. 5). Es betrug $261,1 \pm 17,6$ g.

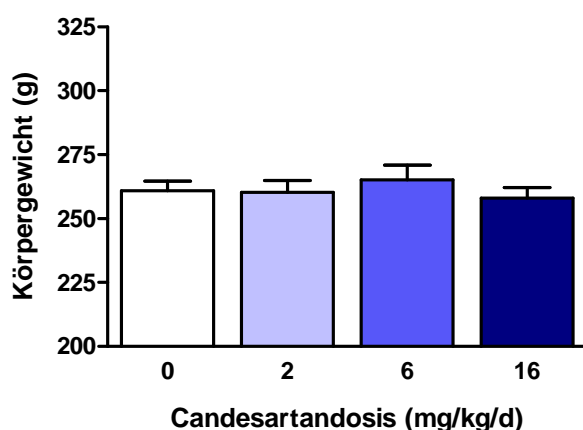


Abb. 5: Körpergewicht am 1. Tag; MW ± SEM, n = 15, es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, die mit 0; 2; 6; 16 mg Candesartan/kg Körpergewicht/ Tag behandelt wurden.

Im Verlauf des Versuches nahmen die Ratten, die mit 16 mg Candesartan pro kg Körpergewicht täglich behandelt wurden, deutlich weniger zu als die Ratten mit den Dosierungen von 0; 2; 6 mg/kg/d (Abb. 6). Die Gewichtszunahme der Tiere mit der Medikation von 2 und 6 mg/kg/d Candesartan lag tendenziell, aber nicht signifikant, über dem der Ratten der Kontrollgruppe. Am 21. Tag wurde den Nagern unter Narkose ein Katheter in die Femoralarterie eingesetzt. Nach diesem Ereignis verloren alle Ratten an Gewicht, die Unterschiede zwischen den Gruppen blieben erhalten. Die Tiere mit der Medikation von 16 mg/kg/d verloren nach dem Eingriff am stärksten an Körpergewicht und wogen, anders als die Ratten der anderen Gruppen, sogar deutlich weniger als zu Beginn der Studie.

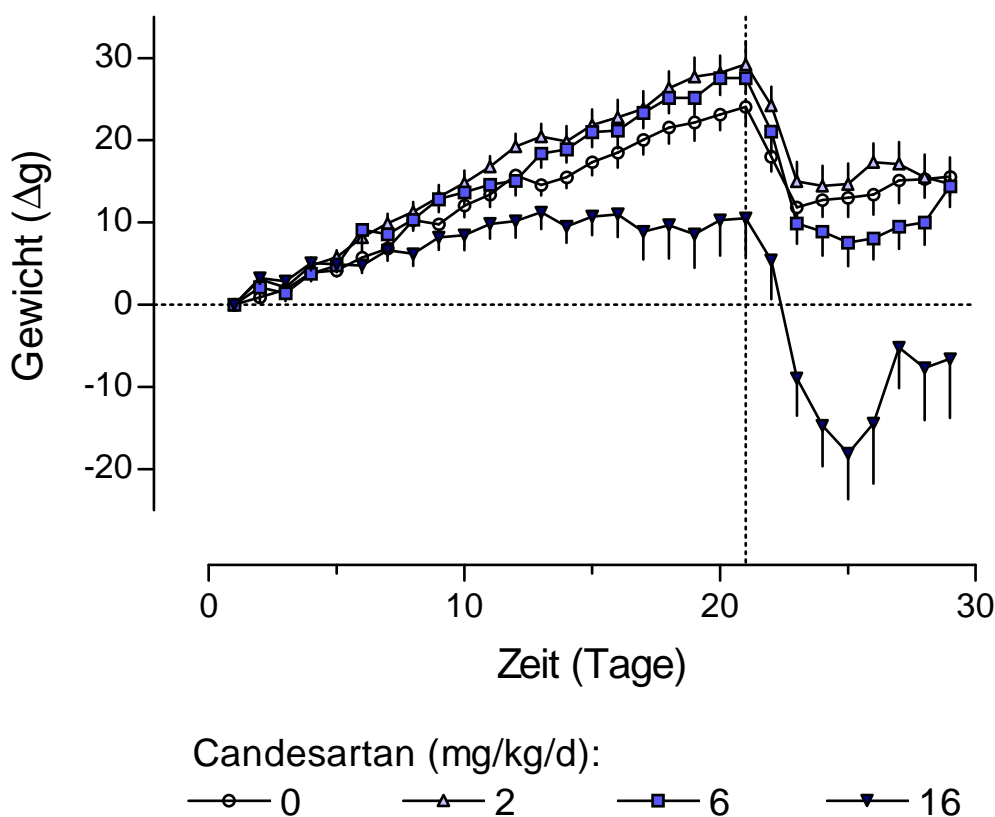


Abb. 6: Entwicklung des Körpergewichts von SH-Ratten unter der Gabe von 0; 2; 6; 16 mg Candesartan/ kg Körpergewicht/ Tag, am 21. Tag wurden die Tiere operiert und ein Katheter in die Femoralarterie eingesetzt; MW \pm SEM, n = 15.

Am Tag 21 war das Körpergewicht der Ratten mit 16 mg/kg/d Candesartan-Behandlung signifikant niedriger ($268,5 \pm 16,5$ g) gegenüber der Kontrollgruppe mit der Behandlung 0 mg/kg/d Candesartan ($284,9 \pm 15,3$ g) (Abb. 7). In der am 21. Tag gemessenen Körperlänge zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen ($0,211 \pm 0,006$ m) (Abb. 8), so dass der Body-Mass-Index (Körpergewicht/ Körperlänge²) bei den Tieren mit 16 mg/kg/d Candesartan im Vergleich zur Gruppe mit 0 mg/kg/d Candesartan ebenfalls signifikant verringert war (Abb. 9).

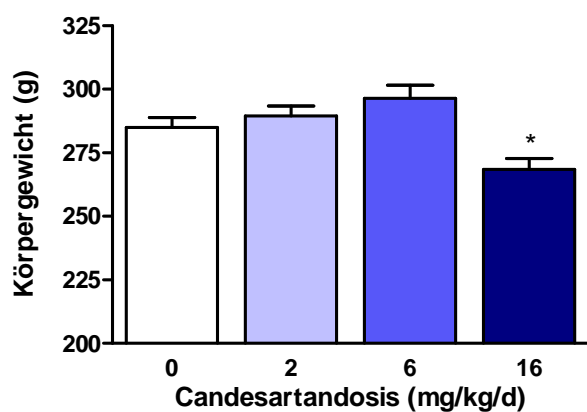


Abb. 7: Körpergewicht am 21. Behandlungstag mit Candesartan (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 15$, *: $p < 0,05$ vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

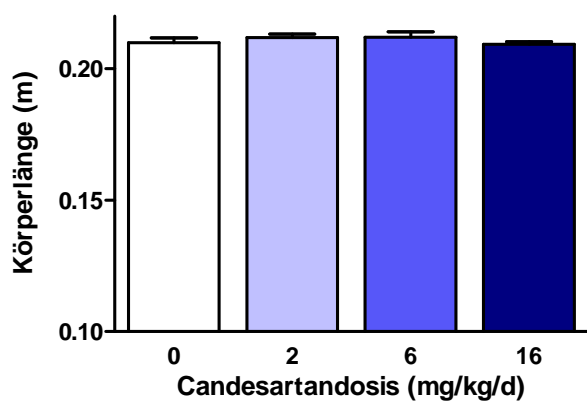


Abb. 8: Körperlänge am 21. Behandlungstag mit Candesartan (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 15$, keine signifikanten Unterschiede.

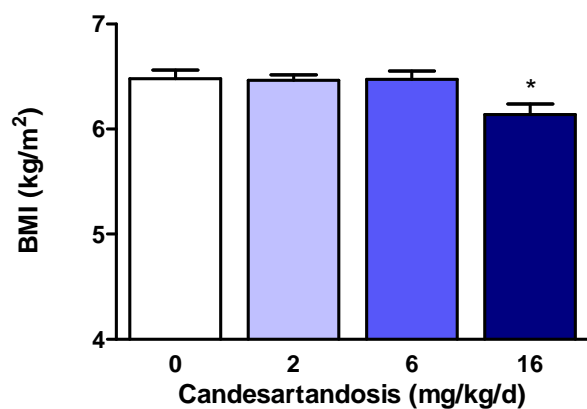


Abb. 9: Body-Mass-Index (BMI) am 21. Behandlungstag mit Candesartan (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 15$, *: $p < 0,05$ vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

Am 20. Tag wurde die Futtermittelaufnahme über 24 h gemessen. In Übereinstimmung mit der eingeschränkten Gewichtszunahme nahm die 16 mg/kg/d Candesartan-Gruppe signifikant weniger Futter zu sich ($16,0 \pm 2,8$ g) als die Kontrollgruppe ($19,6 \pm 2,0$ g) (Abb. 10). Bei den Ratten mit 6 mg/kg/d Candesartan war die Futtermittelaufnahme dagegen deutlich auf $21,3 \pm 1,4$ g erhöht, diese Tiere hatten ein tendenziell aber nicht signifikant höheres Körpergewicht als die Ratten mit 0 mg/kg/d Candesartan.

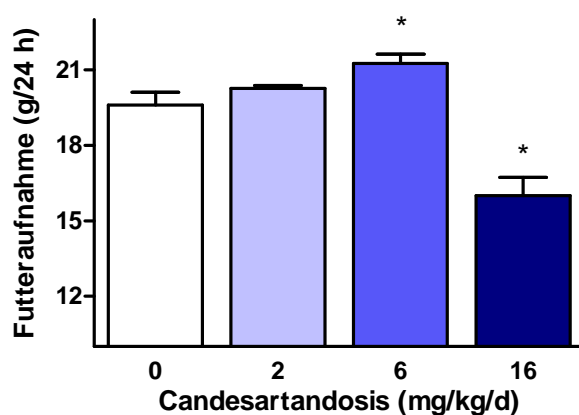


Abb. 10: Futtermittelaufnahme über 24 h am 20. Behandlungstag mit Candesartan (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 15$, *: $p < 0,05$ vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

3.2 Hämodynamik und Parameter des Renin-Angiotensin-Systems

Um die Effektivität der Candesartanbehandlung zu prüfen, wurden am 22. Tag bei allen Tieren mittels Femoralarterienkatheter der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Herzfrequenz (HF) gemessen. Der MAP ist bei spontan hypertensiven Ratten erhöht, wie bei der Kontrollgruppe zu beobachten war ($164,7 \pm 7,04$ mmHg). Durch die Behandlung mit Candesartan sank der Blutdruck stark ab, wobei die Unterschiede zwischen allen Gruppen jeweils signifikant waren (Abb. 11). Bei den Tieren, die Candesartan in der Konzentration von 16 mg/kg/d bekamen, lag der MAP schließlich im Normbereich bei $81,1 \pm 13,3$ mmHg und war damit im Vergleich zur Kontrollgruppe auf die Hälfte verringert. Die Herzfrequenz zeigte in den Gruppen mit 0; 2 und 6 mg/kg/d Candesartan keine Unterschiede, bei den Ratten mit 16 mg/kg/d Candesartan dagegen war sie signifikant niedriger (Abb. 12). Sie war von $382,1 \pm 27,1$ /min (0 mg/kg/d Candesartan) auf $349,3 \pm 21,7$ /min (16 mg/kg/d Candesartan) abgesunken.

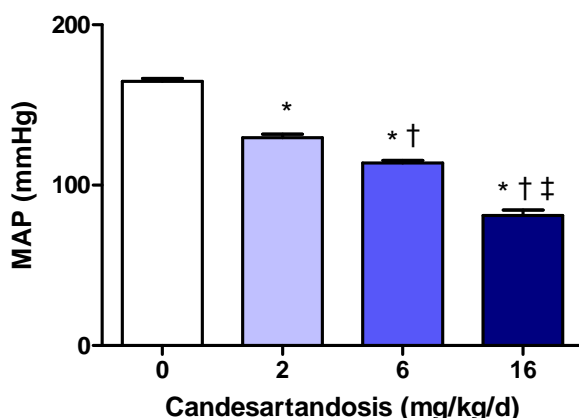


Abb. 11: Mittlerer Arterieller Blutdruck (MAP) am 22. Behandlungstag mit Candesartan (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 15$, *: $p < 0,05$ vs. 0 mg/kg/d Candesartan, †: $p < 0,05$ vs. 2 mg/kg/d Candesartan, ‡: $p < 0,05$ vs. 6 mg/kg/d Candesartan.

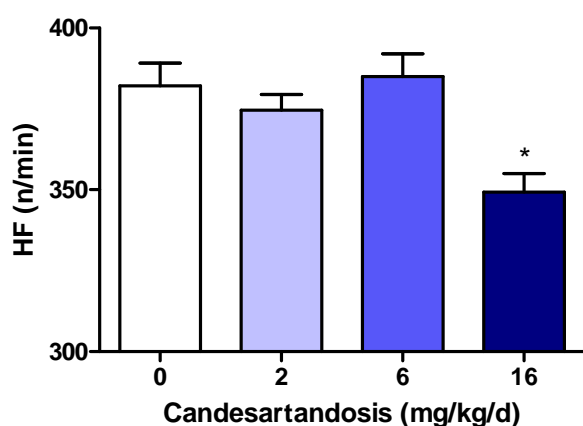


Abb. 12: Herzfrequenz (HF) am 22. Behandlungstag mit Candesartan (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 15$, *: $p < 0,05$ vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

Mit dem Blutdruck und in Abhängigkeit zur Candesartandosis war auch das Gewicht des linken Ventrikels verringert, das am Schlachttag bestimmt wurde. Die Unterschiede im linksventrikulären Gewicht zwischen allen Gruppen und die Korrelation zwischen MAP und linksventrikulären Gewicht waren signifikant (Abb. 13).

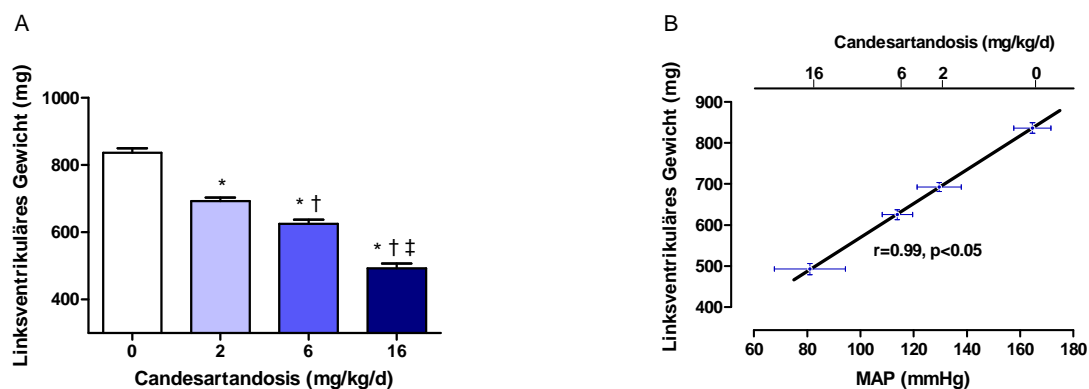


Abb. 13:

A: Linksventrikuläres Gewicht am 30. Behandlungstag mit Candesartan (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 15$, *: $p < 0,05$ vs. 0 mg/kg/d Candesartan, †: $p < 0,05$ vs. 2 mg/kg/d Candesartan, ‡: $p < 0,05$ vs. 6 mg/kg/d Candesartan.

B: Korrelation zwischen Mittlerem Arteriellen Blutdruck (MAP) und Linksventrikulärem Gewicht, $MW \pm SEM$, $n = 15$.

Auf endokriner Ebene war die effektive AT_1 -Blockade erkennbar an einer starken Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Angiotensin II (ANG II) und Aldosteron. Das zirkulierende ANG II war unter der Behandlung mit Candesartan von dem Ausgangswert $41,3 \pm 30,5$ pmol/l um mehr als das Fünffache angestiegen ($225,2 \pm 49,7$ pmol/l bei 16 mg/kg/d Candesartan) (Abb. 14). Die Unterschiede aller Gruppen im Vergleich zur Kontrolle waren hier signifikant. Die Aldosteronkonzentration war erst bei den größeren Candesartangaben von 6 und 16 mg/kg/d (Abb. 15) erhöht und der Anstieg hier ebenfalls signifikant.

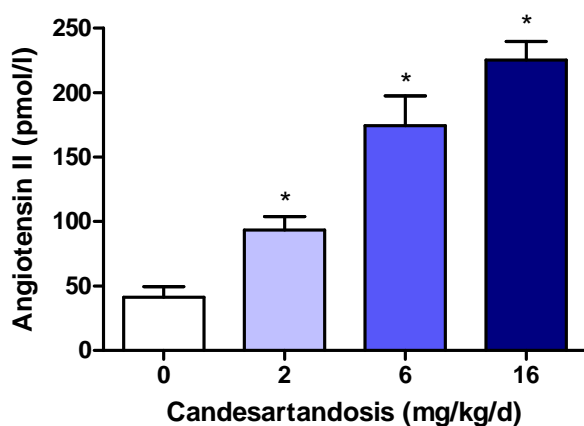


Abb. 14: Plasma-Angiotensin II Konzentration nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 15$, *: $p < 0,05$ vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

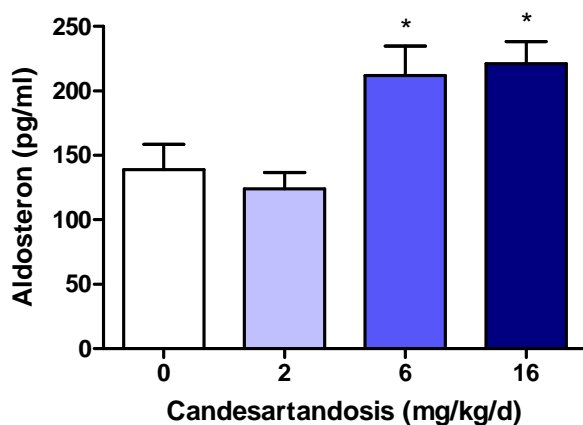


Abb. 15: Plasma-Aldosteron-Konzentration nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 15$, *: $p < 0,05$ vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

Die AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-,mRNA-steady-state“-Konzentrationen im Hypothalamus veränderten sich unter der Candesartan-Behandlung nicht. Auffällig war, dass im Hypothalamus die AT_{1A}-Rezeptor-Level deutlich höher als die AT_{1B}-Rezeptor-Level waren (Tabelle 3).

Tabelle 3: „mRNA-steady-state“-Konzentrationen der AT_{1A} - und AT_{1B} -Rezeptoren im Hypothalamus in Relation zu GAPDH bei Candesartan-behandelten Ratten (0; 2; 6; 16 mg/kg/d).

Candesartan	0 mg/kg/d	2 mg/kg/d	6 mg/kg/d	16 mg/kg/d
AT _{1A}	1,79 * 10 ⁶ ± 2,7 * 10 ⁵	1,89 * 10 ⁶ ± 3,2 * 10 ⁵	1,63 * 10 ⁶ ± 3,4 * 10 ⁵	1,94 * 10 ⁶ ± 3,0 * 10 ⁵
AT _{1B}	3,88 * 10 ⁴ ± 2,6 * 10 ³	3,40 * 10 ⁴ ± 4,4 * 10 ³	3,37 * 10 ⁴ ± 5,4 * 10 ³	3,52 * 10 ⁴ ± 4,6 * 10 ³

3.3 Zirkulierende metabolische und endokrinologische Parameter

Die Behandlung mit Candesartan in unterschiedlichen Dosen führte bei den Ratten nicht zu einer signifikanten Änderung des Leptins im Vergleich zur Kontrolle ($2,08 \pm 0,7$ ng/ml). Tendenziell war die Plasmakonzentration mit steigender Candesartanbehandlung bis zu einer Dosis von 6 mg/kg/d erhöht. Bei den Tieren, die 16 mg/kg/d Candesartan bekamen, war die Leptinmenge im Plasma dann auf einen Wert unterhalb der Kontrollgruppe abgefallen (Abb. 16). Der Unterschied zwischen den Gruppen mit den Behandlungen 6 und 16 mg/kg/d Candesartan war signifikant. Im Fettgewebe war dieser Trend nicht so deutlich. Der Leptingehalt lag dort bei ($5,52 \pm 1,8$ ng/ml) und änderte sich bei den verschiedenen Gruppen nicht (Abb. 17).

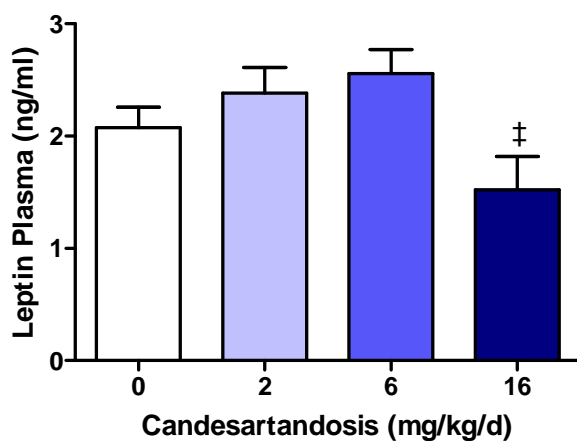


Abb. 16: Leptin im Plasma nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), MW \pm SEM, n = 15, ‡: p < 0,05 vs. 6 mg/kg/d Candesartan.

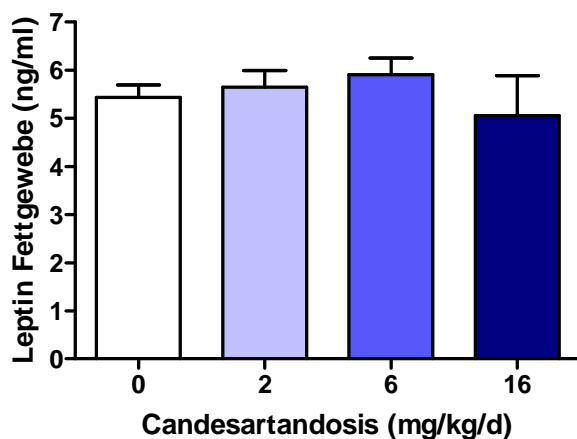


Abb. 17: Leptin im Fettgewebe nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), MW \pm SEM, n = 15.

Die Korrelation von Leptin im Plasma zum Körpergewicht war in allen Gruppen signifikant. Interessanterweise war sie bei den Tieren bis zu einer Candesartandosis von 6 mg/kg/d positiv, während bei den Ratten mit der höheren Dosierung eine inverse Korrelation beobachtet werden konnte (Abb.18; Tabelle 4). Die Tiere mit dem niedrigsten Körpergewicht hatten also eine im Vergleich hohe Leptinkonzentration im Plasma.

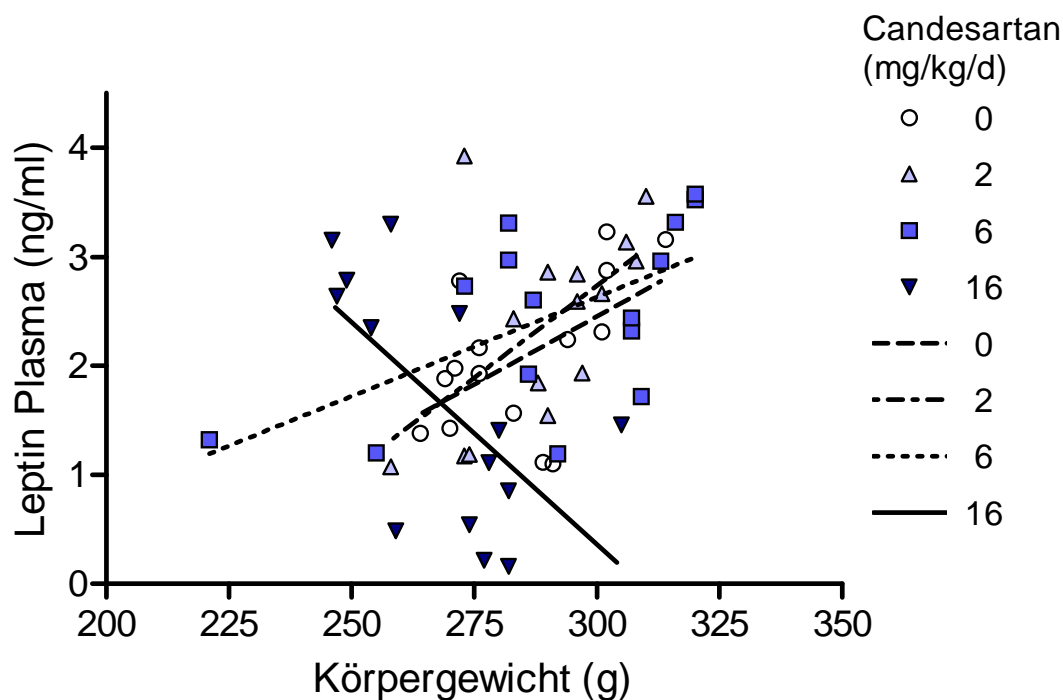


Abb. 18: Korrelation zwischen Plasma-Leptin und Körpergewicht in Abhängigkeit der Candesartandosis, statistische Auswertung siehe Tabelle 4.

Tabelle 4: Statistische Parameter zur Korrelation zwischen Plasma-Leptin und Körpergewicht.

Candesartan	Pearson r	P-Wert Korrelation
0 mg/kg/d	0,5450	0,0178 *
2 mg/kg/d	0,5704	0,0132 *
6 mg/kg/d	0,5925	0,0100 *
16 mg/kg/d	-0,6224	0,0087 *

Außerdem korrelierten nach Behandlung mit 16 mg/kg/d Candesartan die Plasma-Leptinkonzentrationen invers zur Herzfrequenz (Abb. 19).

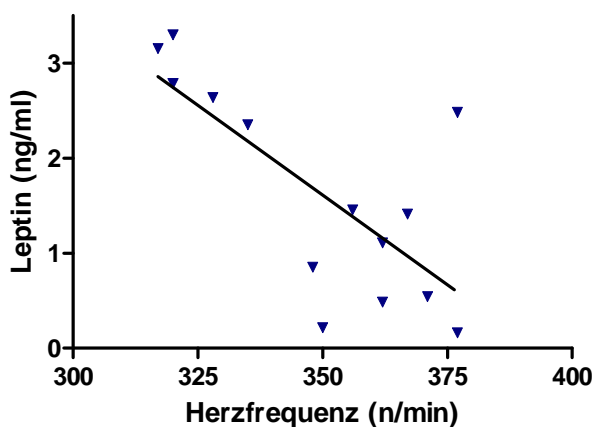


Abb. 19: Korrelation zwischen Plasma-Leptinkonzentration und Herzfrequenz nach Behandlung mit 16 mg/kg/d Candesartan, Pearson $r = -0,7309$, p -Wert der Korrelation = 0,0015.

Die Konzentration von Adiponectin im Plasma änderte sich durch die Gabe von Candesartan nicht, die Menge des zirkulierenden Hormons betrug $2,787 \pm 0,651$ ng/ml (Abb. 20). Die Korrelationsanalyse zwischen Adiponectin und dem Körpergewicht erbrachte dagegen in allen Gruppen einen signifikanten inversen Zusammenhang zwischen beiden Parametern (Abb. 21, Tabelle 5). Die Plasma-Adiponectin-Konzentration war mit Zunahme des Körpergewichts verringert.

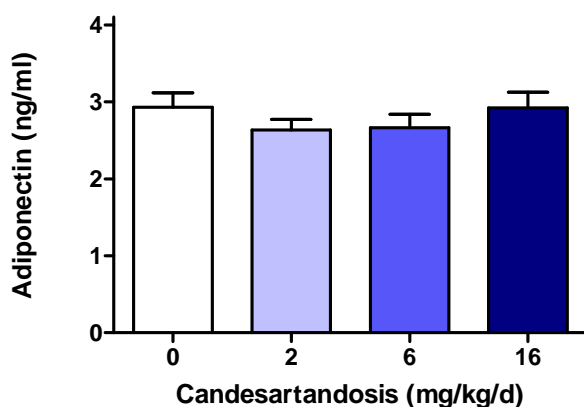


Abb. 20: Adiponectin im Plasma nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 15$, keine signifikanten Unterschiede.

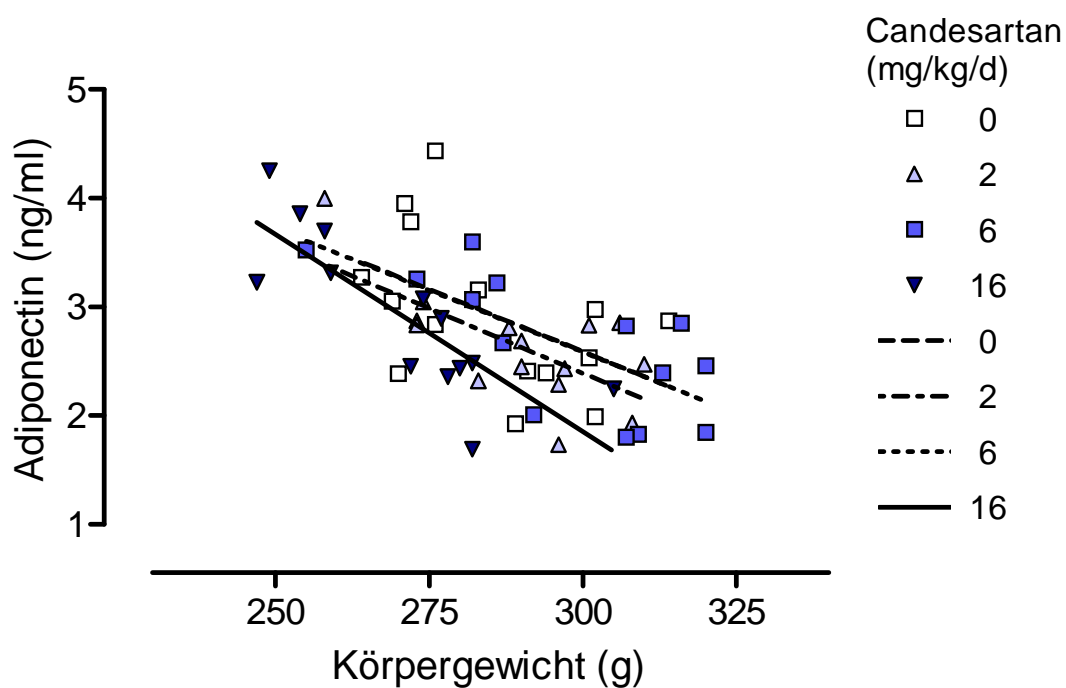


Abb. 21: Korrelation zwischen Plasma-Adiponectin und Körpergewicht nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), statistische Auswertung siehe Tabelle 5.

Tabelle 5: Statistische Parameter zur Korrelation zwischen Adiponectin und Körpergewicht.

Candesartan	Pearson r	p-Wert Korrelation
0 mg/kg/d	-0,4902	0,0315 *
2 mg/kg/d	-0,6806	0,0026 *
6 mg/kg/d	-0,7111	0,0021 *
16 mg/kg/d	-0,8110	0,0004 *

Die weiterhin bestimmten zirkulierenden Parameter Insulin, Glukose, Corticosteron und Interleukin 6 zeigten bei den SH-Ratten keine Veränderungen durch die Candesartanbehandlung in verschiedenen Dosen. Die genauen Werte sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Konzentration von Insulin, Glukose, Corticosteron und Interleukin 6 im Plasma nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), MW \pm SEM, n = 15.

Candesartan	0 mg/kg/d	2 mg/kg/d	6 mg/kg/d	16 mg/kg/d
Insulin (ng/ml)	2,88 \pm 0,90	3,62 \pm 1,99	2,73 \pm 1,05	2,59 \pm 2,00
Glukose (mg/dl)	86,53 \pm 12,09	87,80 \pm 7,53	84,43 \pm 6,70	89,53 \pm 11,39
Corticosteron (ng/ml)	137,9 \pm 87,7	164,6 \pm 101,8	162,4 \pm 100,2	178,7 \pm 124,9
Interleukin 6 (pg/ml)	416,8 \pm 193,9	430,3 \pm 186,2	333,7 \pm 220,8	351,7 \pm 172,4

3.4 Neuropeptide im Hypothalamus

Bei den Ratten, die mit Candesartan der Konzentration 16 mg/kg/d behandelt wurden, halbierten sich die „mRNA-steady-state“-Konzentrationen des orexigenen Peptids MCH im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant um mehr als die Hälfte ($2,33 \cdot 10^8 \pm 7,91 \cdot 10^7$ bei 0 mg/kg/d Candesartan; $1,13 \cdot 10^8 \pm 7,89 \cdot 10^7$ bei 16 mg/kg/d Candesartan). Bei geringeren Candesartandosen war eine leichte aber nicht signifikante Verringerung der Expression zu beobachten (Abb. 22). Die Korrelationsanalyse der Werte zum Körpergewicht der Ratten ergab bei den Tieren mit der Behandlung von 16 mg/kg/d Candesartan eine positive Korrelation (Tabelle 7).

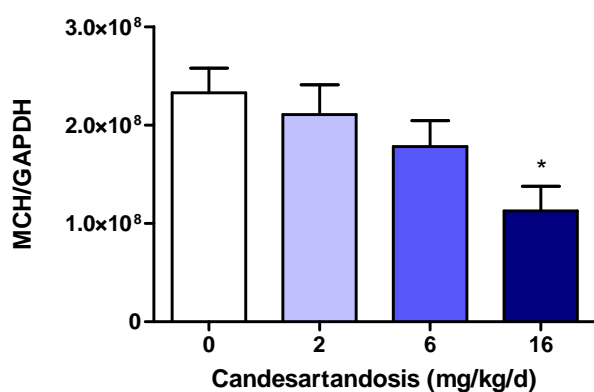


Abb. 22: „mRNA-steady-state“-Konzentration von MCH im Hypothalamus nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), MW \pm SEM, n = 10, *: p < 0,05 vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

Tabelle 7: Statistische Parameter zur Korrelation zwischen hypothalamischen mRNA-Level von MCH und Körpergewicht.

Candesartan	Pearson r	p-Wert Korrelation
0 mg/kg/d	-0,2906	0,2076
2 mg/kg/d	-0,3535	0,1582
6 mg/kg/d	0,04615	0,4496
16 mg/kg/d	0,5596	0,0463 *

Bei der Bestimmung von Orexin-mRNA ergab sich ein ähnliches Bild. Auch hier waren die „mRNA-steady-state“-Konzentrationen bei einer Behandlung mit Candesartan von 16 mg/kg/d signifikant um mehr als 50% reduziert (418072 ± 237573 bei 0 mg/kg/d Candesartan; 159607 ± 108168 bei 16 mg/kg/d Candesartan) (Abb. 23). Im Gegensatz zu MCH korrelierten die Werte hier nicht mit dem Körpergewicht der Ratten (Tabelle 8).

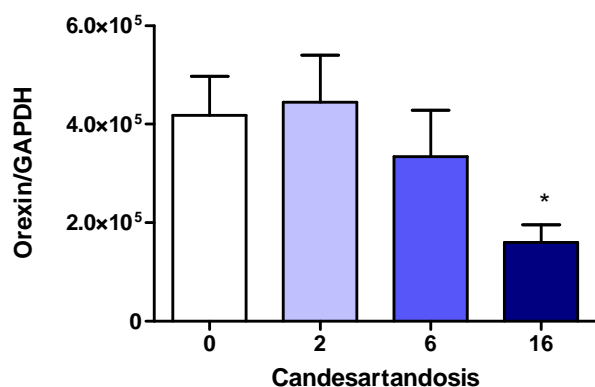


Abb. 23: „mRNA-steady-state“-Konzentration von Orexin im Hypothalamus nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), MW \pm SEM, n = 10, *: p < 0,05 vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

Tabelle 8: Statistische Parameter zur Korrelation zwischen hypothalamischem mRNA-Level von Orexin und Körpergewicht.

Candesartan	Pearson r	p-Wert Korrelation
0 mg/kg/d	-0,5292	0,0579
2 mg/kg/d	-0,1892	0,3003
6 mg/kg/d	0,1185	0,3722
16 mg/kg/d	0,2463	0,2464

Das dritte Neuropeptid, das bei der Behandlung mit 16 mg/kg/d Candesartan wie die orexigenen Parameter MCH und Orexin signifikant verändert war, ist das anorexigen wirkende Peptid CART. Der relative CART-Wert von 1667300 ± 454986 (0 mg/kg/d Candesartan) war auf 1239800 ± 315889 (16 mg/kg/d) abgesunken (Abb. 24). In den anderen Gruppen war kein Unterschied zu beobachten. In der Korrelation zum Körpergewicht waren die Gruppen von 6 und 16 mg/kg/d Candesartan signifikant. Bei der Medikamentendosis von 6 mg/kg/d Candesartan korrelierten die Werte positiv, bei der Dosis von 16 mg/kg/d Candesartan dagegen negativ (Tabelle 9).

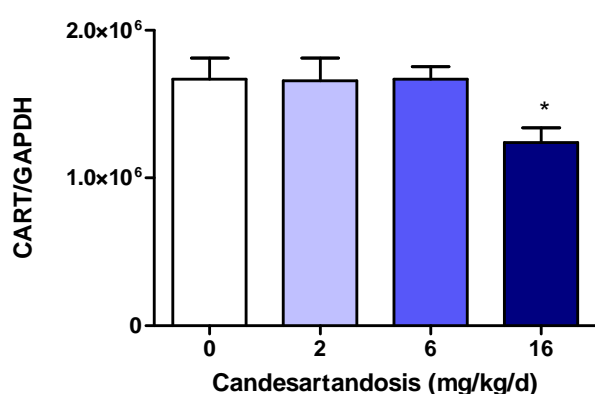


Abb. 24: „mRNA-steady-state“-Konzentration von CART im Hypothalamus nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), MW \pm SEM, n = 10, *: p < 0,05 vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

Tabelle 9: Statistische Parameter zur Korrelation zwischen hypothalamischem mRNA-Level von CART und Körpergewicht.

Candesartan	Pearson r	p-Wert Korrelation
0 mg/kg/d	0,2802	0,2165
2 mg/kg/d	-0,1230	0,3675
6 mg/kg/d	0,7539	0,0059 *
16 mg/kg/d	-0,7260	0,0087 *

Nicht in der Gruppe von 16 mg/kg/d Candesartan, sondern bei der geringeren Dosis von 6 mg/kg/d, waren sowohl das orexigene NPY (Abb. 25) als auch das anorexigene Peptid POMC (Abb. 26) signifikant verändert. Bei beiden Parametern war der bestimmte Wert im Gegensatz zur Kontrollgruppe zunächst bis zu einer Konzentration von 6 mg/kg/d abgesunken und bei der höchsten Dosierung wieder angestiegen.

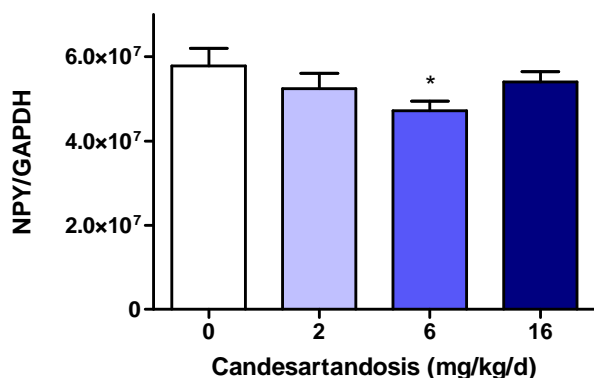


Abb. 25: „mRNA-steady-state“-Konzentration von NPY im Hypothalamus nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), MW \pm SEM, n = 10, *: p < 0,05 vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

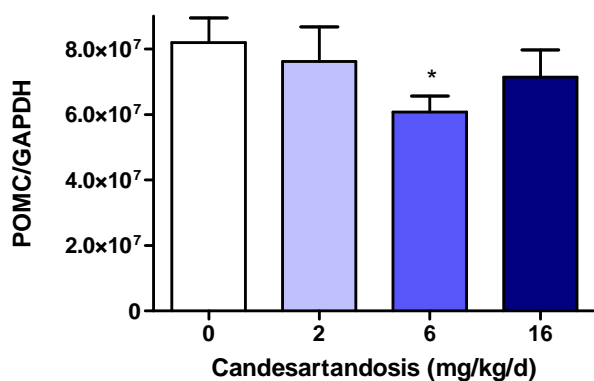


Abb. 26: „mRNA-steady-state“-Konzentration von POMC im Hypothalamus nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), MW \pm SEM, n = 10, *: p < 0,05 vs. 0 mg/kg/d Candesartan.

Die „mRNA-steady-state“-Konzentrationen der weiterhin bestimmten Peptide AgRP und CRH blieben trotz Behandlung mit Candesartan unverändert (Abb. 27).

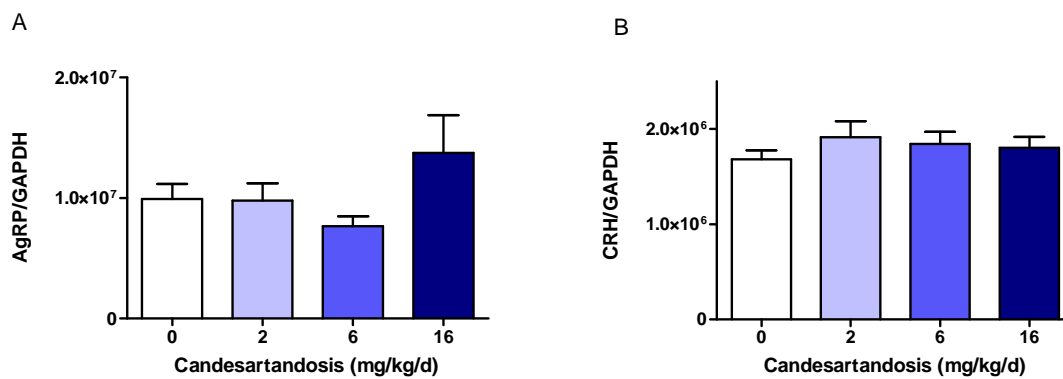


Abb. 27:

A: „mRNA-steady-state“-Konzentration von AgRP im Hypothalamus nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 10$.

B: „mRNA-steady-state“-Konzentration von CRH im Hypothalamus nach Candesartanbehandlung (0; 2; 6; 16 mg/kg/d), $MW \pm SEM$, $n = 10$.

4. Diskussion

Die durchgeführten Versuche hatten zum Ziel, den Zusammenhang zwischen AT₁-Rezeptor-Blockade und Gewichtsverlust zu untersuchen und unter Candesartanbehandlung auftretende Änderungen von peripheren Hormonen und hypothalamischen Peptiden mit Einfluss auf die Regulation des Körpergewichts zu bestimmen.

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit sind die verringerten „mRNA-steady-state“-Konzentrationen der orexigenen Neuropeptide MCH und Orexin im Hypothalamus unter hohen Candesartandosen (16 mg/kg/d). Die Ratten mit dieser Behandlung wiesen ebenfalls ein niedrigeres Körpergewicht und eine geringere Futtermittelaufnahme als die Kontrollgruppe auf. Parallel dazu waren auch die Werte des anorexigenen Peptids CART vermindert. Bei peripheren Hormonen (Leptin, Adiponectin, Insulin, Glukose, Corticosteron, Il 6) konnten keine Veränderungen festgestellt werden.

In Übereinstimmung mit früheren Studien [Raasch et al., 2004] zeigte sich die Effektivität der AT₁-Rezeptor-Blockade durch Candesartan in einer deutlichen Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und des linksventrikulären Gewichts in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis. Die Herzfrequenz dagegen blieb bei mittleren Dosen Candesartan unverändert, war aber bei 16 mg/kg/d des Medikaments ebenfalls signifikant abgesunken.

Wie schon früher beobachtet [Hubner et al., 1997] waren die Plasma-Angiotensin-II-Konzentrationen bei selektivem Antagonismus des AT₁-Rezeptors angestiegen. Durch einen negativen „Feedback“ der AT₁-Rezeptoren [Kurtz und Wagner, 1999] erhöht sich die Renin-Sekretion bei andauernder AT₁-Blockade und führt zu einer Steigerung der ANG II-Konzentration. Aldosteron wird normalerweise durch die Stimulation von AT₁-Rezeptoren freigesetzt [Lumbers, 1999]. Die Erhöhung des Aldosteron im Plasma trotz Behandlung mit 6 und 16 mg/kg/d Candesartan ging vermutlich auf den „Aldo-Escape“ zurück. Bei längerer Blockierung der AT₁-Rezeptoren werden die AT₂-Rezeptoren durch das gestiegene ANG II aktiviert und führen zu der Steigung der Aldosteronkonzentrationen [Hubner et al., 1997; Naruse et al., 2002].

Die Behandlung mit Candesartan führte, wie auch in anderen Arbeiten [Nishimura et al., 2000], nicht zu einer Änderung der zentralen AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-mRNA-Menge.

Die Gewichtszunahme der spontan hypertensiven Ratten war unter der hohen Dosis Candesartan von 16 mg/kg/d deutlich vermindert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Arbeiten, die Gewichtsverlust unter der Therapie von ACE-Hemmern bzw. AT₁-Rezeptor-Antagonisten zeigen [Enalapril in Hypertension Study Group (UK), 1984; McGrath et al., 1990; Campbell et al., 1995; Benson et al., 2004; Fogari et al., 2005; Zorad et al., 2006]. Auch Tiermodelle mit entsprechenden genetischen Veränderungen entwickeln ein niedrigeres Körpergewicht als Kontrollgruppen. Hier sind die ASrAogen-Ratten zu nennen, die eine geringere gliale Expression von Angiotensinogen aufweisen [Schinke et al., 1999; Kasper et al., 2005] bzw. Mäuse mit systemischen Angiotensinogenmangel [Massiera et al., 2001]. Ebenso haben Mäuse, denen durch genetische Manipulation die AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptoren fehlen, ein erniedrigtes Gewicht [Tsuchida et al., 1998].

Interessanterweise war das Gewicht der Ratten in dieser Studie bis zu einer Candesartandosis von 6 mg/kg/d tendenziell erhöht, wenn auch nicht signifikant, und dann bei der höchsten Medikamentendosierung abgefallen. Da die Körperlänge vergleichbar blieb, änderte sich der BMI parallel zum Körpergewicht. Die Futteraufnahme war bei den Ratten mit einer Candesartanbehandlung von 6 mg/kg/d im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich gesteigert, die Tiere mit 16 mg/kg/d Candesartan nahmen dagegen signifikant weniger Nahrung als die Kontrolltiere zu sich.

Die Ratten, die unter der Behandlung von 16 mg/kg/d Candesartan weniger an Gewicht zunahmen als die Tiere mit einer geringeren Medikamentendosis, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede bei den peripheren Hormonen und Adipozytokinen Leptin, Insulin, Adiponectin, Corticosteron und Interleukin-6. Dies ist überraschend, da diese Hormone bekanntermaßen in der Regulation des Körpergewichts eine wichtige Rolle spielen [Richard und Baraboi, 2004; Guerre-Millo, 2004; Tomas et al., 2004].

Lediglich die Leptinkonzentrationen wiesen leichte Veränderungen auf, sie waren wie das Körpergewicht bis zu einer Gabe von 6 mg/kg/d Candesartan angestiegen und dann bei der höchsten Candesartandosierung im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Signifikant war jedoch nur der Unterschied zwischen 6 mg/kg/d und 16 mg/kg/d Candesartan. Auch in der Literatur finden sich Versuche, in denen Interventionen in das RAS mit Gewichtsverlust bei unveränderten zirkulierenden Leptinkonzentrationen einhergehen. So zeigen beispielsweise zentral Angiotensinogen-defiziente Mäuse, die wie SHR unter

AT₁-Blockade eine leichte Hypotension und vermindertes linksventrikuläres Gewicht entwickeln [Tamura et al., 1998; Umemura et al., 1998], ein erniedrigtes Körpergewicht und unverändertes zirkulierendes Leptin [Massiera et al., 2001; Kim et al., 2002a]. In einer neuen Studie dagegen zeigen sich erniedrigte Leptin- und erhöhte Adiponectinkonzentrationen durch die Behandlung von 10 mg/kg/d Candesartan-Cilexetil [Zorad et al., 2006]. Der wesentliche Unterschied zu unserem Versuchsaufbau ist die lange Behandlungsdauer von 18 Wochen. Dadurch ist die Vergleichbarkeit zu unseren nach vier Wochen gemessenen Werten eingeschränkt. Ebenso ist das Plasmaleptin bei hypertensiven, adipösen Patienten unter der Einnahme des AT₁-Rezeptor-Antagonisten Valsartan erniedrigt [Fogari et al., 2005]. Bei diesen Patienten vermindert sich gleichzeitig das Körpergewicht, auch wenn sie keinerlei diätetischen Maßnahmen unterliegen. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht direkt mit unserer Studie bzw. den transgenen Tieren zu vergleichen, da die übergewichtigen Patienten vermutlich von vornherein eine Leptin-Resistenz aufwiesen.

Auch wenn der Unterschied nicht signifikant war, konnte in dieser Arbeit doch insgesamt eine leichte Verminderung des Plasma-Leptins bei der höchsten Candesartankonzentration beobachtet werden. Dies steht wiederum im Einklang mit den eben zitierten Studien. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine Reduzierung des Fettgewebes zurückzuführen, da das Serum-Leptin proportional zu der Körperfettmasse zirkuliert [Fried et al., 2000]. Der erniedrigte BMI in der Gruppe mit 16 mg/kg/d Candesartan lässt auf verringerte Fettreserven schließen, die zu den geringeren Leptin-Werten geführt haben könnten. Das Auftreten von hypotrophen Fettzellen und erniedrigten zirkulierenden Leptinkonzentrationen bei AT₁-Inhibition wurde kürzlich in der Langzeitstudie von Zorad et al. nachgewiesen [Zorad et al., 2006]. Eine andere Möglichkeit wäre eine Änderung der Leptin-Sekretion der Fettzellen, die in diesem Versuchsaufbau allerdings nicht gemessen wurde. Die Leptinkonzentrationen im Fettgewebe waren jedoch gleichbleibend, was nicht auf eine veränderte Sekretionsleistung hinweist.

Da die Tiere freien Zugang zum Futter hatten, müsste die niedrige Leptinkonzentration im Plasma zu einer kompensatorisch gesteigerten Nahrungsaufnahme geführt haben, um den Gewichtsverlust auszugleichen (Abb. 28). Tatsächlich war das anorexigene Peptid CART im Hypothalamus unter der Medikamentengabe von 16 mg/kg/d ebenfalls erniedrigt. CART verringert die Nahrungsaufnahme und führt damit zu einer Reduzierung des Körpergewichts [Kristensen et al., 1998; Vrang et al., 1999; Larsen et al., 2000].

CART-defiziente Mäuse entwickeln dagegen bei hochkalorischer Diät Übergewicht [Asnicar et al., 2001]. Allerdings korrelierten die mRNA-Konzentrationen von CART mit dem Körpergewicht invers.

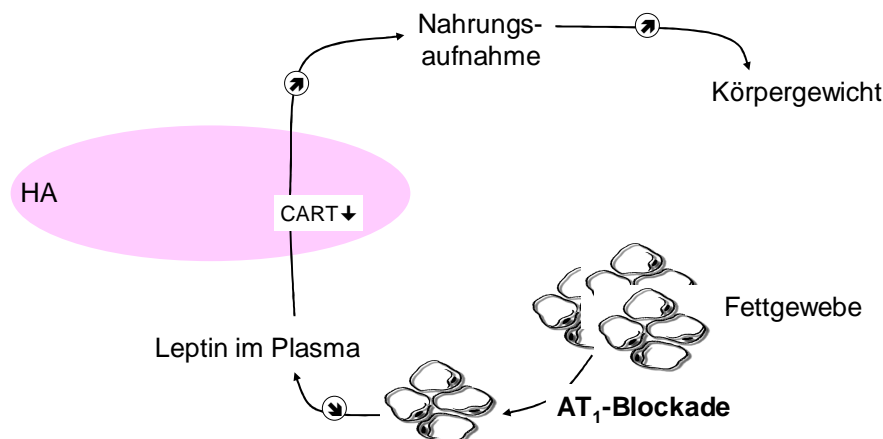


Abb. 28: Schematische Darstellung des peripheren/ hypothalamischen Regelkreises zur Körpergewichtsregulation

HA: Hypothalamus, CART: Cocain-Amphetamin-Reguliertes-Transkript,
 ▼: Erniedrigung, ↗: Erhöhung

Der deutliche Gewichtsunterschied der Ratten unter der Behandlung mit Candesartan in hohen Dosierungen weist auf eine komplexe Regulierung der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts in Abhängigkeit der AT₁-Blockade hin. Die Bedeutung von Leptin und Adiponectin für die Gewichtsregulation lässt sich an der signifikanten Korrelation mit dem Körpergewicht ermesen. Adiponectin korreliert in allen Gruppen invers zum Gewicht. Die Leptin-Werte der Tiere mit 0, 2, 6 mg/kg/d Candesartan korrelieren positiv mit dem Körpergewicht, in der Gruppe mit 16 mg/kg/d Candesartan kehrt sich die Korrelation ins Negative. Betrachtet man die Abb. 18 (Seite 35), so fällt auf, dass aus der Gruppe 16 mg/kg/d Candesartan gerade die Tiere mit niedrigem Körpergewicht hohe Leptinwerte aufweisen und damit zu der negativen Korrelation führen. Würde man diese aus der Korrelationsanalyse nehmen, so wäre die Korrelation in dieser Gruppe wie bei den anderen Ratten positiv. Wegen der kleinen Fallzahl käme hier dann jedoch kein statistisch signifikantes Ergebnis zustande. Obwohl zwischen den einzelnen Tiergruppen keine

signifikanten Änderungen der Leptinkonzentrationen zu beobachten waren, stellt sich die Frage, ob sich bei den SH-Ratten unter der hohen Candesartan-Dosierung eventuell vorhandene gegensätzliche Effekte aufgehoben haben. Bei den besonders schlanken Tieren war das Leptin eher hoch, während die Ratten aus der gleichen Gruppe, die etwas mehr Gewicht zugenommen hatten, die niedrigsten Leptinkonzentrationen aufwiesen.

Die hohen Leptinkonzentrationen bei den dünnen Tieren mit der höchsten Medikamentendosierung lassen auf eine weitere andere Beteiligung von gewichtsregulierenden Peptiden im Hypothalamus schließen. Tatsächlich zeigten sich im Gegensatz zu den unveränderten peripher bestimmten Hormonen bei den untersuchten Neuropeptiden deutliche Effekte. Die mRNA-Werte von MCH im Hypothalamus waren mit zunehmender Medikamentendosis verringert und bei den Ratten mit 16 mg/kg/d Candesartan gegenüber der Kontrollgruppe deutlich reduziert.

MCH ist ein wichtiger Regulator des Körpergewichts, insbesondere der Nahrungsaufnahme. MCH-defiziente bzw. MCH-Rezeptor-defiziente Mäuse nehmen weniger Futter auf, haben damit ein verringertes Körpergewicht und erniedrigte Leptin-Werte [Shimada et al., 1998; Chen et al., 2002; Segal-Lieberman et al., 2003; Kokkotou et al., 2005]. Auch bei Verabreichung von MCH-Rezeptor-Antagonisten beobachtet man eine Verminderung von Futtermittelaufnahme, Körpergewicht und Leptinkonzentrationen [Takekawa et al., 2002; Shearman et al., 2003; Morens et al., 2005; Kowalski et al., 2006]. Dagegen führt die Gabe von MCH zu einer Erhöhung von Futtermittelaufnahme, Körpergewicht und Leptin-Spiegeln [Qu et al., 1996; Ito et al., 2003; Gomori et al., 2003]. Ein ähnliches Bild zeigt die MCH-Überexpression [Ludwig et al., 2001]. Auch umgekehrt beeinflussen sich Leptin und MCH. Gibt man Leptin intrazerebroventrikulär, so erniedrigen sich das MCH, die Futtermittelaufnahme sowie das Körpergewicht [Sahu, 1998a]. Bei erniedrigtem Leptin bzw. Leptinresistenz erhöhen sich in mehreren Studien die MCH-Werte, die Futtermittelaufnahme und das Körpergewicht [Tritos et al., 2001; Stricker-Krongrad et al., 2001; Gavrilina et al., 2005].

Neben ihrer Änderung in den verschiedenen Tiergruppen korrelieren die MCH-Werte bei diesem Versuchsaufbau mit dem Körpergewicht in der Tiergruppe von 16 mg/kg/d Candesartan positiv. Damit ist ein Einfluss des AT₁-Antagonismus auf die Nahrungsaufnahme durch Modulation des MCH wahrscheinlich. Außerdem könnte die Senkung der MCH-Konzentrationen im Hypothalamus auf die erhöhten Leptin-Werte der besonders leichten Ratten zurückzuführen sein (Abb. 29).

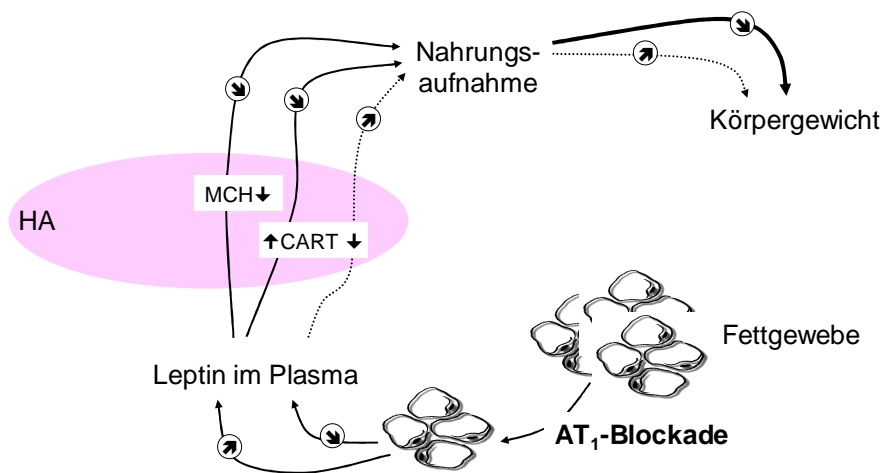


Abb. 29: Schematische Darstellung des peripheren/ hypothalamischen Regelkreises zur Körpergewichtsregulation

HA: Hypothalamus, CART: Cocain-Amphetamin-Reguliertes-Transkript, MCH: Melanin-Concentrating-Hormon, ↘: Erniedrigung, ↗: Erhöhung

Andererseits ist es auch möglich, dass der Effekt der Gewichtsabnahme durch AT_1 -Blockade primär zentral vermittelt wird. Die periphere Gabe eines AT_1 -Rezeptorblockers inhibiert nicht nur peripher sondern auch zentral AT_1 -Rezeptoren [Nishimura et al., 2000; Seltzer et al., 2004]. Die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, hängt von der verabreichten Dosis, dem Zeitpunkt der Gabe und der Lipidlöslichkeit der Komponenten ab [Bui et al., 1992; Polidori et al., 1998; Gohlke et al., 2001; Wang et al., 2003; Seltzer et al., 2004]. Seltzer et al., 2004, zeigten, dass 10 mg/kg/d Candesartan-Cilexetil die Blut-Hirn-Schranke überwinden und an zentrale Rezeptoren binden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei den Ratten mit 16 mg/kg/d Candesartan ebenfalls die zentralen AT_1 -Rezeptoren blockiert wurden. In unserem Versuch gingen die erniedrigten MCH-mRNA-Werte mit verminderter Futtermittelaufnahme, vermindertem Körpergewicht und gleich bleibenden bzw. leicht reduzierten Leptin-Plasmakonzentrationen einher. Das leicht verminderte Leptin könnte als Reaktion im Sinne der Fettreduktion oder als Gegenregulation zur Steigerung des Appetits zu erklären sein. Die Neuropeptide NPY, AgRP und POMC im Nucleus arcuatus und das CRH im Nucleus paraventricularis waren bei den Tieren mit Candesartanbehandlung von 16 mg/kg/d nicht

verändert, obwohl Leptin Einfluss auf ihre Genexpression und Synthese hat. Auch dies könnte die Vermutung unterstützen, dass das Leptin nicht die primäre Ursache für den Gewichtsverlust bei den Tieren ist.

Doch warum sind die Leptinkonzentrationen bei den besonders dünnen Tieren hoch? Der Einfluss von weiteren Regulationsmechanismen liegt nah. ANG II erhöht die Leptin-Sekretion von Adipozyten [Kim et al., 2002b; Skurk et al., 2005]. Damit übereinstimmend waren die Plasma-Konzentrationen von ANG II in unserer Studie insbesondere unter der Candesartanbehandlung mit 16 mg/kg/d erhöht. Allerdings wird dieser Effekt über die AT₁-Rezeptoren vermittelt [Skurk et al., 2005], die in diesem Versuch effektiv blockiert waren. Weiterhin könnte die Leptin-Sekretion durch ANG II-Spaltprodukte wie Angiotensin III und Angiotensin IV stimuliert werden. Diese Metabolite sind nach Langzeittherapie mit AT₁-Antagonisten ebenfalls erhöht [Shibasaki et al., 1999]. Ob die Freisetzung von Leptin in Adipozyten durch Angiotensin III und IV durch den AT₁-Rezeptor vermittelt ist, wie es für die Sekretion des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) gezeigt wurde [Skurk et al., 2001], ist bisher nicht geklärt.

Außerdem könnte das sympathische Nervensystem (SNS) in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, da Leptin vom SNS beeinflusst wird. Die Aktivierung des SNS, die Stimulation von adrenergen Rezeptoren oder Kälteexposition vermindern Leptin *in vitro* und *in vivo* [Hardie et al., 1996; Donahoo et al., 1997; Pinkney et al., 1998; Ricci und Fried, 1999; Ricci et al., 2000; Couillard et al., 2002; Ricci et al., 2005]. Ebenso führt Fasten zu einer Erniedrigung des Leptins, was durch die Aktivierung des SNS erklärt werden kann [Fried et al., 2000]. Eine Blockade der adrenergen Rezeptoren dagegen führt zu Erhöhung der Leptin-mRNA im braunen Fettgewebe, der Sekretion von Leptin im weißen Fettgewebe und der Plasma-Leptinkonzentration bei Ratten und bei kachektischen Patienten [Evans et al., 1999; Mastronardi et al., 2001; Cammisotto und Bukowiecki, 2002; Hryniewicz et al., 2003]. Die in dieser Arbeit gemessenen höheren Leptin-Werte bei den besonders dünnen Tieren mit der Candesartandosierung von 16 mg/kg/d könnten auf eine Verminderung der sympathischen Aktivität zurückgehen. Als Surrogat-Parameter für diesen Zusammenhang könnte die Herzfrequenz dienen, die in dieser Rattengruppe invers zur Leptinkonzentration korreliert (Abb. 13, Seite 31). Eine verminderte Herzfrequenz unter hohen Candesartandosen wurde ebenfalls bei hypertensiven Patienten beobachtet [Ghiadoni et al., 2000]. Dieser Effekt könnte zumindest teilweise durch die Hemmung der sonst durch ANG II induzierten Katecholamin-Freisetzung an präsynaptischen Rezeptoren

durch Candesartan entstehen [Dendorfer et al., 2002]. Die Fähigkeit von Candesartan, die sympathische Aktivität der Muskeln und der Nieren zu vermindern, wurde bereits bei Ratten und Patienten nachgewiesen [Sakata et al., 2002; Grassi et al., 2003].

Außerdem wäre ein modulierender Einfluss des hypothalamischen Peptids Orexin auf die Interaktion zwischen dem RAS und dem SNS hinsichtlich des Körpergewichts möglich. Orexin erhöht intrazerebroventrikulär appliziert die Nahrungsaufnahme, Orexin-Antikörper und Rezeptor-Antagonisten führen dagegen zu Hypophagie und Gewichtsverlust [Sakurai et al., 1998; Yamada et al., 2000; Szekely et al., 2002; Haynes et al., 2002]. Der in unserem Versuch beobachtete Abfall der Orexin-mRNA-Expression im Hypothalamus bei Tieren, die mit 16 mg/kg/d Candesartan behandelt wurden, stimmt mit diesen Ergebnissen überein und könnte zu dem Gewichtsverlust dieser Ratten beigetragen haben. Allerdings korrelierten die Werte des Orexins im Gegensatz zu den bei MCH gemessenen Werten nicht mit dem Körpergewicht. In der Literatur gibt es in Bezug auf die Nahrungsregulation von Orexin widersprüchliche Ergebnisse. So ändert sich die Prepro-Orexin-Expression im Gegensatz zur MCH-Expression als Reaktion auf Fasten nicht [Tritos et al., 2001]. Orexin-defiziente Mäuse zeigen keine Gewichtsabnahme, sie haben stattdessen eine Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus, die der Narkolepsie ähnelt [Chemelli et al., 1999]. In einer anderen Studie entwickeln diese Tiere sogar ein erhöhtes Körpergewicht [Fujiki et al., 2006]. Genetische Ablation von Orexin-Neuronen führt zu Hypophagie und Übergewicht [Hara et al., 2001] und Patienten mit Narkolepsie und Orexin-Mangel entwickeln abdominale Adipositas [Kok et al., 2003]. Zusätzlich zur Regulation der Nahrungsaufnahme stimuliert Orexin zentral oder spinal verabreicht die sympathische Aktivität, erhöht die Herzfrequenz sowie den arteriellen Blutdruck [Samson et al., 1999; Shirasaka et al., 1999; Chen et al., 2000; Antunes et al., 2001; Matsumura et al., 2001]. Da in diesem Versuch die Expression von Orexin im Hypothalamus vermindert war, ist es denkbar, dass ein solcher Orexin-abhängiger Mechanismus zur verminderten Aktivität des SNS und somit zu den gesteigerten zirkulierenden Leptinkonzentrationen trotz ausgeprägter Gewichtsreduktion beigetragen hat (Abb. 30).

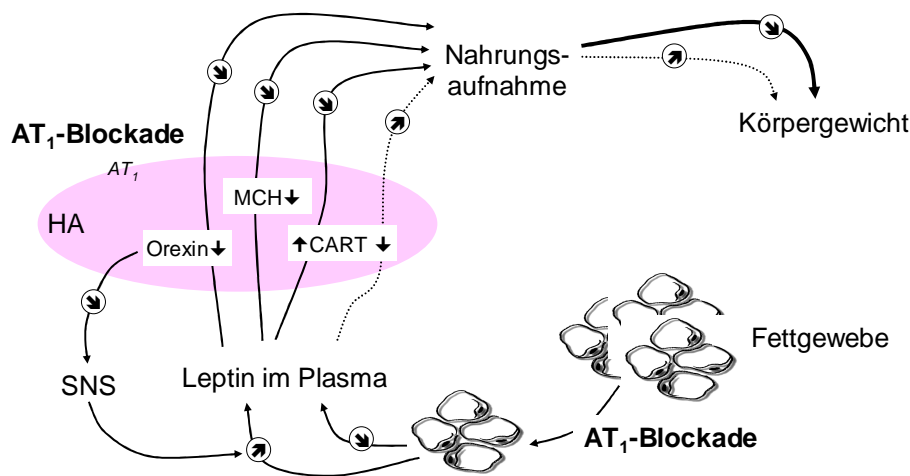


Abb. 30: Schematische Darstellung des peripheren/ hypothalamischen Regelkreises zur Körpergewichtsregulation

HA: Hypothalamus, CART: Cocain-Amphetamin-Reguliertes-Transkript,
MCH: Melanin-Concentrating-Hormon, SNS: Sympathisches Nervensystem,
▼: Erniedrigung, ↗: Erhöhung

Insgesamt erscheint eine Unterteilung der Tiere mit 16 mg/kg/d Candesartan in zwei Untergruppen nach den unterschiedlichen Leptinkonzentrationen sinnvoll zu sein, da sich aus den gemessenen Werten in dieser Tierausswahl deutliche Unterschiede ergeben und für eine Sonderrolle der Ratten mit extrem niedrigem Körpergewicht und höherem Leptin sprechen. Der Mechanismus der Gegenregulation mit Verringerung des Leptins zur Stimulation der Nahrungsaufnahme funktioniert vermutlich bei dem Teil der Tiere, bei denen der Gewichtsunterschied nicht so groß ist. Im Gegensatz dazu scheint er gerade bei den Ratten, deren Gewichtszunahme in dem Behandlungszeitraum gering war, unterbrochen zu sein.

Bei den Tieren, die eine Behandlung von 6 mg/kg/d Candesartan bekamen, sieht das Bild der Neurotransmitter deutlich anders aus als bei den bereits diskutierten Ratten mit 16 mg/kg/d Candesartan. Hier war ein Abfall des anorexigenen Peptids POMC wie auch des orexigenen Peptids NPY zu beobachten. Die Werte von MCH und Orexin lagen bereits unter der Kontrollgruppe, waren aber zu dieser nicht signifikant verändert. Die bei der

höheren Candesartandosierung aufgetretene Reduzierung von CART war nicht zu messen, ebenso unverändert stellten sich die AgRP- und die CRH-Expression dar. Auch bei AT₁-Rezeptor-Blockade geringerer Konzentration kam es demnach zu Veränderungen der Neuropeptide, die mit einer signifikant erhöhten Futteraufnahme aber nur tendenziell höherem Körpergewicht einhergingen. Die Absenkung der NPY- und POMC-Werte war bei der höheren Candesartankonzentration nicht mehr zu beobachten. Diese Ergebnisse könnten mit der dosisabhängigen Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für die AT₁-Antagonisten zusammenhängen. Wenn die Konzentration von 6 mg/kg/d Candesartan nicht ausreicht, um das Medikament in ausreichender Konzentration in den Hypothalamus gelangen zu lassen, müssen die Veränderungen der zentralen Neuropeptid-Expression sekundär über primäre periphere Effekte ausgelöst sein. Allerdings konnten wir bei den peripheren Parametern keine Veränderungen messen, lediglich das Leptin war tendenziell erhöht. Die Neuropeptide des Nucleus arcuatus werden direkt von Leptin reguliert, während im lateralen Hypothalamus zumindest Orexin vermutlich nur indirekt von Leptin beeinflusst wird [Tritos et al., 2001]. Jedenfalls führten die hormonellen Veränderungen trotz erhöhter Futteraufnahme nicht zu einem signifikant erhöhten Körpergewicht.

Aus vorangegangenen Studien war bereits bekannt, dass das Renin-Angiotensin-System einen Einfluss auf den Metabolismus hat und eine Hemmung dieses Systems zur Reduzierung des Körpergewichts führt [Enalapril in Hypertension Study Group (UK), 1984; McGrath et al., 1990; Campbell et al., 1995; Massiera et al., 2001; Benson et al., 2004; Kasper et al., 2005; Fogari et al., 2005; Zorad et al., 2006]. Eine Vielzahl dieser Arbeiten hat die peripheren Parameter untersucht, die in diesem Zusammenhang verändert sind. Wenig ist bisher jedoch über zentrale Veränderungen bekannt, insbesondere in den Zentren des Hypothalamus, die das Körpergewicht regulieren. In dieser Arbeit führte die effektive AT₁-Rezeptor-Blockade mit Candesartan in hoher Dosierung (16 mg/kg/d) bei SH-Ratten zu einer Verminderung des Körpergewichts bei gleichzeitig erhöhter Futteraufnahme. Dies ging mit einer deutlichen Reduzierung der MCH-, Orexin- und CART-„steady-state“-Konzentrationen einher, während NPY, POMC, AgRP und CRH unverändert blieben. Auch bei den peripheren Hormonen wie Leptin, Insulin, Adiponectin, Interleukin-6, Corticosteron wurden keine Änderungen gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen.

In jedem Fall konnte ein Zusammenhang zwischen dem RAS und den Neuropeptiden im Hypothalamus beobachtet werden. Parallel zur Gabe von AT₁-Rezeptor-Antagonisten änderte sich die Expression der mRNA von einigen dieser metabolischen Faktoren des Gehirns. Ob dieser Effekt primär peripher oder primär zentral hervorgerufen wird, lässt sich durch die im Studiendesign vorgesehene Fallzahl und die untersuchten Parameter nicht klären. Ein primär peripherer Effekt durch das Leptin ist denkbar, weil eine Untergruppe der Tiere mit 16 mg/kg/d Candesartan, die ein besonders geringes Körpergewicht aufwiesen, tendenziell höhere Leptinkonzentrationen im Plasma hatten. Dies könnte zu einem Absinken der MCH-Expression mit parallelem Appetit- und Gewichtsverlust geführt haben. Auf der anderen Seite spricht für eine primär zentrale Regulation, dass Candesartan in der Konzentration von 16 mg/kg/d ZNS-gängig ist und die peripheren Parameter außer einer tendenziellen Erniedrigung von Leptin gleich bleibend sind. Bei einem primären Effekt von Leptin müssten auch die Neuropeptide des Nucleus arcuatus verändert und MCH statt erniedrigt wie in anderen Studien hochreguliert sein. Die mangelnde Gewichtszunahme könnte also auf eine Modulation der MCH-Expression durch Candesartan zurückgehen. Alternativ bleibt eine Erklärung der Gewichtsreduktion über einen Effekt des erhöhten ANG II, der nicht AT₁-Rezeptor vermittelt ist, oder eine Wirkung von ANG II-Spaltprodukten. Hier bedarf es weiterer Studien, die die Erforschung des genauen Zusammenhangs vom RAS und der MCH-Expression im Hypothalamus bzw. weitere periphere Effekte des RAS zum Ziel haben.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass schon die Dosis von 6 mg/kg/d Candesartan zu veränderten Neuropeptidkonzentrationen führt. Hier sind NPY und POMC erniedrigt, ein Effekt, der allerdings keinen messbaren Einfluss auf das Körpergewicht hat. Dieser Unterschied zu der höheren Candesartankonzentration könnte durch die dosisabhängige Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zustande kommen.

Diese Arbeit bestätigt, dass der AT₁-Rezeptor-Antagonist Candesartan in den Metabolismus des Körpers eingreift und neben einer Senkung des Blutdrucks zu einer verminderten Gewichtszunahme führt. Die Kombination dieser Wirkungen ist bei der Behandlung des Metabolischen Syndroms, das durch Hypertonie, Insulinresistenz und Adipositas gekennzeichnet ist, wünschenswert. Um einen Effekt der Gewichtsregulation hervorzurufen sind allerdings höhere Dosen des Medikaments notwendig.

5. Zusammenfassung

Das Metabolische Syndrom ist eine weit verbreitete Krankheit mit steigender Prävalenz, erhöhtem Mortalitätsrisiko und eingeschränkter Lebensqualität der Patienten. Zahlreiche Co-Morbiditäten wie zum Beispiel Übergewicht und Hypertonie erschweren die Therapie. In letzter Zeit mehren sich Hinweise auf eine gewichtsregulierende Wirkung der zur Blutdruckreduktion eingesetzten AT₁-Antagonisten. Der zugrunde liegende Mechanismus ist unklar. Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob eine chronische blutdruckeffektive AT₁-Blockade Hormon- bzw. Neuropeptidveränderungen induziert, die mit Hypophagie und Gewichtsverlust assoziiert sind.

60 spontan hypertensive Ratten wurden für vier Wochen mit Candesartan-Cilexetil (0; 2; 6 und 16 mg/kg/d) behandelt und Futteraufnahme, Blutdruck und Herzfrequenz gemessen. Periphere Hormone (u.a. Leptin) sowie Neuropeptide des Hypothalamus (u.a. MCH, Orexin, CART) wurden mittels RIA- bzw. RT-PCR-Analytik ermittelt.

Die Effektivität der Candesartanbehandlung zeigte sich in der Reduktion des Blutdrucks, der Herzfrequenz bzw. dem Anstieg von Angiotensin II und Aldosteron. Die mit 16 mg/kg/d Candesartan behandelten Tiere hatten ein signifikant geringeres Körpergewicht und parallel hierzu deutlich verringerte „mRNA-steady-state“-Konzentrationen von MCH, Orexin und CART, während weitere bestimmte Neuropeptide (NPY, POMC, AgRP, CRH) und periphere Hormone (u.a. Corticosteron, Insulin, IL-6) unverändert blieben. Lediglich Leptin zeigte einen tendenziellen Abfall und korrelierte negativ zum Körpergewicht.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist zu schließen, dass eine chronische AT₁-Rezeptor-Blockade eine Hypophagie und konsekutiv eine geringere Zunahme des Körpergewichts herbeiführt. Allerdings trat dieser Effekt nur unter der Hochdosis von Candesartan (16 mg/kg/d) auf. Vermutlich als Folge der Minderung von Gewicht und Fettmasse war das Plasma-Leptin leicht erniedrigt. Somit könnte die „Downregulation“ des anorexigenen CART im erniedrigten Leptin begründet sein. Allerdings war auffällig, dass gerade in den Tieren mit niedrigstem Körpergewicht erhöhtes Leptin zu beobachten war, was im Gegensatz zu den anderen Behandlungsgruppen bei der Candesartan-Hochdosis zu einer inversen Korrelation zwischen Körpergewicht und Plasma-Leptin führte. Diese höheren Leptin-Werte könnten die „Downregulation“ der orexigenen Peptide MCH und Orexin bei diesen Ratten erklären. Da eine Sympathikus-Stimulation mit einer Leptinreduktion einhergeht, könnte das erhöhte Leptin Folge der Sympathikus-hemmenden Wirkung von Candesartan sein. Für diese Hypothese spricht der zum Körpergewicht proportionale Abfall der Herzfrequenz.

6. Literaturverzeichnis

- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250-252
- Ahren B, Mansson S, Gingerich RL, Havel PJ (1997) Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am J Physiol* 273: R113-R120
- Air EL, Strowski MZ, Benoit SC, Conarello SL, Salituro GM, Guan XM, Liu K, Woods SC, Zhang BB (2002) Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat Med* 8: 179-183
- Akana SF, Scribner KA, Bradbury MJ, Strack AM, Walker CD, Dallman MF (1992) Feedback sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis and its capacity to adjust to exogenous corticosterone. *Endocrinology* 131: 585-594
- ALLHAT (2002) Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA* 288: 2981-2997
- Antunes VR, Brailoiu GC, Kwok EH, Scruggs P, Dun NJ (2001) Orexins/hypocretins excite rat sympathetic preganglionic neurons in vivo and in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1801-R1807
- Arase K, Shargill NS, Bray GA (1989) Effects of intraventricular infusion of corticotropin-releasing factor on VMH-lesioned obese rats. *Am J Physiol* 256: R751-R756
- Arase K, York DA, Shimizu H, Shargill N, Bray GA (1988) Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 255: E255-E259
- Asnicar MA, Smith DP, Yang DD, Heiman ML, Fox N, Chen YF, Hsiung HM, Koster A (2001) Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology* 142: 4394-4400
- Bagdy G, Calogero AE, Szemeredi K, Chrousos GP, Gold PW (1990) Effects of cortisol treatment on brain and adrenal corticotropin-releasing hormone (CRH) content and other parameters regulated by CRH. *Regul Pept* 31: 83-92
- Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24: 410-414
- Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B (2000) Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3338-3342

- Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B (2002) Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2084-2089
- Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW (2004) Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPARgamma-modulating activity. *Hypertension* 43: 993-1002
- Berg AH, Combs TP, Scherer PE (2002) ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13: 84-89
- Bergen HT, Mizuno TM, Taylor J, Mobbs CV (1998) Hyperphagia and weight gain after gold-thioglucose: relation to hypothalamic neuropeptide Y and proopiomelanocortin. *Endocrinology* 139: 4483-4488
- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 319: 218-245
- Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Lagu B, Heurich R, Lichtblau H, Shaposhnik Z, Daniewska I, Blackburn TP, Brancheck TA, Gerald C, Vaysse PJ, Forray C (2002) Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med* 8: 825-830
- Bosello O, Zamboni M (2000) Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev* 1: 47-56
- Boston BA, Blaydon KM, Varnerin J, Cone RD (1997) Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. *Science* 278: 1641-1644
- Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA (2004) Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R943-R949
- Bradley RL, Kokkotou EG, Maratos-Flier E, Cheatham B (2000) Melanin-concentrating hormone regulates leptin synthesis and secretion in rat adipocytes. *Diabetes* 49: 1073-1077
- Bray GA (2003) Risks of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 32: 787-804
- Bray GA, Gray DS (1988) Obesity. Part I--Pathogenesis. *West J Med* 149: 429-441
- Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S (2001) Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 345: 861-869
- 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

- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T (1998) The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15043-15048
- Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B (2003) Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E527-E533
- Bui JD, Kimura B, Phillips MI (1992) Losartan potassium, a nonpeptide antagonist of angiotensin II, chronically administered p.o. does not readily cross the blood-brain barrier. *Eur J Pharmacol* 219: 147-151
- Burnier M (2001) Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation* 103: 904-912
- Cammisotto PG, Bukowiecki LJ (2002) Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C244-C250
- Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A, Harrap SB (1995) Converting enzyme inhibition and its withdrawal in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 26: 426-436
- Carter CS, Cesari M, Ambrosius WT, Hu N, Diz D, Oden S, Sonntag WE, Pahor M (2004) Angiotensin-converting enzyme inhibition, body composition, and physical performance in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59: 416-423
- Cassis LA, Marshall DE, Fettinger MJ, Rosenbluth B, Lodder RA (1998) Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight. *Am J Physiol* 274: E867-E876
- Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC (1994) Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 17: 961-969
- Chaves FJ, Giner V, Corella D, Pascual J, Marin P, Armengod ME, Redon J (2002) Body weight changes and the A-6G polymorphism of the angiotensinogen gene. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 1173-1178
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98: 437-451
- Chen CT, Hwang LL, Chang JK, Dun NJ (2000) Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R692-R697
- Chen Y, Hu C, Hsu CK, Zhang Q, Bi C, Asnicar M, Hsiung HM, Fox N, Sliker LJ, Yang DD, Heiman ML, Shi Y (2002) Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology* 143: 2469-2477
- Cohn JN, Tognoni G (2001) A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 345: 1667-1675

- Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE (1995) Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med* 122: 481-486
- Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P, Stenzel-Poore MP (2000) Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 24: 403-409
- Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE, Schauer PR (2004) The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg* 14: 589-600
- Couillard C, Mauriege P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP (2002) Plasma leptin response to an epinephrine infusion in lean and obese women. *Obes Res* 10: 6-13
- Dagogo-Jack S, Selke G, Melson AK, Newcomer JW (1997) Robust leptin secretory responses to dexamethasone in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3230-3233
- Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H (2002) Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359: 995-1003
- Davisson RL, Oliverio MI, Coffman TM, Sigmund CD (2000) Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J Clin Invest* 106: 103-106
- Dendorfer A, Thornagel A, Raasch W, Grisk O, Tempel K, Dominiak P (2002) Angiotensin II induces catecholamine release by direct ganglionic excitation. *Hypertension* 40: 348-354
- Donahoo WT, Jensen DR, Yost TJ, Eckel RH (1997) Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4139-4143
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402: 442-459
- Ellacott KL, Cone RD (2004) The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Prog Horm Res* 59: 395-408
- Elmquist JK, Elias CF, Saper CB (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232
- Enalapril in Hypertension Study Group (UK) (1984) Enalapril in essential hypertension: a comparative study with propranolol. *Br J Clin Pharmacol* 18: 51-56

- Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, Luft FC, Sharma AM (2005) Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* 45: 356-362
- Engeli S, Sharma AM (2000) Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm Metab Res* 32: 485-499
- Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD (1996) Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381: 415-421
- Evans BA, Agar L, Summers RJ (1999) The role of the sympathetic nervous system in the regulation of leptin synthesis in C57BL/6 mice. *FEBS Lett* 444: 149-154
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD (1997) Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385: 165-168
- Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R (2003) Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 1045-1050
- Filipovsky J, Ducimetiere P, Eschwege E, Richard JL, Rosselin G, Claude JR (1996) The relationship of blood pressure with glucose, insulin, heart rate, free fatty acids and plasma cortisol levels according to degree of obesity in middle-aged men. *J Hypertens* 14: 229-235
- Fitzsimons JT (1998) Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 78: 583-686
- Flier JS, Maratos-Flier E (1998) Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* 92: 437-440
- Fogari R, Derosa G, Zoppi A, Rinaldi A, Lazzari P, Fogari E, Mugellini A, Preti P (2005) Comparison of the effects of valsartan and felodipine on plasma leptin and insulin sensitivity in hypertensive obese patients. *Hypertens Res* 28: 209-214
- Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS (1995) Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1: 1311-1314
- Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrere B (2000) Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* 130: 3127S-3131S
- Fujiki N, Yoshida Y, Zhang S, Sakurai T, Yanagisawa M, Nishino S (2006) Sex difference in body weight gain and leptin signaling in hypocretin/orexin deficient mouse models. *Peptides* 27: 2326-2331
- Gades MD, van Goor H, Kaysen GA, Johnson PR, Horwitz BA, Stern JS (1999) Brief periods of hyperphagia cause renal injury in the obese Zucker rat. *Kidney Int* 56: 1779-1787
- Gavrila A, Chan JL, Miller LC, Heist K, Yiannakouris N, Mantzoros CS (2005) Circulating melanin-concentrating hormone, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone levels in relation to body composition: alterations in response to food deprivation and recombinant human leptin administration. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1047-1054

- Gertz BJ, Contreras LN, McComb DJ, Kovacs K, Tyrrell JB, Dallman MF (1987) Chronic administration of corticotropin-releasing factor increases pituitary corticotroph number. *Endocrinology* 120: 381-388
- Ghiadoni L, Virdis A, Magagna A, Taddei S, Salvetti A (2000) Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension. *Hypertension* 35: 501-506
- Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, Guerrieri M, Mantero F (2002) Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens* 15: 381-388
- Gohlke P, Weiss S, Jansen A, Wiene W, Stangier J, Rascher W, Culman J, Unger T (2001) AT1 receptor antagonist telmisartan administered peripherally inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 62-70
- Gomori A, Ishihara A, Ito M, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, Ito M, Tanaka T, Tokita S, Moriya M, Iwaasa H, Kanatani A (2003) Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E583-E588
- Goossens GH, Blaak EE, van Baak MA (2003) Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes Rev* 4: 43-55
- Gorzelnik K, Engeli S, Janke J, Luft FC, Sharma AM (2002) Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens* 20: 965-973
- Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Trevano FQ, Bombelli M, Scopelliti F, Facchini A, Mancia G (2003) Comparative effects of candesartan and hydrochlorothiazide on blood pressure, insulin sensitivity, and sympathetic drive in obese hypertensive individuals: results of the CROSS study. *J Hypertens* 21: 1761-1769
- Grundey SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C (2004) Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109: 433-438
- Guerre-Millo M (2002) Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest* 25: 855-861
- Guerre-Millo M (2004) Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 30: 13-19
- del Giudice EM, Santoro N, Cirillo G, D'Urso L, Di Toro R, Perrone L (2001) Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family. *Diabetes* 50: 2157-2160
- Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ (2000) Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R47-R52

- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1: 271-272
- Hainault I, Nebout G, Turban S, Ardouin B, Ferre P, Quignard-Boulangé A (2002) Adipose tissue-specific increase in angiotensinogen expression and secretion in the obese (fa/fa) Zucker rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E59-E66
- Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W (2004) Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes* 53: 3024-3029
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30: 345-354
- Hardie LJ, Guilhot N, Trayhurn P (1996) Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res* 28: 685-689
- Harrison-Bernard LM, El Dahr SS, O'Leary DF, Navar LG (1999) Regulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA and protein in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 33: 340-346
- Havel PJ (1998) Leptin production and action: relevance to energy balance in humans. *Am J Clin Nutr* 67: 355-356
- Haynes AC, Chapman H, Taylor C, Moore GB, Cawthorne MA, Tadayyon M, Clapham JC, Arch JR (2002) Anorectic, thermogenic and anti-obesity activity of a selective orexin-1 receptor antagonist in ob/ob mice. *Regul Pept* 104: 153-159
- Henriksen EJ, Jacob S (2003) Modulation of metabolic control by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *J Cell Physiol* 196: 171-179
- Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y (2001) Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50: 1126-1133
- Hryniewicz K, Androne AS, Hudaihed A, Katz SD (2003) Partial reversal of cachexia by beta-adrenergic receptor blocker therapy in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 9: 464-468
- Huang Q, Rivest R, Richard D (1998) Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. *Endocrinology* 139: 1524-1532
- Huang Q, Viale A, Picard F, Nahon J, Richard D (1999) Effects of leptin on melanin-concentrating hormone expression in the brain of lean and obese Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Neuroendocrinology* 69: 145-153
- Hubner R, Hogemann AM, Sunzel M, Riddell JG (1997) Pharmacokinetics of candesartan after single and repeated doses of candesartan cilexetil in young and elderly healthy volunteers. *J Hum Hypertens* 11 Suppl 2: S19-S25

- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-141
- Inagami T, Guo DF, Kitami Y (1994) Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview. *J Hypertens Suppl* 12: S83-S94
- Ionescu E, Sauter JF, Jeanrenaud B (1985) Abnormal oral glucose tolerance in genetically obese (fa/fa) rats. *Am J Physiol* 248: E500-E506
- Ito M, Gomori A, Ishihara A, Oda Z, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, Ito M, Sano H, Tokita S, Moriya M, Iwaasa H, Kanatani A (2003) Characterization of MCH-mediated obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E940-E945
- Iyer SN, Katovich MJ (1996) Effect of acute and chronic losartan treatment on glucose tolerance and insulin sensitivity in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 9: 662-668
- Iyer SN, Raizada MK, Katovich MJ (1996) AT1 receptor density changes during development of hypertension in hyperinsulinemic rats. *Clin Exp Hypertens* 18: 793-810
- Joosten HF, van der Kroon PH (1974) Enlargement of epididymal adipocytes in relation to hyperinsulinemia in obese hyperglycemic mice (ob-ob). *Metabolism* 23: 59-66
- Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L, Plat F, Schork A, Smith B, Zanchetti A (2004) Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet* 363: 2022-2031
- Kaiser T, Schunkert H (2001) [Cardiovascular changes in obesity]. *Herz* 26: 194-201
- Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF (1992) The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension* 19: I110-I115
- Kasper SO, Carter CS, Ferrario CM, Ganten D, Ferder LF, Sonntag WE, Gallagher PE, Diz DI (2005) Growth, metabolism, and blood pressure disturbances during aging in transgenic rats with altered brain renin-angiotensin systems. *Physiol Genomics* 23: 311-317
- Kemmer FW, Berger M, Herberg L, Gries FA, Wirdeier A, Becker K (1979) Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Demonstration of insulin resistance in the obese Zucker rat. *Biochem J* 178: 733-741
- Kim MS, Rossi M, Abusnana S, Sunter D, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Heath MM, Stanley SA, Seal LJ, Bhatti JR, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR (2000) Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* 49: 177-182
- Kim S, Urs S, Massiera F, Wortmann P, Joshi R, Heo YR, Andersen B, Kobayashi H, Teboul M, Ailhaud G, Quignard-Boulange A, Fukamizu A, Jones BH, Kim JH, Moustaid-Moussa N (2002a) Effects of high-fat diet, angiotensinogen (agt) gene inactivation, and targeted expression to adipose tissue on lipid metabolism and renal gene expression. *Horm Metab Res* 34: 721-725

- Kim S, Whelan J, Claycombe K, Reath DB, Moustaid-Moussa N (2002b) Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism. *J Nutr* 132: 1135-1140
- Kok SW, Overeem S, Visscher TL, Lammers GJ, Seidell JC, Pijl H, Meinders AE (2003) Hypocretin deficiency in narcoleptic humans is associated with abdominal obesity. *Obes Res* 11: 1147-1154
- Kokkotou E, Jeon JY, Wang X, Marino FE, Carlson M, Trombly DJ, Maratos-Flier E (2005) Mice with MCH ablation resist diet-induced obesity through strain-specific mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R117-R124
- Kokkotou EG, Tritos NA, Mastaitis JW, Slieker L, Maratos-Flier E (2001) Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. *Endocrinology* 142: 680-686
- Kopelman PG (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* 404: 635-643
- Korner J, Aronne LJ (2003) The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment. *J Clin Invest* 111: 565-570
- Kowalski TJ, Spar BD, Weig B, Farley C, Cook J, Ghibaudi L, Fried S, O'Neill K, Del Vecchio RA, McBriar M, Guzik H, Clader J, Hawes BE, Hwa J (2006) Effects of a selective melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist on food intake and energy homeostasis in diet-induced obese mice. *Eur J Pharmacol*
- Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE (1988) Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res* 443: 63-69
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76
- Kurtz A, Wagner C (1999) Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S162-S168
- Larsen PJ, Vrang N, Petersen PC, Kristensen P (2000) Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res* 8: 590-596
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 322-327
- Leong DS, Terron JA, Falcon-Neri A, Armando I, Ito T, Johren O, Tonelli LH, Hoe KL, Saavedra JM (2002) Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors. *Neuroendocrinology* 75: 227-240
- Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I (2001) Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345: 851-860

- Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Aurup P, Edelman J, Snapinn S (2002) Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 359: 1004-1010
- Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J (2002) Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 360: 57-58
- Liposits Z, Paull WK, Setalo G, Vigh S (1985) Evidence for local corticotropin releasing factor (CRF)-immunoreactive neuronal circuits in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. An electron microscopic immunohistochemical analysis. *Histochemistry* 83: 5-16
- Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E (2001) Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 107: 379-386
- Lumbers ER (1999) Angiotensin and aldosterone. *Regul Pept* 80: 91-100
- Mark AL, Correia ML, Rahmouni K, Haynes WG (2002) Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications. *J Hypertens* 20: 1245-1250
- Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulangé A, Turban S, Saint-Marc P, Fukamizu 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
- Mastronardi CA, Yu WH, Srivastava VK, Dees WL, McCann SM (2001) Lipopolysaccharide-induced leptin release is neurally controlled. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14720-14725
- Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I (2001) Central orexin-A augments sympathoadrenal outflow in conscious rabbits. *Hypertension* 37: 1382-1387
- McGrath BP, Matthews PG, Louis W, Howes L, Whitworth JA, Kincaid-Smith PS, Fraser I, Scheinkestel C, MacDonald G, Rallings M (1990) Double-blind study of dilevalol and captopril, both in combination with hydrochlorothiazide, in patients with moderate to severe hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 16: 831-838
- McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D, Avezum A, Burns RJ, Probstfield J, Tsuyuki RT, White M, Rouleau J, Latini R, Maggioni A, Young J, Pogue J (1999) Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation* 100: 1056-1064
- Mensink GB, Lampert T, Bergmann E (2005) [Overweight and obesity in Germany 1984-2003]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 48: 1348-1356
- Mezey E, Kiss JZ, Skirboll LR, Goldstein M, Axelrod J (1984) Increase of corticotropin-releasing factor staining in rat paraventricular nucleus neurones by depletion of hypothalamic adrenaline. *Nature* 310: 140-141

- Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV (1998) Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47: 294-297
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4196-4200
- Moldow RL, Fischman AJ (1982) Hypothalamic CRF-like immunoreactivity in the rat after hypophysectomy or adrenalectomy. *Peptides* 3: 143-147
- Morens C, Norregaard P, Receveur JM, van Dijk G, Scheurink AJ (2005) Effects of MCH and a MCH1-receptor antagonist on (palatable) food and water intake. *Brain Res* 1062: 32-38
- Morris M, Means S, Oliverio MI, Coffman TM (2001) Enhanced central response to dehydration in mice lacking angiotensin AT(1a) receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1177-R1184
- Morton GJ, Blevins JE, Williams DL, Niswender KD, Gelling RW, Rhodes CJ, Baskin DG, Schwartz MW (2005) Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *J Clin Invest* 115: 703-710
- Muroya S, Funahashi H, Yamanaka A, Kohno D, Uramura K, Nambu T, Shibahara M, Kuramochi M, Takigawa M, Yanagisawa M, Sakurai T, Shioda S, Yada T (2004) Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur J Neurosci* 19: 1524-1534
- Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC, Woo SL (1996) Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14804-14808
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827: 243-260
- Naruse M, Tanabe A, Sato A, Takagi S, Tsuchiya K, Imaki T, Takano K (2002) Aldosterone breakthrough during angiotensin II receptor antagonist therapy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 40: 28-33
- NCEP (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285: 2486-2497
- Nishimura Y, Ito T, Hoe K, Saavedra JM (2000) Chronic peripheral administration of the angiotensin II AT(1) receptor antagonist candesartan blocks brain AT(1) receptors. *Brain Res* 871: 29-38
- Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW (2004) Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 15: 362-369

- Obici S, Feng Z, Karkanas G, Baskin DG, Rossetti L (2002) Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 5: 566-572
- Ortlepp JR, Breuer J, Eitner F, Kluge K, Kluge R, Floege J, Hollweg G, Hanrath P, Joost HG (2002) Inhibition of the renin-angiotensin system ameliorates genetically determined hyperinsulinemia. *Eur J Pharmacol* 436: 145-150
- Padwal R, Li SK, Lau DC (2004) Long-term pharmacotherapy for obesity and overweight. *Cochrane Database Syst Rev* CD004094
- Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB (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
- Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P (2001) The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345: 870-878
- Pasman WJ, Saris WH, Westerterp-Plantenga MS (1999) Predictors of weight maintenance. *Obes Res* 7: 43-50
- Peeke PM, Chrousos GP (1995) Hypercortisolism and obesity. *Ann N Y Acad Sci* 771: 665-676
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18: 9996-10015
- Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de WF, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM (2003) Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 349: 1893-1906
- Pinkney JH, Coppack SW, Mohamed-Ali V (1998) Effect of isoprenaline on plasma leptin and lipolysis in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48: 407-411
- Plotsky PM, Thrivikraman KV, Watts AG, Hauger RL (1992) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the Zucker obese rat. *Endocrinology* 130: 1931-1941
- Polidori C, Ciccocioppo R, Nisato D, Cazaubon C, Massi M (1998) Evaluation of the ability of irbesartan to cross the blood-brain barrier following acute intragastric treatment. *Eur J Pharmacol* 352: 15-21
- Porter JP, Potratz KR (2004) Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R422-R428
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM (2001) C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286: 327-334

- Prasad A, Quyyumi AA (2004) Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. *Circulation* 110: 1507-1512
- Qian S, Chen H, Weingarth D, Trumbauer ME, Novi DE, Guan X, Yu H, Shen Z, Feng Y, Frazier E, Chen A, Camacho RE, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Marsh DJ (2002) Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol* 22: 5027-5035
- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243-247
- Raasch W, Jöhren O, Schwartz S, Gieselberg A, Dominiak P (2004) Combined blockade of AT1-receptors and ACE synergistically potentiates antihypertensive effects in SHR. *J Hypertens* 22: 611-618
- 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
- Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Weickert MO (2006) Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clin Res Cardiol* 95: 136-147
- Ricci MR, Fried SK (1999) Isoproterenol decreases leptin expression in adipose tissue of obese humans. *Obes Res* 7: 233-240
- Ricci MR, Fried SK, Mittleman KD (2000) Acute cold exposure decreases plasma leptin in women. *Metabolism* 49: 421-423
- Ricci MR, Lee MJ, Russell CD, Wang Y, Sullivan S, Schneider SH, Brodin RE, Fried SK (2005) Isoproterenol decreases leptin release from rat and human adipose tissue through posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E798-E804
- Richard D, Baraboi D (2004) Circuitries involved in the control of energy homeostasis and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Treat Endocrinol* 3: 269-277
- Richard D, Rivest R, Naimi N, Timofeeva E, Rivest S (1996) Expression of corticotropin-releasing factor and its receptors in the brain of lean and obese Zucker rats. *Endocrinology* 137: 4786-4795
- Rossi M, Beak SA, Choi SJ, Small CJ, Morgan DG, Ghatge MA, Smith DM, Bloom SR (1999) Investigation of the feeding effects of melanin concentrating hormone on food intake--action independent of galanin and the melanocortin receptors. *Brain Res* 846: 164-170
- Rossner S (2001) Obesity through the ages of man. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 4: S29-S33
- Roth J, Qiang X, Marban SL, Redelt H, Lowell BC (2004) The obesity pandemic: where have we been and where are we going? *Obes Res* 12 Suppl 2: 88S-101S

- Russell CD, Ricci MR, Brolin RE, Magill E, Fried SK (2001) Regulation of the leptin content of obese human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E399-E404
- Sahu A (1998a) Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology* 139: 795-798
- Sahu A (1998b) Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Endocrinology* 139: 4739-4742
- Sainsbury A, Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Zakrzewska KE, Halban PA, Gaillard RC, Jeanrenaud B (1997) Chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats: status of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, and vagal mediation of hyperinsulinaemia. *Diabetologia* 40: 1269-1277
- Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K (1986) Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res* 382: 213-238
- Sakata K, Kumagai H, Osaka M, Onami T, Matsuura T, Imai M, Saruta T (2002) Potentiated sympathetic nervous and renin-angiotensin systems reduce nonlinear correlation between sympathetic activity and blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 106: 620-625
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 1
- Samson WK, Gosnell B, Chang JK, Resch ZT, Murphy TC (1999) Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res* 831: 248-253
- Sanvitto GL, Jöhren O, Hauser W, Saavedra JM (1997) Water deprivation upregulates ANG II AT1 binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. *Am J Physiol* 273: E156-E163
- Schinke M, Baltatu O, Böhm M, Peters J, Rascher W, Bricca G, Lippoldt A, Ganten D, Bader M (1999) Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3975-3980
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671
- Schwartz MW, Woods SC, Seeley RJ, Barsh GS, Baskin DG, Leibel RL (2003) Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? *Diabetes* 52: 232-238
- Segal-Lieberman G, Bradley RL, Kokkotou E, Carlson M, Trombly DJ, Wang X, Bates S, Myers MG, Jr., Flier JS, Maratos-Flier E (2003) Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10085-10090

- Seltzer A, Bregonzio C, Armando I, Baiardi G, Saavedra JM (2004) Oral administration of an AT1 receptor antagonist prevents the central effects of angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1028: 9-18
- Sharma AM (2004) Is there a rationale for angiotensin blockade in the management of obesity hypertension? *Hypertension* 44: 12-19
- Sharma AM, Chetty VT (2005) Obesity, hypertension and insulin resistance. *Acta Diabetol* 42 Suppl 1: S3-S8
- Sharma AM, Engeli S, Pischon T (2001) New developments in mechanisms of obesity-induced hypertension: role of adipose tissue. *Curr Hypertens Rep* 3: 152-156
- Shearman LP, Camacho RE, Sloan SD, Zhou D, Bednarek MA, Hreniuk DL, Feighner SD, Tan CP, Howard AD, Van der Ploeg LH, MacIntyre DE, Hickey GJ, Strack AM (2003) Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats. *Eur J Pharmacol* 475: 37-47
- Shibasaki Y, Mori Y, Tsutumi Y, Masaki H, Sakamoto K, Murasawa S, Maruyama K, Moriguchi Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H (1999) Differential kinetics of circulating angiotensin IV and II after treatment with angiotensin II type 1 receptor antagonist and their plasma levels in patients with chronic renal failure. *Clin Nephrol* 51: 83-91
- Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E (1998) Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396: 670-674
- Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, Takasaki M, Kannan H (1999) Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol* 277: R1780-R1785
- Skurk T, Lee YM, Hauner H (2001) Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture. *Hypertension* 37: 1336-1340
- Skurk T, van H, V, Blum WF, Hauner H (2005) Angiotensin II promotes leptin production in cultured human fat cells by an ERK1/2-dependent pathway. *Obes Res* 13: 969-973
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF (2003) Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361: 226-228
- Stanley SA, Murphy KG, Bewick GA, Kong WM, Opacka-Juffry J, Gardiner JV, Ghatei M, Small CJ, Bloom SR (2004) Regulation of rat pituitary cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) by CRH and glucocorticoids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E583-E590
- Steinbrook R (2004) Surgery for severe obesity. *N Engl J Med* 350: 1075-1079
- Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, . (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377: 530-532

- Strazzullo P, Iacone R, Iacoviello L, Russo O, Barba G, Russo P, D'Orazio A, Barbato A, Cappuccio FP, Farinaro E, Siani A (2003) Genetic variation in the renin-angiotensin system and abdominal adiposity in men: the Olivetti Prospective Heart Study. *Ann Intern Med* 138: 17-23
- Stricker-Krongrad A, Dimitrov T, Beck B (2001) Central and peripheral dysregulation of melanin-concentrating hormone in obese Zucker rats. *Brain Res Mol Brain Res* 92: 43-48
- Szekely M, Petervari E, Balasko M, Hernadi I, Uzsoki B (2002) Effects of orexins on energy balance and thermoregulation. *Regul Pept* 104: 47-53
- Takekawa S, Asami A, Ishihara Y, Terauchi J, Kato K, Shimomura Y, Mori M, Murakoshi H, Kato K, Suzuki N, Nishimura O, Fujino M (2002) T-226296: a novel, orally active and selective melanin-concentrating hormone receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 438: 129-135
- Tamura K, Umemura S, Sumida Y, Nyui N, Kobayashi S, Ishigami T, Kihara M, Sugaya T, Fukamizu A, Miyazaki H, Murakami K, Ishii M (1998) Effect of genetic deficiency of angiotensinogen on the renin-angiotensin system. *Hypertension* 32: 223-227
- Tang-Christensen M, Holst JJ, Hartmann B, Vrang N (1999) The arcuate nucleus is pivotal in mediating the anorectic effects of centrally administered leptin. *Neuroreport* 10: 1183-1187
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45: 205-251
- Tomas E, Kelly M, Xiang X, Tsao TS, Keller C, Keller P, Luo Z, Lodish H, Saha AK, Unger R, Ruderman NB (2004) Metabolic and hormonal interactions between muscle and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 63: 381-385
- van den Top M, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D (2004) Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci* 7: 493-494
- Tritos NA, Maratos-Flier E (1999) Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin-concentrating hormone. *Neuropeptides* 33: 339-349
- Tritos NA, Mastaitis JW, Kokkotou E, Maratos-Flier E (2001) Characterization of melanin concentrating hormone and preproorexin expression in the murine hypothalamus. *Brain Res* 895: 160-166
- Tsao TS, Lodish HF, Fruebis J (2002) ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur J Pharmacol* 440: 213-221
- Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X, Okubo S, Niimura F, Nishimura H, Fogo A, Utsunomiya H, Inagami T, Ichikawa I (1998) Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest* 101: 755-760

- Umemura S, Kihara M, Sumida Y, Yabana M, Ishigami T, Tamura K, Nyui N, Hibi K, Murakami K, Fukamizu A, Ishii M (1998) Endocrinological abnormalities in angiotensinogen-gene knockout mice: studies of hormonal responses to dietary salt loading. *J Hypertens* 16: 285-289
- Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen PJ, Kristensen P (1999) Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res* 818: 499-509
- Walker WG, Whelton PK, Saito H, Russell RP, Hermann J (1979) Relation between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension* 1: 287-291
- Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO (2002) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8: 75-79
- Wang JM, Tan J, Leenen FH (2003) Central nervous system blockade by peripheral administration of AT1 receptor blockers. *J Cardiovasc Pharmacol* 41: 593-599
- Yamada H, Okumura T, Motomura W, Kobayashi Y, Kohgo Y (2000) Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 527-531
- Yamada K, Yuan X, Otabe S, Koyanagi A, Koyama W, Makita Z (2002) Sequencing of the putative promoter region of the cocaine- and amphetamine-regulated-transcript gene and identification of polymorphic sites associated with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 132-136
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2003) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38: 701-713
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T (2003) Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 278: 2461-2468
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-946
- Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U (1999) Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5: 1066-1070
- Yusuf S, Ostergren JB, Gerstein HC, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Olofsson B, Probstfield J, McMurray JV (2005) Effects of candesartan on the development of a new diagnosis of diabetes mellitus in patients with heart failure. *Circulation* 112: 48-53

Zimanyi IA, Fathi Z, Poindexter GS (1998) Central control of feeding behavior by neuropeptide Y. *Curr Pharm Des* 4: 349-366

Zorad S, Dou JT, Benicky J, Hutanu D, Tybitanclova K, Zhou J, Saavedra JM (2006) Long-term angiotensin II AT(1) receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *Eur J Pharmacol* 552: 112-122

Zucker LM (1965) Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Ann N Y Acad Sci* 131: 447-458

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α -MSH	α -Melanozyten-Stimulations-Hormon
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AgRP	Agouti-Related-Protein
ANG I bzw. ANG II	Angiotensin I bzw. II
ARC	Nucleus arcuatus
AT ₁ - bzw. AT ₂ -Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor-Typ-1 bzw. Typ-2
BMI	Body-Mass-Index
CART	Cocain-Amphetamin-Reguliertes-Transkript
cDNA	Complementäre Desoxyribonucleinsäure
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
EDTA	Ethylendiamin-Tetracetat
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HA	Hypothalamus
HF	Herzfrequenz
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IL-6	Interleukin 6
LHA	Lateraler Hypothalamus
MAP	Mittlerer Arterielle Blutdruck
MC3- bzw. MC4R	Melanocortin-3- bzw. Melanocortin-4-Rezeptor
MCH	Melanin-Concentrating-Hormon
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MW	Mittelwert
NPY	Neuropeptid Y
OREX	Orexin-A
POMC	Prepro-Opiomelanocortin
PVN	Nucleus paraventricularis
RAS	Renin-Angiotensin-System
RIA	Radio-Immuno-Assay

RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction
SEM	Standardfehler
SHR	Spontan Hypertensive Ratte
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α

7.2 Material

Laborausrüstung:

Geräte:

Absauggerät Eppendorf 4151	Eppendorf
Blutzuckermessgerät Ascensia ELITE XL	Bayer
Cycler für cDNA-Herstellung	Biometra
Druckmessgeräte:	
Pressure Processor	Gould
DC Amplifier	Gould
Druckaufnehmern Stratham P23Db	Hellige
Eismaschine	Scotsman AF 10
Elektrophoresegerät Sub-Cell GT	BioRad
FLUOstar OPTIMA Basisgerät 2003-8143	BMG LABTECH
Gamma-Counter	Wallac
Gefriertruhen	Bosch
Kamera CellCam b/w digital control	PHASE
Kameragerät Power Pac 300	BioRad
Kühlschränke	Bosch
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Janke & Kunkel Gmbh & Co.KG
Mikrowelle	Cortina
PCR-Gerät:ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
pH-Meter WTW ph 531	WTW Weilheim
RNA-Isolierung: 6100 Nucleic Acid Prep Station	Applied Biosystems
Rüttler	Janke & Kunkel Gmbh & Co.KG
Schüttel/Schwenkgerät REAX 2	Heidolph
Ultra-Tourax 78	IKA-Werke

Vakuum-Verdampfer	Savant
Vortex REAX 2000	Heidolph
Waagen	
Feinwaage	Sartorius
Waage MC1 Laboratory LC220S	Sartorius
Wärmebad	Köttermann
Zentrifugen	
Tischzentrifuge MIKRO 200R	Hettich Zentrifugen
Tischzentrifuge PCR-Labor	Eppendorf
Zentrifuge PCR-Labor	Jouan
Minifuge RF	Heraeus sepatech
<u>Gebrauchsmaterial:</u>	
Futter: Haltungsdiät	Altromin
Gelkammer und Kämmen	BioRad
Glasgefäße	Schott Duran
Guillotine	Harvard Apparatus CO. INC. MILLIS. MASS. USA
Käfige Makrolon Typ III und IV	E. Becker & Co.
Kanülen	Braun
Katheter	SIMS trademarks
Messzylinder	Duran Assistent IDL Germany
Nahtmaterial Mopylen monofil 5-0 USP	Resorba
Operationsinstrumente	FST Heidelberg
Pipetten:	
Pipette 0,5-10µl	Eppendorf
Finnpipette 5-40µl, 40-200µl, 200-1000µl	Labsystems
Anthos 50-200 µl, 200-1000 µl	Anthos new line
Multipipetten 50-300 µl, 1ml	Eppendorf
Glaspipetten 5ml, 10ml,???	Hirschmann EM Technology Brand Omnilab

Pipettenaufzieher	Hirschmann Laborgeräte
Probenplatten:	
PCR-Platte	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co
Splash Guard Plate	Applied Biosystems
RNA-Purification Tray	Applied Biosystems
96-Well optical reaction plate	Applied Biosystems
Rasierer	Aeskulap
Riaröhrchen	Greiner bio-one
Rührfische	Bohlender
Schlundsonden	Fine Science Tools INC
Skalpell Microtome blade	Feather Safety Razor CO., LTD Medical Devison
Spritzen: 2ml, 5ml, 10ml	BD Discardit
Stoppuhr	Junghans
Substanzen	
<u>Medikamente:</u>	
Bestatin	Sigma
Betaisodona	Mundipharma
Candesartan-Cilexetil	Astra-Zeneca
Gummi-Arabicum	Caesar & Loretz GmbH
Pentobarbital-Na	Pharmazeutische Handelsgesellschaft mbH
<u>Chemikalien:</u>	
Agarose NEE0	Carl Roth
Aprotinin (Trasylol 0,5)	Bayer
Diethylpyrocarbinat (DEPC)	Sigma
DNA Molecular Weight Marker XIV	Roche Diagnostics GmbH
EDTA	Merck
Ethanol p.A. 98%	Merck
Ethidiumbromid	BioRad Laboratories
Ethylacetat	Merck

Glycerol	Gibco BRL
HCl	Merck
Hexan	Sigma
Leupeptin	Sigma
Methanol	J.T.Baker
2-Methylbutan	Sigma
Natriumhydroxid	Fluka
Natriumchlorid	Merck
PBS Puffer	Hausapotheke
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma
Saccharose	Merck
Stickstoffstrom	Hausleitung
TAE-Puffer	Invitrogen
Tris 1M	Sigma
Triton X-100	Serva
Trockeneis	Hausapotheke
Xylen-Cyanol	BioRad Laboratories

Fertige Kits:

Euria-Angiotensin II Kit	Euria
Inhalt: Anti-Angiotensin II	
J-125-Angiotensin II	
Doppel-Antikörper-Festphase/ Trennreagenz	
Assaypuffer	
Angiotensin II Standard 300 pmol/l	
Angiotensin II Kontrolle, hoch und niedrig	
Aldosterone DA Kit	MP Biomedicals
Inhalt: Anti-Aldosteron	
Aldosteron-Standards (1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 100 pg/0,5ml)	
J-125-Aldosteron	
Steroid-Diluent	
Präzipitationslösung	

Rat Leptin Ria Kit

Linco Research

Inhalt: Pufferlösung

Ratten-Leptin-Antikörper

J-125-Leptin-Tracer

LabelHydratingPuffer

Standards (0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50 ng/ml)

Kontrolle 1 und 2

Präzipitationslösung

Rat Insulin Ria Kit

Linco Research

Inhalt: Pufferlösung

Ratten-Insulin-Antikörper

J-125-Insulin-Tracer

LabelHydratingPuffer

Standards (0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 ng/ml)

Kontrolle 1 und 2

Präzipitationslösung

Mouse Adiponectin RIA Kit

Linco Research

Inhalt: Assaypuffer

Adiponectin-Antikörper

J-125-Adiponectin

Adiponectin Standard 100 ng/ml

Kontrolle 1 und 2

Rabbit Carrier

Präzipitationslösung

Corticosteron RIA Kit

MP Biomedicals

Inhalt: Steroid-Diluent

Anti-Corticosteron

Corticosteron Standards (25; 50; 100; 250; 500; 1000 ng/ml)

Präzipitationslösung

J-125-Corticosteron

Kontrolle 1 und 2

Rat IL-6 ELISA

Bender MedSystems GmbH

Inhalt: Microwell-Platte, besetzt mit monoklonalen IL-6-Antikörper

Biotin-Conjugate

Streptavidin-HRP

IL-6-Standard

Pufferlösungskonzentrat

Waschpufferkonzentrat

Substrate Solution 1

Substrate Solution 2

Stop Solution

Plate Covers

Kit zur RNA-Isolierung

Applied Biosystems

Inhalt: Proteinase K

Waschpuffer 1

Waschpuffer 2

Elution Solution

Lysis Solution

Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit

Invitrogen

Inhalt: cNTP Mix, 10mM

Oligo(dT), 0,5 µg/µl

5x RT-Puffer

DTT, 0,1M

RNaseOUT, 40 units/µl

Cloned AMV RT, 15 units/µl

Scybr Green I Reaction System

Eurogentec SA

Inhalt: PCR-Master Mix:

Puffer 10X

dNTP-Mix, 5mM

MgCl₂, 50mM

HotGoldStar Enzyme

SybrGreen

7.3 Erklärung über die Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche wurden entsprechend der Deklaration von Helsinki und den entsprechenden Richtlinien für den Umgang und die Verwendung von Labortieren nach Genehmigung durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein bewilligt.

Antrag vom 11.11.03:

„Desensitivierung der HPA-Achse durch Blockade des Renin Angiotensin Systems“

Zeichen V742-72241.122-22

genehmigt am 06.05.04

Antrag vom 13.02.06:

„Die Bedeutung des zentralen RAAS für die Regulation von Futteraufnahme und Gewicht“

Zeichen V362-72241.122-22

genehmigt am 10.03.06

8. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. P. Dominiak danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie der Universität zu Lübeck.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Raasch, der mich zur Erarbeitung des Themas motivierte, mich hervorragend betreute und unterstützte und mir stets mit wertvollen Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Seite stand.

Weiterhin danke ich Herrn C. Wittmershaus für die großzügige Überlassung der Proben und Herrn F. Pahlke vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik für die Beratung bei der statistischen Auswertung.

Herrn PH Dr. O. Jöhren möchte ich für die Beratung bei der Durchführung der RT-PCR danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, insbesondere Frau A. Kaiser, Frau G. Vierke, Frau B. Lembrich und Herrn H. Müller für die exzellente Einarbeitung in die Laborarbeit und die Unterstützung während des experimentellen Teils der Arbeit.

9. Lebenslauf

Name: **Antonie Markert**

Geburtsdatum: 02.03.1980

Geburtsort: Hildesheim

Ausbildung

1986- 1990 Grundschule Moritzberg, Hildesheim

1990- 1999 Gymnasium Andreanum, Hildesheim, Allgemeine Hochschulreife

07.99- 02.00 Community Service Program in Panama- City, Panama

04.00- 07.01 Physikstudium, Technische Universität Berlin

10.01- 09.04 Medizinstudium, Freie Universität Berlin, Universitätsmedizin
Charité Berlin

10.04- 10.08 Medizinstudium, Universität Lübeck

Dissertation

02.05- 02.06 Durchführung des Praktischen Teils, Institut für experimentelle und
klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum
Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

10. Publikationen

Weight loss after AT₁-blockade is correlated to a downregulation.

Raasch W, Markert A, Wittmershaus C, Dominiak P, Jöhren O

Exp Clin Endocrinol Diabetes, OR6-31, S10 (2006)

Weight loss after AT₁-blockade is correlated to a downregulation of orexigenic peptides in the hypothalamus.

Raasch W, Markert A, Wittmershaus C, Jöhren O., Dominiak P

Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol 372 (Suppl): 68/239 (2006)

Reduction of bodyweight and food intake after AT₁-blockade is associated with a downregulation of orexigenic peptides in the hypothalamus 30.

Raasch W, Markert A, Jöhren O, Wittmershaus C, Dominiak P

Wissenschaftlicher Kongress Hypertonie 2006, Deutsche Hochdruckliga DHL – Deutsche Hypertonie Gesellschaft, München 22.-24. 11. 2006 (2006)