

Ein hochkalorisches Futter mit
hohem Fettanteil für Rattenmütter verändert das
Gewicht, den Glukosestoffwechsel und die kardiale
Funktion der Nachkommen.

Dissertation

zur Erlangung des

akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Jan Sebastian Freiburger

geboren am 10. September 1983 in Dresden

Gutachter

(akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)

1. PD Dr. rer. nat. Michael Schwarzer
Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie
Universitätsklinikum Jena
2. Professor Dr. med. Marcus Franz
Klinik für Innere Medizin I
Universitätsklinikum Jena
3. Professor Dr. med. Michel Noutsias
Medizinische Klinik A / Schwerpunkt Kardiologie
Ruppiner Kliniken Hochschulklinikum der medizinischen Hochschule Brandenburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 7. Dezember 2021

Abkürzungsverzeichnis

°C	→ Grad Celsius
µg	→ Mikrogramm
µl	→ Mikroliter
A	→ Späteinstrom des Blutes in den linken Ventrikel
A'	→ Späte Bewegung des septalen Mitralklappenannulus
AUC	→ Integral, bzw. Area under the curve
AKT	→ Proteinkinase B
ATP	→ Adenosintriphosphat
Bidest	→ zweifach destilliertes Wasser
BMI	→ Body Mass Index
DT	→ Dezelerationszeit der E Welle
E	→ Früheinstrom des Blutes in den linken Ventrikel
E'	→ Frühe Bewegung des septalen Mitralklappenannulus
EF	→ Ejektion Fraktion
E/A	→ Verhältnis E zu A
E/DT	→ Verhältnis E zu DT
E/E'	→ Verhältnis E zu E'
EDTA	→ Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	→ Enddiastolisches Volumen
ESV	→ Endsystolisches Volumen
FS	→ Fractional Shortening
g	→ Gramm

<i>g</i>	→ <i>g</i> Kraft
GLUT	→ Glukosetransporter
GTT	→ Glukosetoleranztest
h	→ Stunde
HCl	→ Salzsäure
HEK	→ Hyperinsulinäme euglykämie Klemme
HFD	→ High fat diet (Futter der Untersuchungsgruppe)
HR	→ Herzfrequenz
IE	→ Internationale Einheiten
IR β	→ Insulinrezeptor β
ITT	→ Insulintoleranztest
Kg	→ Kilogramm
l	→ Liter
LVEDD	→ linksventrikuläre enddiastolisches Volumen
LVESD	→ linksventrikuläre endsystolisches Volumen
LVIDd	→ Innerer Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole
LVWT	→ Linksventrikuläre Wanddicke
mA	→ Milliampere
mg	→ Milligramm
mmol	→ Millimol
ml	→ Milliliter
NC	→ Normal chow (Futter der Kontrollgruppe)
ns	→ nicht signifikant

p → Signifikanzniveau
pAKT → phosphorylierte Proteinkinase B
pIR β → phosphorylierter Insulinrezeptor β
SDS → Natriumdodecylsulfat
TRIS → Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
3	Ziele der Arbeit.....	8
4	Methodik	9
4.1	Versuchstiere.....	9
4.2	Studiendesign.....	10
4.3	Chemikalien und Puffer	11
4.4	Geräte	13
4.5	Glukosetoleranztest.....	14
4.6	Insulintoleranztest.....	14
4.7	Organentnahme.....	14
4.8	Proteintransfer (Western Blot)	15
4.9	Hyperinsulinäme euglykämie Klemme (HEK).....	18
4.10	Echokardiographie.....	21
4.11	Statistische Auswertungen und Software	22
5	Ergebnisse	23
5.1	Morphologie.....	23
5.2	Glukose- und Insulintoleranz	28
5.3	Herzfunktion	43
6	Diskussion.....	51
7	Schlussfolgerung.....	57
8	Anhang.....	64

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Übergewicht und die damit verbundenen Veränderungen, wie Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ II werden in westlich geprägten Gesellschaften immer häufiger. Einer der Hauptgründe für Übergewicht ist die Ernährung mit einem hohen Fettanteil. Fettleibigkeit von Müttern geht mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einher, dass auch der Nachwuchs an Fettleibigkeit leidet. Jugendliche und Kinder sind immer häufiger von Fettleibigkeit und sogar Diabetes mellitus Typ II betroffen. Fettleibigkeit und Diabetes mellitus Typ II führen häufig zu einer Herzinsuffizienz. Männer sind häufiger von einer Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Funktion betroffen. Bei Frauen hingegen ist die Herzinsuffizienz häufig mit einer normalen linksventrikulären Funktion einhergehend.

Unser Ziel war es zu untersuchen, ob eine Ernährung von Muttertieren mit hohem Fettanteil in der Trag- und Laktationszeit zu Veränderung des Gewichtes, zu Veränderungen die auf einen Diabetes mellitus Typ II und eine Herzinsuffizienz bei den Nachkommen führt.

Methoden: Zehn Wochen alte Sprague Dawley Ratten wurden verpaart. Nach der Paarung wurde das Futter der Muttertiere auf eine Ernährung mit hohem Fettanteil (HFD) (60% Fettanteil, D 12492) umgestellt. Die Kontrollgruppe erhielt weiterhin das Standardfutter (NC). Nach dem Absetzen der Jungtiere erhielten diese das Futter der Mütter oder das jeweils andere Futter. Die Tiere wurden gewogen und es wurden Glukosetoleranztests (GTT) und Insulintoleranztest (ITT) durchgeführt. Eine hyperinsulinäme euglykämie Klemme (HEK) wurden zur Ermittlung der systemischen und organspezifischen Insulinempfindlichkeit durchgeführt. Außerdem wurde im Western Blot die Aktivierung des Insulinrezeptors, sowie der Proteinkinase B (AKT) gemessen. Die Herzfunktion wurde echokardiographisch überprüft.

Ergebnisse: HFD der Mütter und der Jungtiere führt zu jedem Zeitpunkt zu einem erhöhten Körpergewicht der Jungtiere. Das Integral (AUC) der Blutglukosespiegel im GTT und ITT als Zeichen einer verminderten Glukose- und Insulintoleranz war zu allen Zeitpunkten in der HFD- Gruppen größer

als das der Kontrollgruppe. Die weiblichen HFD- Tiere zeigten in der dritten Lebenswoche im Vergleich zu den männlichen Tieren eine verminderte Insulintoleranz. Im GTT zeigten die weiblichen HFD- Tiere drei, vier und zehn Wochen nach dem Absetzen eine höhere Glukosetoleranz und in der achten Woche eine niedrigere Glukosetoleranz, als die männlichen HFD- Tiere. Die Tiere, welche auf NC umgesetzt wurden, zeigten eine der Kontrollgruppe ähnlichen GTT und ITT. Die Tiere, welche auf eine HFD entwöhnt wurden zeigten im Glukose- und Insulintoleranztest ähnliche Ergebnisse wie die HFD Gruppe. Die insulinstimulierte und nicht insulinstimulierte Phosphorylierung des Insulinrezeptor β (IR β) zeigte keine Unterschiede zwischen der NC und der HFD Gruppe der Männchen. Die insulinstimulierte Phosphorylierung der AKT war in der HFD- Gruppe stärker. Die systolische Funktion war in den HFD- Tieren zu jedem Untersuchungszeitpunkt erhöht. Die diastolische Funktion war gestört. Anzeichen einer linksventrikulären Hypertrophie waren sichtbar.

Schlussfolgerung: In der Arbeit wurde gezeigt, dass eine HFD während der Trag- und Laktationszeit das Gewicht, die Glukose- und die Insulintoleranz schon zum Zeitpunkt des Absetzens der Jungtiere von Ihren Müttern verändert. Die Auswirkung der maternalen HFD auf die Glukose- und Insulintoleranztests der Jungtiere war besonders stark ausgeprägt, wenn sie nach dem Absetzen weiter gegeben wurde und waren reversibel, wenn die Jungtiere auf das Kontrollfutter entwöhnt wurden. Die gesteigerte systolische, die gestörte diastolische Funktion und die tendenzielle Hyperthrophie des Ventrikels der HFD Tiere blieb über den Versuchszeitraum bestehen. Die verstärkte Phosphorylierung von AKT in den HFD Tieren könnte hier ursächlich sein.

2 Einleitung

Weltweit erhöht sich das Körpergewicht der Menschen, während das durchschnittliche Alter der Übergewichtigen sinkt (Zellner et al. 2004, Wijnhoven et al. 2013, Tsugane 2012). Übergewicht ist häufig, und beide Geschlechter in der westlich geprägten Welt leiden daran (Flegal et al. 2012, Deutsche_Diabetes_Gesellschaft 2017). Eine erhöhte Kalorienzufuhr und eine unausgewogene Ernährung können Übergewicht verursachen. Hier wird ein Übermaß an Zucker oder zu viel Fett in der Nahrung verantwortlich gemacht (Hu und Willett 2002). Diese Fehlernährung ist geschlechts- und altersunabhängig. Fettleibigkeit führt zu einer gestörten Insulinresistenz, welche eine Vorstufe des Diabetes mellitus Typ II ist. Bei Männern zeigt sich eine Insulinresistenz bereits in einem erhöhten nüchtern gemessenen Blutzucker. Bei Frauen zeigt sich die Insulinresistenz häufig erst in einem Glukosetoleranztest (DECODE_study_group 1999). Da der Glukosetoleranztest aufwendiger in seiner Durchführung ist, als ein nüchtern gemessener Blutzucker, sind Insulinresistenzen bei Frauen unterdiagnostiziert. Eine Insulinresistenz führt zu einem Diabetes mellitus Typ II und dieser zu einer Herzinsuffizienz. Die Verbindung zwischen Diabetes mellitus Typ II und Herzinsuffizienz ist bekannt und diverse Mechanismen wurden bisher beschrieben (Goyal und Mehta 2013). Goyal und Metha beschreiben in ihrer Übersichtsarbeit drei Stufen der diabetischen Kardiomyopathie. In der frühen Phase kommt es zu Veränderungen des Fettsäuremetabolismus, sowie einer Glukoseverwertungsstörung, welche in einer diastolischen Dysfunktion des Herzens münden. In der mittleren Stufe lassen sich Nekrosen des Herzmuskels finden. Diese führen zu einer Herzvergrößerung, einer diastolischer Dysfunktion und einer normalen bis leicht gestörten linksventrikulären Funktion. Die späte Phase geht mit mikrovaskulären Störungen, deutlich vergrößertem Herzen mit deutlich reduzierter linksventrikulärer Funktion einher.

Eine Verstärkung der Insulinresistenz erhöht zusätzlich das Risiko für eine Verschlechterung der Herzinsuffizienz (Stratton et al. 2000, Gottdiener et al. 2000, Chen et al. 1999). Der Diabetes mellitus erhöht das Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei Männern und bei Frauen (Gottdiener et al. 2000). Die Herzinsuffizienz gehört zu den häufigsten Diagnosen, welche eine stationäre Behandlung erfordern (Neumann et al. 2009, Chamberlain et al. 2017). In den USA wurden 2010 ca. 2% des Gesundheitsbudgets für Patienten mit einer Herzinsuffizienz aufgewendet (Braunschweig et al. 2011). Das mittlere Überleben einer neu diagnostizierten Herzinsuffizienz beträgt ca. fünf Jahre (Go et al. 2013). Es handelt sich um eine teure und häufige Erkrankung mit hohem Letalitätsrisiko. Das Bewusstsein in der Bevölkerung ist ein anderes. Hier wird die Sterblichkeit unterschätzt. Bei einer Befragung hielten viele die Symptome einer Herzinsuffizienz für eine normale Konsequenz des Alterns. Die Sterblichkeit wurde als gering und im Vergleich zu Tumorerkrankungen als deutlich geringer eingeschätzt (Lainscak et al. 2014). Das Erscheinungsbild der Herzinsuffizienz ist sehr variabel und geht klinisch mit Luftnot und Wassereinlagerungen in Geweben einher. Die systolische und die diastolische Funktion unterscheiden sich oft geschlechtsabhängig. Männer zeigen häufiger eine Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Funktion. Bei Frauen ist die linksventrikuläre Funktion oftmals erhalten, jedoch ist die Füllung des Herzens, die diastolische Funktion gestört (Lam et al. 2011). Übergewicht ist eine häufige Begleiterkrankung bei herzinsuffizienten Patienten. Herzinsuffiziente Patienten mit erhaltener linksventrikulärer, aber gestörter diastolischer Funktion sind zu 41% fettleibig (Owan et al. 2006). Eine Metaanalyse beschreibt Fettleibigkeit sogar als unabhängigen Risikofaktor für eine Herzmuskelschwäche (Wong und Marwick 2007).

Interessanterweise zeigt sich ein leicht erhöhter BMI bei schon diagnostizierter Herzinsuffizienz als Überlebensvorteil (Parto und Lavie 2017). Dieses obesity paradox wurde von Horowich im Jahre 2001 zum ersten Mal beschrieben (Horowich et al. 2001). Eine Metaanalyse von Oreopoulos bestätigte die Theorie sieben Jahre später (Oreopoulos et al. 2008). Risikoadjustiert ist das obesity paradox in diesen Untersuchungen bei Männern mit reduzierter systolischer Funktion mit einem Überlebensvorteil assoziiert. Dies zeigte sich bei Frauen oft nicht signifikant (Hong et al. 2018, Clark et al. 2012).

Übergewicht betrifft nicht nur Erwachsene sondern auch Jugendliche und Kinder. Fast jedes achte Vorschulkind in den USA ist fettleibig (Ogden et al. 2014). Insbesondere die Fettleibigkeit von Müttern erhöht das Risiko für die Entwicklung von Fettleibigkeit des Nachwuchses (Heslehurst et al. 2019). Fettleibigkeit des Vaters spielt eine geringere Rolle (Linabery et al. 2013). Die medizinische Versorgung des Nachwuchses von übergewichtigen Müttern und den Müttern selbst ist aufwendiger und die Sterblichkeit sowohl des Nachwuchses (Cundy et al. 2000) als auch der Mutter ist höher. Die Behandlung ist bis zu fünfmal teurer, als bei normalgewichtigen Müttern (Galtier-Dereure et al. 2000). Der Nachwuchs von übergewichtigen Müttern mit Diabetes mellitus Typ II benötigt häufiger eine Behandlung auf einer Intensivstation und die initialen Lebenszeichen sind geringer ausgeprägt (Cade et al. 2016). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Fettleibigkeit der Eltern eine erhöhte Fettleibigkeit bei weiblichem Nachwuchs nach sich zog (Mitanchez et al. 2017). Fettleibige Jungen haben einen höheren Glukose- und Insulinspiegel als fettleibige Mädchen (Aldhoon-Hainerova et al. 2014). Bei fettleibigen Frauen mit Diabetes hat der Nachwuchs im Alter von 5 bis 19 Jahren zu 40% einen Diabetes mellitus Typ II. Im Alter von 25-34 Jahren, steigt die Rate an Diabetes mellitus Typ II auf 70% an (Dabelea et al. 2000).

Eine sich in jüngeren Jahren entwickelnde Insulinresistenz bis hin zu Diabetes mellitus könnte zu einer Zunahme von jungen herzinsuffizienten Erwachsenen führen. Ein obesity paradox bei Kindern ist bisher nicht beschrieben.

Experimentell ist eine Gewichtssteigerung und eine Insulinresistenz mit der Gabe einer HFD zu erzeugen (Storlien et al. 1993). Die Veränderungen der kardialen Funktion durch eine HFD sind sehr unterschiedlich. Leopoldo et al. konnten in adulten, mit einer HFD gefütterten Ratten eine reduzierte linksventrikuläre Funktion und eine Hypertrophie des Herzens zeigen (Leopoldo et al. 2010). Eine weitere Arbeitsgruppe fand bei adulten männlichen Mäusen, welche mit einer HFD gefüttert wurden, eine Reduktion der linksventrikulären Funktion (Louwe et al. 2012). Christopher et al. fanden bei adulten Ratten, welche mit einer HFD gefüttert wurden keine signifikanten Unterschiede in der Herzfunktion (Christopher et al. 2010). Eine Veränderung der diastolischen Funktion des Herzens durch eine HFD konnte an Mäusen gezeigt werden (Manrique et al. 2013). Diese Beispiele zeigen, welche vielfältigen Veränderungen am Herzen durch eine HFD induzierte Insulinresistenz erzeugt werden können. Hier ist eine genauere Betrachtung der Zusammensetzung der Fettsäuren nötig. Der Ersatz von gesättigten Fettsäuren durch ungesättigte Fettsäuren hatte in vielen Studien eine Reduktion von kardiovaskulären Erkrankungen zur Folge (Hu et al. 1997, Leren 1970, Turpeinen et al. 1979). Daher eignen sich besonders ein Fett mit hohem Anteil an ungesättigte Fettsäuren und ein hoher Kalorienanteil durch Fett zur Erzeugung einer Fettleibigkeit und eines Diabetes mellitus Typ II (Bi et al. 2007). Eine Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Tieren erfolgte hier nicht. Außerdem waren die Versuche ausschließlich an adulten Tieren durchgeführt worden. Eine Arbeitsgruppe differenzierte zwischen männlichen und weiblichen Ratten derselben Futtergruppe (Tamashiro et al. 2009). Die Tiere bekamen eine HFD und es zeigte keine geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Glukosetoleranz. Die Herzfunktion war kein Teil der Untersuchungen. Eine Arbeitsgruppe untersuchte Jungtiere deren Muttertiere eine HFD bekam. Diese sah keine Unterschiede

in der systolischen Funktion, jedoch eine Reduktion der diastolischen Funktion. Eine Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen erfolgte nicht (Mdaki et al. 2016).

Die Herzfunktion bei heranwachsenden Ratten beider Geschlechter mit einer HFD induzierten Insulinresistenz ist bisher nur unzureichend verstanden. Eine genauere Kenntnis über die Mechanismen, die zu einer Fettleibigkeit, Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ II und Veränderung der Herzfunktion führen ist wichtig und könnte helfen deren Prognose zu verbessern.

3 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen überprüft werden:

1. Welchen Einfluss hat die Gabe einer High Fat Diet für die Muttertiere auf das Gewicht, die Glukose- und die Insulintoleranz in den Jungtieren?
2. Welchen Einfluss hat die Gabe einer High Fat Diet für die Muttertiere auf die Herzfunktion in den Jungtieren?
3. Sind nach einem Wechsel des Futters der Jungtiere die Störungen reversibel?
4. Welchen geschlechterspezifischen Einfluss hat die Gabe einer High Fat Diet auf die Glukose- und der Insulintoleranz, sowie die Herzfunktion?

4 Methodik

4.1 Versuchstiere

In unserem Tiermodell verwandten wir 10 Wochen alte Sprague Dawley Ratten von Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Männchen und Weibchen wurden eins zu eins verpaart und nach drei Tagen wieder separiert. Die Muttertiere wurden daraufhin in Kontrollgruppe (NC) und Ernährungsgruppe mit hohem Fettanteil (HFD) randomisiert. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes in der Service Einheit Kleinnager des Universitätsklinikum Jena. Diese gewährleistet einen Tageslichtzyklus von 12 Stunden bei 21°C, sowie Pflege und Käfigzusammensetzungen in Standardkäfigen Typ 4. Die Tiere erhielten in der NC- Gruppe das Standardfutter (V1534). In der HFD- Gruppe eine High Fat Diet (D12492) mit einem Kalorienanteil von 60% aus Schweineschmalz. Beide Futter wurden durch die Firma ssniff (Soest, Deutschland) hergestellt und als Pellets verfüttert. Sowohl Futter als auch Wasser stand den Tieren zur freien Verfügung. Das Tierexperiment wurde unter der Bewilligung durch das Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz mit der Reg.-Nr. 02-058/11 in den Laboratorien der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität Jena durchgeführt.

4.2 Studiendesign

Die tragenden Mütter wurden in zwei Gruppen geteilt. Eine Gruppe erhielt Standardfutter (NC- Gruppe) und die andere Gruppe das Futter mit hohem Fettanteil (HFD- Gruppe). Die Fütterung der Mütter mit dem entsprechenden Futter wurde bis zum Absetzen der Jungtiere fortgeführt. Ein Teil der Jungtiere wurden auf das Futter der Mütter entwöhnt. Ein Teil der männlichen Jungtiere erhielten nicht das Futter, welches die Mütter bekamen, sondern das jeweilige andere Futter. Somit bekamen männliche Jungtiere, bei denen die Muttertiere das Kontrollfutter erhielt, zum Absetzen die HFD und Jungtiere bei denen die Muttertiere die HFD bekamen wurden auf NC entwöhnt (NC → HFD, sowie HFD → NC). Die Vatertiere erhielten das Standardfutter und wurden bei den Experimenten nicht weiter betrachtet. Zum Zeitpunkt des Absetzens der Jungtiere von der Mutter, mit ca. drei Wochen, wurden Glukosetoleranztests mit den Jungtieren durchgeführt. Die Glukosetoleranztests wurden in der vierten, sechsten, achten und zehnten Lebenswoche wiederholt. In der dritten und in der achten Lebenswoche wurden Insulintoleranztests mit den Tieren durchgeführt. In der dritten und achten Lebenswoche der Tiere wurde eine hyperinsulinäme Euglykämie Klemme (HEK) bei den männlichen Tieren durchgeführt.

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden bei männlichen und weiblichen Tieren in der dritten, sechsten und zehnten Woche durch Frau Dr. Schrepper durchgeführt. Die Futterwechselgruppen wurden in der achten Lebenswoche untersucht.

In der achten Lebenswoche wurde den männlichen Tieren ohne Futterwechsel insulinstimuliert und nicht insulinstimuliert das Herz entnommen und für einen Proteinnachweis aufgearbeitet. Die Proteine, die wir mittels Western Blot nachwiesen sind die Proteinkinase B (AKT), und deren phosphorylierte Form (p-AKT), sowie der Insulinrezeptor β in seiner dephosphorylierten (IR β) und phosphorylierten (p-IR β) Form.

4.3 Chemikalien und Puffer

Die verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), PerkinElmer (Rodgau, Deutschland), Braun (Melsungen, Deutschland), sanofi aventis (Frankfurt, Deutschland), Baxter (Unterschleißheim, Deutschland) und Bayer (Leverkusen, Deutschland).

3- [³ H] Glukose	→ PerkinElmer
[¹⁴ C] 2 Deoxyglukose	→ PerkinElmer
3fach Lämmli- Puffer	→ 2,1g Dithiothreitol DTT, 111,67mg EDTA, 363,4mg Tris- HCl, 10g SDS, 40ml Glycerol, 2ml Bromphenolblau, 30ml Bidest
Bidest	→ zweifach destilliertes Wasser
Glukose	→ Glukose 20% und Glukose 40%, Braun
Insulin	→ Insuman Rapid 100IE/ml, Sanofi-Aventis
IP- Puffer (10ml)	→ 6,95ml Bidest, 200µl 1M TRIS- HCl, 245µl 2 M Natriumchlorid, 1ml 0,5 M Natriumflorid, 600µl 0,25 M Natriumdiphosphat, 1ml Triton- X 100 10%, 44µl Phenylmethylsulfonylfluorid (10g/l), 200µl 0,1 M Natriumorthovanadatlösung, 1 Primtablette (Complete mini)
Isofluran	→ Isofluran, Baxter
TG- Puffer A	→ 180ml 2 M Trizma Hydrochlorid, 570ml 2M Trizma Base, 20ml 20% SDS- Lösung. auf pH 8,8 einstellen und auf 1l mit Bidest auffüllen

SG- Puffer B	→ 242ml 2 M Trizma Hydrochlorid, 8ml 2M Trizma Base, 20ml 20% SDS- Lsg. auf 1l mit Bi-dest auffüllen
Runningpuffer	→ 14,4g Glycin, 5ml 20% SDS- Lösung, 3g Trizma Base auf 100ml auffüllen
TBS-T	→ 8,76g Natriumchlorid, 6,05g Tris +1ml Tween 20 auf pH 8,0 einstellen und auf 1l auffüllen
Transferpuffer	→ 3g Trizma Base, 1ml 20% SDS- Lösung, 14,1g Glycin, 200ml Methanol, auf 1l auffüllen
Strippingpuffer	→ 37,54g Glycin auf pH 1,8 einstellen und auf 500 ml auffüllen
Thiopental	→ Inresa

4.4 Geräte

Blutzuckermessgerät	→ FreeStyle Lite Accu Chek (Mannheim, Deutschland)
Echokardiographie	→ Vevo 770 mit RMV 716 11-24 MHz Schallkopf Visual Sonics, (Toronto, Kanada)
Homogenatoren	→ Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Spritzenpumpen	→ Syringe Pump SP 10012, WPI (Berlin, Deutschland)
Szintillationszähler	→ LS6500 Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Waagen	→ Kern (Balingen, Deutschland)
Westernblot Apparaturen	→ Bio-Rad (München, Deutschland)
Zentrifugen	→ Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

4.5 Glukosetoleranztest

Für den Glukosetoleranztest (GTT) wurden die männlichen und weiblichen Tiere gewogen. Danach wurde in einer Ultrakurzarkose mit Isofluran der Nüchternblutzucker bestimmt. Für die Messung wurde mittels einer der Größe des Tieres angepassten Kanüle am Fuß der Ratte subkutan Blut gewonnen. Nun wurde den Tieren gewichtsadaptiert 2g Glukose/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Zu den Zeitpunkten 15 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten, 90 Minuten und 120 Minuten nach der Injektion wurde jeweils in Ultrakurzarkose der Blutzucker bestimmt.

4.6 Insulintoleranztest

Für den Insulintoleranztest (ITT) wurden die männlichen und weiblichen Tiere gewogen. Danach wurde in einer Ultrakurzarkose mit Isofluran der Nüchternblutzucker bestimmt. Für die Messung wurde mittels einer der Größe des Tieres angepassten Kanüle am Fuß der Ratte subkutan Blut gewonnen und danach gewichtsadaptiert 1IE Insulin/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Zu den Zeitpunkten 15 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten, 90 Minuten und 120 Minuten nach der Injektion wurde jeweils in Ultrakurzarkose der Blutzucker bestimmt.

4.7 Organentnahme

In der achten Lebenswoche wurden männliche Tiere in eine tiefe Narkose mit 12,5mg Thiopental pro 100g Ratte versetzt. Die Tiere wurden in zwei Gruppen, insulinstimuliert und nicht insulinstimuliert, randomisiert.

Hierfür wurde nach medialer Laparotomie die Vena cava caudales präpariert. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde den Tieren 0,5 IE/kg Körpergewicht Insulin oder 0,9% Natriumchloridlösung mit demselben Volumen in die Vena cava injiziert. Nach fünf Minuten erfolgten eine mediane Sternotomie und die Entnahme des Herzens. Dieses wurde anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren, unter Stickstoffkühlung gemörsert und bis zur Verwendung des Organpulvers bei -80°C gelagert.

4.8 Proteintransfer (Western Blot)

Probenaufbearbeitung

Von dem gewonnenen Herzpulver wurden 50mg in 450 μ l IP-Puffer gelöst und mit einem Mikropistil bei 2000 Umdrehungen/ min für eine Minute homogenisiert. Nun wurde das Homogenat bei 16000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand entnommen. Es schloss sich eine Proteinbestimmung nach Bradford an. Bei diesem Test bildet ein Farbreagenz (Triphenylmethanfarbstoff Coomassie- Brilliant- Blau G-250) mit Proteinen Komplexe. Diese können photometrisch bestimmt und eine Proteinkonzentration daraus errechnet werden. Hiernach wurden alle Proben auf eine Proteinkonzentration von 4 μ g/ μ l eingestellt.

Immunpräzipitation

Für die Untersuchungen des Insulinrezeptor (p-IR β / IR β) wurde der Überstand mit 8 μ l Anti Insulinrezeptor β Antikörper (Anti- IR β SC 711, Santa Cruz Heidelberg, Deutschland) vermengt und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Am nächsten Morgen wurde das Antikörpergemisch unter Zugabe von 20 μ l Protein A Antikörper (SC-2001 Protein A- Agarose, Santa Cruz Heidelberg, Deutschland) für zwei Stunden bei 4°C mittels eines Überkopfschüttlers gedreht. Anschließend wurde das Gemisch mit 1000g zentrifugiert, der Überstand entnommen, verworfen und das Pellet mit 400 μ l IP-Puffer gelöst. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, wobei nach dem letzten Verwerfen des Überstandes 40 μ l 1x Lämmli- Puffer zugegeben wurde. Das Gemisch wurde nun für zehn Minuten bei 95°C denaturiert und für die Gelelektrophorese verwendet.

Gelherstellung

Für ein 7,5% Polyacrylamidtrenngel wurden 2,46ml zweifach destilliertes Wasser, 1,25ml 30% Polyacrylamid, 1,25ml TG-Puffer A, 5µl Tetramethylethyldiamin und 33µl 10% Amoniumperoxodisulfat verwendet.

Für ein 10% Polyacrylamidtrenngel wurden 2,05 ml zweifach destilliertes Wasser, 1,67ml 30% Polyacrylamid, 1,25ml TG-Puffer A, 5µl Tetramethylethyldiamin und 33µl 10% Amoniumperoxiddisulfat verwendet.

Das Sammelgel bestand aus 3,05ml zweifach destilliertes Wasser 0,67ml 30% Polyacrylamid, 1,25ml SG-Puffer B, 5µl Tetramethylethyldiamin und 33µl 10% Amoniumperoxiddisulfat.

Elektrophorese

Es erfolgte eine Gelelektrophorese in einem der Proteingröße adaptierten Polyacrylamidgel. Für den Insulinrezeptornachweis verwendeten wir 7,5% und für AKT ein 10% Polyacrylamid- Gel, wobei jeweils 10µl Probe in jede Tasche pipettiert wurde. Als Marker für die Größe der Proteine verwandten wir Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad, München, Deutschland), leere Taschen wurden mit 3x Lämmli- Puffer beladen. Für die zehnmütige Einlaufphase flossen 10mA. Während der 60 minütigen Auftrennphase flossen 20 mA.

Proteintransfer

Nachdem die Auftrennung abgeschlossen war, wurde das Trenngel vom Sammelgel gelöst und entfernt. Das Trenngel wurde auf eine Polyvinylidenfluoridmembran überführt und es erfolgte eine Proteinübertragung im semi dry Verfahren.

Blockierung und Proteindetektion

Anschließend wurde die Membran für zwei Stunden in Blockingpuffer (5% Milch in TBS-T) geschwenkt. Die Membran wurde anschließend gespült. Die Spülung geschah jedes Mal mit TBS-T für drei mal zehn Minuten. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper für p-AKT (Anti pAKT 9271, Cell Signaling), bzw. für p-IR β (Anti- Phosphotyrosin 05-321, Millipore, Darmstadt, Deutschland) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nun wurde die Membran erneut gespült und mit dem Sekundärantikörper (anti rabbit NA 934V, Amersham Bioscience Buckinghamshire, England) inkubiert. Die Markerproteine wurden separat in einem Conjugat (Precision Protein Conjugat Bio- Rad München, Deutschland) inkubiert. Eine weitere Spülung mit TBS-T erfolgte. Final wurde die Membran mittels Chemilumineszenz (Serva) in einem LAS-300 fotografiert.

Nun wurde die Membran für eine Stunde in Strippingpuffer geschwenkt, anschließend, wie oben erwähnt, blockiert und mit Primärantikörper für AKT (Anti- AKT 9272, Cell Signaling) oder für IR β (Anti- IR β SC 711, Santa Cruz Heidelberg, Deutschland) in einer Schale vermischt. Die weiteren Schritte Sekundärantikörper, Chemilumineszenz und die Fotografie geschahen wie oben beschrieben. Das Spülen erfolgte analog.

Die Membran wurde im letzten Schritt mit Naphtol Blue Black gefärbt und für die Analyse digital fotografiert.

4.9 Hyperinsulinäme euglykämie Klemme (HEK)

Venenkatheteranlage für die HEK

Nach der Einleitung der Narkose der männlichen Tiere mit Isofluran wurde die Tiefe der Narkose mittels eines Schmerzreizes überprüft und gesteuert. Das Tier wurde auf den Rücken gelegt und es erfolgte eine Rasur, sowie eine Hautdesinfektion mit Kodan (Schülke & Mayr Norderstedt, Deutschland) der rechten Halsseite zwischen Clavicula und der Mandibula. Ein Hautschnitt schloss sich nach der Einwirkzeit des Desinfektionsmittels an. Danach wurde die Vena jugularis interna aufgesucht und stumpf frei präpariert. Eine Ligatur mittels Vicryl 2.0 erfolgte. Zentral dieser Ligatur wurde die Vene eröffnet, ein Katheter (0,2 inch Silicone Tube, Helix Medical, Den Haag, Niederlande) eingeführt und mittels der Ligatur fixiert. Es folgte ein Wundverband und eine Überprüfung der intravasalen Lage des Katheters über eine Aspiration. Anschließend wurde der Katheter mit 0,9% Kochsalzlösung gespült.

Durchführung der HEK

Nun wurde an den Katheter eine Spritzenpumpe mit Tritium markierter Glukose angeschlossen und nach einer Bolusgabe von 0,3ml über zwei Minuten auf eine kontinuierliche Rate von 0,23ml/h für 80 Minuten gestellt. Dieser Versuchsteil dient der Messung des basalen Glukoseumsatzes.

Nach 80 Minuten wurde eine Spritze mit tritiummarkierter Glukose und einer auf das Gewicht des Tieres adaptierten Dosis an Insulin vorbereitet und es erfolgte eine Bolusgabe von 0,05ml über eine Minute aus. Nach der Bolusgabe erfolgte die kontinuierliche Gabe diese Spritze mit 0,23ml/h. Über einen Y-Konnektor wurde parallel eine Glukoseinfusion gestartet. In fünfminütigem Abstand wurde der Blutzucker des Tieres gemessen. Die Glukoseinfusionsrate wurde je nach Blutzuckerwert angepasst. Ein stabiler Blutzucker zwischen fünf und sechs mmol/l wurde angestrebt. Zeigte sich ein stabiler Blutzucker über 15 Minuten wurden die Spritzenpumpen gestoppt und 50µl Blut wurde aus der Schwanzspitze entnommen.

Nun wurde ein Bolus von 0,3ml mit [^{14}C] 2 Deoxyglukose über zwei Minuten appliziert und anschließend die Spritzenpumpe erneut gestartet. Eine Blutzuckermessung inklusive Blutentnahme erfolgte nach 5, 10, 15, 25, 35 und 45 Minuten. Dieser Versuchsteil dient dem Nachweis der Aufnahme von [^{14}C] 2 Deoxyglukose in die jeweiligen Organe und dem insulinstimulierten Glukoseumsatz.

Organentnahme

Nach der letzten Blutentnahme wurde die Narkose vertieft und das Tier mittels cervicaler Dislokation euthanasiert. Anschließend wurden die Organe Herz, Lunge Leber, Milz, Pankreas, Nieren, Gehirn, sowie das Hodenfett, beide Muskulus solei und beide Muskulus gastrocnemii entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Außerdem wurde die linke Tibia zur Bestimmung der Länge entnommen und eingefroren.

Probenaufarbeitung und Messung des radioaktiven Zerfalls

Die Blutproben wurden bei 4°C mit 12000g für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand mit 100µl einer 3- molaren Zinksulfatlösung und 100µl einer 3- molaren Bariumhydroxidlösung versetzt. Nun erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C mit 12000g über zehn Minuten. Dieses Gemisch wurde auf zwei Portionen aufgeteilt. Eine Portion wurde mit Szintillationscocktail versetzt, auf einem Probenrüttler gemischt und dann direkt im Szintillationszähler gemessen.

Die andere Portion wurde über Nacht getrocknet, erneut in destilliertem Wasser gelöst und anschließend ebenso mit Szintillationscocktail versetzt, gemischt und im Szintillationszähler gemessen.

Der Szintillationszähler gab den mittleren Zerfall von ^{14}C und Tritium pro Minute an.

Um die spezifische Aktivität der jeweiligen Isotope zu bestimmen, wurden Teile des Inhaltes der Spritzen ebenfalls mit Szintillationscocktail versetzt, gemischt und im Szintillationszähler gemessen.

Die gewonnenen Organe wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Jeweils 200mg des Organs wurden in 5ml Bidest gelöst und mit einem Homogenator homogenisiert. Das Homogenat wurde nun für zehn Minuten gekocht und anschließend bei 4°C und 11000g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und zwei weitere Male unter denselben Bedingungen zentrifugiert.

Nach der dritten Zentrifugation wurde 1ml entnommen mit Szintilationscocktail versetzt, gemischt und im Szintillationszähler gemessen.

Ein weiterer Milliliter des Überstandes wurde mittels einer Säulenchromatographie aufgetrennt und das Eluat wurde mit Szintilationscocktail versetzt, gemischt und im Szintillationszähler gemessen. Die gemessenen Zerfälle dienten der Berechnung des basalen und insulinstimulierten Glukoseumsatzes, sowie der [¹⁴C] 2 Deoxyglukose in die Zelle.

4.10 Echokardiographie

Die Echokardiographien erfolgten durch Frau Dr. A. Schrepper. Es erfolgte die Einleitung der Narkose mit Isofluran. Anschließend wurden die Tiere an der Anlotstelle rasiert und auf einem beheizbaren Untersuchungstisch positioniert. Zur Überwachung der Narkose wurde während der Untersuchungen kontinuierlich die Herzfrequenz abgeleitet und die rektale Temperatur bestimmt.

Untersucht wurden die Tiere im Zweikammer- und im Vierkammerblick. Zur Messung der Parameter wurde der M-Mode verwandt. Der M-Mode stellt ein Bild einer Schnittlinie im zeitlichen Verlauf dar. Die Anlotung des Zweikammerblicks erfolgt parasternal auf der Höhe der Papillarmuskeln der Mitralklappe. In dieser Einstellung können die Wanddicken der Vorder- und der Hinterwand, sowie das intraventrikuläre Volumen und die Durchmesser jeweils in der Systole und der Diastole ermittelt werden. Aus diesen Messungen lassen sich die Ejektionsfraktion (EF) und das Fractional Shortening (FS) wie folgt berechnen.

ESV → Endsystolisches Volumen

EDV → Enddiastolisches Volumen

LVESD → linksventrikuläre endsystolisches Volumen

LVEDD → linksventrikuläre enddiastolisches Volumen

EF in % → $(EDV - ESV) / EDV$

FS in % → $(LVEDD - LVESD) / LVEDD$

Die Einstellung des Vierkammerblicks erfolgte über eine Neigung des Schallkopfes aus dem Zweikammerblick. In dieser Einstellung lassen sich die Flussgeschwindigkeiten des Blutes während der Diastole über der Mitralklappe mittels Pulsed- Wave (E, A) und am septalen Mitralanulus per Tissue- Doppler (E', A') messen. In der Diastole gibt es einen frühen Einstrom des Blutes (E) und einen späten Einstrom des Blutes (A). DT ist die Dezelerationszeit der E- Welle. Diese Parameter und die Verhältnisse zueinander dienen der Beurteilung der diastolischen Funktion.

4.11 Statistische Auswertungen und Software

Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert mit dem Standardfehler. Für die statistische Auswertung und die Erstellung der Diagramme wurde SigmaPlot verwendet. Die Auswertung der Western Blot Banden erfolgte mit AIDA 2.0. Um Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu untersuchen, wurde der t-Test verwendet. Bei vier Gruppen wurde je nach Fragestellung eine einfaktorielle Varianzanalyse (Futter) oder eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Geschlecht und Futter) verwendet. Die post hoc Analysen wurden mittels Holm- Sidak- Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ festgesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Morphologie

Gewichte der Männchen und Weibchen

Lebenswoche	Männchen		Weibchen		ANOVA		
	NC	HFD	NC	HFD	P _{sex}	P _{diet}	P _{inter}
3.	26,1±1,2	35,9±0,9***	36,2±1,5†††	43,2±1,1***†††	***	***	ns
4.	61,4±2,6	80,4±3,5***	50,9±3,7†	72,6±3,1***	**	***	ns
6.	134,4±2,5	161,8±3,4***	114,9±3,5†††	132,8±3,0***†††	***	***	ns
8.	217,7±10,5	267,2±12,2***	164,9±15,3††	206,9±11,5*††	***	***	ns
10.	275,1±6,0	372,6±8,0***	198,6±5,7†††	231,8±4,8***†††	***	***	***

Tabelle 1 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler der Gewichte der Tiere in Gramm; 2-way ANOVA wurde durchgeführt um Effekte des Geschlechts (p_{sex}), Futter (p_{diet}) und deren Interaktion (p_{inter}) festzustellen ; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 – HFD verglichen zu NC, † p<0,05, †† p<0,01, ††† p<0,001 Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe; n=6-20, ns – nicht signifikant.

Tabelle 1 zeigt die Gewichtsentwicklung der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum. Es zeigt sich, dass die mit HFD gefütterten Tiere immer signifikant schwerer waren als die Tiere der NC- Gruppe desselben Geschlechts. Die weiblichen Tiere waren ab der 6. Lebenswoche leichter als die männlichen Tiere.

Gewichte der Tiere mit Futterwechsel

Lebenswoche	Männchen			
	NC	NC→HFD	HFD→NC	HFD
3.	26,1±1,2			35,9±0,9***
6.	134,4±2,5	197,1±6,2***†††	193,9±3,6***†††	161,8±3,4*
8.	206,5±3,5	247,5±7,2	251,4±7,2	267,2±12,2*
10.	272,1±5,6	324,3±9,2***	307±28,1***†††	372,6±14,1***

Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler der Gewichte der Tiere in Gramm; * p<0.05, ** p<0,01, *** p<0.001 – im Vergleich zur NC-Gruppe, ††† p<0.001 Vergleich zur HFD Gruppe; n=5-20.

Diese Tabelle zeigt die Gewichtsentwicklung der männlichen Tiere über den gesamten Versuchszeitraum. Es zeigte sich, dass die mit HFD gefütterten Tiere immer signifikant schwerer waren als die Tiere der NC- Gruppe. Die Tiere mit Futterwechsel waren zunächst schwerer als die Tiere ohne Futterwechsel. Die Länge der HFD Exposition bestimmte die Gewichtstendenz zu der Kontroll- und der HFD Gruppe.

Organgewichte dritte Lebenswoche

Männchen		
	NC	HFD
Herz	151±11	190±14
Lunge	364±14	527±19*
Leber	808±30	993±172
Pankreas	85±6	91±16
Milz	105±13	91±16
Nieren	495±29	431±39
Hodenfett	32±5	47±10
M. soleus	26±4	58±34
M. gastricnemii	239±25	168±32
Gehirn	1183±50	1153±46

Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler der Organgewichte in Milligramm aus der dritten Lebenswoche; * p<0.05, ** p<0,01, *** p<0.001 – HFD verglichen zu NC, n=6-9.

Diese Tabelle zeigt die Organgewichte der dritten Lebenswoche. Das Gewicht der Lunge war in der HFD- Gruppe signifikant größer. Die restlichen Organgewichte zeigten keinen signifikanten Unterschied. Eine Tendenz zur Zunahme des Herzgewichts, des Gewichtes der Leber und des Hodenfettgewichtes in der HFD Gruppe lässt sich ablesen. Das weist auf eine zunehmende Verfettung der Organe hin.

Organgewichte achte Lebenswoche

	Männchen	
	NC	HFD
Herz	767±21	803±34
Lunge	1156±46	1189±69
Leber	7770±220	9534±452**
Pankreas	658±92	932±99
Milz	397±29	355±19
Nieren	1887±51	1991±92
Hodenfett	1098±90	2060±125***
M. soleus	214±18	192±5
M. gastricnemii	2822±61	2464±50
Gehirn	1775±40	1606±70

Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler der Organgewichte in Milligramm aus der achten Lebenswoche; * p<0.05, ** p<0,01, *** p<0.001 – HFD verglichen zu NC, n=6-7.

Diese Tabelle zeigt die Organgewichte in der achten Lebenswoche. Das Gewicht der Leber und das Gewicht des Hodenfett war in der HFD- Gruppe signifikant höher. Eine Tendenz zu einem größeren Herzgewicht blieb bestehen. Das weist auf eine zunehmende Verfettung der Organe hin.

5.2 Glukose- und Insulintoleranz

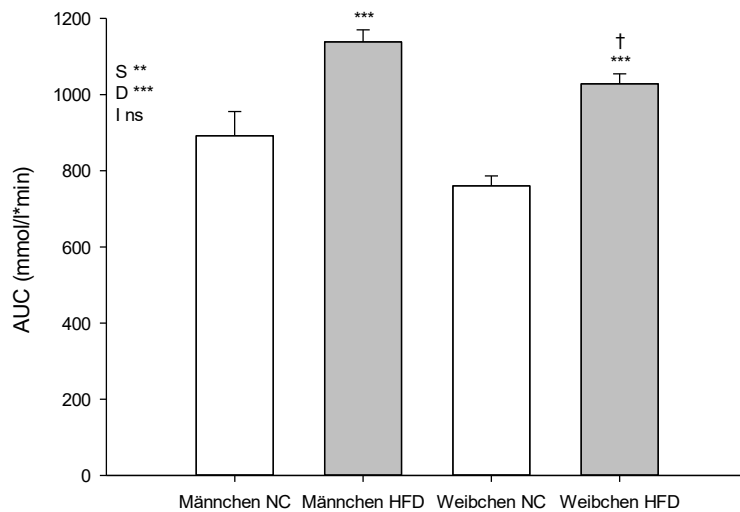


Abbildung 1 zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der intraperitonealen Glukosetoleranztests in der dritten Lebenswoche. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-30$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ für die Faktoren Geschlecht (S), Futter (D), Interaktion (I) im Vergleich zur Kontrollgruppe; ns – nicht signifikant, † $p<0,05$, †† $p<0,01$, ††† $p<0,001$ im Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe.

Diese Abbildung zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der Glukosetoleranztests der männlichen und weiblichen Tiere in der dritten Lebenswoche. Es ergab sich eine signifikante Vergrößerung des Integrals durch HFD bei Männchen und Weibchen im Vergleich zur NC- Gruppe. Es bestand eine gestörte Aufnahme von Zucker in die Gewebe, was einem Diabetes mellitus Typ II entspricht. Dies war durch die HFD verursacht. Weibchen zeigten einen geringeren Blutzucker als Männchen derselben Futtergruppe. Das Futter und das Geschlecht waren unabhängige Faktoren, welche den Blutzucker signifikant beeinflussten.

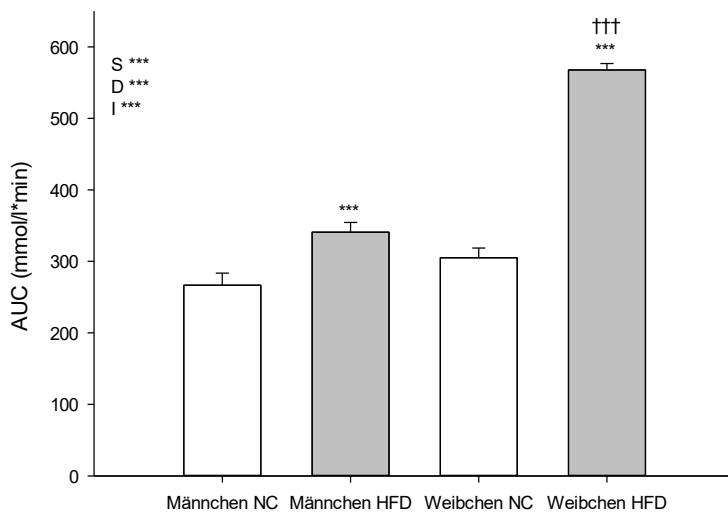


Abbildung 2 zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der intraperitonealen Insulintoleranztests in der dritten Lebenswoche. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-30$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ für die Faktoren Geschlecht (S), Futter (D), Interaktion (I) im Vergleich zur Kontrollgruppe; ns – nicht signifikant, † $p<0,05$, †† $p<0,01$, ††† $p<0,001$ im Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe.

Diese Abbildung zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der Insulintoleranztests der männlichen und weiblichen Tiere in der dritten Lebenswoche. Es ergab sich ein signifikant höherer Blutzucker durch die HFD bei Männchen und Weibchen im Vergleich zur NC- Gruppe. Dies deutet auf eine gestörte systemische Insulintoleranz, ähnlich des Diabetes mellitus Typ II hin.

Hyperinsulinäme euglykämie Klemme in der dritten Lebenswoche der männlichen Tiere

Zur genaueren Bestimmung der Insulintoleranz wurde eine Hyperinsulinäme euglykämie Klemme bei den männlichen Tieren in der dritten Lebenswoche zum Zeitpunkt des Absetzens durchgeführt. Hier wird nur auf die signifikanten Ergebnisse eingegangen. Es wurden die Gewichte der Organe bestimmt und zum Körpergewicht in Verhältnis gesetzt. In der HFD Gruppe zeigte sich das Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht größer ($5,6\text{mg/g} \pm 0,2$, $p=0,002$), als in der NC Gruppe ($4,4\text{ mg/g} \pm 0,2$). In unserem Versuchsaufbau war der basale Glukoseausstoß der Leber in der NC-Gruppe ($7,5 \pm 0,6$) größer ($p=0,003$) als in der HFD- Gruppe ($3,8 \pm 0,6$). Der basale Glukoseumsatz war in der NC Gruppe ($7,5 \pm 0,6$) größer ($p=0,003$), als in der HFD Gruppe ($3,8 \pm 0,6$). Dies deutet auf eine systemisch gestörte Insulintoleranz wie bei Diabetes mellitus Typ II hin.

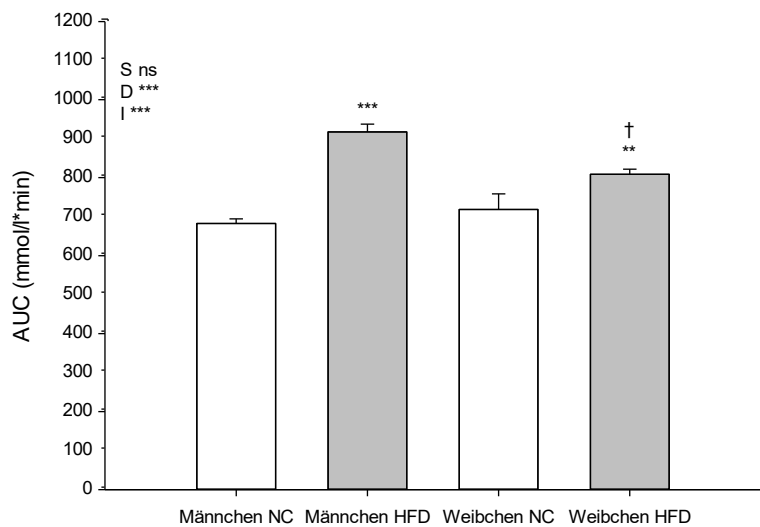


Abbildung 3 zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der intraperitonealen Glukosetoleranztests in der vierten Lebenswoche. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-30$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ für die Faktoren Geschlecht (S), Futter (D), Interaktion (I) im Vergleich zur Kontrollgruppe; ns – nicht signifikant, † $p<0,05$, †† $p<0,01$, ††† $p<0,001$ im Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe.

Diese Abbildung zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der Glukosetoleranztests der männlichen und weiblichen Tiere in der vierten Lebenswoche. Es ergab sich ein signifikanter höherer Blutzucker durch die HFD bei Männchen und Weibchen im Vergleich zur NC. Es bestand eine gestörte Aufnahme von Zucker in die Gewebe, was einem Diabetes mellitus Typ II entspricht. Dies war durch die HFD verursacht. Das Geschlecht alleine war kein den Blutzucker beeinflussender Faktor.

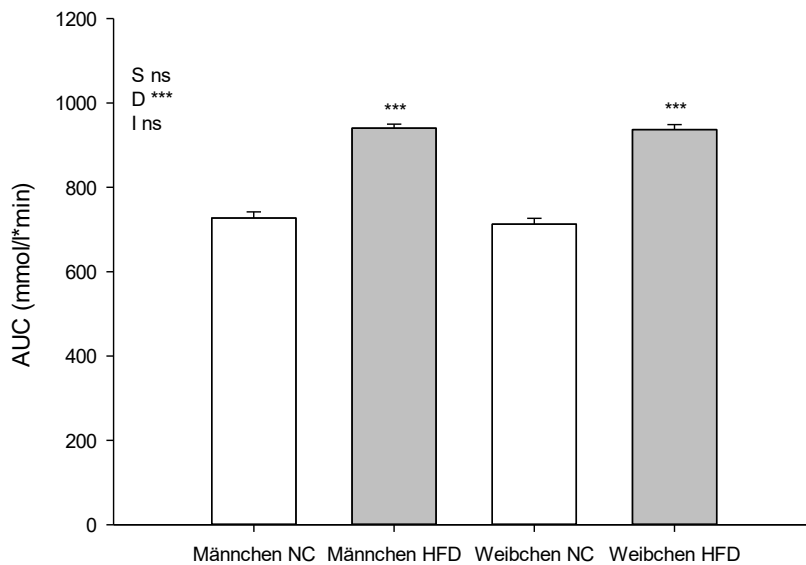


Abbildung 4 zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der intraperitonealen Glukosetoleranztests der Männchen und Weibchen in der sechsten Lebenswoche. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-30$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ für die Faktoren Geschlecht (S), Futter (D), Interaktion (I) im Vergleich zur Kontrollgruppe; ns – nicht signifikant, † $p<0,05$, †† $p<0,01$, ††† $p<0,001$ im Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe.

Diese Abbildung zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der Glukosetoleranztests der männlichen und weiblichen Tiere in der sechsten Lebenswoche. Es ergab sich ein signifikanter höherer Blutzucker durch die HFD bei Männchen und Weibchen im Vergleich zur NC. Es bestand eine gestörte Aufnahme von Zucker in die Gewebe, was einem Diabetes mellitus Typ II entspricht. Dies war durch die HFD verursacht. Das Geschlecht zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den Blutzucker.

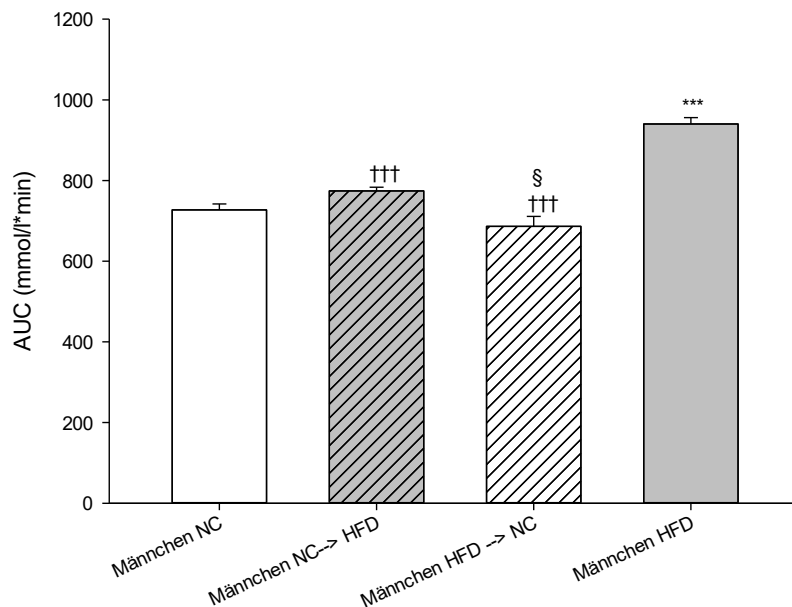


Abbildung 5 zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der intraperitonealen Glukosetoleranztests der Mannen inklusive der Futterwechselgruppen in der sechsten Lebenswoche. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-20$. *** $p<0,001$ im Vergleich zur NC Gruppe, ††† $p<0,001$ im Vergleich zur HFD Gruppe, § $p<0,05$ im Vergleich zur anderen Futterwechselgruppe.

Um die eine mögliche Reversibilität der HFD bedingten gestörten Glukosetoleranz zu untersuchen, erfolgte bei den männlichen Tieren ein Futterwechsel. Zum Zeitpunkt des Absetzens in der dritten Lebenswoche bekam der Nachwuchs das Futter der Muttertiere. Zusätzlich bekam ein Teil der Tiere, bei denen die Mütter das Kontrollfutter erhielten, eine HFD und umgekehrt. In der sechsten Lebenswoche ergab sich ein signifikanter höherer Blutzucker in der HFD Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen. Es bestand eine gestörte Aufnahme von Zucker in die Gewebe, was einem Diabetes mellitus Typ II entspricht. Dies war durch die HFD verursacht. Die Gruppe in welcher die Jungtiere auf das Kontrollfutter umgesetzt wurden, hatte einen geringeren Blutzucker als die Tiere der Gruppe, welche auf die HFD entwöhnt wurde. Die Tiere welche auf das Kontrollfutter entwöhnt wurden, zeigten einen niedrigeren Blutzucker als die auf die HFD entwöhnten Tiere. Die Auswirkungen der maternalen HFD auf den Blutzucker der Jungtiere zeigte sich schon nach 3 Wochen Kontrollfutter als reversibel.

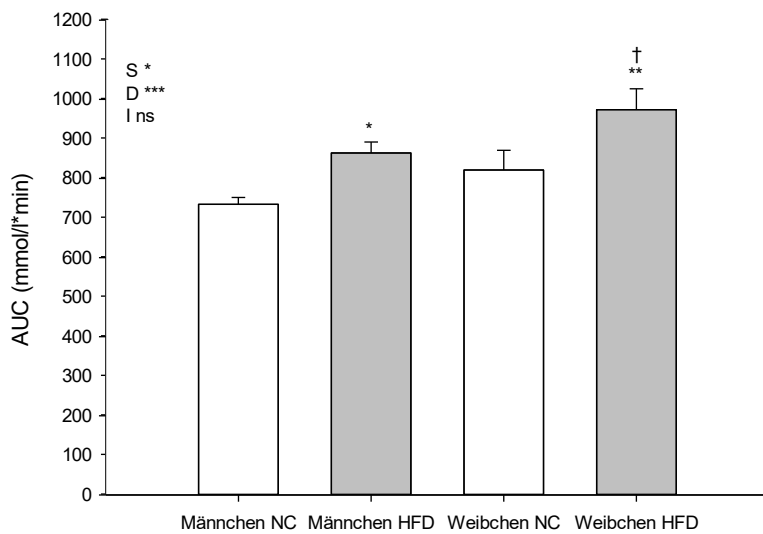


Abbildung 6 zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der intraperitonealen Glukosetoleranztests der Männchen und Weibchen in der achten Lebenswoche. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-30$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ für die Faktoren Geschlecht (S), Futter (D), Interaktion (I) im Vergleich zur Kontrollgruppe; ns – nicht signifikant, † $p<0,05$, †† $p<0,01$, ††† $p<0,001$ im Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe.

Diese Abbildung zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der Glukosetoleranztests der männlichen und der weiblichen Tiere in der achten Lebenswoche. Die HFD gefütterten Tiere zeigten einen höheren Blutzucker als die Kontrollgruppe. Die Auswirkung der HFD waren bei Weibchen zu diesem Zeitpunkt stärker ausgebildet als bei den Männchen. Es bestand eine gestörte Aufnahme von Zucker in die Gewebe, was einem Diabetes mellitus Typ II entspricht. Dies war durch die HFD verursacht. Das Futter und das Geschlecht waren Faktoren, welche den Blutzucker signifikant beeinflussen.

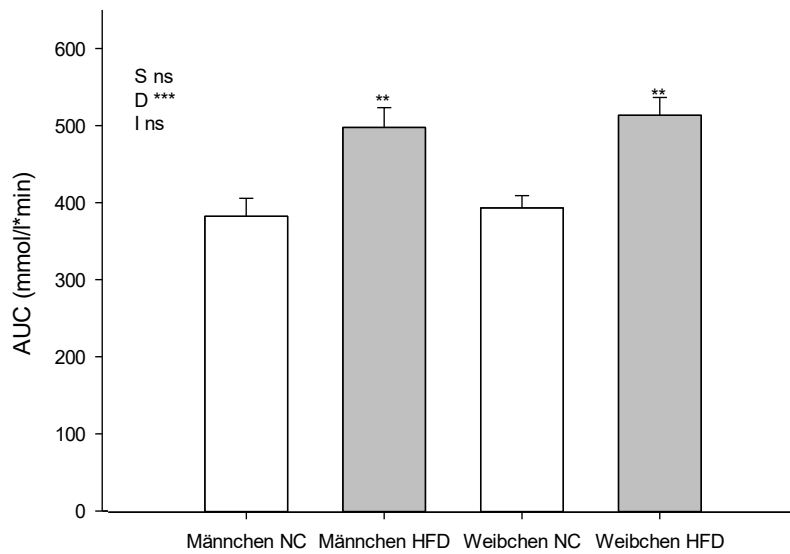


Abbildung 7 zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der intraperitonealen Insulintoleranztests in der achten Lebenswoche. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-30$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ für die Faktoren Geschlecht (S), Futter (D), Interaktion (I) im Vergleich zur Kontrollgruppe; ns – nicht signifikant, † $p<0,05$, †† $p<0,01$, ††† $p<0,001$ im Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe.

Diese Abbildung zeigt die Integrale der Insulintoleranztests der männlichen und weiblichen Tiere in der achten Lebenswoche. Es ergab sich ein signifikant höherer Blutzucker durch die HFD bei Männchen und Weibchen im Vergleich zur NC- Gruppe. Die durch Insulin stimulierte Aufnahme von Zucker in die Gewebe war wie bei Diabetes mellitus Typ II gestört.

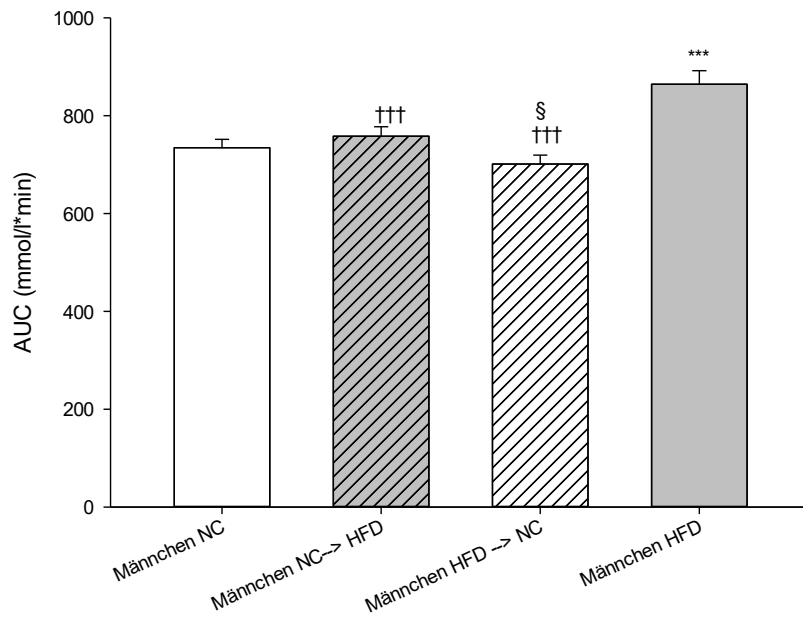


Abbildung 8 zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der intraperitonealen Glukosetoleranztests der Männchen inklusive der Futterwechselgruppen in der achten Lebenswoche. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-20$. *** $p<0,001$ im Vergleich zur NC Gruppe, ††† $p<0,001$ im Vergleich zur HFD Gruppe, § $p<0,05$ im Vergleich zur anderen Futterwechselgruppe.

Diese Abbildung zeigt die Glukosetoleranztests der Futterwechselgruppen in der achten Lebenswoche. Es zeigte sich ein signifikant höherer Blutzucker in der HFD Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen in der achten Lebenswoche. Dies wies auf eine gestörte Aufnahme von Zucker in die Gewebe hin, was einem Diabetes mellitus Typ II entspricht. Dies war durch die HFD verursacht. Die Gruppe, in welcher die Jungtiere auf das Kontrollfutter umgesetzt wurden, hatten einen geringeren Blutzucker, als die Tiere der Gruppe, welche auf die HFD entwöhnt wurde. Die Tiere welche auf das Kontrollfutter entwöhnt wurden zeigten einen niedrigeren Blutzucker als die auf die HFD entwöhnten Tiere. Die Auswirkungen der maternalen HFD auf den Blutzucker der Jungtiere zeigten sich auch nach fünf Wochen Kontrollfutter weiterhin als reversibel.

Hyperinsulinäme euglykämie Klemme in der achten Lebenswoche der männlichen Tiere

Zur genaueren Bestimmung der Insulintoleranz wurde eine Hyperinsulinäme euglykämie Klemme bei den männlichen Tieren in der achten Lebenswoche durchgeführt. Hier wird auf die signifikanten Ergebnisse eingegangen. In unserem Versuchsaufbau kann der Glukoseumsatz unter insulinstimulierten Bedingungen gemessen werden. Dieser war bei konstantem Blutzucker in der HFD Gruppe (8,1 mg/kg/min \pm 1,3), bei gleicher Glukoseinfusionsrate größer ($p=0,016$), als in der NC- Gruppe (4,4 mg/kg/min \pm 0,5). Zusätzlich kann die organgewichtsabhängige [¹⁴C] 2 Deoxyglukoseaufnahme des Herzens bestimmt werden.

[¹⁴C] 2 Deoxyglukoseaufnahme der HEK aus der achten Lebenswoche

	Männchen	
	NC	HFD
Herz	8,9±1,4	38,3±8,7**
Lunge	1,1±0,2	2,2±0,6
Leber	2,3±0,4	3,0±0,6
Pankreas	0,9±0,1	2,0±0,5*
Milz	0,5±0,1	3,4±0,6***
Nieren	27,8±12,3	31,9±8,4
Hodenfett	1,4±0,4	3,5±0,8*
M. soleus	2,8±0,5	26,6±8,1*
M. gastricnemii	1,7±0,3	4,4±0,4***
Gehirn	2,8±0,8	7,4±1,1**

Tabelle 5 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler der organgewichtsadaptierten [¹⁴C] 2 Deoxyglukoseaufnahme in mg/(kg*min) aus der achten Lebenswoche; * p<0.05, ** p<0,01, *** p<0.001 – HFD verglichen zu NC, n=6-7.

In diese Tabelle zeigt sich, dass die organgewichtsabhängige [¹⁴C] 2 Deoxyglukoseaufnahme des Herzens, der Milz, des Pankreas, des Hodenfetts, sowie in den Muskeln M. gastrocnemius und M. soleus in der HFD Gruppe signifikant größer waren als in der NC Gruppe.

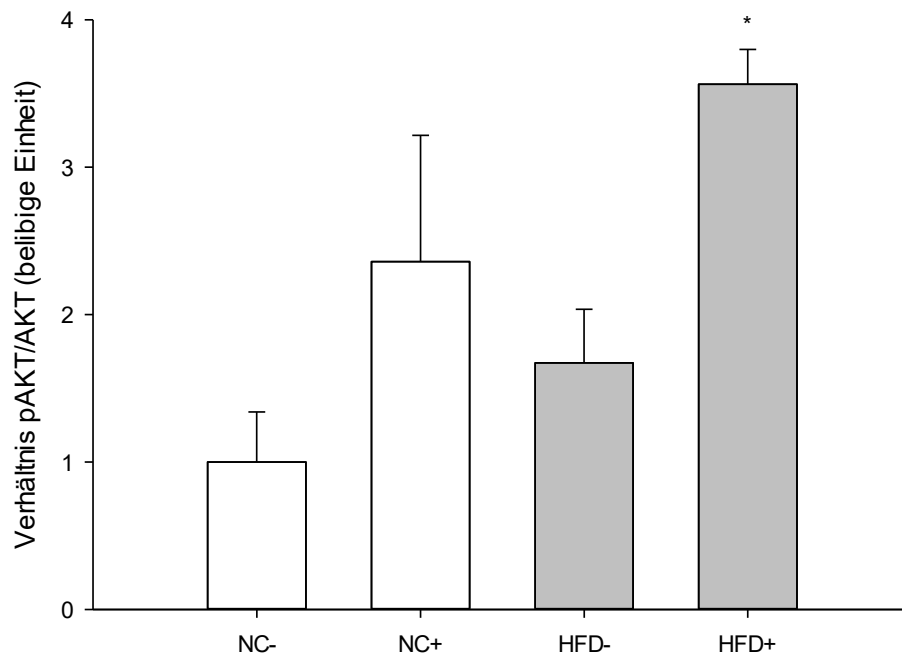


Abbildung 9 zeigt das Verhältnis pAKT/AKT des Herzens, der männlichen Tiere. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-6$. * $p<0,05$ im Vergleich zu NC+, mit „-“ angegebenen Gruppen sind nicht insulinstimuliert mit „+“ angegebenen Gruppen sind insulinstimuliert.

Diese Abbildung zeigt das Verhältnis der phosphorylierten Proteinkinase B (pAKT) zu der nicht phosphorylierten Proteinkinase B (AKT) in der achten Lebenswoche im Herzen der männlichen Tiere. Es ergab sich nach einer Stimulation mit Insulin eine signifikanter stärkere Phosphorylierung des AKT in der HFD Gruppe. Im direkten Vergleich der beiden Gruppen war die Aktivität der AKT erhöht.

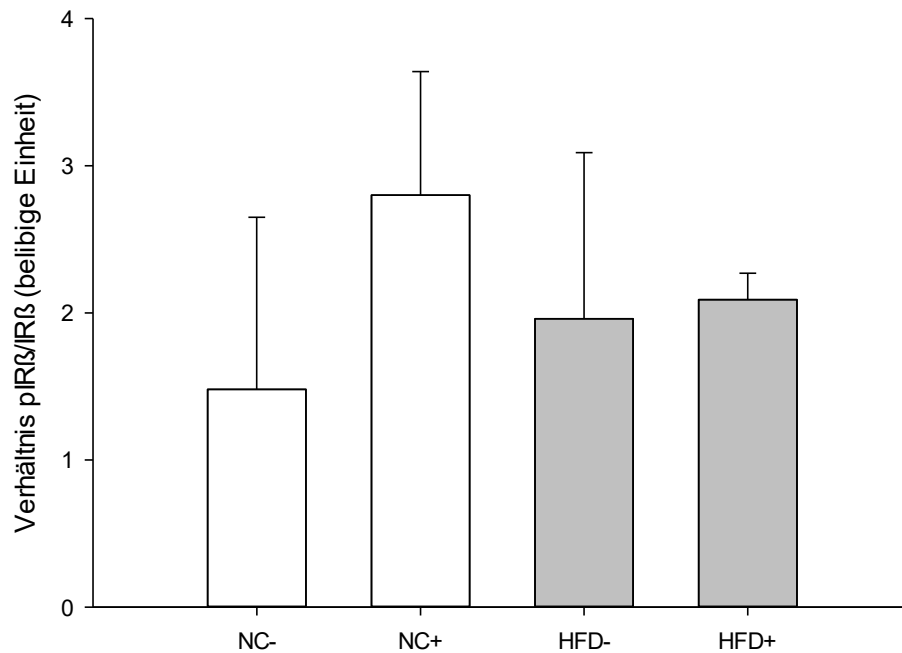


Abbildung 10 zeigt das Verhältnis pIR β /IR β des Herzens der männlichen Tiere. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, mit „-“ angegebenen Gruppen sind nicht insulinstimuliert mit „+“ angegebenen Gruppen sind insulinstimuliert.

Diese Abbildung zeigt das Verhältnis des phosphorylierten Insulinrezeptor β (pIR β) zu dem nicht phosphorylierten Insulinrezeptor β (IR β) der Herzen der männlichen Tiere in der achten Lebenswoche. Es zeigte sich bei gleicher Insulindosis keine unterschiedliche Phosphorylierung des Rezeptors zwischen den Futtergruppen.

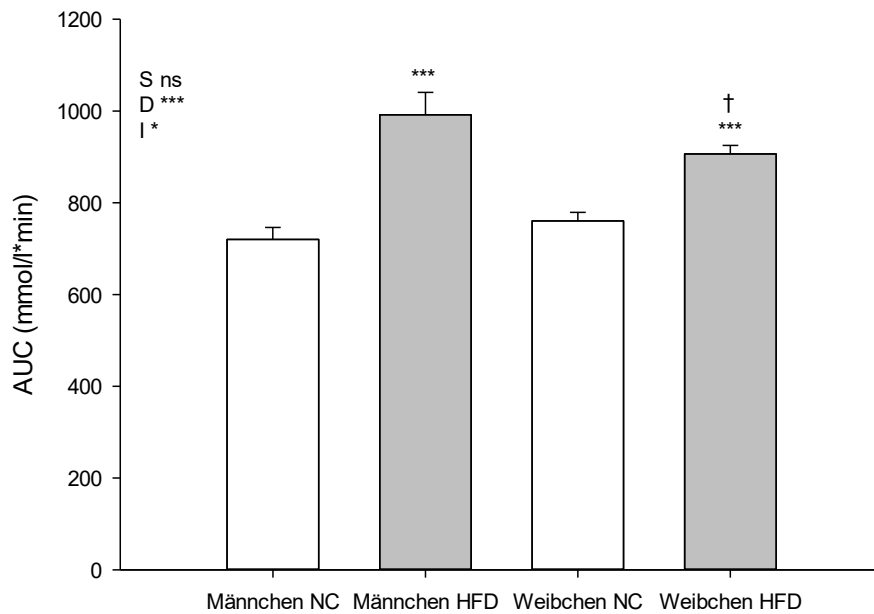


Abbildung 11 zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte der intraperitonealen Glukosetoleranztests in der zehnten Lebenswoche. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-30$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ für die Faktoren Geschlecht (S), Futter (D), Interaktion (I) im Vergleich zur Kontrollgruppe; ns – nicht signifikant, † $p<0,05$, †† $p<0,01$, ††† $p<0,001$ im Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe.

Diese Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Integrale der Blutzuckerwerte der Glukosetoleranztests der männlichen und weiblichen Tiere in der zehnten Lebenswoche. Es ergab sich ein signifikant höherer Blutzucker durch die HFD bei Männchen und Weibchen im Vergleich zur NC- Gruppe. Es bestand eine gestörte Aufnahme von Zucker in die Gewebe, was einem Diabetes mellitus Typ II entspricht. Dies war durch die HFD verursacht. Das Geschlecht allein zeigte keinen Einfluss auf die Blutzuckerwerte.

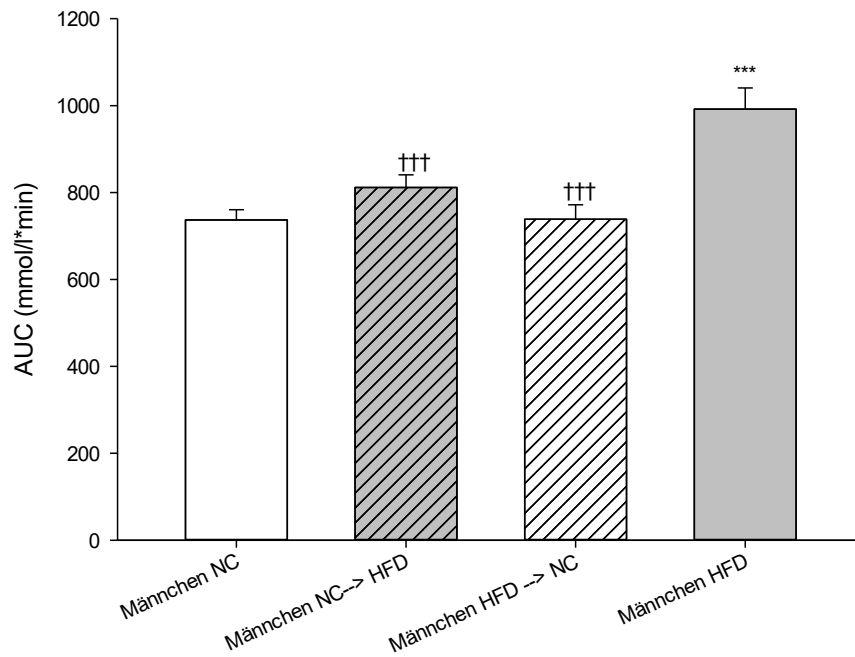


Abbildung 12 zeigt die Integrale der Blutzuckerwerte des intraperitonealen Glukosetoleranztest der Männchen inklusive der Futterwechselgruppen in der zehnten Lebenswoche. Die Graphen zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler, $n=5-7$. *** $p<0,001$ im Vergleich zur NC Gruppe, ††† $p<0,001$ im Vergleich zur HFD Gruppe.

Diese Abbildung zeigt die Glukosetoleranztests der Futterwechselgruppen in der zehnten Lebenswoche. Es ergab sich ein signifikanter höherer Blutzucker in der HFD Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen in der zehnten Lebenswoche. Es bestand eine gestörte Aufnahme von Zucker in die Gewebe, was einem Diabetes mellitus Typ II entspricht. Dies war durch die HFD verursacht. Die Gruppe in welcher die Jungtiere auf das Kontrollfutter umgesetzt wurden hatte einen geringeren Blutzucker als die Tiere der Gruppe, welche auf die HFD entwöhnt wurde. Die Tiere welche auf das Kontrollfutter entwöhnt wurden zeigten einen niedrigeren Blutzucker als die auf die HFD entwöhnten Tiere. Dies zeigte sich nicht signifikant.

5.3 Herzfunktion

Echokardiographie der Männchen und Weibchen in der dritten Lebenswoche

	Männchen		Weibchen		ANOVA		
	NC	HFD	NC	HFD	P _{sex}	P _{diet}	P _{inter}
HR (1/min)	318±7	374±15 **	402±14 †††	398±12	***	*	*
LVWT (mm)	1.6±0	1.7±0.1	2.2±0.1 †††	2.1±0.1 †††	***	ns	ns
LVIDd (mm)	0.87±0.03	0.87±0.05	1.11±0.05 †††	1.02±0.04 †††	***	ns	Ns
EF (%)	69.4±1.8	82±3.7 **	75.2±3.4	83.8±2.9	ns	**	ns
FS (%)	39.2±1.6	50±3.2 **	44.3±2.9	52.8±2.5 *	ns	***	ns
E (mm/s)	622.5±21.1	745.8±49.1 *	694.3±34.7	741.6±30	ns	**	ns
A (mm/s)	425.2±20.8	492±48	369.2±33.9	362.4±29.4 ††	**	ns	ns
DT (ms)	32.7±0.8	35.3±2.6	30±1.8	28.2±1.6 †	**	ns	ns
E' (mm/s)	30.5±1.4	25.7±2.7	32.9±2.2	43.7±1.9 *** †††	***	ns	***
A' (mm/s)	0.7±0.02	0.8±0.06	1±0.05 †††	1.1±0.04 †††	***	ns	ns
E/A	20.8±1	31.7±2.3 ***	21.9±1.6	17.2±1.4 †††	***	ns	***
E/E'	28.2±1.4	36.7±2.8 *	22±2.3 †††	23.1±2 †††	***	***	ns
E/DT (m/s ²)	16.2±1	21.4±2.4	24±1.7 †	26.9±1.5	**	ns	ns

Tabelle 6

Tabelle 6 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler der Echokardiographie aus der dritten Lebenswoche; two-way ANOVA wurde durchgeführt um Effekte des Geschlechts (p_{sex}), Futter (p_{diet}) und deren Interaktion (p_{inter}) festzustellen; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – HFD verglichen zu NC, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe, $n=4-10$, ns – nicht signifikant. HR – Herzfrequenz, LVWT – linksventrikuläre Wanddicke, LVIDd – Innerer Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole, EF – Ejection Fraction, FS – Fractional Shortening. E - Früheinstrom des Blutes in den linken Ventrikel, A - Späteinstrom des Blutes in den linken Ventrikel, DT - Dezelerationszeit der E Welle, E' - frühe Bewegung des septalen Mitralanulus, A' - späte Bewegung des septalen Mitralanulus, E/A – Verhältnis von E zu A, A/E' - Verhältnis von A zu E', E/DT- Verhältnis von E zu DT.

Tabelle 6 zeigt die Messwerte der echokardiographischen Untersuchung der männlichen und weiblichen Tiere in der dritten Lebenswoche. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich geschlechtsspezifische und futterspezifische Unterschiede. Geschlechtsspezifische Unterschiede zeigten sich in der Herzfrequenz. Diese war bei den weiblichen Tieren höher. Die Innendurchmesser der Herzen und die Wandstärke waren bei den Weibchen signifikant größer. DT als Parameter für die diastolische Funktion war bei den weiblichen Tieren signifikant kürzer. Die diastolischen Funktionsparameter E/A und E/E' zeigten sich bei den weiblichen Tieren signifikant kleiner als bei den männlichen Tieren. E/DT zeigte sich in den weiblichen Tieren signifikant größer. Diese Parameter deuten auf eine geschlechtsspezifisch Veränderte diastolische Funktion hin. Futterspezifisch zeigten sich die systolische Parameter EF und FS in der HFD Gruppe signifikant größer. Die diastolischen Parameter DT und E/DT zeigten sich in der HFD Gruppe der Männchen größer und die Parameter E/A und E/E' zeigten sich signifikant größer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies lässt auf eine diastolische Dysfunktion schließen. Bei den weiblichen Tieren zeigten sich die Parameter nicht signifikant unterschiedlich. Eine diastolischen Funktionsstörung bei den Weibchen war an den Parametern E/E' und E/DT erkennbar.

Echokardiographie der Männchen und Weibchen in der sechsten Lebenswoche

	Männchen		Weibchen		ANOVA		
	NC	HFD	NC	HFD	P _{sex}	P _{diet}	P _{inter}
HR (1/min)	423±7	410±7	393±10 ††	398±10	*	ns	ns
LVWT (mm)	2.9±0.1	2.9±0.1	2.9±0.2	3.5±0.2 * ††	*	ns	ns
LVIDd (mm)	6.5±0.1	6±0.1 **	5.6±0.2 †††	5.3±1.8 ††	***	**	ns
EF (%)	74±1.4	79.1±2.3 ***	79.1±2.3	89.1±2.3 **	*	***	ns
FS (%)	44.4±1.5	55.3±1.8 ***	48.8±2.5	60.7±2.5 **	*	***	ns
E (mm/s)	942.9±35.6	1047.8±35.6 *	916±50.3	828.2±50.3 ††	**	ns	*
A (mm/s)	508.3±40.1	557.1±40.1	589.3±56.7	505.1±56.7	ns	ns	ns
DT (ms)	31.5±1.6	30.6±1.6	31.9±2.2	34±2.2	ns	ns	ns
E' (mm/s)	52.5±3.3	54.6±3.3	66.3±4.6 ††	37.2±4.6 *** ††	ns	**	***
A' (mm/s)	33.1±2.5	40±2.5	38±3.5	24.7±3.5 * ††	ns	ns	**
E/A	2±0.2	2.1±0.2	1.6±0.3	1.7±0.3	ns	ns	ns
E/E'	18.5±1.3	19.8±1.3	15.4±1.8	22.9±1.8 **	ns	**	*
E/DT (m/s ²)	30.6±2.2	35.3±2.2	29.7±3.1	24.7±3.1 ††	*	ns	ns

Tabelle 7

Tabelle 7 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler der Echokardiographie aus der sechsten Lebenswoche; two-way ANOVA wurde durchgeführt um Effekte des Geschlechts (p_{sex}), Futter (p_{diet}) und deren Interaktion (p_{inter}) festzustellen ; * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0.001$ – HFD verglichen zu NC, † $p < 0,05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe, n=4-10, ns – nicht signifikant HR – Herzfrequenz, LVWT – linksventrikuläre Wanddicke, LVIDd – Innerer Durchmesser des linken Ventrikel in der Diastole, EF – Ejection Fraction, FS – Fractional Shortening. E - Früheinstrom des Blutes in den linken Ventrikel, A - Späteinstrom des Blutes in den linken Ventrikel, DT - Dezelerationszeit der E Welle, E' - Frühe Bewegung des septalen Mitralanulus, A' - Späte Bewegung des septalen Mitralanulus, E/A – Verhältnis von E zu A, A/E' - Verhältnis von A zu E', E/DT- Verhältnis von E zu DT.

Tabelle 7 zeigt die Messwerte der echokardiographischen Untersuchung der männlichen und weiblichen Tiere in der sechsten Lebenswoche. Zu diesem Zeitpunkt war das unterschiedliche Geschlecht maßgeblich für die gemessenen Unterschiede. Dies zeigte sich in einer höheren Herzfrequenz und einem größerer Innendurchmesser des Herzens der Männchen. Die systolischen Parameter EF und FS waren bei den HFD Tieren größer als bei den Kontrolltieren. Die Werte, die auf eine diastolische Funktionsstörung hinweisen (E, E', A' und E/DT), waren bei den HFD gefütterten Weibchen kleiner als die der NC Weibchen und den HFD Männchen. Es zeigten sich keine Veränderungen der diastolischen Funktion durch die HFD oder das Geschlecht.

Echokardiographie der Männchen der Futterwechselgruppe

	Männchen			
	NC	HFD→NC	NC→HFD	HFD
HR (1/min)	368±6	405±18	402±16	360±10
LVWT (mm)	3.2±0.1	3.35±0.12	3.41±0.12	3.6±0.1 *
LVIDd (mm)	7.2±0.2	6.8±0.2	7±0.2	7.2±0.2
EF (%)	80.1±2.2	80.2±1.8	82.9±2.3	85.4±1.4
FS (%)	51±2	50.5±2.1	53.8±2.8	56.7±2
E (mm/s)	951±42	932.6±31.7	961.9±56	991±56
A (mm/s)	613±54	501.5±32.6	503±27.8	712±22 † \$
DT (ms)	33.4±1.5	32.7±1	31.4±3.5	37.3±2.7
E' (mm/s)	60.8±3.1	55±4.3	54.5±3.3	52.2±2.9
A' (mm/s)	38.5±3	41.5±6.1	30.6±1.4	52.3±2.9 * \$
E/A	1.6±0.1	1.9±0.2	2±0.2	1.4±0.1
E/E'	16.1±1.2	17.5±1.1	18.1±1.7	19.4±1.4
E/DT (m/s ²)	29.5±2.5	28.7±1.4	37±5.5	27.5±1.9

Tabelle 8 zeigt die Mittelwerte ± Standardfehler der Echokardiographie; one-way ANOVA wurde durchgeführt um Effekte des Geschlechts (p_{sex}), Futter (p_{diet}) und deren Interaktion (p_{inter}) festzustellen ; * $p < 0.05$ – verglichen zur NC, † $p < 0,05$, Vergleich zu HFD→ NC Gruppe, \$ $p < 0,05$ im Vergleich zur NC → HFD Gruppe, n=4-10. HR – Herzfrequenz, LVWT – linksventrikuläre Wanddicke, LVIDd – Innerer Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole, EF – Ejection Fraction, FS – Fractional Shortening. E - Früheinstrom des Blutes in den linken Ventrikel, A - Späteinstrom des Blutes in den linken Ventrikel, DT - Dezelerationszeit der E Welle, E' - frühe Bewegung des septalen Mitralanulus, A' - späte Bewegung des septalen Mitralanulus, E/A – Verhältnis von E zu A, A/E' - Verhältnis von A zu E', E/DT- Verhältnis von E zu DT.

Tabelle 8 zeigt die Messparameter der Echokardiographie der männlichen Tiere der Futterwechselgruppe aus der achten Lebenswoche und die der männlichen Tiere bei denen das Futter nicht gewechselt wurde aus der zehnten Woche. Es zeigte sich eine dickere linksventrikuläre Wand (LVWT) bei den HFD Tieren im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe. Die Futterwechseltiere, bei denen die Mütter die HFD und der Nachwuchs die NC bekamen zeigten eine ähnliche systolische Funktion wie die Kontrolltiere selbst. Bei den Futterwechseltieren welche auf die HFD entwöhnt wurden lag die systolische Funktion näher an den HFD Tieren. Der diastolische Parameter A zeigten sich bei den HFD Tieren im Vergleich zu den Futterwechseltieren als signifikant größer. Die weiteren Parameter zur Beurteilung der diastolischen Funktion zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Echokardiographie der Männchen und Weibchen in der zehnten Lebenswoche

	Männchen		Weibchen		ANOVA		
	NC	HFD	NC	HFD	P _{sex}	P _{diet}	P _{inter}
HR (1/min)	368±6	360±10	350±10	354±6	ns	ns	ns
LVWT (mm)	3.2±0.1	3.6±0.1	3,3±0.2	3.4±0.2	ns	ns	ns
LVIDd (mm)	7.2±0.2	7.2±0.2	6.1±0.1	6.9±0.2	**	ns	ns
EF (%)	80.1±2.2	85.4±1.4 *	72.5±1.2 †	85±2.1 **	ns	***	ns
FS (%)	51±2	56.7±2 *	42.5±1.1 †	56.5±3 **	ns	***	ns
E (mm/s)	951±42	991±56	662±23 ††	1024±80 **	*	**	*
A (mm/s)	613±54	712±22	463±29	856±76 ***	ns	***	*
DT (ms)	33.4±1.5	37.3±2.7	28±2	33.8±1.8	ns	ns	ns
E' (mm/s)	60.8±3.1	52.2±2.9 *	37.6±2 †††	48±4	***	ns	*
A' (mm/s)	38.5±3	52.3±2.9 **	28.1±0.9	77.4±5.7 *** †††	ns	***	***
E/A	1.6±0.1	1.4±0.1	1.5±0.1	1.20±0.04	ns	ns	ns
E/E'	16.1±1.2	19.4±1.4	17.7±0.6	21.8±2.2	ns	*	ns
E/DT (m/s ²)	29.5±2.5	27.5±1.9	24±1	30.9±3.5	ns	ns	ns

Tabelle 9

Tabelle 9 zeigt die Mittelwerte \pm Standardfehler der Echokardiographie aus der zehnten Lebenswoche; 2-way ANOVA wurde durchgeführt um Effekte des Geschlechts (p_{sex}), Futter (p_{diet}) und deren Interaktion (p_{inter}) festzustellen; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – HFD verglichen zu NC, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ Vergleich zu Männchen derselben Futtergruppe, n=4-10, ns – nicht signifikant. HR – Herzfrequenz, LVWT – linksventrikuläre Wanddicke, LVIDd – Innerer Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole, EF – Ejection Fraction, FS – Fractional Shortening. E - Früheinstrom des Blutes in den linken Ventrikel, A - Späteinstrom des Blutes in den linken Ventrikel, DT - Dezelerationszeit der E Welle, E' - frühe Bewegung des septalen Mitralanulus, A' - späte Bewegung des septalen Mitralanulus, E/A – Verhältnis von E zu A, A/E' - Verhältnis von A zu E', E/DT- Verhältnis von E zu DT.

Tabelle 9 zeigt die Messwerte der echokardiographischen Untersuchung der männlichen und weiblichen Tiere in der zehnten Lebenswoche. Die systolischen Parameter EF und FS waren futterabhängig und in den HFD Gruppen signifikant größer als in den NC- Gruppen. Die diastolischen Parameter DT und E/DT zeigten sich in den HFD Gruppen tendenziell und E/E' als signifikant erhöht. Dies war hinweisend auf eine futterabhängig gestörte diastolische Funktion.

6 Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass die von uns verwendete HFD zu einer deutlichen Gewichtssteigerung der Tiere führte. Die Gabe einer HFD für Rattenmütter während der sechswöchigen Trag- und Laktationszeit verändert schon zum Zeitpunkt des Absetzens der männlichen und weiblichen Jungtiere die Glukose- und Insulintoleranz. Diese Veränderungen deuten auf einen Diabetes mellitus Typ II hin. Die bestehenden Störungen des Insulin- und Glukosestoffwechsels ließen sich durch die weitere Gabe der HFD beibehalten und waren bei der kontinuierlichen Gabe am stärksten ausgeprägt. Die echokardiographisch nachweisbare Erhöhung der linksventrikulären Funktion in den Tieren der HFD Gruppen bleibt über den Untersuchungszeitraum bestehen. Die beginnende Hypertrophie und die diastolische Funktionsstörung in den HFD Gruppen könnten durch die vermehrte Phosphorylierung von AKT vermittelt sein (DeBosch et al. 2006b, Savage et al. 1990). Ein Wechsel des Futters der Jungtiere auf das Kontrollfutter zum Zeitpunkt des Absetzens zeigte eine Reversibilität der Glukose- und Insulintoleranz. Die alleinige Gabe nach der Trag- und Laktationszeit scheint nicht ausreichend um die HFD bedingten Veränderungen des Gewichts, in der Glukose- und Insulintoleranz sowie den echokardiographischen Beobachtungen hervor zu rufen. Ein Wechsel des Futters der Jungtiere auf die HFD zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Glukose- und Insulintoleranz im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie zur HFD Gruppe.

Zuerst möchte ich die Gewichtsentwicklung diskutieren. Eine in der Literatur beschriebene Auswirkung einer HFD ist eine stärkere Zunahme des Gesamtgewichts von Ratten im Vergleich zum Kontrollfutter. Eine Arbeitsgruppe konnte dies schon nach dem Absetzen der Jungtieren von ihren Müttern beobachten (Tamashiro et al. 2009). Bei Männchen und Weibchen der HFD Gruppe zeigte sich eine HFD bedingte größere Zunahme des Körpergewichtes der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum. Die Zunahme des Gesamtgewichts ist neben dem Wachstum vor allem durch die größere Zunahme der Fettmasse in den HFD Gruppen erklärbar. Die Arbeitsgruppe um Tamashiro fand eine HFD bedingte Zunahme des Fettgewichts in Bezug auf das Gesamtgewicht der Tiere. Die Leber der HFD Tiere war deutlich schwerer als die der Kontrolltiere. Hier ist eine Zunahme des Fettanteils der Leber verantwortlich (Song et

al. 2012, Yokomizo et al. 2014). Eine Erhöhung des Gewichtes mit dem Nachweis einer Zunahme von Fettgewebe lässt auf eine Fettleibigkeit schließen.

Kommen wir nun zu den mit Fettleibigkeit assoziierten Veränderungen der Glukose- und Insulintoleranz. Die Glukosetoleranztests zeigten zu allen Zeitpunkten eine durch die HFD verursachte gestörte Glukosetoleranz bei Männchen und Weibchen. Bei Männchen ist dieser Effekt in der Literatur beschrieben (Tamashiro et al. 2009, Cuthbert et al. 2017, Song et al. 2012). In unserem Versuchsaufbau konnte das bei weiblichen Tieren noch nicht gezeigt werden. Der Glukosetoleranztest lässt nur indirekt den Schluss auf eine gestörte Insulinempfindlichkeit zu, sodass wir zusätzlich Insulintoleranztests durchführten. Diese zeigten eine gestörte Insulintoleranz bei den mit HFD gefütterten männlichen und weiblichen Tieren. In unserem Versuchsaufbau konnte das noch nicht gezeigt werden. Es zeigte sich eine systemisch gestörte Insulintoleranz bei Männchen und Weibchen. Die HFD verursacht eine gestörte Glukose- und Insulintoleranz entsprechend einem Diabetes mellitus Typ II. Zur Ausprägung eines phänotypischen Diabetes mellitus Typ II in der Wachstumsphase der Tiere scheint die Exposition der Mütter mit der HFD entscheidend zu sein (Yokomizo et al. 2014). Vergleicht man die Glukose- und Insulintoleranztests der männlichen und weiblichen Tiere unter HFD gab es teilweise signifikante Unterschiede. In der dritten, vierten und zehnten Lebenswoche zeigen die männlichen Tiere im GTT einen höheren Blutzucker als die weiblichen Tiere. Im ITT der dritten Woche und im GTT der achten Woche sind die durchschnittlichen Blutzuckerwerte bei den weiblichen Tieren höher. Der genaue Grund für die unterschiedliche Reaktion von männlichen und weiblichen Tieren auf Insulin bzw. Glukose während der Toleranztests ist nicht bekannt (Mauvais-Jarvis 2018). Angenommen wird eine unterschiedliche Expression von Genen in der Placenta. Diese ist geschlechtsabhängig und lässt sich von der Gabe einer HFD schon vor der Geburt verändern (Mao et al. 2010). Das Geschlecht hat in den verschiedenen Phasen des Aufwachsens einen Einfluss auf den Blutzuckerspiegel. Hierfür werden die unterschiedlichen Effekte der Geschlechts- und Wachstumshormone und der unterschiedliche Anteil von Muskelmasse zwischen Männchen und Weibchen verantwortlich gemacht (Mauvais-Jarvis 2018). Wir konnten einen Diabetes mellitus Typ II bei Männchen und Weibchen nachweisen. Über den zeitlichen Verlauf sind die Ausprägungen bei männlichen und weiblichen Tieren unterschiedlich stark ausgeprägt.

Die HFD war in der Lage das Äquivalent zu einem adipösen Patienten mit Diabetes mellitus Typ II abzubilden.

Um organspezifische Insulinresistenzen nachzuweisen, wurde eine hyperinsulinäme euglykämie Klemme (HEK) mit den männlichen Jungtieren durchgeführt. Die Daten der HEK in der dritten Lebenswoche lassen auf eine gestörte systemische Glukosetoleranz schließen. Dieses Ergebnis unterstreicht die Daten aus den Glukose- und Insulintoleranztests. In der achten Lebenswoche zeigte sich ein gesteigerter Glukoseumsatz unter Insulinstimulation in der HFD- Gruppe. Außerdem war eine größere Aufnahme von [¹⁴C] 2 Deoxyglukose in Herz, Milz, Muskel, Pankreas und Hodenfett in der HFD- Gruppe sichtbar. Eine gesteigerte Aufnahme des Tracers kann mit einer veränderten insulinstimulierten Phosphorylierung des Insulinrezeptors β einhergehen, sodass wir diesen als wichtigen Bestandteil der Insulinkaskade (Riehle und Abel 2016) im Herzen untersuchten. Ein Unterschied der insulinstimulierten Phosphorylierung des Insulinrezeptors β im Herzmuskel der HFD Gruppe zur NC Gruppe zeigte sich nicht. Eine herzspezifische Insulinresistenz ist nicht ablesbar und die gesteigerte insulinstimulierte [¹⁴C] 2 Deoxyglukoseaufnahme ist nicht auf die veränderte Aktivität des Insulinrezeptor β zurückzuführen. Die gesteigerte Aufnahme des Tracers ist ein nicht erwartetes Ergebnis. Die Daten der ITT und GTT führten zu der Erwartung, dass die Glukoseinfusionsrate und die organspezifische Aufnahme der [¹⁴C] 2 Deoxyglukose in der HFD Gruppe kleiner sei als in der Kontrollgruppe. Dies konnten wir nicht zeigen. Eine Ursache könnte darin liegen, dass unter basalen Bedingungen die geschwindigkeitsabhängige Glukoseaufnahme in die Zelle durch die Glukosetransporter (GLUTs) determiniert ist. Unter Insulinstimulation ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt jedoch die Hexokinase, welche Glukose phosphoryliert und der Glukolyse zuführt (Fueger 2005). Nun hat die Hexokinase eine höhere Affinität zu Glukose als zu dem hier verwendeten Tracer [¹⁴C] 2 Deoxyglukose (Doenst et al. 1998). Daher ist seine Akkumulation in der Zelle unterschätzt. Für die Auswertung der Ergebnisse der HEK ist die Messung des Tracers im Blut notwendig. Die Blutproben wurden aus der Schwanzspitze entnommen. Hier beschreiben Wassermann et al., dass der Blutfluss zur Schwanzspitze nicht frei ist. Durch das Quetschen der Schwanzspitze zur Gewinnung der Blutprobe sind die Blutwerte nicht sicher reproduzierbar (Wasserman et al. 2009). Zusätzlich ist eine Stressreaktion auf den Schwanzspitzenschnitt messbar

(Ayala et al. 2006). Diese führt zu einer Veränderung des Glukosestoffwechsels, wie genau ist bisher nicht bekannt. Die Abhilfe dieses Problems könnte in der Anlage eines weiteren Katheters in ein Gefäß zur sicheren Blutgewinnung liegen. Aber auch hier gibt es Limitationen, da eine weitere Katheteranlage den Versuch zusätzlich verlängert. Insbesondere bei längerer Anwendung ab 90 Minuten Dauer sind Blutzuckererhöhungen beschrieben (Windelov et al. 2016). Die Dauer der HEK lag zu Beginn der konstanten Blutzuckereinstellung mindestens bei 90 Minuten. Daher ist hier eine Überschätzung der Traceraufnahme in die Organe während der HEK denkbar. Außerdem ist das Blutvolumen der Tiere zu berücksichtigen, da Spülung der Katheter und Verwerfung von Blut vor der eigentlichen Probengewinnung notwendig sind. Eine weitere Ursache für unterschiedliche Ergebnisse liegt in dem durch die Narkose veränderten Glukosestoffwechsel. Wir führten Isoflurannarkosen durch. Diese erhöhen den Blutzuckerspiegel von Nagern (Windelov et al. 2016). In unserem Versuchsaufbau ist die Durchführung der HEK ohne Narkose nicht möglich. Die Durchführung der HEK an wachen Tieren wird kritisch betrachtet, da die Aktivität der Tiere und die damit verbundenen Veränderungen im Glukosestoffwechsel einer starken interindividuellen Schwankung unterliegen. Weitere Möglichkeiten für Ungenauigkeiten sind tageszeitliche Schwankungen im Glukosestoffwechsel. Hier sind hohe interindividuelle Schwankungen der Glukoseinfusionsraten bis zu 15% und damit verbundene ungünstige Insulindosierungen in den Tieren beschrieben (Heise et al. 2016). Trotz der diskutierten und in der Literatur bekannten Limitationen und der sehr variablen Durchführung der HEK, gilt diese als Goldstandard bei der Bestimmung der Insulinresistenz (Becker 2011). Organspezifische Insulinresistenzen konnten wir in der HEK nicht zeigen. Die systemische Insulin- und Glukoseresistenz, wie sie bei Diabetes mellitus Typ II vorkommen, konnten in der HEK belegt werden.

Kommen wir zu den echokardiographischen Ergebnissen. Verschiedene Herzfunktionsstörungen sind bei fettleibigen Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ II nachweisbar. Unsere Untersuchungen zeigten einen verdickten linken Ventrikel als Zeichen einer linksventrikulären Hypertrophie. Unterstützt wird diese Beobachtung auch durch das signifikant größere Herz im Vergleich zum Körpergewicht schon direkt nach dem Absetzen der Jungtiere. Nicht nur eine Hypertrophie des Ventrikels, sondern auch diastolische Funktionsstörungen lassen sich bei Diabetes mellitus beobachten.

Die diastolische Funktion ist schwierig zu interpretieren, da im Allgemeinen mehrere Parameter in Kombination und im Verhältnis zueinander auf eine diastolische Funktionsstörung hinweisen. Die Arbeitsgruppe um Jeong und Dudley stellte heraus, dass DT und das Verhältnis von E/A erst größer und im Verlauf der zunehmenden diastolischen Funktionsstörung kleiner wird. Unsere Messwerte der Parameter DT und E/A deuten während der Untersuchungen auf eine diastolische Dysfunktion hin. Das Verhältnis E/E' ist bei diastolischer Dysfunktion erhöht (Nguyen et al. 2013). Wir konnten bei E/E' eine futterspezifische Erhöhung über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigen. Wir gehen daher von einer gestörten diastolischen Funktionsstörung aus. In der Literatur sind diastolische Dysfunktionen bei Diabetikern unabhängig vom Typ häufig (Bertoni et al. 2003, Bella et al. 2001, Di Carli et al. 2003, Mdaki et al. 2016). Dies wird auf eine gestörte Mikrozirkulation zurückgeführt (Di Carli et al. 2003). Eine Arbeitsgruppe mit ähnlichem Versuchsaufbau (HFD 40% Kilokalorien aus dem Fettanteil, (Sprague Dawley Ratte)) um Baack konnte bei männlichen HFD Tieren eine reduzierte diastolische bei unveränderter systolischer Funktion im Alter von drei Wochen feststellen (Baack et al. 2016). Die Arbeitsgruppe um Christopher et. al konnte keine HFD bedingte Veränderung der diastolischen Funktion feststellen (Christopher et al. 2010). Eine diastolische Funktionsstörung ist insbesondere bei der über den Zeitraum der Versuche bestehenden Insulinresistenz ein zu erwartendes Ergebnis. Neben der diastolischen Funktion wurde auch die systolische Funktion gemessen. Wir konnten eine HFD bedingte Zunahme der systolischen Funktion bei Männchen und Weibchen zu jedem Zeitpunkt nachweisen. Eine echokardiographische Differenzierung von weiblichen und männlichen Ratten in unserem Versuchsaufbau, ließen sich in der Literatur nicht finden. Bei männlichen Ratten ist eine reduzierte systolische Funktion beschrieben (Mdaki et al. 2016, Leopoldo et al. 2010). Keinen Unterschied in der systolischen Funktion bei männlichen Ratten sah die Arbeitsgruppe um Christopher (Christopher et al. 2010). Bei männlichen Mäusen ist eine reduzierte systolische Funktion beschrieben (Louwe et al. 2012). Bei weiblichen Mäusen fand die Arbeitsgruppe um Louwe keine Unterschiede in der systolischen Funktion.

Die Ursachen für eine Verbesserung der Kontraktilität des Herzens sind vielfältig. Ein zentrales Protein ist AKT und kann verantwortlich für die gesteigerte systolische Funk-

tion sein (Catalucci et al. 2009). Wir untersuchten die insulinstimulierte Phosphorylierung der AKT im Herzen. Wir konnten eine Erhöhung der insulinstimulierten Phosphorylierung von AKT bei den männlichen HFD- Tieren zeigen. Eine Erhöhung der Phosphorylierung von AKT im Skelettmuskel (Sjoberg et al. 2015) und im Fettgewebe (Litzenburger et al. 2020) von mit einer HFD gefütterten Nagetieren ist bereits gezeigt worden. Als Ursache hierfür wird eine erhöhte intrazelluläre Antwort auf Insulin verantwortlich gemacht (DeBosch et al. 2006a, Hoehn et al. 2008). Dies ist ein Zeichen des erhöhten insulinstimulierten anabolen Stoffwechsels. Die Erhöhung der phosphorylierten AKT und die damit verbundene Steigerung der Proteinsynthese können die Ursache für die Hypertrophie des Herzens sein (DeBosch et al. 2006b, Savage et al. 1990). Das Herz hat eine durch den erhöhten Insulinspiegel gesteigerte Proteinsynthese (Iliadis et al. 2011, O'Neill und Abel 2005), sowie eine verminderte Apoptose (Mangi et al. 2003) und einen verminderten Proteinabbau (McNulty et al. 1995). Dies könnte insbesondere für das wachsende Herz von Bedeutung sein. Da anabole Prozesse gesteigert, katabole Prozesse und Apoptose reduziert sind, kommt es zu einer Vergrößerung des Myokards (Iacobellis et al. 2003). Einer Steigerung der systolischen Funktion und damit die Erhöhung des Herz- Zeitvolumens sind die Folge. Die Steigerung des Herz- Zeitvolumens ist notwendig, da die Durchblutung des schwereren Organismus gewährleistet sein muss. Bei unseren adipösen Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage liegt im Rahmen des Aufwachsens wahrscheinlich eine gesteigerte Proteinsynthese im Herzen vor, welche zu einer verbesserten systolischen Herzfunktion führt. Die Hypertrophie des linken Ventrikels, sowie die diastolische Funktionsstörung in Kombination mit der Insulinresistenz können der frühen Stufe der diabetischen Kardiomyopathie nach Goyal und Mehta zugeordnet werden (Goyal und Mehta 2013). Die verbesserte systolische Funktion ist eine Kompensation, welche in den jungen Tieren noch möglich ist. In Zukunft könnte eine getrennte Betrachtung von Männchen und Weibchen in Versuchen zur Klärung des bisher nur unzureichend verstandenen Obesity paradox beizutragen (Parto und Lavie 2017).

7 Schlussfolgerung

In der Arbeit wurde gezeigt, dass eine HFD während der Trag- und Laktationszeit das Gewicht, die Glukose- und die Insulintoleranz schon zum Zeitpunkt des Absetzens der Jungtiere von Ihren Müttern verändert. Die Auswirkung der maternalen HFD auf die Glukose- und Insulintoleranztests der Jungtiere war besonders stark ausgeprägt, wenn sie nach dem Absetzen weiter gegeben wurde und waren reversibel, wenn die Jungtiere auf das Kontrollfutter entwöhnt wurden. Die gesteigerte systolische, die gestörte diastolische Funktion und die tendenzielle Hyperthrophie des Ventrikels der HFD Tiere blieb über den Versuchszeitraum bestehen. Die verstärkte Phosphorylierung von AKT in den HFD Tieren könnte hier ursächlich sein.

Literaturverzeichnis

- Aldhoon-Hainerova I, Zamrazilova H, Dusatkova L, Sedlackova B, Hlavaty P, Hill M, Hampl R, Kunesova M, Hainer V. 2014. Glucose homeostasis and insulin resistance: prevalence, gender differences and predictors in adolescents. *Diabetol Metab Syndr*, 6 (1):100.
- Ayala JE, Bracy DP, McGuinness OP, Wasserman DH. 2006. Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse. *Diabetes*, 55 (2):390-397.
- Baack ML, Forred BJ, Larsen TD, Jensen DN, Wachal AL, Khan MA, Vitiello PF. 2016. Consequences of a Maternal High-Fat Diet and Late Gestation Diabetes on the Developing Rat Lung. *PLoS One*, 11 (8):e0160818.
- Becker RHA. 2011. Pharmacodynamic Evaluation: Diabetes Methodologies. In: Vogel HG, Maas J, Gebauer A, Hrsg. *Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 457-481.
- Bella JN, Devereux RB, Roman MJ, Palmieri V, Liu JE, Paranicas M, Welty TK, Lee ET, Fabsitz RR, Howard BV. 2001. Separate and joint effects of systemic hypertension and diabetes mellitus on left ventricular structure and function in American Indians (the Strong Heart Study). *Am J Cardiol*, 87 (11):1260-1265.
- Bertoni AG, Tsai A, Kasper EK, Brancati FL. 2003. Diabetes and idiopathic cardiomyopathy: a nationwide case-control study. *Diabetes Care*, 26 (10):2791-2795.
- Bi S, Chen J, Behles RR, Hyun J, Kopin AS, Moran TH. 2007. Differential body weight and feeding responses to high-fat diets in rats and mice lacking cholecystokinin 1 receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293 (1):R55-63.
- Braunschweig F, Cowie MR, Auricchio A. 2011. What are the costs of heart failure? *Europace*, 13 Suppl 2:ii13-17.
- Cade WT, Tinius RA, Reeds DN, Patterson BW, Cahill AG. 2016. Maternal Glucose and Fatty Acid Kinetics and Infant Birth Weight in Obese Women With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 65 (4):893-901.
- Catalucci D, Latronico MV, Ceci M, Rusconi F, Young HS, Gallo P, Santonastasi M, Bellacosa A, Brown JH, Condorelli G. 2009. Akt increases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling by direct phosphorylation of phospholamban at Thr17. *J Biol Chem*, 284 (41):28180-28187.
- Chamberlain AM, Dunlay SM, Gerber Y, Manemann SM, Jiang R, Weston SA, Roger VL. 2017. Burden and Timing of Hospitalizations in Heart Failure: A Community Study. *Mayo Clin Proc*, 92 (2):184-192.
- Chen YT, Vaccarino V, Williams CS, Butler J, Berkman LF, Krumholz HM. 1999. Risk factors for heart failure in the elderly: a prospective community-based study. *Am J Med*, 106 (6):605-612.
- Christopher BA, Huang HM, Berthiaume JM, McElfresh TA, Chen X, Croniger CM, Muzic RF, Jr., Chandler MP. 2010. Myocardial insulin resistance induced by high fat feeding in heart failure is associated with preserved contractile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299 (6):H1917-1927.
- Clark AL, Chyu J, Horwich TB. 2012. The obesity paradox in men versus women with systolic heart failure. *Am J Cardiol*, 110 (1):77-82.

- Cundy T, Gamble G, Townend K, Henley PG, MacPherson P, Roberts AB. 2000. Perinatal mortality in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*, 17 (1):33-39.
- Cuthbert CE, Foster JE, Ramdath DD. 2017. A maternal high-fat, high-sucrose diet alters insulin sensitivity and expression of insulin signalling and lipid metabolism genes and proteins in male rat offspring: effect of folic acid supplementation. *Br J Nutr*, 118 (8):580-588.
- Dabelea D, Knowler WC, Pettitt DJ. 2000. Effect of diabetes in pregnancy on offspring: follow-up research in the Pima Indians. *J Matern Fetal Med*, 9 (1):83-88.
- DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, Courtois M, Muslin AJ. 2006a. Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J Biol Chem*, 281 (43):32841-32851.
- DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ. 2006b. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*, 113 (17):2097-2104.
- DECODE_study_group. 1999. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. *Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe. Lancet*, 354 (9179):617-621.
- Deutsche_Diabetes_Gesellschaft. 2017. *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2017*.
- Di Carli MF, Janisse J, Grunberger G, Ager J. 2003. Role of chronic hyperglycemia in the pathogenesis of coronary microvascular dysfunction in diabetes. *J Am Coll Cardiol*, 41 (8):1387-1393.
- Doenst T, Han Q, Goodwin GW, Guthrie PH, Taegtmeyer H. 1998. Insulin does not change the intracellular distribution of hexokinase in rat heart. *Am J Physiol*, 275 (4 Pt 1):E558-567.
- Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. 2012. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*, 307 (5):491-497.
- Fueger PT. 2005. Glucose phosphorylation as a barrier to muscle glucose uptake. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32 (4):314-318.
- Galtier-Dereure F, Boegner C, Bringer J. 2000. Obesity and pregnancy: complications and cost. *Am J Clin Nutr*, 71 (5 Suppl):1242S-1248S.
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB, American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S. 2013. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 127 (1):e6-e245.
- Gottdiener JS, Arnold AM, Aurigemma GP, Polak JF, Tracy RP, Kitzman DW, Gardin JM, Rutledge JE, Boineau RC. 2000. Predictors of congestive heart failure in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*, 35 (6):1628-1637.

- Goyal BR, Mehta AA. 2013. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiological mechanisms and cardiac dysfunction. *Hum Exp Toxicol*, 32 (6):571-590.
- Heise T, Zijlstra E, Nosek L, Heckermann S, Plum-Morschel L, Forst T. 2016. Euglycaemic glucose clamp: what it can and cannot do, and how to do it. *Diabetes Obes Metab*, 18 (10):962-972.
- Heslehurst N, Vieira R, Akhter Z, Bailey H, Slack E, Ngongalah L, Pemu A, Rankin J. 2019. The association between maternal body mass index and child obesity: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*, 16 (6):e1002817.
- Hoehn KL, Hohnen-Behrens C, Cederberg A, Wu LE, Turner N, Yuasa T, Ebina Y, James DE. 2008. IRS1-independent defects define major nodes of insulin resistance. *Cell Metab*, 7 (5):421-433.
- Hong S, Lee JH, Kim KM, Lee JW, Youn YJ, Ahn MS, Ahn SG, Lee SH, Yoon J, Choe KH, Yoo BS. 2018. Is There a Sex-Related Difference in the Obesity Paradox in Systolic Heart Failure? Sex-Related Difference in the Obesity Paradox. *Yonsei Med J*, 59 (1):57-62.
- Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Woo MA, Tillisch JH. 2001. The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 38 (3):789-795.
- Hu FB, Willett WC. 2002. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA*, 288 (20):2569-2578.
- Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Willett WC. 1997. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*, 337 (21):1491-1499.
- Iacobellis G, Ribaldo MC, Zappaterreno A, Vecci E, Tiberti C, Di Mario U, Leonetti F. 2003. Relationship of insulin sensitivity and left ventricular mass in uncomplicated obesity. *Obes Res*, 11 (4):518-524.
- Iliadis F, Kadoglou N, Didangelos T. 2011. Insulin and the heart. *Diabetes Res Clin Pract*, 93 Suppl 1:S86-91.
- Lainscak M, Letonja M, Kovacic D, Hodoscek LM, Marolt A, Bartolic CM, Mulej M, Penko M, Poles J, Ravnikar T, Iskra MS, Pusnik CS, Jug B. 2014. General public awareness of heart failure: results of questionnaire survey during Heart Failure Awareness Day 2011. *Arch Med Sci*, 10 (2):355-360.
- Lam CS, Lyass A, Kraigher-Krainer E, Massaro JM, Lee DS, Ho JE, Levy D, Redfield MM, Pieske BM, Benjamin EJ, Vasan RS. 2011. Cardiac dysfunction and noncardiac dysfunction as precursors of heart failure with reduced and preserved ejection fraction in the community. *Circulation*, 124 (1):24-30.
- Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, do Nascimento AF, Luvizotto Rde A, de Campos DH, Okoshi K, Dal Pai-Silva M, Padovani CR, Cicogna AC. 2010. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol*, 26 (8):423-429.
- Leren P. 1970. The Oslo diet-heart study. Eleven-year report. *Circulation*, 42 (5):935-942.
- Linabery AM, Nahhas RW, Johnson W, Choh AC, Towne B, Odegaard AO, Czerwinski SA, Demerath EW. 2013. Stronger influence of maternal than paternal obesity on infant and early childhood body mass index: the Fels Longitudinal Study. *Pediatr Obes*, 8 (3):159-169.
- Litzenburger T, Huber EK, Dinger K, Wilke R, Vohlen C, Selle J, Kadah M, Persigehl T, Heneweer C, Dotsch J, Alejandre Alcazar MA. 2020. Maternal high-fat diet

- induces long-term obesity with sex-dependent metabolic programming of adipocyte differentiation, hypertrophy and dysfunction in the offspring. *Clin Sci (Lond)*, 134 (7):921-939.
- Louwe MC, van der Hoorn JW, van den Berg SA, Jukema JW, Romijn JA, van Dijk KW, Rensen PC, Smit JW, Steendijk P. 2012. Gender-dependent effects of high-fat lard diet on cardiac function in C57Bl/6J mice. *Appl Physiol Nutr Metab*, 37 (2):214-224.
- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. 2003. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*, 9 (9):1195-1201.
- Manrique C, DeMarco VG, Aroor AR, Mugerfeld I, Garro M, Habibi J, Hayden MR, Sowers JR. 2013. Obesity and insulin resistance induce early development of diastolic dysfunction in young female mice fed a Western diet. *Endocrinology*, 154 (10):3632-3642.
- Mao J, Zhang X, Sieli PT, Falduto MT, Torres KE, Rosenfeld CS. 2010. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (12):5557-5562.
- Mauvais-Jarvis F. 2018. Gender differences in glucose homeostasis and diabetes. *Physiol Behav*, 187:20-23.
- McNulty PH, Louard RJ, Deckelbaum LI, Zaret BL, Young LH. 1995. Hyperinsulinemia inhibits myocardial protein degradation in patients with cardiovascular disease and insulin resistance. *Circulation*, 92 (8):2151-2156.
- Mdaki KS, Larsen TD, Wachal AL, Schimelpfenig MD, Weaver LJ, Dooyema SD, Louwagie EJ, Baack ML. 2016. Maternal high-fat diet impairs cardiac function in offspring of diabetic pregnancy through metabolic stress and mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 310 (6):H681-692.
- Mitanchez D, Jacqueminet S, Nizard J, Tanguy ML, Ciangura C, Lacorte JM, De Carne C, Foix L'Helias L, Chavatte-Palmer P, Charles MA, Dommergues M. 2017. Effect of maternal obesity on birthweight and neonatal fat mass: A prospective clinical trial. *PLoS One*, 12 (7):e0181307.
- Neumann T, Biermann J, Erbel R, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R. 2009. Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int*, 106 (16):269-275.
- Nguyen TD, Shingu Y, Schwarzer M, Schrepper A, Doenst T. 2013. The E-wave deceleration rate E/DT outperforms the tissue Doppler-derived index E/e' in characterizing lung remodeling in heart failure with preserved ejection fraction. *PLoS One*, 8 (12):e82077.
- O'Neill BT, Abel ED. 2005. Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? *J Clin Invest*, 115 (8):2059-2064.
- Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. 2014. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA*, 311 (8):806-814.
- Oreopoulos A, Padwal R, Kalantar-Zadeh K, Fonarow GC, Norris CM, McAlister FA. 2008. Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. *Am Heart J*, 156 (1):13-22.
- Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. 2006. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*, 355 (3):251-259.

- Parto P, Lavie CJ. 2017. Obesity and Cardiovascular Diseases. *Curr Probl Cardiol*, 42 (11):376-394.
- Riehle C, Abel ED. 2016. Insulin Signaling and Heart Failure. *Circ Res*, 118 (7):1151-1169.
- Savage DD, Levy D, Dannenberg AL, Garrison RJ, Castelli WP. 1990. Association of echocardiographic left ventricular mass with body size, blood pressure and physical activity (the Framingham Study). *Am J Cardiol*, 65 (5):371-376.
- Sjoberg KA, Rattigan S, Jeppesen JF, Lundsgaard AM, Holst JJ, Kiens B. 2015. Differential effects of glucagon-like peptide-1 on microvascular recruitment and glucose metabolism in short- and long-term insulin resistance. *J Physiol*, 593 (9):2185-2198.
- Song Y, Li J, Zhao Y, Zhang Q, Liu Z, Li J, Chen X, Yang Z, Yu C, Xiao X. 2012. Severe maternal hyperglycemia exacerbates the development of insulin resistance and fatty liver in the offspring on high fat diet. *Exp Diabetes Res*, 2012:254976.
- Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD, Baur LA. 1993. High fat diet-induced insulin resistance. Lessons and implications from animal studies. *Ann N Y Acad Sci*, 683:82-90.
- Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. 2000. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*, 321 (7258):405-412.
- Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. 2009. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes*, 58 (5):1116-1125.
- Tsugane S. 2012. Alcohol, smoking, and obesity epidemiology in Japan. *J Gastroenterol Hepatol*, 27 Suppl 2:121-126.
- Turpeinen O, Karvonen MJ, Pekkarinen M, Miettinen M, Elosuo R, Paavilainen E. 1979. Dietary prevention of coronary heart disease: the Finnish Mental Hospital Study. *Int J Epidemiol*, 8 (2):99-118.
- Wasserman DH, Ayala JE, McGuinness OP. 2009. Lost in translation. *Diabetes*, 58 (9):1947-1950.
- Wijnhoven TM, van Raaij JM, Spinelli A, Rito AI, Hovengen R, Kunesova M, Starc G, Rutter H, Sjoberg A, Petrauskiene A, O'Dwyer U, Petrova S, Farrugia Sant'angelo V, Wauters M, Yngve A, Rubana IM, Breda J. 2013. WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative 2008: weight, height and body mass index in 6-9-year-old children. *Pediatr Obes*, 8 (2):79-97.
- Windelov JA, Pedersen J, Holst JJ. 2016. Use of anesthesia dramatically alters the oral glucose tolerance and insulin secretion in C57Bl/6 mice. *Physiol Rep*, 4 (11).
- Wong C, Marwick TH. 2007. Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 4 (8):436-443.
- Yokomizo H, Inoguchi T, Sonoda N, Sakaki Y, Maeda Y, Inoue T, Hirata E, Takei R, Ikeda N, Fujii M, Fukuda K, Sasaki H, Takayanagi R. 2014. Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic beta-cell function in adult offspring with sex differences in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306 (10):E1163-1175.

Zellner K, Jaeger U, Kromeyer-Hauschild K. 2004. Height, weight and BMI of schoolchildren in Jena, Germany--are the secular changes levelling off? *Econ Hum Biol*, 2 (2):281-294.

8 Anhang

Veröffentlichungen

Vorträge

2012 DGK Mannheim

2013 DGTHG Freiburg

Poster

2012 SHVM Oxford

2014 Posterschau Forschungszentrum Lobeda

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	28
Abbildung 2	29
Abbildung 3	31
Abbildung 4	32
Abbildung 5	33
Abbildung 6	34
Abbildung 7	35
Abbildung 8	36
Abbildung 9	39
Abbildung 10	40
Abbildung 12	41
Abbildung 13	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	23
Tabelle 2	25
Tabelle 3	26
Tabelle 4	27
Tabelle 5	38
Tabelle 6	43
Tabelle 7	45
Tabelle 8	47
Tabelle 9	49

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich als erstes Professor Doenst danken. Mit seinem Willen das Beste aus einem heraus zu holen hat er diese Arbeit maßgeblich voran gebracht.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Schwarzer, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. Schrepper für die Geduld mir die Echokardiographie von Nagetieren zu erklären und dem Laborteam für die Unterstützung beim Erlernen des Laboralltags.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Ehefrau für die mir gegebene Kraft, Zeit und Korrekturen danken, die diese Arbeit so haben wachsen lassen wie sie nun ist.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind. Folgende Personen haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt: Herr Univ. - Prof. Dr. med. Torsten Doenst, Herr PD Dr. rer. nat. habil. M. Schwarzer und Frau Dr. rer. nat. A. Schrepper. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwertende Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich habe weder die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 04.01.2022

Ort, Datum

Sebastian Freiburger