

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
(Schwerpunkt: Endokrinologie und Diabetologie, Angiologie,
Nephrologie und Klinische Chemie)
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H.-U. Häring**

**Bedeutung des Apelin für Frühatherosklerose und
Glukosestoffwechsel – Querschnittsanalytische
Betrachtung eines prädiabetischen Kollektivs**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Ursula Christiane Hildebrandt
aus
Düsseldorf
2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. B. Balletshofer

2. Berichtstatter: Professor Dr. U. Stock

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Atherosklerose und Inflammation.....	1
1.2	Endotheliale Dysfunktion.....	2
1.3	Adipositas und Fettverteilungsmuster.....	2
1.4	Insulinresistenz.....	4
1.5	Diabetes mellitus Typ 2.....	5
1.6	Adipozytokine.....	7
1.7	Apelin.....	7
1.8	Fragestellung.....	8
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Probanden.....	9
2.1.1	Einschlusskriterien.....	9
2.1.2	Ausschlusskriterien.....	9
2.2	Methoden.....	10
2.2.1	Oraler Glucose-Toleranz-Test (oGTT).....	10
2.2.2	Messung der peripheren Endothelfunktion.....	10
2.2.2.1	Flussassoziierte Dilatation in Prozent (FAD%).....	11
2.2.2.2	Endothelunabhängige Vasodilatation in Prozent (GTN%).....	11
2.2.2.3	Intima-Media-Dicke (intima-media-thickness, IMT).....	12
2.2.2.4	Prinzip und Durchführung der Messungen.....	12
2.2.3	Evaluation der Apelin-36 Plasma-Spiegel.....	14
2.2.3.1	Prinzip des ELISA.....	14
2.2.4	Kernspintomographische Untersuchungen der Körperfettverteilung...	14
2.2.5	Statistische Auswertung.....	15
2.3	Berechnungen.....	16
2.3.1	Insulinsensitivitätsindex (Matsuda-Index).....	16
2.3.2	Body-Mass-Index (BMI).....	16
2.3.3	Messung des Taillenumfanges.....	17

3	Ergebnisse.....	18
3.1	Übersicht aller erhobener Parameter der Studienpopulation.....	18
3.2	Apelin-Spiegel im Serum und Gefäßparameter.....	19
3.3	Apelin-Spiegel im Serum und Fettverteilungsmuster.....	20
3.4	Apelin-Spiegel im Serum und Parameter des Glukosestoffwechsels...22	
4	Diskussion.....	24
4.1	Apelin und Präatherosklerosemarker (ED und IMT).....	24
4.2	Apelin und Glukosestoffwechselfparameter und Adipositas.....	26
4.3	Fazit.....	28
5	Zusammenfassung.....	29
6	Anhang.....	30
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	30
6.2	Graphiken.....	32
6.3	Paper.....	35
6.4	Literaturverzeichnis.....	40
6.5	Danksagung.....	47
6.6	Lebenslauf.....	48

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose und Inflammation

Die Atherosklerose wird heute allgemein als eine chronisch-entzündliche Erkrankung angesehen. So konnte beispielsweise der Zusammenhang zwischen einem Anstieg verschiedener Entzündungsparameter wie dem C-reaktiven Protein (CRP) mit dem Vorliegen einer Atherosklerose oder deren Frühstadien gezeigt werden (5, 7, 33).

Für die Entstehung der Atherosklerose werden zwei prinzipiell unterschiedliche Gruppen von Risikofaktoren unterschieden. Zum einen die Unveränderlichen, zu denen z.B. Alter, männliches Geschlecht und genetische Merkmale gehören; zum anderen die prinzipiell Veränderlichen, oder Erworbenen wie das Rauchen, die Hypertonie und die Adipositas sowie der Diabetes mellitus. Die drei letztgenannten sind im Rahmen des „metabolischen Syndroms“ eng miteinander verbunden (30). Die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung potenziert sich bei Vorliegen mehrerer dieser Risikofaktoren entsprechend (56). Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass die Adipositas nicht nur ein Epiphänomen der Insulinresistenz ist, sondern dass Fettgewebe selbst aktiv Zytokine („Adipokine“) sezerniert und damit den Krankheitsprozess moduliert (28).

Ferner gibt es Hinweise, dass ein „cross talk“ zwischen Fettgewebe und arteriellen Blutgefäßen existiert, der über eine Modulation des NO-Synthese pathways eine endotheliale Dyfunktion (s.u.) als frühfunktionelle Vorstufe der Atherosklerose triggern könnte.

Die Mechanismen dieses cross-talks sind jedoch noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller sowohl klinischer, als auch Grundlagenforschung.

1.2 Endotheliale Dysfunktion

Der Begriff der endothelialen Dysfunktion (ED) ist in erster Linie eine klinische Beschreibung. Sie steht für eine Funktionsstörung des Endothels, die den morphologischen Veränderungen, die für die klinische Manifestation der Atherosklerose verantwortlich sind, vorausgeht und vom Patienten in der Regel unbemerkt bleibt. Der endothelialen Dysfunktion - im Sinne einer gestörten Dilatationsfähigkeit arterieller Gefäße - liegt eine verminderte NO Bioverfügbarkeit zugrunde, die sowohl einer verminderten Produktion oder einem beschleunigten Abbau geschuldet sein kann. Eine mögliche Ursache für einen vaskulären NO-Mangel kann z.B. durch eine Insulinresistenz, einem manifesten Diabetes mellitus zurückgeführt werden (23). Diese Entitäten gehen häufig mit einer subklinischen Inflammation einher, die die Halbwertszeit des NO und damit seine Bioverfügbarkeit signifikant reduziert.

Man kann die endotheliale Dysfunktion als einen der frühesten quantifizierbaren Parameter einer beginnenden Atherosklerose bezeichnen (12). Die Funktionsstörung umfasst dabei alle NO-vermittelten Funktionsbereiche, also die Regulation der Gefäßweite, die Permeabilität der Gefäße, die Modulation der adhäsiven Eigenschaften für Monozyten und die Thrombozytenaggregation. Die funktionelle Veränderung geht der morphologischen Veränderung voraus und ist im Gegensatz zu dieser reversibel (63). Daraus ergibt sich ein Ansatz für eine effektive Primärprävention der Atherosklerose.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit angewandten hochauflösenden Ultraschallmethode (vgl. 2.2.2) ist es möglich, lange bevor man morphologische Veränderungen oder klinische Symptome bei den Patienten ausmachen kann, diese frühfunktionelle Störung sichtbar zu machen (3, 13, 24).

1.3 Adipositas und Fettverteilungsmuster

Die Adipositas zählt heute in den westlichen Industrieländern zu den häufigsten Ursachen für eine gesteigerte Mortalität (49) und ist als ein zentraler Bestandteil

des metabolischen Syndroms eng mit der Insulinresistenz, dem Diabetes mellitus der endothelialen Dysfunktion und der arteriellen Hypertonie vergesellschaftet (39). Ferner ist bekannt, dass das Fettgewebe maßgeblich an der Sezernierung proinflammatorischer Zytokine beteiligt ist, welche den Prozess des metabolischen Syndroms pathophysiologisch triggern (51, 62).

Adipositas ist unter anderem definiert als ein Fettmasseanteil vom Körpergewicht bei Frauen von mehr als 30% und bei Männern von mehr als 20%.

Die Ursachen der Adipositas sind vielfältig. Generell unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Adipositas. Bei der primären Adipositas spielen genetische und psychische Faktoren, aber auch die Lebensweise eine Rolle. Diskutiert wird beispielsweise eine Leptinresistenz (27). Bei der sekundären Adipositas kommen endokrinologische Erkrankungen wie z.B. der Morbus Cushing, eine zentrale Störungen mit Hypophysentumor und erhöhter ACTH-Produktion zum Tragen. Es besteht generell ein Ungleichgewicht zwischen dem Energieverbrauch und der Energiezufuhr.

Zur Klassifizierung des Grades der Adipositas richtet man sich heute nach dem Body-Mass-Index (BMI), der sich aus dem Körpergewicht in Kilogramm geteilt durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat errechnet. Ein normaler BMI liegt zwischen 18,5 und 24,9. Ab einem BMI von 30 spricht man von erstgradiger Adipositas, eine Adipositas Grad II ist ab einem Wert von 35 erreicht, ab einem BMI von 40 spricht man von Adipositas Grad III.

Innerhalb der letzten 40 Jahre stieg der mittlere BMI in der deutschen Bevölkerung von 21 auf 26 an und liegt damit schon über dem Normbereich (45). Stevens et al. stellten in ihrer Studie die Korrelation eines steigenden BMI mit dem relativen Risiko eines kardiovaskulären Todes dar (59).

Der BMI berücksichtigt jedoch nicht den individuellen Anteil von Muskel- und Fettmasse und ist somit nur ein grobes Richtmaß. Ein weiter wichtiger Parameter zur Abschätzung der Adipositas ist daher die Messung des Taillenumfanges, denn wie man heute weiß, spielt die Fettverteilung ebenfalls eine große Rolle in der Begünstigung von Begleiterkrankungen (20, 50).

Von „abdomineller Adipositas“ spricht man ab einem Taillenumfang von mehr als 94 cm bei Männern und mehr als 80 cm bei Frauen (1).

Der Taillenumfang ist der einfachste anthropometrische Index zur Beurteilung der intraabdominellen Adipositas (IAA). Die Messung des Taillenumfanges korreliert eng mit der direkten IAA-Messung mittels CT-Scan oder MRT, die beide als Goldstandard gelten (19, 50). Sowohl bei Männern als auch bei Frauen nahm der Taillenumfang in den letzten 4 Jahrzehnten deutlich zu (47).

In Studien der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass jedoch nicht die absolute Fettmenge für das Auftreten einer Insulinresistenz entscheidend ist, sondern das Fettverteilungsmuster dabei eine große Rolle spielt (51, 53, 58). Darüber hinaus ist nicht nur die Lokalisation ausschlaggebend für das Auftreten einer Insulinresistenz, sondern auch die endokrine Aktivität des entsprechenden Fettgewebskompartmentes.

Insbesondere beim viszeralen Fett und beim perivaskulären Fett (53) zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang mit der Gesamtkörper-Insulinsensitivität. Das Fettgewebe ist neben seiner Aufgabe zur Fettspeicherung und Sekretion von Lipiden auch ein endokrines Organ, so dient es der Sekretion von Zytokinen und proinflammatorischen Molekülen, wie z.B. Interleukin-6, Apelin oder Tumor-Nekrose-Faktor (20). Man geht davon aus, dass über diese endokrinen Signaltransduktionswege die Insulinsensitivität erheblich beeinflusst wird. Ob, und wenn ja wie Apelin die Insulinresistenz beeinflusst wird aktuell kontrovers diskutiert.

1.4 Insulinresistenz

Die Insulinresistenz wird definiert als ein Mehrbedarf bzw. die verminderte Wirkung von Insulin, zum Beispiel infolge einer Störung der Interaktion zwischen Insulin und seinem Rezeptor an der Zelloberfläche bzw. der Signaltransduktion in der Zelle (48). Als häufigste Ursache für eine Insulinresistenz wird neben einer genetischen Disposition die Adipositas angesehen (16), aber auch andere Erkrankungen wie z.B. die

Hypertriglyzeridämie, eine Vermehrung kontrainsulinärer Hormone oder Infektionen können zu einer - teils passageren - Insulinresistenz führen. Immer mehr Bedeutung kommt hierbei auch der Körperfettverteilung zu (siehe 1.3). Betroffen sind bei der Insulinresistenz nicht nur die Effekte auf den Glukose-, Lipid- und Proteinstoffwechsel, sondern auch die auf die Gefäße. Nicht zwangsläufig jedoch folgt auf die Insulinresistenz die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes (29). Auffallend häufig findet man eine Insulinresistenz auch bei normoglykämischen Patienten mit Erkrankungen aus dem Bereich der Fettstoffwechselstörungen wie z.B. Hypertriglyceridämie oder Adipositas (17), jedoch sind 80-90% der Typ 2 Diabetiker insulinresistent (9). In Folge dieser Assoziation von Glukose- und Fettstoffwechselstörungen wurden die Forschungen zum Verständnis des Typ 2 Diabetes und seiner Folgerkrankungen auf den Fettmetabolismus ausgedehnt (44).

1.5 Diabetes mellitus Typ 2

Dem Diabetes mellitus Typ 2 liegt in aller Regel eine Insulinresistenz zugrunde. In der Folge versucht die pankreatische β -Zelle diese durch vermehrte Ausschüttung von Insulin zu kompensieren. Die hierdurch hervorgerufene Hyperinsulinämie verstärkt durch ihre anabole Wirkung den Mechanismus der Insulinresistenz durch weiteren Aufbau der Fettmenge, wodurch es zu einem „circulus vitiosus“ kommt (18). In der Folge erschöpft sich das endokrine Pankreas und es kommt zum sogenannten Sekundärversagen der β -Zelle mit dem Bild des klinisch manifesten Typ 2 Diabetes.

Zwischen der normalen Glukosetoleranz von Gesunden und dem Vorliegen eines manifesten Diabetes mellitus befindet sich der Zustand der gestörten oder eingeschränkten Glukosetoleranz, eine Vorstufe des Typ 2-Diabetes. Liegt eine eingeschränkte Glukosetoleranz vor, ist das Risiko an einem Typ 2-Diabetes zu erkranken deutlich erhöht, bei mindestens einem Drittel der Individuen mit einer eingeschränkten Glukosetoleranz entwickelt sich innerhalb von 10 Jahren ein manifester Diabetes mellitus (31).

Nach längerer Krankheitsdauer mit chronischer Hyperglykämie kann es zu diabetesspezifischer Mikro- und Makroangiopathie mit Schäden an Blutgefäßen und Nervensystem kommen (26).

Die Prävalenz der Erkrankung ist zum einen ethnisch bedingt und ist zum anderen altersabhängig und steigt mit dem Ausmaß der Überernährung (31).

Die World Health Organisation (WHO) und die American Diabetes Association (ADA) definieren als Kriterien für die Diagnose „Diabetes mellitus“ beim Menschen entweder

- eine Hyperglykämie (≥ 200 mg/dl Plasmaglucoese) bei klassischer Diabetes-Symptomatik wie Polyurie und Polydipsie

oder

- einen erhöhten Nüchternblutzucker (≥ 126 mg/dl Plasmaglucoese)

oder

- erhöhte Plasma-Glucose-Werte während eines oralen Glucose-Toleranz-Testes (≥ 200 mg/dl zwei Stunden nach Gabe von 75mg Glucose) (25).

Der Typ 2-Diabetes ist in den westlichen Industrieländern die häufigste Ursache für Erblindungen, terminaler dialysepflichtiger Niereninsuffizienz und Amputationen. Auch die gesundheitsökonomischen Konsequenzen sind enorm (55).

Häufig kommt es aufgrund der verminderten insulinstimulierten Glukoseaufnahme in die Muskelzelle und den dadurch erhöhten Blutzuckerspiegeln, lange bevor diese sich klinisch bemerkbar machen, zu atherosklerotischen Gefäßveränderungen. Zum Zeitpunkt der Diagnose des Typ 2-Diabetes liegen bereits bei 40-60% der Patienten Schäden an verschiedenen Organsystemen vor (35).

Es konnte gezeigt werden, dass durch eine konsequente Behandlung, besonders durch nicht-medikamentöse Maßnahmen im Sinne einer Lebensstilmodifikation (Diät, gesteigerte körperliche Aktivität, etc.) eine Vielzahl der diabetestypischen Folgeerkrankungen verhindert oder zumindest reduziert

werden können, und der Zeitpunkt des Auftretens eines manifesten Diabetes mellitus bei genetischer Prädisposition nach hinten verschoben werden kann (36).

Im Hinblick auf diese Kenntnisse ist es im Sinne einer Primärprävention des Diabetes mellitus Typ 2 und der mit ihm vergesellschafteten Folgeerkrankungen wichtig, weitere pathophysiologisch potentiell bedeutsame Marker zu identifizieren, die eine Risikoabschätzung und die Vorhersage des Auftretens dieser Erkrankungen erlauben.

1.6 Adipozytokine

Adipozytokine werden von endokrin aktiven Fettzellen sezerniert (62). Sie beeinflussen unter anderem den Energiestoffwechsel und die Insulinsensitivität. Adipozytokine werden als das potentiell fehlende Bindeglied einer Verknüpfung von erhöhtem Körpergewicht und Insulinunempfindlichkeit und daraus folgend der frühen Atherosklerose diskutiert.

1.7 Apelin

Apelin ist ein Adipozytokin welches von weißem Fettgewebe produziert wird und aus 36 Aminosäuren besteht. Die Untersuchungen der letzten Jahre beleuchten seine potentielle Rolle im kardiovaskulären System. Im Jahre 2002 konnte gezeigt werden, dass Apelin bei Nagetieren positiv inotrop wirkt (2, 8, 60). Li et al. konnten ferner zeigen, dass Patienten mit einer stabilen Angina-pectoris-Symptomatik deutlich weniger Serum-Apelin aufweisen als die Kontrollgruppe gesunder Probanden (40). Des Weiteren wird der Einfluss von Apelin auf die Gefäßelastizität und den Blutdruck diskutiert. Hierbei scheinen zwei verschiedene Mechanismen eine Rolle zu spielen. Zum Einen spielt Apelin eine entgegen gesetzte Rolle zum Angiotensin-II-/Angiotensin-Rezeptor-

System, zum Anderen wird ein eNOS-abhängiger vasodilatierender Effekt diskutiert, welcher teilweise über den AKT/PI3-Kinase Weg wirksam werden soll (34, 37, 61, 66).

Des Weiteren wurde unlängst berichtet, dass Apelin bei krankhaft fettleibigen Patienten, im Gegensatz zu normalgewichtigen Kontrollpersonen erhöht ist (57). Andererseits wurden bei Mäusen potentiell positive Effekte in der Regulation des Glucosestoffwechsels gezeigt (21, 65), was vorgenannten Ergebnissen zu widersprechen scheint.

1.8 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen, ausgehend von den zum Apelin vorliegenden – im wesentlichen Tierexperimentellen und *in vitro* Studien – *in vivo* beim Menschen folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Besteht eine Korrelation zwischen Apelin Serumspiegeln und der Gefäßfunktion oder der Intima Media Dicke als frühfunktionelle- bzw. frühmorphologische Atherosklerosemarker?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen Adipositas, absoluter Körperfettmasse, bzw. Körperfettverteilung und Apelin?
- Besteht eine Assoziation zwischen Apelin und der Insulinresistenz?

2 Material und Methoden

2.1 Probanden

Es wurden insgesamt 344 Probanden untersucht, davon waren 216 Frauen und 128 Männer, das Durchschnittsalter betrug 46.4 +/- 0.6 Jahre. Alle Probanden nahmen am Tübinger Lebensstil Interventionsprogramm (TULIP) teil.

2.1.1 Einschlusskriterien

Eingeschlossen in die Studie wurden Personen, die eines oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllten:

- eine erstgradige Verwandtschaft mit einem Typ-2-Diabetiker
- ein früherer Gestationsdiabetes
- eine eingeschränkten Glucosetoleranz
- ein Body-mass-index (BMI) >27

2.1.2 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen von der Studie wurden Personen, die eines oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllten:

- bestehender manifester Diabetes mellitus
- bestehende Schwangerschaft oder Stillzeit
- klinisch manifeste Atherosklerose
- psychiatrische Erkrankungen

2.2 Methoden

2.2.1 Oraler Glucose-Toleranz-Test (OGTT)

Im Vorfeld des Tests wurden die Probanden angehalten, in den Tagen vor der Untersuchung ihre gewohnte körperliche Aktivität und die üblichen Ernährungsgewohnheiten beizubehalten. Zehn Stunden vor dem Test nahmen die Studienteilnehmer keine Nahrung mehr zu sich.

Zu Beginn der Untersuchung wurde den Teilnehmern morgens um 8 Uhr ein peripherer venöser Verweilkatheter in einer Vene des Armes platziert. Anschließend erfolgte die erste Blutentnahme, danach nahm jeder Proband 300 ml einer oralen Glucoselösung, welche 75 g Glucose enthielt (Dextro O.G.T.®, Hoffmann – La Roche AG) zu sich. Es folgten weitere Blutentnahmen nach 30 min, 60 min und 120 min. Während des Untersuchungszeitraumes verzichteten die Probanden auf körperliche Aktivität, Nahrungsaufnahme und Rauchen.

Das abgenommene Blut wurde auf Plasmaglukose, Plasmainsulin, freie Fettsäuren und Adipozytokine im Plasma untersucht.

Nach den Kriterien von Matsuda & DeFronzo wurde aus den Daten des oralen Glucose-Toleranz-Tests ein Insulin-Sensitivitäts-Index berechnet (43).

2.2.2 Messung der peripheren Endothelfunktion

Zur Erhebung der Blutflussgeschwindigkeit und der flussassoziierten Dilatation (FAD%) wurde eine nicht-invasive Methode nach Celermajer et al. (14) verwendet. Diese Methode bedient sich einer post-ischämischen Vasodilatation, bedingt durch einen erhöhten Blutfluss in der proximalen A. brachialis und

folgender stressinduzierter Aktivierung von eNOS mit daraus resultierender NO-Freisetzung und anschließender Vasodilatation. Dadurch, dass diese Dilatation durch N-monomethyl-L-arginine, einem Inhibitor der endothelialen NO-Synthase, blockiert werden kann, konnte bewiesen werden, dass die Vasodilatation endothelabhängig ist (38).

2.2.2.1 Flussassoziierte Dilatation in Prozent (FAD%)

Der Wert, der repräsentativ für die Endothelfunktion bzw. -dysfunktion ist, ist die FAD%. Einer der stärksten Reize für eine NO-Freisetzung an der Endothelzelle ist die Zunahme des Blutflusses. Ein Parameter für frühfunktionelle Störungen an den Gefäßen ist eine verminderte NO-Freisetzung bzw. NO-Wirkung mit verminderter Dilatation. Mit einer künstlich erzeugten Blutflusszunahme lässt sich die FAD% stimulieren und dadurch die Dilatationsfähigkeit der Gefäße bestimmen, indem das Gefäßvolumen vor (LD_rest) und nach dem flussassoziierten Dilatationsreiz gemessen wird.

2.2.2.2 Endothelunabhängige Vasodilatation in Prozent (GTN%)

Nach einer Ruhephase erfolgt nach einer sublingualen Gabe von 0.4 mg Glyceroltrinitrat (GTN) als externer NO-Donator, eine erneute Kontrollmessung, um zwischen einer verminderten NO-Freisetzung und einer verminderten Sensibilität gegenüber NO unterscheiden zu können.

Eine durch Glyceroltrinitrat (GTN) als externer NO-Donator verursachte Gefäßdilatation erfolgt durch eine Relaxation der Gefäßmuskulatur (tunica media), also endothelunabhängig, sie wird als GTN% angegeben. Hierdurch können größere und fortgeschrittenere Gefäßwandveränderungen wie z.B. Plaques oder eine Mediasklerose im Vorfeld ausgeschlossen werden.

2.2.2.3 Intima-Media-Dicke (intima-media-thickness, IMT)

Gemäß den bekannten sonomorphologischen Kriterien (64), wird die IMT am Bulbus beider Aa. Carotis communis gemessen. Sie gilt als ein frühmorphologisches Zeichen bei einer Veränderung der Gefäßwände.

2.2.2.4 Prinzip und Durchführung der Messungen

Alle Messungen werden unter standardisierten Bedingungen bei einer konstanten Raumtemperatur von 25 °C durch erfahrene Untersucher durchgeführt. Die intra-individuellen Schwankungen der FAD und IMT-Messungen nach zwei Trainingsperioden von wenigstens 30 bis 50 Übungsmessungen liegen unter 1%. Der Abweichungskoeffizient der Ausgangsparameter wie auch der post-ischämischen Parameter und der IMT ist unter 0.5 (4). Die FAD- und IMT-Messungen werden vor den laborchemischen Tests und der Genotypisierung durchgeführt.

Nach Eintreffen der Teilnehmer wird für eine ruhige und entspannte Atmosphäre gesorgt. Die Probanden legen sich möglichst bequem auf eine Liege. Durch mehrmalige Messung von Puls und Blutdruck wird der Ruhezustand überprüft. Es wird eine Blutdruckmanschette am abduziert und bequem auf Herzhöhe gelagerten rechten Unterarm angebracht. Während der Untersuchung wird fortwährend ein EKG zur R-Zacken getriggerten Feststellung des Messzeitpunktes in der Enddiastole des Herzzykluses abgeleitet.

Die Probanden müssen mindestens 10 Minuten ruhen, bevor die erste Messung (LD_rest) am rechten Oberarm durchgeführt wird. Um den Ruhezustand sicherzustellen werden 2-3-mal hintereinander Puls und Blutdruck gemessen.

Zur Bestimmung der FAD% wird eine Messstelle 2 bis 10 cm über dem Ellbogen auf Höhe des M. biceps markiert, so dass alle folgenden Messungen an derselben Stelle durchgeführt werden können. Der Arm befindet sich in Supinationsstellung, die rechte A. brachialis wird in Längseinstellung des Schallkopfes vermessen.

Zuerst werden, noch vor der Kompression, die mittlere Blutflussgeschwindigkeit und die Diameter der A. brachialis erhoben. Es wird ein hoch auflösendes Ultraschallgerät (AU5 Idea, Esaote Biomedica®, Genua, Italien) in Verbindung mit einem 13 MHz Schallkopf verwendet. Die axiale Auflösung beträgt 0,12 mm, bei einer Eindringtiefe von 1,0 - 4,5 cm. Hiernach wird der Unterarm der Probanden für 5 Minuten mit einem Manschettendruck von 250 mmHg komprimiert. Direkt nach Öffnen der Okklusion wird der post-ischämische Durchfluss gemessen, 45 – 60 Sekunden nach Öffnen der Manschette wird der post-ischämische Diameter der A. brachialis gemessen, da nach dieser Zeit mit der stärksten NO-Wirkung zu rechnen ist. In den 15 Minuten die zur Erholung für die A. brachialis benötigt werden, wird die IMT am Bulbus beider Aa. Carotis communis mittels des hochauflösenden Ultraschallgerätes an der schallkopffernen Wand an jeweils drei Stellen gemessen. Um von der Pulsphase abhängige Wanddickenunterschiede auszuschließen, erfolgt die Messung EKG getriggert. Die IMT wird beidseitig gemäß dem heute geforderten Standard aus zwei verschiedenen Beschallungswinkeln gemessen um einen möglichst zuverlässigen Messwert zu erhalten. Nach erfolgter Erholung wird die endothelunabhängige Vasodilatation (GTN/GTN%) der A. brachialis gemessen. Hierzu wird ein Hub (0.4 mg) Glyceroltrinitrat sublingual verabreicht, und nach exakt vier Minuten wird erneut der Lumendurchmesser der A. brachialis bestimmt, um zwischen einer verminderten NO-Freisetzung und einer verminderten Sensibilität gegenüber NO unterscheiden zu können.

FAD% und GTN% geben jeweils die prozentuale Abweichung in Bezug zum basalen Diameter unter Ruhebedingungen (LD_rest) an.

2.2.3 Evaluation der Apelin-36 Plasma-Spiegel

Die Apelin-36 Spiegel wurden per ELISA-Technik nach dem Herstellerprotokoll (Phoenix Pharmaceuticals ®) gemessen.

2.2.3.1 Prinzip des ELISA

Mit Hilfe eines ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) lassen sich spezifische Antigene quantitativ nachweisen. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der immunspezifischen Bindung von Antigenen und den zugehörigen Antikörpern (Sandwich-Prinzip). Ein für das zu untersuchende Antigen spezifischer monoklonaler Antikörper wird auf dem Boden einer Mikrotiterplatte adsorbiert. Die verschiedenen Proben werden aufgetragen und das vorhandene Antigen gebunden. Ein weiterer enzymgekoppelter spezifischer Antikörper wird aufgetragen und bindet an das Antigen. Anschließend wird eine Substratlösung zugefügt, die sich durch das gebundene Enzym verfärbt. Diese Farbentwicklung ist der Menge an gebundenen, und somit in den aufgetragenen Lösungen vorhandenen, Antigenen proportional und kann über das Lambert-Beer'sche Gesetz photometrisch bestimmt werden.

2.2.4 Kernspintomographische Untersuchungen der Körperfettverteilung

Das viscerale Fettgewebe wird mit einer axial T1- gewichteten Kernspintechnik bei einer Feldstärke von 1,5 T an einem Ganzkörpertomographen (Magnetom Sonata; Siemens Medical Solutions®) gemessen. Folgende Messparameter kommen zur Anwendung: Echozeit TE 12 ms, Wiederholungszeit TR 490 ms, Schichtdicke 10mm, 5 Schichten pro Sequenz, 10 mm Spalt zwischen den Schichten. Innerhalb von 12 Sekunden kann ein Gewebe von 256 x 178 mm aufgenommen werden, dies erlaubt eine abdominelle Datenerfassung bei

angehaltenem Atem. Die Probanden liegen in Bauchlage mit nach oben ausgestreckten Armen. Die Körperspule dient als Receiver. Um eine absolut identische Position der Probanden bei einer erneuten Positionierung zu gewährleisten, werden die Probanden am Beckenkamm markiert. Die vollständige Reproduzierbarkeit der Messungen wurde an drei Probanden überprüft. Beide Datenerhebungen werden am gleichen Tag durchgeführt. Die Probanden müssen den Scanner vollständig verlassen und werden anschließend neu positioniert. Die Menge des visceralen Fettgewebes in cm^2 quantifiziert man unter Verwendung der Software des Tomographen (42).

Die Menge des visceralen Fettes ist von besonderer Bedeutung, da sie ein starker Prediktor der Insulinresistenz ist (20).

2.2.5 Statistische Auswertung

Die Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Univariate Korrelationsanalysen wurden für die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, oder die Parameter bei denen ein Einfluss auf die unabhängige Variable der Fragestellung bekannt ist, verwendet. Eine Logarithmisierung kam zur Anwendung wenn keine Normalverteilung vorlag. Multivariate lineare Regressionsanalysen wurden durchgeführt mit FMD, IMT und Insulinresistenz als abhängige Variablen unter Berücksichtigung aller univariat assoziierten Parameter mit einem p-Wert < 0.1 . Ein p-Wert kleiner 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Die Analysen wurden unter Verwendung des JMP statistical software package 4.0.4 (SAS Institute®) durchgeführt.

2.3 Berechnungen

2.3.1 Insulinsensitivitätsindex (Matsuda-Index)

Die abgeschätzte Insulinsensitivität ISI_{est} ist ein Parameter des Kohlenhydratstoffwechsels. Sie wird aus den Daten des oralen Glukose-Toleranz-Tests mit Hilfe des Matsuda-Index ermittelt:

$$ISI_{est} = \frac{1000}{\sqrt{(FPG \times FPI) \times (mGlc \times mIns)}}$$

Hierbei steht FPG für den Nüchternglukosewert, FPI für den Nüchterninsulinwert, mGlc für die mittlere OGTT-Glukose-Konzentration und mIns für die mittlere OGTT-Insulin-Konzentration.

mGlc = Mittelwert (BZ₀, BZ₃₀, BZ₆₀, BZ₉₀, BZ₁₂₀)

mIns = Mittelwert (Ins₀, Ins₃₀, Ins₆₀, Ins₉₀, Ins₁₂₀)

2.3.2 Body-Mass-Index (BMI)

Der BMI errechnet sich aus dem Körpergewicht in Kilogramm geteilt durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat.

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Körpergröße (m)}^2}$$

Normwerttabelle BMI:

	BMI kg/(m) ²
Untergewicht	Unter 18,5
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Übergewicht	25,0 – 29,9
Adipositas Grad I	30,0 – 34,9
Adipositas Grad II	35,0 – 39,9
Adipositas Grad III	40 oder mehr

2.3.3 Messung des Taillenumfanges

Zur Messung des Taillenumfanges wird ein Maßband um den bloßen Bauch, zwischen unteren Rippenbogen und Beckenkamm, gelegt. Das Band sollte dabei fest anliegen, die Haut jedoch nicht eindrücken. Während der Messung sollte der Patient entspannt sein und ausatmen.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht aller erhobener Parameter der Studienpopulation

(n=344; w/m=216/128)		Mittelwert \pm SA	Bereich
Alter	(Jahre)	46.2 \pm 0.6	18 - 69
Syst. Blutdruck	(mmHg)	129 \pm 1	80 - 216
Diast. Blutdruck	(mmHg)	80 \pm 1	45 - 118
Raucher	(y/n)	36/301 (7 fehlen)	-
Gewicht	(kg)	87.9 \pm 1.0	52.5 – 189.8
BMI	(kg/m ²)	30.1 \pm 0.3	19.4 – 51.0
Körperfettanteil	(%)	33.1 \pm 0.5	9.8 – 58.3
Gesamtfettgewebe	(kg)	30.1 \pm 0.6	7.1 – 72.5
Viszerales Fettgewebe	(kg)	3.0 \pm 0.1	0.25 – 10.1
Nüchtern-Glukose	(mmol)	5.3 \pm 0.03	4.2 – 6.6
2h Glukose	(mmol)	7.0 \pm 0.1	3.6 – 11.06
Nüchtern-Insulin	(mU/l)	63.4 \pm 2.3	17.0 – 373.0
ISI-Matsuda	(Index)	12.6 \pm 0.4	1.6 – 33.4
Triglyceride	(mmol/l)	1.4 \pm 0.06	0.3 – 9.8
Gesamt-Cholesterin	(mmol/l)	5.1 \pm 0.05	2.5 – 9.1
High-density-Cholesterin	(mmol/l)	1.4 \pm 0.02	0.7 – 2.4
Low-density-Cholesterin	(mmol/l)	3.2 \pm 0.04	1.0 – 5.8
Basal Diameter	(mm)	3.7 \pm 0.04	2.0 – 5.5
FMD	(%)	6.4 \pm 0.2	0.0 – 26.2
GTN-dilation	(%)	18.9 \pm 0.4	0.7 – 42.2
Intima-media-Dicke	(mm)	0.56 \pm 0.01	0.28 – 0.98
Apelin	(ng/ml)	1.8 \pm 0.1	0.3 – 17.5

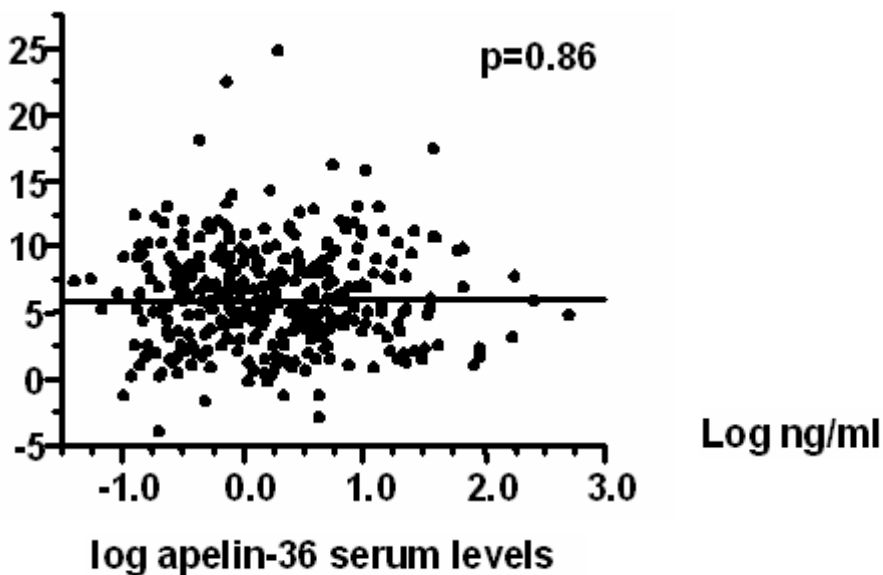
Tabelle 1: Anthropometrische Daten, Gefäßparameter und Laborergebnisse der Studienpopulation.

3.2 Apelin-Spiegel im Serum und Gefäßparameter

Angepasst an Alter und Geschlecht konnten wir keinen signifikanten Einfluss von Apelin auf den systolischen ($p=0.14$) sowie auf den diastolischen Blutdruck feststellen, wenn sich auch eine Tendenz zu niedrigeren diastolischen Blutdruckwerten bei höheren Apelin-Spiegeln abzeichnen ließ ($p=0.08$, LSN $n=429$).

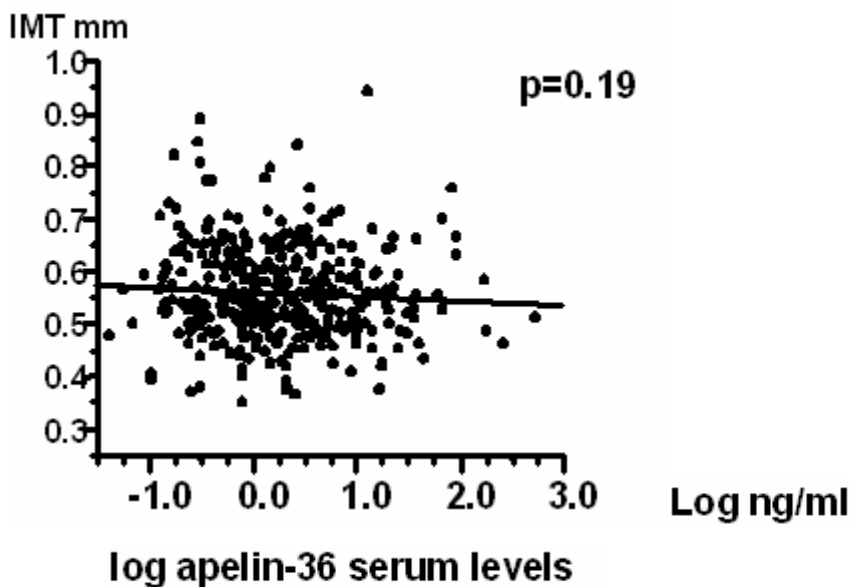
Um den Einfluss von Apelin auf die Gefäßelastizität zu überprüfen, untersuchten wir ob es einen Zusammenhang zwischen Apelin und der FAD der A. brachialis gibt. Diese Auswertung wurde an Alter, Geschlecht, systolischen Blutdruck und an die Ausgangsdiameter der Arterie angepasst. Hier zeigte sich eine negative Korrelation der FAD mit dem Alter ($p=0.0004$; $r=-0.19$) und den Ausgangsdiametern ($p<0.0001$; $r=-0.23$). Es zeigte sich jedoch kein Zusammenhang mit den Serumspiegeln von Apelin (siehe Graphik 1a).

FAD %



Graphik 1a: Zusammenhang zwischen Apelin und FAD

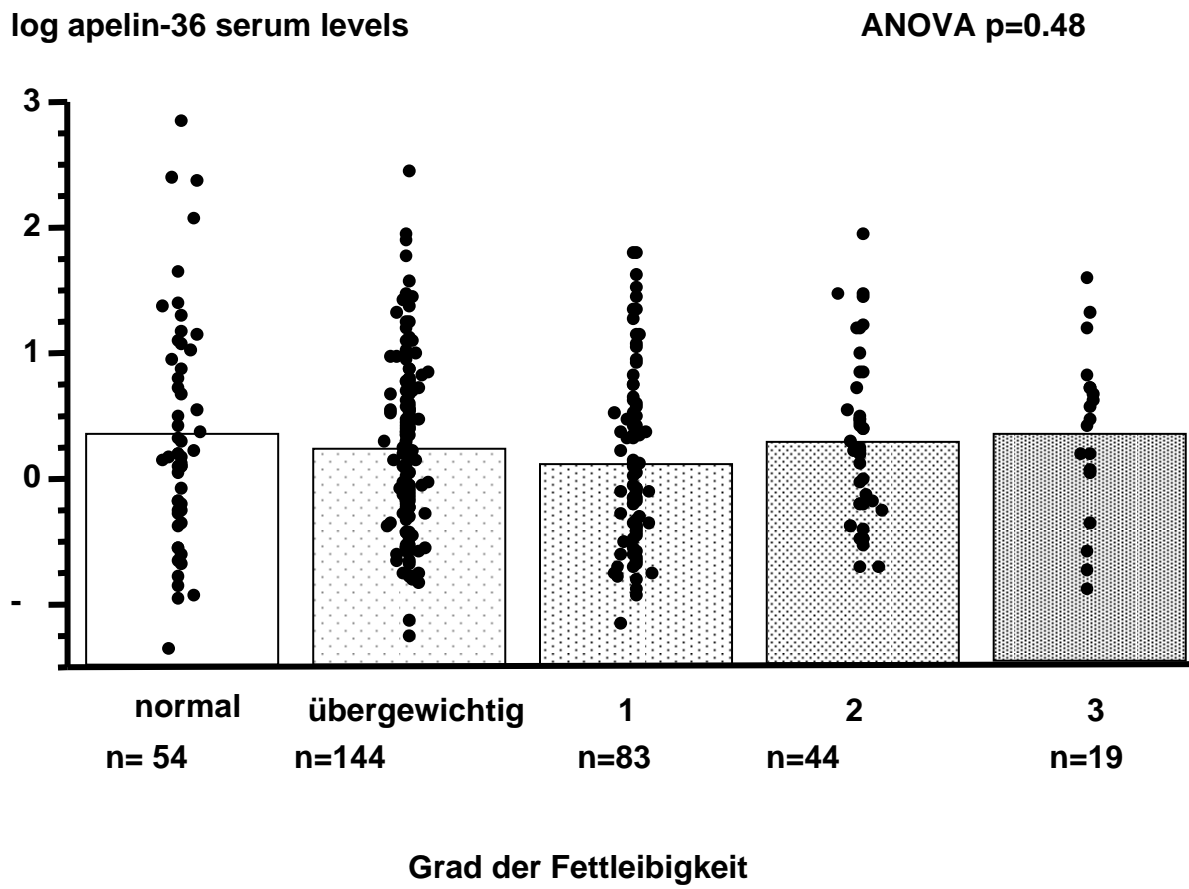
Ein weiterer wichtiger Parameter der frühen Atherosklerose ist die Intima-Media-Dicke der A. carotis communis. Sie repräsentiert frühe morphologische Veränderungen der Gefäßwand. Auch wenn sich eine starke Korrelation mit dem Alter fand, ließ sich keine Korrelation mit dem Serum-Apelin zeigen (siehe Graphik 1b).



Graphik 1b: Zusammenhang zwischen Apelin und der IMT

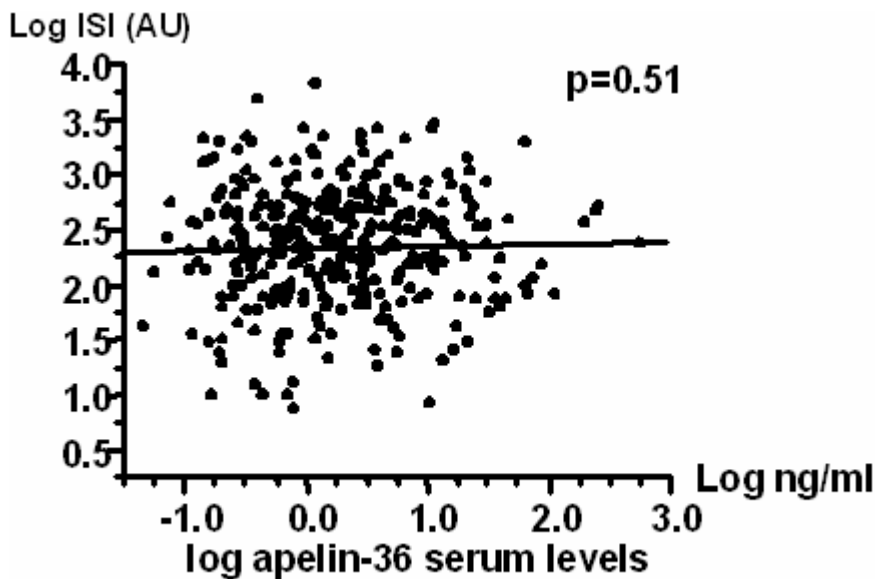
3.3 Apelin-Spiegel im Serum und Fettverteilungsmuster

Angepasst an Alter und Geschlecht korrelierte Apelin weder mit dem BMI ($p=0.89$), noch mit der absoluten Fettmasse, gemessen via MRT ($p=0.43$). Auch nach Unterteilung der Population in die entsprechenden Grade ihrer Adipositas (von Normalgewicht bis Adipositas Grad III) ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen in Hinblick auf den Serum-Apelin-Spiegel feststellen (siehe Graphik 2).



Graphik 2: Zusammenhang von Apelin und dem Grad der Fettleibigkeit

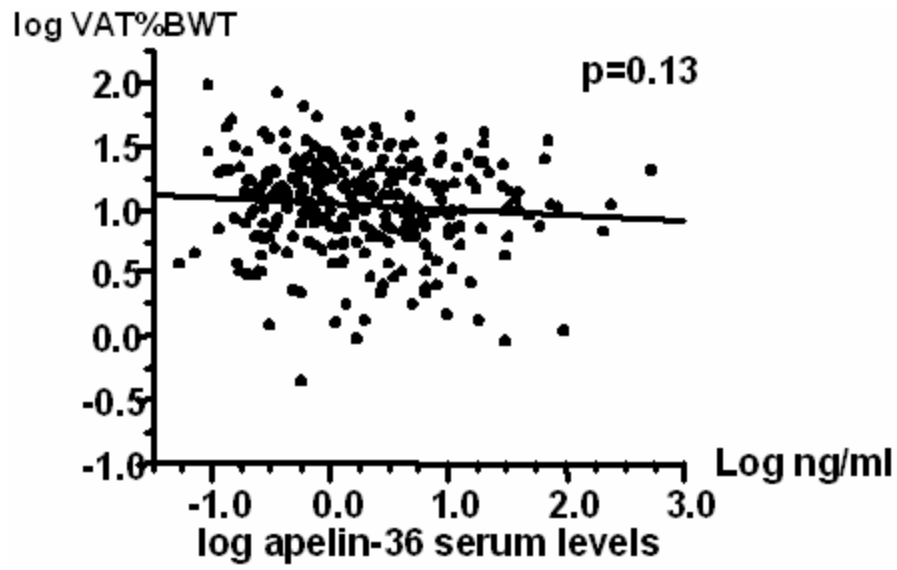
Obwohl das viscerale Fettgewebe stark abhängig von Geschlecht ($f = 2.1\text{kg} \pm 0.99$ vs. $m = 4.5\text{kg} \pm 0.16$; $p < 0.0001$) und Alter ($p < 0.0001$; $r = 0.45$) war, konnte auch hier kein Zusammenhang mit dem Serum-Apelinspiegel gefunden werden (siehe Graphik 1c).



Graphik 1c: Zusammenhang von Apelin und dem visceralem Fettgewebe

3.4 Apelin-Spiegel im Serum und Parameter des Glukosestoffwechsels

Auch diese Messungen wurden an Alter, Geschlecht und BMI angepasst. Beim oralen Glukose-Toleranztest zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Serum-Apelinspiegel und dem Nüchtern- oder zwei Stunden Glukosewert ($p = 0.73$ und $p = 0.66$). Der nach den Kriterien von Matsuda (43) berechnete Insulin-Sensitivitäts-Index korrelierte ebenfalls nicht mit den Serum-Apelin-Spiegeln (siehe Graphik 1d).



Graphik 1d: Zusammenhang von Apelin und dem Insulin-Sensitivitäts-Index

Siehe auch: **Anlage 6.3 Paper**

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie erarbeiteten wir den Zusammenhang des Serumspiegels des Adipozytokin Apelin mit den Frühzeichen einer Atherosklerose, wie endotheliale Dysfunktion und Intima-Media-Dicke. Des Weiteren sollte die Wirkung von Apelin auf die Insulin-Resistenz in vivo beleuchtet werden.

Die Studienpopulation bestand aus 344 Personen mittleren Alters.

4.1 Apelin und Präatherosklerosemarker (ED und IMT)

Der Einfluss von Apelin auf die Entstehung einer Atherosklerose ist unklar, und die physiologischen Aufgaben des Proteins sind umstritten.

So zeigten Hashimoto et al., dass Mäuse denen das ApoE Gen fehlte, und welche damit prinzipiell einen atherosklerotischen Phänotyp entwickeln können, im Falle eines gleichzeitigen „knockouts“ für Apelin und dessen Rezeptor (APJ^{-/-} / ApoE^{-/-}), signifikant weniger atherosklerotische Plaques entwickelten, als die Wildtyp Kontrolltiere, denen auch das ApoE Gen fehlt, bei denen aber der Apelin/Apelinrezeptor erhalten ist (32). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Verhinderung der Apelinwirkung einen protektiven Einfluss auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques haben könnte, und Apelin selbst somit im Umkehrschluss mit einem erhöhten Atherosklerose-Risiko vergesellschaftet sein müsste.

Diese Studie ist bislang jedoch die einzige, die zu einem solchen Schluss kommt. Die deutliche Mehrheit der Studien, sowohl tierexperimentell als auch am Menschen suggeriert dagegen einen kardiovaskulär protektiven Effekt des Apelin.

Beispielsweise konnte durch die i.v. Gabe von Apelin in ApoE^{-/-} Mäusen die Aktivität von Angiotensin II gehemmt werden. Dies führte zu einem reduzierten systolischen Blutdruck, über einen NO-abhängigen Mechanismus, dessen

Produktion gesteigert werden konnte (15, 34, 61). In Anbetracht der vaskuloprotektiven Eigenschaften von NO sprechen diese Ergebnisse für einen protektiven Effekt des Apelin auf die Gefäße.

Diese Studien wurden jedoch an Mäusen durchgeführt und sind somit nicht einfach auf den Menschen übertragbar. Ferner repräsentiert die externe Applikation eines Proteins keinen physiologischen Mechanismus, so dass diese Ergebnisse lediglich einen möglichen Hinweis auf die vaskuläre Rolle Apelins geben können.

Eine weitere Studie jedoch untersuchte die Wirkung von Apelin im Menschen. Hierzu injizierten Japp et al (37) bei 24 gesunden jungen Männer intraarteriell Apelin und maßen mittels Plethysmographie den arteriellen Fluss der Extremität vor und nach der Applikation. Hierbei wurde eine signifikante Zunahme des arteriellen Blutflusses beobachtet. Diese Ergebnisse sprechen abermals für einen Einfluss des Apelin auf den NO-Stoffwechsel. Allerdings sollte auch hier beachtet werden, dass es sich um ein artifizielles System handelte, und die verwendeten Mengen Apelin in supraphysiologischen Konzentrationen vorlagen.

Ausgehend von diesen Daten untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit, ob es einen Zusammenhang zwischen Apelin Serumspiegeln und dem Grad der endothelialen Funktion – einem Surrogatparameter für die NO-Bioverfügbarkeit - gibt.

Einen solchen Zusammenhang konnten wir in 344 Individuen jedoch nicht belegen.

Auch ein Zusammenhang mit dem systolischen oder diastolischen Blutdruck konnte nicht hergestellt werden.

Die Tatsache jedoch, dass bei Individuen mit einer manifesten KHK signifikant geringere Apelin Spiegel gemessen wurden als in einer gesunden Kontrollgruppe (10, 46), kann auf einen möglichen Wert des Apelin als Marker einer manifesten Atherosklerose hinweisen.

Hinsichtlich einer manifesten Atherosklerose kann die vorliegende Untersuchung keinen weiteren Aufschluss geben, da Patienten mit einer

klinisch manifesten Atherosklerose von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Als erste morphologische Manifestation einer Atherosklerose maßen wir jedoch die Intima-Media-Dicke der Probanden, und auch hier ließ sich kein Zusammenhang zu den Apelin Serumspiegeln belegen.

Die Rolle des Apelin in der Atheroskleroseentstehung auf einer zellulären Ebene kann diese Studie nicht beleuchten, und unsere Ergebnisse bedeuten auch nicht notwendigerweise, dass Apelin keinen Modulator der vaskulären Biologie darstellt.

Die Messung der Serumspiegel erscheint als Marker einer frühfunktionellen oder morphologischen Veränderung nicht zuverlässig verwendbar.

Ob Apelin Spiegel hingegen das reduzierte oder progressive Fortschreiten einer Gefäßschädigung anzeigen können, müssen longitudinale Studien klären.

4.2. Apelin und Glukosestoffwechselfparameter und Adipositas

Ein weiterer Punkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Assoziation von Apelin und metabolischen Parametern wie der Insulinsensitivität oder der Adipositas.

Diese Frage ergab sich aus Arbeiten der näheren Vergangenheit, in denen ein potentiell positiver Effekt des Proteins Apelin auf diese Parameter des Glukosestoffwechsels gezeigt wurde (11).

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die externe Applikation von Apelin in insulinresistente Mäuse deren Glukoseverwertung und Insulinresistenz signifikant besserte (21, 41). Im Hinblick auf die "capillary recruitment theory" (6), welche besagt, dass der kapilläre Querschnitt über die Regulierung des Substratangebotes die Insulinsensitivität beeinflusst, und der kapilläre Querschnitt – also die Menge der funktionell geöffneten Kapillaren – maßgeblich vom NO abhängig ist, könnte dies ein weiterer Hinweis auf den Einfluss des Apelin auf den NO-Stoffwechsel darstellen.

Diesen Studien stehen Beobachtungen von Li et al (41) und Dray et al (22) entgegen, die zeigen, dass die Serumspiegel von Apelin mit steigendem Grad einer Glukoseverwertungsstörung zu steigen scheinen. So wurde bei Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (IGT) signifikant höhere Apelinwerte gemessen als bei Probanden mit normaler Glukosetoleranz (NGT). Dray et al zeigten signifikant höhere Spiegel in Probanden mit einem manifesten Typ 2 Diabetes im Vergleich zu gesunden Kontrollen (22). Diese Studien sind jedoch Beobachtungen und können nicht klären, ob Apelin zu einer Glukoseverwertungsstörung führt, oder ob die Apelinspiegel bei Vorliegen einer Glukoseverwertungsstörung möglicherweise im Sinne einer „Apelinresistenz“ steigen. In Anbetracht der tierexperimentellen Daten erscheint diese Betrachtung möglich.

In unserem Patientenkollektiv konnten wir keinen signifikanten Unterschied in den Apelin Serumspiegeln zwischen IGT und NGT feststellen. Auch ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Insulinresistenz – gemessen als Matsuda Index – konnte nicht hergestellt werden. Über diabetische Individuen kann die vorliegende Arbeit keine Aussagen treffen, da diese Probanden von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

Eine Mehraussage zum Status der Glukosetoleranz durch die Bestimmung des Apelins ist unseren Daten zufolge also nicht abzuleiten.

Eng mit der Glukosetoleranz/Insulinresistenz vergesellschaftet ist allgemein anerkannt die Adipositas (47). Zwei Studien, die sich mit der Fragestellung der Apelin Serumkonzentrationen in Abhängigkeit zum Grad der Adipositas beschäftigten (11, 57) zeigten erhöhte Apelinspiegel in adipösen Studienteilnehmern. In unserer Studie haben wir zusätzlich zum BMI die Körperfettverteilung mittel NMR-Tomographie gemessen und können weder einen Zusammenhang zur Adipositas noch zur Körperfettverteilung belegen. Die unterschiedlichen Ergebnisse mögen unter anderem der wesentlich kleineren Studiengröße dieser Studien (obese n=8; non obese n=9) geschuldet sein. Eine solch kleine Fallzahl kann wegen der geringen statistischen power zu zufällig positiven Ergebnissen führen.

4.2 Fazit

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass weder zwischen Apelin Serumspiegeln und frühatherosklerotischen Markern wie der Gefäßfunktion oder der Intima-Media-Dicke, noch mit Parametern des Glukosestoffwechsels oder der Adipositas ein Zusammenhang *in vivo* beim Menschen hergestellt werden kann.

Hinsichtlich der frühen Atherosklerosemarker mag dies in Anbetracht des vergleichsweise kleinen Wirkortes – dem Endothel – unter anderem dem großen Verteilungsvolumen geschuldet sein. Das heißt, dass die gemessenen Serumspiegel nicht notwendigerweise die Konzentrationen des Proteins am Wirkort widerspiegeln. Eine Rolle in der Pathophysiologie von Gefäßerkrankungen ist damit jedoch nicht widerlegt. Künftige Longitudinalstudien müssen klären, ob Apelin Serumspiegel möglicherweise eine Vorhersage der Progression von Gefäßerkrankungen erlauben.

Zum gegenwärtigen Stand scheint die Messung der Apelin Serumspiegel jedoch querschnittsanalytisch keine Aussage zur Gefäßfunktion oder der Güte des Glukosestoffwechsels zuzulassen.

5 Zusammenfassung

Adipositas stellt einen bedeutsamen Risikofaktor für eine gesteigerte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar. Als mögliches kausales Bindeglied werden vom Fettgewebe freigesetzte Botenstoffe, sog. Adipokine angesehen. Besonderes Interesse aus primärpräventiver Sicht gilt dem Einfluss dieser Adipokine auf frühe Atherosklerostadien, wie endotheliale Dysfunktion (FMD) und Verbreiterungen des Intima-Media-Komplexes (IMT). Einen viel diskutierten Vertreter aus der Gruppe der Adipokine stellt Apelin dar. In der vorliegenden Studie wurde daher der Zusammenhang von Apelin und FMD/IMT untersucht. Des Weiteren sollte der Zusammenhang zwischen Apelin und Insulinresistenz/ Adipositas/ Körperfettverteilung beim Menschen beleuchtet werden.

Die Studienpopulation bestand aus 344 Personen (w/m 216/128, mittleres Alter 46; Bereich 18-69 Jahre). Zur Bestimmung der peripheren Gefäßfunktion wurde die flussassoziierte Dilatation (FAD%) der Arteria brachialis, die endothelunabhängige Vasodilatation (GTN%) sowie die Intima-Media-Dicke (IMT) gemessen. Der Apelin-Plasma-Spiegel wurde mittels ELISA-Technik bestimmt. Die Insulinsensitivität wurde aus den Daten eines oralen Glucose-Toleranz-Tests mit Insulinbestimmung mittels der Formel nach Matsuda berechnet. Die Körperfettverteilung wurde mittels Ganzkörper-Magnetresonanztomographie erfasst.

Unsere Daten belegen keinen Zusammenhang zwischen Apelin, FAD bzw. IMT. Ebenso zeichnete sich auch keine Beziehung zwischen den Apelin-Spiegeln, dem Matsuda-Index, BMI und der viszeralen Fettmenge ab.

Unsere Studiendaten belegen damit keinen Zusammenhang zwischen Adipositas/ Fettverteilung und Apelin-Spiegeln. Ebenso zeigt sich keinerlei Korrelation zu anerkannten funktionellen und frümorphologischen Atherosklerosemarkern. Die Wahrscheinlichkeit das Apelin ein mögliches Bindeglied zwischen Fettsucht und kardiovaskulären Erkrankungen darstellt, lässt sich mit unserer Studiendaten am Menschen damit nicht erhärten.

6 Anhang

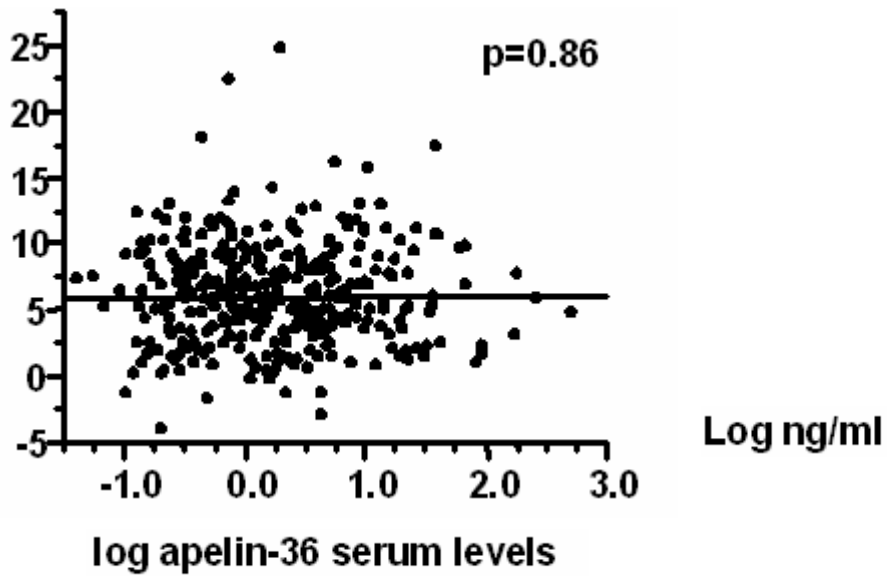
6.1 Abkürzungsverzeichnis

ADA	American Diabetes Association
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
BMI	Body Mass Index
BZ	Blutzucker
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
diast.	diastolisch
dl	Deziliter
ED	Endotheliale Dysfunktion
eNOS	endotheliale Nitric Oxide Synthase
FAD	Fluss assoziierte Dilatation
FMD	Flow mediated vasodilation
g	Gramm
HDL	High density lipoprotein
Hg	Quecksilber
IAA	Intraabdominelle Adipositas
IDF	International Diabetes Federation
IGT	Impaired glucose tolerance
IMD	Intima Media Dicke
IMT	Intima media thickness
ISI	Insulin-Sensitivitäts-Index
kcal	Kilokalorien
kg	Kilogramm
LDL	Low density lipoprotein
m	männlich
m	Meter
mg	Milligramm
mGlc	Mittelwert Glukose

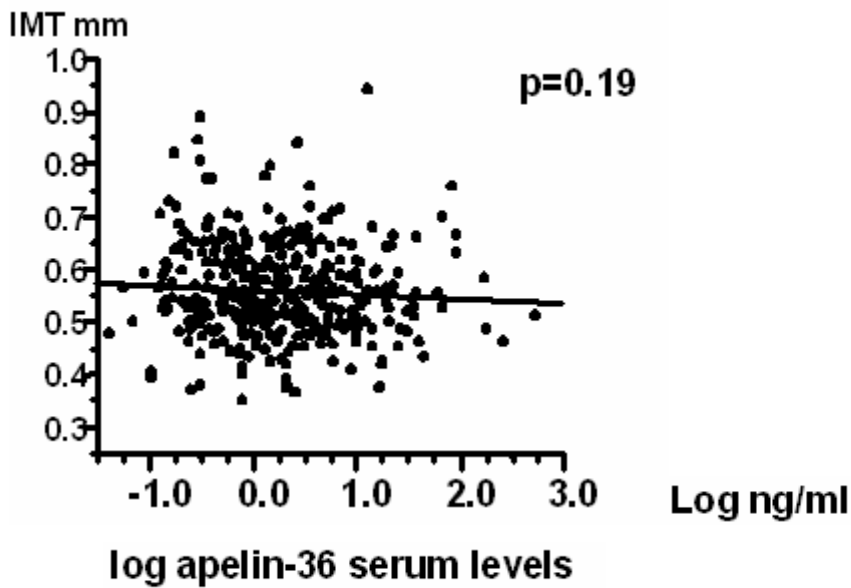
MHz	Megahertz
min	Minute
mIns	Mittelwert Insulin
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
ng	Nanogramm
NGT	Normal glucose tolerance
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	Nicht signifikant
oGTT	Oraler Glukose Toleranz Test
OPL	Optische Pfadlänge
PVAT	Perivaskuläres Fettgewebe
sec	Sekunden
SEM	Standardabweichung
syst.	systolisch
T	Tesla
TULIP	Tübinger Lebensstil Interventionsprogramm
VAT	Viscerales Fettgewebe
w	weiblich
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
μmol	Mikromol
%	Prozent
°C	Grad Celsius

6.2 Graphiken

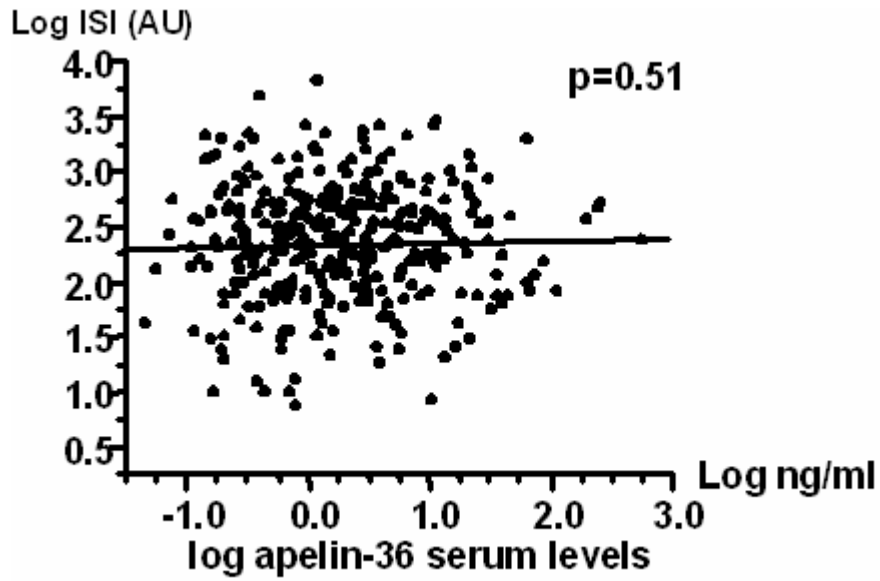
FAD %



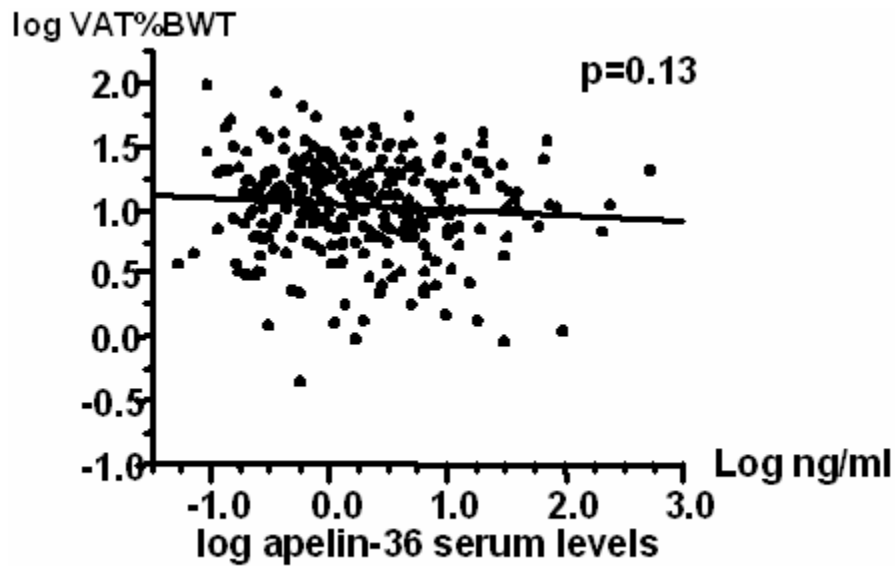
Graphik 1a: Zusammenhang zwischen Apelin und FAD



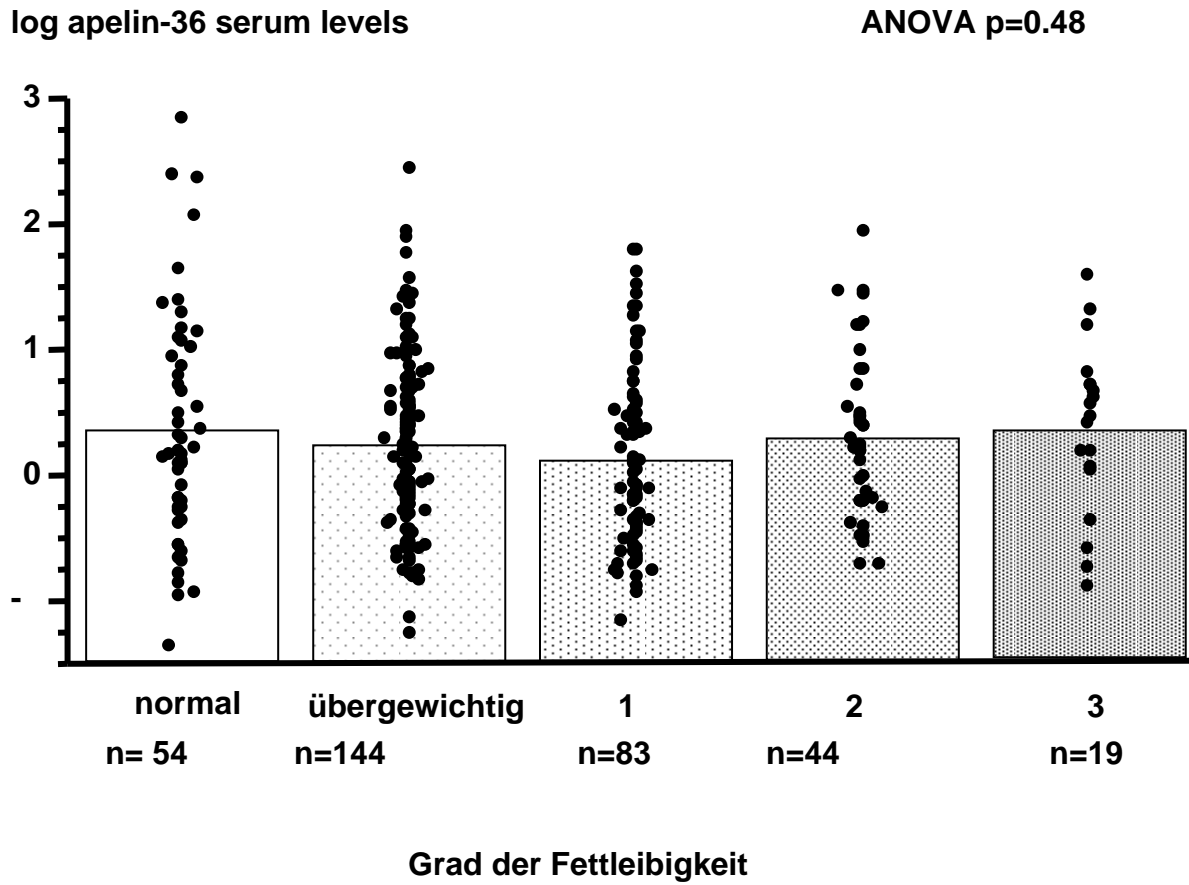
Graphik 1b: Zusammenhang zwischen Apelin und der IMT



Graphik 1c: Zusammenhang von Apelin und dem visceralem Fettgewebe



Graphik 1d: Zusammenhang von Apelin und dem Insulin-Sensitivitäts-Index



Graphik 2: Zusammenhang von Apelin und dem Grad der Fettleibigkeit

6.3 Paper

Rittig, K.; Hildebrandt, U.; Thamer, C.; Staiger, H.; Peter, A.; Stefan, N. et al. (2011): Apelin Serum Levels are not Associated with Early Atherosclerosis or Fat Distribution in Young Subjects with Increased Risk for Type 2 Diabetes. In: Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.

Apelin Serum Levels are not Associated with Early Atherosclerosis or Fat Distribution in Young Subjects with Increased Risk for Type 2 Diabetes

Authors

K. Rittig¹, U. Hildebrandt¹, C. Thamer¹, H. Staiger¹, A. Peter¹, N. Stefan¹, A. Fritsche², H.-U. Häring¹, B. M. Balletshofer¹, D. Siegel-Axel¹

Affiliations

¹Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology, Diabetes, Vascular Medicine, Nephrology and Clinical Chemistry, University of Tübingen, Germany, Member of the German Center for Diabetes Research (DZD)

²Department of Internal Medicine, Division of Nutritional and Preventive Medicine Endocrinology, University of Tübingen, Germany

Key words

- adipokine
- endothelial dysfunction
- intima-media-thickness
- insulin resistance
- fat distribution

received 11.10.2010

first decision 29.10.2010

accepted 03.11.2010

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1268466>
 Published online: 2011
 Exp Clin Endocrinol Diabetes
 © J. A. Barth Verlag in
 Georg Thieme Verlag KG
 Stuttgart · New York
 ISSN 0947-7349

Correspondence

K. Rittig, MD
 Department of Endocrinology,
 Diabetes, Vascular Medicine,
 Nephrology and Clinical
 Chemistry
 University of Tübingen
 Otfried-Müller Straße 10
 72076 Tübingen
 Germany
 Tel.: +49/7071/29 85141
 Fax: +49/7071/29 4151
 kilian.rittig@med.uni-tuebingen.de

Abstract

Apelin is proposed to possess protective cardiovascular properties and may furthermore promote favorable effects on glucose metabolism. First data in humans seem to support this hypothesis. Therefore we aimed to assess the meaning of apelin as an early risk indicator in young subjects prone to atherosclerosis and type 2 diabetes. Furthermore we examined the association of apelin serum levels with insulin sensitivity/resistance and body fat distribution as probably dependent cardiovascular risk factors. We examined 344 individuals (f/m=216/128, mean age 46±1 years) with an increased risk for type 2 diabetes. Apelin-36 serum levels were measured via ELISA. Endothelial dysfunction and intima media thickness (IMT) were assessed using high resolution ultrasound. Visceral adipose tissue

(VAT) was measured with an axial T1-weighted fast spin echo technique with a 1.5T whole-body imager. According to the study population's age, FMD (6.4±0.2%) and IMT (0.56±0.01 mm) were within the expected ranges. Gender or age had no influence on serum apelin levels. When looked at early stages of atherosclerosis, we could not detect a significant correlation between apelin serum levels and FMD or IMT. Blood pressure as well was unaffected by serum apelin levels. Furthermore, neither parameters of insulin sensitivity like insulin sensitivity index (ISI), nor fat distribution like BMI, grade of adiposity, total adipose tissue or VAT were associated with apelin serum levels. We conclude that apelin serum levels do not add further information on the cardiovascular-, or diabetes risk pattern in a diabetes prone population.

Introduction

Apelin is an adipocytokine, first described by Tatemoto et al. comprising 36 amino acids. Several studies support the regulatory role of apelin in the cardiovascular system, although its physiological role is not yet fully understood. Whereas apelin has been shown to be potentially cardiovascular protective (Ashley et al., 2005; Berry et al., 2004), partly by inducing eNOS (Ishida et al., 2004; Japp et al., 2008; Zhong et al., 2007), other studies report on a rather deleterious effect on the vascular system (Li et al., 2008). Furthermore, apelin is thought to influence glucose metabolism, since apelin knockout mice show diminished insulin sensitivity, which can be restored by external apelin administration, (Yue et al., 2009). There is so far not much known about the relevance of these findings in the human system.

To further corroborate the role of apelin in the regulation of endothelial function and glucose metabolism, in the present study we investigated whether apelin serum levels are associated with insulin sensitivity and early markers of atherosclerosis in a diabetes prone population.

Material and Methods

Study population

Informed written consent was given by each participant. The study was approved by the ethics committee of the University of Tuebingen, Germany.

We studied a total of 344 subjects (f:m: 216:128; mean age 46.4±0.6 years). The examinations were performed in individuals in the ongoing TULIP-study (Tuebingen Lifestyle Intervention Program) (Schafer et al., 2007).

Flow mediated vasodilation (FMD) and Intima-media thickness (IMT)

Flow mediated dilation was measured using high resolution ultrasound at the brachial artery, as described previously. (Celermajer et al., 1993; Rittig et al., 2008). In brief, this method uses post-ischemic (forearm) vasodilation, causing enhanced flow in the proximal brachial artery and consequently a shear stress-induced activation of eNOS resulting in NO release, and subsequent vasodilation. IMT was measured R-wave triggered at the common carotid artery using the same ultrasound system according to previously described sonomorphological criteria (Wendelhag et al., 1991).

Oral glucose tolerance test (OGTT)

OGTT was performed using 75 g glucose at 8 am after an overnight fast of > 10h. Venous blood for glucose and insulin measurements was sampled every 30 min. An insulin-sensitivity-index was calculated as described before (Matsuda and DeFronzo, 1999).

Evaluation of Apelin-36 plasma levels

Apelin-36 levels were measured via ELISA technique, according to the manufacturer's (Phoenix Pharmaceuticals®) protocol.

MRI quantification of visceral adipose tissue (VAT)

Visceral adipose tissue was measured with an axial T1-weighted fast spin echo technique with a 1.5T whole-body imager (Magnetom Sonata; Siemens Medical Solutions®) as described before (Machann et al., 2005).

Statistical analyses

Data are provided as means±SEM and range. Univariate testing was done for classical cardiovascular risk factors, or parameters known to influence the dependent variable in question. \log_e -transformation was performed for not normally distributed variables. A p -value less than 0.05 was considered statistically significant. The study was sufficiently powered ($1-\beta \geq 0.8$) to detect effect sizes $\geq 1/5$ Sigma. The analyses were conducted using the JMP statistical software package 4.0.4 (SAS Institute®).

Results

▼
The clinical characteristics of the study population are shown in **Table 1**.

Serum apelin levels and vascular parameters

Adjusted for age and gender, we could not find a significant influence of apelin on systolic ($p=0.15$), or diastolic blood pressure, whereas there was a tendency to lower diastolic blood pressures at higher apelin serum levels ($p=0.08$, LSN=429).

To check for apelin's influence on vascular tone regulation, we looked for an association with FMD at the brachial artery. As expected, FMD was negatively correlated with age ($p=0.0004$; $r=-0.19$) and basal diameter ($p<0.0001$; $r=-0.23$). No association on the other hand was found with apelin serum levels after adjusting for age, gender, systolic blood pressure and basal artery diameter.

Another important parameter in early atherosclerosis is the IMT of the common carotid artery, representing early morphological changes of the vascular wall. Although there was a strong cor-

Table 1 Anthropometrical data, vascular parameters and laboratory findings of the study population.

(n = 344; f/m = 216/128)	Mean ± SEM	Range
age (years)	46 ± 1	18–69
syst. BP (mmHg)	129 ± 1	80–216
diast. BP (mmHg)	80 ± 1	45–118
current smokers (y/n)	36/301 (7 missing)	-
weight (kg)	87.9 ± 1.0	52.5–189.8
BMI (kg/m ²)	30.1 ± 0.3	19.4–51.0
body fat (%)	33.1 ± 0.5	9.8–58.3
total adipose tissue (kg)	30.1 ± 0.6	7.1–72.5
visceral adipose tissue (kg)	3.0 ± 0.1	0.25–10.1
fasting glucose (mmol)	5.3 ± 0.03	4.2–6.6
2 h glucose (mmol)	7.0 ± 0.1	3.6–11.06
ISI-Matsuda (arbitrary units)	12.6 ± 0.4	1.6–33.4
triglycerides (mmol/l)	1.4 ± 0.06	0.3–9.8
total-cholesterol (mmol/l)	5.1 ± 0.05	2.5–9.1
high-density-cholesterol (mmol/l)	1.4 ± 0.02	0.7–2.4
low-density-cholesterol (mmol/l)	3.2 ± 0.04	1.0–5.8
basal diameter (mm)	3.7 ± 0.04	2.0–5.5
FMD (%)	6.4 ± 0.2	0.0–26.2
GTN-dilation (%)	18.9 ± 0.4	0.7–42.2
intima-media-thickness (mm)	0.56 ± 0.01	0.28–0.98
apelin (ng/ml)	1.8 ± 0.1	0.3–17.5

relation with age ($p<0.0001$; $r=0.58$), we could not observe an association between IMT and serum apelin.

Serum apelin levels and fat distribution

Serum levels of apelin did neither correlate with BMI ($p=0.89$), nor with total adipose tissue mass measured via MRT ($p=0.43$) when adjusted for age and gender. When we divided the group according to their grade of adiposity (from lean to obesity grade 3), we could not detect a significant difference between groups in serum apelin levels. Whereas visceral adipose tissue was strongly associated with gender ($f=2.1 \text{ kg} \pm 0.09$ vs. $m=4.5 \text{ kg} \pm 0.16$; $p<0.0001$) and age ($p<0.0001$; $r=0.45$), we could not detect an association with serum apelin levels.

Serum apelin levels and parameters of glucose metabolism

In the oral glucose tolerance test, the serum apelin levels were not associated with fasting or 2-h glucose levels, respectively ($p=0.73$ and $p=0.66$). Furthermore the insulin sensitivity index (calculated according to the formula by Matsuda) was also not associated with apelin serum levels. All calculations were adjusted for age, gender and BMI.

Discussion

▼
In the present study we examined the implication of serum levels of the adipokine apelin on early signs of atherosclerosis such as endothelial dysfunction and IMT. Furthermore, we tried to elucidate the impact of apelin on insulin resistance in vivo, as well as the association to adiposity and body fat distribution. In our study population that consisted of 344 middle aged individuals, we could not detect an association between apelin serum levels and endothelial function, IMT or insulin resistance. Furthermore the discussed association with body fat distribution could not be confirmed.

The physiological actions of apelin are under controversial discussion. Hashimoto could show that the atherosclerotic burden in apelin/apelin receptor (APJ) and ApoE double knockout (APJ^{-/-}/ApoE^{-/-}) mice is significantly lower in terms of smaller aortic plaque formation, as compared to their APJ^{+/+}/ApoE^{-/-} littermates, when fed a high cholesterol diet (Hashimoto et al., 2007). These results are in principal contradictory to the majority of reports dealing with the vascular capabilities of apelin that find positive effects on cardiovascular function. Application of apelin in ApoE^{-/-} mice for example has been shown to inhibit the Ang II actions in vascular disease via increased NO production (Chun et al., 2008). Furthermore, the administration of apelin in rodents seems to lower blood pressure significantly (Ishida et al., 2004; Tatemoto et al., 2001), most likely via a NO-dependent mechanism. However, these results were generated in rodents and external application of the peptide does not necessarily represent physiological conditions. To our knowledge, only one study was performed in humans in vivo showing a favourable effect of apelin on vascular tone. Japp et al. administered increasing amounts of apelin-36 intraarterially in 24 healthy men and observed a dose-dependent increase of arterial blood flow (Japp et al., 2008) in forearm resistance vessels measured by plethysmography. This effect was hypothesised to be nitric oxide mediated. We could not find an association of the apelin level with endothelial function measured as flow mediated/NO-dependent vasodilation in our study group, even though the study design as well as both techniques can not be compared in detail. Furthermore, although the subjects studied by Japp were humans, the exogenous administration of apelin is not physiologic. However, in accordance to our data Japp et al. observed no effect on blood pressure. In another study, serum levels of apelin-36 were measured in patients with stable pectoral angina and compared to individuals without. Here, a significantly lower serum level of apelin was detected in the patient group. This result might indicate that apelin serum levels may be altered in atherosclerotic conditions and may thereby be of diagnostic relevance in this group of patients. Patients with clinically overt atherosclerosis were excluded in our study population, but we measured IMT at the common carotid artery, a well accepted parameter for developing atherosclerosis and prognostic factor for clinically overt atherosclerosis (Bots et al., 1997; O'Leary et al., 1999) and could not find an influence of apelin levels on IMT. Thus our study expands the current knowledge regarding the prestenotic state in the process of atherosclerosis. Because the knowledge of risk indicators should help to predict disease, the interpretation of apelin in younger subjects without stenotic atherosclerosis in this regard must be done with caution.

Another issue of this study was to test the influence of apelin serum levels on parameters of glucose metabolism. Recent reports have linked apelin to insulin resistance and obesity. For instance, it has been shown that external administration of apelin to insulin resistant mice is capable of stimulating their glucose utilisation (Dray et al., 2008). Another study could show that apelin knockout mice were significantly more insulin resistant than their wild type littermates and that insulin resistance could be reversed by administration of apelin (Yue et al., 2009). These studies indicate a favourable effect of apelin on insulin sensitivity in animal models. In contrast, Li et al showed that circulating apelin levels are increased in IGT and type 2 diabetic individuals as compared to metabolically healthy controls (Li et al., 2006) and Dray et al. very recently reports on significantly increased apelin serum levels in type 2 diabetic individuals

(Dray et al., 2010), indicating, that the interpretation of serum apelin levels might change with the severity of insulin resistance. One might speculate that this circumstance is due to evolving apelin resistance in a diabetic state. We had no individuals with manifest diabetes in our population, therefore we can not confirm or refute this finding. However, the serum apelin levels in our study population were almost identical in NGT (n=250; 1.75±0.10 ng/ml) and IGT (n=94; 1.78±0.21 ng/ml) [p=0.98]. Again, a predictive value regarding the risk of developing disturbances in glucose metabolism must be questioned.

Other studies report apelin to be associated with obesity, partly in patients with manifest type 2 diabetes (Boucher et al., 2005; Soriguer et al., 2009). We could not reproduce these findings in our study population, which may be due to the much smaller sample size of Boucher et al. (obese n=8; non obese n=9) and the consecutive problem of supposedly low statistical power.

In conclusion, although recent study results hypothesise that apelin may be involved in regulation of vascular tone and insulin resistance and might as well represent an interesting therapeutic target preventing diabetes and higher grade coronary artery disease, we can not support this hypothesis in our prediabetic population without manifest stenotic atherosclerosis. Probably serum levels do not represent apelin concentrations at the site of action (i.e., the vasculature). Therefore, in younger subjects apelin serum levels must be interpreted with caution in regard to primary prevention of cardiovascular disease or diabetes.

Grants



This study was supported by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft KFO114) and the German Federal Ministry of Education and Research (DLR01GI0925).

Conflict of Interest: The authors have no conflicts or financial interests to disclose.

Trial Registry Number



Name: 'Prävention des Typ 2 Diabetes und seiner Gefäßkomplikationen'

EudraCT number: 2008-000442-31

Informed written consent was given by each participant. The study was approved by the ethics committee of the University of Tuebingen, Germany.

References

- Ashley EA, Powers J, Chen M et al. The endogenous peptide apelin potentially improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 73–82
- Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V et al. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 2004; 110: II187–II193
- Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ et al. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997; 96: 1432–1437
- Boucher J, Masri B, Daviaud D et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 1764–1771
- Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88: 2149–2155

- 6 Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y *et al.* Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest* 2008; 118: 3343–3354
- 7 Dray C, Debard C, Jager J *et al.* Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010
- 8 Dray C, Knauf C, Daviaud D *et al.* Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008; 8: 437–445
- 9 Hashimoto T, Kihara M, Imai N *et al.* Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis. *Am J Pathol* 2007; 171: 1705–1712
- 10 Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y *et al.* Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279: 26274–26279
- 11 Japp AG, Cruden NL, Amer DA *et al.* Vascular effects of apelin in vivo in man. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 908–913
- 12 Li L, Yang G, Li Q *et al.* Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114: 544–548
- 13 Li Z, Bai Y, Hu J. Reduced apelin levels in stable angina. *Intern Med* 2008; 47: 1951–1955
- 14 Machann J, Thamer C, Schnoedt B *et al.* Standardized assessment of whole body adipose tissue topography by MRI. *J Magn Reson Imaging* 2005; 21: 455–462
- 15 Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22: 1462–1470
- 16 O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA *et al.* Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. N Engl J Med* 1999; 340: 14–22
- 17 Rittig K, Peter A, Baltz KM *et al.* The CCR2 promoter polymorphism T-960A, but not the serum MCP-1 level, is associated with endothelial function in prediabetic individuals. *Atherosclerosis* 2008; 198: 338–346
- 18 Schafer S, Kantartzis K, Machann J *et al.* Lifestyle intervention in individuals with normal versus impaired glucose tolerance. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 535–543
- 19 Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S *et al.* Apelin Levels Are Increased in Morbidly Obese Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Obes Surg* 2009
- 20 Tatemoto K, Takayama K, Zou MX *et al.* The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001; 99: 87–92
- 21 Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M *et al.* Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol* 1991; 11: 565–577
- 22 Yue P, Jin H, Aillaud-Manzanera M *et al.* Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009
- 23 Zhong JC, Yu XY, Huang Y *et al.* Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 388–395

6.4 Literaturverzeichnis

1. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*, 2005; 366:1059-1062.
2. Ashley EA, Powers J, Chen M et al.: The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 2005; 65:73-82.
3. Atkov OY, Balahonova TV, Pogorelova OA :Non-invasive ultrasound detection of endothelial dysfunction. *Eur-J-Ultrasound*. 1998 Feb; 7 (1): 37-45
4. Balletshofer BM, Goebbel S, Rittig K et al.: Influence of experience on intra- and interindividual variability in assessing peripheral endothelial dysfunction by measurement of flow associated vasodilation with high resolution ultrasound. *Ultraschall Med* 2001; 22:1-5.
5. Balletshofer, B. M.; Haap, M.; Rittig, K.; Stock, J.; Lehn-Stefan, A; Häring, H-U (2005): Early carotid atherosclerosis in overweight non-diabetic individuals is associated with subclinical chronic inflammation independent of underlying insulin resistance. In: *Horm. Metab. Res* 37 (5), S. 331–335.
6. Baron AD, Tarshoby M, Hook G, Lazaridis EN, Cronin J, Johnson A, Steinberg HO. Interaction between insulin sensitivity and muscle perfusion on glucose uptake in human skeletal muscle: evidence for capillary recruitment. *Diabetes*. 2000 May;49(5):768-74.
7. Becker S, Niess A, Hipp A, Fritsche A, Gallwitz B, Granderath F, Kramer M, Zipfel S: Obesity--an interdisciplinary task; *Ther Umsch*. 2006 Aug;63(8):509-14.
8. Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V et al.: Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 2004; 110:II187-II193.
9. Bonora E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Muggeo M: Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study. *Diabetes* 1998; 47(10) 1643-1649

10. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE: Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* 1997; 96:1432-7.
11. Boucher J, Masri B, Daviaud D et al.: Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146:1764-71.
12. Britten M, Schachinger V: The role of endothelial function for ischemic manifestations of coronary atherosclerosis. *Herz*. 1998 Mar; 23 (2): 97-105
13. Celermajer DS: Testing endothelial function using ultrasound. *J-Cardiovasc-Pharmacol*. 1998; 32 Suppl 3: S29-32
14. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D et al.: Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88:2149-55.
15. Chun HJ, Ali ZA, Kojima Y et al.: Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest* 2008; 118:3343-54.
16. Colditz GA, Willet WC, Rotnitzky A, Manson JE: Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in woman. *Ann.Intern.Med.* 1995; 122(7):481-6
17. DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidämia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14(3): 173-94
18. De Fronzo RA, Bonadonna RC, Ferranini E: Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes care* 1992; 15(3): 318-368
19. Després JP, Lemieux I, Prud`homme D : Traetment of obesity : need to focus on high risk abdominally obese patients. *BMJ* 2001 ; 322 :716-720
20. Depres JP, Lemieux I : Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006; 444, 881-887
21. Dray C, Knauf C, Daviaud D et al.: Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008; 8: 437-45.

22. Dray C, Debard C, Jager J, Disse E, Daviaud D, Martin P et al. (2010): Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 298 (6), S. E1161-9.
23. Drexler H, Landmesser U: Endothelfunktion und kardiovaskuläre Erkrankungen. *Uni-Med* 2. Auflage 2003; 34
24. Enderle MD, Balletshofer BM, Schmülling RM, Haering HU, Pfohl M: Early detection of atherosclerosis with high resolution ultrasound exemplified by type II diabetic patients. *Ultraschall Med.* 1998 Feb; 19 (1): 16-21
25. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 1997; 20 (7): 1183-1197
26. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus *Diabetes care* 2003; 26 Suppl 1: S5-S20
27. Friedman JM: Leptin Regulates Adipose Tissue Mass *Keio J Med* 2011; 60(1): 1-9
28. Ghiadoni L, Taddei S, Virdis A, Sudano I, Di-Legge V, Meola M, Di-Venanzio L, Salvetti A: Endothelial function and common carotid artery wall thickening in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32(1): 25-32
29. Häring HU: Pathogenesis of type II diabetes: are there common causes for insulin resistance and secretion failure? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107: 17-23
30. Harrison: The pathogenesis of atherosclerosis. *Harrison's Internal Medicine* 2007; 224
31. Harris MI: Impaired glucose tolerance – prevalence and conversion to NIDDM. *Diabe Med* 1996; 13(3 Suppl 2), S9-11
32. Hashimoto T, Kihara M, Imai N et al.: Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis. *Am J Pathol* 2007; 171:1705-12.
33. Ikonomidis I, Stamatelopoulos K, Lekakis J, Vamvakou G D, Kremastinos D Th: Inflammatory and non-invasive vascular markers: The

- multimarker approach for risk stratification in coronary artery disease; *Atherosclerosis* 199 (2008) 3–11
34. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279:26274-9.
35. Jacob S, Motz W, Steinhagen-Thiessen E, Tschöpe D: Minimal metabolic data set for patients at high vascular risk. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111(8): 471-474
36. Jacob S, Halle M: Verbesserung der kardiometabolischen Prognose: Was können Typ 2-Diabetiker mit einer Lebensstiländerung erreichen? *Cardiovasc* 2006; 6(5): 34-37
37. Japp AG, Cruden NL, Amer DA et al.: Vascular effects of apelin in vivo in man. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:908-13.
38. Joannides R, Haefeli WE, Linder L et al.: Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995; 91:1314-9.
39. Lakka, T A.; Laaksonen, D E. (2007): Physical activity in prevention and treatment of the metabolic syndrome. In: *Appl Physiol Nutr Metab* 32 (1), S. 76–88.
40. Li Z, Bai Y, Hu J: Reduced apelin levels in stable angina. *Intern Med* 2008; 47:1951-5.
41. Li L, Yang G, Li Q et al.: Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;114:544-8.
42. Machann J, Thamer C, Schnoedt B et al.: Standardized assessment of whole body adipose tissue topography by MRI. *J Magn Reson Imaging* 2005; 21:455-62.
43. Matsuda M, DeFronzo RA: Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22:1462-70.

44. McGarry JD: What if Minkowski had been ageusic? An alternative Angle on Diabetes. *Science* 1992; 258(5083):766-70
45. Müller et al. Prävention und Therapie von Übergewicht im Kindes- und Jugendalter. *Deutsches Ärzteblatt* 2006 ; 103 :6
46. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK, Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999; 340:14-22.
47. Okosun IS et al: Abdominal adiposity in U.S. adults: prevalence and trends, 1960-2000. *Prev Med*; 2004; 39: 197-206
48. Pessin JE, Saltiel AR : Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *Clin Invest.* 2000; 106(2): 165-169.
49. Peeters, A; Barendregt, J J.; Willekens, F; Mackenbach, J P.; Al Mamun, A; Bonneux, L (2003): Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann. Intern. Med* 138 (1), S. 24–32.
50. Pouliot, M. C.; Després, J. P.; Lemieux, S.; Moorjani, S.; Bouchard, C.; Tremblay, A. et al. (1994): Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. In: *Am. J. Cardiol* 73 (7), S. 460–468.
51. Powell K: Obesity: the two faces of fat. *Nature* 2007; 447, 525-527
52. Reinehr T, Woelfle J, Roth CL; Lack of association between apelin, insulin resistance, cardiovascular risk factors, and obesity in children: a longitudinal analysis. *Metabolism.* 2011 Apr 11. [Epub ahead of print]
53. Rittig, K.; Staib, K.; Machann, J.; Böttcher, M.; Peter, A.; Schick, F. et al. (2008): Perivascular fatty tissue at the brachial artery is linked to insulin resistance but not to local endothelial dysfunction. In: *Diabetologia* 51 (11), S. 2093–2099.
54. Rittig, K.; Hildebrandt, U.; Thamer, C.; Staiger, H.; Peter, A.; Stefan, N. et al. (2011): Apelin Serum Levels are not Associated with Early Atherosclerosis or Fat Distribution in Young Subjects with Increased Risk for Type 2 Diabetes. In: *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*
55. Saltiel AR: New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001; 104(4): 517-529

56. Serrano-Rios M: Relationship between obesity and the increased risk of major complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur-J-Clin-Invest.* 1998 ; 28 Suppl 2 : 14-7, discussion 17-8
57. Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S et al. Apelin Levels Are Increased in Morbidly Obese Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Obes Surg* 2009.
58. Stefan, Norbert; Kantartzis, Konstantinos; Machann, Jürgen; Schick, Fritz; Thamer, Claus; Rittig, Kilian et al. (2008): Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. In: *Arch. Intern. Med* 168 (15), S. 1609–1616.
59. Stevens, J.; Cai, J.; Pamuk, E. R.; Williamson, D. F.; Thun, M. J.; Wood, J. L. (1998): The effect of age on the association between body-mass index and mortality. In: *N. Engl. J. Med* 338 (1), S. 1–7.
60. Szokodi I, Tavi P, Foldes G et al.: Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002; 91:434-40.
61. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX et al.: The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001; 99:87-92.
62. Trayhurn P., Wood I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue *Br J Nutr* 2004; 9: 347-355
63. Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Arch-Mal-Cour-Vaisse.* 1997 Nov; 90 Spec No 6: 6-19 + *Eur-Heart-J.* 1997 Nov; 18 Suppl E: E19-29
64. Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M, Berglund G, Wikstrand J: Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol* 1991; 11:565-77.
65. Yue P, Jin H, Aillaud-Manzanera M et al.: Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009.

66. Zhong JC, Yu XY, Huang Y, Yung LM, Lau CW, Lin SG: Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 2007; 74:388-95.

6.5 Danksagung

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Bernd Balletshofer für die Vergabe dieses interessanten Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Kilian Rittig für seine unermüdliche Unterstützung und geduldige Beantwortung aller Fragen als Betreuer meiner Doktorarbeit.

Ebenso möchte ich mich bei allen Medizinisch Technischen Assistentinnen bedanken, die mich in die verschiedenen Messmethoden eingeführt haben und immer mit einer Lösung bereit standen.

Nicht zu vergessen sind die vielen Probanden, ohne die diese Studie überhaupt nicht möglich gewesen wäre, auch Ihnen gilt mein Dank.

Zuletzt möchte ich mich sehr bei meinen Eltern bedanken, die mir nicht nur das Studium ermöglicht haben, sondern mir auch bei dieser Dissertation immer wieder den Rücken gestärkt haben.

6.6 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ursula Christiane Hildebrandt
Geburtsdatum: 23. November 1980
Geburtsort: Düsseldorf
Konfession: evangelisch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1987 – 07/1991 Städtische Katholische Grundschule Florensstraße,
Düsseldorf
08/1991 – 06/2000 Städtisches Gymnasium Norf, Neuss
Abschluss: Abitur

Pflegepraktikum:

08/2000 – 10/2000 2-monatiges Pflegepraktikum auf der internistischen Station
des Israelitischen Krankenhauses Hamburg

Hochschulbildung:

03/2001 – 03/2004 Universität Hamburg
03/2004 Physikum
04/2004 – 04/2008 Eberhard Karls Universität Tübingen
05/2008 2. Ärztliche Prüfung (16.Mai 2008)
06/2008 Approbation

Famulaturen:

08/2004 – 09/2004	Praxis für Allgemeinmedizin, Utting am Ammersee
03/2005 – 04/2005	Sport- und Bewegungsmedizin, Universität Hamburg
07/2005 – 09/2005	Anästhesiologie, Kreiskrankenhaus Dormagen
09/2005 – 09/2005	Innere Medizin, Klinik Dr. Schindelbeck, Herrsching
09/2006 – 09/2006	Pädiatrie, Universitätsklinikum Tübingen

Praktisches Jahr:

02/2007 – 06/2007	Innere Medizin Kardiologie, Endokrinologie, Sportmedizin Universitätsklinikum Tübingen
06/2007 – 10/2007	Pädiatrie Neurologie, Kardiologie, allgemeine Pädiatrie Universitätsklinikum Tübingen
10/2007 – 12/2007	Chirurgie Intensivstation, Ambulanz, Neurochirurgie Universitätsklinikum Tübingen

Klinische Ausbildung:

Fachweiterbildung „Innere Medizin“:

10/2008 – 05/2009	Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin, Bereich Kardiologie, Helios-Klinikum Siegburg
Seit 06/2009	Ärztin im Zentrum für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln

Tätigkeiten in der Lehre:

Seit 06/09 Dozentin an der Deutschen Sporthochschule Köln im Bereich der Inneren Medizin und der Notfallversorgung

Betreuung und Beurteilung von Bachelor- und Diplomarbeiten

Tätigkeiten neben der Ausbildung:

10/2006 – 03/2007 Tätigkeit als studentische Tutorin an der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen, Bereich Neonatologie

2001 – 2003 Pflegehelferin am Evangelischen Krankenhaus Düsseldorf

Seit 11/2000 Nebenberufliche Tätigkeit als Skilehrerin und Reiseleiterin für Sunwave, Hamburg

1995 – 1998 Co-Trainerin einer Voltigiergruppe und des Behindertenvoltigierens

1995 – 1997 Konfirmandenbetreuerin