



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Wirkung von Erythropoietin auf den Stoffwechsel adipöser Mäuse

verfasst von / submitted by

Nevena Arsic, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2023/ Vienna, 2023

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Dr. Clemens Fürnsinn

Danksagung

Ich möchte mich allererst herzlich bei meinem Betreuer Herr Professor Clemens Fürnsinn bedanken. Ich bin sehr dankbar, dass ich die Gelegenheit hatte, an einem solchen Projekt teilzunehmen, was für mich persönlich und für meine akademische Erfahrung von unschätzbarem Wert war. Er hat maßgeblich dazu beigetragen, dass die Arbeit mit den Tieren sowohl für mich als auch für die Tiere so angenehm wie möglich verlief, indem er mir alle relevanten Techniken beigebracht hat. Ich möchte mich für seine Geduld und Unterstützung während des gesamten Schreibprozesses sowie für seine stets wertvollen Ratschläge bedanken. Besonders schätze ich die Zeit und das Engagement, die er meiner Arbeit gewidmet hat und dafür, dass er immer in kürzester Zeit erreichbar war. Es war mir eine Ehre und ein Vergnügen, mit Dir zusammenzuarbeiten.

Ich möchte meiner Familie und meinem Freund danken, denn sie haben mich die ganze Zeit begleitet, sowohl vom ersten Schritt an, als ich zum Studieren nach Wien gezogen bin, als auch in all den schönen und herausfordernden Momenten, die das Studentenleben mit sich bringt. Ohne ihre Unterstützung und Liebe wäre ich nicht das, was ich heute bin und hätte nicht so weit kommen können.

Vielen Dank auch an Doki, Lanci, Maki, Meli und Sarci, die von Anfang an dabei waren und mit mir gemeinsam durch das Studentenleben gegangen sind. Ohne sie wäre mein Studierenerlebnis nicht dasselbe gewesen.

Zahvalnica

Želim da se najpre srdačno zahvalim svom mentoru, gospodinu profesoru Clemensu Fürnsinnu. Veoma sam zahvalna što sam imala priliku da učestvujem u ovakvom projektu, što je za mene lično i za moje akademsko iskustvo bilo neprocenjivo. On je pre svega doprineo tome da rad s životinjama bude što prijatniji, kako za mene, tako i za životinje, tako što me je poducio svim relevantnim tehnikama. Želim da se zahvalim na strpljenju i podršci tokom celog procesa pisanja, kao i na uvek dragocenim savetima. Posebno cenim vreme i posvećenost koje je posvetio mom radu i to što je uvek bio brzo dostupan. Bilo mi je čast i zadovoljstvo sarađivati s Tobom.

Takođe želim da zahvalim svojoj porodici i svom momku, jer su me pratili tokom celog ovog perioda, od samog početka, kada sam se preselila u Beč radi studiranja, pa kroz sve lepe i izazovne trenutke koje studentski život nosi sa sobom. Bez njihove podrške i ljubavi ne bih bila to što sam danas i ne bih dospela ovako daleko.

Hvala Doki, Lanci, Maki, Meli i Sarci što su bile tu od samog početka i što smo zajedno prolazile kroz studentski život. Bez njih moje iskustvo na fakultetu ne bi bilo isto.

Zusammenfassung

Hintergrund und Zielsetzung: Das in der Niere produzierte Hormon Erythropoietin ist der wichtigste endogene Stimulator der Erythrozytenbildung (Erythropoese). In einigen Studien wurde beschrieben, dass Erythropoietin Körpergewicht und Blutglukose senken und diverse Stoffwechselfparameter verbessern kann. Solche Effekte sind von besonderem Interesse, da für Adipositas und Typ-2-Diabetes eine epidemieartige Zunahme der Fallzahlen zu beobachten ist und daher neue Ansatzmöglichkeiten für Therapien gesucht werden.

Das Hauptziel vorliegender Arbeit war es zu klären, ob Erythropoietin die Blutglukose und andere metabolische Parameter bloß als Folge einer Gewichtsreduktion oder direkt, also gewichtsunabhängig, beeinflusst.

Material und Methode: Männliche Mäuse des Wildtypstammes C57BL/6J wurden mit fettreicher Diät gefüttert. Dieser Mausstamm ist bekannt dafür, unter fettreicher Ernährung Adipositas und metabolische Störungen zu entwickeln. Die adipösen Mäuse bekamen über zwei Monate dreimal wöchentlich hochdosierte Erythropoietininjektionen (1000 U/kg Epoetin theta). Um den gewichtsunabhängigen Effekt von Erythropoietin zu untersuchen, also das Körpergewicht als Ursache für Veränderungen auszuschließen, erhielt die Kontrollgruppe eingeschränkte Futterportionen, sodass ihre Gewichtskurve derjenigen der Erythropoietin-Gruppe möglichst glich. Metabolische Parameter wie Blutglukose, Blutketone, Blutfette, Körperzusammensetzung, körperliche Aktivität und Energieverbrauch wurden gemessen.

Ergebnisse: Die Erythropoietinbehandlung führte zu signifikant niedrigeren Blutglukosewerten bei Erythropoietin-behandelten Mäusen als bei Kontrollmäusen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich auch beim relativen Körperfett, das bei Erythropoietin-behandelten Mäusen trotz gleichem Gesamtgewichts niedriger war. Beim Gesamtcholesterin und beim Gewicht des epididymalen Fettpolsters wurden Trends zu niedrigeren Werten in der Erythropoietin-Gruppe beobachtet. Es konnte kein signifikanter Effekt der Erythropoietinbehandlung auf Energieverbrauch und körperliche Aktivität festgestellt werden.

Schlussfolgerung: Zweimonatige Erythropoietinbehandlung hatte signifikante Auswirkungen auf die Blutglukose und die Körperzusammensetzung von männlichen adipösen Mäusen, obwohl das Körpergewicht der Gruppen vergleichbar war. Dies lässt den Schluss zu, dass Blutglukose und Körperzusammensetzung einer direkten Erythropoietinwirkung unterliegen und Erythropoietin-induzierte Effekte nicht bloß Folge einer Gewichtsreduktion sind.

Abstract

Background and objective: The hormone erythropoietin is produced in the kidney and is the predominant endogenous stimulator of erythrocyte production (erythropoiesis). Recent studies have shown erythropoietin-induced improvements in several metabolic parameters, including reductions in body weight and blood glucose. Such effects are of particular interest in consideration of the world-widely rising numbers of patients with obesity and type 2 diabetes, a situation calling for novel therapeutic strategies.

The main objective of the present study was to sort out, whether erythropoietin actions on blood glucose and other metabolic parameters are the consequence of weight loss or direct, i.e., weight-independent effects.

Material and methods: Male mice of the wild-type strain C57BL/6J were fed high fat diet. This strain is known to develop obesity and metabolic disorders under high fat diets. For two months, the obese mice received high-dose erythropoietin injections (1000 U/kg epoietin theta) three times a week. To dissect the weight-mediated from the weight-independent effects of erythropoietin, the control group received restricted portions of food so to ensure that their weight curve was comparable to that of the erythropoietin-treated group. Various metabolic parameters such as blood glucose, blood ketones, plasma lipids, body composition, physical activity, and energy expenditure were measured.

Results: Erythropoietin significantly reduced blood glucose as compared to control mice. A significant difference was also observed for relative body fat, which despite comparable total weight was lower in erythropoietin-treated mice. Regarding total cholesterol and epididymal fat pad weight, trends towards lower values were observed in the erythropoietin group. There was no significant effect of erythropoietin on energy expenditure and physical activity.

Conclusions: Two months of treatment with erythropoietin had significant effects on blood glucose and body composition in male obese mice, although body weight was comparable between the groups. In conclusion, the effects of erythropoietin on blood glucose and body composition are not merely consequences of weight reduction, but are at least in part direct, i.e. weight-independent, effects.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Glukosemetabolismus	1
1.2. Fettmetabolismus-Triglyzeride	2
1.3. Regulation von Glukose- und Fettmetabolismus	4
1.4. Diabetes mellitus	7
1.4.1. Typ-1-Diabetes mellitus	7
1.4.2. Typ-2-Diabetes mellitus	7
1.4.3. Kurz- und langfristige Folgen von Diabetes Mellitus	9
1.5. Erythropoietin	10
1.5.1. Biosynthese	11
1.5.2. Erythropoese	12
1.5.3. Nicht-hämatopoetische Wirkungen des Erythropoietins	13
1.5.4. Erythropoietin als Therapeutikum	15
2. Zielsetzungen	17
3. Materialien und Methoden	18
3.1. Versuchstiere und Haltung	18
3.2. Versuchsablauf und Protokoll	19
3.2.1. Interventionen und Versuchsgruppen	19
3.3. Messungen	21
3.3.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme	21
3.3.2. Körperzusammensetzung	21
3.3.3. Nüchternblutglukose	21
3.3.4. Blutketone	22
3.3.5. Metabolische Käfige	22
3.3.6. Terminales Sammeln von Plasma- und Gewebeproben	24
3.4. Statistik	25
4. Ergebnisse	26
4.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme	26
4.2. Körperzusammensetzung	27
4.3. Nüchternblutglukose	28
4.4. Blutketone	30
4.5. Respiratorischer Quotient	31
4.6. Energieverbrauch	33

4.7.	Aktivität.....	35
4.8.	Futtermittelaufnahme.....	36
4.9.	Wasseraufnahme.....	37
4.10.	Blutfette	39
4.11.	Organgewichte	40
5.	Diskussion.....	42
6.	Schlussfolgerung	46
7.	Literaturverzeichnis.....	47
8.	Abbildungsverzeichnis.....	52

1. Einleitung

1.1. Glukosemetabolismus

Menschen und Tiere sind heterotrophe Lebewesen, die auf Energiegewinnung aus organischen Verbindungen angewiesen sind. In diesem Zusammenhang dient Glukose als die Hauptenergiequelle für den menschlichen Organismus und spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese vieler körpereigener Produkte.

Kohlenhydrate machen bis zu 50 % der aufgenommenen Energie aus, hauptsächlich in Form von Stärke sowie den Disacchariden Laktose und Saccharose. Diese größeren Kohlenhydratmoleküle werden im Magen während der Verdauung in Monosaccharide, vor allem Glukose, abgebaut. Kleinere Mengen Fruktose und Galaktose fallen ebenfalls an und werden im Darm aufgenommen und zur Leber transportiert.

Die Glukose wird von der Leber je nach Bedarf aus dem Blut aufgenommen und in das Blut abgegeben, um die konstante Blutglukosekonzentration aufrechtzuerhalten. Überschüssige Glukose wird in der Leber gespeichert. Fruktose und Galaktose werden in Glukosemetaboliten umgewandelt und münden in verschiedene Stoffwechselwege ein, genau wie überschüssige Glukose, die nicht ins Blut abgegeben wird. Der Organismus verwendet Glukose als Ausgangsstoff für die Biosynthese zahlreicher körpereigener Stoffe, die nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Geweben stattfindet.

Die ersten Schritte des Abbaus von Glukose, wenn sie zum Zweck der Energiegewinnung (=ATP-Produktion) verwertet wird, finden im Zytosol der Zelle statt. Dieser Prozess wird als Glykolyse bezeichnet und umfasst eine Kette von 10 Reaktionen, bei denen sowohl exogene als auch endogene Glukose abgebaut wird. In der anaeroben Glykolyse entsteht Laktat als Abbauprodukt, während in der aeroben Glykolyse Pyruvat gebildet wird, das in nachfolgenden Prozessen, die im Mitochondrium stattfinden (Zitratzyklus und oxidative Phosphoryllierung), zu H_2O und CO_2 abgebaut wird. Alle diese Prozesse haben zum Ziel, chemische Energie in Form von ATP verfügbar zu machen (vgl. Löffler et al., 2007).

Im Ruhezustand erfolgt der Abbau von etwa 200 g Glukose täglich durch die Glykolyse, um dem Körper Energie zur Verfügung zu stellen. Das Gehirn allein beansprucht 75% dieses minimalen Tagesbedarfs von 200 g Glukose. Dieser minimale Tagesbedarf entspricht etwa den Glukosereserven, die hauptsächlich in Leber und Muskulatur gespeichert werden. Für die Speicherung von Glukose dient das Glukosepolymer Glykogen.

Da sowohl die Glukoseaufnahme als auch ihr Verbrauch nicht konstant sind, stellt die Verwendung von Glykogen als Speichermolekül eine Lösung dar. Glukose wird nach den Mahlzeiten vom Organismus aufgenommen, während der Verbrauch vor allem von der körperlichen Aktivität abhängt. Um die Schwankungen der Glukose im Blutplasma möglichst gering zu halten, erfolgt sowohl ein schneller Abbau als auch eine schnelle Synthese von Glykogen. Auf

diese Weise wird die Glukosekonzentration im Blutplasma in einem engen Bereich von 70–110 mg/100 ml bzw. 4–6 mmol/l gehalten.

Die größten Mengen an Glykogen werden in der Skelettmuskulatur gespeichert, die bis zu 250 g Glukose in dieser Form speichern kann. Darüber hinaus kann die Leber bis zu 150 g Glukose als Glykogen speichern, was etwa 10% des Gewichts dieses Organs ausmacht. Die Glykogenolyse in der Muskulatur dient hauptsächlich dazu, Glukose für die Glykolyse in der Muskelzelle bereitzustellen. Der Glykogenabbau in der Leber dient vor allem der Glukoseproduktion und der Glukoseabgabe ins Blut, also der Versorgung der verschiedenen Organe mit Glukose (vgl. Müller-Esterl, 2018).

Im Hexosemonophosphatweg wird durch die Verwertung von Glukose Energie in Form von NADPH sowie Ribose-5-Phosphat bereitgestellt, welches ein essentieller Baustein für Nukleinsäuren ist (vgl. Löffler et al., 2007).

Es bedarf beim Menschen etwa 1-2 Tage eines Glukosemangels, um die Glykogenreserven vollständig aufzubauchen. Für längere Fastenphasen hat der Organismus daher einen Mechanismus entwickelt, um Glukose über die Glukoneogenese bereitzustellen, falls sie nicht über die Nahrung aufgenommen wird. Dieser Prozess hat besonders große Bedeutung für Erythrozyten, das Knochenmark und das Nervensystem, da Glukose für diese Zellen unentbehrlich ist. Die Glukoneogenese ermöglicht die Synthese von Glukose aus Ausgangsverbindungen, die keine Kohlenhydrate sind, wie beispielsweise Pyruvat, Laktat oder Aminosäuren. Die glukogenen Aminosäuren, die dafür benötigt werden, stammen hauptsächlich aus den Proteinreserven der Skelettmuskulatur. Leber und Niere spielen hierbei eine zentrale Rolle, da sie die einzigen Organe sind, die über die erforderlichen Enzyme verfügen und in der Lage sind, größere Mengen von Glukose durch Glukoneogenese neu zu synthetisieren (vgl. Müller-Esterl, 2018).

1.2. Fettmetabolismus-Triglyzeride

Lipide sind von entscheidender Bedeutung für die normale Funktion von Zellen, da viele zelluläre Prozesse und Biosynthesen von Lipiden abhängen. Abgesehen von ihrer Rolle beim Aufbau von Zellmembranen sind Lipide an zahlreichen Stoffwechselprozessen beteiligt, die für das Überleben von Zellen unerlässlich sind. Eicosanoide, die aus ungesättigten Fettsäuren gebildet werden, spielen eine wichtige Rolle als Gewebshormone. Darüber hinaus dienen Lipide als Ausgangsverbindungen für die Synthese vieler Signalmoleküle.

Etwa 40% der durch die Nahrung aufgenommenen Energie stammen aus Lipiden, zu denen u.a Triglyzeride, Phospholipide und Cholesterin zählen. Triglyzeride machen den Großteil der in der Nahrung vorhandenen Lipide aus. Bevor sie im Darmtrakt resorbiert werden, werden sie durch Lipasen in Fettsäuren, Monoacylglyzeride und Glycerin umgewandelt. Nach der Resorption kommt es zur erneuten Bildung von Triglyzeriden, die mit Apolipoproteinen verpackt und in Form von Chylomikronen in die Lymphgefäße abgegeben werden. Über die Lymphgefäße gelangen die Chylomikronen zu verschiedenen Geweben. Die meisten Zellen sind in der Lage, zumindest geringe Mengen an

Triglyzeriden zu speichern, die hauptsächlich als rasch verfügbare Energiequelle dienen. Fettgewebezellen sind auf die Synthese und Speicherung von Triglyzeriden spezialisiert, wodurch der Großteil der gespeicherten Triglyzeride im Fettgewebe zu finden ist. Bis zu 95% des Fettgewebes bestehen aus eingelagerten Triglyzeriden. Bei Nahrungskarenz können Triglyzeride unter hormonellem Einfluss rasch abgebaut und freigesetzt werden, um verschiedenen Geweben Energie zur Verfügung zu stellen. Dieser Abbau erfolgt durch Lipasen in Fettsäuren und Glycerin, die dann ins Blut abgegeben werden, um den Energiebedarf zu decken. Durch die β -Oxidation werden Fettsäuren zu Acetyl-CoA abgebaut, das in verschiedene Stoffwechselprozesse einmündet. Bei erhöhter β -Oxidation in der Leber entstehen Ketonkörper als wasserlösliche Abbauprodukte von Fettsäuren. Diese Ketonkörper dienen insbesondere beim Fasten als wichtige Energiequelle für verschiedene extrahepatische Gewebe (vgl. Löffler et al., 2007).

1.3. Regulation von Glukose- und Fettmetabolismus

Die Regulation der Glukosekonzentration im Blut erfolgt vorrangig durch Insulin und Glukagon, die antagonistisch wirken. Diese Hormone werden in den Langerhans-Inseln des Pankreas synthetisiert, allerdings von verschiedenen Zelltypen. Die β -Zellen im Zentrum der Inseln sind für die Produktion, Speicherung und Abgabe von Insulin ins Blut verantwortlich, während die α -Zellen am Rand der Inseln Glukagon produzieren. Im menschlichen Organismus sind die β -Zellen in den Langerhans-Inseln die einzigen Produzenten von Insulin.

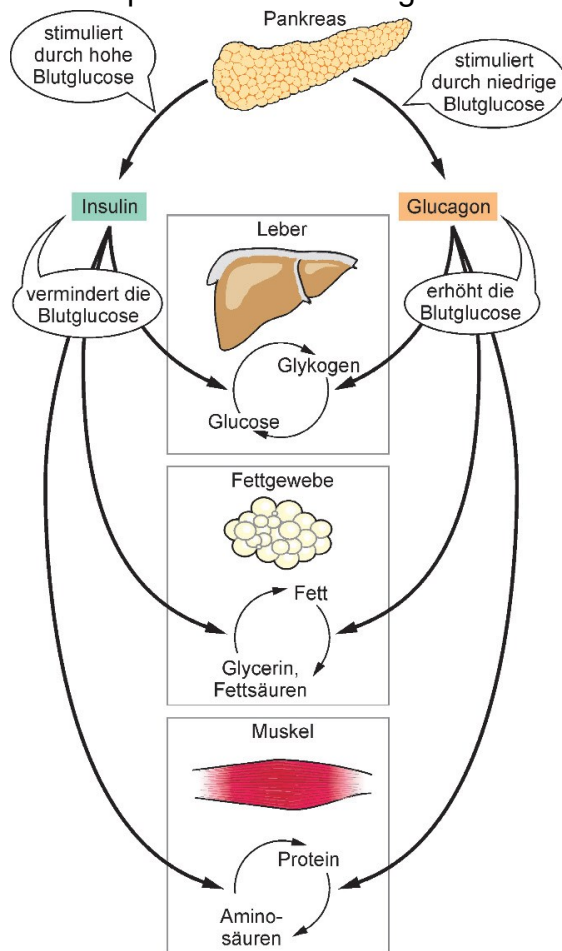


Abbildung 1. Regulation des Glukosemetabolismus durch Insulin und Glukagon (Müller-Esterl, 2018)

Sowohl Insulin als auch Glukagon tragen zur Regulierung der Blutglukosekonzentration bei. Ihr Ziel ist es, während Hungerperioden ebenso wie nach Nahrungsaufnahme eine stabile Glukosekonzentration aufrechtzuerhalten und Hypo- und Hyperglykämien zu vermeiden.

Nach einer Mahlzeit erfolgt die Aufnahme von Glukose im Dünndarm, was zu einem vorübergehenden Anstieg der Blutglukosekonzentration führt. Das löst die Freisetzung von Insulin aus und hemmt die Ausschüttung von Glukagon. Der Anstieg der Blutglukosekonzentration regt die β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse an, was schließlich zur Freisetzung von Insulin führt. Der Parasympathikus, der durch die Nahrungsaufnahme aktiviert wird, stimuliert ebenfalls die β -Zellen (vgl. Müller-Esterl, 2018).

Die Freisetzung von Hormonen wird durch die Glukosekonzentration im zirkulierenden Blut gesteuert, das vom Inselzentrum zur Peripherie fließt. Die

ausgeschütteten Hormone werden über den Blutkreislauf zu den Zielorganen transportiert, darunter die Leber, die Muskulatur und das Fettgewebe. Insulin erhöht die Aufnahme von Glukose sowohl in die Skelettmuskulatur als auch ins Fettgewebe. Hierbei sind insulinsensitive Transporter beteiligt, die nach der Bindung von Insulin in der Lage sind, Glukose aufzunehmen, was die Glukoseverwertung fördert. Im Gegensatz dazu verfügt die Leber über ein eigenes Glukosetransportsystem, das nicht von Insulin abhängig ist. Die Glukoseaufnahme in die Leber erfolgt über dieses insulinunabhängige Transportsystem, das hauptsächlich von der Glukosekonzentration im Blut abhängt und durch einen Konzentrationsgradienten gefördert wird. Die Aufnahme

von Glukose in die Leber führt zur Hemmung des Glykogenabbaus und zur Stimulation von Glykolyse und Glykogensynthese (Abbildung 1).

Die Auffüllung der Glykogenspeicher in der Leber stimuliert auch die Fettsäuresynthese. Die gebildeten Fettsäuren werden in Triglyzeride eingebaut und mit VLDL (very-low-density Lipoproteinen) ins Fettgewebe transportiert, wo sie zur Auffüllung des Fettdepots verwendet werden.

Die erhöhte Glukoseaufnahme in verschiedene Zellen führt zu einem Abfall der Blutglukosekonzentration, aber gleichzeitig werden unterschiedliche Stoffwechseleffekte in diesen Zellen ausgelöst. In Muskelzellen wird die Glykogensynthese gesteigert, es kommt jedoch auch zu einer verstärkten Glykolyse, während der Abbau von Proteinen gehemmt wird. In den Fettzellen wird die vermehrt aufgenommene Glukose über den Hexosemonophosphatweg unter Bildung von NADPH abgebaut. Darüber hinaus wird die Glykolyse gesteigert, was zu einer erhöhten Bereitstellung von Azetyl-CoA für die Fettsäurebiosynthese führt. Daher fördert Insulin auch in den Fettzellen die Bildung von Speichermolekülen. Der Fettabbau (Lipolyse) wird gleichzeitig durch Insulin gehemmt.

Insulin hat langfristige Wirkungen auf den Glukosemetabolismus, einerseits durch Stimulation der Expression von Enzymen, die an der Glykolyse beteiligt sind und andererseits hemmt das Insulin die Expression von Enzymen, die an der Glukoneogenese beteiligt sind (vgl. Löffler et al., 2007).

Zwischen den Mahlzeiten oder bei Hunger sinkt die Blutglukosekonzentration, was die α -Zellen des Pankreas stimuliert, Glukagon freizusetzen. Glukagon hat die Aufgabe, beispielsweise im Falle von Nahrungskarenz Glukose bereitzustellen. Seine Hauptwirkung konzentriert sich vor allem auf die Leber, da die meisten Glukagon-Rezeptoren auf den Hepatozyten vorhanden sind. Indem es die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht, stimuliert Glukagon Prozesse wie Glukoneogenese, Glykogenolyse und Lipolyse, während gleichzeitig Glykolyse, Fettsäuresynthese und Glykogensynthese gehemmt werden. Die kombinierte Wirkung dieser Prozesse führt zu einem Anstieg der Blutglukosekonzentration durch verstärkte Freisetzung von Glukose aus der Leber (vgl. Löffler et al., 2007; vgl. Müller-Esterl 2018) (Abbildung 1).

Nach einer kurzen Hungerperiode erfolgt die Ausschüttung von Glukagon, das die Glykogenolyse anregt. Die Glukagonausschüttung führt somit zum Abbau der in der Leber gespeicherten Glykogenreserven und zur Bereitstellung von Glukose, um die Blutglukosehomöostase aufrechtzuerhalten. Gleichzeitig fördert Glukagon die Lipolyse in den Fettdepots, wodurch die bei der Lipolyse entstehenden Substrate in die Glukoneogenese einmünden können. Aufgrund der verminderten Insulinausschüttung nimmt die Glukoseaufnahme in den Muskeln ab und sie schalten weitgehend auf die Verwertung von Fettsäuren um. Die gesteigerte Proteolyse liefert ebenfalls Substrate, die in die Glukoneogenese einfließen können. Das bei der Lipolyse im Fettgewebe entstehende Glycerin kann ebenfalls in die Glukoneogenese eingeschleust werden.

Nach etwa einem Tag des Fastens sind die Glykogenreserven erschöpft und der Körper beginnt verstärkt auf Fett- und Proteinreserven zurückzugreifen. Bei anhaltendem Fasten wird der Zitratzyklus aufgrund des anhaltenden Mangels an Oxalazetat, das für die Glukoneogenese benötigt wird, immer langsamer. Das

führt folglich zur Akkumulation von Ketonkörpern, die aus der β -Oxidation stammen. So schaltet die Leber auf die Produktion von Ketonkörpern um, um Funktionen des lebenswichtigen Organs aufrechtzuerhalten (vgl. Müller-Esterl, 2018). Der Austausch von Kraftstoffen zwischen Organen ist in Abbildung 2 nochmal zusammengefasst.

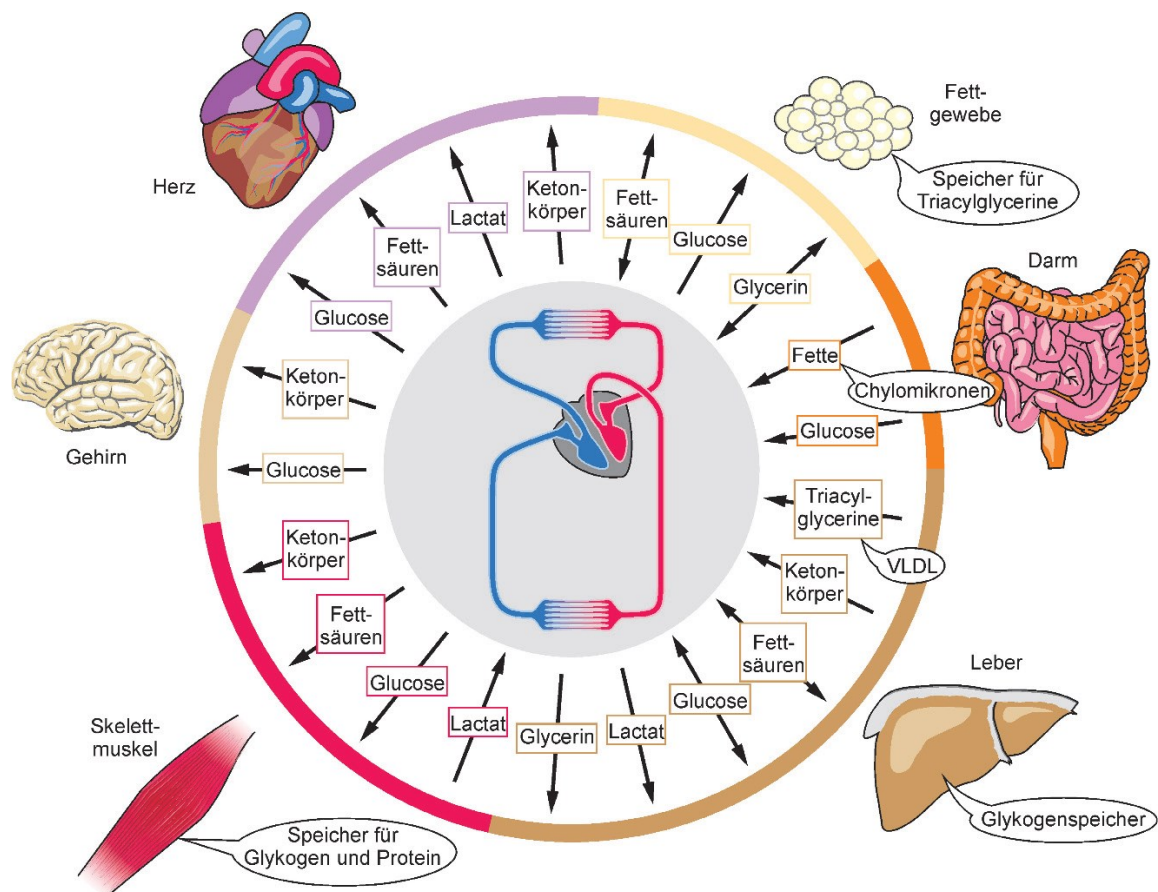


Abbildung 2. Metabolische Wechselwirkungen zwischen Organen über die Blutbahn (Müller-Esterl, 2018)

1.4. Diabetes mellitus

Durch die Beteiligung der Hormone Adrenalin, Cortisol, Glukagon und Insulin am Stoffwechsel wird eine konstante Konzentration der Blutglukose aufrechterhalten. Diese Hormone ermöglichen eine schnelle Reaktion und Anpassung des Organismus an eine Änderung der Ernährungszustände. Wenn endokrine Störungen den Hormonhaushalt betreffen, kann das schwere Erkrankungen auslösen (vgl. Müller-Esterl, 2018).

Durch eine Störung des Glukosemetabolismus, die entweder auf absoluten oder relativen Insulinmangel beruht, entsteht Diabetes mellitus. Die wichtigsten Diabetes-Typen werden folgendermaßen unterschieden: Typ-1-Diabetes und Typ-2-Diabetes, von denen die meisten Patienten betroffen sind. Es werden noch weitere Typen wie Gestationsdiabetes (Schwangerschaftsdiabetes, MODY (maturity onset diabetes of the young) und LADA (latent autoimmune diabetes of the adult) unterschieden, aber diese werden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter diskutiert (vgl. Aktories et al., 2013).

1.4.1. Typ-1-Diabetes mellitus

Obwohl Typ-1-Diabetes in jeder Altersgruppe auftreten kann, tritt Typ-1-Diabetes in der Regel im jugendlichen Alter auf. Es kommt zu einer autoimmunen Zerstörung der β -Zellen, die in einem absoluten Insulinmangel resultiert. Die Symptome werden manifest, wenn schon 80% der β -Zellen zerstört sind. Der genaue Auslöser der Autoimmunreaktion ist noch nicht bekannt. In Betracht werden sowohl genetische als auch Umweltfaktoren gezogen, aber auch Virusinfekte werden diskutiert.

Durch die Aktivierung des Immunsystems rufen die zytotoxischen T-Zellen eine entzündliche Reaktion in β -Zellen hervor, die letztendlich für den Untergang der β -Zellen verantwortlich ist. Hierbei können auch Antikörper gegen Insulin oder Bestandteile der β -Zellen nachgewiesen werden, die heutzutage zur Diagnosestellung und zur Risikoeinschätzung bei Kindern von Eltern mit Typ-1-Diabetes verwendet werden. Mit fortschreitender Schädigung der verbleibenden β -Zellen nimmt die körpereigene Produktion von Insulin kontinuierlich ab. Das führt schließlich dazu, dass die Patienten vollständig auf externe Insulingabe angewiesen sind, da sie über keine endogene Insulinversorgung mehr verfügen (vgl. Aktories et al., 2013; vgl. Löffler et al., 2007).

1.4.2. Typ-2-Diabetes mellitus

Typ-2-Diabetes ist die häufigste Form von Diabetes. Eine frühzeitige Diagnose und Behandlung sind vor allem wichtig, um rechtzeitig die Spätfolgen zu mildern, die auch fatal sein können. Obwohl Typ-2-Diabetes noch als Altersdiabetes bekannt ist und typischerweise bei Menschen ab 40 Jahren auftritt, hat die Verbreitung dieser Erkrankung unter jungen Menschen ebenfalls zugenommen (vgl. Löffler et al., 2007).

In der frühen Phase ist Typ-2-Diabetes durch relativen Insulinmangel gekennzeichnet, da es hier noch nicht zum Untergang der β -Zellen kommt. Diese Phase des Typ-2-Diabetes ist durch sowohl verzögerte Insulinsekretion als auch Insulinresistenz in verschiedenen Geweben gekennzeichnet. Die verminderte Empfindlichkeit des Gewebes gegenüber Insulin wird durch die erhöhte Insulinkonzentration im Blut kompensiert, was zu einer Reduktion der Rezeptorendichte in der Peripherie führt. Insulinresistenz kann in speziellen Fällen auf molekularer Ebene durch genetische Defekte des Insulinrezeptors oder durch Fehlfunktionen in den Insulin-vermittelten Signalkaskaden in den Zellen verursacht werden (vgl. Brandes et al., 2019).

Die Krankheit entwickelt sich schleichend, zunächst ist sie durch eine leichte Hyperglykämie und erhöhte Insulinkonzentration im Blut gekennzeichnet. Die erhöhte Insulinproduktion und -freisetzung kompensieren die Insulinresistenz in den frühen Stadien der Krankheit. Doch im späteren Verlauf der Krankheit nimmt die Funktion der β -Zellen aufgrund der anhaltenden Überforderung der Insulinsekretion allmählich ab, was zu einer gestörten Insulinsekretion führt. Im fortgeschrittenen Stadium kann dies zur Degeneration und zum Absterben dieser Zellen führen und letztendlich zu einem absoluten Insulinmangel (vgl. Freissmuth et al., 2020; vgl. Löffler et al., 2007).

Typ-2-Diabetes entwickelt sich in der Regel aufgrund einer Kombination von genetischer Prädisposition und ungesundem Lebensstil, der fettreiche Ernährung, Bewegungsmangel und Adipositas einschließt. Tatsächlich sind bis zu 70% der Typ-2-Diabetes-Patienten adipös. Häufig tritt Adipositas auch in Verbindung mit anderen Gesundheitsproblemen auf, insbesondere wenn es sich um ausgeprägtes Bauchfett handelt. Das metabolische Syndrom umfasst diese typische Kombination von Gesundheitsproblemen. Das metabolische Syndrom ist durch gestörte Glukosetoleranz, periphere Insulinresistenz, Dyslipoproteinämie und Hypertonie charakterisiert. Die meisten Fälle von Typ-2-Diabetes entwickeln sich auf dem Hintergrund eines metabolischen Syndroms (vgl. Löffler et al., 2007).

Es wird vermutet, dass chronisch entzündliche Prozesse im Fettgewebe sowie die erhöhte Freisetzung von Fettsäuren infolge von Adipositas ursächlich zur Insulinresistenz beitragen. Es gibt Hinweise, dass die Verteilung des Fettgewebes ein wichtiger Faktor ist, insbesondere ist es die Ansammlung von viszeralem Fett, die zu einem Anstieg der freien Fettsäuren im Blut führt. Ein Anstieg der Konzentration an freien Fettsäuren im Blut reduziert die Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur, erhöht die hepatische Glukosefreisetzung und wirkt sich negativ auf die Insulinsekretion aus. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass Adipositas nicht die einzige Ursache für Insulinresistenz ist. Da die Mehrheit der übergewichtigen Menschen keinen Diabetes hat und die Insulinresistenz in der Allgemeinbevölkerung weit verbreitet ist, ist eine Insulinresistenz allein nicht ausreichend, um Typ-2-Diabetes auszulösen. Typ-2-Diabetes tritt erst auf, wenn der durch Insulinresistenz erhöhte Bedarf an Insulin nicht vollständig durch die β -Zellen abgedeckt werden kann. Daher sind Insulinsekretionsdefekte notwendig, um Typ-2-Diabetes zu entwickeln. Es wird angenommen, dass sowohl Insulinresistenz als auch

Insulinsekretionsdefekte polygenetisch bedingt sind (vgl. Aktories et al., 2013; vgl. Löffler et al., 2007).

Im Gegensatz zum Typ-1-Diabetes sind Typ-2-Diabetes-Patienten erst in einem fortgeschrittenen Stadium auf die Insulinersatztherapie angewiesen. Bei der Therapie von früheren Stadien des Typ-2-Diabetes werden verschiedene Wirkstoffgruppen eingesetzt, die entweder insulinotrop oder nicht-insulinotrop wirken. Insulinotrope Wirkstoffe sind sinnvoll, solange der Körper in der Lage ist, eigenes Insulin zu produzieren. Zum Beispiel wirken Sulfonylharnstoffe und ihre Analoga insulinotrop, indem sie die Insulinsekretion steigern. Ähnlich verhalten sich DPP-4-Hemmer und GLP-1-Agonisten, die eine verzögerte Magenentleerung bewirken und zugleich glukoseabhängig die Insulinsekretion verstärken. Unter den nicht-insulinotropen Wirkstoffen wirkt Metformin auf den Glukosemetabolismus, während SGLT-2-Hemmer die Glukoseausscheidung über den Harn erhöhen und Thiazolidindione die Insulinsensitivität steigern (vgl. Aktories et al., 2013; Freissmuth et al., 2020).

1.4.3. Kurz- und langfristige Folgen von Diabetes Mellitus

Alle Diabetesformen können, wenn sie unbehandelt bleiben, schwerwiegende Spätkomplikationen hervorrufen, die die Lebensqualität der Patienten erheblich beeinträchtigen. Daher ist das Hauptziel jeder Therapie, normale Blutglukosewerte zu erreichen, um das Risiko von Spätkomplikationen zu verringern.

Die häufigsten und bedeutendsten Spätkomplikationen betreffen das Gefäßsystem. Chronisch erhöhte Blutglukose ruft Veränderungen in Kapillaren (Mikroangiopathie) sowie in mittleren und großen Arterien (Makroangiopathie) hervor. Mikroangiopathien können Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie verursachen, während Makroangiopathien das Risiko für Herzinfarkt, Schlaganfall und Gangrän erhöhen. Diabetische Retinopathie und Nephropathie sind die führenden Ursachen für Erblindung und dialysepflichtige Niereninsuffizienz (vgl. Aktories et al., 2013).

Bei einer Entgleisung des Stoffwechsels und unbehandeltem Diabetes kommt es zu einer gesteigerten Glukoseproduktion in der Leber, gleichzeitig jedoch zu einer stark eingeschränkten Glukoseverwertung in den meisten Organen. Das führt zu einer vermehrten Abgabe von Glukose und erhöhter Blutglukosekonzentration. Das hat zur Folge, dass die Fähigkeit der Nieren, Glukose rückzuresorbieren, erschöpft wird, was Glukosurie verursacht. Dieser Prozess erhöht den osmotischen Wasserverlust, der letztendlich zu Polyurie und Dehydratation führt. Gleichzeitig steigt aufgrund der verminderten Glukoseverwertung durch die Organe der Fettsäureabbau stark an, was zu einer massiven Ansammlung von sauren Ketonkörpern führt und in der Folge eine metabolische Azidose verursacht. Infolgedessen kommt es zur Bildung von Azeton, das über die Lunge ausgeschieden wird und einen charakteristischen Azetongeruch bei der Ausatmung erzeugt. Diese Entgleisung kann zu einem lebensbedrohlichen Zustand führen, der als diabetisches Koma (Coma diabeticum) bezeichnet wird (vgl. Müller-Esterl, 2018).

1.5. Erythropoietin

Humanes Erythropoietin gehört zur Familie der Zytokine, genauer gesagt zur Gruppe der Colony Stimulating Factors (CSF). Das ist eine von fünf Hauptgruppen der Zytokine und spielt eine Rolle bei der Differenzierung und dem Wachstum im Organismus, ähnlich wie die anderen Zytokine (vgl. Sprigg & Bath, 2007).

Erythropoietin ist ein saures Glykoprotein mit einer Molekularmasse von 34 kDa. Es besteht aus einer Peptidkette, die 165 Aminosäuren und vier Glykane enthält. Von diesen Glykanen ist eine O-glykosidisch gebunden und drei sind N-glykosidisch gebunden. Die Monosaccharide, die an der Bildung dieser Zuckerseitenketten beteiligt sind, umfassen Galaktose, Fruktose, Mannose, N-Azetylglukosamin, N-Azetylgalaktosamin und N-Azetylneuraminsäure (vgl. Sasaki et al., 1987) (Abbildung 3).

Die N-glykosidischen Seitenketten neigen zu Verzweigungen, was zu Unterschieden in der Reihenfolge der Monosaccharide und somit zu einer Variabilität dieser Seitenketten führt. Diese Unterschiede in der Feinstruktur werden als Mikroheterogenität einzelner Erythropoietinmoleküle oder als Polymorphismus des Erythropoietins bezeichnet. Die Feinstruktur hängt hauptsächlich von dem Zelltyp ab, in dem Erythropoietin synthetisiert wird (Freissmuth et al., 2020). Dieses Phänomen ist sowohl bei humanem als auch bei rekombinantem Erythropoietin vorhanden. Darüber hinaus spiegelt sich der Polymorphismus in der unterschiedlichen Anzahl der endständigen N-Azetylneuraminsäuren wider, die zur Gruppe der Sialinsäuren gehören. Die Anzahl der endständigen Sialinsäuren beeinflusst die biologische Aktivität des Erythropoietins erheblich. Höherer Grad der Sialysierung verlängert die Serumhalbwertszeit und senkt die Affinität zum Erythropoietin-Rezeptor (vgl. Wasley et al., 1991).

Die Stabilität des Erythropoietins wird also durch die Glykosylierungsmuster bestimmt. Demzufolge zeigen Erythropoietinmoleküle mit geringerem Sialisierungsgrad als natürlich vorkommendes Erythropoietin eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber pH-Werten und Temperaturen, was letztendlich zu einer beschleunigten Denaturierung führen kann (vgl. Narhi et al., 1991).

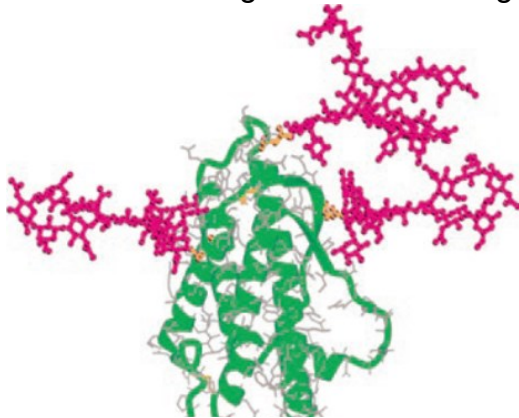


Abbildung 3. Erythropoietin besteht aus vier α -Helices und hat vier Glykosylierungsstellen (Freissmuth et al., 2020). Grün: Peptidkette; Rosa: Seitenketten.

Erythropoietin zeichnet sich durch eine spezifische Struktur aus, die aus vier α -Helices besteht. Dabei verlaufen jeweils zwei der vier α -Helices antiparallel zueinander und bilden ein Bündel (vgl. Freissmuth et al., 2020).

1.5.1. Biosynthese

Die Menge des Erythropoietins wird in internationalen Einheiten (IE) angegeben. Bei gesunden Menschen liegen die Normwerte der Serumkonzentration des Erythropoietins in einem Bereich zwischen 5 – 25 U/l (vgl. Lappin et al., 2002; Schöffel et al., 2008).

Die Synthese von Erythropoietin findet hauptsächlich in den fibroblastenähnlichen Zellen zwischen den proximalen Tubuli in der Nierenrinde (peritubuläre Fibroblasten) statt (vgl. Jelkmann, 2007). Während der fötalen Entwicklung ist die Leber für die Erythropoietinsynthese verantwortlich, aber bei Erwachsenen wird nur ein geringer Anteil in den Hepatozyten synthetisiert (vgl. Fisher, 2003). Neben der Leber sind auch andere Organe an der Synthese beteiligt. Daher sind geringere Mengen an Erythropoietin in der Gebärmutter, der Lunge, dem Knochenmark, dem Eileiter, dem Hoden, dem Gehirn und der Milz nachweisbar (vgl. Schöffel et al., 2008). Die von diesen Organen produzierte Menge an Erythropoietin ist nicht ausreichend, um die endokrine Funktion der Niere bei Niereninsuffizienz zu kompensieren (vgl. Brandes et al., 2019).

Ein Abfall des Sauerstoffpartialdrucks im Blut sowie ein Abfall des Hämatokrits fördern die Erythropoietinsynthese und -freisetzung. Die peritubulären Fibroblasten sind in der Lage, Veränderungen des Sauerstoffgehalts wahrzunehmen und im hypoxischen Zustand nötige Prozesse in Gang zu setzen, um die Normoxie im Organismus wiederherzustellen.

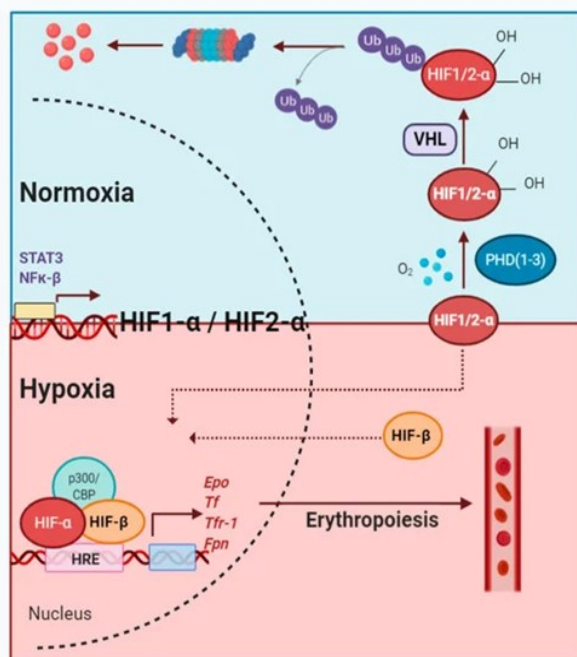


Abbildung 4. Oben: Unter Normoxie wird HIF-1α hydroxyliert und durch die Bindung an das Von-Hippel-Lindau-Protein von einem Proteasom abgebaut. Unten: Unter Hypoxie bleibt die Hydroxylierung aus, HIF-1α kann in den Zellkern translozieren und dort die Transkription des Erythropoietins aktivieren (Watts et al., 2020).

Die Regulation der Erythropoietinfreisetzung wird hauptsächlich durch den sauerstoffsensitiven Transkriptionsfaktor HIF1 (Hypoxie-Induzierter-Faktor 1) beeinflusst. Der HIF1 ist ein Heterodimer, das aus einer α- und einer β-Untereinheit besteht. HIF-1α wird bei normalem Sauerstoffpartialdruck ständig im Zellplasma exprimiert, während sich der HIF-1β im Zellkern befindet. Bei normalem Sauerstoffpartialdruck unterliegt HIF-1α einer Hydroxylierung, wodurch HIF-1α an das Von-Hippel-Lindau-Protein gebunden wird. Der ausgebildete Komplex wird ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (vgl. Freissmuth et al., 2020; vgl. Marxsen et al., 2004; vgl. Schöffel et al., 2008).

Bei Verringerung des Sauerstoffpartialdrucks unterbleibt die Hydroxylierung des HIF-1 α , wodurch HIF-1 α nicht abgebaut wird und folglich in den Zellkern transloziert. Durch die Bindung des HIF-1 α an die zugehörige HIF-1 β -Untereinheit entsteht im Zellkern der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF-1, der an das Hypoxie-sensible Bindungselement (HRE) bindet. Dadurch werden weitere Transkriptionsfaktoren rekrutiert sowie „cAMP response element-binding protein“ (CREB) und p300, die die Transkription des Erythropoietin-Gens induzieren (vgl. Aktories et al., 2013; vgl. Stockmann & Fandrey, 2006) (Abbildung 4).

Von humanem Erythropoietin-Gen wird ein Pro-Erythropoietin-Protein kodiert, das 193 Aminosäuren enthält. Die posttranslationale Modifikation beginnt damit, dass ein Peptid mit 27 Aminosäureresten am N-Terminus abgespalten wird, gefolgt von der Abspaltung des verbleibenden C-terminalen Asparagins durch eine intrazelluläre Carboxypeptidase. Anschließend erfolgen posttranslationale Modifikationen des Pro-Erythropoietin-Proteins, darunter Glykosilierung, Sulfatierung und Sialisierung (vgl. Choi et al., 1996; vgl. Narhi et al., 1991; vgl. Schöffel et al., 2008).

1.5.2. Erythropoese

Von der Niere sezerniertes Erythropoietin erreicht das Knochenmark über die Blutbahn und stimuliert dort die Erythropoese. Während die Erythropoese beim Menschen weitgehend im Knochenmark stattfindet, spielt bei der Maus auch die Milz eine wesentliche Rolle. Die Wirkung von Erythropoietin erfolgt durch die Bindung an den transmembranären homodimeren Erythropoietin-Rezeptor, der zu den Rezeptoren gehört, die mit Tyrosinkinase assoziiert sind. Diese Rezeptoren verfügen nicht über eine eigene Kinasedomäne, sondern rekrutieren Kinasen, die sich im Zytosol befinden, entweder vor oder nach der Bindung des Liganden (vgl. Brandes et al., 2019).

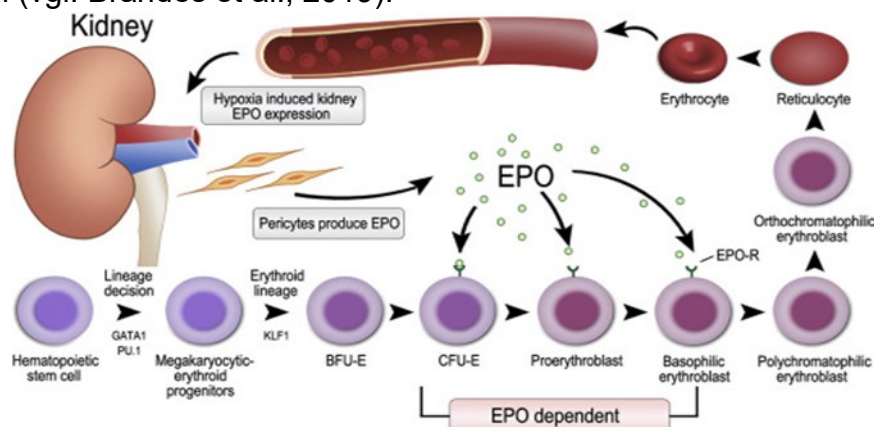


Abbildung 5. Erythropoietin beeinflusst vor allem die Vorläuferzellen im Stadium BFU-E (Erythroid Burst Forming Unit), die sich zunächst zu reiferen Vorläuferzellen des Typs CFU-E (Erythroid Colony Forming Unit) entwickeln und schließlich erfolgt die Ausdifferenzierung von Retikulozyten zu Erythrozyten (Shih et al., 2018).

Am intrazellulären C-Terminus des Erythropoietin-Rezeptors befindet sich die Janus Kinase 2 (JAK), die nach der Bindung von Erythropoietin aktiviert wird und zytosolische Proteine phosphoryliert. Dadurch wird die Rekrutierung von

Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie ausgelöst, insbesondere von STAT5, der für die Erythropoese von besonderer Bedeutung ist (vgl. Yoshimura & Arai, 1996). Nach der Phosphorylierung bilden die STAT-Proteine Dimere und translozieren in den Zellkern. Dort binden sie an die Cytokine Responsive Promoter Elements (CRPE), was die Transkription induziert und somit die Erythropoese fördert. Vor allem die Vorläuferzellen im Stadium BFU-E (Erythroid Burst Forming Unit) werden von Erythropoietin beeinflusst, die zunächst zu Vorläuferzellen des Typs CFU-E (Erythroid Colony Forming Unit) reifen, bevor sie über Retikulozyten zu Erythrozyten ausdifferenzieren (vgl. Aktories et al., 2013) (Abbildung 5).

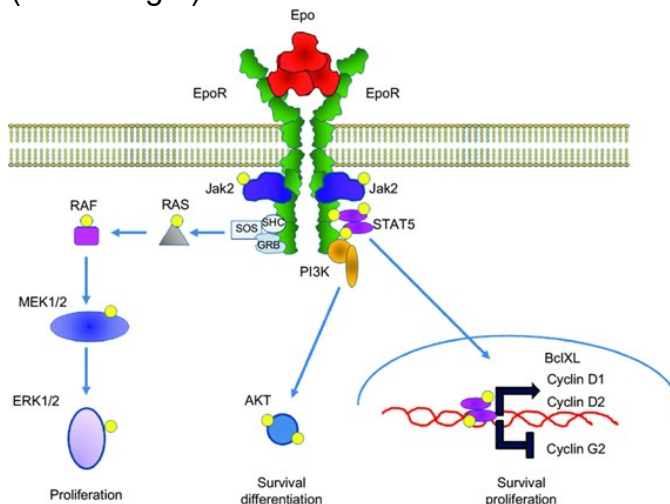


Abbildung 6. Nach der Bindung des Erythropoietins an den Rezeptor und deren Dimerisierung werden in der Zelle verschiedene Signaltransduktionswege in Gang gesetzt (Elliott & Sinclair, 2012).

Zudem wird das GTP-bindende Protein RAS aktiviert, welches verschiedene Signaltransduktionswege in Gang setzt. Außerdem werden der MAP-Kinase-Weg (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg (PI-3-K) aktiviert, die die Apoptose der hämatopoetischen Vorläuferzellen unterdrücken (vgl. Freissmuth et al., 2020) (Abbildung 6).

1.5.3. Nicht-hämatopoetische Wirkungen des Erythropoietins

Neben seiner primären Rolle in der Erythropoese ist das Erythropoietin durch die verbreitete Expression des Erythropoietin-Rezeptors an der Regulation vieler unterschiedlicher Gewebe beteiligt, was in zahlreichen Studien an Tiermodellen untersucht worden ist (zusammengefasst in Abbildung 7).

Es wurde gezeigt, dass sowohl endogenes als auch exogenes Erythropoietin in der Lage sind, unterschiedliche Reaktionen im Körper auszulösen. Im Gehirn wurden neuroprotektive Effekte entdeckt und es wurde auch ein Beitrag des Gehirns zur metabolischen Regulation aufgedeckt, der durch Erythropoietin ausgelöst wird. Im kardiovaskulären System wurden ebenfalls kardioprotektive Effekte beobachtet sowie eine Regulation des Gefäßtonus. In Endothelzellen erfolgte eine verbesserte Sauerstoffversorgung. Bei ischämischem Stress, sowohl im Herzen als auch im Gehirn wird die eNOS aktiviert, die die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) stimuliert und so den Gefäßtonus reguliert. Erythropoietin ist auch in der Lage, die Wundheilung zu fördern und den Knochenumbau zu beeinflussen (vgl. Suresh et al., 2020).

Weiters zeigen die Tierstudien einen Erythropoietin-Effekt, der im Zusammenhang mit Adipositas und Typ-2-Diabetes stehen dürfte. Die Regulation des Stoffwechsels durch Erythropoietin erstreckt sich über die

Sauerstoffversorgung hinaus und trägt zur Aufrechterhaltung des Stoffwechselgleichgewichts bei. Tierstudien legen nahe, dass Erythropoietin bei Adipositas, die durch eine Diät verursacht wird, schützend wirken kann, indem es die Glukosetoleranz verbessert, die Insulinresistenz reduziert und die Ansammlung von Fettmasse reduziert, insbesondere bei männlichen Mäusen (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2014). Eine blutglukosesenkende Wirkung ist auch gezeigt worden (Foskett et al., 2011; Meng et al., 2013). Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit Beobachtungen bei Menschen, die in höheren Gebieten leben. Wie in metabolischen Studien an männlichen Mäusen angenommen, gibt es eine Verbindung zwischen erhöhter Erythropoietinkonzentration im Plasma und einer Verringerung des Körperfettanteils, was die Möglichkeit nahelegt, dass das erhöhte Erythropoietin teilweise für die geringere Adipositasrate bei Menschen in Höhen verantwortlich sein könnte. Für diese Effekte sind mehrere Organe verantwortlich (vgl. Voss et al., 2014).

Die Fütterung mit einer fettreichen Diät bei C57BL/6-Mäusen führt zu Entzündungen und zur Infiltration von Makrophagen in das weiße Fettgewebe. Vermehrte Makrophagen bilden kronenartigen Strukturen um Adipozyten. Der Erythropoietin-Rezeptor ist im weißen Fettgewebe stark exprimiert und die Erythropoietinbehandlung zeigt eine entzündungshemmende Wirkung im weißen Fettgewebe von adipösen Mäusen (vgl. Alnaeeli & Noguchi, 2015).

Ursprüngliche Studien an Mäusen, die auf eine mögliche Rolle von Erythropoietin in der Regulation des Stoffwechsels hinwiesen, beinhalteten die Übertragung des Erythropoietin-Gens in die Skelettmuskulatur, um eine verstärkte Expression von Erythropoietin zu erzielen, was bei adipösen Mäusen zu einer Verringerung des Körpergewichts aufgrund einer Abnahme des Fettgewebes führte. Gleichzeitig wurde eine gesteigerte Oxidation von Fetten in den Muskeln beobachtet und das Ansprechen auf Glukose normalisierte sich (vgl. Højman et al., 2009; vgl. Teng et al., 2011).

Bei Mäusen, bei denen der Erythropoietin-Rezeptor in den Adipozyten gezielt gelöscht wurde, wurde gezeigt, dass Erythropoietin direkt in die Regulation des Körpergewichts und der Fettmasse eingreift (vgl. Wang et al., 2013).

Durch die Erythropoietinwirkung werden in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse schützende Effekte ausgelöst. In Studien mit Mausmodellen für Diabetes wirkte Erythropoietin proliferativ, entzündungshemmend und angiogen auf das Pankreas (vgl. Choi et al., 2010). Daneben ist Erythropoietin in der Lage, eine Leberentzündung zu reduzieren, die mit durch die Diät verursachter Adipositas einhergeht (vgl. Meng et al., 2013).

Die metabolische Homöostase wird auch durch die Aktivität von Erythropoietin im Gehirn, insbesondere im Hypothalamus, beeinflusst (vgl. Dey et al., 2015).

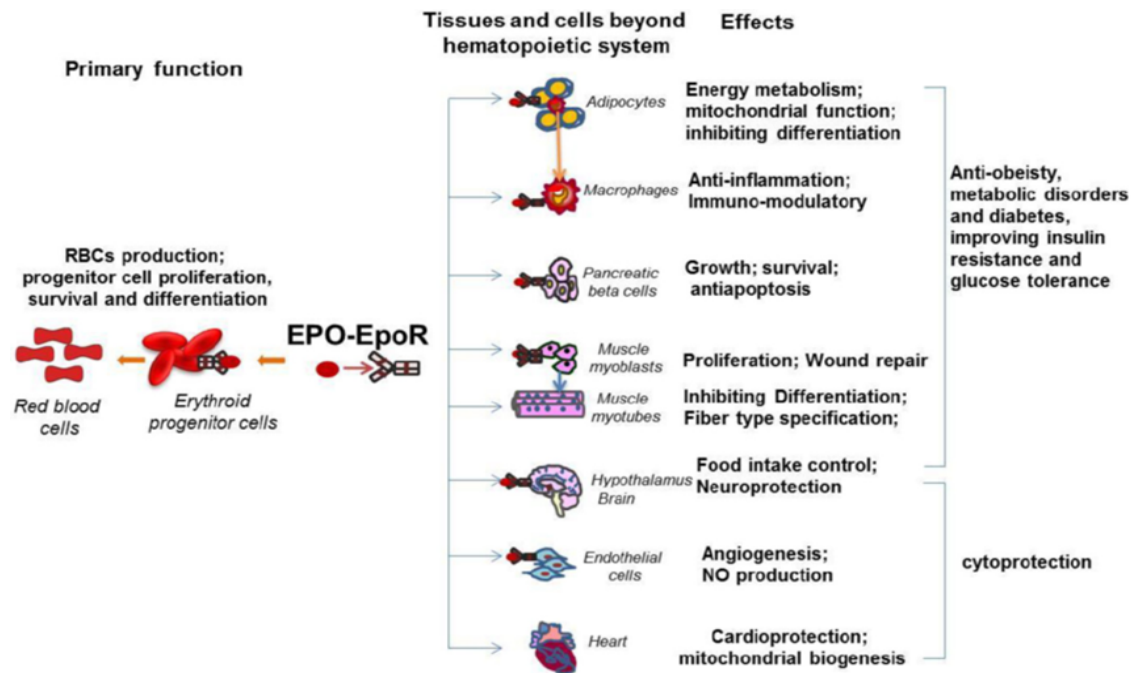


Abbildung 7. Nicht-hämatopoetische Wirkung von Erythropoietin auf verschiedene Gewebe (Wang et al., 2014)

1.5.4. Erythropoietin als Therapeutikum

Renale Anämie kann sowohl als Folge einer akuten als auch einer chronischen Niereninsuffizienz auftreten. Dieser Zustand ist durch zwei Hauptfaktoren charakterisiert: Zum einen wird die Produktion von Erythropoietin in den geschädigten Nieren reduziert oder kann aufgrund der Schädigung von Fibroblasten sogar vollständig ausfallen. Zum anderen zeigt die Niere eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Hämoglobinkonzentration, was zu einer verminderten Produktion von Erythropoietin führt. Die Behandlung der renalen Anämie erfolgt heutzutage in der Regel durch die Verwendung von gentechnisch hergestelltem Erythropoietin, was dessen wichtigste Indikation darstellt (vgl. Brandes et al., 2019).

Wie bereits erwähnt, ist das Glykosylierungsmuster des Erythropoietins von entscheidender Bedeutung für seine biologische Aktivität. Aus diesem Grund wird rekombinantes Erythropoietin in Säugerzellen hergestellt, da diese eine posttranslationale Modifikation ermöglichen. Häufig wird die sogenannte CHO-Zelllinie (Chinese Hamster Ovary) verwendet, die gut erforscht ist. Das Glykosylierungsmuster der in CHO-Zellen hergestellten Proteine weist einige Unterschiede im Vergleich zum nativen Erythropoietin auf. Obwohl die gentechnisch hergestellten Erythropoietine die gleiche Aminosäuresequenz und die gleichen Glykosylierungsstellen wie das native Erythropoietin aufweisen, zeigen sie dennoch ein unterschiedliches, aber ähnliches Glykosylierungsmuster (vgl. Freissmuth et al., 2020).

Die Behandlung mit Erythropoietin bringt auch ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse. Diese Folge ergibt sich aus der Kombination von erhöhter Blutviskosität und einer gesteigerten Thrombozytenzahl, was letztendlich zur Bildung von Thromben führt (Jelkmann, 2010). Bei 20-30% der

behandelten Personen tritt Hypertonie nicht nur aufgrund der erhöhten Blutviskosität, sondern auch aufgrund der durch Erythropoietin stimulierten Proliferation der glatten Muskelzellen und der daraus resultierenden Vasokonstriktion auf (vgl. Freissmuth et al., 2020).

Erythropoietin wird auch zur Behandlung von Anämie, die durch Zytostatika verursacht wird, eingesetzt. Paradoxe Weise stimuliert aber Erythropoietin das Tumorwachstum, indem es die Expression der Erythropoietin-Rezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen fördert und somit die Progression vieler Tumore beschleunigt (vgl. Freissmuth et al., 2020; vgl. Sytkowski, 2007).

2. Zielsetzungen

Einige Studien berichteten bereits darüber, dass Erythropoietin bei adipösen Mäusen das Körpergewicht reduzieren, die Blutglukose senken und den Stoffwechsel beeinflussen kann. Da eine Reduktion des Körpergewichts auch unabhängig von Erythropoietin mit allen diesen Effekten einhergeht, bleibt jedoch die Frage, ob die Erythropoietin-induzierten Veränderungen dieser Parameter lediglich eine Folge der Gewichtsreduktion sind oder ob Erythropoietin darüber hinaus auch direkt wirkt.

In vorliegender Arbeit wurde die Wirkung des Erythropoietins bei adipösen männlichen Mäusen auf Parameter wie Blutglukose, -ketone, -fette, Fettmasse, körperliche Aktivität und Energieverbrauch gemessen. Die Untersuchungen hatten zum Ziel, durch kontrollierte Ernährung der Kontrollmäuse zu unterscheiden, welche Erythropoietineffekte lediglich Folge eines Verlusts an Körpergewicht sind und welche - zumindest teilweise - durch direkte, also gewichtsunabhängige Wirkung des Erythropoietins verursacht werden.

3. Materialien und Methoden

3.1. Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere wurden für dieses Experiment 30 männliche Mäuse aus dem Wildtypstamm C57BL/6J gewählt. Als die Mäuse ca. 8 Wochen alt waren, wurden sie vom Institut für Tierzucht der Medizinischen Universität Wien in Humberg, Österreich, geliefert. Die Entscheidung für diesen Mausstamm basierte auf früheren Experimenten und Studien, durch die nachgewiesen wurde, dass der Stamm C57BL/6J unter einer fettreichen Ernährung besonders anfällig für die Entwicklung von Stoffwechselstörungen ist. Eine von Montgomery et al. (2013) durchgeführte Studie verglich 5 unterschiedliche Mäusestämme (C57BL/6, 129X1/SvJ, BALB/c, DBA/2 und FVB/N) und deren Ansprechen auf Low-Fat-Diet gegenüber High-Fat-Diet. In der Studie wurde erkannt, dass bei dem Stamm C57BL/6 das Übergewicht deutlich ausgeprägt ist, sowie dass der Stamm besonders stark dazu neigt, metabolische Erkrankungen infolge von Adipositas zu entwickeln. Letztendlich eignete sich diese Kombination von Stamm und High-Fat-Diet für die hier durchgeführten Untersuchungen sehr gut, da das Ziel dieses Experiments war zu zeigen, wie hohe Dosen an Erythropoietin den Folgen von Adipositas entgegenwirken.

Von der Lieferung bis zum Ende des Experiments bekamen die Mäuse fettreiches Futter (High-Fat-Diet; HFD). Die HFD von der Firma Research Diets in New Brunswick, USA, enthielt 60% der Kalorien als Fett und verursachte wie erwartet Gewichtszunahme bei den Mäusen bis zur deutlichen Adipositas samt deren typischen Folgen (v.a. Hyperglykämie). Außer Fett enthielt das Futter Kohlenhydrate und Proteine je zu 20%, sowie eine Vitamin- und Mineralstoff-Mischung. Um Verwechslungen zu vermeiden, ist dem Futter ein spezifischer grünblauer Farbstoff zugesetzt. Der Farbstoff war für die Mäuse nicht toxisch und konnte nicht resorbiert werden. Er blieb also bei der Darmpassage chemisch unverändert, was dazu führte, dass die Mäuse grüne Fäzes ausschieden.

Die Mäuse wurden in 6 Käfigen untergebracht, wobei sich in jedem Käfig 5 Mäuse befanden. Mäuse als soziale Tiere werden im Rahmen von Experimenten öfter in Gruppen als einzeln in Käfigen gehalten. In einem Review von Kappel et al. (2017) schlossen die Autoren Folgendes zu diesem Thema: "Group housing broadly provides males with opportunities to express natural needs as a social species and fulfil the desire to be with others, but there may be negative welfare implications depending on the position of an individual in the hierarchy."

Melotti et al. (2019) konzentrierten ihre Aufmerksamkeit nur auf den Stamm C57BL/6 und unter Berücksichtigung des Alters kamen zu folgenden Schlussfolgerungen: "We demonstrated that under standard laboratory conditions, the welfare of pair housed C57 male mice is not affected by separation into single housing at different ages from adolescence to adulthood. At the same time, we showed how pair housed male mice can maintain low levels of aggression across a long period of their life and perform increasing levels of sociopositive behaviours which may serve to promote stable social relations."

Im Laufe des hier beschriebenen Experiments kam es zu einem Vorfall, in dem eine Maus andere vier Mäuse aus demselben Käfig angriff und jede der vier

Mäuse mit Bissen am Bauch verletzte. Es wurde schnell reagiert und die problematische Maus wurde von der Gruppe getrennt und in einen neuen kleineren Käfig, der genau gleich wie die anderen Käfige ausgestattet war, isoliert.

Jeder Käfig bestand aus zwei Teilen, einem unteren aus Kunststoff und einem Gittereinsatz als Dach. Der Boden der Käfige wurde Einstreu bedeckt, die sowohl zum Knabbern als auch zum Nestbau geeignet war. Zusätzlich wurden die Käfige je mit einem Unterschlupf aus Kunststoff, einer Trinkflasche, Nagehölzern und Nestbaumaterial versehen. Zur Trinkflasche mit Leitungswasser hatten die Mäuse immer freien Zugang.

Während der gesamten Dauer des Experiments wurden die Mäuse in einem Raum untergebracht, in dem konstante Raumtemperatur, konstante Luftfeuchtigkeit, sowie ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus (7-19 Uhr Licht - 12h Tag; 19-7 Uhr Dunkelheit - 12h Nacht) aufrechterhalten wurden.

3.2. Versuchsablauf und Protokoll

3.2.1. Interventionen und Versuchsgruppen

Nach etwa zwei Monaten Fütterung mit HFD und eine Woche, bevor die Intervention begonnen wurde, wurden die Ausgangswerte für Nüchternblutglukose und Körpergewicht für jede Maus bestimmt. Basierend auf Mittelwerten dieser Parameter wurden die Mäuse mittels „Matching“ in zwei Gruppen eingeteilt. Durch diesen Vorgang wurde erreicht, dass möglichst ähnliche Gruppen entstanden, damit die Ergebnisse des Experimentes durch eventuelle Unterschiede zwischen den Gruppen unbeeinflusst blieben. Aus diesem Vorgang ergaben sich zwei gleich große Gruppen mit jeweils 15 Mäusen. Die erste Gruppe, die regelmäßig Erythropoietin bekam, die Erythropoietin-Gruppe, und die zweite Gruppe, die stattdessen nur Vehikel bekam und die als Kontrollgruppe bezeichnet wurde. Wie oben angeführt wurden die Mäuse je zu 5 in 6 Käfigen gehalten, daher 3 Käfige pro Gruppe.

Um die Mäuse im selben Käfig unterscheiden zu können, wurden verschiedene Stifffarben zur Schwanzfärbung verwendet. Dadurch war in jedem Käfig eine Maus

1. mit dem an der Wurzel schwarz gefärbten Schwanz,
2. mit dem an der Wurzel grün gefärbten Schwanz,
3. mit dem komplett grün gefärbten Schwanz,
4. mit dem an der Wurzel rot gefärbten Schwanz,
5. mit dem nicht gefärbten Schwanz.

Den Mäusen sowohl der Erythropoietin- als auch der Kontrollgruppe wurden dreimal wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag) Injektionen intraperitoneal (= in die Bauchhöhle) verabreicht. Die Mäuse der Erythropoietin-Gruppe erhielten Epoietin theta (Eporatio®, 20.000 U/ml, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland). Die Stammlösung wurde mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:60

verdünnt, die Mäuse erhielten davon 3 µl/g Körpergewicht entsprechend einer Dosis von 1.000 U/kg Erythropoietin theta. Die Dosis entsprach im Durchschnitt einem Volumen von 135 µl. Auf der anderen Seite erhielten die Mäuse der Kontrollgruppe das gleiche Volumen an physiologischer Kochsalzlösung. Die Verabreichung von Vehikelinjektionen bei Mäusen der Kontrollgruppe war notwendig, um dieselben Stressbedingungen für beide Gruppen zu erzeugen.

Die intraperitoneale Injektionsmethode kommt in Experimenten mit Nagetieren sehr häufig zum Einsatz, da die Methode relativ leicht zu beherrschen ist und minimalen Stress bei den Tieren verursacht.

Die Nadeln wurden so gewählt, dass das eventuelle Risiko einer Organverletzung reduziert war, dementsprechend wurden die Nadeln mit einer Länge von 0,8 cm und einem Durchmesser von 0,305 mm verwendet. Die Mäuse wurden am Schwanz mit nach unten gerichtetem Kopf fixiert, sodass durch Bewegungen verursachte Verletzungen verhindert wurden. Die Injektionen wurden unteren Bereich des Bauchs gesetzt. Durch diese Haltung wurden die Organe mehr in die kraniale Richtung befördert, somit der rechte und linke untere Quadrant des Bauchs für die Injektion geeignet, da die Organe durch den Einfluss der Gravitation ihre Position veränderten (Talcott et al., 2015).

Obwohl die intravenöse Injektionsmethode die höchste Bioverfügbarkeit anbietet, bestehen zahlreiche Nachteile bei der Verwendung dieser Methode. Aufgrund der kleinen Blutgefäße der Mäuse ist diese Methode schwer zu beherrschen und nicht für eine wiederholte Verabreichung geeignet. Außerdem können intravenös nur kleine Volumina verabreicht werden, weswegen die Methode nicht immer geeignet ist. Die intraperitoneale Injektionsmethode unterscheidet sich in diesem Fall, da in die Bauchhöhle größere Volumina injiziert werden können, sodass diese Route für ein vielfältigeres Spektrum von Substanzen geeignet ist und auch die Wahrscheinlichkeit einer Irritation oder Verletzung kleiner ist. Aus diesem Grund eignet sich die intraperitoneale Injektion für eine häufige Verabreichung über einen längeren Zeitraum. Die Absorptionsgeschwindigkeit und die Bioverfügbarkeit der interperitonealen Injektion sind niedriger als bei intravenöser Injektion, aber höher im Vergleich zu subkutaner, intramuskulärer und peroraler Applikation. Kleine Peptide wie Erythropoietin werden intraperitoneal gut resorbiert (Shoyaib et al., 2019).

Die Mäuse der Erythropoietin-Gruppe hatten uneingeschränkten Zugang zum Futter, während die Mäuse der Kontrollgruppe einmal täglich beschränkte Futterportionen bekamen. Die Futterportionen wurden in Abhängigkeit der Gewichtskurve der Erythropoietin-Gruppe regelmäßig angepasst, sodass die Gewichtskurven beider Gruppen möglichst gleich blieben.

3.3. Messungen

3.3.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme

Das Körpergewicht wurde mindestens einmal wöchentlich gemessen. In den ersten Wochen war es zur besseren Verfolgung der Änderungen der Gewichtskurven nötig, zweimal wöchentlich das Körpergewicht zu messen. Für die Messungen kam eine Präzisionswaage der Firma Mettler Toledo (Columbus, OH, USA) zum Einsatz. Zur Messung wurden die Mäuse in eine kleine Schachtel, die auf der Waage lag, gesetzt. Das Gewicht der kleinen Schachtel wurde vor jeder Messung tariert. Obwohl sich die Mäuse während der Messung ständig bewegten, war es möglich, durch das Einstellen der Funktion „dynamic weighing“ (dynamisches Wägen) präzise Werte zu erhalten. Durch die Funktion „dynamisches Wägen“ wurde ein Mittelwert innerhalb von 3 Sekunden berechnet, der schließlich im Protokoll dokumentiert wurde.

Zur Bestimmung der von der Erythropoietin-Gruppe aufgenommenen Futtermengen wurde die gleiche Präzisionswaage, nur unter Funktion „normal weighing“, verwendet. Man konnte nicht die Futtermenge für jede individuelle Maus feststellen, sondern es wurde käfigweise gefüttert. Die Ergebnisse basieren somit auf Mittelwerten pro Käfig. Bevor das Futter den Mäusen im Käfig zur Verfügung gestellt wurde, wurde die Futtermenge genau gewogen und dokumentiert. Nach einer gewissen Zeit, nachdem die Mäuse einen Teil des Futters verbraucht hatten, wurde die Futtermenge wieder gemessen und das Gewicht des verbliebenen Futters ausgewertet. Dadurch wurde festgestellt, wie viel Gramm Futter die Mäuse über eine bestimmte Zeit gegessen hatten. Für Mäuse unter eingeschränkter Fütterung wurden die täglichen Portionen für jeden Käfig mit dieser Waage eingewogen.

3.3.2. Körperzusammensetzung

Die Bestimmung der Körperzusammensetzung wurde etwa nach zwei Monaten bzw. gegen Ende des Experiments mittels Body Composition Analyzer EMR-188 (EchoMRI, Houston, TX, USA) durchgeführt. Jede Maus musste einzeln in ein Rohr gesetzt werden, das in das Gerät eingeführt wurde. Dabei wurde innerhalb einer Minute sowohl der Fettanteil als auch der fettfreie Anteil des Körpers bestimmt. Für die Messung war keine vorherige Vorbereitung der Mäuse oder Fasten nötig. Individuen unter eingeschränkter Fütterung wurde vor Verabreichung der täglichen Portion vermessen.

3.3.3. Nüchternblutglukose

Die Nüchternblutglukose wurde während des Experiments insgesamt viermal gemessen. Der erste Wert wurde zum Zweck des Matchings gemessen, weitere Messungen fanden 1 Woche, 1 Monat und 2 Monate nach dem Beginn der Erythropoietininjektionen statt. Es ist wichtig zu erwähnen, dass die

Bestimmungen immer nach einem 4-stündigen bzw. 18-stündigen Fasten und 48 Stunden nach der letzten Injektion von Erythropoietin durchgeführt wurden.

Zur Bestimmung der Nüchternblutglukose wurde ein Handmessgerät „StatStrip Xpress“ von der Firma Nova Biomedical (Waltham, MA, USA) eingesetzt. Die Firma Data Sciences International (St. Paul, MN, USA) hat die Software dieses Gerätes bearbeitet und seine Funktionen für die Anwendung an kleinen Labortieren angepasst. Zur Bestimmung wurde der Maus 1,2 µl Kapillarblut durch Anstechen mithilfe einer Nadel aus der Schwanzspitze entnommen und von der Schwanzspitze durch mildes Ausdrücken direkt auf den Teststreifen überführt, der zuvor in das Messgerät eingeführt worden war.

Außer benötigtem kleinem Volumen hat das Gerät noch einen Vorteil - die niedrige Hämatokritsensitivität. Von Anfang des Experiments an wurde erwartet, dass eine Erhöhung des Hämatokrits bei den Mäusen als Folge von hohen Dosen an Erythropoietin auftreten wird. Aus diesem Grund war die niedrige Hämatokritsensitivität des Glukosemessgeräts eine maßgebende Eigenschaft.

In einer Studie von Liu et al. (2013), die mehrere gebräuchliche Handmessgeräte für Blutglukose verglich, war das StatStrip-Messgerät das einzige Gerät, dessen Werte vom Hämatokrit unbeeinflusst blieben. Die von StatStrip gemessenen Blutglukosewerte blieben ebenfalls stabil gegenüber Acetaminophen, Ascorbinsäure, Maltose, Harnsäure, Galaktose und Dopamin.

Musholt et al. (2011) testeten 15 verschiedene Glukosemessgeräte und stellten fest, dass das StatStrip-Messgerät bei Hämatokritwerten im Bereich 20-65% kaum Schwankungen zeigte.

3.3.4. Blutketone

Zur Bestimmung der Ketonkörper wurde ähnlich wie bei der Blutglukosemessung nur ein Tropfen Blut benötigt. Das Blut wurde nach einem vierstündigen Fasten aus der Schwanzspitze entnommen. Zu diesem Zweck kam das Handmessgerät Freestyle Precision Neo der Firma Abbott (Kalifornien, USA) zum Einsatz, mit dem die Konzentration der Blutketone in kurzer Zeit gemessen wurde.

3.3.5. Metabolische Käfige

Um eine genauere Untersuchung des Stoffwechsels durchzuführen, wurden sogenannte metabolische Käfige verwendet. Es handelte sich um den PhenoMaster der Firma TSE Systems (TSE Systems GmbH, Deutschland), der eine direkte Messung der Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidabgabe, Wasser- und Futteraufnahme sowie die indirekte Bestimmung des Energieverbrauchs ermöglichen. Ebenfalls konnte man die Bewegungen der Mäuse, sowohl über y- als auch über x-Achse verfolgen, da die Käfige mit Bewegungssensoren ausgerüstet waren.

In den Käfigen herrschten die gleichen Bedingungen bezüglich Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Tag-Nacht-Rhythmus wie in dem Raum, in dem Mäuse

üblicherweise stationiert waren. Die metabolischen Käfige waren ähnlich wie klassische Käfige mit einer Wasserflasche und Futter versehen, jedoch mit weniger Einstreu, damit die Bewegungssensoren ungestört funktionieren konnten.

Die Mäuse verbrachten insgesamt 4 Tage in den metabolischen Käfigen, dabei wurden die Mäuse einzeln in die Käfige gesetzt. Die ersten zwei Tage dienten einer Adaptation an die neue Umgebung, sodass die Mäuse zu ihrem gewöhnlichen Verhalten zurückkehren konnten und der Versuch authentische Werte lieferte. In den nächsten 48 Stunden nach der Adaptation liefen die Messungen, die zuerst bei einem freien Zugang zum Futter, dann unter Fasten erfasst wurden. Jede Messung lief über 24h. In den ersten 24 Stunden standen den Mäusen Futter und Wasser die ganze Zeit ad libitum zur Verfügung. Am nächsten Tag wurden den Mäusen Futter und Wasser entzogen, also die Mäuse einem Fasten über weitere 24 Stunden ausgesetzt, während die diversen Parameter abermals dokumentiert wurden. Es wurden Daten für jeweils sechs Mäuse aus jeder Gruppe aufgezeichnet und verglichen.

Bevor die Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidabgabe gemessen wurden, mussten die Gassensoren kalibriert werden. Hierzu wurden die Gase N₂, CO₂ und O₂ mit bekannten Konzentrationen als Standard eingesetzt.

Die Messungen von Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidabgabe ermöglichten die Ermittlung des respiratorischen Quotienten. Der respiratorische Quotient als dimensionslose Größe stellt das Verhältnis des abgegebenen Kohlendioxid zu dem unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Sauerstoff in einer definierten Zeitspanne dar. Eine häufig vorkommende synonyme Bezeichnung für den respiratorischen Quotienten ist Respiratory exchange ratio (RER). Der RER unterscheidet sich aber streng genommen in seiner Definition vom RQ. Der RER stellt das Verhältnis des abgegebenen Kohlendioxids und aufgenommenen Sauerstoffs im Bereich des Mundes dar („Lungen-RQ“), während der RQ auch als „Stoffwechsel-RQ“ bezeichnet wird und sich auf den Grundenergieumsatz bezieht. Unter gleichmäßiger Atmung sind RER und RQ gleich. Eine Hyper- oder Hypoventilation kann jedoch dazu führen, dass der RER vom RQ getrennt wird. In den hier beschriebenen Experimenten sollte dies aber keinen Einfluss gehabt haben (vgl. Kroidl, et al., 2015).

Mit der Nahrung aufgenommene energiereiche Stoffe werden zu immer kleineren und energieärmeren Verbindungen abgebaut, was der Bereitstellung chemischer Energie für Stoffwechselprozesse dient. Der RQ beschreibt realistisch den momentanen Stoffwechselzustand und dient der Einschätzung, in welchem Ausmaß Kohlenhydrate gegenüber Fetten als Energiequelle am Gesamtumsatz beteiligt sind. Im Ruhezustand stammt die Energie hauptsächlich von der Fettverbrennung. Theoretisch ergibt sich bei ausschließlicher Nutzung von Fetten ein RQ-Wert von 0,7, da mehr Sauerstoff verbraucht wird als Kohlendioxid synthetisiert wird. Bei Annahme einer reinen Kohlenhydratverbrennung ist der RQ-Wert gleich 1, da genauso viel Sauerstoff verbraucht als Kohlendioxid produziert wird. Für reine Proteinverbrennung ist ein RQ von 0,81 typisch, weil der Stickstoffanteil der Proteine im Metabolismus von Tieren nicht oxidiert wird (vgl. Hildebrandt et al., 2021).

3.3.6. Terminales Sammeln von Plasma- und Gewebeproben

Zum Schluss des Experiments wurden die Mäuse 48 Stunden nach der letzten Erythropoietin-Injektion und nach einem 4-stündigen Fasten zum Sammeln von Plasma- und Gewebeproben getötet. Zuerst erfolgte eine Narkose mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran. Dafür wurden die Mäuse in eine kleine Box gesetzt. Als die Narkose eingetreten war, wurde die Maus auf einen Sektionstisch getragen. Damit die Wirkung der Narkose erhalten blieb, wurde den Mäusen das Maul mit einem Röhrchen bedeckt, das ein Isofluran-getränktes Papier enthielt. Nachdem mittels Toe-Pinch-Reflex-Methode sichergestellt wurde, dass die Maus in tiefer Narkose liegt, wurden die Brust und der Bauch mit einer Schere geöffnet. Anschließend erfolgte die Herzpunktion, wobei die größtmögliche Menge an Blut (500-900µl) aus dem Herzen entnommen wurde. Als Folge dieser Entblutung und unter tiefer Narkose trat der Tod der Maus ein. Die Herzpunktion wurde mithilfe einer EDTA-haltigen Spritze durchgeführt, um die Blutgerinnung zu hemmen. Das gesammelte Blut wurde in ein kleines Gefäß übergeführt, vorerst auf Eis gelegt und schließlich 10 Minuten lang zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde das Blutplasma abgetrennt, schließlich entnommen und bei -20 Grad für die geplanten Messungen gelagert.

Es wurden noch die Leber und der epididymale Fettpolster jeder Maus gesammelt, deren Gewichte zuerst dokumentiert wurden. Unmittelbar danach wurde ein kleines Stück des Gewebes ohne weitere Verzögerung in Flüssigstickstoff schockgefroren und danach bei -80 Grad gelagert, um für spätere Analysen zur Verfügung zu stehen.

Weißes Fettgewebe dient hauptsächlich als Energiespeicher in Form von Triglyzeriden, außerdem bietet es einen mechanischen Schutz sowie einen Schutz vor Kälte. Der Einfluss von weißem Fett auf Fett- und Glukosestoffwechsel besteht nicht nur in der Fettspeicherung, auch von weißem Fettgewebe ausgeschüttete Signalstoffe (Adipokine) haben eine wichtige regulierende Rolle. Akkumulation und Sekretion des weißen Fetts stehen in einem engen Zusammenhang mit metabolischen Erkrankungen und mit der Verursachung des metabolischen Syndroms (vgl. Hajer et al., 2008).

Das epididymale Fett wird wegen seiner intraperitonealen anatomischen Lage oft als Teil des viszeralen weißen Fetts betrachtet. Aufgrund von metabolischen Aspekten wird es aber von vielen nicht als Teil des klassischen viszeralen Fetts kategorisiert. Bestehend aus schon gereiften Adipozyten, Immunzellen, Präadipozyten und Endothelzellen unterscheidet sich der Aufbau des epididymalen Fetts vom restlichen viszeralen Fett tatsächlich kaum. Das epididymale Fett lässt sich aufgrund seiner histologischen und biochemischen Eigenschaften in zwei Regionen aufteilen - proximal und distal. Die proximale Region fängt am Kopf der Nebenhoden an, die distale Region erstreckt sich weiter in die Bauchhöhle. Es wurden keine großen morphologischen Unterschiede zwischen den Regionen entdeckt, während sich die zwei Regionen in deren biomolekularen Eigenschaften unterscheiden. Obwohl die Funktion dieses Gewebes noch nicht komplett erforscht ist, ist bisher bekannt, dass durch

die Entfernung des epididymalen Fetts die Spermatogenese negativ beeinflusst wird (Chu et al., 2010; Lee & Kim, 2019; Tirard et al., 2007).

Lee und Kim (2019) untersuchten das epididymale Fett in Abhängigkeit vom Alter und kamen zu folgendem Schluss: "Because of broad biological effects of molecules originated from the adipocyte, it is supposed that the altered expressional levels of adipocyte-secreted elements in the distal epididymal fat with age could be linked with the onset of metabolic syndrome and/or the decline of reproductive capacity, which is a common condition frequently found at the late age."

Unter der Erythropoietinbehandlung wurde eine Gewichtsreduktion des epididymalen Fettpolsters beschrieben, was ebenfalls für das vorliegende Experiment von Interesse war (Kodo et al., 2017).

3.4. Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Zur Berechnung der p-Werte wurde ein ungepaarter zweiseitiger Student's-t-Test verwendet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen angenommen.

4. Ergebnisse

Im Laufe des Experiments wurden drei Mäuse der Erythropoietin-Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten (am Tag 31, 39 bzw. 73 der Erythropoietinbehandlung) in ihren Käfigen tot aufgefunden. Diese drei Mäuse verstarben mutmaßlich zufolge einer Embolie, die durch hohe Erythropoietin-Dosierungen verursacht wurde.

Eine Maus der Kontrollgruppe wurde während des Experiments offenkundig krank und musste am Tag 32 der Vehikel-Behandlung nach starkem Gewichtsverlust euthanasiert werden.

Alle Daten dieser Mäuse wurden aus der Statistik entfernt.

4.1. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme

Aus der ersten Messung des Körpergewichts zum Beginn des Experiments ergab sich nach dem Matching ein durchschnittliches Körpergewicht von ca. 43 g in beiden Gruppen. Wie aus Abbildung 1 zu sehen ist, nahm das Körpergewicht der Mäuse der Erythropoietin-Gruppe zwar allmählich und konstant, jedoch geringfügig, mit der Zeit zu.

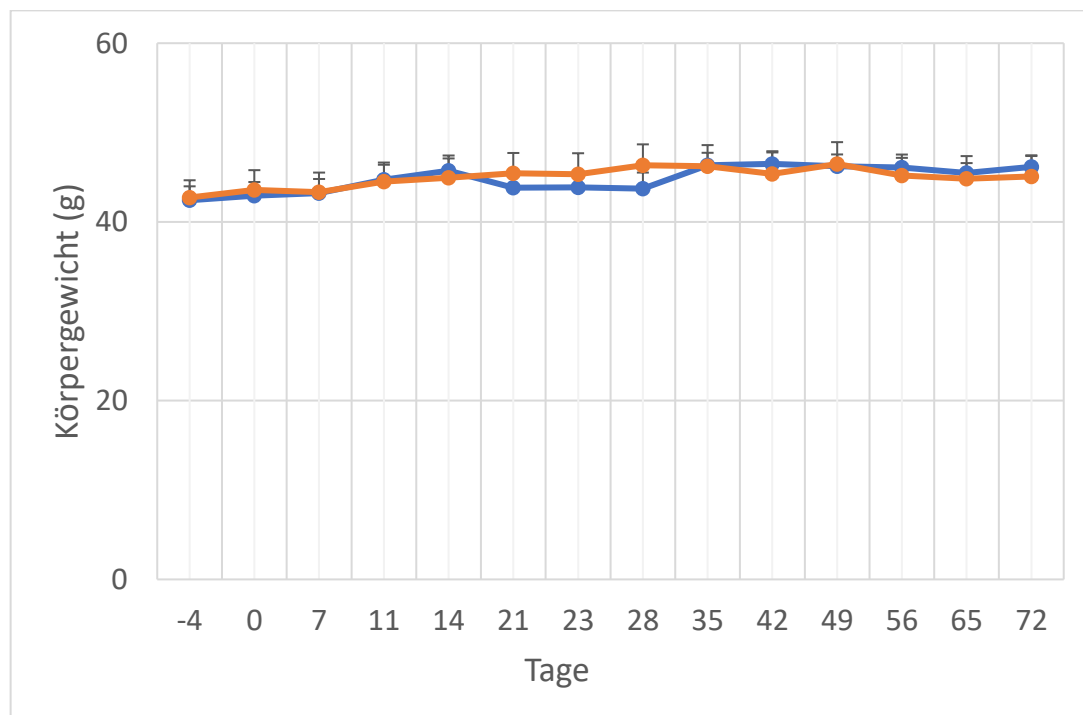


Abbildung 8. Körpergewicht adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Erythropoietin-Gruppe: orange, n=12; Kontrollgruppe: blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Das mittlere Körpergewicht der Erythropoietin-Gruppe betrug am Anfang $43,6 \pm 2,2$ g und erreichte am 72. Tag $45,1 \pm 2,4$ g. Die Gewichtskurve der

Kontrollgruppe war, wie im Protokoll vorgesehen, durch entsprechende Anpassung der täglichen Futterportionen jener der Erythropoietin-Gruppe sehr ähnlich. Diese Gruppe hatte anfänglich ein durchschnittliches Körpergewicht von $42,9 \pm 1,5$ g und bis zum Ende stieg das Körpergewicht auf $46,2 \pm 1,2$ g an (Abbildung 8).

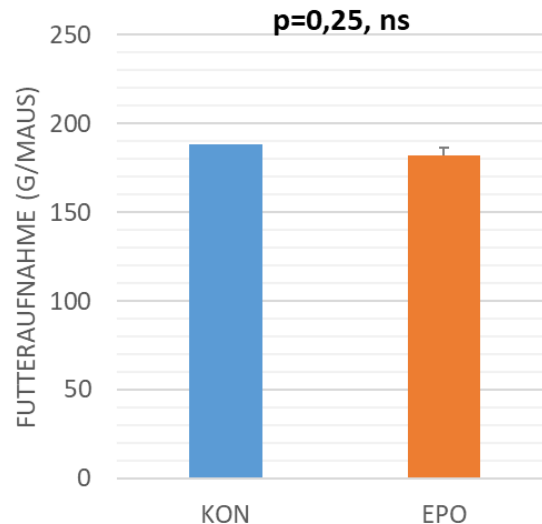


Abbildung 9. Futtermenge adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Futtermenge in g pro Maus über 77 Tage; EPO=Erythropoietin-Gruppe, orange; KON=Kontrollgruppe, blau; EPO: Mittelwert von 3 Käfigen $\pm$ SEM; kein signifikanter Unterschied

Mit dem Wert von $182,0 \pm 4,6$ g pro Maus in der Erythropoietin-Gruppe war die Futtermenge über die gesamte Dauer des Experiments etwas niedriger als in der Kontrollgruppe mit einem Wert von 188,1 g. Dadurch ergab sich im Mittel eine täglich aufgenommene Futtermenge von $2,36 \pm 0,06$ g pro Maus in der Erythropoietin-Gruppe, während die durchschnittliche Menge in der Kontrollgruppe 2,44 g pro Maus betrug. Ein signifikanter Einfluss der Erythropoietinbehandlung auf die Nahrungsaufnahme war nicht feststellbar (Abbildung 9).

4.2. Körperzusammensetzung

Die Körperzusammensetzung wurde am Tag 71 nach zweimonatiger Behandlung mit Erythropoietin gemessen. Obwohl die Werte des Körpergewichts annähernd gleich waren, zeigten die mit dem EchoMRI-Gerät erfassten Daten einen signifikanten Effekt der Erythropoietinbehandlung auf die Körperzusammensetzung. Ein bemerkenswerter Unterschied zeigte sich bereits in Bezug auf die Fettmasse. In der Kontrollgruppe betrug die durchschnittliche Fettmasse $19,7 \pm 1,3$ g, während sie in der Erythropoietin-Gruppe einen Durchschnitt von $16,5 \pm 1,7$ g aufwies. Bei der Magermasse wurden signifikant

geringere Werte in der Kontrollgruppe ($26,4 \pm 0,4$ g) im Vergleich zur Erythropoietin-Gruppe ($27,8 \pm 0,4$ g) festgestellt. Dies führte zu einer signifikant höheren relativen Fettmasse in der Kontrollgruppe ($42,2 \pm 1,5$ %) im Vergleich zur Erythropoietin-Gruppe ($35,8 \pm 2,8$ %) (Abbildung 10).

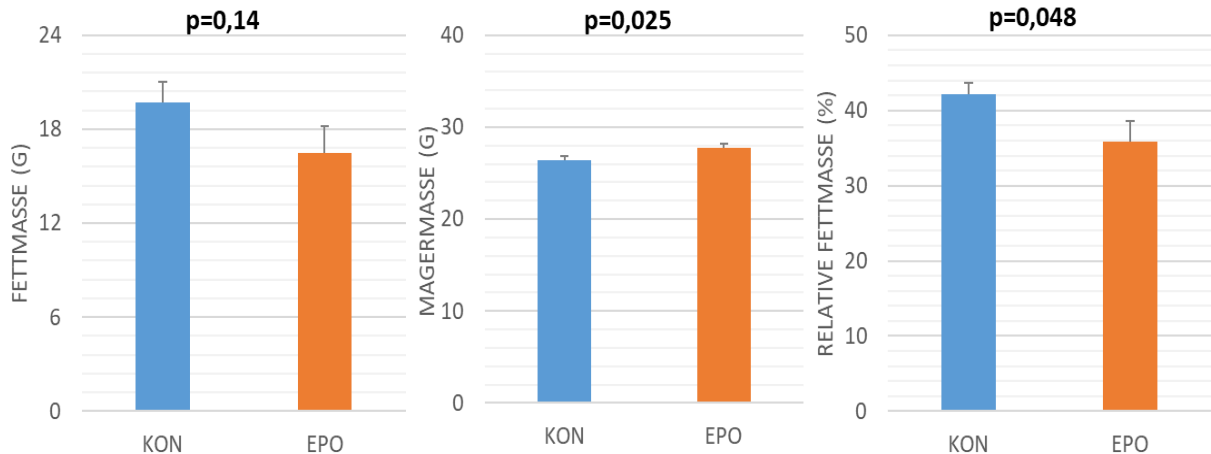


Abbildung 10. Fettmasse, Magermasse und relative Fettmasse adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. EPO=Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; KON=Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM;

4.3. Nüchternblutglukose

Wie schon erwähnt wurde, wurden die Ausgangswerte der Nüchternblutglukose in seit 4 Stunden gefasteten Mäusen vier Tage vor der ersten Erythropoietin-Injektion zum Matching bestimmt. Die nächste Messung erfolgte eine Woche nach dem Beginn des Experiments und damit nach einer einwöchigen Erythropoietinbehandlung. Nach dieser kurzen Zeitperiode war zwar noch kein signifikanter Unterschied sichtbar, es war jedoch ein Trend zu erkennen ($p=0,057$). Zu diesem Zeitpunkt hatten die Mäuse der Erythropoietin-Gruppe eine Nüchternblutglukose von $150,6 \pm 8,7$ mg/dl im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $171,1 \pm 5,4$ mg/dl. Nach einem Monat Erythropoietinbehandlung sanken die Werte in der Erythropoietin-Gruppe weiter deutlich ab. So hatten die Mäuse der Erythropoietin-Gruppe mit $97,1 \pm 5,8$ mg/dl signifikant geringere Nüchternblutglukose als jene der Kontrollgruppe mit einem Wert von $167,9 \pm 7$ mg/dl ($p<0,0001$). Nach zweimonatiger Erythropoietinbehandlung waren die Werte ähnlich (Abbildung 11).

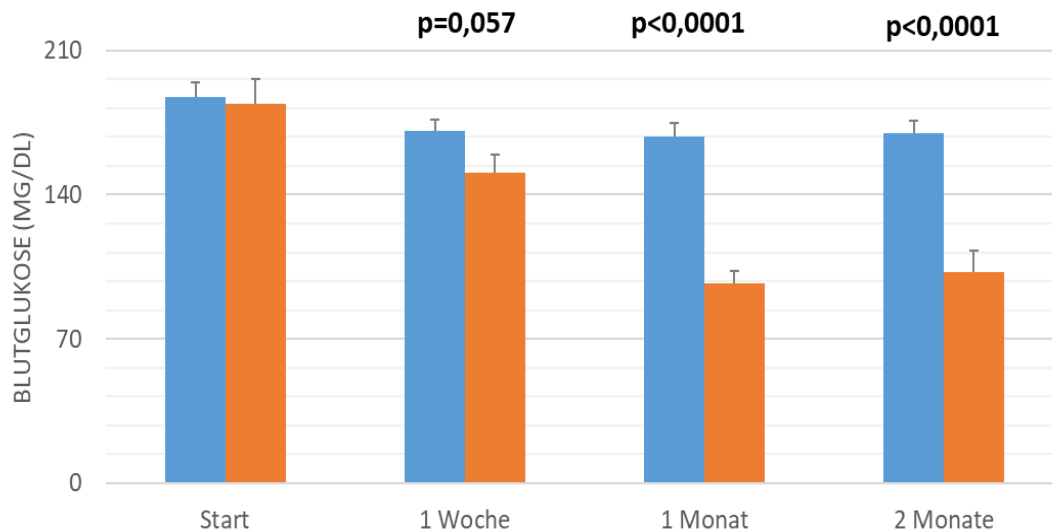


Abbildung 11. Blutglukose nach vierstündigem Fasten in adipösen, männlichen Mäusen unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM.

Eine signifikant geringere Nüchternblutglukose in der Erythropoietin-Gruppe wurde ebenfalls nach längerem Fasten über 18 Stunden beobachtet. Die erste Messung erfolgte 1 Monat nach dem Beginn des Experiments. Zu diesem Zeitpunkt lagen die Werte in der Erythropoietin-Gruppe mit $60,4 \pm 4,3$ mg/dl deutlich niedriger als jene der Kontrollgruppe mit $129,9 \pm 5,3$ mg/dl ($p<0,0001$). Als die Messung nach einem weiteren Monat wiederholt wurde, bestätigte sich die blutglukosesenkende Wirkung des Erythropoietins mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 12).

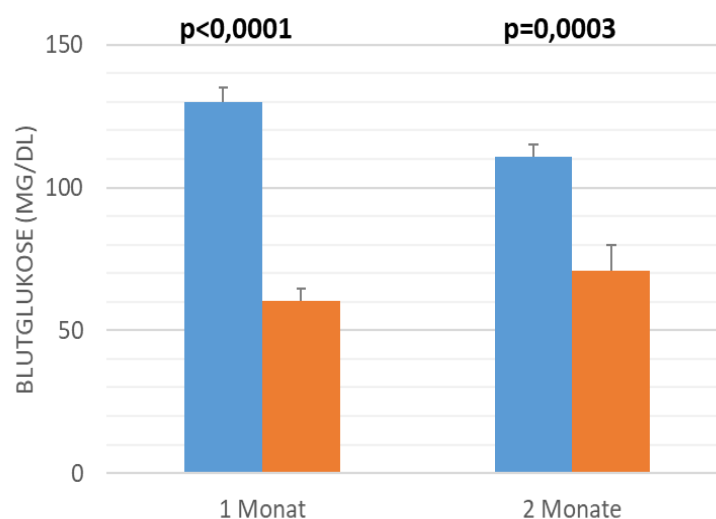


Abbildung 12. Blutglukose nach achtzehnstündigem Fasten in adipösen, männlichen Mäusen unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM.

4.4. Blutketone

Blutketone wurden nach kurzfristigem Fasten (4h) und langfristigem Fasten (18h) bestimmt. Dabei wurde kein signifikanter Einfluss von Erythropoietin beobachtet. Als eine natürliche Reaktion des Körpers unter Hungerbedingungen stieg die Konzentration der Blutketone durch langfristiges Fasten deutlich in beiden Gruppen an (Abbildung 13).

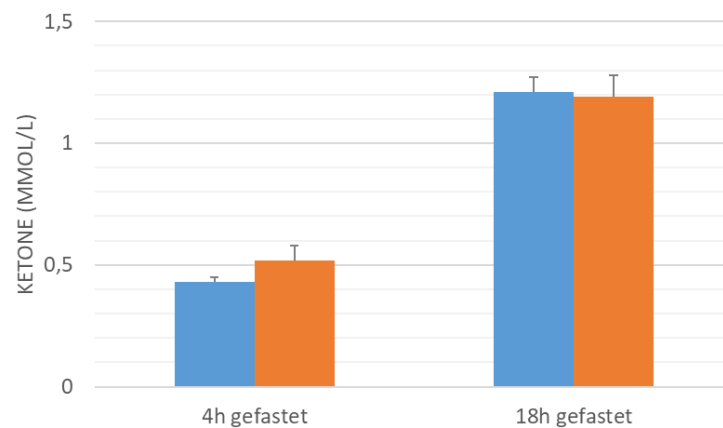


Abbildung 13. Blutketone adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Erythropoietin-Gruppe=orange, n=12; Kontrollgruppe=blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede.

4.5. Respiratorischer Quotient

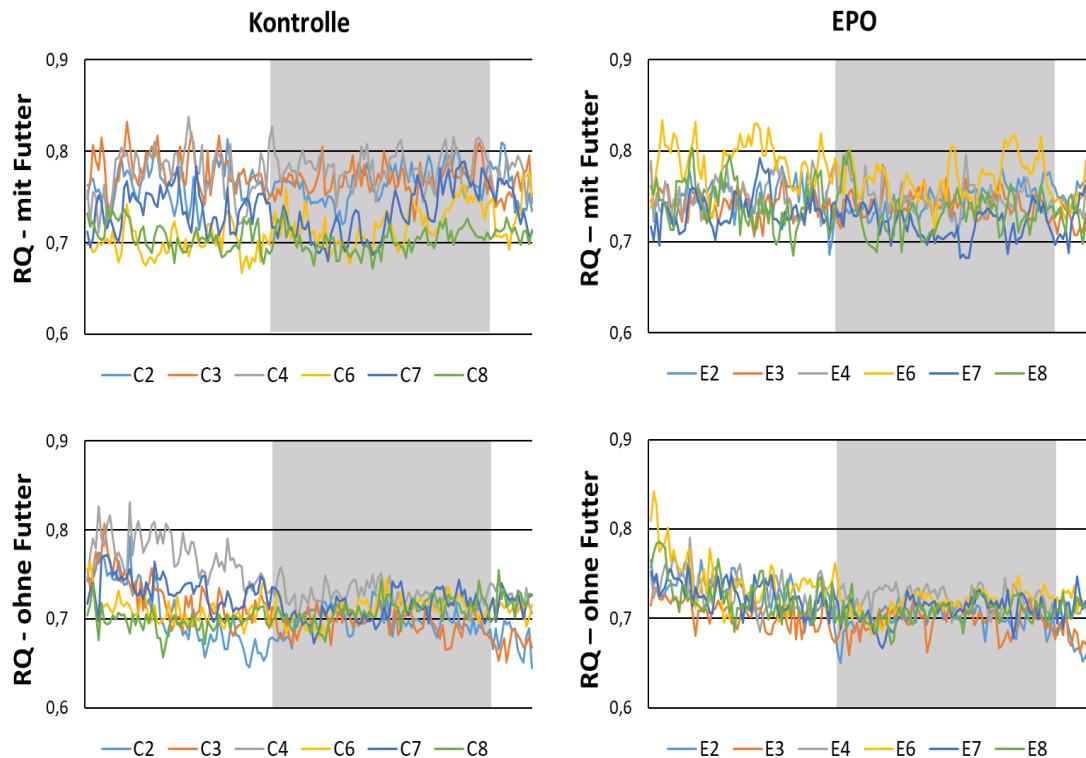


Abbildung 14. Respiratorischer Quotient (RQ) adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoietin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Der RQ wurde indirekt als Verhältnis zwischen abgegebenem Kohlendioxid und aufgenommenem Sauerstoff in metabolischen Käfigen gemessen; oben: 24 Stunden mit Futter, unten: 24 Stunden ohne Futter; Weiße Fläche=Tag von 7 bis 19 Uhr; Graue Fläche=Nacht von 19 bis 7 Uhr; E=Individuen der Erythropoietin-Gruppe, n=6; C=Individuen der Kontrollgruppe, n=6.

Die Mäuse wurden nach zwei Monaten in metabolische Käfige gesetzt, als die Erythropoietinbehandlung schon vorangeschritten war und auch langsame Wirkungen des Erythropoietins auf den Stoffwechsel darstellbar sein sollten. Wie in der Abbildung 14 an den individuellen Verläufen der Mäuse zu sehen ist, lag der respiratorische Quotient in einem Bereich zwischen 0,7 und 0,8, was darauf zurückzuführen ist, dass der Hauptbestandteil ihres HFD-Futters Fett war. Der respiratorische Quotient wurde während der Hungerperiode (zweiter Messtag) noch niedriger, da im Hungerzustand als Energiespeicher fast nur Fett zur Verfügung steht (Abbildung 15). Sobald die letzten Glykogenreserven verstoffwechselt sind, schaltet der Körper auf die reine Verstoffwechselung der Fette um.

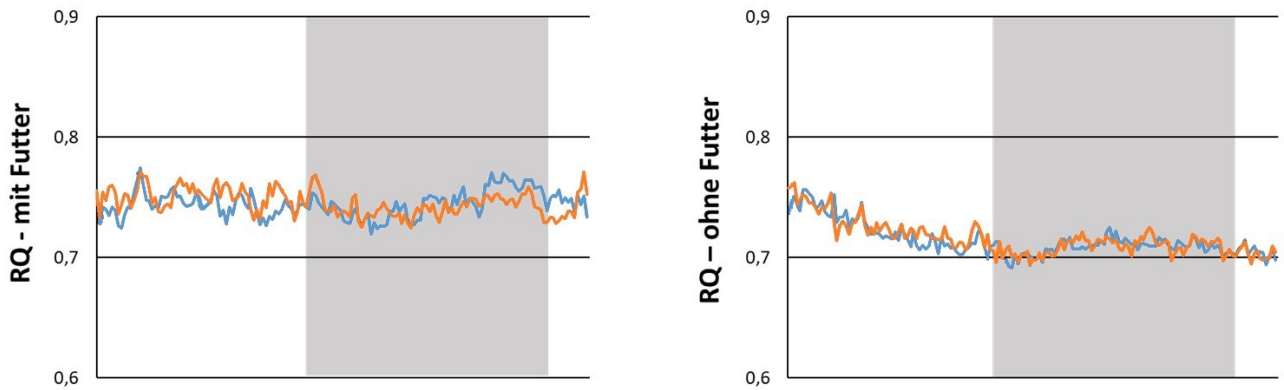


Abbildung 15. Respiratorischer Quotient adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Der RQ wurde indirekt als Verhältnis zwischen abgegebenem Kohlendioxid und aufgenommenem Sauerstoff in metabolischen Käfigen gemessen; 24 Stunden mit Futter - links, 24 Stunden ohne Futter - rechts; Weiße Fläche=Tag, 7 Uhr bis 19 Uhr; Graue Fläche=Nacht, 19 Uhr bis 7 Uhr. Erythropoietin-Gruppe: orange, n=6; Kontrollgruppe: blau, n=6. Mittelwerte; keine signifikanten Unterschiede.

Im Mittel betrug der respiratorische Quotient bei freiem Zugang zu Futter in der Erythropoietin-Gruppe $0,776 \pm 0,029$ und in der Kontrollgruppe $0,756 \pm 0,017$. Es war kein signifikanter Unterschied feststellbar (Abbildung 16).

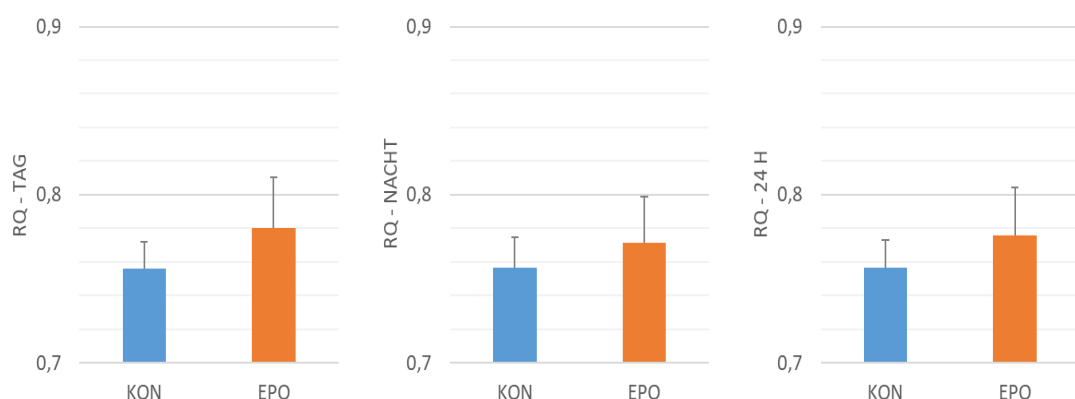


Abbildung 16. Durchschnittlicher respiratorischer Quotient adipöser, männlicher Mäuse, die freien Zugang zu Futter hatten und einer regelmäßigen, hochdosierten Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) unterzogen wurden. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Der RQ wurde indirekt als Verhältnis zwischen abgegebenem Kohlendioxid und aufgenommenem Sauerstoff in metabolischen Käfigen gemessen; Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede.

Als den Mäusen das Futter entzogen wurde, wurde ein leichtes Absinken des respiratorischen Quotienten sowie dessen Annäherung an den Wert von 0,7 in beiden Gruppen bemerkt. Dadurch wurde erwartungsgemäß bestätigt, dass zunehmend Fette als Energiequelle dienen.

Auch hier wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen bemerkt, was aber nicht merkwürdig ist, da der respiratorische Quotient hauptsächlich von der Ernährung abhängt. (Abbildung 17).

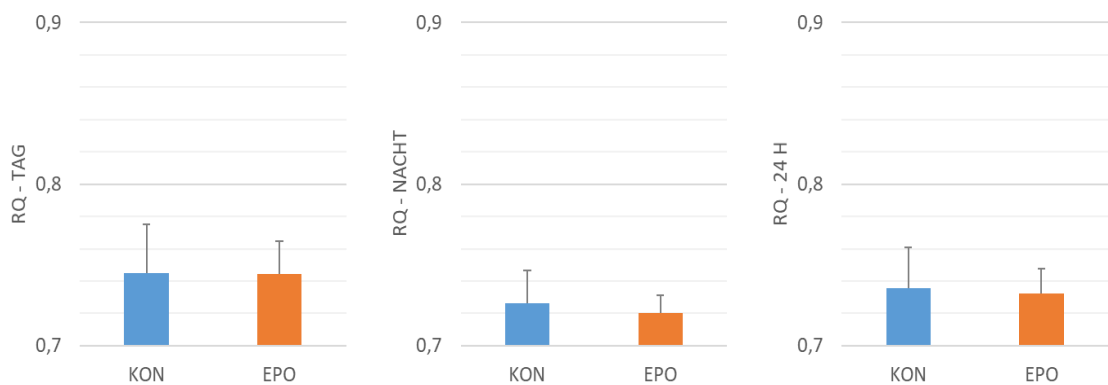


Abbildung 17. Durchschnittlicher respiratorischer Quotient (RQ) adipöser, männlicher Mäuse, die keinen Zugang zu Futter hatten, unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Der RQ wurde indirekt über 24 Stunden unter Futterentzug als Verhältnis zwischen abgegebenem Kohlendioxid und aufgenommenem Sauerstoff in metabolischen Käfigen gemessen; Tag=von 7 bis 19 Uhr; Nacht=von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede.

4.6. Energieverbrauch

Während ihres Aufenthalts in den PhenoMaster-Käfigen wurde bei den Mäusen der durchschnittliche Energieverbrauch über einen Zeitraum von 24 Stunden indirekt gemessen. Die Messung erfolgte unter zwei unterschiedlichen Bedingungen, mit freiem Zugang zu Futter sowie ohne Futter.

Der Versuch lieferte ähnliche Daten für beiden Gruppen. Die über den Tag ermittelten Werte lagen eng beieinander und auch in der Nacht blieben die Werte ähnlich. Dies führte in Erythropoietin-behandelten Mäusen zu einem durchschnittlichen Energieverbrauch von $0,549 \pm 0,022$ kcal/h, was einem vergleichbaren Wert in der Kontrollgruppe entsprach (Abbildung 18).

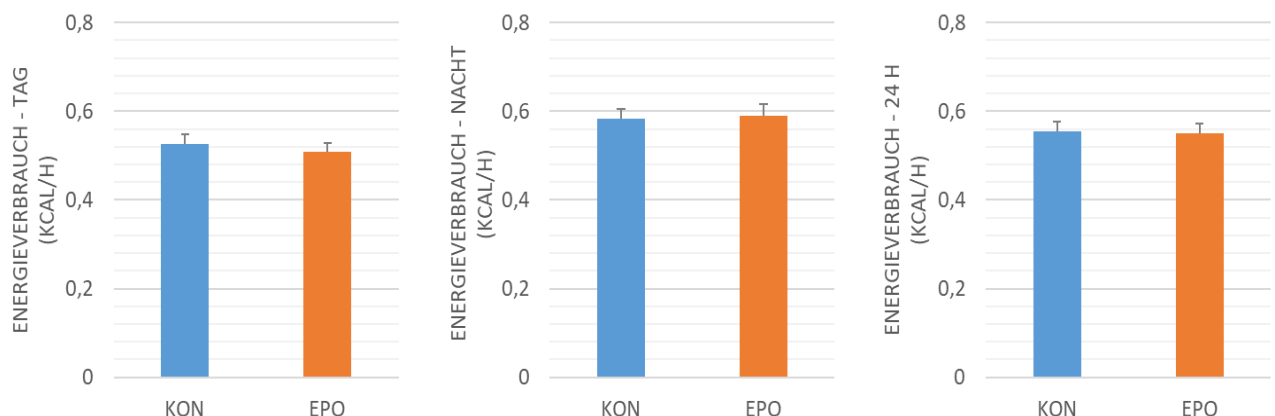


Abbildung 18. Durchschnittlicher Energieverbrauch mit freiem Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag=von 7 bis 19 Uhr; Nacht=von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Wenn den Mäusen das Futter entzogen wurde, zeigten beide Gruppen etwas niedrigeren Energieverbrauch (Abbildung 19), ein Einfluss von Erythropoietin konnte jedoch auch unter Fastenbedingungen nicht festgestellt werden.

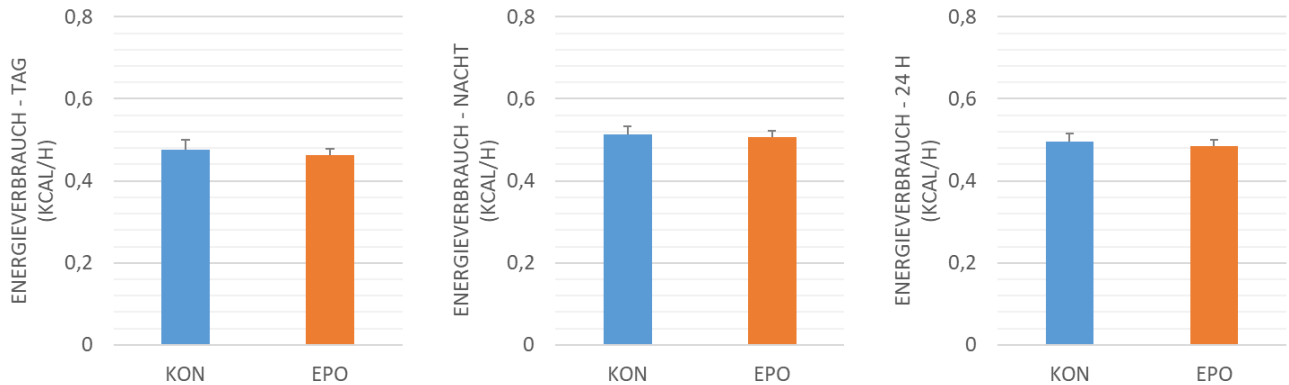


Abbildung 19. Durchschnittlicher Energieverbrauch ohne Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag=von 7 bis 19 Uhr; Nacht=von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

In Abbildungen 20 und 21 ist der Energieverbrauch pro Körpergewicht dargestellt. Da die Mäuse der beiden Gruppe ähnliches Körpergewicht hatten, wurden auch nach Gewichtskorrektur keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Die Ergebnisse waren diesbezüglich vergleichbar mit den zuvor beschriebenen Daten zum gewichtsunabhängigen Energieverbrauch.

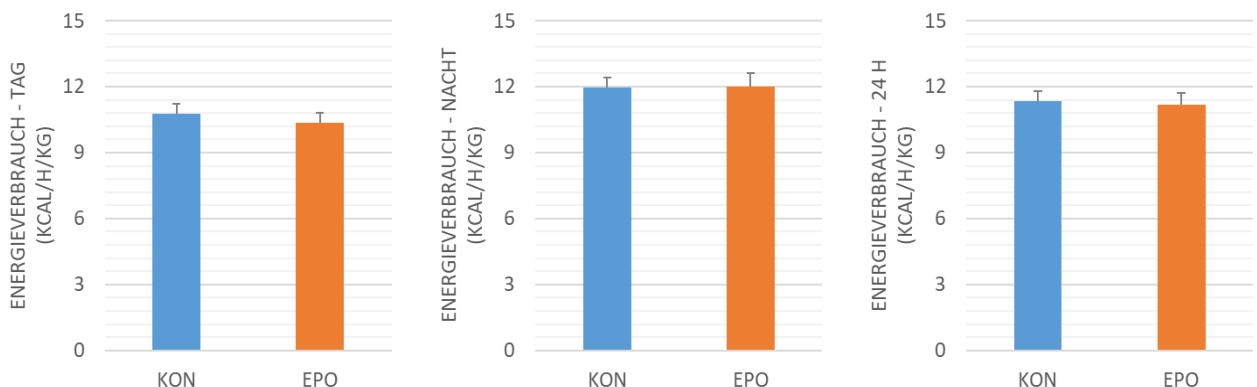


Abbildung 20. Durchschnittlicher Energieverbrauch mit freiem Zugang zum Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag=von 7 bis 19 Uhr; Nacht=von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

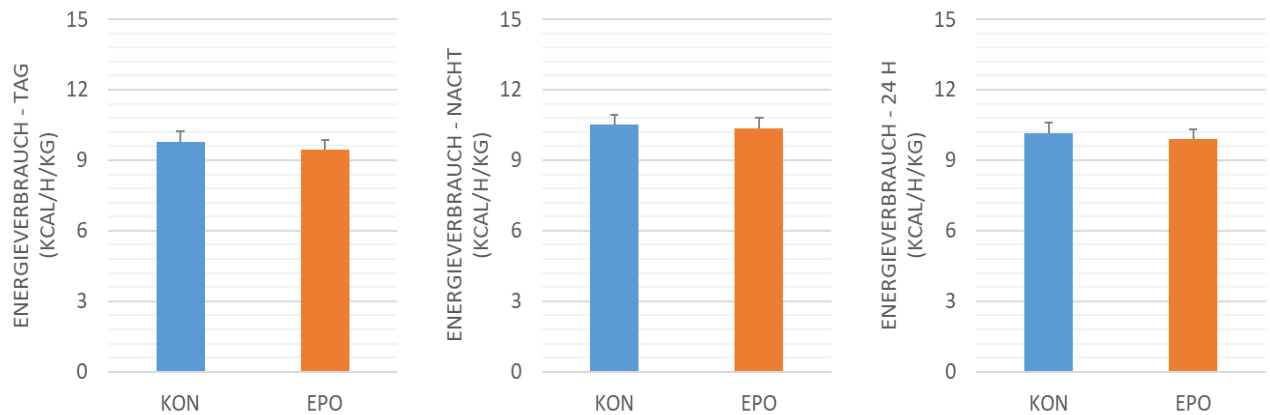


Abbildung 21. Durchschnittlicher Energieverbrauch über 24 Stunden ohne Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

4.7. Aktivität

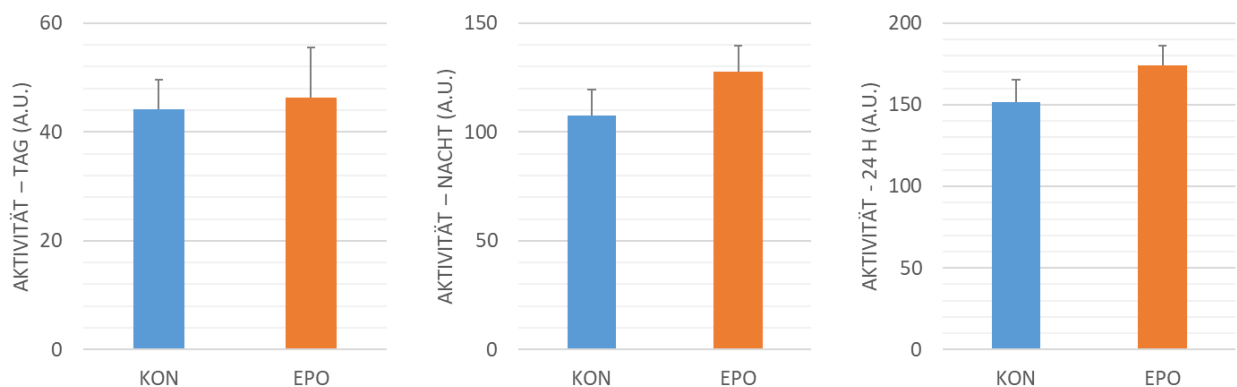


Abbildung 22. Aktivität pro Maus mit freiem Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Die Aktivität wurde durch die Bewegung der Mäuse erfasst, die mithilfe von Bewegungssensoren (Lichtschranken) in den metabolischen Käfigen verfolgt wurde. Hierbei wurde die Anzahl der Bewegungsereignisse gezählt und die Aktivität als die Summe dieser Ereignisse dargestellt. Die Aktivität der Mäuse wurde sowohl unter Fasten als auch bei uneingeschränktem Zugang zu Futter gemessen (wie auch die zuvor beschriebenen Parameter).

Bei diesem Parameter wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Es ist zu bemerken, dass die Mäuse vorwiegend nachtaktive Tiere sind. Dementsprechend war ihre Aktivität in der Nacht mehr als doppelt so hoch wie am Tag. So stieg die Aktivität in der Erythropoietin-Gruppe von $46,250 \pm 9,339$ Einheiten tagsüber auf einen Wert von $127,718 \pm 11,790$ in der Nacht an. Ähnliche Werte wurden auch in der Kontrollgruppe beobachtet (Abbildung 22).

Der Futterentzug hatte kaum Einfluss auf die Aktivität. Hier führte die Nachtaktivität auch zu deutlich höheren Werten in beiden Gruppen im Vergleich zur Tagesaktivität (Abbildung 23).

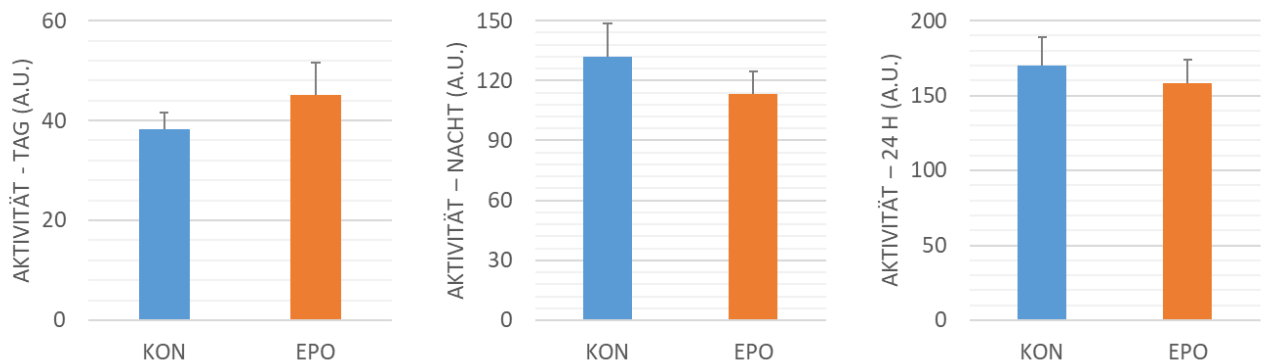


Abbildung 23. Aktivität pro Maus ohne Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

4.8. Futteraufnahme

In den metabolischen Käfigen wurde die Futteraufnahme sorgfältig überwacht. Das Futter befand sich in Gitterschüsseln, die in jedem Käfig aufgehängt waren. Bei jedem Fressen wurde die Futtermenge neu vermessen und protokolliert. Wie in Abbildung 24 ersichtlich ist, fraßen die Mäuse der Kontrollgruppe im Durchschnitt $2,25 \pm 0,35$ g Futter über 24 Stunden, was signifikant weniger war als die Futtermenge, die von den Mäusen in der Erythropoietin-Gruppe aufgenommen wurde, $3,34 \pm 0,33$ g. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich in Bezug auf die aufgenommene Futtermenge tagsüber. Die Mäuse der Erythropoietin-Gruppe fraßen mit $1,82 \pm 0,47$ g mehr als doppelt so viel wie die Mäuse der Kontrollgruppe, die $0,85 \pm 0,18$ g zu sich nahmen. Im Hinblick auf die Futteraufnahme in der Nacht nahmen die Mäuse der

Kontrollgruppe ($1,39 \pm 0,20$ g) mehr Futter als am Tag auf, aber immer noch weniger als die Mäuse der Erythropoietin-Gruppe ($1,82 \pm 0,17$ g) (Abbildung 24).

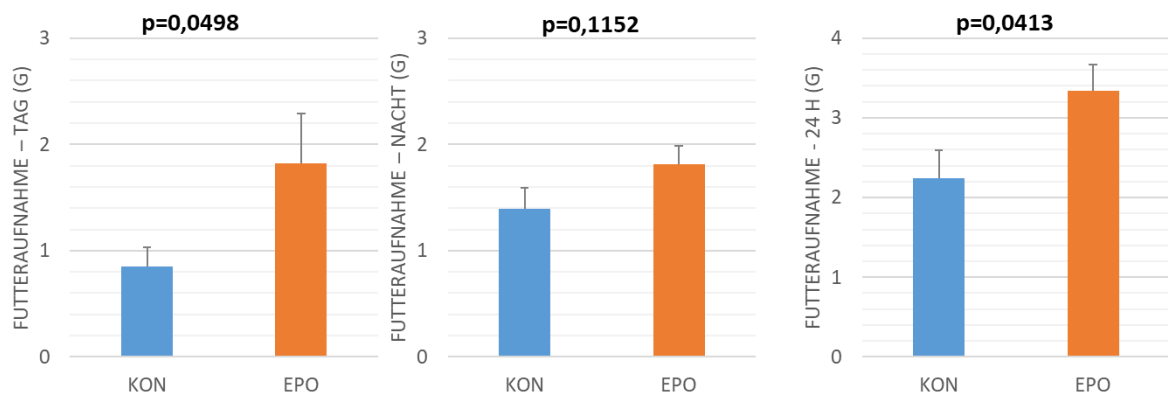


Abbildung 24. Futteraufnahme adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 Uhr bis 19 Uhr; Nacht= von 19 Uhr bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM

4.9. Wasseraufnahme

Die Trinkmenge pro Maus wurde ähnlich wie die aufgenommene Futtermenge gemessen. Zum Beginn des Versuchs wurde eine bekannte Menge an Wasser jeder Maus zur Verfügung gestellt. Jedes Mal, wenn eine Maus Wasser trank, wurde die Differenz neu berechnet und dokumentiert.

Während der 24-stündigen Phase, in der den Mäusen freier Zugang zu Futter gewährt wurde, ergab sich in der Erythropoietin-Gruppe eine mittlere Trinkmenge von $2,40 \pm 0,33$ ml, während die Kontrollgruppe im Mittel $1,74 \pm 0,21$ ml trank. Somit war ein Trend zu höherer Wasseraufnahme in der Erythropoietin-Gruppe zu erkennen, was die ebenfalls erhöhte Futteraufnahme widerspiegelte. In der Erythropoietin-Gruppe wurde tagsüber eine Wasseraufnahme von $0,82 \pm 0,14$ ml festgestellt, die in der Nacht deutlich auf $1,57 \pm 0,22$ ml anstieg. Ein ähnlicher Anstieg war auch in der Kontrollgruppe zu beobachten, bei der die Wasseraufnahme tagsüber bei $0,53 \pm 0,11$ ml lag und in der Nacht auf $1,21 \pm 0,14$ ml anstieg (Abbildung 25).

Während des Fastens wurde der Trend zu höherer Wasseraufnahme in der Erythropoietin-Gruppe bestätigt. Hier lagen die Werte in der Erythropoietin-Gruppe bei $1,05 \pm 0,20$ ml und in der Kontrollgruppe bei $0,63 \pm 0,13$ ml. Ähnlich wie bei freiem Zugang zu Futter waren die nächtlichen Werte in beiden Gruppen deutlich höher als tagsüber (Abbildung 26).

Es ist erwähnenswert, dass sowohl in der Erythropoietin-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe während des Fastens geringere Wassermengen aufgenommen wurden als während des freien Zugangs zu Futter. Ein solcher Zusammenhang zwischen höherer Nahrungsaufnahme und Wasseraufnahme war auch beim Vergleich der Erythropoietin-Gruppe gegen die Kontrollgruppe feststellbar.

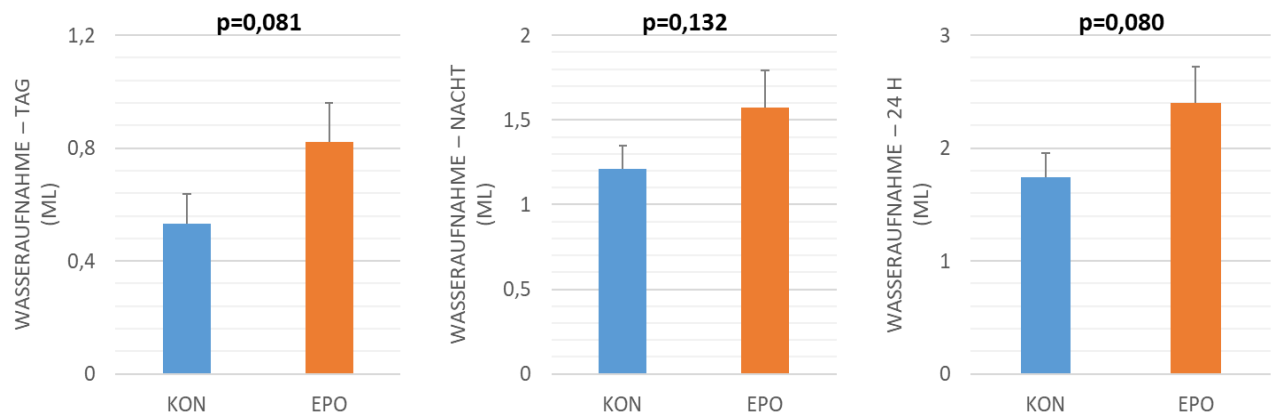


Abbildung 25. Wasseraufnahme pro Maus mit freiem Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag=von 7 bis 19 Uhr; Nacht=von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

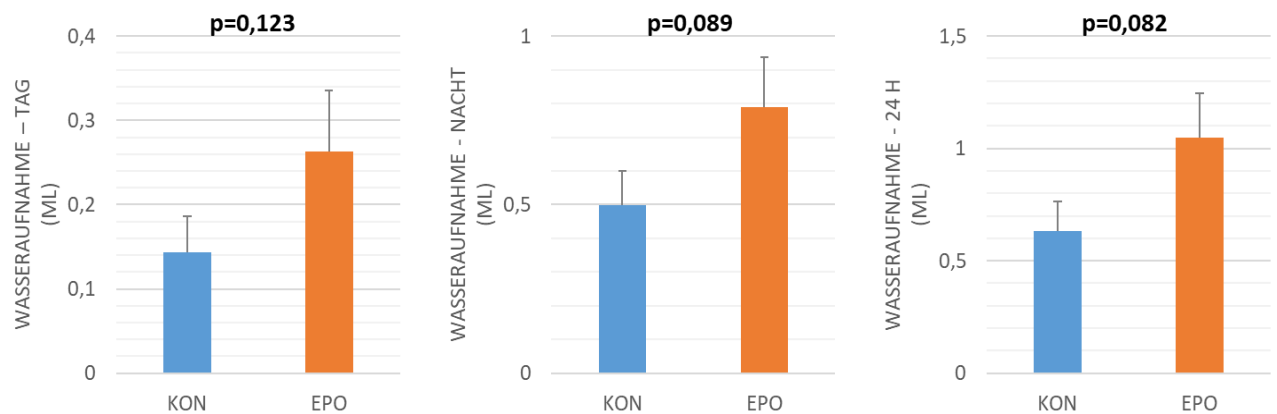


Abbildung 26. Wasseraufnahme pro Maus ohne Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag=von 7 bis 19 Uhr; Nacht=von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

4.10. Blutfette

Die Blutfette (Triglyzeride, LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin) wurden aus dem zum Schluss gesammelten Plasma analysiert. Die Messung des HDL-Cholesterins erfolgte nicht direkt, sondern das HDL-Cholesterin wurde mithilfe der Friedewald-Formel berechnet.

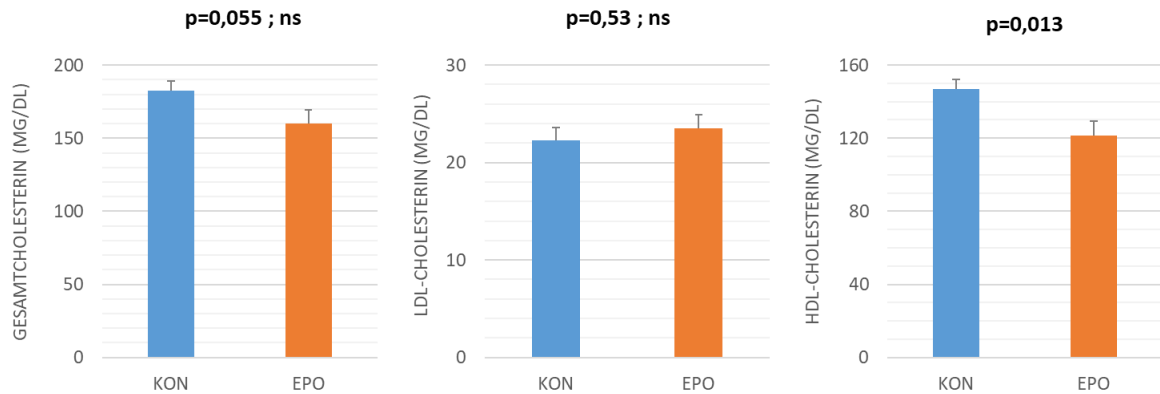


Abbildung 27. Plasmacholesterin adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. EPO=Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; KON=Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte ± SEM;

Im Unterschied zu Menschen weisen Mäuse eine relativ höhere Konzentration an HDL-Cholesterin und eine niedrigere Konzentration an LDL-Cholesterin auf. Dadurch ist das Risiko für die Entwicklung von Arteriosklerose bei Mäusen deutlich geringer.

Das HDL-Cholesterin betrug in der Erythropoietin-Gruppe $121,6 \pm 7,9$ mg/dl, während es in der Kontrollgruppe bei $146,7 \pm 5,5$ mg/dl lag. Somit ist das HDL-Cholesterin in der Erythropoietin-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, während sich das LDL-Cholesterin nicht signifikant zwischen den Gruppen unterschied. Bei Gesamtcholesterin war, getrieben durch den Unterschied im HDL-Cholesterin, ein Trend zu erkennen, wobei in der Erythropoietin-Gruppe das Gesamtcholesterin mit $160,3 \pm 9,2$ mg/dl niedriger war als jenes der Kontrollgruppe mit $182,7 \pm 6,6$ mg/dl (Abbildung 27).

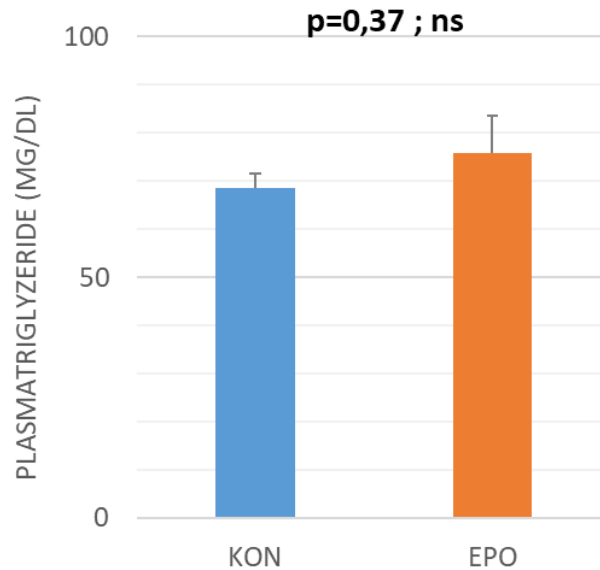


Abbildung 28. Plasmatriglyzeride adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. EPO=Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; KON=Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM;

Auch die Plasmatriglyzeride wurden aus terminal gesammeltem Blut von gefasteten Mäusen (2-4 h) bestimmt. In der Erythropoietin-Gruppe lag der Mittelwert bei $75,8 \pm 7,7$ mg/dl, während er in der Kontrollgruppe bei $68,6 \pm 2,9$ mg/dl lag. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt (Abbildung 28).

4.11. Organgewichte

Am Tag 77, zum Abschluss des Experiments und nach der Tötung der Mäuse, wurden Gewebeproben von Leber und epididymalem Fettpolster entnommen. Diese Proben wurden gewogen und für etwaige spätere Analysen bei -80°C gelagert. Das Lebergewicht zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, die Werte waren in beiden Gruppen nahezu gleich. Für das Gewicht des epididymalen Fettpolsters zeigte sich ein Trend zu etwas niedrigeren Werten in der Erythropoietin-Gruppe ($0,92 \pm 0,10$ g) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,10 \pm 0,06$ g) (Abbildung 29).

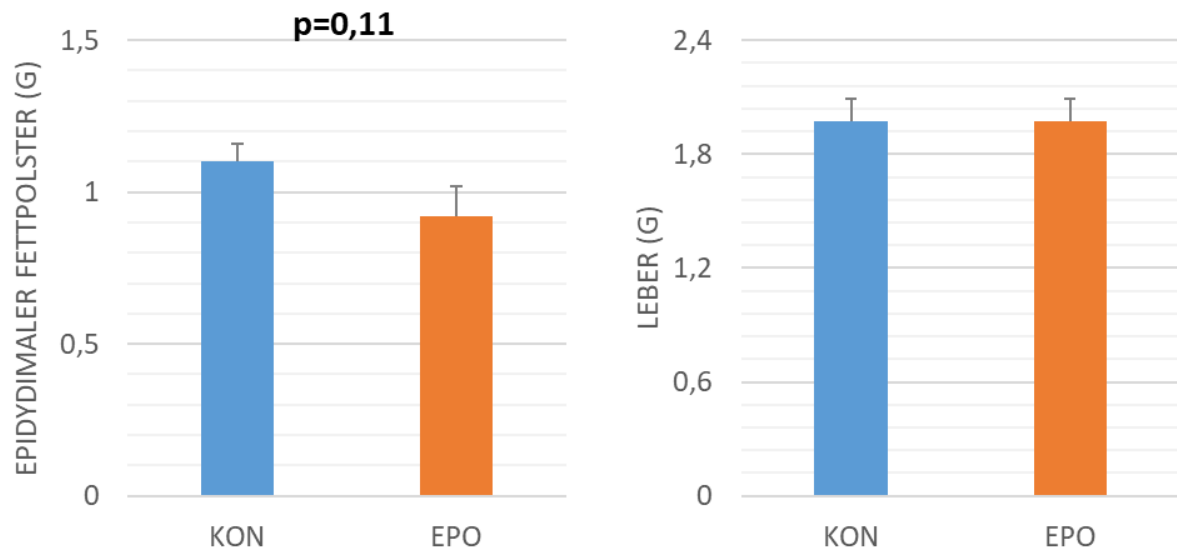


Abbildung 29. Gewicht der Leber und des epidydimalen Fettpolsters adipöser, männlicher Mäuse nach regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. EPO=Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; KON=Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

5. Diskussion

Diabetes und metabolisches Syndrom als häufig auftretende Erkrankungen mit steigender Prävalenz erfordern ständig neue Ansätze zur Behandlung. Nachdem die Auswirkungen von Erythropoietin bei Patienten mit Diabetes, die sich einer Hämodialyse unterzogen, entdeckt wurden, wuchs das Interesse an einer vertieften Erforschung dieser Effekte (Allegra et al., 1996; Mak, 1998). Daher wurden zahlreiche Studien an Tiermodellen durchgeführt, alle mit dem gemeinsamen Ziel, den Wirkungsmechanismus von Erythropoietin genauer zu verstehen. Basierend auf diesen Studien häufen sich die Berichte über die positiven Auswirkungen von Erythropoietin auf den Stoffwechsel. Dies könnte in Zukunft ein neues Anwendungsgebiet für Erythropoietin eröffnen, im Rahmen einer neuen therapeutischen Strategie zur Bekämpfung von Adipositas und metabolischen Störungen. Die vorliegende Arbeit hat sich mit diesem Thema befasst.

Mäuse des Wildtypstamms C57BL/6, die unter fettreicher Diät bekanntermaßen besonders anfällig für die Entwicklung metabolischer Störungen sind, wurden einer hochdosierten Erythropoietinbehandlung unterzogen, während sie mit HFD gefüttert wurden. Hierbei wurden die Mäuse dreimal wöchentlich mit 1000 U/kg Epoetin theta behandelt. Um die Effekte von Erythropoietin unabhängig vom Körpergewicht zu betrachten, wurden die Gewichte in beiden Gruppen möglichst gleich gehalten. In der Kontrollgruppe erhielten die Mäuse täglich eine begrenzte Futtermenge, um sicherzustellen, dass ihre Gewichtskurve jener der Erythropoietin-behandelten Mäuse ähnelte. Dieser Ansatz wurde gewählt, um herauszufinden, welche Effekte von Erythropoietin unabhängig von Veränderungen im Körpergewicht auftraten und daher nicht nur Folge eines Gewichtsverlustes durch die Erythropoietinbehandlung sind.

Um den wirksamen Dosierungsbereich der Erythropoietinbehandlung zu beschreiben, untersuchten Foscett et al. (2011) die Erythropoietin-Effekte bei fünf unterschiedlichen Dosen, die als niedrig (75 U/kg, 150 U/kg), mittel (300 U/kg, 600 U/kg) und hoch (1000 U/kg) bezeichnet wurden. Die Untersuchung wurde, wie in der vorliegenden Arbeit, an adipösen Tieren vom Wildtypmäusestamm C57BL/6 durchgeführt, wobei jeden zweiten Tag Injektionen verabreicht wurden. Dabei wurde deutlich, dass die Dosis von 150 U/kg lediglich Auswirkungen auf das Körpergewicht und die Fettmasse hatte, während sich keine Veränderungen im Glukosestoffwechsel zeigten. Die Dosen von 300 bis 1000 U/kg führten zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichts und der Fettmasse, während sie gleichzeitig positive Auswirkungen auf die Nüchternblutglukose, die Glukosetoleranz und die Insulinresistenz hatten. Die Dosis von 75 U/kg zeigte sich bei allen diesen Parameter als unwirksam. Keine der Erythropoietin-Dosen hatte nachweisbare Auswirkungen auf die Nahrungsaufnahme und nur die Dosis von 1000 U/kg erhöhte die körperliche Aktivität signifikant. Laut Autoren deuten diese Daten darauf hin, dass die Nahrungsaufnahme möglicherweise nicht beteiligt ist, während die körperliche Aktivität nur teilweise an der Regulation des Körpergewichts, der Fettmasse und des Glukosestoffwechsels durch die Erythropoietinbehandlung beteiligt ist.

Im Einklang mit den oben genannten Dosen wurde in einer Studie von Kodo et al. (2017) bereits bei einer Dosis von 200 U/kg Gewichtsreduktion wie auch niedrigere Blutglukose (jedoch nur als Trend) festgestellt. Auf der anderen Seite gab es keine Auswirkungen auf die körperliche Aktivität und die Nahrungsaufnahme, was auch mit den oben genannten Erkenntnissen übereinstimmt. Es wurde auch eine signifikante Reduktion des epidydimalen Fettpolsters und des Gesamtcholesterins beobachtet, ähnlich wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. In der Studie wurde außerdem festgestellt, dass Erythropoietin den Energieverbrauch steigert, indem es die Masse des braunen Fettgewebes erhöht. Braunes Fettgewebe (BAT) trägt zur Steigerung des Energieverbrauchs im Organismus bei, indem es chemische Energie in Wärme umwandelt.

Teng et al. (2011) untersuchten die Erythropoietin-Effekte einerseits an transgenen Mäusen, bei denen die Expression des Erythropoietin-Rezeptors (EpoR) auf hämatopoetisches Gewebe beschränkt ist und auf anderer Seite bei Wildtyp-Mäusen, denen 3000 U/kg Erythropoietin verabreicht wurde. Die transgenen Mäuse entwickelten eine Glukoseintoleranz und zeigten Adipositas sowie Insulinresistenz. Die Behandlung männlicher Mäuse mit Erythropoietin führte zu einer Steigerung der körperlichen Aktivität und der Magermasse, während die Nahrungsaufnahme abnahm. Das hatte zur Folge, dass sowohl das Körpergewicht als auch die Fettmasse reduziert wurden.

In einer Studie von Wang et al. (2013) wurden Mäuse unter HFD-Fütterung dreimal wöchentlich mit 3000 U/kg Erythropoietin behandelt. Gleichzeitig wurden Mäuse mit einer gezielten Deletion des Erythropoietin-Rezeptors im Fettgewebe untersucht, sodass nur die direkten Wirkungen auf das Fettgewebe eliminiert wurden. Es wurde gezeigt, dass die endogene Erythropoietin-Aktivität im Fettgewebe einen bedeutenden Beitrag zum Schutz vor Adipositas und damit verbundenen Stoffwechselerkrankungen leistet. Die Mäuse entwickelten Adipositas, Glukoseintoleranz und Insulinresistenz, wiesen erhöhte Blutglukosewerte auf und verzeichneten eine Zunahme des Körperfetts sowie eine Abnahme der körperlichen Aktivität, ohne dass es zu Veränderungen in der Nahrungsaufnahme kam. Die Erythropoietin-behandelte Wildtypmäuse wurden hingegen schlanker, wiesen eine Abnahme des angesammelten Körperfetts auf und zeigten eine Zunahme der Aktivität. Aus diesen Daten lässt sich klar erkennen, dass sowohl endogenes als auch exogenes Erythropoietin in Adipozyten eine wichtige Rolle in der Regulation von Adipositas spielt und dass die Wirkung von Erythropoietin im Fettgewebe maßgeblich für die Regulation des Körpergewichts, der Fettmasse, des Glukosestoffwechsels und der Insulinsensitivität verantwortlich ist.

Die Mäuse, bei denen der EpoR auf erythroides Gewebe beschränkt war und die Mäuse mit gezielter Deletion von EpoR in Adipozyten zeigten keine signifikanten Veränderungen in der Fettmasse und dem Körpergewicht bei erythropoietin-stimulierter Erythropoese. Das weist darauf hin, dass unter diesen experimentellen Umständen die Kontrolle des Körpergewichts und der Fettmasse nicht von der erythropoietin-vermittelten Erythropoese abhängt, sondern vielmehr von der Erythropoietin-Aktivität in nicht hämatopoetischem Gewebe (Noguchi, 2020).

Die Effekte auf das Gewicht könnten möglicherweise durch eine Studie von Dey et al. (2020) besser verstanden werden. In dieser Studie wurden transgene Mäuse mit überexprimierten EpoR im Gehirn, Wildtypmäuse mit zerebraler Infusion von Erythropoietin und Wildtyp-Mäuse mit gelöschtem EpoR im Gehirn untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass zerebrales Erythropoietin die Gewichtszunahme reguliert, was unabhängig von der Erythropoietin-stimulierten Erythropoese ist.

Trotz zahlreicher Studien ist der exakte Mechanismus, durch den Erythropoietin die Senkung der Blutglukose bewirkt, nach wie vor nicht vollständig geklärt. Oft geht die Senkung der Blutglukosekonzentration mit einer Gewichtsabnahme einher, was die Frage aufwirft, ob die Blutglukosesenkung lediglich aufgrund der Gewichtsreduktion erfolgt. Das gilt auch für andere Parameter, auf die Erythropoietin Einfluss nimmt. In den oben genannten Studien wurde auch häufig über einen signifikanten Anstieg des Hämatokrits berichtet und es wird vermutet, dass diese Erhöhung des Hämatokrits ein möglicher Mechanismus für die Blutglukosesenkung sein könnte. Darüber hinaus wird in Erwägung gezogen, dass Erythropoietin in einigen Studien die körperliche Aktivität und den Energieverbrauch gesteigert hat und dies wird als einer der potenziellen Wirkmechanismen berücksichtigt.

Wie also bereits in den zuvor genannten Studien betont wurde, zeigt Erythropoietin auch eine Wirkung auf die Blutglukose. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Senkung der Blutglukose bei Erythropoietin-behandelten Mäusen beobachtet, da ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt wurde.

Während in den zuvor erwähnten Studien bereits bei niedrigeren Dosen als 1000 U/kg eine Gewichtsreduktion beobachtet wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit dieser Effekt durch eingeschränkte Fütterung der Kontrollmäuse vermieden. Daher konnten Effekte, die durch einen Gewichtsunterschied bedingt sind, ausgeschlossen werden. Die Mäuse beider Gruppen nahmen gleichermaßen allmählich an Gewicht zu. Trotz des gleichen Gewichts traten Unterschiede in der Körperzusammensetzung auf. In den zuvor genannten Studien kam es zu einer Reduzierung der Fettmasse, der aufgrund des unterschiedlichen Körpergewichts nicht überraschend ist. In der vorliegenden Arbeit war ohne Gewichtsunterschied ein Trend in diese Richtung erkennbar, gleichzeitig war die Magermasse signifikant erhöht. Auch das Gewicht des epidydimalen Fettpolsters war bei den Mäusen, die Erythropoietin erhielten, geringer, jedoch zeigte sich auch hier nur ein Trend. Erythropoietin hat somit auch bei gleichem Gewicht einen leichten Einfluss auf die Körperzusammensetzung bzw. auf das relative Körperfett.

Die gesteigerte körperliche Aktivität führt dazu, dass der Körper mehr Energie benötigt, was wiederum die Verwendung von Glukose aus dem Blut erhöht, um alle Zellen, insbesondere die Muskeln, ausreichend mit Energie zu versorgen. Als nachaktive Tiere zeigten Mäuse in der Nacht eine Aktivität, die etwa doppelt so hoch war wie tagsüber. Dieses Verhalten ist evolutionär bedingt und eine Reaktion auf potenzielle Raubtiere. Daher sind Mäuse nachts am aktivsten, wenn die Gefahr für sie am geringsten ist (Steinlechner, 2012). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied

in der Aktivität zwischen den Gruppen festgestellt und die Aktivität blieb durch die Erythropoietinbehandlung unbeeinflusst.

Die gesteigerte nächtliche Aktivität führte auch zu einem Anstieg der Futteraufnahme und Wasseraufnahme während der Nacht. In der Nacht war daher auch in der vorliegenden Studie der Energieverbrauch etwas höher als am Tag. Der Energieverbrauch war allerdings sowohl am Tag als auch in der Nacht sehr ähnlich zwischen den beiden Gruppen. Daher wurde der Energieverbrauch nicht durch die Erythropoietinbehandlung beeinflusst.

Diese Daten deuten darauf hin, dass bei gleichem Körpergewicht Erythropoietin auch auf Energieverbrauch und Aktivität keinen signifikanten Effekt hatte. Von anderen beschriebene Effekte auf diese Parameter könnten daher Folge des Erythropoietin-induzierten Gewichtsunterschiedes sein. Die Senkung der Blutglukose trat bei gleichem Körpergewicht auf und ist daher nicht allein als Folge eines Gewichtsunterschiedes erklärbar.

Erythropoietin ist dazu fähig, pleiotrope Effekte im Organismus hervorzurufen. So wird vermutlich auch die Blutglukosesenkung sowohl direkt als indirekt durch Zusammenspiel unterschiedlicher Organe erzielt. Daher sind Körpergewicht und Energieverbrauch zum Teil an der Regulation der Blutglukose beteiligt, aber nicht hauptverantwortlich.

6. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass unabhängig vom Körpergewicht regelmäßige Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg dreimal wöchentlich) signifikante Auswirkungen auf die Blutglukose und die Körperzusammensetzung von männlichen Mäusen hat. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass weder die Senkung der Blutglukose noch die Veränderungen des relativen Körperfetts allein auf Gewichtsverlust zurückzuführen sind.

7. Literaturverzeichnis

- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B. & Starke, K. (2013). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel (11. Aufl.). „Elsevier, Urban&Fischer Verlag“.
- Allegra, V., Mengozzi, G., Martimbianco, L. & Vasile, A. (1996). Early and late effects of erythropoietin on glucose metabolism in maintenance hemodialysis patients. *American Journal of Nephrology*, 16(4), 304–308. <https://doi.org/10.1159/000169014>
- Alnaeeli, M. & Noguchi, C. T. (2015). Erythropoietin and obesity-induced white adipose tissue inflammation: Redefining the boundaries of the immunometabolism territory. *Adipocyte*. <https://doi.org/10.4161/21623945.2014.978654>
- Sprigg, N. & Bath, P. M. (2007). Colony stimulating factors (Blood growth factors) are promising but unproven for treating stroke. *Stroke*, 38(6), 1997–1998. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.107.482877>
- Brandes, R., Lang, F. & Schmidt, R. F. (2019). Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie (32. Aufl.). Springer-Verlag.
- Choi, D., Kim, M. & Park, J. (1996). Erythropoietin: Physico- and biochemical analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 687(1), 189–199. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(96\)00308-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(96)00308-8)
- Choi, D., Schroer, S. A., Lu, S., Wang, L., Wu, X., Liu, Y., Zhang, Y., Gaisano, H. Y., Wagner, K. U., Wu, H., Retnakaran, R. & Woo, M. (2010). Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 207(13), 2831–2842. <https://doi.org/10.1084/jem.20100665>
- Chu, Y., Huddleston, G. G., Clancy, A. N., Harris, R. B. S. & Bartness, T. J. (2010). Epididymal fat is necessary for spermatogenesis, but not testosterone production or copulatory behavior. *Endocrinology*, 151(12), 5669–5679. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0772>
- Dey, S., Cui, Z., Гаврилова, О., Zhang, X., Gassmann, M. & Noguchi, C. T. (2020). Sex-specific brain erythropoietin regulation of mouse metabolism and hypothalamic inflammation. *JCI insight*, 5(5). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.134061>
- Dey, S., Li, X., Teng, R., Alnaeeli, M., Chen, Z., Rogers, H. & Noguchi, C. T. (2015). Erythropoietin regulates POMC expression via STAT3 and potentiates leptin response. *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(2), 55–67. <https://doi.org/10.1530/jme-15-0171>
- Elliott, S. & Sinclair, A. M. (2012). The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics: Targets & Therapy*, 163. <https://doi.org/10.2147/btt.s32281>

- Fisher, J. W. (2003). Erythropoietin: Physiology and Pharmacology update. *Experimental Biology and Medicine*, 228(1), 1–14. <https://doi.org/10.1177/153537020322800101>
- Foskett, A., Alnaeeli, M., Wang, L., Teng, R. & Noguchi, C. T. (2011). The effects of erythropoietin dose titration during High-Fat Diet-Induced Obesity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2011/373781>
- Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S. (2020). *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie* (3. Aufl.). Springer-Verlag.
- Hajer, G. R., Van Haeften, T. W. & Visseren, F. L. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, 29(24), 2959–2971. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn387>
- Hildebrandt, J., Bleckmann, H. & Homberg, U. (2021). *Energiehaushalt*. In Springer eBooks (S. 375–389). https://doi.org/10.1007/978-3-662-61595-9_9
- Højman, P., Brolin, C., Gissel, H., Brandt, C., Zerahn, B., Pedersen, B. K. & Gehl, J. (2009). Erythropoietin Over-Expression protects against Diet-Induced obesity in mice through increased fat oxidation in muscles. *PLOS ONE*, 4(6), e5894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005894>
- Jelkmann, W. (2007). Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. In *Methods in Enzymology* (S. 179–197). [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(07\)35010-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(07)35010-6)
- Jelkmann, W. (2010). Erythropoietin: Back to basics. *Blood*, 115(21), 4151–4152. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-271395>
- Kodo, K., Sugimoto, S., Nakajima, H., Mori, J., Itoh, I., Fukuhara, S., Shigehara, K., Nishikawa, T., Kosaka, K. & Hosoi, H. (2017). Erythropoietin (EPO) ameliorates obesity and glucose homeostasis by promoting thermogenesis and endocrine function of classical brown adipose tissue (BAT) in diet-induced obese mice. *PLOS ONE*, 12(3), e0173661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173661>
- Kappel, S., Hawkins, P. & Mendl, M. (2017). To group or not to group? Good practice for housing male laboratory mice. *Animals*, 7(12), 88. <https://doi.org/10.3390/ani7120088>
- Kroidl, R. F., Schwarz, Š., Lehnigk, B. & Fritsch, J. (2015). *Kursbuch Spiroergometrie*. <https://doi.org/10.1055/b-003-104201>
- Lappin, T., Maxwell, A. P. & Johnston, P. G. (2002). EPO's alter ego: Erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells*, 20(6), 485–492. <https://doi.org/10.1634/stemcells.20-6-485>
- Lee, K. & Kim, N. H. (2019). Differential expression of Adipocyte-Related molecules in the distal epididymal fat of mouse during postnatal period.

- Development & reproduction, 23(3), 213–221.
<https://doi.org/10.12717/dr.2019.23.3.213>
- Liu, H., Zhang, G., Kang, X., Yuan, H., Lv, Y., Wang, W. & Randall, R. (2013). Factors interfering with the accuracy of five blood glucose meters used in Chinese hospitals. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 27(5), 354–366.
<https://doi.org/10.1002/jcla.21611>
- Löffler, G., Petrides, P. E. & Heinrich, P. C. (2007). *Biochemie und pathobiochemie* (8. Aufl.). Springer Verlag.
- Mak, R. H. (1998). Metabolic effects of erythropoietin in patients on peritoneal dialysis. *Pediatric Nephrology*, 12(8), 660–665.
<https://doi.org/10.1007/s004670050524>
- Marxsen, J. H., Stengel, P., Doege, K., Heikkinen, P. T., Jokilehto, T., Wagner, T. M., Jelkmann, W., Jaakkola, P. & Metzen, E. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-A-prolyl-4-hydroxylases. *Biochemical Journal*, 381(3), 761–767.
<https://doi.org/10.1042/bj20040620>
- Melotti, L., Kästner, N., Eick, A. K., Schnelle, A. L., Palme, R., Sachser, N., Kaiser, S. & Richter, S. H. (2019). Can live with ‘em, can live without ‘em: Pair housed male C57BL/6J mice show low aggression and increasing sociopositive interactions with age, but can adapt to single housing if separated. *Applied Animal Behaviour Science*, 214, 79–88.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.03.010>
- Meng, R., Zhu, D., Bi, Y., Yang, D., & Wang, Y. (2013). Erythropoietin inhibits gluconeogenesis and inflammation in the liver and improves glucose intolerance in high-fat diet-fed mice. *PloS one*, 8(1), e53557.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053557>
- Montgomery, M. K., Hallahan, N., Brown, S. H. J., Liu, M., Mitchell, T. W., Cooney, G. J. & Turner, N. (2013). Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*, 56(5), 1129–1139. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2846-8>
- Müller-Esterl, W. (2018). *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger* (3. Aufl.). Springer Spektrum.
- Musholt, P. B., Schipper, C., Thomé, N., Ramljak, S., Schmidt, M., Forst, T. & Pfützner, A. (2011). Dynamic electrochemistry corrects for hematocrit interference on blood glucose determinations with patient Self-Measurement devices. *Journal of diabetes science and technology*, 5(5), 1167–1175. <https://doi.org/10.1177/193229681100500520>
- Narhi, L. O., Arakawa, T., Aoki, K. H., Elmore, R. H., Rohde, M. F., Boone, T. C. & Strickland, T. W. (1991). The effect of carbohydrate on the structure and

- stability of erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*, 266(34), 23022–23026. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)54457-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)54457-4)
- Noguchi, C. T. (2020). Erythropoietin regulates metabolic response in mice via receptor expression in adipose tissue, brain, and bone. *Experimental Hematology*, 92, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.09.190>
- Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A. & Fukuda, M. N. (1987). Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin CDNA. *Journal of Biological Chemistry*, 262(25), 12059–12076. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)45317-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)45317-3)
- Schöffel, N., Börger, J., Quarcoo, D., Scutaru, C. & Groneberg, D. (2008). Erythropoietin – aktueller Stand der Wissenschaft. *Sportverletzung-sportschaden*, 22(04), 201–206. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1027826>
- Shih, H., Wu, C. & Lin, S. (2018). Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *Journal of the Formosan Medical Association*, 117(11), 955–963. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.03.017>
- Shoyaib, A. A., Archie, S. R. & Karamyan, V. T. (2019). Intraperitoneal route of drug administration: Should it be used in experimental animal studies? *Pharmaceutical Research*, 37(1). <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>
- Steinlechner, S. (2012). Biological rhythms of the mouse. In Elsevier eBooks (S. 383–407). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382008-2.00017-9>
- Stockmann, C. & Fandrey, J. (2006). HYPOXIA-INDUCED ERYTHROPOIETIN PRODUCTION: A PARADIGM FOR OXYGEN-REGULATED GENE EXPRESSION. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(10), 968–979. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04474.x>
- Suresh, S., Rajvanshi, P. K. & Noguchi, C. T. (2020). The many facets of erythropoietin physiologic and metabolic response. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01534>
- Sytkowski, A. J. (2007). Does erythropoietin have a dark side? EPO signaling and cancer cells. *Science's STKE*, 2007(395). <https://doi.org/10.1126/stke.3952007pe38>
- Talcott, M., Akers, W. J. & Marini, R. P. (2015). Techniques of experimentation. In Elsevier eBooks (S. 1201–1262). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409527-4.00025-0>
- Teng, R., Гаврилова, О., Suzuki, N., Chanturiya, T., Schimel, D., Hugendubler, L., Mammen, S., Yver, D. R., Cushman, S. W., Mueller, E., Yamamoto, M., Hsu, L. L. & Noguchi, C. T. (2011). Disrupted erythropoietin signalling promotes obesity and alters hypothalamus proopiomelanocortin production. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1526>

- Tirard, J., Gout, J., Lefrançois-Martinez, A. M., Martinez, A., Bégeot, M. & Naville, D. (2007). A novel inhibitory protein in adipose tissue, the Aldo-Keto reductase AKR1B7: Its role in adipogenesis. *Endocrinology*, 148(5), 1996–2005. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1707>
- Voss, J. D., Allison, D. B., Webber, B. J., Otto, J. & Clark, L. L. (2014). Lower obesity rate during residence at high altitude among a military population with frequent migration: a quasi experimental model for investigating spatial causation. *PLOS ONE*, 9(4), e93493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093493>
- Wang, L., Di, L. & Noguchi, C. T. (2014). Erythropoietin, a novel versatile player regulating energy metabolism beyond the erythroid system. *International Journal of Biological Sciences*, 10(8), 921–939. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9518>
- Wang, L., Teng, R., Di, L., Rogers, H., Wu, H., Kopp, J. B. & Noguchi, C. T. (2013). PPARA and SIRT1 mediate erythropoietin action in increasing metabolic activity and browning of white adipocytes to protect against obesity and metabolic disorders. *Diabetes*, 62(12), 4122–4131. <https://doi.org/10.2337/db13-0518>
- Wasley, L., Timony, G., Murtha, P., Stoudemire, J. B., Dorner, A., Caro, J., Krieger, M. & Kaufman, R. (1991). The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. *Blood*, 77(12), 2624–2632. <https://doi.org/10.1182/blood.v77.12.2624.2624>
- Watts, D., Gaete, D., Rodríguez, D. A., Hoogewijs, D., Rauner, M., Sormendi, S. & Wielockx, B. (2020). Hypoxia pathway proteins are master regulators of erythropoiesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8131. <https://doi.org/10.3390/ijms21218131>
- Yoshimura, A. & Arai, K. (1996). The erythropoietin receptor and signal transduction. *Oncologist*. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.1-5-337>
- Zhang, Y., Wang, L., Dey, S., Alnaeeli, M., Suresh, S., Rogers, H., Teng, R. & Noguchi, C. T. (2014). Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 10296–10333. <https://doi.org/10.3390/ijms150610296>

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Regulation des Glukosemetabolismus durch Insulin und Glukagon (Müller-Esterl, 2018)

Abbildung 2. Metabolische Wechselwirkungen zwischen Organen über die Blutbahn (Müller-Esterl, 2018).

Abbildung 3. Erythropoietin besteht aus vier α -Helices und hat vier Glykosilierungsstellen (Freissmuth et al., 2019). Grün: Peptidkette; Rosa: Seitenketten.

Abbildung 4. Oben: Unter Normoxie wird HIF-1 hydroxyliert und durch die Bindung an das Von-Hippel-Lindau-Protein von einem Proteasom abgebaut. Unten: Unter Hypoxie bleibt die Hydroxylierung aus, HIF-1 α kann in den Zellkern translozieren und dort die Transkription des Erythropoietins aktivieren (Watts et al., 2020).

Abbildung 5. Erythropoietin beeinflusst vor allem die Vorläuferzellen im Stadium BFU-E (Erythroid Burst Forming Unit), die sich zunächst zu reiferen Vorläuferzellen des Typs CFU-E (Erythroid Colony Forming Unit) entwickeln und schließlich erfolgt die Ausdifferenzierung von Retikulozyten zu Erythrozyten (Shih et al., 2018).

Abbildung 6. Nach der Bindung des Erythropoietins an den Rezeptor und deren Dimerisierung werden in der Zelle verschiedene Signaltransduktionswege in Gang gesetzt (Elliott & Sinclair, 2012).

Abbildung 7. Nicht-hämatopoetische Wirkung von Erythropoietin auf verschiedene Gewebe (Wang et al., 2014)

Abbildung 8. Körpergewicht adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Erythropoietin-Gruppe: orange, n=12; Kontrollgruppe: blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Abbildung 9. Futteraufnahme adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Futteraufnahme in g pro Maus über 77 Tage; EPO=Erythropoietin-Gruppe, orange; KON=Kontrollgruppe, blau; EPO: Mittelwert von 3 Käfigen $\pm$ SEM; kein signifikanter Unterschied

Abbildung 10. Fettmasse, Magermasse und relative Fettmasse adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit

Vehikelinjektionen behandelt wurden. EPO=Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; KON=Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM

Abbildung 11. Blutglukose nach vierstündigem Fasten in adipösen, männlichen Mäusen unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM.

Abbildung 12. Blutglukose nach achtzehnstündigem Fasten in adipösen, männlichen Mäusen unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM.

Abbildung 13. Blutketone adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Erythropoietin-Gruppe=orange, n=12; Kontrollgruppe=blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 14. Respiratorischer Quotient (RQ) adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Der RQ wurde indirekt als Verhältnis zwischen abgegebenem Kohlendioxid und aufgenommenem Sauerstoff in metabolischen Käfigen gemessen; oben: 24 Stunden mit Futter, unten: 24 Stunden ohne Futter; Weiße Fläche=Tag von 7 bis 19 Uhr; Graue Fläche=Nacht von 19 bis 7 Uhr; E=Individuen der Erythropoietin-Gruppe, n=6; C=Individuen der Kontrollgruppe, n=6.

Abbildung 15. Respiratorischer Quotient adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Der RQ wurde indirekt als Verhältnis zwischen abgegebenem Kohlendioxid und aufgenommenem Sauerstoff in metabolischen Käfigen gemessen; 24 Stunden mit Futter - links, 24 Stunden ohne Futter - rechts; Weiße Fläche=Tag, 7 Uhr bis 19 Uhr; Graue Fläche=Nacht, 19 Uhr bis 7 Uhr. Erythropoietin-Gruppe: orange, n=6; Kontrollgruppe: blau, n=6. Mittelwerte; keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 16. Durchschnittlicher respiratorischer Quotient adipöser, männlicher Mäuse, die freien Zugang zu Futter hatten und einer regelmäßigen, hochdosierten Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) unterzogen wurden. Im

Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Der RQ wurde indirekt als Verhältnis zwischen abgegebenem Kohlendioxid und aufgenommenem Sauerstoff in metabolischen Käfigen gemessen; Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 17. Durchschnittlicher respiratorischer Quotient (RQ) adipöser, männlicher Mäuse, die keinen Zugang zu Futter hatten, unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Der RQ wurde indirekt über 24 Stunden unter Futterentzug als Verhältnis zwischen abgegebenem Kohlendioxid und aufgenommenem Sauerstoff in metabolischen Käfigen gemessen; Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 18. Durchschnittlicher Energieverbrauch mit freiem Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Abbildung 19. Durchschnittlicher Energieverbrauch ohne Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Abbildung 20. Durchschnittlicher Energieverbrauch mit freiem Zugang zum Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Abbildung 21. Durchschnittlicher Energieverbrauch über 24 Stunden ohne Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich

dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Abbildung 22. Aktivität pro Maus mit freiem Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Abbildung 23. Aktivität pro Maus ohne Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Abbildung 24. Futteraufnahme adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 Uhr bis 19 Uhr; Nacht= von 19 Uhr bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM

Abbildung 25. Wasseraufnahme pro Maus mit freiem Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Abbildung 26. Wasseraufnahme pro Maus ohne Zugang zu Futter. Adipöse, männliche Mäuse wurden regelmäßig mit hochdosierten Erythropoietin-Injektionen (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) behandelt. Im Vergleich dazu Kontrollmäuse, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. Tag= von 7 bis 19 Uhr; Nacht= von 19 bis 7 Uhr; EPO=Erythropoietin-Gruppe, n=6; KON=Kontrollgruppe, n=6; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede

Abbildung 27. Plasmacholesterin adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. EPO=Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; KON=Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM;

Abbildung 28. Plasmatriglyzeride adipöser, männlicher Mäuse unter regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. EPO=Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; KON=Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM;

Abbildung 29. Gewicht der Leber und des epidydimalen Fettpolsters adipöser, männlicher Mäuse nach regelmäßiger, hochdosierter Erythropoietinbehandlung (1000 U/kg Epoetin theta intraperitoneal dreimal wöchentlich über 71 Tage) im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit Vehikelinjektionen behandelt wurden. EPO=Erythropoietin-Gruppe, orange, n=12; KON=Kontrollgruppe, blau, n=14; Mittelwerte $\pm$ SEM; keine signifikanten Unterschiede