

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

**Einfluss von Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten auf die neurovaskuläre
Kopplung, den zerebralen Blutfluss und das Verhalten bei einer Diät-
induzierten Adipositas**



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Gianna Aline Huber

aus Frankfurt/Main

Lübeck, 2021

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

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog

Tag der mündlichen Prüfung: 19. April 2021

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 22. April 2021

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Adipositas	3
2.2. Zerebraler Blutfluss und neurovaskuläre Kopplung.....	6
2.2.1. Neurovaskuläre Veränderung im Zusammenhang mit Adipositas	9
2.2.2. Psychosomatische Veränderungen im Zusammenhang mit Adipositas	10
2.3. Das Renin-Angiotensin-System	12
2.3.1. RAS im zentralen Nervensystem	15
2.3.2. Zusammenhang zwischen RAS und der Gewichtsregulation	16
2.4. Fragestellung.....	19
3. Material	21
3.1. Chemikalien und Reagenzien	21
3.2. Puffer und Lösungen.....	23
3.2.1. Suspensionen für orale Gavage.....	23
3.2.2. Puffer und Lösungen.....	24
3.3. Kits und Proteine.....	25
3.4. Antikörper	25
3.5. Geräte.....	26
3.6. Verbrauchsmaterialien	29
3.7. Software	31
4. Methoden	33
4.1. Tierexperimentelle Methoden	33
4.1.1. Allgemeine Haltungsbedingungen	33

4.1.2. Studienprotokolle.....	34
4.1.3. Laser Speckle Imaging.....	37
4.1.4. Magnetresonanztomographie.....	39
4.1.5. Verhaltensversuche	40
4.1.6. Funktionstests	44
4.1.7. Gewinnung von biologischem Material	45
4.2. Proteinbiochemische Methoden	47
4.2.1. Multiplex-Assay	47
4.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	48
4.2.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	48
4.2.4. Western Blot.....	49
4.2.5. Immunhistochemie	50
4.3. Statistik	52
5. Ergebnisse.....	53
5.1. Eine HFD-Fütterung für 8 Wochen ist nicht ausreichend für eine neurovaskuläre Entkopplung.....	53
5.2. HFD für 16 und 24 Wochen führt zu einer neurovaskulären Entkopplung im Bereich des somatosensorischen Cortex.....	57
5.3. TEL verhindert eine HFD-induzierte neurovaskuläre Entkopplung und normalisiert den CBF.....	59
5.4. TEL schützt vor HFD-induzierten Veränderungen in der zerebralen Gefäßstruktur und verbessert den oxidativen Status.....	67
5.5. TEL hat positive Effekte auf das Angstverhalten bei Mäusen, die mit HFD gefüttert wurden, jedoch nicht auf die Gedächtnisbildung	71
6. Diskussion	77
6.1. Adipositas-induzierte Effekte auf die neurovaskuläre Einheit	78

6.1.1. Potenzielle Mechanismen Adipositas-induzierter neurovaskulärer Einschränkungen	80
6.2. Adipositas-induzierte kognitive Einschränkungen	85
6.3. Protektive Effekte von TEL bei einer Diät-induzierten Adipositas.....	88
6.3.1. Bedeutung von TEL als Protektor des zerebralen Gefäßsystems bei Adipositas	88
6.3.2. Bedeutung von TEL hinsichtlich eines Adipositas-induzierten Risikos einer Demenzerkrankung.....	91
6.4. Limitationen	93
6.5. Ausblick.....	94
6.6. Abschließendes Fazit	96
Literatur.....	99
Anhang	123
Abbildungsverzeichnis.....	129
Tabellenverzeichnis.....	131
Abkürzungsverzeichnis	133
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Publikationen.....	137
Danksagung	141
Eidesstattliche Erklärung	143

1. Zusammenfassung

Adipositas und deren Folgeerscheinungen gehören mittlerweile zu den häufigsten vermeidbaren Todesursachen weltweit und die Prävalenz nimmt stetig zu. Effektive Therapiemöglichkeiten gibt es bislang kaum. Allerdings gibt es eindeutige Hinweise, dass das Renin-Angiotensin-System, neben seiner Bedeutung bei der Blutdruckregulation, auch eine entscheidende Rolle bei der Glukoseregulation und bei der Prävention von Adipositas spielt. Häufig genutzte Angiotensin II-Rezeptorblocker, wie Telmisartan, schützen Ratten und Mäuse vor einer Diät-induzierten Adipositas auf der einen Seite und verbessern ihren metabolischen Status auf der anderen. Es liegt daher nahe, dass Telmisartan weitere protektive Wirkungen bei einer Adipositas hat. Neben den klassischen Folgeerscheinungen einer Adipositas, wie Bluthochdruck, Hyperglykämie, Leptin- und Insulinintoleranz, sind außerdem zerebrovaskuläre Beeinträchtigungen von Adipositas in verschiedenen Diabetes- und Adipositasmodellen gezeigt worden. Diese Einschränkungen könnten im Verlauf des Krankheitsbildes zu Verhaltensdefiziten führen.

Für diese Arbeit wurde untersucht, ob eine Diät-induzierte Adipositas bei Mäusen die neurovaskuläre Kopplung stört und ob es gleichzeitig zu einer Reduktion des zerebralen Blutflusses kommt. Des Weiteren wurde analysiert, welche Prozesse und Mechanismen potenziell an der Entwicklung solcher Beeinträchtigungen beteiligt sein könnten und ob die Adipositas-induzierten Einschränkungen im zerebrovaskulären System zu Defiziten im Verhalten zur Folge haben. Abschließend wurde überprüft, ob Telmisartan die Adipositas-induzierten Veränderungen im neurovaskulären System verbessert oder sogar vor ihnen schützt.

Nach der Fütterung einer Hochfettdiät für 16 und 24, aber nicht nach 8 Wochen, war die neurovaskuläre Kopplung bei den adipösen Mäusen beeinträchtigt und der zerebrale Blutfluss war in den Bereichen des Cortex, der Amygdala und des Thalamus reduziert. Im Cortex wurde beobachtet, dass die Endothelzellen durch die Hochfettdiät vermehrt in einen seneszenten Zustand übergingen und ein erhöhtes oxidatives Stresslevel zu diesem Übergang beitrug. Dies könnte die Ursache für die zerebrovaskulären Veränderungen sein, die im zeitlichen Verlauf zu

einer Reduktion des Blutflusses führten. In der Amygdala spielten hingegen weder zelluläre Seneszenz noch ein erhöhtes Level an oxidativem Stress eine Rolle. Dort kam es durch die Hochfettdiät allerdings zu einer gesteigerten Bildung von *String Vessel*, durch die kein Blutfluss mehr möglich ist. Dies hat eine Minderdurchblutung des Gewebes zur Folge. Hinsichtlich der Verhaltensveränderungen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass adipöse Mäuse ein ausgeprägteres Angstverhalten entwickelten als nicht-adipöse Mäuse, die Hochfettdiät aber keinen Effekt auf die Gedächtnisleistung hatte. Abschließend wurde mit dieser Arbeit bewiesen, dass die Behandlung mit Telmisartan für 16 Wochen die beschriebenen Effekte trotz einer Hochfettdiät verbessert bzw. verhindert. Somit bieten AT₁-Rezeptor-Antagonisten wie Telmisartan mögliche Therapiemöglichkeiten, um Adipositas-induzierte Erkrankungen, die auf neurovaskuläre Veränderungen zurückzuführen sind, wie zum Beispiel Demenzerkrankungen, vorzubeugen.

2. Einleitung

2.1. Adipositas

Unter Adipositas, abgeleitet von dem lateinischen Wort *adeps* für Fett, versteht man eine krankhafte Vermehrung von Fettgewebe über das normale Maß hinaus, welche als chronische Erkrankung angesehen wird^{1, 2}. Klassischerweise entsteht Adipositas durch ein massives Ungleichgewicht zwischen der Energieaufnahme über die Nahrung und dem Verbrauch dieser Energie³. Die Gründe für die Entstehung einer Adipositas können vielschichtig sein. Neben der familiären oder genetischen Disposition spielt der eigene Lebensstil wohl die bedeutendste Rolle. Bewegungs- und Schlafmangel, Stress, Fehlernährung und die ständige Verfügbarkeit von Nahrung, teilweise verbunden mit einem niedrigen Sozialstatus, sind dabei die wichtigsten Einflussfaktoren^{2, 4}. Ebenso kann Adipositas die Folge endokriner Erkrankungen, wie Hypothyreose oder das Cushing-Syndrom sein. Außerdem haben psychosomatische Faktoren wie depressive Erkrankungen, Essstörungen und die damit verbundene Einnahme bestimmter Medikamente, wie beispielsweise Antidepressiva oder Neuroleptika, einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung von Adipositas^{2,5,6}.

Der am häufigsten verwendete Parameter zur Beurteilung und Klassifikation von Übergewicht und Adipositas ist der *Body Mass Index* (BMI). Dieser ist definiert als der Quotient aus Gewicht (in kg) und Körpergröße (in m) zum Quadrat. Die Weltgesundheitsorganisation definiert einen BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ als Übergewicht und einen BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ als Adipositas mit weiteren Unterteilungen in Grad I bis III^{1, 2}. Studien haben gezeigt, dass das Risiko insbesondere für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herz-Kreislaufkrankungen und Schlaganfälle⁷⁻¹⁰, welche im Jahr 2012 die häufigste Todesursache weltweit darstellten, mit der Höhe des BMI zunimmt¹. Aber auch die Entstehung von Diabetes^{8, 9, 11, 12}, Beeinträchtigungen des Muskelapparats, des Skeletts^{13,14} und verschiedene onkologische Erkrankungen^{8, 15} werden durch einen erhöhten BMI begünstigt¹. Bei der Beurteilung von Adipositas spielt aber auch die Fettverteilung eine entscheidende Rolle. So steht eine Anreicherung von viszeralem Fett stark in Zusammenhang mit

metabolischen Komplikationen und einem erhöhten Risiko von Folgeerkrankungen, insbesondere der Entstehung von Hypertonie, aber auch von zerebralen Läsionen^{10, 16-18}. Ein Taillenumfang von ≥ 94 cm bei Männern und ≥ 80 cm bei Frauen erhöht das Risiko für diese Folgeerkrankungen deutlich¹⁹. Generell ist Adipositas im Kindesalter bereits mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von Adipositas, frühzeitigem Tod und Behinderungen im Erwachsenenalter assoziiert, genauso wie mit Atemproblemen, einem erhöhten Risiko für Knochenbrüche, Bluthochdruck, Insulinresistenz und psychologischen Effekten^{1, 7, 20, 21}. In diesem Zusammenhang ist außerdem das metabolische Syndrom zu nennen, zu dessen wichtigsten Promotoren Übergewicht und Adipositas gehören. Das metabolische Syndrom bezeichnet ein Cluster an Faktoren, die Hinweise auf das metabolische und kardiovaskuläre Gesundheitsrisiko geben^{2, 22}. Wie Tabelle 1 zeigt, ist die Krankheit multikausal und wird mit weiteren Faktoren wie chronischer Inflammation und Insulinresistenz assoziiert, welche wiederum Folgen von Adipositas sind²²⁻²⁴.

Tabelle 1. Risikofaktoren, die dem metabolischen Syndrom zugeordnet werden. Einteilung der Grenzwerte nach der *American Heart Association* für verschiedene Faktoren, die mit dem metabolischen Syndrom in Zusammenhang stehen. SBP: systolischer Blutdruck; DSP: diastolischer Blutdruck. Tabelle adaptiert von².

Risikofaktoren		mit ≥ 3 der untenstehenden Faktoren wird vom metabolischen Syndrom gesprochen
Taillenumfang	Männer	> 102 cm
	Frauen	> 88 cm
Triglyzeride		≥ 150 mg/dl oder Lipidsenker
HDL-Cholesterin	Männer	> 40 mg/dl
	Frauen	> 50 mg/dl oder Medikament
Blutdruck		≥ 130 mmHg SBP ≥ 85 mmHg DBP oder Antihypertensiva
Nüchternblutzucker		≥ 100 mg/dl oder Antidiabetika

Weltweit hat sich das Auftreten von Adipositas seit dem Jahr 1975 verdreifacht. So litten im Jahr 2016 etwa 39 % der Erwachsenen über 18 Jahren an Übergewicht und 13 % an Adipositas. Im Kindesalter ist die Inzidenz von Adipositas weltweit ebenfalls stark gestiegen. Dies zeigt sich unter anderem daran, dass 2016 über 340 Millionen Kinder im Alter von 5 bis 19 Jahren als

übergewichtig oder adipös eingestuft wurden. Bei noch jüngeren Kindern im Alter unter 5 Jahren waren es im Jahr 2019 bereits 38 Millionen, mit weiter steigender Prävalenz¹.

Schon lange ist Adipositas kein rein kosmetisches Problem mehr, sondern muss als Epidemie betrachtet werden²⁵. Mittlerweile gehört Adipositas und die dazugehörigen Folgeerkrankungen zur am häufigsten vermeidbaren Todesursache weltweit⁴. Dennoch sind die bislang verfügbaren Therapiemöglichkeiten begrenzt oder erzielen nicht den gewünschten Erfolg^{2, 26}. Die am häufigsten empfohlene, nicht invasive oder medikamentöse Therapie ist die grundlegende Umstellung des eigenen Lebensstils^{2, 22}. Allerdings sind Ernährungs-, Bewegungs- und Verhaltenstherapien allein meist nicht ausreichend und für viele Patienten schwer durchzuführen. Bei besonders schweren Fällen werden chirurgische Eingriffe im Sinne einer bariatrischen Operation als begleitender Therapieansatz angewandt². Für eine medikamentöse Therapie stehen hingegen nur wenige Präparate zur Verfügung und diese gelten auch nicht als primäre Therapieform. Sie wird erst dann eingesetzt, wenn weder eine Veränderung des Lebensstils noch eine Verhaltenstherapie den gewünschten Erfolg erbringen konnten². Als gängiges Präparat ist dabei Orlistat zu nennen. Orlistat hemmt die intestinale Lipase irreversibel, indem es kovalent an das aktive Zentrum des Enzyms bindet und dadurch die Resorption von Fetten aus der Nahrung verhindert. Sekundär wird zudem die Glukosetoleranz verbessert und erhöhte Blutdruckwerte werden gesenkt^{27, 28}. Allerdings hat die Einnahme nicht zu vernachlässigende Nebenwirkungen zur Folge. Häufig kommt es zu Steatorrhoe (Fettstühle) und Darmkrämpfen. Außerdem sinkt die Resorptionsfähigkeit fettlöslicher Vitamine, was eine Reduktion der Serumspiegel von Vitamin D, E und β -Carotin zur Folge hat²⁹. Auch Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, wie beispielsweise Acetylsalicylsäure oder Zytostatika können auftreten³⁰. Des Weiteren gab es ein appetithemmendes Präparat, Sibutramin, welches 2010 allerdings die Marktzulassung entzogen bekam, da es das Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Herzinfarkt oder Schlaganfall, nachweisbar erhöhte³¹. Auch das Präparat Rimonabant, ein inverser Agonist des Cannabinoid 1-Rezeptors, hat die Zulassung im Jahr 2008 wegen unzureichender Wirkung und psychischer Nebenwirkungen entzogen bekommen³². Des Weiteren ist das Liraglutid als gentechnisch hergestelltes Analogon des Inkretins *Glucagon-like Peptide* (GLP-1) unter dem Namen Saxenda® auf dem Markt zu finden. Es erhöht die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen und hemmt die Glukagonfreisetzung aus den α -Zellen des Pankreas. Außerdem steigert es die Insulinsensitivität der Zellen, verstärkt

Sättigungssignale und entfaltet damit seine anti-diabetische Wirkung. Zunächst war das Präparat lediglich für die Behandlung von Diabetes zugelassen. 2015 wurde es jedoch zusätzlich für die Indikation Adipositas zugelassen. Der Nachteil von Saxenda® ist, dass es täglich subkutan gespritzt werden muss und eine Gewichtsreduktion von höchstens 5-10 % erzielt werden kann^{31, 33, 34}. Die beschriebenen Aspekte machen deutlich, wie unzureichend bisherige Therapiemöglichkeiten bei Adipositas sind. Sie bieten nur geringfügige Erfolge hinsichtlich einer Gewichtsreduktion und sind zudem meist mit erheblichen Eingriffen und Einschränkungen für den Patienten verbunden.

2.2. Zerebraler Blutfluss und neurovaskuläre Kopplung

Das Gehirn ist ein Organ, welches große Energiemengen benötigt, aber kein Reservoir besitzt, aus dem bei Bedarf Energie gewonnen werden kann. Aus diesem Grund ist das Gehirn auf die stetige Zufuhr von Energie, hauptsächlich in Form von Sauerstoff und Glukose, angewiesen. Diese Zufuhr erfolgt über den Blutfluss^{35, 36}. Je nach Aktivität der einzelnen Regionen im Gehirn muss der Blutfluss zeit- und ortsspezifisch reguliert werden. Die arterielle Blutversorgung geschieht dabei über zwei Hauptwege: zum einen über die *Arteria (A.) carotis interna* (ICA, engl. *internal carotid artery*) und zum anderen über die *A. basilaris* (BA, engl. *basilar artery*). Die ICA verzweigt sich mit ihrem linken und rechten Ast auf beiden Seiten des Gehirns weiter in die *A. cerebri anterior* (ACA, engl. *anterior cerebral artery*) und die *A. cerebri media* (MCA, engl. *middle cerebral artery*) und aus der BA entspringt die *A. cerebri posterior* (PCA, engl. *posterior cerebral artery*)^{37, 38}. Die BA und ICA bilden zusammen mit den verbundenen Arterien einen geschlossenen Ring, den man als *Circle of Willis* bezeichnet (Abbildung 1). Bei Schädigungen und Beeinträchtigungen eines Abschnitts davon kann die Blutversorgung somit durch andere Teile dieses Systems übernommen werden³⁸. Das gesamte Gehirnparenchym wird sowohl über oberflächliche (*pial arteries*) und tieferliegende Arterien (*penetrating arteries*) als auch über tief eindringende und weiter verzweigte Arteriolen bis hin zu Kapillaren mit Blut versorgt³⁹. Letztere sind Teil der weiter unten beschriebenen neurovaskulären Einheit.

Die sogenannte Autoregulation des Gehirns geschieht bei Menschen unabhängig vom peripheren Blutdruck in einem Bereich des mittleren arteriellen Drucks (MAD) zwischen 60 und 150 mmHg⁴⁰. Außerhalb dieses Bereichs steht der Blutfluss im Gehirn in direktem Zusammenhang mit dem peripheren Blutdruck⁴¹. Demzufolge können Defizite in der Versorgung von Gehirnregionen

binnen kürzester Zeit zu schweren, teils irreversiblen Schädigungen im Gehirn führen und dessen Funktionalität nachhaltig beeinträchtigen^{35, 42, 43}. Die Aufklärung der komplexen, autonomen und regionalen Regulation des zerebralen Blutflusses (CBF, engl. *cerebral blood flow*) ist daher bereits seit vielen Jahren von großem wissenschaftlichem Interesse.

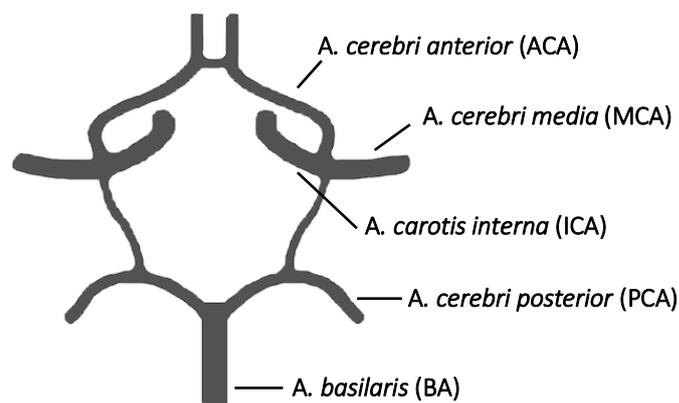


Abbildung 1. Circle of Willis. Schematische Darstellung des *Circle of Willis* mit den dazugehörigen Gefäßverzweigungen⁴⁴.

Im Juli 2001 kam beim ersten *Stroke Progress Review Group Meeting* erstmals der Begriff der neurovaskulären Einheit auf, um die symbiotische Interdependenz zwischen Zellen des Gehirns und zerebralen Gefäßen hervorzuheben⁴⁵. Die neurovaskuläre Einheit besteht aus verschiedenen Zelltypen, wie Gefäßzellen mit Endothelzellen und Perizyten oder Zellen glatter Muskulatur (je nach Gefäßtyp), Gliazellen mit Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten und Neuronen (Abbildung 2).

Die prototypische und umfassend erforschte Funktion der neurovaskulären Einheit ist die Kopplung zwischen neuronaler Aktivität und dem CBF - ein Prozess, der als neurovaskuläre Kopplung bekannt ist^{35, 46}. Je nach Energieverbrauch variiert der CBF in den einzelnen Gehirnregionen. So konnte bereits 1945 beobachtet werden, dass ein Anstieg der neuronalen Aktivität einen Anstieg der lokalen Gefäßdichte zur Folge hatte⁴⁷. Der durch neuronale Aktivität induzierte CBF-Anstieg ist auf die jeweilig aktivierte Gehirnregion beschränkt und wird als funktionale Hyperämie bezeichnet⁴⁸⁻⁵⁰. Neben der Tatsache, dass durch die Erhöhung des CBF die Nährstoff- und Energieversorgung sichergestellt wird, hat eine Erhöhung des CBF auch eine protektive Aufgabe. So werden potenziell toxische Nebenprodukte der Gehirnaktivität, wie

Laktat, Kohlenstoffdioxid (CO₂), das Amyloid-β-Peptid und Tau beseitigt⁵¹. Zusammen mit der Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und Energie bildet die Beseitigung dieser Nebenprodukte ein System, in welchem einerseits die metabolischen Bedürfnisse und andererseits der Abtransport von Abfallprodukten den Blutfluss im Gehirn steuern⁵². Dabei übernehmen vornehmlich Neurone die Initiation der lokalen vaskulären Antwort, indem sie direkt Signale an den lokalen Blutgefäßen generieren oder Signale über zwischengeschaltete Zellen an die Gefäße weitergeben³⁵. Dabei führt die glutamaterge synaptische Aktivität zu einem Anstieg intrazellulärem Calciums (Ca²⁺) und zur Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Enzyme, wie die Stickstoffmonoxid(NO)-Synthase (NOS) und Cyclooxygenase 2 (COX-2), welche wiederum vor allem NO als potenten Vasodilatator produzieren³⁶. Des Weiteren wird der Ca²⁺-Anstieg in Astrozyten durch Glutamat und damit die Produktion weiterer vasoaktiver Stoffe induziert³⁵.

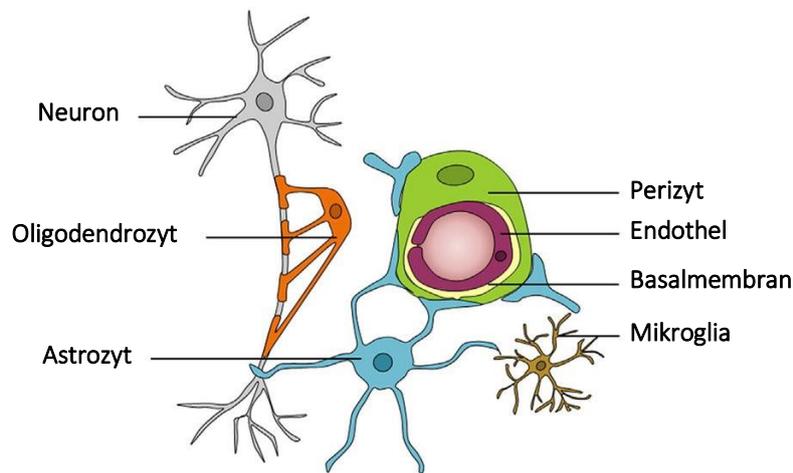


Abbildung 2. Neurovaskuläre Einheit. Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit, bestehend aus dem Endothel der zerebralen Blutgefäße, Perizyten, einer Basalmembran und den Ausläufern von Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten, die mit den Axonen von Neuronen in Kontakt stehen⁵³.

Astrozyten befinden sich aufgrund ihrer engen Assoziation mit den Synapsen und den lokalen Mikrogefäßen in der Position, die neuronale Aktivität mit der Funktion der Mikrogefäße zu verbinden. Dennoch ist noch nicht vollends geklärt, welches *Downstream* Signal zur Vasodilatation von Kapillaren führt. Während die Beteiligung von Endothelzellen an der Regulation des CBF als Antwort auf chemische oder mechanische Signale seit geraumer Zeit bekannt ist, ist das Interesse an deren Rolle bei der neurovaskulären Kopplung erst innerhalb der letzten Jahre gewachsen^{54, 55}. Die Hinweise verdichten sich, dass die Endothelzellen an der

retrograden Weiterleitung von vasomotorischen Antworten beteiligt sind^{35, 56}, welche über *gap junctions* und myoendotheliale *junctions* vom Endothelium an die glatte Muskulatur der Gefäße (SMC, engl. *smooth muscle cells*) weitergegeben werden⁵⁷. Die SMCs um die Gefäße herum werden als Haupteffektoren der vasomotorischen Antwort und der CBF-Regulation betrachtet³⁷. Sie reagieren auf verschiedene vasoaktive Stoffe, aber auch auf Veränderungen des intravaskulären Drucks^{37, 58}. Dabei muss beachtet werden, dass in Kapillaren die SMCs durch Perizyten ersetzt sind, welche ebenfalls an der Regulation des CBF beteiligt sind⁵⁹. So haben Studien gezeigt, dass ein Teil der Perizyten kontraktile agiert und auf vasoaktive Signale im Gehirn reagiert^{60, 61}, während der andere Teil nicht kontraktile ist. Trotz der vielen bereits bekannten Zellinteraktionen bleiben einige Aspekte des genauen Zusammenspiels der Zelltypen in den unterschiedlichen Segmenten des neurovaskulären Netzwerks weiterhin ungeklärt³⁵.

2.2.1. Neurovaskuläre Veränderung im Zusammenhang mit Adipositas

Das Gehirn benötigt für eine einwandfreie Funktionalität eine konstante Durchblutung, welche unabhängig von den metabolischen Bedürfnissen anderer Organe ist⁴⁰. Neben den klassischen funktionalen Einschränkungen, die als Folge von Adipositas auftreten (Abschnitt 2.1), sind auch Adipositas-assoziierte Veränderungen im zerebralen Gefäßsystem aufgezeigt worden. So wird in mehreren Studien beschrieben, dass adipöse Patienten und Patienten mit erhöhtem BMI einen reduzierten CBF aufweisen^{62, 63}. Auch der Zusammenhang zwischen Typ 2 Diabetes und einer Reduktion des CBF wurde in klinischen Studien mit unterschiedlichen Methoden mehrfach belegt⁶⁴⁻⁶⁶. In Diät-induzierten Adipositasmodellen mit Ratten, die mit einer Hochfettdiät (HFD) oder einer Cafeteriadiät, welche sich durch einen hohen Kohlenhydratanteil auszeichnete, gefüttert wurden, war erkennbar, dass die funktionale Hyperämie beeinträchtigt ist und es folglich zu einer lokalen Reduktion des CBF kommt^{67, 68}. Einen möglichen Grund für diese Beeinträchtigung stellen strukturelle Veränderungen der zerebralen Gefäße dar. So zeigten Tiere mit einer Diät-induzierten Adipositas einen reduzierten Lumen- und Außenwanddurchmesser der MCA, einhergehend mit einer dickeren Gefäßwand, welche zu einer erhöhten Steifigkeit der MCA führt⁶⁹. Eine Reduktion des Gefäßdurchmessers wurde ebenfalls in einem Modell mit adipösen Zucker Ratten nachgewiesen. Dabei wurde zusätzlich beobachtet, dass Adipositas eine Erhöhung

des zerebrovaskulären myogenen Tonus zur Folge hat⁷⁰. Für diesen Effekt in zerebralen Arterien ist auch ein Zusammenhang mit Hyperglykämie und Insulinresistenz beschrieben^{71, 72}.

Der Einfluss einer HFD auf die neurovaskuläre Kopplung wurde bislang mit nur wenigen Studien untersucht. Eine humane Studie deutete mit Hilfe einer funktionalen Magnetresonanztomographie (MRT) Messung auf eine Einschränkung der neurovaskulären Kopplung bei diabetischen Patienten hin⁷³. Li *et al.* haben in ihren Untersuchungen diesbezüglich zeigen können, dass Ratten nach 8 Wochen HFD mit einem geringeren CBF-Anstieg auf die Stimulation der Vibrissen reagieren. Da weder der Blutdruck noch das Glukose- oder Insulinlevel bei diesen Tieren verändert war, schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass die neurovaskuläre Entkopplung rein auf die HFD und nicht auf metabolische Abnormalitäten zurückzuführen ist⁷⁴. Dennoch zeigen die meisten Studien ähnlich zu den klinischen Studien einen Zusammenhang zwischen einer akuten oder chronischen Hyperglykämie und einer neurovaskulären Entkopplung^{39, 68, 75}. So haben Vetri *et al.* in einem Typ 1 Diabetes-Modell gezeigt, dass es bei den diabetischen Tieren nach einer Nervenstimulation zu einer verringerten Gefäßerweiterung kommt^{76, 77}. Das Endothel ist ein frühes Ziel pathologischer Veränderungen im Verlauf von metabolischen Erkrankungen, sodass die endotheliale Dysfunktion maßgeblich zu einem signifikant erhöhten zerebrovaskulären Widerstand und einem reduzierten Blutfluss beiträgt³⁹. Die genauen Mechanismen, die zu einer Adipositas-induzierten vaskulären Dysfunktion führen, sind nur teilweise bekannt.

2.2.2. Psychosomatische Veränderungen im Zusammenhang mit Adipositas

All die oben genannten zerebrovaskulären Veränderungen gehen unter anderem mit einem erhöhten Risiko für Schlaganfälle und vaskuläre Demenz einher^{40, 69, 78}. Der Heilungsprozess im Anschluss an einen Schlaganfall wird zudem durch einen reduzierten CBF gestört^{79, 80}. Neben den eng mit Adipositas und Diabetes assoziierten zerebrovaskulären Veränderungen können aber auch kognitive Beeinträchtigungen die Folge von Adipositas oder Diabetes sein⁸¹⁻⁸³. Diese kognitiven Beeinträchtigungen werden in diesem Abschnitt genauer beschrieben.

Adipositas ist eng mit strukturellen und funktionalen Veränderungen in zerebralen Arterien verbunden, welche für den Anstieg des vaskulären Gefäßwiderstands und die Reduktion des CBF verantwortlich gemacht werden. Solche Veränderungen können auch für die Entwicklung von

Demenz oder kognitiven Einschränkungen bei Menschen verantwortlich sein⁸². So sorgt eine milde Hypoperfusion für Defizite beim Lernen und der Gedächtnisbildung, da die Proteinsynthese und synaptische Plastizität reduziert ist⁸⁴. Eine moderate bis starke Hyperperfusion sorgt für eine eingeschränkte ATP-Synthese und eine eingeschränkte Generierung von neuronalen Aktionspotentialen⁸⁵. Ein verminderter CBF löst zudem die Entstehung von Ödemen und Läsionen an der weißen Substanz aus, genauso wie die Akkumulierung von Proteinen wie Amyloid- β und phosphoryliertem Tau, welche mit der Alzheimererkrankung assoziiert sind⁸⁶. Generell sind vaskuläre Schäden die zweithäufigste Ursache für Demenz und kognitive Einschränkungen, welche von milden Beeinträchtigungen bis hin zu schwerer vaskulärer Demenz reichen⁸⁷. Die Assoziation dieser kognitiven Erkrankungen mit Symptomen von Adipositas wird in verschiedenen Studien verdeutlicht⁸³. So zeigte sich in humanen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen Adipositas und einem schlechteren Abschneiden bei kognitiven Testaufgaben^{81, 88}. Gestützt werden diese Ergebnisse dadurch, dass in Tierstudien eine Beeinträchtigung des Lernens^{89, 90} und bei der Gedächtnisperformance⁹¹⁻⁹³ bei HFD-induziert adipösen Tieren im Vergleich zu den Normalgewichtigen beobachtet wurde. Kosari *et al.* beobachteten dabei zwar eine Unabhängigkeit von der Veränderung des Blutdrucks⁹¹, der zugrunde liegende Mechanismus, durch den Adipositas zu kognitiven Beeinträchtigungen führt, ist jedoch noch nicht lückenlos nachgewiesen. Vorgeschlagene Mechanismen schließen die Effekte von Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und vaskulären Schädigungen im zentralen Nervensystem ein⁹⁴. Diesbezüglich scheint die Forschung noch zu keinem klaren Stand gekommen zu sein. Einige Studien haben ferner einen Zusammenhang zwischen erhöhten Lipidlevels und der kognitiven Funktion nahegelegt, wohingegen andere Untersuchungen diese Korrelation nicht erkennen ließen^{95, 96}. Solch ein Zusammenhang wird damit erklärt, dass Dyslipidämie ein höheres Risiko birgt, einen Schlaganfall zu erleiden oder eine zerebrovaskuläre Hypoperfusion zu entwickeln. Farr *et al.* zeigten bei Mäusen, dass kognitive Einschränkungen, die durch Diät-induzierte Adipositas verursacht wurden, durch die Reduktion von Triglyceriden wieder behoben, und durch die Injektion von Triglyceriden ins Gehirn wieder induziert werden können⁹². Durch die Reduktion der Triglyceride konnte außerdem der oxidative Stress im zentralen Nervensystem bei den adipösen Mäusen gesenkt werden. Dies macht die Anreicherung von Triglyceriden zu einem Prozess, welcher potenziell an den kognitiven Einschränkungen beteiligt ist, die durch Adipositas induziert werden. Aber auch Insulinresistenz und ein erhöhtes Level an oxidativem Stress oder Inflammationsfaktoren, wie der Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin (IL)-6 und das

Monozyten-chemotaktische Protein 1 (MCP-1), werden mit den kognitiven Beeinträchtigungen in Zusammenhang gebracht^{97,98}.

Neben den bereits erwähnten Einschränkungen hinsichtlich der Gedächtnisleistung sind auch weitere psychosomatische Beeinträchtigungen in der Literatur beschrieben, die mit Adipositas assoziiert werden². So zum Beispiel kamen Baumeister und Härter in ihrer Untersuchung von größeren Stichproben von normalgewichtigen, übergewichtigen und adipösen Menschen zu dem Ergebnis, dass adipöse Menschen gegenüber normalgewichtigen Personen eine deutlich höhere Häufigkeit von psychischen Störungen aufwiesen, wobei insbesondere depressive, Angst- und somatoforme Störungen die häufigsten Diagnosen darstellten⁹⁹. Erwähnenswert ist, dass ein solcher Zusammenhang zwischen Adipositas und psychischen Folgeerscheinungen auch in Tierstudien beobachtet werden konnte. So zeigten Ogradnik *et al.*, dass adipöse Mäuse ein HFD-assoziiertes Angstverhalten entwickeln, welches in Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz steht, einem Prozess, der sich durch einen irreversiblen Zellzyklusarrest auszeichnet¹⁰⁰. Weitere Untersuchungen bestätigten dieses HFD-assoziierte, erhöhte Angstverhalten und setzten außerdem ein erhöhtes depressives Verhalten und einen erhöhten zellulären oxidativen Stress bei adipösen Mäusen in Zusammenhang mit einer HFD^{101,102}.

Es lässt sich folglich sagen, dass die genauen Mechanismen oder Mediatoren, die dem Zusammenhang von Adipositas und dem Risiko für kognitive und psychosomatische Beeinträchtigungen unterliegen, noch nicht im Detail aufgeklärt sind. Es ist ebenfalls denkbar, dass ein Milieu aus mehreren Faktoren ursächlich für die kognitiven Einschränkungen ist.

2.3. Das Renin-Angiotensin-System

Bei dem klassischen Renin-Angiotensin-System (RAS, Abbildung 3) handelt es sich um ein peptiderges System mit endokrinen Charakteristika, welches seit der Identifikation von Renin durch Tigerstedt und Bergmann 1898 intensiv untersucht wurde^{103, 104}. RAS reguliert den Blutdruck über die Vasokonstriktion, die Rückresorption von Natrium und Wasser in der Niere und die Steuerung des Durstgefühls. Dabei wird das α -Glykoprotein Angiotensinogen, das Substrat des Systems, von der Leber gebildet und im Blutkreislauf durch das Enzym Renin, welches von der Niere sekretiert wird, in Angiotensin (Ang) I gespalten¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Ang I, welches selbst

keine biologische Wirkung hat, wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE, engl. *angiotensin converting enzyme*) aus der Lunge weiter in biologisch aktives Ang II umgewandelt. Ang II aktiviert als Haupteffektor des RAS schließlich spezifische Membranrezeptoren (AT-Rezeptoren), wobei die Ang II-Aktivität hauptsächlich vom AT₁- und AT₂-Rezeptor vermittelt wird.

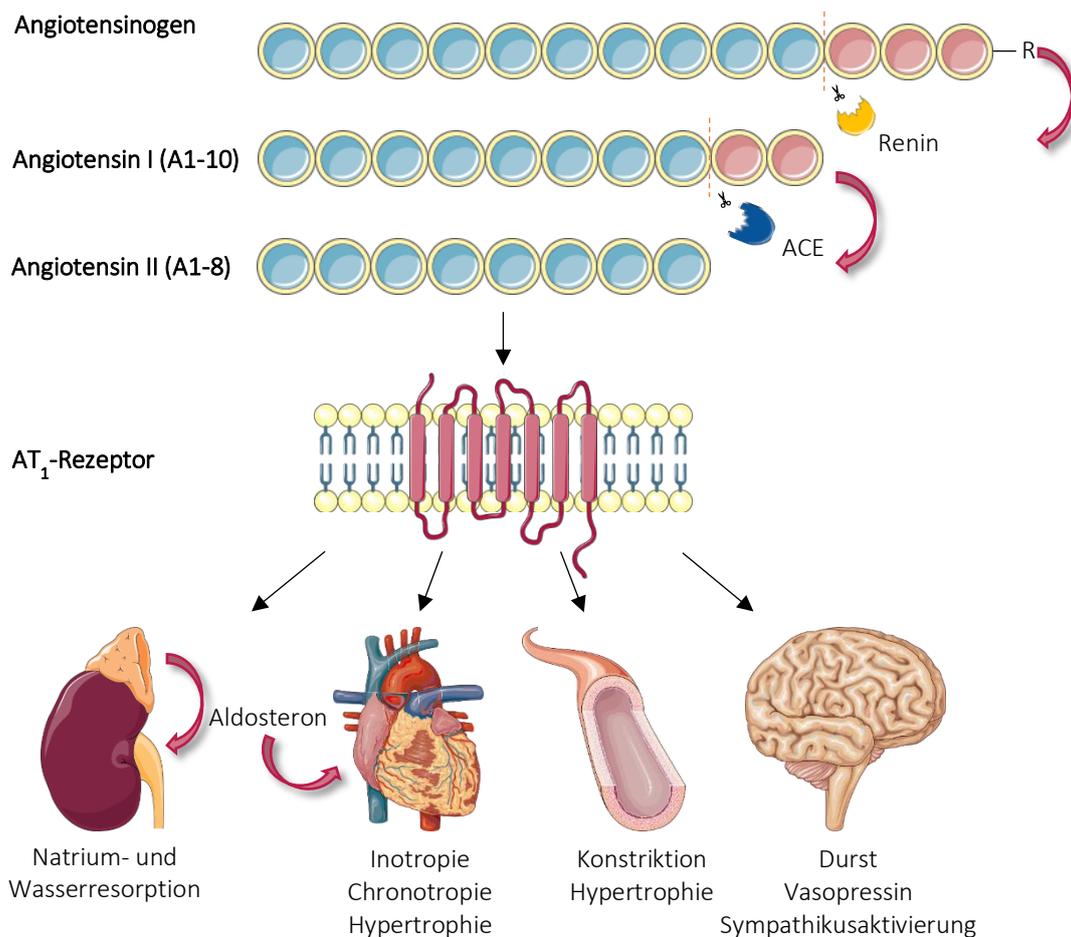


Abbildung 3. Das klassische Renin-Angiotensin-System. Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems und dessen Wirkung auf verschiedene Organe. ACE: *Angiotensin converting enzyme*; AT₁-Rezeptor: Angiotensin II-Rezeptor Typ 1; R: Aminosäurerest. Erstellt mit Hilfe von Servier Medical Art.

Beide Rezeptoren zeigen dabei zwar ähnliche Bindungseigenschaften zu Ang II, jedoch unterscheiden sich sowohl genomische Strukturen und Lokalisation als auch die gewebspezifische Expression und Regulation¹⁰⁸. Konkret gesagt ist der AT₁-Rezeptor vornehmlich für die Vasokonstriktion und Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde verantwortlich und stellt somit den physiologisch wichtigsten Rezeptor dar^{103, 105, 109, 110}. Im

Gegensatz dazu ist die Rolle des AT₂-Rezeptors noch Teil aktueller Forschung, sie wird aber eher in der fötalen Entwicklung und Wachstums- und Regenerationsprozessen gesehen. Die Expression des AT₂-Rezeptors ist beim Erwachsenen daher gering^{103, 108, 111}. Für den AT₁-Rezeptor wurden bei Nagern wie Ratten und Mäusen, aber nicht beim Menschen, zwei Subtypen identifiziert, AT_{1A} und AT_{1B}¹¹². Diese Subtypen unterscheiden sich im Expressionsmuster in verschiedenen Organen. Durch etablierte AT₁-Rezeptor-Antagonisten lassen sich diese allerdings nicht diskriminieren¹¹³⁻¹¹⁵. AT₁-Rezeptoren sind G_q- und G₁₂-Protein-gekoppelte Rezeptoren und werden hauptsächlich in Endothelzellen, aber auch in Zellen glatter Muskulatur exprimiert. Dabei sind sie in der Niere, der Nebenniere und im Gehirn, aber auch in vielen anderen Organen zu finden¹¹⁶⁻¹¹⁸. Die Ang II-induzierte Aktivierung von AT₁-Rezeptoren führt in Blutgefäßen, wie oben angedeutet, zu einer Vasokonstriktion und folglich zur Erhöhung des Blutdruckes. In der Niere wirkt Ang II in einem negativen Rückkopplungsmechanismus, indem es hemmend auf die Freisetzung von Renin wirkt¹¹⁸. Wie oben erwähnt verstärkt Ang II in der Nebenniere die Freisetzung des Mineralkortikoid Aldosteron und dadurch die Rückresorption von Wasser und Natrium in der Niere. Demzufolge wird das Blutvolumen erhöht und es kommt schließlich zu einem Anstieg des Blutdrucks. Die Rückresorption von Wasser und Natrium und die damit verbundene Erhöhung des Blutdrucks wird darüber hinaus durch die zerebrale Wirkung von Ang II vermittelt, indem es eine vermehrte Freisetzung des antidiuretischen Hormons Vasopressin aus dem Hypophysenhinterlappen hervorruft^{103, 118}. Damit das RAS seine Beteiligung an der Blutdruckregulation ausüben kann, werden durch Ang II vielfältige Signalwege aktiviert. Dabei vermitteln die G-Protein-gekoppelten AT₁-Rezeptoren ihre Wirkung hauptsächlich über die Phospholipase C und Inositoltriphosphat, wodurch sie einerseits den Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺ und andererseits die Aktivierung der Proteinkinase C über Diacylglycerol induzieren^{111, 118}. Auch die Aktivierung weiterer Proteinkinasen, wie der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase, der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (ERK) und der c-Jun N-terminalen Kinase steht mit Ang II in Zusammenhang^{113, 119}. Aufgrund seiner Bedeutung für die Blutdruckregulation ist das RAS folglich ein wichtiges pharmakologisches Zielsystem zur Behandlung von Hypertonie. Dabei sind die wichtigsten regulatorischen Optionen die Inhibierung von Renin (z.B. Aliskiren) und der ACE-Aktivität (z.B. Ramipril), genauso wie das Verwenden von AT₁-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. Telmisartan¹²⁰⁻¹²².

Dieses klassische Bild des RAS, welches sich über viele Jahre Forschung entwickelt hat, muss aufgrund neuerer Erkenntnisse zu einem komplexeren System erweitert werden. Dies liegt daran, dass sowohl weitere Spaltprodukte des Angiotensins wie das Ang (1-7), Ang III und Ang IV als auch mit diesen in Zusammenhang stehende Rezeptoren identifiziert worden sind¹²³⁻¹²⁵. Dabei bindet Ang (1-7), welches sich aus den ersten sieben Aminosäuren des Ang II zusammensetzt, an den Mas-Rezeptor. Ang III (Aminosäuren 2-8) hingegen wird durch die Aminopeptidase A gebildet und bindet nach aktuellem Stand ebenfalls an AT₁- und AT₂-Rezeptoren, wohingegen Ang IV (Aminosäuren 3-8) an den AT₄-Rezeptor koppelt^{116, 126}.

Wie oben bereits beschrieben, besitzen mehrere Gewebetypen auch ein lokales RAS, welches sich durch das Vorkommen oder die Produktion der Hauptkomponenten des Systems, Angiotensinogen, Renin, Ang I, ACE und Ang II auszeichnet. Zu finden ist solch ein lokales RAS im Herz, im Gefäßsystem, in der Niere, im Fettgewebe und auch im Gehirn^{103, 116}. Auf die Rolle des RAS im Gehirn wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

2.3.1. RAS im zentralen Nervensystem

Neben dem systemischen RAS gibt es unter anderem im Gehirn auch ein lokales RAS, wobei Ganten *et al.* bereits 1971 Hinweise von Renin im Gehirn entdeckten^{127, 128}. Des Weiteren sind neben den klassischerweise beschriebenen Funktionen des RAS, wie Vasokonstriktion und der daraus resultierenden Erhöhung des Blutdruckes, mittlerweile auch Effekte von RAS hinsichtlich Neuroprotektion, Kognition und zerebraler Vasodilatation bekannt¹²⁷. So sind für die Wirkung von Ang II im Gehirn verschiedene, potenziell schädigende Effekte verifiziert worden. Dazu gehören Hypertonie, Inflammation, erhöhter oxidativer Stress, Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und Neurotoxizität. Diese Prozesse werden überwiegend über die Aktivierung des AT₁-Rezeptors vermittelt. Konkret heißt das, dass Ang II unter anderem die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , TNF- α und IL-6, im *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus erhöht. Die Erhöhung von Zytokinen konnte jedoch durch eine Überexpression von ACE rückgängig gemacht werden¹²⁹. Dagegen induziert Ang II die Produktion von NO, das Wachsen von Axonen und die Entwicklung des Gehirns über die AT₂-Rezeptor-Aktivierung¹³⁰.

Ang (1-7) hingegen besitzt abgesehen von kardiovaskulären Funktionen weitere Effekte, welche über den Mas-Rezeptor vermittelt werden. So spielt Ang (1-7) eine bedeutende Rolle beim Lernen, der Gedächtnisleistung und der Neuroprotektion^{127, 131, 132}. Es sorgt außerdem für einen Anstieg der NO-Produktion im Gehirn über die Aktivierung der neuronalen (nNOS) und endothelialen NOS (eNOS), welche in verschiedenen Studien als elementarer Prozess für die Gedächtnisleistung und die Langzeitpotenzierung im Hippocampus und der Amygdala beschrieben ist^{131, 133}. In Bezug darauf zeigten Ratten und Mäuse mit einem Mas-Rezeptor *Knockout* erkennbare Defizite in der Objekterkennung^{131, 132}. Dieser defizitäre Effekt konnte jedoch durch Losartan behoben werden¹³⁴. Erwähnenswert ist auch, dass die ACE/Ang (1-7)- und Mas-Achse zusätzlich zu einer normalen Endothelfunktion in zerebralen Gefäßen beiträgt^{127, 135}.

Das lokale RAS im Gehirn spielt außerdem eine Rolle bei der Entstehung degenerativer Erkrankungen. Dabei verhindert Ang II bei Ratten die Kalium-induzierte Freisetzung von Acetylcholin im entorhinalen Cortex und beim Menschen im temporalen Cortex¹³⁶. Die durch Ang II induzierten pro-inflammatorischen und pro-oxidanten Effekte, die zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, reduziertem CBF und einem Anstieg des Amyloid- β führen, tragen außerdem maßgeblich zum Krankheitsgeschehen der Alzheimer-Demenz bei¹³⁷. Im Gegensatz dazu verbesserte eine Blockade von AT₁-Rezeptoren mit Sartanen die klinische Situation von Alzheimerpatienten und sollte dementsprechend bei der Vorbeugung und Behandlung in Betracht gezogen werden¹³⁸. Obwohl AT₁-Rezeptor-Antagonisten die beschriebenen prophylaktischen Effekte im Gehirn verursachen, bleibt deren Verwendung als kardiovaskuläres Therapeutikum im Fokus des Interesses.

2.3.2. Zusammenhang zwischen RAS und der Gewichtsregulation

Neben der Regulation des Flüssigkeitshaushalts und der kardiovaskulären Funktionen spielt das RAS eine wichtige Rolle in Bezug auf den Metabolismus, besonders bei der Glukosekontrolle, dem Lipidstoffwechsel und der Gewichtskontrolle. Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, tritt Adipositas selten als isolierte Erkrankung oder isoliertes Symptom auf, sondern meist als Teil des metabolischen Syndroms zusammen mit Hypertonie, Insulinresistenz und Dyslipoproteinämie⁷. Eine Folgeerkrankung ist unter anderem Diabetes. Beim Diabetes Typ 2 kann aufgrund einer Insulinresistenz der Insulinbedarf durch die Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas nicht

mehr ausreichend gedeckt werden. Es kommt dadurch zu einem relativen Insulinmangel, im Gegensatz zum Typ 1, der sich durch einen absoluten Insulinmangel auszeichnet¹³⁹. Die Folge ist die Notwendigkeit einer Supplementierung von Insulin zur Verbesserung der Glukoseaufnahme in die Zellen. Verschiedene Studien haben in Bezug darauf gezeigt, dass sowohl AT₁-Rezeptor-Antagonisten als auch Inhibitoren des ACE die Glukosehomöostase verbessern und die Inzidenz von Diabetes reduzieren¹⁴⁰⁻¹⁴³.

Neben der Hypertonie und Diabetes haben AT₁-Rezeptor-Antagonisten außerdem Einfluss auf das Gewicht. Im Forschungsfeld von Adipositas werden häufig genetisch modifizierte Ratten- oder Mauslinien genutzt, um die Entwicklung von Adipositas zu modellieren. Solche Modelle beruhen auf genetischen Veränderungen am Adipokin Leptin oder dessen Rezeptor. Sie stellen die Situation der Adipositas bzw. des metabolischen Syndroms allerdings nicht adäquat dar, da diese genetischen Veränderungen beim Menschen nur sehr selten vorkommen^{144, 145}. Für die Darstellung von Adipositas eignen sich daher Modelle, bei denen diese durch ein übermäßiges Angebot an kalorienreicher Nahrung entsteht. Sie wird als Diät-induzierte Adipositas bezeichnet¹⁴⁶. Wie oben bereits angedeutet, spielt das RAS genau in diesen Modellen bei der Gewichtsreduktion eine Rolle. Genauer gesagt verhindern AT₁-Rezeptor-Antagonisten bei Ratten und Mäusen, die hochkalorisches Futter erhielten, die Entstehung von Adipositas¹⁴⁷⁻¹⁵¹. Es konnte außerdem eine kurative Wirkung der AT₁-Rezeptor-Antagonisten beobachtet werden. So verloren übergewichtige Mäuse und Ratten durch die Behandlung mit AT₁-Rezeptor-Antagonisten an Gewicht^{150, 152, 153}, aber auch in humanen Studien wurde diese gewichtsreduzierende Wirkung gezeigt^{154, 155}. Dabei handelt es sich um einen Klasseneffekt der Sartane. Beispiele für solche Sartane, deren Beteiligung an der Regulation des Körpergewichts nachgewiesen wurde, sind: Candesartan^{151, 156-158}, Irbesatan¹⁵⁵, Telmisartan^{140, 148, 150, 159, 160} und Valsartan¹⁵⁴. Neben den gewichtsregulierenden Effekten der AT₁-Rezeptor-Antagonisten gibt es aber auch Hinweise, dass ACE-Inhibitoren das Körpergewicht reduzieren können, jedoch geschieht dies in einem schwächeren Ausmaß als durch die AT₁-Rezeptor-Antagonisten^{140, 161, 162}. Zudem ist der gewichtsregulierende Effekt der AT₁-Rezeptor-Antagonisten unabhängig von der Regulation des Blutdruckes¹⁵¹. Damit eine Gewichtsabnahme erreicht werden kann, müssen die AT₁-Rezeptor-Antagonisten allerdings hochdosiert verabreicht werden. Bei niedrigen bis mittleren Dosierungen wurde das Gewicht nicht reduziert¹⁵¹. Der zugrundeliegende Mechanismus der Gewichtsregulierung ist noch nicht vollends geklärt. Zum einen gibt es

eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung Leptin-vermittelter Signalwege und zum anderen darauf, dass das zerebrale RAS ebenfalls eine Rolle bei der Gewichtsregulierung spielt. Bei Zucker Ratten, bei denen aufgrund des fehlenden Leptinrezeptors die Leptin-Signaltransduktion gestört ist, führte die Behandlung mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten Candesartan zum Beispiel nicht zu einer Reduktion des Körpergewichts. Bei den Kontrolltieren mit intakter Leptin-Signaltransduktion war diese allerdings zu beobachten¹⁵¹. Ein ebenso durch Leptin vermittelter Effekt konnte in einer Studie mit Ratten beobachtet werden, bei denen mit hochkalorischem Futter eine Diät-induzierte Adipositas ausgelöst wurde. Eine gleichzeitige, zweiwöchige Behandlung der Tiere mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten Telmisartan führte bereits ab dem 10. Tag zu einer Gewichtsreduktion. Die Kontrolltiere zeigten dabei unter hochkalorischem Futter im Leptinresistenztest eine positive Korrelation zwischen Leptinkonzentration im Plasma und der aufgenommenen Energiemenge. Demzufolge hatten diese Tiere offensichtlich eine Leptinresistenz entwickelt, da sie trotz hoher Leptinlevel viel Futter zu sich genommen hatten¹⁴⁸. Diejenigen Tiere, die gleichzeitig mit Telmisartan behandelt wurden, entwickelten jedoch keine Leptinresistenz und es konnte bei ihnen eine negative Korrelation zwischen Leptinkonzentration im Plasma und der aufgenommenen Energiemenge beobachtet werden. Außerdem verbesserte die Behandlung mit Telmisartan von Mäusen unter HFD den Leptintransport entlang der Blut-Hirn-Schranke. Im Vergleich dazu war dieser bei den unbehandelten Mäusen unter HFD reduziert¹⁴⁷. Neben den genannten Wirkungen von Telmisartan normalisierte die Behandlung außerdem die STAT3-Signaltransduktion im Hypothalamus, welche durch das hochkalorische Futter reduziert war¹⁴⁸.

In Bezug auf die Gewichtsregulierung ist neben der Beteiligung des Leptinsignalwegs weiter gezeigt worden, dass das zerebrale RAS ebenfalls eine bedeutende Rolle spielt. Das zeigt sich unter anderem daran, dass transgene Ratten mit einem gehirnspezifischen Angiotensinogendefizit trotz hochkalorischem Futter weder adipös noch insulin- oder leptinresistent wurden. Zudem war die Glukosekontrolle bei diesen transgenen Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren unter hochkalorischer Diät verbessert¹⁶³. Des Weiteren wurde die Gewichtszunahme und Energieaufnahme bei den Kontrolltieren der Studie durch die Behandlung mit Telmisartan unter hochkalorischer Diät verbessert. Dies galt ebenso für die transgenen Ratten, wenn auch zu einem geringeren Ausmaß. Somit wird deutlich, dass das lokale RAS im Gehirn ebenfalls an der Gewichtsregulierung, dem Fressverhalten und an der Entstehung von

metabolischen Einschränkungen beteiligt ist¹⁶³. In einer weiteren Diät-induzierten Adipositas Studie mit Mäusen konnte außerdem beobachtet werden, dass die Behandlung mit Telmisartan neben dem anti-adipösen Effekt die mit HFD-gefütterten Tiere vor einer Akkumulation von Lipiden und Lipidtoxizität im Hypothalamus schützt. Dies geht mit einer anti-inflammatorischen Wirkung einher¹⁶⁴. Es lässt sich also sagen, dass die AT₁-Rezeptor-Antagonisten auch im Gehirn eine besondere Rolle bei der Gewichtsregulierung und Verbesserung des metabolischen Status spielen. Inwiefern die AT₁-Rezeptor-Antagonisten im Zusammenhang mit einer Diät-induzierten Adipositas weitere präventive Effekte im Gehirn haben, ist noch nicht untersucht und daher ein Teil dieser Arbeit.

2.4. Fragestellung

Die Regulierung des CBF ist von den Bedürfnissen der aktiven Areale im Gehirn abhängig und stellt somit einen unerlässlichen Prozess für eine physiologische Gehirnfunktion dar. Veränderungen innerhalb dieses eng miteinander verwobenen Systems aus Zellen und Signalkaskaden führen schnell zu funktionalen, teilweise irreversiblen Schädigungen. Adipositas ist ein Krankheitsbild, welches neben den klassischen Folgeerkrankungen wie beispielsweise Herz-Kreislaufkrankungen, solche Veränderungen induzieren kann^{62, 63}. Adipositas-induzierte Veränderungen im Bereich der neurovaskulären Einheit können eine Reduktion des CBF und Strukturveränderungen im zentralen Gefäßsystem hervorrufen. Diese sind weiter mit einem erhöhten Risiko für Schlaganfälle oder kognitiven Schädigungen verbunden³⁹. Eine effektive Therapiemöglichkeit von Adipositas gibt es bislang jedoch nicht.

Hinsichtlich protektiver Effekte bei der Gewichtsregulierung spielt allerdings das RAS eine entscheidende Rolle. Genauer gesagt heißt das, dass unter anderem das RAS im Gehirn, konkreter gesagt die AT₁-Rezeptor-Antagonisten, an der Reduktion des Körpergewichts beteiligt sind^{163, 164}. Dies lässt vermuten, dass AT₁-Rezeptor-Antagonisten weitere zerebral-präventive Effekte im Zusammenhang mit einer Diät-induzierten Adipositas haben könnten. So ist zum Beispiel bei Alzheimererkrankungen während der Gabe von hochkalorischem Futter solch ein Effekt durch AT₁-Rezeptor-Antagonisten in hypertensiven Koletsky Ratten bereits gezeigt worden¹⁶⁵.

All die beschriebenen Aspekte führen zu der Hypothese, dass die neurovaskuläre Kopplung und der CBF unter hochkalorischer Fütterung eingeschränkt sind und diese Beeinträchtigungen zu kognitiven und psychosomatischen Veränderungen führen. Des Weiteren wird vermutet, dass eine gleichzeitige Behandlung mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten Telmisartan (TEL) die Adipositas-induzierten Beeinträchtigungen verbessert oder gar verhindert. Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit folgende Fragen untersucht:

1. Kommt es durch eine Diät-induzierte Adipositas zu einer neurovaskulären Entkopplung mit gleichzeitiger Reduktion des CBF?
2. Welche strukturellen oder funktionalen Veränderungen stehen möglicherweise mit diesen Defiziten im Zusammenhang?
3. Gehen neurovaskuläre Einschränkungen mit kognitiven und psychosomatischen Defiziten einher?
4. Kann eine Behandlung mit dem AT₁-Rezeptor-Antagonisten TEL während einer hochkalorischen Diät diese Beeinträchtigungen verbessern?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde bei Mäusen durch HFD eine Diät-induzierte Adipositas ausgelöst. Ein Teil der Tiere erhielt zusätzlich den AT₁-Rezeptor-Antagonisten TEL. Mittels *Laser Speckle Imaging* (LSI) und MRT wurden die neurovaskuläre Kopplung und der CBF untersucht. Zudem wurde mit verschiedenen Verhaltensversuchen der Behandlungseffekt auf Kognition und Psychosomatik analysiert. Um Hinweise auf mögliche beteiligte Prozesse zu erhalten, wurden unterschiedliche Gehirnareale auf Faktoren untersucht, die mit Adipositas in Zusammenhang stehen, wie zum Beispiel die Bildung von *String Vessel* (oder auch *acellular capillaries* genannt), durch die aufgrund fehlender Endothelzellen kein Blutfluss mehr stattfinden kann. Sie bestehen lediglich aus einer Basalmembranhülle¹⁶⁶. Zudem wurden zelluläre Seneszenz und oxidativer Stress in Endothelzellen untersucht.

3. Material

3.1. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid-Mischung (Rotiphorese 30 %)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Albumin Fraktion V (Bovines Serumalbumin, BSA)	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont (UK)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
Bromphenolblau	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont (UK)
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Dithiothreitol (DTT)	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont (GB)
Einbettmedium	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
Ethanol, absolut	J. T. Baker, Center Valley (USA)
Ethanol, 70% (v/v), vergällt	Th. Geyer, Renningen (D)
Formamide	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Gummi arabicum	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, (D) Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

MATERIAL

Glycerin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Heparin 25000 U / 5 ml	Ratiopharm, Ulm (D)
Isofluran	Baxter International, Deerfield (USA)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Ketamin	
Ketaset	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin (D)
Ketabel 100 mg/ml	bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta (D)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Meditomedin, Dorbene	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin (D)
Methanol	Th. Geyer, Renningen (D)
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Avantor, Center Valley (USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumhydroxid (NaOH) 1 M	Merck KGaA, Darmstadt (D)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Ringerlösung / Isotone Natriumchlorid-Lösung 0,9% (NaCl)	Berlin-Chemie Menarini, Berlin (D)
Salzsäure (HCl) 1 M	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Sheath Fluid	Merck KGaA, Darmstadt (D)

SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Telmisartan: Micardis® 40 mg Tabletten	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, (D)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Tris-HCl (2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol) Lösung 0,5M, pH 8,8	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Tris-HCl (2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol) Lösung 1,5M, pH 6,8	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Xylazin Rompun® 2 % Injektionslösung	Bayer AG, Leverkusen (D)

3.2. Puffer und Lösungen

3.2.1. Suspensionen für orale Gavage

Telmisartan Suspension

Micardis® 40 mg Tabletten von Boehringer Ingelheim wurden gemörsert und mit 2,5 g Gummi arabicum vermengt. Die Mischung wurde anschließend in 25 ml Leitungswasser suspendiert. Die Konzentration der Suspension betrug 1,6 mg/ml TEL in 10 % (v/v) Gummi arabicum.

Vehikel-Kontrolllösung

Analog zur TEL-Suspension wurde eine 10 %-ige (v/v) Lösung Gummi arabicum in Leitungswasser hergestellt. Sie diente der Kontrollbehandlung (KON).

3.2.2. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Eindeckmedium (Mowiol/DABCO)	3,6 M Glycerin 0,43 mM Mowiol 4-88 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5) 22,3 mM DABCO
Hybridisierungspuffer	70 % Formamide 25 nM MgCl ₂ 0,1 M Tris (pH 7,2) 5 % Blocking Reagent
Paraformaldehyd (PFA) (4 %), pH 7,4	PBS 4 % (w/v) Paraformaldehyd mit Natriumhydroxid auf pH 7,4 eingestellt
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
Ringer-Heparin	Ringer-Lösung 10 U / ml Heparin
SDS-PAGE Probenpuffer, pH 6,8 (4x)	300 mM Tris-HCl (pH 6,8) 12,5 % SDS 20 % (v/v) Glycin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 402 mM Dithiotriol (DTT)
Tris-gepufferte Salzsäure (TBS)-T, pH 7,6	20 mM Tris 137 mM NaCl 0,1 % Tween-20

Western Blot Elektrophoresepuffer pH 8,3	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Western Blot Transferpuffer pH 8,5	17 mM Tris 187 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

3.3. Kits und Proteine

Bezeichnung	Hersteller
Bullet Blender® <i>PINK Bead Lysis Kit</i>	Next Advance, Averill Park (USA)
Milliplex® <i>MAP Mouse Metabolic Magnetic Bead Panel #MMH-K44 und #MMHE-K44</i>	Merck KGaA, Darmstadt (D)

3.4. Antikörper

Primärantikörper	Hersteller, Katalognummer	Ursprung, Verdünnung	Sekundärantikörper
CD31/Pecam1	BD Pharmingen, #553370	Ratte, 1:500	anti-Ratte, Alexa 488, Esel, 1:400
	Abcam, #ab28364	Kaninchen, 1:50	anti-Kaninchen, Alexa 488, Ziege, 1:1000
Collagen IV (Col IV)	Abcam, #ab6586	Kaninchen, 1:500	anti-Kaninchen, Cy TM 3, Esel, 1:400
4-Hydroxynonenal (4-HNE)	Merck KGaA, #393207	Kaninchen, 1:1000	anti-Kaninchen, Cy TM 3, Esel, 1:500

MATERIAL

Perilipin 2 (Plin2)	Progen, #GP46	Meerschwein, 1:250	anti-Meerschwein, Alexa 594, Ziege, 1:1000
S100β	Synaptic Systems, #287006	Huhn, 1:500	anti-Huhn, Alexa 488, Ziege, 1:1000
eNOS (Typ III)	BD Transduction, #610296	Maus, 1:2500	anti-Maus-IgG HRP, Kaninchen, 1:5000
phospho-eNOS (Ser1177)	Cell Signaling Technology, #9571S	Kaninchen, 1:500	anti-Kaninchen-IgG HRP, Ziege, 1:5000
α-Tubulin	Cell Signaling Technology, #2144	Kaninchen, 1:5000	anti-Kaninchen-IgG HRP, Ziege, 1:5000

3.5. Geräte

Bezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
7-Tesla Kleintier- Magnetresonanztomograph	ClinScan	Bruker, Billerica (USA)
96-Well-Plattenmagnet	Bio-Plex® Handheld Magnetic Washer	BioRad Laboratories, München (D)
Autoklav	Systemec V-65	Systemec, Linden (D)
Beatmungsgerät	MiniVent, Model 845	Havard Apparatus, Holliston (USA)
Blutdruckmessgerät freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Jens Mittag, Medizinische Klinik I, UKSH Lübeck	Blood Pressure Analysis System, Model: SC-1000	Hatteras Instruments, Cary (USA)

Blutzuckermessgeräte	Ascensia Elite XL	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
Chemiluminiszenz- Aufnahmeggerät	Fusion Solo S	VWR International LLC, Radnor (USA)
Feedback-reguliertes Wärmesystem	TCAT-2LV	Physitemp Instruments, Clifton MA (USA)
Fluoreszenzmikroskop	DMI 6000B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
	DM5500	Leica Microsystems, GmbH Wetzlar (D)
Gefrierschränke	-80 °C: MDF-594	Sanyo, Moriguchi (JP)
	-20 °C: MediLinie	Liebherr, Biberach a. d. Riß (D)
Gelelektrophorese-System für Polyacrylamidgele	Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories, München (D)
Gelgießapparatur für Polyacrylamidgele	Handcasting Set	Bio-Rad Laboratories, München (D)
Heizblock	QBT2	Grant Instruments Ltd., Royston (UK)
Homogenisator	Bullet Blender®	Next Advance Inc., Troy (USA)
	Storm 24 Modell BBY24M-CE	
Horizontalschüttler	MTS4	IKA®-Werke, Staufen (D)
Isofluranverdampfer		Dräger AG, Lübeck (D)
Kapnometer	microCapstar	CWE Inc. (USA)
Kryotom	CM 3050	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Laser Speckle Imaging	FLPI	Moor Instruments Ltd., Axminster (UK)
Lichtquelle	Polychrome V	FEI Munich, München (D)
Mörser und Pistill	Mörser 55 / Pistill 56	Haldenwanger, Waldkraiburg (D)

MATERIAL

Multipette	Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Multiplex Reader, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Marcus Altfeld, Heinrich- Pette-Institut Hamburg	Luminex 200™ System (Bio-Plex® 200)	Bio-Rad Laboratories, München (D)
Nuklear-Magnet-Resonanz- Spektroskop	LF110-BCA Analyzer	Bruker (USA)
pH-Meter	S220-Kit SevenCompact™	Mettler-Toledo, Columbus (USA)
Pipetten	Reference / Research (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg (D) Gilson, Middleton (USA)
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (D)
Rollenmischer	RM5	CAT, Ballrechten-Dottingen (D)
Schlundkanüle für orale Gavage	1428 LL	Acufirm Ernst Kratz, Dreieich (D)
UV-Vis-Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Waagen	ABT 100-5 M	Kern & Sohn GmbH, Balingen (D)
	BL600	Sartorius AG, Göttingen (D)
	MC1 LC 220 S	Sartorius AG, Göttingen (D)
	MC1 LC 4200 S	Sartorius AG, Göttingen (D)

Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Reference	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Wippschüttler	WT17	Biometra GmbH, Göttingen (D)
	DRS-12	neoLab GmbH, Heidelberg (D)
Zentrifugen	Biofuge Pico	Heraeus, Hanau (D)
	Mikro 200 R	Andreas Hettich, Tuttlingen (D)
	Universal 320 R	Andreas Hettich, Tuttlingen (D)

3.6. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Typ	Hersteller
Blutzuckerteststreifen	Elite Sensor	Bayer Vital, Leverkusen (D)
Deckgläser	24 x 50 mm	Th. Geyer, Renningen (D)
Einmalküvetten	PMMA semi-micro	VWR International, Radnor (USA)
Fettstift	DAKO Pen	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Filterpapier	Whatman	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont (UK)
Infusionskanüle	Safety-Multifly 21 G	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Injektionskanülen	BD Microlance 3 23 G, 26 G, 27 G	BD, Franklin Lakes (USA)
medizinisches Klebeband	DuraporeTM	3M, St. Paul (USA)
Mikrovette	CB300	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Multipettenaufsätze	Combitips advanced 0,5 ml / 2,5 ml / 5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg (D)

MATERIAL

Nitrilhandschuhe	Peha-soft nitrile FINO	Hartmann, Heidenheim (D)
Nitrozellulosemembran	0,2 µm	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont (UK)
Objektträger	Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Pipettenspitzen	10 µl / 200 µl / 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht (D)
	10 µl / 200 µl / 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Polypropylen Röhrchen	CELLSTAR® 15 ml / 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (AT)
Reaktionsgefäße	0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Serologische Pipetten	CELLSTAR® 5 ml / 10 ml / 25 ml / 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (AT)
Skalpelle	Typ 10 / 11	Feather, Osaka (JP)
Spezialdiäten für Mäuse	Hochfettdiät (HFD) EF acc. D12492 (I) mod.	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest (D)
	Normalfettdiät (NFD) EF S12450B mod.	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest (D)
	Hochfettdiät (HFD) D12492	Research Diets Inc., New Brunswick (USA)
	Normalfettdiät (NFD) D12450J	Research Diets Inc., New Brunswick (USA)
	Standard-Zuchtdiät Maus 1314	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage (D)
Spritzen	1 ml / 5 ml / 10 ml / 20 ml / 50 ml	BD, Franklin Lakes (USA)

Szintillationsgefäß	6 ml	PerkinElmer Inc., Waltham (USA)
Vinylhandschuhe	Vinyl 2000 PF	Meditrade GmbH, Kiefersgelden (D)

3.7. Software

Bezeichnung	Hersteller
Anymaze	Stoelting, Chicago (USA)
EndNote X7.7.1	Thomson Reuters, New York City (USA)
Evolution Capt	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell (D)
Fiji ImageJ	Open Source Project
GraphPad® Prism 8 und 9	GraphPad® Software, La Jolla (USA)
LAS AF Imaging Software	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
moorFLPI V2.1 Software	Moor Instruments Ltd., Axminster (UK)
Office 2010	Microsoft, Redmond (USA)

4. Methoden

4.1. Tierexperimentelle Methoden

Alle Tierversuche wurden den Richtlinien des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Bundeslandes Schleswig-Holstein entsprechend durchgeführt und unter dem Zeichen V241-60532/2017 (126-10/17) am 27. November 2017, mit Änderungen am 15. Februar 2018, 28. August 2018, 17. September 2018 und 24. Januar 2020 genehmigt.

4.1.1. Allgemeine Haltungsbedingungen

Die Mäuse wurden in individuell ventilierten Käfigen (IVC) mit einer Fläche von 500 cm² in Gruppen von 3-4 Mäusen in den klimatisierten Haltungsräumen der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck im Gebäude 66 bei einem 12h Hell-Dunkel-Rhythmus (Lichtphase 6:00-18:00 Uhr) gehalten. Lediglich für die Durchführung der Verhaltensversuche (Abschnitt 4.1.5) wurden die Mäuse vier Tage vor dem Versuch in Einzelhaltung gesetzt, um die Variabilität der Stressreaktion zu minimieren.

Für die Studien 1 und 3 wurden 5 Wochen alte männliche Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6N des externen Züchters Charles River Deutschland verwendet. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Tiere *ad libitum* mit einer Standarddiät (Altromin Zuchtdiät Maus, #1314) und Leitungswasser gefüttert und anschließend auf die Spezialdiät (SNIFF Spezialdiäten GmbH, Hochfettdiät #E15742-34 und Normalfettdiät #E15748-047) umgestellt.

Für Studie 2 wurden 21 und 29 Wochen alte männliche Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J des externen Züchters Jackson Lab USA (#380050) bezogen, die bereits ab der 7. Lebenswoche eine Spezialdiät (Research Diets Inc., Hochfettdiät #31466 und Normalfettdiät #39072) beim Züchter erhalten haben, welche nach Ankunft der Tiere in den eigenen Haltungsräumen weiter

gefüttert wurde. Nach einer Akklimatisierung von 2 Wochen waren die Tiere zu Beginn der Versuche 23 bzw. 31 Wochen alt (16 und 24 Wochen Spezialdiät).

4.1.2. Studienprotokolle

Für die Studien 1 und 3 wurden die Tiere mit einer unterschiedlichen Gesamtdauer nach dem gleichen Protokoll behandelt. Dafür wurden die Mäuse vor Versuchsbeginn gewichtsrandomisiert in vier gleich große Behandlungsgruppen eingeteilt, und es wurde eine Prüfung auf eine gleichmäßige Verteilung hinsichtlich des Gewichts durchgeführt. Zu Beginn der Behandlung (Tag 0) wurde die Standarddiät gegen eine Spezialdiät ausgetauscht. Zur Induktion von Adipositas und Diabetes bekam die Hälfte der Tiere Futter mit einem sehr hohen Fettanteil (Hochfett diät, HFD), während die andere Hälfte Kontrollfutter mit einem normalen Fettanteil erhielt (Normalfett diät, NFD). Der Fettanteil der HFD betrug 35 %, enthielt 24 kJ/g mit einer umsetzbaren Energiemenge, die zu 21 % aus Kohlenhydraten, 19 % aus Proteinen und 60 % aus Fett bestand. Der Stärkeanteil in der NFD war höher und der Anteil an Fett entsprechend niedriger bei nur 5 %. Die NFD enthielt 18 kJ/g mit einer umsetzbaren Energiemenge, die zu 67 % aus Kohlenhydraten, 20 % aus Proteinen und 13 % aus Fett bestand.

Ab Tag 0 des Behandlungszeitraums bekamen die Tiere zusätzlich in Abhängigkeit der Behandlungsgruppe täglich TEL oder die Vehikelkontrolle (KON) verabreicht (Abschnitt 4.1.2). Die TEL-Behandlung erfolgte in Abhängigkeit des Gewichts. Daher wurden die Mäuse täglich vor der Verabreichung gewogen. Es gab bei Studie 1 und 3 folgende Behandlungsgruppen: NFD + KON (NFD_{KON}), NFD + TEL (NFD_{TEL}), HFD + KON (HFD_{KON}) und HFD + TEL (HFD_{TEL}), wobei sich die Länge des Behandlungszeitraums unterschied (siehe Protokoll Studie 1 und 3).

Die Tiere der Studie 2 erhielten bereits ab der 7. Lebenswoche beim externen Züchter die Spezialdiät (Abschnitt 4.1.1). Der Fettanteil der HFD betrug hier 35 % und die Diät enthielt 22 kJ/g mit einer umsetzbaren Energiemenge, die zu 20 % aus Kohlenhydraten, 20 % aus Proteinen und 60 % aus Fett bestand. Das NFD Kontrollfutter hatte einen Fettanteil von 4 % und enthielt 16 kJ/g mit einer umsetzbaren Energiemenge, die zu 70 % aus Kohlenhydraten, zu 20 % aus Proteinen und zu 10 % aus Fett bestand. Nach Ankunft in Lübeck erhielten die Mäuse bis zum Ende der

gewünschten Fütterungsperiode von 16 bzw. 24 Wochen das gleiche Futter. Für Studie 2 wurden die Tiere nicht mit TEL behandelt.

Orale Verabreichung von TEL

TEL wurde in Studie 1 und 3 analog zu Dapper *et al.*, Rawish *et al.* und Schuster *et al.*^{147, 164, 167} täglich mit einer Dosis von 8 mg/kg Körpergewicht mittels oraler Gavage über eine Schlundsonde verabreicht. Die ein bis zweimal wöchentlich angesetzte TEL-Lösung (Abschnitt 3.2.1) mit einer Konzentration von 1,6 mg/ml wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Jede Maus erhielt entsprechend 5 µl pro g Körpergewicht der Lösung. Die Kontrollgruppen erhielten das gleiche Volumen der KON-Lösung (Abschnitt 3.2.1).

Studie 1

In Studie 1 wurde untersucht, ob die Fütterung mit HFD für 8 Wochen und die resultierende Adipositas zu einer verminderten neurovaskulären Kopplung und zu einer reduzierten Gedächtnisleistung führt und ob die gleichzeitige Behandlung mit TEL diese Defizite verbessern oder verhindern kann. Alle Mäuse dieser Studie wurden für insgesamt 8 Wochen bzw. 56 Tage entsprechend obiger Beschreibung behandelt. Während der letzten Behandlungswoche wurde bei allen Mäusen der *Barnes Maze* Test (Abschnitt 4.1.5) durchgeführt und am letzten Behandlungstag (Tag 56) wurde die neurovaskuläre Kopplung mittels LSI-Messung (Abschnitt 4.1.3) untersucht. Die Studie wurde am selben Tag mit der Blut- und Organentnahme (Abschnitt 4.1.7) beendet. Jede Behandlungsgruppe bestand aus 13 Mäusen, wobei drei Tiere während der Operation für die LSI-Messung gestorben sind.

Studie 2

Ziel von Studie 2 war die Untersuchung der Zeitabhängigkeit beim Auftreten von Defiziten in der neurovaskulären Kopplung. Dafür erhielten die Mäuse ihre Spezialdiät für insgesamt 16 oder 24 Wochen ohne eine zusätzliche TEL-Behandlung. Während der letzten Behandlungswoche wurde bei allen Tieren der *Barnes Maze* Verhaltenstest (Abschnitt 4.1.5) und an Tag 112 bzw. 168 die neurovaskuläre Kopplung mittels LSI (Abschnitt 4.1.3) untersucht. Die Studie wurde am selben

Tag mit der Blut- und Organentnahme (Abschnitt 4.1.7) beendet. Jede Behandlungsgruppe bestand aus 13 Mäusen, wobei ein Tier während der Operation für die LSI-Messung gestorben ist.

Studie 3

Da alle Experimente möglichst innerhalb der letzten Behandlungswoche durchgeführt werden sollten und die Anzahl der verschiedenen Untersuchungen das durchführbare Pensum übertraf, wurde diese Studie in zwei Kohorten durchgeführt. Jede Behandlungsgruppe bestand aus 13 Mäusen, wobei eine Maus während des Behandlungszeitraums aufgrund einer Zahndysplasie getötet werden musste.

Studienteil A

In Teil A von Studie 3 (Abbildung 4) wurde untersucht, ob eine verminderte neurovaskuläre Kopplung nach 16 Wochen HFD-Fütterung durch die Behandlung mit TEL normalisiert werden kann. Des Weiteren wurde überprüft, ob die HFD-induzierte Adipositas zu kognitiven Defiziten führt, und ob TEL diese verbessern oder verhindern kann. Alle Mäuse dieser Studie erhielten für insgesamt 16 Wochen bzw. 114 Tage die Spezialdiät wie oben beschrieben und wurden gleichzeitig täglich mit TEL oder KON behandelt. In Woche 16 wurde bei allen Mäusen der *Open Field Test* (Abschnitt 4.1.5) als Teil der *Adaptionsphase* des *Object Place Recognition Tests* (Abschnitt 4.1.5), der an den darauffolgenden Tagen erfolgte, durchgeführt. Die neurovaskuläre Kopplung wurde mittels LSI (Abschnitt 4.1.3) als finaler Versuch an Tag 114 durchgeführt. Die Studie wurde am selben Tag mit der Blut- und Organentnahme (Abschnitt 4.1.7) beendet.



Abbildung 4. Studienplan 3A. Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Experimente von Studie 3A. OF: *Open Field Test*; OPR: *Object Place Recognition Test*; LSI: *Laser Speckle Imaging*

Studienteil B

Teil B von Studie 3 (Abbildung 5) diente der Untersuchung des Einflusses der HFD und TEL auf Parameter des metabolischen Syndroms. Außerdem wurde mit einem weiteren Test zum Angstverhalten das Ergebnis aus Studienteil A bestätigt und die absolute Perfusion in verschiedenen Gehirnarealen gemessen. Alle Mäuse dieses Studienteils wurden für insgesamt 16 Wochen bzw. 114 Tage wie beschrieben behandelt. In Woche 15 (Tag 104) wurde bei allen Tieren der *Elevated Plus Test* (Abschnitt 4.1.5) durchgeführt. In Woche 16 wurde an Tag 105 die Körperzusammensetzung (Abschnitt 4.1.6) und an den Tagen 106-110 der Blutdruck (Abschnitt 4.1.6) bestimmt. Am Tag 112 wurden die Mäuse nach Kiel zum *Molecular Imaging North Competence Center* (MOIN CC) transportiert. Dort wurden am finalen Versuchstag (Tag 114) die MRT zur Bestimmung der Gehirnperfusion durchgeführt. Am selben Tag wurde die Studie mit der Blut- und Organentnahme (Abschnitt 4.1.7) beendet.



Abbildung 5. Studienplan 3B. Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Experimente von Studie 3B. EP: *Elevated Plus Test*; BC: Körperfettzusammensetzung, engl. *Body Composition*; BP: Blutdruck; MRT: Magnetresonanztomographie

4.1.3. Laser Speckle Imaging

Bei der *Laser Speckle Imaging* (LSI) Methode handelt es sich um eine indirekte Messmethode der Gewebsperfusion, welche hier genutzt wurde, um Veränderungen in der Gehirnperfusion nach entsprechender Stimulation darzustellen. Die Methode wurde, abgesehen von kleinen Änderungen, in Anlehnung an Wenzel *et al.* adaptiert¹⁶⁸.

Für die Messung wurden die Mäuse mit einer intraperitoneal (i.p.) verabreichten Kombination aus Ketamin (70 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (16 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert, welche initial während der Operation durch 1-1,5 % Isofluran ergänzt wurde. Da Letzteres selbst

eine Durchblutung fördernde Wirkung hat, wurde es mindestens 15 min vor Beginn der Messung ausgestellt. In regelmäßigen Abständen wurde mittels Zwischenzehenreflex getestet, ob bei den Mäusen Schmerzfreiheit gegeben war. Die Aufrechterhaltung der Narkose wurde mit Ketamin i.p. (70 mg/kg Körpergewicht) zwischen den Messungen alle 30-40 min gewährleistet. Die Tiere wurden für die Messung tracheotomiert und waren während der gesamten Messung intubiert. Die Ventilation über ein Beatmungsgerät erfolgte mit einem Luftgasgemisch aus 70 % Stickstoff und 30 % Sauerstoff. Zur Überwachung der Atmung in Form der CO₂-Konzentration in der expiratorischen Luft waren die Mäuse zusätzlich an ein Kapnometer angeschlossen. Das Beatmungsvolumen und die Frequenz wurden so eingestellt, dass ein physiologischer CO₂-Wert von 34-38 mmHg erreicht und stabil gehalten werden konnte. Zudem wurde die Körpertemperatur mit einem Feedback-regulierten Wärmesystem während der gesamten Messzeit bei 37 °C gehalten.

Für die Messung wurde zunächst der Schädelknochen durch das Entfernen der Kopfhaut freigelegt. Um diesen vor dem Austrocknen während der Messung zu schützen, wurde ein Tropfen Öl aufgebracht. Nach einer Adaptionszeit von durchschnittlich 15 min hatte sich in der Regel ein stabiler und gleichmäßiger Fluss eingestellt und es wurde mit der Messung und Stimulation begonnen. Über Elektroden, die subkutan im Bereich der Vibrissen eingebracht worden waren, wurde der somatosensorische Cortex stimuliert. Die Messregionen wurden entsprechend auf diesen Bereich festgelegt (Abbildung 7A). Die elektrische Stimulation erfolgte mit einer Stärke von 750 µA (5 ms, 5 Hz) für 5 Sekunden. Der Anstieg der Perfusion in diesem Bereich wurde mit dem LSI-Gerät gemessen und mit der moorFLPI Software aufgezeichnet. Die Stimulation erfolgte fünfmal hintereinander im Abstand von jeweils einer Minute. Nach einer kurzen Messpause von ein paar Minuten wurde die zweite Stimulation durch eine Beimischung von ca. 7 % CO₂ in die Beatmungsluft für eine Dauer von 10 min durchgeführt. Der Flussanstieg wurde im Bereich der großen sichtbaren Gefäße (Abbildung 7E) gemessen und aufgezeichnet.

Für die Auswertung wurden pro Maus die Daten der drei Vibrissenstimulationen mit den größten Flussamplituden ausgewertet und gemittelt. Als Basalwert wurden die Messwerte über die Zeit von einer Minute vor der ersten Stimulation gemittelt und anhand dessen der relative Anstieg berechnet. Für die Auswertung der CO₂-Stimulation wurde auf die gleiche Weise verfahren. Dabei wurden die Messwerte 5 min vor Beginn der Stimulation gemittelt und als Basalwert festgelegt. Für die Berechnung der *Area under the Curve* (AUC) wurde die gesamte Fläche unter den

einzelnen Kurven gemessen. Dabei wurden lediglich die Werte berücksichtigt, die sich oberhalb der *Baseline* befanden.

4.1.4. Magnetresonanztomographie

Die *arterial spin labeling* Magnetresonanztomographie (ASL-MRT) wurde zur Messung der absoluten Gehirnperfusion in verschiedenen Gehirnregionen und die *time-of-flight* (TOF) Angiographie zur Darstellung der Gefäßstrukturen durchgeführt. Die Methoden wurden, abgesehen kleiner Änderungen, in Anlehnung an Wenzel *et al.* adaptiert¹⁶⁸ und erfolgte in Kooperation mit dem MOIN CC in Kiel unter der Leitung von Prof. Jan-Bernd Hövener und der Unterstützung seines Teams.

Für diese final geplanten Versuche wurden die Mäuse 2 Tage vor der geplanten Messung zur Akklimation nach Kiel transportiert. Während der Zeit vor Ort erhielten die Tiere weiterhin ihrer Gruppe entsprechendes Spezialfutter und wurden mit KON oder TEL behandelt.

Für die MRT-Messung wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Ketamin (80 mg/kg Körpergewicht) und Medetomidin (0,5 mg/kg Körpergewicht) i.p. anästhesiert. Fortlaufend wurden dabei die physiologischen Parameter wie Herz-, Atemfrequenz und Körpertemperatur überwacht. Um einen Wärmeverlust zu verhindern, wurden die Mäuse für die Messung auf einer Wärmeplatte mit 37 °C platziert. Die Messung erfolgte mit einem 7 Tesla MRT-Gerät und einer T2-gewichteten Turbo-Spinecho-Sequenz mit folgenden Sequenzparametern: *echo time* (TE) = 32 ms, *repetition time* (TR) = 4500 ms, *field of view* (FoV) = 15×20 mm², *image matrix* = 256×256, *turbo factor* = 7, *number of slices* = 30, *slice thickness* = 0.5 mm, *readout bandwidth* = 100 Hz/pixel, 75 % *phase oversampling*, *total acquisition time* = 4:53 min. Zunächst wurde die TOF-Angiographie durchgeführt und für die Sequenz folgende Parameter verwendet: TE=3.06 ms, TR =18 ms, FoV =20×20mm², *image matrix* =256×256, *number of slices* =28, *number of 3D Blocks* =4, *slice thickness* = 0.13 mm, *partial Fourier factor* =6/8, *readout bandwidth* = 150 Hz/pixel, *total acquisition time* = 6:26 min. Der CBF wurde mittels ASL mit Q2TIPS (*quantitative imaging of perfusion using a single subtraction with interleaved thin-slice T1 periodic saturation*) mit T11/T12/SS= 900/1400/1375 ms gemessen. Weitere ASL Scanparameter waren: *Echo planar imaging technique* mit TE =12 ms, TR =2400 ms, FoV =16×16 mm², *image matrix* = 64×64,

number of slices = 9, slice thickness = 0.5 mm, partial Fourier factor = 6/8, readout bandwidth = 2112 Hz/pixel, total acquisition time = 3:42 min.

Für die Auswertung wurden die mittleren Grauwerte mittels Fiji ImageJ Software bestimmt und anhand derer die absoluten Perfusionswerte in den verschiedenen Gehirnregionen berechnet (Abbildung 12). Die Werte beider Hemisphären wurden dabei gemittelt.

4.1.5. Verhaltensversuche

Allgemeine Vorgehensweise bei Verhaltensversuchen

Für die Durchführung der Verhaltensversuche wurden folgende Umgebungsparameter beachtet: In dem Raum, in dem der jeweilige Versuch stattfand, herrschten stets die gleichen Umgebungsbedingungen. Die Raumtemperatur und -beleuchtung wurden während der Versuchstage nicht geändert und waren für alle Mäuse an allen Tagen gleich. Für den *Barnes Maze Test* (Abschnitt 4.1.5) wurden die Mäuse ca. 2 h vor Versuchsbeginn in den Raum gebracht, damit sie sich an die Umgebung im Raum gewöhnen konnten. Für alle weiteren Versuche waren die Mäuse ab 2 Tage vor Versuchsbeginn bis zum Ende des Versuchs durchgehend im Versuchsraum untergebracht. Starke Gerüche durch Kosmetik- oder Waschmittelprodukte oder durch Essen wurden vermieden, um unnötigen Stress zu vermeiden. Das Anheben am Schwanz wurde ebenfalls aus diesem Grund so kurz wie möglich gehalten. Alle Mäuse wurden vor Versuchsbeginn über mehrere Tage an das tägliche *Handling* gewöhnt. Zwischen jeder Maus wurden die Testfelder und alle Objekte, die mit dem Tier in Kontakt gekommen waren, mit 70 %-igem Ethanol gereinigt.

Open Field Test

Um Rückschlüsse auf das Angstverhalten der Mäuse und deren Aktivität zu schließen, wurde ein *Open Field Test* durchgeführt. Für den Test wurden die Tiere 4 Tage vor Beginn in Einzelhaltung gesetzt und 2 Tage vorher vom allgemeinen Haltungs- in den Versuchsraum gebracht, in dem sie bis zum Versuchsende verblieben. 3 Tage vor dem Versuch wurden die Mäuse zudem für 3-5 min täglich an die Transportbox (leerer IVC 500 cm²) gewöhnt. Für den Test wurden die Mäuse jeweils

für 10 min mit gleicher Orientierung in das 35 cm x 35 cm große, leere Testfeld gesetzt, welches gleichmäßig mit 19 Lux ausgeleuchtet war. Das Verhalten der Mäuse wurde mittels Kamera dokumentiert und anschließend wie in dem Kapitel *Auswertung der Verhaltensversuche* beschrieben ausgewertet.

Elevated Plus Maze

Ähnlich zum *Open Field* Test wurde der *Elevated Plus* Test durchgeführt, um Angstverhalten und Aktivität der Mäuse zu untersuchen. Für diesen Versuch wurden die Mäuse auf ein Gestell gesetzt, welches sich ca. 50 cm über dem Boden befand und aus zwei offenen und zwei durch Wände begrenzte Arme bestand. Die Breite der Arme betrug 5 cm und die Länge jeweils 35 cm, sodass die Mäuse sich darauf frei bewegen konnten. Für den Versuch wurden die Mäuse nach dreitägigem *Handling* für 5 min auf das Gestell gesetzt und deren Verhalten mittels Kamera dokumentiert und anschließend dem Kapitel *Auswertung der Verhaltensversuche* entsprechend ausgewertet.

Barnes Maze Test

Mit dem *Barnes Maze* Test wurde die Fähigkeit des räumlichen Lernens und der räumlichen Gedächtnisleistung untersucht, welche sich vor allem auf die Funktion des Hippocampus zurückzuführen lässt. Mit Hilfe des Tests wurde untersucht, inwiefern die Mäuse in der Lage sind, die Position eines bestimmten, visuell gekennzeichnet Bereichs zu erlernen und sich diesen zu merken. Das Protokoll beruht auf den Durchführungen von Sunyer *et al.*¹⁶⁹. Der Test basiert dabei auf der intrinsischen Vermeidung von aversiven Umgebungsbedingungen, die hier durch eine starke Ausleuchtung des offenen Testfeldes mit 350 Lux gegeben war. Das Testfeld besteht aus einer runden Plattform mit einem Durchmesser von einem Meter und weist am Rand 20 Vertiefungen im gleichmäßigen Abstand auf. Eine Vertiefung führt in eine *Escape Box*, welche die Maus vor dem hellen Licht schützt.

An fünf aufeinander folgenden Tagen wurden die Mäuse zunächst an die Testumgebung gewöhnt bzw. an diesen Tagen lernten sie, wo auf der Plattform sich die *Escape Box* befand. Dafür wurde ihnen diese im ersten Versuch (Adaptation) gezeigt, indem sie von der durchführenden Person

mit den Händen geleitet wurden, nachdem sie mittig auf die Plattform gesetzt worden waren. Befand sich die Maus in der verdunkelten *Escape Box*, verblieb sie dort für 2 min. Am selben Tag und den darauffolgenden 3 Tagen (Akquisitionsphase) erkundeten die Mäuse die Plattform eigenständig für jeweils 3 min. Dabei endete der Versuch entweder, wenn die Maus die *Escape Box* gefunden und betreten hatte oder die 3 min verstrichen waren. Sollte die Maus die *Escape Box* innerhalb dieser Zeit nicht gefunden haben, wurde sie mit den Händen wie bei der Adaptation vorsichtig zur *Escape Box* geleitet. Die Maus verblieb abschließend für 1 min in der verdunkelten *Escape Box*. Pro Tag und Maus wurden 4 Versuche in einem zeitlichen Abstand von 15 min durchgeführt. Während der Pause wurden die Mäuse jeweils zurück in ihre gewohnten Käfige gesetzt.

Am Tag 6 des Tests (*Probe Trial*) erkundeten die Tiere die ausgeleuchtete Plattform für jeweils 90 Sekunden. Bei diesem Versuch war die *Escape Box* verschlossen.

Während aller Versuche wurden die Bewegungen der Mäuse mit Hilfe einer Kamera aufgezeichnet und im Anschluss entsprechend ausgewertet.

Object Place Recognition Test

Der *Object Place Recognition* Test zielt auf die Analyse der Funktionalität des Hippocampus ab und beruht auf dem Wiedererkennen von bekannten Objekten und ihrer Position im Testfeld.

Dieser Test besteht aus drei Phasen: dem *Handling*, der Habituation und dem eigentlichen *Object Place Recognition* Test. Für den Test wurden die Mäuse 4 Tage vor dem Beginn der Habituationsphase in Einzelhaltung überführt und 2 Tage vor Testbeginn zur Akklimatisierung an die Umgebung in den Verhaltensraum gebracht, in welchem sie bis zum Ende des Versuchs verblieben. 3 Tage vor Beginn der Habituation wurden die Mäuse für 3-5 min täglich an die Transportbox (leerer IVC, 500 cm²) gewöhnt. Die darauffolgende Habituationsphase erfolgte für weitere 3 Tage (Tag 1-3) und diente der Gewöhnung an das Testfeld. Dafür wurden die Mäuse je einmal täglich für 10 min mit gleicher Orientierung in das 35 cm x 35 cm große, leere Testfeld gesetzt, welches gleichmäßig mit 19 Lux ausgeleuchtet war (Abschnitt 4.1.5). Am Tag 4 und 5 erfolgte der eigentliche Test. Dafür wurden die Tiere mit zwei identischen Objekten in jeweils unterschiedlichen Ecken im gewohnten Testfeld konfrontiert und sie konnten diese für 10 min

erkunden. Nach einer Retentionszeit von 1 h (Test 1), für die die Mäuse zurück in ihre gewohnten Käfige gesetzt wurden, wurde die Position von eins der beiden Objekte in eine andere Ecke verändert, während das andere Objekt exakt an derselben Stelle verblieb. Die Mäuse hatten anschließend erneut 5 min Zeit, das Testfeld zu erkunden. Gleiches wurde nach einer Retentionszeit von 24 h (Test 2) durchgeführt. Das bereits einmal verstellte Objekt wurde dabei nochmals in eine andere Ecke positioniert. Sowohl die Habituations- als auch Testphasen wurden mittels Kamera aufgezeichnet, dokumentiert und anschließend ausgewertet.

Auswertung der Verhaltensversuche

Alle Verhaltensversuche wurden mit der Software Anymaze ausgewertet. Die aufgenommenen Videos wurden geladen und die Position der Maus wurde von dem Programm automatisch identifiziert, sodass eine automatische Messung der Laufstrecke, der Geschwindigkeit und des Aufenthaltsorts im Testfeld bestimmt wurde.

Für die Auswertung des *Open Field* Tests und die Untersuchung der Ängstlichkeit wurde ein Bereich von 11 % im Zentrum der Gesamtfläche definiert, die Verweildauer der Mäuse in dieser Zone detektiert und ins Verhältnis zur Verweildauer im restlichen Versuchsfeld gesetzt.

Für die Auswertung des *Elevated Plus* Tests wurde die Verweildauer der Tiere in den Bereichen der offenen Arme mit der Zeit ins Verhältnis gesetzt, die sie sich im Bereich der geschlossenen Arme aufhielten, und somit die Ängstlichkeit bewertet.

Die Videos des *Barnes Maze* Tests wurden für jeden Versuchstag einzeln analysiert und ausgewertet. Für die Akquisitionsphase wurden die primären Fehler eines jeden Versuchs gezählt. Dabei handelt es sich um die Fehler, die eine Maus gemacht hat, bevor sie das erste Mal die *Escape Box* erreicht hat. Des Weiteren wurden die primäre Latenz und Distanz ermittelt. Die primäre Latenz ist die Zeit, die eine Maus benötigt hat, um das erste Mal zur *Escape Box* zu gelangen und die primäre Distanz, die Strecke, die die Maus dafür gelaufen ist. Die Videos des letzten Versuchstags, dem *Probe Trial*, wurden ebenfalls auf primäre Fehler, Latenz und Distanz hin analysiert. Dabei wurde außerdem die Strategie bestimmt, mit der die Mäuse nach der *Escape Box* gesucht haben. Hier wurde zwischen drei Strategien differenziert: der direkten Strategie, welche sich durch das direkte Draufzulaufen der Maus auf die Position der *Escape Box* oder eine

der direkt benachbarten Vertiefungen auszeichnet; der gemischten Strategie, die sich durch ein zufälliges und unorganisiertes Suchen nach der *Escape* Box mit Durchkreuzen der Plattformmitte auszeichnet; und der serienmäßigen Strategie, die sich durch das Absuchen der Plattform im oder gegen den Uhrzeigersinn von nebeneinanderliegenden Vertiefungen auszeichnet. Außerdem wurden die Gesamtdistanz und die Geschwindigkeit der Mäuse bestimmt.

Für die Auswertung des *Object Place Recognition* Tests wurde die Zeit bestimmt, die die Mäuse am verstellten Objekt verbracht haben im Verhältnis zur Gesamtzeit, die sie beide Gegenstände untersucht haben. Als Interaktion mit dem Objekt wurde das Untersuchen des Objekts mit Augen und Nase in unmittelbarer Nähe zum Objekt oder das Abtasten mit den Pfoten oder den Vibrissen gewertet. Dieses Verhältnis wurde als der Präferenzindex definiert.

$$\text{Präferenzindex} = \frac{\text{Zeit}_{\text{verstelltes Objekt}}}{\text{Zeit}_{\text{verstelltes Objekt}} + \text{Zeit}_{\text{nicht verstelltes Objekt}}}$$

4.1.6. Funktionstests

Messung der Körperfettzusammensetzung

Die Körperfettzusammensetzung wurde mittels Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie (Minispec BCA Analyzer) durchgeführt. Kurz vor der Messung wurden die Mäuse in den Messungsraum gebracht. Die Mäuse wurden in eine Röhre gesetzt und räumlich so weit eingeschränkt, dass nur noch minimale Bewegungen möglich waren. Die Röhre wurde in dem Gerät platziert und die Messung durchgeführt. Nach der Messung wurden die Mäuse umgehend wieder zurück in ihren gewohnten Käfig gesetzt, um unnötigen Stress zu vermeiden.

Für die Auswertung wurde die Fettmasse, die fettfreie Körpermasse und die Masse an freier Flüssigkeit auf das Gesamtkörpergewicht der Mäuse bezogen.

Plethysmographische Blutdruckmessung

Mittels nicht-invasiver *Tail-Cuff* Methode wurde die Blutdruckmessung durchgeführt. Für diese Messung wurden die Mäuse auf einer Wärmeplatte unter einer Box fixiert. Die

Blutdruckmanschette wurde an der Schwanzwurzel angelegt und der Schwanz auf dem Infrarotsensor platziert und mit einem Klebestreifen fixiert. Im ersten Teil der Messung wurde der Puls mit der Hilfe von Infrarotlicht bestimmt. Konnte ein Puls detektiert werden, wurde der Blutdruck mit der Blutdruckmanschette über die Veränderung des Pulses bestimmt. Über zwei aufeinanderfolgende Tage wurde der Blutdruck zur Eingewöhnung während der inaktiven Phase der Mäuse gemessen und die eigentlichen Messungen anschließend an den Tagen 3-5 durchgeführt. Pro Messtag wurde ein Zyklus mit 15 Messungen pro Maus durchgeführt. Dafür wurden folgende Einstellungen am Gerät vorgenommen und für alle Messungen beibehalten: *operating mode: platform; preliminary cycles: 0; measurement cycles: 15; movement detection: no; min. pulse amplitude: 5 %; No. of consecutive peaks: 70; ignore peaks smaller than: 0.5 %; max. pressure: 242 mmHg; pulse time out: 30 s; measurement time: 30 s; time between measurements: 2.5 s; systolic threshold: 20 %; diastolic threshold: 50 %; systolic criterion: signal below threshold 90 %; systolic criterion: time below 0.5 s; diastolic criterion: signal below threshold 90 %; diastolic criterion: time below 0.5 s; platform temperature: 100 F/37 °C; dual operation.*

Die Messwerte wurden für die Auswertung über die 3 Messtage gemittelt. Dabei wurden Messwerte mit einem diastolischen Wert unter 40 mmHg nicht mit einbezogen.

Blutzuckermessung

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut fand nach Abschluss der LSI-Messungen unter Narkose statt und wurde mit einem kommerziellen Blutzuckermessgerät und den entsprechenden Teststreifen durchgeführt. Dafür wurde den Mäusen 1 mm der Schwanzspitze abgeschnitten, ein Blutropfen mit den Teststreifen aufgenommen und der gemessene Wert dokumentiert.

4.1.7. Gewinnung von biologischem Material

Plasmagewinnung

Für die Plasmagewinnung wurde eine kardiale Blutentnahme durchgeführt. Dafür wurde der rechte Ventrikel vor der Perfusion punktiert, bis zu 1,5 ml Blut entnommen und in eine EDTA-

Mikrovette überführt. Die Vollblutproben wurden für 10 min bei 4 °C und 1000 g zentrifugiert. Das klare Plasma wurde abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Transkardiale Perfusion und Organentnahme

Für die Studien 1-3A wurden zur Vermeidung von Verunreinigungen durch Blutrückstände für die Analysen ausschließlich perfundierte Organe verwendet. Am Ende der Studien 1-3A befanden sich die Mäuse aufgrund der LSI-Messung bereits in Narkose. Hier wurde die Anästhesie durch eine erneute Gabe von Ketamin (70 mg/kg Körpergewicht) vertieft und die Maus mittels Zwischenzehenreflex auf Schmerzfreiheit geprüft. Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet, das Zwerchfell durchtrennt und der Brustkorb durch Zertrennen der Rippen geöffnet. Nach der kardialen Blutentnahme (Abschnitt 4.1.7) wurde die Infusionskanüle in den linken Ventrikel eingeführt und gleichzeitig der rechte Vorhof durch einen Einschnitt geöffnet. Es folgte die Perfusion mit 10-15 ml heparinierter Ringerlösung (10 U/ml Heparin) und einer Flussrate von 300 ml/h. Zunächst wurde durch Dekapitation der Kopf abgetrennt und durch Öffnen der Schädeldecke das Gehirn mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig entnommen. Nach der Entnahme wurde das Gehirn direkt auf Trockeneis eingefroren und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die Studie 3B wurden die Mäuse nicht perfundiert und durch eine Überdosis des Narkosemittels getötet. Für diesen Studienteil wurden die Gehirne nach der Entnahme für 24 h in 4 % PFA (Abschnitt 0) auf einem Rüttler fixiert. Nach der Fixierung und einmaligem Waschen mit PBS wurden die Gehirne in die zwei Hemisphären geteilt. Die linke Hemisphäre wurde über Nacht zunächst in 15 %-iger Saccharoselösung in PBS (m/v) und anschließend eine weitere Nacht in 30 %-iger Saccharoselösung in PBS (m/v) inkubiert. Danach wurden die linken Hemisphären in Einbettmedium eingebettet und bei -80 °C eingefroren. Die rechten Hemisphären wurden nach der PFA-Fixierung in 70 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

4.2. Proteinbiochemische Methoden

4.2.1. Multiplex-Assay

Der Multiplex-Assay ermöglicht es, mehrere Proteine mithilfe der Luminex™ xMAP™-Technologie auf Basis eines Immunadsorptionsassays gleichzeitig zu erkennen und zu quantifizieren. Dafür werden kleine magnetische Kügelchen (*Beads*) genutzt, die mit Fluorophoren unterschiedlicher Intensität gefärbt sind. Dadurch entstehen eindeutig zuordbare Farbsignale. Außerdem sind die *Beads* mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper beschichtet. Nach dem Sandwichprinzip bindet das gewünschte Protein an den primären Antikörper und anschließend ein weiterer, enzymgekoppelter Antikörper an das Protein. Die Farbintensität der enzymatischen Farbreaktion ist dabei proportional zur Menge des nachzuweisenden Proteins. Sowohl die spezifische Farbkodierung des Kügelchens als auch die Intensität der enzymatischen Färbung werden mittels Durchflusszytometrie gemessen. Im selben Assay können durch die fluoreszierende Farbkodierung mehrere unterschiedliche Analyten gleichzeitig gemessen werden.

Für die Bestimmung verschiedener metabolisch relevanter Hormone im Blutplasma wurden also Luminex xMAP®-basierte Multiplex-Assays durchgeführt. Puffer, Waschlösungen und Standards wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet und gelagert. Ebenso wurden die Assays entsprechend dem Herstellerprotokoll entsprechend durchgeführt:

In jede Vertiefung der 96-Well-Platte wurden 200 µl Waschpuffer gegeben und für 10 min auf dem Rüttler inkubiert. Nach dem ersten Waschen wurden 10 µl der Matrixlösung in die Vertiefungen für Hintergrund, Standards und Kontrollen gegeben. Als Hintergrund wurden 10 µl Assay Puffer in die entsprechende Vertiefung und ebenso in die Vertiefungen für die Proben hinzugegeben. In die Vertiefungen für Standards und Kontrollen wurden 10 µl der im Kit enthaltenden Standards und Kontrollen hinzugefügt und in die Vertiefungen der Proben 10 µl der entsprechenden Probe. Danach wurden in jede Vertiefung 25 µl der *Beads* hinzugegeben und die Platte im Dunkeln bei 4 °C auf dem Rüttler über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Platteninhalt entfernt und die Platten 3 x mit 200 µl Waschpuffer und Hilfe eines Plattenmagnets gewaschen. Anschließend wurden in jede Plattenvertiefung 50 µl

des Detektionsantikörpers gegeben und diese auf dem Rüttler bei Raumtemperatur (RT) für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 50 µl Streptavidin-Phycoerythrin in jede Vertiefung gegeben und diese erneut für 30 min auf dem Rüttler bei RT im Dunkeln inkubiert, gefolgt von 3 Waschschritten mit 200 µl Waschpuffer. Danach wurden in jede Vertiefung 150 µl Luminex® Sheath Fluid gegeben und die *Beads* darin für 5 min auf dem Rüttler inkubiert.

Die Messung der Platte wurde mit dem Luminex 200™-System in Kooperation mit Herrn Altfeld und seinem Team vom Heinrich-Pette-Institut in Hamburg durchgeführt.

4.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden die Gehirne der Mäuse bei 4 °C aufgetaut und anschließend in ein mit Zirconiumoxidperlen befülltes Reaktionsgefäß gegeben. Die Menge der Perlen entsprach dem zweifachen Volumen des zu homogenisierenden Gewebes. Anschließend wurde das dreifache Volumen an PBS hinzugefügt und das Gewebe für 3 min bei Stufe 8 des Homogenisators homogenisiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das homogenisierte Gehirngewebe wurde bei -80 °C gelagert.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das homogenisierte Gehirngewebe mit einer 0,9 %-igen Natriumchloridlösung verdünnt (v/v, 1:300). Anschließend wurden 200 µl der Verdünnung mit 800 µl Lowry-Reagenz versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Folin-Reagenz gestoppt und die Absorption nach 30-45 min bei einer Wellenlänge von 750 nm am Photometer gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Standardreihe mit Albumin von 20-200 µg/ml erstellt und parallel zu den Proben mit Lowry- und Folin-Reagenz behandelt.

4.2.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse der Proteine aus den Gehirnhomogenaten wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) verwendet, um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Nachdem die Konzentration (Abschnitt 4.2.2) der Proben mit 1x SDS angepasst und die Proben 1:4 (v/v) in 4x

SDS-Probenpuffer verdünnt wurden, erfolgte eine Denaturierung für 5 min bei 95 °C. Daraufhin wurden jeweils 120 µg Proteinprobe auf das Gel (Tabelle 2) aufgetragen und mittels Tankpuffer für 2 h bei 120 V im SDS-Gel aufgetrennt.

Tabelle 2. Zusammensetzung des SDS Trenn- und Sammelgels.

Substanz	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	4,05 ml	3,05 ml
Tris pH 8,8 (1,5 M)	2,5 ml	-
Tris pH 6,8 (0,5 M)	-	1,25 ml
SDS (10 %)	100 µl	50 µl
Polyacrylamid-Mix (Rothiphorese™30)	3,3 ml	0,67 µl
APS (10 %)	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	5 µl

4.2.4. Western Blot

Nach der Trennung der Proteine im SDS-Gel wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran überführt, um die Proteine anschließend mit den entsprechenden Antikörpern nachzuweisen. Dafür wurden Trenn- und Sammelgel voneinander getrennt und alle Komponenten des Sandwich-Blots in Transferpuffer gewaschen. Das Trenngel wurde auf der Nitrozellulosemembran zwischen Whatman-Filterpapieren und Schwämmen im Stützgitter positioniert und dieses dann in den Blotapparat eingesetzt, so dass die Membran zur Anode hin ausgerichtet war. Der Sandwich-Blot wurde vollständig mit Transferpuffer bedeckt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte dann bei einer Stromstärke von 400 mA für 2 h. Die Membran wurde im Anschluss dem Sandwich-Blot entnommen und für 1 h mit 5 % Milchpulver in TBS-T (m/v) blockiert. Nach der Inkubation konnte spezifisch die Detektion der Proteine erfolgen. Die Membran wurde dafür über Nacht mit dem Primärantikörper (Abschnitt 3.4) in Blockierlösung bei 4 °C auf dem Rüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 3 x für 5 min in TBS-T gewaschen und für 2 h mit einem an die Meerrettichperoxidase (HRP, engl. *horse radish peroxidase*) gekoppelten Sekundärantikörper (Abschnitt 3.4) in Blockierlösung bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Membran nochmals 3 x für 5 min mit TBS-T gewaschen und es folgte die Detektion der

Chemielumineszenz an einem Fusion Solo S Aufnahmegerät und der Evolution Capt Aufnahmesoftware. Dafür wurde das SuperSignal™ West Femto *Maximum Sensitivity Substrate* Kit 1:2 (v/v) verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Detektionsdauer wurde so angepasst, dass deutlich Banden auf der Membran sichtbar waren, es aber nicht zu einer Überbelichtung kam. Die Quantifizierung wurde mit der Evolution Capt Software durchgeführt und die Bandenintensität des Zielproteins wurde stets auf die des Referenzproteins Tubulin normalisiert.

4.2.5. Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Analyse wurden koronare Gehirnschnitte aus unfixierten kryokonservierten oder aus PFA-fixierten in Paraffin eingebettete Gehirne angefertigt. Die 20 µm dicken Kryoschnitte wurden bei -20 °C geschnitten und bis zur Antikörperfärbung bei -20 °C gelagert. Die 3 µm dicken Paraffinschnitte wurden in Kooperation mit der Mayo Clinic, Rochester MN erstellt und bis zur Antikörperfärbung bei Raumtemperatur gelagert.

CD31/Col IV/4-HNE

Für die Charakterisierung des zerebrovaskulären Systems wurden die mit heparinierter Ringerlösung perfundierten und unfixierten Gehirne verwendet (Abschnitt 4.1.7). Die Kryoschnitte wurden für die Antikörperfärbung zunächst bei RT für mindestens 30 min getrocknet. Da es sich um unfixiertes Gewebe handelte, wurden die Schnitte zunächst für 10 min bei -20 °C in Methanol fixiert und danach 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte bei RT für 1 h mit 1 % BSA in PBS (m/v) blockiert. Danach wurden die Primärantikörper (Abschnitt 3.4) in Blockierlösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut 3 x für 5 min mit PBS gewaschen und dann die Sekundärantikörper (Abschnitt 3.4) in Blockierlösung mit DAPI (1:2000) auf die Schnitte gegeben und bei RT für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit Mowiol/DABCO eingedeckt.

Pro Gehirn wurden aus zwei Schnitten je zwei Bilder pro Region mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mit Hilfe von Fiji ImageJ wurden die Aufnahmen ausgewertet. Alle Bilder wurden auf Gesamtgefäßlänge, Anzahl der Gefäßverzweigungen und Länge der *String Vessel* bzw. der 4-Hydroxynonenal (4-HNE)-positiven

Gefäße hin analysiert. Dabei wurden für die *String Vessel* Länge die Gefäße gemessen, die für Col IV positiv, aber für CD31 negativ waren; für die Messung von 4-HNE, die Gefäße, die Col IV-positiv und gleichzeitig 4-HNE-positiv waren.

CD31/CENPB

Für die Detektion der *Senescence-associated distension of satellites* (SADS) in Endothelzellen wurden in Paraffin eingebettete Gehirne verwendet, die ohne vorherige Perfusion entnommen worden waren (Abschnitt 4.1.7). Zunächst wurden die Schnitte mit Histoclear deparaffinisiert und mittels Ethanol-Gradienten (100 %, 90 %, 70 %) hydratisiert, gefolgt von einer Inkubation in Wasser und PBS. Zur Antigenwiederherstellung wurden die Schnitte anschließend in 0,01 M Citratpuffer (pH 6) bei 95 °C für 10 min inkubiert. Nach dem Abkühlen auf etwa 40 °C erfolgte je ein Waschschrift mit Wasser und PBS. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierlösung (1:60 *normal goat serum* in 0,1 % BSA in PBS) für 1 h bei RT blockiert. Die primären Antikörper wurden mit Blockierlösung entsprechend den Konzentrationen in Abschnitt 3.4 verdünnt, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Schnitte 3 x mit PBS gewaschen, mit den entsprechend Abschnitt 3.4 verdünnten sekundären Antikörpern für 1 h bei RT inkubiert und abermals mit PBS gewaschen. Für die Detektion der SADS folgte die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Dafür wurden die Schnitte mit 4 % PFA für 20 min quervernetzt und danach mit -20 °C kaltem Ethanol (70 %, 90 %, 100 %) dehydratisiert. Anschließend erfolgte eine Denaturierung für 10 min bei 80 °C in Hybridisierungspuffer (Abschnitt 3.2.2), welcher 2,5 mg/ml FAM-markierte CENPB-spezifische (Centromer) Peptid-Nukleinsäure (ATTCTTGGAAACGGGA) Probe (Panagene) enthielt. Es folgte die Hybridisierung für 2 h bei RT. Die Schnitte wurden danach mit 70 % Formamid in 2x SSC für 15 min, 2 x 10 min mit 2x SSC und 1 x 10 min in PBS gewaschen, bevor sie in DAPI-enthaltenem Eindeckmedium eingedeckt wurden.

Pro Gehirn wurden 10-11 Z-Stacks (alle 0,4 µm) mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 63-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mit Hilfe von Fiji ImageJ wurden die Aufnahmen ausgewertet. Dabei wurden die Zellkerne der CD31-positiven Zellen gezählt, die mehr als zwei SADS Events aufwiesen. Dies hat sich in der Arbeitsgruppe um Diana Jurk aus Rochester bei dieser Methode als stabiler Grenzwert für Endothelzellen erwiesen.

Plin2/S100 β

Für die Charakterisierung der *Lipid Droplets* in Ependymzellen entlang des lateralen Ventrikels wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte (Abschnitt 4.1.7) verwendet. Bis zur Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Schnitte identisch zu Abschnitt CD31/CENPB behandelt. Die Primärantikörper wurden entsprechend den Konzentrationen in Abschnitt 3.4 mit Blockierlösung verdünnt, auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Schnitte 3 x mit PBS gewaschen, anschließend die Sekundärantikörper entsprechend Abschnitt 3.4 in Blockierlösung verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten erneut 3 Waschschrte mit PBS, bevor die Schnitte mit DAPI-enhaltenem Eindeckmedium eingedeckt wurden.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 63-fachen Vergrößerung wurde die gesamte Ependymzellschicht entlang des lateralen Ventrikels aufgenommen. Mit Hilfe von Fiji ImageJ wurden die Aufnahmen ausgewertet. Alle Bilder wurden auf die Größe der *Lipid Droplets* pro Zelle hin analysiert.

4.3. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mittels GraphPad Prism (Version 8 und 9) durchgeführt. Alle Datensätze wurden mit dem Ausreißertest nach Grubbs untersucht und sofern Ausreißer vorhanden waren, wurden diese aus der Analyse ausgeschlossen. Zudem wurden die Daten mit dem D'Agostino & Pearson Test auf eine Gaußsche Normalverteilung hin überprüft. Für den Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde ein zweiseitiger Student's t-Test durchgeführt und bei einem signifikanten Varianzenunterschied wurde eine Welch's Korrektur angewendet. Für den Vergleich von vier Gruppen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für die statistische Auswertung genutzt. Im Falle eines signifikanten Effekts wurde anschließend ein Bonferroni-Post-hoc Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug 0,05. Die Daten sind in den Abbildungen als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM, engl.: *standard error of the mean*) angegeben. Die Anzahl der unabhängigen Proben (n) ist in den Abbildungsunterschriften angegeben.

5. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war zunächst zu untersuchen, ob eine HFD in einem klassischen Diät-induzierten Adipositasmodell zu einer neurovaskulären Entkopplung und einer Reduktion des CBF führt und welche Prozesse möglicherweise zu den Einschränkungen beitragen. Zudem wurde überprüft, ob die neurovaskulären Beeinträchtigungen Verhaltensveränderungen zur Folge haben und schließlich, ob der AT₁-Rezeptor-Antagonist TEL die neurovaskulären und kognitiven Defizite verbessern oder gar verhindern kann. Dafür wurden 5-7 Wochen alte, männliche Wildtyp C57BL/6 Mäuse für verschieden lange Perioden mit NFD oder HFD gefüttert und währenddessen täglich je nach Protokoll mit KON oder TEL behandelt. Alle Untersuchungen sind anschließend innerhalb der letzten Behandlungswoche oder am letzten Behandlungstag durchgeführt worden.

5.1. Eine HFD-Fütterung für 8 Wochen ist nicht ausreichend für eine neurovaskuläre Entkopplung

In der Literatur ist in verschiedenen Modellen der Zusammenhang zwischen HFD, Diabetes bzw. Hyperglykämie und neurovaskulären Einschränkungen, wie die neurovaskuläre Entkopplung und die Reduktion des CBF, beschrieben worden, auch teilweise bereits nach 8 Wochen HFD-Fütterung^{39, 70, 74}. Da diese Studien überwiegend in Rattenmodellen durchgeführt worden sind, wurde mit der ersten Studie zunächst überprüft, ob bei Mäusen eine Fütterung mit HFD über einen Zeitraum von 8 Wochen eine neurovaskuläre Entkopplung zur Folge hat. Um die neurovaskuläre Kopplung zu untersuchen, wurde am Ende des Behandlungszeitraums eine LSI-Messung (Abschnitt 4.1.3) durchgeführt. Dabei wurde die Amplitude des physiologischen Anstiegs der Gewebepfusion als Reaktion auf eine elektrische Tasthaarstimulation oder die Stimulation mit CO₂ gemessen.

Bereits an Tag 16 der Fütterungsperiode hatten die HFD_{KON}-Mäuse im Vergleich zu den mit NFD-gefütterten Mäusen signifikant an Gewicht zugenommen. Bis zum Ende des Behandlungszeitraums entwickelten die HFD_{KON}-Mäuse eine ausgeprägte Diät-induzierte

Adipositas mit einer knapp dreimal so starken Gewichtszunahme im Vergleich zu den NFD_{KON}-Mäusen (Abbildung 6A). Zudem zeigten die adipösen HFD_{KON}-Mäuse deutliche metabolische Defizite. So waren die Insulin-, Resistin- und Leptinlevel im Plasma der HFD_{KON}-Mäuse im Vergleich zu den NFD_{KON}-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 6B-D).

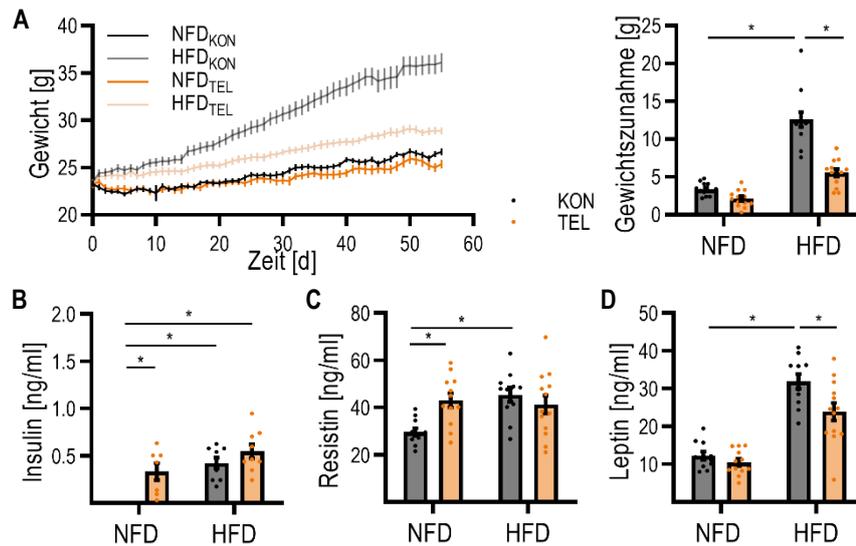


Abbildung 6. Metabolische Charakterisierung von Mäusen nach 8-wöchiger Behandlung mit HFD und TEL. Mäuse wurden für 8 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. (A) Gewichtsverlauf und die absolute Gewichtszunahme am Ende des Behandlungszeitraums; (B)-(D) Bestimmung der angegebenen Plasmaproteinlevel am Ende der Behandlung; 2-Wege ANOVA mit Bonferroni *multiple comparison* Posttest: (A) Interaktion $F=25,61$, $P<0,001$; Diät $F=121,0$, $P<0,001$; Behandlung $F=51,98$, $P<0,001$; (B) Interaktion $F=3,404$, $P=0,0738$; Diät $F=32,02$, $P<0,0001$; Behandlung $F=16,58$, $P=0,0003$; (C) Interaktion $F=8,137$, $P=0,0066$; Diät $F=5,152$, $P=0,0283$; Behandlung $F=2,249$, $P=0,1410$; (D) Interaktion $F=3,223$, $P=0,0797$; Diät $F=90,79$, $P<0,0001$; Behandlung $F=7,880$, $P=0,0075$; * $P<0,05$ im *multiple comparison* Posttest; $n=10-13$ pro Gruppe; Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Für diese Studie wurde die eine Hälfte der Tiere zusätzlich simultan zur HFD-Fütterung täglich mit TEL oder KON behandelt. Die HFD_{TEL}-Mäuse waren dabei vor der Diät-induzierten Adipositas geschützt und nahmen vergleichbar viel Gewicht wie die NFD-gefütterten Mäuse zu (Abbildung 6A). Auch auf die Level der metabolischen Peptide hatte die Behandlung mit TEL eine teilweise protektive Wirkung. Dies wird dadurch deutlich, dass die Plasmalevel insbesondere von Leptin der HFD_{TEL}-Mäuse durch die gleichzeitige Behandlung mit TEL zum Teil reduziert werden konnten (Abbildung 6D). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Mäuse nach 8 Wochen bereits erste

HFD-induzierte, phänotypische Veränderungen hinsichtlich des metabolischen Syndroms entwickelt hatten, welche durch TEL teilweise abgemildert werden konnten.

Am letzten Tag des 8-wöchigen Behandlungszeitraums wurde die LSI-Messung zur Untersuchung der neurovaskulären Kopplung durchgeführt. Die Veränderung der Gewebepfusion während der Stimulation der Vibrissen wurde im Bereich des somatosensorischen Cortex gemessen (Abbildung 7A). Die Mäuse reagierten dabei auf die elektrische Tasthaarstimulation mit einem Anstieg der Gewebepfusion um 53-58 % im Vergleich zum Basalwert vor der Stimulation (Abbildung 7A, B). Entgegen der Erwartung konnte allerdings kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden. Die adipösen HFD_{KON}-Mäuse reagierten mit demselben Anstieg der Perfusion des somatosensorischen Cortex wie die schlanken NFD_{KON}-Mäuse und auch die AUC zeigte keine Unterschiede (Abbildung 7A-C). Auf die Reaktion auf die Tasthaarstimulation hatte die Behandlung mit TEL ebenso keinen Effekt (Abbildung 7A-C) und auch bei dem Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der vier Gruppen, mit denen das Halbmaximum erreicht wurde, ließen sich keine HFD- oder TEL-Effekte feststellen (Abbildung 7D).

Um den metabolischen Anforderungen des Gehirns gerecht zu werden, unterliegt der CBF streng regulierten Prozessen. So führen die neuronale Aktivität, welche durch die Tasthaarstimulation ausgelöst wird, oder auch ein Anstieg der arteriellen CO₂-Konzentration durch Gefäßdilataion zu einem Anstieg der Gehirnperfusion in der entsprechenden Region¹⁷⁰. Um diesen Zusammenhang in einem Diät-induzierten Adipositasmodell zu überprüfen, wurde eine weitere Stimulation durchgeführt. Für diese Stimulation mit CO₂ wurden die Messregionen auf die großen oberflächlichen Gefäße festgelegt (Abbildung 7E) und ebenfalls der Anstieg der Perfusion als Reaktion auf die CO₂-Stimulation mittels LSI gemessen. Bei allen vier Behandlungsgruppen stieg dabei die Perfusion in gleichem Maße um 15-25 % im Vergleich zum basalen Niveau, wobei allerdings erneut kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen beobachtet werden konnte (Abbildung 7E, F). Die maximale Reaktion war lediglich bei den NFD-gefütterten Tieren durch die TEL-Behandlung tendenziell geringer im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 7F). Effekte durch HFD oder TEL waren jedoch auch beim Hinzuziehen der AUC nicht erkennbar (Abbildung 7G). Hier ist zu beachten, dass für die Berechnung der AUC lediglich die Werte einbezogen wurden, die sich oberhalb der *Baseline* befanden.

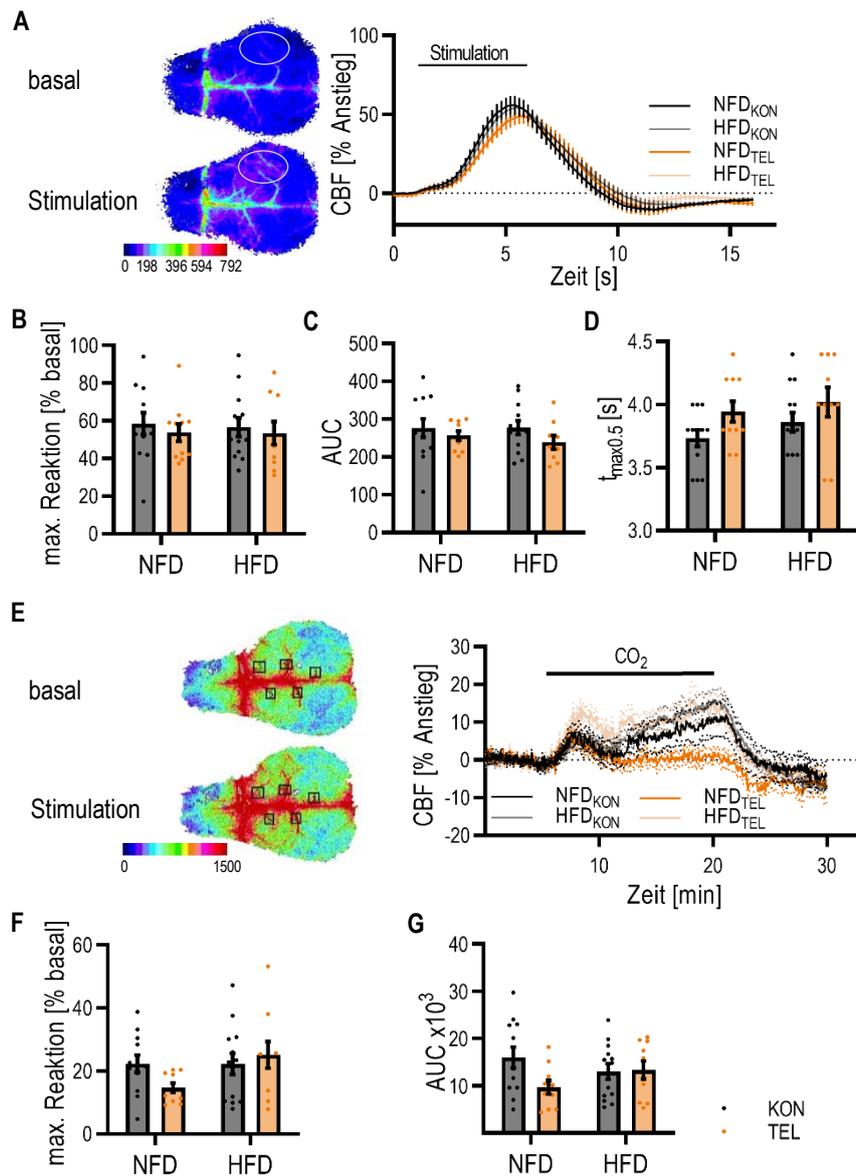


Abbildung 7. Die Neurovaskuläre Kopplung ist nach 8 Wochen weder durch HFD noch durch TEL beeinflusst. Mäuse wurden für 8 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. (A) Beispielbilder vor und während der Tasthaarstimulation und Quantifizierung der LSI-Messung mit Angabe von (B) maximaler Reaktion auf die Stimulation, (C) *Area under the Curve* (AUC) und (D) Zeit am Halbmaximum ($t_{max0.5}$). (E) Beispielbilder vor und während der Stimulation mit CO₂ und Quantifizierung der LSI- Messung mit Angabe von (F) maximaler Reaktion auf die Stimulation und (G) AUC. Keine Signifikanzen in der 2-Wege ANOVA; n=10-13 pro Gruppe; Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Es lässt sich also schlussfolgern, dass eine 8-wöchige HFD-Fütterung nicht ausreichend ist, um

neurovaskuläre Defizite hervorzurufen. Dafür scheint eine längere Fütterungsperiode notwendig zu sein. Um diese Dauer zu bestimmen, wurde eine weitere Studie für 16 und 24 Wochen durchgeführt.

5.2. HFD für 16 und 24 Wochen führt zu einer neurovaskulären Entkopplung im Bereich des somatosensorischen Cortex

Um zu untersuchen, für wie lange Mäuse die HFD erhalten müssen, sodass sie neurovaskuläre Defizite entwickeln, wurden für die nächste Studie 21 und 29 Wochen alte Mäuse bestellt, die bereits beim Züchter ab der 7. Lebenswoche NFD oder HFD erhalten hatten. Diese waren nach einer Eingewöhnungsphase an die Umgebung in den Haltungsräumen in Lübeck zu Versuchsbeginn 23 bzw. 31 Wochen alt und wurden für insgesamt 16 und 24 Wochen mit der jeweiligen Diät gefüttert.

Nach 16 Wochen hatten die mit HFD-gefütterten Mäuse eine ausgeprägte Adipositas mit einem 28 % höheren Gewicht als das der mit NFD-gefütterten Kontrollen entwickelt (Abbildung 8A). Außerdem wiesen die adipösen Mäuse eine deutliche Hyperglykämie auf. Das Glukoselevel war bei den HFD-Mäusen mit im Mittel 352,3 mg/dl um 35,4 % höher als bei den mit NFD-gefütterten Mäusen mit 227,4 mg/dl (Abbildung 8A). Vergleichbar sind die Ergebnisse mit denen nach einer 24-wöchigen Fütterung mit HFD. Die mit HFD-gefütterten Mäuse wogen nach 24 Wochen im Mittel 53 g und damit 32 % mehr als die NFD-gefütterten Mäuse (Abbildung 8B). Außerdem hatten die Mäuse mit Diät-induzierter Adipositas genau wie nach dem 16-wöchigen Fütterungszeitraum eine Hyperglykämie entwickelt. Die Glukosewerte der HFD-Mäuse waren nach 24 Wochen mehr als doppelt (171,4 mg/dl zu 390,8 mg/dl) so hoch als die der NFD-Kontrollgruppe (Abbildung 8B). Außerdem waren die Insulin-, Resistin- und Leptinlevel nach 24 Wochen bei den HFD-gefütterten Mäusen deutlich höher als bei den NFD-gefütterten Tieren (Abbildung S1).

Mittels LSI-Messung wurde wie zuvor die Reaktion auf die elektrische Stimulation der Vibrissen gemessen, um Rückschlüsse auf die neurovaskuläre Kopplung zu ziehen. Der Perfusionsanstieg während der elektrischen Tasthaarstimulation war bei den adipösen, für 16 Wochen mit HFD-gefütterten Mäusen im Vergleich zu den schlanken NFD-Mäusen signifikant um etwa 16,2 %

reduziert. Ebenso war die AUC bei den HFD-Mäusen um 19,6 % kleiner als nach der NFD (Abbildung 8C). Ein ähnliches Bild zeigte sich nach einem Fütterungszeitraum von 24 Wochen. Die Antwort auf die Tasthaarstimulation war bei den HFD-Mäusen um etwa 25,5 % reduziert und die AUC um 30 % geringer als bei den mit NFD-gefütterten Mäusen (Abbildung 8D).

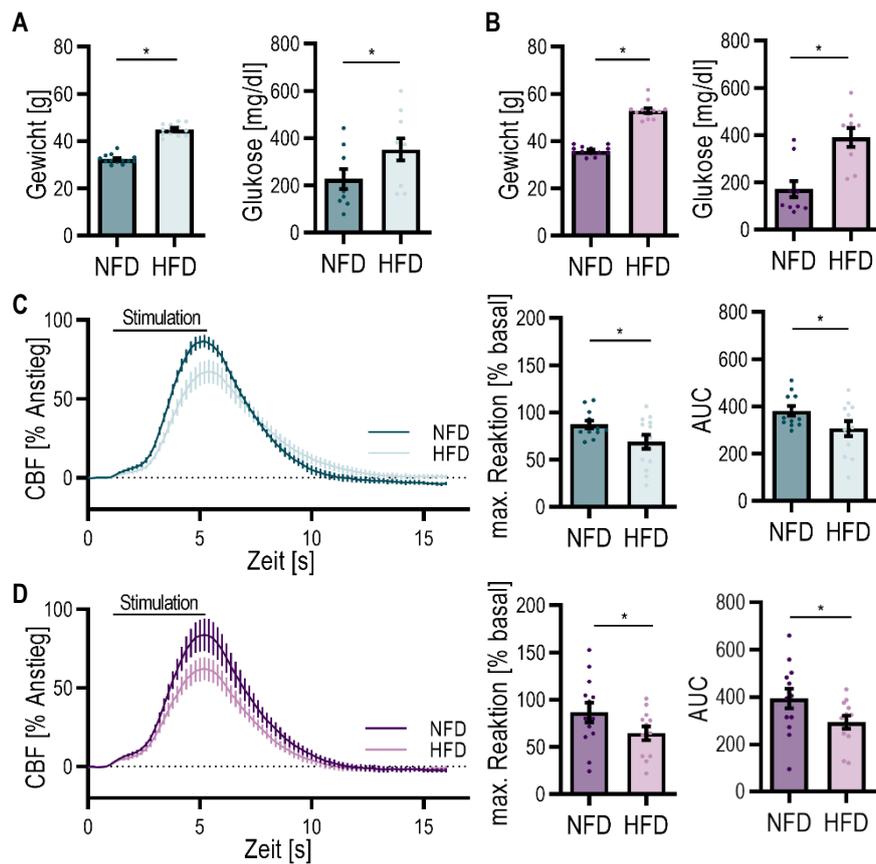


Abbildung 8. Die neurovaskuläre Kopplung ist nach 16 und 24 Wochen HFD beeinträchtigt. Mäuse wurden für 16 (A und C) oder 24 (B und D) Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert. (A) und (B) Gewicht und Glukoselevel im Blut am Ende des Fütterungszeitraums. (C) und (D) Quantifizierung der LSI-Messung mit Angabe der maximalen Reaktion (Mitte) und *Area under the Curve* (AUC, rechts); *P<0,05 im Student's t Test (mit Welch's Korrektur bei C); n=12-13 pro Gruppe; Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Wie auch nach 8-wöchiger HFD-Fütterung wurden die Mäuse einer weiteren Stimulation mit CO₂ ausgesetzt und es wurde währenddessen der Anstieg der Gewebepfusion gemessen. Dabei hatte bei den mit HFD-gefütterten Mäusen weder die Fütterung über 16 noch die über 24

Wochen eine Veränderung der Anstiegshöhe zur Folge (Abbildung S2). Sowohl nach 16 als auch nach 24 Wochen betrug der Perfusionsanstieg bei den schlanken, mit NFD-gefütterten Mäusen rund 33 % und bei den Mäusen mit Diät-induzierter Adipositas rund 31 % (Abbildung S2B, E). Auch die Berechnung der AUC ergab keinen Unterschied zwischen schlanken und adipösen Tieren (Abbildung S2C, F).

Es zeigt sich, dass bei Verwendung einer HFD eine Fütterungsperiode von mindestens 16 Wochen erforderlich ist, damit sich nicht nur eine Adipositas entwickelt, sondern sich auch damit verbundene neurovaskuläre Defizite einstellen. Da der Effekt nach 24 Wochen nur geringfügig und nicht signifikant stärker als nach 16 Wochen war, wurden alle weiteren Studien für 16 Wochen durchgeführt.

5.3. TEL verhindert eine HFD-induzierte neurovaskuläre Entkopplung und normalisiert den CBF

Die folgenden Studien 3A und 3B sind die Hauptstudien dieser Arbeit. Mit ihnen wurde nun untersucht, ob eine Behandlung mit TEL die in Abschnitt 5.2 gezeigte neurovaskuläre Einschränkung verbessern oder verhindern kann. Dafür wurden erneut 5 Wochen alte Mäuse für 16 Wochen mit NFD oder HFD gefüttert und täglich zur selben Zeit mit TEL behandelt. Zunächst wurden verschiedene funktionale Untersuchungen zur metabolischen Charakterisierung durchgeführt. Wie in den Studien zuvor gezeigt, entwickelten die mit HFD-gefütterten Mäuse eine ausgeprägte Diät-induzierte Adipositas mit einer absoluten Gewichtszunahme von etwa 30 g im Mittel, was einer dreifach stärkeren Gewichtszunahme als bei den mit NFD-gefütterten Mäusen entspricht (Abbildung 9A). Bestätigend zu den Ergebnissen des ersten Abschnitts und wie bereits mehrfach in anderen Studien gezeigt, waren die HFD_{TEL}-Mäuse vor einer Diät-induzierten Adipositas geschützt. Sie nahmen im Mittel 15 g zu und blieben damit in etwa auf dem Niveau der Kontrolltiere (Abbildung 9A). Zudem konnte durch TEL die bei den HFD_{KON}-Mäusen entstandene Hyperglykämie nahezu vermieden werden (Abbildung 9B). So hatten die HFD_{TEL}-Mäuse am Ende des Behandlungszeitraums ein Glukoselevel von rund 221 mg/dl im Vergleich zu den HFD_{KON}-Mäusen mit 384 mg/dl. Dies entsprach einem mehr als doppelt so hohen Wert als bei den NFD_{KON}-Mäusen mit rund 145 mg/dl (Abbildung 9B). Es zeigt sich somit, dass die protektive Wirkung von TEL hinsichtlich der Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas und

der Entstehung einer Hyperglykämie auch nach mehrwöchiger Behandlungszeit aufrechterhalten und stabil bleibt. Die durch HFD erhöhten Proteinlevel von Insulin und Leptin konnten durch TEL bei den HFD-Mäusen normalisiert werden (Abbildung 9C, E).

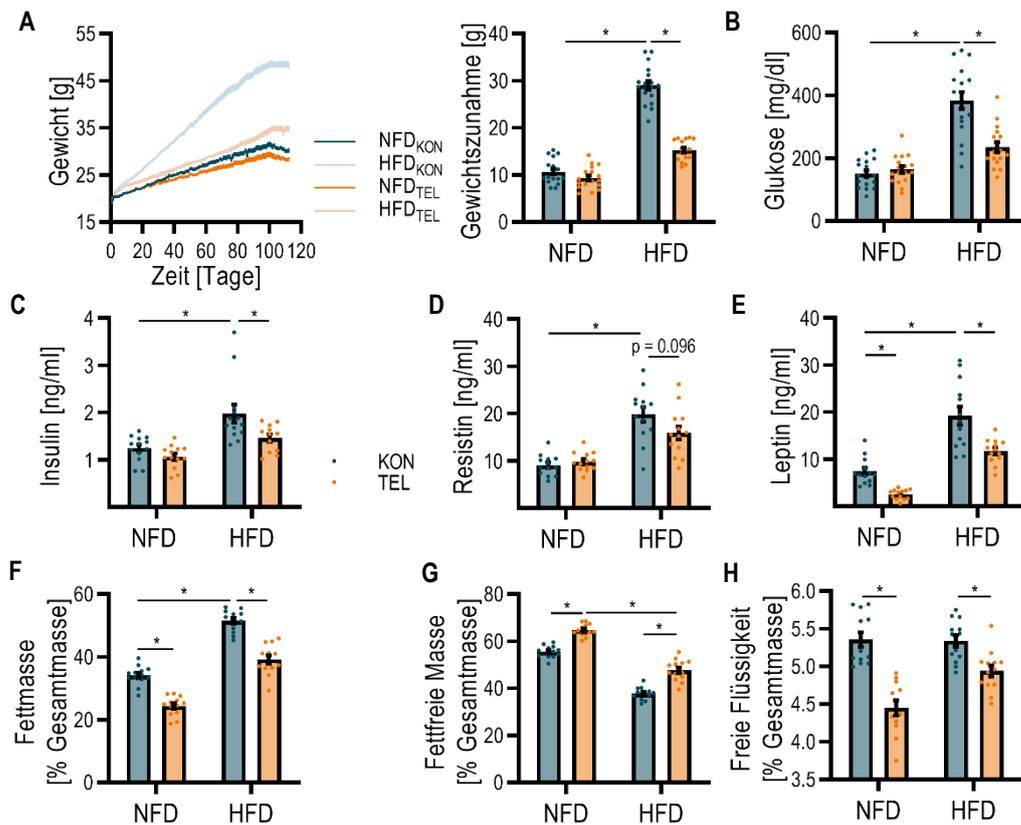


Abbildung 9. TEL verbessert den Phänotyp des metabolischen Syndroms nach einer HFD-Fütterung. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfett diät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. (A) Gewichtsverlauf und absolute Gewichtszunahme, (B) Glukoselevel im Blut und (C)-(E) Bestimmung der Plasmaproteinlevel am Ende des Behandlungszeitraums mit Insulin (C), Resistin (D) und Leptin (E). (F)-(H) Bestimmung der Körperfettzusammensetzung mit Fettmasse (F), fettfreier Masse (G) und freier Flüssigkeit (H). 2-Wege ANOVA mit Bonferroni *multiple comparison* Posttest: (A) Interaktion $F=79,48$, $P<0,0001$; Diät $F=300,3$, $P<0,0001$; Behandlung $F=116,4$, $P<0,0001$; (B) Interaktion $F=21,57$, $P<0,0001$; Diät $F=76,05$, $P<0,0001$; Behandlung $F=14,98$, $P=0,0003$; (C) Interaktion $F=2,045$, $P=0,1593$; Diät $F=23,03$, $P<0,0001$; Behandlung $F=8,840$, $P<0,0046$; (D) Interaktion $F=4,429$, $P=0,0406$; Diät $F=56,28$, $P<0,0001$; Behandlung $F=2,022$, $P=0,1615$; (E) Interaktion $F=1,353$, $P=0,2506$; Diät $F=85,75$, $P<0,0001$; Behandlung $F=29,72$, $P<0,0001$; Interaktion $F=1,619$, $P=0,2094$; Diät $F=255,9$, $P<0,0001$; Behandlung $F=120,3$, $P<0,0001$; (F) Interaktion $F=1,619$, $P=0,2094$; Diät $F=255,9$, $P<0,0001$; Behandlung $F=120,3$, $P<0,0001$; (G) Interaktion $F=0,1843$, $P=0,6696$; Diät $F=395,2$, $P<0,0001$; Behandlung $F=117,8$, $P<0,0001$; (H) Interaktion $F=8,371$, $P=0,0058$; Diät $F=7,306$, $P=0,0096$; Behandlung $F=55,4$, $P<0,0001$; * $P<0,05$ im *multiple comparison* Posttest; $n=17-18$ pro Gruppe bei (A)-(B); $n=12-13$ pro Gruppe bei (C)-(H); Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Nur bei Resistin war die TEL-induzierte Reduktion bei den mit HFD-gefütterten Mäusen knapp nicht signifikant im Vergleich zu den HFD_{KON}-Mäusen (Abbildung 9D).

Des Weiteren wurde bei den Mäusen die Körperfettzusammensetzung am Ende der Behandlung gemessen. Dabei lag die Fettmasse bei den HFD_{KON}-Mäusen um etwa 15 % höher als bei den NFD_{KON}-behandelten Tieren (Abbildung 9F). Die fettfreie Masse hingegen war durch die HFD tendenziell geringer als in den Kontrolltieren (Abbildung 9G). Auch auf die Körperfettzusammensetzung wirkte sich TEL positiv aus. Dies zeigte sich daran, dass die gleichzeitige Behandlung mit TEL bei den HFD-gefütterten Mäusen einen Anstieg der Fettmasse verhinderte und gleichzeitig zu einer Vermehrung der fettfreien Masse führte (Abbildung 9F-G). Auf den Anteil freier Flüssigkeit hatte die Diät keinen Effekt, allerdings führte die Behandlung mit TEL sowohl bei den mit NFD- als auch mit HFD-gefütterten Mäusen zu einer Reduktion der freien Flüssigkeit um 0,5-1 % (Abbildung 9H).

Als weiterer Parameter zur Charakterisierung des metabolischen Syndroms wurde mittels der *Tail-Cuff* Methode der Blutdruck gemessen (Abbildung 10). Dabei zeigte sich kein klarer Effekt durch die Fütterung mit HFD. Bei den mit HFD-gefütterten Mäusen war in Bezug auf den mittleren arteriellen Druck (MAD) lediglich ein geringfügig sichtbarer Trend in Richtung höherer Werte zu beobachten. Dieser betrug bei den NFD_{KON}-Mäusen im Mittel 75 mmHg und bei den HFD_{KON}-Mäusen 82 mmHg (Abbildung 10A). Eine ähnlich geringe Tendenz zeigten die Messergebnisse von Systole und Diastole. Die Systolen der NFD_{KON}-Mäuse betragen im Mittel 90 mmHg und die der HFD-gefütterten Kontrolltiere im Mittel 103 mmHg (Abbildung 10B). Die Diastolen der NFD_{KON}-Tiere betragen im Mittel 69 mmHg und die der HFD_{KON}-Mäuse 75 mmHg (Abbildung 10C). Die Unterschiede waren folglich nicht signifikant. Allerdings zeigte sich für diese drei Parameter ein Effekt durch die Behandlung mit TEL. So reduzierte TEL in den NFD-gefütterten Mäusen den MAD und den diastolischen Wert um jeweils 12 % und bei den HFD-gefütterten Mäusen um 20-22 % (Abbildung 10A, C). Die Systole wurde durch die Behandlung mit TEL jedoch lediglich bei den mit HFD-gefütterten Mäusen um rund 29 % reduziert. Bei den HFD-gefütterten Tieren war die tendenziell sichtbare Reduktion durch TEL nicht signifikant (Abbildung 10B). Der zusätzlich gemessene Puls wurde weder durch die HFD noch die TEL-Behandlung beeinflusst (Abbildung 10D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach 16-wöchiger HFD-Fütterung die Mäuse weitestgehend den Phänotyp des metabolischen Syndroms zeigten. Dies geschieht aber ohne,

dass sie eine Hypertonie entwickelten. TEL konnte dabei den metabolischen Status von HFD-gefütterten Mäusen teilweise verbessern.

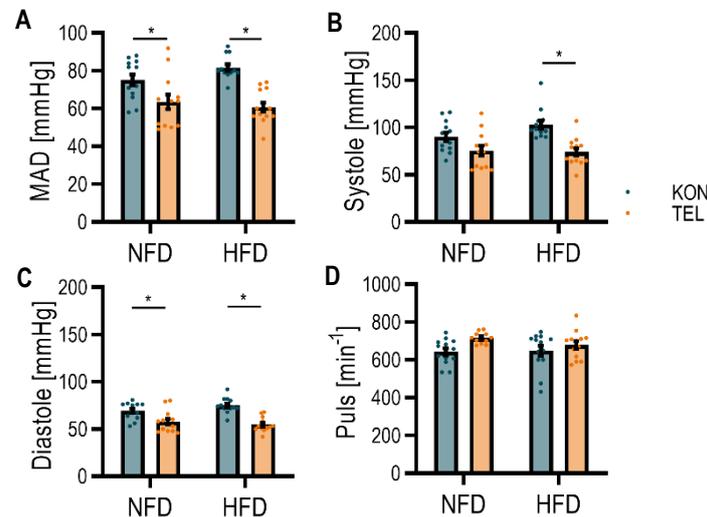


Abbildung 10. HFD für 16 Wochen hat keinen Einfluss auf den Blutdruck. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfett- (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. Quantifizierung der Blutdruckmessung mit (A) mittlerem arteriellen Druck (MAD), (B) Systole, (C) Diastole und (D) Puls. 2-Wege ANOVA mit Bonferroni *multiple comparison* Posttest: (A) Interaktion $F=2,576$, $P=0,1152$; Diät $F=0,4087$, $P=0,5257$; Behandlung $F=32,29$, $P<0,0001$; (B) Interaktion $F=2,367$, $P=0,1305$; Diät $F=1,608$, $P=0,2110$; Behandlung $F=22,89$, $P<0,0001$; (C) Interaktion $F=3,158$, $P=0,0819$; Diät $F=0,2600$, $P=0,6125$; Behandlung $F=41,12$, $P<0,0001$; (D) Interaktion $F=1,011$, $P=0,3198$; Diät $F=0,6160$, $P=0,4365$; Behandlung $F=6,599$, $P=0,0134$; * $P<0,05$ im *multiple comparison* Posttest; $n=12-13$ pro Gruppe; Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Bei der Messung des Anstiegs der Gewebepfusion im somatosensorischen Cortex mittels LSI wurde während der Tasthaarstimulation das Ergebnis aus Abschnitt 5.2 bestätigt: Nach 16 Wochen HFD kommt es zu einem geringeren Anstieg der Perfusion bei den adipösen Mäusen. Die Reaktion der HFD_{KON}-Mäuse auf die elektrische Stimulation war mit einem Anstieg von 69,5 % um etwa 30 % geringer als bei den NFD-Kontrollen (Abbildung 11A, B). Überraschenderweise hatte die Behandlung mit TEL in den mit NFD-gefütterten Mäusen ebenfalls einen reduzierenden Effekt. Im Gegensatz dazu erhöhte die Behandlung mit TEL bei den HFD-gefütterten Mäusen den Perfusionsanstieg während der Stimulation auf rund 86 % (Abbildung 11A, B). Die Daten bezüglich der AUC unterstützen dieses Ergebnis. Die AUC war bei den HFD_{KON}-Mäusen um 29 % kleiner als bei den NFD_{KON}-Mäusen und die Behandlung mit TEL vergrößerte die AUC bei den HFD-

gefütterten Mäusen um 23 % (Abbildung 11C). Ähnlich zur maximalen Reaktion scheint TEL allein auch hier bereits einen reduzierenden Effekt zu haben. Im Vergleich war die AUC bei den NFD_{TEL}-Mäusen um etwa 22 % kleiner als bei den NFD_{KON}-Mäusen (Abbildung 11C). Wie nach den bisherigen Ergebnissen zu erwarten, war die Reaktion auf die CO₂-Stimulation weder durch die HFD noch die Behandlung mit TEL verändert (Abbildung 11D-F).

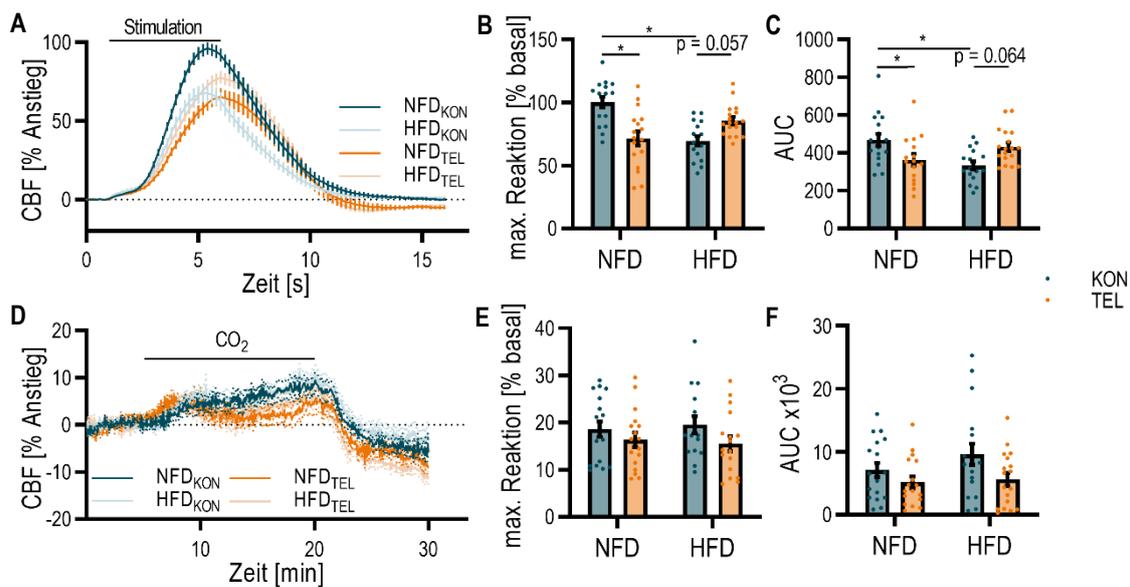


Abbildung 11. TEL schützt vor neurovaskulären Einschränkungen nach einer HFD-Fütterung. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. (A) Quantifizierung der LSI-Messung während Stimulation der Tastaare mit Angabe der (B) maximalen Reaktion auf die Stimulation und (C) Area under the Curve (AUC). (D) Quantifizierung der LSI-Messung während der CO₂-Stimulation mit Angabe der (E) maximalen Reaktion auf die Stimulation und (F) AUC. 2-Wege ANOVA mit Bonferroni *multiple comparison* Posttest: (B) Interaktion $F=28,09$, $P<0,0001$; Diät $F=3,927$, $P=0,0518$; Behandlung $F=2,286$, $P=0,135401$; (C) Interaktion $F=14,36$, $P<0,001$; Diät $F=1,528$, $P=0,221$; Behandlung $F=0,008769$, $P=0,926$; (E) Interaktion $F=0,2868$, $P=0,5941$; Diät $F=0,001186$, $P=0,9726$; Behandlung $F=3,560$, $P=0,0637$; (F) Interaktion $F=0,6858$, $P=0,4105$; Diät $F=1,456$, $P=0,2318$; Behandlung $F=5,899$, $P=0,0178$; * $P<0,05$ im *multiple comparison* Posttest; $n=17-18$ pro Gruppe; Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

In der Literatur ist beschrieben, dass auch der basale CBF durch Adipositas, Hyperglykämie oder Diabetes reduziert wird^{68, 75, 76, 171}. Um eine HFD-induzierte Reduktion des CBF in unserem Adipositasmodell zu überprüfen, wurden die Mäuse nach dem gleichen Protokoll für 16 Wochen mit HFD oder NFD gefüttert und mit KON oder TEL behandelt. Am letzten Tag der Behandlung ist

bei den Mäusen die absolute Gewebepfusion in verschiedenen Gehirnregionen mittels ASL-MRT (Abschnitt 4.1.4) gemessen worden (Abbildung 12A). Der HFD-Effekt auf die neurovaskuläre Kopplung aus Abschnitt 5.3 wurde im Bereich des somatosensorischen Cortex gemessen. Daher wurde die Perfusion im Cortex auch mit der ASL-MRT-Messung gemessen und berechnet. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die mit NFD-gefütterten Kontrolltiere eine Perfusion des Cortex von rund 224 ml/min/100 g Gewebe im Mittel aufwiesen, wohingegen bei den HFD_{KON}-Mäusen nur 216 ml/min/100 g Gewebe gemessen wurden. Dies stellt eine Reduktion des CBF um etwa 4 % dar und ist somit statistisch signifikant (Abbildung 12B).

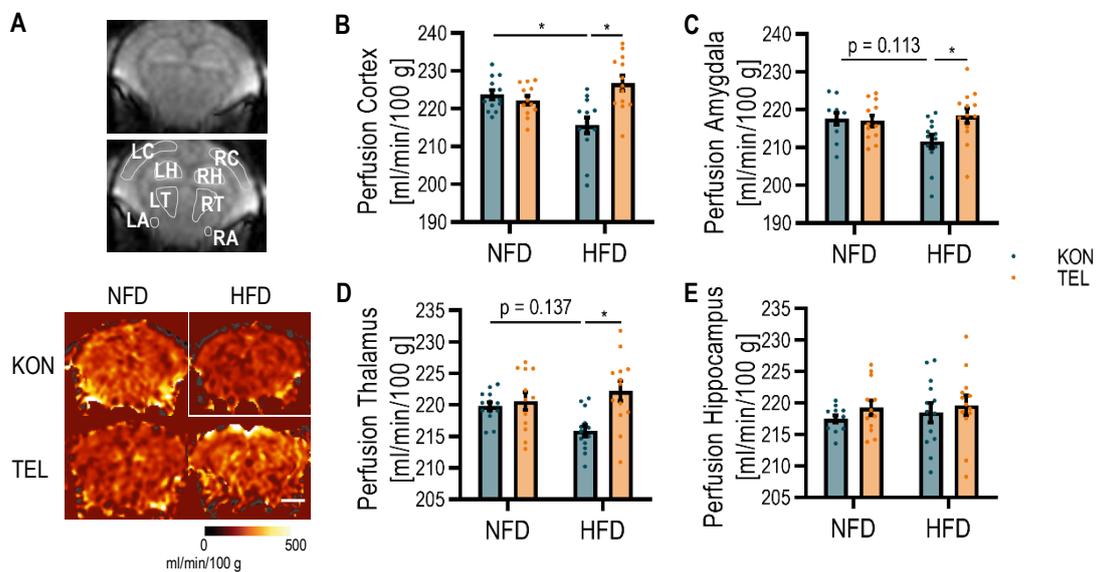


Abbildung 12. TEL normalisiert CBF nach einer HFD-Fütterung. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. (A) Beispielbilder mit dargestellten Messbereichen (LC: linker Cortex; LH: linker Hippocampus; LT: linker Thalamus; LA: linke Amygdala; RC: rechter Cortex; RH: rechter Hippocampus; RT: rechter Thalamus; RA: rechte Amygdala) und repräsentative Bilder für jede Gruppe; Scale bar 2 mm. (B)-(E) Quantifizierung der Gewebepfusion aus der ASL-MRT-Messung in den angegebenen Hirnregionen. 2-Wege ANOVA mit Bonferroni *multiple comparison* Posttest: (B) Interaktion $F=13,84$, $P=0,0005$; Diät $F=1,124$, $P=0,2946$; Behandlung $F=8,101$, $P=0,0065$; (C) Interaktion $F=4,604$, $P=0,0373$; Diät $F=1,793$, $P=0,1873$; Behandlung $F=3,234$, $P=0,0788$; (D) Interaktion $F=5,367$, $P=0,0249$; Diät $F=0,9594$, $P=0,3324$; Behandlung $F=8,985$, $P=0,0043$; (E) Interaktion $F=0,05509$, $P=0,8155$; Diät $F=0,2785$, $P=0,6002$; Behandlung $F=1,221$, $P=0,2750$; * $P<0,05$ im *multiple comparison* Posttest; $n=12-13$ pro Gruppe; Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Die Behandlung mit TEL hatte in den mit NFD-gefütterten Mäusen keinen Effekt, bei den mit HFD-gefütterten allerdings schon. So konnte TEL in den mit HFD-gefütterten Tieren den Blutfluss auf 227 ml/min/100 g Gewebe erhöhen und verbesserte ihn damit um rund 5 % im Vergleich zu den HFD_{KON}-Mäusen (Abbildung 12B). Ferner wurde in diesem Zusammenhang auch die Perfusion im Bereich der Amygdala gemessen. Ein HFD-induzierter Effekt war dort nicht so deutlich erkennbar wie zuvor für die Messung im Cortex. Die HFD reduzierte den Blutfluss lediglich um 5 ml/ min/ 100 g Gewebe, was jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 12C). Allerdings konnte auch in der Amygdala ein TEL-Effekt in den HFD-gefütterten Mäusen beobachtet werden. Der CBF war um 6 ml/min/100 g Gewebe höher, was einen Anstieg um etwa 3 % im Vergleich zu den HFD_{KON}-Mäusen ausmacht. Ein ähnliches Ergebnis konnte ebenfalls für die Messung im Thalamus beobachtet werden (Abbildung 12D). Der HFD-Effekt war dabei auch nur tendenziell zu beobachten, da die Reduktion des CBF durch HFD lediglich knapp 2 % betrug. Allerdings konnte erneut ein TEL-Effekt bei den mit HFD-gefütterten Mäusen beobachtet werden: Der CBF in den HFD_{TEL}-Mäusen betrug 3 % und war damit im Vergleich zu den HFD_{KON}-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 12D). Sowohl bei der Messung in der Amygdala als auch der im Thalamus konnte kein TEL-Effekt bei den mit NFD-gefütterten Mäusen beobachtet werden (Abbildung 12C-D). Zusätzlich wurde die Perfusion noch in einem weiteren Areal, dem Hippocampus, gemessen. Interessanterweise wurde hier weder ein Effekt durch die Diät noch durch die Behandlung mit TEL beobachtet (Abbildung 12E). Bei allen vier Behandlungsgruppen lag die Perfusion bei im Mittel 217-219 ml/min/100 g Gewebe. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass der Effekt der HFD und von TEL auf die jeweilige Gehirnregion verschieden zu sein scheint und nicht für das gesamte Gehirn verallgemeinert werden kann.

In Bezug auf die zerebrovaskuläre Funktionalität wurde als weiterer Parameter der Durchmesser der wichtigsten Gefäße des *Circle of Willis* mittels TOF-Angiographie hinzugezogen. Die in der Studie vermessenen Gefäße sind in Abbildung 13A dargestellt. Der Durchmesser der MCA bei den NFD-gefütterten Kontrolltieren betrug dabei im Mittel 0,214 mm und war bei den HFD_{KON}-Mäusen um rund 15 % auf 0,182 mm reduziert (Abbildung 13B). Eine solche Reduktion konnte allerdings durch die Behandlung mit TEL bei den mit HFD-gefütterten Mäusen verbessert werden. So war der MCA-Durchmesser bei den HFD_{TEL}-Mäusen mit 0,191 mm tendenziell größer als bei den HFD_{KON}-Mäusen mit 0,182 mm und auch nicht anders als der Wert der NFD_{KON}-Mäuse (Abbildung 13B). Auf die MCA-Länge hatte die HFD keinen statistisch signifikanten Effekt

(Abbildung 13C), denn die MCA-Länge der HFD_{KON}-Mäuse war um 0,345 mm verringert als bei den NFD_{KON}-Mäusen, was lediglich eine Tendenz darstellt. Im Gegensatz dazu war in den TEL-behandelten und mit HFD-gefütterten Mäusen die MCA um knapp 17 % länger als bei den HFD_{KON}-Mäusen (Abbildung 13C). Hinsichtlich des Abstandes zwischen den Verzweigungspunkten von MCA und PCA konnte weder durch die HFD noch durch TEL ein Effekt beobachtet werden (Abbildung 13D).

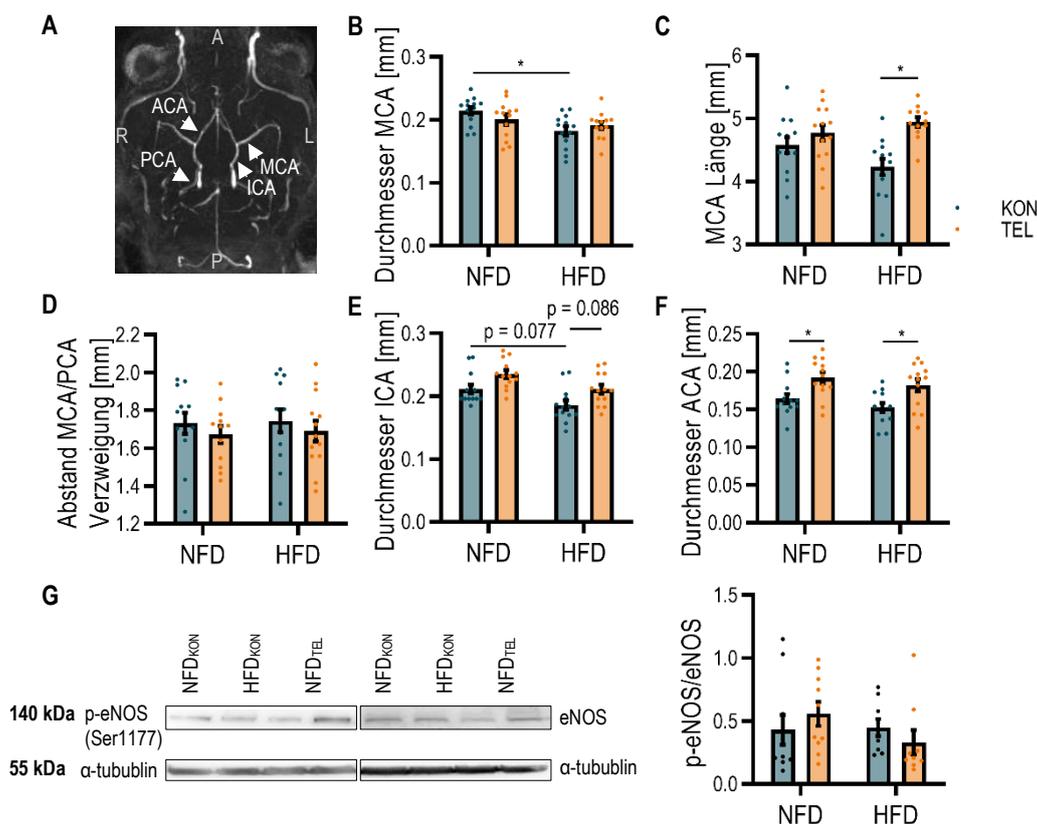


Abbildung 13. HFD und TEL Effekte auf den Gefäßdurchmesser im *Circle of Willis*. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfett diät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. (A) Beispiel Bild der TOF-Angiographie und der gemessenen Gefäße; A anterior; P posterior; L links; R rechts. (B) Durchmesser- und (C) Längenbestimmung der *middle cerebral artery* (MCA). (D) Abstandsmessung zwischen den Abzweigungen von MCA und *posterior cerebral artery* (PCA). Durchmesser von (E) *internal carotid artery* (ICA) und (F) *anterior cerebral artery* (ACA). 2-Wege ANOVA mit Bonferroni *multiple comparison* Posttest: (B) Interaktion F=2,670, P=0,1088; Diät F=8,636, P=0,0051; Behandlung F=0,1231, P=0,7272; (C) Interaktion F=4,830, P=0,0329; Diät F=0,5391, P=0,4664; Behandlung F=14,91, P=0,0003; (D) keine Signifikanzen; (E) Interaktion F=0,0131, P=0,9094; Diät F=12,51, P=0,0009; Behandlung F=12,13, P=0,0011; (F) Interaktion F=0,01345, P=0,9082; Diät F=2,512, P=0,1195; Behandlung F=16,93, P=0,0002; (G) Interaktion F=1,572, P=0,2185; Diät F=1,147, P=0,2917; Behandlung F=0,0027, P=0,9591; * P<0,05 im *multiple comparison* Posttest; n=12-13 pro Gruppe bei (A)-(F); n = 10 pro Gruppe bei (G); Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

Der Durchmesser der ICA betrug bei den NFD-gefütterten Kontrollmäusen 0,211 mm und wurde durch die HFD um 13,4 % auf 0,186 mm bei den HFD_{KON}-Mäusen reduziert (Abbildung 13E). Die gleichzeitige TEL-Behandlung der HFD-gefütterten Mäuse konnte den Durchmesser auf das Niveau der NFD_{KON}-Mäuse normalisieren (Abbildung 13E). Für den Durchmesser der ACA war hingegen lediglich ein TEL-Effekt zu beobachten. Sowohl bei den mit NFD- als auch mit HFD-gefütterten Mäusen war der ACA-Durchmesser durch TEL erhöht (Abbildung 13F), wobei der Anstieg 16-17 % im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren betrug.

Der Gefäßdurchmesser wird von verschiedenen Mediatoren beeinflusst. Diesbezüglich gilt NO als ein maßgeblicher Regulator von Gefäßdilatation, welches unter anderem durch die eNOS gebildet wird¹⁷². Daher wurden im folgenden Teil der Studie die eNOS-Level überprüft und mittels Western Blot bestimmt. Bei den Messungen konnte kein HFD-induzierter Effekt auf das Verhältnis zwischen aktivierter p-eNOS und eNOS beobachtet werden und ein Effekt durch die Behandlung mit TEL war nur tendenziell erkennbar (Abbildung 13G). Genauer gesagt erhöhte sich das Verhältnis durch TEL bei den NFD-gefütterten Mäusen um 23,2 % auf 0,56, wohingegen eine gegensätzliche Tendenz durch TEL bei den HFD-Mäusen beobachtet werden konnte. Es zeigte sich hier eine Reduktion des Verhältnisses um 23,3 % im Vergleich zu den NFD_{KON}-Mäusen und um 26,7 % im Vergleich zu den HFD_{KON}-Mäusen (Abbildung 13G). Dabei war das eNOS-Level bei allen vier Gruppen gleich und die Aktivierung der eNOS scheint in diesem Behandlungsmodell keine maßgebliche Rolle zu spielen.

5.4. TEL schützt vor HFD-induzierten Veränderungen in der zerebralen Gefäßstruktur und verbessert den oxidativen Status

In dem folgenden Abschnitt wird dargestellt, welche Mechanismen möglicherweise zur Entstehung der HFD-induzierten neurovaskulären Defizite beitragen. In diesem Zusammenhang wurden in der Studie unter anderem die Bildung von sogenannten *String Vessel* untersucht. Bei *String Vessel* handelt es sich um Gefäße, die keine Endothelzellen, sondern lediglich die Basalmembran besitzen. Sie sind somit leere Gefäße, durch die kein Blutfluss mehr erfolgt. Daher tragen sie nicht zur Perfusion des entsprechenden Gewebes bei¹⁶⁶. Bislang ist lediglich ein Zusammenhang von Diabetes und der Entstehung von *String Vessel* im Bereich der Retina gezeigt worden¹⁷³. Im Gehirn wurde diese Verbindung noch nicht untersucht. Daher wurden für die

Studie im Gehirn der Mäuse mittels Immunhistochemie koronare Gehirnschnitte mit Antikörpern gegen den Endothelzellmarker CD31 und Col IV als Marker für die Basalmembran angefärbt und die Länge der Gefäßabschnitte gemessen, die Col IV-positiv aber CD31-negativ waren.

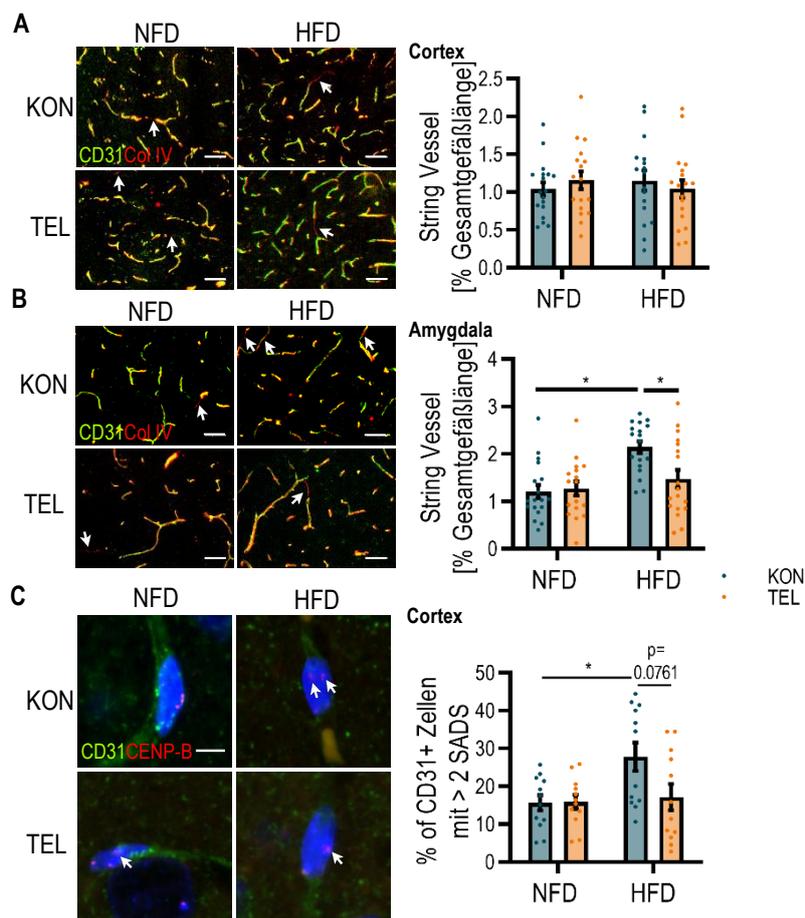


Abbildung 14. TEL hat mögliche protektive Effekte auf die zerebrale Gefäßstruktur nach einer HFD-Fütterung. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. (A) und (B) Repräsentative Bilder der Immunhistochemie mit einem Antikörper für Endothelzellen (CD31) und der Basalmembran (Collagen IV; Col IV) und Quantifizierung der *String Vessel* Länge (CD31-/Col IV+, durch Pfeile verdeutlicht) im (A) Cortex und (B) der Amygdala; *Scale bar* 50 μ m. (C) Repräsentative Bilder mit peri/centromeren *satellite DNA signals* (SADS; durch Pfeile verdeutlicht); Bilder zeigen CD31+ (grün) Zellnuklei mit CENP-B (Centromer, rot); *Scale bar* 5 μ m und (D) Anteil der CD31+ Zellen mit >2 SADS. 2-Wege ANOVA mit Bonferroni *multiple comparison* Posttest: (A) Interaktion $F=0,9810$, $P=0,3256$; Diät $F=0,0002057$, $P=0,9886$; Behandlung $F=0,001083$, $P=0,9738$; (B) Interaktion $F=5,681$, $P=0,0200$; Diät $F=13,79$, $P=0,0004$; Behandlung $F=3,758$, $P=0,0568$; (C) Interaktion $F=9,101$, $P=0,0074$; Diät $F=0,06261$, $P=0,8053$; Behandlung $F=1,176$, $P=0,2925$; * $P<0.05$ im *multiple comparison* Posttest; $n=17-18$ pro Gruppe bei (A)-(B) (4 Bilder pro n); $n=6$ pro Gruppe bei (C) (im Mittel 52 CD31+ Zellen pro n); Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Im Bereich des Cortex war dabei hinsichtlich der *String Vessel* Länge weder ein Effekt durch die HFD noch durch die Behandlung mit TEL zu beobachten, denn dort betrug die Länge der *String Vessel* bei allen Gruppen rund 1 % der Gesamtgefäßlänge (Abbildung 14A). Im Vergleich dazu zeigte die Untersuchung auf *String Vessel* im Bereich der Amygdala eine Erhöhung der *String Vessel* bei den HFD_{KON}-Mäusen um fast das Doppelte (Abbildung 14B). Der Anteil an *String Vessel* bei den NFD_{KON}-Mäusen lag dabei ähnlich zu dem gemessenen Anteil im Cortex bei 1,2 % und bei den adipösen HFD_{KON}-Mäusen bei 2,1 % (Abbildung 14B). Die gleichzeitige Behandlung mit TEL reduzierte den *String Vessel* Anteil bei den mit HFD-gefütterten Mäusen auf das Level der Kontrollmäuse, bei den mit NFD-gefütterten Mäusen gab es jedoch keinen Effekt durch TEL (Abbildung 14B). Es lässt sich somit erkennen, dass TEL in der Amygdala eine HFD-induzierte Bildung von *String Vessel* verhindert. Die Gesamtgefäßlänge und die Anzahl an Gefäßverzweigungen zwischen den Gruppen unterschieden sich weder im Cortex noch in der Amygdala (Abbildung S3).

Als weiterer Parameter, der sich auf die Funktionalität der Endothelzellen und somit auf den CBF auswirken kann, wurde der Grad der endothelialen Seneszenz untersucht. Seneszenz ist ein Zustand des irreversiblen Zellzyklusarrest, welcher durch verschiedene Stressoren, wie beispielsweise oxidativen Stress, induziert werden kann¹⁷⁴. Als frühes Geschehen im seneszenten Stadium gilt die Bildung von SADS¹⁷⁵. Daher wurde in dieser Studie auch die Bildung von SADS in Endothelzellen des Cortex untersucht. Dabei konnte bei den HFD_{KON}-Mäusen im Vergleich zu den NFD_{KON}-Mäusen ein deutlicher Anstieg hin zu einem vermehrten Vorkommen von SADS in Endothelzellen beobachtet werden (Abbildung 14C). Bei den NFD-Kontrollmäusen lag der Anteil an Endothelzellen mit mehr als zwei SADS-Events bei etwa 15,64 % und bei den adipösen HFD-Kontrollen bei 27,82 %. Dies stellt einen statistisch signifikanten Anstieg um rund 43,8 % dar. Die TEL-Behandlung verringerte den Anteil der Endothelzellen mit mehr als zwei SADS-Events bei den HFD-gefütterten Mäusen auf 17,16 % (Abbildung 14C). Es zeigt sich folglich, dass TEL im Cortex den HFD-induzierten Übergang von Endothelzellen in ein seneszentes Stadium verhindert.

Wie oben beschrieben, ist oxidativer Stress ein Parameter, der zum Übergang einer Zelle in ein seneszentes Stadium beitragen kann und der auch im Zusammenhang mit Adipositas bereits beschrieben ist¹⁷⁶. Daher wurden in dieser Studie verschiedene Gehirnregionen auf oxidativen Stress hin untersucht (Abbildung 15). Um Rückschlüsse auf den allgemeinen oxidativen Status im Gehirn zu ziehen, wurde zunächst der Einfluss von HFD und TEL auf die Bildung von *Lipid Droplets*

als Indikator für oxidativen Stress in Ependymzellen entlang des lateralen Ventrikels überprüft. Dabei betrug die Lipid-Dropletgröße pro Zelle bei den NFD_{KON}-Mäusen im Mittel 2,5 μm^2 und wurde bei den HFD_{KON}-Mäusen um 31,7 % auf 3,7 μm^2 vergrößert (Abbildung 15A).

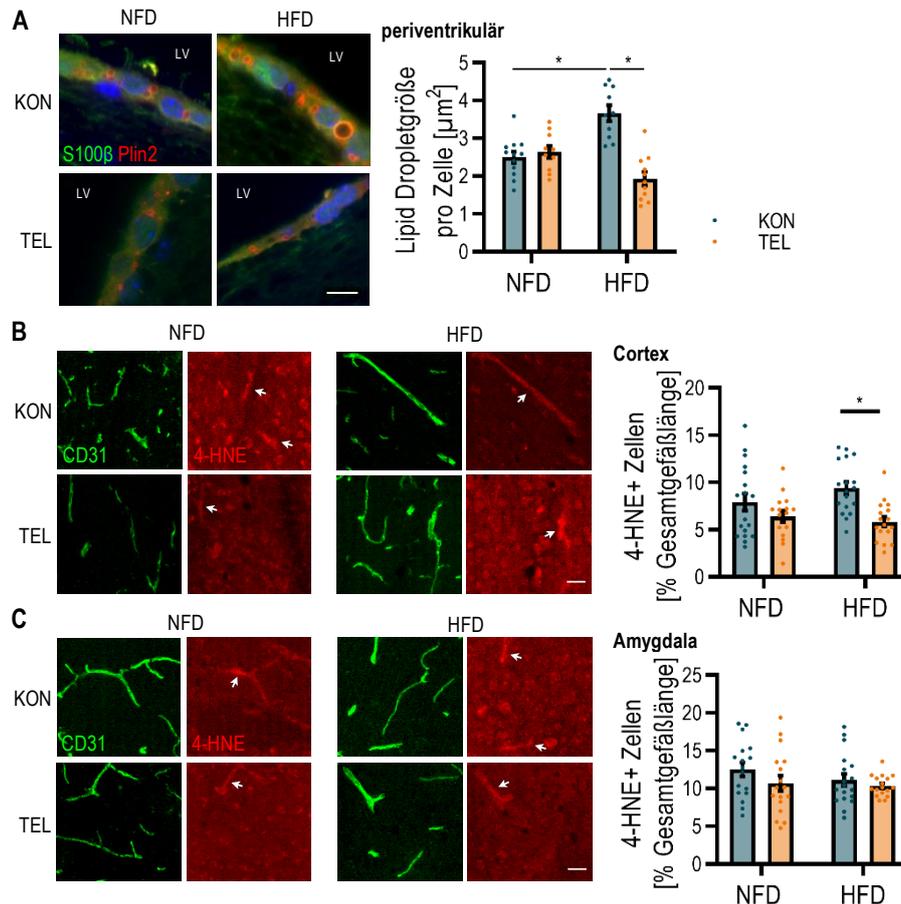


Abbildung 15. HFD and TEL haben abhängig von der Gehirnregion einen Effekt auf Marker für oxidativen Stress. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. (A) Repräsentative Bilder der Immunhistochemie mit einem Antikörper für *Lipid Droplets* (Perilipin 2, Plin2) und Ependymzellen (S100 β) entlang des lateralen Ventrikels (LV) und Quantifizierung der *Lipid Droplet* Größe pro Zelle; *Scale bar* 10 μm . (B) und (C) Repräsentative Bilder der Immunhistochemie mit einem Antikörper für den Endothelzellmarker CD31 und dem Marker 4-Hydroxynonenal (4-HNE) für oxidativen Stress und Quantifizierung der CD31+/4-HNE+ Zelllänge im (C) Cortex und (D) der Amygdala; *Scale bar* 30 μm . 2-Wege ANOVA mit Bonferroni *multiple comparison* Posttest: (A) Interaktion $F=27,98$, $P<0,0001$; Diät $F=1,647$, $P=0,2070$; Behandlung $F=20,24$, $P<0,0001$ (B) Interaktion $F=2,203$, $P=0,1426$; Diät $F=0,4587$, $P=0,5007$; Behandlung $F=13,53$, $P=0,0005$; (C) Interaktion $F=0,4211$, $P=0,5187$; Diät $F=1,143$, $P=0,2890$; Behandlung $F=2,503$, $P=0,1185$; * $P<0,05$ im *multiple comparison* Posttest; $n=12$ pro Gruppe bei (A); $n=17-18$ pro Gruppe bei (B)-(C) (4 Bilder pro n); Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

TEL bewirkte dabei bei den mit HFD-gefütterten Mäusen eine erkennbare Reduktion der Dropletgröße pro Zelle, denn im Vergleich zu den HFD_{KON}-Mäusen reduzierte sich die Größe bei den HFD_{TEL}-Mäusen um 47,3 % auf 1,93 μm^2 (Abbildung 15A). Als direkter Marker für oxidativen Stress wurde des Weiteren 4-HNE verwendet und es wurden sowohl im Cortex als auch in der Amygdala Endothelzellen auf diesen Marker hin untersucht (Abbildung 15B-C). Im Bereich des Cortex konnte dabei durch die HFD ein Trend in Richtung erhöhtem oxidativen Stress in den Endothelzellen beobachtet werden. Die Länge der 4-HNE-positiven Gefäße betrug im Mittel bei den NFD-Kontrollmäusen 7,9 % und stieg bei den HFD-Kontrollmäusen auf 9,4 % an, wenn auch dieser Anstieg nicht signifikant war (Abbildung 15B). Allerdings konnte hier ein Effekt durch TEL bei den HFD-gefütterten Mäusen beobachtet werden. Dies zeigte sich darin, dass bei den HFD_{TEL}-Mäusen der Längenanteil der 4-HNE-positiven Gefäße im Mittel 5,8 % betrug und somit im Vergleich zu den HFD_{KON}-Mäusen um rund 38 % reduziert wurde (Abbildung 15B). Im Bereich der Amygdala konnte im Vergleich dazu allerdings weder durch die HFD-Fütterung noch die TEL-Behandlung ein Effekt auf die Expression von 4-HNE in den Endothelzellen beobachtet werden. Die Länge der 4-HNE-positiven Gefäße betrug dort bei allen vier Behandlungsgruppen im Mittel 10-12 % und unterschied sich somit nicht (Abbildung 15C). Generell hatten HFD oder TEL weder im Cortex noch in der Amygdala einen Einfluss auf die Gesamtgefäßlänge oder die Anzahl der Gefäßverzweigungen (Abbildung S4). Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die Diät-induzierte Adipositas im Cortex Seneszenz und oxidativen Stress hervorruft, wohingegen im Bereich der Amygdala die Bildung von *String Vessel* verstärkt wird. Es zeigte sich zudem, dass die Behandlung mit TEL in den jeweiligen HFD-induzierten Veränderungen einen protektiven Effekt aufweist.

5.5. TEL hat positive Effekte auf das Angstverhalten bei Mäusen, die mit HFD gefüttert wurden, jedoch nicht auf die Gedächtnisbildung

Adipositas, Hyperglykämie und Diabetes stehen in einem kausalen Zusammenhang mit psychischen Folgeerscheinungen wie Depressionen und einem erhöhten Angstverhalten^{100, 101}. Im weiteren Verlauf des Projekts wurde daher untersucht, ob auch im hier verwendeten Diät-induzierten Adipositasmodell Veränderungen bezüglich Angst, Depression und Kognition

nachzuweisen sind, und ob TEL in den verschiedenen Verhaltensversuchen eine protektive Eigenschaft besitzt.

Im *Open Field Test* (Abschnitt 4.1.5) wurde analysiert, wie lange sich die Mäuse im Zentrum im Vergleich zum Rand der Testfläche aufhielten, wobei ein vermehrtes Aufhalten im Zentrum in diesem *Setting* ein vermindertes Angstlevel indizierte. Bei diesem Test zeigten die adipösen HFD_{KON}-Mäuse eine niedrigere Aufenthaltswahrscheinlichkeit im zentralen Bereich, was ein gesteigertes Angstverhalten im Vergleich zu den NFD_{KON}-Mäusen nahelegt.

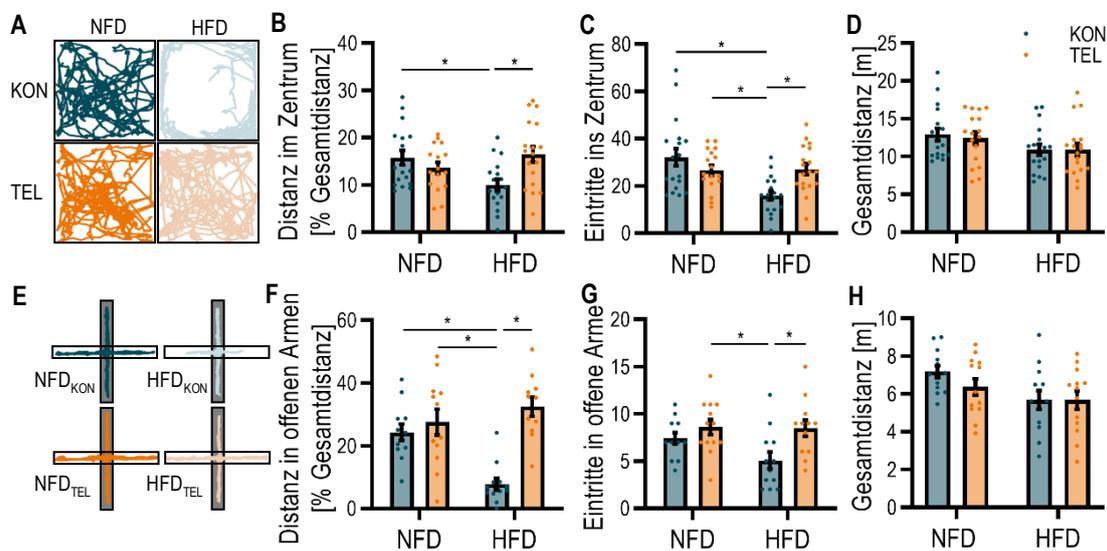


Abbildung 16. TEL reduziert Angstverhalten nach einer HFD-Fütterung. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. (A) Repräsentative *Track Reports* während des *Open Field Tests* für jede Gruppe und Quantifizierung der (B) Distanz, die die Mäuse in der mittleren Zone abgedeckt haben, (C) die Anzahl der Eintritte in die mittlere Zone und (D) die gelaufene Gesamtdistanz während des Tests. (E) Repräsentative *Track Reports* während des *Elevated Plus Tests* für jede Gruppe und Quantifizierung der (F) Distanz, die die Mäuse in den offenen Armen abgedeckt haben, (G) die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme und (H) die gelaufene Gesamtdistanz während des Tests. 2-Wege ANOVA mit Bonferroni *multiple comparison* Posttest: (B) Interaktion $F=8,968$, $P=0,0039$; Diät $F=0,9871$, $P=0,3241$; Behandlung $F=2,299$, $P=0,1343$; (C) Interaktion $F=9,973$, $P=0,0024$; Diät $F=9,014$, $P=0,0038$; Behandlung $F=1,158$, $P=0,2858$; (D) keine Signifikanzen; (F) Interaktion $F=12,80$, $P=0,0009$; Diät $F=3,746$, $P=0,0595$; Behandlung $F=21,84$, $P<0,0001$; (G) Interaktion $F=1,892$, $P=0,1758$; Diät $F=2,306$, $P=0,1359$; Behandlung $F=8,192$, $P=0,0064$; (H) keine Signifikanzen; * $P<0,05$ im *multiple comparison* Posttest; $n=17-18$ pro Gruppe bei (A)-(D); $n=12-13$ pro Gruppe bei (E)-(H); Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Dies zeigte sich durch eine um etwa 36,4 % geringere Distanz, die die Mäuse im Zentrum des Feldes zurücklegten (Abbildung 16A-B). Dieses Ergebnis wird durch die um die Hälfte reduzierte Anzahl an Eintritten in das Zentrum der HFD_{KON}-Mäuse im Vergleich zu den schlanken NFD_{KON}-Mäusen unterstützt (Abbildung 16C).

Mit dem *Elevated Plus Maze* wurde mit einem weiteren Test das Angstverhalten bei den Mäusen überprüft, wobei ein vermehrtes Aufhalten der Mäuse in den Testarmen ohne Seitenbegrenzung als weniger ausgeprägtes Angstverhalten gewertet wurde. Dabei haben die Ergebnisse des *Elevated Plus* Test die des *Open Field* Tests bestätigt, denn die HFD_{KON}-Mäuse hielten sich im Vergleich zu den NFD_{KON}-Mäusen weniger im Bereich der offenen Arme auf. Dies zeigte sich darin, dass die zurückgelegte Distanz der HFD_{KON}-Mäuse im Bereich der offenen Arme ohne Abgrenzung etwa 68,1 % geringer war als bei den NFD_{KON}-Mäusen (Abbildung 16E-F). Die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme war bei den HFD_{KON}-Mäusen nicht signifikant geringer als bei den NFD_{KON}-Mäusen. Dennoch konnte ein deutlicher Trend beobachtet werden, denn die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme war bei den HFD_{KON}-Mäusen um etwa 31,5 % reduziert im Vergleich zu den NFD_{KON}-Mäusen (Abbildung 16G). Die gleichzeitige Behandlung mit TEL konnte das Angstverhalten der mit HFD-gefütterten Mäuse in beiden Tests statistisch signifikant reduzieren. Dies zeigte sich darin, dass die zurückgelegte Distanz der HFD_{TEL}-Mäuse im Zentrum des *Open Fields* und in den offenen Armen des *Elevated Plus Maze* auf demselben Level wie die NFD-gefütterten Kontrollmäuse lag (Abbildung 16B, F). TEL hatte bei den mit NFD-gefütterten Mäusen jedoch keinen Effekt. Der Effekt durch die TEL-Behandlung zeigte sich bei den mit HFD-gefütterten Mäusen auch bei der Anzahl an Eintritten ins Zentrum bzw. in die offenen Arme. Diese wurden um etwa 41,1 % bzw. 40,2 % auf die des Kontrollniveaus erhöht (Abbildung 16C, G). Bei beiden Tests unterschied sich die zurückgelegte Gesamtdistanz zwischen den vier Gruppen nicht (Abbildung 16D, H).

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Tests zum Angstverhalten, wurden mittels *Object Place Recognition* und *Barnes Maze* Test weitere Verhaltensparameter hinsichtlich der Gedächtnisbildung, insbesondere des räumlichen Gedächtnisses, nach der Fütterung mit HFD untersucht. Im *Object Place Recognition* Test nach 16 Wochen Behandlung haben alle vier Gruppen nach einer Retentionszeit von 1h das umplatzierte Objekt bevorzugt, wobei allerdings kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen erkennbar war (Abbildung 17B). Auch nach einer Retentionszeit von 24 h war weder durch HFD noch durch TEL ein Effekt auf die

Testperformance sichtbar. Lediglich eine leichte Tendenz bei den HFD_{KON}-Mäusen ließ sich erkennen, dass sie das verstellte Objekt im Vergleich zu den NFD_{KON}-Mäusen weniger stark bevorzugten (Abbildung 17C). Allgemeine Parameter der Aktivität, wie Gesamtdistanz, Geschwindigkeit und Explorationszeit, waren sowohl nach 1 h als auch nach 24 h Retentionszeit zwischen den Gruppen gleich (Abbildung S5).

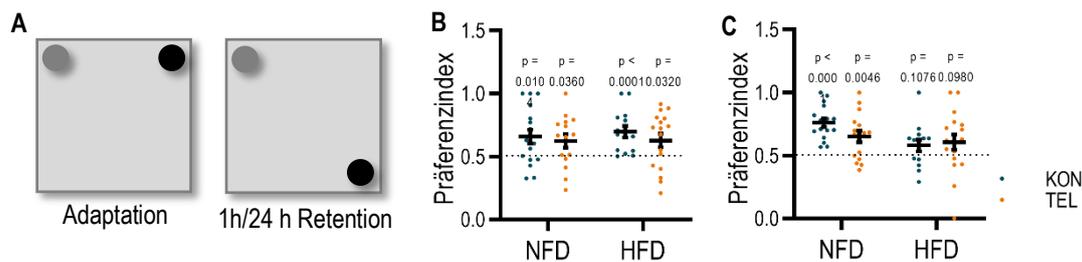


Abbildung 17. Weder HFD noch TEL haben einen Effekt auf das Objektgedächtnis. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. (A) Beispielbild zur Lokalisation des Objekts während des *Object Place Recognition* Tests mit errechnetem Präferenzindex für das verstellte Objekt nach (B) einer Stunde (h) und (C) 24 h Retentionszeit. 2-Wege ANOVA mit Bonferroni *multiple comparison* Posttest: (B) Interaktion $F=0,1112$, $P=0,7400$; Diät $F=0,1597$, $P=0,6909$; Behandlung $F=0,9991$, $P=0,3216$; (C) Interaktion $F=1,952$, $P=0,1676$; Diät $F=5,435$, $P=0,0232$; Behandlung $F=0,6937$, $P=0,4083$; Einstichproben-t-Test mit einem hypothetischem P-Wert von 0,5, P-Werte wie in (B) und (C) angegeben; $n=17-18$ pro Gruppe; Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Als weiterer Gedächtnistest wurde der *Barnes Maze* Test hinzugezogen, bei dem die Mäuse, nachdem sie für 16 Wochen mit NFD oder HFD gefüttert worden waren, über mehrere Tage erlernten, wo sich der Ausweg von der stark beleuchteten Testfläche befand. Bei allen Mäusen ließ sich während der Akquisitionsphase eine Verbesserung der Testperformance erkennen (Abbildung S6A). Allerdings verbesserte sich die Anzahl der primären Fehler und die primäre Latenz sowohl bei den NFD- als auch den HFD-gefütterten Mäusen über die 5 Akquisitionstage im gleichen Maße (Abbildung S6A). Auch am *Probe Trial* (Tag 6), an dem der Ausweg vom Testfeld verschlossen war, gab es zwischen NFD und HFD keinen Unterschied hinsichtlich der primären Testparameter (Abbildung 18A-D). Ferner haben sowohl die adipösen HFD- als auch die schlanken NFD-Mäuse am häufigsten eine serielle Strategie bei der Suche nach dem Ausweg verwendet (Abbildung 18D). Dabei war der Anteil dieser Strategie bei den NFD-Mäusen im Vergleich zu den

HFD-Mäusen leicht erhöht. Um genau diesen Anteil haben die HFD-Mäuse häufiger die gemischte Strategie angewendet (Abbildung 18D), welche als die weniger effiziente Suchstrategie definiert ist (Abschnitt 4.1.5). Derselbe Test wurde auch mit Mäusen durchgeführt, die für 24 Wochen mit HFD gefüttert wurden. Ähnlich zu den vorherigen Ergebnissen nach 16 Wochen, konnte auch hier kein eindeutiger HFD-Effekt beobachtet werden (Abbildung 18E-H). Während der Akquisitionsphase verbesserten beide Gruppen ihre Testperformance im selben Maße (Abbildung S6B). Lediglich bei der Anzahl an primären Fehlern am Tag des *Probe Trials* konnte ein deutlicher Trend beobachtet werden, auch wenn dieser nicht statistisch signifikant war (Abbildung 18E).

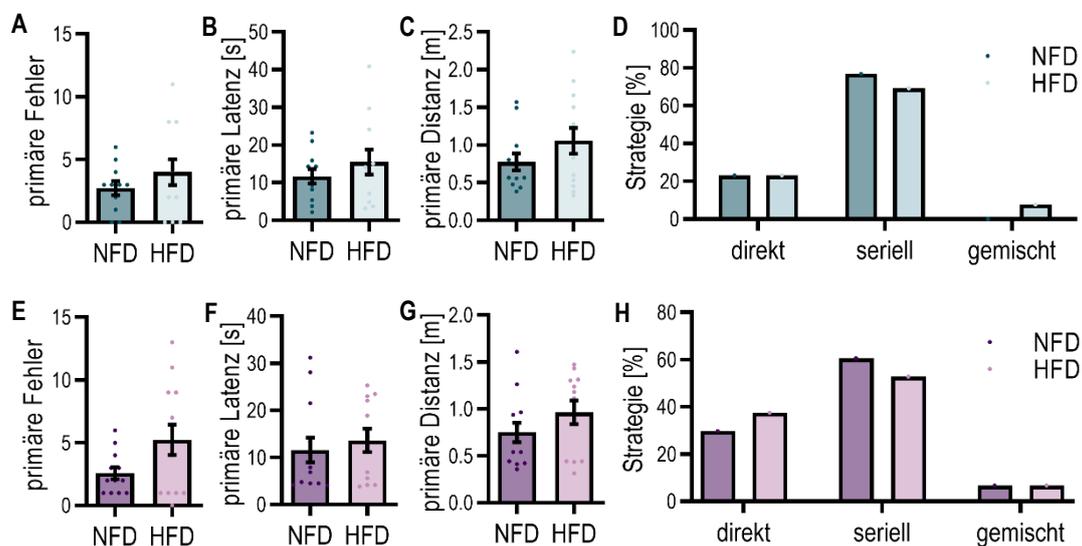


Abbildung 18. Weder HFD noch TEL haben einen Effekt auf das Ortsgedächtnis. Mäuse wurden für (A)-(D) 16 oder (E)-(H) 24 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfett- (HFD) gefüttert. (A) und (E) zeigen die primären Fehler, (B) und (F) die primäre Latenz, (C) und (G) die primäre Distanz und (D) und (H) die angewandte Suchstrategie am *Probe Trial* des Barnes Maze Tests. Keine Signifikanzen im Student's t-Test; n=12-13 pro Gruppe. Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Die adipösen HFD-Mäuse machten hier die doppelte Anzahl an Fehlern, bis sie den verschlossenen Ausweg auf der Plattform das erste Mal erreichten als die schlanken NFD-Mäuse (Abbildung 18E). Auch die primäre Distanz war bei den HFD-Mäusen tendenziell erhöht (Abbildung 18G). Bei der verwendeten Suchstrategie wurde aber kein Unterschied beobachtet (Abbildung 18H). Die abgedeckte Gesamtdistanz und die Geschwindigkeit waren sowohl nach 16 als auch nach 24 Wochen Diät bei beiden Gruppen gleich (Abbildung S6). Anhand dieser

ERGEBNISSE

Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass HFD-induziertes Angstverhalten nach 16 Wochen durch die gleichzeitige Behandlung mit TEL verringert werden kann, wohingegen weder HFD für 16 oder 24 Wochen noch TEL einen Effekt auf die Gedächtnisbildung haben.

6. Diskussion

Für diese Arbeit wurden die Folgen einer Diät-induzierten Adipositas auf die neurovaskuläre Kopplung und den CBF bei Mäusen untersucht, wobei auch betrachtet wurde, welche Prozesse daran beteiligt sein könnten. Weiterhin wurde überprüft, ob derartige Diät-induzierten Effekte Defizite im Bereich der Psychosomatik oder der Kognition zur Folge haben und ob der AT₁-Rezeptor-Antagonist TEL bei zeitgleicher Verabreichung diese Effekte verbessert oder gar verhindert.

Nach 8, 16 und 24 Wochen HFD hatten die für die jeweiligen Studien verwendeten Mäuse, denen kein TEL verabreicht worden war, eine ausgeprägte Diät-induzierte Adipositas entwickelt, die mit metabolischen Veränderungen, wie einem erhöhten Glukose-, Insulin- und Leptinlevel einherging. Solche Effekte lassen die Schlussfolgerung zu, dass die HFD-gefütterten Mäuse den Phänotyp des metabolischen Syndroms entwickelt hatten, zu welchem klassischerweise auch Hypertonie zählt. Entgegen dieser Annahme konnte bei den Mäusen jedoch eine Normotonie festgestellt werden. Dieses Ergebnis einer ausbleibenden Hypertonie trotz einer HFD-Fütterung über mehrere Wochen deckt sich mit dem aus einer vorherigen Studie¹⁴⁷. Wurden die Mäuse zusätzlich mit TEL behandelt, kam es weder nach 8 noch nach 16 Wochen Behandlungszeit zu einer Gewichtszunahme. Ebenso verbesserte TEL den metabolischen Status. Dies bestätigt TEL zusammen mit vorherigen Studien als potenzielles Medikament in der Prävention von Adipositas und den damit einhergehenden metabolischen Begleiterscheinungen^{147, 164}.

Zusammengefasst wurden mit dieser Arbeit angelehnt an die Hypothesen der Einleitung folgende Ergebnisse erzielt:

1. Bei der Untersuchung der neurovaskulären Kopplung ließen die Mäuse nach 16 Wochen HFD ohne Verabreichung von TEL eine verminderte neurovaskuläre Funktionalität erkennen, welche mit einer Reduktion des CBF in den Arealen des Cortex, der Amygdala und des Thalamus einherging.

2. Als mögliche Mechanismen, die an den beschriebenen Adipositas-induzierten Dysfunktionen beteiligt sind, wurden die vermehrte Bildung von *String Vessel*, der Übergang von Endothelzellen in ein senescentes Stadium und ein erhöhtes Level an oxidativem Stress identifiziert. In diesem Zusammenhang konnte eine Abhängigkeit der Prozesse von den jeweiligen Gehirnarealen beobachtet werden.
3. Die Untersuchungen hinsichtlich des Verhaltens zeigten, dass die Mäuse mit Diät-induzierter Adipositas ein gesteigertes Angstverhalten im Vergleich zu den schlanken Kontrollmäuse aufwiesen, die HFD jedoch keinen erkennbaren Effekt auf die Gedächtnisbildung und den Lernprozess hatte.
4. Die oben beschriebenen defizitären Effekte durch eine Adipositas können durch TEL verbessert bzw. verhindert werden. Dabei führte die Behandlung mit TEL zu einer Rekonstitution der neurovaskulären Kopplung und gleichzeitig verhinderte TEL die Adipositas-induzierte Blutflussreduktion im Gehirn. Zudem hatte die TEL-Behandlung einen protektiven Effekt auf das Adipositas-induzierte Angstverhalten.

Daraus lässt sich zum einen ableiten, dass eine Diät-induzierte Adipositas zu neurovaskulären Beeinträchtigungen führt, welche mit Defiziten im Angstverhalten einhergehen; und zum anderen zeigt dies, dass diese Veränderungen durch eine Behandlung mit TEL verhindert werden können. Die Zusammenhänge dieser Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt näher erläutert und diskutiert.

6.1. Adipositas-induzierte Effekte auf die neurovaskuläre Einheit

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde demonstriert, dass eine HFD die neurovaskuläre Kopplung beeinträchtigt. So war nach 16 Wochen HFD der Perfusionsanstieg als Reaktion auf die Vibrissenstimulation deutlich reduziert. Nach 8 Wochen konnte dieser Effekt allerdings nicht beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass eine 8-wöchige Fütterung mit HFD nicht ausreichend ist, um solche defizitären Effekte hervorzurufen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein HFD-induzierter Effekt auf die neurovaskuläre Kopplung stark zeitabhängig ist. Allerdings haben publizierte Studien aufgezeigt, dass auch bereits Fütterungsperioden kürzer als 16 Wochen einen Effekt auf die neurovaskuläre Kopplung haben können. Diesbezüglich wiesen Studien, die nicht mit Mäusen sondern mit Wistar Ratten durchgeführt wurden, bereits nach 8 Wochen HFD

eine signifikant reduzierte Perfusion während der Stimulation der Tasthaare auf⁷⁴, was auf einen Speziesunterschied zwischen Ratte und Maus hindeuten könnte. Boitard *et al.* beobachteten allerdings auch bei Mäusen bereits nach 11 Wochen HFD zerebrale Veränderungen. Dabei postulierten sie eine Abhängigkeit des HFD-Effekts vom Alter der Mäuse zu Beginn der HFD-Fütterung¹⁷⁷. Die Arbeitsgruppe begründete dies damit, dass bei den Mäusen, die bereits im Alter von 3 Wochen eine HFD erhielten, zerebrale Einschränkungen zu beobachten waren, wohingegen bei den Mäusen, die zu Beginn der HFD-Fütterung 12 Wochen alt waren, dieser Effekt ausblieb¹⁷⁷. Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit 5 Wochen alte Mäuse beim Züchter bestellt, was dem frühestmöglichen Zeitpunkt entsprach. Dennoch konnte ein HFD-Effekt auf die neurovaskuläre Kopplung erst nach 16 Wochen Fütterung beobachtet werden, womit die Schlussfolgerung naheliegt, dass neben dem Alter der Mäuse zu Beginn der HFD ebenfalls die Behandlungsdauer eine entscheidende Rolle auf die Adipositas-induzierten neurovaskulären Einschränkungen spielt. Es kann dabei allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Mäuse durch das verwendete Fütterungsregime ab der 9. bis zur 16. Woche neurovaskuläre Einschränkungen entwickelten. Dies wurde nicht untersucht.

Ein weiterer durch die HFD-induzierter neurovaskulärer Effekt ist die Reduktion des basalen CBF. In Bezug darauf entsprechen die in dieser Arbeit mittels ASL-MRT gemessenen Blutflusswerte der NFD_{KON}-Mäuse weitestgehend den in der Literatur angegebenen Werten für Cortex, Amygdala und Thalamus bei Mäusen¹⁷⁸. Lediglich die Werte für den Hippocampus liegen mit ca. 217 ml/min/100 g unterhalb von Literaturvergleichswerten (277 ml/min/100 g)¹⁷⁸. Infolge der Fütterung mit HFD war der CBF im Cortex, in der Amygdala und im Thalamus reduziert. Somit ergänzen die hier erzielten Ergebnisse die in der Literatur beschriebene Reduktion des CBF durch Adipositas und Diabetes in sowohl humanen als auch tierexperimentellen Studien^{62, 66, 75-77, 179}. Im Bereich des Hippocampus blieb ein HFD-induzierter Effekt auf den CBF allerdings aus. Der Hippocampus ist ein elementares Areal im Gehirn, welches an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt und außerdem von großer Bedeutung für die räumliche Orientierung ist¹⁸⁰. Daher könnte der normale CBF im Hippocampus bei den HFD_{KON}-Mäusen dafürsprechen, dass dessen Funktionalität durch die HFD nicht eingeschränkt ist. Dies wird durch das Ausbleiben von Defiziten bei den Gedächtnistests der HFD_{KON}-Mäuse unterstützt.

Es lässt sich also zusammenfassen, dass die Reduktion des kortikalen CBF sowie die eingeschränkte neurovaskuläre Reaktivität durch die HFD die erste Hypothese dieser Arbeit

(„Eine Diät-induzierte Adipositas führt zu neurovaskulären Beeinträchtigungen“) bestätigt. Darüber hinaus konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass solche Defizite abhängig von der Dauer der HFD und der jeweiligen Gehirnregion sind und nicht für das gesamte Gehirn pauschalisiert werden können.

6.1.1. Potenzielle Mechanismen Adipositas-induzierter neurovaskulärer Einschränkungen

Die ursächlichen Mechanismen, die zu HFD-induzierten Einschränkungen im Bereich der zerebralen Gefäßstrukturen beitragen, sind bis dato nicht vollständig erforscht. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, welche Mechanismen und Prozesse an der Entwicklung neurovaskulärer Beeinträchtigungen im Diät-induzierten Adipositasmodell beteiligt sein könnten.

Li *et al.* konnten diesbezüglich zeigen, dass eine HFD-induzierte Reduktion der neurovaskulären Kopplung unabhängig von Veränderungen des Blutdruckes, der Glukose- oder Insulinlevel ist⁷⁴. Dies steht allerdings im Gegensatz zu mehreren Studien, die auf einen Zusammenhang zwischen beeinträchtigter neurovaskulärer Kopplung und Hyperglykämie bzw. Diabetes hinweisen⁷⁵⁻⁷⁷. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell kommt einem Diabetes Typ 2-Modell sehr nahe, da die Mäuse unter starker Hyperglykämie litten. Auch wenn kein Insulintoleranztest durchgeführt wurde, kann aufgrund der hohen Insulinwerte bei den HFD_{KON}-Mäusen davon ausgegangen werden, dass die adipösen Mäuse außerdem an einer Insulinintoleranz litten. Diese Annahme wird durch die ebenfalls hohen Resistinwerte bei den HFD_{KON}-Mäusen unterstützt. Resistin wird von Adipozyten exprimiert und ist im Zusammenhang mit der Induktion einer Insulinresistenz, der Hauptursache für Diabetes, beschrieben¹⁸¹. Daher sprechen die hohen Resistinlevel bei den HFD_{KON}-Mäusen dafür, dass sie an einer Insulinresistenz und schließlich Diabetes litten. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich mittels Insulintoleranztest Hinweise auf eine Insulinintoleranz bei Mäusen nach einer HFD-Fütterung ermitteln^{164, 167}. Somit ist ein Vergleich zur neurovaskulären Kopplung zwischen dem hier verwendeten Modell nach HFD-Fütterung und den oben genannten Diabetesmodellen zulässig. Daher erscheint es plausibel, dass sowohl Hyperglykämie und Hyperinsulinämie als auch ein erhöhtes Lipidlevel im Gehirn die Ursache für die beschriebenen neurovaskulären Einschränkungen sind. Erhöhte Lipidlevel im Gehirn nach einer HFD sind bereits

in vorherigen Studien gezeigt worden und stehen teilweise im Zusammenhang mit zentraler Inflammation^{100, 164}, was zu neurovaskulären Beeinträchtigungen beitragen könnte.

Eine wichtige Rolle in Bezug auf die neurovaskuläre Regulation und den CBF spielt der Blutdruck bzw. ein fehlregulierter Blutdruck im Sinne einer Hypertonie. So ist etabliert, dass Veränderungen der zerebralen Gefäße zur Entwicklung einer Hypertonie beitragen und diese wiederum zu einer Reduktion des CBF führen¹⁸². Hypertonie ist eine häufige Folgeerkrankung von Adipositas¹⁷ und somit als Ursache für neurovaskuläre Beeinträchtigungen denkbar. Mittels Blutdruckkontrolle gegen Ende der Behandlung ließ sich jedoch keine Erhöhung bei den HFD_{KON}-Mäusen nachweisen. Daraus lässt sich ableiten, dass in unserer Studie eine Hypertonie als Kausalität eines dysfunktionalen CBF keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. In Übereinstimmung mit dieser Schlussfolgerung beobachteten Katakam *et al.* ebenso keinen Zusammenhang zwischen einer Hypertonie oder erhöhtem myogenen Tonus und den Veränderungen zerebraler Gefäße bei Adipositas¹⁸³.

Des Weiteren sind die Gefäße des *Circle of Willis* für die Versorgung des Gehirns mit Blut entscheidend, da sie als Basis für die Verästelungen in alle wichtigen Gefäße gelten¹⁸⁴. Da strukturelle Veränderungen in diesem Bereich ebenfalls zu einer Reduktion des CBF in bestimmten Bereichen führen könnten, wurden die Durchmesser der wichtigsten Gefäße des *Circle of Willis* analysiert. Diesbezüglich konnte in mehreren Studien eine Korrelation zwischen verminderter neurovaskulärer Reaktivität und strukturellen Veränderungen der Arterien bei einer Diät-induzierten Adipositas beobachtet werden⁴⁰. So haben Deutsch *et al.* in einem Diät-induzierten Adipositasmodell mit 3 Wochen alten Sprague Dawley Ratten nachgewiesen, dass es zu einer Umstrukturierung der MCA durch die HFD kommt. Dies manifestierte sich zum einen durch einen verminderten Lumen- und Außenwanddurchmesser der MCA und zum anderen durch eine Verdickung der Gefäßwand bei den HFD-gefütterten Tieren⁶⁹. Diese Ergebnisse bestätigend wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass bei den HFD_{KON}-Mäusen der Durchmesser der MCA deutlich vermindert war. Da die MCA einen Großteil der lateralen Oberfläche des zerebralen Cortex mit Blut versorgt³⁸, könnte eine Adipositas-induzierte Verringerung ihres Durchmessers für die Reduktion des Blutflusses im Cortex verantwortlich sein. Neben der MCA könnten aber auch strukturelle Veränderungen der ICA zum veränderten CBF beitragen. Zwar war infolge der HFD deren Durchmesser nicht signifikant reduziert, es zeichnete sich aber ein deutlicher Trend ab. Die ICA verästelt sich in ihrem weiteren Verlauf unter anderem

in Arterien, die einen Teil der Amygdala mit Blut versorgen³⁸. Da der Durchmesser der ICA nicht klar von der HFD beeinflusst wurde, könnte dies eine Erklärung dafür sein, dass der CBF im Bereich der Amygdala ebenfalls nur tendenziell reduziert war. Im Gegensatz zur Versorgung der Amygdala, ist für die Versorgung des Hippocampus vornehmlich die PCA verantwortlich³⁹. Da die PCA mittels TOF-Angiographie allerdings nicht bei allen Mäusen in ausreichender Qualität dargestellt werden konnte, konnte eine Veränderung nicht überprüft werden. Daher kann hier nur spekuliert werden, dass die HFD auf den Durchmesser der PCA womöglich keinen Effekt hatte, da im Bereich des Hippocampus keine Reduktion des CBF gemessen worden ist.

Der Durchmesser von Gefäßen steht in Abhängigkeit von Vasokonstriktion und -dilatation. Eine blutflussabhängige Vasodilatation initiiert am Endothelium eine Freisetzung von relaxierenden Faktoren, die zu einer Erhöhung des Gefäßdurchmessers führen. Infolgedessen steigt das Perfusionsvolumen¹⁸⁵. Die eNOS beeinflusst bekannterweise die Gefäßreagibilität über die Freisetzung von NO^{35, 186, 187} und somit stellt sich die Frage, ob die Expression und Funktion von eNOS durch die HFD verändert sein könnte, zumal ein Zusammenhang zwischen Diabetes und einer Dysregulation der NO-Freisetzung beobachtet wurde^{39, 188, 189}. In dieser Arbeit konnte allerdings keine veränderte Expression von eNOS bei den adipösen Mäusen festgestellt werden. In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen, jedoch konträr zu den zuvor genannten Untersuchungen, konnten Wang *et al.* ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen eNOS und einer neurovaskulären Kopplung nachweisen¹⁹⁰. Limitierend für die Darstellung der eNOS ist in den Untersuchungen dieser Arbeit, dass eNOS aus Lysaten des gesamten Gehirns bestimmt wurde, sich aber Dilatation und neurovaskuläre Kopplung entlang der zerebrovaskulären Verästelungen unterscheiden^{35, 191-193}. Unterschiede der eNOS-Expression und -Aktivierung in verschiedenen Gehirnarealen sind in der Literatur bislang nicht beschrieben aber denkbar, da die neuronale Isoform der NOS (nNOS) als Perfusionsregulator und synaptischer Modulator während einer somatosensorischen Stimulation im Bereich des Cerebellums eine Rolle spielt. Dies gilt jedoch nicht für den Bereich des Neocortex¹⁹¹. Unterstützt werden die Hinweise durch Regionen spezifische Unterschiede der miteinander interagierenden Zellen entlang des zerebrovaskulären Systems³⁵. Beispielsweise werden die SMC in den Arteriolen während der weiteren Verästelung zu Kapillaren durch Perizyten ersetzt (Abschnitt 2.2)⁵⁹. Dieser Aspekt sollte für zukünftige Untersuchungen bedacht werden.

Der Gefäßdurchmesser wird neben gefäßdilatierenden auch durch gefäßkonstringierende Mediatoren (z.B. Endothelin-1) reguliert. Im Kontext von Adipositas weisen Studien auf eine funktionelle Korrelation zwischen Adipositas und Vasokonstriktion hin¹⁹⁴. Da eine Balance zwischen Dilatatoren und Konstriktoren für eine funktionale Regulierung des Gefäßdurchmessers und damit der Gehirnperfusion unerlässlich ist, müsste in weitergehenden Versuchen der Frage nachgegangen werden, ob Vasokonstriktoren (z.B. Endothelin-1) in dem für diese Arbeit verwendeten Adipositasmodell verändert sind.

Bei metabolischen Erkrankungen sind aber auch weitere Parameter, wie endotheliale Dysfunktion, oxidativer Stress, Inflammation und Zelltod nachgewiesen worden, die zu einer Vasoregression wesentlich beitragen können^{176, 195-197}. Dies wird durch Studien verdeutlicht, bei denen es infolge einer Adipositas zu einer progressiven mikrovaskulären Rarefizierung im Sinne einer Reduktion der Dichte an Mikrogefäßen in verschiedenen Organen kam^{194, 198}. Im Gegensatz zu diesen Befunden, konnten wir im Rahmen dieser Arbeit weder im Cortex noch in der Amygdala eine Adipositas-induzierte Reduktion der Gesamtgefäße beobachten. Allerdings konnten wir eine Gehirnareal-abhängige Regulation von *String Vessel* nachweisen. Diese waren in der Amygdala, nicht aber im Cortex durch die HFD-Fütterung erhöht. *String Vessel* lassen keinerlei Blutfluss mehr zu, sodass ihr Auftreten zu einer Minderdurchblutung des jeweiligen Gewebes beiträgt und die Ursache für die Reduktion des CBF in der Amygdala sein könnte. *String Vessel* sind bislang hauptsächlich im Kontext von Diabetes untersucht worden, wobei der Fokus einer Kapillardegeneration weniger im Gehirn, sondern vielmehr im Bereich der Retina lag¹⁷³. Ein direkter Zusammenhang von Adipositas und der Bildung von *String Vessel* ist vor allem im Gehirn bislang nicht gezeigt worden. Diese Zusammenhänge erscheinen für die Interpretation unserer Befunde von großer Relevanz, da Ischämie-bedingte Degenerierung von funktionalen Gefäßen zu weiteren zellulären Dysfunktionen führen kann¹⁹⁴, wobei eine endotheliale Dysfunktion im Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung der zerebralen Gefäßreaktivität steht¹⁹⁹.

Ein weiterer Prozess, der bei der Entstehung einer zellulären Dysfunktion eine Rolle spielt, ist der Übergang von Zellen in ein senescentes Stadium, einem irreversiblen Zellzyklusarrest^{174, 200}, welcher längerfristig die Regeneration und Aufrechterhaltung von Gewebefunktionen verhindert und dadurch zum Altern des jeweiligen Gewebes beiträgt¹⁰⁰. Zelluläre Seneszenz zeichnet sich durch die Bildung von SADS aus und steht im Zusammenhang mit einer Diät-induzierten Adipositas^{100, 175, 201}. Dies konnte im Bereich des Cortex in dieser Arbeit durch die HFD-Fütterung

bestätigt werden. Die adipösen Mäuse wiesen mehr Endothelzellen mit einer erhöhten Anzahl an SADS-Events auf als die schlanken. Im Cortex scheint also die HFD-induzierte endotheliale Seneszenz eine Rolle bei der Beeinträchtigung des kortikalen Blutflusses zu spielen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen haben Ogradnik *et al.* ein vermehrtes Vorkommen von seneszenten Zellen in der Amygdala nachweisen können. Die Ergebnisse bezogen sich jedoch auf Gliazellen (Astrozyten und Mikroglia), wobei Endothelzellen nicht untersucht wurden¹⁰⁰. Daher sind die Daten von Ogradnik *et al.* nicht direkt mit denen dieser Arbeit vergleichbar, zumal Ogradnik *et al.* einen anderen Marker für die Analyse der Seneszenz verwendet haben. Aus diesem Grund wäre eine Erweiterung der in dieser Arbeit durchgeführten Seneszenzanalyse auf weitere Zelltypen und Gehirnareale interessant und sinnvoll.

Die Seneszenz ist ein Prozess, der durch verschiedene Faktoren induziert werden kann. Dazu gehören unter anderem Inflammation²⁰² und oxidativer Stress^{174, 203}. Oxidativer Stress ein bei Adipositas verstärkt auftretender Prozess, der für eine Beeinträchtigung der Dilatation von zerebralen Arterien verantwortlich ist^{72, 204}. Da es durch Adipositas zu einer Anreicherung von Lipiden und einer Veränderung des Redoxstatus kommt, ist ein Anstieg von oxidativem Stress die Folge¹⁷⁶. Dies bestätigen auch die Ergebnisse dieser Arbeit. Entlang des lateralen Ventrikels der HFD_{KON}-Mäuse war ein deutlicher Anstieg des Lipidlevels zu erkennen, was die Daten von vorherigen Studien ergänzt, welche einen HFD-induzierten Anstieg von *Lipid Droplets* im Hypothalamus nachwiesen^{164, 205}. Daher ist davon auszugehen, dass im Gehirn ein Anstieg des oxidativen Stresslevels vorliegt. Genauer gezeigt wurde dies unter anderem im Cortex, denn dort war das oxidative Stresslevel, genauer gesagt das Level des Markers 4-HNE, in den Endothelzellen bei den mit HFD-gefütterten Mäusen im Vergleich zu den schlanken Mäusen erhöht. 4-HNE ist das Hauptendprodukt der Lipidperoxidation und induziert neben der Seneszenz außerdem Apoptose über die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und Caspase 3 Aktivierung²⁰⁴. Diese Charakteristika würden dafürsprechen, dass 4-HNE folglich zu einer Degeneration von Zellen führt und somit zur Reduktion des CBF beitragen könnte. Diese Hypothese bestätigend, ist in adipösen Zucker Ratten eine Interaktion zwischen erhöhtem oxidativem Stress und der Konstriktorreaktivität als Ursache für eine beeinträchtigte Dilatation der zerebralen Arterien bewiesen worden⁷².

Abschließend lässt sich sagen, dass noch nicht alle möglichen Parameter bezüglich eines Einflusses einer Adipositas auf die Arterienstruktur umfassend verifiziert worden sind, auch weil

diese sehr vielfältig sind. Teilweise kommt es zur Rarefizierung oder Degeneration von Gefäßen im Gehirn, was in der Folge die zerebrale Perfusion reduziert oder den zerebrovaskulären Widerstand erhöht, jedoch sind die zugrundeliegenden Prozesse für die Reduktion des Blutflusses durch eine HFD nicht in allen Gehirnarealen identisch. Dies zeigt auch die vorliegende Arbeit sowohl hinsichtlich der Bildung von *String Vessel* als auch der Entstehung von Seneszenz und oxidativem Stress als Modulatoren der CBF-Reduktion. Zudem sollte in zukünftigen Untersuchungen zwischen den Gefäßtypen des Gehirns unterschieden werden, da die neurovaskuläre Kopplung vom jeweiligen Segment des neurovaskulären Netzwerks abhängig ist³⁵. So entwickeln zerebrale Arteriolen eine endotheliale Dysfunktion schneller als die zerebralen Makrogefäße, wobei die Gründe dafür nicht völlig geklärt sind^{206, 207}. Außer Endothelzellen können auch weitere Zelltypen von Veränderungen betroffen sein. Im Allgemeinen ist davon auszugehen, dass sich Diät-induzierte Schädigungen der neurovaskulären Kopplung und des CBF aus einem multifaktoriellen Milieu heraus entwickeln. Die zweite Hypothese dieser Arbeit kann also insofern beantwortet werden, als dass es durch die Adipositas zu endothelialen Veränderungen kommt, die zu den neurovaskulären Defiziten beitragen können.

6.2. Adipositas-induzierte kognitive Einschränkungen

Durch die oben beschriebenen Veränderungen, die durch Adipositas induziert werden, sind weitreichende Folgen für die Funktionalität verschiedener Gehirnareale eine logische Konsequenz. Beim metabolischen Syndrom, einer häufigen Folge von Adipositas, führt ein reduzierter CBF zu einer verminderten Gedächtnisfunktion¹⁷⁹. So wurde in 12 Wochen alten C57BL/6J Mäusen bereits nach wenigen Tagen HFD ein Defizit im räumlichen und kontextuellen Gedächtnis beobachtet; im objektbezogenen Gedächtnis war ein solches Defizit jedoch nicht erkennbar²⁰⁸. Ein weiteres Beispiel für die Gedächtniseinschränkungen bei Adipositas ist, dass Ratten mit einem Adipositasbeginn im Erwachsenenalter kognitive Beeinträchtigungen in Tests zeigten, die eine cortikale Dysfunktion nahelegen⁹⁷. Was die Gruppe um McNeilly dabei nicht beobachtete, war eine Assoziation zwischen Adipositas und einer geminderten Hippocampusfunktion⁹⁷. Interessanterweise zeigte eine weitere Studie an Mäusen, dass Adipositas Defizite in der Hippocampusfunktion induziert, wenn sich die Adipositas bereits im jugendlichen Alter entwickelte¹⁷⁷. Die Tatsache, dass in der Weltbevölkerung die Prävalenz der

kindlichen und jugendlichen Adipositas steigt²⁰⁹, macht dies zu einem wichtigen Aspekt, um die Unterschiede bei der Entwicklung von Adipositas-assoziiierter Demenz im Alter zu verstehen⁴⁰. Auch Boitard *et al.* sahen einen Zusammenhang zwischen kognitiven Defiziten und einem frühen Beginn einer Adipositas. Bei ihrer Studie wurden Mäuse bereits ab einem Alter von 3 Wochen für 11 Wochen mit HFD gefüttert. Der frühere Beginn der HFD im Vergleich zur vorliegenden Arbeit könnte dazu beigetragen haben, dass die HFD_{KON}-Mäuse weder im *Object Place Recognition* noch im *Barnes Maze* Test eine schlechtere Performance als die NFD_{KON}-Mäuse ablieferten. Weiterhin stehen die in der Literatur beschriebenen kognitiven Beeinträchtigungen häufig im Zusammenhang mit hohen Insulin-, Glukose- oder Cholesterolumkonzentrationen infolge der HFD^{210, 211}. Derart hohe Level konnten zwar auch in dieser Arbeit bei HFD-gefütterten Mäusen gezeigt werden, trotz dessen ermittelten wir keinen Unterschied im Lernverhalten der dicken und dünnen Mäuse, auch nicht nach einer Fütterungsperiode von 24 Wochen. Selbst unter dieser Langzeit-HFD-Fütterung fanden wir lediglich einen leichten Trend zu einer schlechteren Performance der HFD_{KON}-Mäuse im *Barnes Maze* Test. Dies lässt die Vermutung zu, dass bei einem Beginn der HFD im Alter von 5 Wochen eine noch längere Fütterungsperiode als 16 und 24 Wochen notwendig ist, um das Gedächtnis und somit das Lernverhalten zu beeinflussen. Boitard *et al.* haben zudem festgestellt, dass die metabolischen Parameter, wie Insulin-, Leptin- und Glukoselevel, zwischen jungen und adulten Mäusen unter HFD vergleichbar waren. Sie haben daraus gefolgert, dass die kognitiven Einschränkungen explizit auf den frühen Beginn der HFD und nicht auf gesteigerte Insulin- oder Glukosewerte zurückzuführen sind¹⁷⁷. Auch wenn die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu denen von Boitard *et al.* stehen, korreliert das Ausbleiben kognitiver Defizite mit der fehlenden Reduktion des CBF im Hippocampus infolge der HFD. Die Vermutung wäre, dass unter HFD-Fütterung bei gleichbleibendem CBF die Funktionalität des Hippocampus erhalten bleibt. Allerdings spielt der präfrontale Cortex bei der Gedächtnisleistung ebenfalls eine wichtige Rolle²¹² und sollte mit in Betracht gezogen werden. Daher wäre es denkbar, dass sich der verminderte CBF im Cortex bei längerer HFD-Fütterung auch auf das Lernverhalten auswirkt. Auch die mikrovaskuläre Dichte im Hippocampus und Cortex beeinflusst die Hippocampus-abhängige kognitive Funktion²¹². Allerdings war in dieser Arbeit die Gesamtgefäßlänge im Cortex sowohl bei den adipösen als auch schlanken Mäusen ohne TEL Behandlung identisch, was dafürspricht, dass die Hippocampusfunktion auch in den dicken HFD_{KON}-Mäusen aufrecht erhalten bleibt.

Während in unseren Untersuchungen keine Bestätigung einer verminderten kognitiven Leistung infolge der HFD gefunden wurde, haben wir deutliche Hinweise auf die Entstehung eines gesteigerten Angstverhaltens aufgezeigt, welche Literaturbefunde bestätigen¹⁰⁰. In Übereinstimmung zu den tierexperimentellen Studien haben auch humane Studien eine erhöhte Häufigkeit von psychischen Störungen, insbesondere von Angst und Depressionen bei Adipositas zeigen können^{99, 213}. In diesem Zusammenhang gilt die Amygdala als Hauptentstehungsort für Angst²¹⁴, und die tendenziell reduzierte Perfusion dieses Hirnareals könnte ursächlich für deren Dysfunktion sein. Diesbezüglich ist bereits ein Zusammenhang zwischen Einschränkungen der neurovaskulären Einheit mit einem erhöhten Angstverhalten bewiesen worden¹⁶⁸. Des Weiteren besteht auch eine positive Korrelation zwischen einem HFD-induzierten Anstieg von Angst und dem Vorkommen von zellulärer Seneszenz, wohingegen die Regression von seneszenten Zellen das Angstverhalten bei Mäusen mindert¹⁰⁰. In der vorgelegten Arbeit ist das Stadium der Seneszenz in der Amygdala selbst nicht untersucht worden, allerdings im Cortex, welcher ebenfalls an der Entstehung von Angst beteiligt ist. Darin zeigte sich ein Anstieg der Seneszenz in den Endothelzellen, was die Schlussfolgerung erlaubt, dass das erhöhte Angstverhalten der HFD-gefütterten Mäuse auf eine Erhöhung der Seneszenz in Endothelzellen, und womöglich auch in weiteren Zellen, zurückzuführen ist. Es wird spekuliert, dass neben der Seneszenz auch weitere Prozesse wie Inflammation^{215, 216}, veränderte Hormonsignalwege²¹⁷ und Stammzell dysfunktion²¹⁸ an einer Adipositas-induzierten Erhöhung von Angst beteiligt sind. Daher sollte die Analyse um diese Faktoren erweitert werden. Weitere Untersuchungen bestätigten dieses HFD-assoziierte Angstverhalten und setzten außerdem ein verstärkt depressives Verhalten und einen erhöhten zellulären oxidativen Stress bei adipösen Mäusen in Zusammenhang mit einer HFD^{101, 102}. Ein depressives Verhalten der Mäuse ist in dieser Arbeit nicht im Einzelnen untersucht worden, allerdings gibt der Vergleich der gelaufenen Gesamtstrecke einen Hinweis darauf, dass die HFD_{KON}-Mäuse kein depressives Verhalten entwickelt haben. Dies hätte sich in einer reduzierten Lauf- und Erkundungsbereitschaft widerspiegeln müssen. Dieser erste Hinweis, dass kein depressives Verhalten vorliegt, sollte weiter überprüft werden, gerade weil sich das höhere Körpergewicht der adipösen Mäuse auf deren Bewegung auswirken könnte.

6.3. Protektive Effekte von TEL bei einer Diät-induzierten Adipositas

Adipositas geht mit vielen Begleiterscheinungen und -erkrankungen einher, allen voran Hyperglykämie, Insulin- und Leptinresistenz, Diabetes und kardiovaskuläre Begleiterscheinungen wie Hypertonie^{2, 7}. Wie auch diese Arbeit gezeigt hat, können diese metabolischen Veränderungen durch eine Behandlung mit TEL verhindert werden. Dies wurde bereits in zahlreichen Studien unterschiedlicher Behandlungsdauer sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen gezeigt^{147, 149, 164}. Die vorliegende Arbeit bestätigt somit nachhaltig die Adipositasprävention und die Verbesserung des metabolischen Status durch TEL. Im Folgenden sollen weniger die Mechanismen diskutiert werden, die einen anti-adipösen Effekt erklären können, sondern vielmehr soll der Fokus der Diskussion auf potenziell zerebrale Einflüsse gerichtet sein. Diesbezüglich haben Studien gezeigt, dass AT₁-Rezeptor-Antagonisten trotz ihrer Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und insbesondere TEL, peripher verabreicht, zeit- und dosisabhängig die zentral vermittelten Effekte von Ang II inhibieren kann^{219, 220}.

6.3.1. Bedeutung von TEL als Protektor des zerebralen Gefäßsystems bei Adipositas

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, induziert Adipositas neben den klassischen metabolischen Symptomen auch neurovaskuläre Einschränkungen, die unter anderem mit einem reduzierten CBF einhergehen. Ermutigt durch die Tatsache, dass TEL eine Diät-induzierte Adipositas sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen verhindert und sie vor weiteren metabolischen Veränderungen schützt, wurde in dieser Arbeit zudem der Effekt von TEL auf die neurovaskuläre Einheit im *Setting* von Adipositas untersucht. Vorherige Studien haben bereits eine Beteiligung der zerebralen RAS-Komponenten und der AT₁-Rezeptorblockade durch TEL an den protektiven Effekten bewiesen^{116, 147, 148, 156, 163, 164}. Die zu Beginn formulierte Hypothese, dass TEL die neurovaskulären Beeinträchtigungen und die Reduktion des CBF bei HFD-gefütterten Mäusen verbessert oder gar verhindert, wurde mit dieser Arbeit bestätigt. Die HFD_{TEL}-Mäuse zeigten eine gesteigerte neurovaskuläre Kopplung im Vergleich zu den HFD_{KON}-Mäusen. Allerdings war auch bei den NFD-gefütterten Mäusen eine verminderte Antwort nach der Vibrissenstimulation unter TEL zu beobachten. Dies könnte auf den reduzierten Blutdruck bei diesen Tieren zurückzuführen sein. Die TEL-induzierte Reduktion des Blutdruckes in den NFD- oder HFD-gefütterten Kollektiven

könnte also prinzipiell zur Normalisierung der neurovaskulären Kopplung beitragen, da die Blutdrucksenkung und somit die Erweiterung der Gefäße eine bessere basale Perfusion des Gewebes zur Folge haben könnte, sodass die Amplitude der Reaktion auf die Stimulation geringer ist. Im Rahmen der CBF-Messung zeigte sich dies allerdings nicht. Der Aspekt, dass TEL auch bei den NFD-gefütterten Mäusen einen Effekt hat, kann somit nicht eindeutig geklärt werden.

Auf den CBF bei HFD-gefütterten Mäusen hatte die Behandlung mit TEL ebenfalls einen protektiven Effekt. So normalisierte TEL den CBF im Cortex, der Amygdala und im Thalamus bei den HFD_{TEL}-Mäusen. Nach welchen genauen Mechanismen dies geschieht, ist noch unklar. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass der TEL-Effekt über die Wirkung an den zerebralen Gefäßen vermittelt wird, da das RAS Adipositas-bedingt chronisch aktiviert ist, was mit einem dramatischen Anstieg von Ang II und einer chronischen Aktivierung der AT₁-Rezeptoren einhergeht, wodurch eine vasokonstriktive Reaktion eingeleitet wird²²¹. Im Gehirn stimuliert Ang II die AT₁-Rezeptoren, welche vor allem im zerebrovaskulären Endothelium und den circumventrikulären Organen lokalisiert sind²²². Die Aktivität der AT₁-Rezeptoren beeinflusst den CBF und dadurch konsequenterweise die Gehirnfunktion im Allgemeinen^{223, 224}. In der Diskussion stehen weitere Rezeptoren des Gehirnparenchyms, die in spezifischen Neuronen exprimiert werden und durch Ang II aktiviert werden^{222, 225, 226}. Diese Neurone sind an der sensorischen, zerebrovaskulären und verhaltenssteuernden Regulation beteiligt, sodass eine übermäßige Ang II-Zirkulation und Rezeptoraktivierung Veränderungen in diesen Bereichen hervorrufen würde. Eine chronische Aktivierung von AT₁-Rezeptoren durch Ang II, die bei adipösen Mäusen auch in dieser Arbeit angenommen wird, kann außerdem eine Inflammation, vaskuläres *Remodelling* und Thrombose zur Folge haben^{227, 228}. Dabei gilt Aldosteron, dessen Freisetzung von Ang II induziert wird, als treibende Kraft von Inflammationsprozessen auch im Gehirn^{229, 230}. Damit wäre die logische Konsequenz, dass die Blockade des AT₁-Rezeptors durch einen AT₁-Rezeptor-Antagonisten wie TEL die Minderung der Aldosteronfreisetzung diesen Inflammationsprozess verhindert und dadurch die zerebralen Gefäße geschützt werden. Interessanterweise ist für den AT₁-Rezeptor-Antagonisten Azilsartan bereits die Protektion vor zerebrovaskulärem *Remodelling* und die Normalisierung des myogenen Tonus in diabetischen Tieren gezeigt worden²³¹. Ein Adipositas-induziertes *Remodelling* konnte für diese Arbeit zwar nur bei der MCA beobachtet werden, allerdings konnte trotz HFD der Durchmesser von ICA, ACA und minimal auch MCA durch die Behandlung mit TEL normalisiert werden.

Durch die Lokalisation der AT₁-Rezeptoren im zerebrovaskulären Endothelium liegt die Vermutung nahe, dass Veränderungen, die durch eine übermäßige Ang II-Aktivität induziert werden, vor allem die Endothelzellen als Teil der neurovaskulären Einheit betreffen und eine AT₁-Rezeptorblockade ebenfalls dort protektiv wirkt. Daher wurden für diese Arbeit die Effekte des AT₁-Rezeptor-Antagonisten TEL vor allem in Endothelzellen untersucht. Generell ist die Interaktion zwischen Ang II und dessen Rezeptor AT₁ mit einem erhöhten oxidativen Stresslevel im Endothelium verbunden²²⁷. Diesen Rückschluss lassen auch die Ergebnisse dieser Arbeit zu. Die vermutliche Anreicherung und Aktivität von Ang II am AT₁-Rezeptor, die durch die HFD ausgelöst wird, und der daraus resultierende Anstieg des oxidativen Stresses im Bereich des Cortex, wurden durch TEL antagonisiert. Diese Vermutung bestätigt sich darin, dass in HFD_{TEL}-Mäusen im Vergleich zu den adipösen HFD_{KON}-Mäusen die 4-HNE-positiven Endothelzellen vermindert waren. Das bedeutet, dass TEL das Endothelium vor oxidativem Stress bei Adipositas schützt und dessen Funktionalität erhalten bleibt. Diese Wirkung von TEL auf das Level von oxidativem Stress scheint allerdings nicht auf das gesamte Gehirn zuzutreffen. Dies zeigt sich darin, dass in der Amygdala, im Gegensatz zum Cortex, die Behandlung mit TEL keinen Effekt auf die 4-HNE-positiven Zellen hatte.

Es ist etabliert, dass oxidativer Stress eng mit zellulärer Seneszenz korreliert¹⁷⁴. Somit erscheint es konklusiv, dass die Behandlung mit TEL die Endothelzellen im Cortex vor dem Übergang in einen seneszenten Status schützt. Ob dies direkt oder indirekt beispielsweise über die Reduktion des oxidativen Stresses geschieht, lässt sich allerdings im Rahmen dieser Untersuchungen nicht ausreichend klären. Ogrodnik *et al.* zeigten diesbezüglich, dass die Lyse von seneszenten Zellen mit den senolytischen Präparaten Dasatinib und Quercetin zu einer Verbesserung von Verhaltenseinschränkungen wie dem erhöhten Angstverhalten bei HFD führt¹⁰⁰. In Bezug auf das Angstverhalten konnte in unseren Untersuchungen genau dieser Effekt beobachtet werden: Die HFD_{TEL}-Mäuse waren vor einem gesteigerten Angstverhalten geschützt und verhielten sich wie die NFD_{KON}-Mäuse. In Anbetracht dessen lässt sich mutmaßen, dass TEL eine senolytische Wirkung im Cortex hat und somit die Anzahl der seneszenten Zellen reduziert wird, was folglich zu der beobachteten Verbesserung des Angstverhaltens bei den HFD_{TEL}-Mäusen führt. Ob TEL eine senolytische oder protektive Wirkung hinsichtlich eines Übergangs von Zellen in ein seneszentes Stadium hat, ist damit allerdings nicht geklärt und somit wäre es notwendig, auch andere Gehirnregionen (z.B. die Amygdala) zu untersuchen. Dies erscheint von großer Relevanz

zu sein, da senolytische Präparate als neue potenzielle therapeutische Möglichkeit bei neuropsychiatrischen Störungen diskutiert werden^{100, 232, 233}. Ein weiterer Parameter, der die Folge von erhöhter Seneszenz sein könnte und auf den die Behandlung mit TEL einen protektiven Effekt hatte, ist die Entstehung von *String Vessel* und dem damit verbundenen Untergang von funktionalem Endothelium. Auch hier zeichnete sich eine Abhängigkeit von den einzelnen Gehirnregionen ab. Im Cortex, für den zuvor eine Reduktion von Adipositas-induzierter Seneszenz beschrieben wurde, hatte TEL keinen Effekt auf die Menge an *String Vessel*. Im Vergleich dazu konnte TEL in der Amygdala die Entstehung von HFD-induzierten *String Vessel* verhindern. In der Literatur wurde auch ein protektiver Effekt für die AT₁-Rezeptor-Antagonisten Valsartan und Candesartan gezeigt^{234, 235}. Dabei reduzierte Valsartan in einem Diabetesmodell mit Ratten die Anzahl an *String Vessel* und proliferierender Endothelzellen in der Retina und wird daher als Therapeutikum bei diabetischer Retinopathie diskutiert²³⁵. Den gleichen Effekt hatte der ACE-Hemmer Captopril²³⁶. Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt dies die wichtige Rolle der Inhibitoren des RAS beim Schutz vor der Degeneration von Gefäßen auch im Gehirn bei Adipositas und Diabetes. Allerdings kann mit dieser Arbeit nicht differenziert werden, ob es sich bei den beschriebenen protektiven Wirkungen von TEL um einen akuten Effekt durch die Antagonisierung von Ang II am AT₁-Rezeptor handelt, oder ob der TEL-vermittelte Schutz vor einer Adipositas folglich auch die neurovaskulären Beeinträchtigungen verhindert. Dafür wären weitere Untersuchungen notwendig.

6.3.2. Bedeutung von TEL hinsichtlich eines Adipositas-induzierten Risikos einer Demenzerkrankung

Wie auch mit dieser Arbeit gezeigt wird, sind strukturelle und funktionale Veränderungen im zerebralen Gefäßsystem die Folge von Adipositas und führen zur Erhöhung des Gefäßwiderstandes und gleichzeitig zur Reduktion des CBF. Dies kann zur Entstehung von Demenz und kognitiven Einschränkungen beitragen⁸², da Hypoperfusion Defizite beim Lernen und in der Gedächtnisbildung induziert⁸⁴. Wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, wirkt TEL protektiv auf das Gefäßsystem im Gehirn und kann dadurch eine Reduktion des CBF verhindern. Im Verlauf dessen könnte dies dazu führen, dass TEL auch vor kognitiven Defiziten schützt. Auch wenn unter TEL ein reduziertes Angstverhalten einhergehend mit einer Reduktion von *String*

Vessel, oxidativem Stress und Seneszenz zu beobachten war und diese Prozesse auch in Bezug auf Kognition eine Rolle zu spielen scheinen, konnten wir hier keinen Effekt von TEL auf die Kognition in den Verhaltensversuchen nachweisen. Allerdings ist diese Tatsache vermutlich darauf zurückzuführen, dass die HFD schon keinen nachteiligen Effekt auf das Gedächtnis gezeigt hat. Im Gegensatz dazu zeigten einige Studien eine protektive Wirkung von Sartanen auf die Kognition. Diesbezüglich verbesserte der AT₁-Rezeptor-Antagonist Candesartan die beeinträchtigte kognitive Funktion bei Mäusen mit Typ 2 Diabetes²³⁷, und Olmesartan hatte einen therapeutischen Effekt bei Mäusen, die durch HFD und eine salzreiche Diät kognitive Beeinträchtigungen aufwiesen²³⁸.

Wie wir mit unseren Untersuchungen zeigen konnten, führt die AT₁-Rezeptorblockade zu einer Reduktion von oxidativem Stress, welcher zusammen mit Inflammation mit einer erhöhten Inzidenz von Demenz in Zusammenhang steht²³⁹. So haben bereits große Kohortenstudien festgestellt, dass antihypertensive Medikamente, insbesondere AT₁-Rezeptor-Antagonisten, die Inzidenz von Demenz reduzieren können²⁴⁰⁻²⁴². Der AT₁-Rezeptor-Antagonist Valsartan war dabei in der Lage die Oligomerisierung von Amyloid- β Peptiden abzuschwächen und unterbrach zudem die Entwicklung von Amyloid- β vermittelten kognitiven Beeinträchtigungen im Alzheimer-Mausmodell²⁴³. Das Protein ACE zeigte hingegen eine Beteiligung an der Zersetzung von Amyloid- β ²⁴⁴. Aber auch für TEL ist ein protektiver Effekt vor der Minderung der kognitiven Leistung in einem Alzheimer-Mausmodell beschrieben, bei dem die Mäuse intrazerebroventrikulär Amyloid- β injiziert bekamen^{245, 246}. Diese Aspekte unterstützen die Annahme, dass AT₁-Rezeptor-Antagonisten, mit TEL als wichtigem Vertreter, die Entstehung von Diabetes- und Adipositas-induzierter Demenz verhindern können. Hinzu kommt, dass bei einer Alzheimererkrankung vermehrt *String Vessel* auftreten¹⁶⁶, und wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, TEL die Entstehung von genau diesen vermindert. Auch die Reduktion von seneszenten Zellen steht im Zusammenhang mit Tau-abhängigen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer^{232, 247}. Auch hier konnte mit dieser Arbeit ein protektiver Effekt im *Setting* von Adipositas gezeigt werden.

Die in zusammengefassten Studien zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen AT₁-Rezeptorblockern (ARB) und einer Verbesserung der kognitiven Leistung sind zumeist in Alzheimermodellen durchgeführt worden und daher nur bedingt mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar. Auch wenn hier mit einem klassischen Diät-induzierten Adipositasmodell

keine kognitiven Einschränkungen beobachtet wurden, liegt die Vermutung nahe, dass TEL durch die protektive Wirkung hinsichtlich der Gefäßstruktur auch die Folgen einer Adipositas-induzierten Veränderung der zerebralen Gefäße und somit Demenzerkrankungen wie Alzheimer verhindert. Das Alter der Mäuse spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidene Rolle, denn Demenzerkrankungen sind Erkrankungen, die mit einem fortgeschrittenen Alter in Verbindung stehen^{42, 85}. Die Verwendung von sehr jungen Mäusen war aufgrund der in Abschnitt 6.2 beschriebenen Studie von Boitard *et al.* gerechtfertigt¹⁷⁷. Dennoch sollte für weitere Untersuchungen, die auf ein durch Adipositas erhöhtes Alzheimerisiko und die protektive Wirkung von TEL abzielen, ein höheres Alter der Mäuse in Betracht gezogen werden.

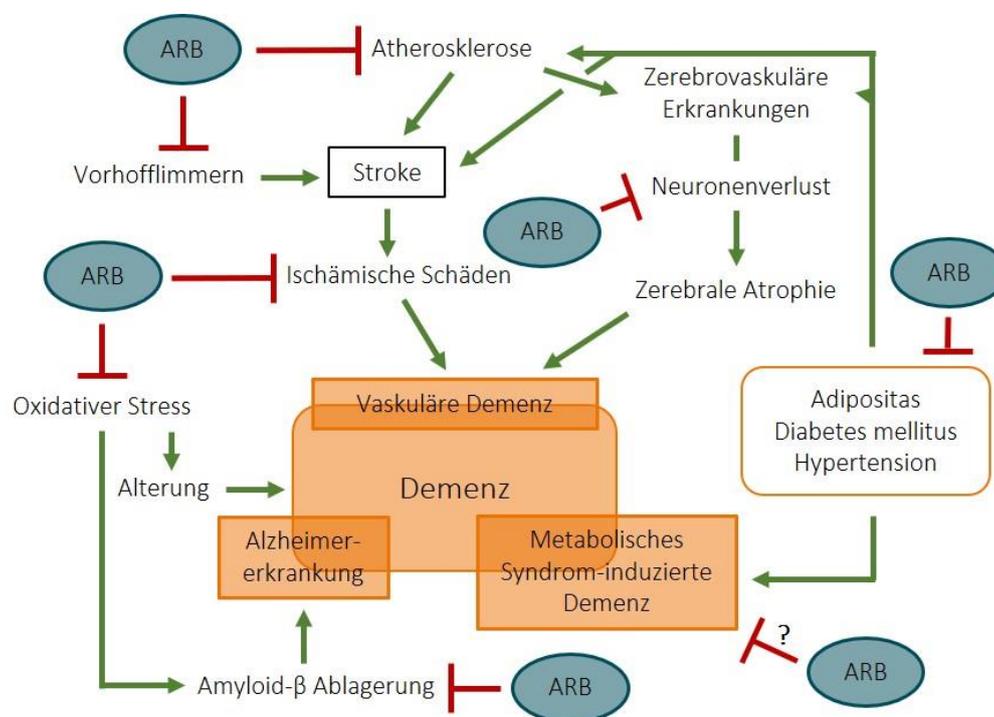


Abbildung 19. Protektive Wirkung von AT₁-Rezeptorblockern (ARB) hinsichtlich einer Demenzerkrankung. Adaptiert von Mogi *et al.*²³⁹; → fördert; —| verhindert

6.4. Limitationen

Mit dieser Arbeit konnte eindeutig ein protektiver Effekt von TEL hinsichtlich Adipositas-induzierter Defizite auf das neurovaskuläre System und auch das Angstverhalten gezeigt werden. Was jedoch bedacht werden muss ist, dass hier nicht zwischen einem akuten und chronischen

TEL-Effekt differenziert werden kann. Um die Frage zu beantworten, ob TEL durch die akute Antagonisierung von Ang II am AT₁-Rezeptor die beschriebenen Einschränkungen verhindert oder ob die Protektion durch TEL vor einer Adipositas dazu führt, dass die Beeinträchtigungen erst gar nicht entstehen, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Des Weiteren stellt die Behandlungsdauer bzw. das Alter der Mäuse hinsichtlich einer Überprüfung protektiver Effekte von TEL auf Kognition und Demenz einen limitierenden Faktor dar. Neurodegenerative Erkrankungen wie Demenz, sind Erkrankungen, die mit einem fortgeschrittenen Alter assoziiert sind. Die hier verwendeten Mäuse waren sehr jung, was, wie in Abschnitt 6.1 diskutiert wurde, auch gerechtfertigt war. Dennoch gehen wir davon aus, dass kognitive Defizite erst bei einer noch längeren Fütterungsperiode sichtbar werden, sodass auch eine protektive Wirkung von TEL vor Demenz-assoziierten Parametern erst zu diesem Zeitpunkt sichtbar würde.

6.5. Ausblick

Die Tatsache, dass Adipositas und auch Diabetes Risikofaktoren nicht nur für vaskuläre Erkrankungen per se, sondern auch für zerebrale Pathologien mit vaskulären Beeinträchtigungen sind, macht eine kontinuierliche Forschung hinsichtlich der Effekte des metabolischen Syndroms auf die Regulation von zerebrovaskulärer Reaktivität und Perfusion erforderlich. Der Einsatz von AT₁-Rezeptor-Antagonisten als präventive und auch kurative Therapeutika bei Adipositas und den damit assoziierten Folgeerscheinungen scheint dabei vielversprechend. Dennoch gibt es noch viele Aspekte in Bezug auf deren genauen Effekte und Wirkmechanismen im Zusammenhang mit Adipositas zu erforschen.

Ein wesentlicher Aspekt, der eine entscheidende Rolle bei Adipositas-assoziierten Veränderungen im Gehirn spielt und in dieser Arbeit nicht betrachtet wurde, sind entzündliche Prozesse. Adipositas geht mit einer chronischen *low grade* Inflammation einher, wodurch andere Aspekte wie oxidativer Stress und Seneszenz beeinflusst werden^{176, 197, 202}. Eine zerebrovaskuläre Inflammation kann die Ursache für einen unterbrochenen CBF und für Veränderungen bei der Autoregulation sein²²⁵. Kommt es dabei zu einer unregulierten Inflammation, wird die Inzidenz und Progression von Veränderungen der zerebralen Zirkulation erhöht und kann unter anderem

eine Ischämie hervorrufen, welche wiederum inflammatorische Prozesse verstärkt und neuronale Schädigungen verursacht^{248, 249}. In einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe ist eine protektive Wirkung von TEL auf einen HFD-induzierten Anstieg der Inflammationsfaktoren TNF α und IL-1 α bereits gezeigt worden¹⁶⁴. Daher wäre eine Untersuchung von weiteren Faktoren der Inflammation im hier verwendeten Adipositasmodell auch unter TEL-Behandlung sehr sinnvoll. Gliazellen im Gehirn, genauer gesagt Mikroglia, sind dabei entscheidend an der zerebralen Inflammationsantwort beteiligt und stellen die Makrophagen des Gehirns dar²⁵⁰. Sie produzieren inflammatorische Mediatoren, wie Zytokine, und setzen diese frei. Neben der Bestimmung dieser Zytokine im Gehirn wäre es daher sinnvoll, die Aktivierung von Mikroglia in den verschiedenen Gehirnregionen zu bestimmen. Die von den Mikroglia freigesetzten Mediatoren haben wiederum einen Effekt auf die mit den Mikroglia in Kontakt stehenden Neuronen (Abbildung 2). Somit stellen die Neurone einen weiteren Zelltyp der neurovaskulären Einheit dar, der zum Gegenstand weiterer Untersuchungen werden sollte. Beispielsweise könnten Neurone auf eine mögliche Degeneration oder auf Defizite bei der Neurogenese bei einer vorliegenden Adipositas hin überprüft werden. So besteht nämlich ein Zusammenhang zwischen einer Adipositas-assoziierten Seneszenz, die auch in dieser Arbeit bei den adipösen Mäusen im Cortex gezeigt wurde, pro-inflammatorischen Gliazellen und einer fehlregulierten Neurogenese. Genauer gesagt wurden bei HFD-gefütterten Mäusen mit erhöhter Seneszenz pro-inflammatorische Gliazellen in direkter Nähe von Gehirnarealen gefunden, welche Marker für neuronale Vorläuferzellen und unreife Neurone exprimieren¹⁰⁰. Zudem wurde bei Ratten eine reduzierte Neurogenese im Hippocampus in Verbindung mit einer HFD beobachtet²⁵¹. Eine mögliche protektive Wirkung von TEL hinsichtlich einer durch HFD-induzierten Einschränkung der Neurogenese würde ebenfalls zum präventiven und therapeutischen Effekt von TEL auf neurodegenerative Erkrankungen bei Adipositas beitragen. Neurone stehen indes über Astrozyten mit den oben beschriebenen Mikroglia in Kontakt (Abbildung 2). In Astrozyten sind wiederum ebenfalls eine signifikante Anzahl an AT₁-Rezeptoren enthalten^{222, 252} und sie sind die Hauptquelle von Angiotensinogen im Gehirn²⁵³. Außerdem ist die Funktion der Astrozyten bei der Regulierung der Nahrungsaufnahme bei einer Diät-induzierten Adipositas gestört²⁵⁴. Diese Charakteristika machen Astrozyten ebenfalls zu einem Zelltyp, auf den TEL potenziell einen protektiven Effekt im *Setting* von Adipositas haben könnte.

Für die Weiterverfolgung der protektiven Effekte von TEL auf neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer bei Adipositas, sollte, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, das Alter der Tiere nicht außer Acht gelassen werden. Hier sollte eine deutlich längere Fütterungs- und Behandlungsperiode in Betracht gezogen werden, um die Auswirkungen einer juvenilen Adipositas auf eine deutlich gealterte Maus zu untersuchen. Es ist davon auszugehen, dass die in der vorliegenden Arbeit induzierten Effekte dadurch noch deutlicher sein können, da das Altern beispielsweise den Adipositas-induzierten oxidativen Stress und die Einschränkungen beim CBF verstärkt²¹². Außerdem deuten die Ergebnisse des *Barnes Maze* Tests dieser Arbeit (Abbildung 18) darauf hin, dass messbare Gedächtniseinschränkungen erst durch eine noch längere Fütterung mit HFD hervorgerufen werden. Erst dann wäre es sinnvoll, die Level von Alzheimer-assoziierten Proteinen wie die Akkumulation von Amyloid- β und des Tau-Proteins zu bestimmen, um weitere protektive Effekte von TEL zu untersuchen.

6.6. Abschließendes Fazit

Abschließend lässt sich konstatieren, dass mit dieser Arbeit die einleitenden Hypothesen eindeutig beantwortet werden konnten. Eine Diät-induzierte Adipositas schränkt die neurovaskuläre Kopplung abhängig von der Fütterungsperiode ein und führt zudem nach 16 Wochen zu einer deutlichen Reduktion des CBF im Cortex, Thalamus und der Amygdala, aber nicht im Hippocampus. Strukturelle und funktionale Prozesse tragen zur Entwicklung dieser neurovaskulären Defizite bei. Insbesondere die auf oxidativen Stress und Seneszenz beruhenden Veränderungen im Endothelium sind ebenfalls abhängig von der jeweiligen Gehirnregion. Die gleichzeitige Behandlung mit TEL verbessert oder verhindert messbar die beschriebenen Defizite bei HFD-gefütterten Mäusen (zusammengefasst in Abbildung 20).

Dadurch stellt TEL ein potenzielles Therapeutikum von Adipositas-assoziierten neurovaskulären Erkrankungen wie Schlaganfällen und Alzheimererkrankungen dar. Folglich könnten RAS-Hemmstoffe, insbesondere AT₁-Rezeptor-Antagonisten, im Sinne einer personalisierten Medizin und der Vermeidung von Polymedikation, von besonderer Bedeutung sein. Sie sind multifunktionale Wirkstoffe, die für mehrere Indikationen eingesetzt werden können. Vornehmlich Patienten, die unter dem multifaktoriellen metabolischen Syndrom leiden, könnten davon profitieren.

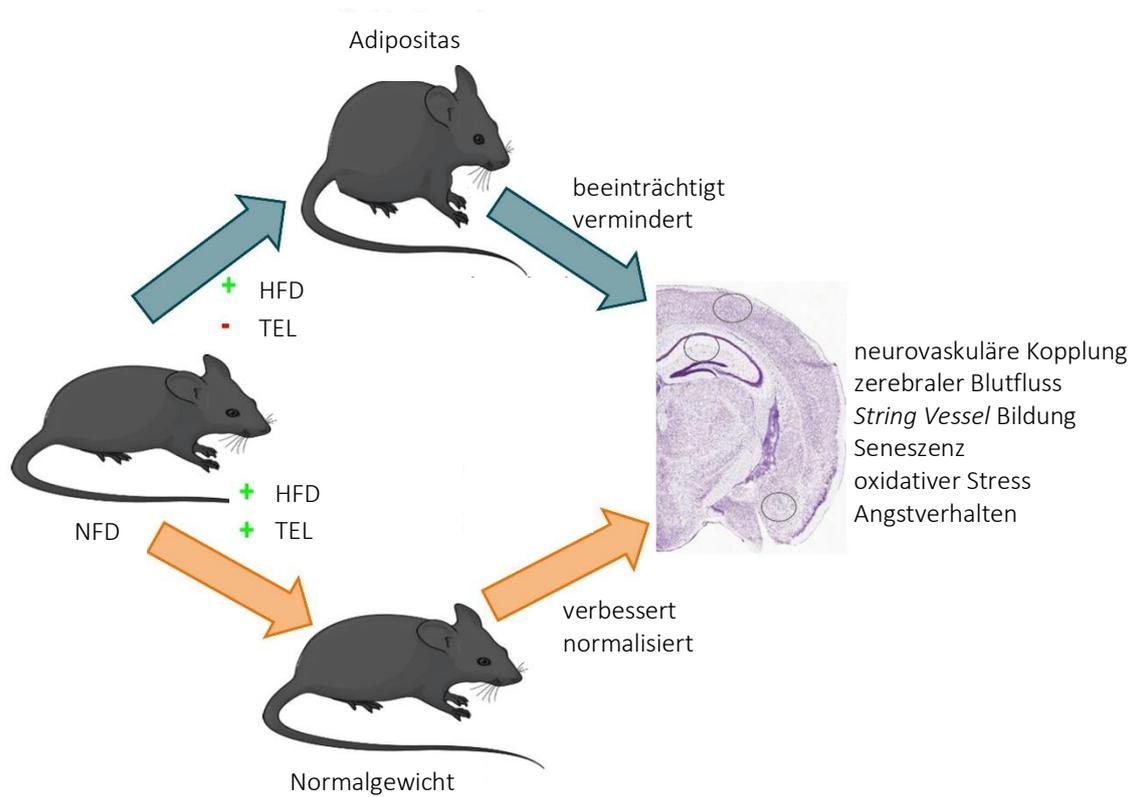


Abbildung 20. Zusammenfassung der Ergebnisse. Gezeigt sind die verschiedenen Behandlungsstrategien mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) und Telmisartan (TEL) und deren Wirkungen auf das neurovaskuläre System und das Verhalten.

Literatur

1. World Health Organization. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Aufruf am 30.09.2020
2. Deutsche Adipositas-Gesellschaft. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“. 2014
3. Hall KD, Sacks G, Chandramohan D, Chow CC, Wang YC, Gortmaker SL, Swinburn BA. Quantification of the effect of energy imbalance on bodyweight. *Lancet*. 2011;378:826-837
4. Jaacks LM, Vandevijvere S, Pan A, McGowan CJ, Wallace C, Imamura F, Mozaffarian D, Swinburn B, Ezzati M. The obesity transition: Stages of the global epidemic. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7:231-240
5. McElroy SL, Kotwal R, Malhotra S, Nelson EB, Keck PE, Nemeroff CB. Are mood disorders and obesity related? A review for the mental health professional. *The Journal of clinical psychiatry*. 2004;65:634-651,
6. de Zwaan M, Mitchell JE. Binge eating in the obese. *Annals of medicine*. 1992;24:303-308
7. Wang HH, Lee DK, Liu M, Portincasa P, Wang DQ. Novel insights into the pathogenesis and management of the metabolic syndrome. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2020;23:189-230
8. Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A, Marczak L, Mokdad AH, Moradi-Lakeh M, Naghavi M, Salama JS, Vos T, Abate KH, Abbafati C, Ahmed MB, Al-Aly Z, Alkerwi Aa, Al-Raddadi R, Amare AT, Amberbir A, Amegah AK, Amini E, Amrock SM, Anjana RM, Ärnlöv J, Asayesh H, Banerjee A, Barac A, Baye E, Bennett DA, Beyene AS, Biadgilign S, Biryukov S, Bjertness E, Boneya DJ, Campos-Nonato I, Carrero JJ, Cecilio P, Cercy K, Ciobanu LG, Cornaby L, Damtew SA, Dandona L, Dandona R, Dharmaratne SD, Duncan BB, Eshrati B, Esteghamati A, Feigin VL, Fernandes JC, Fürst T, Gebrehiwot TT, Gold A, Gona PN, Goto A, Habtewold TD, Hadush KT, Hafezi-Nejad N, Hay SI, Horino M, Islami F, Kamal R, Kasaeian A, Katikireddi SV, Kengne AP, Kesavachandran CN, Khader YS, Khang Y-H, Khubchandani J, Kim D, Kim YJ, Kinfu Y, Kosen S, Ku T, Defo BK, Kumar GA, Larson HJ, Leinsalu M, Liang X, Lim SS, Liu P, Lopez AD, Lozano R, Majeed A, Malekzadeh R, Malta DC, Mazidi M, McAlinden C, McGarvey ST, Mengistu DT, Mensah GA, Mensink GBM, Mezgebe HB, Mirrakhimov EM, Mueller UO, Noubiap JJ, Obermeyer CM, Ogbo FA, Owolabi MO, Patton GC, Pourmalek F,

- Qorbani M, Rafay A, Rai RK, Ranabhat CL, Reinig N, Safiri S, Salomon JA, Sanabria JR, Santos IS, Sartorius B, Sawhney M, Schmidhuber J, Schutte AE, Schmidt MI, Sepanlou SG, Shamsizadeh M, Sheikhbahaei S, Shin M-J, Shiri R, Shiue I, Roba HS, Silva DAS, Silverberg JJ, Singh JA, Stranges S, Swaminathan S, Tabarés-Seisdedos R, Tadese F, Tedla BA, Tegegne BS, Terkawi AS, Thakur JS, Tonelli M, Topor-Madry R, Tyrovolas S, Ukwaja KN, Uthman OA, Vaezghasemi M, Vasankari T, Vlassov VV, Vollset SE, Weiderpass E, Werdecker A, Wesana J, Westerman R, Yano Y, Yonemoto N, Yonga G, Zaidi Z, Zenebe ZM, Zipkin B, Murray CJL. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Engl J Med*. 2017;377:13-27
9. Singh GM, Danaei G, Farzadfar F, Stevens GA, Woodward M, Wormser D, Kaptoge S, Whitlock G, Qiao Q, Lewington S, Di Angelantonio E, Vander Hoorn S, Lawes CM, Ali MK, Mozaffarian D, Ezzati M. The age-specific quantitative effects of metabolic risk factors on cardiovascular diseases and diabetes: A pooled analysis. *PLoS one*. 2013;8:e65174
 10. Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Wood AM, Pennells L, Thompson A, Sarwar N, Kizer JR, Lawlor DA, Nordestgaard BG, Ridker P, Salomaa V, Stevens J, Woodward M, Sattar N, Collins R, Thompson SG, Whitlock G, Danesh J. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: Collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet*. 2011;377:1085-1095
 11. Tuomi T, Santoro N, Caprio S, Cai M, Weng J, Groop L. The many faces of diabetes: A disease with increasing heterogeneity. *The Lancet*. 2014;383:1084-1094
 12. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of comorbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC public health*. 2009;9:88
 13. Chen JH, Pan WH, Hsu CC, Yeh WT, Chuang SY, Chen PY, Chen HC, Chang CT, Huang WL. Impact of obesity and hypertriglyceridemia on gout development with or without hyperuricemia: A prospective study. *Arthritis care & research*. 2013;65:133-140
 14. Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: Inflammatory signals. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003;27 Suppl 3:S25-28
 15. Lauby-Secretan B, Scocciati C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body fatness and cancer — viewpoint of the iarc working group. *New England Journal of Medicine*. 2016;375:794-798
 16. Karcher HS, Holzwarth R, Mueller HP, Ludolph AC, Huber R, Kassubek J, Pinkhardt EH. Body fat distribution as a risk factor for cerebrovascular disease: An mri-based body fat quantification study. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2013;35:341-348

17. Després J-P. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2012;126:1301-1313
18. Ding J, Visser M, Kritchevsky SB, Nevitt M, Newman A, Sutton-Tyrrell K, Harris TB. The association of regional fat depots with hypertension in older persons of white and african american ethnicity. *American journal of hypertension*. 2004;17:971-976
19. Lean ME, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *Bmj*. 1995;311:158-161
20. Chiarelli F, Marcovecchio ML. Insulin resistance and obesity in childhood. *European journal of endocrinology*. 2008;159 Suppl 1:S67-74
21. Garrison RJ, Kannel WB, Stokes J, Castelli WP. Incidence and precursors of hypertension in young adults: The framingham offspring study. *Preventive Medicine*. 1987;16:235-251
22. Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Diagnosis and management of the metabolic syndrome in obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2005;6:283-296
23. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444:840-846
24. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: Time for a critical appraisal: Joint statement from the american diabetes association and the european association for the study of diabetes. *Diabetes care*. 2005;28:2289-2304
25. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404:635-643
26. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, Hu FB, Hubbard VS, Jakicic JM, Kushner RF, Loria CM, Millen BE, Nonas CA, Pi-Sunyer FX, Stevens J, Stevens VJ, Wadden TA, Wolfe BM, Yanovski SZ. 2013 aha/acc/tos guideline for the management of overweight and obesity in adults. *Circulation*. 2014;129:S102-S138
27. Sumithran P, Proietto J. Benefit-risk assessment of orlistat in the treatment of obesity. *Drug Safety*. 2014;37:597-608
28. Ellrichmann M, Kapelle M, Ritter PR, Holst JJ, Herzig K-H, Schmidt WE, Schmitz F, Meier JJ. Orlistat inhibition of intestinal lipase acutely increases appetite and attenuates postprandial glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide-1, cholecystokinin, and peptide yy concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93:3995-3998
29. Sjöström L, Rissanen A, Andersen T, Boldrin M, Golay A, Koppeschaar HP, Krempf M. Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight

- regain in obese patients. European multicentre orlistat study group. *Lancet*. 1998;352:167-172
30. Xiao D, Shi D, Yang D, Barthel B, Koch TH, Yan B. Carboxylesterase-2 is a highly sensitive target of the antiobesity agent orlistat with profound implications in the activation of anticancer prodrugs. *Biochemical Pharmacology*. 2013;85:439-447
 31. James WPT, Caterson ID, Coutinho W, Finer N, Van Gaal LF, Maggioni AP, Torp-Pedersen C, Sharma AM, Shepherd GM, Rode RA, Renz CL. Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. *New England Journal of Medicine*. 2010;363:905-917
 32. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: A meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*. 2007;370:1706-1713
 33. Dong Z, Xu L, Liu H, Lv Y, Zheng Q, Li L. Comparative efficacy of five long-term weight loss drugs: Quantitative information for medication guidelines. *Obesity Reviews*. 2017;18:1377-1385
 34. Nuffer WA, Trujillo JM. Liraglutide: A new option for the treatment of obesity. *Pharmacotherapy*. 2015;35:926-934
 35. Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: A journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron*. 2017;96:17-42
 36. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010;468:232-243
 37. Cipolla MJ. Integrated systems physiology: From molecule to function. *The cerebral circulation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2009.
 38. Dorr A, Sled J, Kabani N. Three-dimensional cerebral vasculature of the cba mouse brain: A magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *NeuroImage*. 2007;35:1409-1423
 39. Coucha M, Abdelsaid M, Ward R, Abdul Y, Ergul A. Impact of metabolic diseases on cerebral circulation: Structural and functional consequences. *Comprehensive Physiology*. 2018;8:773-799
 40. Dorrance AM, Matin N, Pires PW. The effects of obesity on the cerebral vasculature. *Current vascular pharmacology*. 2014;12:462-472

41. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*. 1990;2:161-192
42. Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*. 2013;80:844-866
43. Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010;67:181-198
44. Sánchez van Kammen M, Moomaw CJ, van der Schaaf IC, Brown RD, Jr., Woo D, Broderick JP, Mackey JS, Rinkel GJE, Huston J, 3rd, Ruigrok YM. Heritability of circle of willis variations in families with intracranial aneurysms. *PloS one*. 2018;13:e0191974
45. Lo EH. Chapter 46 - the neurovascular unit. In: Caplan LR, Biller J, Leary MC, Lo EH, Thomas AJ, Yenari M, Zhang JH, eds. *Primer on cerebrovascular diseases (second edition)*. San Diego: Academic Press; 2017:226-229.
46. Petzold GC, Murthy VN. Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron*. 2011;71:782-797
47. Craigie Horne E. The architecture of the cerebral capillary bed. *Biological Reviews*. 1945;20:133-146
48. Tiret P, Chaigneau E, Lecoq J, Charpak S. Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2009;489:81-91
49. Cox SB, Woolsey TA, Rovainen CM. Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1993;13:899-913
50. LeDoux JE, Thompson ME, Iadecola C, Tucker LW, Reis DJ. Local cerebral blood flow increases during auditory and emotional processing in the conscious rat. *Science (New York, N.Y.)*. 1983;221:576-578
51. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, Axel L, Rusinek H, Nicholson C, Zlokovic BV, Frangione B, Blennow K, Ménard J, Zetterberg H, Wisniewski T, de Leon MJ. Clearance systems in the brain-implications for alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology*. 2015;11:457-470
52. Freeman RD, Li B. Neural-metabolic coupling in the central visual pathway. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 2016;371
53. Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1862:887-900

54. Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci (Lond)*. 2011;120:357-375
55. Andresen J, Shafi NI, Robert M. Bryan J. Endothelial influences on cerebrovascular tone. *Journal of Applied Physiology*. 2006;100:318-327
56. Chen BR, Kozberg MG, Bouchard MB, Shaik MA, Hillman EMC. A critical role for the vascular endothelium in functional neurovascular coupling in the brain. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:e000787-e000787
57. Segal SS. Integration and modulation of intercellular signaling underlying blood flow control. *J Vasc Res*. 2015;52:136-157
58. Longden TA, Hill-Eubanks DC, Nelson MT. Ion channel networks in the control of cerebral blood flow. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2016;36:492-512
59. Krueger M, Bechmann I. Cns pericytes: Concepts, misconceptions, and a way out. *Glia*. 2010;58:1-10
60. Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA, Attwell D. Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nature Neuroscience*. 2016;19:1619-1627
61. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*. 2014;508:55-60
62. Willeumier KC, Taylor DV, Amen DG. Elevated bmi is associated with decreased blood flow in the prefrontal cortex using spect imaging in healthy adults. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2011;19:1095-1097
63. Selim M, Jones R, Novak P, Zhao P, Novak V. The effects of body mass index on cerebral blood flow velocity. *Clin Auton Res*. 2008;18:331-338
64. Last D, Alsop DC, Abduljalil AM, Marquis RP, de Bazelaire C, Hu K, Cavallerano J, Novak V. Global and regional effects of type 2 diabetes on brain tissue volumes and cerebral vasoreactivity. *Diabetes care*. 2007;30:1193-1199
65. Nagamachi S, Nishikawa T, Ono S, Ageta M, Matsuo T, Jinnouchi S, Hoshi H, Ohnishi T, Futami S, Watanabe K. Regional cerebral blood flow in diabetic patients: Evaluation by n-isopropyl-123i-imp with spect. *Nuclear Medicine Communications*. 1994;15:455-460-460

66. Sabri O, Hellwig D, Schreckenberger M, Schneider R, Kaiser HJ, Wagenknecht G, Mull M, Buell U. Influence of diabetes mellitus on regional cerebral glucose metabolism and regional cerebral blood flow. *Nuclear medicine communications*. 2000;21:19-29
67. Howitt L, Sandow SL, Grayson TH, Ellis ZE, Morris MJ, Murphy TV. Differential effects of diet-induced obesity on bkca β 1-subunit expression and function in rat skeletal muscle arterioles and small cerebral arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011;301:H29-H40
68. Duckrow RB, Beard DC, Brennan RW. Regional cerebral blood flow decreases during chronic and acute hyperglycemia. *Stroke*. 1987;18:52-58
69. Deutsch C, Portik-Dobos V, Smith AD, Ergul A, Dorrance AM. Diet-induced obesity causes cerebral vessel remodeling and increases the damage caused by ischemic stroke. *Microvasc Res*. 2009;78:100-106
70. Osmond JM, Mintz JD, Dalton B, Stepp DW. Obesity increases blood pressure, cerebral vascular remodeling, and severity of stroke in the zucker rat. *Hypertension*. 2009;53:381-386
71. Butcher JT, Goodwill AG, Stanley SC, Frisbee JC. Differential impact of dilator stimuli on increased myogenic activation of cerebral and skeletal muscle resistance arterioles in obese zucker rats. *Microcirculation*. 2013;20:579-589
72. Phillips SA, Sylvester FA, Frisbee JC. Oxidant stress and constrictor reactivity impair cerebral artery dilation in obese zucker rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2005;288:R522-530
73. Duarte JV, Pereira JMS, Quendera B, Raimundo M, Moreno C, Gomes L, Carrilho F, Castelo-Branco M. Early disrupted neurovascular coupling and changed event level hemodynamic response function in type 2 diabetes: An fmri study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35:1671-1680
74. Li W, Prakash R, Chawla D, Du W, Didion SP, Filosa JA, Zhang Q, Brann DW, Lima VV, Tostes RC, Ergul A. Early effects of high-fat diet on neurovascular function and focal ischemic brain injury. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2013;304:R1001-1008
75. Kelly-Cobbs AI, Prakash R, Coucha M, Knight RA, Li W, Ogbi SN, Johnson M, Ergul A. Cerebral myogenic reactivity and blood flow in type 2 diabetic rats: Role of peroxynitrite in hypoxia-mediated loss of myogenic tone. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;342:407-415

76. Vetri F, Qi M, Xu H, Oberholzer J, Paisansathan C. Impairment of neurovascular coupling in type 1 diabetes mellitus in rats is prevented by pancreatic islet transplantation and reversed by a semi-selective pkc inhibitor. *Brain Research*. 2017;1655:48-54
77. Vetri F, Xu H, Paisansathan C, Pelligrino DA. Impairment of neurovascular coupling in type 1 diabetes mellitus in rats is linked to pkc modulation of bk(ca) and kir channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H1274-H1284
78. Xu WL, Atti AR, Gatz M, Pedersen NL, Johansson B, Fratiglioni L. Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: A population-based twin study. *Neurology*. 2011;76:1568-1574
79. Reeson P, Jeffery A, Brown CE. Illuminating the effects of stroke on the diabetic brain: Insights from imaging neural and vascular networks in experimental animal models. *Diabetes*. 2016;65:1779-1788
80. Yang H, Ma S, Liu Y, Li Y, Wu W, Han E, Jia G, Wang C. Poor outcome of experimental ischemic stroke in type 2 diabetic rats: Impaired circulating endothelial progenitor cells mobilization. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2015;24:980-987
81. Jeong SK, Nam HS, Son MH, Son EJ, Cho KH. Interactive effect of obesity indexes on cognition. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2005;19:91-96
82. Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, K areholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and alzheimer disease. *Archives of neurology*. 2005;62:1556-1560
83. Smith E, Hay P, Campbell L, Trollor JN. A review of the association between obesity and cognitive function across the lifespan: Implications for novel approaches to prevention and treatment. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2011;12:740-755
84. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5:347-360
85. Kalaria RN. Vascular basis for brain degeneration: Faltering controls and risk factors for dementia. *Nutrition reviews*. 2010;68 Suppl 2:S74-87
86. Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in alzheimer's disease and other disorders. *Nature reviews. Neuroscience*. 2011;12:723-738
87. Dichgans M, Zietemann V. Prevention of vascular cognitive impairment. *Stroke*. 2012;43:3137-3146

88. Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, Wolf PA, D'Agostino RB. Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: The framingham heart study. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003;27:260-268
89. Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gómez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience*. 2002;112:803-814
90. Murray AJ, Knight NS, Cochlin LE, McAleese S, Deacon RMJ, Rawlins JNP, Clarke K. Deterioration of physical performance and cognitive function in rats with short-term high-fat feeding. *The FASEB Journal*. 2009;23:4353-4360
91. Kosari S, Badoer E, Nguyen JCD, Killcross AS, Jenkins TA. Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. *Behavioural Brain Research*. 2012;235:98-103
92. Farr SA, Yamada KA, Butterfield DA, Abdul HM, Xu L, Miller NE, Banks WA, Morley JE. Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology*. 2008;149:2628-2636
93. Winocur G, Greenwood CE, Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Reagan LP, McEwen BS. Memory impairment in obese Zucker rats: An investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behavioral neuroscience*. 2005;119:1389-1395
94. Morley JE. The metabolic syndrome and aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2004;59:139-142
95. Reitz C, Luchsinger J, Tang MX, Manly J, Mayeux R. Impact of plasma lipids and time on memory performance in healthy elderly without dementia. *Neurology*. 2005;64:1378-1383
96. Rogers RL, Meyer JS, McClintic K, Mortel KF. Reducing hypertriglyceridemia in elderly patients with cerebrovascular disease stabilizes or improves cognition and cerebral perfusion. *Angiology*. 1989;40:260-269
97. McNeilly AD, Williamson R, Sutherland C, Balfour DJK, Stewart CA. High fat feeding promotes simultaneous decline in insulin sensitivity and cognitive performance in a delayed matching and non-matching to position task. *Behavioural Brain Research*. 2011;217:134-141
98. Morrison CD, Pistell PJ, Ingram DK, Johnson WD, Liu Y, Fernandez-Kim SO, White CL, Purpera MN, Uranga RM, Bruce-Keller AJ, Keller JN. High fat diet increases hippocampal

- oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: Implications for decreased nrf2 signaling. *J Neurochem.* 2010;114:1581-1589
99. Baumeister H, Härter M. Mental disorders in patients with obesity in comparison with healthy probands. *International journal of obesity.* 2007;31:1155-1164
100. Ogrodnik M, Zhu Y, Langhi LGP, Tchkonja T, Krüger P, Fielder E, Victorelli S, Ruswhandi RA, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Podgorni O, Enikolopov G, Johnson KO, Xu M, Inman C, Palmer AK, Schafer M, Weigl M, Ikeno Y, Burns TC, Passos JF, von Zglinicki T, Kirkland JL, Jurk D. Obesity-induced cellular senescence drives anxiety and impairs neurogenesis. *Cell Metab.* 2019;29:1061-1077.e1068
101. Sharma S, Fulton S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *International journal of obesity.* 2013;37:382-389
102. Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR, Pereira AG, Rieger DK, Souza DO, Souza TM, Portela LV, Perry ML. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life sciences.* 2007;81:198-203
103. Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews.* 2006;86:747-803
104. Marks LS, Maxwell MH. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. *Hypertension.* 1979;1:384-388
105. Hall JE. Historical perspective of the renin -angiotensin system. *Methods in molecular medicine.* 2001;51:3-21
106. Deschepper CF. Angiotensinogen: Hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin ii. *Kidney International.* 1994;46:1561-1563
107. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiological Reviews.* 1990;70:1067-1116
108. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. Xxiii. The angiotensin ii receptors. *Pharmacological Reviews.* 2000;52:415-472
109. Bollag WB. Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Comprehensive Physiology.* 2014;4:1017-1055

110. Hollenberg NK, Williams GH. Angiotensin as a renal, adrenal, and cardiovascular hormone: Responses to saralasin in normal man and in essential and secondary hypertension. *Kidney international. Supplement*. 1979:S29-35
111. Carey RM, Wang Z-Q, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*. 2000;35:155-163
112. Shin-ichiro M, Satoshi I, Keijiro S. Recent progress in molecular mechanisms of angiotensin ii type 1 and 2 receptors. *Current Pharmaceutical Design*. 2013;19:2981-2987
113. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: Overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*. 2003;144:2179-2183
114. Jöhren O, Saavedra JM. Expression of at1a and at1b angiotensin ii receptor messenger rna in forebrain of 2-wk-old rats. *The American journal of physiology*. 1996;271:E104-112
115. Balmforth AJ, Bryson SE, Aylett AJ, Warburton P, Ball SG, Pun KT, Middlemiss D, Drew GM. Comparative pharmacology of recombinant rat at1a, at1b and human at1 receptors expressed by transfected cos-m6 cells. *Br J Pharmacol*. 1994;112:277-281
116. Huber G, Schuster F, Raasch W. Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Pharmacological research*. 2017;125:72-90
117. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (raas): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;94:317-325
118. Wong MKS. Chapter 29 - renin-angiotensin system. In: Takei Y, Ando H, Tsutsui K, eds. *Handbook of hormones*. San Diego: Academic Press; 2016:253-e229-253.
119. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin ii cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2007;292:C82-97
120. Bakheit AH, Abd-Elgalil AA, Mustafa B, Haque A, Wani TA. Telmisartan. *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology*. 2015;40:371-429
121. Daugherty KK. Aliskiren. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2008;65:1323-1332
122. Meisel S, Shamiss A, Rosenthal T. Clinical pharmacokinetics of ramipril. *Clinical pharmacokinetics*. 1994;26:7-15

123. Yugandhar VG, Clark MA. Angiotensin iii: A physiological relevant peptide of the renin angiotensin system. *Peptides*. 2013;46:26-32
124. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin iv/at4 receptor. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2004;61:2728-2737
125. Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A, Tallant EA. Angiotensin-(1-7): A new hormone of the angiotensin system. *Hypertension*. 1991;18:lii126-133
126. Ohishi M, Yamamoto K, Rakugi H. Angiotensin (1-7) and other angiotensin peptides. *Curr Pharm Des*. 2013;19:3060-3064
127. Farag E, Sessler DI, Ebrahim Z, Kurz A, Morgan J, Ahuja S, Maheshwari K, John Doyle D. The renin angiotensin system and the brain: New developments. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2017;46:1-8
128. Ganten D, Marquez-Julio A, Granger P, Hayduk K, Karsunky K, Boucher R, Genest J. Renin in dog brain. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1971;221:1733-1737
129. Sriramula S, Cardinale JP, Lazartigues E, Francis J. Ace2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin ii-induced hypertension. *Cardiovascular Research*. 2011;92:401-408
130. Mogi M, Horiuchi M. Effect of angiotensin ii type2 receptor on stroke, cognitive impairment and neurodegenerative diseases. *Geriatrics & Gerontology International*. 2013;13:13-18
131. Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D. Angiotensin-(1-7) enhances ltp in the hippocampus through the g-protein-coupled receptor mas. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2005;29:427-435
132. Lazaroni TLN, Raslan ACS, Fontes WRP, de Oliveira ML, Bader M, Alenina N, Moraes MFD, dos Santos RA, Pereira GS. Angiotensin-(1-7)/mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2012;97:113-123
133. Yang R-F, Yin J-X, Li Y-L, Zimmerman MC, Schultz HD. Angiotensin-(1-7) increases neuronal potassium current via a nitric oxide-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2011;300:C58-C64
134. Gard PR. The role of angiotensin ii in cognition and behaviour. *European Journal of Pharmacology*. 2002;438:1-14

135. Vaajanen A, Vapaatalo H, Kautiainen H, Oksala O. Angiotensin (1-7) reduces intraocular pressure in the normotensive rabbit eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008;49:2557-2562
136. Barnes JM, Barnes NM, Costall B, Coughlan J, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM, Williams TJ. Angiotensin-converting enzyme inhibition, angiotensin, and cognition. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1992;19:S63-S71
137. Miners JS, van Helmond Z, Raiker M, Love S, Kehoe PG. Ace variants and association with brain a β levels in alzheimer's disease. *Am J Transl Res*. 2010;3:73-80
138. Saavedra JM. Evidence to consider angiotensin ii receptor blockers for the treatment of early alzheimer's disease. *Cellular and molecular neurobiology*. 2016;36:259-279
139. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2003;26 Suppl 1:S5-20
140. Miesel A, Müller-Fielitz H, Jöhren O, Vogt FM, Raasch W. Double blockade of angiotensin ii (at1))-receptors and ace does not improve weight gain and glucose homeostasis better than single-drug treatments in obese rats. *Br J Pharmacol*. 2012;165:2721-2735
141. Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P, Anderson C. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med*. 2008;358:1547-1559
142. Andraws R, Brown DL. Effect of inhibition of the renin-angiotensin system on development of type 2 diabetes mellitus (meta-analysis of randomized trials). *The American Journal of Cardiology*. 2007;99:1006-1012
143. Scheen AJ. Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 1. A meta-analysis of randomised clinical trials. *Diabetes & metabolism*. 2004;30:487-496
144. Carlsson B, Lindell K, Gabrielsson B, Karlsson C, Bjarnason R, Westphal O, Karlsson U, Sjöström L, Carlsson LM. Obese (ob) gene defects are rare in human obesity. *Obesity research*. 1997;5:30-35
145. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997;387:903-908
146. Wang C-Y, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods in molecular biology*. 2012;821:421-433

147. Schuster F, Huber G, Stölting I, Wing EE, Saar K, Hübner N, Banks WA, Raasch W. Telmisartan prevents diet-induced obesity and preserves leptin transport across the blood-brain barrier in high-fat diet-fed mice. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2018;470:1673-1689
148. Müller-Fielitz H, Lau M, Geißler C, Werner L, Winkler M, Raasch W. Preventing leptin resistance by blocking angiotensin ii at1 receptors in diet-induced obese rats. *Br J Pharmacol*. 2015;172:857-868
149. Schuchard J, Winkler M, Stölting I, Schuster F, Vogt F, Barkhausen J, Thorns C, Santos R, Bader M, Raasch W. Prevention of weight gain after at 1 receptor blockade in diet-induced rat obesity is at least partially related to an angiotensin(1-7)/mas-dependent mechanism: Ang(1-7) and weight loss after at 1 blockade. *Br J Pharmacol*. 2015;172
150. Müller-Fielitz H, Hübel N, Mildner M, Vogt FM, Barkhausen J, Raasch W. Chronic blockade of angiotensin at1 receptors improves cardinal symptoms of metabolic syndrome in diet-induced obesity in rats. *Br J Pharmacol*. 2014;171:746-760
151. Müller-Fielitz H, Markert A, Wittmershaus C, Pahlke F, Jöhren O, Raasch W. Weight loss and hypophagia after high-dose at1-blockade is only observed after high dosing and depends on regular leptin signalling but not blood pressure. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2011;383:373-384
152. Fujisaka S, Usui I, Kanatani Y, Ikutani M, Takasaki I, Tsuneyama K, Tabuchi Y, Bukhari A, Yamazaki Y, Suzuki H, Senda S, Aminuddin A, Nagai Y, Takatsu K, Kobayashi M, Tobe K. Telmisartan improves insulin resistance and modulates adipose tissue macrophage polarization in high-fat-fed mice. *Endocrinology*. 2011;152:1789-1799
153. Souza-Mello V, Gregório Bianca M, Cardoso-de-Lemos Fernando S, de Carvalho L, Aguila Márcia B, Mandarim-de-Lacerda Carlos A. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in c57bl/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clinical Science*. 2010;119:239-250
154. McMurray JJ, Holman RR, Haffner SM, Bethel MA, Holzhauer B, Hua TA, Belenkov Y, Boolell M, Buse JB, Buckley BM, Chacra AR, Chiang FT, Charbonnel B, Chow CC, Davies MJ, Deedwania P, Diem P, Einhorn D, Fonseca V, Fulcher GR, Gaciong Z, Gaztambide S, Giles T, Horton E, Ilkova H, Jenssen T, Kahn SE, Krum H, Laakso M, Leiter LA, Levitt NS, Mareev V, Martinez F, Masson C, Mazzone T, Meaney E, Nesto R, Pan C, Prager R, Raptis SA, Rutten GE, Sandstroem H, Schaper F, Scheen A, Schmitz O, Sinay I, Soska V, Stender S, Tamás G, Tognoni G, Tuomilehto J, Villamil AS, Vozár J, Califf RM. Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2010;362:1477-1490

155. Kintscher U, Bramlage P, Paar WD, Thoenes M, Unger T. Irbesartan for the treatment of hypertension in patients with the metabolic syndrome: A sub analysis of the treat to target post authorization survey. Prospective observational, two armed study in 14,200 patients. *Cardiovascular diabetology*. 2007;6:12-12
156. Müller-Fielitz H, Landolt J, Heidbreder M, Werth S, Vogt FM, Jöhren O, Raasch W. Improved insulin sensitivity after long-term treatment with at1 blockers is not associated with ppar γ target gene regulation. *Endocrinology*. 2012;153:1103-1115
157. Wang Z, Koike T, Li P, Jiang H, Natsume Y, Mu L, Chen T, Oshida Y. Effects of angiotensin ii at1 receptor inhibition and exercise training on insulin action in rats on high-fat diet. *Life sciences*. 2012;90:322-327
158. Zorad S, Dou JT, Benicky J, Hutanu D, Tybitanclova K, Zhou J, Saavedra JM. Long-term angiotensin ii at1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and ppar γ . *Eur J Pharmacol*. 2006;552:112-122
159. He H, Yang D, Ma L, Luo Z, Ma S, Feng X, Cao T, Yan Z, Liu D, Tepel M, Zhu Z. Telmisartan prevents weight gain and obesity through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- δ -dependent pathways. *Hypertension*. 2010;55:869-879
160. Zanchi A, Dulloo AG, Perregaux C, Montani J-P, Burnier M. Telmisartan prevents the glitazone-induced weight gain without interfering with its insulin-sensitizing properties. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007;293:E91-E95
161. Michel MC, Brunner HR, Foster C, Huo Y. Angiotensin ii type 1 receptor antagonists in animal models of vascular, cardiac, metabolic and renal disease. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016;164:1-81
162. Premaratna SD, Manickam E, Begg DP, Rayment DJ, Hafandi A, Jois M, Cameron-Smith D, Weisinger RS. Angiotensin-converting enzyme inhibition reverses diet-induced obesity, insulin resistance and inflammation in c57bl/6j mice. *International journal of obesity*. 2012;36:233-243
163. Winkler M, Schuchard J, Stölting I, Vogt FM, Barkhausen J, Thorns C, Bader M, Raasch W. The brain renin-angiotensin system plays a crucial role in regulating body weight in diet-induced obesity in rats. *Br J Pharmacol*. 2016;173:1602-1617
164. Rawish E, Nickel L, Schuster F, Stölting I, Frydrychowicz A, Saar K, Hübner N, Othman A, Kuerschner L, Raasch W. Telmisartan prevents development of obesity and normalizes hypothalamic lipid droplets. *J Endocrinol*. 2020;244:95-110

165. Zhao M, Li Y, Wang J, Ebihara K, Rong X, Hosoda K, Tomita T, Nakao K. Azilsartan treatment improves insulin sensitivity in obese spontaneously hypertensive koletsky rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2011;13:1123-1129
166. Brown WR. A review of string vessels or collapsed, empty basement membrane tubes. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;21:725-739
167. Dapper C, Schuster F, Stölting I, Vogt F, Castro ESLA, Alenina N, Bader M, Raasch W. The antiobese effect of at1 receptor blockade is augmented in mice lacking mas. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2019;392:865-877
168. Wenzel J, Hansen CE, Bettoni C, Vogt MA, Lembrich B, Natsagdorj R, Huber G, Brands J, Schmidt K, Assmann JC, Stölting I, Saar K, Sedlacik J, Fiehler J, Ludewig P, Wegmann M, Feller N, Richter M, Müller-Fielitz H, Walther T, König GM, Kostenis E, Raasch W, Hübner N, Gass P, Offermanns S, de Wit C, Wagner CA, Schwaninger M. Impaired endothelium-mediated cerebrovascular reactivity promotes anxiety and respiration disorders in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020;117:1753-1761
169. Sunyer B, Patil s. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Nature protocol exchange*. 2007;390
170. Peterson EC, Wang Z, Britz G. Regulation of cerebral blood flow. *Int J Vasc Med*. 2011;2011:823525-823525
171. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Obesity-induced cerebral hypoperfusion derived from endothelial dysfunction: One of the risk factors for alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2014;11:733-744
172. Cockcroft JR. Exploring vascular benefits of endothelium-derived nitric oxide. *American journal of hypertension*. 2005;18:177S-183S
173. Yu F, Chapman S, Pham DL, Ko ML, Zhou B, Ko GY-P. Decreased mir-150 in obesity-associated type 2 diabetic mice increases intraocular inflammation and exacerbates retinal dysfunction. *BMJ Open Diabetes Research & Care*. 2020;8:e001446
174. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000;1:72-76
175. Swanson EC, Manning B, Zhang H, Lawrence JB. Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. *Journal of Cell Biology*. 2013;203:929-942

176. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International journal of molecular sciences*. 2011;12:3117-3132
177. Boitard C, Etchamendy N, Sauvant J, Aubert A, Tronel S, Marighetto A, Layé S, Ferreira G. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus*. 2012;22:2095-2100
178. Chugh BP, Bishop J, Zhou YQ, Wu J, Henkelman RM, Sled JG. Robust method for 3d arterial spin labeling in mice. *Magnetic resonance in medicine*. 2012;68:98-106
179. Birdsill AC, Carlsson CM, Willette AA, Okonkwo OC, Johnson SC, Xu G, Oh JM, Gallagher CL, Kosciak RL, Jonaitis EM, Hermann BP, LaRue A, Rowley HA, Asthana S, Sager MA, Bendlin BB. Low cerebral blood flow is associated with lower memory function in metabolic syndrome. *Obesity*. 2013;21:1313-1320
180. Knierim JJ. Hippocampus and memory: Can we have our place and fear it too? *Neuron*. 2003;37:372-374
181. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409:307-312
182. Rigsby CS, Pollock DM, Dorrance AM. Spironolactone improves structure and increases tone in the cerebral vasculature of male spontaneously hypertensive stroke-prone rats. *Microvascular Research*. 2007;73:198-205
183. Katakam PVG, Domoki F, Snipes JA, Busija AR, Jarajapu YPR, Busija DW. Impaired mitochondria-dependent vasodilation in cerebral arteries of zucker obese rats with insulin resistance. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2009;296:R289-R298
184. Ginsberg MD. Cerebral blood flow and metabolism. In: Green BA, Marshall LF, Gallagher TJ, eds. *Intensive care for neurological trauma and disease*. Academic Press; 1982:217-227.
185. Henrion D. Pressure and flow-dependent tone in resistance arteries. Role of myogenic tone. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*. 2005;98:913-921
186. Rancillac A, Rossier J, Guille M, Tong X-K, Geoffroy H, Amatore C, Arbault S, Hamel E, Cauli B. Glutamatergic control of microvascular tone by distinct gaba neurons in the cerebellum. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26:6997-7006

187. Cauli B, Tong X-K, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, Hamel E. Cortical gaba interneurons in neurovascular coupling: Relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci*. 2004;24:8940-8949
188. Schwaninger RM, Sun H, Mayhan WG. Impaired nitric oxide synthase-dependent dilatation of cerebral arterioles in type ii diabetic rats. *Life sciences*. 2003;73:3415-3425
189. Zimmermann PA, Knot HJ, Stevenson AS, Nelson MT. Increased myogenic tone and diminished responsiveness to atp-sensitive k+ channel openers in cerebral arteries from diabetic rats. *Circulation research*. 1997;81:996-1004
190. Wang Q, Kjaer T, Jørgensen MB, Paulson OB, Lassen NA, Diemer NH, Lou HC. Nitric oxide does not act as a mediator coupling cerebral blood flow to neural activity following somatosensory stimuli in rats. *Neurological research*. 1993;15:33-36
191. Hayashi T, Katsumi Y, Mukai T, Inoue M, Nagahama Y, Oyanagi C, Yamauchi H, Shibasaki H, Fukuyama H. Neuronal nitric oxide has a role as a perfusion regulator and a synaptic modulator in cerebellum but not in neocortex during somatosensory stimulation—an animal pet study. *Neuroscience research*. 2002;44:155-165
192. Dirnagl U, Lindauer U, Villringer A. Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats. *Neuroscience Letters*. 1993;149:43-46
193. Krimer LS, Muly EC, Williams GV, Goldman-Rakic PS. Dopaminergic regulation of cerebral cortical microcirculation. *Nature Neuroscience*. 1998;1:286-289
194. Stapleton PA, James ME, Goodwill AG, Frisbee JC. Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiology*. 2008;15:79-89
195. Ergul A, Valenzuela JP, Fouda AY, Fagan SC. Cellular connections, microenvironment and brain angiogenesis in diabetes: Lost communication signals in the post-stroke period. *Brain research*. 2015;1623:81-96
196. Ergul A, Abdelsaid M, Fouda AY, Fagan SC. Cerebral neovascularization in diabetes: Implications for stroke recovery and beyond. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34:553-563
197. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114:1752-1761
198. Frisbee JC. Obesity, insulin resistance, and microvessel density. *Microcirculation*. 2007;14:289-298

199. Lavi S, Gaitini D, Milloul V, Jacob G. Impaired cerebral co2 vasoreactivity: Association with endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;291:H1856-H1861
200. Wang S, Wang X, Cheng Y, Ouyang W, Sang X, Liu J, Su Y, Liu Y, Li C, Yang L, Jin L, Wang Z. Autophagy dysfunction, cellular senescence, and abnormal immune-inflammatory responses in amd: From mechanisms to therapeutic potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:3632169
201. Ogradnik M, Miwa S, Tchkonja T, Tiniakos D, Wilson CL, Lahat A, Day CP, Burt A, Palmer A, Anstee QM, Grellescheid SN, Hoeijmakers JHJ, Barnhoorn S, Mann DA, Bird TG, Vermeij WP, Kirkland JL, Passos JF, von Zglinicki T, Jurk D. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun*. 2017;8:15691-15691
202. Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, Saretzki G, Fox C, Lawless C, Anderson R, Hewitt G, Pender SLF, Fullard N, Nelson G, Mann J, van de Sluis B, Mann DA, von Zglinicki T. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Commun*. 2014;5:4172
203. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, Saretzki G, Rudolph KL, Kirkwood TBL, von Zglinicki T. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology*. 2010;6:347
204. Singhal SS, Singh SP, Singhal P, Horne D, Singhal J, Awasthi S. Antioxidant role of glutathione s-transferases: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;289:361-370
205. González-García I, Fernø J, Diéguez C, Nogueiras R, López M. Hypothalamic lipids: Key regulators of whole body energy balance. *Neuroendocrinology*. 2017;104:398-411
206. Kitayama J, Faraci FM, Gunnnett CA, Heistad DD. Impairment of dilator responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus: Role of inducible no synthase. *Stroke*. 2006;37:2129-2133
207. Van Buren T, Vleeming W, Krutzen MM, Van de Kuil T, Gispen WH, De Wildt DJ. Vascular responses of isolated mesenteric resistance and basilar arteries from short- and long-term diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1998;358:663-670
208. McLean F, Grant C, Morris A, Horgan G, Polanski A, Allan K, Campbell F, Langston R, Williams L. Rapid and reversible impairment of episodic memory by a high-fat diet in mice. *Scientific Reports*. 2018;8
209. Rocchini AP. Childhood obesity and a diabetes epidemic. *N Engl J Med*. 2002;346:854-855

210. Greenwood CE, Winocur G. High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiology of aging*. 2005;26 Suppl 1:42-45
211. Stranahan AM. Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. *Neuroscience*. 2015;309:125-139
212. Nguyen JCD, Killcross AS, Jenkins TA. Obesity and cognitive decline: Role of inflammation and vascular changes. *Frontiers in Neuroscience*. 2014;8
213. Hryhorczuk C, Sharma S, Fulton S. Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Frontiers in Neuroscience*. 2013;7
214. Janak PH, Tye KM. From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*. 2015;517:284-292
215. Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics*. 2011;130:226-238
216. Lasselin J, Capuron L. Chronic low-grade inflammation in metabolic disorders: Relevance for behavioral symptoms. *Neuroimmunomodulation*. 2014;21:95-101
217. Ulrich-Lai Yvonne M, Ryan Karen K. Neuroendocrine circuits governing energy balance and stress regulation: Functional overlap and therapeutic implications. *Cell Metab*. 2014;19:910-925
218. Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017;18:335-346
219. Culman J, von Heyer C, Piepenburg B, Rascher W, Unger T. Effects of systemic treatment with irbesartan and losartan on central responses to angiotensin ii in conscious, normotensive rats. *Eur J Pharmacol*. 1999;367:255-265
220. Gohlke P, Weiss S, Jansen A, Wiene W, Stangier J, Rascher W, Culman J, Unger T. At₁ receptor antagonist telmisartan administered peripherally inhibits central responses to angiotensin ii in conscious rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;298:62-70
221. South AM, Nixon PA, Chappell MC, Diz DI, Russell GB, Shaltout HA, O'Shea TM, Washburn LK. Obesity is associated with higher blood pressure and higher levels of angiotensin ii but lower angiotensin-(1-7) in adolescents born preterm. *The Journal of pediatrics*. 2019;205:55-60.e51
222. Saavedra JM. Angiotensin ii at(1) receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. *Clin Sci (Lond)*. 2012;123:567-590

223. Saavedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine Reviews*. 1992;13:329-380
224. Zhou J, Pavel J, Macova M, Yu Z-X, Imboden H, Ge L, Nishioku T, Dou J, Delgiacco E, Saavedra JM. At₁ receptor blockade regulates the local angiotensin ii system in cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2006;37:1271-1276
225. Saavedra JM. Angiotensin ii at(1) receptor blockers ameliorate inflammatory stress: A beneficial effect for the treatment of brain disorders. *Cellular and molecular neurobiology*. 2012;32:667-681
226. Phillips MI, de Oliveira EM. Brain renin angiotensin in disease. *Journal of molecular medicine*. 2008;86:715-722
227. Knudson JD, Dincer UD, Bratz IN, Sturek M, Dick GM, Tune JD. Mechanisms of coronary dysfunction in obesity and insulin resistance. *Microcirculation*. 2007;14:317-338
228. Singer G, Granger N. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirculation*. 2007;14:375-387
229. Felder RB. Mineralocorticoid receptors, inflammation and sympathetic drive in a rat model of systolic heart failure. *Experimental Physiology*. 2010;95:19-25
230. Gomez-Sanchez EP. Mineralocorticoid receptors in the brain and cardiovascular regulation: Minority rule? *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2011;22:179-187
231. Abdelsaid M, Coucha M, Ergul A. Cerebrovasculoprotective effects of azilsartan medoxomil in diabetes. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. 2014;164:424-432
232. Musi N, Valentine JM, Sickora KR, Baeuerle E, Thompson CS, Shen Q, Orr ME. Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell*. 2018;17:e12840
233. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, Inman CL, Ogrodnik MB, Hachfeld CM, Fraser DG, Onken JL, Johnson KO, Verzosa GC, Langhi LGP, Weigl M, Giorgadze N, LeBrasseur NK, Miller JD, Jurk D, Singh RJ, Allison DB, Ejima K, Hubbard GB, Ikeno Y, Cubro H, Garovic VD, Hou X, Weroha SJ, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Khosla S, Tchkonja T, Kirkland JL. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*. 2018;24:1246-1256
234. Gao B-B, Phipps JA, Bursell D, Clermont AC, Feener EP. Angiotensin at1 receptor antagonism ameliorates murine retinal proteome changes induced by diabetes. *J Proteome Res*. 2009;8:5541-5549

235. Wilkinson-Berka JL, Tan G, Jaworski K, Ninkovic S. Valsartan but not atenolol improves vascular pathology in diabetic ren-2 rat retina. *American journal of hypertension*. 2007;20:423-430
236. Zhang JZ, Xi X, Gao L, Kern TS. Captopril inhibits capillary degeneration in the early stages of diabetic retinopathy. *Current eye research*. 2007;32:883-889
237. Tsukuda K, Mogi M, Li J-M, Iwanami J, Min L-J, Sakata A, Fujita T, Iwai M, Horiuchi M. Amelioration of cognitive impairment in the type-2 diabetic mouse by the angiotensin ii type-1 receptor blocker candesartan. *Hypertension*. 2007;50:1099-1105
238. Mogi M, Tsukuda K, Li J-M, Iwanami J, Min L-J, Sakata A, Fujita T, Iwai M, Horiuchi M. Inhibition of cognitive decline in mice fed a high-salt and cholesterol diet by the angiotensin receptor blocker, olmesartan. *Neuropharmacology*. 2007;53:899-905
239. Mogi M, Horiuchi M. Effects of angiotensin ii receptor blockers on dementia. *Hypertension Research*. 2009;32:738-740
240. Villapol S, Saavedra JM. Neuroprotective effects of angiotensin receptor blockers. *American journal of hypertension*. 2015;28:289-299
241. Villapol S, Yaszemski AK, Logan TT, Sánchez-Lemus E, Saavedra JM, Symes AJ. Candesartan, an angiotensin ii at1-receptor blocker and ppar- γ agonist, reduces lesion volume and improves motor and memory function after traumatic brain injury in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37:2817-2829
242. Qiu C, Winblad B, Fratiglioni L. The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia. *The Lancet. Neurology*. 2005;4:487-499
243. Wang J, Ho L, Chen L, Zhao Z, Zhao W, Qian X, Humala N, Seror I, Bartholomew S, Rosendorff C, Pasinetti GM. Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117:3393-3402
244. Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin-converting enzyme degrades alzheimer amyloid beta-peptide (a beta); retards a beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:47863-47868
245. Mogi M, Li JM, Tsukuda K, Iwanami J, Min LJ, Sakata A, Fujita T, Iwai M, Horiuchi M. Telmisartan prevented cognitive decline partly due to ppar-gamma activation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;375:446-449

246. Tsukuda K, Mogi M, Iwanami J, Min L-J, Sakata A, Jing F, Iwai M, Horiuchi M. Cognitive deficit in amyloid- β -injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan partly because of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. *Hypertension*. 2009;54:782-787
247. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*. 2018;562:578-582
248. Denes A, Thornton P, Rothwell NJ, Allan SM. Inflammation and brain injury: Acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain, behavior, and immunity*. 2010;24:708-723
249. Meschia JF, Bushnell C, Boden-Albala B, Braun LT, Bravata DM, Chaturvedi S, Creager MA, Eckel RH, Elkind MSV, Fornage M, Goldstein LB, Greenberg SM, Horvath SE, Iadecola C, Jauch EC, Moore WS, Wilson JA. Guidelines for the primary prevention of stroke. *Stroke*. 2014;45:3754-3832
250. Cope EC, LaMarca EA, Monari PK, Olson LB, Martinez S, Zych AD, Katchur NJ, Gould E. Microglia play an active role in obesity-associated cognitive decline. *The Journal of Neuroscience*. 2018;38:8889-8904
251. Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, Erlanson-Albertsson C. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *European Journal of Neurology*. 2006;13:1385-1388
252. Min L-J, Mogi M, Iwanami J, Sakata A, Jing F, Tsukuda K, Ohshima K, Horiuchi M. Angiotensin ii and aldosterone-induced neuronal damage in neurons through an astrocyte-dependent mechanism. *Hypertension Research*. 2011;34:773-778
253. O'Callaghan EL, Bassi JK, Porrello ER, Delbridge LM, Thomas WG, Allen AM. Regulation of angiotensinogen by angiotensin ii in mouse primary astrocyte cultures. *J Neurochem*. 2011;119:18-26
254. Yang Y. Astrocytes: Targets in obesity. *Oncotarget*. 2015;6:12835-12836

Anhang

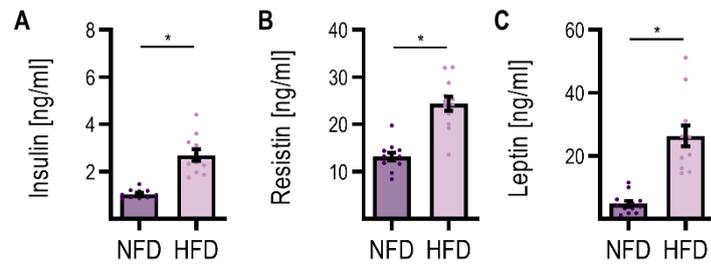


Abbildung S1. Bestimmung metabolischer Hormone im Plasma. Mäuse wurden für 24 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert. Mittels Multiplex-Assay wurden die Konzentrationen von (A) Insulin, (B) Resistin und (C) Leptin im Plasma bestimmt. n=12 pro Gruppe; * P<0,05 im Student's t Test (mit Welch's Korrektur bei A und C); Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

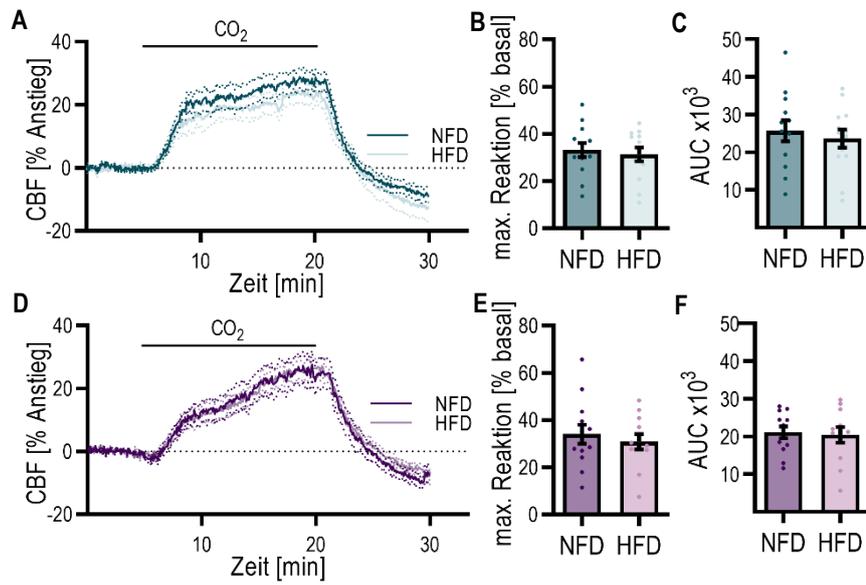


Abbildung S2. Messung der Gewebepfusion während der Stimulation mit CO₂. Mäuse wurden für (A)-(C) 16 und (D)-(F) 24 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfett- (HFD) gefüttert. (A) und (D) Quantifizierung der LSI-Messung mit (B) und (E) Angabe der maximalen Reaktion und (C) und (F) Area under the Curve (AUC); n=12-13 pro Gruppe; * P<0,05 im Student's t Test. Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

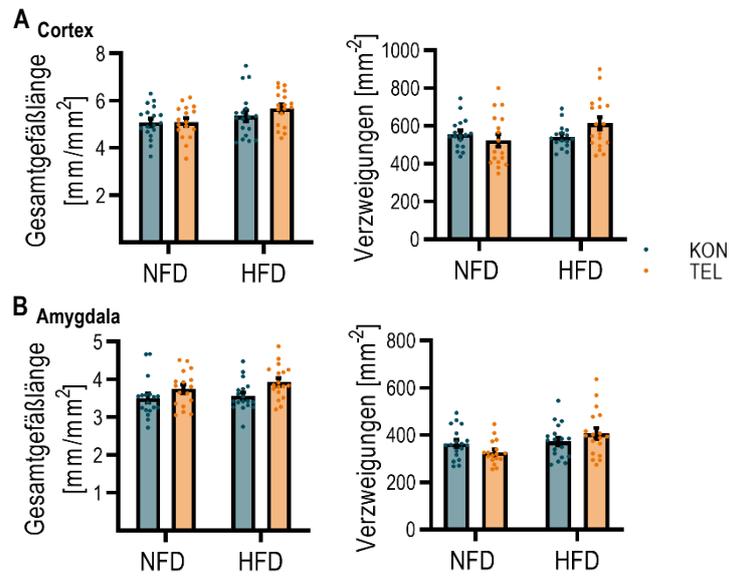


Abbildung S3. Gefäßquantifizierung der Immunhistochemie für *String Vessel*. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. Gesamtgefäßlänge (links) und Anzahl der Gefäßverzweigungen (rechts) im (A) Cortex und (B) der Amygdala. 2-Wege ANOVA ergab keine Signifikanzen. $n=17-18$ pro Gruppe (4 Bilder pro n); Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

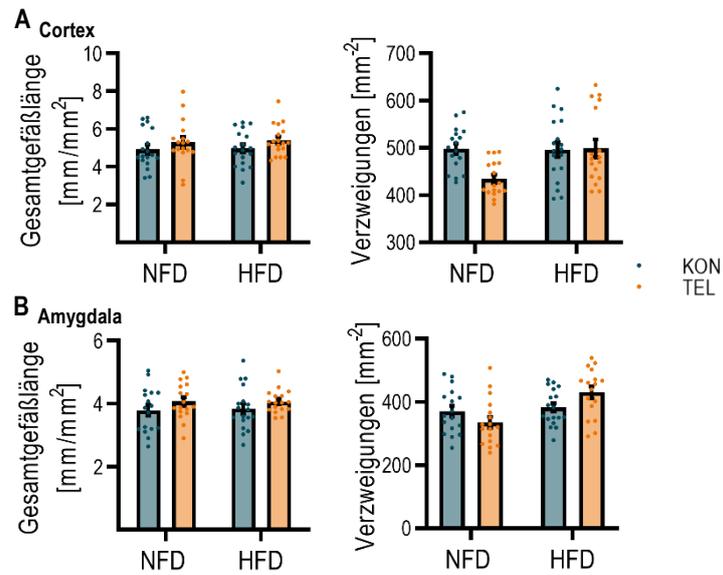


Abbildung S4. Gefäßquantifizierung der Immunhistochemie für 4-HNE. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. Gesamtgefäßlänge (links) und Anzahl der Gefäßverzweigungen (rechts) im (A) Cortex und (B) der Amygdala. 2-Wege ANOVA ergab keine Signifikanzen. n=17-18 pro Gruppe (4 Bilder pro n); Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

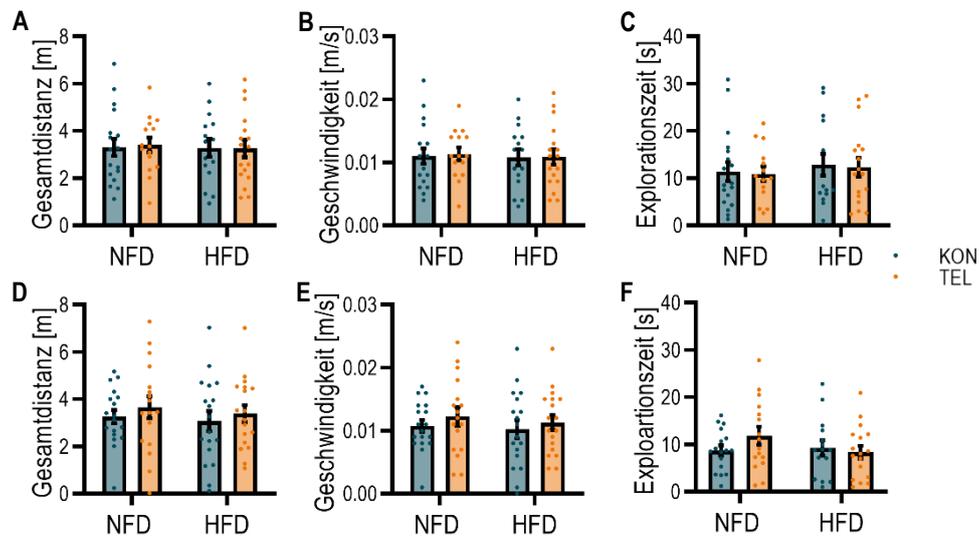


Abbildung S5. Allgemein untersuchte Parameter während des *Object Place Recognition* Tests. Mäuse wurden für 16 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und gleichzeitig täglich mit Vehikelkontrolle (KON) oder Telmisartan (TEL) behandelt. Gemessene Aktivitätsparameter während des *Object Place Recognition* Tests nach einer Retentionszeit von (A)-(C) 1 h und (D)-(F) 24 h mit (A) und (D) gelaufener Gesamtdistanz, (B) und (E) Geschwindigkeit und (C) und (F) Explorationszeit. 2-Wege ANOVA ergab keine signifikanten Unterschiede. n=17-18 pro Gruppe; Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

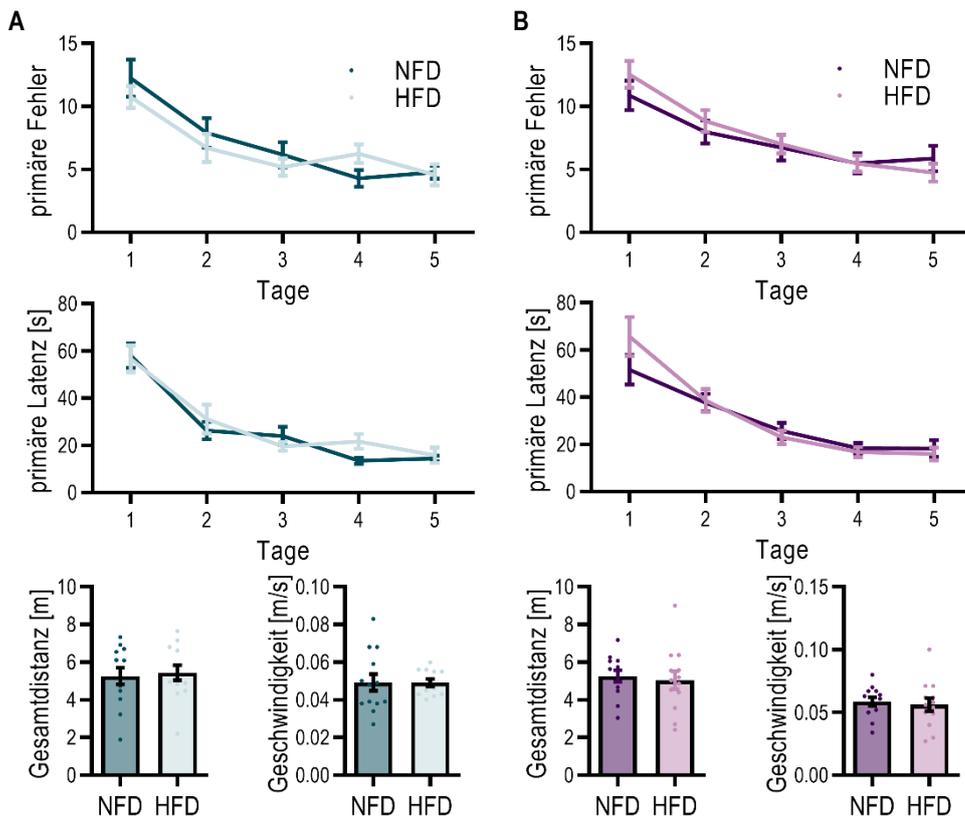


Abbildung S6. 16 oder 24 Wochen HFD hat keinen Effekt auf den Lernprozess. Mäuse wurden für (A) 16 oder (B) 24 Wochen mit Normalfett- (NFD) oder Hochfettdiät (HFD) gefüttert und in der letzten Fütterungswoche wurde ein *Barnes Maze* Test durchgeführt. Primäre Fehler, primäre Latenz während der Akquisitionsphase und gelaufene Gesamtdistanz und Geschwindigkeit am *Probe Trial* sind jeweils gezeigt. n=12-13 pro Gruppe; keine Signifikanzen im Student's t Test. Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Circle of Willis	7
Abbildung 2. Neurovaskuläre Einheit	8
Abbildung 3. Das klassische Renin-Angiotensin-System	13
Abbildung 4. Studienplan 3A	36
Abbildung 5. Studienplan 3B. Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Experimente von Studie 3B	37
Abbildung 6. Metabolische Charakterisierung von Mäusen nach 8-wöchiger Behandlung mit HFD und TEL	54
Abbildung 7. Die Neurovaskuläre Kopplung ist nach 8 Wochen weder durch HFD noch durch TEL beeinflusst	56
Abbildung 8. Die neurovaskuläre Kopplung ist nach 16 und 24 Wochen HFD beeinträchtigt	58
Abbildung 9. TEL verbessert den Phänotyp des metabolischen Syndroms nach einer HFD- Fütterung	60
Abbildung 10. HFD für 16 Wochen hat keinen Einfluss auf den Blutdruck	62
Abbildung 11. TEL schützt vor neurovaskulären Einschränkungen nach einer HFD-Fütterung ..	63
Abbildung 12. TEL normalisiert CBF nach einer HFD-Fütterung	64
Abbildung 13. HFD und TEL Effekte auf den Gefäßdurchmesser im <i>Circle of Willis</i>	66
Abbildung 14. TEL hat mögliche protektive Effekte auf die zerebrale Gefäßstruktur nach einer HFD-Fütterung	68
Abbildung 15. HFD and TEL haben abhängig von der Gehirnregion einen Effekt auf Marker für oxidativen Stress	70

Abbildung 16. TEL reduziert Angstverhalten nach einer HFD-Fütterung	72
Abbildung 17. Weder HFD noch TEL haben einen Effekt auf das Objektgedächtnis	74
Abbildung 18. Weder HFD noch TEL haben einen Effekt auf das Ortsgedächtnis	75
Abbildung 19. Protektive Wirkung von AT ₁ -Rezeptorblockern (ARB) hinsichtlich einer Demenzkrankung	93
Abbildung 20. Zusammenfassung der Ergebnisse	97
Abbildung S1. Bestimmung metabolischer Hormone im Plasma	123
Abbildung S2. Messung der Gewebepfusion während der Stimulation mit CO ₂	124
Abbildung S3. Gefäßquantifizierung der Immunhistochemie für String Vessel	125
Abbildung S4. Gefäßquantifizierung der Immunhistochemie für 4-HNE	126
Abbildung S5. Allgemein untersuchte Parameter während des Object Place Recognition Tests	127
Abbildung S6. 16 oder 24 Wochen HFD hat keinen Effekt auf den Lernprozess	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Risikofaktoren, die dem metabolischen Syndrom zugeordnet werden	4
Tabelle 2. Zusammensetzung des SDS Trenn- und Sammelgels.	49

Abkürzungsverzeichnis

4-HNE	4-Hydroxynonenal
A.	<i>Arteria</i>
ACA	<i>anterior cerebral artery</i>
ACE	Angiotensin-konvertierende Enzym, engl. <i>angiotensin converting enzyme</i>
Ang	Angiotensin
APS	Ammoniumpersulfat
ARB	AT ₁ -Rezeptor Blocker
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AUC	<i>area under the curve</i>
BA	<i>basilar artery</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CBF	zerebraler Blutfluss, engl. <i>cerebral blood flow</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col IV	Collagen IV
COX-2	Cyclooxygenase 2
DTT	Dithiotriol
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	extrazellulär Signal-regulierten Kinase
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide</i>
HFD	Hochfett-diät
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. <i>horse radish peroxidase</i>
ICA	<i>internal carotid arteries</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IVC	<i>individually ventilated cage</i>
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KON	Vehikelkontrolle
LSI	<i>Laser Speckle Imaging</i>
MAD	mittlerer arterieller Druck
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MCA	<i>middle cerebral artery</i>
MCP-1	Monozyten chemotaktische Protein 1
MRT	Magnetresonanztomographie
NFD	Normalfettdiät
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCA	<i>posterior cerebral artery</i>
PFA	Paraformaldehyd
Plin2	Perilipin 2
RAS	Renin-Angiotensin-System
RT	Raumtemperatur
SADS	<i>Senescence-associated distension of satellites</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes, engl. <i>standard error of the mean</i>
SMC	<i>smooth muscle cells</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEL	Telmisartan

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TOF	<i>time-of-flight</i>
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol

Publikationen

Huber, G., Ogrodnik, M., Wenzel, J., Stölting, I., Huber, L., Will, O., Peschke, E., Matschl, U., Hövener J.B., Schwaninger, M., Jurk, D. & Raasch, W. (2021) Telmisartan prevents high-fat diet-induced neurovascular impairments and reduces anxiety-like behavior. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 271678X211003497

Wenzel, J., Hansen, C. E., Bettoni, C., Vogt, M. A., Lembrich, B., Natsagdorj, R., **Huber, G.**, Brands, J., Schmidt, K., Assmann, J. C., Stölting, I., Saar, K., Sedlacik, J., Fiehler, J., Ludewig, P., Wegmann, M., Feller, N., Richter, M., Müller-Fielitz, H., Walther, T., König, G. M., Kostenis, E., Raasch, W., Hübner, N., Gass, P., Offermanns, S., de Wit, C., Wagner, C. A. & Schwaninger, M. (2020) Impaired endothelium-mediated cerebrovascular reactivity promotes anxiety and respiration disorders in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 117, 1753-1761

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

Huber, G., Schuster, F. & Raasch, W. (2017) Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Pharmacological research*. 125, 72-90

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Walter Raasch für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie anfertigen zu können. Ich habe in dieser Zeit auf verschiedenen Ebenen viel gelernt und bin sehr dankbar dafür, dass die Zusammenarbeit mit Herrn Raasch immer produktiv und auf Augenhöhe war. Auf der einen Seite wurde mir das Vertrauen entgegengebracht, eigenständig zu arbeiten und eigene Ideen für das Projekt einzubringen; auf der anderen Seite wurde mir immer die nötige Unterstützung gegeben, Vorhaben erfolgreich realisieren zu können - und besonders die Balance zwischen Vertrauen und Unterstützung wusste ich sehr zu schätzen, denn sie war ein Garant für die erfolgreiche Durchführung dieses Projektes.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Kollegen aus der Pharmakologie bedanken. Die Hilfsbereitschaft, gegenseitige Unterstützung oder einfach auch ein offenes Ohr bereicherten die Umsetzung von Projekten durch ein sehr angenehmes Arbeitsumfeld. Die gemeinsamen Verschnaufpausen beim Mittagessen taten ihr Übriges, um zwischendurch auch mal den Kopf frei von Institutsthemen zu bekommen und um regelmäßig den Glykogenspeicher wieder zu füllen. Insbesondere möchte ich mich hier bei Ines, Jan und Marius bedanken, die, wenn nötig, beim Schlunden oder an Perfusionstagen eingesprungen sind.

Außerdem bin ich meiner Familie und insbesondere Frank außerordentlich dankbar, dass sie mir stets den Rücken gestärkt und an mich geglaubt haben. Der private Ausgleich hat mir in dieser Zeit gutgetan und mir immer wieder Kraft geschenkt. Die Geduld und das Verständnis, dass ihr für mich hattet, hat diesen Weg um einiges erleichtert.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Lübeck, den 15. Dezember 2021

