

Aus der Klinik für Nephrologie und Hypertensiologie der Franz-Volhard-
Klinik, Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Auswirkung von Atenolol und Valsartan auf die Produktion von
Adipokinen**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Lüdtkke

aus Ulm

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Jordan

2. Prov. Dr. med. H. Hauner

3. Priv.-Doz. Dr. J. Spranger

Datum der Promotion: 07.12.2007

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	6
Verzeichnis der Abbildungen	8
Verzeichnis der Tabellen	9
1 Einleitung	10
1.1 Probleme der Pharmakotherapie der adipositas-assoziierten Hypertonie	10
1.2 Adipokine als Mediatoren adipositas-assoziiierter Erkrankungen	11
1.3 Hypothesen und Ziele	15
2 Materialien und Methoden	16
2.1 Patienten und Ablauf der Hauptstudie	16
2.2 Untersuchungen und Probennahme in der Substudie	18
2.2.1 Anthropometrische Messungen	18
2.2.2 Blutentnahmen und Laborbestimmungen	18
2.2.3 Blutdruckmessung	18
2.2.4 Fettgewebebiopsie	19
2.3 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	19
2.4 Quantitative <i>TaqMan</i> RealTime RT-PCR	20
2.4.1 Prinzip der RT-PCR	20
2.4.2 Endogene Kontrolle	22
2.4.3 Weitere methodische Merkmale der <i>TaqMan</i> RT-PCR	22
2.4.4 Standardkurve	22
2.4.5 Durchführung der <i>TaqMan</i> RT-PCR	23
2.5 Direkter Sandwich ELISA	25
2.5.1 Prinzip des ELISA	25
2.5.2 Messung und Berechnung	25
2.5.3 Durchführung des ELISA	26
2.6 Statistik	28

3	Ergebnisse	29
3.1	Klinische Charakteristika	29
3.2	Adipokine	30
3.2.1	Testcharakteristika	30
3.2.2	Gruppenvergleiche für Valsartan und Atenolol	30
3.2.3	Korrelationsanalysen	33
4	Diskussion	34
4.1	Ergebnisse	34
4.2	Methodenkritik	40
5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	44
	Lebenslauf	53
	Selbständigkeitserklärung	55
	Danksagung	56

Verzeichnis der Abkürzungen

ACEI	eng. angiotensin converting enzyme inhibitor
Acrp30	engl. adipocyte complement-related protein of 30 kDa
AdipoQ	Adiponectin
ADSF	engl. adipose tissue-specific secretory factor
ARIC	eng. Atherosclerosis Risk in the Community
AT1-Blocker	Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptorantagonist
Ang II	Angiotensin II
apM1	engl. adipose most abundant gene transcript 1
AT1-Rezeptor	Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
β-Blocker	beta-1-selektive Adrenorezeptorantagonisten
BMI	engl. body mass index
cDNA	engl. complementary desoxyribonucleic acid
CT	engl. cycle time
CTP	Cystidin-5'-Triphosphat
CV	engl. coefficient of variation
DNA	engl. desoxyribonukleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
ELISA	engl. Enzym-linked Immunosorbent Assay
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FIZZ3	engl. found in inflammatory zone 3
GAPDH	Glycerolaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HDL	engl. high density lipoprotein
HOMA	engl. Homeostasis Model Assessment

hsCRP	hochsensitives C-reaktives Protein
ICH-GCP	International Conference on Harmonisation – Good Clinical Practice
IL-6	Interleukin-6
LDL	engl. low density lipoprotein
M-MLV	Moloney Murine Leukaemia Virus
mRNA	eng. messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NTC	engl. Non Template Control
ob	engl. obese
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction
PPAR- γ	engl. Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RNA	engl. ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	engl. reverse transcriptase - polymerase chain reaction
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (gemeint ist die DNA-Polymerase)
TTP	Thymidin-5'-Triphosphat
UNG	Uracil-N-Glycosylase
UTP	Uracil-5'-Triphosphat
WHO	engl. World Health Organization

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Sekretionsprodukte der Adipocyten	12
Abbildung 2: Organisation von Haupt- und Substudie	17
Abbildung 3: Prinzip der <i>TaqMan</i> -PCR	21
Abbildung 4: Schema des <i>TaqMan</i> -Amplifikationsplots	21
Abbildung 5: Erstellen einer Verdünnungsreihe für die Verwendung im ELISA	27
Abbildung 6: Leptin-Genexpression und Leptin-Serumkonzentrationen.....	31
Abbildung 7: Adiponectin-Genexpression und Adiponectin-Serumkonzentrationen	31
Abbildung 8: Resistin-Genexpression und Resistin-Serumkonzentrationen.....	32
Abbildung 9: IL-6-Genexpression und IL-6-Serumkonzentrationen	32

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Studienpopulation	29
Tabelle 2: Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten.....	30
Tabelle 3: Zusammenhang zwischen Genexpression und Serumkonzentrationen.....	33
Tabelle 4: Zusammenhang zwischen Adipokinen und Stoffwechselfparametern	33

1 Einleitung

1.1 Probleme der Pharmakotherapie der adipositas-assoziierten Hypertonie

In Deutschland wiesen 1998 laut des Bundesgesundheits surveys 20 % der Männer und Frauen einen Body Mass Index (BMI) von über 30 kg/m² auf (1) und erfüllten damit das World Health Organization (WHO) -Kriterium für Adipositas (2). Wichtiger als der BMI ist aber die Akkumulation von intraabdominalem Fettgewebe, da dieses als der Hauptfaktor für die Ausbildung von Folgekrankheiten der Adipositas gilt (3;4). Ein klinisch wichtiges Maß für die abdominale Adipositas ist der Taillenumfang. Die WHO spricht bei einem Taillenumfang >88 cm bei Frauen und >102 cm bei Männern von abdominaler Adipositas (2). Adipositas prädisponiert zu Insulinresistenz bzw. Typ 2 Diabetes mellitus, Hypertonie und Fettstoffwechselstörungen mit erniedrigten HDL- und erhöhten Triglyzerid-Werten, wodurch das kardiovaskuläre Risiko bei Adipositas deutlich erhöht wird (5;6). Die fortschreitende Atherosklerose bei Adipositas leistet kardiovaskulären Erkrankungen ebenfalls Vorschub und ist als subklinische chronische Entzündungsreaktion durch erhöhte zirkulierende Konzentrationen von hoch-sensitivem CRP (hsCRP) und Interleukin-6 (IL-6) charakterisiert (7;8).

Arterielle Hypertonie ist die häufigste Begleiterkrankung der Adipositas (9). Beim Einsatz antihypertensiver Medikamenten ist es wichtig, dass die erwünschte blutdrucksenkende Wirkung nicht gleichzeitig durch unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf den Stoffwechsel konterkariert wird. Trotz des guten blutdrucksenkenden Effekts von beta-1-selektiven Adrenorezeptorantagonisten (β -Blocker) muss gerade bei Adipösen die teilweise negative Auswirkung auf Insulinsensitivität und Körpergewicht beachtet werden (10). In der prospektiven ARIC (Atherosclerosis Risk in the Community) Studie war das Risiko, einen Typ 2 Diabetes bei Behandlung mit β -Blockern zu entwickeln, um 28 % größer als bei Behandlung mit vergleichbaren Antihypertensiva (11). Dagegen zeigt eine Metaanalyse zehn randomisierter klinischer Studien, dass durch Behandlung der Hypertonie mit Hemmern des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), sowohl mit Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren (ACEI) als auch mit Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptorantagonisten (genannt AT1-Blocker), im Vergleich mit Placebogabe oder Vergleichsmedikamenten (β -Blocker, Diuretika oder Kalzium-Antagonisten) die Ausbildung eines Typ II Diabetes um 22 % gesenkt werden konnte (12).

Die Ursachen der unterschiedlichen Nebenwirkungsprofile von β -Rezeptor- und RAAS-Blockade sind zu großen Teilen unbekannt. Die Untersuchung der Wirkungen und Nebenwirkungen von β -Rezeptor- und RAAS-Blockade ist deshalb von Bedeutung, weil sich beide Ansätze aus pathophysiologischer Sicht in gleicher Weise zur Therapie der adipositas-assoziierten Hypertonie eignen (13). Sowohl das sympathische Nervensystem als auch das RAAS sind bei Adipositas durch Überaktivierung gekennzeichnet (14;15). Damit kommt es zur typischen Natriumretention bei Adipositas (16). Insbesondere die renale Sympathikusaktivität wird durch Leptin gesteigert (17;18), sodass die Akkumulation von Fettgewebe eine besondere Rolle in der Pathophysiologie der adipositas-assoziierten Hypertonie spielt (19). Andere sog. Adipokine aus dem Fettgewebe beeinflussen die Insulinsensitivität und könnten damit das langfristige Risiko für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes steigern (20).

1.2 Adipokine als Mediatoren adipositas-assoziiierter Erkrankungen

Das Fettgewebe dient nicht nur als reiner Energiespeicher, sondern ist in die Regulation von Zellfunktionen aktiv involviert. Dies geschieht durch ein komplexes Netzwerk von endokrinen, parakrinen und autokrinen Signalen, die den Stoffwechsel unterschiedlicher Gewebe beeinflussen (21). In den letzten Jahren wurden viele Cytokine und Hormone entdeckt, die vom Fettgewebe ausgeschüttet werden (Abbildung 1). Hierzu zählen Leptin, das entscheidenden Einfluss auf das Körpergewicht und die Sympathikusaktivität nehmen kann (22;23), Adiponectin, das die Insulinsensitivität verbessern und die Ausbildung einer Atherosklerose verzögern kann (24-26), Interleukin-6 als Regulator des regionalen Fettgewebemetabolismus und wichtiger Entzündungsmediator (8;27) und Resistin, das zumindest im Tiermodell Insulinresistenz hervorruft und beim Menschen mit chronischer Entzündung und Atherosklerose assoziiert ist (28;29). Diese Adipokine wurden aufgrund ihrer besonderen Bedeutung für adipositas-assoziierte kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen in der vorhandenen klinischen Studie untersucht.

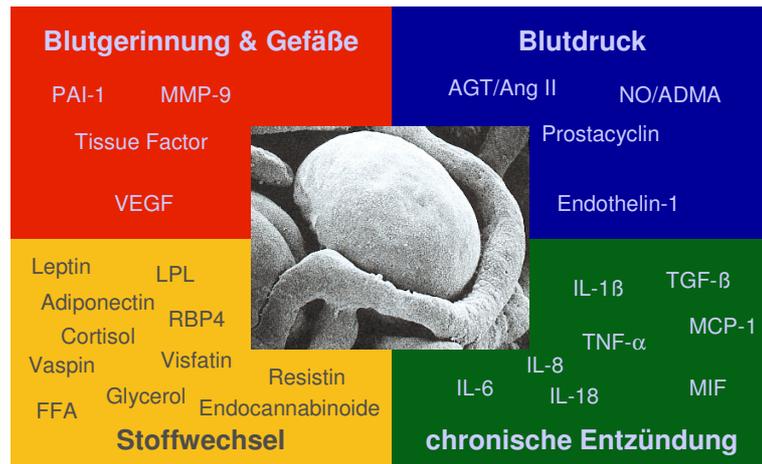


Abbildung 1: Sekretionsprodukte der Adipocyten („Adipokine“) mit Wirkungen auf Stoffwechsel, Blutgefäßfunktionen, Blutdruck und Inflammation. Viele der hier gezeigten Adipokine üben vielfältige Funktionen aus, die Zuordnung basiert auf den Erstbeschreibungen. ADMA – asymmetrisches Dimethylarginin, AGT – Angiotensinogen, ANG II – Angiotensin II, FFA – free fatty acids (freie Fettsäuren), IL – Interleukin, LPL – Lipoproteinlipase, MCP-1 – Monocyte Chemoattractant Protein 1, MIF – Macrophage Migration Inhibitory Factor, MMP-9 – Methionin-Metalloprotease 9, NO – Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid), PAI-1 – Plasminogen Activator Inhibitor 1, RBP4 – Retinol Binding Protein 4, TGF- β – Transforming Growth Factor β , TNF- α – Tumor Necrosis Factor α , VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor. Elektronenmikroskopische Aufnahme aus Saverio Cinti: The Adipose Organ. Editrice Kurtis, 1999.

Adipocyten sezernieren das Peptid Leptin in enger Korrelation zur Fettzellmasse (23). Das 16 kDa große Protein reguliert durch Reduktion der Nahrungsaufnahme und Steigerung des Energieverbrauchs das Körpergewicht (30;31). Adipositas führt zur Entwicklung von Leptin-Resistenz, die ebenfalls zu den hohen Leptinspiegeln bei Adipositas beiträgt (32;33). Eine Mutation im *ob* (obese) Gen der Maus resultiert in Leptindefizienz, starker Fettleibigkeit und Ausbildung eines Typ 2 Diabetes mellitus (22). Der gewichtsreduzierende Effekt von Leptin wird durch Signaltransduktion des Leptin-Rezeptors im Hypothalamus vermittelt (34). Der Leptin-Rezeptor, der Ähnlichkeit mit einem Klasse I Cytokinrezeptor aufweist, wird auch auf Adipocyten exprimiert (35). Sowohl eine verbesserte Insulinsensitivität als auch eine Verstärkung der Insulinresistenz durch Leptin wurden beschrieben (36). Leptin spielt eine wichtige Rolle bei der adipositas-assoziierten Aktivierung des Sympathikus, die unmittelbar mit der Blutdruckerhöhung bei Adipositas zusammenhängt (17;18). Im Rahmen eines negativen feed-back Mechanismus senkt Isoprenalin, ein β -Sympathikomimetikum, die Leptinsekretion durch Adipocyten *in vitro* und *in vivo* beim Menschen (37). Das RAAS und Leptin interagieren in komplexer Weise: Angiotensin II (Ang II) stimuliert die Leptinsekretion muriner und humaner Adipocyten *in vitro* (38;39). Angiotensin II-Infusionen bei Ratten führten jedoch zu verringerten Leptinspiegeln, da die zusätzliche

Sympathikusaktivierung sekundär die Leptinsekretion unterdrückte (40). Weiterführende Daten für den Menschen sind nicht bekannt. Auf der Basis der beschriebenen Experimente ist eine Beeinflussung der Leptinexpression im Fettgewebe und der zirkulierenden Leptinspiegel durch β -adrenerge und RAAS-Blockade zu erwarten.

Adiponectin (auch Acrp30 oder AdipoQ) ist ein Produkt des apM1-Gens, das ausschließlich von Adipocyten exprimiert wird. Das Protein besteht aus 244 Aminosäuren und weist ähnliche Strukturen wie Complementfaktor C1q, Kollagen VIII und X auf (24;41). Adiponectin macht bis zu 0,05 % des Gesamtserumproteins aus (24). Die Konzentration von Adiponectin im Blut liegt bei gesunden Menschen zwischen 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ und ist bei Adipositas und/oder Insulinresistenz deutlich verringert, u.a. aufgrund verringerter Genexpression im Fettgewebe (41-44). Substitution von Adiponectin dagegen verbessert die Insulinsensitivität (45;46). Die antiatherogene Wirkung von Adiponectin beruht auf der Hemmung der Entzündungsantwort des Endothels und der Transformation von Makrophagen in Schaumzellen (26;47).

Berg et al. zeigten, dass die Behandlung mit Thiazolidinedionen (orale Antidiabetika, PPAR γ -Agonisten) zu einer Zunahme von Adiponectin im Blut und einer Verbesserung der Insulinsensitivität führt (48). Diese Wirkung von PPAR γ -Agonisten ist auch für den Menschen nachgewiesen worden (49). β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin reduziert die Genexpression von Adiponectin in klonalen Adipocyten der Maus (50). Die bei Adipositas typische Sympathikusaktivierung könnte also über eine Reduzierung der Adiponectinspiegel die Ausbildung der Insulinresistenz fördern (51). Andererseits fördern β -Blocker die Entstehung der Insulinresistenz (11), sodass Effekte der β -Blockade auf Adiponectin unklar sind. Angiotensin II-Infusion bei Ratten steigert die Produktion von Sauerstoffradikalen, die ihrerseits die Sekretion von Adiponectin durch Adipocyten unterdrücken (52). Durch Hemmung dieses AT1-Rezeptor-vermittelten Effektes könnte Adiponectin im Blut, analog zur Behandlung mit Thiazolidinedionen, ansteigen und sekundär die Insulinwirkung verbessern. Von der Behandlung mit Atenolol (β 1-Blocker) und Valsartan (AT1-Blocker) ist also ein Einfluss auf Adiponectin im Fettgewebe und im Blut zu erwarten.

Resistin („Resistent to Insulin“) ist ein cysteinreiches Protein (114 Aminosäuren bei der Maus, 104 Aminosäuren beim Menschen) mit negativen Wirkungen auf die Insulinresistenz im Tiermodell (28;53). Andere Arbeitsgruppen haben es FIZZ3 („found in inflammatory zone 3“) und ADSF („adipose tissue-specific secretory factor“) genannt (54;55). Während Resistin bei Nagern von Adipocyten sezerniert wird, findet man beim Menschen nur minimale mRNA-Mengen in Adipocyten (56), aber mononukleäre Zellen und stromavaskuläre Zellen des Fettgewebes sezernieren Resistin (55).

Während Resistin bei Mäusen ein Bindeglied zwischen Adipositas und Insulinresistenz ist (28), konnten diese Ergebnisse nicht auf den Menschen übertragen werden (56) (57). Das Thiazolidinedion Rosiglitazon hemmt die Gen- und Proteinexpression von Resistin sowohl in Mausadipocyten als auch in humanen Makrophagen (28;58). Die Sekretion von Resistin durch Monocyten wird von Entzündungsmediatoren wie TNF- α und Interleukin-6 stimuliert (59). In klonalen Adipocyten der Maus erhöhen Sympathikomimetika die Resistin-Sekretion (60). Für die Serumkonzentrationen von Resistin fanden Lee et al. keine Unterschiede zwischen Schlanken, Adipösen und Typ 2 Diabetikern (61), wogegen andere Autoren erhöhte Serumkonzentrationen bei Typ 2 Diabetikern und adipösen Patienten fanden (62;63). Ethnische Unterschiede und Patienten mit sehr hohem BMI in diesen Studien könnten die diskrepanten Befunde erklären. Über die Wirkung von Angiotensin II auf die Resistin-Regulation gibt es keine Daten, damit sind potentielle Effekte von Valsartan offen. Aufgrund der *in vitro* Daten wird vermutet, dass β -Blockade die Resistinbildung verringert.

Interleukin-6 ist ein typisches Cytokin, das unter anderem an der Immunantwort, der Entzündungsreaktion und der Hämatopoese beteiligt ist (64). Gebildet wird Interleukin-6 zu 30 – 35 % im Fettgewebe (65), wobei das abdominale Fettgewebe mehr Interleukin-6 produziert als das subkutane (27;66). Die restliche Interleukin-6-Produktion stammt aus Immunzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten (27). Interleukin-6 hemmt die Aktivität der Lipoproteinlipase der Adipocyten, stimuliert die Lipolyse und erhöht die hepatische Sekretion von Triglyzeriden, was zur Hypertriglyzeridämie bei viszeraler Adipositas beitragen könnte (27;67). Die starke Korrelation zwischen C-reaktivem Protein, Fibrinogen und Interleukin-6 ist auf den starken Einfluss von Interleukin-6 auf die hepatische Produktion dieser Akut-Phase-Proteine zurückzuführen und erklärt die Rolle in der Atheroskleroseentstehung (8;68).

Bei gesunden Personen korreliert die Interleukin-6-Konzentration mit dem Grad der Adipositas (44;66). Die positive Korrelation zwischen Insulinresistenz und Interleukin-6-Konzentration im Fettgewebe des Menschen (69) kann durch die Hemmung der Genexpression und Sekretion von Adiponectin durch Interleukin-6 erklärt werden (70). Passend dazu senkt Rosiglitazon die Interleukin-6-Ausschüttung, was zum insulinsensitivierenden Effekt der Thiazolidinedione beitragen könnte (71). Noradrenalin und Angiotensin II steigern die Interleukin-6-Genexpression und Proteinsekretion von humanen Adipocysten, beteiligt sind hierbei β -adrenerge und AT1-Rezeptoren (67;72-74). Daher sollten sowohl Atenolol als auch Valsartan die Bildung von Interleukin-6 im Fettgewebe und die Serumkonzentration reduzieren.

1.3 Hypothesen und Ziele

Adipositas ist häufig mit Insulinresistenz, Fettstoffwechselstörungen und Hypertonie assoziiert. Pathogenetisch spielt das veränderte Sekretionsmuster von Adipokinen eine Rolle. Leptin, Adiponectin, Resistin und Interleukin 6 beeinflussen in unterschiedlicher Weise diese Veränderungen und tragen damit langfristig zum gesteigerten Atheroskleroserisiko bei Adipositas bei. Von besonderer Bedeutung ist die Frage, ob sich Medikamente, die zur Behandlung der Hypertonie bei Adipositas eingesetzt werden, ebenfalls auf die Bildung von Adipokinen auswirken. Dies würde helfen, günstige Effekte von AT1-Blockern bzw. negative Effekte von β -Blockern bspw. auf die Insulinresistenz besser zu verstehen.

In dieser Arbeit soll die Auswirkung der antihypertensiven Therapie mit Valsartan, einem AT1-Blocker, und Atenolol, einem β 1-Blocker, auf Insulinsensitivität und Adipokinprofile bei übergewichtigen Hypertonikern untersucht werden. Aufgabe war die Messung der quantitativen Genexpression im Fettgewebe und der Serumkonzentrationen von Leptin, Adiponectin, Resistin und Interleukin-6 vor und nach der Therapie mit Atenolol bzw. Valsartan. Basierend auf vorhandenen tierexperimentellen Daten und Zellkulturexperimenten werden folgende Veränderungen erwartet:

	Leptin	Adiponectin	Resistin	Interleukin-6
Atenolol	↑	?	↓	↓
Valsartan	↓	↑	?	↓

2 Materialien und Methoden

2.1 Patienten und Ablauf der Hauptstudie

In der Hauptstudie (Sponsor: Novartis Pharma, Nürnberg) wurde bei 132 Patienten mit einem BMI ≥ 30 kg/m² und mildem bis mäßigem arteriellem Hypertonus in 20 Zentren innerhalb Deutschlands der Einfluss von Valsartan (AT1-Blocker) und Atenolol (β 1-Blocker) auf den Blutdruck, den Lipid- und Glucosemetabolismus und das hoch-sensitive CRP gemessen (75). Alle Patienten unterschrieben vor Studienbeginn eine schriftliche Einverständniserklärung. Die Studie wurde von den für die Untersucher verantwortlichen Ethikkommissionen genehmigt und nach Richtlinien der Deklaration von Helsinki und den ICH-GCP Richtlinien durchgeführt.

In der randomisierten, doppelblinden Hauptstudie wurden 67 Patienten für 13 Wochen mit Valsartan und 65 Patienten mit Atenolol behandelt. Zu Beginn der Studie wurde in einer 2-wöchigen wash-out Phase die antihypertensive Medikation durch einfach-blinde Placebo-Gabe ersetzt. Danach bekamen die Patienten zufällig Valsartan 80 mg/Tag oder Atenolol 50 mg/Tag. Die Dosis wurde nach einer Woche verdoppelt. Nach weiteren 4 Wochen wurde den Patienten mit einem systolischen Blutdruck > 140 mmHg und/oder einem diastolischen Blutdruck > 90 mmHg zusätzlich 12,5 mg/d Hydrochlorothiazid gegeben. Diese Dosis konnte nach weiteren 2 Wochen auf 25 mg/d erhöht werden (Abbildung 2). Die Verblindung wurde durch die Anwendung der double-dummy Technik gesichert. Die Medikamente wurden einmal täglich zwischen 8.00 Uhr und 9.00 Uhr eingenommen. An den Untersuchungstagen erfolgte die Medikamenteneinnahme erst nach Abschluss der Untersuchungen und Messungen.

18 der 132 Probanden wurden in Berlin rekrutiert und am Franz-Volhard-Zentrum für Klinische Forschung (Charité Campus Buch) im Rahmen der Substudie untersucht (76;77). Blut- und Fettgewebeproben sowie alle weiteren hier beschriebenen Messwerte wurden am selben Tag vom nüchternen Patienten gewonnen, einmal vor Beginn der medikamentösen Therapie nach einer zweiwöchigen wash-out und Placebophase, ein weiteres Mal am Ende der dreizehnwöchigen Behandlungsphase.

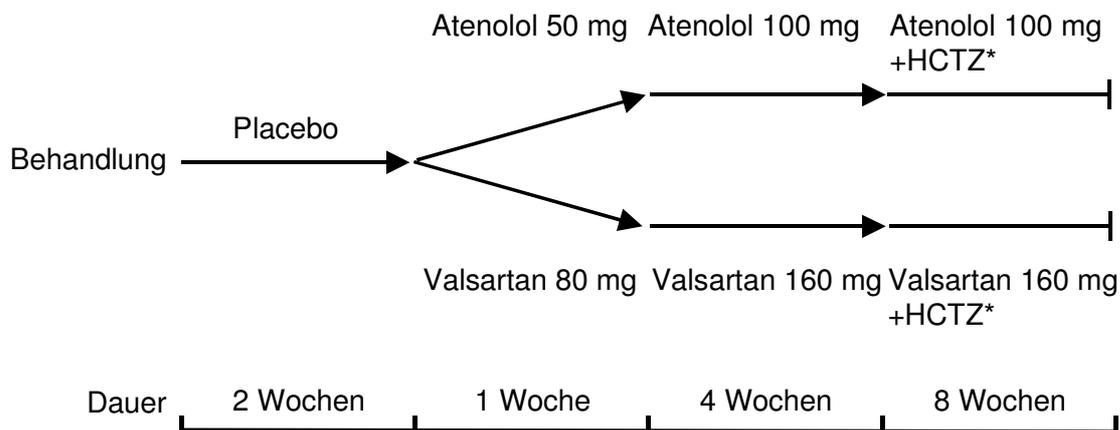


Abbildung 2: Organisation von Haupt- und Substudie. * Unverblindete Gabe von Hydrochlorothiazid, (HCTZ) wenn der Zielblutdruck nicht erreicht wurde.

Einschlusskriterien:

- BMI zwischen 30 kg/m² und 40 kg/m²
- Alter ab 18 Jahre
- systolischer Blutdruck 150-179 mmHg und/oder diastolischer Blutdruck 95-109 mmHg (Mittelwerte aus 3 Messungen) oder antihypertensive Therapie
- Verständnis des Studienablaufs und schriftliche Einwilligung

Ausschlusskriterien:

- schwerwiegende oder behandlungsbedürftige Erkrankungen außer Hypertonie
- Typ 1 oder 2 Diabetes mellitus
- Einnahme von lipidsenkenden Medikamenten 6 Wochen vor und während der Studie
- sekundäre Hypertonie
- bekannte Intoleranz gegenüber Valsartan, Atenolol oder Hydrochlorothiazid
- Drogen- oder Alkoholabusus
- Leber- oder Nierenerkrankungen
- Schwangerschaft und Stillzeit

2.2 Untersuchungen und Probennahme in der Substudie

Diese Daten und Proben wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

2.2.1 Anthropometrische Messungen

Körpergröße und Körpergewicht wurden an bis auf die Unterwäsche entkleideten und stehenden Probanden mittels geeichtem Personenlängenmessgerät 5001 und geeichter Waage S20-7720 (beide Geräte von Soehnle-Waagen, Murrhardt, Deutschland) bestimmt. Die Messung des Taillenumfanges erfolgte in leichter Expiration zwischen Rippenbogen und Beckenkamm.

2.2.2 Blutentnahmen und Laborbestimmungen

Blutentnahmen erfolgten aus einer Kubitalvene nach 20 min Liegen in Ruhe. Nach der Venenpunktion wurden im Abstand von 5 min je zwei Insulin- und Glucosewerte abgenommen, dazwischen 4x EDTA-Röhrchen und 3x Serum-Röhrchen für die Hormon-, Elektrolyt- und Lipidbestimmungen. Serum und Plasma wurden durch Zentrifugation bei 1700 g und 4°C gewonnen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C. Es wurden Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyzerid-Werte bestimmt. Glucose und Insulin wurden mit der Hexokinase-Methode bzw. einem Immunoassay bestimmt. Alle Messungen erfolgten in einem zertifizierten Labor nach Standardmethoden. Der HOMA (homeostasis model assesment) -Index zur Bestimmung der Insulinresistenz aus Nüchtern-Insulin und Nüchtern-Glucose wurde nach folgender Formel berechnet: $(\text{Insulin } [\mu\text{U/l}] \times \text{Glucose } [\text{mmol/l}]) / 22,5$ (78).

2.2.3 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessungen erfolgten mit einem Standard-Sphygmomanometer und mit einer dem Umfang des Oberarms angepassten Manschettenbreite. Der Blutdruck wurde nach einer mindestens fünfminütigen Ruhepause dreimal anhand der Korotkoff-Geräusche I und V im Sitzen bestimmt und gemittelt. Die Messung der Herzfrequenz erfolgte an der Arteria radialis über 30 s vor den Blutdruckmessungen, einmal im Sitzen und einmal im Stehen.

2.2.4 Fettgewebebiopsie

Die hier beschriebene Methode der Fettgewebebiopsie ist in der Arbeitsgruppe im Laufe der Jahre optimiert und häufig eingesetzt worden (44;79). Die Biopsien werden aus dem subkutanen Fettgewebe der Bauchhaut entnommen. Der Eingriff dauert ca. 15 min.

1. Hautdesinfektion, Abdeckung der Bauchhaut mit einem sterilen Lochtuch
2. Lokalanästhesie seitlich unterhalb des Bauchnabels mit 3 ml 1 % Lidocain eines 1 cm x 1 cm großen Hautareals (26 G-Kanüle), Aspiration vor der Injektion vermeidet intravasale Injektionen
3. 2-3 mm lange Stichinzision; Auffangen von Blut mit sterilen Tupfern
4. Strauss-Kanüle durch den Schnitt einführen, 10 ml Spritze mit 5 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung anschließen
5. Durch Bewegung der Kanüle sowie Einspritzen und Aspiration der Kochsalzlösung werden kleine Fettgewebestückchen gewonnen, schnelle Spritzenwechsel verhindern die Blutgerinnung in der Spritze
6. Unmittelbar nach Spritzenwechsel den Inhalt in Zentrifugenröhrchen (14 ml) überführen, mit NaCl-Heparin-Lösung auf 13 ml auffüllen und ins Labor bringen
7. Kochsalzreste durch Druck aus dem Gewebe entfernen, Inzisionsstelle desinfizieren, trocknen, mit Steri-Strips verschließen, mit großem Pflaster bedecken; Pflasterwechsel bei Bedarf; Steri-Strips nach 5 Tagen entfernen

2.3 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Zur Bestimmung der Genexpression von Adiponectin, Leptin, Resistin und Interleukin-6 für die vorliegende Arbeit wurde die komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) zur Verfügung gestellt. Es sei damit auf ausführliche Beschreibungen der Methoden in Publikationen der Arbeitsgruppe verwiesen (44;76;80;81). Die Gesamt-RNA-Menge wird mittels des RNeasy Mini Kit der Fa. Qiagen isoliert. Bei dieser Methode erfolgt die Präparation der RNA mittels Zentrifugation über eine RNA-selektive Silikatmembran. Die Zellen werden in einem Guanidiniumisothiocyanat-Puffer aufgeschlossen, anschließend wird die RNA mit Ethanol gefällt. Durch Zentrifugation wird das Lysat über die in einer Säule befindliche Silikatmembran filtriert. Die RNA bindet dabei an die

Matrix, und die übrigen Zellbestandteile gelangen ins Filtrat bzw. werden in den folgenden Waschschritten vollständig ausgewaschen. Auf der Membran erfolgt zusätzlich ein DNase Verdau (RNase-free-DNase-Kit von Qiagen). Die RNA wird zuletzt mit Wasser von der Säule eluiert. Die cDNA wird mittels Reverse Transkriptase aus der RNA synthetisiert. Dabei wird die RNA als Matrize verwendet und das 3'-Ende eines Primers liefert den Synthesestartpunkt. Die Reverse Transkriptase M-MLV ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Als Primer dienen Randomhexamere. Das Volumen des Gesamtansatzes beträgt 20 µl, wobei 2 µg der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt werden. Alle cDNAs werden zuletzt 1 zu 10 verdünnt und bei -20°C gelagert. Die Konzentrationen der cDNA-Lösungen entsprechen, ausgehend von der ursprünglich eingesetzten RNA-Menge, 10 ng/µl.

2.4 Quantitative *TaqMan* RealTime RT-PCR

2.4.1 Prinzip der RT-PCR

Bei der RT-PCR wird die durch Reverse Transkription (RT) hergestellte cDNA amplifiziert. Bei der *TaqMan* RT-PCR, einer quantitativen RealTime PCR, wird mit der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*Polymerase und mit einer fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde gearbeitet. Die Sonde bindet zwischen den beiden PCR-Primern an die Zielsequenz, sie trägt am 5'-Ende einen fluoreszierenden „Reporter“-Farbstoff (Fluoreszein) und am 3'-Ende einen „Quencher“-Farbstoff (Rhodamin). Bei Anregung der intakten Sonde mit einer Wellenlänge von 488nm wird die Fluoreszenz des Reporters durch Energietransfer vom Quencher unterdrückt. Mittels der *Taq*Polymerase und dem Primer als Startpunkt wird bei der PCR-Reaktion ein DNA-Strang gebildet. Sobald die *Taq*Polymerase dabei auf die Sonde trifft, wird diese hydrolysiert. Reporter und Quencher werden räumlich voneinander getrennt, und das Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffes wird messbar (Abbildung 3).

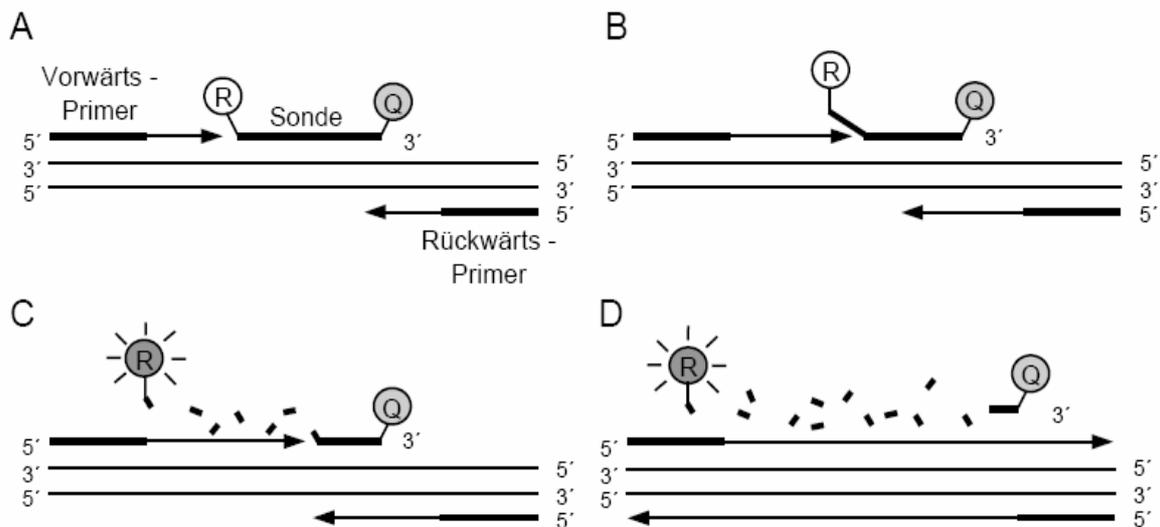


Abbildung 3: Prinzip der TaqMan-PCR. A: Primer-Extension (R=Reporter, Q=Quencher), B: Ausbildung der Y-förmigen Sekundärstruktur, C: Sondenhydrolyse, D: Abschluss der Polymerisation.

Mit jedem PCR-Zyklus steigt die Fluoreszenzintensität des Reporters direkt proportional zur Akkumulation des PCR-Produktes an. Die exponentielle Vermehrung der cDNA geht nach einer variablen Zyklenzahl in ein Plateau über (Abbildung 4). Um die einzelnen Proben vergleichen zu können, erfolgt die Quantifizierung zu dem Zeitpunkt (Zyklus, CT-Wert), bei dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (threshold cycle) überschreitet. Der CT-Wert wird so gewählt, dass er in allen zu vergleichenden Proben in der exponentiellen Phase der Amplifikationskurve liegt. Der Schwellenwert wird schneller erreicht, wenn mehr Ausgangsmaterial vorliegt. Während der exponentiellen Phase und unter Annahme einer Amplifikationseffizienz von 100 % steigt bei Halbierung der Startkopienzahl der CT-Wert um einen Zyklus an. Die wirkliche Effizienz wird mit der Standardkurve ermittelt und bei Berechnung quantitativer Unterschiede berücksichtigt.

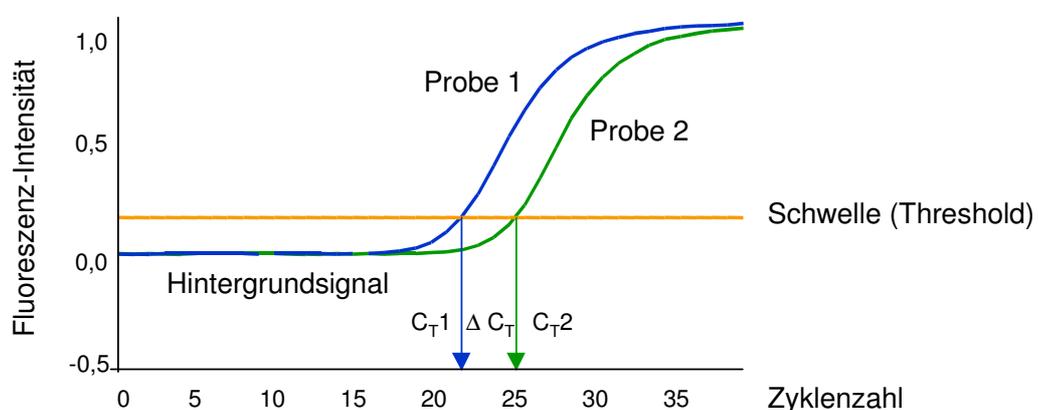


Abbildung 4: Schema des TaqMan-Amplifikationsplots.

2.4.2 Endogene Kontrolle

Zum Ausgleich von Messungenauigkeiten bei der RNA-Quantifizierung sowie von Effizienzunterschieden bei der cDNA-Synthese werden die zu vergleichenden Proben „normalisiert“. Dabei wird aus jeder zu messenden Probe zusätzlich ein Kontroll-Gen („Housekeeping-Gen“) amplifiziert, welches unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht transkriptionell reguliert wird. Nun kann der Zielsequenzwert einer Probe direkt durch die endogene Referenz geteilt werden, sodass Messungenauigkeiten und Effizienzunterschiede in der Probensynthese ausgeglichen werden.

2.4.3 Weitere methodische Merkmale der TaqMan RT-PCR

Zur Überprüfung etwaiger Kontaminationen mit DNA, cDNA oder PCR-Amplifikaten werden bei jedem PCR-Lauf zwei Proben mit Wasser anstelle des „Templates“ (Non Template Control, NTC) amplifiziert. Um Reamplifikationen durch Kontaminationen aus vorangegangenen PCRs zu verhindern, enthält der *TaqMan* Mastermix (neben ATP, GTP und CTP), UTP (anstelle von TTP) und das Enzym AmpErase UNG (Uracil-N-Glycosylase). Das Enzym UNG baut in einem 2-minütigen Verdau doppelsträngige DNA, die UTP enthält, vor der eigentlichen PCR ab. Der *TaqMan* Mastermix enthält den Referenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin), mit dem Pipettierungenauigkeiten vor der eigentlichen PCR erkannt und über die Software ausgeglichen werden.

2.4.4 Standardkurve

Die Proben können nur dann mittels endogener Kontrolle normalisiert werden (s. 2.4.2), wenn die Effizienz beider Amplifikationsreaktionen gleich ist, d.h. wenn die Steigung beider Amplifikationskurven identisch ist. Bei unterschiedlicher Amplifikationseffizienz variiert der bei der Normalisierung gebildete Quotient mit zunehmender Amplifikatmenge immer stärker und gibt das ursprüngliche Verhältnis beider Gene in einer Probe immer weniger genau an. Um dieses Problem zu beseitigen, werden Standardkurven (Verdünnungsreihen) für das Zielgen und die endogene Kontrolle erstellt und daraus die jeweiligen Steigungen, d.h. die Amplifikationseffizienz berechnet. Diese wird in der späteren Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt. Dividiert man

nun den Zielsequenzwert durch die Werte der endogenen Referenz, so erhält man die normalisierten Zahlen als einheitslose Zahl.

Da keine absolute Quantifizierung, sondern nur ein relativer Vergleich der Proben untereinander durchgeführt werden soll, benötigt man keine genaue Startkopienzahl bei der Standardreihe. Wenn die Proben mehrerer Läufe verglichen werden, muss jedoch die gleiche cDNA-Stammlösung für alle Läufe eingesetzt werden, um vergleichbare Daten zu erhalten.

2.4.5 Durchführung der *TaqMan* RT-PCR

Die quantitative RT-PCR wird für die Genexpressionsmessung von Adiponectin, Leptin, Resistin und Interleukin-6 durchgeführt. Das erfolgt mit dem „*TaqMan*[®] Universal PCR Master Mix“ von PE Biosystem. Als endogene Kontrolle dient die GAPDH (Glycerolaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase), die den Herstellerangaben entsprechend verwendet wird.

Die PCR erfolgt in 25 µl-Ansätzen. Pro *TaqMan*-Lauf werden in einer 96-Well Platte die Proben vierfach und die Standardreihe jeweils dreifach bestimmt. Die Negativkontrolle erfolgt mit Wasser anstatt cDNA. Als Standardreihe dient eine Verdünnungsreihe einer Standard-cDNA aus einem Fettgewebepool von 10 Probanden.

Die *TaqMan* RT-PCR wird als 2-Schritt-PCR über 40 Zyklen mit einem für alle hier untersuchten Gene gleichen Temperaturprofil durchgeführt:

	2 min	50° C	UNG Verdau
	10 min	95° C	DNA-Polymerase Aktivierung, initiale Denaturierung, Inaktivierung der UNG
45 Zyklen:	15 sec	95° C	Denaturierung
	1 min	60° C	Primer Annealing und Amplifikation

Das *TaqMan*-System von PE Biosystem (Weiterstadt, Deutschland) besteht aus:

- GenAmp[®] 5700 Sequence Detection System mit SDS Softwar Version 1.3
- MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plates (N8010560) und Caps (N8010935)
- *TaqMan* Universal PCR Master Mix (4310884E)
- Human-GAPDH-Kit (4310884E, ABI Applied Biosystem), und Interleukin-6 (Catalog Number Hs00174131_m1); Sequenzen von Primer und Sonden werden vom Hersteller nicht mitgeteilt

Die nachfolgenden Primer wurden von der Fa. Life Technologies bezogen, die Sonden von der Fa. BioTez (Berlin-Buch) sind am 5'-Ende mit FAM (6-Carboxy-Fluorescein, Emission bei 518 nm) und am 3'-Ende mit TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, Emission bei 582 nm) markiert. Angegeben sind die Endkonzentrationen für Primer und Sonden sowie die eingesetzten cDNA-Mengen (10 ng cDNA für Interleukin-6). Die optimale Konzentration von Primern und Sonden wurde im Rahmen früherer Etablierung ermittelt.

Adiponectin (20 ng cDNA Ausgangsmenge pro Probe)

Vorwärtsprimer:	5' GCT CTG TGC TCC TGC ATC TG 3'	300 nM
Rückwärtsprimer:	5' AGG TGG GCG ACC AAG TCT GGC TC 3'	900 nM
Sonde:	5' ACG CTC TCC TTC CCC ATA CA 3'	125 nM

Leptin (10 ng cDNA Ausgangsmenge pro Probe)

Vorwärtsprimer:	5' ACC AGG ATC AAT GAC ATT TCA CAC 3'	50 nM
Rückwärtsprimer:	5' CCA GGA ATG AAG TCC AAA CCG 3'	300 nM
Sonde:	5' CGC AGT CAG TCT CCT CCA AAC AGA AAG TCA 3'	50 nM

Resistin (50 ng cDNA Ausgangsmenge pro Probe)

Vorwärtsprimer:	5' GGT CGC CGG CTC CCT A 3'	300 nM
Rückwärtsprimer:	5' GGA GGT GAC GCT CTG GCA 3'	300 nM
Sonde:	5' TTT AGG GCA ATA AGC AGC ATT GGC CTG 3'	200 nM

2.5 Direkter Sandwich ELISA

2.5.1 Prinzip des ELISA

Enzym-linked Immunsorbent-Assays (ELISA) sind Tests, bei denen das zu messende Molekül durch einen spezifischen Antikörper gebunden wird (82). Der Antikörper ist an ein Enzym gekoppelt, das in einer entsprechenden Lösung zu einer Farbentwicklung durch Abbau seines Substrates führt. Beim direkten Sandwich ELISA wird im ersten Reaktionsschritt das zu messende Protein von einem im Reaktionsgefäß immobilisierten, proteinspezifischen Antikörper gebunden. Nach der Inkubationsphase werden die Reaktionsgefäße mit einer Pufferlösung gewaschen, die eine unspezifische Bindung der Proteine an die Gefäßwand verhindert. Die entstandenen Antikörper-Antigen-Komplexe haften fest an der Oberfläche. Im zweiten Reaktionsschritt bindet ein zweiter proteinspezifischer monoklonaler Antikörper, der an einen Enzymkomplex gekoppelt ist, an das im ersten Reaktionsschritt gebundene Protein. Diese zweite Antigen-Antikörper-Bindung vervollständigt das „Sandwich“. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung zugegeben, die vom Enzymkomplex umgesetzt wird. Dadurch entsteht eine Färbung, deren Intensität proportional zur im ersten Reaktionsschritt gebundenen Proteinmenge steht.

Durch eine interne Kontrolle (arbeitsgruppeneigener Serumpool von zehn Probanden) wird in jedem Lauf die Qualität der Messung kontrolliert. Über eine Negativkontrolle mit dem jeweiligen Lösungspuffer, aber ohne Probenmaterial, kann eine Kontamination der Mikrotiterplatte überprüft werden. Mit der Proteinstandardlösung (im Kit vorhanden) wird nach Herstellerangaben eine Verdünnungsreihe (Standardreihe) hergestellt.

2.5.2 Messung und Berechnung

Nach 30 Minuten wird die Farbentwicklung gestoppt und die Farbintensität mit Hilfe eines Spectrophotometers (ELISA-Reader) bei 450 nm gemessen. Eine zusätzliche Messung mit 570 nm als Referenzwellenlänge gleicht die optische Ungenauigkeit der Platte aus. Die Bestimmung der Konzentration des gesuchten Moleküls geschieht durch Verwendung der Absorptionswerte der Standardreihe. Die korrigierten Absorptionswerte (Mittelwerte nach automatischer Wellenlängenkorrektur) der Doppelbestimmung von Leerwert, Standards, Kontrolle und Proben werden automatisch von der Software ermittelt. Der Mittelwert des Leerwerts wird von den Mittelwerten der Standards, der

Kontrollen und Proben subtrahiert. Die Standardkurve wird berechnet, indem die durchschnittliche Absorption (y) der Referenzstandards gegen die entsprechende Konzentration (x) aufgetragen wird und eine Regressionsgerade aus den Werten konstruiert wird ($y = m x + b$). Die Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben und in der Kontrolle erfolgt über die Formel der Regressionsgeraden. Anschließend werden die Werte mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.5.3 Durchführung des ELISA

Die Messung der Proteinkonzentration von Adiponectin, Leptin, Resistin und Interleukin-6 erfolgte mit Hilfe direkter Sandwich ELISA der Quantikine[®]-Serie von R&D Systems nach Herstellerangaben (Human Adiponectin/Acrp30 Immunoassay DRP300, Human Leptin Immunoassay DLP00, Human Interleukin-6 Immunoassay D6050, Human Resistin Immunoassay DRSN00).

1. Die aufgetauten Proben mit Probenpuffer verdünnen (Proben für die Interleukin-6-Bestimmung bleiben unverdünnt)
2. Waschpuffer ansetzen, mit 20 ml Pufferkonzentrat 1:25 und 480 ml destilliertem Wasser
3. Die vorhandene Standardlösung mit dem Probenpuffer verdünnen
 - Leptin: Standard mit 1 ml destilliertem Wasser lösen (Ausgangskonzentration 10000 pg/ml) und mit dem Probenpuffer RD5P verdünnen
 - Adiponectin: Standard in 2 ml Probenpuffer RD6-39 lösen (Ausgangskonzentration 250 ng/ml) und demselbigen verdünnen
 - Resistin: Standard mit 1 ml destilliertem Wasser lösen (Ausgangskonzentration 100 ng/ml) und mit dem Probenpuffer RD5K verdünnen
 - Interleukin-6: Standard mit 5 ml Probenpuffer RD6F lösen (Ausgangskonzentration 300 pg/ml) und mit demselbigen verdünnen
4. Standardreihe entsprechend dem Muster in Abbildung 5 pipettieren

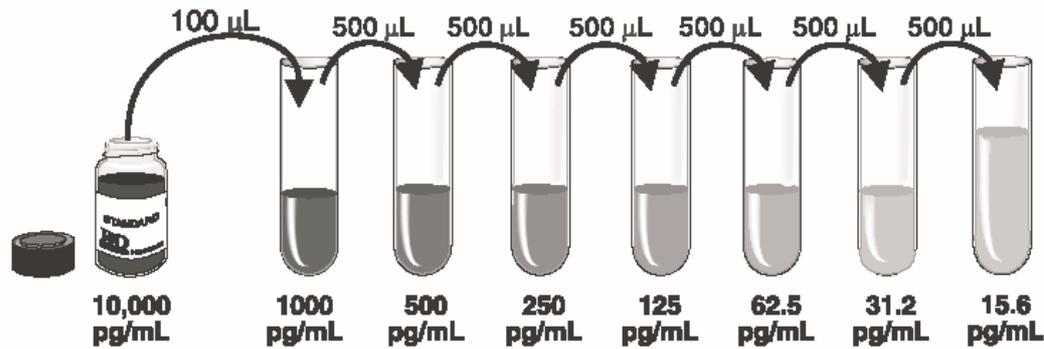


Abbildung 5: Erstellen einer Verdünnungsreihe für die Verwendung im ELISA am Bsp. Leptin (Quelle: www.rndsistemas.com).

5. Jeweils Doppelbestimmung von Proben, Standards, Kontrolle und Probenpuffer ansetzen:
 - Leptin: pro Reaktionsgefäß 100 µl Probenpuffer RD1-19 plus 100 µl Standards, Kontrolle und Proben
 - Adiponectin: pro Reaktionsgefäß 100 µl Probenpuffer RD1W plus 50 µl Standards, Kontrolle und Proben
 - Resistin: pro Reaktionsgefäß 100 µl Probenpuffer RD1-19 plus 100 µl Standards, Kontrolle und Proben
 - Interleukin-6: pro Reaktionsgefäß 100 µl Probenpuffer RD1A plus 100 µl Standards, Kontrolle und Proben
6. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur dreimal mit Waschpuffer waschen und Zugabe des spezifischen Konjugats (zweiter Antikörper), weitere Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur
7. Erneutes dreimaliges Waschen und Hinzufügen der Substratlösung, nach 30 min Beenden der lichtgeschützten Enzymreaktion durch die Stopplösung

Die Farbstoffentwicklung wurde mit dem ELISA-Reader Dynatech MR 5000 gemessen; die Berechnungen erfolgten mit der Software Revelation Version 4.21 (Dynex Technologies Germany).

2.6 Statistik

Die Ergebnisse der Genexpressions- und ELISA-Messungen wurden mit EXCEL 2002 (Microsoft) berechnet. Die Datenanalyse erfolgte mit SPSS 13.0 (SPSS Inc.), die Erstellung der Abbildungen 6 bis 9 mit GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc.). Die Normalverteilung der Ergebnisse wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Alle Daten waren normal verteilt und werden daher als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Die Effekte der Behandlung mit Atenolol oder Valsartan wurden mittels paarweisem T-Test analysiert. Ein Vergleich von Atenolol und Valsartan wurde nicht durchgeführt, weil dann aufgrund des Studiendesigns verbundene und unverbundene Stichproben miteinander analysiert worden wären. Zudem war die Ausgangsfrage nicht der Substanzvergleich, sondern der Versuch, bekannte metabolische Wirkungen von β -Blockade und RAAS-Blockade auf Ebene der Adipokine erklären zu können. Beziehungen zwischen Variablen oder Änderungen von Variablen im Studienverlauf wurden mittels Pearsons Korrelationskoeffizient berechnet. Die Powerkalkulation wurde mit Hilfe des „Power Calculators“ (<http://calculators.stat.ucla.edu/powercalc/>) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Charakteristika

Die Zusammensetzung der Substudie unterscheidet sich unwesentlich von der Hauptstudie, auffällig ist der Altersunterschied zwischen den Behandlungsgruppen, der in der Hauptstudie nicht vorlag (75). Die Ergebnisse der antihypertensiven Therapie sind in Tabelle 1 gezeigt. 10 Patienten erhielten Atenolol, 8 Patienten Valsartan. Den Zielblutdruck erreichten 6 Patienten in der Atenolol- und 7 Patienten in der Valsartan-Gruppe nicht, sodass zusätzlich Hydrochlorothiazid eingenommen wurde (Hauptstudie: 50% in der Atenolol- und 70% in der Valsartan-Gruppe). In der Atenolol-Gruppe fanden sich eine signifikante Reduktion des HDL-Cholesterins sowie signifikante Anstiege der Triglyzeride, des hoch-sensitiven CRP, des Insulins und des HOMA-Index.

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Studienpopulation

	Atenolol		Valsartan	
	vor Therapie	nach Therapie	vor Therapie	nach Therapie
Anzahl (Männer/Frauen)	10 (4/6)	--	8 (5/3)	--
Alter [Jahre]	52 ± 3	--	61 ± 2	--
Body Mass Index [kg/m²]	36,3 ± 0,6	36,2 ± 0,7	33,3 ± 0,7	33,0 ± 1,0
Taillenumfang [cm]	112 ± 2	113 ± 2	110 ± 7	109 ± 6
Blutdruck syst/diast [mm Hg]	155 ± 5 / 94 ± 2	136 ± 4 * / 81 ± 3 *	160 ± 3 / 92 ± 5	142 ± 4 * / 86 ± 3
Herzfrequenz [min⁻¹]	80 ± 3	69 ± 2 *	70 ± 5	70 ± 4
Gesamtcholesterin [mmol/l]	5,7 ± 0,3	5,8 ± 0,3	5,5 ± 0,3	5,6 ± 0,4
HDL-Cholesterin [mmol/l]	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1 *	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
LDL-Cholesterin [mmol/l]	3,4 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,4 ± 0,4
Triglyzeride [mmol/l]	2,4 ± 0,5	4,8 ± 0,9 *	2,3 ± 0,3	1,8 ± 0,2
Glucose [mmol/l]	4,4 ± 0,2	4,5 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,2 ± 0,2
Insulin [µU/l]	9,8 ± 1,9	12,2 ± 1,8 *	9,6 ± 1,9	10,1 ± 2,4
HOMA Index	1,9 ± 0,4	2,5 ± 0,5 *	2,0 ± 0,5	1,9 ± 0,5
hsCRP [mg/l]	2,8 ± 0,4	3,9 ± 0,6 *	3,3 ± 0,8	3,9 ± 1,0

Alle Daten sind Mittelwerte ± Standardfehler. Innerhalb jeder Therapiegruppe wurde der Einfluss der antihypertensiven Behandlung mittels gepaartem t-Test überprüft * p < 0.05 vs. "vor Therapie".

3.2 Adipokine

3.2.1 Testcharakteristika

Zur Bestimmung der Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten (coefficient of variation, CV) wurden auf jeder RT-PCR- und ELISA-Platte die gleichen Kontrollen aus einem Fettgewebe-cDNA-Pool von 10 Probanden bzw. aus einem Serum-Pool von 10 Probanden gemessen. Tabelle 2 zeigt die entsprechenden Ergebnisse. In der RT-PCR wurden mehrere Platten pro Gen gemessen, im ELISA jeweils nur eine Platte, sodass hier die Interassay-CV entfallen. Alle Messungen erfolgten aus technischer Sicht einwandfrei, was auch für die Qualität der Verdünnungsreihen zutrifft. Es wurden nur solche Messungen verwendet, für die die Berechnung der Streuung der Standardkurve (lineare Regression) ein $R^2 > 0.990$ ergab.

Tabelle 2: Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten

	Intraassay-CV [%]	Interassay-CV [%]
Leptin RT-PCR	0,6	1,0
Leptin ELISA	1,3	--
Adiponectin RT-PCR	0,5	1,5
Adiponectin ELISA	2,0	--
Resistin RT-PCR	0,5	3,1
Resistin ELISA	6,1	--
IL-6 RT-PCR	0,4	0,8
IL-6 ELISA	2,5	--
GAPDH RT-PCR	0,9	1,2

3.2.2 Gruppenvergleiche für Valsartan und Atenolol

Die 13-wöchige Therapie mit Atenolol steigerte die Genexpression von Leptin im subkutanen Fettgewebe (Abbildung 6), die Expression von Interleukin-6, Adiponectin und Resistin wurden nicht beeinflusst (Abbildungen 7-9). Atenolol verringerte das zirkulierenden Adiponectin (Abbildung 7), beeinflusste aber Interleukin-6, Resistin und Leptin nicht (Abbildung 6,8,9). Valsartan beeinflusste weder Genexpression noch Serumspiegel der untersuchten Adipokine in signifikanter Weise (Abbildung 6-9).

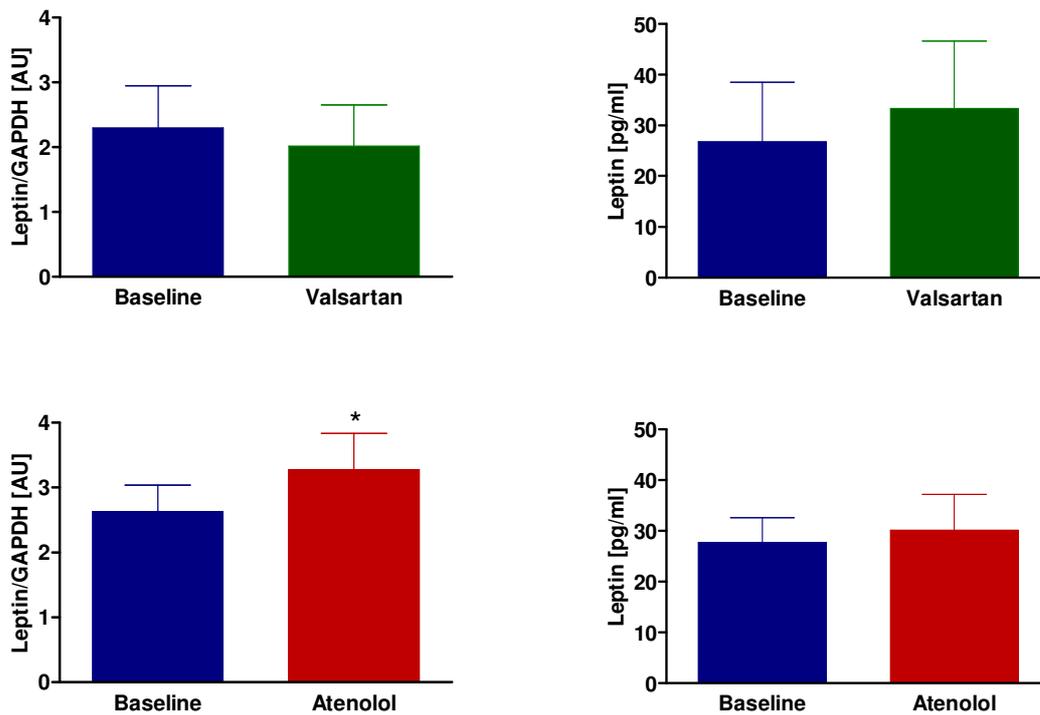


Abbildung 6: Leptin-Genexpression (linke Spalte) und Leptin-Serumkonzentrationen (rechte Spalte) unter Atenolol- oder Valsartantherapie. Die Expression von Leptin wurde durch die Expression des internen Kontrollgens GAPDH normalisiert und in künstlichen Einheiten [AU] angegeben. Alle Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Gruppenvergleiche jeweils mittels gepaartem t-Test. * $p < 0,05$.

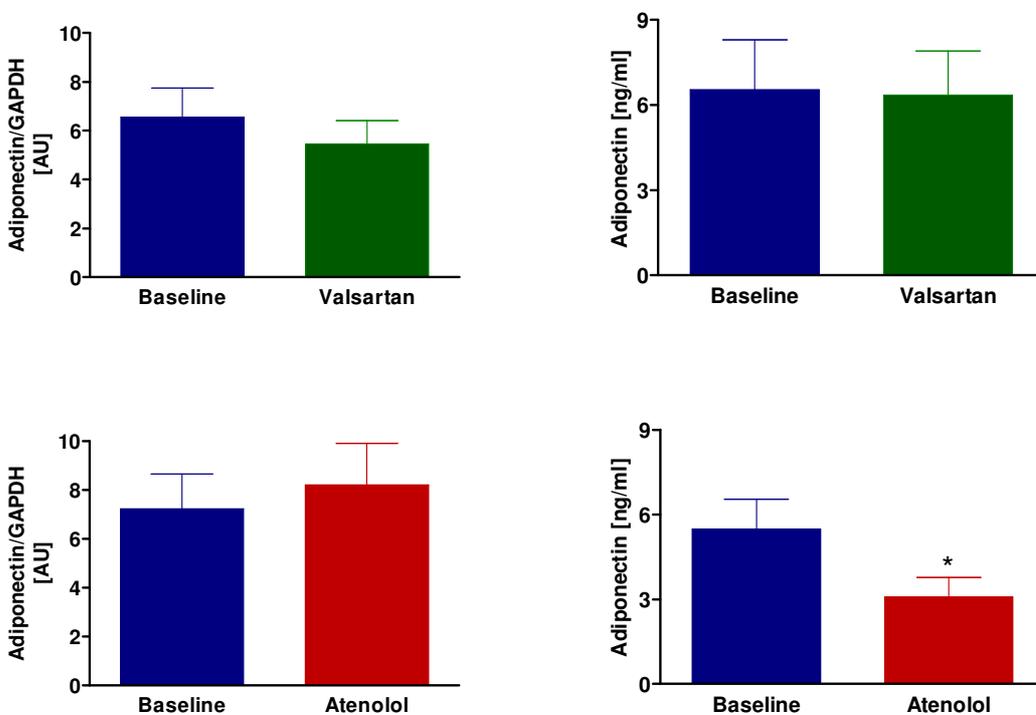


Abbildung 7: Adiponectin-Genexpression (linke Spalte) und Adiponectin-Serumkonzentrationen (rechte Spalte) unter Atenolol- oder Valsartantherapie. Die Expression von Adiponectin wurde durch die Expression des internen Kontrollgens GAPDH normalisiert und in künstlichen Einheiten [AU] angegeben. Alle Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Gruppenvergleiche mittels gepaartem t-Test. * $p < 0,05$.

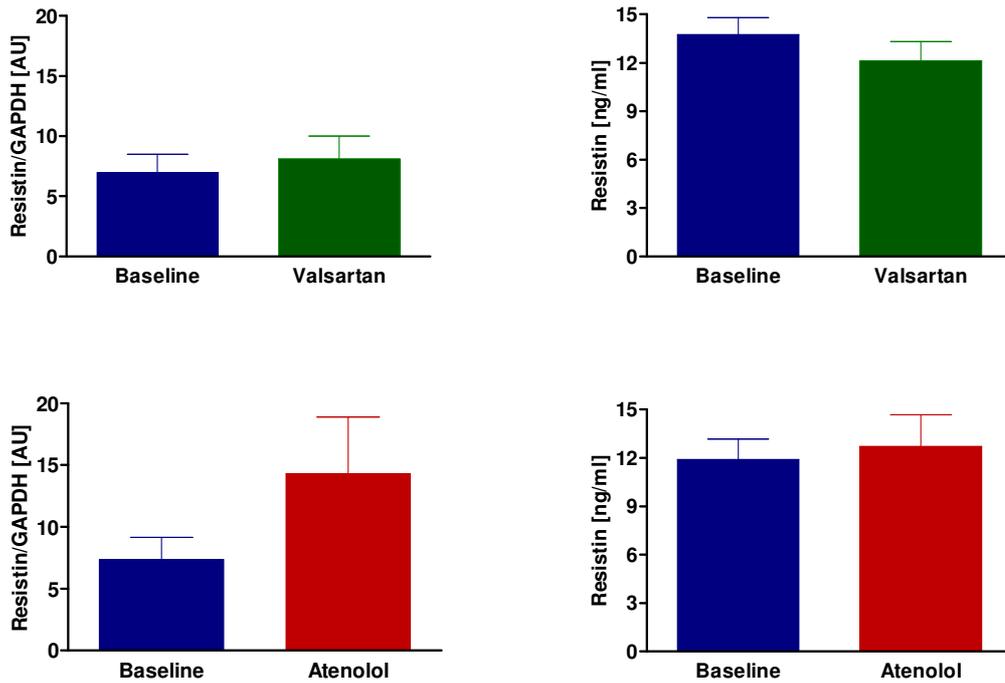


Abbildung 8: Resistin-Genexpression (linke Spalte) und Resistin-Serumkonzentrationen (rechte Spalte) unter Atenolol- oder Valsartantherapie. Die Expression von Resistin wurde durch die Expression des internen Kontrollgens GAPDH normalisiert und in künstlichen Einheiten [AU] angegeben. Alle Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Gruppenvergleiche jeweils mittels gepaartem t-Test.

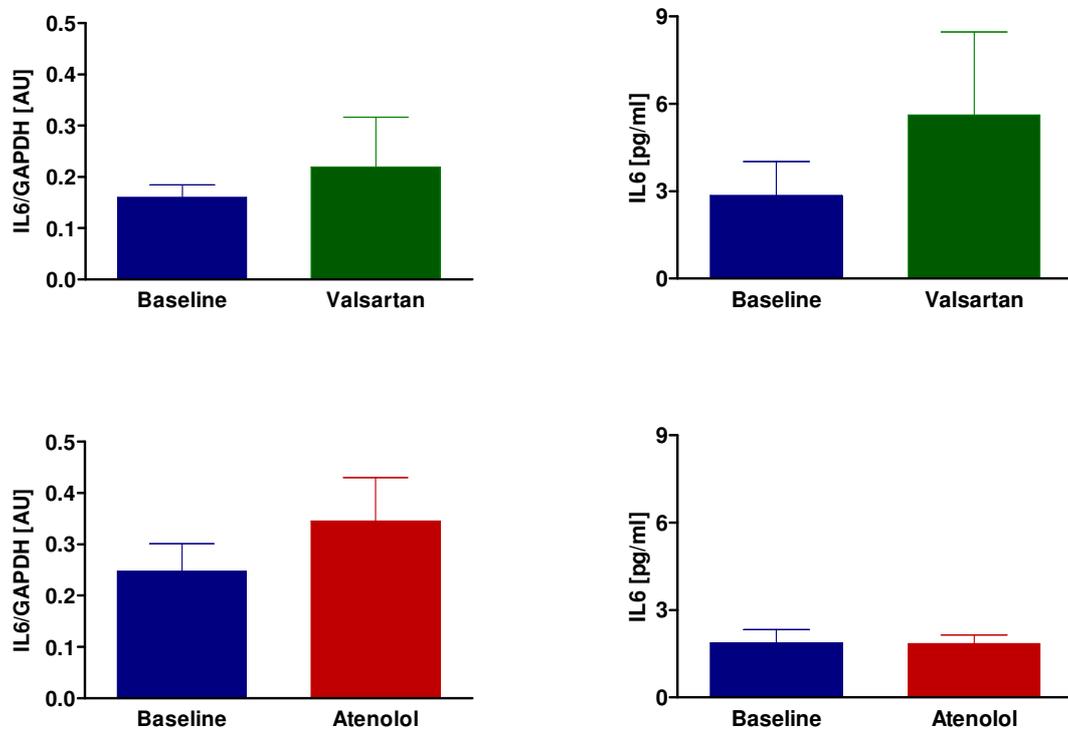


Abbildung 9: IL-6-Genexpression (linke Spalte) und IL-6-Serumkonzentrationen (rechte Spalte) unter Atenolol- oder Valsartantherapie. Die Expression von IL-6 wurde durch die Expression des internen Kontrollgens GAPDH normalisiert und in künstlichen Einheiten [AU] angegeben. Alle Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Gruppenvergleiche jeweils mittels gepaartem t-Test.

3.2.3 Korrelationsanalysen

Neben den Gruppenvergleichen zum Einfluss von Atenolol oder Valsartan wurden auch Korrelationsanalysen durchgeführt. Für die Korrelationen zwischen Genexpression und Serumspiegeln ergaben sich die in Tabelle 3 gezeigten nicht-signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 3: Zusammenhang zwischen Genexpression im Fettgewebe und Serumkonzentrationen der untersuchten Adipokine (Daten vor Therapie)

	Korrelationskoeffizient	p-Wert
Leptin	r = 0,52	p = 0,06
Adiponectin	r = 0,02	p = 0,94
Resistin	r = -0,39	p = 0,21
IL-6	r = -0,10	p = 0,72

Lineare Korrelation nach Pearson, r : Korrelationskoeffizient, p : Signifikanzwert.

Die Veränderungen von Stoffwechselfparametern unter Atenolol-Therapie (Tabelle 1) könnten durch veränderte Adipokinmuster zu erklären sein. Wie in Tabelle 4 gezeigt, fanden sich bei Berechnung der Korrelationskoeffizienten jedoch keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Veränderungen von Insulin, HDL, Triglyzeriden und hoch-sensitivem CRP mit den Änderungen von Adiponectin, Leptin, Resistin und Interleukin-6.

Tabelle 4: Zusammenhang zwischen den Änderungen der Adipokinserumkonzentrationen und den Änderungen von Stoffwechselfparametern unter Atenolol-Therapie

	Δ Adiponectin	Δ Leptin	Δ Resistin	Δ IL-6
Δ Insulin	r = 0,19; p = 0,61	r = -0,20; p = 0,59	r = 0,57; p = 0,08	r = -0,26; p = 0,51
Δ HDL	r = -0,27; p = 0,45	r = -0,01; p = 0,86	r = 0,17; p = 0,63	r = 0,23; p = 0,56
Δ Triglyzeride	r = -0,16; p = 0,67	r = 0,16; p = 0,65	r = -0,21; p = 0,55	r = -0,19; p = 0,63
Δ hsCRP	r = -0,53; p = 0,12	r = 0,09; p = 0,81	r = 0,20; p = 0,58	r = 0,65; p = 0,06

Lineare Korrelation nach Pearson, r : Korrelationskoeffizient, p : Signifikanzwert.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse

In dieser Studie wurde der Zusammenhang von Veränderungen von Stoffwechselfparametern unter Therapie mit Atenolol und Valsartan und Veränderungen der Genexpression und/oder der Serumspiegel sogenannter Adipokine untersucht. „Adipokine“ sind Moleküle, die im Fettgewebe gebildet werden und die neben lokalen auch systemische Wirkungen entfalten, indem sie ins Blut sezerniert werden (83). Adipokine sind bei Adipositas oftmals fehlreguliert und tragen zu adipositas-assoziierten Begleiterkrankungen bei (21). Leptin, Adiponectin, Resistin und Interleukin-6 wurden als Vertreter der Adipokine ausgewählt, weil sie zu den detailliert untersuchten Adipokinen mit zumindest im Tiermodell gesicherten Auswirkungen auf Insulinsensitivität, Fettstoffwechsel und Blutdruck gehören. Die Regulation dieser Adipokine durch β -adrenerge bzw. AT1-Rezeptor-Stimulation ist in tierexperimentellen und Zellkulturstudien beschrieben worden, sodass Veränderungen von Leptin (37;84), Adiponectin (50;52), Resistin (60) und Interleukin-6 (73;74) erwartet werden konnten.

Daher war es überraschend, dass neben den nur geringen Veränderungen von Stoffwechselfparametern (s.u.) ebenso nur wenige Veränderungen der Adipokine festgestellt wurden. Unter Behandlung mit Atenolol stieg die Expression des Leptin-Gens im abdominal-subkutanen Fettgewebe leicht an und die Adiponectin-Serumspiegel nahmen deutlich ab. Allerdings wurden Adiponectin im Fettgewebe, Leptin im Serum sowie Gen- und Serumkonzentration von Resistin und Interleukin-6 nicht durch Atenolol beeinflusst. Valsartan veränderte keinen der gemessenen Adipokin-Parameter.

In dieser Studie wurden 18 adipöse Hypertoniker randomisiert für 13 Wochen mit Atenolol (100 mg) oder Valsartan (160 mg) behandelt. Die Patienten erfüllten mit einem mittleren BMI $>33 \text{ kg/m}^2$ und einem mittleren Taillenumfang $>110 \text{ cm}$ die WHO-Kriterien für eine abdominale Adipositas. Die Patienten, die mit Atenolol behandelt wurden, zeigten die erwarteten signifikanten Anstiege des Insulins, der Triglyzeride und des hoch-sensitiven CRP sowie eine signifikante Verringerung des HDL-Cholesterins (11;85). Alle genannten Veränderungen waren gering ausgeprägt. Valsartan senkte den systolischen Blutdruck, aber verursachte keine weiteren signifikanten Veränderungen.

Dies war überraschend, denn eine Verbesserung der Insulinsensitivität und eine Abnahme des hoch-sensitiven CRP konnten erwartet werden (12;20;86).

Auch in der Hauptstudie waren die metabolischen Auswirkungen der Therapie mit Atenolol und Valsartan nur gering ausgeprägt. Im Gruppenvergleich zeigten sich keinerlei Unterschiede (75). Über den Zeitverlauf, berechnet als Fläche unter der Kurve, zeigte sich aber eine zunehmende Differenz im HOMA-Index zwischen beiden Gruppen, die am Ende der 13 Wochen signifikant war, da der HOMA-Index in der Atenolol-Gruppe leicht zunahm, in der Valsartan-Gruppe dagegen kontinuierlich über den Zeitverlauf abnahm. Betroffen von der Verschlechterung des HOMA-Index waren vor allem Patienten mit Ausgangswerten $<2,0$, also erhaltener Insulinsensitivität. Diese subtile Veränderung im Zeitverlauf war für die Lipidparameter und das hoch-sensitive CRP nicht zu finden (75). Damit zeigte diese Studie weder die negativen Auswirkungen der β -Blocker-Therapie noch die Effekte der Therapie mit dem AT1-Blocker auf den Lipidstoffwechsel und die Insulinsensitivität im erwarteten Ausmaß.

In randomisierten Studien erkrankten mit β_1 -selektiven Adrenorezeptorblockern behandelte Patienten signifikant häufiger an Typ 2 Diabetes als Patienten, die mit Blockern des Renin-Angiotensin Systems oder Calcium-Antagonisten behandelt wurden (11;12;85). Mögliche Pathomechanismen hierfür sind eine Verschlechterung der Insulinsensitivität unter β -Blockade, wie sie in unserer Studie in subtilem Ausmaß sichtbar wurde, eine Gewichtszunahme unter β -Blockade (10), die aufgrund der kurzen Dauer unserer Studie nicht zu erwarten war und – als Hypothese dieser Studie – eine Veränderung des Adipokinmusters.

Zwischen Leptin, dem sympathischen Nervensystem und dem RAAS bestehen komplexe Interaktionen. Einerseits stimuliert Leptin die Sympathikusaktivität (17,18), andererseits führt ein negativer feed-back Mechanismus zur β -adrenerg vermittelten Hemmung der Leptinsekretion aus Adipocyten (37;86;87). Angiotensin II stimuliert die Leptinbildung *in vitro* in Adipocyten der Maus und des Menschen (38;39;84). *In vivo* jedoch führt Angiotensin II zur Aktivierung des Sympathikus bei Ratten und damit im Gesamteffekt zu einer Verringerung der zirkulierenden Leptinspiegel (40). Entsprechend wurde in der vorliegenden Studie ein Anstieg des Leptins unter Atenolol- und eine Senkung unter Valsartan-Therapie erwartet. In Bezug auf Atenolol hat sich unsere Hypothese bestätigt, allerdings nur für die Genexpression von Leptin. Diese stieg unter

Atenolol an, dagegen blieben die Serumspiegel unverändert. Valsartan hatte keinen Einfluss auf Leptin in der vorliegenden Studie.

Der fehlende Einfluss von Valsartan ist bei den deutlichen Effekten, die *in vitro* mit Angiotensin II-Stimulation erzielt wurden, überraschend (38;39;84). Wie aber schon bei Ratten beschrieben, sind die *in vitro* und *in vivo* Situationen praktisch nicht vergleichbar (40). *In vivo* spielen sehr viele Regulationsmechanismen zusammen, und es ist vorstellbar, dass der durch Valsartan blockierte Angiotensin II-Effekt durch vielfältige Gegenregulationsmechanismen aufgehoben wurde. Außerdem ist nicht klar, wie wichtig die hormonelle Regulation von Leptin beim Menschen tatsächlich ist. Ein bedeutender Faktor für die Leptinbildung ist die Fettzellgröße (88), die im Verlauf der Behandlung mit Valsartan vermutlich nicht beeinflusst wurde. Dies wurde nicht gemessen, aber da die Patienten weder eine Gewichtsabnahme noch eine Reduktion des Taillenumfangs zeigten, ist es sehr unwahrscheinlich, dass diese wichtige Einflussgröße auf die Leptinbildung der Adipocyten verändert wurde. Weiterhin ist es möglich, dass die Blockade lokaler AT1-Rezeptoren humaner Adipocyten durch systemische Gabe von Sartanen nur von untergeordneter regulatorischer Wirkung ist: Direkte Gabe von Angiotensin II durch Mikrodialyse ins Fettgewebe steigerte die Lipolyse (89). AT1-Rezeptor-Blockade dagegen hatte keine Auswirkung auf die Lipolyse (77;90). Eine direkte lokale Applikation von Angiotensin II beeinflusst also den Stoffwechsel, wogegen Blockade der AT1-Rezeptoren nicht im gegenteiligen Effekt resultierte. Diese Befunde bestätigen die vorliegenden Ergebnisse zum Einfluss von Valsartan auf Leptin.

Die abweichenden Effekte von Atenolol auf Genexpression und Serumkonzentrationen spiegeln die komplexen Vorgänge wider, die bei der Bildung eines Proteins beteiligt sind. Nach der Synthese der mRNA folgt die Translation, dann die Verpackung in Vesikel sezernierter Proteine, die mit posttranslationalen Modifizierungen verbunden ist, und zuletzt die Sekretion, die konstitutiv und auf einen Reiz hin erfolgen kann. Diese Prozesse laufen zum Teil unabhängig voneinander ab und jeder einzelne Schritt kann reguliert werden. Differentielle Regulationsprozesse zwischen Mensch und Ratten wurden bei *in vitro* Studien für Leptin beschrieben. β -adrenerge Stimulation von Adipocyten der Ratte hemmt die Proteinsynthese, β -adrenerge Stimulation von Adipocyten des Menschen hemmt die Sekretion. Im Ergebnis findet sich jeweils eine verringerte Leptinkonzentration im Kulturmedium bei unveränderter Genexpression (86). Die vorliegenden Befunde zeigen, dass die Untersuchung der Regulation der

Genexpression nur ein Baustein bei der Betrachtung von Leptin und anderen Adipokinen sein kann.

Diese Aussage wird durch einen weiteren Befund erhärtet. Theoretisch sollte eine Korrelation zwischen Genexpression und Serumspiegeln von Adipokinen existieren. Wenn die Ausgangswerte der untersuchten Patienten unter dieser Fragestellung analysiert werden, zeigt sich jedoch, dass eine solche Korrelation für kein Adipokin zu finden ist. Auch die Änderungen der Genexpression und zirkulierenden Spiegel von Leptin und Adiponectin unter Atenolol-Therapie korrelieren nicht miteinander. Damit ist klar, dass die Analyse der Genexpression nicht geeignet ist, Rückschlüsse auf die tatsächlich verfügbaren Mengen von Adipokinen zu ziehen. Der Einfluss der pharmakologischen Therapie muss also getrennt für Genexpression und Serumkonzentrationen betrachtet und diskutiert werden.

Die Expression von Adiponectin wird *in vitro* durch Katecholamine gehemmt. Diese Wirkung in klonalen Adipocyten der Maus (3T3-L1 Zellen) wird durch β -adrenerge Rezeptoren, stimulierendes G-Protein, Adenlyatcyclase und die Proteinkinase A vermittelt (50). Damit könnte die verringerte Expression von Adiponectin bei Adipositas, Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes des Menschen zumindest in Teilen durch die gesteigerte Sympathikusaktivität erklärt werden (43;44;91). Umgekehrt wäre die Insulinresistenz unter gesteigerter Sympathikusaktivität u.a. auch durch eine Verminderung der Adiponectinbildung zu erklären (92). Basierend auf den Zellkulturdaten sollte also eine β -adrenerge Blockade die Adiponectin-Genexpression im Fettgewebe fördern. Diese Wirkung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Stattdessen war nach Atenolol die Adiponectin-Genexpression unverändert, und die zirkulierenden Adiponectinspiegel waren erniedrigt.

Möglicherweise wird die Genexpression von Adiponectin in den klonalen Mausadipocyten anders reguliert als beim Menschen. Auch die Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen können zu diesem diskrepanten Befund geführt haben. Dennoch lässt sich sagen, dass die verringerten Adiponectin-Serumspiegel zunächst gut zur verschlechterten Insulinsensitivität der hier untersuchten Patienten passen (gezeigt durch gesteigerte Nüchtern-Insulinspiegel und den Anstieg des HOMA-Index). Die negative Assoziation von Serum-Adiponectin mit der Insulinsensitivität ist gut beschrieben (93). Die koordinierte Veränderung von

Adiponectin (Anstieg) und Insulinresistenz (Abnahme) wurde beim Menschen insbesondere bei Behandlung mit Thiazolidinedionen und bei Gewichtsreduktion beschrieben (49;63). Ob der Verlust von Adiponectin zur Insulinresistenz mit gesteigerten Insulinspiegeln führt oder ob das ansteigende Insulin sekundär zur Hemmung der Adiponectinbildung führt, ist derzeit beim Menschen ungelöst. Auffällig in der vorliegenden Arbeit war, dass es keine Korrelation zwischen der Genexpression und den Serumspiegeln von Adiponectin gab, obwohl solche Beziehungen in anderen Kollektiven gefunden wurden (44). Weiterhin fällt auf, dass die Veränderungen von Adiponectin und Insulin/HOMA-Index nicht miteinander korrelieren. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Therapie mit Atenolol zu einer Verschlechterung der Insulinsensitivität und einer Verringerung der Adiponectinspiegel führte. Ob hier ein kausaler Zusammenhang besteht, muss Thema weiterer Studien sein.

Unter RAAS-Blockade, auch bei Gabe von Valsartan, wurde in mehreren Studien ein Anstieg des Serum-Adiponectins beobachtet (94-96). Umgekehrt führt die Infusion von Angiotensin II bei Ratten zur Hypoadiponectinämie (97). Der entscheidende Wirkmechanismus scheint nach den neusten Erkenntnissen in einer Hemmung der AT1-Rezeptor-vermittelten Bildung von Sauerstoffradikalen im Fettgewebe zu liegen, da diese die Expression von Adiponectin hemmen (52). Bei den hier untersuchten Patienten ergaben sich unter Behandlung mit Valsartan keinerlei Veränderungen der Adiponectin-Genexpression und der Adiponectin-Serumspiegel. Die entscheidende Ursache scheint in der Auswahl des Patientenkollektivs zu liegen. In den genannten Studien (94-96) wurden entweder nur Diabetiker untersucht oder der Anstieg des Adiponectins war nur bei den diabetischen Subgruppen, nicht aber bei den nicht-diabetischen adipösen Patienten zu finden. Die hier untersuchten Patienten hatten normale Blutzuckerspiegel und zeigten keine Hinweise auf das Vorliegen eines Typ 2 Diabetes (was auch ein Ausschlusskriterium war). Damit scheint eine AT1-Rezeptorblockade nur bei stark hemmenden Stimuli auf die Adiponectinspiegel einen konzentrationsfördernden Effekt zu haben. Die insgesamt geringeren Veränderungen bei adipösen Patienten sprechen hier möglicherweise noch nicht an.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Komedikation mit Hydrochlorothiazid. Sieben der acht mit Valsartan behandelten Patienten erhielten zusätzlich Hydrochlorothiazid, da sie den Zielblutdruck im Studienverlauf mit 160 mg/d Valsartan nicht erreichten. Ridker et al. zeigten kürzlich in einer sechswöchigen Studie mit den von uns untersuchten

vergleichbaren Patienten, dass die (geringen) positiven Effekte von Valsartan als Monotherapie auf das hoch-sensitive CRP komplett aufgehoben wurden, wenn die Kombination Valsartan/Hydrochlorothiazid eingenommen wurde (98). Ein vergleichbarer Effekt kann auch in unserer Studie gewirkt haben, sodass die potentielle Wirkung von Valsartan durch Hydrochlorothiazid neutralisiert wurde. Es sei daran erinnert, dass die hier untersuchten Patienten an einer multizentrischen randomisierten Studie teilnahmen. Damit war es nicht möglich, Einfluss auf das Studiendesign zu nehmen.

Systemische Entzündung trägt zur Ausbildung einer Insulinresistenz bei und prädisponiert zur Entwicklung des Typ 2 Diabetes mellitus (99;100). Interleukin-6, Resistin und hoch-sensitives CRP sind inflammatorische Cytokine, deren Konzentration mit dem Körpergewicht ansteigt und die stellvertretend stehen für die vielfältigen Interaktionen zwischen Stoffwechselregulation und Inflammation. Resistin und Interleukin-6 wurden als Adipokine betrachtet, da sie auch im Fettgewebe gebildet werden und Daten zum Einfluss von β -adrenerger Stimulation bzw. AT1-Rezeptor-Aktivierung auf die Bildung dieser Moleküle in Adipocyten vorliegen (60;67;71-73). Es war überraschend, dass die Behandlung mit Atenolol oder Valsartan keinen Einfluss auf Resistin und Interleukin-6 hatte. In anderen Studien zeigte sich ein Einfluss der AT1-Blockade auf inflammatorischer Moleküle: so reduzierte Olmesartan in einer 12-wöchigen Studie hoch-sensitives CRP und Interleukin-6 signifikant (101). In dieser Studie waren die Probanden im Durchschnitt leichter und erhielten nur in wenigen Fällen Hydrochlorothiazid als Komedikation bei nicht ausreichender Blutdrucksenkung.

Resistin und Interleukin-6 werden von vielen Zelltypen gebildet. Insbesondere sind dies Entzündungszellen, die bei Adipositas auch vermehrt im Fettgewebe zu finden sind (102). In der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Expression von Resistin in isolierten humanen Adipocyten praktisch nicht nachweisbar ist (56). Dafür besteht eine enge Korrelation zwischen der Resistin-Expression und Makrophagenmarkern im subkutanen Fettgewebe der hier untersuchten Patienten als Ausdruck der Tatsache, dass Resistin vor allem von diesen Zellen gebildet wird (76). Dennoch ist die Expressionsstärke von Resistin im Fettgewebe deutlich niedriger als die aller anderen gemessenen Gene. Damit ist aber eine differentielle Regulation zwischen verschiedenen Organen und Körperregionen nicht ausgeschlossen. So stellt sich die Frage, ob es sinnvoll ist, solche Moleküle mit vielfältigen Bildungsorten überhaupt als „Adipokine“ zu bezeichnen.

4.2 Methodenkritik

Es war überraschend, dass in der vorliegenden Arbeit nicht die erwarteten Änderungen der Genexpression und Serumspiegel von Leptin, Adiponectin, Resistin und Interleukin-6 gefunden wurden. Berücksichtigt man die Messungen zur Qualität der Genexpressions- und ELISA-Messungen (s. 3.2.1), dann scheiden technische Mängel der Messmethoden aus. Die Variationskoeffizienten im ELISA und in der *TaqMan*-RT-PCR sind ausreichend klein, um mit den bestimmten Werten arbeiten zu können.

Die hier geprüften Hypothesen basieren weitgehend auf tier- und zellkulturexperimentellen Daten, da entsprechende Untersuchungen beim Menschen nicht durchgeführt oder nicht publiziert wurden. Die Übertragung von tierexperimentellen Daten auf den Menschen ist vielfach problematisch und insbesondere bei der Untersuchung von Fettgewebe/Adipocyten haben sich in der Vergangenheit deutliche Unterschiede gezeigt. Als Bsp. seien die unterschiedliche Regulation und Physiologie des adipocytären RAAS und die unterschiedliche Bildung und Bedeutung von Resistin genannt (103;104). Wie das Bsp. der Leptinregulation bei Ratten zeigte, ist der Vergleich von *in vitro* und *in vivo* Daten problematisch, und keinesfalls kann aus der *in vitro* Regulation eine definitive Aussage für die Regulation *in vivo* gemacht werden (40). Wenn aber Untersuchungen beim Menschen fehlen, ist der Rückgriff auf solche Daten nicht zu vermeiden. Die Art der Hypothesenbildung kann damit von erheblichem Einfluss auf die Studienergebnisse sein.

Bei der Interpretation der Daten ist auch die insgesamt geringe Gruppengröße zu erwähnen. Diese basiert auf der Tatsache, dass die eingeschlossenen Patienten Teilnehmer einer multizentrischen Studie waren. Aufgrund der Fettgewebebiopsien konnten nur die in Berlin teilnehmenden Patienten auch in die Substudie aufgenommen werden, sodass die Zahl der Teilnehmer limitiert war. Fragen nach der Gruppengröße lassen sich anhand der Powerkalkulation beantworten. Für verbundene Stichproben hätte bei der gemessenen Abnahme des Serumadiponectins unter Atenolol die Gruppengröße $n=13$ betragen müssen, um eine Power von 80% zu erreichen. Bei der vorhandenen Gruppengröße von $n=10$ betrug die statistische Power 68%. Für die Expression des Leptin-Gens ergibt sich eine notwendige Gruppengröße von $n=18$ bzw. eine erzielte Power von 60%.

Neben der kleinen Gruppengröße erschweren auch einige Probleme im Studiendesign die Interpretation der erzielten Ergebnisse. Die Dauer von 12 Wochen könnte zu kurz gewesen sein, um die erwarteten Stoffwechsel- und Adipokinveränderungen herbeizuführen. Allerdings treten Änderungen der Genexpression im Bereich von Stunden auf und auch hormonelle Änderungen können bei einem ausreichend starken Stimulus innerhalb von Stunden auftreten. Auch die Ergebnisse der zitierten Studie mit Olmesartan zeigen, dass bei zwölfwöchiger Therapie mit einem AT1-Rezeptorblocker deutliche antiinflammatorische Wirkungen erkennbar sind (101). Umgekehrt ist es möglich, dass eine zwölfwöchige Behandlung mit Rezeptorantagonisten gegenregulatorische Reaktionen hervorruft, die die mögliche Akutwirkung einer Substanz maskieren. Da aber eine der Fragestellungen in dieser Arbeit war, ob anhand von Änderungen des Cytokinmusters geeignete von ungeeigneten Medikamenten bei der Behandlung adipöser Hypertoniker unterschieden werden können, wäre eine Akutgabe von wenigen Tagen aus klinischer Sicht nicht sinnvoll gewesen.

Ein weiterer Aspekt ist die Auswahl der Dosierung von Atenolol und Valsartan. Die hier eingesetzten Dosierungen orientieren sich an den zur Hypertonie zugelassenen Dosierungen, da hier insbesondere für AT1-Rezeptorblocker keine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung besteht. Eine kürzlich publizierte Studie mit Irbesartan hat aber gezeigt, dass bei anderen Indikationen (hier Albuminurie) höhere Dosierungen durchaus auch stärkere Effekte hervorrufen (105). Ähnliches könnte auch für die metabolischen und Adipokineffekte von AT1-Rezeptorblockern zutreffen (77;90). Eine weitere Variable, die die Interpretation der klinischen Daten erschwert, ist die Komedikation mit Hydrochlorothiazid, das von 60% der Atenolol- und 88% der Valsartangruppe zusätzlich eingenommen wurde. Die Studien von Ridker und Fliser zeigen deutlich, dass antiinflammatorische Effekte durch Valsartan oder Olmesartan erzielt werden, die durch Hydrochlorothiazid aufgehoben werden können (98;101).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untersuchung von Patienten im Rahmen einer Substudie nicht geeignet ist, solche spezifischen Fragen, wie sie hier bearbeitet wurden, zu beantworten. Die Vorgaben des Studiendesigns sind in der Regel den besonderen Anforderungen einer Studie zur Regulation bestimmter Moleküle nicht angepasst. Variable wie Komedikation, Gruppengröße, Geschlechterverhältnis sind durch die Hauptstudie vorgegeben und können nicht aktiv dem Bedarf der Substudie angepasst werden.

5 Zusammenfassung

Adipositas prädisponiert zu Typ 2 Diabetes mellitus, Hypertonie und Fettstoffwechselstörungen. Die Akkumulation von Fettgewebe spielt eine besondere Rolle in der Pathophysiologie der adipositas-assoziierten Hypertonie und ist assoziiert mit Veränderungen der renalen Natriumausscheidung, einer gesteigerten Aktivität des sympathischen Nervensystems und einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS). Auf der Basis dieser pathophysiologischen Zusammenhänge erscheinen für die Behandlung der adipositas-assoziierten Hypertonie insbesondere beta-1-selektive Adrenorezeptorantagonisten (β -Blocker) und Hemmer des RAAS, sowohl Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren (ACEI) als auch Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptorantagonisten (genannt AT1-Blocker) als geeignet. Trotz des guten blutdrucksenkenden Effekts von β -Blockern muss gerade bei Adipösen die negative Auswirkung auf Insulinsensitivität und Körpergewicht beachtet werden. Hemmer des RAAS dagegen wirken eher positiv auf die Insulinsensitivität. Bei gleicher blutdrucksenkender Wirkung ist deshalb die Beachtung von Nebenwirkungen der β -Rezeptor- und RAAS-Blockade bei Behandlung adipöser Hypertoniker von Bedeutung. Große klinische Studien weisen auf ein gesteigertes Diabetes-Risiko unter β -Blocker-Therapie hin, wogegen RAAS-Blockade das Diabetes-Risiko im Mittel um 20% reduziert. Die Beeinflussung der Insulinsensitivität und damit des langfristigen Risikos für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes könnte unter anderem mit der Sekretion von „Adipokinen“ aus dem Fettgewebe in Zusammenhang stehen. Hierzu zählen unter anderem Leptin, Adiponectin, Resistin und Interleukin-6.

Leptin nimmt entscheidenden Einfluss auf das Körpergewicht und die Sympathikusaktivität, Adiponectin verbessert die Insulinsensitivität und verzögert die Ausbildung einer Atherosklerose. Interleukin-6 ist ein wichtiger Regulator des regionalen Fettgewebemetabolismus und Entzündungsmediator und Resistin ruft zumindest im Tiermodell eine Insulinresistenz hervor und trägt beim Menschen zur chronischen Entzündung und Atherosklerose bei.

Ziel der vorliegenden Studie war es, Veränderungen der Adipokine und des Glucosestoffwechsels unter 13-wöchiger Therapie mit Valsartan, einem AT1-Blocker, und Atenolol, einem β 1-Blocker, zu bestimmen. Hierfür wurden im Rahmen einer Substudie 18 Patienten untersucht, die an einer multizentrischen Studie mit 132 randomisierten adipösen Patienten mit einem BMI ≥ 30 kg/m² und mildem bis mäßigem

essentiellern Hypertonus in 20 Zentren innerhalb Deutschlands teilnahmen. Nach Randomisierung wurde der Einfluss von Valsartan und Atenolol auf den Blutdruck, den Lipid- und Glucosemetabolismus und das hoch-sensitive C-reaktive Protein gemessen. 18 Patienten aus Berlin wurden am Franz-Volhard-Zentrum für Klinische Forschung (Charité Campus Buch) untersucht. Ihnen wurde vor und nach der Therapie Blut und Fettgewebe entnommen und die Serumkonzentration und Genexpression von Adiponectin, Leptin, Resistin und Interleukin-6 bestimmt.

Unter Atenolol kam es zu einem signifikanten Anstieg der Leptin-Genexpression und einem Abfall der Adiponectin-Serumkonzentration, Resistin und Interleukin-6 blieben unverändert. Valsartan veränderte weder die Genexpression noch die Serumkonzentrationen der untersuchten Adipokine. In der Gruppe der Patienten, die mit Atenolol behandelt wurden, war die Verringerung der Adiponectinspiegel mit einem Anstieg des Serum-Insulins assoziiert und könnte damit den bekannten negativen Einfluss von β -Blockern auf die Insulinsensitivität erklären. Die individuelle Analyse der Änderungen von Insulin und Adiponectin zeigt jedoch, dass es keine Korrelation zwischen beiden Parametern im einzelnen Patienten gab.

Zusammenfassend stützen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht die Hypothese, dass metabolische Veränderungen bei Behandlung mit AT1-Blockern oder β -Blockern auf der Ebene der Adipokine erklärt werden können.

6 Literaturverzeichnis

1. Thefeld,W: Verbreitung der Herz-Kreislauf-Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Übergewicht, Hypertonie und Rauchen in der Bevölkerung. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 43:415-423, 2000
2. WHO Consultation on Obesity, Geneva 3-5 June 1997. Obesity - Preventing and managing the global epidemic. 1-276. 1997.
3. Kissebah,AH, Krakower,GR: Regional adiposity and morbidity. *Physiol.Rev.* 74:761-811, 1994
4. Yusuf,S, Hawken,S, et al.: Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 366:1640-1649, 2005
5. Wilson,PW, D'Agostino,RB, et al.: Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch.Intern.Med.* 162:1867-1872, 2002
6. Kenchaiah,S, Evans,JC, et al.: Obesity and the risk of heart failure. *N.Engl.J.Med.* 347:305-313, 2002
7. Yudkin,JS, Stehouwer,CD, et al.: C-Reactive Protein in Healthy Subjects: Associations With Obesity, Insulin Resistance, and Endothelial Dysfunction : A Potential Role for Cytokines Originating From Adipose Tissue? *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19:972-978, 1999
8. Yudkin,JS, Kumari,M, et al.: Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148:209-14., 2000
9. Mikhail,N, Golub,MS, Tuck,ML: Obesity and hypertension. *Prog.Cardiovasc.Dis.* 42:39-58, 1999
10. Sharma,AM, Pischon,T, et al.: Hypothesis: Beta-adrenergic receptor blockers and weight gain: A systematic analysis. *Hypertension.* 37:250-4., 2001
11. Gress,TW, Nieto,FJ, et al.: Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *N.Engl.J.Med.* 342:905-912, 2000
12. Scheen,AJ: Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 1. A meta-analysis of randomised clinical trials. *Diabetes Metab* 30:487-496, 2004

13. Sharma,AM, Pischon,T, et al.: Choice of drug treatment for obesity-related hypertension: where is the evidence? *J.Hypertens.* 19:667-74., 2001
14. Grassi,G, Cattaneo,BM, et al.: Obesity and the sympathetic nervous system. *Blood Press.Suppl.* 1:43-46, 1996
15. Engeli,S, Bohnke,J, et al.: Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension.* 45:356-362, 2005
16. Hall,JE: The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension.* 41:625-633, 2003
17. Rahmouni,K, Morgan,DA, et al.: Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes.* 54:2012-2018, 2005
18. Eikelis,N, Lambert,G, et al.: Extra-adipocyte leptin release in human obesity and its relation to sympathoadrenal function. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 286:E744-E752, 2004
19. Engeli,S, Sharma,AM: Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm.Metab.Res.* 32:485-99., 2000
20. Scheen,AJ: Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 2. Overview of physiological and biochemical mechanisms. *Diabetes Metab* 30:498-505, 2004
21. Fruhbeck,G, Gomez-Ambrosi,J, et al.: The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am.J.Physiol.* 280:E827-47., 2001
22. Zhang,Y, Proenca,R, et al.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432, 1994
23. Considine,RV, Sinha,MK, et al.: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N.Engl.J.Med.* 334:292-295, 1996
24. Scherer,PE, Williams,S, et al.: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J.Biol.Chem.* 270:26746-26749, 1995
25. Stefan,N, Vozarova,B, et al.: Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes.* 51:1884-1888, 2002
26. Ouchi,N, Kihara,S, et al.: Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte- derived plasma protein adiponectin. *Circulation.* 100:2473-2476, 1999

27. Fried,SK, Bunkin,DA, Greenberg,AS: Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83:847-850, 1998
28. Stepan,CM, Bailey,ST, et al.: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-12., 2001
29. Reilly,MP, Lehrke,M, et al.: Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation*. 111:932-939, 2005
30. Halaas,JL, Gajiwala,KS, et al.: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546, 1995
31. Larsson,H, Elmstahl,S, et al.: Evidence for leptin regulation of food intake in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83:4382-4385, 1998
32. Frederich,RC, Hamann,A, et al.: Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat.Med*. 1:950-953, 1995
33. Bjorbaek,C, El Haschimi,K, et al.: The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J.Biol.Chem*. 274:30059-30065, 1999
34. White,DW, Zhou,J, et al.: Identification of leptin-induced transcripts in the mouse hypothalamus. *Diabetes*. 49:1443-1450, 2000
35. Aprath-Husmann,I, Rohrig,K, et al.: Effects of leptin on the differentiation and metabolism of human adipocytes. *Int.J.Obes*. 25:1465-70., 2001
36. Ceddia,RB, Koistinen,HA, et al.: Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J*. 16:1163-1176, 2002
37. Donahoo,WT, Jensen,DR, et al.: Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82:4139-4143, 1997
38. Jones,BH, Standridge,MK, Moustaid,N: Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology*. 138:1512-1519, 1997
39. Kim,S, Whelan,J, et al.: Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism. *J.Nutr*. 132:1135-1140, 2002
40. Cassis,LA, English,VL, et al.: Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. *Endocrinology*. 145:169-174, 2004
41. Hu,E, Liang,P, Spiegelman,BM: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J.Biol.Chem*. 271:10697-10703, 1996

42. Arita,Y, Kihara,S, et al.: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 257:79-83., 1999
43. Hotta,K, Funahashi,T, et al.: 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.* 50:1126-33., 2001
44. Engeli,S, Feldpausch,M, et al.: Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes.* 52:942-947, 2003
45. Yamauchi,T, Kamon,J, et al.: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat.Med.* 7:941-6., 2001
46. Berg,AH, Combs,TP, et al.: The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat.Med.* 7:947-53., 2001
47. Okamoto,Y, Kihara,S, et al.: Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 106:2767-2770, 2002
48. Combs,TP, Wagner,JA, et al.: Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology.* 143:998-1007., 2002
49. Yu,JG, Javorschi,S, et al.: The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 51:2968-2974, 2002
50. Fasshauer,M, Klein,J, et al.: Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 507:142-6., 2001
51. Maison,P, Byrne,CD, et al.: Hypertension and its treatment influence changes in fasting nonesterified fatty acid concentrations: a link between the sympathetic nervous system and the metabolic syndrome? *Metabolism.* 49:81-87, 2000
52. Hattori,Y, Akimoto,K, et al.: Angiotensin-II-induced oxidative stress elicits hypoadiponectinaemia in rats. *Diabetologia.* 48:1066-1074, 2005
53. Shojima,N, Sakoda,H, et al.: Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes.* 51:1737-1744, 2002
54. Kim,KH, Lee,K, et al.: A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J.Biol.Chem.* 276:11252-6., 2001

55. Savage,DB, Sewter,CP, et al.: Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 50:2199-202., 2001
56. Janke,J, Engeli,S, et al.: Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes.Res*. 10:1-5, 2002
57. Nagaev,I, Smith,U: Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem.Biophys.Res.Comm*. 285:561-4., 2001
58. Patel,L, Buckels,AC, et al.: Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem.Biophys.Res.Comm*. 300:472-476, 2003
59. Kaser,S, Kaser,A, et al.: Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Comm*. 309:286-290, 2003
60. Fasshauer,M, Klein,J, et al.: Isoproterenol inhibits resistin gene expression through a G(S)- protein-coupled pathway in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*. 500:60-3., 2001
61. Lee,JH, Chan,JL, et al.: Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88:4848-4856, 2003
62. Youn,BS, Yu,KY, et al.: Plasma resistin concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89:150-156, 2004
63. Vendrell,J, Broch,M, et al.: Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes.Res*. 12:962-971, 2004
64. Hibi,M, Nakajima,K, Hirano,T: IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J.Mol.Med*. 74:1-12., 1996
65. Mohamed-Ali,V, Goodrick,S, et al.: Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-a, *in vivo*. *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 82:4196-4200, 1997

66. Mohamed-Ali,V, Goodrick,S, et al.: Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Am.J.Physiol.* 277:E971-5, 1999
67. Path,G, Bornstein,SR, et al.: Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 86:2281-2288, 2001
68. Ridker,PM, Rifai,N, et al.: Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.* 101:1767-72., 2000
69. Bastard,JP, Maachi,M, et al.: 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, 2002
70. Fasshauer,M, Kralisch,S, et al.: Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 301:1045-1050, 2003
71. Lagathu,C, Bastard,JP, et al.: Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 311:372-379, 2003
72. Vicennati,V, Vottero,A, et al.: Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 26:905-911, 2002
73. Mohamed-Ali,V, Flower,L, et al.: beta-Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86:5864-9., 2001
74. Skurk,T, van,H, V, Hauner,H: Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:1199-1203, 2004
75. Jordan,J, Engeli,S, et al.: Hemodynamic and metabolic responses to valsartan and atenolol in obese hypertensive patients. *J.Hypertens.* 23:2313-2318, 2005
76. Boschmann,M, Engeli,S, et al.: Adipose tissue metabolism and CD11b expression on monocytes in obese hypertensives. *Hypertension.* 46:130-136, 2005

77. Boschmann,M, Kreuzberg,U, et al.: The Effect of Oral Glucose Loads on Tissue Metabolism During Angiotensin II Receptor and Beta-receptor Blockade in Obese Hypertensive Subjects. *Horm.Metab Res.* 38:323-329, 2006
78. Matthews,DR, Hosker,JP, et al.: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 28:412-419, 1985
79. Gorzelniak,K, Engeli,S, et al.: Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J.Hypertens.* 20:965-973, 2002
80. Janke,J, Engeli,S, et al.: Extraction of total RNA from adipocytes. *Horm.Metab.Res.* 33:213-5., 2001
81. Janke,J, Engeli,S, et al.: Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes.* 51:1699-1707, 2002
82. Engvall,E, Perlman,P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8:871-874, 1971
83. Kershaw,EE, Flier,JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89:2548-2556, 2004
84. Skurk,T, van,H, V, Blum,WF, Hauner,H: Angiotensin II promotes leptin production in cultured human fat cells by an ERK1/2-dependent pathway. *Obes.Res.* 13:969-973, 2005
85. Lindholm,LH, Ibsen,H, et al.: Risk of new-onset diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study. *J.Hypertens.* 20:1879-1886, 2002
86. Ricci,MR, Lee,MJ, et al.: Isoproterenol decreases leptin release from rat and human adipose tissue through posttranscriptional mechanisms. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 288:E798-E804, 2005
87. Scriba,D, Aprath-Husmann,I, et al.: Catecholamines suppress leptin release from in vitro differentiated subcutaneous human adipocytes in primary culture via beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Eur.J.Endocrinol.* 143:439-445, 2000
88. Farnier,C, Krief,S, et al.: Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 27:1178-1186, 2003

89. Boschmann,M, Jordan,J, et al.: Tissue-specific response to interstitial angiotensin II in humans. *Hypertension*. 41:37-41, 2003
90. Boschmann,M, Engeli,S, et al.: Influences of AT1 receptor blockade on tissue metabolism in obese men. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 290:R219-R223, 2006
91. You,T, Yang,R, et al.: Abdominal adipose tissue cytokine gene expression: relationship to obesity and metabolic risk factors. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 288:E741-E747, 2005
92. Esler,M, Rumantir,M, et al.: Sympathetic nervous system and insulin resistance: from obesity to diabetes. *Am.J.Hypertens*. 14:304S-309S, 2001
93. Berg,AH, Combs,TP, Scherer,PE: ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol.Metab* 13:84-89, 2002
94. Nomura,S, Shouzu,A, et al.: Effect of valsartan on monocyte/endothelial cell activation markers and adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Thromb.Res*. 2005
- 95 Furuhashi,M, Ura,N, et al.: Blockade of the renin-angiotensin system increases adiponectin concentrations in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 42:76-81, 2003
96. Yenicesu,M, Yilmaz,MI, et al.: Blockade of the renin-angiotensin system increases plasma adiponectin levels in type-2 diabetic patients with proteinuria. *Nephron Clin.Pract*. 99:c115-c121, 2005
97. Ran,J, Hirano,T, et al.: Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for hypertension-related insulin resistance. *Metabolism*. 55:478-488, 2006
98. Ridker,PM, Danielson,E, et al.: Valsartan, blood pressure reduction, and C-reactive protein: primary report of the Val-MARC trial. *Hypertension*. 48:73-79, 2006
99. Savage,DB, Petersen,KF, Shulman,GI: Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension*. 45:828-833, 2005
100. Shoelson,SE, Lee,J, Yuan,M: Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord*. 27 Suppl 3:S49-S52, 2003

101. Fliser,D, Buchholz,K, Haller,H: Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation. *Circulation*. 110:1103-1107, 2004
102. Weisberg,SP, McCann,D, et al.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 112:1796-1808, 2003
103. Engeli,S, Schling,P, et al.: The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int.J.Biochem.Cell Biol*. 35:807-825, 2003
104. Stumvoll,M, Haring,H: Resistin and adiponectin--of mice and men. *Obes.Res*. 10:1197-1199, 2002
105. Rossing,K, Schjoedt,KJ, et al.: Enhanced renoprotective effects of ultrahigh doses of irbesartan in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Kidney Int*. 68:1190-1198, 2005

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Susanne Lüdtker, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Auswirkung von Atenolol und Valsartan auf die Produktion von Adipokinen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 26.Juli 2006

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken:

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Stefan Engeli, der mir jederzeit beratend zur Seite stand und mich durch seine wissenschaftliche Sachkenntnis und seine pädagogische Kompetenz dabei unterstützte, viele Hürden dieser Arbeit zu überwinden.

Herrn Prof. Dr. Jens Jordan danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe in der Franz-Volhard-Klinik zu erstellen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Jürgen Jahnke und Frau Dr. Kerstin Gorzelniaik. Durch ihre optimale Unterstützung bei der Einarbeitung in die Arbeitstechniken, die ständige Bereitschaft zu Erklärung und Gespräch und das sehr angenehme Klima im Labor haben sie mir bei meiner Arbeit sehr geholfen.

Herrn Damm möchte ich für die Aufbereitung der Proben und die Unterstützung im Labor danken.

Schließlich danke ich auch meinen Eltern Dr. Anneliese und Dr. Klaus-Werner Lüdtkke für das stets offene Ohr für die während der Arbeit auftretenden Schwierigkeiten und ihre finanzielle Unterstützung während der Zeit der Promotion.