

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger

Zum Einfluss von experimentell induzierten katabolen, hyperglykämischen und  
hyperinsulinämischen Stoffwechselzuständen auf die Konzentrationsverläufe von  
Metaboliten des Energie- und Proteinstoffwechsels sowie von Insulin und Glucagon im  
Blutplasma beim Huhn

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Judith Maria Mandetzky  
aus Trostberg

München 2014

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger

**Korreferent:** Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

*Meinen Eltern,*

*Großmama*

*und*

*Simon*

## Abkürzungsverzeichnis

AUC	area under curve
BLZ	Blutzuckerspiegel
BW	body weight
βHB	β-Hydroxybutyrat
βHBA	β-hydroxybutrate
Dunn	Dunn-Test
FFS	Freie Fettsäuren
GDBN	nüchtern und 2 h mit Glucose vorbelastet
GTT	intravenöser Glucosetoleranztest
h	Stunden
H	hungernd
HK	Kontrolltiere hungernd
HP	hungernd und unter Phlorizineinfluss
HPK	Kontrolltiere hungernd und unter Phlorizineinfluss
i.v.	intravenös
K-W	Kruskal-Wallis-Test
min	Minuten
N	nüchtern
NEFA	non esterified fatty acids
NK	Kontrolltiere nüchtern
nK	Anzahl der Kontrolltiere
nPrH	Anzahl der Versuchstiere im Tagesprofil unter „Hunger“ Bedingungen
nPrHP	Anzahl der Versuchstiere im Tagesprofil unter „Hunger“ Bedingungen und „unter Phlorizineinfluss“
nPrN	Anzahl der Versuchstiere im Tagesprofil unter „nüchtern“ Bedingungen
nT	Anzahl der Testtiere
p.i.	post injectionem
pK-W	der p-Wert für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet, da die Werte nicht normalverteilt waren oder die Varianzen signifikant unterschiedlich waren
pM-W	der p-Wert für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, da die Werte nicht normalverteilt waren oder die Varianzen signifikant unterschiedlich waren

Pr	Tagesprofil
PrH	Tagesprofil unter „Hunger“ Bedingungen
PrHP	Tagesprofil unter „Hunger“ Bedingungen und „unter Phlorizineinfluss“
PrN	Tagesprofil unter „nüchtern“ Bedingungen
RIA	Radioimmunoassay
s.	siehe
s.c.	sub cutan
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
TH	intravenöse Tolbutamidinjektion unter der Bedingung „hungernd“
TN	intravenöse Tolbutamidinjektion unter der Bedingung „nüchtern“
Tukey	Tukey-Test
vs	versus

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Physiologische Gegebenheiten beim Huhn .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Huhn als Versuchstier: Verhalten, Nahrungsaufnahme und Stalleinrichtung .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2</b>	<b>Merkmale des Glucosestoffwechsels.....</b>	<b>4</b>
1.2.1	Zellulärer Glucosetransport.....	4
1.2.2	Gluconeogenese .....	5
1.2.3	Glycolyse .....	5
1.2.4	Glykogensynthese .....	6
1.2.5	Kontrolle der Glucose-Stoffwechselwege .....	7
<b>1.3</b>	<b>Merkmale des Fettstoffwechsels .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Freie Fettsäuren im Blut.....</b>	<b>8</b>
1.3.1.1	Einfluss von Futteraufnahme und Hungern .....	9
1.3.1.2	Einfluss von Hormonen.....	9
<b>1.3.2</b>	<b>β-Hydroxybutyrat im Blut .....</b>	<b>10</b>
1.3.2.1	Einfluss von Hungern bzw. einer exogenen Glucosezufuhr .....	11
1.3.2.2	Einfluss von Hormonen.....	12
<b>1.4</b>	<b>Merkmale des Eiweißstoffwechsels .....</b>	<b>12</b>
1.4.1	Stickstoffausscheidung.....	12
1.4.2	Nutritive und hormonale Einflüsse auf den Harnsäurespiegel im Blut .....	12
1.4.3	Enzyme im Harnsäurestoffwechsel.....	13
1.4.4	Harnsäure als Antioxidanz .....	13
<b>1.5</b>	<b>Die Hormone des Pankreas .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1</b>	<b>Insulin.....</b>	<b>14</b>
1.5.1.1	Physiologische Besonderheiten beim Vogel.....	14

1.5.1.2	Zur Wirkung von diabetogenen Agentien .....	18
1.5.1.3	Zur Wirkung von Insulin auf den Glucosestoffwechsel .....	19
1.5.1.4	Zur Wirkung von Insulin auf den Fettstoffwechsel .....	20
1.5.1.5	Zur Wirkung von Insulin auf Hepatozyten .....	21
1.5.1.6	Zu Rasse-abhängigen Unterschieden im Blutspiegel von Insulin .....	21
<b>1.5.2</b>	<b>Glucagon .....</b>	<b>22</b>
1.5.2.1	Physiologische Besonderheiten beim Vogel.....	22
1.5.2.2	Zur Wirkung von Glucagon auf den Glucose- und Fettsäurestoffwechsel sowie auf die Leber .....	23
<b>1.6</b>	<b>Zum Zusammenspiel von Insulin und Glucagon bei der Glucosehomeostase des Huhns.....</b>	<b>25</b>
<b>1.7</b>	<b>Tageszeitliche Einflüsse auf die Konzentration von Stoffwechselmetaboliten und Hormonen im Blut von Hühnern .....</b>	<b>26</b>
<b>1.8</b>	<b>Einflüsse des Futterentzugs beim Huhn.....</b>	<b>28</b>
1.8.1	Zur Wirkung eines Futterentzugs auf das Körpergewicht .....	28
1.8.2	Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen im Blut nach Futterentzug .....	28
1.8.2.1	Konzentrationsverlauf von Metaboliten nach Futterentzug.....	29
1.8.2.2	Konzentrationsverlauf von Hormonen nach Futterentzug .....	32
1.8.3	Zur Wirkung eines Futterentzugs auf Enzyme .....	33
<b>2.</b>	<b>Beeinflussung des Stoffwechsels durch die Applikation verschiedener Wirkstoffe .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>Phlorizin induzierte Glucosurie .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Glucose induzierte Hyperglykämie .....</b>	<b>35</b>
2.2.1	Die intravenöse Glucoseinjektion .....	35
2.1.2	Die intravenöse Dauerbelastung mit Glucose (GDB).....	37
<b>2.3</b>	<b>Tolbutamid induzierte Hyperinsulinämie .....</b>	<b>37</b>
2.3.1	Zur Wirkung von Tolbutamid auf den Insulinspiegel im Blut.....	38
2.3.2	Zur Wirkung von Tolbutamid auf den Blutglucosespiegel.....	38
2.3.3	Zur Wirkung von Tolbutamid auf den Glucagonspiegel im Blut .....	39

2.3.4	Zur Wirkung von Tolbutamid auf die Skelettmuskulatur .....	40
2.3.5	Zur Wirkung von Tolbutamid auf den Fettstoffwechsel.....	40
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>42</b>
<b>1.</b>	<b>Tierhaltung .....</b>	<b>42</b>
<b>2.</b>	<b>Versuchsablauf.....</b>	<b>44</b>
2.1	Maßnahmen für eine variable metabolische Belastung der Versuchstiere .....	44
2.2	Maßnahmen zur Erstellung eines Tagesprofils der Konzentrationen von Blutparametern.....	45
2.3	Durchführung des intravenösen Glucosetoleranztests (GTT).....	46
2.4	Durchführung der intravenösen Glucosedauerbelastung (GDB) .....	47
2.5	Durchführung der intravenösen Tolbutamidinjektion (T) .....	47
<b>3.</b>	<b>Technik der Blutentnahme und Aufbereitung der Blutproben .....</b>	<b>48</b>
<b>4.</b>	<b>Herstellung der verwendeten Injektionslösungen.....</b>	<b>49</b>
<b>5.</b>	<b>Laboranalytische Bestimmung der Metabolite .....</b>	<b>50</b>
5.1	Glucose.....	50
5.2	Freie Fettsäuren.....	50
5.3	β-Hydroxybutyrat.....	51
5.4	Harnsäure .....	51
<b>6.</b>	<b>Laboranalytische Bestimmung der Hormone .....</b>	<b>51</b>
<b>6.1</b>	<b>Insulin.....</b>	<b>51</b>
6.1.1	Testvalidierung.....	52
6.1.2	Testdurchführung .....	53
<b>6.2</b>	<b>Glucagon .....</b>	<b>53</b>
6.2.1	Testvalidierung.....	53
6.2.2	Testdurchführung .....	54
<b>7.</b>	<b>Statistik und weitere Berechnungen.....</b>	<b>54</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>



<b>1.</b>	<b>Körpergewichtsveränderungen der Versuchstiere bei den Stoffwechselbedingungen „hungernd“ und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ .....</b>	<b>56</b>
<b>2.</b>	<b>Mittlere tageszeitliche Konzentration (Tagesprofil) von Metaboliten und Hormonen bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ und „hungernd“ .....</b>	<b>57</b>
2.1	Glucose-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H) .....	58
2.2	Freie Fettsäuren-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H) .....	58
2.3	$\beta$ -Hydroxybutyrat-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H) .....	58
2.4	Harnsäure-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H) .....	59
2.5	Insulin-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H) .....	61
2.6	Glucagon-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H) .....	61
<b>3.</b>	<b>Mittlere tageszeitliche Konzentration (=Tagesprofil) von Metaboliten und Hormonen bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP).....</b>	<b>62</b>
3.1	Glucose-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) .....	62
3.2	Freie Fettsäuren-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) .....	63
3.3	$\beta$ -Hydroxybutyrat-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) .....	63
3.4	Harnsäure-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) .....	63
3.5	Insulin-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) .....	65
3.6	Glucagon-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) .....	65
<b>4.</b>	<b>Vergleich der Tagesprofile von Metaboliten und Hormonen bei den drei Versuchsbedingungen („nüchtern“, „hungernd“, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ .....</b>	<b>66</b>
4.1	Glucose-Tagesprofile .....	66
4.2	Freie Fettsäuren-Tagesprofil .....	67

4.3	$\beta$ -Hydroxybutyrat-Tagesprofil .....	68
4.4	Harnsäure-Tagesprofil .....	69
4.5	Insulin-Tagesprofil.....	70
4.6	Glucagon-Tagesprofil .....	71
<b>5.</b>	<b>Metabolit- und Hormonkonzentrationsverlauf nach i.v. Glucose- oder Kochsalz-Kurzzeitapplikationen bei den gegebenen Versuchsbedingungen „nüchtern“, „hungernd“ sowie „hungernd und unter Phlorizineinfluss“.....</b>	<b>72</b>
<b>5.1</b>	<b>i.v. Glucose-Injektion (GTT) versus i.v. NaCl-Injektion (Kontrolle K) bei „nüchternen“ Tieren.....</b>	<b>73</b>
5.1.1	Mittlerer Glucosekonzentrationsverlauf nach dem GTTN .....	73
5.1.2	Mittlerer Freie Fettsäuren-Konzentrationsverlauf nach dem GTTN .....	73
5.1.3	Mittlerer $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentrationsverlauf nach dem GTTN .....	74
5.1.4	Mittlerer Harnsäure-Konzentrationsverlauf nach dem GTTN.....	74
5.1.5	Mittlerer Insulin-Konzentrationsverlauf nach dem GTTN .....	75
5.1.6	Mittlerer Glucagon-Konzentrationsverlauf nach dem GTTN.....	76
<b>5.2</b>	<b>i.v. Glucose-Injektion (GTT) versus i.v. NaCl-Injektion (Kontrolle K) bei „hungernden“ Tieren.....</b>	<b>77</b>
5.2.1	Mittlerer Glucosekonzentrationsverlauf nach dem GTTH .....	77
5.2.2	Mittlerer Freie Fettsäuren-Konzentrationsverlauf im GTTH.....	77
5.2.3	Mittlerer $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentrationsverlauf nach dem GTTH .....	78
5.2.4	Mittlerer Harnsäurekonzentrationsverlauf nach dem GTTH.....	78
5.2.5	Mittlerer Insulinkonzentrationsverlauf nach dem GTTH .....	79
5.2.6	Mittlerer Glucagonkonzentrationsverlauf nach dem GTTH.....	80
<b>5.3</b>	<b>i.v. Glucose-Injektion (GTT) versus i.v. NaCl-Injektion (Kontrolle K) bei „hungernden“ Tieren „und unter Phlorizineinfluss“ (HP).....</b>	<b>81</b>
5.3.1	Mittlerer Glucosekonzentrationsverlauf nach dem GTTHP .....	81
5.3.2	Mittlerer Freie Fettsäuren-Konzentrationsverlauf nach dem GTTHP .....	81
5.3.3	Mittlerer $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentrationsverlauf nach dem GTTHP .....	82
5.3.4	Mittlerer Harnsäurekonzentrationsverlauf nach dem GTTHP.....	82
5.3.5	Mittlerer Insulinkonzentrationsverlauf nach dem GTTHP .....	83

5.3.6	Mittlerer Glucagonkonzentrationsverlauf nach dem GTTHP.....	84
<b>6.</b>	<b>Metabolit- und Hormonkonzentrationsverlauf nach i.v. Glucose-Dauer(2h)-oder NaCl-Applikation bei der Versuchsbedingung „nüchtern (GDBN).....</b>	<b>84</b>
6.1	Mittlerer Glucosekonzentrationsverlauf im GDBN .....	84
6.2	Mittlerer Freie Fettsäuren-Konzentrationsverlauf im GDBN .....	85
6.3	Mittlerer $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentrationsverlauf im GDBN .....	86
6.4	Mittlerer Harnsäurekonzentrationsverlauf im GDBN.....	86
6.5	Mittlerer Insulinkonzentrationsverlauf im GDBN .....	87
6.6	Mittlerer Glucagonkonzentrationsverlauf im GDBN .....	88
<b>7.</b>	<b>Vergleich der Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen nach einer i.v. Glucose-Kurzzeitbelastung (GTT) jeweils bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H), „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) sowie „nüchtern und mit Glucose i.v. vorbelastet“ (GDBN).....</b>	<b>89</b>
7.1	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose.....	89
7.2	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren.....	90
7.3	Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ -Hydroxybutyrat.....	91
7.4	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure .....	93
7.5	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin.....	94
7.6	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon .....	96
<b>8.</b>	<b>Konzentrationsverlauf von Metaboliten und Hormonen nach i.v. Tolbutamid- oder Kochsalz-Applikation bei „nüchternen“ (N) und „hungernden“ (H) Tieren .....</b>	<b>98</b>
<b>8.1</b>	<b>i.v. Tolbutamid (T)- versus i.v.-Kochsalz (K)-Injektion bei „nüchternen“ Tieren (N).....</b>	<b>98</b>
8.1.1	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose.....	98
8.1.2	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren.....	98
8.1.3	Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ -Hydroxybutyrat.....	99
8.1.4	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure .....	99
8.1.5	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin.....	100
8.1.6	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon .....	101

<b>8.2</b>	<b>i.v. Tolbutamid (T)- versus i.v.-Kochsalz (K)-Injektion bei „hungernden“ Tieren (H).....</b>	<b>102</b>
8.2.1	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose.....	102
8.2.2	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren.....	102
8.2.3	Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ HB .....	103
8.2.4	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure .....	103
8.2.5	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin.....	104
8.2.6	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon .....	105
<b>9.</b>	<b>Vergleich der Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen nach einer i.v. Tolbutamid-Injektion bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (TN) bzw. „hungernd“ (TH) .....</b>	<b>106</b>
9.1	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose.....	106
9.2	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren.....	107
9.3	Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ -Hydroxybutyrat.....	108
9.4	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure .....	109
9.5	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin.....	110
9.6	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon .....	111
<b>10.</b>	<b>Vergleich der Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen nach einer i.v. Glucose-Kurzzeitinjektion (GTT) bzw. einer i.v. Tolbutamid-Injektion (T) bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H) .....</b>	<b>112</b>
<b>10.1</b>	<b>Versuchsbedingung „nüchtern“ .....</b>	<b>113</b>
10.1.1	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose und Insulin .....	113
10.1.2	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon .....	115
10.1.3	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren.....	116
10.1.4	Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ -Hydroxybutyrat.....	117
10.1.5	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure .....	118
<b>10.2</b>	<b>Versuchsbedingung „hungernd“ .....</b>	<b>119</b>
10.2.1	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose und Insulin .....	119
10.2.2	Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon .....	121
10.2.3	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren.....	122

10.2.4	Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ -Hydroxybutyrat.....	123
10.2.5	Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure .....	124
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>126</b>
<b>1.</b>	<b>Versuchstechnische Anmerkungen .....</b>	<b>126</b>
1.1	Der Blutentnahmestress .....	126
1.2	Sonstiger Stress .....	128
1.3	Verhaltensanomalien und Tierverluste .....	128
<b>2.</b>	<b>Tageszeitliche Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen bei verschiedenen katabolen Stoffwechselsituationen .....</b>	<b>129</b>
2.1	Nüchterne und mehrtägig hungernde Hennen .....	129
2.2	Tageszeitliche Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen bei mit Phlorizin behandelten mehrtägig hungernden Hennen .....	136
<b>3.</b>	<b>Zum Einfluss einer intravenösen Glucoseinjektion (GTT) auf den Konzentrationsverlauf von Metaboliten und Hormonen bei den Stoffwechselbedingungen „nüchtern“, „hungernd“ und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ sowie bei mit Glucosemehrfachinjektionen vorbehandelten nüchternen Tieren .....</b>	<b>141</b>
<b>4.</b>	<b>Zum Einfluss von Tolbutamid auf die Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen bei den Stoffwechselbedingungen „nüchtern“ und „hungernd“ .....</b>	<b>152</b>
<b>5.</b>	<b>Überlegungen zu den Besonderheiten des Glucose- bzw. Energiestoffwechsels beim Vogel aufgrund der gewonnen Erkenntnisse .....</b>	<b>160</b>
<b>6.</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>167</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>169</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>172</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>175</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>191</b>
<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung aller in dieser Untersuchung erhobenen absoluten Werte sowie der Ergebnisse der statistischen Auswertungen .....</b>	<b>191</b>
<b>2.</b>	<b>Darstellung der mittleren Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen nach i.v.-NaCl-Injektion (K) unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H) und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP).....</b>	<b>209</b>
<b>X.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>211</b>

### I. EINLEITUNG

Hungerphasen, wie auch Phasen des Nahrungsüberflusses, sind durchaus Normalsituationen im Laufe eines tierischen Lebens eingebunden in den Jahreskreislauf in der Natur: sei es der Hirsch in der Brunstzeit, die säugende Bärin während der Winterruhe, Gans und Ganter während der Brutzeit, oder schlicht wegen Nahrungsknappheit im Winter. Das heißt, der tierische Organismus muss in der Lage sein, relativ spontan und auch in gewisser Weise anhaltend sich von Überfluss auf Mangel und umgekehrt einzustellen. Gerade die Klasse der Vögel bringt auf diesem Gebiet große Leistungen. Balzzeit, Brutzeit und lange Flugrouten mit eingeschränkter, unzureichender oder fehlender Nahrungsaufnahme verlangen reichlich Anpassungsvermögen.

Das Huhn als ortstreuer Bodenbewohner ist sicherlich in seinem Stoffwechsel nicht mit den Zugvögeln zu vergleichen. Dennoch ist es gerade bei einem Nutztier, das sich Haltungsbedingt während seines Lebens nicht mit echten Hungerphasen auseinander setzen muss, interessant, die Anpassung des Stoffwechsels und seiner hormonalen Regulation an experimentell induziertem Nahrungsentzug zu untersuchen.

Hungerversuche wurden von verschiedenen Autoren beim Huhn durchgeführt und auch publiziert. Allerdings steht man gerade bei diesem Versuchstier vor dem Problem, dass es in der Literatur hinsichtlich Alter, Rasse und Geschlecht kaum einheitliche Ergebnisse gibt. Häufig wurden subadulte Tiere oder Küken verwendet, die in ihrem Stoffwechsel noch nicht ausgereift sind. So können Ergebnisse nur schwer verglichen werden. Zudem sind die heute gängigen Hühnerrassen durch einseitige Zucht auf Mast- oder Legeleistung in ihrem Stoffwechsel weit voneinander entfernt. Gerade bei Hungerversuchen macht es einen deutlichen Unterschied, ob man einen auf Ansatz von Körpermasse, tendenziell adipösen, oder einen leistungsbedingt auf Nährstoffabgabe (Ei) gezüchteten, eher kachektischen Organismus betrachtet.

Die in den vorliegenden Versuchen verwendeten jungen, adulten Hennen einer Legerasse, die noch nicht in der Legephase sind, befinden sich in einer vergleichsweise stabilen Stoffwechsellage: die Tiere sind nicht mehr im Wachstum, sie sind nicht übergewichtig und sie werden noch nicht durch die züchterisch determinierte hohe Legeleistung metabolisch gefordert. In dieser Situation lassen sich möglichst neutrale Werte zum Grundstoffwechsel des Huhns ermitteln.

Als Grundgerüst für die Untersuchungen werden Tagesprofile der gewünschten Parameter erstellt. Zu diesem Thema gibt es wenig bis gar keine Literatur mit dem Versuchstier

Huhn. Es gibt Versuche mit Singvögeln oder Zugvögeln, diese enthalten oft aber nur wenig Parameter, da man bei diesen Rassen aufgrund der Körpergröße in der Blutprobenmenge begrenzt ist. Dieses Problem hat man bei adulten Hühnern nicht, ein weiterer Grund für die Verwendung dieser Rasse. Gerade das Zusammenspiel von Hormonen, Blutzucker, Fett- und Eiweißstoffwechsel, wie es hier untersucht wird, wurde auf diese Weise bisher noch nicht präsentiert.

Aber nicht nur das Hungern allein, sondern auch die Reaktion des Organismus auf eine intravenöse Zuckergabe nach der Hungerphase ist Bestandteil unserer Untersuchungen. Im Rahmen eines Glucosetoleranztestes können hier die Auswirkungen auf Hormonhaushalt und Veränderungen von Blutparametern untersucht werden.

Eine Verstärkung der Mangelsituation wird durch eine medikamentell induzierte Glucosurie herbeigeführt. Auch unter dieser Bedingung wird erstmals der Verlauf der Blutparameter über den Tag betrachtet und der Einfluss einer Glucoseinjektion getestet.

Zuletzt werden die Veränderungen im Blut untersucht, die durch eine endogene Insulinausschüttung ohne eine Erhöhung des Blutzuckers verursacht werden. Auch dabei wird auf die Unterschiede durch die einzelnen Mangelzustände eingegangen.

So soll ein Überblick gewonnen werden über die Veränderungen im Stoffwechsel, die durch Energiemangel ausgelöst werden. Zudem soll durch die Verwendung von standardisiertem Tiermaterial eine Vergleichsbasis für andere Versuche dieser Art geschaffen werden.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Physiologische Gegebenheiten beim Huhn**

#### **1.1 Das Huhn als Versuchstier: Verhalten, Nahrungsaufnahme und Stalleinrichtung**

Das Huhn gehört zur Familie der Galliformes (=Hühnervögel) der Klasse Aves.

Es ist ein Bodenbewohner (Storch 2004).

Aufgrund seiner guten Verfügbarkeit, unkomplizierten Haltung und stabilen Gesundheit wird es gern als Versuchstier verwendet. Zudem gibt es mehrere einfache Möglichkeiten der Blutentnahme beim Huhn und es lässt sich eine Blutmenge von bis zu 10 % des Blutvolumens an einem Tag gefahrlos entnehmen (Ausschuss für Tierschutzbeauftragte 2009) .

Zum Verhaltensrepertoire des Haushuhns gehören neben Scharren und Futtersuchen auch Staubbaden sowie Flügelschlagen. Das Stehen, Sitzen, Ruhen und die Gefiederpflege werden bevorzugt auf einer erhöhten Standfläche ausgeführt. Zudem ist der Sozialkontakt zu anderen Tieren wichtig. Folglich muss zur artgemäßen Haltung von Hühnern eine ausreichend große Standfläche mit Einstreu, ein Sandbad und eine erhöhte Sitzstange angeboten werden. Die Tiere sollten mindestens zu zweit aufgestellt werden (Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V. 1997).

Durch geeignete Einstreu wie langstieliges Stroh kann das Erkundungs- und Pickbedürfnis der Hühner befriedigt werden und so aggressivem Verhalten gegenüber anderen Tieren vorgebeugt werden (Lohmann Tierzucht GmbH 2008).

Bei der Aufzucht von Junghennen wird empfohlen, ca. 2 Wochen vor Beginn der Legereife zusätzlich Legehennenfutter unterzumischen, um frühreife Hühner mit den nötigen Mineralstoffen für die Eischalenproduktion zu versorgen, sowie spätreife Tiere optimal mit Nährstoffen zu versorgen (Lohmann Tierzucht GmbH 2008). Wasser wird bevorzugt aus offenen Wasserbehältern aufgenommen (Verein Beratung artgerechter Tierhaltung e.V. 2003).

Die Nahrungsaufnahme erfolgt hauptsächlich morgens sowie am frühen und am späten Nachmittag. Mittags ruhen die Tiere oder sind mit Gefiederpflege und Staubbaden beschäftigt (Verein Beratung artgerechter Tierhaltung e.V. 2003).



### 1.2 Merkmale des Glucosestoffwechsels

Die Energieträger Kohlenhydrate werden beim Vogel zu 98 % als freie, gelöste Zucker im Blut aktiv transportiert. D-Glucose ist die häufigste Form, nur bis zu 2 % werden als D-Fructose transportiert, weniger als 0,6 % als D-Galaktose. Glukose wird im aeroben Stoffwechsel (Glykolyse) zu Pyruvat umgebaut, während unter anaeroben Bedingungen Laktat entsteht (Prinzinger and Misovic 1994).

Blutzuckerspiegel beim Vogel sind 2- bis 3-mal höher als beim Säugetier (Prinzinger and Misovic 1994). Auch Vögel, die vergleichsweise wenig Kohlehydrate aufnehmen (reine Karnivore), halten diesen hohen Blutzuckerspiegel aufrecht (Stevens 1996).

Spitzenwerte erreichen unter anderem Nektarvögel: 17 mmol/l Nüchternblutzucker und bis zu 42 mmol/l nach der Futteraufnahme (Beuchat and Chong 1998).

Dabei scheint die Höhe des Blutzuckerspiegels vor allem vom Energiebedarf bestimmt zu sein, der wiederum abhängig ist von der Fortbewegungsart, der Jahres- bzw. Tageszeit und dem Nährstoffangebot. So haben Flugvögel mit  $12,4 \pm 1,4$  mmol/l einen höheren Blutzuckerspiegel als Laufvögel mit  $10,7 \pm 1,2$  mmol/l. Der Blutzuckerspiegel wird durch die Flugtätigkeit in Abhängigkeit vom Trainingszustand der Tiere kaum beeinflusst. Tauben können etwa eine Stunde fliegen, ohne dass der Blutzuckerspiegel sinkt. Reicht bei längerer körperlicher Anstrengung die Blutglucose nicht aus, stellt der Körper auf die Verarbeitung von Freien Fettsäuren um (Prinzinger and Misovic 1994).

#### 1.2.1 Zellulärer Glucosetransport

Eine wichtige Rolle im Glucosemetabolismus spielt die Aufnahme von Glucose mittels Transportsystemen in die verschiedenen Gewebe. Die sogenannten GLUT (=Glucosetransporter) sind Transportproteine, die die passive Diffusion von Glucose durch die Plasmamembran unterstützen. Es gibt verschiedene Isoformen dieser Transporter, die in den einzelnen Geweben unterschiedlich verteilt sind (Kono, Nishida et al. 2005).

Bei Hühnern findet sich GLUT1 in allen untersuchten Geweben (Skelettmuskel, Leber, Herz, Niere und Hoden), erreicht aber besonders hohe Konzentrationen in Gehirn und Fettgewebe. Er scheint damit wie beim Säuger der Haupttransporter zu sein. GLUT2 ist nur in Leber und Niere vorhanden, GLUT3 überwiegend im Gehirn. GLUT8 ist in allen untersuchten Geweben zu finden, vor allem in Niere und Fettgewebe. Insgesamt sind die GLUT im Skelettmuskel nur wenig vertreten. Der GLUT4, der beim Säugetier als der Insulin-responsive Transporter beschrieben wird, wurde bisher beim Huhn noch nicht nachgewiesen (Kono, Nishida et al. 2005).

Allerdings erhöht eine Insulingabe die Aufnahme von D-Xylose (Gibson, Bourne et al. 1980) bzw. 2-Deoxyglucose (Tokushima, Takahashi et al. 2005; Zhao, Lin et al. 2009) in den isolierten Skelettmuskel von Hühnern, demnach muss ein Insulinempfindlicher Transportmechanismus existieren.

Im Gegensatz dazu stehen die  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glucosetransporter (SGLT), die die Glucose entgegen der Glucosekonzentration aktiv transportieren. Antrieb für den Transport ist ein  $\text{Na}^+$ -Konzentrationsgradient, der durch eine ATP-abhängige Na-K-Pumpe erzeugt wird (Zhao and Keating 2007). Diese Transporter finden sich beim Huhn überwiegend in der Darmschleimhaut (Ferrer, Gil et al. 1994) und in der Niere (Sutterlin and Laverty 1998) sowie im Gehirn (Gibbs, Hutchinson et al. 2008).

### 1.2.2 Gluconeogenese

Die Gluconeogenese findet beim Huhn in der Leber und in der Niere statt (Stevens 1996). Dabei wird Glucose aus geeigneten Vorstufen synthetisiert. Dazu zählen Endstufen der Glykolyse, wie z. B. Pyruvat und Laktat, aber auch Zwischenstufen wie z.B. Glycerol sowie glucoplastische Aminosäuren wie z.B. Alanin. Laktat und Alanin sind dabei die am meisten genutzten Substrate in der Leber. Viele Enzyme der Gluconeogenese sind identisch mit den Enzymen der Glykolyse. Vier spezielle Enzyme katalysieren jedoch nur Schritte der Gluconeogenese: die Pyruvat-Carboxylase, die Phosphoenol-Pyruvat-Carboxykinase (=PEPCK), die Fructose-1-6-Bisphosphatase und die Glucose-6-Phosphatase. Diese Enzyme stellen wichtige Kontrollpunkte dar und sind Angriffspunkte von Hormonen (Stevens 1996).

In der Niere gibt es zwei Isoformen der PEPCK: eine im Cytosol und eine im Mitochondrium. Die Leber besitzt nur die mitochondriale Isoform. Diese verstoffwechselt hauptsächlich Laktat, das zum Beispiel beim anaeroben Muskelstoffwechsel anfällt. Die cytosolische Form in der Niere dagegen passt sich insbesondere an Nährstoffbedingte Veränderungen an und benutzt Pyruvat und Aminosäuren als Ausgangssubstanzen für Glucose (Stevens 1996)

### 1.2.3 Glycolyse

Für den Abbau von Glucose gibt es zwei verschiedene Wege: die Glykolyse und den Pentosephosphatweg.

Dabei entstehen neben Energie in Form von ATP auch wichtige Zwischenprodukte für die Biosynthese von beispielsweise Steroiden, Fettsäuren oder Nukleinsäuren (Stevens 1996).

Bei dem Pentosephosphatweg im Cytosol werden aus Glucose-6-Phosphat durch Dehydrierung und Decarboxylierung am C-Atom Pentosephosphate gebildet, die unter anderem für die Nucleotidbiosynthese genutzt werden können.

Bei der Glykolyse entsteht unter aeroben Bedingungen Pyruvat, unter anaeroben Bedingungen Laktat (Löffler 2007).

Die beiden Geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der Glykolyse sind 6-Phosphofruktokinase (= PFK1) und Pyruvat-Kinase. Sie dienen als Kontrollpunkte (Stevens 1996).

Beim Mensch gibt es zwei verschiedene PFK: eine Isoform in der Muskulatur (PFK-M) und eine in Leber, Niere und Gehirn (PFK-L). Beim Vogel stimmen die Aminosäuresequenzen der PFK zu über 80 % mit den humanen Sequenzen überein, jedoch ist die Verteilung der Isoformen anders. Die PFK-L findet sich beim Vogel ebenso wie die PFK-M im Muskel und zusätzlich im Gehirn, während in der Leber, anders als beim Säuger, nur geringe Mengen nachweisbar sind. Die PFK-M wird beim Säuger in einem Gewebe exprimiert, das seine Energie überwiegend aus Glykolyse bezieht. Die PFK-L findet man stattdessen in Gewebe, die Glucose über aktive Gluconeogenese generieren. Beim Vogel scheinen die Aufgaben der beiden Isoformen demnach anders verteilt zu sein. Die PFK-M lässt sich, wie beim Säuger, durch Insulin nicht beeinflussen. Dagegen steigt im Brustmuskel der Hühner die PFK-L um ein Vielfaches an nach Insulingabe (Seki, Sato et al. 2006).

Da die Glykogen-Synthetase-Aktivität nach Insulingaben unverändert bleibt, kann man folgern, dass Insulin im Muskel eher zur Glykolyse als zur Glycogensynthese führt. Allerdings ist beim Huhn, anders als beim Säuger, die PFK-L das beeinflussbare Enzym im Muskel (Seki, Sato et al. 2006).

### **1.2.4 Glykogensynthese**

Ist Glucose im Überschuss vorhanden, kann sie mittels der Glykogen-Synthetase in Glykogen umgewandelt und gespeichert werden.

Dabei aktivieren hohe Plasmagluconspiegel sowie Insulin die membrangebundene Glukokinase in der Leber, die Glucose zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert und damit als Schlüsselmetabolit für nachgeschaltete Stoffwechselprozesse zur Verfügung stellt (Stangassinger 2010). Wichtige Glykogenspeicher beim Huhn sind in der Leber, der Niere und im Skelettmuskel. Während das Glykogen in der Muskulatur überwiegend zur

Energiegewinnung vor Ort genutzt wird, wird aus den Glykogenspeichern von Leber und Niere in einer Glucose-Mangelsituation Glucose ins Blut abgegeben (Stevens 1996).

### 1.2.5 Kontrolle der Glucose-Stoffwechselwege

Ob der anabole oder der katabole Stoffwechselweg eingeschlagen wird, wird auf zellulärer Ebene unter anderem auch durch das Vorhandensein oder Fehlen von Reaktionsprodukten gesteuert: Viel ATP hemmt die Glycolyse, während reichlich AMP einen stimulierenden Einfluss hat (Stevens 1996).

Im Wesentlichen sind es aber Hormone und das vegetative Nervensystem, die insbesondere auch systemisch, also auf Ebene von Organen oder des Gesamtorganismus, auf den Glucosestoffwechsel Einfluss nehmen.

Eine **Insulininjektion** (sowohl heterologes Säugetierinsulin als auch homologes Hühnerinsulin) führt auch beim Huhn zu einem Abfall der Blutzuckerkonzentration. Trotz des hohen Blutzuckerspiegels beim Vogel werden je nach Dosis zum Teil sogar nicht mehr messbare Werte erreicht (Rager, Schauder et al. 1969; Neubert and Gurtler 1996; Akiba, Chida et al. 1999; Chida, Ohtsu et al. 2000).

Die Senkung des Blutzuckerspiegels mittels Insulin erfolgt durch verschiedene Mechanismen, die zum einen die Aufnahme von Glucose in die Gewebe und zum anderen die Verstoffwechselung der Glucose in den Organen beinhalten. So steigert Insulin die Aufnahme von Glucose in Adipozyten (Gomez-Capilla and Langslow 1977) und die Glucoseoxidation in Hepatozyten, Adipozyten und Muskelzellen (Vives, Sancho et al. 1981).

Leber, Herzmuskel, isolierte Adipozyten und Skelettmuskel von Hühnern nehmen Glucose bei über Normalwerte erhöhtem BLZ aber auch unabhängig von Insulin durch die GLUT mittels passiver Diffusion auf (Kono, Nishida et al. 2005) und bauen die Kohlenstoffatome in Triglyceride ein. Die Leber nimmt dabei insulinunabhängig am meisten Zucker auf, gefolgt von den Fettzellen, der Skelettmuskulatur und dem Herz (Vives, Sancho et al. 1981).

Eine **Glucagoninjektion** führt dagegen zu einem Anstieg des BLZ (Rager, Schauder et al. 1969; Hazelwood 1973; Freeman and Manning 1974; Neubert and Gurtler 1996) durch den Abbau von Glucosespeichern in Leber und Niere und durch die Neusynthese von Glucose. So stimuliert Glucagon in der Leber die Glycogenolyse und die Abgabe von freier Glucose ins Blut (Cramb, Langslow et al. 1982 b). Durch Hemmung der Phosphofruktokinase wird

die Glycolyse gestoppt und stattdessen die Gluconeogenese in der Leber stimuliert und so Glucose neu synthetisiert (Fister, Eigenbrodt et al. 1983).

Die **Hormone der Nebenniere** nehmen ebenfalls Einfluss auf den Glucosestoffwechsel. Sowohl die Gabe von Adrenalin als auch von Noradrenalin führt zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels beim Huhn (Neubert and Gurtler 1996), überwiegend durch einen gesteigerten Glykogenabbau in der Leber (Cramb, Langslow et al. 1982 b).

Ein weiteres Hormon der Nebenniere, Corticosteron, beeinflusst maßgeblich den Glucosestoffwechsel durch Wirkung auf die pankreatischen Hormone, die Leber und den Eiweißstoffwechsel im Sinne einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels und einer Energiebereitstellung aus Proteinspeichern (Simon 1984). So mindert eine chronische Corticosterongabe bei Hühnern die Anzahl von Insulinrezeptoren und deren Kinase-Aktivität in der Leber und führt so zu einer gewissen Insulinresistenz des Organs (Taouis, Derouet et al. 1993).

Das vegetative Nervensystem übt ebenfalls einen maßgeblichen Einfluss auf den Glucosestoffwechsel aus. Sympathische Fasern stimulieren die Glucoseabgabe aus der Leber, indem sowohl die Glykogenphosphorylase als auch die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) aktiviert werden. Dagegen fördern parasympathische Fasern die Glykogensynthese durch Aktivierung der Glykogensynthase und die Inaktivierung der PEPCK (Stangassinger 2010).

### **1.3 Merkmale des Fettstoffwechsels**

#### **1.3.1 Freie Fettsäuren im Blut**

Als Freie oder unveresterte Fettsäuren bezeichnet man Fettsäuren, die durch Hydrolyse von Triglyceriden (=mittel- bis langkettige Fettsäuren, verestert mit Glycerin) abgespalten und ins Blut abgegeben werden (Wiesner and Ribbeck 2000) .

Das Huhn hat einen höheren Prozentsatz an mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Körper als Säugetiere. Das Verhältnis von gesättigten zu einfach ungesättigten zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren beträgt beim Huhn typischerweise 0,31 : 0,45 : 0,23 (Yau, Denton et al. 1991)

Die Leber wird als das wichtigste Organ für die de novo Lipidsynthese beim Huhn angesehen, während dem Fettgewebe überwiegend eine Speicherfunktion zugesprochen wird (Vives, Sancho et al. 1981; Stevens 1996). Auch die Muskulatur ist zur Synthese von FFS nach Insulinstimulation fähig (Gomez-Capilla, Sancho et al. 1980).

Wird nun Fett als Energielieferant benötigt, erfolgt die Lipolyse in Leber und Fettgewebe. Freie Fettsäuren werden ins Blut abgegeben und an Albumin gebunden oder als VLDL (=very low density lipoproteins) in die peripheren Gewebe transportiert (Stevens 1996).

### **1.3.1.1 Einfluss von Futteraufnahme und Hungern**

Hungern führt zu einer Reduktion der Fettsäuresynthese, während Nahrungsaufnahme zu einem Anstieg führt. Das heißt, bei hohem Nährstoffangebot werden Fettdepots angelegt, während bei niedrigem Nahrungsangebot Fettspeicher mobilisiert werden (Stevens 1996).

Etwa 20 Minuten nach der Futteraufnahme bei Hühnern sinkt der Spiegel der FFS und steigt nach 50 Minuten (Buyse, Janssens et al. 2002) bzw. 8 bis 12 Stunden (de Beer, McMurtry et al. 2008) wieder auf Normalwerte an. Ebenso fällt nach einer oralen Glucosegabe (2 g/kg) der Spiegel der FFS bis eine Stunde nach der Gabe kontinuierlich ab und erreicht erst nach 90 Minuten wieder Ausgangswerte (Rideau, Karmann et al. 1990). Wird die Glucose intracardial verabreicht, fällt der Spiegel der FFS ebenfalls auf ein Minimum 30 Minuten nach der Injektion (Langslow, Butler et al. 1970).

Ob sich der Körper in einer anabolen oder einer katabolen Stoffwechsellage befindet, ist an dem Spiegel der FFS im Blut zu sehen.

Bei vermehrtem Fettabbau (Lipolyse) beobachtet man einen Anstieg, bei vermehrtem Fettaufbau (Lipogenese) einen Abfall der FFS im Blut. Zudem nehmen die peripheren Gewebe die FFS als Energiequelle auf, so dass ab einem bestimmten Pegel ein Gleichgewicht zwischen FFS-Bereitstellung und zellulärer Aufnahme in einer Mangelsituation herrscht (Buyse, Janssens et al. 2002). Dies ist daran erkennbar, dass in einer Hungersituation der Spiegel der FFS initial zwar ansteigt, sich aber nicht weiter erhöht, auch wenn der Nahrungsmangel über die Zeit aufrechterhalten wird. So findet sich sowohl nach 12 Stunden (van der Wal, Reimert et al. 1999), 16 Stunden (Lepkovsky, Dimick et al. 1967; Geraert, Padilha et al. 1996) bzw. 24 Stunden Futterentzug (Freeman, Manning et al. 1983; Serr, Suh et al. 2009) ein ca. doppelt so hoher, aber weitgehend stabiler Spiegel der FFS.

### **1.3.1.2 Einfluss von Hormonen**

Verschiedene Hormone beeinflussen den Fettsäurestoffwechsel in der Leber: die Schilddrüsenhormone und das Wachstumshormon (Cogburn, Liou et al. 1989) fördern die Fettsäuresynthese; Glucocorticoide, Glucagon und Adrenalin (Freeman and Manning 1974) hemmen sie bzw. bewirken eine Freisetzung von FFS ins Blut.

Glucagon wirkt lipolytisch (Langslow, Butler et al. 1970) und hemmt die Fettsäuresynthese: das Hormon führt über cAMP als second messenger u.a. zur Hemmung der Phosphofruktokinase. Dadurch wird die Glycolyse reduziert, was zu einem Abfall von Pyruvat und Citrat führt. Citrat wirkt aber als Aktivator der Acetyl-CoA-Carboxylase, dem wichtigsten Enzym der Fettsäuresynthese. Eine Verminderung der Konzentration von Citrat bewirkt demnach eine reduzierte Aktivität dieser Carboxylase und dadurch der Fettsäuresynthese insgesamt (Stevens 1996).

Die Wirkung von Insulin im Fettstoffwechsel ist noch nicht restlos geklärt (siehe Abschnitt II 1.5.1 Insulin).

Allgemein wird Insulin eine lipogenetische und damit FFS-senkende Wirkung zugesprochen (Stevens 1996).

Dennoch sieht man einen Anstieg der FFS nach einer Insulininjektion, der vermutlich auf eine dem Insulin nachfolgende sekundäre Glucagonausschüttung zurückgeführt werden kann (Heald, McLachlan et al. 1965; Lepkovsky, Dimick et al. 1967; Langslow, Butler et al. 1970; Chida, Ohtsu et al. 2000; Niezgoda, Bobek et al. 2005). Für diese Vorstellung spricht, dass der Anstieg nach einer Insulininjektion verglichen mit dem Anstieg nach einer Glucagoninjektion deutlich verzögert abläuft (Heald, McLachlan et al. 1965).

Im Gegensatz hierzu zeigt eine Arbeit an Hühnern, in der die Gabe von homologen Hühnerinsulin sowie von Rinderinsulin erfolgte, den vom Säugetier her bekannten Abfall des Spiegels der FFS (Rager, Schauder et al. 1969).

### 1.3.2 $\beta$ -Hydroxybutyrat im Blut

Ketonkörper,  $\beta$ -Hydroxybutyrat und Acetoacetat, sind Metabolite des Fettsäurestoffwechsels, die insbesondere in zellulären Glucosemangelsituationen (z.B. Hunger, Diabetes) auch quantitativ an Bedeutung erlangen (Fuhrmann and Sallmann 2010).

Hauptort der Ketogenese ist die Leber. Dort wird das  $\beta$ -Oxidationsprodukt der FFS, Acetyl-CoA, von verschiedenen Enzymen zur Synthese der Ketonkörper benutzt. Das Endprodukt Acetoacetat kann in einer  $\text{NADH} + \text{H}^+$ -abhängigen Reaktion mittels der  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase zu dem im Blutplasma besser löslichen  $\beta$ HB reduziert werden (Stevens 1996).

In den peripheren Geweben können Ketonkörper durch die 3-Ketoacyl-CoA-Transferase in Acetoacetyl-CoA umgewandelt und durch nachfolgende Oxidation im Stoffwechsel genutzt werden. Die peripheren Gewebe zeigen eine unterschiedliche Präferenz für die

Nutzung von Ketonkörpern (Stevens 1996). Beim Huhn nutzen vor allem Gehirn (Nehlig 1983) und Niere Ketonkörper als Energiequelle, während Skelett- und Herzmuskulatur überwiegend die Oxidation von FFS zur Energiegewinnung heranziehen (Stevens 1996).

$\beta$ HB dient nicht nur der Energiegewinnung, sondern kann auch als Vorstufe für andere Endprodukte genutzt werden. Insbesondere die Leber und die Mucosa des Duodenums nutzen  $\beta$ -HB zur Lipidsynthese. Auch die Niere kann Lipide aus dem Ketonkörper bilden, allerdings nur etwa die Hälfte der Menge der anderen beiden Organe. Dabei werden in Leber und Niere überwiegend Triglyceride synthetisiert, während in der Darmschleimhaut vor allem Phospholipide und FFS gebildet werden (Caamano, Sanchez-del-Castillo et al. 1990).

Alle drei Gewebe sind zudem in der Lage, aus  $\beta$ HB ketogene Aminosäuren zu bilden, wobei Glutamat mit mehr als 50 % die häufigste Aminosäure ist (Caamano, Sanchez-del-Castillo et al. 1990)

Die Spiegel von  $\beta$ HB und Acetoacetat sind beim gefütterten Vogel höher als bei gefütterten monogastrischen Säugetieren (Emmanuel, Berzins et al. 1982).

### **1.3.2.1 Einfluss von Hungern bzw. einer exogenen Glucosezufuhr**

Ketonkörper gelten als Energiequelle insbesondere in Insulinmangelsituationen (z.B. Hungern, Diabetes).

Ähnlich wie beim Säuger steigt auch beim Huhn Acetoacetat während einer Hungersituation nicht markant an, während bei  $\beta$ HB ein deutlicher Konzentrationsanstieg im Blut zu beobachten ist (Belo, Romsos et al. 1976; Brady, Romsos et al. 1978; Le Maho, Vu Van Kha et al. 1981; Emmanuel, Berzins et al. 1982; Hamano 2007).

Ketonkörper sind nicht nur eine Energiequelle, sondern entfalten selbst eine „regulierende“ Wirkung am Muskel. So hemmen sie am Skelettmuskel die Proteinsynthese und den Aminosäureabbau im Hungerzustand. Es wird angenommen, dass Ketonkörper in einer Hungersituation durch ihren Einfluss auf den Proteinstoffwechsel im Muskel die Aminosäure-Versorgung von wichtigeren Organen wie Leber und Niere begünstigen (Wu and Thompson 1990).

Beim Menschen konnte nachgewiesen werden, dass bei zeitgleicher Blockade der Insulin- und Glucagonsekretion mittels Somatostatin-Infusion eine Erhöhung des BLZ einen hemmenden Effekt auf die Ketogenese hat, also unabhängig von den Hormonen wirkt. Dabei reduziert ein hoher BLZ sowohl die Ketogenesekapazität der Leber als auch die Lipolyse (Riou, Beylot et al. 1986).



Bei der Gartengrasmücke konnte gezeigt werden, dass eine orale Glucosegabe ebenfalls zu einem Abfall der  $\beta$ HB-Konzentration nach 10 Minuten führt, während die FFS-Konzentration unverändert bleibt (Totzke, Hubinger et al. 1999).

Pyruvat als Endprodukt des Glucoseabbaus hat eine hemmende Wirkung auf die Ketogenese beim Huhn (Ogata, Watford et al. 1982)

### **1.3.2.2 Einfluss von Hormonen**

Eine Insulininjektion bewirkt bei Masthähnchen einen Anstieg des  $\beta$ HB-Gehalts in Leber und Muskel, aber keine Veränderung im Plasmaspiegel des Ketonkörpers. Als Ursache wird eine vermehrte Produktion von  $\beta$ HB aus FFS angesehen, da eine Hyperinsulinämie durch nachfolgende Stimulierung der Glucagonausschüttung die Lipolyse fördert (Chida, Ohtsu et al. 2000).

Beim Menschen reduziert Insulin die hepatische Ketogenese (Keller, Gerber et al. 1988).

## **1.4 Merkmale des Eiweißstoffwechsels**

### **1.4.1 Stickstoffausscheidung**

Als uricotelische Tiere scheiden Vögel überschüssigen Stickstoff aus Aminosäuren hauptsächlich über Harnsäure aus und nicht über Harnstoff wie Säugetiere. Hauptort der Harnsäuresynthese ist die Leber. Nur 20 % der Synthese erfolgen in der Niere.

Die Serumkonzentration von Harnsäure ist dabei ein Hinweis auf die Rate des Proteinkatabolismus (Stevens 1996).

Harnsäure liegt zu ca. 10 % frei im Plasma vor und ist zu ca. 18 % an Protein gebunden, während gut 70 % in kolloidaler Form vorliegen. Es kann extreme Schwankungen des Harnsäurewertes geben (von 50 – 660  $\mu\text{mol/l}$ ). Der Normwert beim Vogel liegt etwa bei 100 – 300  $\mu\text{mol/l}$  (Prinzinger and Misovic 1994).

### **1.4.2 Nutritive und hormonale Einflüsse auf den Harnsäurespiegel im Blut**

Der Harnsäurespiegel steigt kurz nach der Futteraufnahme an, beginnt aber bereits nach einer Stunde wieder zu fallen. Ein zweiter Peak findet sich 4 bis 12 Stunden nach der letzten Mahlzeit (de Beer, McMurtry et al. 2008).

Der Proteingehalt der Ration hat einen maßgeblichen Einfluss auf den Harnsäurespiegel. Nach einer Caseinhaltigen Mahlzeit steigt der Harnsäurespiegel innerhalb von 2 Stunden in Abhängigkeit der Caseinmenge an (Okumura and Tasaki 1969).

Enthält die Futterrationsration die zehnfache Menge an Casein (entspricht 50 % der Ration), steigt der Harnsäurespiegel im Vergleich um ca. das 9-fache an (Katunuma, Matsuda et al. 1970).

Futterentzug senkt den Harnsäurespiegel nach 16 Stunden Hungern um 50 % (Geraert, Padilha et al. 1996) und nach 36 Stunden Hungern um 70 % (Belldrin, McIndoe et al. 1959), da keine Proteine aufgenommen werden, die verstoffwechselt werden müssen.

Nach sieben Tagen Hungern steigt der Harnsäurespiegel wieder leicht an durch endogenen Proteinkatabolismus zur Energiebereitstellung aus körpereigenem Eiweiß (Buyse, Janssens et al. 2002).

In vitro stimuliert Insulin direkt die Harnsäuresynthese in der Leber (Barratt, Buttery et al. 1974) und so steigt in vivo nach Insulininjektion der Harnsäurespiegel nach 2 bis 5 Minuten an. Nach einer Glucagoninjektion dauert es 15 Minuten bis zum Anstieg. In beiden Fällen bleibt der Harnsäurespiegel während der 60 Minuten Beobachtungszeit erhöht (Hazelwood and Langslow 1978).

Corticosteron, ein Hormon der Nebenniere, erhöht den Harnsäurespiegel durch einen vermehrten Proteinkatabolismus (Simon 1984; Saadoun, Simon et al. 1987)

### **1.4.3 Enzyme im Harnsäurestoffwechsel**

Der Serumspiegel von Harnsäure ist proportional zu der Aktivität der Glutaminsynthetase. Das Produkt Glutamin ist demnach eine wichtige Zwischenstufe im Harnsäurestoffwechsel (Matsuda, Kuroda et al. 1973).

Enzyme in der Leber, die Reaktionen mit Glutamin katalysieren, nehmen daher im Harnsäurezyklus eine wichtige Stellung ein. Die Aktivität von Glutaminsynthetase und Glutamin-Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Aminotransferase (ein Schlüsselenzym der Purin-Biosynthese) ist im Huhn 10- bis 15-mal so hoch wie in der Ratte. Eine stark Proteinhaltigen Diät sowie Hungern sind potente Aktivatoren für die beiden Enzyme (Katunuma, Matsuda et al. 1970).

### **1.4.4 Harnsäure als Antioxidanz**

Vögel leben deutlich länger als Säugetiere vergleichbarer Körpergröße. Das ist insofern überraschend, als ihr Stoffwechsel einige Besonderheiten aufweist, die einen

beschleunigten Alterungsprozess erwarten lassen. Dazu gehören zum einen die um mehr als doppelt so hohe Stoffwechselrate und erhöhte Körpertemperatur, die zu einem vermehrten Anfall von freien Sauerstoffradikalen und damit zu Gewebeschäden führt. Zum anderen ist der BLZ beim Vogel deutlich höher als beim Säugetier. Man sieht einen Zusammenhang mit der Akkumulation von Maillard-Produkten, die bei der nichtenzymatischen Reaktion von Glucose mit Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren entstehen, und Alterungsprozessen beim Säuger. Zusammenfassend gesagt, sollte der Vogel sogar noch schneller altern als der Säuger. Aus diesen Gründen postulieren Forscher das Vorhandensein von Schutzmechanismen gegen die beschriebenen Schadwirkungen (Holmes and Austad 1995).

Einer dieser Mechanismen wird der Harnsäure zugesprochen. Sie wirkt als Radikalfänger und Antioxidanz. Sie reagiert mit Hydroxylradikalen oder Hypochloriger Säure und wird dabei zu unschädlichen Produkten wie Allantoin oder Oxalat umgesetzt. Damit ist die Säure ein wichtiger Radikalfänger in den Geweben (Becker 1993; Hellsten, Tullson et al. 1997). Zudem schützt Harnsäure die Nucleobasen vor Ozon-induziertem Abbau (Meadows and Smith 1986).

Eine Reduktion der Harnsäurekonzentration bei Hühnern erhöht den oxidativen Stress und führt zu einer vermehrten Ansammlung von Pentosidinen, Produkten der Glucoseoxidation, in der Haut. Folglich hat die Harnsäure ebenfalls eine Bedeutung beim Schutz vor glycosylierten Produkten (Klandorf, Rathore et al. 2001).

### **1.5 Die Hormone des Pankreas**

#### **1.5.1 Insulin**

##### **1.5.1.1 Physiologische Besonderheiten beim Vogel**

Insulin ist ein Peptidhormon, das aus zwei Ketten besteht, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (A-Kette und B-Kette) (Möstl 2010).

Die Aminosäuresequenzen in beiden Ketten sind tierartenspezifisch unterschiedlich (s. Tab. L1):

**Tab. L1: Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der A- und B-Kette des Insulins bei diversen Säugetieren und beim Huhn (Smith 1966)**

Source	A Chain				B Chain					
	4	8	9	10	1	2	3	27	29	30
Pig	Glu	Thr	Ser	Ilu	Phe	Val	Asn	Thr	Lys	Ala
Dog	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Sperm	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Fin whale	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Sei whale	---	Ala	+	Thr	---	---	---	---	---	---
Human	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Thr
Elephant	---	---	Gly	Val	---	---	---	---	---	Thr
Rabbit	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Ser
Goat	---	Ala	Gly	Val	---	---	---	---	---	---
Rat 1	Asp	---	---	---	---	---	Lys	---	---	Ser
Rat 2	Asp	---	---	---	---	---	Lys	---	Met	Ser
Chicken	---	His	Asn	Thr	Ala	Ala	---	Ser	---	---

\* Sequences are identical except in positions indicated.

Syntheseort sind die  $\beta$ -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas. Diese Zellen sind beim Huhn in der ganzen Drüse verteilt (Mikami and Ono 1962).

Insulin wird im rauen endoplasmatischen Retikulum zunächst als Präproinsulin gebildet und anschließend zum Proinsulin gespalten und gefaltet. Nach Abspaltung des sog. C-Peptid entsteht das fertige Insulin, das in Sekretgranula gespeichert wird. Diese werden mit Hilfe von Mikrofilamenten nach einem Stimulus der  $\beta$ -Zelle zur Zellmembran transportiert, wo sie bei Bedarf ihren Inhalt ins Plasma abgeben (LeRoith, Taylor et al. 2004).

Beim Vogel enthält das Pankreas nur wenig gespeichertes Insulin im Vergleich zum Säuger: 2-3 mg/100 g Organmasse beim Huhn bzw. 10-12 mg/100 g Organmasse beim Säugetier (Hazelwood 1973).

Dafür zeigt das Hühnerinsulin eine höhere Fremdaktivität als z.B. Schweineinsulin: Es wirkt z.B. stärker als Schweineinsulin auf Hepatozyten (Glucoseaufnahme) über den „pull“-Mechanismus und auf Adipozyten (Hemmung der Lipolyse) von Ratten (McCumbee and Hazelwood 1978).

Diese erhöhte Aktivität wird auf die stärkere Bindungsaffinität des Hühnerinsulins an die Membranrezeptoren (Simon, Freychet et al. 1974) sowie eine langsamere Dissoziation des Insulin-Rezeptor-Komplexes (Simon, Freychet et al. 1977) zurückgeführt.

In der Nähe der Rezeptorbindungsstelle befindet sich in Position 8 der A-Kette des Hühnerinsulins ein Histidin. Stellt man Humaninsulin her, das ebenfalls ein Histidin an Position 8 enthält, beobachtet man ebenfalls eine verstärkte Wirkung aufgrund veränderter

Rezeptorbindung. Es liegt deshalb nahe, dass das Histidin dafür ursächlich ist (Simon 1989).

Hühner tolerieren einerseits Injektionen von Säugerinsulin in Dosen, die beim Säugetier bereits Krämpfe auslösen und tödlich wirken (Chen, Anderson et al. 1945). Andererseits sind sie aber durchaus empfänglich für die hypoglykämische Wirkung von exogenem Insulin. Nach Gabe von hohen Mengen Insulin zeigten die Tiere stark erniedrigte, zum Teil nicht mehr messbare Glucosewerte (Rager, Schauder et al. 1969).

Eine intravenöse Insulininjektion senkt den Blutzuckerspiegel bei Hühnern vorübergehend, aber auch mehrere Tage anhaltend bei kontinuierlicher Insulingabe (Mikami and Ono 1962; Akiba, Chida et al. 1999; Chida, Ohtsu et al. 2000).

Allerdings kann erst mit dem Vierfachen der beim Säuger verwendeten Dosis (22,5 Units/kg KG) eine über vier Tage persistierende Hypoglykämie aufrechterhalten werden. Bei ad. lib Fütterung erreichen die Hühner nach zwei Tagen wieder normale Blutzuckerwerte trotz einer fortgesetzten konstanten Insulininfusion (Akiba, Chida et al. 1999).

Die oben genannten Untersuchungen wurden mit Säugetierinsulin durchgeführt, d. h. das Huhn reagiert demnach schwächer auf das spezieisfremde Insulin. Verwendet man dagegen homologes Hühnerinsulin, ist die Wirkung auf den Blutzuckerspiegel stärker als bei Verwendung von Rinderinsulin (Rager, Schauder et al. 1969).

Hühner können einen sehr weitgehenden Verlust der Insulinproduzierenden Zellen gut verkraften: Nach partieller Pankreatektomie (99% entfernt) fällt der Insulinspiegel innerhalb des ersten Tages ab, normalisiert sich in den nächsten Tagen aber wieder, ohne dass die Tiere in eine diabetische Stoffwechsellage geraten (Colca and Hazelwood 1976).

Werden dagegen die Glucagonproduzierenden Anteile des Pankreas bei gehungerten Tieren entfernt, so fallen die Hühner in eine Hypoglykämie und sterben, obwohl prozentual gesehen mehr Pankreasrestgewebe verblieben ist als im vorherigen Versuch (Mikami and Ono 1962). Wird dagegen eine ähnlich starke Hypoglykämie durch eine Insulininjektion hervorgerufen, so überleben die Tiere (Rager, Schauder et al. 1969).

Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass beim Huhn Glucagon das wichtigere Hormon für die Aufrechterhaltung des BLZ darstellt. Insulin wird lediglich für die „Feineinstellung“ der Blutglucose im Zusammenspiel mit Glucagon benötigt (Hazelwood 1984).

Neuere Studien zeigen jedoch, dass Insulin insbesondere bei gefütterten Hühnern eine wichtige Rolle spielt. So wird dort bei Gabe von Anti-Insulin-Serum eine deutliche

Hyperglykämie, ein Anstieg der FFS und von Glucagon sowie eine reduzierte Aktivität der hepatischen Glucokinase erreicht. Die Autoren postulieren, dass Insulin vergleichbar zum Säuger im gefütterten (tendenziell hyperglykämischen) Zustand das wichtigere Hormon ist, während im gehungerten (tendenziell hypoglykämischen) Zustand Glucagon eine bedeutendere Rolle für die Glucosehomeostase spielt (Simon, Derouet et al. 2000; Dupont, Tesseraud et al. 2008).

Zudem werden Veränderung in der Genexpression von Leber und Muskel beobachtet, wenn Hühner durch das Serum in einen Insulinmangelzustand versetzt werden. Dabei werden unter anderem Gene für Stoffwechselwege, Strukturproteine, Transportproteine und Signalkaskaden maßgeblich beeinflusst (Simon, Milenkovic et al. 2012).

Betrachtet man die Variabilität des Plasmaspiegels von Insulin spezievergleichend, so zeigen die absoluten Werte von Insulin im Plasma von Hühnern und Ratten eine starke von der Futteraufnahme abhängige Variabilität (Hazelwood 1973). Insulinwerte bei der Ratte liegen im gehungerten Zustand bei  $0,56 \pm 0,13 \mu\text{g/l}$  und bei  $2,06 \pm 0,27 \mu\text{g/l}$  im gefütterten Zustand. Bei Hühnern liegen die Werte für hungernde Tiere bei  $0,6 \pm 0,1$  bis  $0,7 \pm 0,33 \mu\text{g/l}$  und für gefütterte Tiere bei  $1,87 \pm 0,42$  bis  $2,17 \pm 0,43 \mu\text{g/l}$ . Demnach unterscheiden sich die von der Nahrungsaufnahme abhängigen Insulinspiegel zwischen Säuger und Vogel nur wenig (Simon, Rideau et al. 2011).

Insulin wirkt über spezifische transmembranale, heterotetramere Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität an den jeweiligen Zielzellen. Nach Insulinbindung phosphoryliert die Tyrosin-Kinase verschiedene intrazelluläre Substrate, darunter das Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS1), welches als Schlüsselsubstanz für die Induktion der metabolischen Wirkungen von Insulin gilt. Der typische Insulinrezeptor und dieses Rezeptorsubstrat sowie deren Interaktion wurden beim Huhn in Leber, Muskel (Dupont, Derouet et al. 1998) und Gehirn (Adamo, Simon et al. 1987) nachgewiesen.

In der Leber des Huhns ist die Sensitivität und Affinität der Rezeptoren für Insulin ähnlich zu der in der Säugerleber, jedoch beträgt die Zahl der Bindungsstellen nur ca. 20 %. Dies führt zu einer Minderung der maximalen Bindungskapazität beim Huhn (Simon, Freychet et al. 1977), die wohl durch die erhöhte Bindungsaffinität des Hühnerinsulins wieder zum Teil ausgeglichen werden kann.

Hungern führt zu einem Anstieg der Insulinrezeptordichte in der Leber und einer Abnahme der Tyrosinkinaseaktivität. In der Muskulatur finden sich keine Veränderungen (Adamo, Simon et al. 1987).

Die Antwort der Signalkaskade auf Rezeptorgebundenes, exogenes Insulin ist in der Hühnerleber ähnlich wie in der Säugerleber. Sie weist allerdings tierartliche Unterschiede in der Muskulatur auf. So hat exogenes Insulin keine Wirkung auf die ersten Schritte der Signalkaskade insbesondere in der Muskulatur. Erst bei den später folgenden Schritten zeigt sich eine entsprechende Wirkung (Dupont, Dagou et al. 2004).

Beim Huhn finden sich in der Niere Insulinrezeptoren, die in ihrem Molekulargewicht und den Bindungseigenschaften für Insulin den Rezeptoren in der Leber entsprechen (Bisbis, Derouet et al. 1994).

Beim Säuger gilt der in der Muskulatur und im Fettgewebe vorkommende Glucosetransporter GLUT 4 als der einzige Insulinabhängige Transporter. Beim Vogel konnte GLUT 4 noch nicht nachgewiesen werden (Kono, Nishida et al. 2005). Allerdings erhöht eine Insulingabe die Aufnahme von D-Xylose (Gibson, Bourne et al. 1980) bzw. von 2-Deoxyglucose (Tokushima, Takahashi et al. 2005; Zhao, Lin et al. 2009) in den isolierten Skelettmuskel von Hühnern. Dies spricht für die Existenz eines Insulinabhängigen Glucose-Transportmechanismus auch beim Vogel.

### **1.5.1.2 Zur Wirkung von diabetogenen Agentien**

Bei experimenteller Anwendung von Streptozotocin und Alloxan schädigen diese Stoffe im Säuger direkt die  $\beta$ -Zellen des Pankreas und verursachen so Insulinmangel-Diabetes (Szkudelski 2001). Keiner dieser Stoffe zeigt eine schädigende Wirkung auf das Pankreas bei Hühnern: die Plasmaspiegel von Glucose und Insulin bleiben unverändert. Auch nach einer Glucosegabe oder nach Injektion von Sulfonylharnstoff-Derivaten bleibt der Blutzuckerverlauf identisch zu dem in Kontrolltieren (Langslow, Butler et al. 1970; Stellenwerf and Hazelwood 1979; Danby, Bluff et al. 1982a). Bei den Hennen, die mit Streptozotocin behandelt wurden, ist der Insulingehalt im Pankreas sowie der Insulinspiegel im Blut nach einer Glucosegabe etwas niedriger als bei unbehandelten Tieren, ohne dass diese Veränderungen zu einer erkennbaren Glucoseintoleranz führen (Stellenwerf and Hazelwood 1979). Lediglich durch den Einsatz von Streptozotocin in Hühnerembryos kann eine Hyperglykämie und Hypoinsulinämie hervorgerufen werden (Yoshiyama, Sugiyama et al. 2005).

Eine Senkung des Insulinspiegels bei intaktem Pankreasgewebe kann beim Huhn mit einem Anti-Insulin-Serum erreicht werden. Die Gabe des Serums resultiert in einer deutlichen Hyperglykämie (Simon, Derouet et al. 2000; Dupont, Métayer-Coustard et al. 2012), einem Anstieg der FFS und von Glucagon (Dupont, Tesseraud et al. 2008).

### 1.5.1.3 Zur Wirkung von Insulin auf den Glucosestoffwechsel

Insulin senkt den BLZ über verschiedene stoffwechselanabole Mechanismen. In der Leber wird z. B. durch die Aktivierung der Phosphorylierung von Glucose ein in die Leber gerichteter Konzentrationsgradient erzeugt, der die passive Aufnahme von Glucose aus dem Blut über den Insulinunabhängigen GLUT 2 fördert (pull-Mechanismus) (Stangassinger 2010). Hinzu kommt, dass durch Aktivierung der Glycogensynthase ein rascher Verbrauch von phosphorylierter Glucose in Leber und Muskulatur stattfindet. Ob es beim Vogel in der Muskulatur den vom Säuger bekannten insulinabhängigen GLUT 4 (push-Mechanismus) für die beschleunigte Glucoseaufnahme gibt, ist noch nicht endgültig geklärt (Kono, Nishida et al. 2005). Gezeigt wurde, dass Insulin-abhängig die Kohlenhydrat-Aufnahme in den Muskel und die Glykogensynthese dort gesteigert werden kann (Gibson, Bourne et al. 1980; Zhao, Lin et al. 2009)

Als Antwort auf einen erhöhten BLZ wird beim Säuger bekanntermaßen die Insulinausschüttung aus dem Pankreas stimuliert. Im isolierten, perfundierten Pankreas von Hühnern führt eine Glucosekonzentration von 500 mg/100 ml im Perfusat zu einer transienten Insulinausschüttung, während Konzentrationen von 700 mg/100 ml eine konstant hohe Insulinausschüttung, gemessen im venösen Rückfluss des isolierten Organs, zur Folge haben. Bei 250 mg/100 ml wird die Insulinsekretion nicht stimuliert (King and Hazelwood 1976).

Nach der Nahrungsaufnahme steigt beim Säuger der Insulinspiegel an, und erreicht nach etwa zwei Stunden (=interdigestiv) wieder Ausgangswerte. Bei 16-Wochen alten Broiler-Zuchthennen findet sich eine unterschiedlich ausgeprägte Insulinantwort auf die Futteraufnahme und zwar bei täglich bzw. alle zwei Tage gefütterten Tieren. So sind die Insulinwerte der seltener gefütterten Tiere in der ersten Stunde nach dem Fressen zwei- bis dreimal höher als die der täglich gefütterten Tiere. Sie bekamen die doppelte Menge an Futter, um den vorhergegangenen Fastentag auszugleichen (de Beer, McMurtry et al. 2008).

Nach funktioneller Hepatektomie reagieren Hühner auf eine Insulingabe (1,0 U/kg) schnell mit einem kontinuierlichen Blutzuckerabfall. Ohne die Leber wirkt Insulin stärker und über einen längeren Zeitraum. Dies gilt als Hinweis darauf, dass beim Huhn eine Gegenregulation zur Insulinwirkung über Glucagon möglich ist, dafür aber eine intakte Leber als ausführendes Organ benötigt (Hazelwood 1958).



### 1.5.1.4 Zur Wirkung von Insulin auf den Fettstoffwechsel

Insulin führt unter anderem zu einer Hypoglykämie, indem es die Aufnahme von Glucose und die Triglyceridsynthese aus der Glucose in verschiedenen Geweben fördert. Dabei kommt beim Huhn der Leber die Hauptrolle der Triglyceridsynthese zu, während das Fettgewebe im Vergleich zum Säuger nur wenig synthetisiert (Vives, Sancho et al. 1981).

Demnach erwartet man nach einer Insulingabe einen Abfall der FFS im Blut, da sie vermehrt gespeichert werden.

Allerdings beobachtet man beim Huhn als Reaktion auf eine Insulingabe (Säugerinsulin), dass der Spiegel der FFS im Blut, anders als beim Säuger, ansteigt. Die Autoren vermuten als Ursache eine sekundäre Glucagonausschüttung. Der Anstieg erfolgt langsamer als nach einer exogenen Glucagonzufuhr und ist nicht so stark ausgeprägt (Heald, McLachlan et al. 1965; Lepkovsky, Dimick et al. 1967; Hazelwood and Langslow 1978; Chida, Ohtsu et al. 2000). Demgegenüber steht eine Untersuchung, bei der die FFS im Blut sowohl nach Gabe von homologen Hühnerinsulin als auch von Rinderinsulin abfallen. Damit scheint die Insulinwirkung auf die FFS wie beim Säuger abzulaufen (Rager, Schauder et al. 1969).

Das Fettgewebe beim Huhn ist zwar empfindlich für Insulin, aber nicht so umfassend wie beim Säuger. So scheint das Hormon auf das Fettgewebe keine anti-lipolytische Wirkung zu haben (Langslow and Hales 1969).

Allerdings wird im Fettgewebe des Huhns die Aufnahme von Glucose zur Synthese von Triglyceriden sowie zur Oxidation zu CO<sub>2</sub> durch eine Insulingabe annähernd verdoppelt (Rager, Schauder et al. 1969; Gomez-Capilla and Langslow 1977; Gomez-Capilla, Sancho et al. 1980; Vives, Sancho et al. 1981). Demnach kann Insulin im Fettgewebe des Huhnes die Lipogenese fördern. Im Vergleich zur metabolischen Leistung der Fettzellen der Ratte ist der Effekt aber signifikant geringer und setzt später ein (Gomez-Capilla and Langslow 1977; Vives, Sancho et al. 1981). Auch kann in Fettzellen von Hühnern die Glycogensynthese durch Insulin, im Gegensatz zur Ratte, nicht gefördert werden (Vives, Sancho et al. 1981).

Im in-vitro-Ansatz von Leberexplantat von Hühnern zeigt exogenes Insulin keine Wirkung auf die Lipogenese (Rosebrough and McMurtry 1992).

In vivo dagegen wird eine Zunahme der Triglyceridsynthese in der Leber des Huhnes nach Insulingabe beobachtet (Vives, Sancho et al. 1981). Zudem sinkt bei Hypoinsulinämie, induziert durch ein Anti-Insulinserum, die Aktivität der Fettsäuresynthetase in der Leber (Dupont, Tesseraud et al. 2008).

Zusammenfassend ist die Wirkung von Insulin auf den FFS-Stoffwechsel ähnlich, aber weniger stark ausgeprägt als beim Säuger. Unterschiedliche Ergebnisse zur Insulinwirkung beim Huhn sind häufig auf unterschiedlichen Versuchsansätze (z. B. mit isolierten Zellen, isolierten Organpräparaten oder lebenden Tiere) zurückzuführen (Vives, Sancho et al. 1981).

### **1.5.1.5 Zur Wirkung von Insulin auf Hepatozyten**

Schon bei geringen Insulinkonzentrationen erfolgt eine Bindung des Hormons an Hepatozyten von Hühnern in vitro (Cramb, Langslow et al. 1982 a). Die postulierte geringere Insulinwirkung bei Hühnern hat seine Ursache demnach nicht in einem Mangel an Rezeptoren oder der Bindungsaffinität, sondern vermutlich in der modulierten zellulären Antwort (Cramb, Langslow et al. 1982 a).

Insulin hat keine Wirkung auf die Glucagoninduzierte Glucoseproduktion von isolierten Hühner-Hepatozyten (Langslow and Siddle 1979). Auch ein Anstieg des Glycogengehalts oder ein hemmender Einfluss auf die Gluconeogenese ist nicht zu beobachten (Cramb, Langslow et al. 1982 b). Glucagon dagegen zeigte in diesen Versuchen eine deutliche Wirkung an den Hepatozyten. Es scheint, als ob Insulin (zumindest in vitro) beim Huhn keine herausragende Wirkung für den Glucosehaushalt der Leberzellen hat, obwohl Rezeptoren dafür an den Zellen zu finden sind.

Allerdings stimuliert Insulin in isolierten Hepatozyten von Küken die Synthese von verschiedenen Proteinen, darunter Albumin und Globuline (Liang and Grieninger 1981).

### **1.5.1.6 Zu Rasse-abhängigen Unterschieden im Blutspiegel von Insulin**

Untersucht wurden zwei Mastrassen: Eine Zuchtlinien mit hohem, und eine mit niedrigem Körperfettanteil bei identischem Mastendgewicht. Die fetten Hühner zeigten gefüttert und 16 h nüchtern sowie als Antwort auf eine Glucosegabe höhere Insulinwerte als die mageren Hühner. Der Glucosespiegel war bei noch jungen Tieren der fetten Linie niedriger. Dieser Unterschied war bei Tieren im Alter von acht Wochen nicht mehr zu sehen, trotz der höheren Insulinwerte. Dies spricht für eine sich entwickelnde eingeschränkte Insulinwirkung (=Insulinresistenz) bei den fetten Tieren (Touchburn, Simon et al. 1981).

Auch Sinsigalli et al. (1987) beobachteten eine Glucoseintoleranz (gemessen an einer verlängerten Glucoseeliminationszeit aus dem Blut nach einer oralen Glucosegabe) bei

Masthühnern, kombiniert mit erhöhten Insulin- und Glucagonwerten. Sie folgern daraus eine bedeutende Rolle von Insulin für den Fettansatz und die Gewichtszunahme bei Mastrassen (Sinsigalli, McMurtry et al. 1987).

Demzufolge haben Masthühner im gefütterten Zustand auch einen höheren Insulinspiegel als Legehennen. Nach 24 h Hungern gibt es bei beiden Rassen keine Unterschiede mehr (Shiraishi, Yanagita et al. 2011).

### **1.5.2 Glucagon**

#### **1.5.2.1 Physiologische Besonderheiten beim Vogel**

Hühnerglucagon ist ein Peptidhormon mit 29 Aminosäuren, das im Vergleich zu Schweineglucagon ein Serin anstelle eines Asparagin an der Stelle 28 in der Aminosäuresequenz enthält (Pollock and Kimmel 1975; Huang, Eng et al. 1987). Es ist demnach dem Säugerglucagon sehr ähnlich. Die Aminosäuresequenz des Glucagon von Schwein, Rind und Mensch ist gleich (Thomsen, Kristiansen et al. 1972).

Anders als beim Insulin, wo das Hühnerhormon im Vergleich zum Säugerhormon eine höhere Aktivität hat, hat porcines Glucagon eine stärkere Wirkung auf Hepatozyten (Glucoseausschüttung) und Adipozyten (Glycerolfreisetzung) von Hühnern und Ratten als Hühnerglucagon (McCumbee and Hazelwood 1978).

Das Hormon wird in den A<sub>2</sub>-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas gebildet. Der Hauptteil dieser Zellen findet sich im dritten Lappen und im Milzlappen des Pankreas (Mikami and Ono 1962; Hazelwood 1984). Glucagon ist im Pankreas in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden als Insulin (Hazelwood 1973; Hazelwood 1984).

Die Ausschüttung wird stimuliert durch den Parasympaticus (Acetylcholin), durch Aminosäuren und durch eine Hypoglykämie, während sie durch Insulin, Somatostatin, eine Hyperglykämie und durch hohe Spiegel von Fettsäuren gehemmt wird (Hazelwood 1984).

Wirkungsorte von Glucagon sind die Leber und das Fettgewebe. Durch die Bindung an die Rezeptoren wird die Adenylatcyclase aktiviert und so die intrazelluläre Konzentration von cAMP erhöht. Mittels der cAMP-abhängiger Proteinkinase wird die Glucogenolyse und die Gluconeogenese stimuliert sowie die Lipolyse gehemmt. Die Gluconeogenese erfolgt aus Aminosäuren oder aus Metaboliten der Glycolyse. Durch Hemmung der 6-Phosphofruktokinase-1-Phosphatase, einem die Reaktionsgeschwindigkeit in der Glycolyse bestimmenden Schlüsselenzym, wird die Reaktion in Richtung Gluconeogenese unterstützt. Glucagon stimuliert die Lipolyse im Fettgewebe mittels Aktivierung einer

cAMP-abhängigen Lipoprotein-Lipase. Dadurch steigt der Gehalt an freigesetzten langkettigen Fettsäuren im Blutplasma (Stevens 1996).

### **1.5.2.2 Zur Wirkung von Glucagon auf den Glucose- und Fettsäurestoffwechsel sowie auf die Leber**

Nach Futteraufnahme fällt der Glucagonspiegel ab, bleibt über mehrere Stunden erniedrigt und steigt mit der Kropfentleerung wieder an (de Beer, McMurtry et al. 2008).

Hühner und Puten unterschiedlicher Altersgruppen zeigen eine zum Säuger ähnliche hyperglykämische Reaktion auf eine Glucagoninjektion: der BLZ steigt um 50 % bis 80 % an und hat nach einer Stunde wieder Ausgangswerte erreicht (Hazelwood and Lorenz 1957; Mikami and Ono 1962; Freeman and Manning 1974; McMurtry, Tsurk et al. 1996). Bei jüngeren Hühnern (6-Wochen alt) hält die Hyperglykämie fünf Stunden an. Hazelwood stellt die Hypothese einer Unterfunktion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas bei den jungen Tieren auf, so dass sie auf die Hyperglykämie noch nicht adäquat mit einer Insulinsekretion reagieren können (Hazelwood and Lorenz 1957).

Nach chirurgischer Entfernung des besonders A-Zell-haltigen Milzlappens des Pankreas (entspricht etwa  $\frac{1}{4}$  der Organmasse) entwickeln Hühner eine starke Hypoglykämie, bekommen Krämpfe und sterben innerhalb von 12 bis 36 Stunden nach der Operation. Glucagonsubstitution normalisiert den BLZ, so dass sich die Tiere innerhalb von 30 Minuten bereits wieder normal verhalten. Sobald kein Glucagon mehr gegeben wird, zeigen sich wieder die oben genannten Symptome (Mikami and Ono 1962).

Dagegen passen sich Hühner nach einer partiellen Pankreatektomie ohne Entnahme des Milzlappens schnell an die Reduktion des Anteils an  $\beta$ -Zellen an (Colca and Hazelwood 1976).

Die Anwendung von des-His1(Glu9) Glucagon-Amid, einem beim Säugetier wirksamen Glucagonantagonisten, verändert den BLZ bei gefütterten Hühnern nicht, obwohl wegen der sehr ähnlichen Bindungseigenschaften von Hühner- und Säugerglucagon geschlossen werden kann, dass der Antagonist auch an Glucagonrezeptoren im Huhn bindet (Simon, Derouet et al. 2000).

Dies ist insofern interessant, als – wie bereits erwähnt - die Gabe von Insulin-Antikörpern beim Huhn deutliche Konzentrationsveränderungen in diversen Blutparametern (Glucose, Glucagon, FFS) zur Folge hat (Dupont, Tesseraud et al. 2008).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Pankreatektomie mit Entfernung der  $\beta$ -Zellen keine Wirkung auf den Blutzuckerspiegel hat, während eine Hypoinsulinämie

mittels verabreichter Antikörper signifikante Veränderungen zur Folge hat. Genau umgekehrt ist die Situation beim Glucagon: Eine Entfernung Glucagon produzierender Pankreasanteile hat tödliche Folgen, während ein Glucagonantagonist im Blut keine Wirkung zeigt.

Betrachtet man den **Einfluss von Glucagon auf den Fettsäurestoffwechsel**, so wird das Hormon als das Haupthormon für die Kontrolle der Lipolyse beim Huhn angesehen (Freeman and Manning 1974). Glucagon sorgt durch vermehrten Abbau von Fett im Fettgewebe und der Freisetzung von FFS sowie durch eine Hemmung der Fettspeicherung in der Leber zu einer Bereitstellung von Energie. Experimentelle Belege, die diese Annahme unterstützen, sind wie folgt:

Glucagon bewirkt in vitro an Adipozyten von Hühnern eine Lipolyse (McCumbee and Hazelwood 1978). Die Lipogenese dagegen wird in Leberexplantaten von Hühnern in vitro gehemmt (Rosebrough and McMurtry 1992).

Als Resultat dieser Vorgänge steigt bei Hühnern unterschiedlicher Altersgruppen in vivo der Spiegel der FFS ca. 5 Minuten nach einer Glucagoninjektion an, erreicht etwa sechsfache Werte bei 30 Minuten und fällt dann langsam wieder ab (Heald, McLachlan et al. 1965; Freeman and Manning 1974; Hazelwood and Langslow 1978).

In der **Wirkung von Glucagon auf die Leber** finden sich Unterschiede zwischen Säugetier und Huhn. So ist die Bindungsaffinität für Glucagon an Rezeptoren der Hepatozyten bei Hühnern deutlich geringer als bei Ratten. Dafür findet sich eine 2 bis 3-mal höhere Rezeptordichte für Glucagon an den Hepatozyten. Zusammen mit den etwa 8 mal höheren Glucagonwerten im Blut kann beim Huhn die geringe Bindungsaffinität für Glucagon so kompensiert werden (Cramb, Langslow et al. 1982 a).

Glucagon erhöht in vitro ab einer Konzentration von 0,29 nM den Gehalt von cAMP in Hühner-Hepatozyten für etwa 30 Minuten. Die Glucoseproduktion wird bereits bei sehr niedrigen Glucagonkonzentrationen stimuliert, die noch keine messbare Erhöhung des cAMP bewirken (0,003 nM) (Langslow and Siddle 1979; Cramb, Langslow et al. 1982 b).

Das Hormon führt zur Glycogenolyse in Leberzellen von Hühnern (McCumbee and Hazelwood 1978; Cramb, Langslow et al. 1982 b) und bewirkt eine Steigerung der Gluconeogenese aus Laktat, ebenfalls in vitro gemessen (Cramb, Langslow et al. 1982 b).

### **1.6 Zum Zusammenspiel von Insulin und Glucagon bei der Glucosehomeostase des Huhns**

Glucagon ist sowohl Gegenspieler als auch Aktivator für Insulin. Nach einer Glucagoninjektion steigt in vivo der Insulinspiegel im Blut bereits nach wenigen Minuten an, und zwar noch bevor der BLZ gestiegen ist. Sobald sich durch die Glucagonwirkung eine Hyperglykämie abzeichnet, erscheint im Insulinkonzentrationsverlauf ein zweiter Peak (Hazelwood and Langslow 1978).

Insulin unterdrückt die Glucagonsekretion in den A-Zellen (Honey, Fallon et al. 1980; Hazelwood 1984) für kurze Zeit, führt langfristig aber zu einem Anstieg (Simon 1989; Stevens 1996) nach etwa 60 Minuten (Hazelwood and Langslow 1978).

Eine zusätzliche Gabe von Glucagon ins Inkubationsmedium von isolierten Hühnerpankreatata erhöht die Insulinsekretion um das Sechsfache im Vergleich zu Glucose allein (King and Hazelwood 1976).

Da die Wirkung der beiden Hormone über die Höhe ihrer Plasmaspiegel eng miteinander verknüpft ist, macht es Sinn, zur Beurteilung der Stoffwechsellage im Sinne von anabol oder katabol den molaren Konzentrationsquotienten aus Insulin und Glucagon ( $=I/G$ ) zu betrachten.

Bei Säugetieren wird ein I/G von 3,0-3,5 im nüchternen Zustand als normal angesehen. Im katabolen Zustand sinkt der Insulinspiegel und gleichzeitig steigt der Glucagonspiegel, um die benötigten Energiereserven zu mobilisieren. Daher sinkt bei Nahrungsmangel der Quotient auf  $< 1$ . Bei lang anhaltenden Hungerzuständen kann er sogar bis auf 0,6 fallen. Bei einem Überangebot an Energie muss ein anaboler Stoffwechsel mit hohen Insulinwerten begünstigt werden, um die Aufnahme und Speicherung der Glucose in die Gewebe zu ermöglichen. Der Quotient steigt in diesem Fall beim Säuger auf Werte von 10, 20 oder sogar 50 an (Hazelwood 1984).

Adulte, nicht-gehungerte Hühner haben einen I/G von 1,3 bis 2,0. Vergleichbar zum Säuger steigt der Quotient nach einer Glucoseinfusion deutlich an (Hazelwood 1984).

Zusammenfassend gibt es festzustellen: Insulin ist in geringeren Mengen im Hühnerpankreas vorhanden und es finden sich auch weniger Rezeptoren, z.B. in der Leber. Allerdings hat es dort eine höhere metabolische Aktivität als das Säugerinsulin. Die Wirkung auf den Fettstoffwechsel im Fettgewebe ist dennoch geringer als beim Säuger.

Glucagon hat eine schwächere Aktivität und Rezeptorbindungsaffinität im Huhn. Dafür findet sich im Zielgewebe eine höhere Rezeptordichte und im Blut ein höherer Spiegel.

Wird der Spiegel beider Hormone durch experimentelle passende Methoden erniedrigt (z. B. Pankreatektomie für Hypoglucagonämie und Antikörper für Hypoinsulinämie), so zeigen sich eindrucksvolle Veränderungen im Stoffwechsel von einer deutlichen Hyperglykämie bei Insulinmangel bis hin zum Tod durch Hypoglykämie bei Glucagonmangel.

### **1.7 Tageszeitliche Einflüsse auf die Konzentration von Stoffwechselmetaboliten und Hormonen im Blut von Hühnern**

Circadiane Rhythmen werden zum einen durch einen endogenen Schrittmacher synchronisiert, zum anderen durch exogene Faktoren, sog. Zeitgeber, beeinflusst. Ein wichtiger Zeitgeber ist das Licht (Nichelmann, Hochel et al. 1999). Photosensitive Ganglienzellen in der Retina, im Pinealorgan und im Hypothalamus leiten die Informationen an den Nucleus suprachiasmaticus im Hypothalamus weiter, der als primärer Schrittmacher dient (Mohr 2010). Als einer der wichtigsten Transmitter wird Melatonin angesehen, ein Hormon des Pinealorgans in der Epiphyse, das in Abhängigkeit von Licht ausgeschüttet wird. Als weitere exogene Faktoren werden Temperatur, akustische Reize und soziale Interaktionen genannt (Nichelmann, Hochel et al. 1999).

Bei Hühnern, denen die Hypophyse entfernt wurde, findet sich kein circadianer Rhythmus mehr, z. B. demonstriert an der Aktivität von Leberenzymen. Das betont die Bedeutung der Hypophyse für die Ausbildung von Tageszeitrhythmen (Chandrabose, Bensadoun et al. 1971).

Hühner sind tagaktive Tiere. Die Stoffwechselrate (gemessen als Sauerstoffverbrauch und über die Produktion von Körperwärme) steigt bei Tieren, die in einem 12-12-Licht-Rhythmus gehalten werden, in der Lichtphase an. Dabei beginnt der Anstieg bereits etwa eine halbe Stunde vor der Lichtphase und fällt etwa zwei Stunden vor Beginn der Dunkelphase kontinuierlich ab. Während eines 6 Stunden Licht-6 Stunden Dunkel-Zyklus ist die Produktion von Körperwärme während der Lichtphasen ebenfalls signifikant erhöht. Dagegen entspricht die Stoffwechselrate während konstanter Lichtverhältnisse von 700 bzw. 0,07 Lux über 24 h in etwa der Rate der Dunkelphasen während Licht-Dunkel-Zyklen. Demnach ist vor allem der Wechsel der Beleuchtungsintensität für circadiane Rhythmik beim Huhn wichtig (Berman and Meltzer 1978).

Hühner fressen bevorzugt morgens und/oder abends, wenn die Lichtphasen ausreichend lang sind. Legende Hennen fressen mehr am Abend, nicht legende Hennen mehr am Morgen (Savory 1980).

Entsprechend dem Futteraufnahmeverhalten haben ad-lib gefütterte Hühner während der Lichtphase (12-12-Rhythmus) signifikant höhere **Glucosewerte** als während der Dunkelphase. Entsprechend der Untersuchungen von Twiest (1970) steigt der BLZ bereits 15 Minuten vor Licht-an (Twiest and Smith 1970).

Ein etwas anderes Muster findet sich in der Arbeit von Davison (1975). Dort steigt bei gefütterten Tieren der Glucosespiegel im Blut um 10:00 Uhr (vier Stunden nach Licht an) und bleibt bis 22:00 Uhr (vier Stunden nach Beginn der Dunkelphase) hoch. Bei diesen Ergebnissen ist jedoch zu beachten, dass die Blutproben mittels Herzpunktion gewonnen wurden, eine Technik, die per se schon einen stressbedingten Anstieg der Blutglucose verursachen kann (Davison 1975).

In einer Studie von Raheja (1973) wurden die Hühner zu festgelegten Zeiten gefüttert und Blutproben jeweils eine Stunde nach der Fütterung entnommen. Er konnte keine Schwankungen des Blutzuckers zu den Zeitpunkten 10 Uhr, 16 Uhr, 22 Uhr und 4 Uhr feststellen. Auch der Glycogengehalt der Leber sowie der Insulinspiegel im Blut zeigten keine Unterschiede. Er stellt die Hypothese auf, dass circadiane Rhythmen im Leberglycogengehalt und Konzentrationsverlauf der Plasmaglutose durch die Futterintervalle bei einer ad lib Fütterung zustande kommen, und daher nur indirekt durch die Tageszeit beeinflusst werden (Raheja 1973).

Auch in anderen Studien findet sich die Bestätigung dieser These. Wird Hühnern das Futter entzogen, bleibt der Blutzuckerspiegel am zweiten Hungertag über 24 h nahezu unverändert (Decuypere and Kühn 1984; Akiba, Chida et al. 1999).

Der Spiegel der **Freien Fettsäuren** ist bei gefütterten Hühnern am Vormittag höher als am Nachmittag. Diese Schwankung ist vermutlich ebenfalls mit der Futteraufnahme korreliert, denn 24 h gehungerte Hühner haben zwar einen etwa doppelt so hohen Fettsäurespiegel, zeigen aber kaum tageszeitabhängige Schwankungen (Freemann and Manning 1976).

Raheja (1973) beobachtet für den **Insulinspiegel** bei Hühnern kein einheitliches tageszeitliches Konzentrationsverhalten sowie keinen Zusammenhang zur Plasmaglutosekonzentration oder zum Leberglycogengehalt (Raheja 1973).

Nach der Untersuchung von Tedford und Meier (1993) an japanischen Wachteln folgen tageszeitabhängige Schwankungen im Insulinspiegel nicht der Nahrungsaufnahme. Da die Tiere gegen Abend in der Regel einen vollen Kropf haben, ist zu erwarten, dass in den folgenden Stunden eine Erhöhung des Insulinspiegels als Antwort auf die sukzessive Kropfentleerung stattfindet. Dies ist aber nicht der Fall. So ist der Insulinspiegel von 6 Uhr



morgens (Licht an) bis 18 Uhr (vier Stunden vor Licht aus) am höchsten mit Werten etwa viermal höher als um 22 Uhr und 4 Uhr (Tedford and Meier 1993).

Eine tageszeitabhängige Variation in der hyperglykämischen Wirkung von **Glucagon** nach einer Glucagoninjektion bei zwei Wochen alten Hühnern beschreiben Freeman und Manning (1978). Sie fanden vormittags eine geringere Hyperglykämie als Reaktion auf eine Glucagoninjektion als am Nachmittag. Unter Aufzucht mit Dauerlicht zeigen eine Woche alte Hühner keine Unterschiede mehr in der Reaktion auf Glucagon in Abhängigkeit der Tageszeit (Freeman and Manning 1978).

Zusammenfassend nehmen das Futteraufnahmeverhalten und die Änderung der Lichtintensität Einfluss auf den Konzentrationsverlauf von verschiedenen Blutparametern.

### **1.8 Einflüsse des Futterentzugs beim Huhn**

#### **1.8.1 Zur Wirkung eines Futterentzugs auf das Körpergewicht**

Je nach Alter und Anfangskörpergewicht werden unterschiedliche prozentuale Lebendmasseverluste während einer Hungerphase beobachtet. Je leichter die Tiere sind, desto mehr verlieren sie prozentual.

Zwei Jahre alte Legehennen verlieren nach drei Tagen Hungern 13 % ihres Körpergewichtes, nach sieben Tagen sind es 25 % (Buyse, Decuypere et al. 1995).

Masthähnchen mit einer Lebendmasse von 1,2 kg verlieren nach vier Tagen Hungern 24 % von ihrem ursprünglichen Körpergewicht. Nach acht Tagen sind es 34 % Verlust (Brady, Romsos et al. 1978).

Bei einem Ausgangsgewicht von 4 kg verlieren Hühner innerhalb von 72 Stunden Hungern 10 % ihres Körpergewichts (Belo, Romsos et al. 1976).

Aus Untersuchungen zur induzierten Mauser mittels Futterentzug bei Legehennen weiß man, dass ein Körpergewichtsverlust von 35 % oder mehr negative Auswirkungen auf die Lebens- und Legefähigkeit der Hühnergruppe hat (Berry 2003).

#### **1.8.2 Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen im Blut nach Futterentzug**

Schon ein Futterentzug für 24 h bewirkt eine deutliche Veränderung im Stoffwechsel beim Huhn (Buyse, Janssens et al. 2002). Es zeigt sich z. B. eine Verschiebung von Lipogenese zu Lipolyse, ein erhöhter Fettsäureumsatz, eine Reduktion des anabolen Proteinstoffwechsels und eine verringerte Stoffwechselrate. Dabei kann der erniedrigte

Spiegel von Thyroxin (Hormon der Schilddrüse) in einer Hungersituation beim Huhn als ein Hinweis auf die reduzierte Stoffwechselrate gewertet werden. Die endogene Glucoseverfügbarkeit wird dabei als wichtiger Trigger für derartige Veränderungen im Konzentrationsverlauf von Stoffwechselhormonen und von Metaboliten gesehen (Buyse, Janssens et al. 2002).

Die physiologischen metabolischen Ausgleichsmechanismen, typisch für eine Hungersituation, beginnen, sobald der Kropf geleert ist. Bei täglicher Fütterung ist letzteres nach 12 Stunden der Fall (de Beer, McMurtry et al. 2008).

24-stündiges Hungern senkt die Körpertemperatur von Hühnern um 0,6°C, ein Mechanismus, um Energie einzusparen (Ait-Boulahsen, Garlich et al. 1989).

Die metabolischen Anpassungsmechanismen bei einem zwei Monate anhaltenden Futterentzug lassen sich beim Vogel in drei Phasen einteilen: Phase eins: Das Körpergewicht nimmt stark ab und der Körper stellt den Stoffwechsel auf Energiegewinnung aus den Fettspeichern um; Phase zwei: Die Stoffwechselrate wird deutlich reduziert und die Stickstoffausscheidung nimmt ab; Phase drei: Es zeigt sich im Blut ein deutlicher Anstieg der FFS und des  $\beta$ HB und es findet ein erhöhter Eiweißabbau statt (Stevens 1996). Diese Phaseneinteilung wurde anhand einer 2-monatigen Hungerphase bei Gänsen während der Brut etabliert (Le Maho, Vu Van Kha et al. 1981).

Interessant ist, dass bei Hühnern bereits nach 24 h Hungern eine Absenkung der Proteinsynthese im Skelettmuskel um 59-65 % beobachtet wurde (Nieto, Palmer et al. 1994).

Um den BLZ aufrecht zu erhalten, werden bei fehlender regelmäßiger Futteraufnahme zunächst die Glykogenspeicher der Leber abgebaut. Noch während dieser Glycogenolyse wird bereits mittels Gluconeogenese aus Zwischenprodukten der Glykolyse, aus Glycerol sowie später auch aus Aminosäuren, Glucose produziert. Dies ist begleitet von einem leichten Anstieg des BLZ (Hazelwood and Lorenz 1959).

Die Leber gilt als das Hauptorgan für die Gluconeogenese auch bei hungernden Hühnern. Die Niere kann auf diesem Wege etwa 30 % der Gesamtglucose zur Verfügung stellen (Tinker, Brosnan et al. 1986).

### 1.8.2.1 Konzentrationsverlauf von Metaboliten nach Futterentzug

Zur Wirkung von Hungern auf den **Blutzuckerspiegel** bei Hühnern gibt es stark divergierende Ergebnisse: Einen niedrigeren Blutzuckerspiegel nach einer Hungerzeit von 10, 16, 24 bzw. 72 Stunden (Lepkovsky, Dimick et al. 1967; Langslow, Butler et al. 1970;

Savory 1987; Edwards, McMurtry et al. 1999; van der Wal, Reimert et al. 1999; Serr, Suh et al. 2009; Christensen, McMurtry et al. 2013) oder zunächst ein Sinken, dann wieder einen Anstieg der Blutglucose nach 48 Stunden (Decuypere and Kühn 1984; Abe, Mujahid et al. 2006) bzw. nach 65 h (Simon and Rosselin 1978) oder ein Absinken erst nach 4 Tagen Hungern (Hazelwood and Lorenz 1959) oder gar keine Veränderung nach 24 oder 72 Stunden bzw. 6 oder 8 Tagen (Belo, Romsos et al. 1976; Brady, Romsos et al. 1978; Tinker, Brosnan et al. 1986).

Nach Emmanuel et al (1982) sind die Blutglucoseschwankungen nur gering, da Hühner sehr gut in der Lage sind, nach 48 h Futterentzug die Glucoseoxidation zugunsten der Oxidation von  $\beta$ HB signifikant zu reduzieren, erkennbar auch an dem stark gesunkenen  $\text{CO}_2$  Anteil aus der Glucoseoxidation (Emmanuel, Berzins et al. 1982) (siehe auch Tab. L2).

Bei hungernden Hühnern wird zudem der Glucoseverbrauch signifikant reduziert und die Wiederverwertung von Kohlenstoff aus Glucosemetaboliten (=Recycling) gefördert (Belo, Romsos et al. 1976).

Nach der ersten Futteraufnahme im Anschluss an eine Hungerphase ist der BLZ deutlich höher als bei ad. lib. gefütterten Hühner (Savory 1987). Als Ursache sehen die Autoren eine hungerinduzierte Abnahme der pankreatischen B-Zell-Sensitivität für Glucose mit einer dadurch verminderten Insulinausschüttung und einer gestörten Glucosetoleranz (Simon and Rosselin 1978; Simon and Rosselin 1979). So haben 120 Minuten nach einer oralen Glucosegabe 65 h gehungerte Tiere die Glucoseausgangskonzentration noch nicht wieder erreicht, während 5 h gehungerten Tiere bereits nach 90 Minuten wieder Basalwerte erreichen (Simon and Rosselin 1978).

Eine Erklärung für diese Glucoseintoleranz wäre der Anstieg von Corticosteron im Blut bei hungernden Hühnern (Freeman, Manning et al. 1983). Chronische Corticosterongaben hemmen die Wirkung von exogenem Insulin, mindern die Kinase-Aktivität von Insulinrezeptoren in der Leber (Taouis, Derouet et al. 1993) und führen zu einer Erhöhung des Insulinspiegels bei Hühnern (Bisbis, Taouis et al. 1994). Offensichtlich verursacht Corticosteron eine Insulinresistenz und könnte daher zumindest im länger hungernden Tier für die geminderte Glucosetoleranz verantwortlich sein. Bei sehr kurzen Hungerzeiten wären der Anstieg von Corticosteron und die davon ausgehende Wirkung auf Insulin allerdings vergleichsweise gering.

Beim Menschen führt ein 14-tägiger Nahrungsentzug dagegen nicht zu einer Erhöhung des Cortisolspiegels im Blut (Tzagournis and Skillman 1970).

Der **Gehalt an Freien Fettsäuren** im Blut steigt in einer Hungersituation als Folge von zunehmender Lipolyse, vor allem vermittelt durch die Dominanz von Glucagon, im Vergleich zu gefütterten Tieren an (de Beer, McMurtry et al. 2008) (siehe auch Tab. L2).

Bei Untersuchung der Genexpression wird beobachtet, dass Hungern zu einer gesteigerten Expression von Genen führt, die für die Mobilisation von FFS und deren Oxidation zuständig sind, während Gene für die FFS-Synthese und Speicherung unterdrückt werden (Ji, Ernest et al. 2012).

Die Zunahme im Fettsäurespiegel des Blutes ist in ihrer Ausprägung überraschenderweise nach unterschiedlichen Hungerzeiten identisch, wobei nach einer initialen Erhöhung nach etwa 10 h Hungern keine weitere Steigerung der Konzentration der FFS mehr erfolgt: So zeigt der Spiegel der FFS etwa eine Verdoppelung sowohl nach 10 h (van der Wal, Reimert et al. 1999), nach 16 h (Lepkovsky, Dimick et al. 1967; Geraert, Padilha et al. 1996), nach 24 h (Buyse, Janssens et al. 2002; Serr, Suh et al. 2009), als auch nach 48 h (Benson and Bensadoun 1977; Abe, Mujahid et al. 2006) sowie 72 h hungern (Langslow, Butler et al. 1970).

**Tab. L2: Der Konzentrationsverlauf von Glucose und FFS im Blutplasma von Broilern während eines 12-stündigen Futterentzugs (van der Wal, Reimert et al. 1999)**

Time (h)	Glucose		NEFA					
	Male and female		Male		Female		Male and female	
	$\bar{x}$	SE	$\bar{x}$	SE	$\bar{x}$	SE	$\bar{x}$	SE
	(mmol/L)							
0	12.95	0.174	0.36	0.010	0.34	0.010	0.35	0.008
2	13.53	0.425	0.39	0.024	0.37	0.024	0.38	0.012
3	12.67	0.759	0.47	0.043	0.49	0.043	0.48	0.035
4	13.62	0.427	0.49	0.025	0.50	0.024	0.50	0.020
6	13.16	0.529	0.57	0.030	0.62	0.030	0.59	0.024
8	12.02	0.425	0.48	0.024	0.59	0.024	0.54	0.020
10	11.46	0.426	0.57	0.024	0.63	0.024	0.60	0.020
12	12.49	0.425	0.52	0.024	0.73	0.024	0.62	0.024
LSD <sup>1</sup>	1.29		0.07		0.07			

<sup>1</sup>The average Least Significant Difference is 0.06 for comparing two means within the same feed withdrawal period.

Nach 24 bzw. 72 Stunden Hungern steigt beim Huhn die **Konzentration von  $\beta$ -Hydroxybutyrat** im Blutplasma um das 3- bis 5-fache an, nach 96 Stunden sogar auf das Zehnfache. Acetoacetat bleibt in seiner Konzentration unverändert (Belo, Romsos et al. 1976; Brady, Romsos et al. 1978; Emmanuel, Berzins et al. 1982). Offensichtlich ist das Huhn in der Lage, in einer Hungersituation sehr effektiv  $\beta$ HB zur Energiegewinnung heranzuziehen, und dadurch den Glucoseverbrauch zu reduzieren (Emmanuel, Berzins et al. 1982).

So steigt nach 48 h Hungern die  $\beta$ HB-Oxidationsrate von 124  $\mu\text{mol/kg}$  pro h auf 737  $\mu\text{mol/kg}$  pro h und der Anteil von  $\text{CO}_2$ , der durch Oxidation von  $\beta$ HB entsteht, steigt von 1,7 auf 9,92 % (Emmanuel, Berzins et al. 1982).

Bereits nach 5 h Hungern werden die Geschwindigkeits-bestimmenden Gene für die  $\beta$ -Oxidation im Mitochondrium vermehrt aktiviert. Zudem nimmt der Gehalt an  $\beta$ HB im weißen Fettgewebe signifikant zu, und zeigt damit eine vermehrte unvollständige Oxidation von FFS an (Ji, Dupont et al. 2012).

Der **Harnsäurespiegel** im Blut gilt beim Huhn als Parameter des Proteinstoffwechsels. Dies gilt insbesondere auch für die Situation des Hungerns. Dort fällt er in der ersten Phase ab, da im Proteinumsatz gespart wird und bleibt zunächst auch auf einem niedrigen Niveau. Er steigt dann aber wieder an, sobald körpereigenes Eiweiß als Aminosäuren- und Energielieferant abgebaut wird. Dieser Verlauf kann bei Gantern über eine Hungerphase von 2,5 Monaten beobachtet werden (Robin, Cherel et al. 1987).

Bei Hühnern fällt der Harnsäurespiegel nach Hungerphasen von 16 Stunden um 50 % (Geraert, Padilha et al. 1996), nach 24 Stunden um 60 % ab (Buyse, Janssens et al. 2002). Nach 72 Stunden liegt der Abfall nur noch bei 52 % (Buyse, Decuypere et al. 1995) und steigt nach insgesamt 7 Tagen Futterentzug sogar wieder an (Buyse, Decuypere et al. 1995).

Okumura und Tasaki (1969) machen bei hungernden Hähnen einer Legerasse dagegen die Beobachtung, dass der Harnsäurespiegel 24 Stunden unverändert bleibt, und erst nach 72 Stunden bis 240 Stunden massiv ansteigt (Okumura and Tasaki 1969).

### 1.8.2.2 Konzentrationsverlauf von Hormonen nach Futterentzug

Im Vergleich zu gefütterten Tieren fällt der **Insulinspiegel** im Blut von männlichen und weiblichen Masthühnern nach 12 h um ca. 60 % (Christensen, McMurtry et al. 2013), nach 24 h bei Broilern um ca. 80 % auf 0,5  $\mu\text{g/l}$  und bei Legehennen um ca. 65 % auf 0,7  $\mu\text{g/l}$  (Shiraishi, Yanagita et al. 2011) und nach 48 h Hungern um ca. 43 % auf 1,11  $\mu\text{g/l}$  (Bisbis, Derouet et al. 1994) ab. Im Vergleich zu 5 h nüchternen Tieren steigt der Insulinspiegel von 0,4  $\mu\text{g/l}$  um ca. 70 % auf 1,2  $\mu\text{g/l}$  an nach 65 h Hungern (Simon and Rosselin 1978). Die vier zitierten Untersuchungen benutzten denselben RIA für die Insulinanalyse, entwickelt von McMurtry et al (McMurtry, Rosebrough et al. 1983).

Aus diesen zum Teil ähnlichen Insulinwerten wird ersichtlich, dass für eine Aussage bezüglich einer Zu- oder Abnahme im Hungern immer der Zustand der Vergleichsgruppe (gefüttert oder 5 h gehungert) in Betracht gezogen werden muss.

Die Wirkung einer Insulininjektion wird nach einer Hungerphase am BLZ verstärkt sichtbar: Nach einer Insulininjektion fällt er bei 16 Stunden hungernden Tieren stärker ab als bei gefütterten Tieren (Geraert, Padilha et al. 1996). Beim Menschen führt eine 14-tägige Hungerphase zu einer stärkeren Wirkung von exogenem Insulin (Tzagournis and Skillman 1970).

Zu dieser Wirkungsverstärkung von Insulin würde passen, dass die Insulinrezeptordichte in der Leber nach 48 Stunden Hungern ansteigt. Die Tyrosinphosphorylierung der Rezeptoren sowie die Phosphorylierung des IRS1 nehmen jedoch ab (Dupont, Derouet et al. 1998). Demnach gibt es zwar mehr Rezeptoren, sie reagieren aber langsamer. Für den sogenannten Nettoeffekt dieser beiden gegenläufigen Entwicklungen im Sinne einer stärkeren oder schwächeren Insulinwirkung im Hunger ist entscheidend, welcher Effekt dominiert. In der Muskulatur bleiben die Insulinrezeptoren auch im Hunger unverändert (Dupont, Derouet et al. 1998).

Was das Verhalten des **Glucagonspiegels** im Blut unter Hungerbedingungen betrifft, so zeigt sich nach 24-stündigem Hungern beim Huhn ein Anstieg von Glucagon um 30 % (Edwards, McMurtry et al. 1999) bzw. bereits nach 6 h Futterentzug ein Anstieg um 70 % (Christensen, McMurtry et al. 2013), wodurch die Lipolyse aktiviert wird.

Beim Menschen steigt der Glucagonspiegel nach dreitägigem Hungern auf mehr als das Doppelte an, fällt nach weiteren 2,5 Wochen Hungern wieder nahezu auf Ausgangswerte ab (Marliss, Aoki et al. 1970).

Zu diesem im Hunger relativ früh ansteigendem Glucagonspiegel passt, dass der Glycogengehalt der Leber in einer Hungerphase frühzeitig deutlich abfällt. Der dabei auftretende prozentuale Glycogenverlust variiert jedoch deutlich. So können Hühner bereits nach 6 Stunden Hungern 95 % (Warriss, Kestin et al. 1988) oder erst nach einem Tag bis zu 77 % (Edwards, McMurtry et al. 1999) des Leberglycogen verlieren. Noch längere Hungerzeiten verändern den Glycogengehalt nicht mehr weiter (Hazelwood and Lorenz 1959; Warriss, Kestin et al. 1988). Auch der Gehalt an Muskelglykogen reduziert sich nach 6 Tagen Hungern um 50 % (Tinker, Brosnan et al. 1986).

### **1.8.3 Zur Wirkung eines Futterentzugs auf Enzyme**

Die Genexpression für mitochondriale Enzyme der  $\beta$ -Oxidation im Skelettmuskel von Hühnern (z.B. die Acyl CoA-Dehydrogenase und die 3-hydroxyacylCoA-Dehydrogenase), wird nach 24 bzw. 48 Stunden Hungern deutlich hochreguliert (Abe, Mujahid et al. 2006).

Die Niere spielt beim Vogel eine wesentliche Rolle für die Gluconeogenese während einer Hungerphase. 48-stündiges Fasten führt *in vitro* zu einem Anstieg der Aktivität der cytosolischen Phosphoenolpyruvat-Carboxylase in der Niere. Dieses Enzym benutzt Lactat, Pyruvat, Glycerol, Glutamin, Alanin, Glutamat, Aspartat, Prolin und Propionat als Ausgangssubstanzen zur Glucosebereitstellung. Damit ist es das Hauptenzym zur Gluconeogenese aus Aminosäuren in einer Hungersituation beim Huhn (Watford, Hod et al. 1981; Bisbis, Derouet et al. 1994).

Brady et al. (1978) beobachten allerdings keine Änderung der Aktivität von hepatischer und renaler Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase während einer 4 bzw. 8 Tage dauernden Hungerphase bei Hühnern. Dagegen stieg die Aktivität der hepatischen Laktat-Dehydrogenase deutlich an (Brady, Romsos et al. 1978).

Die Expression der Triglycerid-Lipase, ein Enzym, das den ersten Schritt der Lipolyse katalysiert, ist nach 24 Stunden Hungern deutlich erhöht (Serr, Suh et al. 2009).

## **2. Beeinflussung des Stoffwechsels durch die Applikation verschiedener Wirkstoffe**

### **2.1 Phlorizin induzierte Glucosurie**

Das Dihydrochalon Phlorizin ist ein natürlicher Stoff aus Wurzelrinde und Blättern von Obstbäumen. Es verursacht Glucosurie und behindert die Glucoseaufnahme aus dem Darm (Ehrenkranz, Lewis et al. 2005).

Phlorizin blockiert den Natrium-abhängigen Glucosetransporter (SGLT-1 = sodium dependent glucose transporter). Bei diesem Transporter wird Glucose entgegen eines Konzentrationsgradienten ins Zellinnere aufgenommen. Angetrieben wird diese erleichterte Glucosediffusion durch einen in die Zelle gerichteten Natriumkonzentrationsgradienten, der durch eine ATP-abhängige Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pumpe aufrechterhalten wird (Zhao and Keating 2007).

Phlorizin empfindliche Glucosetransporter finden sich beim Huhn im Epithel von Dün- und Dickdarm (Ferrer, Gil et al. 1994), im Epithel der proximalen Nierentubuli (Sutterlin and Lavery 1998) und im Endothel des Gehirns zum Transport in die Astrozyten (Gibbs, Hutchinson et al. 2008).

Phlorizin selbst wird beim Huhn in der Niere sowohl glomerulär filtriert als auch tubulär sezerniert (Braun, Whittaker et al. 1957).

Bereits 1938 wurde beim Huhn eine Glucosurie aufgrund der durch Phlorizin gehemmten tubulären Glucoserückresorption festgestellt. In vivo erhöht die intravenöse Phlorizingabe von 400 mg/Huhn die renale Glucoseclearance auf Inulin typische Werte. Inulin wird renal nur filtriert, nicht sezerniert oder rückresorbiert und wird daher zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate genutzt. Glucose wird physiologischerweise filtriert und in Abhängigkeit vom Spiegel im Blut komplett oder teilweise in den Tubuli reabsorbiert (Pitts 1938).

Die hemmende Wirkung von Phlorizin auf die renalen Glucosetransporter ist in vitro nachgewiesen worden, und zwar sowohl beim Säugetier (Oulianova and Berteloot 1996), als auch beim Huhn (Rabito and Ausiello 1980; Sutterlin and Lavery 1998).

Verschiedene Applikationsformen und Dosierungen von Phlorizin sind in der Literatur beschrieben. Intravenös wurden Dosen von 1,4 bis 20 mg/kg beim Huhn (Ferguson and Wolbach 1967) sowie 400 mg pro Huhn (Pitts 1938) verabreicht.

## **2.2 Glucose induzierte Hyperglykämie**

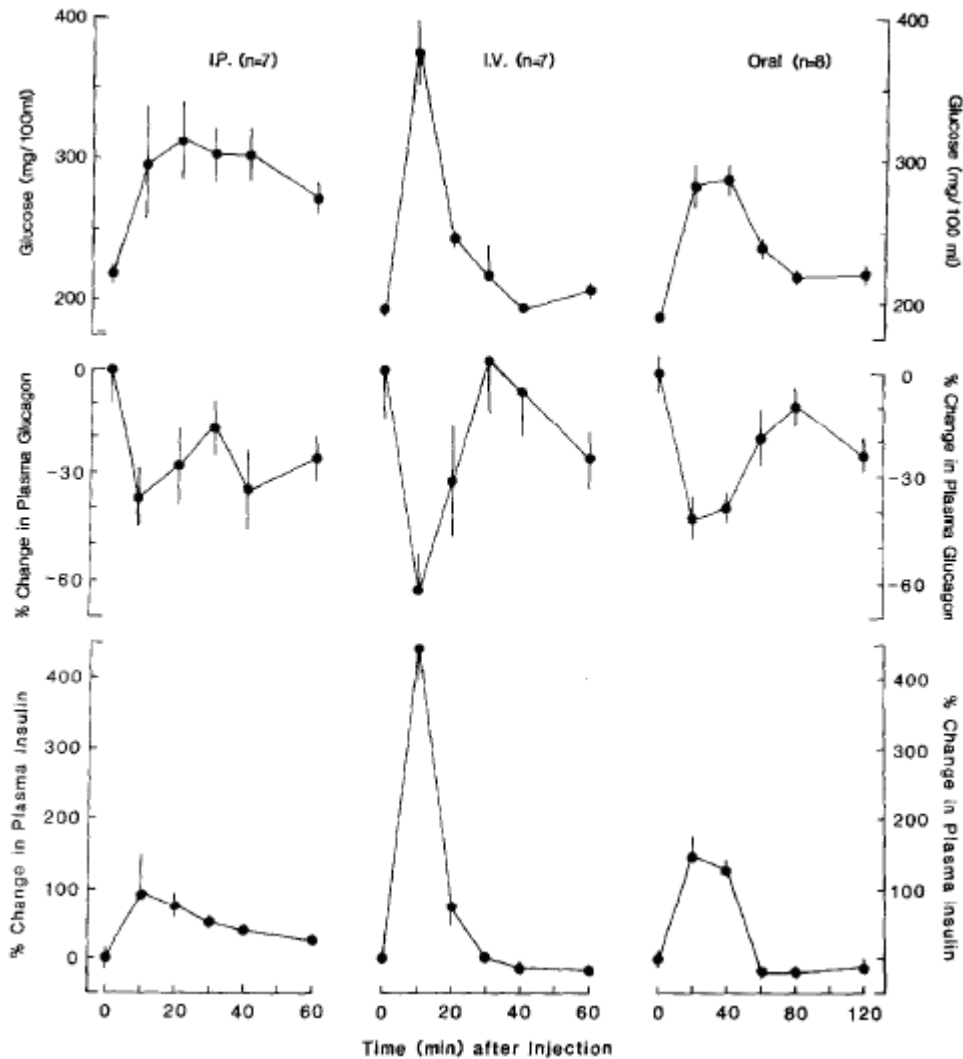
### **2.2.1 Die intravenöse Glucoseinjektion**

Glucosetoleranztests (GTT) werden in der Humanmedizin routinemäßig zur Diagnostik des Diabetes mellitus eingesetzt, wobei wegen der Praktikabilität insbesondere die orale Verabreichung der Glucose Anwendung findet (Unger 1957). Die Geschwindigkeit der Glucoseeliminierung aus dem Blut, dargestellt anhand der Glucosehalbwertszeit und/oder der Eliminationskonstanten  $K$ , sind dabei für die Bewertung des Stoffwechsels ausschlaggebend (Ko, Chan et al. 1998). In der Forschung wird der GTT häufig genutzt, um das Zusammenspiel der pankreatischen Hormone für die Glucosehomeostase z. B. bei verschiedenen Stoffwechselsituationen zu untersuchen. Dabei kann es recht unterschiedliche zeitliche Vorgaben für die Blutentnahmen p.i. geben.

Klandorf (1988) führte einen intravenösen Glucosetoleranztest bei 20 Wochen alten Legehennen, die 24 h gehungert hatten, durch (s. Abb. L2). Es wurden 0,5 g/kg Lebendmasse Glucose rasch intravenös verabreicht und Blutproben davor sowie 10, 20, 30, 40 und 60 Minuten p.i. genommen.

Für die vorliegende Studie wurde ebenfalls die intravenöse Applikation gewählt, weil man damit im Vergleich zu anderen Verabreichungswegen von Glucose die größten Effekte hinsichtlich der erreichten Hyperglykämie und z.B. der induzierten Hyperinsulinämie sieht (s. Abb L2).





**Abb. L1: Konzentrationsverläufe von Glucose und prozentuale Änderung der Konzentrationsverläufe von Insulin und Glucagon im Blutplasma von über Nacht nüchternen Hühnern bei unterschiedlichen Applikationsformen (intraperitoneal, intravenös, oral) der Glucose (0,5 g/kg) im Toleranztest; Nullwerte von Insulin (ng/ml) und Glucagon (pg/ml) der ip, iv und oralen Versuchsgruppen waren  $0,22 \pm 0,02$  und  $57 \pm 6$  pg/ml,  $0,24 \pm 0,02$  und  $55 \pm 8$  pg/ml, sowie  $0,38 \pm 0,04$  und  $33 \pm 2$  pg/ml; aus Klandorf (1988)**

Sowohl bei der oralen als auch bei der intraperitonealen Verabreichung von Glucose sind die Abweichungen in der Konzentration von Glucose und Insulin weniger prägnant (s. Abb. L1) (Klandorf 1988).

Heald et al (1965) verabreichten 1 g/kg KM Glucose iv und begannen die Blutzuckermessungen bereits 5 min p.i.. Aus dieser Studie wurde ersichtlich, dass anders als bei der in Abb. L2 zitierten Untersuchung das Maximum des Blutzuckerspiegels sich bereits zwischen 5 und 10 min p.i. zeigt, und zwar mit einer Erhöhung um 300 %. Nach 15

Minuten sind es noch 200 % und nach 30 Minuten werden wieder die Ausgangswerte erreicht.

### 2.1.2 Die intravenöse Dauerbelastung mit Glucose (GDB)

Eine länger anhaltende Glucoseinfusion zur beständigen Erhöhung des BLZ beim Huhn ist in der Literatur in vivo bisher noch nicht beschrieben. Es findet sich lediglich ein Versuch am isolierten, perfundierten Pankreas. Dort führt die Infusion von Glucose in einer Konzentration von 500 mg/100 ml zu einer transienten Insulinausschüttung, die mittels einer wiederholten Glucosegabe nicht wieder stimuliert werden kann. Dagegen bleibt der Insulinspiegel bei der Infusion mit einer Glucoselösung in der Konzentration von 700 mg/100 ml während der gesamten Expositionszeit hoch. Bei einer erneuten Erhöhung der Glucosekonzentration auf die hohen Werte steigt der Insulinspiegel nur noch auf die Hälfte der vorher erreichten Werte an. Die Autoren sehen darin eine gewisse „Unempfindlichkeit“ des aviären Pankreas gegenüber experimentell induzierten Hyperglykämien. Ob dieses Phänomen durch eine eingeschränkte Insulinsynthese oder durch eine ungenügende enzymatische Spaltung aus Proinsulin zu Stande kommt, bleibt unklar (King and Hazelwood 1976).

### 2.3 Tolbutamid induzierte Hyperinsulinämie

Tolbutamid (s. Abb. L2) gehört zur Gruppe der Sulfonylharnsäuren. Durch Bindung an die SUR1-Untereinheit von ATP-abhängige Kaliumkanälen und der dadurch induzierten Kanalblockade mit Depolarisation der  $\beta$ -Zellmembran stimuliert es die Insulinsekretion. Auch bei der Verstoffwechselung von Glucose und dem dadurch erhöhten ATP-Gehalt in den  $\beta$ -Zellen werden die Kaliumkanäle geschlossen, was eine Depolarisation der Membran und einen ladungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zur Folge hat. Aufgrund der erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es zur Exocytose von Insulin und von C-Peptid aus Proinsulin haltigen Sekretgranula (Proks, Reimann et al. 2002).

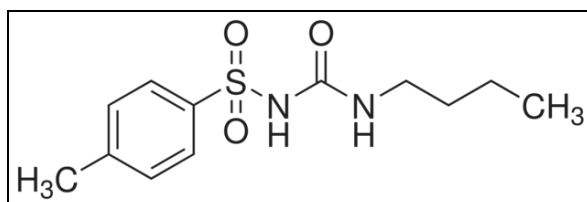


Abb. L2: Struktur von Tolbutamid (Sigma-Aldrich 2013)

### **2.3.1 Zur Wirkung von Tolbutamid auf den Insulinspiegel im Blut**

Der Anstieg von Insulin im Blut erfolgt bei Hühnern nach oraler Tolbutamidgabe schnell, ist allerdings nur von kurzer Dauer. Nach 20 Minuten sind wieder Basalwerte erreicht (Simon 1980). Dabei tritt in der Untersuchung von Simon (1980) nach einer oralen Tolbutamiddosis von 100 mg/kg bei den meisten Hühnern bei Erreichen einer ausgeprägten Hypoglykämie (0,65 mg/ml Blutglucose von anfänglich 2,5 mg/ml) eine hechelnde Atmung auf, 20-25 % der Tiere sind nicht mehr ansprechbar und zeigen Muskelzittern und 7-10 % erleiden sogar schwere Krämpfe.

Nach einwöchiger kontinuierlicher Tolbutamidfütterung (0,4 g/kg Futter) wiegen die Testtiere bei gleicher Futteraufnahme mehr als Kontrolltiere. Das spricht für eine verbesserte Energieverwertung durch erhöhte Insulinspiegel (Simon 1980).

Die stimulierende Wirkung des Tolbutamid kann in vitro bestätigt werden: An isolierten  $\beta$ -Zellen des Pankreas von Hühnern wird eine Ausschüttung von Insulin nach Inkubation mit Tolbutamid beobachtet (Datar, Suryavanshi et al. 2006).

Tolbutamid stimuliert die Insulinsekretion schneller als hohe Blutglucosewerte. Allerdings ist der Effekt auch kurzlebiger, z.B. bewirkt im isolierten, perfundierten Hühnerpankreas eine Tolbutamidinfusion von 0,13 mg/ml einen schnelleren Anstieg der Insulinsekretion (innerhalb einer Minute) als hohe Glucosekonzentrationen und auch einen schnelleren Abfall der Insulinkonzentration (nach fünf Minuten) auf Basalwerte (King and Hazelwood 1976).

### **2.3.2 Zur Wirkung von Tolbutamid auf den Blutglucosespiegel**

Über die verursachte Insulinausschüttung wird der BLZ gesenkt, sowohl bei oraler (Seki, Sato et al. 2001) als auch bei intramuskulärer Applikation von Tolbutamid (Hazelwood 1958).

In Bezug auf die hypoglykämische Wirkung von Tolbutamid ist die Dosis von 10 mg/kg KM Tolbutamid zu einer Insulindosis von 1,0 U/kg KM wirkungsäquivalent (Hazelwood 1958).

Die Hypoglykämie, die durch Tolbutamid hervorgerufen wird, ist 30-60 Minuten nach dessen intramuskulärer Injektion am stärksten (Hazelwood 1958). Bei oraler Tolbutamidgabe beginnt der Abfall des Blutzuckers erst nach 10 Minuten, obwohl der dadurch induzierte Anstieg von Insulin schon früher erfolgt (Simon 1980). Nach intravenöser Tolbutamidgabe fällt der Blutzuckerspiegel bei Enten und Gänsen nach 15

Minuten ab, erreicht nach 60 Minuten das Minimum und steigt über die folgenden zwei Stunden wieder langsam an (Grande 1971).

Nach oraler Tolbutamidgabe von 25 mg/kg KM erreicht der BLZ nach vier Stunden wieder Normalwerte, bei Gabe von 100 mg/kg KM dauert diese Normalisierung 12 Stunden. Bei chronischer oraler Tolbutamidgabe (dreimal täglich 100 mg/kg KM) unterliegt der BLZ in Abhängigkeit der Tolbutamidgaben gewissen Schwankungen, ist aber über den Applikationszeitraum von fünf Tage stets hypoglykämisch (Seki, Sato et al. 2001).

### **2.3.3 Zur Wirkung von Tolbutamid auf den Glucagonspiegel im Blut**

Tolbutamid scheint nicht nur eine Wirkung auf die Insulinsekretion zu haben. Bei gesunden Enten fällt nach einer Tolbutamidinjektion der Glucagonspiegel zeitgleich zum Insulinanstieg deutlich ab. Samols und Tyler (1969) sehen darin die Ursache für die anhaltende Unterzuckerung auch nachdem die Insulinwerte wieder Normalwerte erreicht haben. Sie folgern, dass durch den niedrigen Glucagonspiegel die Zuckerausschüttung aus den Glykogenreserven der Leber nicht ausreichend stimuliert wird. Der Glucagonspiegel normalisiert sich nach einer Stunde wieder, steigt aber nicht über die Normalwerte hinaus, wie man es bei der starken Unterzuckerung als Gegenregulation erwarten würde. Auch hier sehen die Autoren den suppressiven Effekt des Tolbutamid (Samols, Tyler et al. 1969).

Beim Säuger ist die Wirkung von Tolbutamid auf Glucagon Konzentrationsabhängig: Bei Untersuchungen an isolierten Ratten-Pankreata reagieren die  $\alpha$ -Zellen auf 0,1 mmol/l Tolbutamid mit einer Ausschüttung von Glucagon. Bei dieser niedrigen Konzentration wird noch kein Anstieg der Insulinsekretion beobachtet (Franklin, Gromada et al. 2005).

Bei 1,0 mmol/l Tolbutamid im Medium fällt der Glucagonspiegel dagegen ab (Grodsky, Epstein et al. 1977). Auch bei 500  $\mu$ g/Min wird am isolierten Rattenpankreas ein zum Insulinanstieg paralleler Abfall des Glucagonspiegels beobachtet. Dieser Abfall ist nicht Insulinabhängig, da nach Zerstörung der  $\beta$ -Zellen mittels Streptozotin und damit einer fehlenden Insulinsekretion der Abfall der Glucagonkonzentration dennoch genauso stark ist wie zuvor. Auch die Glucosekonzentration im Medium hat keinen Einfluss auf die Stärke des Abfalls (Laube, Fussgänger et al. 1971).

Zusätzliche extrapankreatische Effekte beim Säuger zeigen sich bei Untersuchungen an isolierten Rattenlebern bzw. an Hepatozyten. Tolbutamid fördert die Glycolyse und hemmt die Gluconeogenese in der Leber. Es beeinflusst die Aktivität von Phosphofruktokinase und Fructose-Diphosphatase durch Hemmung der Glucagon-induzierten Phosphorylierung der Fruktose-2,6-Bisphosphatase. Demnach behindert Tolbutamid direkt in der Leber die

Wirkung von Glucagon beim Säuger (Hatao, Kaku et al. 1985; Ayame, Matsutani et al. 1995).

Bei Hühnern scheint die Wirkung anders zu sein: Durch Glucagoninjektion bei Tolbutamid-behandelten Hühnern kann der Blutzuckerspiegel wieder auf Normalwerte angehoben werden. Die Glucagonwirkung wird also bei Hühnern nicht gehemmt (Hazelwood and Lorenz 1957). Auch bei Enten und Gänsen verändert eine Tolbutamidinjektion die lipolytische Wirkung von Glucagon auf das Fettgewebe nicht: Der Spiegel der FFS steigt trotz der Tolbutamidgabe nach einer Glucagoninjektion an (Grande 1971).

Zudem zeigen hepatektomierte Hühner keine Unterschiede in der Tolbutamidwirkung zu Kontrolltieren. Ein direkter Einfluss von Tolbutamid auf den Leberstoffwechsel ist daher unwahrscheinlich (Hazelwood 1958).

### **2.3.4 Zur Wirkung von Tolbutamid auf die Skelettmuskulatur**

Tolbutamid scheint insulinunabhängig auch eine Wirkung an der Muskulatur zu zeigen (Gibson, Bourne et al. 1980). So kann *in vitro* die Aufnahme von D-Xylose in den Skelettmuskel beim Huhn sowohl mit als auch ohne exogenen Insulin durch Tolbutamid gesteigert werden. Beim Säuger funktioniert dies nicht. Die verwendete Tolbutamidmenge entspricht *in vivo* einer Menge von 200 mg/kg LM. Unklar ist, ob diese Wirkung im lebenden Tier mit nur einem Zehntel der Menge auch zu erreichen ist. Im *in vitro*-Ansatz zur Demonstration dieser Wirkung hatten geringere Konzentrationen keinen Effekt (Gibson, Bourne et al. 1980).

Die Glucoseaufnahme in die Muskulatur wird bekanntermaßen durch die Aktivierung von Enzymen und Glucosetransportern gesteuert. Nach einer oralen Tolbutamidgabe von 100 mg/kg LM bei Hühnern steigt die Genexpression der mRNA von Hexokinase 1 (ein Regulatorenzym für die Glucoseaufnahme in Skelettmuskel) und der mRNA vom Glucosetransporter GLUT 1 (Seki, Sato et al. 2005). So kann über die dadurch gesteigerte Aufnahme der Glucose in die Muskulatur der Blutzuckerspiegel gesenkt werden.

### **2.3.5 Zur Wirkung von Tolbutamid auf den Fettstoffwechsel**

Beim Menschen wurde nach der oralen Gabe von Tolbutamid ein Abfall des Spiegels der FFS beobachtet (Stone and Brown 1966). Diskutiert wird, ob dieser Abfall auf den provozierten Insulinanstieg oder auf eine direkte Wirkung von Tolbutamid z.B. auf das

Fettgewebe zurückzuführen ist. Auch beim Vogel (Gänsen und Enten) beobachtet man einen Abfall der FFS mit einem Minimum 30 Minuten nach der Injektion. Dieser Abfall wird nicht beobachtet, wenn gleichzeitig Glucagon injiziert wird (Grande 1971).

Bei diabetischen Ratten konnte gezeigt werden, dass Tolbutamid die Carnitin-Palmitoyltransferase in Leber, Herz und Skelettmuskel hemmt. Damit werden die Oxidation von Fettsäuren und so die Gluconeogenese in der Leber gehemmt. Bei gefasteten Tieren war der Effekt nicht so ausgeprägt (Cook 1987).

Zudem senkt Tolbutamid unabhängig von Insulin die Ketonkörperproduktion in Leberzellen von diabetischen Ratten (Mori, Kaku et al. 1992).

## III. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Tierhaltung

Es wurden insgesamt 116 Brown Classic Hennen der Firma Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven für die Untersuchungen verwendet. Die braunen Hühner erreichen in der Kleingruppenhaltung mit 20 Wochen ein Gewicht von 1,6-1,7 kg. Die Lebensfähigkeit liegt bei Kleingruppenhaltung in der Aufzuchtperiode bei 97-98 % und in der Legeperiode bei 94-96% (Lohmann 2010). Während unserer Versuche traten keine Tierverluste auf.

Die Tiere wurden im Alter von 13 bis 14 Wochen als Versuchstiere im Tierhaltungsraum A U109 des Instituts für Tierphysiologie eingestallt und mit Flügelmarken gekennzeichnet. Es wurden jeweils zwei Tiere in einem Gitterkäfig aus Metall (87 x 78 x 75 cm) mit einer darunter liegenden Blechwanne für die Ausscheidungen gehalten. Es standen jeweils zwei Käfige übereinander. Die Vorderseite wurde von einer Gittertür eingenommen, über deren gesamte Breite der Futtertrog reichte. Der Wassertrog hatte eine Länge von 32 cm und war an der linken Käfigseitenwand angebracht. Futter und Wasser wurden ad libitum angeboten. Das Wasser wurde täglich gewechselt.

Das Lichtprogramm im Tierstall war im 12-12 Rhythmus geschaltet, von 8 Uhr bis 20 Uhr MEZ. Die Lichtquelle war flackerfrei und erreichte in der Mitte des Raumes auf ein Meter Höhe eine Luxzahl von 376.

Die Tiere wurden mit Junghennenfutter (JAK C PELL, Raiffeisen Kraftfutterwerke Süd GmbH, Würzburg) und Ergänzungsfuttermittel für Legehennen (LEGEKORN S PELL, Raiffeisen Kraftfutterwerke Süd GmbH, Würzburg) in einem Mischverhältnis von 1:3 gefüttert. Zusätzlich wurde Weizen (Raiffeisen Kraftfutterwerke Süd GmbH, Heilbronn: 1,1 % Rohasche, 14,6 % Rohprotein, 1,9 % Rohfett, 2,8 % Rohfaser, 59,9 % Stärke (Strobel, Ahrens et al. 2001) und Geflügelgrit (Korngold, Raiffeisen Kraftfutterwerke Süd GmbH, Würzburg: 31 % Calcium, 1,2 % Natrium, 0,2 % Phosphor, 95 % Rohasche) im Verhältnis 1:4 untergemischt.

Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Futtermittel gibt Tabelle M1.

**Tab. M1: Zusammensetzung der Hühner-Futtermittel (Herstellerangaben)**

Angaben je kg		<u>Junghennen</u>	
		<u>Alleinkorn C</u>	<u>Legekorn S</u>
Energie (ME)	MJ	9,8	9,8
Rohprotein	%	15,5	20
Methionin	%	0,3	0,4
Calcium	%	1,1	5,5
Phosphor	%	0,7	0,7
Natrium	%	0,16	0,23
Vitamin A	I.E.	10.000	19.000
Vitamin D3	I.E.	2.500	4.600
Vitamin E	mg	20	40
Selen	mg	0,4	0,45
Kupfer	mg	9	25
Antioxidans		zugewetzt	zugewetzt
Multi-Enzym-Komplex		zugewetzt	
Coccidiostatikum		zugewetzt	
Dotterfarbstoffe			zugewetzt

Als Bereicherung der Haltungsumwelt befand sich in jedem Käfig ein Sandbad (42 x 30 x 28 cm) gefüllt mit Quarzsand (Sakret, Trockenbaustoffe GmbH & Co KG, Wiesbaden) und eine Sitzstange aus Holz über die gesamte Breite in 27 cm Höhe. Außerdem wurde als Teileinstreu Heu und Stroh angeboten. Die Käfige und das Sandbad wurden einmal wöchentlich ausgemistet und frisch eingestreut.

Die Raumtemperatur für die Hühnerhaltung betrug durchschnittlich  $22,3^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$  und die relative Luftfeuchtigkeit lag im Schnitt bei  $43\% \pm 24\%$ .

Nach der Einnistung wurden die Tiere vier Wochen lang an die für die eigentlichen Versuchsabläufe benötigten Manipulationen gewöhnt. So wurden die Hühner aus dem Käfig gehoben und auf dem Blutentnahmetisch auf die Seite gelegt. Im Anschluss bekamen sie einen Körperverband (CoFlex Binden haftend, Henry Schein, Hamburg) angelegt und wurden in eine Vogeltransportbox aus Karton (43 x 30 x 28 cm) gesetzt. Frequenz und Dauer der jeweiligen Übung wurden im Laufe des Trainings zunehmend erhöht.



Einmal pro Woche wurde das Körpergewicht der Tiere kontrolliert. In allen Gruppen nahmen die Tiere über die vier Trainingswochen kontinuierlich zu. Versuchsbeginn war im Alter von 18 Wochen. Tiere, die vor Versuchsbeginn bereits begonnen hatten, Eier zu legen, wurden von den Versuchen ausgeschlossen. Aufgrund dieser Vorgabe musste im Verlauf ein Tier ausgeschlossen werden.

Die Versuche fanden im Haltungsraum statt.

Beim Umgang mit den Tieren wurden Kittel und Überschuhe getragen, die nur in diesem Raum verwendet wurden.

## **2. Versuchsablauf**

Alle Tierversuche fanden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern statt (AZ 55.2-1-54-2531-166-09).

### **2.1 Maßnahmen für eine variable metabolische Belastung der Versuchstiere**

Die Untersuchung wurde in vier Teilversuche unterteilt mit jeweils unterschiedlichen Versuchsbedingungen (=Stoffwechselsituationen). Alle Versuche starteten am Versuchstag jeweils ca. eine Stunde nach Beginn der Lichtphase.

Bei der Bedingung „nüchtern“ (=N) wurde den Tieren am Vorabend des Versuchs um 17 Uhr das Futter entzogen. Bis zum Versuchsbeginn am nächsten Morgen hatten die Tiere im Schnitt mindestens 16 h gefastet.

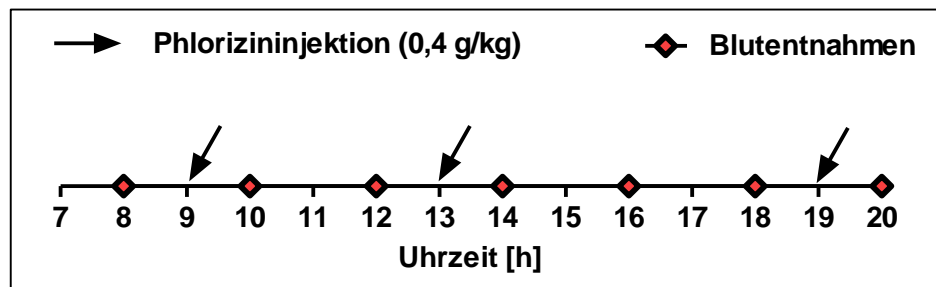
Bei der Bedingung „hungernd“ (=H) wurde den Tieren vier Tage vor Versuchsbeginn am Morgen um 9 Uhr das Futter entzogen. Bis zum Versuchsbeginn am Morgen des vierten Tages hatten die Tiere mindestens 96 h gehungert. Täglich wurde eine Gewichtskontrolle durchgeführt. Hatten Tiere mehr als 15 % ihres Körpergewichtes verloren, wurden sie aus dem Versuch genommen. Auch 24 h nach der Wiederaufütterung der Tiere wurde das Körpergewicht ermittelt.

Bei der Bedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (=HP) wurde den Tieren wie oben beschrieben das Futter 96 h entzogen. Zusätzlich wurde ihnen am dritten und vierten Hungertag zur Einleitung einer Glucosurie dreimal täglich (um 8 Uhr, 13 Uhr und 19 Uhr) Phlorizin s.c. (0,4 g/kg KM) in die Kniefalte verabreicht. Waren die am 4. Hungertag morgens begonnenen Untersuchungen vor der zweiten (13 Uhr) oder der dritten (19 Uhr) Phlorizininjektion bereits beendet, so wurde auf die letzte oder die letzten beiden Phlorizingaben verzichtet.

Unmittelbar im Anschluss an alle Untersuchungen bei Futterentzug wurde den Tieren wieder Futter im Heimkäfig angeboten.

## 2.2 Maßnahmen zur Erstellung eines Tagesprofils der Konzentration von Blutparametern

Die Konzentrationsprofile von Metaboliten und Hormonen wurden unter den Bedingungen „nüchtern“, „hungernd“ sowie „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (=PrN, PrH, PrHP) erstellt (Abb. M1). Die betroffenen Tiere wurden vor Versuchsbeginn um 8 Uhr gewogen. Die Blutentnahmen erfolgten über einen Flügel-Venenverweilkatheter einheitlich um 10, 12, 14, 16, 18 und 20 Uhr.



**Abb. M1: Frequenz der Blutprobenentnahme zur Erstellung des Konzentrationsprofils von Blutparametern**

Um den Tieren insgesamt nicht ein zu großes Blutvolumen entnehmen zu müssen, wurde auf die Entnahme um 8 Uhr verzichtet. Bei diesem Zeitpunkt konnte durch die Nullwerte vor speziellen Untersuchungen (z.B. GTT) Einblick in die Konzentrationen der im Profil zu erstellenden Blutparameter gewonnen werden.

Bei der Erstellung eines Blutparameter-Konzentrationsprofils unter „nüchtern“ Bedingungen (n=8) wogen die Versuchstiere im Mittel 1,31 kg und waren 18,3 Wochen alt. Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme hatten sie 17 h gehungert.

Bei den Konzentrationsprofil-Messungen unter Hungerbedingungen (n=8) hatten die Tiere zu Beginn ein Alter von 18,2 Wochen bei einem Gewicht von durchschnittlich 1,37 kg. Nach 97 h erreichten sie nach einem Körpergewichtsverlust von 12,87 % nur noch 1,19 kg Körpergewicht.

Unter der Bedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (n=8) waren die Tiere 18,6 Wochen alt. Sie verloren in 97 h durchschnittlich 11,67 % Körpergewicht und fielen damit von 1,47 kg auf 1,29 kg zurück.

### 2.3 Durchführung des intravenösen Glucosetoleranztests (GTT)

Der GTT fand unter den Bedingungen „nüchtern“, „hungernd“ sowie „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ statt (Abb. M2).

Am Morgen des Versuchstages wurde das Huhn gewogen und die erforderlichen Volumina an Injektionslösungen vorbereitet (mittels einer 15 %en Glucoselösung für 0,5 g Glucose/kg Körpergewicht (Klandorf 1988) oder mittels einer 2,4 %igen NaCl-Lösung in einem Volumen, das dem Volumen an Glucoselösung für das jeweilige Körpergewicht entspricht). Die Entscheidung, ob das Tier als Kontroll- oder Versuchstier dienen soll, wurde zufällig getroffen.

Dann wurden dem Tier zwei Venenverweilkatheter in die beiden Venae ulnares gelegt und fixiert. Dabei wurde sofort die Blutprobe für den Null-Wert entnommen und aufbereitet. Unmittelbar anschließend wurde die jeweilige Lösung über einen der Katheter appliziert. Die Applikationsdauer betrug ca. 30 Sekunden.

Für die folgenden Blutentnahmen (siehe Abb. M2) wurde der zweite Katheter genutzt, um eine Kontamination der Probe durch lokale Hämolyse an der Glucose- bzw. NaCl-Applikationsstelle zu vermeiden.

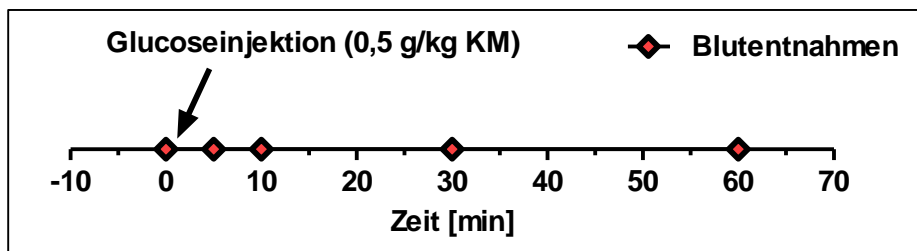


Abb. M2: Frequenz der Blutprobenentnahme beim intravenösen Glucosetoleranztest

Bei der Stoffwechselsituation „nüchtern“ (nT=12, nK=10) waren die Tiere im Schnitt 18,3 Wochen alt. Nach einer Nüchternzeit von durchschnittlich 16 h 33 min wogen die Tiere zu Versuchsbeginn 1,44 kg.

Die Versuchsbedingung „hungernd“ (nT=10, nK=10) wurde mit Tieren durchgeführt, die im Schnitt 18,4 Wochen alt waren. Zu Beginn wogen die Tiere durchschnittlich 1,51 kg. Nach einer Fastenzeit von 95 h 43 min hatten die Tiere nach einem Verlust von im Schnitt 10,6 % Körpermasse ein Körpergewicht zu Versuchsbeginn von 1,35 kg erreicht.

Bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (nT=10, nK=10) waren die Tiere zu Versuchsbeginn im Schnitt 18,4 Wochen alt. Nach 95 h 34 min

Hungern hatte sich das Anfangsgewicht von 1,44 kg um 12,49 % auf durchschnittlich 1,26 kg am Versuchstag reduziert.

#### 2.4 Durchführung der intravenösen Glucosedauerbelastung (GDB)

Eine Glucosedauerbelastung fand nur unter der Stoffwechselsituation „nüchtern“ statt (nT=13).

Am Morgen des Versuchstages wurde das Huhn gewogen und das erforderliche Volumen an Injektionslösung ausgerechnet und vorbereitet (mittels einer 15 %igen Glucoselösung für 0,5 g Glucose /kg Körpergewicht).

Anschließend wurde dem Tier ein Katheter in eine Vena ulnaris gelegt und die erste Glucoseinjektion (Dauer ca. 30 sec) vorgenommen.

Zu den Zeitpunkten 30 min, 60 min, 90 min und 120 min wurde die Glucoseinjektion mit derselben Dosis wiederholt (Abb. M3).

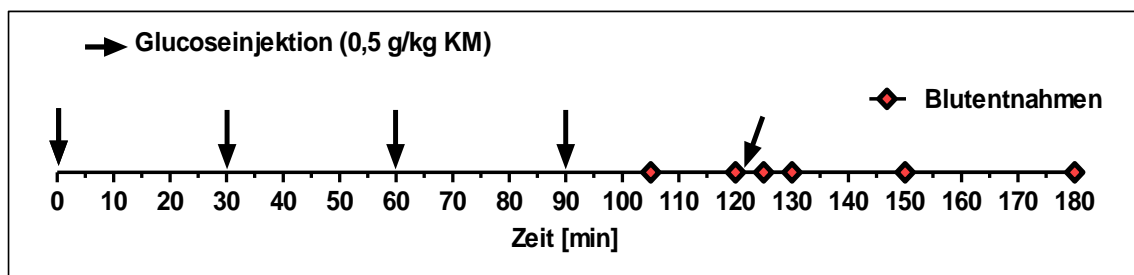


Abb. M3: Ablauf der i.v. Glucosedauerbelastung und Frequenz der Blutprobenentnahme

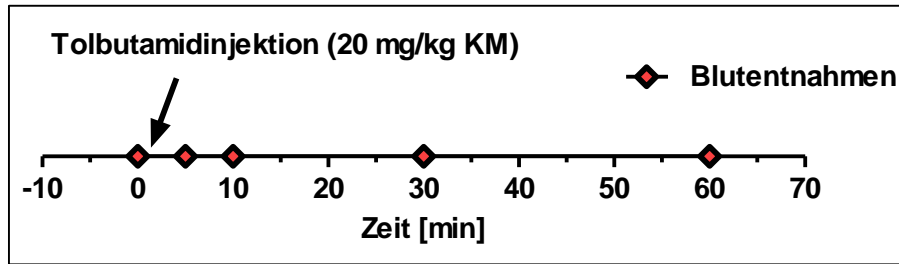
Vor der ersten Blutentnahme zum Zeitpunkt 105 min wurde der zweite Venenkatheter gelegt. Darauf folgten die Blutentnahmen bei 120, 125, 130, 150 und 180 Minuten. Die Glucoseinjektion bei 120 min erfolgte nach der Blutentnahme zu diesem Zeitpunkt.

Im Mittel waren die Tiere 18,7 Wochen alt und wogen 1,37 kg. Die Hungerzeit betrug durchschnittlich 16 h 06 min.

#### 2.5 Durchführung der intravenösen Tolbutamidinjektion (T)

Die Behandlung mit Tolbutamid zur Induzierung einer Hyperinsulinämie fand an „nüchternen“ und „hungernden“ Tieren statt. Vor Versuchsbeginn wurde das Tier gewogen und die erforderliche Dosis Tolbutamid vorbereitet (20 mg Tolbutamid /kg Körpergewicht (Stellenwerf and Hazelwood 1979). Nach dem Legen zweier Venenverweilkatheter in die Flügelvenen wurde die Nullwert-Blutprobe genommen. Anschließend wurde die Tolbutamidlösung i.v. appliziert.

Weitere Blutentnahmen erfolgten 5, 10, 30 und 60 Minuten nach der Tolbutamidgabe (Abb. M4).



**Abb. M4: Frequenz der Blutentnahme bei der i.v. Tolbutamidbelastung von „nüchternen“ und „hungernden“ Tieren**

Als Kontrollgruppe dienten auch hier die Tiere, denen eine NaCl-Lösung injiziert wurde. Bei dem Versuch „nüchtern“ (nT=11) waren die Tiere durchschnittlich 18,3 Wochen alt und hatten nach einem Futterentzug über 16 h 06 min ein Körpergewicht von 1,34 kg. Die „hungernden“ Tiere (nT=11) waren 18,6 Wochen alt. Am Versuchstag hatten sie ein durchschnittliches Gewicht von 1,28 kg, nachdem sie innerhalb 95 h 67 min Hungern von ihrem Anfangsgewicht von 1,47 kg im Schnitt 13,21 % verloren hatten.

### 3. Technik der Blutentnahme und Aufbereitung der Blutproben

Das Huhn wurde auf einem Behandlungstisch in Seitenlage an den Ständer sowie am Körper von einer Hilfsperson fixiert. Durch Strecken des Flügels bekam man Zugang zur Vena ulnaris auf der Flügelunterseite. Nach Desinfektion mit 70 % Alkohol und manuellem Stauen der Vene wurde knapp proximal des Ellbogengelenks der Venenverweilkatheter (VasoVet Braunüle G 20 1,1x25 mm rosa, Henry Schein, Hamburg) in die Vene eingeführt, sofort verschlossen und mittels Fixierpflaster (Leukosilk 9,2 m x 2,5 cm, Henry Schein, Hamburg) dessen korrekter Sitz gesichert.

Die Blutentnahmen erfolgten mit einer Spritze (3 ml, 3-teilig Luer, Henry Schein, Hamburg). Anschließend wurde der Katheter mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Dies erforderte, dass unmittelbar vor der nächsten Blutentnahme die ersten Tropfen Blut verworfen werden mussten, um einer Verdünnung der Probe vorzubeugen.

In Ausnahmefällen, z.B. bei Schwierigkeiten mit dem Venenkatheter, wurde Blut mittels Spritze und aufgesetzter Kanüle (HS-Kanülen schwarz G 22 0,7 x 30 mm, Henry Schein, Hamburg) ebenfalls aus der Vena ulnaris entnommen.

Ebenso in Ausnahmefällen wurde für das Legen eines Katheters oder für eine Punktion die Vena jugularis gewählt. Dabei erfolgte die Blutentnahme wiederum in Seitenlage.

Nach jeder Blutentnahme wurde das Huhn nach Anlegen eines Körperverbandes (CoFlex Binden haftend, Henry Schein, Hamburg) bis zur nächsten Entnahme in eine abgedunkelte Transportbox verbracht.

Das entnommene Blut wurde sofort in eine im Eisbad gekühlte Monovette (S-Monovetten Hämatologie/EDTA 2,7 ml, Henry Schein, Hamburg) überführt und geschwenkt.

Anschließend wurden bestimmte Anteile der Blutprobe auf drei Reaktionsgefäße (Reagiergefäß 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht) aufgeteilt: 500 µl in ein Gefäß mit 20 µl Aprotinin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), einem kompetitiven Serin-Protease-Inhibitor, für die Stabilisierung von Glucagon, jeweils 800 µl Blut wurden auf die beiden anderen Gefäße verteilt und im Eisbad gekühlt.

Alle Gefäße wurden anschließend bei 3500 Umdrehungen pro Minute acht Minuten lang zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau). Das gewonnene Plasma wurde auf sechs vorbeschriftete Mikro Schraubröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) mit einem Schraubdeckel (Sarstedt, Nümbrecht) aufgeteilt und sofort in flüssigen Stickstoff verbracht. Am Ende des Versuchstages wurden die Proben in eine Tiefkühltruhe umgelagert und bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt.

#### **4. Herstellung der verwendeten Injektionslösungen**

Für die jeweiligen i.v. Glucoseapplikationen wurde eine 40 %ige Glucoselösung (Glucose-Lösung 40 % ad us. vet., Braun Melsungen AG) verwendet und jeden Tag frisch mit Aqua injectabile auf 15 % verdünnt. Daraus wurde das Volumen entnommen, das für die Dosis von 0,5 g Glucose/kg Körpergewicht (Klandorf 1988) erforderlich war.

Die Kontrolltiere sollten eine zur Glucoselösung isotone Kochsalzlösung bekommen. Hierfür kam eine sterile NaCl-Lösung von 2,4 % zum Einsatz.

Die Injektionslösung von Tolbutamid (1-Butyl-3-(4-methylphenylsulfonyl)urea, purum, TO 891-25G, Sigma Aldrich, Schnellendorf) wurde so angesetzt, dass das i.v. zu applizierende Volumen den Volumina in den Glucosetoleranztests entsprach. Bei einer Dosis von 20 mg Tolbutamid/kg Körpergewicht (Stellenwerf and Hazelwood 1979) und einem Ansatz für 10 Tiere, wurden 333,5 mg in 2 ml 1N NaOH gelöst (Danby, Bluff et al. 1982a), mit 48 ml Aqua dest. aufgefüllt und mittels 1N HCl ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Die Injektionslösung von Phlorizin (Phlorizin Dihydrat 98 % für die Biochemie, Roth, Karlsruhe) wurde in einer Menge von 0,4 g/kg (Rossetti, Smith et al. 1987) s.c. in die Kniefalte appliziert. Zur Herstellung einer Stammlösung wurde 1 g Phlorizin in 3 ml

Propandiol (Laybutt, Glandt et al. 2003) gelöst. Damit betrug die Konzentration 0,333 g/ml.

## **5. Laboranalytische Bestimmung der Metabolite**

### **5.1 Glucose**

Alle Glucosemessungen erfolgten im Analyseautomaten Hitachi 912 (Fa Roche, Grenzach-Wyhlen) mittels einer enzymatischen Methode (Testkit von ROCHE, Grenzach-Wyhlen, Gluco-quant Glucose/HK) nach Herstellerangaben. Dabei wird Glucose durch ATP und Hexokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Dieses wird dann durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu Gluconat-6-Phosphat oxidiert, wobei NADP zu NADPH + H<sup>+</sup> umgewandelt wird. Die Geschwindigkeit der NADPH + H<sup>+</sup>-Zunahme ist direkt proportional zur Glucosekonzentration und wird photometrisch bei 340 nm gemessen.

Der Messbereich reicht von 2 bis 750 mg Glucose/dl.

Laut Hersteller liegt der Variationskoeffizient innerhalb einer Serie bei 1,0 % (n=63) und bei verschiedenen Durchläufen bei 1,7 %.

### **5.2 Freie Fettsäuren**

Die Freien oder unveresterten Fettsäuren (FFS oder NEFA) wurden ebenfalls im Analyseautomaten Hitachi 912 (Fa Roche, Grenzach-Wyhlen) mittels einer enzymatischen kolorimetrischen Methode (Testkit von RANDOX, Crumlin, NEFA-Non Esterified Fatty Acids FA115) nach Herstellerangaben bestimmt. Dabei werden die FFS durch die Acyl CoA Synthetase in Acyl CoA umgewandelt. In weiteren Folgereaktionen entsteht durch die Acyl CoA Oxidase daraus zunächst H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches mittels Peroxidase zu einem lila Farbprodukt umgesetzt wird, dessen Absorption schließlich bei 550 nm gemessen werden kann.

Der Test ist für Konzentrationen bis 2,24 mmol/l linear. Der niedrigste messbare Wert liegt bei 0,071 mmol/l.

Laut Hersteller liegt der Variationskoeffizient innerhalb eines Durchlaufs bei 4,74 % (n=20), innerhalb verschiedener Durchläufe bei 4,51 % (n=20). Für die Validierung wurde eine Verdünnungsreihe mit Hühnerplasmaproben angelegt. Bei einer 1:1 Verdünnung mit destilliertem Wasser ergibt sich eine Abweichung von 6,6 % (n=5).

### 5.3 $\beta$ -Hydroxybutyrat

$\beta$ -Hydroxybutyrat ( $\beta$ HB) wurde ebenfalls im Analyseautomaten Hitachi 912 (Fa Roche, Grenzach-Wyhlen) mittels einer kinetischen enzymatischen Methode (Testkit von RANDOX, Crumlin, D-3-Hydroxybutyrat RB 1007) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Analyse basiert auf der Oxidation von D-3-Hydroxybutyrat zu Acetoacetat durch das Enzym 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase. Bei dieser Reaktion wird der Cofaktor  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert. Die daraus resultierende photometrische Absorptionsänderung bei 340 nm ist dabei direkt proportional zur Konzentration von D-3-Hydroxybutyrat.

Die Abweichung bei der selbst ermittelten Präzision liegt bei 1,69 % (n=8) innerhalb eines Durchlaufs. Bei Messung einer Probe in zwei verschiedenen Durchläufen beträgt die prozentuale Abweichung 4,9 % (n=40). Da einige Werte außerhalb des Referenzbereichs lagen, wurde eine Verdünnung mit destilliertem Wasser angefertigt. Bei der 1:3 Verdünnung lag die Abweichung vom Ausgangswert bei 2,93 % (n=18).

### 5.4 Harnsäure

Harnsäure wurde im Hitachi 912 (Fa Roche, Grenzach-Wyhlen) mittels eines enzymatischen kolometrischen Tests (Testkit von ROCHE, Grenzach-Wyhlen, Uric Acid plus) nach Herstellerangaben bestimmt. Harnsäure wird durch die Uricase überführt in Allantoin und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Durch eine Peroxidase wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  in einen roten Farbkomplex umgesetzt, der photometrisch bei 590 nm bestimmt werden kann und dessen Farbintensität proportional zur Harnsäurekonzentration ist.

Der Test ist linear von 11,9 bis 1487  $\mu\text{mol}$  Harnsäure /l.

Laut Hersteller liegt der Variationskoeffizient innerhalb eines Durchlaufs bei 0,5 % (n=21). Der Variationskoeffizient bei wiederholten Messdurchgängen liegt bei 1,7 %.

Für die Valdierung wurde hier ebenfalls eine Verdünnungsreihe mit Hühnerplasma durchgeführt. Bei einer 1:1-Verdünnung mit destilliertem Wasser betrug die Abweichung 4,08 % (n=4), bei einer 1:3-Verdünnung 2,07 % (n=4).

## 6. Laboranalytische Bestimmung der Hormone

### 6.1 Insulin

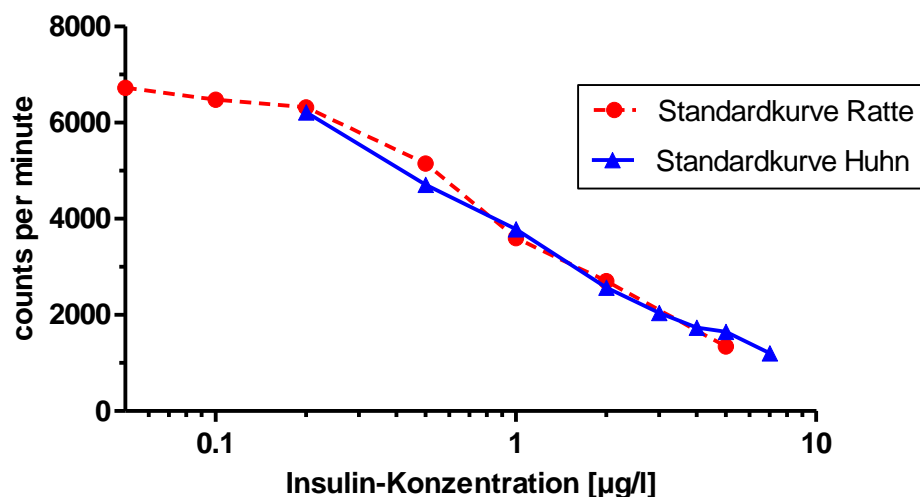
Die Bestimmung von Insulin erfolgte mittels eines Ratteninsulin-RIAs (=Radioimmunoassay) (Millipore, Billerica, Rat Insulin RI-13K) nach Herstellerangaben.



Als Standard diente Ratteninsulin, als Insulinantikörper wurden Antikörper vom Meerschweinchen verwendet.

### 6.1.1 Testvalidierung

Zur Validierung des Testes für Hühnerinsulin wurde eine Standardkurve mit Hühnerinsulin (freundlicherweise bereitgestellt von John P. McMurtry, Animal & Natural Resources in Beltsville, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture) erstellt. Hierfür wurden folgende Konzentrationen: 0,2 µg/l, 0,5 µg/l, 1 µg/l, 2 µg/l, 3 µg/l, 4 µg/l, 5 µg/l, 7 µg/l verwendet. Die daraus resultierende Kurve verlief parallel zu der Standardkurve des Testkits (siehe Abb. M5). Demnach bindet der Antikörper Hühnerinsulin vergleichbar gut wie Ratteninsulin.



**Abb. M5: Vergleich der Standardkurven von Ratteninsulin und Hühnerinsulin**

$$y(\text{Huhn}) = -1422\ln(x) + 3778$$

$$y(\text{Ratte}) = -1238\ln(x) + 3679$$

Die Wiederfindung von Hühnerinsulin in Hühnerplasma lag bei 89,73 %.

Die Präzision innerhalb eines Messdurchlaufs lag bei 3,77 %, für die errechneten Konzentrationen bei 14,97 % (n=11).

Die Präzision innerhalb verschiedener Kits derselben Charge lag für die Qualitätskontrollen bei 13,3 % (Qualitätskontrolle 1) und 9,3 % (Qualitätskontrolle 2). Bei mehrmals aufgetragenen Plasmaproben desselben Tieres lag die Präzision bei 17,3 % (n=8).

Bei einer Verdünnungsreihe mit einer 1:3 Verdünnung lag die durchschnittliche Abweichung bei 5 % (n=14). Allerdings wurde zur Bestimmung der Insulinwerte keine Verdünnung benötigt, da die zu erwartenden Werte innerhalb des linearen Standardkurvenbereichs lagen.

#### **6.1.2 Testdurchführung**

Die Durchführung eines Messansatzes für Insulin dauerte zwei Tage und erfolgte nach Herstellerangaben. Als Probengefäße wurden Reagenzgläser (AR Sodaglas 12x75 von Neolab, E-2406) verwendet.

Nach Abschluss der Testkit spezifischen Schrittfolge wurde das radioaktive Pellet am Probengefäßboden im Gamma-Zähler (1470 Wizard, Wallac, Waltham Massachusetts) gemessen.

Die Berechnung der Werte erfolgte über das Programm MultiCalc 2000 v 2.7 (Wallac Oy, Waltham Massachusetts, Software 1985-1999). Als Berechnungsprotokoll diente das 4 PL weighted-Modell mit der Funktionsgleichung:

$$F(x) = D + (A-D) / [ 1 + (x/C)^B ]$$

wobei: x= Konzentration; D= Referenzwert, Maximum; A= Leerwert, Minimum; B= Steigungsfaktor; C= Wendepunkt

#### **6.2 Glucagon**

Für die Bestimmung von Glucagon wurde ein speziesübergreifender RIA verwendet (Millipore, Billerica, Glucagon GL-32K). Das Testprinzip entsprach dem von Insulin und war in einer Herstellervorschrift festgelegt.

##### **6.2.1 Testvalidierung**

Bei der Validierung des Kits mit Hühnerplasma wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Die Präzision lag bei 11,2 % (n=8) und 15,7 % (n=4) innerhalb eines Durchlaufs. Innerhalb verschiedener Kits lag die Präzision bei 15,98 % (n=8 verschiedene Tiere)

Die Wiederfindung von Glucagon (bei Verwendung eines Glucagonstandards aus dem Testkit: 25 µl des Standards mit der Konzentration 400 pg/ml in 50µl Probe) lag bei 96,4 % in Hühnerplasma.

Versetzte man eine Probe bekannter Konzentration mit einer anderen bekannten Proben, so lag die prozentuale Abweichung vom errechneten Wert bei 1,07 %.

Da die Glucagonwerte bei Hühnern zum Teil deutlich höher sind als beim Säuger und zu erwarten war, dass Werte außerhalb des linearen Bereichs zu liegen kommen, mussten die Proben verdünnt werden. Daher wurde die Verlässlichkeit einer Verdünnung überprüft.

Bei einer 1:3 Verdünnung lag die Abweichung vom Ausgangswert bei 3 bis 15 %. Bei einer 1:1 Verdünnung lag die Abweichung bei 24 bis 35 % (n=11). Daher wurden diese Werte rechnerisch mit einem Faktor von 0,8 angeglichen.

Zum Schluss wurde noch untersucht, inwieweit die vom Testkit-Hersteller empfohlene Zugabe des Serin-Protease-Hemmers Aprotinin zum Plasma wichtig für die Stabilität von Glucagon ist. Es ergab sich lediglich eine Abweichung von 0,51 % (n=4). Das lässt sich unter Umständen dadurch erklären, dass die Plasmaproben unmittelbar nach dem Zentrifugieren in flüssigen Stickstoff verbracht wurden und so die Stoffwechselvorgänge gestoppt wurden.

Laut Testhersteller liegt der Variationskoeffizient innerhalb eines Messdurchlaufs zwischen 4,0 und 6,8 % (n=4). Zwischen verschiedenen Durchläufen variiert er von 7,3 bis 13,5 %. Die Wiederfindung von Glucagon in Hundeplasma liegt zwischen 96 und 98 %.

#### **6.2.2 Testdurchführung**

Der Testablauf erstreckte sich über drei Tage. Als Reaktionsgefäße wurden wieder Reagenzgläser aus AR-Sodaglas verwendet.

Für die Radioaktivitätsmessungen wurde mit den Proben wie bei dem Insulin-RIA verfahren.

Die Berechnung der Werte in den Versuchsproben erfolgte nach denselben Berechnungsprinzipien wie beim Insulin über das Programm MultiCalc (siehe III 6.1.2).

### **7. Statistik und weitere Berechnungen**

Alle statistischen Berechnungen einschließlich der Flächenberechnungen wurden mit dem Programm Prism 5.04 (1992-2009 GraphPad, Inc., Avenida de la Playa, La Jolla) ausgeführt.

Für den Vergleich von zwei verschiedenen Tiergruppen (z.B. Testtiere und Kontrolltiere) zu den einzelnen Zeitpunkten wurde im Vorfeld auf Normalverteilung überprüft mit Hilfe des d'Agostino-Pearson-Tests. In fast allen Fällen folgten die Werte der Gauss-

Normalverteilung und wurden daher mit dem Student's t-Test berechnet. Die wenigen rechnerisch nicht normalverteilten Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test untersucht. Die p-Werte aus diesen Berechnungen sind im Ergebnisteil mit „M-W“ gekennzeichnet (pM-W). Für den Test auf Homogenität der Varianzen wurde bei dem Zwei-Gruppen-Vergleich der F-Test angewendet. Waren die Varianzen inhomogen, wurde ebenfalls der Mann-Whitney-Test angewendet.

Um die Ausschüttung der Metaboliten und Hormone bei den verschiedenen Stoffwechselzuständen und den jeweiligen Versuchsmaßnahmen über die Zeit vergleichen zu können, wurde die Fläche unter den einzelnen Konzentrationsverlaufskurven für jedes Tier berechnet (genannt „area under curve“=AUC).

Bei der Berechnung der Flächen wurde die x-Achse als Basislinie ausgewählt, da die Werte bei den einzelnen Tieren sehr stabil sind und so die Kurven einer Gruppe immer bei einem gut begrenzten Nullwert beginnen. Soweit nicht anders erwähnt, wurde die Fläche immer über den gesamten Zeitverlauf von einer Stunde berechnet.

Die Flächen sowie die Zeitwerte wurden auch zwischen den einzelnen Versuchsbedingungen verglichen. Dieser Gruppenvergleich wurde mit einer one-way-ANOVA durchgeführt, wobei untersucht wurde, ob es einen Unterschied zwischen den Gruppen gibt. Um bei einem positiven Ergebnis zu erfahren, zwischen welchen Gruppen der Unterschied besteht, wurde als post-hoc-Test der Test nach Tukey verwendet. Als Test für die Varianzenhomogenität wurde der Test nach Bartlett angewendet. Waren die Varianzen inhomogen, wurden die Werte mit einem nichtparametrischen Testverfahren, dem Kruskal-Wallis-Test, noch mal analysiert. Als post-hoc-Test diente dann der Dunn-Test. Diese Werte sind im Ergebnisteil mit „K-W“ gekennzeichnet.

Bei allen Untersuchungen wurde ein p-Wert <0,05 als signifikant angesehen.

Alle in Tabellen und Abbildungen wiedergegebenen Werte sind Mittelwerte.

In den Diagrammen wird durch die Balken der Standardfehler (=SE) angezeigt.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Körpergewichtsveränderungen der Versuchstiere bei den Stoffwechselbedingungen „hungernd“ und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“

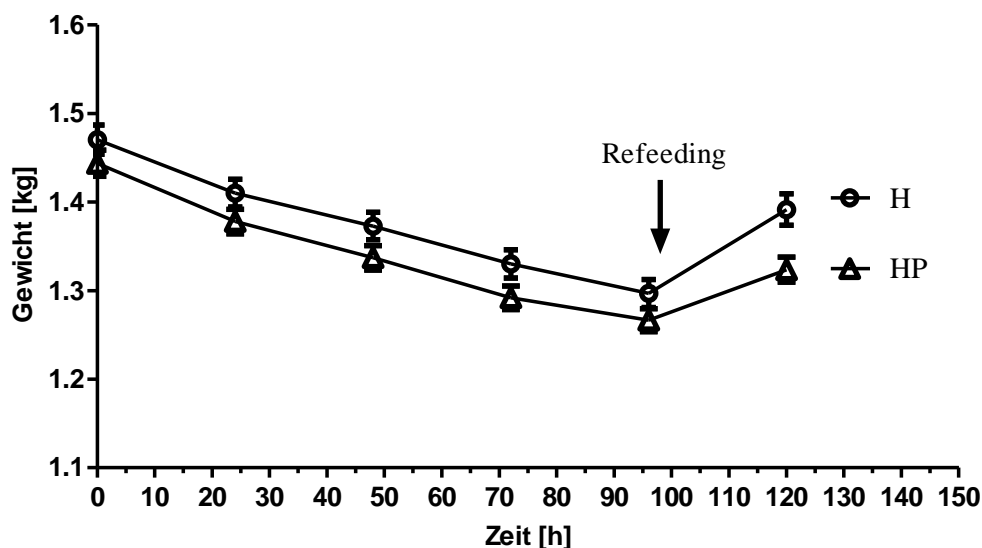
In diesem Abschnitt werden die Gewichtskurven derjenigen Tiere wiedergegeben, bei denen eine viertägige Hungerphase („hungernd“, H) eingeleitet wurde bzw. bei denen zusätzlich eine mehrmalige Phlorizininjektion („hungernd und unter Phlorizineinfluss“, HP) vorgenommen wurde. Bei diesen Versuchsbedingungen war mit Gewichtsverlusten zu rechnen. Das Gewicht wurde jeweils am Morgen jedes Hungertages protokolliert. Zusätzlich wurden die Tiere auch noch 24 h nach Wiederaanfütterung („refeeding“) gewogen. Alle Tiere hatten bereits nach 24 h signifikant an Gewicht verloren (s. Tab. E1 und E2). Auch 24 h nach Wiederaanfütterung hatten die Tiere signifikant weniger Gewicht als zu Beginn der Hungerphase.

**Tab. E1: Mittleres Körpergewicht der Versuchstiere bei den einzelnen Versuchsbedingungen**

Experiment	KG zu Beginn (kg)	Hungerzeit (h:min)	KG nach Hungern (kg)	KG-Verlust %
PrH	1,37	97:00	1,19	12,87%
GTTH	1,51	95:43	1,35	10,60%
TH	1,47	95:67	1,28	13,21%
PrHP	1,47	97:00	1,29	11,67%
GTTHP	1,44	95:34	1,26	12,49%

**Tab. E2: Verlauf der Körpergewichtsreduktion bei den Versuchsbedingungen „hungernd“ und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“**

Hungerzeit (h)	0	24	48	72	96	„Refeeding“
<b>H: KG (kg)</b>	1,47	1,41	1,37	1,33	1,30	1,39
p-Wert: Vergleich zum 0-Wert		0,009	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0018
Standardfehler	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Einzelwerte (n)	40	40	38	38	40	38
<b>HP: KG (kg)</b>	1,44	1,38	1,34	1,29	1,27	1,32
p-Wert: Vergleich zum 0-Wert		0,002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Standardfehler	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Einzelwerte (n)	28	28	28	28	28	28
<b>p-Wert, Vergleich H und HP</b>	0,275	0,116	0,083	0,0713	0,089	0,166



**Abb. E1: Verlauf des mittleren Körpergewichts während der Versuchsbedingung „hungernd“ bzw. „hungernd und unter Phlorizineinfluss“**

Vergleicht man die Gewichtsabnahmen der Tiere unter Hungerbedingungen mit denen der Tiere, die zusätzlich zum Hungern noch Phlorizin verabreicht bekommen, so zeigen sich zu keinem Zeitpunkt (=Hungerstunden) signifikante Körpergewichtsunterschiede (Abb. E1, Tab. E2).

Das Gewicht 24 Stunden nach Wiederaanfütterung unterscheidet sich weder zwischen den Versuchsbedingungen, noch zwischen Test- und Kontrolltieren bei den gegebenen Stoffwechselsituationen ( $p=0,943$  bei HP-Tieren,  $p=0,07$  bei H-Tieren).

Auch der prozentuale Verlust des Körpergewichts zum Zeitpunkt 96 Stunden unterscheidet sich bei den beiden Versuchsbedingungen nicht ( $p=0,064$ ).

## **2. Mittlere tageszeitliche Konzentration (Tagesprofil) von Metaboliten und Hormonen bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ und „hungernd“**

Nachfolgend werden die Gegebenheiten bzw. Veränderungen bei den mittleren Konzentrationen von Metaboliten und Hormonen abhängig von der Tageszeit bei jeweils einer der induzierten Versuchsbedingungen besprochen. Ein Vergleich der Charakteristika dieser Einzel-Tagesprofile von Metaboliten und Hormonen bei den Versuchsbedingungen („nüchtern“, „hungernd“ und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“) erfolgt in Abschnitt 3.

### **2.1 Glucose-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H)**

Trotz des sich verschärfenden „nüchtern“-Zustandes der Tiere steigen die Glucosewerte der N-Tiere über den Tag leicht an (s. Abb. E2 und Tab. A1). Diese Zunahme zwischen den Werten um 8:30 Uhr und um 20:00 Uhr ist allerdings nicht signifikant.

Der Verlauf der Glucosewerte der H-Tiere zeigt eine ähnliche Tendenz, aber nur bis 16 Uhr. Danach fallen die Werte wieder ab. Keine dieser Veränderungen im Tagesverlauf sind zum 8:30 Uhr-Wert signifikant.

### **2.2 Freie Fettsäuren-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H)**

Die FFS-Konzentration der N-Tiere zeigt ausgehend vom 8:30 Uhr-Wert (entspricht 16 h hungern) bis zum 10 Uhr-Wert eine deutliche (+ 66%) und signifikante ( $p=0,00002$ ) Zunahme (s. Abb. E3 und Tab. A1). Anschließend nimmt die Konzentration zum Zeitpunkt 20 Uhr hin wieder kontinuierlich und signifikant ( $p=0,002$ ) ab. Die Werte zu den Zeitpunkten 8:30 Uhr und 20 Uhr unterscheiden sich nicht ( $p=0,09$ ).

Bei den H-Tieren verläuft die Mittelwertskurve der FFS trotz des sich im Tagesverlauf verschärfenden Hungerzustandes nahezu konstant gleichmäßig. Lediglich der Wert um 9:00 Uhr ist signifikant zwischen 11 % und 26% niedriger als die folgenden Werte (8:30- (n=7) zu 9:00-Uhr-Wert (n=13):  $p=0,169$ ; 9:00-(n=13) zu 10:00-Uhr-Wert (n=8):  $p=0,0023$ ; 9:00- (n=13) zu 20:00-Uhr-Wert (n=8):  $p=0,0141$ ).

### **2.3 $\beta$ -Hydroxybutyrat-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H)**

Die  $\beta$ HB-Konzentrationskurve der N-Tiere steigt zur Tagesmitte hin um etwa das Doppelte an und fällt zum 20:00 Uhr-Zeitpunkt wieder ab (s. Abb. E4 und Tab. A1). Dementsprechend sind auch die Werte um 8:30 Uhr und 9:00 Uhr signifikant niedriger als die folgenden Werte: 8:30- (n=4) zu 14:00 Uhr-Wert (n=8):  $p=0,0265$ ; 9:00-(n=12) zu 14:00 Uhr-Wert (n=8):  $p=0,0002$ ; 9:00-(n=12) zu 20:00 Uhr-Wert (n=8):  $p=0,0025$ .

Der  $\beta$ HB-Konzentrationsverlauf im Tagesprofil der H-Tiere bleibt weitgehend konstant, d.h. vorhandene Schwankungen um 9 Uhr und um 14 Uhr sind zum Anfangs- (8:30) oder Endwert (20 Uhr) nicht signifikant.

#### **2.4 Harnsäure-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H)**

Die Mittelwertskurven der Harnsäurekonzentration zeigen in beiden katabolen Situationen im Tagesverlauf keine wesentlichen Veränderungen (s. Abb. E5 und Tab. A1). Die auftretenden Schwankungen sind nicht signifikant.



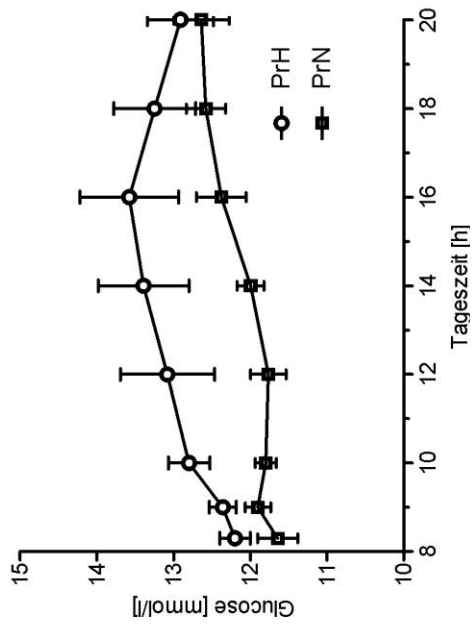


Abb. E2: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Glucosekonzentration im Blutplasma unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ und „hungrnd“

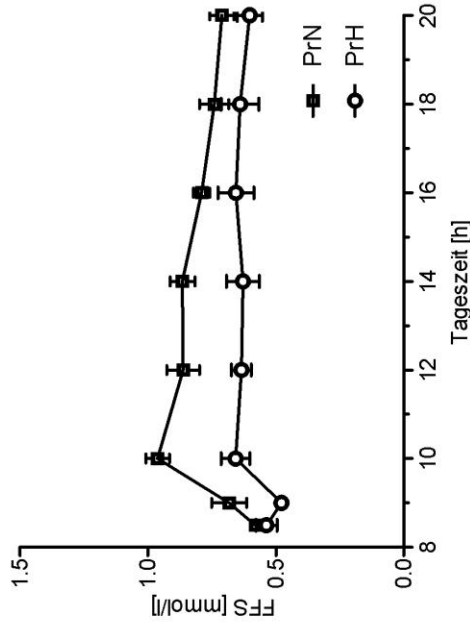


Abb. E3: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) FFS-Konzentration im Blutplasma unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ und „hungrnd“

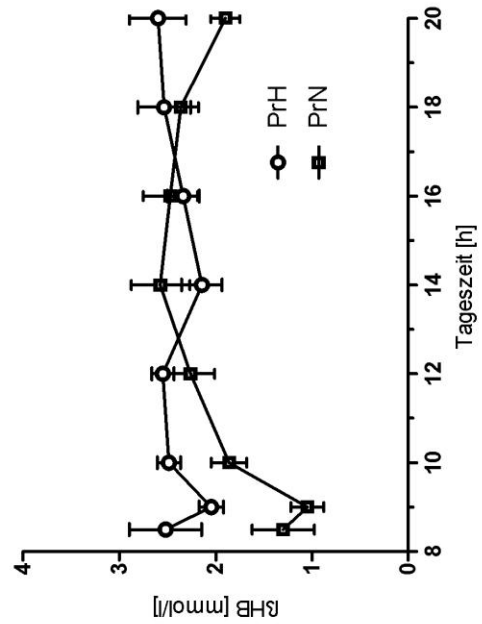


Abb. E4: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE)  $\beta$ Hb-Konzentration im Blutplasma unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ und „hungrnd“

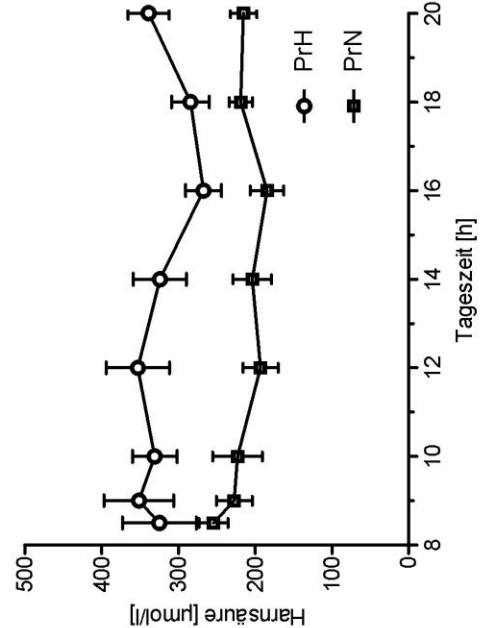


Abb. E5: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Harnsäurekonzentration im Blutplasma unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ und „hungrnd“

## 2.5 Insulin-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H)

Die mittlere Konzentration des Insulins der N-Tiere verläuft über den Tag relativ stabil bei rund 0,56  $\mu\text{g/l}$  (s. Abb. E6 und Tab. A1). Eine Ausnahme macht der 9:00-Uhr Insulinpeak mit 0,92  $\mu\text{g/l}$ , der zum 20 Uhr-Wert sogar signifikant ( $p=0,047$ ) erhöht ist

Bei den H-Tieren nimmt der mittlere Insulinspiegel am Vormittag und am Nachmittag ein unterschiedlich hohes Niveau ein. Der Abfall vom vormittäglich höheren Niveau (von 1,48  $\mu\text{g/l}$  bis 1,86  $\mu\text{g/l}$ ) erfolgt am frühen Nachmittag zwischen 12 und 16 Uhr und ist signifikant (8:30-( $n=7$ ) zu 16-Uhr-Wert ( $n=8$ ):  $p=0,033$ ; 12- ( $n=8$ ) zu 16-Uhr-Wert ( $n=8$ ):  $p=0,023$ ).

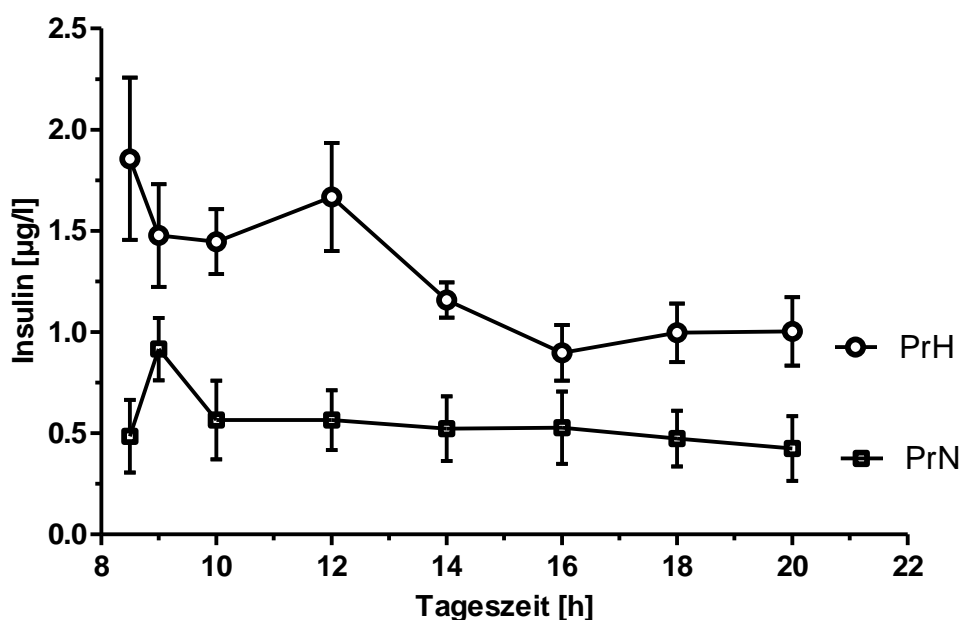


Abb. E6: Tagesprofil der mittleren ( $\pm\text{SE}$ ) Insulinkonzentration im Blutplasma unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ und „hungernd“

## 2.6 Glucagon-Tagesprofil unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H)

Der mittlere Glucagonspiegel der N-Versuchstiere (s. Abb. E7 und Tab. A1) zeigt im Tagesverlauf ausgehend von 685,6 ng/l um 8:30 Uhr und begleitet von einem Wiederanstieg auf 630,8 ng/l um 12 Uhr eine deutliche Abnahme auf 399,8 ng/l um 20 Uhr (8:30- ( $n=4$ ) zu 20-Uhr-Wert ( $n=8$ ):  $p=0,002$ ; 9-( $n=12$ ) zu 20-Uhr-Wert ( $n=8$ ):  $p=0,037$ ; 12-( $n=8$ ) zu 20-Uhr-Wert ( $n=8$ ):  $p=0,015$ ).

Bei den H-Tieren zeigt der mittlere Glucagonspiegel im Tagesverlauf insbesondere nachmittags tendenziell einen leichten Anstieg (von 470,3 ng/l um 8:30 Uhr auf 576,3 ng/l um 20 Uhr), der jedoch nicht signifikant ist.

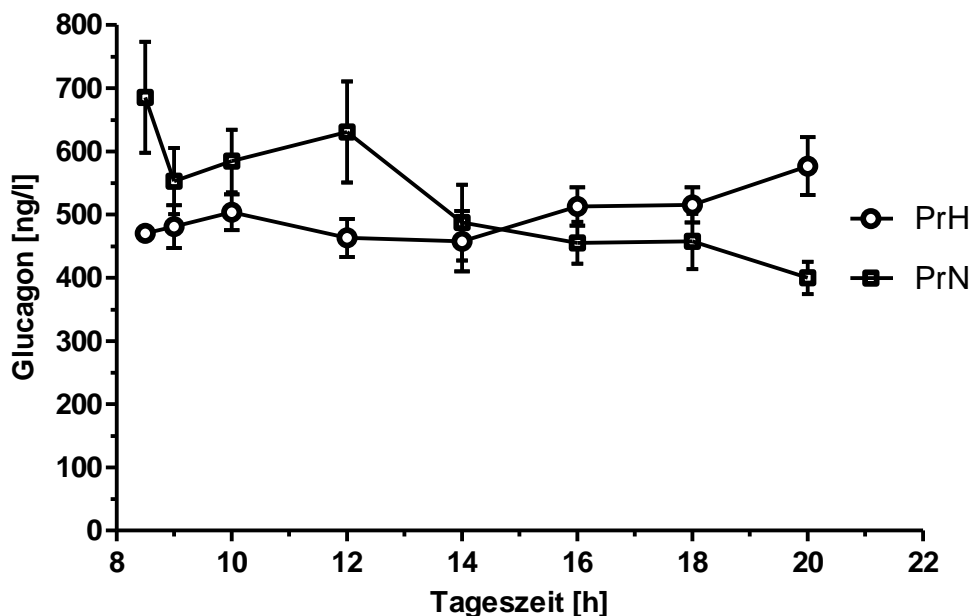


Abb. E7: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Glucagonkonzentration im Blutplasma unter den zwei Versuchsbedingungen „nüchtern“ und „hungernd“

### 3. Mittlere tageszeitliche Konzentration (=Tagesprofil) von Metaboliten und Hormonen bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)

#### 3.1 Glucose-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)

Der Verlauf der Blutglucose zeigt bei den HP-Tieren zwei deutliche Peaks (s. Abb. E8 und Tab. A1): einen mit 13,19 mmol/l um 9:00 Uhr und einen mit 12,56 mmol/l um 16:00 Uhr. Lediglich die erhöhten Werte um 9:00 Uhr sind signifikant höher als die folgenden Werte (9:00- (n=5) zu 10:00-Uhr-Wert (n=8):  $p=0,0094$ ; 9:00- (n=5) zu 14:00-Uhr-Wert (n=8):  $p=0,0014$ ).

Setzt man die Schwankungen im Glucosespiegel mit der Phlorizininjektion (8:00, 13:00 und 19:00 Uhr) in Verbindung, so sinkt der Blutzucker erst nach einem vorübergehenden (möglicherweise stressbedingtem) Anstieg am Morgen eine Stunde nach der Phlorizininjektion und mittags erst 3 Stunden nach der Phlorizininjektion an.

### **3.2 Freie Fettsäuren-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)**

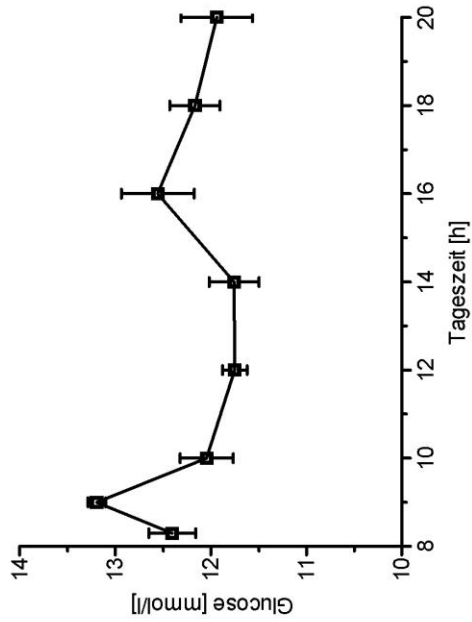
Der Kurvenverlauf der FFS-Konzentration zeigt in der ersten Tageshälfte eine stetige Zunahme (s. Abb. E9, Tab. A1) und erreicht mit 0,838 mmol/l einen signifikanten Peak um 14:00 Uhr (eine Stunde nach der Phlorizininjektion) mit höherem SEM als zu den anderen Zeitpunkten. (9:00- (n=5) zu 14:00-Uhr-Wert (n=8):  $p=0,044$  , 14:00- (n=8) zu 20:00-Uhr-Wert (n=8):  $p=0,037$ ). Danach sinkt der FFS-Spiegel wieder deutlich und erreicht abends mit 0,571 mmol/l um 20:00 Uhr wieder nahezu den Wert (0,584 mmol/l) am Morgen (8:30 Uhr).

### **3.3 $\beta$ -Hydroxybutyrat-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)**

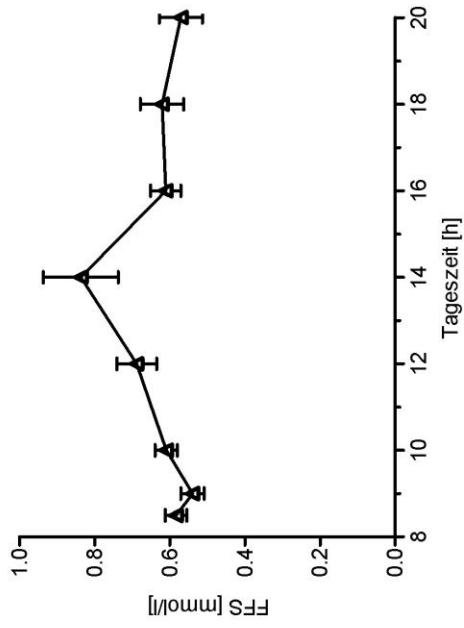
Die  $\beta$ HB-Konzentrationskurve steigt über den Tag kontinuierlich an (s. Abb. E10, Tab. A1). Der 20:00-Uhr-Wert ist mit 8,69 mmol/l um 348 % größer als der 9:00 Uhr-Wert (8:30- (n=15) zu 20:00-Uhr-Wert (n=8):  $p=0,0016$ ; 9:00- (n=5) zu 20:00-Uhr-Wert (n=8):  $p=0,0093$ ). Auffallend ist zudem der „Knick“ im Kurvenverlauf zwischen 8:30 Uhr und 9:00 Uhr. Die  $\beta$ HB-Werte fallen dort signifikant ( $p=0,0335$ ) von 4,3 mmol/l um 8:30 Uhr um 42 % auf 2,5 mmol/l um 9:00 Uhr ab, um danach wie beschrieben anzusteigen. Ein ähnlicher Knick im Verlauf fällt auch bei der Harnsäure-Kurve auf (siehe IV 3.4).

### **3.4 Harnsäure-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)**

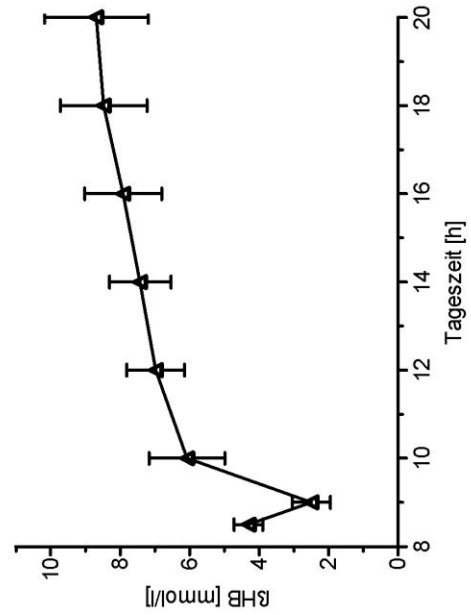
Die Kurve verläuft insgesamt relativ stabil (s. Abb. E11, Tab. A1) mit einem geringgradigem, nicht signifikanten Anstieg von 402,9 mmol/l um 8:30 Uhr auf 425,2 mmol/l um 18:00 Uhr. Ähnlich wie in der  $\beta$ HB-Konzentrationskurve zeigt der Kurvenverlauf um 9:00 Uhr mit 323,2 mmol/l einen zum 18:00-Uhr-Wert signifikanten Abfall (9:00- (n=5) zu 18:00-Uhr-Wert (n=8):  $p=0,039$ ).



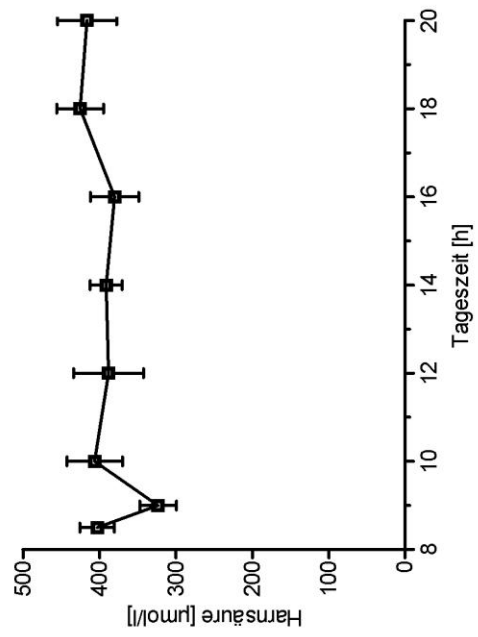
**Abb. E8:** Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Glukosekonzentration im Blutplasma unter der Versuchsbedingung „hungrnd und unter Phlorizineinfluss“



**Abb. E9:** Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) FFS-Konzentration im Blutplasma unter der Versuchsbedingung „hungrnd und unter Phlorizineinfluss“



**Abb. E10:** Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE)  $\beta$ HB-Konzentration im Blutplasma unter der Versuchsbedingung „hungrnd und unter Phlorizineinfluss“



**Abb. E11:** Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Harnsäure-Konzentration im Blutplasma unter der Versuchsbedingung „hungrnd und unter Phlorizineinfluss“

### 3.5 Insulin-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)

Hier finden sich etwas höhere Werte am Morgen (s. Abb. E12, Tab. A1) mit 0,61 µg/l um 9:00 Uhr und am späten Nachmittag (0,44 µg/l um 18:00 Uhr) sowie dazwischen ein Minimum um 14:00 Uhr mit 0,19 µg/l. Die Konzentrationsunterschiede sind jedoch nicht signifikant.

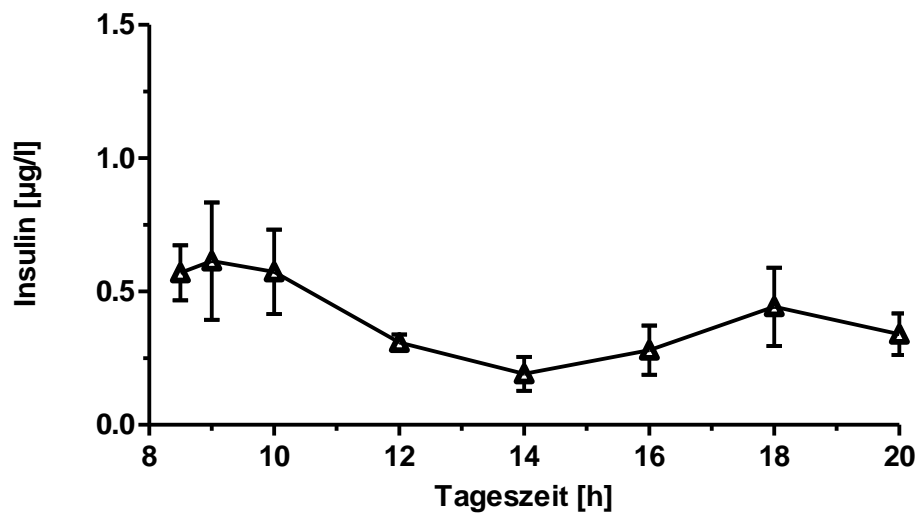


Abb. E12: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Insulinkonzentration unter der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“

### 3.6 Glucagon-Tagesprofil bei der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)

Der Konzentrationsverlauf von Glucagon scheint weitgehend stabil (s. Abb. E13, Tab. A1), mit nicht signifikanten „Ausschlägen“ nach oben um 9:00 (506,9 ng/l) und um 14:00 Uhr (552,2 ng/l). Allerdings ist die Konzentration um 8:30 (433,4 ng/l) und um 12:00 Uhr (440,1 ng/l) signifikant niedriger als die Endkonzentration um 20:00 Uhr mit 562,2 ng/l ( $p=0,011$  und  $p=0,006$ )

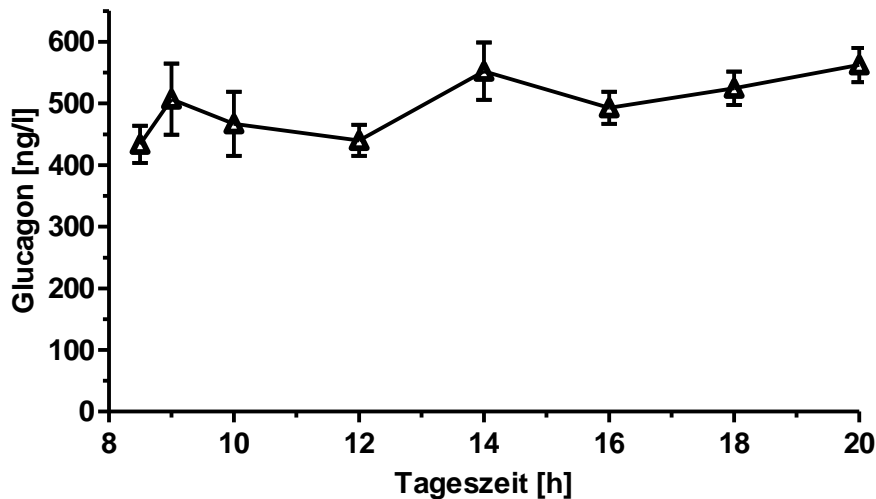


Abb. E13: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Glucagonkonzentration unter der Versuchsbedingung „hungernd und unter Phlorizineinfluss“

#### 4. Vergleich der Tagesprofile von Metaboliten und Hormonen bei den drei Versuchsbedingungen („nüchtern“, „hungernd“, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“

##### 4.1 Glucose-Tagesprofile

Im Gesamtverlauf der Blutglucose der Profile deuten sich Niveau-Unterschiede (s. Abb. E14, Tab. A1 und A2) mit dem meist höheren Glucoseniveau bei den PrH-Tieren und einem, mehrheitlich ähnlichem, niedrigerem Niveau bei den PrN- und den PrHP-Tieren an. Signifikant ist dieser Konzentrationsunterschied zumindest zwischen PrH- und PrHP-Tieren. Die Berechnung der Flächen (AUC) zeigt, dass die AUC unter dem H-Tagesprofil signifikant um knapp 10 % größer ist als die unter dem HP-Profil (siehe Tab. A2).

Beim Vergleich von Einzelmittelwerten zu bestimmten Tageszeiten zeigen sich zwischen den PrH-Tieren und den PrN- bzw. PrHP-Tieren nur um 9, 12, und 14 Uhr signifikante Unterschiede (siehe Tab. A2): Höchste Werte haben um 9 Uhr die HP-Tiere, während um 12 und um 14 Uhr die H-Tiere die signifikant höheren Werte aufweisen.

Um 16, 18 und 20 Uhr sind die drei Versuchsspezifischen Glucose-Mittelwerte nicht signifikant unterschiedlich.

Auffällig ist, dass um 9:00 Uhr die PrHP-Tiere mit 13,19 mmol/l den signifikant höheren Glucosespiegel aufweisen. Der 8:30-Uhr-Wert der drei Tagesprofile ist dagegen nicht signifikant verschieden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Obwohl sich die drei Versuchsbedingungen in ihren katabolen Auswirkungen ( $N < H < HP$ ) deutlich unterscheiden sollten, zeigt sich überraschenderweise bei den „hungernden“ Tieren im Tagesverlauf überwiegend das signifikant höchste Glucoseniveau. Die PrHP-Tiere zeigen zwar erwartungsgemäß im Tagesverlauf meist ein deutlich abgesenktes Glucoseniveau, das aber erstaunlicherweise auch von den PrN-Tieren erreicht bzw. sogar tendenziell unterschritten wird.

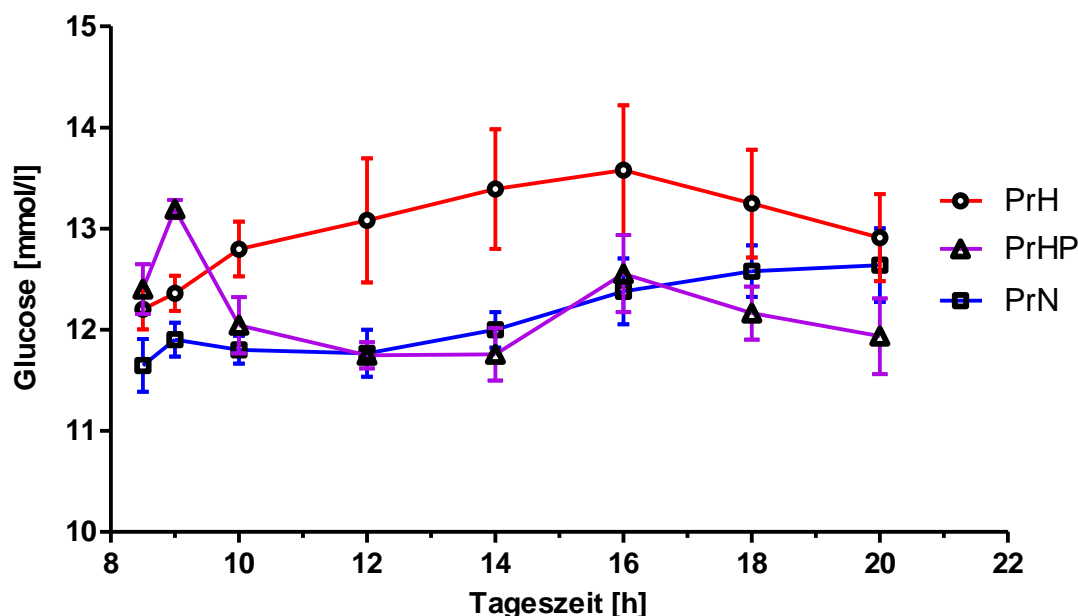


Abb. E14: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Glucosekonzentration im Blutplasma unter den drei Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H) und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)

#### 4.2 Freie Fettsäuren-Tagesprofil

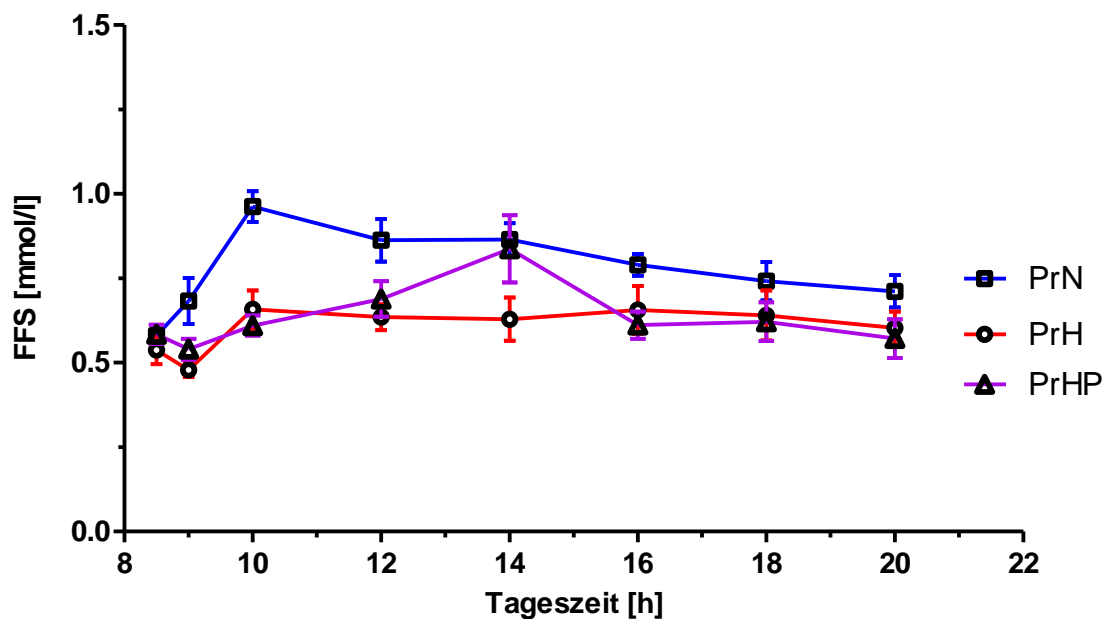
Ähnlich wie bei der Blutglucose entspricht der Verlauf der mittleren FFS-Konzentration nicht den Erwartungen (s. Abb. E15, Tab. A1 und A2). So ist auffallend, dass die FFS-Tagesprofil-Werte der PrH-Tiere und der PrHP-Tiere vom Niveau her gesehen meist nahe beieinander und deutlich niedriger als bei den PrN-Tieren liegen.

Ein Vergleich der AUC (siehe Tab. A2) unterstreicht diesen Umstand, indem er zeigt, dass die PrH-Tiere eine (um 20 %) signifikant kleinere Fläche unter dem Tagesprofil aufweisen als die PrN-Tiere ( $p < 0,05$ ). Die Fläche der PrHP-Tiere ist allerdings nicht signifikant kleiner.



Ähnliches zeigt auch ein Vergleich der Mittelwerte um 9, 10 und 12 Uhr, die bei den N-Tieren um ca. 25 %, 34 % und 23 % signifikant höher liegen als bei den PrH- und PrHP-Tieren.

Nur bei den PrN-Tieren zeigt sich eine auffallende Dynamik bzw. Umorientierung im Konzentrationsverlauf der FFS, mit einem morgendlichen Anstieg (8:30 Uhr: 0,58 mmol/l; 10:00 Uhr: 0,963 mmol/l) und einem darauffolgenden kontinuierlichen Abfall (auf 0,711 mmol/l um 20 Uhr). Der FFS-Konzentrationsverlauf der H- und insbesondere der HP-Tiere zeigt zwar um 9 Uhr und um 14 Uhr eine gewisse vorübergehende Unruhe, mit Abfall bzw. Anstieg, bleibt aber zu den übrigen Zeiten plateauartig stabil.



**Abb. E15:** Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) FFS-Konzentration im Blutplasma unter den drei Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H) und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)

#### 4.3 $\beta$ -Hydroxybutyrat-Tagesprofil

Die mittlere  $\beta$ HB-Konzentrationskurven in den Versuchen PrN und PrH verlaufen vom Niveau und der plateauartigen Verlaufsform her gesehen sehr ähnlich bei durchschnittlich 1,97 mmol/l für die PrN-Tiere und 2,4 mmol/l für die PrH-Tiere (s. Abb. E16, Tab. A1 und A2). Dagegen zeigt die von Beginn (8:30 Uhr) an im Niveau höhere PrHP- $\beta$ HB-Kurve einen signifikanten Anstieg auf etwas mehr als das Doppelte (von 4,3 mmol/l um 8:30 Uhr auf 8,69 mmol/l um 20 Uhr;  $p=0,0016$ ) und liegt damit (ausgenommen der 9-Uhr-Wert) immer signifikant höher als die  $\beta$ HB-Kurven der anderen beiden Behandlungsgruppen.

Auch die AUC der PrN- und der PrH-Tiere erreichen nur etwas 30 % der AUC der PrHP-Tiere ( $p=0,0004$ ).

Viertägiges Hungern allein führt demnach nicht zu einem starken Anstieg der  $\beta$ HB-Konzentration. Allein die zusätzliche Glucosurie nimmt einen markanten Einfluss insbesondere auf das Niveau und den Verlauf von  $\beta$ HB.

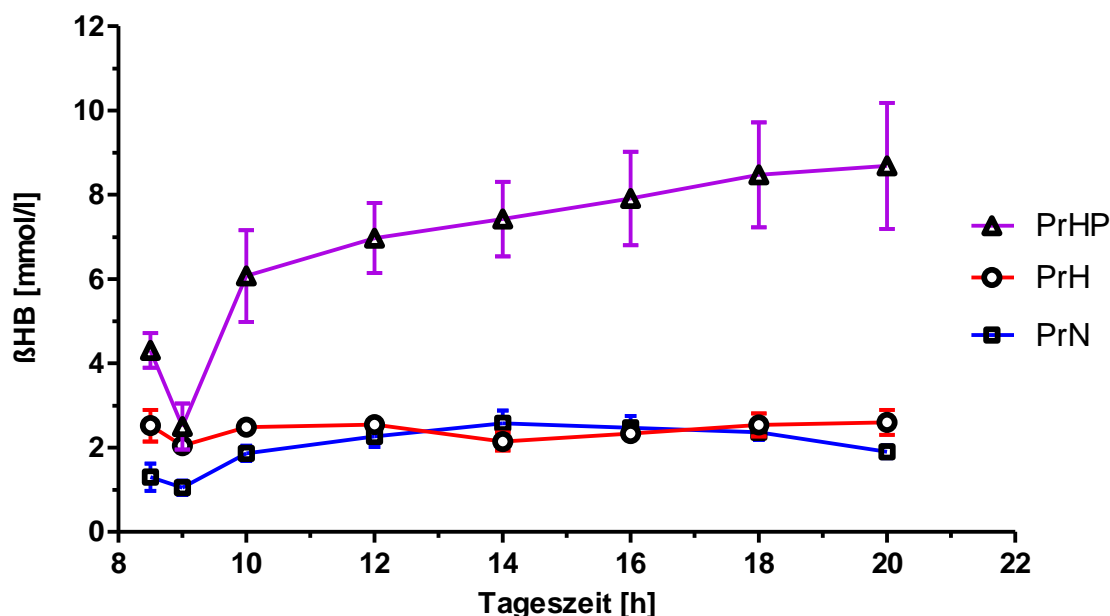


Abb. E16: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE)  $\beta$ HB-Konzentration im Blutplasma unter den drei Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H) und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)

#### 4.4 Harnsäure-Tagesprofil

Die mittlere Harnsäure-Konzentrationskurve der PrN-Tiere verläuft weitgehend plateauartig stabil (s. Abb. E17, Tab. A1 und A2), während bei den beiden anderen Behandlungsgruppen etwas mehr „Unruhe“ im sonst ebenfalls plateauartigen Verlauf (PrH-Tiere um 16 Uhr ein Abfall und im Verlauf der PrHP-Tiere um 18 und um 20 Uhr ein Anstieg) zu verzeichnen ist.

Das Niveau der Konzentrationskurve der PrN-Tiere ist am niedrigsten, gefolgt von den PrH-Tieren, während die Kurve der PrHP-Tiere das höchste Niveau aufweist.

Ausgenommen der Zeitpunkt 9 Uhr sind die Werte der PrN-Tiere auch immer signifikant niedriger als die der PrHP-Tiere (s. Tab. A1 und A2). Im Vergleich mit den PrH-Tieren erreichen die N-Tiere lediglich zu den Zeitpunkten 9, 12, 14 und 20 Uhr signifikant niedrigere Harnsäure-Konzentrationswerte.

Die Harnsäure-Konzentrationskurve der PrHP-Tiere verläuft zwar höher als die der PrH-Tiere, der Unterschied ist aber lediglich zum Zeitpunkt 16 Uhr signifikant.

Ähnlich wie im FFS-Konzentrationsverlauf fällt die Kurve der PrHP-Tiere um 9 Uhr ab. Der Unterschied ist aber lediglich zum 18-Uhr-Wert signifikant ( $p=0,039$ ). Die beiden anderen Gruppen zeigen keinen vergleichbaren Abfall.

Die AUC der PrN-Tiere beträgt nur die Hälfte der Fläche der PrHP-Tiere ( $p<0,001$ ) und nur zwei Drittel der Fläche der PrH-Tiere ( $p<0,05$ ).

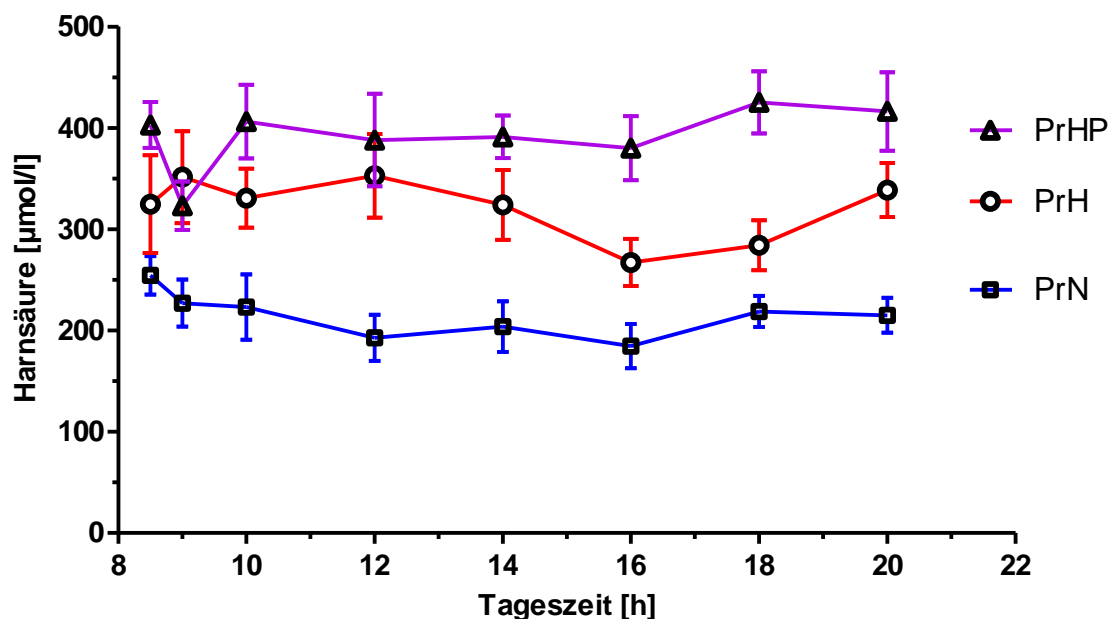


Abb. E17: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Harnsäurekonzentration im Blutplasma unter den drei Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H) und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)

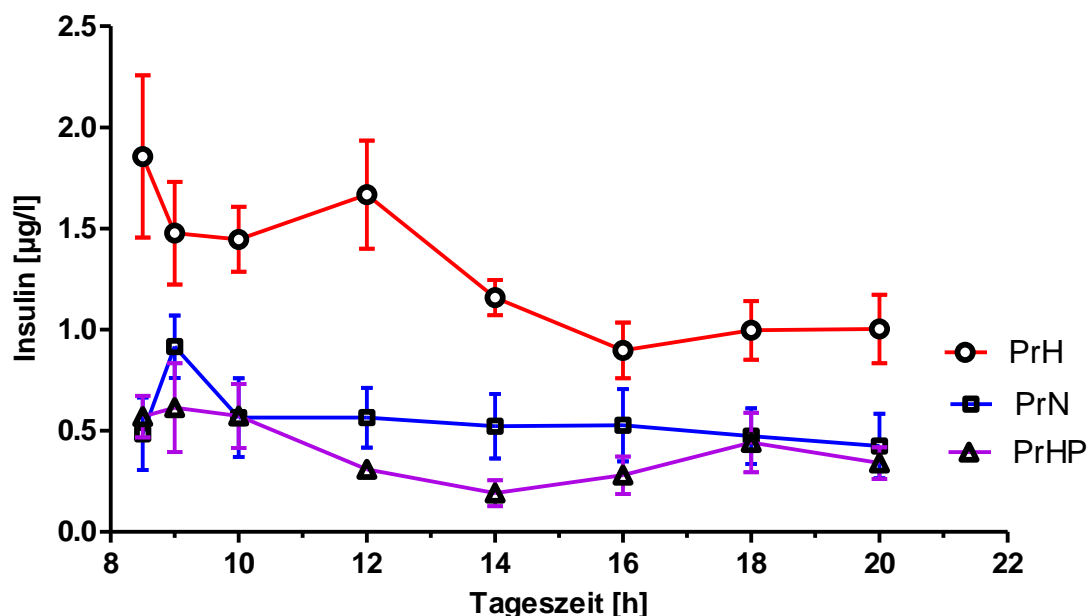
#### 4.5 Insulin-Tagesprofil

Die Insulin-Konzentrationskurven der PrN-Tiere und der PrHP-Tiere verlaufen weitgehend plateauartig (s. Abb. E18, Tab. A1 und A2) bis auf einen vorübergehenden Anstieg um 9 Uhr (9- und 20-Uhr-Wert:  $p=0,047$ ) bei den PrN-Tieren und einem vorübergehenden Abfall um 14 Uhr (nicht signifikant) bei den PrHP-Tiere. Es gibt zu keinem Zeitpunkt signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Die Insulin-Konzentrationskurve der PrH-Tiere verläuft stufenartig abnehmend mit höheren Werten am Vormittag und den niedrigsten Werten am Nachmittag. Sie liegt damit (mit Ausnahme des 16-Uhr-Werts) signifikant höher als der Konzentrationsverlauf der beiden anderen Gruppen. Um 16 Uhr unterscheiden sich die mittleren

Insulinkonzentrationen der PrH- und die PrN-Tiere nicht, während die PrHP-Tiere mit 0,28 µg/l einen signifikant niedrigeren Wert als die PrH-Tiere aufweisen ( $p < 0,05$ ).

Die AUC der PrN- und der PrHP-Tiere unterscheiden sich nicht. Die AUC der PrH-Tiere ist etwa doppelt so groß wie die der PrN-Tiere ( $p < 0,01$ ) und ca. dreimal so groß wie die der PrHP-Tiere ( $p < 0,001$ ).



**Abb. E18: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Insulinkonzentration im Blutplasma unter den drei Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H) und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)**

#### 4.6 Glucagon-Tagesprofil

Die Glucagon-Konzentrationsverläufe der PrH- und der PrHP-Gruppe gleichen sich im Niveau (s. Abb. E19, Tab. A1 und A2) und in ihrer Tendenz zum Abend hin anzusteigen, während die PrN-Tiere am Morgen höhere Werte aufweisen und zum Abend hin abfallen. Dabei haben sie um 8:30 mit 685,6 ng/l signifikant ( $p < 0,05$  im Vergleich zu den PrH-Tieren;  $p < 0,01$  im Vergleich zu den PrHP-Tieren) höhere Glucagonwerte, sowie um 20 Uhr mit 399,8 signifikant ( $p < 0,01$ ) niedrigere Werte als die beiden anderen Gruppen (s. Tab. A1, A2).

Zum Zeitpunkt 12 Uhr erreichen die PrN-Tiere zudem mit 630 ng/l einen signifikant ( $p < 0,05$ ) um etwa 30 % höheren Glucagonwert als die PrHP-Tiere.

Um 9, 10, 14, 16 und 18 Uhr sind die Konzentrationsunterschiede nicht signifikant. Auch die AUC der drei Versuchsgruppen unterscheiden sich nicht.

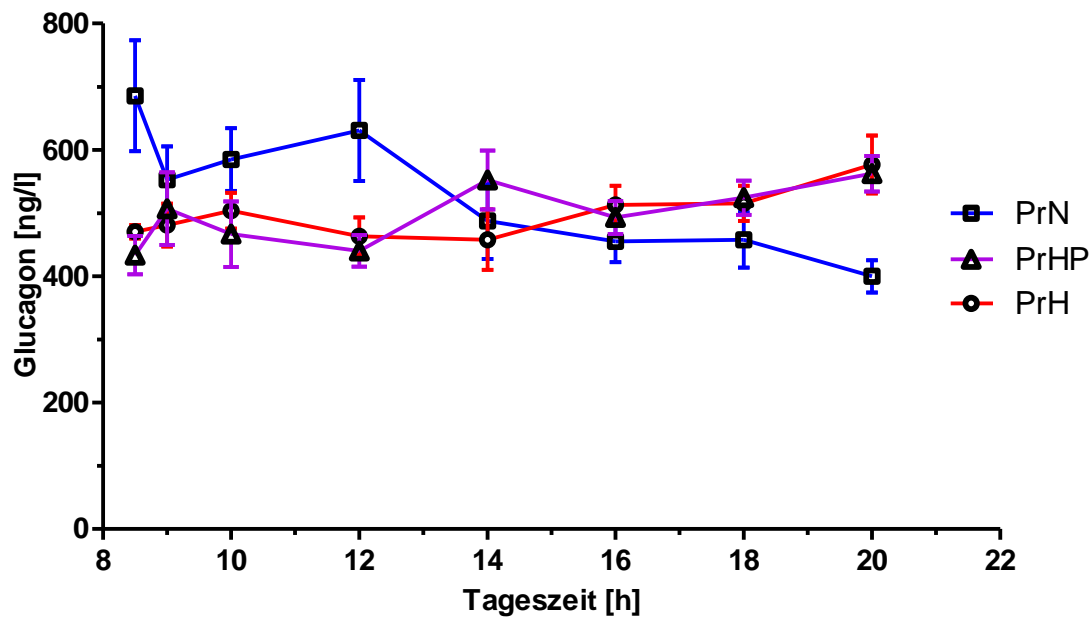


Abb. E19: Tagesprofil der mittleren ( $\pm$ SE) Glucagonkonzentration im Blutplasma unter den drei Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H) und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)

##### 5. Metabolit- und Hormonkonzentrationsverlauf nach i.v. Glucose- oder Kochsalz-Kurzzeitapplikationen bei den gegebenen Versuchsbedingungen „nüchtern“, „hungernd“ sowie „hungernd und unter Phlorizineinfluss“

Im folgenden Abschnitt werden die bei den drei vorgegebenen Versuchsbedingungen jeweils durch i.v. Glucose- (GTT) bzw. Kochsalzapplikation (Kontrolle K) induzierten Konzentrationsverläufe der vorgegebenen Parameter dargestellt und auf signifikante Unterschiede zu den einzelnen Messzeitpunkten untersucht. Jeder Teilversuch (Glucose- oder Kochsalzapplikation) wird bei den gegebenen Versuchsbedingungen auch für sich allein betrachtet, indem alle erfassten Parameter in ihrem zeitabhängigen Konzentrationsverlauf vorgestellt werden und statistisch bewertet werden.

## **5.1 i.v. Glucose-Injektion (GTT) versus i.v. NaCl-Injektion (Kontrolle K) bei „nüchternen“ Tieren**

### **5.1.1 Mittlerer Glucosekonzentrationsverlauf nach dem GTTN**

Der Verlauf der mittleren Glucosekonzentration der Kontrolltiere zeigt sich weitgehend stabil plateauartig (s. Abb. E20, Tab. A3 und A4). Das mittlere Niveau zwischen 0 und 60 Minuten liegt bei 12,19 mmol/l.

Bei den GTTN-Tieren erreicht die Glucosekonzentration einen Gipfel von 26,21 mmol/l (216 % des Nullwertes) nach 5 Minuten ( $p < 0,0001$ , Tab. A4). Danach fällt die Kurve stark ab, sodass zum Zeitpunkt 30 min p.i. wieder das Kontrollniveau von 13,09 mmol/l erreicht ist ( $p = 0,3287$ ).

Die Halbwertszeit der Glucoseelimination beträgt 8,64 min.

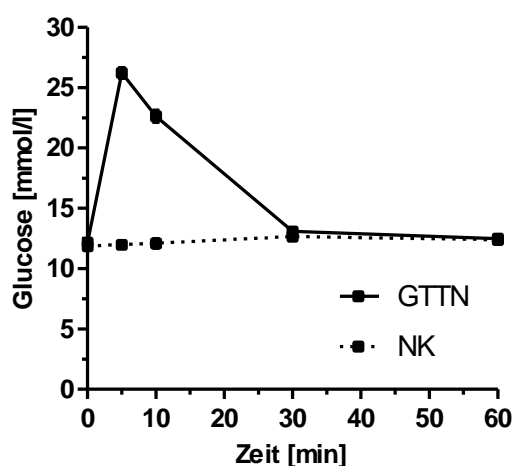
Die AUC von Glucose- und Kontrolltieren sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0,0001$ ), wobei die Fläche der Glucosetiere das 1,3-fache der Fläche der Kontrolltiere beträgt.

### **5.1.2 Mittlerer Freie Fettsäuren-Konzentrationsverlauf nach dem GTTN**

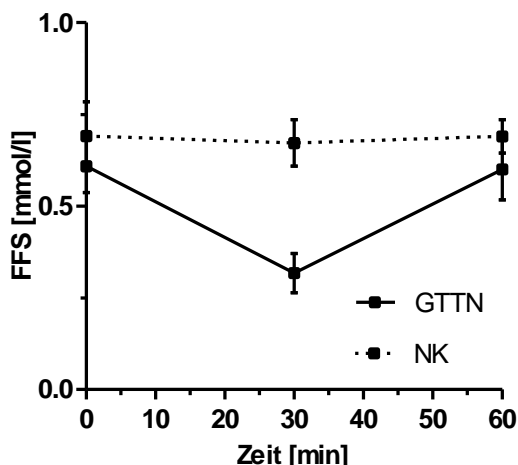
Bei den Kontrolltieren liegt das plateauartige FFS-Konzentrationsniveau im Mittel bei 0,684 mmol/l (s. Abb. E21, Tab. A3 und A4).

Zum Zeitpunkt 30 min p.i. fällt der Wert der FFS der GTTN-Tiere von anfangs 0,609 mmol/l um etwa die Hälfte auf 0,318 mmol/l ab ( $p = 0,004$ ). Zum Zeitpunkt 60 min p.i. sind mit 0,6 mmol/l wieder Ausgangswerte erreicht. Die Anfangs- und Endwerte der GTTN-Tiere sind niedriger als die der Kontrolltiere, der Unterschied ist aber nicht signifikant ( $p = 0,4924$  und  $p = 0,3795$ ).

Die AUC der GTTN-Tiere ist um das 1,6-fache kleiner als die der Kontrolltiere ( $p = 0,005$ ).



**Abb. E20: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Blutglucose ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren**



**Abb. E21: Mittlerer Konzentrationsverlauf der FFS ( $\pm$ SE) im Blutplasma nach i.v. Glucoseinjektion (GTTN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren**

### 5.1.3 Mittlerer $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentrationsverlauf nach dem GTTN

Die  $\beta$ HB-Konzentrationskurve der Kontrolltiere steigt innerhalb des Beobachtungszeitraums leicht an (s. Abb. E22, Tab. A3 und A4), und zwar von 1,21 mmol/l auf 1,32 mmol/l. Der Unterschied ist aber nicht signifikant ( $p=0,6821$ ).

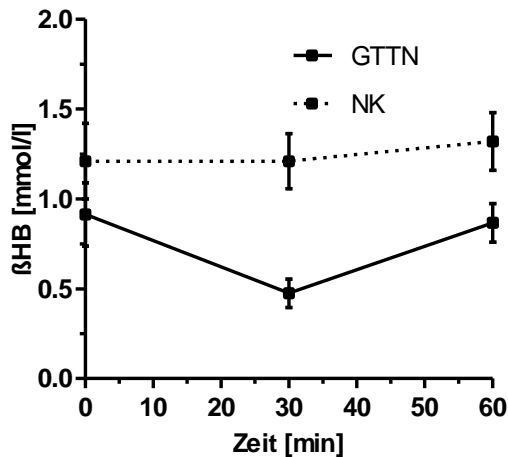
Der Anfangswert der GTTN-Tiere ist mit 0,91 mmol/l niedriger als der Wert der Kontrolltiere, der Unterschied ist aber nicht signifikant ( $p=0,2907$ ). Zum Zeitpunkt 30 min nach der Glucoseinjektion fällt die  $\beta$ HB-Konzentration auf 0,48 mmol/l (ca. 50 % des Ausgangswertes von 0,9 mmol/l) ab ( $p$ -W=0,001). Nach weiteren 30 Minuten ist der Basiswert der GTTN-Tiere wieder erreicht ( $p=0,8191$ ). Aufgrund des ansteigenden Verlaufs der Kontrollkurve errechnet sich jedoch zum Zeitpunkt 60 min p.i. ein signifikanter Unterschied zwischen den GTTN- und den Kontrolltieren ( $p=0,025$ ).

Die AUC der GTTN-Tiere ist um die Hälfte kleiner als die der Kontrolltiere ( $p=0,002$ ).

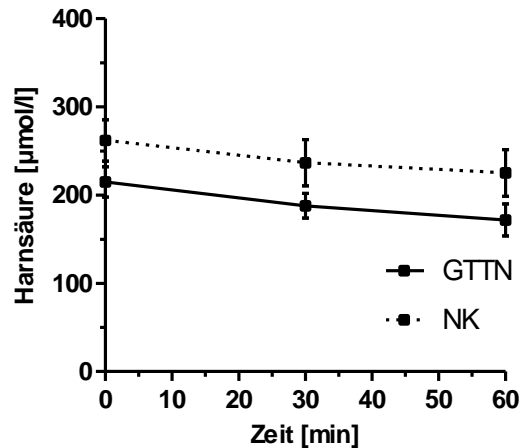
### 5.1.4 Mittlerer Harnsäure-Konzentrationsverlauf nach dem GTTN

Beide Harnsäure-Konzentrationskurven zeigen auf unterschiedlichem Niveau einen parallelen, stetig absteigenden Verlauf (s. Abb. E23, Tab. A3 und A4). Dabei werden die Werte der Kontrolltiere um 14,1 % niedriger (von 262,1 mmol/l auf 225,1 mmol/l), während die Werte der GTTN-Tiere (von 214,9 mmol/l auf 171,8 mmol/l) um 20,1 %

abfallen. Es finden sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zum Kontrollkonzentrationsverlauf (s. Tab. A4), auch wenn die Kurve der GTTN-Tiere, vom Niveau her gesehen um 76 % bis 82 % niedriger liegt als die Kurve der Kontrolltiere. Die beiden AUC sind ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,059$ ).



**Abb. E22: Mittlerer Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren**



**Abb. E23: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren**

### 5.1.5 Mittlerer Insulin-Konzentrationsverlauf nach dem GTTN

Die Insulin-Konzentrationskurve der Kontrolltiere verläuft weitgehend stabil, bei im Mittel  $0,41 \mu\text{g/l}$ , zeigt aber einen einzelnen vorübergehenden Abfall auf  $0,21 \mu\text{g/l}$  nach 5 Minuten (s. Abb. E24, Tab. A3 und A4). Dieser Konzentrationsunterschied ist jedoch nicht signifikant, weder zum Nullwert ( $p=0,0509$ ), noch zum 10-Minutenwert ( $p=0,6694$ ).

5 Minuten nach der Glucoseinjektion steigt die mittlere Insulinkonzentration der GTTN-Tiere von  $0,93 \mu\text{g/l}$  um 440 % auf  $4,1 \mu\text{g/l}$  ( $p<0,0001$ ). Nach einer kurzen Plateauphase 5-10 min p.i. fällt der Insulinspiegel steil ab und erreicht 30 min p.i. mit  $0,61 \mu\text{g/l}$  wieder das Ausgangsniveau ( $p=0,473$ ).

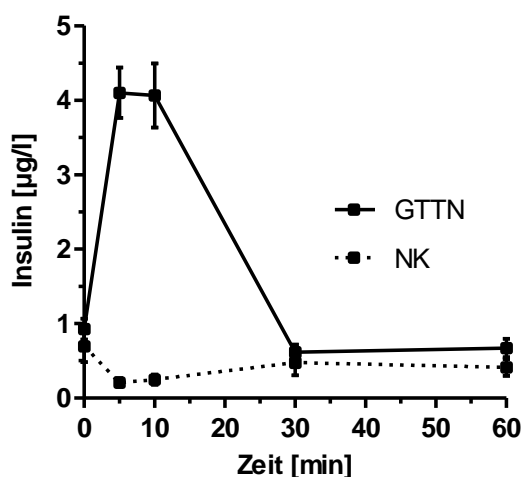
Die AUC der GTTN-Tiere ist signifikant etwas mehr als doppelt so groß wie die AUC der Kontrolltiere ( $p=0,001$ ).



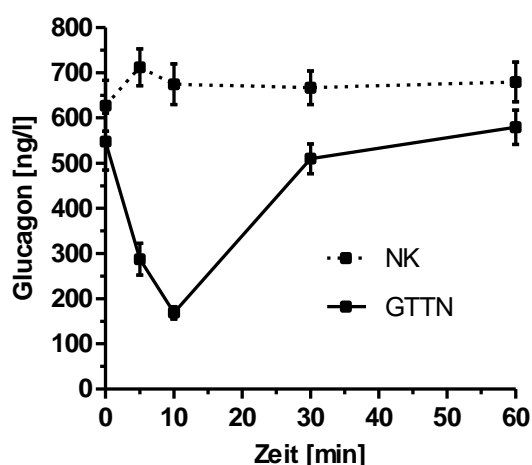
### 5.1.6 Mittlerer Glucagon-Konzentrationsverlauf nach dem GTTN

Der Kurvenverlauf der mittleren Glucagonkonzentration der Kontrolltiere ist leicht ansteigend von 626,8 ng/l zum Zeitpunkt 0 auf 679,7 ng/l zum Zeitpunkt 60 (s. Abb. E25, Tab. A3 und A4). Auffallend ist der kleine Konzentrations-Gipfel 5 min p.i. mit 712,3 ng/l, der aber nicht signifikant ist ( $p=0,2455$  im Vergleich mit 0-Wert;  $p=0,5463$  im Vergleich mit 10-Minutenwert).

Die Werte der GTTN-Tiere liegen im Mittel mit 547,6 ng/l zum Zeitpunkt 0 niedriger als die der Kontrolltiere, der Unterschied ist aber nicht signifikant ( $p=0,3634$ ). 10 min p.i. sind die Glucagonwerte im Mittel auf ein Minimum von 168,9 ng/l ( $p<0,0001$ ) gesunken. Nach einem steilen Wiederanstieg gibt es 30 min p.i. mit 509,7 ng/l keinen signifikanten Unterschied mehr zum 0-Wert der GTTN-Tiere ( $p=0,5999$ ). 60 min p.i. findet sich auch kein signifikanter Unterschied mehr zum Mittelwert der Kontrolltiere. Die AUC der GTTN-Tiere ist nur halb so groß wie die AUC der Kontrolltiere ( $p=0,03$ ).



**Abb. E24:** Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren



**Abb. E25:** Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren

## **5.2 i.v. Glucose-Injektion (GTT) versus i.v. NaCl-Injektion (Kontrolle K) bei „hungernden“ Tieren**

### **5.2.1 Mittlerer Glucosekonzentrationsverlauf nach dem GTTH**

Die mittlere Glucosekonzentration der Kontrolltiere verläuft plateauartig bei im Mittel 12,89 mmol/l (s. Abb. E26, Tab. A3 und A4).

Die Blutglucosekonzentration steigt bei den GTTH-Tieren 5 min p.i. um 234 % auf ein Maximum von 28,7 mmol/l an und fällt anschließend steil ab. Zum Zeitpunkt 30 liegt der Mittelwert der GTTH-Tiere mit 15,77 mmol/l jedoch noch signifikant höher als der zeitgleiche Wert der Kontrolltiere ( $p < 0,0001$ ).

Erst mit dem 60-Minuten-Glucosewert ist das Ausgangs (0 min)- und Kontrollniveau wieder erreicht ( $p = 0,6278$ ).

Die Halbwertszeit der Glucoseelimination beträgt 12,47 min.

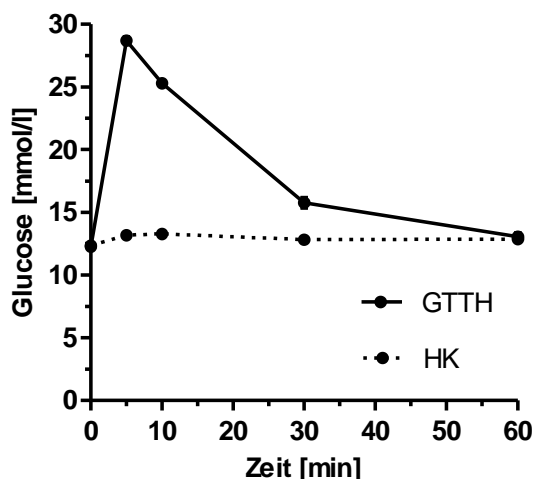
Die AUC der Glucosetiere ist um das 1,3-fache größer als die AUC der Kontrolltiere ( $pM-W = 0,0028$ ).

### **5.2.2 Mittlerer Freie Fettsäuren-Konzentrationsverlauf im GTTH**

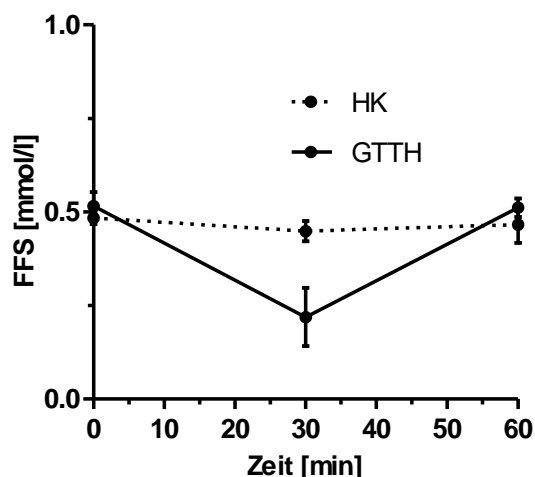
Die FFS-Konzentrationskurve der Kontrolltiere verläuft stabil bei im Mittel 0,466 mmol/l.

30 min p.i. ist die FFS-Konzentration der GTTN-Tiere signifikant von 0,515 mmol/l um 58 % auf 0,219 mmol/l gesunken ( $p = 0,0128$ ), um dann 60 min p.i. wieder den Ausgangswert zu erreichen ( $p = 0,4398$ ) (s. Abb. E27, Tab. A3 und A4).

Die AUC der GTTH-Tiere ist signifikant 30 % kleiner als die der Kontrolltiere ( $p = 0,048$ ).



**Abb. E26: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Blutglucose ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungernden“ Tieren**



**Abb. E27: Mittlerer Konzentrationsverlauf der FFS im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungernden“ Tieren**

### 5.2.3 Mittlerer $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentrationsverlauf nach dem GTTH

Der mittlere  $\beta$ HB-Konzentrationsverlauf der Kontrolltiere ist plateauartig bei durchschnittlich 2,19 mmol/l (s. Abb. E28, Tab. A3 und A4).

Die mittlere  $\beta$ HB-Konzentrationskurve der GTTH-Tiere startet bei einem sehr ähnlichen Ausgangswert von 2,21 mmol/l, fällt 30 min p.i. um fast 75 % auf 0,56 mmol/l ab ( $p$ -W=0,0002), steigt dann wieder an, ist aber nach einer weiteren halben Stunde (60 min p.i.) immer noch um ca. 40 % niedriger als die Kurve der Kontrolltiere ( $p$ -W=0,008).

Die AUC der GTTH-Tiere ist um 49 % kleiner als die AUC der Kontrolltiere ( $p$ =0,0001).

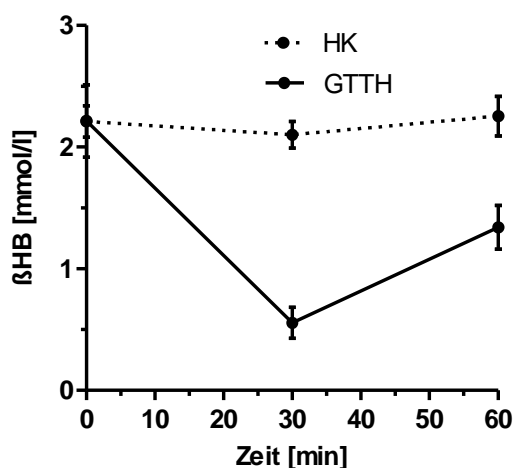
### 5.2.4 Mittlerer Harnsäurekonzentrationsverlauf nach dem GTTH

Die mittlere Harnsäure-Konzentrationskurve der Kontrolltiere zeigt einen tendenziell fallenden Verlauf von 283,5  $\mu$ mol/l zum Zeitpunkt 0 auf 219,6  $\mu$ mol/l zum Zeitpunkt 60 min. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ( $p$ =0,2236) (s. Abb. E29, Tab. A3 und A4).

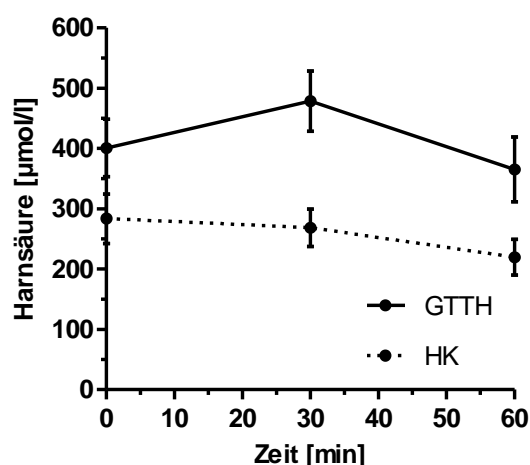
Die Harnsäure-Konzentrationskurve der GTTH-Tiere startet mit 400,7  $\mu$ mol/l zahlenmäßig höher als die Kurve der Kontrolltiere (nicht signifikant:  $p$ =0,0781) und zeigt zum Zeitpunkt 30 min p.i. zunächst einen ansteigenden (19,4 % auf 478,6  $\mu$ mol/l) und dann wieder abfallenden Verlauf (um 9 % auf 365,3  $\mu$ mol/l). Die zahlenmäßigen Unterschiede

innerhalb der Harnsäure-Konzentrationskurve sind jedoch nicht signifikant. Im Vergleich zum Harnsäure-Konzentrationsverlauf der Kontrolltiere sind die Harnsäurewerte der GTTH-Tiere zum Zeitpunkt 30 min signifikant um 78 % ( $p\text{-W}=0,001$ ) und zum Zeitpunkt 60 min signifikant um 66 % ( $p=0,0261$ ) erhöht.

Die AUC der GTTH-Tiere ist um 59 % größer als die der Kontrolltiere ( $p=0,022$ ).



**Abb. E28:** Mittlerer Konzentrationsverlauf von  $\beta\text{HB}$  im Blutplasma ( $\pm\text{SE}$ ) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungernden“ Tieren



**Abb. E29:** Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure im Blutplasma ( $\pm\text{SE}$ ) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungernden“ Tieren

### 5.2.5 Mittlerer Insulinkonzentrationsverlauf nach dem GTTH

Die mittlere Insulinkonzentration der Kontrolltiere fällt 5 min p.i. um 31 % von 1,69  $\mu\text{g/l}$  (0 min) auf 1,16  $\mu\text{g/l}$  ab (s. Abb. E30, Tab. A3 und A4). Dieser zahlenmäßige Unterschied ist aber nicht signifikant ( $p=0,1977$ ). Über den weiteren Beobachtungszeitraum bleibt die Insulinkonzentration stabil auf dem niedrigeren Niveau von im Mittel 1,13  $\mu\text{g/l}$ .

Die Konzentrationskurve der GTTH-Tiere steigt von 1,5  $\mu\text{g/l}$  steil um 300 % auf 4,61  $\mu\text{g/l}$  (5 min p.i.) an ( $p\text{-W}<0,0001$ ) und bleibt bis zum Zeitpunkt 10 min auf etwa demselben Niveau ( $p\text{-W}=0,0002$ ), um danach wieder abzufallen. 30 min p.i. ist der Ausgangswert mit 1,09  $\mu\text{g/l}$  wieder erreicht ( $p=0,9208$ ) und bleibt bis 60 min p.i. unverändert.

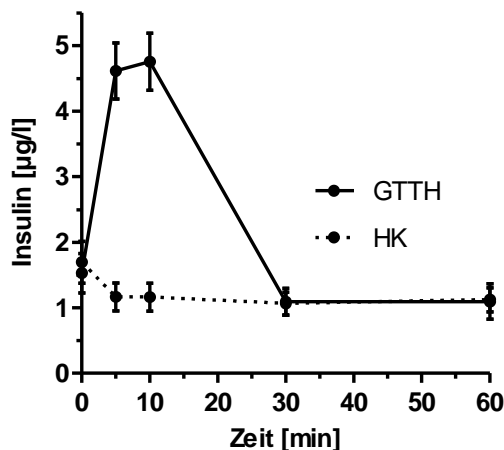
Die AUC der GTTH-Tiere ist doppelt so groß wie die AUC der Kontrolltiere ( $p=0,021$ ).

### 5.2.6 Mittlerer Glucagonkonzentrationsverlauf nach dem GTTH

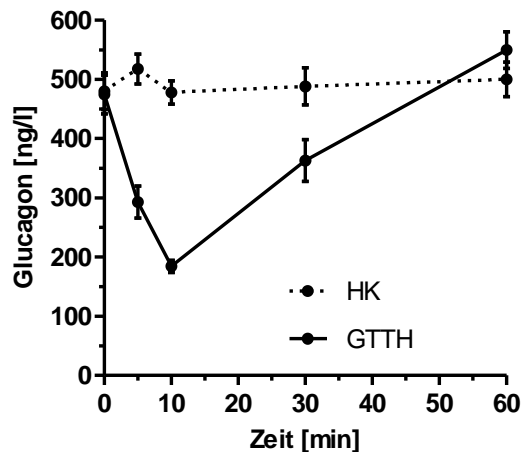
Ähnlich wie schon bei den nüchternen Kontrolltieren fällt bei den hungernden Kontrolltieren ein kleiner Glucagonkonzentrationspeak (von 480 ng/l bei 0 min auf 517,7 ng/l bei 5 min p.i.) im ansonsten stabil plateauartigen Verlauf der Kurve auf (s. Abb. E31, Tab. A3 und A4). Diese zahlenmäßige Veränderung ist aber nicht signifikant ( $p=0,3646$  im Vergleich zum Nullwert,  $p=0,2256$  im Vergleich zum 10-Minutenwert).

Die mittlere Glucagon-Konzentrationskurve der GTTH-Tiere fällt ausgehend vom Nullwert mit 474,6 ng/l um 61,2 % auf ein Minimum von 184,4 ng/l zum Zeitpunkt 10 Minuten ab ( $p<0,0001$ ). Mit dem darauf folgenden kontinuierlichen Anstieg erreicht die Kurve erst zum Zeitpunkt 60 min p.i. wieder den Ausgangswert ( $p=0,273$ ), zum Zeitpunkt 30 min sind die Glucagonwerte noch signifikant (knapp 26 %) niedriger als die Werte der Kontrolltiere ( $p=0,016$ ).

Die AUC der GTTH-Tiere beträgt 61 % der AUC der Kontrolltiere ( $p=0,002$ ).



**Abb. E30: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungernden“ Tieren**



**Abb. E31: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungernden“ Tieren**

### **5.3 i.v. Glucose-Injektion (GTT) versus i.v. NaCl-Injektion (Kontrolle K) bei „hungrigen“ Tieren „und unter Phlorizineinfluss“ (HP)**

#### **5.3.1 Mittlerer Glucosekonzentrationsverlauf nach dem GTTHP**

Die mittlere Glucosekonzentrationskurve der Kontrolltiere verläuft plateauartig stabil bei durchschnittlich 12,92 mmol/l (s. Abb. E32, Tab. A3 und A4).

Die Kurve der Glucosekonzentration der GTTHP-Tiere zeigt einen steilen Anstieg zum 5-Minutenwert und einen darauffolgenden etwas flacheren Abfall. Dabei steigen die Werte vom Nullwert mit 12,55 mmol/l um 240 % auf 30,08 mmol/l 5 min p.i. an ( $pM-W < 0,0001$ ). Anschließend fallen die Werte zunächst rasch und dann langsamer wieder ab, so dass 60 min p.i. mit 15,65 mmol/l ein Wert erreicht ist, der immer noch 21 % über dem zeitgleichen Kontroll-Glucosewert liegt ( $pM-W < 0,0001$ ).

Die Halbwertszeit der Glucoseelimination beträgt 12,3 min.

Die AUC der GTTHP-Tiere ist fast doppelt so groß wie die der Kontrolltiere ( $pM-W < 0,0001$ ).

#### **5.3.2 Mittlerer Freie Fettsäuren-Konzentrationsverlauf nach dem GTTHP**

Die mittleren FFS-Werte der Kontrolltiere verlaufen plateauartig bei durchschnittlich 0,533 mmol/l (s. Abb. E33, Tab. A3 und A4).

Bei den GTTHP-Tieren zeigt sich ein FFS-Konzentrationsabfall vom Startwert 0,586 mmol/l um 41 % auf 0,346 mmol/l 30 min p.i. ( $p = 0,0004$ ). Durch den nachfolgenden Wiederanstieg der FFS-Werte wird zum Zeitpunkt 60 mit 0,538 mmol/l wieder das Ausgangsniveau erreicht ( $pM-W = 1$ ).

Die AUC der GTTHP-Tiere ist überraschenderweise nicht signifikant unterschiedlich zu der AUC der Kontrolltiere (AUC der GTTHP-Tiere=27,78, AUC der Kontrolltiere=31,74;  $p = 0,08$ ).

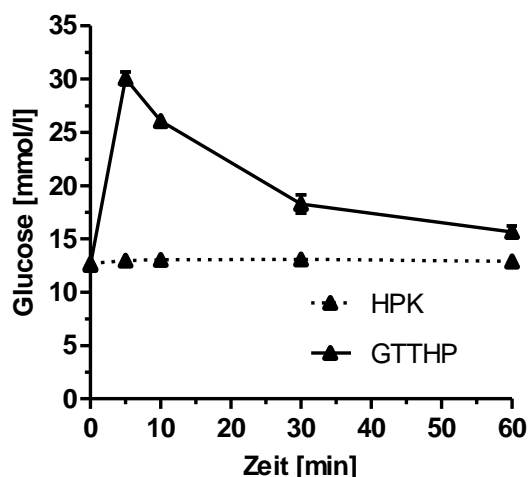


Abb. E32: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Blutglucose ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTHP) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HPK) bei „hungernden“ Tieren „und unter Phlorizineinfluss“

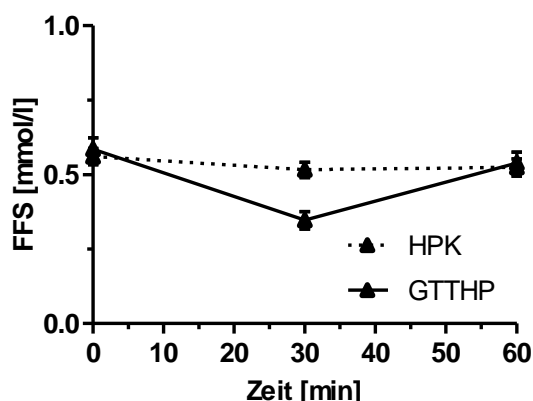


Abb. E33: Mittlerer Konzentrationsverlauf der FFS im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTHP) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HPK) bei „hungernden“ Tieren „und unter Phlorizineinfluss“

### 5.3.3 Mittlerer $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentrationsverlauf nach dem GTTHP

Die mittlere  $\beta$ HB-Konzentrationskurve der Kontrolltiere zeigt tendenziell zunächst einen Abfall (von 3,93 mmol/l auf 3,67 mmol/l) und einen Wiederanstieg (auf 4,1 mmol/l). Weder der Abfall noch der Anstieg sind signifikant (0-Wert vs 30-Wert:  $p=0,7674$ , 30-Wert vs 60-Wert:  $p=0,6176$ , 0-Wert vs 60-Wert:  $p=8467$ ) (s. Abb. E34, Tab. A3 und A4).

Bei den GTTHP-Tieren fallen die  $\beta$ HB-Werte innerhalb einer halben Stunde von 3,78 mmol/l signifikant um 40 % auf 2,17 mmol/l ab ( $p=0,048$ ) und steigen anschließend nur leicht wieder an auf 2,48 mmol/l zum Zeitpunkt 60. Die GTTHP-Tiere erreichen dadurch nicht den  $\beta$ HB-Ausgangswert und bleiben auch signifikant unter dem zeitgleichen Konzentrationsniveau der Kontrolltiere ( $p=0,027$ ).

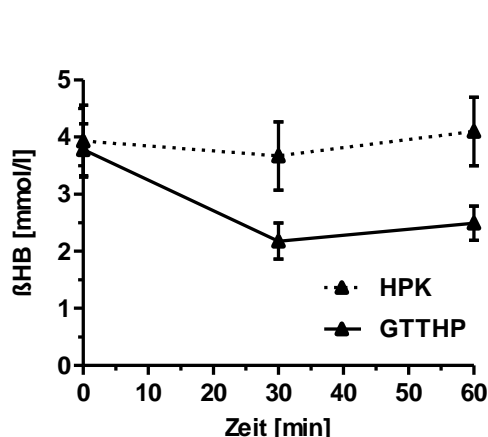
Die AUC der GTTHP-Tiere ist signifikant kleiner, sie beträgt nur 68 % der AUC der Kontrolltiere ( $p=0,0135$ ).

### 5.3.4 Mittlerer Harnsäurekonzentrationsverlauf nach dem GTTHP

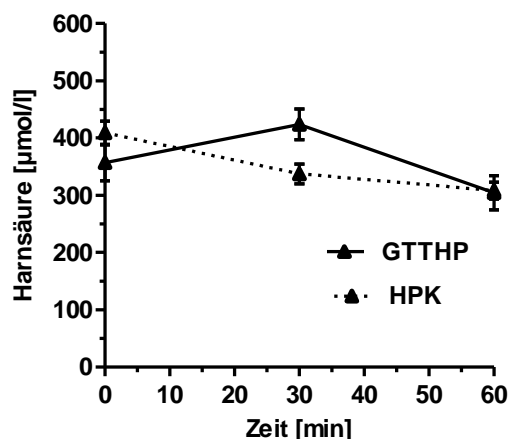
Die mittlere Harnsäurekonzentration der Kontrolltiere fällt im Verlauf einer Stunde signifikant von 408,7  $\mu$ mol/l um 25 % auf 308,2  $\mu$ mol/l ab ( $p=0,0009$ ) (s. Abb. E35, Tab. A3 und A4).

Die GTTHP-Tiere zeigen dagegen einen Harnsäure-Konzentrationspeak zum Zeitpunkt 30 min. Die Harnsäurekonzentration steigt zunächst von 357,2  $\mu\text{mol/l}$  um 15 % auf 423,7  $\mu\text{mol/l}$  an und erreicht nach einer weiteren halben Stunde wieder das Ausgangsniveau mit 304,5  $\mu\text{mol/l}$  ( $p\text{-W}=0,796$ ). Dieser Anstieg ist signifikant zum zeitgleichen Harnsäurewert der Kontrolltiere ( $p=0,014$ ), aber nicht zum Ausgangswert der GTTHP-Tiere ( $p=0,133$ ).

Die AUC beider Tiergruppen sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,485$ ).



**Abb. E34:** Mittlerer Konzentrationsverlauf von  $\beta\text{HB}$  im Blutplasma ( $\pm\text{SE}$ ) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTHP) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HPK) bei „hungernden“ Tieren „und unter Phlorizineinfluss“



**Abb. E35:** Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure im Blutplasma ( $\pm\text{SE}$ ) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTHP) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HPK) bei „hungernden“ Tieren „und unter Phlorizineinfluss“

### 5.3.5 Mittlerer Insulinkonzentrationsverlauf nach dem GTTHP

Die mittlere Insulin-Konzentrationskurve der Kontrolltiere zeigt nur geringe, nicht signifikante Schwankungen um den Nullwert (s. Abb. E36, Tab. A3 und A4).

Der mittlere Insulinspiegel der GTTHP-Tiere steigt in den ersten fünf Minuten von 0,53  $\mu\text{g/l}$  um 615 % auf 3,26  $\mu\text{g/l}$  an ( $p\text{-W}<0,0001$ ) und erreicht zum 10-Minutenwert schließlich mit 3,96  $\mu\text{g/l}$  747 % des Nullwerts ( $p\text{-W}<0,0001$ ). Nach weiteren zwanzig Minuten fällt die mittlere Insulinkonzentration wieder auf das Niveau der Kontrolltiere ( $p=0,83$ ) ab. Dieses Niveau ist allerdings immer noch signifikant höher als der Nullwert der GTTHP-Tiere ( $n\text{T}=10$ ,  $p=0,023$ ).

Die AUC der GTTHP-Tiere ist sechsmal so groß wie die der Kontrolltiere ( $p=0,0001$ ).



### 5.3.6 Mittlerer Glucagonkonzentrationsverlauf nach dem GTTHP

Der mittlere Glucagonspiegel der Kontrolltiere verläuft plateauartig bei durchschnittlich 471,3 ng/l mit einem kleinen (nicht signifikanten) Gipfel (493,6 ng/l) zum Zeitpunkt 5 min. Die Glucagon-Konzentrationskurve der GTTHP-Tiere fällt steil auf ein Minimum zum Zeitpunkt 10 min ab und erreicht dadurch mit 100,9 ng/l nur 23 % des Nullwertes von 442,9 ng/l ( $pM-W < 0,0001$ ) (s. Abb. E37, Tab. A3 und A4). Zum Zeitpunkt 30 steigt die Glucagonkonzentration wieder langsam an, ist aber mit 257,1 ng/l immer noch um 42 % niedriger als der Ausgangswert ( $pM-W = 0,003$ ). Insgesamt eine Stunde nach der Glucosegabe findet sich kein signifikanter Unterschied mehr zum Glucagonkonzentrationsniveau der Kontrolltiere ( $p = 0,053$ ). Die AUC der GTTHP-Tiere ist nur halb so groß wie die AUC der Kontrolltiere ( $p < 0,0001$ ).

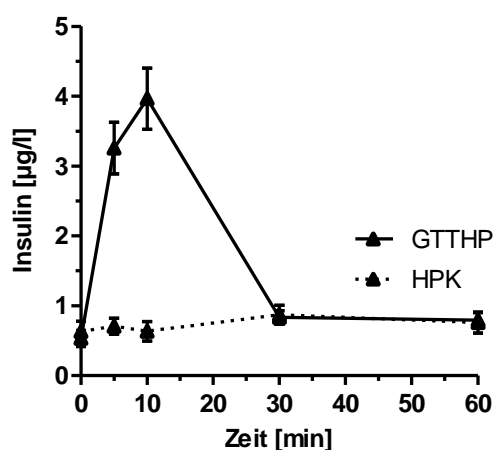


Abb. E36: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin im Blutplasma ( $\pm SE$ ) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTHP) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HPK) bei „hungrnden“ Tieren „und unter Phlorizineinfluss“

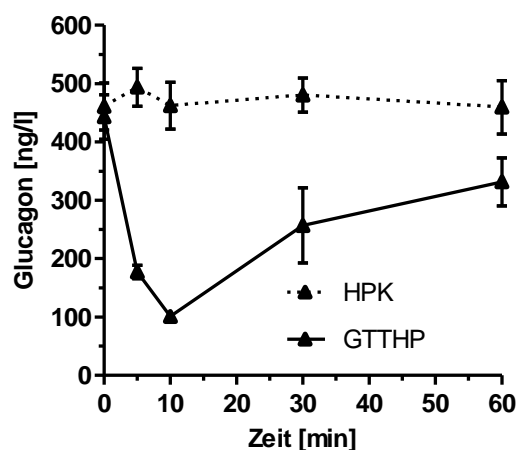


Abb. E37: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon im Blutplasma ( $\pm SE$ ) nach i.v. Glucoseinjektion (GTTHP) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HPK) bei „hungrnden“ Tieren „und unter Phlorizineinfluss“

## 6. Metabolit- und Hormonkonzentrationsverlauf nach i.v. Glucose-Dauer (2h)- oder NaCl-Applikation bei der Versuchsbedingung „nüchtern“ (GDBN)

### 6.1 Mittlerer Glucosekonzentrationsverlauf im GDBN

Der mittlere Glucose-Konzentrationsverlauf der Kontrolltiere ist konstant bei durchschnittlich 12,19 mmol/l (s. Abb. E38, Tab. A3 und A4).

Trotz der vorangegangenen über zwei Stunden verteilten vier Glucoseinjektionen starten die GDBN-Tiere vor der fünften Injektion mit einem zu den Kontrolltieren nur tendenziell (nicht signifikant) erhöhten mittleren Glucose-Konzentrationsausgangswert ( $pM-W=0,138$ ) von 12,7 mmol/l. Die Kurve steigt 5 min p.i. mit 28,65 mmol/l auf 226 % des Nullwertes an und fällt dann 30 min p.i. auf einen nur noch um 10 % erhöhten Wert (13,98 mmol/l;  $p=0,011$ ) ab. Zum Zeitpunkt 60 ist mit 13 mmol/l der Ausgangswert wieder erreicht ( $p=0,069$ ).

Die Halbwertszeit der Glucoseelimination beträgt 8,83 min.

Die AUC der GDBN-Tiere ist um ein Drittel größer als die der Kontrolltiere ( $p<0,0001$ ).

### **6.2 Mittlerer Freie Fettsäuren-Konzentrationsverlauf im GDBN**

Die mittlere FFS-Konzentrationskurve der Kontrolltiere verläuft plateauartig und liegt im Mittel bei 0,684 mmol/l (s. Abb. E39, Tab. A3 und A4).

Die mittlere FFS-Konzentration der GDBN-Tiere liegt vor der letzten Glucoseinjektion mit 0,34 mmol/l signifikant niedriger (um 51 %) als die der Kontrolltiere ( $p=0,003$ ). Dieser Unterschied ist zum Zeitpunkt 30 min p.i. mit einem um 61 % niedrigeren Wert (0,258 mmol/l) noch ausgeprägter ( $p<0,0001$ ). Zum 60-Minutenzeitpunkt findet sich kein Unterschied mehr zwischen der mittleren FFS-Konzentration der GDBN- und der Kontrolltiere ( $p=0,223$ ). Allerdings hat der Mittelwert der GDBN-Tiere dabei ein Niveau erreicht, das um 174 % über deren Ausgangswert liegt ( $p=0,0007$ ).

Die AUC der GDBN-Tiere ist nur halb so groß wie die AUC der Kontrolltiere ( $p=0,0001$ ).

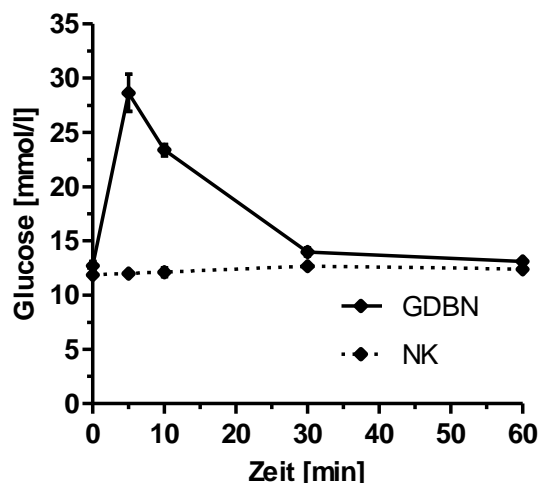


Abb. E38: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Blutglucose ( $\pm$ SE) nach mehrfachen i.v. Glucoseinjektionen (GDBN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren

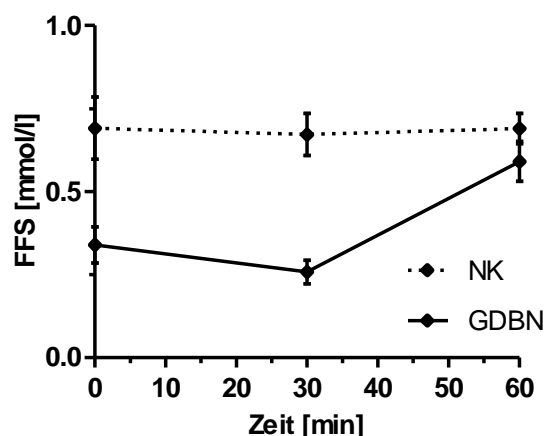


Abb. E39: Mittlerer Konzentrationsverlauf der FFS im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach mehrfachen i.v. Glucoseinjektionen (GDBN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren

### 6.3 Mittlerer $\beta$ -Hydroxybutyrat-Konzentrationsverlauf im GDBN

Die mittlere  $\beta$ HB-Konzentrationskurve der Kontrolltiere zeigt einen tendenziell leicht ansteigenden (nicht signifikant) Verlauf (von 1,21 mmol/l auf 1,32 mmol/l) (s. Abb. E40, Tab. A3 und A4).

Die  $\beta$ HB-Werte sind bei den GDBN-Tieren schon zum Zeitpunkt 0 mit 0,23 mmol/l um 81 % kleiner als bei den Kontrolltieren ( $pM-W=0,0002$ ). Die Konzentrationskurve steigt jedoch kontinuierlich an und liegt so zum Zeitpunkt 30 mit 0,34 mmol/l nur noch 72 % unter dem zeitgleichen Wert der Kontrolltiere ( $pM-W=0,001$ ). Zum Zeitpunkt 60 ist die mittlere  $\beta$ HB-Konzentration mit 0,68 mmol/l noch 49 % niedriger als die zeitgleiche  $\beta$ HB-Konzentration der Kontrolltiere ( $pM-W=0,003$ ).

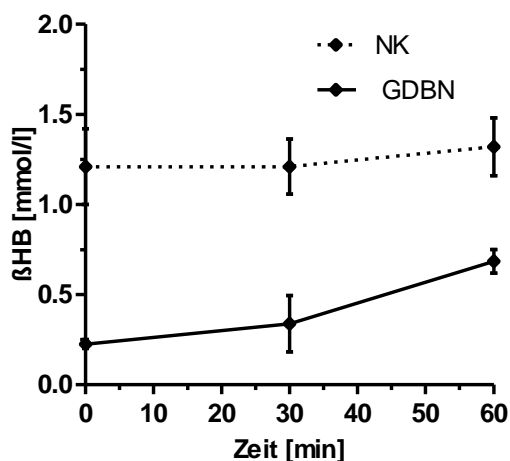
Dadurch beträgt die AUC der GDBN-Tiere nur 57 % der AUC der Kontrolltiere ( $pM-W=0,0001$ ).

### 6.4 Mittlerer Harnsäurekonzentrationsverlauf im GDBN

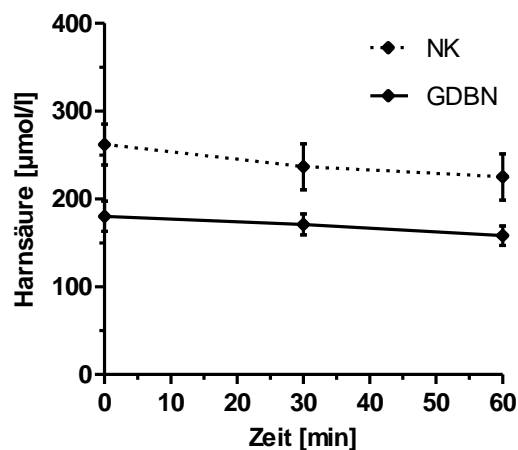
Die mittleren Harnsäure-Konzentrationskurven beider Versuchsgruppen zeigen einen tendenziell abfallenden Verlauf, wobei beide Abnahmen nicht signifikant sind (s. Abb. E41, Tab. A3 und A4).

Die mittleren Harnsäurewerte der GDBN-Tiere bleiben während der 60-minütigen Messperiode, ausgehend vom Nullwert mit 180,3  $\mu\text{mol/l}$ , zu allen Zeitpunkten signifikant (um etwa 30 %) niedriger als die Harnsäurewerte der Kontrolltiere.

Die Größe der AUC der GDB-Tiere beträgt 70 % der AUC der Kontrolltiere ( $p=0,007$ ).



**Abb. E40: Mittlerer Konzentrationsverlauf von  $\beta\text{HB}$  im Blutplasma ( $\pm\text{SE}$ ) nach mehrfachen i.v. Glucoseinjektionen (GDBN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren**



**Abb. E41: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure im Blutplasma ( $\pm\text{SE}$ ) nach mehrfachen i.v. Glucoseinjektionen (GDBN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren**

## 6.5 Mittlerer Insulinkonzentrationsverlauf im GDBN

Der mittlere Insulinkonzentrationsverlauf der Kontrolltiere bleibt weitgehend stabil bei im Mittel 1,13  $\mu\text{mol/l}$ . Das „Einknicken“ der Kurve um 31 % von 1,69  $\mu\text{mol/l}$  auf 1,16  $\mu\text{mol/l}$  ( $p=0,1977$ ) zum Zeitpunkt 5 min p.i. ist nicht signifikant (s. Abb. E42, Tab. A3 und A4).

Der mittlere Insulinspiegel der GDBN-Tiere zum Zeitpunkt 0 gleicht mit 0,48  $\mu\text{g/l}$  dem der Kontrolltiere mit 0,69  $\mu\text{g/l}$  ( $p=0,337$ ). Zum Zeitpunkt 5 min p.i. steigt die Insulinkonzentration mit 3,11  $\mu\text{g/l}$  auf 648 % des Ausgangswertes an ( $p\text{M-W}<0,0001$ ). Im weiteren Verlauf fällt die Insulinkonzentrationskurve wieder ab, so dass 10 min p.i. mit 2,07  $\mu\text{g/l}$  noch 431 % des Ausgangswertes erreicht werden ( $p\text{M-W}<0,0001$ ). Zum Zeitpunkt 30 mit 0,4  $\mu\text{g/l}$  ( $p\text{M-W}=0,926$ ) sowie zum Zeitpunkt 60 mit 0,36  $\mu\text{g/l}$  ( $p=0,697$ ) wird jedoch kein signifikanter Unterschied mehr sichtbar.

Die AUC der GDBN-Tiere ist mehr als doppelt so groß wie die der Kontrolltiere ( $p=0,007$ ).

### 6.6 Mittlerer Glucagonkonzentrationsverlauf im GDBN

Die mittlere Glucagonkonzentration der Kontrolltiere zeigt mit 712,3 ng/l zum Zeitpunkt 5 einen nicht signifikanten Gipfel im ansonsten plateauartigen Verlauf bei durchschnittlich 671,9 ng/l und liegt damit vom Niveau gesehen höher als die mittlere Kurve der GDBN-Tiere (s. Abb. E43, Tab. A3 und A4).

Deren mittlere Glucagonkonzentration zeigt jedoch zum Zeitpunkt 0 min mit 507,1 ng/l keinen signifikanten Unterschied zum Nullwert der Kontrolltiere mit 626,8 ng/l ( $p=0,183$ ). Innerhalb von 5 Minuten nach der letzten Glucoseinjektion hat sich der mittlere Glucagonwert halbiert ( $p<0,0001$ ). Zum Zeitpunkt 10 min beträgt er mit 128,3 ng/l nur noch 25 % des Ausgangswertes ( $pM-W<0,0001$ ). Zum Zeitpunkt 30 min p.i. findet sich nach einem Konzentrationswiederanstieg mit 465,4 ng/l noch ein signifikanter Unterschied zum zeitgleichen Wert der Kontrolltiere mit 666,5 ng/l ( $p=0,0009$ ). Allerdings gibt es keinen signifikanten Unterschied mehr zum Ausgangswert der GDBN-Tiere ( $p=0,537$ ). Auch zum Zeitpunkt 60 min p.i. liegt der Mittelwert der GDBN-Tiere signifikant unter dem der Kontrolltiere ( $p=0,001$ ), obwohl es keinen Unterschied zum Ausgangswert gibt ( $p=0,82$ ). Die AUC der GDBN-Tiere ist etwa halb so groß wie die AUC der Kontrolltiere ( $p<0,0001$ ).

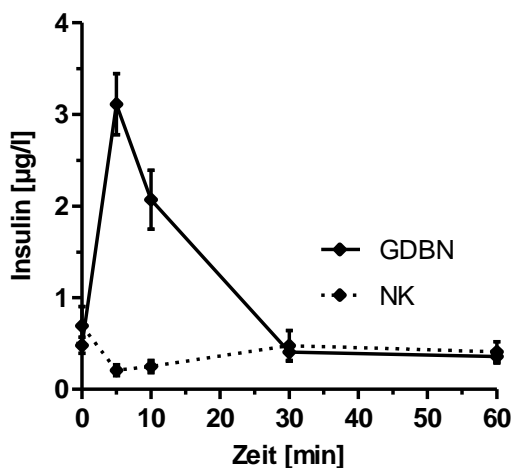


Abb. E42: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach mehrfachen i.v. Glucoseinjektionen (GDBN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren

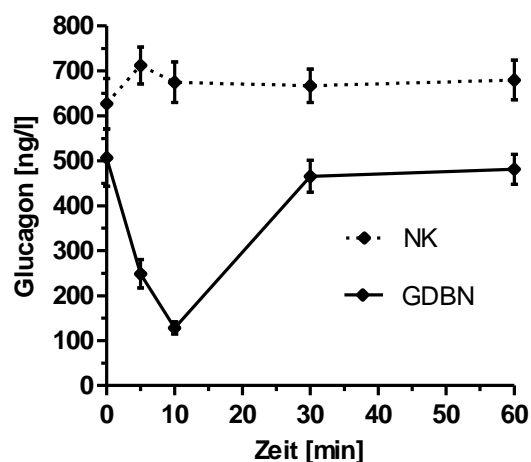


Abb. E43: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach mehrfachen i.v. Glucoseinjektionen (GDBN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren

## 7. Vergleich der Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen nach einer i.v. Glucose-Kurzzeitbelastung (GTT) jeweils bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H), „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) sowie „nüchtern und mit Glucose i.v. vorbelastet“ (GDBN)

### 7.1 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose

Die N-Kontrolltiere haben mit  $12,20 \pm 0,14$  mmol/l die signifikant niedrigste mittlere Glucosekonzentration ( $p=0,0001$ ). Die H- und die HP-Kontrolltiere unterscheiden sich mit ihren höheren Glucosekonzentrationen ( $12,89 \pm 0,08$  mmol/l bzw.  $12,92 \pm 0,11$  mmol/l) nicht signifikant voneinander (s. Abb. E44, Tab. A3 und A5, Abb. A1).

Grundsätzlich ähneln sich die Verläufe der mittleren Glucosekonzentration der vier Versuchsgruppen sehr stark, und zwar mit höchsten Werten 5 min p.i. und einem flacheren Abfall bis zum Zeitpunkt 30 min p.i. (für die N- und die GDBN-Tiere) bzw. zum Zeitpunkt 60 min p.i. (für die H-Tiere und die HP-Tiere)

Zum Zeitpunkt 5 min p.i. erreichen die HP-Tiere die höchsten Glucosewerte der vier Versuchsgruppen und brauchen auch am längsten, um sich wieder Ausgangswerten zu nähern, wobei allerdings die  $T_{1/2}$  der HP-Tiere geringfügig kürzer ist (s. Tab. E3) als die der H-Tiere ( $T_{1/2}$ : H>HP>GDBN>N).

**Tab. E3: Halbwertszeit der Glucoseelimination nach Glucoseinjektion unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H), „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) sowie „nüchtern und mit Glucose i.v. vorbelastet“ (GDBN)**

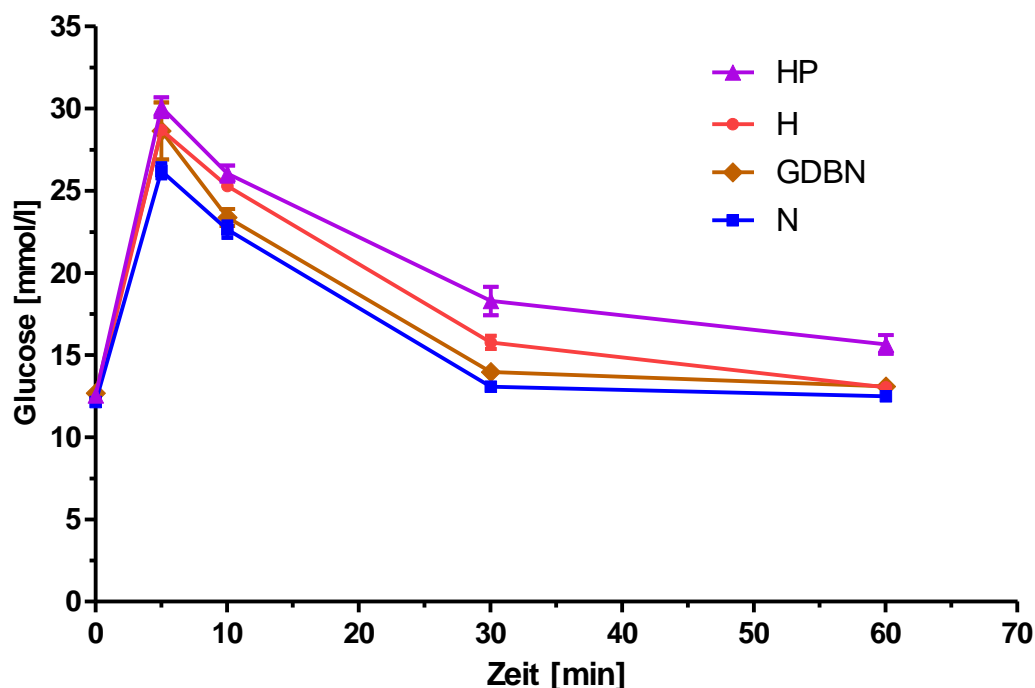
	GDBN	GTTN	GTTH	GTTHP
Halbwertszeit der Glucoseelimination (min) ± SE	$8,83 \pm 0,64$	$8,64 \pm 0,87$	$12,47 \pm 1,05$	$12,3 \pm 1,19$
Probenzahl (n)	13	12	10	9

Die Konzentrationskurve der N-Tiere zeigt dagegen beim Gipfel 5 min p.i. die niedrigsten Glucosewerte, erreicht aber tendenziell am schnellsten wieder Ausgangswerte. Die Glucose-Konzentrationskurve der H-Tiere liegt vom Niveau unter der Kurve der HP-Tiere, ist aber ebenfalls zum Zeitpunkt 30 min p.i. noch nicht wieder beim Ausgangswert angelangt. Die Glucose-Konzentrationskurve der GDBN-Tiere liegt zwischen den N-Tieren und den H-Tieren.

Dem Kurvenverlauf entsprechend können die AUC der Versuchsgruppen in absteigender Reihenfolge wie folgt sortiert werden: HP>H>GDBN>N. Dabei ist die AUC der HP-Tiere

signifikant um 22 % größer als die AUC der N-Tiere und 17 % größer als die AUC der GDBN-Tiere ( $pK\text{-}W < 0,001$ ). Zudem ist die AUC der H-Tiere signifikant um ca. 9 % größer als die AUC der N-Tiere ( $pK\text{-}W < 0,05$ ).

Die  $T_{1/2}$  der beiden hungernden Versuchsgruppen sind um ca. 44 % länger als bei den beiden nüchternen Versuchsgruppen ( $p < 0,05$ ).



**Abb. E44: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Glucose im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach GTT bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H), „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) sowie „nüchtern und mit Glucose i.v. vorbelastet“ (GDBN)**

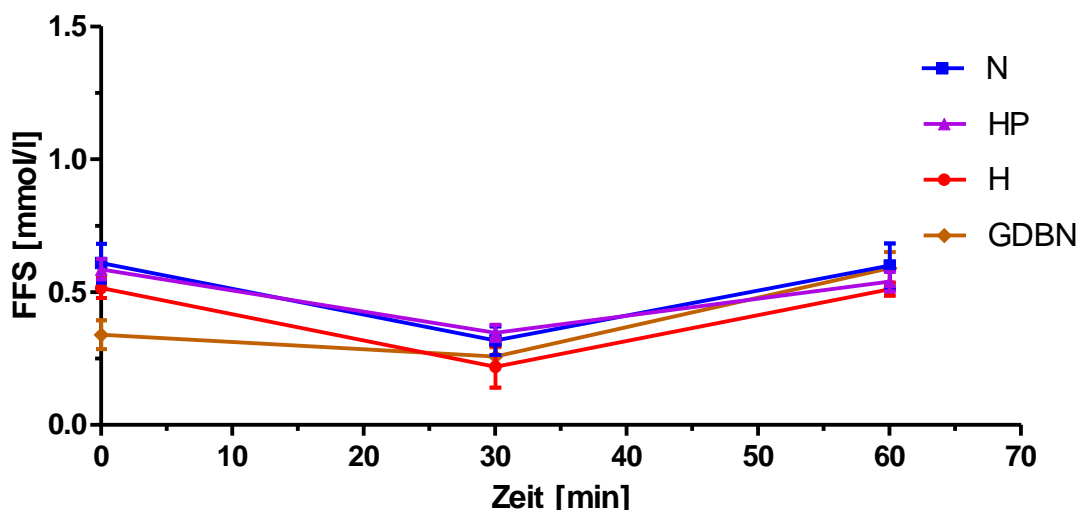
## 7.2 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren

Bei den Kontrolltieren weisen die HP-Kontrolltiere im Vergleich zu den H-Kontrolltieren eine signifikant höhere mittlere FFS-Konzentration auf ( $0,533 \pm 0,016$  mmol/l vs  $0,466 \pm 0,019$  mmol/l;  $p = 0,008$ ). Dagegen unterschieden sich die N-Kontrolltiere nicht von den anderen beiden Gruppen ( $0,506 \pm 0,05$  mmol/l) (s. Abb. E45, Tab. A3 und A5, Abb. A2).

Die Kurvenverläufe der mittleren FFS-Konzentration der vier Gruppen beginnen mit unterschiedlichen Ausgangswerten, ähneln sich aber im weiteren Verlauf mit Abfall und Wiederanstieg der Konzentration sehr stark. Dabei haben die GDBN-Tiere den signifikant niedrigsten Nullwert ( $0,339$  mmol/l;  $p < 0,01$ ) und die N- bzw. die HP-Tiere die höchsten Nullwerte ( $0,609$  mmol/l bzw.  $0,586$  mmol/l). Die H-Tiere liegen mit dem Nullwert von

0,515 mmol/l zwischen dem der GDBN-Tieren und den anderen beiden Gruppen, fallen nach 30 Minuten aber am stärksten ab (um 37 % auf 0,219 mmol/l).

Aufgrund des sehr ähnlich ausgerichteten, zum Teil sogar parallelen Verlaufs der vier FFS-Konzentrationskurven unterscheiden sich die AUC bei den vier Behandlungen nicht signifikant.



**Abb. E45: Mittlerer Konzentrationsverlauf der FFS im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach GTT bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H), „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ (GDBN)**

### 7.3 Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ -Hydroxybutyrat

Die mittlere  $\beta$ HB-Konzentration bei den Kontrolltieren zeigt mit Verschärfung der katabolen Situation eine Zunahme, so dass alle drei Versuchsgruppen signifikante Unterschiede zueinander aufweisen (NK:  $1,25 \pm 0,1$  mmol/l < HK:  $2,19 \pm 0,08$  mmol/l < HPK:  $3,9 \pm 0,34$  mmol/l) (s. Abb. E46, Tab. A3 und A5, Abb. A3).

Die mittleren  $\beta$ HB-Konzentrationsverläufe der HP- und der H-Tiere ähneln sich sehr stark. Sie beginnen ausgehend von vergleichsweise hohen Ausgangswerten (3,77 mmol/l und 2,21 mmol/l), zeigen einen weitgehend parallelen starken Abfall zum Zeitpunkt 30 min p.i. und einem deutlichen Wiederanstieg zum Endwert. Die Kurve der GDBN-Tiere verläuft dagegen von einem niedrigen Nullwert (0,23 mmol/l) ausgehend über den Messzeitraum kontinuierlich leicht ansteigend. Die N-Tiere liegen sowohl vom Verlauf als auch vom Niveau her gesehen zwischen den GDBN- und den H-Tieren.

Im  $\beta$ HB-Niveauvergleich liegen die GDBN-Tiere am niedrigsten, wobei sich die Konzentrationsverläufe der GDBN- der N- und der H-Tiere nach 30 Minuten weitgehend

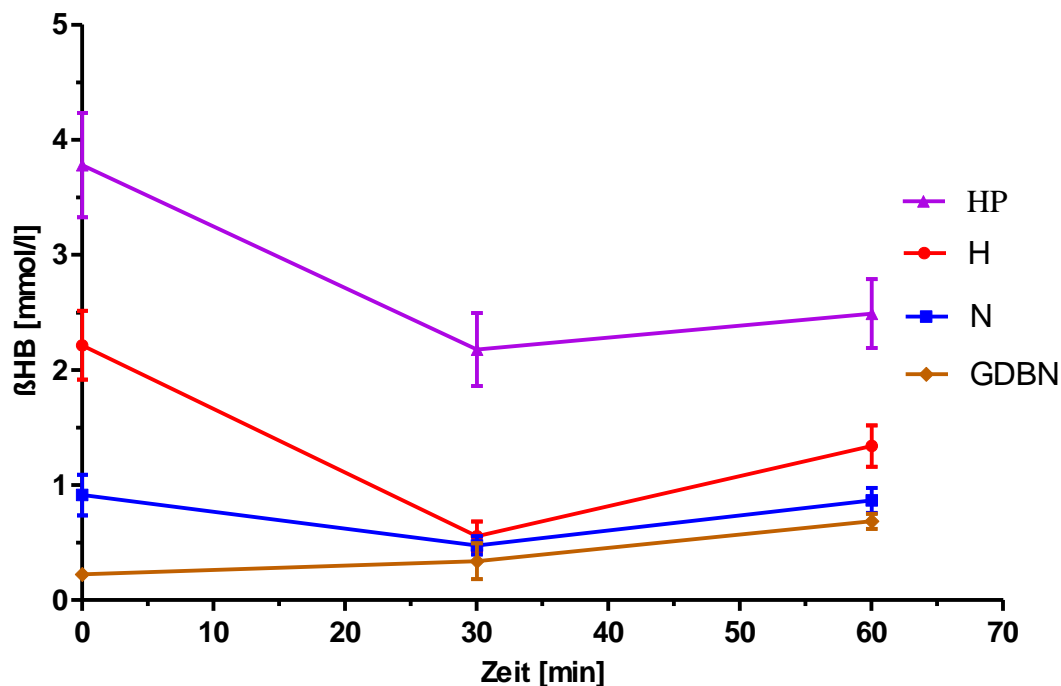


angleichen. Dagegen ist die Kurve der HP-Tiere durchweg am höchsten und fällt auch nicht auf das Niveau der anderen Tiere ab.

Dementsprechend ist die Reihenfolge der Flächengrößen wie folgt: HP>H>N>GDBN.

Dabei ist die AUC der HP-Tiere signifikant zwischen 50 und 85 % größer als die der N- und GDBN-Tiere ( $pK-W < 0,0001$ ) und zudem die AUC der H-Tiere signifikant um ca. 70 % größer als die der GDBN-Tiere ( $pK-W < 0,01$ ).

Bei Betrachtung der Signifikanzen zu den einzelnen Zeitpunkten hat die Gruppe GDBN mit 0,23 mmol/l den signifikant niedrigsten Nullwert im Vergleich zu den H- (2,21 mmol/l) und den HP-Tieren (3,77 mmol/l) ( $pK-W < 0,0001$ ). Zudem erreichen die Werte der N-Tiere mit 0,91 mmol/l nur etwa 24 % der Werte der HP-Tiere ( $pK-W < 0,05$ ). Zum Zeitpunkt 30 und 60 Minuten weisen die HP-Tiere signifikant (um ca. 80 %) höhere Werte auf als die N- und die GDBN-Tiere ( $pK-W < 0,001$ ). Die anderen Gruppen haben zum Zeitpunkt 30 Minuten keine signifikant unterschiedlichen Werte, während zum Zeitpunkt 60 min die H-Tiere wieder um ca. 50 % höhere Werte erreichen als die GDBN-Tiere ( $pK-W < 0,05$ ).



**Abb. E46: Mittlerer Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach GTT bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H), „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ (GDBN)**

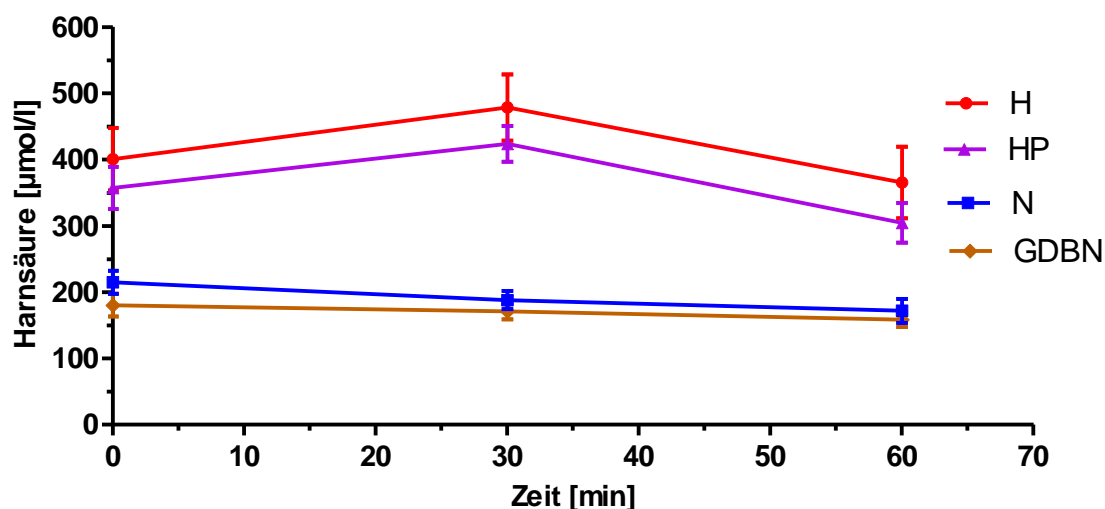
#### **7.4 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure**

Die mittlere Harnsäurekonzentration ist bei den HP-Kontrolltieren signifikant ( $p=0,0002$ ) höher als bei den N- und H-Kontrolltieren ( $351,4 \pm 12,6 \mu\text{mol/l}$  vs.  $241,3 \pm 14,4 \mu\text{mol/l}$  bzw.  $257,1 \pm 19,8 \mu\text{mol/l}$ ) (s. Abb. E47, Tab. A3 und A5, Abb. A4).

Betrachtet man Niveau und Konzentrationsverlauf der Harnsäure bei den vier Versuchsbedingungen, so gleichen sich einerseits die beiden hungernden Gruppen mit einem insgesamt höheren Niveau und einem Maximum bei 30 Minuten, andererseits die beiden nüchternen Gruppen mit einem insgesamt niedrigeren Niveau und einem tendenziell abfallenden Verlauf. Dabei erreichen die H-Tiere das höchste Harnsäure-Konzentrationsniveau und die GDBN-Tiere das niedrigste.

Dies spiegelt sich auch im Flächenvergleich wieder. Die AUC der beiden hungernden Gruppen sind signifikant (um etwa 60 %) größer als die AUC der GDBN-Tiere ( $pK-W<0,01$ ). Die AUC der HP-Tiere ist signifikant (um 200 %) größer als die AUC der N-Tiere ( $pK-W<0,01$ ).

Zum Zeitpunkt 0 liegen die Harnsäure-Konzentrationen bei den hungernden Gruppen um ca. 50 % höher als die Ausgangswerte der Gruppe GDBN ( $pK-W<0,001$ ). Zudem ist die Harnsäure-Anfangskonzentration der H-Tiere auch signifikant (um ca. 46 %) höher als die der N-Tiere ( $pK-W<0,05$ ). Zum Zeitpunkt 30 min steigen die Harnsäurewerte der beiden hungernden Gruppen an, so dass beide Gruppen signifikant (um etwa 60 %) höhere Harnsäurekonzentrationen aufweisen als die nüchternen Gruppen (H und HP vs N:  $pK-W<0,01$ ; H und HP vs GDBN:  $pK-W<0,001$ ). Zum Zeitpunkt 60 min sind die Harnsäurewerte der beiden hungernden Gruppen immer noch signifikant (ca. 50 %) höher als die der beiden nüchternen Gruppen (H und HP vs N:  $pK-W<0,05$ ; H und HP vs GDBN:  $pK-W<0,01$ ).



**Abb. E47: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach GTT bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H), „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ (GDBN)**

### 7.5 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin

Bei Vergleich der mittleren Insulinkonzentration zwischen den Kontrolltieren der Versuchsbedingungen finden sich signifikante Unterschiede ( $p=0,0007$ ) zwischen allen Gruppen mit höchsten Werten bei den HK-Tieren ( $1,24 \pm 0,1 \mu\text{g/l}$ ) und niedrigsten Werten bei den NK-Tieren ( $0,41 \pm 0,06 \mu\text{g/l}$ ). Die Insulinkonzentration der HPK-Tiere liegt bei  $0,72 \pm 0,06 \mu\text{g/l}$  (s. Abb. E48, Tab. A3 und A5, Abb. A5).

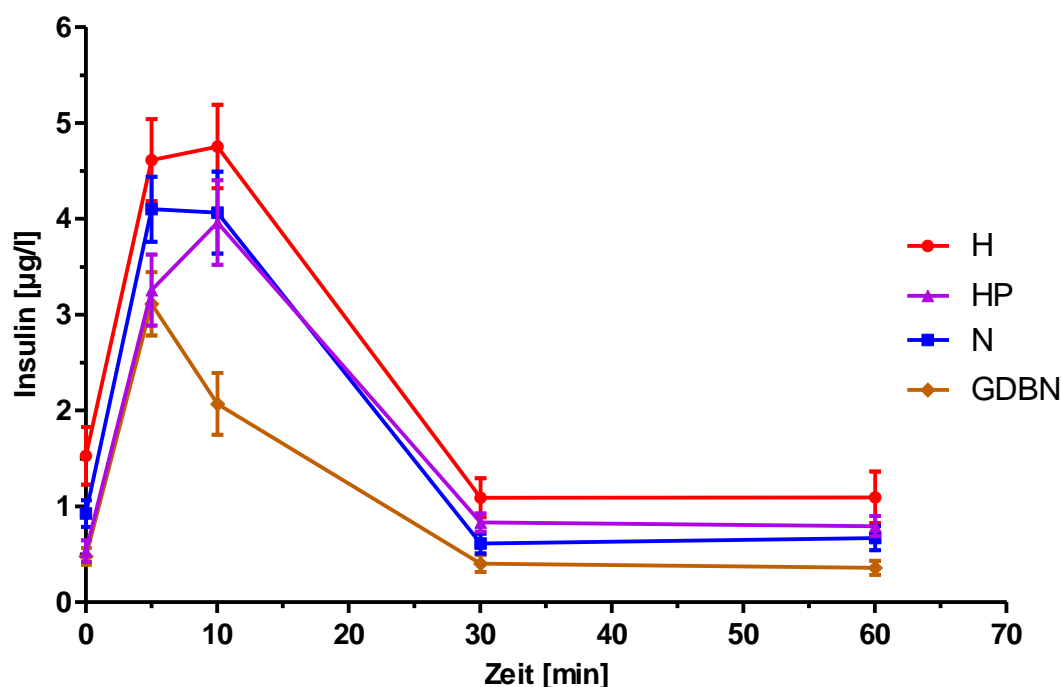
Die mittleren Konzentrationsverläufe von Insulin ähneln sich in gewisser Weise, in dem bei allen vier Versuchsbedingungen zu den Zeitpunkten 5 und/oder 10 min p.i. Konzentrationsmaxima zu finden sind. Höhe und Breite dieses Insulinpeaks sind jedoch zum Teil recht unterschiedlich. Die H-Tiere haben insgesamt die höchste Insulinkonzentration und zeigen ausgehend vom Messpunkt 5 min noch einen weitergehenden Anstieg zum Messpunkt 10 min. Ähnlich verläuft auch die Insulinkurve der HP-Tiere, allerdings mit (ca. 30 % bzw. 17 %) niedrigeren Werten. Dagegen haben die N-Tiere zum Zeitpunkt 5 min das Maximum bereits erreicht und fallen zum Zeitpunkt 10 tendenziell leicht ab. Sie liegen vom Konzentrationsniveau her gesehen unter den H-Tieren, jedoch über den HP-Tieren. Die GDBN-Tiere schließlich haben die niedrigsten Werte, wobei das Maximum beim Zeitpunkt 5 zu finden ist und die Werte zum Zeitpunkt 10 schon wieder deutlich abgefallen sind.

Einheitlich zeigt sich bei allen Gruppen eine Plateauphase zwischen den Messpunkten 30 und 60 min, aber auf unterschiedlichem Konzentrationsniveau.

Bei Betrachtung der von den Insulin-Konzentrationsverläufen zustande gekommenen AUC findet sich der einzige signifikante Flächenunterschied zwischen der Gruppe GDBN und der Gruppe H. So beträgt die AUC der GDBN-Tiere nur etwa 60 % der AUC der H-Tiere ( $p < 0,001$ ).

So überrascht es nicht, dass die mittleren Insulinkonzentrationen der GDBN-Tiere zu allen fünf Messpunkten signifikant niedriger sind als die Werte der H-Tiere (0 min:  $pK-W < 0,01$ ; 5 min:  $p < 0,05$ ; 10 min:  $p < 0,001$ ; 30 min:  $p < 0,05$ ; 60 min:  $p < 0,05$ ). Zudem sind die Werte der GDBN-Tiere zu den Zeitpunkten 0 ( $pK-W < 0,05$ ), 30 ( $p < 0,01$ ) und 60 min ( $p < 0,05$ ) signifikant niedriger als die Werte der HP-Tiere. Die N-Tiere haben lediglich zum Zeitpunkt 10 min p.i. signifikant höhere Werte als die GDBN-Tiere ( $p < 0,01$ ).

Die höchste prozentuale Zunahme bis zum Erreichen eines Maximums haben die HP-Tiere (747 %), gefolgt von den GDBN-Tieren (648 %), den N-Tieren (441 %) und den H-Tieren (310 %). Damit haben die H-Tiere zwar das größte Insulinmaximum mit 4,75  $\mu\text{g/l}$ , aber ausgehend vom Nullwert die prozentual geringste Konzentrationszunahme. Die GDBN-Tiere zeigen beim Erreichen des Insulinmaximums die zweitgrößte prozentuale Zunahme. Die absoluten Insulinwerte sind jedoch am niedrigsten. Zudem hält das Insulinmaximum mit 3,11  $\mu\text{g/l}$  zum Zeitpunkt 5 min p.i. nur kurz an, denn zum Zeitpunkt 10 min p.i. ist die Insulinkonzentration bereits wieder deutlich abgefallen und beträgt nur mehr 431 % der Ausgangskonzentration, während der Insulinpeak bei den anderen Gruppen länger anhält, indem die Insulinkonzentration zum Zeitpunkt 10 min hin weiter ansteigt (H, HP) oder etwa gleich bleibt (N).



**Abb. E48: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach GTT bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H), „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ (GDBN)**

### 7.6 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon

Die N-Kontrolltiere weisen die signifikant höchste mittlere Glucagonkonzentration auf ( $671,2 \pm 19,8$  ng/l), während die Glucagonkonzentrationen der HK- und der HPK-Tiere nicht signifikant unterschiedlich sind ( $492,2 \pm 12,1$  ng/l bzw.  $471,2 \pm 16,4$  ng/l) (s. Abb. E49, Tab. A3 und A5, Abb. A6).

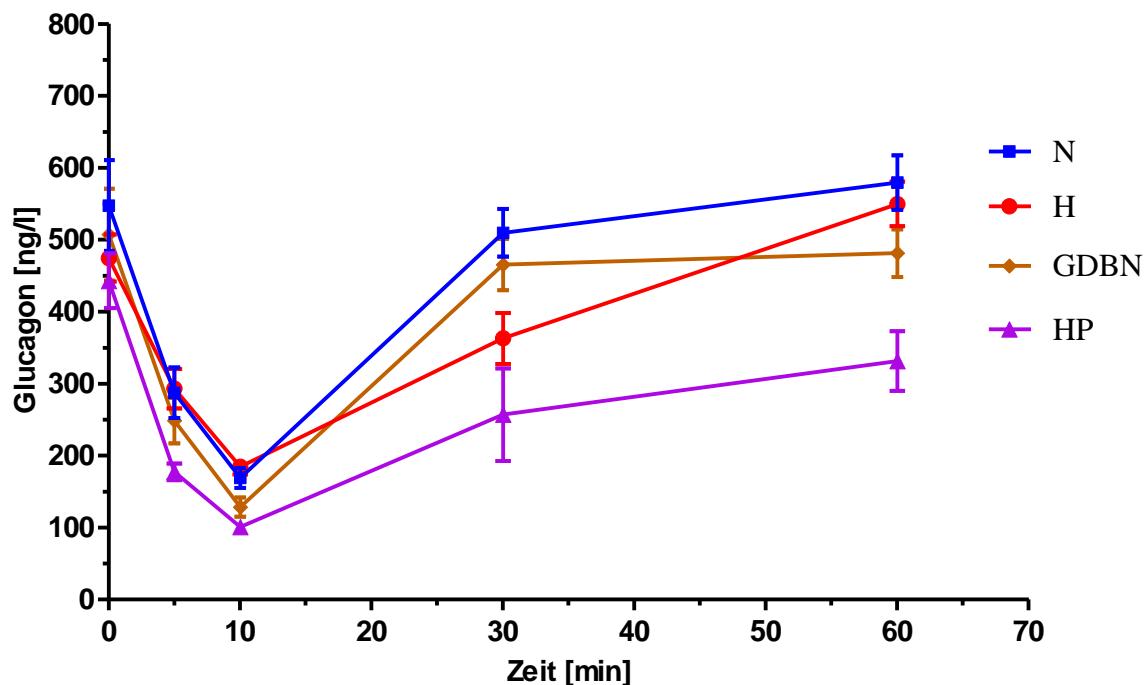
Die Glucagon-Mittelwertskurven der vier Versuchsgruppen verlaufen bis zum Zeitpunkt 10 min p.i. nahezu parallel abnehmend. Bei dem dadurch erreichten Glucagonminimum zum Zeitpunkt 10 min p.i. zeigen die HP-Tiere die niedrigste Glucagonkonzentration, gefolgt von den GDBN-, den N- und den H-Tieren in aufsteigender Reihenfolge. Diese Reihenfolge entspricht auch dem prozentualen Abfall vom Ausgangswert: die HP-Tiere verlieren mit -77 % am meisten, gefolgt von den GDBN-Tieren (mit -75 %), den N-Tieren (mit -70 %) und den H-Tieren (mit -61 %).

Der Wiederanstieg erfolgt einheitlich ab 10 min p.i., und zwar bei den beiden nüchternen Gruppen steil, so dass zum Zeitpunkt 30 min bereits wieder 93 % des Ausgangswertes bei den N-Tieren und 92 % bei den GDBN-Tieren erreicht werden. Die Glucagonkurven der beiden hungernden Gruppen zeigen einen flacheren Anstieg, so dass die H-Tiere nur 76,5% und die HP-Tiere sogar nur 58 % des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 30 min p.i.

erreichen. Während die mittlere Glucagonkonzentration bei den HP-Tieren zum Zeitpunkt 60 min nur auf 75 % ihres Nullwerts angestiegen ist, haben die Glucagonwerte der H-Tiere zeitgleich wieder das Ausgangsniveau erreicht.

Diese Verlaufsunterschiede spiegeln sich auch im Flächenvergleich wieder. Die AUC der HP-Tiere ist signifikant um ca. 19 % kleiner als die AUC der H-Tiere (nicht signifikant) bzw. um ca. 35 % kleiner als die AUC der N- und der GDBN-Tiere ( $p < 0,05$ ) ( $N > GDBN > H > HP$ ).

Während sich die mittleren Glucagonkonzentrationen der vier Gruppen zu den Messpunkten 0 und 5 min nicht signifikant unterscheiden, ist zum Zeitpunkt 10 min p.i. die Glucagonkonzentration der HP-Tiere signifikant (um 40 % bzw. 45 %) niedriger als die der N- bzw. der H-Tiere ( $pK-W < 0,01$ ). Durch den steilen Wiederanstieg der Glucagonkonzentration der beiden nüchternen Gruppen sind die Glucagonwerte der HP-Tiere zum Zeitpunkt 30 min p.i. signifikant (um etwa 45 %) niedriger als die der N- und der GDBN-Tiere ( $p < 0,01$ ). Während die Glucagonkonzentration der H-Tiere zum Zeitpunkt 60 min p.i. ebenfalls ansteigt, ist nun die Konzentration der HP-Tiere signifikant niedriger als bei den anderen drei Gruppen (HP vs N:  $p < 0,001$ ; HP vs GDBN:  $p < 0,05$ ; HP vs H:  $p < 0,01$ ).



**Abb. E49: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach GTT bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H), „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP) sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ (GDBN)**

**8. Konzentrationsverlauf von Metaboliten und Hormonen nach i.v. Tolbutamid- oder Kochsalz-Applikation bei „nüchternen“ (N) und „hungernden“ (H) Tieren**

**8.1 i.v. Tolbutamid (T)- versus i.v.-Kochsalz (K)-Injektion bei „nüchternen“ Tieren (N)**

**8.1.1 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose**

Die mittlere Glucose-Konzentration der Kontrolltiere verläuft plateauartig stabil. Der Mittelwert für den Beobachtungszeitraum liegt bei 12,19 mmol/l (s. Abb. E50, Tab. A6 und A7).

Die Glucosekonzentration der TN-Tiere fällt ausgehend von 12,55 mmol/l (Nullwert) etwas verzögert erst ab dem Zeitpunkt 5 min kontinuierlich ab, wobei die Konzentrationsabnahme zwischen 5 und 30 min relativ mit -44 % am steilsten ist ( $p < 0,0001$ ). Bis zum Zeitpunkt 60 min p.i. fällt der Glucagonspiegel nur noch um weitere 18 % ab ( $p < 0,0001$ ). Der Abfall ist bereits zum Zeitpunkt 10 min p.i. signifikant zu den Kontrolltieren ( $p = 0,002$ ).

Als Maß für die induzierte Hypoglykämie ist die AUC der TN-Tiere um etwa 35 % kleiner als die AUC der Kontrolltiere ( $p < 0,0001$ ).

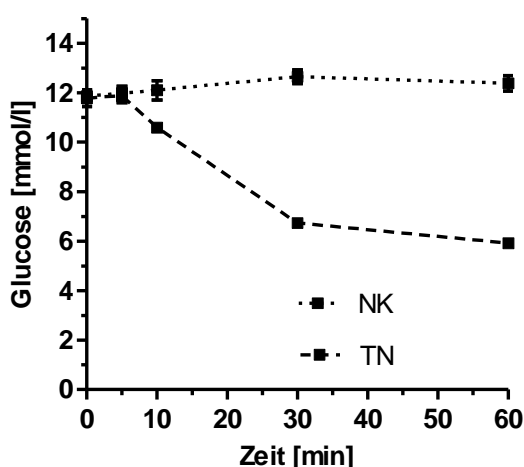
**8.1.2 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren**

Die mittlere FFS-Konzentration der Kontrolltiere verläuft plateauartig und liegt für den Beobachtungszeitraum im Mittel bei 0,684 mmol/l (s. Abb. E51, Tab. A6 und A7).

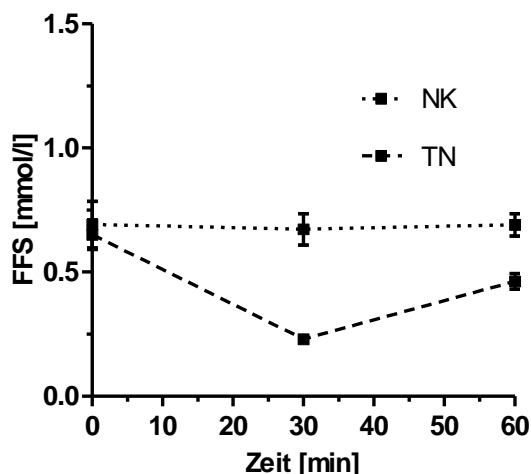
Der Kurvenverlauf der TN-Tiere ist ausgehend von 0,651 mmol/l (Nullwert) durch einen Abfall um 65 % auf 0,23 mmol/l 30 min p.i. und einen Wiederanstieg auf 71 % des Ausgangswerts zum Zeitpunkt 60 min p.i. gekennzeichnet.

Sowohl zum Zeitpunkt 30 min ( $p < 0,0001$ ) als auch zum Zeitpunkt 60 min ( $p\text{-M-W} = 0,0002$ ) sind die Werte der TN-Tiere signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren.

Dementsprechend beträgt die AUC der TN-Tiere nur noch ca. 58 % der AUC der Kontrolltiere ( $p\text{-M-W} = 0,0007$ ).



**Abb. E50: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Blutglucose ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren**



**Abb. E51: Mittlerer Konzentrationsverlauf der FFS im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren**

### 8.1.3 Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ -Hydroxybutyrat

Die mittlere  $\beta$ HB-Konzentration der Kontrolltiere verläuft plateauartig und liegt für den Beobachtungszeitraum im Mittel bei 1,25 mmol/l (s. Abb. E52, Tab. A6 und A7).

Ähnlich wie bei den FFS fällt die  $\beta$ HB-Kurve der TN-Tiere ausgehend von 1 mmol/l (Nullwert) zum Zeitpunkt 30 min p.i. um ca. 50 % auf 0,5 mmol/l ab und steigt zum Zeitpunkt 60 min p.i. wieder auf 73 % des Ausgangswertes an, so dass es am Ende des Beobachtungszeitraums keinen signifikanten Unterschied zwischen Anfangs- und End- $\beta$ HB-Konzentration der TN-Tiere gibt ( $p=0,243$ ).

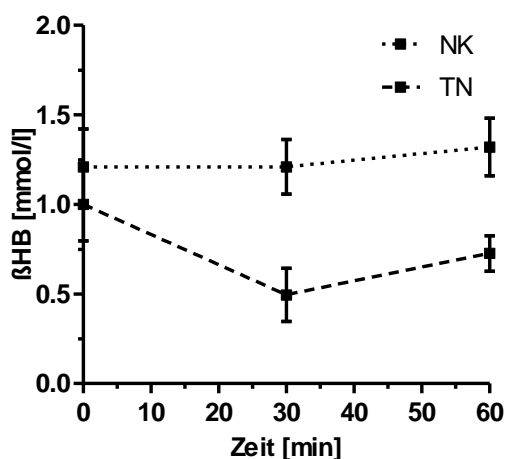
Die  $\beta$ HB-Mittelwerte der TN-Tiere sind allerdings zu den Zeitpunkten 30 min p.i. ( $pM-W=0,003$ ) und 60 min p.i. ( $p=0,005$ ) signifikant niedriger als die Werte der Kontrolltiere.

Die AUC der TN-Tiere erreicht dadurch nur 55 % der AUC der Kontrolltiere ( $p=0,008$ ).

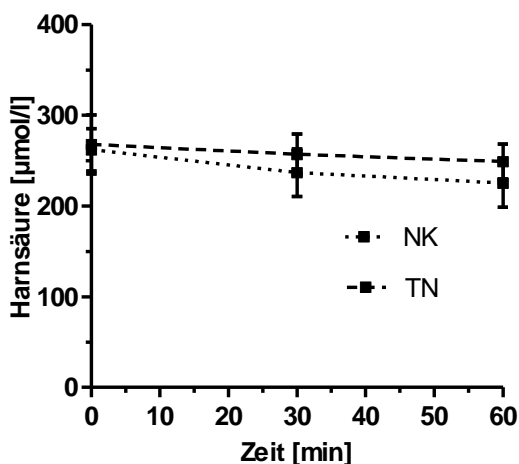
### 8.1.4 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure

Die mittleren Harnsäure-Konzentrationskurven beider Gruppen zeigen auf ähnlichem Niveau eine leicht fallende Tendenz, ohne dass Anfangs- oder Endwert signifikant unterschiedlich wären. Es gibt deshalb auch zwischen den drei Messwerten der TN- und der Kontrollgruppe sowie zwischen den beiden AUC ( $p=0,591$ ) keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. E53, Tab. A6 und A7).





**Abb. E52: Mittlerer Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren**



**Abb. E53: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren**

### 8.1.5 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin

Der mittlere Insulin-Konzentrationsverlauf der Kontrolltiere ist überraschenderweise nicht durchgehend plateauartig. Er zeigt eine Art Minimum mit  $0,21 \mu\text{g/l}$  nach 5 Minute bzw. mit  $\mu\text{g/l}$  nach 10 Minuten. Dieser Abfall ist aber weder zum Nullwert ( $p=0,0509$ ) noch zum 30-Minutenwert signifikant ( $p=0,6694$ ). Der Mittelwert über den Beobachtungszeitraum der Kontrolltiere liegt bei  $0,41 \mu\text{g/l}$  (s. Abb. E54, Tab. A6 und A7). Die Insulin-Ausgangskonzentrationen der beiden Tiergruppen unterscheiden sich nicht signifikant. 5 min nach der Tolbutamidinjektion erfolgt ein Anstieg der Insulinkonzentration auf  $2,53 \mu\text{g/l}$ , der 224 % des Nullwertes von  $1,13 \mu\text{g/l}$  entspricht ( $p\text{-M-W}=0,0002$ ). Zum Zeitpunkt 10 min p.i. fällt die mittlere Insulinkonzentration auf  $1,57 \mu\text{g/l}$  steil ab und beträgt damit noch 139 % des Nullwertes ( $p\text{-M-W}=0,001$ ). Auch zum Zeitpunkt 30 min p.i. findet sich noch ein signifikanter Unterschied zum Mittelwert der Kontrolltiere ( $p\text{-M-W}=0,011$ ). Zum 0-Wert der TN-Tiere ist allerdings hier kein Unterschied mehr zu finden ( $p=0,703$ ). Zum Zeitpunkt 60 min p.i. gibt es keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den Mittelwerten der Kontroll- und der TN-Tiere ( $p=0,112$ ).

Die AUC der TN-Tiere beträgt nur etwa 30 % der AUC der Kontrolltiere ( $p\text{-M-W}=0,001$ ).

### 8.1.6 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon

Die Kurve der mittleren Glucagonkonzentration der Kontrolltiere verläuft stabil und liegt bei durchschnittlich 671,9 ng/l. Ein kleiner Konzentrationsanstieg zum Zeitpunkt 5 Minuten (auf 712,3 ng/l) ist aber nicht signifikant (s. Abb. E55, Tab. A6 und A7).

Vor der Tolbutamidinjektion (0 min) liegt die mittlere Glucagonkonzentration bei 576,3 ng/l und ist damit nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrolltieren. Zum Zeitpunkt 5 min p.i. hat die mittlere Glucagonkonzentration um nahezu 50 % abgenommen ( $p < 0,0001$ ). Bis zum Zeitpunkt 10 min p.i. fällt sie weiter auf ein Minimum, das 30 % des 0-Wertes bzw. 26 % des zeitgleichen Kontrollwertes ausmacht ( $p_{M-W} = 0,012$ ). Bis zum Zeitpunkt 30 min p.i. hat sich die Glucagonkonzentration zwar wieder verdoppelt, liegt aber damit immer noch um 47 % unter dem Level der Kontrolltiere ( $p < 0,0001$ ). Auch zum Zeitpunkt 60 min p.i. erreichen die Glucagonwerte der TN-Tiere noch nicht das Niveau der Kontrolltiere ( $p = 0,012$ ), allerdings gibt es keinen Unterschied mehr zum Ausgangswert vor der Tolbutamidinjektion ( $p = 0,061$ ). Die AUC der TN-Tiere ist nur halb so groß wie die der Kontrolltiere ( $p < 0,0001$ ).

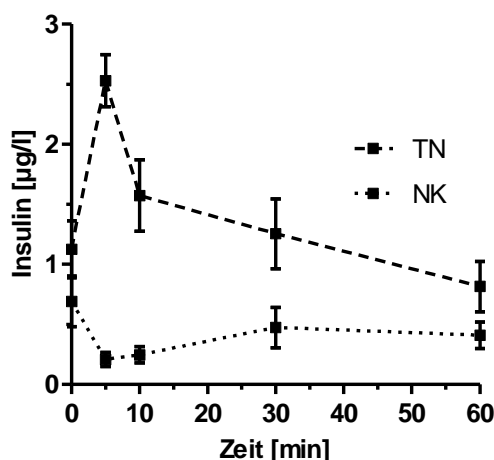


Abb. E54: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren

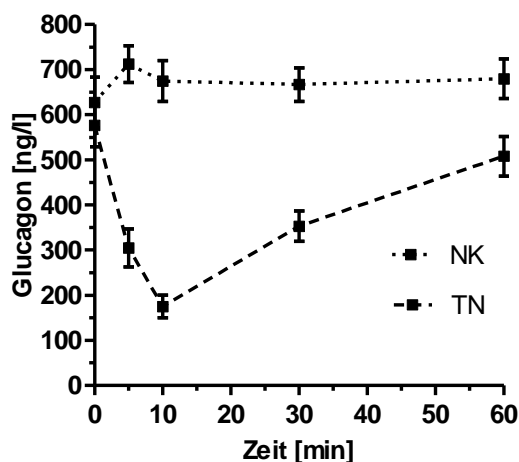


Abb. E55: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bzw. i.v. NaCl-Injektion (NK) bei „nüchternen“ Tieren

## **8.2 i.v. Tolbutamid (T)- versus i.v.-Kochsalz (K)-Injektion bei „hungernden“ Tieren (H)**

### **8.2.1 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose**

Während die mittlere Glucose-Konzentrationskurve der Kontrolltiere plateauartig stabil bei durchschnittlich 12,89 mmol/l verläuft, fällt die Glucosekonzentration der TH-Tiere ausgehend von 12,37 mmol/l (Nullwert) ab dem Zeitpunkt 5 min bis zum Zeitpunkt 60 min kontinuierlich ab und erreicht mit 7,13 mmol/l ca. 58 % des Nullwertes (s. Abb. E56, Tab. A6 und A7).

Während die Glucosekonzentration der TH-Tiere zum Zeitpunkt 10 min sich noch nicht signifikant von der zeitgleichen Konzentration der Kontrolltiere unterscheidet ( $pM-W=0,072$ ), wird der Unterschied aber im weiteren hypoglykämischen Verlauf ausgeprägter und signifikant (30 min:  $p=0,001$ , 60 min:  $p<0,0001$ ).

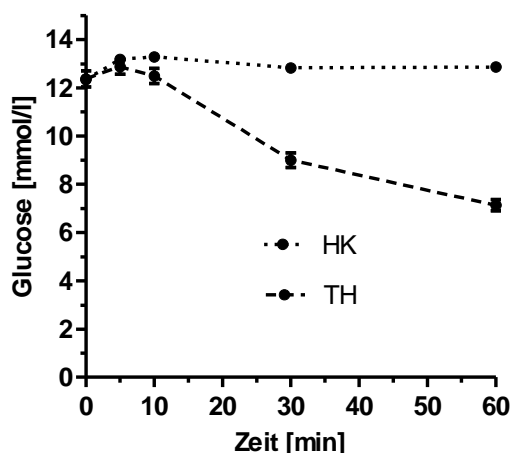
Dementsprechend beträgt beim Flächenvergleich die AUC der TH-Tiere nur 75 % der AUC der Kontrolltiere ( $p<0,0001$ ).

### **8.2.2 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren**

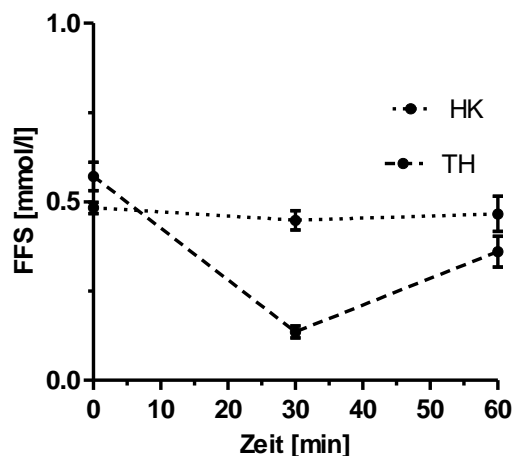
Die mittlere FFS-Kurve der Kontrolltiere verläuft plateauartig stabil bei durchschnittlich 0,466 mmol/l. Dagegen fällt die FFS-Konzentration der TH-Tiere zum Zeitpunkt 30 min p.i. von anfänglich 0,571 mmol/l auf 0,135 mmol/l (=24 % des Nullwertes) ab. Durch den darauffolgenden Wiederanstieg werden 60 min p.i. 63 % des Ausgangswertes erreicht. Der Unterschied zum Nullwert (0,571 mmol/l) ist signifikant ( $p=0,0172$ ) (s. Abb. E57, Tab. A6 und A7).

Im Vergleich zum FFS-Konzentrationsverlauf der Kontrolltiere ist bei den TH-Tieren nur zum Zeitpunkt 30 min p.i. eine signifikant niedrigere FFS-Konzentration gegeben ( $p<0,0001$ ).

Die AUC der TH-Tiere beträgt 65 % der AUC der Kontrolltiere ( $p=0,0002$ ).



**Abb. E56: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Blutglucose ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungernden“ Tieren**



**Abb. E57: Mittlerer Konzentrationsverlauf der FFS im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungernden“ Tieren**

### 8.2.3 Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ HB

Der mittlere  $\beta$ HB-Konzentrationsverlauf der Kontrolltiere ist plateauartig mit einem geringgradigem Anstieg von 2,21 mmol/l auf 2,25 mmol/l. Dieser Konzentrationsunterschied ist aber nicht signifikant. Der Mittelwert für den Beobachtungszeitraum liegt bei 2,19 mmol/l (s. Abb. E58, Tab. A6 und A7).

Die  $\beta$ HB-Kurve der TH-Tiere fällt vom Nullwert mit 2,39 mmol/l steil um 77 % auf 0,55 mmol/l ab und bleibt plateauartig niedrig bis zum Zeitpunkt 60 min p.i. mit 0,67 mmol/l (30 min vs 60 min:  $p=0,3122$ ).

Zum Zeitpunkt 30 min p.i. ( $pM-W=0,0001$ ) und 60 min p.i. ( $pM-W=0,0002$ ) sind die  $\beta$ HB-Konzentrationen der TH-Tiere signifikant (um ca. 74 %) niedriger als die Werte der Kontrolltiere.

Dadurch ist die AUC der TH-Tiere auch nur halb so groß wie die AUC der Kontrolltiere ( $p<0,0001$ ).

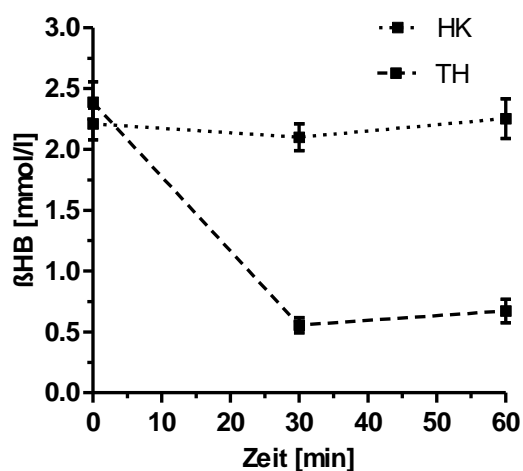
### 8.2.4 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure

Die mittlere Harnsäure-Konzentrationskurve der Kontrolltiere fällt zwar vom Nullwert (mit 283,5  $\mu$ mol/l) zum Zeitpunkt 60 min p.i. (mit 219,6  $\mu$ mol/l) zahlenmäßig deutlich ab, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ( $p=0,2236$ ) (s. Abb. E59, Tab. A6 und A7).

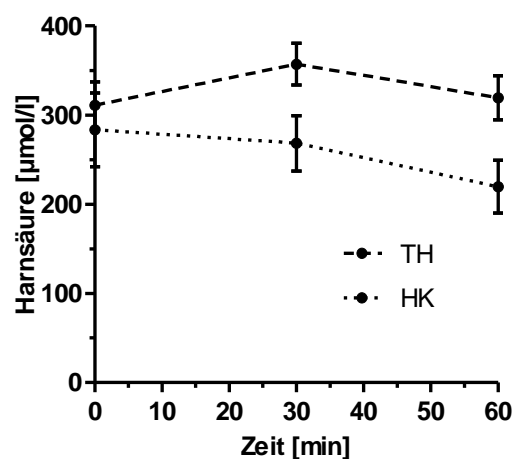
Auch bei den TH-Tieren verändert sich die Harnsäurekonzentration zahlenmäßig im Beobachtungszeitraum. Keine dieser Änderungen ist jedoch signifikant (30 min p.i.:  $p=0,2048$ ; 60 min p.i.:  $p=0,2842$ ).

Durch den zahlenmäßig absteigenden Harnsäure-Konzentrationsverlauf der Kontrolltiere sind die Harnsäurewerte der TH-Tiere zum Zeitpunkt 30 ( $p=0,0326$ ) und 60 min p.i. ( $p=0,0176$ ) signifikant (um 25 % bzw. 31 %) größer als die Harnsäurewerte der Kontrolltiere.

Die AUC der beiden Gruppen unterscheiden sich nicht ( $p=0,0597$ ).



**Abb. E58: Mittlerer Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungernden“ Tieren**



**Abb. E59: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungernden“ Tieren**

### 8.2.5 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin

Der Insulin-Konzentrationsverlauf der Kontrolltiere weist 5 min p.i. mit  $1,16 \mu\text{g/l}$  zwar einen Abfall im Vergleich zum Ausgangswert mit  $1,69 \mu\text{g/l}$  auf, der Unterschied ist aber nicht signifikant ( $p=0,1977$ ). Der Mittelwert über den Beobachtungszeitraum liegt bei  $1,13 \mu\text{g/l}$  (s. Abb. E60, Tab. A6 und A7).

Die mittlere Insulinkonzentration der TH-Tiere erreicht ausgehend von  $1,14 \mu\text{g/l}$  (Nullwert) zum Zeitpunkt 5 min mit einem Anstieg um 241 % auf  $2,75 \mu\text{g/l}$  ein Maximum ( $p=0,0002$ ). Zum Zeitpunkt 10 min p.i. fällt die Kurve wieder um 24 % ab, das Niveau bleibt aber im Vergleich zu dem der Kontrolltiere signifikant erhöht ( $p\text{M-W}=0,012$ ). Erst zum Zeitpunkt 30 min p.i. erreicht die mittlere Insulinkonzentration wieder das

Ausgangsniveau ( $p=0,545$ ). Zum 60-Minutenwert unterschreitet die mittlere Insulinkonzentration der TH-Tiere mit  $0,75 \mu\text{g/l}$  sogar das zeitgleiche Insulinniveau der Kontrolltiere von  $1,12 \mu\text{g/l}$  (nicht signifikant:  $p=0,0785$ ). Dies mag ursächlich dafür sein, dass die AUC der beiden Konzentrationsverläufe sich nicht signifikant unterscheiden ( $p=0,429$ ), denn bei Berechnung von Teilflächen (im Zeitraum 0 bis 30 min p.i.) zeigt sich noch ein signifikanter Unterschied ( $p=0,031$ ).

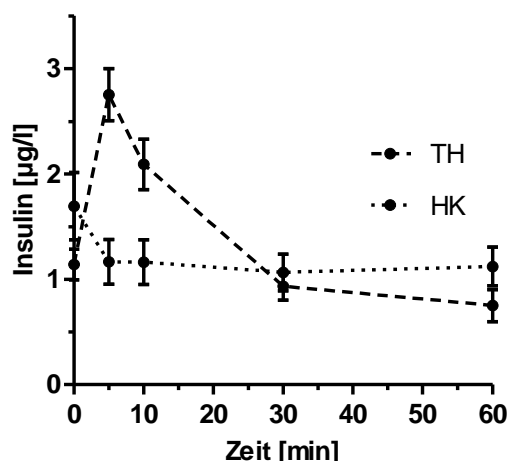
#### **8.2.6 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon**

Im mittleren Glucagon-Konzentrationsverlauf der Kontrolltiere findet sich zum Zeitpunkt 5 min p.i. ein kleiner Anstieg (von anfänglich  $480 \text{ ng/l}$  auf  $517,7 \text{ ng/l}$ ). Dieser Anstieg ist aber nicht signifikant ( $p=0,3646$  im Vergleich zum Nullwert,  $p=0,2256$  im Vergleich zum 10-Minutenwert), so dass sich über den Beobachtungszeitraum ein Mittelwert von  $492,8 \text{ ng/l}$  berechnen lässt (s. Abb. E61, Tab. A6 und A7).

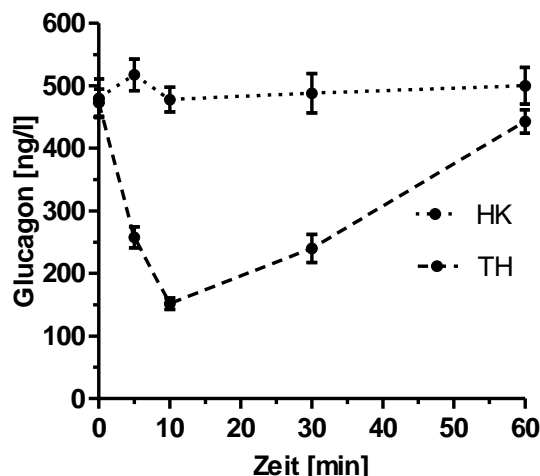
Im mittleren Glucagon-Konzentrationsverlauf der TH-Tiere findet sich zum Zeitpunkt 10 min p.i. ein Minimum (mit  $151,8 \text{ ng/l}$ ), das nur 32 % des Ausgangswertes ( $473 \text{ ng/l}$ ) entspricht. Im weiteren Verlauf steigt die Glucagonkonzentration wieder an, so dass zum Zeitpunkt 30 min mit  $240 \text{ ng/l}$  50 % des Nullwertes und zum Zeitpunkt 60 min p.i. mit  $442,9 \text{ ng/l}$  wieder das Ausgangsniveau (0- vs 60-Minutenwert:  $p=0,3054$ ) erreicht werden.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren finden sich bei den TH-Tieren signifikant niedrigere Glucagon-Werte zu den Zeitpunkten 5 min ( $p<0,0001$ ), 10 min ( $p\text{M-W}=0,0001$ ) und 30 min ( $p<0,0001$ ). Zum Zeitpunkt 60 min sind die Werte der beiden Gruppen nicht mehr unterschiedlich ( $p=0,111$ ).

Die AUC der TH-Tiere ist etwa halb so groß wie die der Kontrolltiere ( $p<0,0001$ ).



**Abb. E60: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungrnden“ Tieren**



**Abb. E61: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bzw. i.v. NaCl-Injektion (HK) bei „hungrnden“ Tieren**

## 9. Vergleich der Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen nach einer i.v. Tolbutamid-Injektion bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (TN) bzw. „hungernd“ (TH)

### 9.1 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose

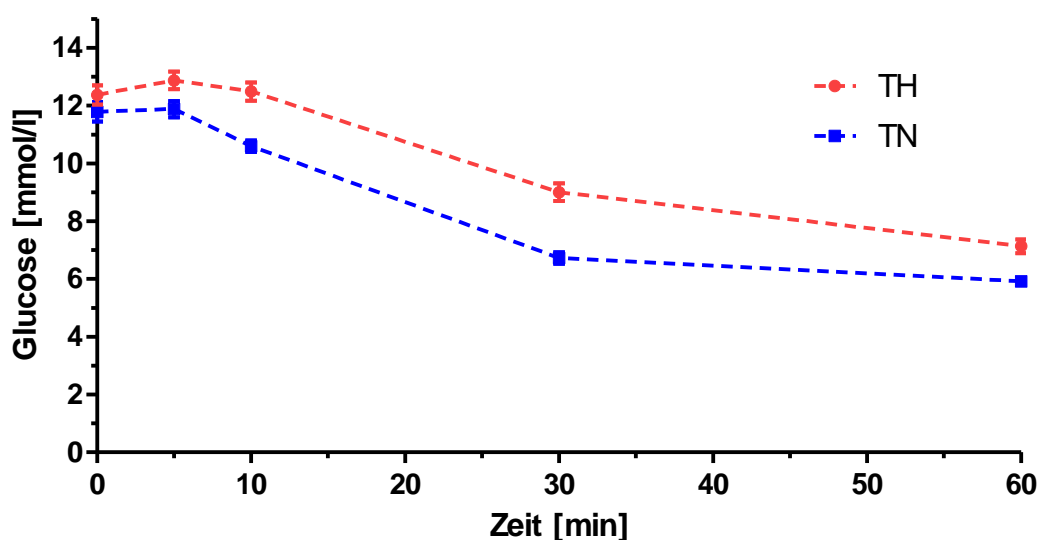
Die mittleren Glucose-Konzentrationskurven der beiden Gruppen verlaufen nach einer 5 minütigen Verzögerungsphase weitgehend parallel abfallend. Vom Konzentrationsniveau her gesehen liegen die Mittelwerte der TH-Tiere jedoch immer über den Mittelwerten der TN-Tiere (s. Abb. E62, Tab. A6 und A8).

Zwischen dem 0-Wert und dem 30-min-Wert fällt die Glucosekonzentration bei nüchternen Tieren auf 57 % ab, während sie bei den hungernden Tieren nur auf 73 % abfällt. Zum Zeitpunkt 60 min p.i. beträgt die Glucosekonzentration der TN-Tiere nur noch 50 % des 0-Wertes und die der TH-Tiere noch 58 %. Das heißt, die anfangs rascherer Glucose-Konzentrationsabnahme bei nüchternen Tieren (1,4 % pro Minute vs. 0,9 % pro Minute) gleicht sich in der zweiten Hälfte der Beobachtungszeit der Konzentrationsabnahme bei den hungernden Tieren an (0,9 % pro Minute vs. 0,7 % pro Minute).

Zum Zeitpunkt 0 gibt es noch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p=0,231$ ). Fünf Minuten nach der Tolbutamidinjektion liegen die nüchternen

Tiere mit 11,88 mmol/l bereits signifikant um 7 % ( $p=0,027$ ) unter dem mittleren Glucosewert der hungernden Tiere mit 12,87 mmol/l. Zum Zeitpunkt 10 min p.i. verstärkt sich dieser Effekt ( $p<0,0001$ ) nochmals (-15 %). Die TN-Tiere weisen mit 10,59 mmol/l eine Differenz von 2 mmol/l zum Glucosewert der TH-Tiere auf. 30 min p.i. beträgt die Differenz der beiden mittleren Blutglucosewerte 2,27 mmol/l (6,73 mmol/l (TN) vs 9 mmol/l (TH);  $p<0,0001$ ). Zum Zeitpunkt 60 min p.i. ist der Unterschied der Konzentrationsmittelwerte mit 1,21 mmol/l zwar kleiner geworden, aber immer noch signifikant ( $p=0,0006$ ). Die nüchternen Tiere liegen hier mit 5,91 mmol/l etwa 20 % unter dem Glucosewert der hungernden Tiere.

Die beiden AUC zum zeitlichen Verlauf der mittleren Glucosekonzentration sind signifikant verschieden ( $p<0,0001$ ). So beträgt die Glucose-Fläche der TN-Tiere nur 82 % der Fläche der TH-Tiere.



**Abb. E62: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Blutglucose ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamid-Injektion bei den zwei Versuchsbedingungen „nüchtern“ (TN) und „hungernd“ (TH)**

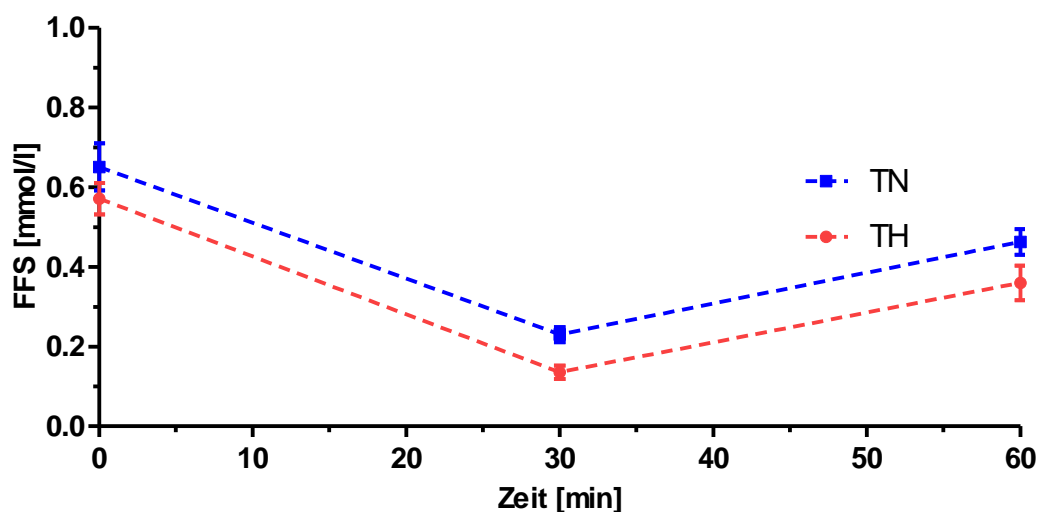
## 9.2 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren

Der mittlere FFS-Konzentrationsverlauf der beiden Gruppen ist vergleichsweise einheitlich. Einem Minimum bei 30 min p.i. folgt ein Wiederanstieg zum Zeitpunkt 60 min p.i., jedoch liegt das Konzentrationsniveau der nüchternen Tiere immer über dem der hungernden Tiere (s. Abb. E63, Tab. A6 und A8).



Zum Zeitpunkt 0 unterscheiden sich die mittleren FFS-Ausgangskonzentrationen (0,651 mmol/l vs. 0,571 mmol/l) der beiden Gruppen nicht signifikant ( $p=0,274$ ). 30 min p.i. haben die TN-Tiere mit 0,23 mmol/l einen um ca. 40 % höheren Wert als die TH-Tiere ( $p=0,001$ ). 60 min p.i. sind die FFS-Mittelwerte der zwei Gruppen jedoch nicht mehr signifikant unterschiedlich ( $p=0,071$ ).

Die AUC unter den Verlaufskurven der mittleren FFS-Konzentration bei beiden Behandlungsbedingungen sind signifikant unterschiedlich ( $p=0,0094$ ). So beträgt die AUC der TH-Tiere nur 72 % der Fläche der TN-Tiere.



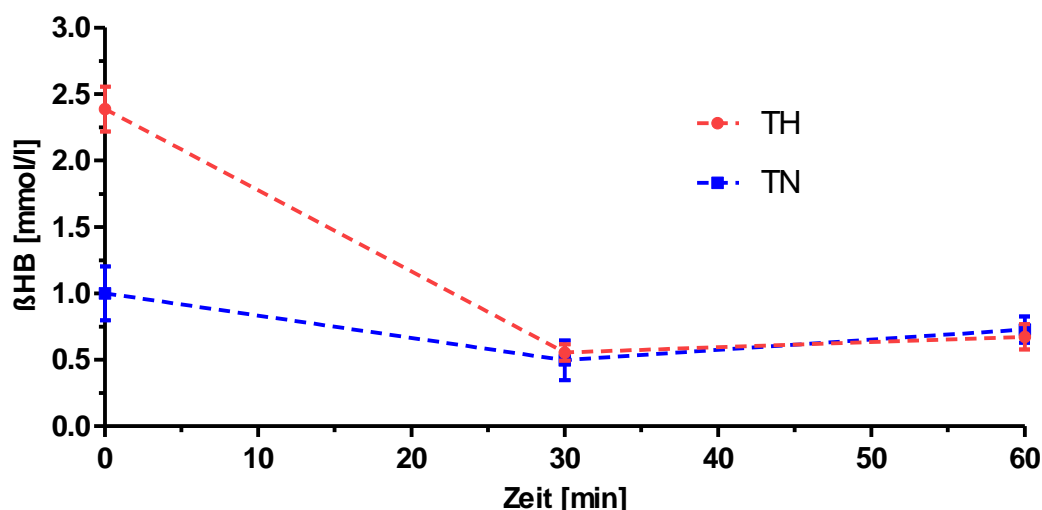
**Abb. E63: Mittlerer Konzentrationsverlauf der FFS im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamid-Injektion bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (TN) und „hungernd“ (TH)**

### 9.3 Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ -Hydroxybutyrat

Die mittleren Ausgangskonzentrationen von  $\beta$ HB unterscheiden sich deutlich zwischen den beiden Tiergruppen. So ist die  $\beta$ HB-Konzentration bei den TH-Tieren mit 2,39 mmol/l im Vergleich zu 1 mmol/l bei den TN-Tieren um 240 % höher. Im weiteren Verlauf fallen die  $\beta$ HB-Konzentrationskurven unterschiedlich steil ab (bei TH deutlich steiler) und treffen sich auf gleichem Konzentrationsniveau zum Zeitpunkt 30 min p.i., um dann bis zum Zeitpunkt 60 min p.i. plateauartig auf diesem Niveau zu bleiben (s. Abb. E64, Tab. A6 und A8).

Der Unterschied zum Zeitpunkt 0 ist dabei signifikant ( $p < 0,0001$ ). Im weiteren Verlauf findet sich weder zum Zeitpunkt 30 ( $p\text{-W}=0,052$ ) noch 60 min p.i. ( $p=0,696$ ) ein signifikanter Unterschied.

Die Fläche unter der  $\beta$ HB-Konzentrationskurve der TN-Tiere beträgt nur etwa zwei Drittel der Fläche der TH-Tiere ( $p=0,011$ ).



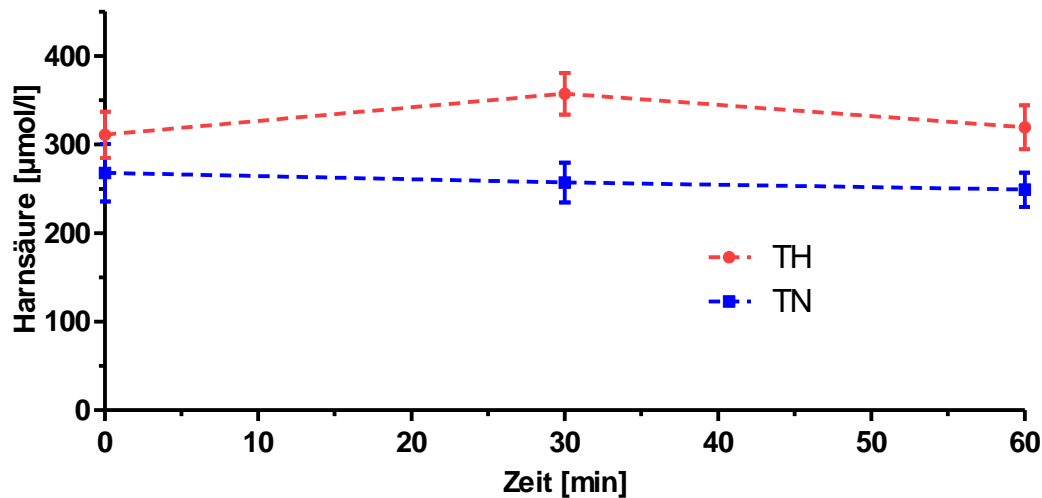
**Abb. E64: Mittlerer Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamid-Injektion bei den Versuchsbedingungen „nuchtern“ (TN) und „hungernd“ (TH)**

#### 9.4 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure

Während die Kurve der Harnsäurekonzentration bei den TN-Tieren plateauartig verläuft, findet sich bei den TH-Tieren ein leichter (nicht signifikanter) Anstieg zum Zeitpunkt 30 min p.i. und insgesamt ein höheres Niveau als bei den TN-Tieren. So betragen die Mittelwerte über die Beobachtungszeit bei TN- bzw. TH-Tieren 258 mmol/l bzw. 329 mmol/l (s. Abb. E65, Tab. A6 und A8).

Zum Zeitpunkt 0 zeigen die mittleren Harnsäurekonzentrationen der beiden Versuchsgruppen noch keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,767$ ). Durch den Konzentrationsanstieg bei den TH-Tieren ist deren mittlere Harnsäurekonzentration zum Zeitpunkt 30 min p.i. signifikant (um 28 %) höher als die der TN-Tiere ( $p=0,006$ ). Auch zum Zeitpunkt 60 min p.i. liegt das Harnsäure-Konzentrationsniveau der TH-Tiere signifikant um 22 % höher als das Niveau der TN-Tiere ( $p=0,037$ ).

So beträgt die AUC unter der Konzentrationskurve der TN-Tiere nur 77 % der Fläche der TH-Tiere ( $p=0,02$ ).

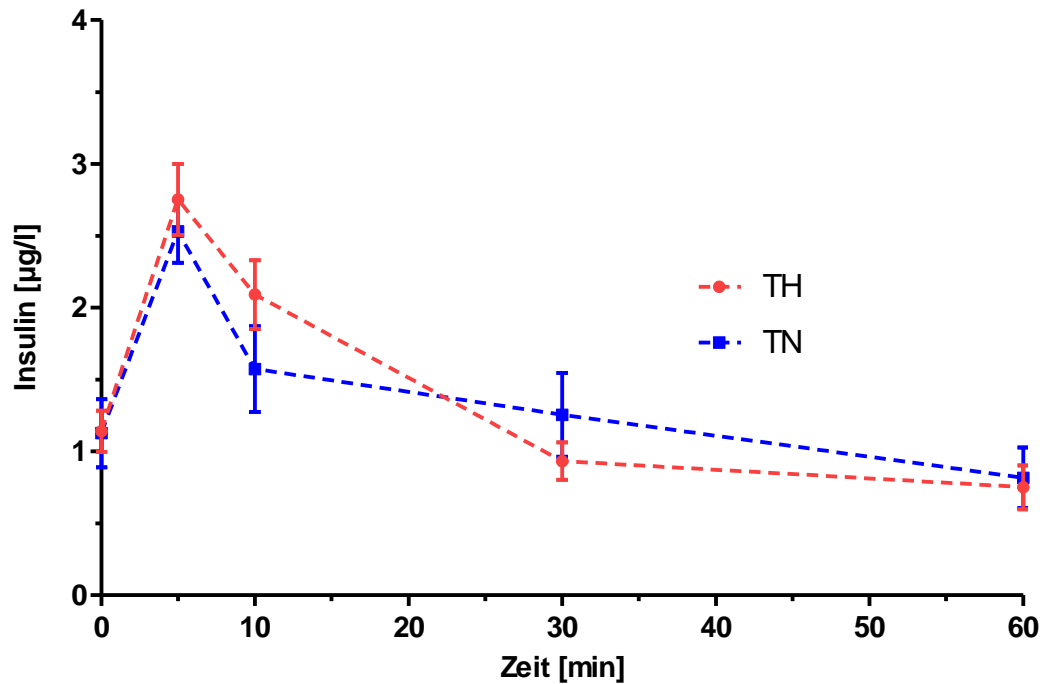


**Abb. E65: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamid-Injektion bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (TN) und „hungernd“ (TH)**

### 9.5 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin

Die Kurven der mittleren Insulinkonzentration bei beiden Tiergruppen verlaufen bis zum Maximum 5 min p.i. sehr ähnlich. Der wieder abfallende Verlauf bis zum Zeitpunkt 60 min p.i. gestaltet sich bei beiden Tiergruppen recht unterschiedlich. Beim Insulingipfel zum Zeitpunkt 5 min p.i. erreichen die TH-Tiere 241 % und die TN-Tiere 224 % der Ausgangskonzentration. Zu den Zeitpunkten 10 bzw. 30 min p.i. sinken die Werte der TH-Tiere auf 183 % bzw. 82 % des Ausgangswertes ab, während die zeitgleichen Werte der TN-Tiere auf 139 % bzw. 110 % des Nullwertes abfallen (s. Abb. E66, Tab. A6 und A8). Zum Zeitpunkt 60 min p.i. haben die abfallenden Insulinkonzentrationen bei beiden Tiergruppen mit 0,82 µg/l (TN) bzw. 0,75 µg/l (TH) wieder Ausgangsniveau erreicht. Obwohl Niveauunterschiede im Konzentrationsverlauf von Insulin zu sehen sind, unterscheiden sich die beiden Tiergruppen in ihrem Insulinlevel zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Die Flächen unter den mittleren Insulinkonzentrationsverläufen der beiden Gruppen sind nicht signifikant verschieden ( $p=0,9242$ ).



**Abb. E66: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamid-Injektion bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (TN) und „hungernd“ (TH)**

### 9.6 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon

Die beiden Kurven des mittleren Glucagon-Konzentrationsverlaufes sind trotz signifikant unterschiedlicher Nullwerte ( $pM-W=0,018$ ) in der Anfangsphase recht ähnlich, und zwar mit einem Minimum zum Zeitpunkt 10 min p.i., das 30 % des Ausgangswertes bei den TN-Tieren und 32 % des Ausgangswertes bei den TH-Tieren entspricht (s. Abb. E67, Tab. A6 und A8).

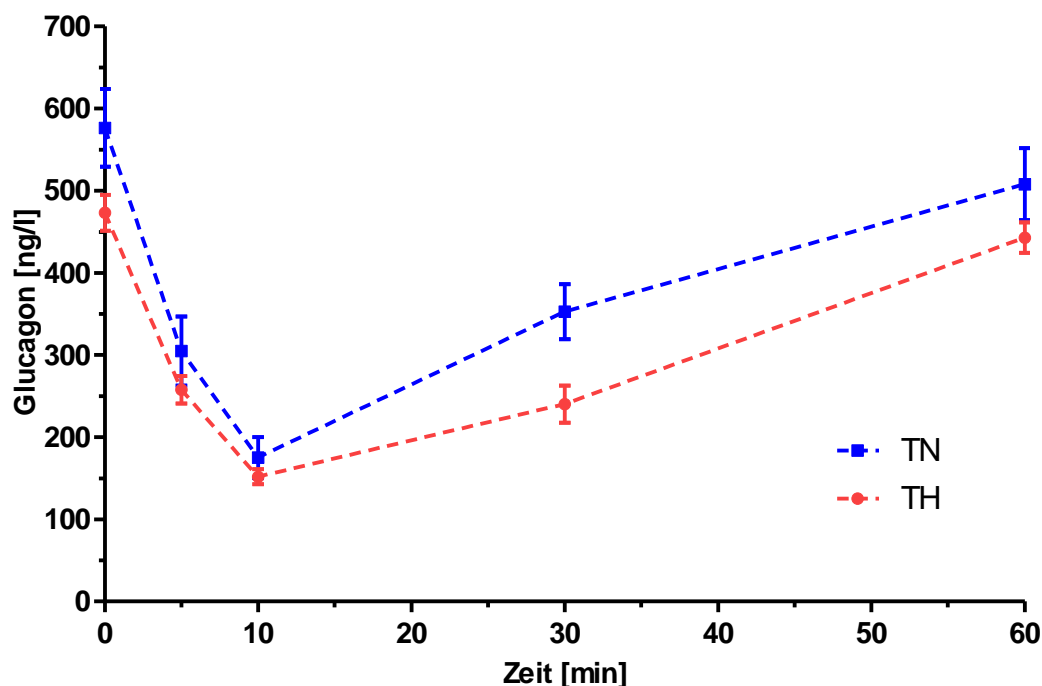
Der folgende Wiederanstieg der Glucagonkonzentration verläuft bei den TN-Tieren tendenziell steiler und erreicht zum Zeitpunkt 30 min p.i. 61 % des Nullwertes, während die TH-Tiere nur auf 50 % des Glucagonnullwertes ansteigen. Zum Zeitpunkt 60 min p.i. erreicht die Glucagonkonzentration der TH-Tiere 94 % des Ausgangswertes. Mit dem Glucagon-Konzentrationsanstieg der TN-Tiere werden zeitgleich nur 88 % des Nullwertes erreicht.

Insgesamt gesehen ist das Niveau der Glucagon-Konzentrationskurve der TN-Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum höher als das Niveau der TH-Tiere.

Für die mittleren Nullwerte lässt sich ein signifikanter Unterschied feststellen mit etwa

18 % höheren Glucagonmittelwerten der TN-Tiere ( $pM-W=0,018$ ). Zu den Zeitpunkten 5, 10 und 60 min p.i. finden sich keine signifikanten Unterschiede in den mittleren Glucagonwerten der beiden Behandlungsgruppen. Nur zum Zeitpunkt 30 min beträgt der Wert der TH-Tiere mit 240,0 ng/l nur 68 % des Wertes der TN-Tiere ( $p=0,011$ ).

Dennoch unterscheiden sich die AUC der beiden Tiergruppen nicht signifikant.



**Abb. E67: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon im Blutplasma ( $\pm SE$ ) nach i.v. Tolbutamid-Injektion bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (TN) und „hungernd“ (TH)**

#### 10. Vergleich der Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen nach einer i.v. Glucose-Kurzzeitinjektion (GTT) bzw. einer i.v. Tolbutamid-Injektion (T) bei den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H)

In den nachfolgenden Kapiteln werden die metabolischen Auswirkungen einer Glucose-induzierten (GTT) Hyperinsulinämie mit denen einer Tolbutamid-induzierten (T) Hyperinsulinämie jeweils bei „nüchternen“ und „hungernden“ Versuchstieren verglichen. Der Tolbutamid-Testansatz erlaubt wegen der die Hyperinsulinämie begleitenden Hypoglykämie eine Differenzierung zwischen der verbundenen hyperglykämischen und hyperinsulinämischen metabolischen Wirkung einerseits und der reinen hyperinsulinämischen metabolischen Wirkung andererseits.

## 10.1 Versuchsbedingung „nüchtern“

### 10.1.1 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose und Insulin

Erwartungsgemäß induziert die experimentelle exogene Glucosebelastung eine massive Hyperglykämie (Glucosemaximum bei 5 min p.i. um 216 % höher als der Ausgangswert), die bis zum Zeitpunkt 30 min p.i. weitgehend wieder abgeklungen ist mit einer  $T_{1/2}$  von 8,64 min. Annähernd deckungsgleich zur Intensität und Dauer dieser Hyperglykämie stellt sich eine deutliche Hyperinsulinämie (Maximum 441 % des Ausgangswertes 5 min p.i.) ein, die zum Zeitpunkt 30 min p.i. wieder abgeklungen ist bzw. zum Zeitpunkt 60 min p.i. sogar die Ausgangskonzentration um 34 % unterschreitet (s. Abb. E68a, E68b, E68c, Tab. A3, A6, A9).

Die Tolbutamidinjektion führt ebenfalls zu einer signifikanten Hyperinsulinämie (224 % des Nullwertes zum Zeitpunkt 5 min p.i.; s. Abb. E68b) und einer sich daraus allmählich entwickelnden Hypoglykämie (Absenkung der Glucosekonzentration zu den Zeitpunkten 10, 30 bzw. 60 min p.i. um 10 %, 43 % bzw. 50 %).

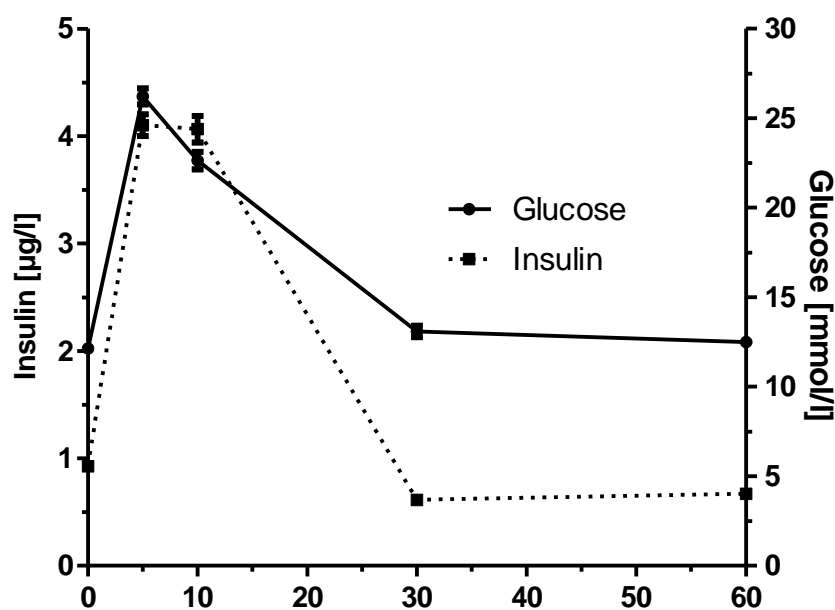
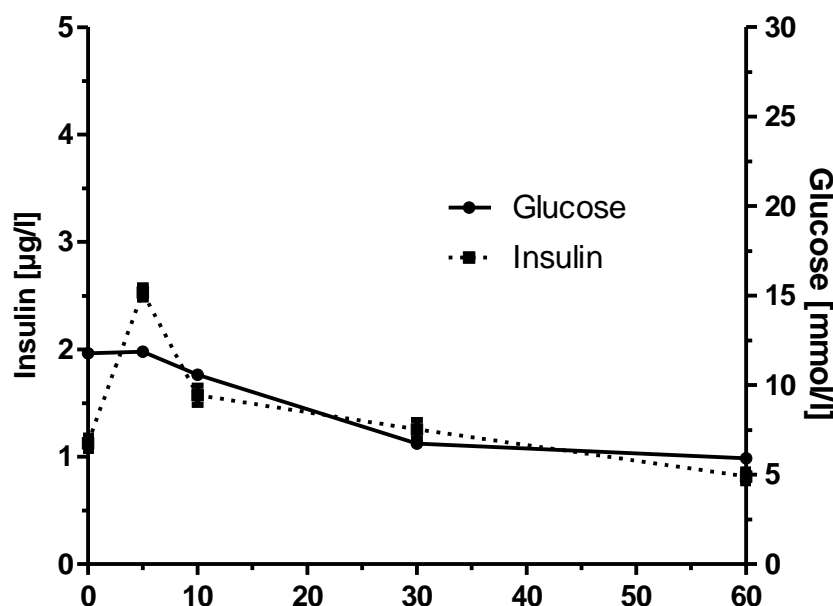


Abb. E68a: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose und Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion bei „nüchternen“ Versuchstieren (GTTN)

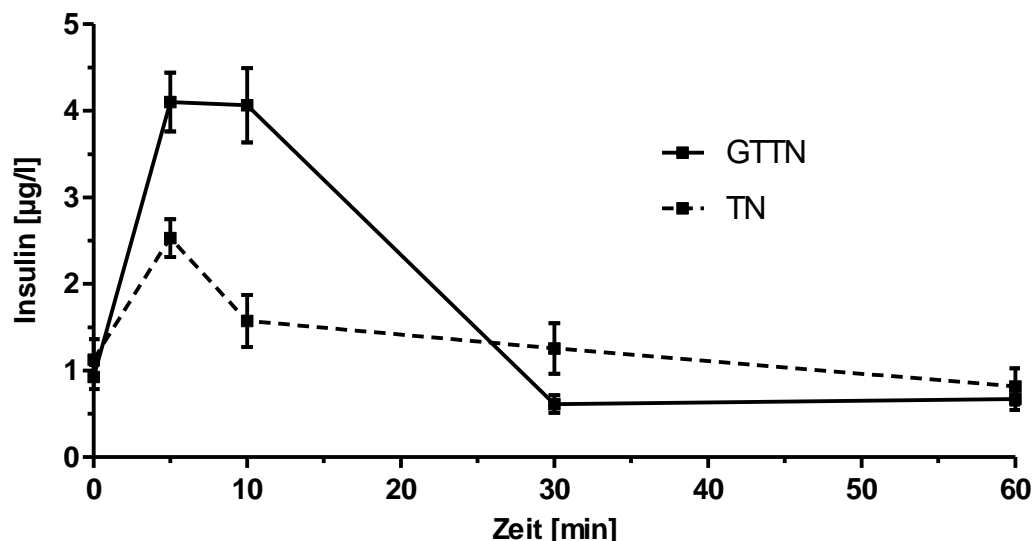


**Abb. E68b: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose und Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion bei „nüchternen“ Versuchstieren (TN)**

Auch wenn die Kurvenverläufe der mittleren Insulinkonzentrationen nach i.v. Glucoseinjektion oder nach i.v. Tolbutamidinjektion sich in der Ausprägung eines Maximum 5 min p.i. gleichen, erreicht die mittlere Insulinkonzentration im Maximum bei den TN-Tieren lediglich ca. 62 % des Wertes der GTTN-Tiere. Während die Insulinkonzentration bei der GTTN-Gruppe nach 30 min wieder auf Ausgangswerte abgesunken ist, erreicht der Insulinspiegel der TN-Tiere erst zum Zeitpunkt 60 min p.i. wieder Ausgangswerte (s. Abb. E68c).

Aufgrund des insgesamt höheren Insulinspiegels ist die AUC der GTTN-Tiere um das 1,6-fache größer als die der TN-Tiere ( $p=0,009$ ).

Signifikant niedrigere Insulinkonzentrationen im Vergleich zu den GTTN-Tieren haben die TN-Tiere zu den Zeitpunkten 5 ( $p=0,0009$ ) und 10 min p.i. ( $p=0,0001$ ). Zum Zeitpunkt 30 min p.i. weisen sie mit 1,26  $\mu\text{g/l}$  einen doppelt so hohen Wert wie die GTTN-Tiere auf ( $p=0,044$ ). Bei dem letzten Messpunkt unterscheiden sich die beiden Behandlungen in der Insulinkonzentration nicht mehr ( $p=0,549$ ).



**Abb. E68c: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucose-Injektion (GTTN) oder i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bei „nüchternen“ Versuchstieren**

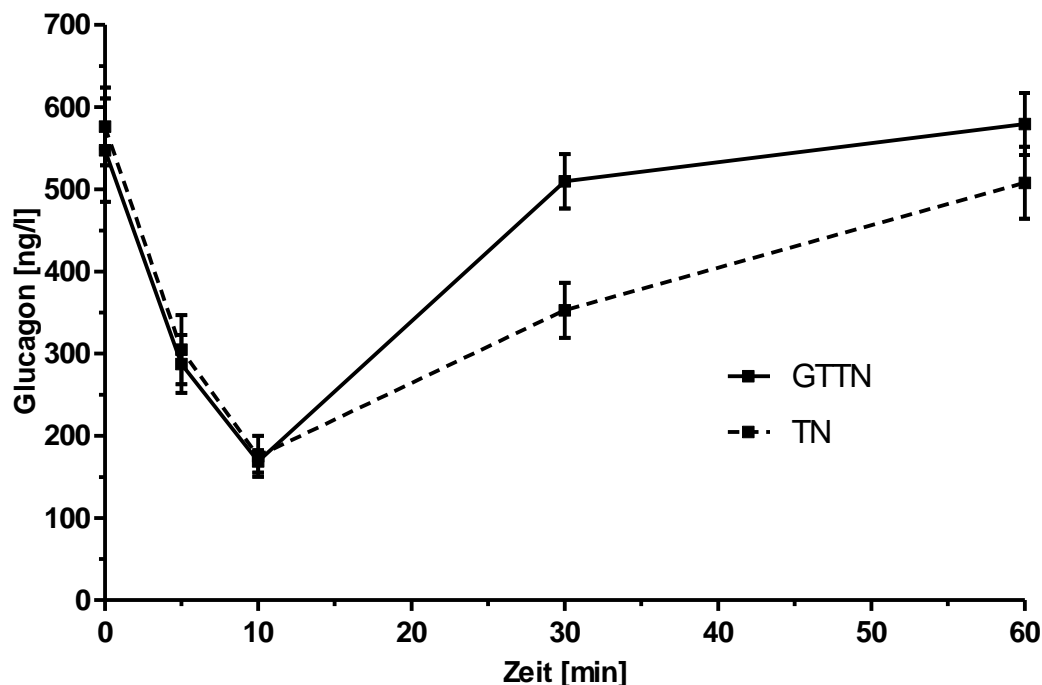
### 10.1.2 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon

Trotz der sich erheblich unterscheidenden Glucosespiegel sind sich die Glucagon-Konzentrationsverläufe nach beiden Behandlungen (GTT vs T) anfangs überraschend ähnlich, und zwar insbesondere auch in Bezug auf das erreichte Glucagon-Konzentrationsminimum zum Zeitpunkt 10 min p.i. (Abfall auf 30 % des Ausgangswertes bei den TN-Tieren und den GTTN-Tieren) (s. Abb.69, Tab. A3, A6, A9). Unterschiedlich zeigt sich dagegen der nachfolgende Konzentrationswiederanstieg auf Ausgangswerte. Während die GTTN-Tiere zum Zeitpunkt 30 min p.i. bereits wieder auf Kontrollniveau sind, steigt die Konzentrationskurve der TN-Tiere flacher an, so dass die Glucagonkonzentration zum Zeitpunkt 30 min p.i. nur 61 % des Ausgangsniveaus erreicht. Zum Zeitpunkt 60 min p.i. findet sich mit 507,9 ng/l kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert, allerdings wird das Kontrollniveau von 679,7 ng/l noch nicht wieder erreicht (75 %;  $p=0,01$ ). Die Normalisierung der Hypoglucagonämie erfolgt bei den TN-Tieren deutlich langsamer, obwohl bei ihnen zeitgleich eine Hypoglykämie als wichtiges Signal für die Glucagonausschüttung gegeben ist.

So ist auch die AUC der GTTN-Tiere um 11 % größer als die AUC der TN-Tiere. Der Unterschied ist aber nicht signifikant ( $p=0,3642$ ).



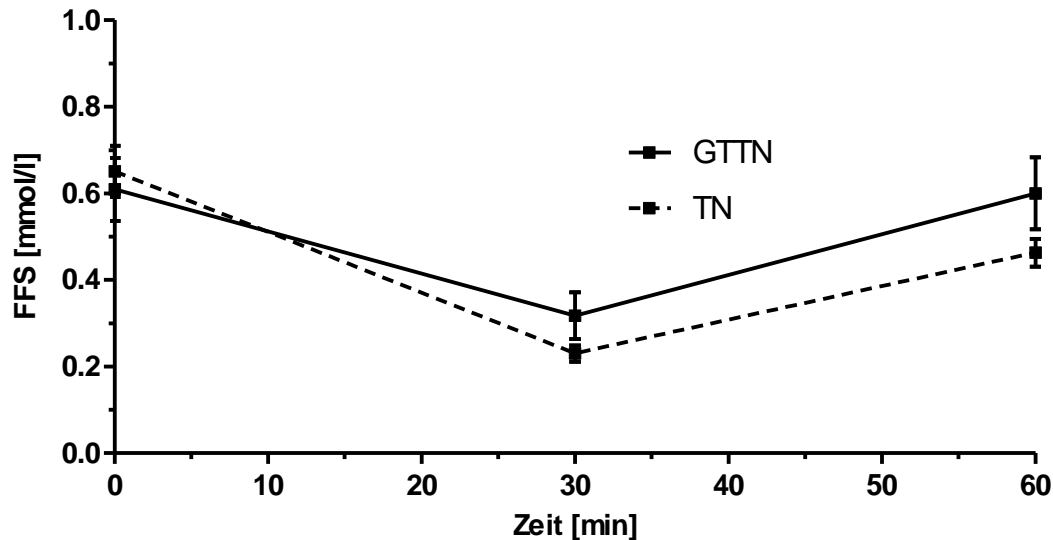
Signifikant unterschiedlich sind die Glucagonwerte der TN-Tiere nur zum Zeitpunkt 30 min p.i. Dort erreichen sie mit 352,8 ng/l etwa 70 % des Wertes der GTTN-Tiere ( $p=0,003$ ).



**Abb. E69: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucose-Injektion (GTTN) oder i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bei „nüchternen“ Versuchstieren**

### 10.1.3 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren

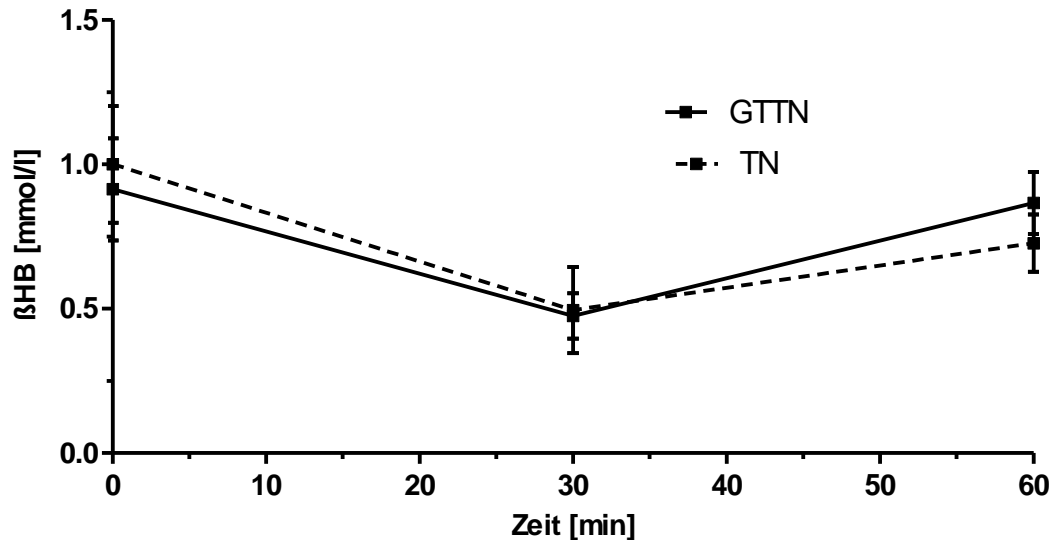
Die beiden FFS-Konzentrationskurven verlaufen ausgehend von weitgehend identischen Nullwerten (0,651 mmol/l vs. 0,609 mmol/l) nahezu parallel mit einem Abfall der FFS-Konzentration um 65 % bei den TN-Tieren und um 48 % bei den GTTN-Tieren zum Zeitpunkt 30 min p.i. (s. Abb. E70, Tab. A3, A6, A9). Der Wiederanstieg der FFS-Konzentration verläuft bei den TN-Tieren flacher. Zum Zeitpunkt 60 min p.i. erreichen sie 71 % des Ausgangswertes, während die GTTN-Tiere 98 % ihres Nullwertes erreichen. Insgesamt gesehen liegt das FFS-Konzentrationsniveau der GTTN-Tiere in der Zeit von 30 min bis 60 min p.i. über dem Niveau der TN-Tiere. Die Unterschiede zwischen den FFS-Mittelwerten sind aber zu keinem Zeitpunkt signifikant und auch die AUC der beiden Gruppen unterscheiden sich nicht.



**Abb. E70: Mittlerer Konzentrationsverlauf der FFS im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucose-Injektion (GTTN) oder i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bei „nüchternen“ Versuchstieren**

#### 10.1.4 Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ -Hydroxybutyrat

Die Kurven der mittleren  $\beta$ HB-Konzentration verlaufen ausgehend von weitgehend identischen Nullwerten (1 mmol/l vs. 0,91mmol/l) in beiden Behandlungsgruppen sehr ähnlich, mit einem Minimum zum Zeitpunkt 30 min p.i., das bei den TN-Tieren 50 % und bei den GTTN-Tieren 53 % des Ausgangswertes beträgt. Bis zum Zeitpunkt 60 min p.i. steigt die  $\beta$ HB-Konzentration bei den TN-Tieren auf 73 % des Nullwertes und bei den GTTN-Tieren auf 96 % des Nullwertes an (s. Abb. E71, Tab. A3, A6, A9). Es gibt weder Behandlungsspezifische signifikante Konzentrationsunterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten, noch unterscheiden sich die AUC der zwei Behandlungsgruppen.



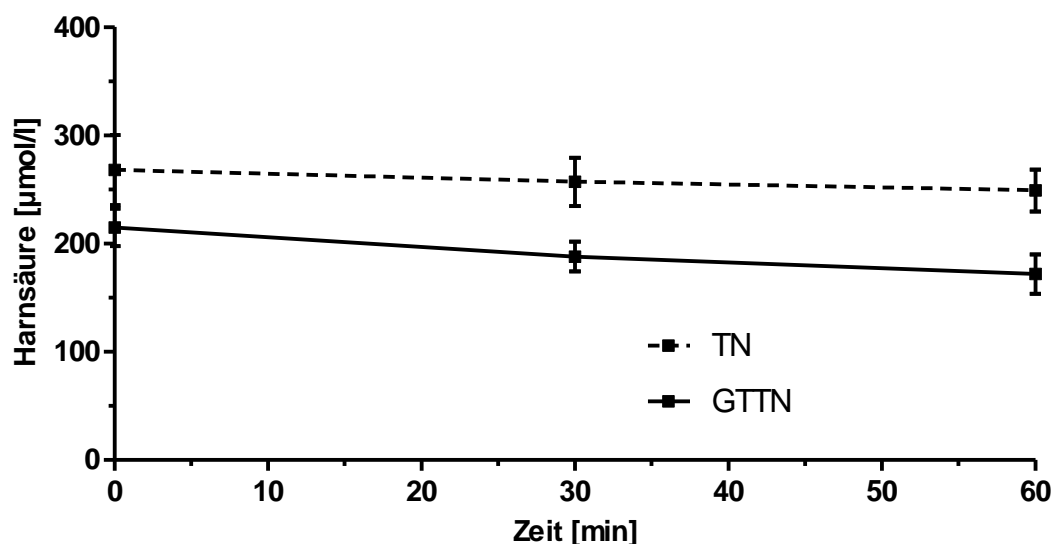
**Abb. E71: Mittlerer Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucose-Injektion (GTTN) oder i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bei „nüchternen“ Versuchstieren**

#### 10.1.5 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure

Die mittlere Harnsäurekonzentration sinkt ausgehend von nicht signifikant ( $p=0,164$ ) unterschiedlichen Nullwerten (267,9 mmol/l vs 214,9 mmol/l) bei beiden Behandlungsgruppen im Beobachtungszeitraum kontinuierlich ab: Um 7 % bei den TN-Tieren und um 20 % bei den GTTN-Tieren bis zum Zeitpunkt 60 min p.i. Dabei liegt das Konzentrationsniveau der TN-Tiere immer höher als das Niveau der GTTN-Tiere.

So beträgt die mittlere Harnsäurekonzentration der GTTN-Tiere zum Zeitpunkt 0 min p.i. 80 % (nicht signifikant:  $p=0,164$ ) der Harnsäurekonzentration der TN-Tiere, zum Zeitpunkt 30 min p.i. noch 73 % (signifikant:  $p=0,014$ ) und zum Zeitpunkt 60 min p.i. 69 % (signifikant:  $p=0,008$ ) (s. Abb. E72, Tab. A3, A6, A9).

Dadurch beträgt die AUC der Harnsäurekonzentration der GTTN-Tiere nur etwa 75 % der Fläche der TN-Tiere ( $p=0,011$ ).



**Abb. E72: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucose-Injektion (GTTN) oder i.v. Tolbutamidinjektion (TN) bei „nüchternen“ Versuchstieren**

## 10.2 Versuchsbedingung „hungernd“

### 10.2.1 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose und Insulin

Die Glucoseinjektion verursacht bei den GTTH-Tieren eine Hyperglykämie mit einem Glucose-Maximum von 234 % des Ausgangswertes 5 min p.i., die bis zum Zeitpunkt 30 min p.i. noch nicht abgeklungen ist. Begleitet wird dieser Glucose-Konzentrationsverlauf von einer Hyperinsulinämie, die zum Zeitpunkt 10 min p.i. mit 310 % des Ausgangswertes ein Maximum erreicht und zum Zeitpunkt 30 min p.i. bereits wieder das Nullniveau erreicht hat, obwohl der Glucosespiegel noch erhöht ist (s. Abb. E73a, E73b, E73c, Tab. A3, A6, A9)

Bei den TH-Tieren zeigt sich ein Insulinmaximum (+241 % des Nullwertes) 5 min nach der Tolbutamidinjektion. Auch in dieser Behandlungsgruppe werden zum Zeitpunkt 30 min p.i. wieder Ausgangswerte erreicht. Interessant ist, dass die eingeleitete Hypoglykämie trotz des wieder normalisierten Insulinspiegels weiter zunimmt. So ist der Glucosespiegel bis zum Zeitpunkt 60 min p.i. mit 7,13 mmol/l auf 58 % des Ausgangswertes abgesunken (s. Abb. E73b).

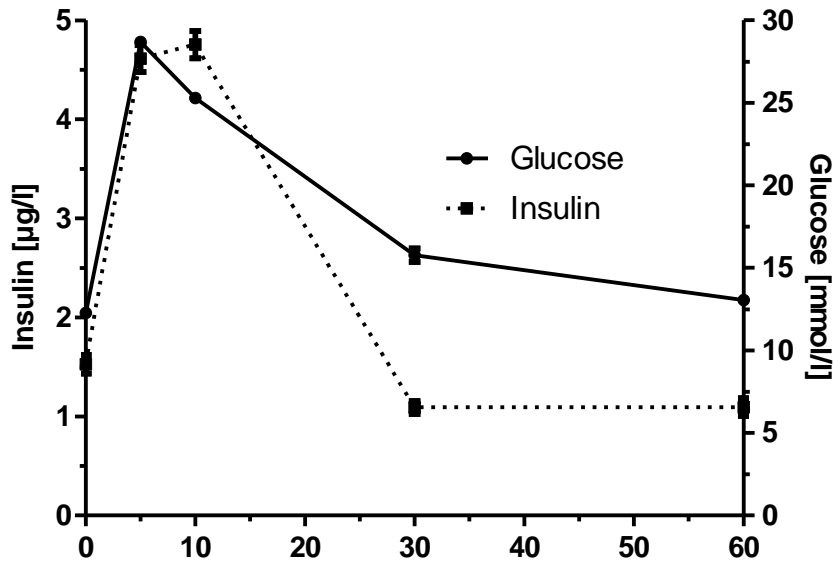


Abb. E73a: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose und Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucoseinjektion bei „hungrigen“ Versuchstieren (GTTH)

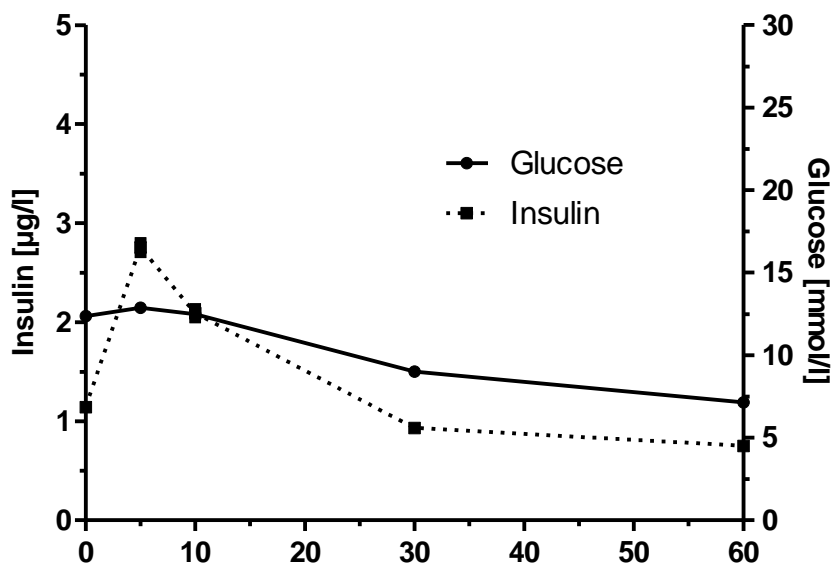
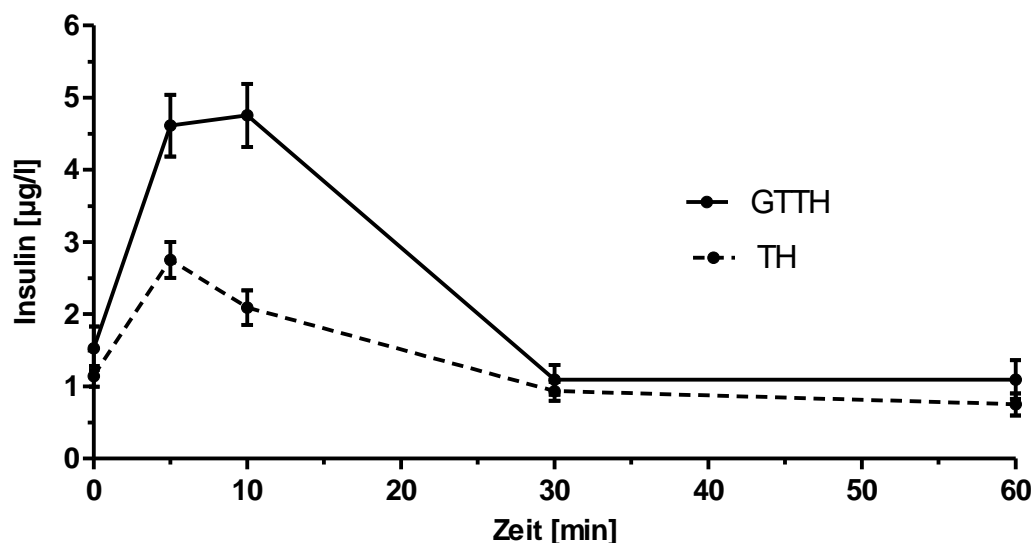


Abb. E73b: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucose und Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Tolbutamidinjektion bei „hungrigen“ Versuchstieren (TH)

Die Fläche unter der Insulinkonzentrationskurve der Tiergruppe GTTH ist signifikant doppelt so groß wie die Fläche der Gruppe TH ( $p=0,0009$ ).

Im Behandlungsvergleich erreichen die TH-Tiere signifikant niedrigere Insulinspiegel zum Zeitpunkt 5 (60 % der Insulinkonzentration der GTTH-Tiere:  $p=0,001$ ) und zum Zeitpunkt 10 min p.i. (44 % der Insulinkonzentration der GTTH-Tiere:  $p<0,0001$ ). Zum Zeitpunkt 30

und 60 min p.i. sind die Insulinkonzentrationen bei beiden Behandlungsgruppen nicht mehr signifikant unterschiedlich ( $p=0,511$  bzw.  $p=0,259$ ).



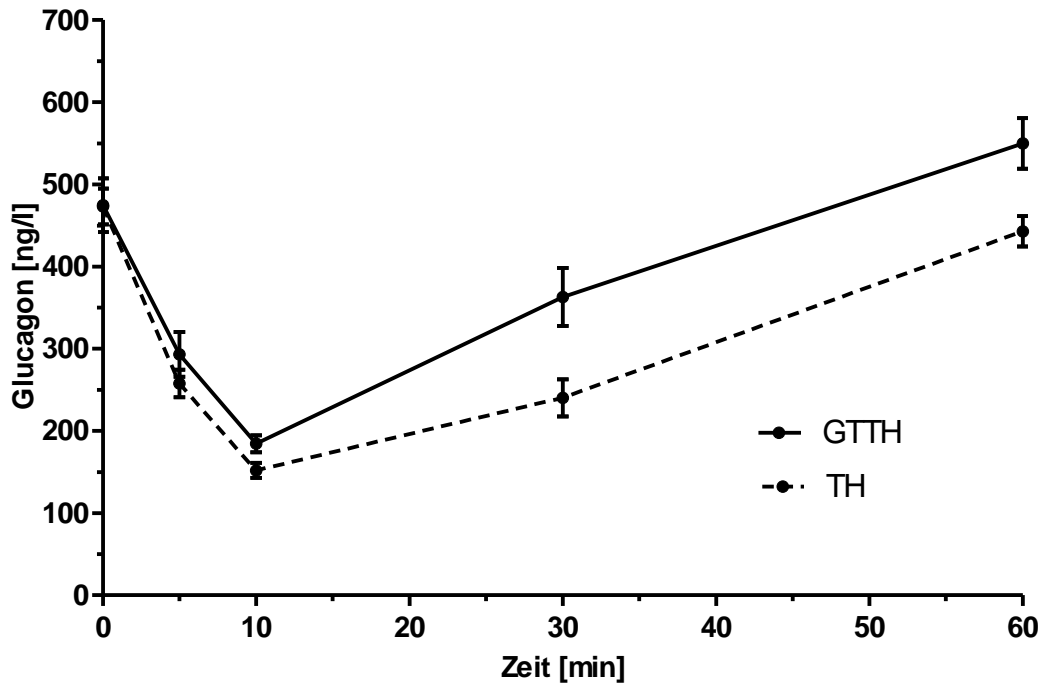
**Abb. E73c: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Insulin im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucose-Injektion (GTTH) oder i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bei „hungrnden“ Versuchstieren**

### 10.2.2 Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon

Wie schon bei der Versuchsbedingung „nüchtern“ gleichen sich die Glucagon-Konzentrationsverläufe nach beiden Behandlungen auch im Hungerzustand, und zwar mit der steil absinkenden Glucagonkonzentration bis zum Zeitpunkt 10 min p.i., wobei die prozentuale Abnahme der Glucagonkonzentration bei den TH-Tieren mit -68 % tendenziell noch ausgeprägter ist als bei den GTTH-Tiere mit -61 %. In beiden Behandlungsgruppen wird nach einem flachen Wiederanstieg erst zum Zeitpunkt 60 min p.i. wieder das Ausgangsniveau erreicht (GTTH) bzw. annähernd (TH) erreicht, wobei das Glucagonniveau der TH-Tiere zum Zeitpunkt 30 min p.i. um 34 % und zum Zeitpunkt 60 min p.i. immer noch um 20 % niedriger ist als das Niveau der GTTH-Tiere (s. Abb. E74, Tab. A3, A6, A9).

Zu den Zeitpunkten 10, 30 und 60 min p.i. ist die Glucagonkonzentration der TH-Tiere signifikant niedriger als die der GTTH-Tiere (-17 %:  $p=0,028$ , -34 %:  $p=0,008$ , -20 %:  $p=0,007$ ).

Trotz der Behandlungsspezifischen Konzentrationsunterschiede in der zweiten Beobachtungshälfte unterscheiden sich die AUC der beiden Tiergruppen nicht ( $p=0,068$ ).



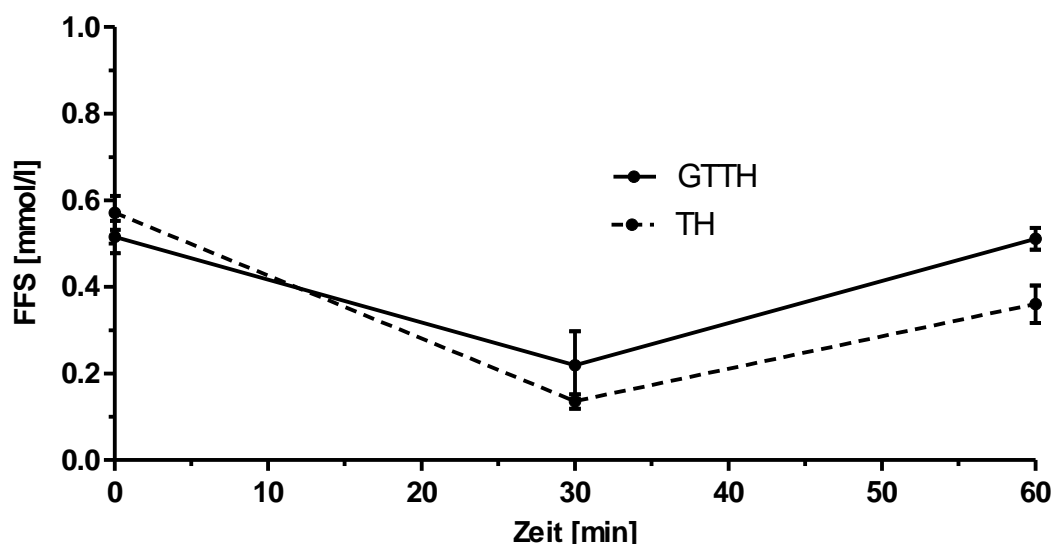
**Abb. E74: Mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucose-Injektion (GTTH) oder i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bei „hungrigen“ Versuchstieren**

### 10.2.3 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Freien Fettsäuren

Wegen des initialen Abfalles der FFS-Konzentration entspricht die zum Zeitpunkt 30 min p.i. erreichte FFS-Konzentration bei den TH-Tieren rund 76 % und bei den GTTH-Tieren rund 57 % des Ausgangswertes. Die FFS-Konzentrationen beider Behandlungsgruppen steigen anschließend wieder an, wobei die Mittelwerte 60 min p.i. bei den TH-Tieren nur auf 63 % ihres Nullwertes ansteigen, während die GTTH-Tiere zeitgleich 99 % ihres Ausgangswertes erreichen. Ähnlich wie im „nüchtern“-Vergleich (s. Abb. E77) liegt das FFS-Konzentrationsniveau der GTTH-Tiere in der Zeit von 30 min bis 60 min p.i. über dem Niveau der TH-Tiere (s. Abb. E75, Tab. A3, A6, A9).

So findet sich zu den Zeitpunkten 0 und 30 min p.i. kein signifikanter Behandlungsspezifischer Unterschied der FFS-Konzentration. Allerdings erreichen die TH-Tiere zum Zeitpunkt 60 min mit 0,36 mmol/l nur etwa 70 % des Wertes der GTTH-Tiere ( $p=0,012$ ).

Die AUC der FFS der zwei Behandlungsgruppen unterscheiden sich jedoch nicht signifikant ( $p=0,363$ ).



**Abb. E75: Mittlerer Konzentrationsverlauf der FFS im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucose-Injektion (GTTH) oder i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bei „hungrigen“ Versuchstieren**

#### 10.2.4 Mittlerer Konzentrationsverlauf von $\beta$ -Hydroxybutyrat

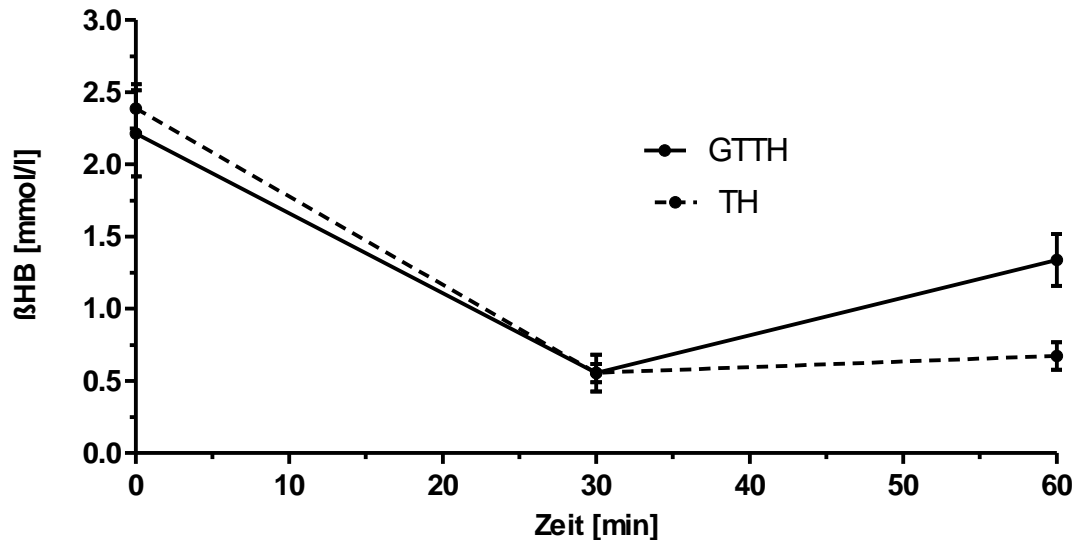
Die beiden Behandlungsspezifischen mittleren  $\beta$ HB-Konzentrationskurven fallen zum Zeitpunkt 30 min p.i. nahezu parallel auf ein Minimum ab, das bei TH 26 % des Nullwertes und bei GTTH 25 % des Nullwertes beträgt (s. Abb. E76, Tab. A3, A6, A9).

Der Wiederanstieg der  $\beta$ HB-Konzentration verläuft bei den TH-Tieren deutlich flacher und erreicht dadurch 60 min p.i. lediglich 30 % des Ausgangswertes, während die Werte der GTTH-Tiere zeitgleich auf 61 % ihres Ausgangswertes ansteigen.

Daher unterscheiden sich die Werte der beiden Behandlungsgruppen zu den Zeitpunkten 0 und 30 min p.i. nicht signifikant, wohingegen zum Zeitpunkt 60 min p.i. die Werte der TH-Tiere mit 0,67 mmol/l nur 50 % der mittleren  $\beta$ HB-Konzentration der GTTH-Tiere erreichen (signifikant:  $p=0,003$ ).

Die beiden AUC des  $\beta$ HB sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,692$ ).





**Abb. E76: Mittlerer Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucose-Injektion (GTTH) oder i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bei „hungrigen“ Versuchstieren**

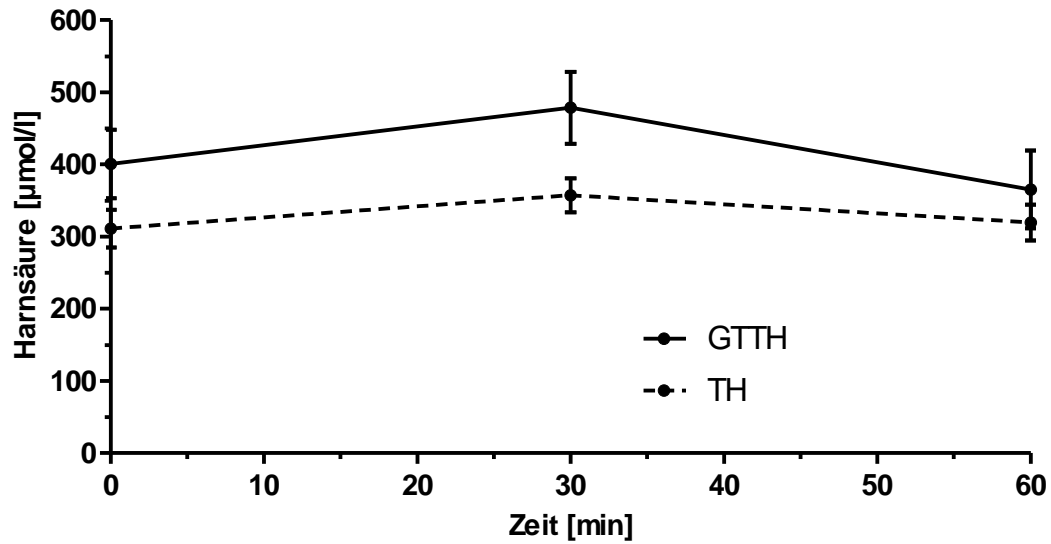
#### 10.2.5 Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure

Die Harnsäure-Konzentrationsverläufe ähneln sich bei beiden Behandlungen sehr stark, mit einem vorübergehenden Anstieg zum Zeitpunkt 30 min p.i. Das Niveau der Harnsäure-Konzentrationskurve der GTTH-Tiere liegt jedoch stets deutlich über dem Niveau der Harnsäure-Konzentrationskurve der TH-Tiere (s. Abb. E77, Tab. A3, A6, A9).

Zum Zeitpunkt 0 sind die mittleren Harnsäurekonzentrationen der beiden Gruppen noch nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,105$ ), obwohl die GTTH-Tiere mit  $400 \mu\text{mol/l}$  eine deutlich höhere Ausgangskonzentration aufweisen als die TH-Tiere mit  $311 \mu\text{mol/l}$ .

Während die Harnsäurekonzentration der GTTH-Gruppe zum Zeitpunkt 30 min p.i. auf  $478,6 \mu\text{mol/l}$  ansteigt (+20 %), erreichen die TH-Tiere mit  $357,1 \mu\text{mol/l}$  (+15 %) einen signifikant niedrigen Anstieg ( $p=0,035$ ). Zum Zeitpunkt 60 min p.i. fällt die Harnsäurekonzentration der beiden Behandlungsgruppen mit  $365,3 \mu\text{mol/l}$  (GTTH) bzw.  $319,4 \mu\text{mol/l}$  (TH) wieder in den Konzentrationsbereich des Ausgangsniveaus ab, so dass kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Gruppen mehr besteht ( $p=0,422$ ).

Die beiden AUC der Harnsäurekonzentration sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,177$ ).



**Abb. E77: Mittlerer Konzentrationsverlauf der Harnsäure im Blutplasma ( $\pm$ SE) nach i.v. Glucose-Injektion (GTTH) oder i.v. Tolbutamidinjektion (TH) bei „hungernden“ Versuchstieren**

## **V. DISKUSSION**

Durch die vorliegende Untersuchung an adulten Hennen, die noch legeinaktiv waren, sollte mittels diverser tierexperimenteller Maßnahmen ein differenzierter Einblick in den Glucose- (und Energie-) Stoffwechsel und dessen hormonale Regulation durch Insulin und Glucagon gewonnen werden.

Es wurden unterschiedlich ausgeprägte katabole Stoffwechselsituationen (nüchtern, mehrtägig hungernd, mehrtägig hungernd und glucosuretisch) herbeigeführt und ein Tagesprofil der Konzentration von Glucose, von Metaboliten des Fettstoffwechsels (FFS,  $\beta$ HB) und des Proteinstoffwechsels (Harnsäure) sowie von Insulin und Glucagon im Blutplasma erstellt.

Ein während dieser katabolen Zustände jeweils durchgeführter i.v.-Glucosetoleranztest sollte Einblick in die jeweils vorherrschende Glucoseelimination aus dem Blut und in die dabei induzierten hyperglykämischen Auswirkungen auf die Ausschüttung von Insulin und Glucagon ermöglichen.

Bei nüchternen Hennen sollte mittels i.v. Glucose-Mehrfachinjektionen und der dadurch anhaltend erhöhten Glucoseverfügbarkeit im Blut deren Auswirkung auf die Konzentration der bereits genannten Metabolite und Hormone im Blut untersucht werden.

Um die Wirkung einer experimentell erhöhten Insulinverfügbarkeit im Stoffwechsel, und zwar unbeeinflusst von einer Glucosezufuhr, bei nüchternen und hungernden Tieren darstellen zu können, wurde Tolbutamid i.v. injiziert und dessen Auswirkung auf den Konzentrationsverlauf der bereits genannten Metabolite und Hormone im Blut untersucht.

Die dafür erforderlichen tierexperimentiellen Maßnahmen sowie insbesondere die dadurch erzielten Ergebnisse werden nachfolgend kritisch bewertet bzw. interpretiert und in den bisherigen Wissensstand integriert.

### **1. Versuchstechnische Anmerkungen**

#### **1.1 Der Blutentnahmestress**

Für die Erstellung von zeitabhängigen Konzentrationsverläufen von Metaboliten und Hormonen im Blut ist die wiederholte Blutentnahme unumgänglich. Aufgrund eigener Erfahrungen bei der Einarbeitung in die für die Untersuchung erforderlichen Techniken war bekannt, dass Hühner leicht Hämatome nach der Punktion einer Vene entwickeln. Diese können bei einer erneuten Irritation der Vene nicht nur das Tier in seinem

Allgemeinbefinden beeinträchtigen, sondern auch weitere Entnahmen erschweren bzw. unmöglich werden lassen. Oft sind auch erhebliche Veränderungen im qualitativen und quantitativen Vorkommen von Blutinhaltsstoffen gegeben.

Die Wahl der Blutentnahmemethode ist daher von großer Bedeutung, sowohl was die mögliche körperliche Beeinträchtigung der Versuchstiere als auch was die Gültigkeit bzw. Aussagekraft der gemessenen Konzentrationen von diversen Blutparametern betrifft.

Beim Huhn gibt es grundsätzlich drei verschiedene Möglichkeiten der Blutgewinnung: Die Punktion der Vena jugularis am Hals, die Punktion der Venae saphenae an den Flügeln oder die Herzpunktion.

Die frequente Blutentnahme durch Herzpunktion verändert den Spiegel von Blutmetaboliten bei Hühnern nachhaltig. Dies gilt als Hinweis auf die Induktion von Stress durch die Manipulation am Tier (Davison 1975).

So erhöht die viermalige Blutentnahme mittels Herzpunktion im Abstand von 30 Minuten den Blutzucker bei 48 h gehungerten Hühnern um ca. 50 % (Davison 1975).

Bei wiederholter Blutentnahme durch Herzpunktion zeigt sich die stärkste induzierte Hyperglykämie innerhalb der ersten halben Stunde (drei Blutentnahmen). In dieser Phase steigt auch der Spiegel der FFS kontinuierlich an (Freemann and Manning 1976).

Andere Blutentnahmetechniken erscheinen daher sinnvoll, will man stressempfindliche Parameter wie den Glucosespiegel bestimmen.

Für die Punktion der Flügelvene spricht, dass bei wiederholten Blutentnahmen daraus keine signifikanten Konzentrationsveränderungen bei der Glucose und den FFS im Blut auftraten (Heald, McLachlan et al. 1965).

Generell ist die Entnahme einiger Milliliter Blut beim Huhn aus der Flügelvene durchaus praktikabel. Häufig ist sie jedoch mit der Entstehung eines Hämatoms verbunden. So ist bei wiederholten Blutentnahmen die Verwendung eines Venenverweilkatheters anstelle der mehrmaligen Punktion der Venen deutlich schonender und mit geringeren Nachblutungen verbunden. Werden die Tiere angemessen an die notwendigen Manipulationen gewöhnt, stellt die Blutentnahme lediglich eine mäßige Belastung dar. Insbesondere mittels eines Venenverweilkatheters kann der Blutentnahmestress für die Tiere erheblich reduziert werden (Ausschuss für Tierschutzbeauftragte 2009). Die in den so gewonnenen Blutproben gemessenen Parameter repräsentieren wesentlich zuverlässiger die jeweils geltende (ggf. experimentiell induzierte) körperliche bzw. metabolische Situation der Versuchstiere.

Aus diesen Gründen war es für die beabsichtigten Untersuchungen naheliegend, die Blutentnahmen aus der Flügelvene mittels Venenverweilkathetern vorzunehmen.

Während der Pausen zwischen den mehrmaligen Blutentnahmen für den GTT reichte ein einfacher, den Tieren bekannter Körperverschluss, um den Katheter zu schützen. Die Tiere saßen währenddessen in einer abgedunkelten Transportbox, was zusätzlich der Beruhigung diente.

War die Zeitspanne zwischen einzelnen Probennahmen größer, so wurden die Versuchstiere zwischenzeitlich in den Heimkäfig zurückgesetzt. Hier genügte der Körperverschluss nicht. Zum einen hält der Verschluss einem entschlossenen Schnabelpicken über längere Zeit nicht stand. Zum anderen können sich die Tiere damit nicht normal bewegen, weil sie ohne die Möglichkeit des Abspreizens der Flügel das Gleichgewicht verlieren. Die mangelnde Bewegungsmöglichkeit als Stressor hätte die Werte verfälschen können. In diesem Fall war statt des Körperverschlusses der Flügelverschluss für den Schutz des Katheters eine gute Lösung. Die Tiere konnten so immer noch den Flügel zum Balancieren benutzen. Indem sie auch noch auf die Sitzstange springen oder das Sandbad nutzen konnten, verhielten sie sich weitgehend normal.

### **1.2 Sonstiger Stress**

Auffallend ist, dass die Kontrolltiere zu den GTT-Versuchen, denen statt der Glucoselösung eine äquivalent hypertone Kochsalzlösung injiziert wurde, häufig kleine vorübergehende Schwankungen in der Konzentration von Insulin (Konzentrationsabnahme) und Glucagon (Konzentrationszunahme) innerhalb der ersten 10 min p.i. zeigen, den Rest der Zeit aber beide Hormone wieder auf „Normalniveau“ stabil bleiben. Es ist nicht auszuschließen, dass trotz des vorhergehenden Blutentnahmetrainings die i.v. Volumeninjektion mit einem gewissen Stress für die Tiere verbunden ist. Diese initialen stressinduzierten gegenläufigen Konzentrationsveränderungen bei den pankreatischen Hormonen sind nicht signifikant und beeinträchtigen die nachfolgenden Ergebnisse nicht.

### **1.3 Verhaltensanomalien und Tierverluste**

Während der gesamten Versuchszeit war kein einziger Tierverlust zu verzeichnen. Auch während der Hungerphasen traten weder Kannibalismus noch Federpicken auf. Hierfür mag einerseits die Rasse ursächlich sein. Braune Hühner gelten im Allgemeinen als

verträglicher und weniger Stress anfällig als Tiere von weißen Legerassen. Andererseits wird der Gewährleistung eines flackerfreien Raumlichts ein positiver Einfluss auf das Sozialverhalten zugesprochen. Neonröhren ohne Vorschaltgerät beunruhigen die Tiere durch ihr ständiges Flimmern. Des Weiteren konnten die Tiere durch die Bereicherung ihrer Haltungsumwelt mit Sandbad und Stroh ihr Scharr- und vor allem Pickbedürfnis befriedigen.

Insbesondere wenn Hühnern das Futter über einen längeren Zeitraum entzogen wird, sollte ausreichend Beschäftigungsmaterial zur Verfügung stehen, um einer aus Langeweile und Hunger resultierenden Aggressivität vorzubeugen.

## **2. Tageszeitliche Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen bei verschiedenen katabolen Stoffwechselsituationen**

### **2.1 Nüchterne und mehrtägig hungernde Hennen**

Die meisten der bisherigen Untersuchungen zum tageszeitabhängigen „Normal“-Konzentrationsverlauf von Metaboliten und Hormonen im Blutplasma fanden an gefütterten Tieren statt. Da derartige Blutparameter zum Teil ganz maßgeblich, aber nicht einheitlich, durch das jeweilige hochvariable tierartspezifische Futteraufnahmeverhalten beeinflusst werden können und dieses aber schlecht standardisiert werden kann, wurde in der vorliegenden Untersuchung als Ausgangssituation für die Beurteilung der massiveren katabolen Stoffwechselsituationen der tageszeitliche Konzentrationsverlauf dieser Parameter im Blutplasma nach einer Nüchterungszeit von durchschnittlich 17 h im Blut gemessen.

Die **tageszeitabhängigen Glucosekonzentrationen** von 17 h nüchternen und 97 h hungernden Hennen sind in Abb. E2 einander gegenübergestellt. Obwohl die nüchternen Hennen im Tagesverlauf von der 8:30-Uhr-Blutentnahme bis zur 20-Uhr-Blutentnahme eine weitere 11,5-stündige Nüchterung erfahren, unterliegt die Glucosekonzentration in diesem Zeitraum einem kontinuierlichen Anstieg (von 8:30 Uhr bis 20 Uhr um 8 %).

Ein ähnliches überraschendes Anstiegsphänomen (zumindest vormittags und nachmittags) ist auch bei den hungernden Tieren zu beobachten, obgleich sich deren Hungerdauer im Beobachtungszeitraum von insgesamt 97 h (um 8:30 Uhr) auf 108,5 h (um 20 Uhr) ausdehnt. Allerdings sind keine dieser Konzentrationsveränderungen signifikant, so dass von einem weitgehend konstant bleibenden Blutzuckerspiegel trotz der sich

verschärfenden Anforderungen gesprochen werden muss. Letzteres war auch schon in der Literatur so beschrieben worden (Decuypere and Kühn 1984; Akiba, Chida et al. 1999).

Nicht minder überraschend ist beim Vergleich der beiden Glucosekonzentrationskurven das deutlich höhere Glucoseniveau bei den hungernden Tieren. Bei diesen sind die Mittelwerte zu den Zeitpunkten 12 und 14 Uhr signifikant höher als bei den N-Tieren. Auch die AUC der H-Tiere ist um 8 % größer.

In der Literatur gibt es zum Blutzuckerspiegel nach Futterentzug unterschiedliche Ergebnisse. Einige Autoren beobachten ebenso wie wir einen Konzentrationsanstieg nach 48 h (Decuypere and Kühn 1984; Abe, Mujahid et al. 2006) bzw. nach 65 h (Simon and Rosselin 1978). Andere sehen ein Absinken des Blutzuckerspiegels nach einer Hungerphase. Allerdings ist dort der untersuchte Zeitraum mit bis zu 24 stündigem Futterentzug kürzer als die Hungerzeit in der vorliegenden Untersuchung. Anscheinend fällt der Blutzuckerspiegel beim Huhn insbesondere am ersten Hungertag (bis 24 h hungern) tendenziell ab (Lepkovsky, Dimick et al. 1967; Langslow, Butler et al. 1970; Savory 1987; Edwards, McMurtry et al. 1999; van der Wal, Reimert et al. 1999; Serr, Suh et al. 2009), während er danach während einer länger andauernden Hungerphase wieder ansteigt.

Andere Autoren beobachten dagegen keinerlei Veränderung im Konzentrationsniveau der Blutglucose nach 24 oder 72 Stunden bzw. sogar nach 6 oder 8 Tagen Hungern (Belo, Romsos et al. 1976; Brady, Romsos et al. 1978; Tinker, Brosnan et al. 1986).

Offensichtlich können hungernde Hühner ihre Glucoseverfügbarkeit im Blut mittels gesteigerter Gluconeogenese auf unverändert hohem Niveau halten, z.B. durch Nutzung von glucoplastischen Aminosäuren aus dem Proteinabbau, von Glycerol aus dem Fettabbau und von Lactat (Cori-Zyklus) aus dem muskulären Glycogenabbau (Tinker, Brosnan et al. 1986). Gleichzeitig müssen sie aber auch den irreversiblen metabolischen Glucoseverbrauch für die oxidative Energiegewinnung erheblich einschränken können, z.B. durch Nutzung von alternativen Kohlenwasserstoffverbindungen wie FFS und Ketonkörpern (Emmanuel, Berzins et al. 1982).

Unterstützung erfahren diese Annahmen durch die vorliegenden Befunde zu den FFS-,  $\beta$ HB- und den Harnsäure-Konzentrationsverläufen bei nüchternen bzw. hungernden Tieren im Beobachtungszeitraum.

Das um 22 % niedrigere FFS-Konzentrationsniveau (AUC der H-Tiere um 22 % kleiner als die AUC der N-Tiere) und das gleichzeitig um 18 % höhere  $\beta$ HB-Konzentrationsniveau

(AUC der H-Tiere um 5 % größer als die AUC der N-Tiere) der mehrtägig hungernden Tiere sprechen für einen hohen oxidativen Verbrauch der lipolytisch verstärkt freigesetzten FFS, wobei die  $\beta$ -Oxidation der mobilisierten FFS scheinbar pro Molekül nicht vollständig zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  vollzogen wird, sondern zu einem erheblichen Teil auch auf der Zwischenstufe beendet wird, die zur Ketonkörperproduktion führt (Königshoff and Brandenburger 2012).

Bestätigung findet dieses komplexe Geschehen durch Literaturbefunde, in denen nach 48 h Futterentzug beim Huhn die Glucoseoxidation (zugunsten der Oxidation von  $\beta\text{HB}$ ) signifikant um 65 % (von 1491  $\mu\text{mol/kg KG pro h}$  auf 525  $\mu\text{mol/kg KG pro h}$ ) reduziert wird. Passend hierzu sinkt der Anteil an  $\text{CO}_2$  aus der Glucoseoxidation von 29,2 % auf 10,2 %. Gleichzeitig steigt die  $\beta\text{HB}$ -Oxidationsrate um den Faktor 5,9 (von 124  $\mu\text{mol/kg KG pro h}$  auf 737  $\mu\text{mol/kg KG pro h}$ ) und der Anteil von  $\text{CO}_2$  aus der Oxidation von  $\beta\text{HB}$  steigt von 1,7 auf 9,92 % (Emmanuel, Berzins et al. 1982). Demnach wird der aviäre Energiestoffwechsel unter Hungerbedingungen schon nach 48 h markant und signifikant auf die Energiebereitstellung aus Fettdepots umgestellt.

Dieser Glucosespareffekt zusammen mit einem markanten Anstieg der Gluconeogenese aus reichlich verfügbaren Vorstufen führt dazu, dass das Blutglucose-Konzentrationsniveau im Hunger nicht sinkt. Dass in der vorliegenden Arbeit gegenüber nüchternen Hühnern sogar ein Anstieg im Glucosekonzentrationsniveau bei mehrtägig hungernden Hennen beobachtet werden konnte, mag an der metabolischen „Übergangssituation“ der nüchternen (=einige Stunden hungernden) Tiere liegen. Nach 16 bis 17 h dürften die Glykogenreserven der Leber bereits erschöpft sein, die Gluconeogenese sich aber noch im (sich steigernden) Anlauf befinden.

Dass im Verlauf einer sich verschärfenden Hungersituation neben der zunehmenden oxidativen Nutzung der lipolytisch freigesetzten FFS zur Energiegewinnung das ebenfalls anfallende Glycerol für die Gluconeogenese, insbesondere in der Niere, genutzt werden kann, gilt als belegt (Watford, Hod et al. 1981; Tinker, Brosnan et al. 1986).

Es konnte beim Säugetier gezeigt werden, dass in der Leber durch die gesteigerte FFS-Oxidation bei hohen FFS- und Ketonkörper-Spiegeln im Blut die Gluconeogenese insbesondere aus Laktat, aber auch aus anderen Vorstufen deutlich gesteigert werden kann. In der Niere wirken sich hohe Konzentrationen von FFS und/oder Ketonkörpern deutlich steigernd insbesondere auf die Gluconeogenese aus Glycerin aus (Newsholme and Start 1977; Stangassinger and Sallmann 2004; Stangassinger 2010).



Das um 33 % höhere **Harnsäurekonzentrationsniveau** (AUC der H-Tiere um 34 % größer als AUC der N-Tiere) der hungernden Hennen spricht zudem dafür, dass bei diesen Tieren aus Körperproteinen durch Proteolyse Aminosäuren freigesetzt werden und deren desaminierte Kohlenwasserstoff-Skelette zur oxidativen und zur gluconeogenetischen Verwendung zur Verfügung gestellt werden. Wie in der Literatur beschrieben, können im Hungerzustand alle Aminosäuren außer Leucin zu Verbindungen abgebaut werden, die dann in Leber und zum Teil auch in der Niere zur Gluconeogenese genutzt werden (Tinker, Brosnan et al. 1986).

Betrachtet man den **tageszeitlichen Konzentrationsverlauf der FFS** bei den beiden sich deutlich unterscheidenden katabolen Stoffwechselsituationen (s. Abb. E3), so sind nicht nur die bereits angesprochenen Niveauunterschiede in den Kurven unerwartet und auffällig. Insbesondere die nüchternen Tiere zeigen am Vormittag (8:30 – 10:00 Uhr) immer noch eine auffällige Dynamik im FFS-Konzentrationsverlauf in Form eines signifikanten Anstieges (um 40 %). Erst nachmittags bzw. am frühen Abend nimmt die Konzentration wieder ab und nähert sich dadurch im Tagesverlauf allmählich dem recht stabil gehaltenen plateauartigen Konzentrationsniveau der hungernden Tiere an, die zu dieser Zeit bereits 104 h auf Futterentzug waren.

Vergleichend mit der Literatur zeigt sich, dass diese (noch vorhandene) FFS-Konzentrations-Reaktivität nüchterner bzw. kurzfristig hungernder Hennen bereits beschrieben wurde (Langslow, Butler et al. 1970; van der Wal, Reimert et al. 1999; Buyse, Janssens et al. 2002). Schon 10 h nach Futterentzug wurden FFS-Konzentrationszunahmen beschrieben, die denen unserer nüchternen Tiere sehr ähnlich sind. Darüber hinaus wurde auch dort im Verlauf der Verschärfung der Hungersituation (bis 72 h) keine maßgebliche Konzentrationsveränderung mehr beobachtet.

Am Anfang einer Hungerphase setzt beim Huhn der FFS-Mobilisierungsvorgang wahrscheinlich relativ rasch und zunächst bedarfsüberschreitend ein und bestimmt durch ein Beibehalten dieser hohen Lipolyserate auch den weiteren Konzentrationsverlauf (Anstieg) der FFS entscheidend. Im fortgesetzten Hunger dagegen steht diesem anhaltenden Mobilisierungsvorgang die inzwischen quantitativ gleichwertige Verwertung der FFS (zur Energiegewinnung) gegenüber, sichtbar am plateauartigen FFS-Konzentrationsverlauf im Blut.

Gestützt wird diese Annahme durch den **tageszeitlichen Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB** (s. Abb. E4), einem wichtigen Zwischenprodukt der oxidativen FFS-Verwertung. Während bei mehrtägig hungernden Tieren durch den ebenfalls plateauartigen  $\beta$ HB-Konzentrationsverlauf ein Gleichgewicht zwischen Produktion (aus FFS) und dem oxidativen Verbrauch der Ketonkörper zum Ausdruck kommt, zeigen die nüchternen (bzw. inzwischen 21 h hungernden Tiere) von 8:30 Uhr bis zum frühen Nachmittag (14 Uhr) einen deutlichen  $\beta$ HB-Konzentrationsanstieg (+ 50 %). Erst nachmittags bzw. abends scheint der metabolische Ketonkörper-Verbrauch sich allmählich der Produktionsrate angeglichen zu haben, so dass im Blut das Konzentrationsniveau mehrtägig hungernder Hennen eingenommen werden kann. Dass in der Literatur (Belo, Romsos et al. 1976; Brady, Romsos et al. 1978) im Bereich von 16 h bis 96 h hungern immer noch ein  $\beta$ HB-Anstieg beschrieben wurde, mag daran liegen, dass dort Masthähnchen verwendet wurden, die zu Versuchsbeginn im Vergleich zu unseren Legehennen mehr Körperfett angesetzt hatten und bei energetischem Bedarf dieses stärker zur Mobilisation von FFS und diese wiederum oxidativ bzw. teiloxidativ (=Ketogenese) nutzten.

Ein ähnliches Phänomen findet sich bei zu fetten Milchkühen nach der Kalbung. Diese mobilisieren ebenfalls deutlich mehr Körperfett zur Energiebereitstellung zu Beginn der Laktation als magere Tiere und kommen dadurch auch schneller in eine ketotische Stoffwechsellage (Dirksen 2006).

Bei Einzelbetrachtung des **tageszeitlichen Konzentrationsverlaufs der Harnsäure** im Blut von 17 h nüchternen und 97 h hungernden Tieren gibt es folgendes festzustellen:

Laut einer Angabe in der Literatur (Buyse, Decuypere et al. 1995) fällt der Harnsäurespiegel in den ersten drei Hungertagen zunächst ab und steigt erst nach etwa 7 Tagen Futterentzug wieder an. Bei dem hier zitierten Versuch wurden 2 Jahre alte Legehennen am Ende des zweiten Legejahres verwendet, bei denen auch beobachtet wurde, dass sie in den ersten drei Hungertagen deutlich an intraabdominalem Fettgewebe verlieren, während in den folgenden vier Hungertagen zunehmend Proteinkatabolismus anhand steigender Harnsäurewerte im Blut beobachtet wird. Das heißt, die Muskelproteinmasse wird bei diesen Tieren erst relativ spät abgebaut.

In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich jedoch bereits nach 97 h Hungern im Vergleich zu 17 h eine signifikante Erhöhung (um ca. 28 %) des Harnsäurespiegels (s. Abb. E5). Dies passt zu anderen publizierten Ergebnissen (Okumura and Tasaki 1969), die nach 72 h sogar eine Erhöhung der Harnsäure im Blut um 700 % zeigen. Dort wurden 20

Wochen alte Hähne einer Legerasse verwendet, die damit altersmäßig eher den Gegebenheiten in unseren Versuchen entsprechen.

Gerade durch Unterschiede im Alter und im Reproduktionsstatus der eingesetzten Versuchstiere könnten diese zu den Befunden von Buyse, Decuypere et al (1995) gegensätzlichen Ergebnisse erklärt werden. So wurde beobachtet, dass der Harnsäurespiegel durch eben diese Parameter dahingehend beeinflusst wird, dass nicht legende Hennen einen höheren Harnsäurespiegel als legende Hennen aufweisen (Bell, McIndoe et al. 1959). Dagegen reagieren Hähne auf Hungern mit höheren Harnsäurespiegeln als Hühner (Bell, McIndoe et al. 1959; Okumura and Tasaki 1969). Unsere Hennen haben dasselbe Alter wie die Hähne von Okumura und Tasaki (1969), sie legen aber noch nicht. So wäre es erklärlich, dass wir bei unseren Hennen bereits nach 17 h Hungern Harnsäurewerte von über 240  $\mu\text{mol/l}$  messen, ein Konzentrationsniveau, das bei Buyse, Decuypere et al (1995) erst nach sieben Tagen Futterentzug erreicht wird.

Um die Frage zu klären, ob den bisher bei nüchternen bzw. hungernden Hennen anhand des Konzentrationsverlaufs von wichtigen Metaboliten vergleichend dargestellten katabolen Stoffwechselsituationen auch eine entsprechend gestaltete hormonale Regulation zu Grunde liegt, muss der **tageszeitliche Konzentrationsverlauf von Insulin und Glucagon** in die Diskussion miteinbezogen werden. Überraschend ist das deutlich höhere Insulinniveau der anhaltend hungernden Hennen (s. Abb. E6). Ein Blick in die Literatur zeigt, dass der Insulinspiegel bei gefütterten Hühnern höher ist als bei hungernden Tieren (Bisbis, Derouet et al. 1994; Shiraishi, Yanagita et al. 2011). Das ist auch zu erwarten, da die Insulinabgabe durch eine erhöhte Energieverfügbarkeit bzw. einen erhöhten Glucosegehalt im Blut als Folge der Nahrungsaufnahme stimuliert wird. Fehlt die Kohlenhydratzufuhr aus der Nahrung, sinkt der Insulinspiegel. Die Hungerzeit über Nacht (=Nüchternzustand morgens) entspricht dem normalen Futteraufnahmeverhalten der Hühner. Durch die Füllung des Kropfes während der letzten Futteraufnahme steht den Tieren noch ca. 12 h lang (de Beer, McMurtry et al. 2008) Futter aus diesem Reservoir für Verdauung und Resorption zur Verfügung, so dass die Tiere nur langsam in eine sich mehr und mehr ausprägende interdigestive Mangelsituation geraten können. Der Insulinspiegel bleibt in dieser Phase niedrig, da einerseits nur minimale resorptive energetische Stimuli die Insulin sezernierenden B-Zellen des Pankreas erreichen und andererseits aber schon steigende Mengen endogen (glykogenolytisch und/oder gluconeogenetisch) produzierter

Glucose bereitgestellt werden müssen, um ein Absinken der Blutglucosekonzentration aufzufangen.

Der Insulinspiegel von länger hungernden (60 h) Tieren ist allerdings höher als der Spiegel von lediglich wenige (5 h) Stunden gehungerten Hühnern (Simon and Rosselin 1978). Auch in unserer Untersuchung zeigt sich in den tageszeitlichen Konzentrationsverläufen, dass die hungernden Tiere einen deutlich höheren Insulinspiegel aufweisen als die nüchternen Tiere. Zieht man in diese Betrachtung das ebenfalls höhere (endogen über die Gluconeogenese zustande gekommene) Glucosekonzentrationsniveau der hungernden Tiere mit ein, so macht deren gleichzeitig hyperglykämisches und hyperinsulinämisches metabolisches Zustandbild nur Sinn, wenn einerseits diese endogen (gluconeogenetisch) gesteigerte Glucosebereitstellung als Stimulus für eine anhaltende Insulinausschüttung fungiert und andererseits Insulin selbst trotz seiner hohen Verfügbarkeit im Blut (im Sinne eines „Hungerdiabetes“ bzw. einer Insulin-Resistenz) weitgehend unwirksam ist (Simon and Rosselin 1978).

Bezieht man den **tageszeitlichen Konzentrationsverlauf von Glucagon** mit in die bisherigen Betrachtungen einer milden (17 h, „nüchtern“) bzw. einer massiven (97 h „hungernd“) katabolen Belastung des Glucosehaushaltes von Hennen ein, so gibt es folgendes festzustellen: Beide mittleren Konzentrationsverläufe divergieren tendenziell im morgendlichen bzw. nachmittäglichen Konzentrationsverlauf (s. Abb. E7: vormittags hohe Glucagonwerte mit abnehmender Tendenz bei nüchternen Tieren und nachmittags niedrige Glucagonwerte mit zunehmender Tendenz bei hungernden Tieren). Dennoch besteht beim jeweiligen Glucagonmittelwert (8:30 – 20:00 Uhr) der beiden katabolen Zustände kein signifikanter Unterschied. Das heißt, der vergleichsweise hohe Glucosekonzentrationsverlauf im Blut der hungernden Tiere verhindert die im Hungerzustand erwartbare Niveauanhebung im Konzentrationsverlauf des Glucagon im Blut.

Man hätte einen derartigen positiven Zusammenhang zwischen Glucagonspiegel und der Hungerdauer auch in unserer Untersuchungen erwarten können. Denn sowohl am Menschen (Marliss, Aoki et al. 1970) als auch am Huhn (Edwards, McMurtry et al. 1999) konnte ein Glucagonanstieg im Hungerzustand gezeigt werden.

In den genannten Studien wurde allerdings dieser Glucagonanstieg immer im Vergleich zu gefütterten Individuen (Kontrolle) festgestellt. Es kann daher sein, dass wir in unseren Untersuchungen bereits nach dem 17 stündigem Futterentzug zur Erzeugung eines

Nüchternzustandes, einen erhöhten Glucagonspiegel im Blut beobachten, der sich auch nach einer längeren Hungerphase nicht mehr weiter erhöht. Dafür spricht, dass beobachtet wurde, dass der Glucagonspiegel bereits nach 6 stündigem Futterentzug beim Huhn erhöht ist und nach weiterem 24 stündigem Hungern nicht weiter ansteigt (Christensen, McMurtry et al. 2013).

Dass dieses Fehlen einer weiteren Zunahme im Glucagon-Konzentrationsniveau mehrtägig hungernder Hennen ohne negative metabolische Auswirkungen im Energie- und Glucosestoffwechsel bleibt, lässt sich eventuell mit der zunehmenden Bedeutung der Glucocorticoesteroiden für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase (insbesondere durch Gluconeogenese aus Aminosäuren) erklären. Angaben in der Literatur zeigen einen Anstieg des Corticosteronspiegels bereits in den ersten Tagen eines mehrtägigen Futterentzugs bei Hühnern (Scanes, Merrill et al. 1980; Harvey and Klandorf 1983) .

## **2.2 Tageszeitliche Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen bei mit Phlorizin behandelten mehrtägig hungernden Hennen**

Mit der Vorgehensweise, insgesamt 106 h hungernden Hennen am Tag 3 und 4 (72 bis 106 h) zusätzlich mehrmals täglich Phlorizin zu injizieren, war die Absicht verbunden, über die dadurch induzierte Glucosurie den scheinbar erheblich eingeschränkten irreversiblen metabolischen Glucoseverlust der mehrtägig hungernden Tiere zu steigern. Dadurch sollte die im Blut über endogene Prozesse noch hoch gehaltene Glucoseverfügbarkeit strapaziert werden. Gleichzeitig sollte auch Einblick in die noch vorhandene Flexibilität bzw. Kapazität von im mehrtägigen Hunger bereits genutzten energetischen Kompensationsvorgängen gewonnen werden.

Tatsächlich wurde die Glucosurie, die durch Phlorizin verursacht werden sollte, bei unseren Versuchstieren nicht überprüft. Dies wäre nur in aufwendig gestalteten Stoffwechselkäfigen möglich und hat beim Vogel zudem die Komplikation der gemeinsamen Ausscheidung von Harn und Kot über die Kloake. Jedoch gilt die Wirkung von Phlorizin beim Huhn als belegt, da Phlorizin-empfindliche Glucosetransporter in verschiedenen Geweben (Niere, Darmschleimhaut, Gehirn) aufgezeigt werden konnten (Ferrer, Gil et al. 1994; Sutterlin and Lavery 1998; Gibbs, Hutchinson et al. 2008), und die hemmende Wirkung auf den Glucosetransport in der Niere auch nachgewiesen wurde (Sutterlin and Lavery 1998).

Dass das Vorhaben einer „Verschärfung“ der katabolen metabolischen Situation bei hungernden Tieren durch die Glucosurie mittels Phlorizin gelang, zeigen neben den

tendenziell verstärkten Körpergewichtsverlusten insbesondere die Veränderungen in Niveau und Verlauf der Konzentration von Metaboliten und Hormonen im Blut.

Zunächst fallen bereits Veränderungen beim **mittleren tageszeitabhängigen Konzentrationsverlauf der Blutglucose** auf (s. Abb. E8, E14). Phlorizin behandelte Hennen erreichen im Glucoseniveau mehrheitlich nur Werte, die von kurzfristig hungernden (=mehrstündig nüchternen) Tieren her bereits bekannt waren. Bei letzteren ist davon auszugehen, dass die erniedrigte Blutglucose wie folgt zustande kommt: Es wurden noch keine wesentlichen Einsparungen im metabolischen Glucoseverbrauch eingeleitet, obgleich die Leberglykogenreserven zur Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase bereits erschöpft und die Gluconeogenese zur Kompensation dieses noch weitgehend uneingeschränkt hohen Glucosebedarfs noch nicht massiv angelaufen ist.

Bei Phlorizin behandelten mehrtägig hungernden Tieren ist davon auszugehen, dass die ähnlich niedrige Blutglucosekonzentration anders zustande gekommen ist. Trotz eines bereits erheblich eingeschränkten irreversiblen metabolischen Glucoseverbrauchs schafft es die Gluconeogenese trotz der bereits aufgezeigten erheblichen Steigerungsmöglichkeiten im Hungerzustand nicht, den zusätzlichen renalen Glucoseverlust vollständig zu kompensieren.

Dass der tageszeitliche Konzentrationsverlauf gewissen, teilweise recht deutlichen Schwankungen unterworfen ist, mag darauf zurückzuführen sein, dass die Phlorizinapplikation per Injektion und nicht kontinuierlich erfolgte und damit auch der renale Glucoseverlust Schwankungen unterworfen sein musste.

Sucht man nach Glucosurie bedingten Veränderungen in der energetischen Kompensation, so lässt der im Niveau den ausschließlich hungernden Tieren weitgehend entsprechende **mittlere tageszeitabhängige Konzentrationsverlauf der FFS** im Blut von PrHP-Tieren nicht unmittelbar eine Steigerung der Lipolyse erkennen (s. Abb. E9, E15).

Zieht man jedoch für die Suche nach energetischen Kompensationsmöglichkeiten bei PrHP-Tieren auch noch die **mittleren tageszeitabhängigen Konzentrationen von  $\beta$ HB** im Blut mit heran (Abb. E10, E16), so lässt der auf sehr hohem Niveau kontinuierlich weiter ansteigende Konzentrationsverlauf vermuten, dass zwar eine massive Steigerung der lipolytischen FFS-Freisetzung, aber auch gleichzeitig der unvollständigen  $\beta$ -oxidativen Verwertung (=Ketogenese) der dabei freigesetzten Fettsäuren stattgefunden haben muss (FFS-AUC der PrN- und der PrH-Tiere nur 30 % der FFS-AUC der PrHP-Tiere).

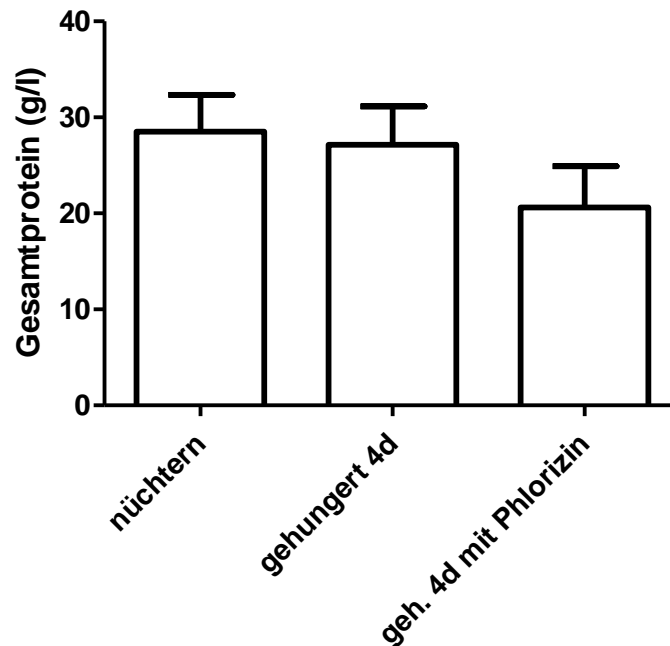
Dagegen hat mehrtägiges Hungern allein kaum Einfluss auf den Tagesverlauf der  $\beta$ HB-Konzentration. Die Tiere sind anscheinend nach 96 h bereits in einem Gleichgewicht, was die Produktion und den Verbrauch von Ketonkörpern betrifft, so dass die zusätzlichen 12 h Hungern für die Beprobung im Tagesverlauf dieses  $\beta$ HB-Gleichgewicht nicht mehr erkennbar beeinflussen. Der aufgrund der zeitlichen Abfolge der Phlorizininjektionen sich verschärfende Glucoseverlust über die Niere bei den PrHP-Tieren stört dagegen den Energiehaushalt zusätzlich empfindlich.

So erreichen diese Tiere  $\beta$ HB-Konzentrationen, die weit über den Werten liegen, die zum Beispiel Hochleistungsmilchkühe bei ihrem laktationsinduzierten Energiemangel aufweisen und noch verkraften. Bereits die PrH-Tiere liegen mit ca. 2,5 mmol/l bei  $\beta$ HB-Konzentrationen, die bei der Milchkuh für eine klinische Manifestation der vorhandenen Ketose bzw. Ketoazidose ausreichen (Dirksen 2006). Bei  $\beta$ HB-Konzentrationen von 7 bis über 8 mmol/l, wie sie bei den PrHP-Tieren auftreten, sind bei der Milchkuh schon längst massive zentralnervöse Störungen zu beobachten (Dirksen 2006). Die Hühner dagegen zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten. Sie vertragen demnach erhöhte Ketonkörperspiegel deutlich besser als Wiederkäuer.

Berücksichtigt man bei Betrachtung des Energiehaushaltes neben dem Fettstoffwechsel auch noch den Proteinstoffwechsel anhand des **mittleren tageszeitabhängigen Konzentrationsverlaufes der Harnsäure** im Blut (s. Abb. E11, E17) von PrHP-Tieren, so übersteigt dieser im Niveau die Werte nur hungernder Hennen (AUC der PrHP-Tiere 28 % größer als AUC der PrH-Tiere). Dies zeigt, dass eine weitere Proteolyse mit Desaminierung der Aminosäuren zum Zweck der metabolischen Verwendung des Aminosäure-Kohlenstoffgerüsts stattgefunden haben muss. Dadurch, dass dabei auch sogenannte ketogene Aminosäuren (Lysin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan) freigesetzt und zu Ketonkörpern metabolisiert werden (Röhm 2007), könnte ein nicht näher zu beziffernder, aber durchaus substantieller Anteil am erheblich angestiegenen  $\beta$ HB-Niveau der PrHP-Tiere auf diesen Ketogeneseweg zurückgeführt werden.

Ein Hinweis darauf, dass neben dem Körperfett auch ein zunehmender substantieller Anteil an Körperprotein bei sich verschärfenden katabolen Stoffwechselsituationen metabolisch verloren geht, zeigt sich neben den Körpergewichtsverlusten der Versuchstiere insbesondere auch im Gehalt des Gesamtproteins im Blutplasma (s. Abb. D1). Während sich der Gesamtproteingehalt im Blutplasma bei hungernden Tieren nur wenig von dem

nüchterner Tiere unterscheidet, führen die Phlorizininjektionen zu einem ca. 26 %igem Abfall des Gesamtproteingehalts.



**Abb. D1: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Gesamtproteins im Blutplasma von Legehennen, denen über Nacht (nüchtern, n=24), 4 Tage lang (gehungert 4d, n=26) oder 4 Tage lang mit zusätzlichen Phlorizin-Gaben (gehungert mit Phlorizin 4d, n=20) das Futter entzogen wurde**  
(Angabe des Medians; die Box umfasst das 25-75%-Quantil, die Whiskers reichen vom 10- 90%-Quantil)\*

\*Anm.: Diese Daten wurden in einer zur vorliegenden Untersuchung parallel laufenden analytischen Erhebung ermittelt und von Frau Dr. Janine Schneider, München, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Bezieht man das Konzentrationsverhalten der beiden pankreatischen Stoffwechselhormone Insulin und Glucagon im Blutplasma in diese Betrachtung der durch Phlorizin stark verschärften katabolen Stoffwechselsituation mit ein, so ergibt sich folgendes Bild:

Der **mittlere tageszeitabhängige Konzentrationsverlauf von Insulin** im Blut (s. Abb. E12, E18) der PrHP-Tiere befindet sich deutlich unter hungertypischem Niveau (AUC der PrHP-Tiere beträgt nur 29 % der AUC der PrH-Tiere). Die im Tagesverlauf sichtbar werdenden Schwankungen mit einem Insulin-Gipfel morgens bzw. spät nachmittags und einem Insulin-Minimum dazwischen am frühen Nachmittag (s. Abb. E12) erfolgen

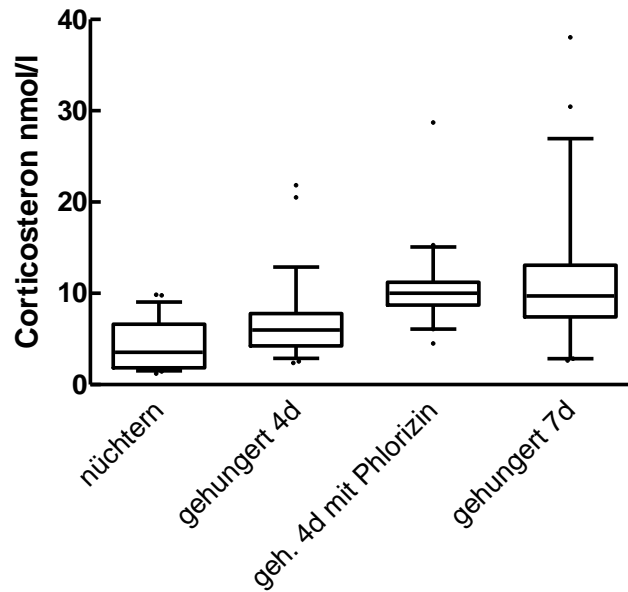


weitgehend analog zu den Schwankungen im Glucosekonzentrationsverlauf (s. Abb. E8). Offensichtlich steht das niedrige Insulin-Niveau in ursächlichem Zusammenhang mit der aufgrund des renalen Glucoseverlustes niedrigen Glucoseverfügbarkeit im Blut.

Was den **mittleren tageszeitabhängigen Konzentrationsverlauf von Glucagon** im Blut der PrHP-Tiere (s. Abb. E13, E18) betrifft, so ist dieser bezüglich Niveau und Verlauf von dem nur hungernder Tiere kaum zu unterscheiden.

Offensichtlich sind die Glucagon abhängigen regulatorischen Anpassungsmöglichkeiten insbesondere im Glucosehaushalt bereits durch die metabolische Belastung im mehrtägigen Hungerzustand „ausgereizt“. Wie bereits bei der Besprechung der Bedeutung des Glucagons für mehrtägig hungernde Tiere angedeutet, dürften auch bei der durch Glucosurie verschärften katabolen Situation insbesondere den Glucocorticosteroiden (hier: Corticosteron) mit ihrer proteinkatabolen und gleichzeitig gluconeogenetischen (aus Aminosäuren) Wirkung eine entscheidende Bedeutung für den Erhalt der endogenen Glucoseverfügbarkeit zukommen.

Ein Hinweis, der diese Vermutung bestätigt, findet sich in den Ergebnissen der parallel abgelaufenen Studie von Frau Dr. Janine Schneider (s. Abb. D2). Der Corticosterongehalt von Legehennen steigt demnach in Abhängigkeit zur Dauer des Futterentzuges an. Zusätzliche Phlorizininjektionen lassen die Corticosteronkonzentration von vier Tagen gehungerten Tieren auf Werte ansteigen, die denen von sieben Tagen gehungerten Hennen entsprechen.



**Abb. D2: Corticosteron-Gehalt (nmol/l) im Blutplasma von adulten Legehennen vor der Legereife, denen über Nacht (nüchtern, n=24), 4 Tage lang (gehungert 4d, n=26) oder 4 Tage lang mit zusätzlichen Phlorizin-Gaben (gehungert mit Phlorizin 4d, n=20) sowie 7 Tage lang (gehungert 7d, n=23) das Futter entzogen wurde (Angabe des Medians; die Box umfasst das 25-75%-Quantil, die Whiskers reichen vom 10- 90%-Quantil)\***

### **3. Zum Einfluss einer intravenösen Glucoseinjektion (GTT) auf den Konzentrationsverlauf von Metaboliten und Hormonen bei den Stoffwechselbedingungen „nüchtern“, „hungernd“ und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ sowie bei mit Glucosemehrfachinjektionen vorbehandelten „nüchternen“ Tieren**

Um die metabolische Toleranz einer raschen exogenen Glucosezufuhr darzustellen und um gleichzeitig deren Wirkung auf den Konzentrationsverlauf von Metaboliten und Hormonen im Blut bei den gegebenen katabolen Stoffwechselsituationen („nüchtern“, „hungernd“ und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“) zu erfassen, wurde jeweils morgens zwischen 8:30 Uhr und 9:00 Uhr ein GTT durchgeführt und dessen Wirkung auf die Konzentration von Glucose und anderen Metaboliten und von Hormonen im Blut eine Stunde lang verfolgt.

Bei nüchternen Tieren wurde der GTT zusätzlich nach einer vorangegangenen Glucosedauerbelastung mittels i.v. Glucose-Mehrfachinjektionen („GDBN“) wiederholt,

um die metabolischen Anpassungen an eine gesteigerte Glucoseverfügbarkeit insbesondere auf hormonaler Ebene erkennen zu können.

Für alle vorgegebenen Stoffwechselsituationen (außer für Glucosemehrfachinjektionen), bei denen ein GTT vollzogen wurde, wurde Kontrolltieren eine zur Glucoselösung isoosmolare NaCl-Lösung i.v. injiziert (Kontrolle K), um nicht vermeidbare wiederkehrende Einflüsse, z. B. von Stress durch die Injektionsmaßnahmen, herausarbeiten zu können und von den beabsichtigten metabolischen Effekten der applizierten Glucose unterscheiden zu können.

Wie bei der Erläuterung der Ergebnisse bereits angesprochen, war bei den Kontrolltieren unter allen Stoffwechselsituationen nach der NaCl-Injektion (p.i.) lediglich am frühen mittleren Konzentrationsverlauf p.i. der pankreatischen Hormone tendenziell die vom Säuger her bekannte Stresswirkung (Brunicardi, Shavelle et al. 1995) am endokrinen Pankreas festzustellen, und zwar im Sinne einer Blockade der Insulinabgabe (Langslow, Butler et al. 1970) und einer Stimulation der Glucagonabgabe (Freeman and Manning 1976).

Um die nach der i.v. Glucoseinjektion durch die jeweilige Stoffwechselsituation bedingten Veränderungen in der Glucosehomeostase und bei der Insulinansprechbarkeit leichter erkennen und besprechen zu können, wurden einige Teilaspekte aus dem Ergebnisteil herausgegriffen und hier nochmals diskussionsorientiert dargestellt (s. Tab. D1a und D1b).

**Tab. D1a: Wichtige Kenndaten des mittleren Glucosekonzentrationsverlaufes nach i.v. Glucoseinjektion (GTT) bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ GDBN)**

Glucosemaximum	Zeitpunkt (min p.i.)	Wert absolut (mmol/l)	Wert relativ (in % des Nullwertes)
GTTN	5	26,21	216
GTTH	5	28,70	234
GTTHP	5	30,08	240
GDBN	5	28,65	226

Glucose- AUC	Gesamtfläche		Fläche des Glucoseanstiegs über Kontrollniveau
	absolut	Relativ (in % der Kontroll-AUC)	
GTTN	948	128	205
GTTH	1037	133	261
GTTHP	1208	155	429
GDBN	1002	135	258

**Tab. D1b: Signifikante Unterschiede bei den Kenndaten des mittleren Glucosekonzentrationsverlaufes nach i.v. Glucoseinjektion (GTT) bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ GDBN)**

Glucose	AUC	Maximum 5 min p.i.
GDBN vs GTTN	ns	ns
GDBN vs GTTH	ns	ns
GDBN vs GTTHP	pK-W<0,001	ns
GT TN vs GTTH	ns	ns
GT TN vs GTTHP	pK-W<0,001	s: pK-W=0,0017
GTTH vs GTTHP	ns	ns

Glucose	AUC	Maximum 5 min p.i.
GT TN - NK	s: p<0,0001	s: p<0,0001
GTTH - HK	s: pM-W=0,0028	s: pM-W<0,0001
GTTHP - HPK	s: pM-W<0,0001	s: pM-W=0,0002
GDBN - NK	s: p<0,0001	s: pM-W=0,0001

Für den **mittleren Glucosekonzentrationsverlauf** (s. Tab. D1) p.i. im Blut gibt es für alle Stoffwechselsituationen geltend folgendes festzuhalten: der Glucoseverlauf der Kontrolltiere bleibt plateauartig konstant (trotz der bereits erwähnten „Stress“-bedingten initialen Schwankungen auf Seiten der Pankreashormone), während nach der Glucoseinjektion ein Glucosemaximum sehr früh (hier zum Zeitpunkt 5 min p.i. erstmalig erfasst) erreicht wird. Dieser schnelle Anstieg wurde in der Literatur fürs Huhn bereits beschrieben, wobei dort allerdings der Blutzuckerwert p.i. erstmalig nach 10 min bestimmt wurde (Klandorf 1988). Betrachtet man den nach dem jeweiligen Maximum bei den hungernden und glucosuretischen Tieren abnehmenden mittleren Glucosekonzentrationsverlauf, so scheint die darin sichtbar werdende Glucoseelimination bei den genannten Zuständen erwartungsgemäß am stärksten eingeschränkt bzw. verlangsamt zu werden.

Dies zeigt sich insbesondere bei Berechnung der Halbwertszeit der Glucoseelimination aus dem Blut (s. Tab. D2). Die jeweils mehrtägig hungernden Tiere brauchen um etwa die Hälfte länger (=signifikant), um den Blutzuckerspiegel wieder auf Normalwerte zu senken. Dagegen führen weder die vorab erfolgten mehrfachen Glucoseinjektionen noch die Phlorizininjektionen zu einer signifikanten Veränderung der Halbwertszeit bei den jeweils gleich lang hungernden Tieren.

**Tab. D2: Halbwertszeit der Glucoseelimination des GTT** (berechnet ab Zeitpunkt 5 min bis Zeitpunkt 60 min p.i.) **und Insulin/Glucagon-Quotient sowie signifikante Unterschiede bei den Versuchsbedingungen „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ (GDBN), „nüchtern“ (N), „hungrnd“ (H) sowie „hungrnd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)**

		<b>GDBN</b>	<b>GTTN</b>	<b>GTTH</b>	<b>GTTHP</b>
	<b>Zeit p.i. (min)</b>				
<b>Halbwertszeit der Glucoseelimination (min)</b>		8,83	8,64	12,47	12,3
<b>Insulin (µg/l)</b>	5	3,11	4,1	4,61	3,26
	10	2,07	4,06	4,75	3,96
	60	0,36	0,67	1,09	0,79
<b>Glucagon (ng/l)</b>	5	248,7	287,4	293	177,3
	10	128,3	168,9	184,4	100,9
	60	481,3	579,5	549,7	331,6
<b>Insulin/Glucagon</b>	5	7,60	8,67	9,56	11,17
	10	9,80	14,61	15,65	23,85
	60	0,45	0,70	1,20	1,45

<b>Halbwertszeit der Glucoseelimination</b>	<b>Signifikanz</b>
GTTN vs GTTH	<0,05
GTTN vs GTTHP	<0,05
GTTN vs GDBN	ns
GTTH vs GTTHP	ns
GTTH vs GDBN	<0,05
GTTHP vs GDBN	<0,05

Erfasst man mittels der AUC die Verfügbarkeit von Glucose im Blutplasma für den Zeitraum von einer Stunde p.i., so unterstützt (im Vergleich zur Glucose-Fläche (AUC=205) der nüchternen Tiere) die ca. 30 % größere Glucosefläche bei hungrnden Tieren (AUC=261) die für letzteren Zustand bereits vermutete eingeschränkte Glucoseelimination aus dem Blutplasma (s. Tab. D1).

Dieses Phänomen der eingeschränkten Glucosetoleranz, auch als „**Hunger-Diabetes**“ bezeichnet, wurde beim Huhn bereits beschrieben. Simon und Rosselin (1978) stellen die These auf, dass Hungern zu einer Abnahme der B-Zell-Sensitivität für Glucose sowie zu einer geringeren Ansprechbarkeit für Insulin bei Glucose verbrauchenden Geweben führt und es dadurch zu einer messbar verminderten Glucosetoleranz beim Huhn kommt.

Bestätigung findet diese These in den Ergebnissen von Dupont, Derouet et al (1998), die zeigten, dass Hungern die Insulinrezeptordichte der Leberzellen zwar erhöht, die enzymatische Glucosephosphorylierung aber langsamer abläuft und dadurch Glucose im

Hungerzustand langsamer aus dem Blut in die Leber aufgenommen wird. Hierzu passen auch die Ergebnisse zur Halbwertszeit der Glucoseelimination (s. Tab. D2).

Bei diversen Säugetieren führt ein mehrtägiger Nahrungsentzug ebenfalls zu einer beeinträchtigten Glucosetoleranz. Man beobachtet z. B. beim Menschen eine deutlich verlängerte Glucoseelimination und einen verspäteten Insulinanstieg mit länger anhaltender Hyperinsulinämie im Hungerzustand (Unger, Eisentraut et al. 1963). Ähnliches gilt für die Ratte. Während der Insulingehalt des Rattenpankreas unverändert bleibt, sind nach einer Hungerphase die Sekretion von Insulin sowie die Neusynthesemechanismen empfindlich gestört (Buchanan, Vance et al. 1969).

Passend hierzu beobachten wir am Huhn ebenfalls, dass die AUC des Glucose-induzierten Insulinanstiegs bei den hungernden Tieren (mit 70 bei GTTH bzw. mit 55 bei GTTHP) kleiner ist als bei den nur nüchternen Tieren (74) (s. Tab. D4).

Die GTT induzierte Glucose-AUC (s. Abb. E44, Tab. D1) bei den **glucosuretischen, hungernden Tieren** ist mit einem Wert von 429 etwa 64 % größer als die Fläche der reinen Hungersituation (Glucose-AUC=261) und ist gegenüber der Nüchtern-Situation (Glucose-AUC=205) sogar mehr als doppelt so groß. Dies mag darin begründet sein, dass bei den glucosuretischen Tieren durch den akut verstärkten Glucoseverlust über die Niere die Nutzung von Glucose als Energielieferant zugunsten von oxidativ rasch nutzbaren Ersatzsubstraten wie dem  $\beta$ HB (s. Abb E46: vergleichende  $\beta$ HB-Verläufe) weiter eingeschränkt wurde und daher die Mechanismen zum Abbau einer rasch erhöhten Blutglucose im Sinne einer verstärkten Insulinresistenz nicht adäquat reagieren.

Bestätigung findet diese These in der Glucose induzierten, über das Blut sichtbar gewordene Insulinantwort. So zeigt sich, dass die Fläche des Insulinanstiegs (s. Tab. D3) über das Kontrollniveau hinaus im Zeitraum eine Stunde p.i. bei glucosuretischen Tieren mit dem Wert von 55 gegenüber den Flächenwerten bei nüchternen (mit 74) und bei nur hungernden Tieren (mit 70) deutlich reduziert ist. Dies mag, verursacht durch den besonders ausgeprägten Energiemangel glucosuretischer Tiere, in einer deutlichen Einschränkung der Insulinneusynthese begründet sein, wie es schon bei nur hungernden Ratten beobachtet wurde (Buchanan, Vance et al. 1969).

**Tab. D3a: Wichtige Kenndaten des mittleren Insulinkonzentrationsverlaufes nach i.v. Glucoseinjektion (GTT) bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ GDBN)**

Insulinmaximum	Zeitpunkt (min p.i.)	Wert absolut (µg/l)	Wert relativ (in % des Nullwertes)
GTTN	5	4,10	443
GTTH	10	4,75	311
GTTHP	10	3,96	747
GDBN	5	3,11	649

Insulin -AUC	Gesamtfläche		Fläche des Insulinanstiegs über Kontrollniveau
	absolut	relativ (in % der Kontroll-AUC)	
GTTN	98	406	74
GTTH	138	203	70
GTTHP	101	219	55
GDBN	58	238	33

**Tab. D3b: Signifikante Unterschiede der Kenndaten des mittleren Insulinkonzentrationsverlaufes nach i.v. Glucoseinjektion (GTT) bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ GDBN)**

Insulin	AUC	Werte 5 min p.i.	Werte 10 min p.i.
GDBN vs GTTN	ns	ns	<0,01
GDBN vs GTTH	<0,001	<0,05	<0,001
GDBN vs GTTHP	ns	ns	<0,01
GTTN vs GTTH	ns	ns	ns
GTTN vs GTTHP	ns	ns	ns
GTTH vs GTTHP	ns	ns	ns

Insulin	AUC	Werte 5 min p.i.	Werte 10 min p.i.
GTTN - NK	s: p<0,0001	s: pM-W=0,0002	s: pM-W=0,0001
GTTH - HK	s: p=0,0023	s: pM-W<0,0001	s: pM-W=0,0002
GTTHP - HPK	s: p=0,1252	s: pM-W<0,0001	s: pM-W<0,0001
GDBN - NK	s: p=0,0068	s: pM-W=0,0001	s: pM-W<0,0001

Will man die Wirkung dieser zwar verminderten, aber dennoch noch vorhandenen Insulinausschüttung erfassen, so eignet sich der ebenfalls erfasste **Konzentrationsverlauf der FFS** (s. Tab. D4) im Blut hierfür besonders. Anders als bei der Nutzung des Verlaufes des Glucosespiegels als Wirkungskriterium für Insulin wird der FFS-Konzentrationsverlauf nicht homeostatisch reguliert (LeRoith, Taylor et al. 2004).

Das heißt, analog zu Ergebnissen in der Literatur (Langslow, Butler et al. 1970) gibt die Intensität des raschen Abfalles der FFS-Konzentration im Blut nach der Glucoseinjektion die Intensität der im Insulinmangel induzierten Hemmung der Triglyceridspaltung (über die Hormonsensitive Lipase) unter den jeweiligen Stoffwechselzuständen wieder.

So ist zum Zeitpunkt 30 min p.i. die FFS-Konzentration der nur hungernden Tiere mit 0,219 mmol/l signifikant (um ca. 37 %) niedriger als die der hungernden und glucosuretischen Tiere (s. Tab. D4). Dies spricht beim letztgenannten extrem katabolen Stoffwechselzustand für eine geringere Insulinwirksamkeit im Fettgewebe. Im Analogieschluss ließe sich hieraus die bereits vermutete erhebliche Einschränkung der Insulinwirkung auch im Glucosestoffwechsel bei hungernden und glucosuretischen Hennen (GTTHP) ableiten.

**Tab. D4a: Wichtige Kenndaten des mittleren FFS-Konzentrationsverlaufes nach i.v.**

**Glucoseinjektion (GTT) bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ GDBN)**

FFS-Minimum (30 min p.i.)	Wert absolut (mmol/l)	Wert relativ (in % des Nullwertes)
GTTN	0,318	52
GTTH	0,219	43
GTTHP	0,346	59
GDBN	0,258	76

FFS-AUC	Gesamtfläche		Fläche des FFS-Abfalls unter Kontrollniveau
	absolut	relativ (in % der Kontroll-AUC)	
GTTN	26	64	14,7
GTTH	21	76	6,7
GTTHP	28	88	4,0
GDBN	21	51	19,9



**Tab. D4b: Signifikante Unterschiede bei den Kenndaten des mittleren FFS-Konzentrationsverlaufes nach i.v. Glucoseinjektion (GTT) bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ GDBN)**

FFS	AUC	Minimum (30 min p.i.)
GDBN vs GTTN	ns	ns
GDBN vs GTTH	ns	ns
GDBN vs GTTHP	ns	ns
GTTN vs GTTH	ns	ns
GTTN vs GTTHP	ns	ns
GTTH vs GTTHP	ns	pK-W<0,05

FFS	AUC	Minimum ( 30 min p.i.)
GTTN - NK	s: p=0,0049	s: p=0,0004
GTTH - HK	s: p=0,0484	s: pM-W=0,008
GTTHP - HPK	s: p=0,0802	s: p=0,0004
GDBN - NK	s: p=0,0001	s: p<0,0001

In Bezug auf Besonderheiten im **Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB** ist auffallend, dass mit Ausnahme der GDBN-Tiere, deren  $\beta$ HB-Konzentration durch die vorangegangenen Glucoseinjektionen bereits erniedrigt ist (0,23 mmol/l), die übrigen Versuchstiergruppen nach der i.v. Glucoseinjektion mit einem Abfall der  $\beta$ HB-Konzentration zum Zeitpunkt 30 min p.i. reagieren. Dieser Konzentrationsabfall passt zu der Vorstellung, dass Glucose per se (z. B. beim Menschen) einen hemmenden Effekt auf die Ketogenese hat (Riou, Beylot et al. 1986).

Durch die Hyperinsulinämie bedingte Erhöhung der intrazellulären Glucoseverfügbarkeit z. B. in der Leber muss weniger Oxalacetat für die Gluconeogenese aus dem Citratzyklus abgezogen werden, so dass das über die  $\beta$ -Oxidation von FFS reichlich entstandene Acetyl-CoA vermehrt über diese Eintrittsstelle wieder über den Citratzyklus der Endoxidation zugeführt werden kann und nicht mehr zu einem großen Teil in der Ketogenese verwendet werden muss (Königshoff and Brandenburger 2012).

Dabei fallen die  $\beta$ HB-Werte der hungernden Tiere ausgehend von vergleichsweise hohen  $\beta$ HB-Ausgangskonzentrationen (2,21 mmol/l) mit - 75 % am stärksten ab. Bei den N-Tieren (Nullwert: 0,91 mmol/l) bzw. den HP-Tieren (Nullwert: 3,77 mmol/l) beträgt der Abfall - 47 % bzw. - 45 %. Der vergleichsweise gering ausgeprägte Abfall der hohen  $\beta$ HB-Konzentration bei den HP-Tieren ist wiederum ein Hinweis auf die bei diesen Tieren sehr eingeschränkte Insulinwirkung. Denn erst nach der Insulinvermittelten Aufnahme der Glucose in die Zelle können die vorher besprochenen Stoffwechselvorgänge zur Senkung der Ketogenese ablaufen.

Auch vom Säuger ist bekannt, dass die erhöhte Verfügbarkeit von Ketonkörpern im Blut den Mangel an Insulin oder dessen eingeschränkte periphere Wirkung im Energiestoffwechsel widerspiegelt (LeRoith, Taylor et al. 2004).

Anders als für die Metabolite des Fettstoffwechsels findet sich für den **Konzentrationsverlauf der Harnsäure** im Blutplasma nach der Glucoseinjektion kein einheitliches Muster. Allerdings ist analog zu den Harnsäuredaten im Tagesverlauf ein erhöhter Harnsäurespiegel bei beiden hungernden Gruppen (H und HP) im Vergleich zu den nüchternen Gruppen (N und GDBN) zu beobachten. Auffallend ist auch der in den beiden hungernden Gruppen sich tendenziell abzeichnende Harnsäureanstieg zum Zeitpunkt 30 min p.i.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Insulin eine Steigerung der Harnsäuresynthese in der perfundierten Leber von 18 h gehungerten Hühnern bewirken kann (Barratt, Buttery et al. 1974). So führt eine exogene Insulininjektion schon nach 5-10 Minuten zu einem 60-minütigem Anstieg des Harnsäurespiegels im Blut (Hazelwood and Langslow 1978). Da in den beiden nüchternen Gruppen (N und GDBN) trotz deutlicher Insulin-Reaktion p.i. keinerlei ähnlich geartete Zunahme der Harnsäure-Konzentration 30 min p.i. zu erkennen ist, dürfte Insulin als Ursache für die obengenannte tendenzielle Zunahme der Harnsäure-Konzentration ausscheiden.

Vergleicht man den Stoffwechselzustand der nüchternen Tiere mit dem **der nüchternen, mit Glucose vorbelasteten Tiere**, so entspricht die im GTT induzierte AUC für Glucose mit dem Wert 258 bei mit Glucose vorbelasteten Tieren nicht mehr der Fläche (205) bei nur nüchternen Tieren. Eine mögliche Erklärung hierfür findet sich in der zugehörigen Fläche des GTT-induzierten Insulinkonzentrationsanstiegs, die mit dem Wert 33,4 etwas weniger als die Hälfte der AUC (73,8) bei nur nüchternen Tieren ausmacht (s. Tab. D3). Möglicherweise hat eine gewisse Entleerung der Insulinspeicher in den B-Zellen des endokrinen Pankreas durch die vorangegangenen Glucose-Mehrfachinjektionen stattgefunden, so dass im Verlauf des GTT diesen Tieren nur noch eine eingeschränkte sich fortsetzende Insulinausschüttung zur Beeinflussung der Glucoseelimination aus dem Blut möglich war. In der Literatur wurde passend hierzu beobachtet, dass der isolierte, perfundierte Hühnerpankreas auf eine wiederholte Erhöhung des Zuckergehalts im Medium mit einer geringer werdenden Insulinsekretion reagiert (King and Hazelwood 1976).

Die AUC des Glucoseanstiegs (s. Tab. D1) ist im Vergleich zu hungernden Tieren bei den GDBN-Tieren sehr ähnlich (GDBN: 258 vs. H: 261). Dagegen ist die Fläche des Insulinanstieg mit 33 bei den GDBN-Tieren um 40 % kleiner als bei den H-Tieren (55) (s. Tab. D3a) . Das heißt, dass die nüchternen, mit Glucose vorbelasteten Tiere mit einer geringeren Insulinmenge im Blut dennoch eine mengenmäßig gleiche und bei Betrachtung der  $T_{1/2}$  (s. Tab. D2) sogar schnellere Glucoseelimination (8,83 min vs. 12,47 min) aufweisen als die hungernden Tiere.

Im Vergleich zu nüchternen Tieren ist die Fläche des Insulinanstiegs der GDBN-Tiere um 55 % kleiner, die Fläche des Glucoseanstiegs dagegen um 25 % größer. Demnach wird zwar weniger Insulin sezerniert (evtl. aufgrund der erwähnten Ermüdung der Insulinspeicher), das Hormon erreicht aber dennoch verstärkte Wirksamkeit. Eventuell werden die peripheren Gewebe durch die anhaltende Glucosestimulation für die Insulinwirkung sensibilisiert, so dass Transportproteine und –mechanismen auf geringere Mengen des Hormons dennoch ausreichend reagieren können. Für diese These spricht die identische  $T_{1/2}$  der Glucoseelimination von GDBN- und N-Tieren (s. Tab. D2).

Auch bei Betrachtung des **FFS-Konzentrations-Abfalls** im Blut findet sich ein Hinweis für eine beibehaltene Insulinwirkung. Die mit dem AUC-Wert von 19,8 größte Flächenabnahme bei den GDBN-Tieren (entspricht der geringsten FFS-Verfügbarkeit im Blut!) auch im Vergleich zur Abnahme bei den nur nüchternen Tieren (mit dem AUC Wert 14,7; s. Tab D3), lässt vermuten, dass die bei nüchternen Tieren noch deutlich vorhandene, sich in Form der Lipolysehemmung zeigende Insulinwirkung (gesteigerte intrazelluläre Glucoseverfügbarkeit) durch die Glucosevorbelastung noch gesteigert werden kann.

Hierzu passt, dass der in Abb. E46 vergleichend wiedergegebene **mittlere  $\beta$ HB-Konzentrationsverlauf** vor und nach dem GTT bei den **mit Glucose-Mehrfachinjektionen vorbelasteten Tieren** das niedrigste Niveau aufweist. Der Spiegel von  $\beta$ HB lässt sich folglich durch halbstündig wiederholte Glucosegaben deutlich unter das Konzentrationsniveau der nur nüchternen Tiere senken.

**Tab. D5a: Wichtige Kenndaten des mittleren Glucagonkonzentrationsverlaufes nach i.v. Glucoseinjektion (GTT) bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ GDBN)**

<b>Glucagonminimum 10 min p.i.</b>	<b>Wert absolut (ng/l)</b>	<b>Wert relativ (% des Nullwertes)</b>
GTTN	168,9	30,8
GTTH	184,4	25,3
GTTHP	100,9	38,9
GDBN	128,3	22,8

<b>Glucagon-AUC</b>	<b>Gesamtfläche</b>		<b>Fläche des Glucagonabfalls unter Kontrollniveau</b>
	absolut	relativ (in % der Kontroll-AUC)	
GTTN	24251	60	16112
GTTH	17957	61	11504
GTTHP	14661	52	13637
GDBN	22827	57	17536

**Tab. D5b: Signifikante Unterschiede der Kenndaten des mittleren Glucagonkonzentrationsverlaufes nach i.v. Glucoseinjektion (GTT) bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP sowie „nüchtern und mit Glucose vorbelastet“ GDBN)**

<b>Glucagon</b>	<b>AUC</b>	<b>Minimum 10 min p.i.</b>
GDBN vs GTTN	ns	ns
GDBN vs GTTH	ns	ns
GDBN vs GTTHP	<0,05	ns
GTTN vs GTTH	ns	ns
GTTN vs GTTHP	<0,05	pK-W=0,0003
GTTH vs GTTHP	ns	pK-W=0,0003

<b>Glucagon</b>	<b>AUC</b>	<b>Minimum 10 min p.i.</b>
GTTN - NK	s: p<0,0001	s: pM-W=0,0001
GTTH - HK	s: p=0,0024	s: p<0,0001
GTTHP - HPK	s: p=0,0001	s: pM-W<0,0001
GDBN - NK	s: p<0,0001	s: pM-W<0,0001

Was den **Konzentrationsverlauf von Glucagon** im GTT betrifft, so zeigen alle vier Stoffwechselsituationen den Hyperglykämie abhängigen Einbruch der Glucagonverfügbarkeit im Blut 10 min p.i. (s. Abb. E49, Tab. D5). Interessanterweise sind die niedrigsten dabei erreichten Glucagonminima (mit rund 23 % bzw. 25 % des jeweiligen Kontrollwertes) bei den hungernden und glucosuretischen bzw. bei den mit Glucose vorbelasteten nüchternen Tieren zu finden.

Während die GDBN-Tiere bereits 20 min später (zum Zeitpunkt 30 min p.i.) mit ca. 92 % fast wieder den Glucagon-Ausgangswert (zum Zeitpunkt 0 min) erreicht haben, hat die Glucagonkonzentration der HP-Tiere zum Zeitpunkt 60 min p.i. erst 75 % des Ausgangswertes erreicht. Möglicherweise zeigt dies erneut, dass - wie bereits früher angedeutet - in dieser extrem katabolen Situation weniger dem Glucagon als vielmehr dem Corticosteron eine wichtige, die Glucoseverfügbarkeit unterstützende Funktion zugeordnet werden muss.

Während der beiden Nüchtern-Zustände (N, GDBN) hat Glucagon, als Gegenspieler zum Insulin, offensichtlich noch eine weit größere regulative Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase. Dafür spricht die rasche Normalisierung der durch die Glucoseinjektion abgesenkten Glucagonkonzentration im Blutplasma.

Eine weitere Erklärung wäre, dass durch den länger erhöhten Glucosespiegel aufgrund der verminderten Insulinwirkung im Hungerzustand die Normalisierung des Glucagonspiegels tendenziell gehemmt wird.

#### **4. Zum Einfluss von Tolbutamid auf die Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen bei den Stoffwechselbedingungen „nüchtern“ und „hungernd“**

Um die Wirkung einer Hyperinsulinämie beim Huhn unbeeinflusst vom Niveau des Blutglucosespiegels darstellen zu können, wurde bei Hennen während der Stoffwechselzustände „nüchtern“ und „hungernd“ morgens (zeitlich analog zu den Glucoseinjektionen des GTT) i.v. Tolbutamid injiziert und dessen Auswirkung auf die Konzentrationsverläufe der Pankreashormone sowie von Glucose und anderen Metaboliten im Blutplasma im Zeitraum eine Stunde p.i. verfolgt.

Wie Abb. E66 zeigt, gelang es in beiden Stoffwechselsituationen rasch, eine vorübergehende Hyperinsulinämie zu induzieren. Die dabei erreichten Konzentrationsmaxima (s. Tab. D7) zum Zeitpunkt 5 min p.i. waren mit 224 % (TN) bzw. 241 % (TH) des Nullwertes nicht signifikant verschieden, erreichten aber bei weitem nicht die mit den i.v. Glucoseinjektionen erzielten prozentualen Insulinzunahmen (443 % versus 311 %) (s. Abb.E68c, E73c). Dieser Verlauf deckt sich mit Ergebnissen in der Literatur, wonach eine Tolbutamidinjektion eine schnelle, aber weniger markante und kürzer anhaltende Insulinsekretion bewirkt als eine i.v. Glucoseinjektion (King and Hazelwood 1976).

Vergleicht man die hyperinsulinämische Gesamtsituation (im Zeitraum eine Stunde p.i.) als Maß der induzierten Insulinantwort bei nüchternen und hungernden Tieren (s. Tab. D7), so finden sich keine signifikanten Unterschiede, weder im Nullwert (1,13 µg/l vs. 1,14 µg/l) noch im Insulinmaximum (2,53 µg/l vs. 2,75 µg/l). Dies ist überraschend, denn eigentlich hätte man erwartet, dass analog zu den Gegebenheiten beim Säuger (Tzagournis and Skillman 1970; Penicaud, Kande et al. 1985) im Hungerzustand eine deutlich eingeschränkte Insulinfreisetzung (auch nach einem exogenen Stimulus) stattfindet. Unterstützung erfährt diese Erwartung auch dadurch, dass Befunde in der Literatur am Huhn diese hungerspezifische Einschränkung bei der Insulinsekretion bereits angedeutet haben (Simon and Rosselin 1978).

Allerdings führt die ähnlich erhöhte Insulinverfügbarkeit bei den nüchternen Tieren zu einer markanteren Hypoglykämie und einer um die Hälfte kürzeren  $T_{1/2}$  (s. Tab. D6). Dies spricht für eine weitaus bessere Insulinwirkung im Nüchternzustand als bei hungernden Tieren. Unterstützung erfährt diese Annahme durch die Intensität der durch Insulin induzierten relativen Abnahme der Glucosekonzentration von 0 min auf 30 min bzw. auf 60 min p.i. Diese ist bei nüchternen Tieren deutlicher als bei hungernden Tieren (-43 % vs. -37 % bzw. -50 % vs. -42 %).

So bestätigen diese Ergebnisse wiederum die bereits diskutierte (s.o.) und in der Literatur postulierte (Simon and Rosselin 1978) Insulinresistenz im Hungerzustand.

**Tab. D6a: Wichtige Kenndaten des mittleren Glucosekonzentrationsverlaufes nach i.v. Tolbutamidinjektion bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ TN und „hungernd“ TH)**

Glucoseminimum (60 min p.i.)	Wert absolut (mmol/l)	Wert relativ (in % des Nullwertes)
TN	5,92	50
TH	7,13	58

Glucose AUC	Gesamtfläche		Fläche des Glucoseabfalls unter Kontrollniveau
	absolut	relativ (in % der Kontroll-AUC)	
TN	478	64	265
TH	583	75	193

	TN	Probenzahl	TH	Probenzahl
Halbwertszeit der Glucoseelimination (min)	24,3 ± 3,2	n = 11	48,5 ± 11,9	n = 7

**Tab. D6b: Signifikante Unterschiede der Kenndaten des mittleren**

**Glucosekonzentrationverlaufes nach i.v. Tolbutamidinjektion bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ TN und „hungernd“ TH sowie GTTN und GTTH)**

Glucose	AUC	Minimum (60 min p.i.)
TN vs NK	s: p<0,0001	s: p<0,0001
TH vs HK	s: p<0,0001	s: p<0,0001
TN vs TH	s: p<0,0001	s: p=0,0006
TN vs GTTN	s: p< 0,0001	s: p< 0,0001
TH vs GTTH	s: p=0,0002	s: p< 0,0001

**Tab. D7a: Wichtige Kenndaten des mittleren Insulinkonzentrationverlaufes nach i.v.**

**Tolbutamidinjektion bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ TN und „hungernd“ TH)**

Insulinmaximum	Zeitpunkt (min p.i.)	Wert absolut (µg/l)	Wert relativ (in % des Nullwertes)
TN	5	2,53	224
TH	5	2,75	241

Insulin AUC	Gesamtfläche		Fläche des Insulinanstiegs über Kontrollniveau
	absolut	relativ (in % der Kontroll-AUC)	
TN	79	326	55
TH	77	114	9

**Tab. D7b: Signifikante Unterschiede der Kenndaten des mittleren**

**Insulinkonzentrationverlaufes nach i.v. Tolbutamidinjektion bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ TN und „hungernd“ TH sowie GTTN und GTTH)**

Insulin	AUC	Werte 5 min p.i.	Werte 10 min p.i.
TN vs NK	s: pM-W=0,001	s: pM-W=0,0002	s: pM-W=0,001
TH vs HK	ns: p=0,4294	s: p=0,0002	s: pM-W=0,012
TN vs TH	ns: p=0,9242	ns: p=0,5073	ns: p=0,1902
TN vs GTTN	s: p=0,0089	s: p=0,0009	s: p=0,0001
TH vs GTTH	s: p=0,0009	s: p=0,0011	s: p< 0,0001

Erklärungsbedarf besteht noch für die anhaltend progressive Hypoglykämie und zwar trotz wieder normalisiertem Insulinspiegel (s. Tab. D6 und D7). Möglicherweise hängt dies damit zusammen, dass aufgrund der immer noch vorherrschenden Hypoglucagonämie (s. Abb. E67) dem sehr weitgehend wieder abgesunkenen Insulinspiegel (s. Abb. E 66) doch

noch eine gewisse Wirkungsdominanz zugesprochen werden muss. Dies wiederum ließe vermuten, dass, ähnlich zum Säugetier, auch beim Huhn dem antagonistisch regulierend tätigen pankreatischen Hormonpaar (Insulin und Glucagon) für die Regulation der Glucosehomeostase, zumindest unter Nüchternbedingungen mit der Wirkungsdominanz des Glucagons eine wichtige Bedeutung zukommt.

Man kann aber auch eine mögliche zusätzliche Wirkung von Tolbutamid selbst nicht außer Betracht lassen. Am Säuger konnte ein direkter Effekt von Tolbutamid *in vitro* an Hepatozyten gezeigt werden. So wurde die Glucagonwirkung an bestimmten Enzymen gehemmt und dadurch die Glucolyse stimuliert bzw. die Gluconeogenese unterdrückt. Dies würde *in vivo* die Insulin induzierte Hypoglykämie nach Tolbutamidgabe weiter verstärken, da wichtige enzymatische Mechanismen zur Wiederanhebung des Glucosespiegels blockiert wären (Ayame, Matsutani et al. 1995; Kaku, Inoue et al. 1995). Allerdings wurde beim Huhn festgestellt, dass eine Glucagoninjektion auch bei Tolbutamid behandelten Tieren zu einer Aufhebung der Hypoglykämie mit Anstieg des Blutzuckerspiegels führt, was einer Hemmung der Glucagonwirkung durch Tolbutamid widerspricht (Hazelwood and Lorenz 1957; Grande 1971).

Anders als beim Säuger führt Tolbutamid beim Huhn zu einer Insulin unabhängigen Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel (Gibson, Bourne et al. 1980) sowie zu einer erhöhten Expression von GLUT1 in der Skelettmuskulatur (Seki, Sato et al. 2005). Auch wenn diese Wirkungen bisher nur *in vitro* beobachtet wurden, so könnten sie doch als Erklärung für die hier vorliegende sich fortlaufend verstärkende Hypoglykämie dienen.

Interessant ist, dass auch der **mittlerer Konzentrationsverlauf von Glucagon**, ähnlich zur Situation während des GTT, mit einer deutlichen Absenkung reagiert (s. Abb. E67). Die nach der Injektion von Glucose bzw. von Tolbutamid jeweils 10 min p.i. eingetretenen Konzentrationsminima von Glucagon (s. Tab. D5 und Tab. D8) liegen relativ einheitlich bei Werten um 30 % des Nullwertes. Weder in Abhängigkeit zur Wirkstoffapplikation (Tolbutamid versus Glucose) noch in Abhängigkeit zur Stoffwechselsituation (N versus H) lassen sich signifikante Unterschiede erkennen, obwohl die absolute Insulinausschüttung in den Tolbutamidversuchen deutlich geringer ausfällt.

Vergleicht man die AUC als Maß für die Glucagonpräsenz im Blut im Zeitverlauf von einer Stunde p.i., so zeigen sich für die beiden Wirkstoffinjektionen (Tolbutamid versus Glucose) keine signifikante Unterschiede. Lediglich zwischen den nüchternen und



hungernden Tieren des Tolbutamidversuchs findet sich ein signifikanter Flächenunterschied (s. Tab D8).

**Tab. D8a: Wichtige Kenndaten des mittleren Glucagonkonzentrationverlaufes nach i.v. Tolbutamidinjektion bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ TN und „hungernd“ TH)**

Glucagonminimum	Wert absolut (ng/l)	Wert relativ (in % des Nullwertes)
TN	175,2	30
TH	151,8	32

Glucagon AUC	Gesamtfläche		Fläche des Glucagonabfalls unter Kontrollniveau
	absolut	relativ (in % der Kontroll-AUC)	
TN	21593	54	18770
TH	17013	58	12448

**Tab. D8b: Signifikante Unterschiede der Kenndaten des mittleren Glucagonkonzentrationverlaufes nach i.v. Tolbutamidinjektion bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ TN und „hungernd“ TH sowie GTTN und GTTH)**

Glucagon	AUC	Minimum 10 min p.i.
TN vs NK	s: p<0,0001	s: pM-W=0,012
TH vs HK	s: pM-W=0,0002	s: pM-W=0,0001
TN vs TH	s: p=0,0228	ns: p=0,3895
TN vs GTTN	ns: p=0,2874	ns: p=0,8227
TH vs GTTH	ns: p=0,0682	s: p=0,028

Während bei der Diskussion der eingeschränkten Glucagonreaktion nach GTT die dadurch induzierte deutliche Hyperglykämie als Auslöser dieser Hypoglucagonämie in Erwägung gezogen wurde, so scheint eine analoge Begründung in den Tolbutamid-Applikationsversuchen, hier ebenfalls ausgehend vom induzierten mittleren Glucosekonzentrationsverlauf, nicht möglich zu sein (s. Abb. E62). Letzterer nimmt über den Beobachtungszeitraum von einer Stunde p.i. in beiden Stoffwechselsituationen, durch die Hyperinsulinämie induziert, kontinuierlich auf 50 % (TN) bzw. 58 % (TH) des Nullwertes ab. Das heißt, in beiden Stoffwechselsituationen ist eigentlich eine deutliche hypoglykämische Situation entstanden, die üblicherweise nicht eine Hemmung, sondern eine Stimulation der Glucagonausschüttung zur Folge hätte (Hazelwood and Langslow 1978).

So bleibt zum Beispiel beim Säugetier (Mensch, Hund, Ratte) der Glucagonspiegel nach einer Tolbutamidinjektion entweder gleich oder er steigt an (Buchanan, Williams et al. 1969). In vitro zeigt sich dagegen, dass der Effekt von Tolbutamid Dosis abhängig ist: Die Tolbutamidkonzentration von 0,1 mmol/l verursachte an  $\alpha$ -Zellen von Rattenpankreatata eine Glucagonausschüttung (Franklin, Gromada et al. 2005), während durch 1 mmol/l die Glucagonausschüttung, auch unabhängig von der Insulinsekretion, gehemmt wurde (Laube, Fussgänger et al. 1971).

In den eigenen in vivo Versuchen an Hühnern, aber auch bei Enten (Samols, Tyler et al. 1969), war ein deutlicher und schneller Abfall des Glucagonspiegels nach der Tolbutamidinjektion zu sehen.

Bei den Hühnern betrug die Tolbutamidkonzentration im Injektionsvolumen bei einer Tolbutamiddosis von 20 mg/kg (bei Enten wurden 15 mg/kg KG verwendet (Samols, Tyler et al. 1969)) etwas weniger als 0,1 mmol/l und es konnte dennoch ein deutlicher Abfall der Glucagonkonzentration beobachtet werden. Erschwert wird der Wirkungsvergleich anhand der Stoffmengenkonzentration dadurch, dass in vitro Versuche an Ratten mit in vivo Versuchen am Huhn verglichen werden müssen. Möglicherweise könnte bei in vitro Untersuchungen am Hühnerpankreas bereits mit deutlich niedrigeren Stoffmengenkonzentrationen von Tolbutamid (als bei der Ratte) eine Hemmung der Glucagonausschüttung erreicht werden. Dass Unterschiede in der Stimulierbarkeit der Glucagonausschüttung zwischen Vogel und Säuger bestehen müssen, zeigt auch die Einbeziehung des beim Vogel hohen Blutglucosespiegels. Bei Werten von ca. 12,2 mmol/l Glucose bei nüchternen Hühnern, liegt der mittlere Glucagonspiegel mit 671,6 ng/l auf einem Niveau, das etwa dreimal höher ist als die Glucagonkonzentration beim Säuger (McAuley 2013).

Um auch bei den mit Tolbutamid behandelten Tieren eine Aussage zur stoffwechselsituationsspezifischen (N vs H) Wirkung der induzierten Hyperinsulinämie treffen zu können, bietet es sich an, neben den bereits in die Diskussion eingebunden hypoglykämischen Glucosekonzentrationsverlauf auch den nicht homeostatisch regulierten **Konzentrationsverlauf der FFS** mit einzubinden.

In beiden Stoffwechselgruppen (N und H) zeigt sich eine deutliche parallel laufende (signifikante) Abnahme im FFS-Konzentrationsverlauf bis zum Zeitpunkt 30 min p.i. (s. Abb E63, Tab. D9). Relativ betrachtet nimmt der FFS-Ausgangswert (0 min) in beiden Konzentrationsverläufen um 65 % (N) bzw. 76 % (H) ab. Auch die absolute FFS-

Konzentrationsänderung ist mit 0,014 mmol/min (N) bzw. 0,015 mmol/min (H) während dieser 30 min identisch. Während der nächsten 30 min steigen die FFS-Spiegel wiederum weitgehend parallel an und erreichen zum Zeitpunkt 60 min bereits wieder 71 % (N) bzw. 69 % (H) der Ausgangskonzentration (0 min). Die über den gesamten Beobachtungszeitraum sichtbar werdende Parallelität im Tolbutamid induzierten FFS-Konzentrationsverlauf deckt sich weitgehend mit dem bei N- und H-Tieren sehr ähnlichen Insulinkonzentrationsverlauf (s. Abb. E66). So hat die initial induzierte Hyperinsulinämie (0 bis 10 min) zum Zeitpunkt 30 min bereits annähernd wieder das Insulinausgangsniveau erreicht bzw. sogar leicht unterschritten (N: +11 %; H: -18 %) und zum Zeitpunkt 60 min ein deutlich niedrigeres Niveau als zum Zeitpunkt 0 erreicht (N: -27 %; H: -34 %). Das heißt, die Art und die Ähnlichkeit der Konzentrationsverläufe der FFS und des Insulins bei N- und H-Tieren lässt den Schluss zu, dass sich bezüglich der antilipolytischen Eigenschaften von Insulin bei den beiden doch recht unterschiedlichen katabolen Stoffwechselsituationen überraschenderweise kaum ein Unterschied aufzut.

**Tab. D9a: Wichtige Kenndaten des mittleren FFS-Konzentrationsverlaufes nach i.v. Tolbutamidinjektion bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ TN und „hungernd“ TH)**

FFS-Minimum	Wert absolut 30 min p.i. (mmol/l)	Wert relativ (in % des Nullwertes)
TN	0,230	35,34
TH	0,135	23,73

FFS-AUC	Gesamtfläche		Fläche des FFS-Abfalls unter Kontrollniveau
	absolut	relativ (in % der Kontroll-AUC)	
TN	24	58	17,28
TH	18	65	9,64

**Tab. D9b: Signifikante Unterschiede der Kenndaten des mittleren FFS-Konzentrationsverlaufes nach i.v. Tolbutamidinjektion bei den gegebenen Stoffwechselsituationen („nüchtern“ TN und „hungernd“ TH sowie GTTN und GTTH)**

FFS	AUC	Minimum 30 min p.i.
TN vs NK	s: p<0,0001	s: p<0,0001
TH vs HK	s: p=0,0002	s: p<0,0001
TN vs TH	s: p=0,0094	s: p=0,0013
TN vs GTTN	ns: pM-W=0,4234	ns: pM-W=0,3711
TH vs GTTH	ns: p=0,3626	ns: p=0,3202

In der Literatur finden sich recht unterschiedliche Angaben über die Wirkung von Insulin auf den Spiegel der FFS beim Huhn. Viele Arbeiten sehen einen Anstieg der FFS-Konzentration sowohl nach einer Glucagon- als auch nach einer Insulingabe (Säugerinsulin). Der Anstieg der FFS-Konzentration nach einer Insulininjektion erfolgt jedoch etwas langsamer als nach einer Glucagoninjektion, daher nehmen die Autoren nicht die Hyperinsulinämie als Ursache an, sondern postulieren eine sekundäre Wirkung durch die reaktiv erhöhte Glucagonausschüttung (Heald, McLachlan et al. 1965; Lepkovsky, Dimick et al. 1967; Hazelwood and Langslow 1978; Chida, Ohtsu et al. 2000) .

Dagegen haben Rager, Schauder et al (1969) beobachtet, dass nach Gabe von Hühner- und Rinderinsulin der Spiegel der FFS im Blut abfällt, er also genauso reagiert wie beim Säugetier.

In den Tolbutamidversuchen sinkt der Glucagonspiegel als Folge der induzierten Insulinsekretion und/oder einer direkten Tolbutamidwirkung deutlich ab und kann daher nicht korrigierend auf die Hypoglykämie und die Abnahme des FFS-Spiegels wirksam werden. In Versuchen an Enten und Gänsen ist der Glucagonspiegel eine Stunde nach Tolbutamidinjektion wieder normal (Samols, Tyler et al. 1969), während der Spiegel der FFS weiter über drei Stunden erniedrigt bleibt (Grande 1971). Grande bezweifelt daher, dass bezüglich des Abfalls der FFS-Konzentration im Blut dem Glucagonspiegel ein wichtiges korrigierendes Potential zukommt.

Auffallend ist zudem, dass trotz der deutlich geringeren Insulinausschüttung nach Tolbutamidinjektion im Vergleich zum GTT (s. Abb. E68c, 73c) die Kurven der FFS-Konzentration jeweils nahezu parallel verlaufen oder sogar im Minimum noch niedrigere Werte erreichen (s. Abb. E70, E75). Auch die im Vergleich zum GTT langsamer wieder ansteigende Glucagonkonzentrationskurve (s. Abb. E69, E74) bei den Tolbutamid behandelten Tieren passt nicht zu dem ausgeprägten antilipolytischen Effekt, der durch die abfallende Kurve der FFS-Konzentration abgebildet wird.

Beim Menschen wird hinsichtlich der Senkung des FFS-Spiegels im Blut ein direkter Effekt von Tolbutamid auf die Leber und das Fettgewebe diskutiert (Stone and Brown 1966). Möglicherweise ist auch beim Huhn ein ähnliches Phänomen für den ungewöhnlichen Verlauf der FFS-Konzentration nach Tolbutamidgabe verantwortlich.

Die **Konzentration von  $\beta$ HB** fällt bei den Tolbutamid behandelten Tieren (s. Abb E64) spezifisch für die Stoffwechselsituation in einem ähnlichen Ausmaß ab wie nach dem GTT (s. Abb E46). So beträgt der Konzentrationsabfall zum Zeitpunkt 30 min p.i. bei N-Tieren

nach GTT (von 0,91 mmol/l auf 0,48 mmol/l) ca. 47 % und bei Tolbutamid behandelten Tieren (von 1 mmol/l auf 0,5 mmol/l) 50 %. Bei hungernden Tieren nach GTT sinkt der  $\beta$ HB-Spiegel (von 2,21 mmol/l auf 0,56 mmol/l) um ca. 75 %, nach Tolbutamidinjektion (von 2,39 mmol/l auf 0,55 mmol/l) um ca. 77 %. Diese Ähnlichkeit im reaktiven Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB bei beiden Stoffapplikationen (Glucose vs. Tolbutamid) lässt eine direkte hemmende Wirkung des Tolbutamid unwahrscheinlich erscheinen. Bei Ratten wurde eine derartige hemmende Wirkung des Tolbutamid auf die Ketonkörperproduktion vermutet (Mori, Kaku et al. 1992).

Wahrscheinlicher ist, dass hierfür die Hyperinsulinämie-induzierte Absenkung des FFS-Spiegels (s. Abb. E45 und E63) ursächlich ist. Man kann annehmen, dass das bei N- und H-Tieren vor der Tolbutamidinjektion vorherrschende, überraschenderweise weitgehend identische FFS-Konzentrationsniveau (0,651 mmol/l vs. 0,571 mmol/l) wie folgt zustande gekommen ist. Die bei H-Tieren erwartbar höhere FFS-Mobilisierung spiegelt sich deshalb nicht voll im Blut wieder, weil ein hoher Anteil dieser FFS sich nach unvollständiger  $\beta$ -Oxidation in den Ketonkörpern ( $N_0=1$  mmol/l;  $H_0=2,39$  mmol/l) wieder findet. Unter diesen Gegebenheiten wäre es tatsächlich nahe liegend, dass die Glucose- bzw. Tolbutamid induzierte Hyperinsulinämie mit seiner die Lipolyse hemmenden Wirkung sich in der Ketogenese bzw. dem Konzentrationsverlauf von  $\beta$ HB im Blut der hungernden Tiere besonders markant negativ auswirkt (GTTH: 0,055 mmol/min; TH: 0,061mmol/min). Da die Rate der  $\beta$ HB-Konzentrationszunahme pro l Blut zwischen 30 und 60 min p.i. bei H-Tieren nach Tolbutamidinjektion mit 0,004 mmol/min deutlich langsamer erfolgt als nach Glucoseinjektion mit 0,026 mmol/min kann eine gewisse hemmende Wirkung von Tolbutamid auf die Ketogenese jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zusätzliche Literaturbelege hierfür beim Huhn fehlen jedoch.

## **5. Überlegungen zu den Besonderheiten des Glucose- bzw. Energiestoffwechsels beim Vogel aufgrund der gewonnen Erkenntnisse**

Der Stoffwechsel von Glucose dient beim Vogel wie beim Säuger verschiedenen Funktionen, z. B. der Energiegewinnung aus zellulärer Oxidation, der Glykogensynthese in Leber und Muskel, der Fettsäuresynthese sowie der Synthese von Vitamin C und anderen Metaboliten.

Glucose gilt beim Vogel als das wichtigste Monosaccharid, das nach einer Kohlenhydrathaltigen Mahlzeit im Verdauungstrakt transzellulär (ca. 80 % Carrier unterstützt mittels  $Na^+$ -abhängigem Cotransport), aber auch parazellulär resorbiert wird (Klasing 1998).

Einzelne Literaturbefunde besagen, dass ca. ein Drittel der resorbierten Glucose in den Dünndarm-Enterozyten zu Laktat verstoffwechselt wird (Riesenfeld, Geva et al. 1982).

Wenige Stunden nach der Nahrungsaufnahme wird wegen der bereits entleerten Glykogenreserven und der gleichbleibend hohen Stoffwechselrate heraus die Gluconeogenese stimuliert. Hauptsubstrate hierfür sind das Glycerol (aus dem Fettabbau) und Aminosäuren aus dem Proteinabbau (Hazelwood and Lorenz 1959; Klasing 1999)

Karnivore Vögel scheinen den Prozess der Gluconeogenese auch im Fütterungszustand aufrecht zu erhalten (Migliorini, Linder et al. 1973).

Vögel haben den höchsten „normal“-Glucosespiegel im Blutplasma unter den Wirbeltieren. Unter Berücksichtigung von 511 Spezies konnte ein mittlerer Glucosewert von 15,6 mmol/l ermittelt werden. Dieser ist im Vergleich zum Spiegel von Säugetieren (n=381) rund 2-fach und im Vergleich zum Spiegel von Amphibien (n=19) ca. 7-fach höher. Andererseits zeigen Vögel eine besonders hohe interspezifische Variabilität. So können bei einigen gesunden Vogelspezies Glucosespiegel bis zu 28 mmol/l erreicht werden (Polakof, Mommsen et al. 2011).

Unter dem Aspekt eines tierartigen Vergleichs konnte gezeigt werden (Umminger 1975), dass bei Wirbeltieren der Blutglucosespiegel positiv mit der Stoffwechselrate korreliert. Darüber hinaus zeigt die Blutglucosekonzentration bei Wirbeltieren auch einen allometrischen Bezug dahingehend, dass bei großen Wirbeltieren der Glucosespiegel niedriger ist. Aber auch unter dieser Betrachtung haben bei identischem Körpergewicht Vögel (n=37 Spezies) gegenüber Säugetieren einen deutlich höheren Blutglucosespiegel (Beuchat and Chong 1998).

In einer neueren Untersuchung konnte dieser Unterschied an 97 Vogelspezies bzw. 162 Säugerspezies weiter bestätigt werden. Interessanterweise konnte darüber hinaus auch gezeigt werden, dass in beiden Wirbeltiergruppen zwischen dem Glucosespiegel  $y$  (mmol/l) und der Körpermasse  $BM$  (kg) eine eigenständige negative Beziehung mit identischer negativer Steigung (-0,44) existiert (Vögel:  $y=15,3-0,44\log BM$  bzw. Säuger:  $y=7,6-0,44\log BM$ ), bei den Vögeln jedoch auf einem ca. 2-fach höheren Niveau.

Bei Nutzung dieser oben genannten Vogel typischen Regressionsgleichung und des mittleren Körpergewichts unserer Versuchshühner (1,45 kg) ergäbe sich ein Blutglucosewert von 15,2 mmol/l. Da in vorliegender Untersuchung die Blutglucosekonzentration bei gefütterten Hühnern nicht erfasst worden ist, fehlen gemessene Vergleichsdaten.

Dieser berechnete Glucosewert wäre aber nicht ungewöhnlich, wenn man berücksichtigt, dass die mittlere, bei nüchternen Hühnern (nach 15 h Futterentzug gemessene Blutglucosekonzentration bei knapp über 12 mmol/l liegt. Etwas verwunderlich ist dann jedoch der Befund, dass beim Erreichen eines massiven Hungerzustandes (nach 96 h Futterentzug und einem ca. 12 %igen Körpergewichtsverlust) der mittlere Blutglucosespiegel etwas höher liegt und annähernd 13 mmol/l erreicht (s. Tab D1). Ein derartiges initiales und nur vorübergehendes „Einknicken“ des Glucosespiegels während des Futterentzuges wurde mehrheitlich schon früher beobachtet (Murray and Rosenberg 1953; Hazelwood 1986). Es ist auch von einer Untersuchung an Broilern (n=240) her bekannt (van der Wal, Reimert et al. 1999). Ausgehend von 12,59 mmol/l (gefütterte Tiere) sank die Blutglucosekonzentration vorübergehend auf 11,46 mmol/l (10 h Futterentzug) und begann dann ab 12 stündigem Futterentzug wieder signifikant auf 12,62 mmol/l anzusteigen. Offensichtlich kann das Huhn im Futterentzug einerseits schon recht früh und auch besonders ergiebig den Prozess der Gluconeogenese steigern (bei gleichzeitiger Einschränkung des energetisch ausgerichteten metabolischen Glucoseverbrauchs) und andererseits für die Bereitstellung von metabolisch verfügbarer Energie die Lipolyse stimulieren. So war in der oben zitierten Broiler-Untersuchung mit dem Futterentzug ein früher und stetiger Anstieg der FFS im Blutplasma zu beobachten, der innerhalb von 12 Stunden mit 0,73 mmol/l bei weiblichen Broilern zu einer Verdoppelung des FFS-Spiegels führte. Männliche Broiler reagierten im selben Zeitraum mit 0,52 mmol/l interessanterweise signifikant weniger markant.

Die weiblichen noch nicht legeaktiven Hühner der vorliegenden Untersuchung zeigten im Nüchtern-Zustand (15 h Futterentzug) mit im Mittel annähernd 0,7 mmol/l ähnlich hohe Werte (s. Tab. D5). Dass mit dieser hohen FFS-Verfügbarkeit auch ein oxidativer Zweck verfolgt wurde, zeigt das mit ca. 1,25 mmol/l ebenfalls beachtlich hohe Konzentrationsniveau von  $\beta$ HB bei nüchternen Hühnern. Aus der Literatur (Abumrad, Coburn et al. 1999) ist bekannt, dass Vögel innerhalb der Wirbeltiere die höchsten zytosolischen Gehalte an FS-bindenden Proteinen aufweisen. Das heißt, die Voraussetzung für eine rasche und reichliche zelluläre Aufnahme von FFS für den oxidativen Zweck ist hiermit gegeben. Dass die dadurch gewährleistete metabolische Kapazität zur oxidativen FS-Verwertung in Vogelgeweben außergewöhnlich hoch ist, zeigen die enormen Konzentrationszunahmen beim  $\beta$ HB (s. Tab. A1, A3) nach mehrtägigem Hungern (+75 %) bzw. nach Hungern mit Phlorizin induzierter Glucosurie (HP +212 %).

Gleichzeitig steht mit dem bei der Lipolyse freigesetzten Glycerol ein wichtiges, effizient, d. h. ohne großen Energieaufwand, gluconeogenetisch nutzbares Substrat zu Verfügung.

Passend zu dieser eindeutig oxidativen Nutzung von FFS unter sehr variablen katabolen Stoffwechselsituationen sind die Befunde zum auch lipolytisch wirksamen Glucagon (s. Tab. D6). Die Konzentration dieses katabolen Hormons bleibt unter den sich verschärfenden Stoffwechselsituationen ( $N \rightarrow H \rightarrow HP$ ) weitgehend konstant hoch. Hierzu passt, dass auch die Glucagonkonzentration im Vogelpankreas 8-10 mal höher ist als im Säugerpankreas (Hazelwood 1973). Die in vitro Exposition des Vogelpankreas mit exogener Glucose hemmt die Glucagonfreisetzung (-27 %), aber erst bei sehr hohen Konzentrationen (42 mmol/l) (Ruffier, Simon et al. 1998). In der Literatur wurde immer wieder die Vermutung geäußert, dass der Stoffwechsel des Vogels „Glucagon-getragen“ ist (Cieslak and Hazelwood 1983) und dementsprechend Vögel, verglichen mit Säugern, wesentlich höhere Glucagonspiegel im Blut aufweisen und auch wesentlich empfindlicher auf Glucagon reagieren (verglichen mit der Reaktion auf Insulin), und zwar mit erhöhten Blutspiegeln von Glucose, Triglyceriden, Glycerol und FFS.

Die Spiegel von Glucagon im Blut überschreiten die von Insulin oftmals (Hazelwood 1984; Minick, Duke et al. 1996), so dass daraus niedrige molare Insulin/Glucagon-Quotienten resultieren ( $<1$ ), die vermuten lassen, dass Vögel „normalerweise“ in einer katabolen Stoffwechselsituation leben, vergleichbar mit diabetischen, hungernden oder körperlich aktiven Säugetieren (Hazelwood 1984). Dies führte immer wieder auch zu der Vermutung (Minick, Duke et al. 1996), dass aus dieser speziellen Stoffwechselsituation heraus der hohe Blutzuckerspiegel der Vögel resultiert. Die Bedeutung dieses hohen Blutglucosespiegels für den Vogel kommt auch dadurch zum Ausdruck, dass - wie in der vorliegenden Untersuchung gezeigt (s. Tab. D1) - auch unter diversen Belastungen (nüchtern, hungernd, glucosuretisch) des Energiehaushaltes der Glucosespiegel unverändert hoch gehalten wird (Bernard, Orvoine et al. 2003). Mit Ausnahme der ersten Flugminuten (Rothe, Biesel et al. 1987) gibt es auch keine signifikant unterschiedlichen Blutglucosespiegel bei ruhenden oder fliegenden Vögeln. Dies zeigt, dass der hohe Blutglucosespiegel sogar unter den Bedingungen eines leistungsbedingt hohen Energieumsatzes aufrechterhalten wird (Bordel and Haase 1993).

Vor diesem Hintergrund einer unverändert stabilen Glucosehomeostase auf hohem Niveau und einer massiven Lipolyse und hohen FFS-Oxidation unter katabolen Stoffwechselsituationen (s. Tab. D4) ist es überraschend, dass der Blutspiegel von Insulin - anders als beim Säuger- sogar noch ansteigt und in Relation zum Glucagon scheinbar an



Bedeutung gewinnt:  $N=0,37 \mu\text{g/l}$ ;  $H=1,53 \mu\text{g/l}$ ;  $HP=0,93 \mu\text{g/l}$  (s. Tab. D4, A6). Beim Säuger würde sich während der Futteraufnahme (je nach dem Kohlenhydratanteil in der Ration) eine Insulin-Dominanz mit einem molaren I/G-Quotienten von 5 bis 20 bzw. sogar bis 50 einstellen. Nüchtern wäre der Quotient bei 3-1 und im Hunger bei ca. 0,5 (Hazelwood 1984). Beim Vogel verändert sich der Quotient im Verlauf des Wandels von der anabolen zur katabolen Stoffwechselsituation offensichtlich umgekehrt. Da trotz dieser scheinbar zunehmenden Bedeutung von Insulin die entsprechende metabolische Wirkung (z.B. Antilipolyse) fehlt (s. Tab D2 und D3), muss angenommen werden, dass beim Vogel eine verminderte Insulin-Empfindlichkeit (=Insulin-Resistenz) vorliegt. Bereits publizierte Befunde diesbezüglich (Sweazea, McMurtry et al. 2006) unterstützen diese Annahme. Als Ursache hierfür könnte die Hyperglykämie (Tomás, Lin et al. 2002) und /oder die hohen FFS-Spiegel im Blut (Boden 1997) in Frage kommen.

Unterstützung erfährt diese Vorstellung (einer Insulinresistenz, die mit der sich verschärfenden katabolen Situation zunimmt) in der vorliegenden Untersuchung durch die Ergebnisse der diversen i.v. Glucosetoleranztests. So liegt die Halbwertszeit der Glucoseelimination aus dem Blutplasma bei GDBN- und GTTN-Tieren (s. Tab. D2) relativ einheitlich knapp unter 9 min. Bei den GTTH und den GTTHP-Tieren dagegen verlangsamt sich  $T_{1/2}$  ebenfalls einheitlich auf deutlich über 12 min (+ 41 % bzw. + 42 %). Beobachtet man die Entwicklung des I/G-Quotienten während des GTT bei den vier Stoffwechselzuständen, so liefern (im Vergleich zu den GDBN-Tieren) die bei GTTN, GTTH und insbesondere GTTHP besonders hohen Quotienten (s. Tab. D2) erneut einen Hinweis auf eine gewisse Insulinunempfindlichkeit, die jedoch schon im reinen Nüchternzustand zu beginnen scheint. Darüber hinaus zeigen die unterschiedlichen I/G-Quotienten Veränderungen bei den GDBN- und GTTN-Tieren, dass zumindest die exogene i.v. Glucosezufuhr (über zwei Stunden) die Insulinempfindlichkeit nüchterner Tiere nicht weiter verschärft. Dass die FFS-Spiegel während des GTT bei den drei eindeutig katabolen Stoffwechselsituationen mehr oder minder einheitlich auf die Hälfte (zum Zeitpunkt 30 min p.i.) abgesenkt wurden, mag deshalb seine Ursache im einheitlich, äußerst massiv abgesunkenen (um ca. 70 %, 10 min p.i.) Glucagonspiegel haben (s. Tab. A3).

Nutzt man für die Beurteilung der Insulinwirkung beim nüchternen bzw. hungernden Vogel die Ergebnisse der jeweiligen Tolbutamidinjektion (s. Tab. D8, A6, A7), so wird die bisherige Vorstellung durchaus unterstützt. Denn obgleich die Konzentrationszunahmen beim Insulin p.i. im Hungerszustand markanter und anhaltender sind und dadurch die I/G-

Quotienten größer sind, erfolgt die Induktion der Hypoglykämie bei den nüchternen Tieren rascher (-43 % vs. -27% jeweils bei 30 min p.i.) und anhaltender (-50 % vs. -42% jeweils bei 60 min p.i.), was sich auch in der ca. doppelt so langen Halbwertszeit der Glucoseelimination bei hungernden Tieren widerspiegelt (s. Tab. D10).

**Tab. D10: Halbwertszeit der Glucoseelimination sowie Vergleich der absoluten und relativen (%) Veränderungen der mittleren Konzentrationen von Metaboliten und Hormonen nach Tolbutamidinjektion (T) unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N) und „hungernd“ (H)**

Parameter	Zeit p.i. (min)	TN		TH	
<b>Halbwertszeit der Glucoseelimination</b>		24,3 ± 3,2	n=11	48,5 ± 11,9	n=7
<b>Glucose (mmol/l)</b>	0	11,78		12,37	
	30	6,73	57 % a)	9	73 %
	60	5,92	50 %	7,13	58 %
<b>FFS (mmol/l)</b>	0	0,651		0,571	
	30	0,23	35 %	0,135	24 %
	60	0,463	71 %	0,36	69 %
<b>βHB (mmol/l)</b>	0	1		2,39	
	30	0,5	50 %	0,55	23 %
	60	0,73	73 %	0,67	28 %
<b>Harnsäure (μmol/l)</b>	0	267,9		311	
	30	257	96 %	357,1	115 %
	60	249	93 %	319,4	103 %
<b>Insulin (μg/l)</b>	0	1,13		1,14	
	5	2,53	224 %	2,75	241 %
	10	1,57	139 %	2,09	183 %
	60	0,82	73 %	0,75	91 %
<b>Glucagon (ng/l)</b>	0	576,3		473	
	5	304,7	53 %	257,8	54 %
	10	175,2	30 %	151,8	32 %
	60	507,9	88 %	442,9	87 %
<b>Insulin/Glucagon</b>	0	1,19		1,46	
	5	5,05	424 %	6,48	444 %
	10	5,44	457 %	8,36	573 %
	60	0,98	82 %	1,03	70 %

a) = % des 0-Wertes

Was nun die Ursache dieser Insulin-Resistenz betrifft, so ist es höchstwahrscheinlich doch die gesteigerte Lipolyse mit der intrazellulär besonders hohen FS-Oxidation (erkennbar am βHB-Spiegel), die im Hunger, wie hier gezeigt, zumindest zu einer weiteren Verschärfung der generell gegebenen Insulinresistenz führt. Die Ergebnisse einer Untersuchung an 2-3

Stunden nüchternen Tauben (Sweazea, McMurtry et al. 2006), bei denen die Lipolyse experimentell gehemmt wurde und keine Verbesserung der Insulinwirkung in Bezug auf die Gewebeaufnahme von Glucose erzielt wurde, veranlassten die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass FFS allein nicht zur Insulinresistenz beim Vogel beitragen. Aus unserer Sicht gilt diese Feststellung möglicherweise nur für den Beginn der Nüchternphase beim Vogel.

Möglicherweise ist aber auch der beim Vogel beschriebene Mangel an GLUT4-Transportern, beim Säuger das einzige mittels Insulin stimulierbare Glucosetransport-Protein (Kern, Wells et al. 1990) in Muskeln (Herz und Skelett) und im Fettgewebe (Seki, Sato et al. 2003; Sweazea, McMurtry et al. 2006) ein Faktor, der zur Insulin-Resistenz in diesen Geweben beiträgt, und zwar schon unter einer anabolen Stoffwechselsituation.

Gibt es nun - auch angesichts der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung - eine überzeugende Antwort auf die Frage, warum Vögel innerhalb der Wirbeltiere so außergewöhnlich hohe Blutglucosekonzentrationen aufweisen? Leider nein! Folgt man den Ausführungen von Braun und Sweazea (2008), so müsste man wohl eher die Frage stellen, warum Säuger einen so niedrigen Blutglucosespiegel haben bzw. warum sie einen Insulinempfindlichen Glucosetransporter (GLUT4) haben und warum sie hohe, Vogel ähnliche Glucosespiegel so schlecht vertragen. Vielleicht zeigen die evolutionär älteren Vögel die Normal-Situation des Glucose- bzw. Energiestoffwechsels und die Säugetiere sind die „Ausreißer“.

Vielleicht muss man die besondere, aus Säuger Sicht gefährliche langfristige hyperglykämische Situation der Vögel auch im Zusammenhang mit anderen Besonderheiten sehen. So leben Vögel - von einigen wenigen Ausnahmen abgesehen - in der Regel bis zu 3-mal länger bzw. zeigen langsamerer Alterungserscheinungen als Säuger mit identischer Körpermasse. Dies ist paradox, denn sie haben auch 2-2,5mal höhere Stoffwechselraten (Gesamtenergieausgaben bezogen auf die ganze Lebensperiode sind ca. 15-mal höher als beim Säuger) und eine um ca. 3° C höhere Körpertemperatur. Sie zeigen also weitere Besonderheiten, die alle entsprechend den derzeit geltenden biochemischen Theorien das Altern eigentlich beschleunigen müssten (Holmes, Fluckiger et al. 2001).

Dies führte zu der Hypothese, dass Vögel - im Gegensatz zum Säuger - noch über spezielle Anpassungen verfügen, die altersbedingte Schäden, z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und durch hohe Glykosylierungsraten von Proteinen, verhindern.

## 6. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit sollten Einblicke in den Energie-, Fett- und Eiweißstoffwechsel und deren hormonale Regulation beim Huhn unter unterschiedlichen experimentiell induzierten Stoffwechselzuständen (hungernd, glucosuretisch, hyperglykämisch, hyperinsulinämisch) gewonnen werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Beginnend bereits nach 17 h Hungern und markant nach 96 h Hungern wird der Energiestoffwechsel beim Huhn auf die Energiebereitstellung aus Fettdepots umgestellt, erkennbar anhand einer vermehrten Lipolyse, aber unvollständiger Oxidation der FFS mit Ketogenese in der Folge. Glucoseeinsparende intermediäre Mechanismen und ein Anstieg der Gluconeogenese aus verfügbaren Substraten, unter anderem auch Aminosäuren aus der Proteolyse, führen dazu, dass das Blutglucose-Konzentrationsniveau im Hunger nicht sinkt.
2. 96 h Hungern führt zu einem hyperinsulinämischen, aber Insulinresistenten und dadurch tendenziell hyperglykämischen Zustand, der deshalb wegen der Analogie der Symptome beim Säuger als „Hunger-Diabetes“ bezeichnet werden kann.
3. Der Glucagonspiegel im Blut ist deutlich höher als beim Säuger. Er steigt aber bei länger andauerndem Hungern nicht weiter an. Eine zunehmende katabole Bedeutung des Corticosterons als proteinkataboles und Blutzucker erhöhendes Hormon ist naheliegend.
4. Eine durch Phlorizininjektionen verursachte Glucosurie bei 96 h hungernden Hühnern beeinflusst den Glucose- bzw. Energiehaushalt markant mit einer Abnahme des Blutzuckerspiegels, einer massiven lipolytischen Freisetzung von FFS und gleichzeitig deren ketogenetischer Nutzung (Hyperketonämie) sowie mit einer gesteigerten Proteolyse. Das im Vergleich zu gleichlang nur hungernden Tieren niedrige Insulinniveau im Blut steht offensichtlich in ursächlichem Zusammenhang mit der glucosuretisch erniedrigten endogenen Glucoseverfügbarkeit.
5. Ein steigender Glucosemangel (nüchtern→hungernd→hungernd und glucosuretisch) führt zu einer zunehmend verringerten Insulinwirkung erkennbar insbesondere während einer exogenen i.v. Glucoseinjektion (GTT) mit einem höheren Glucosekonzentrationsmaximum im Blut, einer verlängerten Halbwertszeit

der Glucoseelimination aus dem Blut und einem geringeren antilipolytischen Effekt.

6. Ein anhaltender endogener Glucoseüberschuss („nüchtern und 2 h lang mit Glucose vorbelastet“) führt, erkennbar während eines GTT, zu einer geringeren Insulinsekretion, vermutlich aufgrund von erschöpften Insulinspeichern, aber zu einer verbesserten Insulinwirkung, erkennbar anhand der Senkung der Spiegel von Glucose, FFS und  $\beta$ HB im Blut.
7. Eine Tolbutamidinduzierte Hyperinsulinämie führt zu einer Senkung des Blutzucker-, Glucagon-, FFS- und  $\beta$ HB-Spiegels im Blut. Auch hierbei zeigt sich erneut die im Hungerzustand schlechtere Insulinwirkung erkennbar anhand des Anstieges der Halbwertszeit bei der Glucoseelimination im Blut.
8. Eine Tolbutamid-Eigenwirkung im Sinne einer Hemmung der Glucagonverfügbarkeit und der Ketogenese kann nicht ausgeschlossen werden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Untersuchung an noch legeinaktiven Hennen (n=116; Lohmann Classic Brown) sollte mittels wiederholten Blutentnahmen vor, während und nach diversen tierexperimentellen Eingriffen in den Energiestoffwechsel der Hennen (jeweils n $\geq$ 10) einen differenzierten Einblick in den Glucose- (und Energie-) Stoffwechsel und dessen hormonale Regulation ermöglichen.

So wurden zu diesem Zweck unterschiedlich ausgeprägte katabole Stoffwechselsituationen induziert: nüchtern (16 h) mehrtägig hungernd (96 h), mehrtägig hungernd (96 h) und mittels mehrmaligen Phlorizininjektionen (0,4 g/kg LM s.c.) glucosuretisch.

In einem Tagesprofil (8:00-20:00) wurde der Konzentrationsverlauf von Glucose, von Metaboliten des Fettstoffwechsels (FFS,  $\beta$ HB) und des Proteinstoffwechsels (Harnsäure) sowie von Insulin und Glucagon erstellt.

Ein während dieser katabolen Zustände jeweils durchgeführter i.v.-Glucosetoleranztest (0,5 g/kg LM) sollte Einblick in die jeweils vorherrschende Glucoseelimination aus dem Blut und in die dabei induzierten hyperglykämischen Auswirkungen auf die Ausschüttung von Insulin und Glucagon ermöglichen.

Bei nüchternen Hennen sollte mittels i.v. Glucose-Mehrfachinjektionen (0,5 g/kg LM iv) und der dadurch für zwei Stunden anhaltend erhöhten Glucoseverfügbarkeit im Blut deren Auswirkungen auf die Konzentration der bereits genannten Metabolite und Hormone im Blut dargestellt werden.

Um die Wirkung einer experimentell erhöhten Insulinverfügbarkeit im Energiestoffwechsel, und zwar unbeeinflusst von einer exogenen Glucosezufuhr, bei nüchternen und hungernden Tieren darstellen zu können, wurde Tolbutamid (20mg/kg LM) i.v. injiziert und dessen Auswirkungen auf den Konzentrationsverlauf der bereits genannten Metabolite und Hormone im Blut sowie auf die Glucoseelimination aus dem Blut im Toleranztest untersucht.

Als Vergleichssituation für alle Ergebnisse bei den oben genannten tierexperimentellen Maßnahmen diente der Nüchtern-Zustand (16 h) der Hennen.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

4-tägiges Hungern führt im Tagesprofil zu einem tendenziellen Anstieg der Blutglucose (12,09 mmol/l bei nüchternen Tieren vs 12,95 mmol/l bei hungernden Tieren) sowie zu einer Erhöhung der Konzentrationen von Insulin (0,56  $\mu$ g/l vs 1,32  $\mu$ g/l) und Harnsäure (214,9  $\mu$ mol/l vs 321,7  $\mu$ mol/l). Der Spiegel von  $\beta$ HB (1,97 mmol/l vs 2,4 mmol/l) ist nur

geringfügig höher und der Spiegel der FFS (0,775 mmol/l vs 0,605 mmol/l) ist geringfügig niedriger im Vergleich zu nüchternen Tieren, während der Glucagonspiegel (531,8 ng/l vs 510,7 ng/l) unverändert ist.

Eine durch Glucosurie verschärfte viertägige Hungersituation führt zu niedrigeren Glucose- (12,23 mmol/l) und Insulinspiegeln (0,41 µg/l), einem erhöhten FFS- (0,633 mmol/l) und Harnsäurespiegel (391,6 µmol/l) und einem stark erhöhten  $\beta$ HB-Spiegel (6,55 mmol/l). Glucagon ist unverändert (497,3 ng/l).

Offensichtlich nutzen massiv hungernde Tiere nach 4 Tagen Hungern überwiegend Fettreserven (FFS-Oxidation) als Energiequelle, wodurch der metabolische Glucoseverbrauch erheblich reduziert werden kann. Dies zusammen mit einer deutlichen Steigerung der Gluconeogenese aus Aminosäuren dürfte dazu beitragen, dass die Glucosehomeostase auf Nüchtern-Niveau gehalten werden kann. Von hormoneller Seite wird dies offensichtlich durch einen konstanten Glucagonspiegel bei gleichzeitiger Insulinresistenz gefördert. Unterstützt wird diese Vorstellung eines durch die FFS-Oxidation (hohe Ketogeneserate) getragenen Energiestoffwechsels und einer durch die Gluconeogenese ganz maßgeblich getragenen Glucosehomeostase durch die Ergebnisse der glucosuretisch verschärften Hungersituation.

Im Glucosetoleranztest bei nüchternen Hennen zeigt sich ein schneller Anstieg der Glucose- (12,14 mmol/l auf 26,21 mmol/l) und der Insulin- (0,93 µg/l auf 4,1 µg/l) Konzentration im Blut sowie ein vorübergehender Abfall von Glucagon (547,6 ng/l auf 168,9 ng/l), FFS (0,609 mmol/l auf 0,318 mmol/l) und  $\beta$ HB (0,91 mmol/l auf 0,48 mmol/l). Der Harnsäurespiegel ist unverändert. 4-tägiges Hungern ebenso wie glucosuretisches Hungern verursacht eine signifikant verzögerte Glucoseelimination ( $T_{1/2}$  von 8,64 min auf 12,47 min bzw. 12,3 min). Die Lipolyse-hemmende Wirkung der induzierten Hyperinsulinämie, erkennbar am Abfall des FFS-Spiegel, ist bei den hungernden sowie den hungernden und glucosuretischen Tieren vermindert (52 % bzw. 59 %). Wegen der vorübergehenden i.v. erhöhten Glucoseverfügbarkeit sinkt der Spiegel von  $\beta$ HB bei hungernden Tieren auf das Nüchternniveau ab (25 %). Bei glucosuretischen Tieren ist die iv-induzierte Glucoseverfügbarkeit zusätzlich belastet, so dass der stark erhöhte  $\beta$ HB-Spiegel nur mäßig (58 %) gesenkt wird. Der Harnsäurespiegel lässt sich bei keinem der induzierten Stoffwechselzustände durch die Glucoseinjektion beeinflussen.

Eine durch Glucose-Mehrfachinjektionen erhöhte i.v. Glucoseverfügbarkeit bei nüchternen Tieren verursacht im nachfolgenden Glucosetoleranztest ein erniedrigtes Insulinmaximum (3,11 µg/l), aber eine nur geringgradig verzögerte Glucoseelimination aus dem Blutplasma

( $T_{1/2}$  8,83 min vs 8,64 min). Im Vergleich zu ausschließlich nüchternen Hennen führen wiederholte Glucosegaben zu einer Absenkung der Spiegel von  $\beta$ HB und FFS. Auch der Glucagonspiegel erfährt eine deutliche Absenkung.

Tolbutamid induziert ebenso wie beim Mensch auch beim Huhn eine vorübergehende Hyperinsulinämie. Auch wenn im Vergleich zum Glucosestimulus das Insulinmaximum schwächer ausgeprägt ist, wird im Hungerzustand doch ebenfalls eine Reduktion in der Insulinantwort sichtbar im Vergleich zu nüchternen Tieren. Die gleichzeitige Senkung des Blutzuckerspiegels ist nur mäßig (50 % des Ausgangswertes bei nüchternen Tieren, 58 % bei hungernden Tieren). Trotz der geringeren Insulinausschüttung nach Tolbutamidapplikation wird der Glucagonspiegel ähnlich wie im Glucosetoleranztest abgesenkt. Eine zusätzliche hemmende Wirkung auf die Glucagonsekretion durch Tolbutamid scheint möglich.

Der Spiegel der FFS im Blutplasma nach Tolbutamidgabe wird analog zu den Ergebnissen nach Glucoseinjektion durch den jeweiligen Insulinkonzentrationsanstieg gesenkt, wobei wiederum dieser Effekt bei den hungernden Tieren geringer ausfällt. Dies zusammen mit der nur mäßigen Insulinwirkung auf den Glucosespiegel kann als weiterer Beleg für das Vorhandensein einer Insulinresistenz im Hungerzustand gewertet werden. Der Befund, dass der  $\beta$ HB-Spiegel trotz weitgehend unveränderter Glucoseverfügbarkeit nach 30 min sinkt und erniedrigt bleibt, lässt eine Hemmung der Ketogenese durch Tolbutamid möglich erscheinen.

Alle Ergebnisse werden unter Einbindung des bisher publizierten Kenntnisstandes zum Energiestoffwechsel und dessen hormonaler Regulation beim Huhn diskutiert. Dabei deuten viele Fakten, auch aus der vorliegenden Untersuchung, darauf hin, dass der Stoffwechsel des Huhnes „Glucagon-getragen“ ist. So überschreiten im Blut die Spiegel von Glucagon die von Insulin oftmals deutlich, was vermuten lässt, dass Vögel normalerweise in einer katabolen, Glucose sparenden Stoffwechselsituation leben, vergleichbar mit der bei diabetischen, hungernden oder körperlich aktiven Säugetieren.

Wahrscheinlich resultiert aus dieser speziellen Stoffwechselsituation heraus der besonders hohe Normal-Blutzuckerspiegel der Vögel und gleichzeitig die Fähigkeit, auch unter diversen Belastungen des Energiehaushaltes (z.B. nüchtern, hungernd, glucosuretisch) den Glucosespiegel unverändert hoch zu halten.



## VII. SUMMARY

### **About the effects of experimentally induced catabolic, hyperglycemic and hyperinsulinemic metabolic states on the concentration of metabolites of the energy and protein metabolism and, additionally, of insulin and glucagon in blood plasma of the chicken**

In the present study the changes in glucose and energy metabolism and its hormonal regulation under different experimentally induced metabolic states were examined in not yet laying hens (n=116; Lohmann Classic Brown) by use of repeated blood samples.

Various catabolic metabolic states were induced: fasting (16 h), starving (96 h), and starving with glucosuria caused by several phlorizin injections (0.4 g/kg BW s.c.).

The changes in concentration of glucose, of metabolites of fat metabolism (NEFA,  $\beta$ HBA), of protein metabolism (uric acid) and of insulin and glucagon were measured over the day (8:00-20:00).

A glucose tolerance test (0.5 g/kg BW i.v.) was performed under the mentioned catabolic states. By this test the actual glucose elimination from the blood and the induced hyperglycemic effects on the secretion of insulin and glucagon were examined.

In an additional part of the study, fasting hens received several intravenous glucose injections over a period of two hours (0.5g/kg BW) thus producing a permanently increased glucose level in the blood. The effects of this experimentally induced glucose availability on the concentration of the mentioned metabolites and hormones were then investigated.

To illustrate the effect of an experimentally increased insulin availability on energy metabolism independent of an exogenous glucose dose, tolbutamide (20 mg/kg BW) was injected intravenously in fasting and starving hens. The effects of the drug on the concentration curves of the mentioned metabolites and hormones in the blood as well as the glucose elimination during a glucose tolerance test were examined.

The fasting condition (16 h) of the hens served as reference for all experimentally induced states.

The following results were achieved:

Four days of starving led to a tendential increase in blood glucose over the day (12.09 mmol/l with fasting hens vs 12.95 mmol/l with starving hens) and to an increase of the concentration of insulin (0.56  $\mu$ g/l vs 1.32  $\mu$ g/l) and uric acid (214.9  $\mu$ mol/l vs 321.7

$\mu\text{mol/l}$ ). The level of  $\beta\text{HBA}$  was slightly increased (1.97 mmol/l vs 2.4 mmol/l) and the level of NEFA was slightly diminished (0.775 mmol/l vs 0.605 mmol/l) in comparison to fasting hens, whereas the level of glucagon was unchanged (531.8 ng/l vs 510.7 ng/l).

Starving with glucosuria led to diminished levels of glucose (12.23 mmol/l) and insulin (0.41  $\mu\text{g/l}$ ), an increased level of NEFA (0.633 mmol/l) and uric acid (391.6  $\mu\text{mol/l}$ ) and a massively increased level of  $\beta\text{HBA}$  (6.55 mmol/l). The level of glucagon was unchanged (497.3 ng/l).

Obviously, starving hens predominantly use fat reserves (NEFA-oxidation) as energy source after four days of fasting, thus reducing the metabolic glucose expenditure. This, in combination with a distinct augmentation of gluconeogenesis from amino acids, allowed a glucose homeostasis on fasting level. It seemed that this was supported by a constant glucagon level and, simultaneously, an insulin resistance. The results of the examination of the starving hens with glucosuria confirmed the idea of an energy metabolism maintained by NEFA-oxidation (high ketogenesis rate) and a glucose homeostasis maintained heavily by gluconeogenesis.

During the glucose tolerance test in fasting hens there was a fast increase of the glucose (12.14 mmol/l to 26.21 mmol/l) and insulin (0.93  $\mu\text{g/l}$  to 4.1  $\mu\text{g/l}$ ) concentrations in the blood combined with a transient decrease of glucagon (547.6 ng/l to 168.9 ng/l), NEFA (0.609 mmol/l to 0.318 mmol/l) and  $\beta\text{HBA}$  (0.91 mmol/l to 0.48 mmol/l). The level of uric acid was unchanged. Starving and starving with glucosuria caused a significantly delayed glucose elimination ( $T_{1/2}$ : 8.64 min to 12.47 min / 12.3 min). The lipolysis inhibiting effect of the induced hyperinsulinemia, visible in the decrease of the NEFA-level, was diminished in starving hens and starving hens with glucosuria. With starving hens, the level of  $\beta\text{HBA}$  fell to the level of fasting hens because of the transiently increased blood glucose. The induced glucose availability was reduced in starving hens with glucosuria, so the level of  $\beta\text{HBA}$  was only slightly decreased. The level of uric acid was not influenced by the glucose injection in any of the induced metabolic states.

An intravenous glucose availability increased by previous multiple glucose injections led to a reduced insulin maximum (3.11  $\mu\text{g/l}$ ) during a glucose tolerance test in fasting hens, but only to slightly delayed glucose elimination ( $T_{1/2}$  8,83 min vs 8,64 min). In comparison with only fasting hens repeated glucose doses led to a decrease of the levels of  $\beta\text{HBA}$ , NEFA and the level of glucagon.

Tolbutamide induced a transient hyperinsulinemia. Although the insulin maximum was less distinct than after a glucose dose, a diminution in the insulin secretion in the starving

state was visible. However, the simultaneous decrease of the glucose level was only small. Despite the lower insulin secretion after a tolbutamide injection the glucagon level was as distinctly decreased as after a glucose injection. An additionally inhibiting effect of tolbutamide itself on the glucagon secretion seemed possible.

After a tolbutamide injection, the decrease of the NEFA level caused by an increase of insulin concentration was as distinct as after a glucose injection. Again, the effect was less distinct in starving hens. Even more, the effect of insulin on the glucose level was only moderate thus postulating again the existence of an insulin resistance in the starving state.

The fact that the level of  $\beta$ HBA was still falling after 30 minutes despite a broadly similar glucose availability and stayed further decreased, let an inhibition of ketogenesis by tolbutamide seem possible.

The results of this study were discussed on the basis of the present state of knowledge of the energy metabolism and its hormonal regulation in the hen. Many facts described in publications and likewise found in the present study, indicate that the metabolism of the hen is dominated by glucagon. The level of glucagon in blood is often much higher than the level of insulin. Therefore it can be assumed that birds usually live in a catabolic, glucose saving metabolic state, comparable to diabetic, starving or physically active mammals.

This special metabolic situation probably causes the particular high normal blood glucose level of birds and enables them to keep the glucose level constantly high even under different metabolic conditions (fasting, starving, glucosuria).

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abe, T., A. Mujahid, K. Sato, Y. Akiba and M. Toyomizu (2006). Possible role of avian uncoupling protein in down-regulating mitochondrial superoxide production in skeletal muscle of fasted chickens. *FEBS Letters* **580**: 4815-4822.

Abumrad, N., C. Coburn and A. Ibrahimi (1999). Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1441**(1): 4-13.

Adamo, M., J. Simon, R. W. Rosebrough, J. P. McMurtry, N. C. Steele and D. LeRoith (1987). Characterization of the chicken muscle insulin receptor. *General and Comparative Endocrinology* **68**(3): 456-465.

Ait-Boulahsen, A., J. D. Garlich and F. W. Edens (1989). Effect of fasting and acute heat stress on body temperature, blood acid-base and electrolyte status in chickens. *Comparativ Biochemistry and Physiology-Part A* **94 A**: 683-687.

Akiba, Y., Y. Chida, T. Takahashi, Y. Ohtomo, K. Sato and K. Takahashi (1999). Persistent hypoglycemia induced by continuous insulin infusion in broiler chickens. *British Poultry Science* **40**(5): 701-705.

Ausschuss für Tierschutzbeauftragte (2009). Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. Berlin, Gesellschaft für Versuchstierkunde,.

Ayame, H., A. Matsutani, H. Inoue, T. Kaneko and K. Kaku (1995). Tolbutamide inhibits glucagon-induced phosphorylation of 6PF-2-K/Fru-2,6-P2ase in rat hepatocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **268**(3): E391-E396.

Barratt, E., P. J. Buttery and K. N. Boorman (1974). Urate synthesis in the perfused chick liver. *Biochemical Journal* **144**: 189-198.

Becker, B. F. (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biology and Medicine* **14**(6): 615-631.

Bell, D. J., W. M. McIndoe and D. Gross (1959). Tissue components of the domestic fowl. 3. The non-protein nitrogen of plasma and erythrocytes. *Biochemical Journal*. **February**; **71**(2): 355-364.

Belldrin, D. J., W. M. McIndoe and D. Gross (1959). Tissue components of the domestic fowl 3. The non-protein nitrogen of plasma and erythrocytes. *Biochemical Journal* **February**; **71**(2): 355-364.

Belo, P. S., D. R. Romsos and G. A. Leville (1976). Blood metabolites and glucose metabolism in the fed and fasted chicken. *Journal of Nutrition* **106**(8): 1135-1143.

Benson, J. D. and A. Bensadoun (1977). Response of adipose tissue lipoprotein lipase to fasting in the chicken and the rat-A species difference. *Journal of Nutrition* **107**: 990-997

- Berman, A. and A. Meltzer (1978). Metabolic rate: its circadian rhythmicity in the female domestic fowl. *Journal of Physiology* **282**: 419-427.
- Bernard, S. F., J. Orvoine and R. Groscolas (2003). Glucose regulates lipid metabolism in fasting king penguins. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **285**(2): R313-R320.
- Berry, W. (2003). The physiology of induced molting. *Poultry Science* **82**(6): 971-980.
- Beuchat, C. A. and C. R. Chong (1998). Hyperglycemia in hummingbirds and its consequences for hemoglobin glycation. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A* **120**(3): 409-416.
- Bisbis, S., M. Derouet and J. Simon (1994). Characterization of insulin receptors in chicken kidneys: effect of nutritional status. *General and Comparative Endocrinology* **96**(1): 37-49.
- Bisbis, S., M. Taouis, M. Derouet, B. Chevalier and J. Simon (1994). Corticosterone-induced insulin resistance is not associated with alterations of insulin receptor number and kinase activity in chicken kidney. *General and Comparative Endocrinology* **96**(3): 370-377.
- Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* **46**(1): 3-10.
- Bordel, R. and E. Haase (1993). Effects of flight on blood parameters in homing pigeons. *Journal of Comparative Physiology B* **163**(3): 219-224.
- Brady, L. J., D. R. Romsos, P. S. Brady, W. G. Bergen and G. A. Leveille (1978). The effects of fasting on body composition, glucose turnover, enzymes and metabolites in the chicken. *Journal of Nutrition* **108**(4): 648-657.
- Braun, W., V. P. Whittaker and W. D. Lotspeich (1957). Renal excretion of phlorizin and phlorizin glucuronide. *American Journal of Physiology - Legacy Content* **190**(3): 563-569.
- Brunicardi, F. C., D. Shavelle and D. Andersen (1995). Neural regulation of the endocrine pancreas. *International Journal of Pancreatology* **18**(3): 177-195.
- Buchanan, K., R. Williams and J. Vance (1969). Pancreatic glucagon release and sulphonylureas. *The Lancet* **293**(7591): 420-421.
- Buchanan, K. D., J. E. Vance and R. H. Williams (1969). Effect of starvation on insulin and glucagon release from isolated islets of Langerhans of the rat. *Metabolism* **18**(2): 155-162.
- Buyse, J., E. Decuypere and E. R. Kühn (1995). Effect of progressive fasting on physiological criteria of adult Warren SSL hens. *Hormone and Metabolic Research* **27**(11): 482,484.
- Buyse, J., K. Janssens, S. Van der Geyten, P. Van As, E. Decuypere and V. M. Darras (2002). Pre- and postprandial changes in plasma hormone and metabolite levels and

hepatic deiodinase activities in meal-fed broiler chickens. *British Journal of Nutrition* **88**(6): 641-653.

Caamano, G. J., M. A. Sanchez-del-Castillo, A. Linares and E. Garcia-peregrin (1990). In vivo lipid and amino-acid synthesis from 3-hydroxybutyrate in 15-day-old chickens. *Archives Internationales de Physiologie de Biochimie et de Biophysique* **98**(5): 217-224.

Chandrabose, K. A., A. Bensadoun and C. K. Clifford (1971). Diurnal rhythms of liver enzymes in the chicken, *Gallus domesticus*. *International Journal of Biochemistry* **2**(11): 581-584.

Chen, K. K., R. C. Anderson and N. Maze (1945). Susceptibility of birds to insulin as compared with mammals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **84**(1): 74-77.

Chida, Y., H. Ohtsu, K. Takahashi, K. Sato, M. Toyomizu and Y. Akiba (2000). Carbohydrate metabolism in temporal and persistent hypoglycemic chickens induced by insulin infusion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **126**(2): 187-193.

Christensen, K., J. P. McMurtry, Y. V. Thaxton, J. P. Thaxton, A. Corzo, C. McDaniel and C. G. Scanes (2013). Metabolic and hormonal responses of growing modern meat type chickens to fasting. *British Poultry Science* **54**(2): 199-205.

Cieslak, S. and R. Hazelwood (1983). Does somatostatin (SRIF) stimulate glucagon release in aves. *Endocrinology* **112**: 398.

Cogburn, L. A., S. S. Liou, A. L. Rand and J. P. McMurtry (1989). Growth, metabolic and endocrine responses of broiler cockerels given a daily subcutaneous injection of natural or biosynthetic chicken growth hormone. *Journal of Nutrition* **119**(8): 1213-1223.

Colca, J. R. and R. L. Hazelwood (1976). Pancreatectomy in the chicken: Does an extra-pancreatic source of insulin exist? *General and Comparative Endocrinology* **28**(2): 151-162.

Cook, G. A. (1987). The hypoglycemic sulfonylureas glyburide and tolbutamide inhibit fatty acid oxidation by inhibiting carnitine palmitoyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **262**(11): 4968-4972.

Cramb, G., D. R. Langslow and J. H. Phillips (1982 a). The binding of pancreatic hormones to isolated chicken hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology* **46**(3): 297-309.

Cramb, G., D. R. Langslow and J. H. Phillips (1982 b). Hormonal effects on cyclic nucleotides and carbohydrate and lipid metabolism in isolated chicken hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology* **46**(3): 310-321.

Danby, R., L. Bluff, T. P. Deheny and W. R. Gibson (1982a). Effects of alloxan and streptozotocin at high doses on blood glucose levels, glucose tolerance, and responsiveness to sulphonylureas in chickens. *General and Comparative Endocrinology* **47**(2): 159-169.

- Datar, S. P., D. S. Suryavanshi and R. R. Bhonde (2006). Chick pancreatic B islets as an alternative in vitro model for screening insulin secretagogues. *Poultry Science* **85**(12): 2260-2264.
- Davison, T. F. (1975). The effects of multiple sampling by cardiac puncture and diurnal rhythm on plasma glucose and hepatic glycogen of the immature chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology* **50A**: 569-573.
- de Beer, M., J. P. McMurtry, D. M. Brocht and C. N. Coon (2008). An examination of the role of feeding regimens in regulating metabolism during the broiler breeder grower period. 2. Plasma hormones and metabolites. *Poultry Science* **87**(2): 264-275.
- Decuypere, E. and E. R. Kühn (1984). Effect of fasting and feeding time on circadian rhythms of serum thyroid hormone concentrations, glucose, liver monodeiodinase activity and rectal temperature in growing chickens. *Domestic Animal Endocrinology* **1**(3): 251-262.
- Dirksen, G. (2006). Krankheiten von Leber und Gallenblase. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. G. Dirksen, H.-G. Gründer and M. Stöber. Stuttgart, Verlag Paul Parey: 651-662.
- Dupont, J., C. Dagou, M. Derouet, J. Simon and M. Taouis (2004). Early steps of insulin receptor signaling in chicken and rat: apparent refractoriness in chicken muscle. *Domestic Animal Endocrinology* **26**(2): 127-142.
- Dupont, J., M. Derouet, J. Simon and M. Taouis (1998). Nutritional state regulates insulin receptor and IRS-1 phosphorylation and expression in chicken. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **274**(2): E309-E316.
- Dupont, J., S. Métayer-Coustard, B. Ji, C. Ramé, C. Gespach, B. Voy and J. Simon (2012). Characterization of major elements of insulin signaling cascade in chicken adipose tissue: Apparent insulin refractoriness. *General and Comparative Endocrinology* **176**(1): 86-93.
- Dupont, J., S. Tesseraud, M. Derouet, A. Collin, N. Rideau, S. Crochet, E. Godet, E. Cailleau-Audouin, S. Metayer-Coustard, M. J. Duclos, C. Gespach, T. E. Porter, L. A. Cogburn and J. Simon (2008). Insulin immuno-neutralization in chicken: effects on insulin signaling and gene expression in liver and muscle. *Journal of Endocrinology* **197**(3): 531-542.
- Edwards, M. R., J. P. McMurtry and R. Vasilatos-Younken (1999). Relative insensitivity of avian skeletal muscle glycogen to nutritive status. *Domestic Animal Endocrinology* **16**(4): 239-247.
- Ehrenkranz, J. R., N. G. Lewis, C. R. Kahn and J. Roth (2005). Phlorizin: a review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **21**(1): 31-38.
- Emmanuel, B., R. Berzins and A. R. Robblee (1982). Rates of entry and oxidation of d(-)-3-hydroxybutyrate and glucose in fed and fasted chickens. *Poultry Science* **61**(12): 2435-2439.

- Ferguson, R. K. and R. A. Wolbach (1967). Effects of glucose, phlorizin and parathyroid extract on renal phosphat transport in chickens. *American Journal of Physiology* **212**(5): 1123-1130.
- Ferrer, R., M. Gil, M. Moretó, M. Oliveras and J. M. Planas (1994). Hexose transport across the apical and basolateral membrane of enterocytes from different regions of the chicken intestine. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **426**: 83-88.
- Fister, P., E. Eigenbrodt and W. Schoner (1983). Glucagon induced inactivation of phosphofructokinase and its counteraction by insulin in isolated hepatocytes from the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **75**(2): 341-345.
- Franklin, I., J. Gromada, A. Gjnovci, S. Theander and C. B. Wollheim (2005).  $\beta$ -Cell secretory products activate  $\alpha$ -cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes* **54**(6): 1808-1815.
- Freeman, B. M. and A. C. C. Manning (1974). The prandial state and the glycaemic and lipolytic responses of *Gallus domesticus* to catecholamines and glucagon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **47**(4): 1145-1152.
- Freeman, B. M. and A. C. C. Manning (1976). Mediation of glucagon in the response of the domestic fowl to stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **53**(2): 169-171.
- Freeman, B. M. and A. C. C. Manning (1978). Ontogeny of a circadian rhythm in the glycaemic response of *Gallus domesticus* to glucagon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **61**(1): 27-30.
- Freeman, B. M., A. C. C. Manning and I. H. Flack (1983). Adrenal cortical activity in the domestic fowl, *Gallus domesticus*, following withdrawal of water or food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **74**(3): 639-641.
- Freemann, B. M. and A. C. C. Manning (1976). Cicadian rhythms in the glycaemic and lipolytic response of *Gallus domesticus* to handling and repeated blood sampling. *Comparative Biochemistry and Physiology* **57 A**: 5.
- Fuhrmann, H. and H.-P. Sallmann (2010). Physiologische Aspekte der Leberfunktion. *Physiologie der Haustiere*. W. v. Engelhardt. Stuttgart, Enke Verlag: 462.
- Geraert, P. A., J. C. Padilha and S. Guillaumin (1996). Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: biological and endocrinological variables. *British Journal of Nutrition* **75**(2): 205-216.
- Gibbs, M. E., D. S. Hutchinson and R. J. Summers (2008). Role of beta-adrenoceptors in memory consolidation: beta(3)-adrenoceptors act on glucose uptake and beta(2)-adrenoceptors on glycogenolysis. *Neuropsychopharmacology* **33**(10): 2384-2397.
- Gibson, W. R., A. R. Bourne and C. Sernia (1980). D-xylose transport in isolated skeletal-muscle of chickens - effects of insulin and tolbutamide. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **67**(1): 41-47.



- Gomez-Capilla, J. A. and D. R. Langslow (1977). Insulin action on glucose utilisation by chicken adipocytes. *International Journal of Biochemistry* **8**(6): 417-420.
- Gomez-Capilla, J. A., J. Sancho, J. M. Fernandez-Fernandez and C. Osorio (1980). Effect of insulin in vivo on the synthesis of free fatty acids (FFA) in chicken heart and skeletal muscle. *Experientia* **36**: 611-612.
- Grande, F. (1971). Effect of tolbutamide on plasma free fatty acids and blood sugar in birds. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. (New York, N.Y.) **137**(2): 548-552.
- Grodsky, G. M., G. H. Epstein, R. Fanska and J. H. Karam (1977). Pancreatic action of the sulfonylureas. *Federation proceedings* **36**(13): 2714-2719.
- Hamano, Y. (2007). Continuous infusion of lipoic acid rapidly reduces plasma  $\beta$ -hydroxybutyrate with elevation of non-esterified fatty acids in broiler chickens. *British Journal of Nutrition* **97**: 495-501.
- Harvey, S. and H. Klandorf (1983). Reduced adrenocortical function and increased thyroid function in fasted and refed chickens. *Journal of Endocrinology* **98**(1): 129-135.
- Hatao, K., K. Kaku, M. Matsuda, M. Tsuchiya and T. Kaneko (1985). Sulfonylurea stimulates liver fructose-2,6-bisphosphate formation in proportion to its hypoglycemic action. *Diabetes Research and Clinical Practice* **1**(1): 49-53.
- Hazelwood, R. L. (1958). The peripheral action of tolbutamide in domestic fowl. *Endocrinology* **63**(5): 611-618.
- Hazelwood, R. L. (1973). The avian endocrine pancreas. *American Zoologist* **13**(3): 699-709.
- Hazelwood, R. L. (1984). Pancreatic hormones, insulin/glucagon molar ratios, and somatostatin as determinants of avian carbohydrate metabolism. *Journal of Experimental Zoology* **232**(3): 647-652.
- Hazelwood, R. L. (1986). *Carbohydrate Metabolism. Avian Physiology*. P. D. Sturkie, Springer New York: 303-325.
- Hazelwood, R. L. and D. R. Langslow (1978). Intrapancreatic regulation of hormone secretion in the domestic fowl, *gallus domesticus*. *Journal of Endocrinology* **76**(3): 449-459.
- Hazelwood, R. L. and F. W. Lorenz (1957). Responses of the domestic fowl to hyper- and hypoglycemic agents. *Endocrinology* **61**: 520-527.
- Hazelwood, R. L. and F. W. Lorenz (1959). Effects of fasting and insulin on carbohydrate metabolism of the domestic fowl. *American Journal of Physiology - Legacy Content* **197**(1): 47-51.

- Heald, P. J., P. M. McLachlan and K. A. Rookledge (1965). The effects of insulin, glucagon and adrenocorticotrophic hormone on the plasma glucose and free fatty acids of the domestic fowl. *Journal of Endocrinology* **33**(1): 83-95.
- Hellsten, Y., P. C. Tullson, E. A. Richter and J. Bangsbo (1997). Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. *Free Radical Biology and Medicine* **22**(1-2): 169-174.
- Holmes, D. J. and S. N. Austad (1995). Birds as animal-models for the comparative biology of aging - a prospectus. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences* **50**(2): B59-B66.
- Holmes, D. J., R. Fluckiger and S. N. Austad (2001). Comparative biology of aging in birds: an update. *Exp Gerontol* **36**(4-6): 869-883.
- Honey, R. N., M. B. Fallon and G. C. Weir (1980). Effects of exogenous insulin, glucagon, and somatostatin on islet hormone secretion in the perfused chicken pancreas. *Metabolism* **29**(12): 1242-1246.
- Huang, J., J. Eng and R. S. Yalow (1987). Chicken Glucagon: Sequence and Potency in Receptor Assay. *Hormone and Metabolic Research* **19**(11): 542-544.
- Ji, B., J. Dupont, J. Simon, S. Lamont, A. Saxton and B. Voy (2012). Dynamic regulation of adipose tissue metabolism in the domestic broiler chicken – an alternative model for studies of human obesity. *BMC Proceedings* **6**(3): 1-2.
- Ji, B., B. Ernest, J. Gooding, S. Das, A. Saxton, J. Simon, J. Dupont, S. Metayer-Coustard, S. Campagna and B. Voy (2012). Transcriptomic and metabolomic profiling of chicken adipose tissue in response to insulin neutralization and fasting. *BMC Genomics* **13**(1): 441.
- Kaku, K., Y. Inoue and T. Kaneko (1995). Extrapankreatic effects of sulfonylurea drugs. *Diabetes Research and Clinical Practice* **28**(0): 105-108.
- Katunuma, N., Y. Matsuda and Y. Kuroda (1970). Phylogenic aspects of different regulatory mechanisms of glutamine metabolism. *Advances in Enzyme Regulation* **8**: 73-81.
- Keller, U., P. Gerber and W. Stauffacher (1988). Fatty acid-independent inhibition of hepatic ketone body production by insulin in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* **254**(6): E694-E699.
- Kern, M., J. A. Wells, J. M. Stephens, C. W. Elton, J. E. Friedman, E. B. Tapscott, P. H. Pekala and G. L. Dohm (1990). Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (Glut4) protein level. *Biochemical Journal* **270**: 397-400.
- King, D. L. and R. L. Hazelwood (1976). Regulation of avian insulin secretion by isolated perfused chicken pancreas. *American Journal of Physiology - Legacy Content* **231**(6): 1830-1839.

- Klandorf, H. (1988). Glucose tolerance and pancreatic hormones in thyroidectomized and thyroid hormone-injected cockerels. *General and Comparative Endocrinology* **69**(2): 226-232.
- Klandorf, H., D. S. Rathore, M. Iqbal, X. Shi and K. Van Dyke (2001). Accelerated tissue aging and increased oxidative stress in broiler chickens fed allopurinol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **129**(2): 93-104.
- Klasing, K. C. (1998). *Comparative avian nutrition*, Cab International.
- Klasing, K. C. (1999). Avian gastrointestinal anatomy and physiology. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **8**(2): 42-50.
- Ko, G. T., J. C. Chan, V. T. Yeung, C. C. Chow, L. W. Tsang, J. K. Li, W. Y. So, H. P. Wai and C. S. Cockram (1998). Combined use of a fasting plasma glucose concentration and HbA1c or fructosamine predicts the likelihood of having diabetes in high-risk subjects. *Diabetes Care* **21**(8): 1221-1225.
- Königshoff, M. and T. Brandenburger (2012). *Kurzlehrbuch Biochemie*. Stuttgart, Thieme.
- Kono, T., M. Nishida, Y. Nishiki, Y. Seki, K. Sato and Y. Akiba (2005). Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *British Poultry Science* **46**(4): 510-515.
- Langslow, D. R., E. J. Butler, C. N. Hales and A. W. Pearson (1970). The response of plasma insulin, glucose and non-esterified fatty acids to various hormones, nutrients and drugs in the domestic fowl. *Journal of Endocrinology* **46**(2): 243-260.
- Langslow, D. R. and C. N. Hales (1969). Lipolysis in chicken adipose tissue in vitro. *Journal of Endocrinology* **43**(2): 285-294.
- Langslow, D. R. and K. Siddle (1979). The action of pancreatic hormones on the cyclic AMP content of isolated chicken hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology* **39**(4): 521-526.
- Laube, H., R. Fussgänger, R. Goberna, K. Schröder, K. Straub, K. Sussman and E. Pfeiffer (1971). Effects of tolbutamide on insulin and glucagon secretion of the isolated perfused rat pancreas. *Hormone and Metabolic Research* **3**: 238-242.
- Laybutt, D. R., M. Glandt, G. Xu, Y. B. Ahn, N. Trivedi, S. Bonner-Weir and G. C. Weir (2003). Critical reduction in  $\beta$ -cell mass results in two distinct outcomes over time: Adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes. *Journal of Biological Chemistry* **278**(5): 2997-3005.
- Le Maho, Y., H. Vu Van Kha, H. Koubi, G. Dewasmes, J. Girard, P. Ferre and M. Cagnard (1981). Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long-term fasting geese. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **241**(5): E342-E354.

- Lepkovsky, S., M. K. Dimick, F. Furuta, N. Snapir, R. Park, N. Narita and K. Komatsu (1967). Response of blood glucose and plasma free fatty acids to fasting and to injection of insulin and testosterone in chickens. *Endocrinology* **81**(5): 1001-1006.
- LeRoith, D., S. I. Taylor and J. M. Olefsky (2004). *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: Seiten: 27-40,170-172.
- Liang, T. J. and G. Grieninger (1981). Direct effect of insulin on the synthesis of specific plasma proteins: biphasic response of hepatocytes cultured in serum- and hormone-free medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**(11): 6972-6976.
- Löffler, G. (2007). *Stoffwechsel von Glucose und Glykogen*. Biochemie und Pathobiochemie  
G. Löffler, P. E. Petrides and P. C. Heinrich. Heidelberg, Springer.
- Lohmann (2010). Herkunft / Legehennen / LOHMANN BROWN-CLASSIC. Retrieved 24.01.2013, from <http://www.ltz.de/produkte/Legehennen/LOHMANN-BROWN-CLASSIC/>.
- Lohmann Tierzucht GmbH (2008). Managementempfehlungen für Legehennen in Boden-, Volieren- und Freilandhaltung. Retrieved 21.07.2013, from [http://www.gzho.de/pdf/Managementprogramm\\_Alternative%20Haltung\\_Produktion.pdf](http://www.gzho.de/pdf/Managementprogramm_Alternative%20Haltung_Produktion.pdf).
- Marliss, E. B., T. T. Aoki, R. H. Unger, J. S. Soeldner and G. F. J. Cahill (1970). Glucagon levels and metabolic effects in fasting man. *Journal of Clinical Investigation* **49**(12): 2256–2270.
- Matsuda, Y., Y. Kuroda, K. Kobayashi and N. Katunuma (1973). Comparative studies on glutamine, serine and glycine metabolisms in reotelic and uricotelic animals. *Journal of Biochemistry* **73**: 291-298.
- McAuley, D. (2013). Common Laboratory (LAB) values. Retrieved 18.08.2013, from [http://www.globalrph.com/labs\\_g.htm#Glucagon](http://www.globalrph.com/labs_g.htm#Glucagon).
- McCumbee, W. D. and R. L. Hazelwood (1978). Sensitivity of chicken and rat adipocytes and hepatocytes to isologous and heterologous pancreatic hormones. *General and Comparative Endocrinology* **34**(4): 421-427.
- McMurtry, J. P., R. W. Rosebrough and N. C. Steele (1983). A homologous radioimmunoassay for chicken insulin. *Poultry Science* **62**(4): 697-701.
- McMurtry, J. P., W. Tsurk, L. Cogburn, R. Rosebrough and D. Brocht (1996). Metabolic responses of the turkey hen (*Meleagris gallopavo*) to an intravenous injection of chicken or porcine glucagon. *Comparative Biochemistry and Physiology* **114C**: 159-163.
- Meadows, J. and R. C. Smith (1986). Uric acid Protection of nucleobases from ozone-induced degradation. *Archives of biochemistry and biophysics* **246**: 838-845.
- Migliorini, R., C. Linder, J. Moura and J. Veiga (1973). Gluconeogenesis in a carnivorous bird (black vulture). *American Journal of Physiology-Legacy Content* **225**(6): 1389-1392.

- Mikami, S.-I. and K. Ono (1962). Glucagon deficiency induced by extirpation of alpha islets of the fowl pancreas. *Endocrinology* **71**(3): 464-473.
- Minick, M. C., G. E. Duke, S. W. Fishman and R. B. Harvey (1996). Effects of intragastric nutrients upon simultaneously determined plasma insulin, glucagon, insulin/glucagon ratios and glucose in red-tailed hawks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **113**(2): 173-179.
- Mohr, E. (2010). *Biologische Rhythmen. Physiologie der Haustiere*. W. v. Engelhardt. Stuttgart, Enke Verlag: 673-677.
- Mori, K.-i., K. Kaku, H. Inoue, M. Aoki, A. Matsutani and T. Kaneko (1992). Effects of tolbutamide on fructose-2,6-bisphosphate formation and ketogenesis in hepatocytes from diabetic rats. *Metabolism* **41**(7): 706-710.
- Möstl, E. (2010). *Spezielle Endokrinologie. Physiologie der Haustiere*. W. v. Engelhardt and G. Breves. Stuttgart, Enke Verlag: 522-524.
- Murray, H. C. and M. M. Rosenberg (1953). Studies on blood sugar and glycogen levels in chickens. *Poultry Science* **32**(5): 805-811.
- Nehlig, A. (1983). The effects of fasting on glucose and 3-hydroxybutyrate utilization by the adult chick brain. *Brain Research* **262**(1): 177-180.
- Neubert, E. and H. Gurtler (1996). Metabolic effects of insulin, glucagon and adrenergic agonists in laying hens. *Archiv für Geflügelkunde* **60**(1): 29-37.
- Newsholme, E. A. and C. Start, Eds. (1977). *Regulation des Stoffwechsels - Homöostase im menschlichen und tierischen Organismus*. New York Chemie Weinheim.
- Nichelmann, M., J. Hochel and B. Tzschentke (1999). Biological rhythms in birds-development, insights and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **124**(4): 429-437.
- Nieto, R., R. M. Palmer, I. Fernandez-Figares, L. Perez and C. Prieto (1994). Effect of dietary protein quality, feed restriction and short-term fasting on protein synthesis and turnover in tissues of the growing chicken. *British Journal of Nutrition* **72** 499-507.
- Niezgoda, J., S. Bobek and D. Wronska-Fortuna (2005). Enhanced non-esterified fatty acids and corticosterone in blood plasma of chickens treated with insulin are significantly depleted by reverse T3: minor changes in hypoglycaemia. *Journal of Veterinary Medicine* **52**: 429-435.
- Ogata, K., M. Watford, L. J. Brady and R. W. Hanson (1982). Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) and the regulation of gluconeogenesis and ketogenesis in avian liver. *Journal of Biological Chemistry* **257**(10): 5385-5391.

- Okumura, J.-I. and I. Tasaki (1969). Effect of fasting, refeeding and dietary protein level on uric acid and ammonia content of blood, liver and kidney in chickens. *The Journal of Nutrition* **97**(3): 316-320.
- Oulianova, N. and A. Berteloot (1996). Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein? 1. Glucose transport studies. *Journal of Membrane Biology* **153**(3): 181-194.
- Penicaud, L., J. Kande, J. Le Magnen and J. R. Girard (1985). Insulin action during fasting and refeeding in rat determined by euglycemic clamp. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **249**(5): E514-E518.
- Pitts, R. F. (1938). The excretion of phenol red by the chicken. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **11**(1): 99-115.
- Polakof, S., T. P. Mommsen and J. L. Soengas (2011). Glucosensing and glucose homeostasis: from fish to mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **160**(4): 123-149.
- Pollock, H. G. and J. R. Kimmel (1975). Chicken glucagon. Isolation and amino acid sequence studies. *Journal of Biological Chemistry* **250**(24): 9377-9380.
- Prinzinger, R. and A. Misovic (1994). Vogelblut - eine allometrische Übersicht der Bestandteile. *Journal für Ornithologie* **135**(2): 133-165.
- Proks, P., F. Reimann, N. Green, F. Gribble and F. Ashcroft (2002). Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* **51**: S368-S376.
- Rabito, C. A. and D. A. Ausiello (1980). Na<sup>+</sup>-dependent sugar transport in a cultured epithelial cell line from pig kidney. *Journal of Membrane Biology* **54**(1): 31-38.
- Rager, K., P. Schauder and W. Kemmler (1969). Activity of chicken insulin in the chicken. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* **151**(3): 261-270.
- Raheja, K. L. (1973). Comparison of diurnal variations in plasma glucose, cholesterol, triglyceride, insulin and in liver glycogen in younger and older chicks (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **44**(4): 1009-1014.
- Rideau, N., H. Karmann and J. Simon (1990). Effects of cysteamine administration on plasma concentration of metabolites, pancreatic glucagon and insulin in the chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **96**(2): 327-331.
- Riesenfeld, G., A. Geva and S. Hurwitz (1982). Glucose homeostasis in the chicken. *The Journal of nutrition* **112**(12): 2261.
- Riou, J. P., M. Beylot, M. Laville, L. De Parscau, J. Delinger, G. Sautot and R. Mornex (1986). Antiketogenic effect of glucose per se in vivo in man and in vitro in isolated rat liver cells. *Metabolism* **35**(7): 608-613.

- Robin, J.-P., Y. Cherel, H. Girard, A. Géloën and Y. Le Maho (1987). Uric acid and urea in relation to protein catabolism in long-term fasting geese. *Journal of Comparative Physiology B* **157**: 491-499.
- Röhm, K.-H. (2007). Stoffwechsel der Aminosäuren. *Biochemie und Pathobiochemie* G. Löffler, P. E. Petrides and P. C. Heinrich. Heidelberg, Springer: 439-442.
- Rosebrough, R. W. and J. P. McMurtry (1992). Insulin, glucagon and catecholamine interactions in avian liver explants. *Comparative Biochemistry and Physiology. B. Comparative Biochemistry* **103**(1): 281-287.
- Rossetti, L., D. Smith, G. I. Shulman, D. Papachristou and R. A. DeFronzo (1987). Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *Journal of Clinical Investigation* **79**(5): 1510–1515.
- Rothe, H.-J., W. Biesel and W. Nachtigall (1987). Pigeon flight in a wind tunnel II Gas exchange and power requirements. *Journal of comparative Physiology B* **157B**(1): 99-109.
- Ruffier, L., J. Simon and N. Rideau (1998). Isolation of functional glucagon islets of Langerhans from the chicken pancreas. *General and comparative endocrinology* **112**(2): 153-162.
- Saadoun, A., J. Simon and B. Leclercq (1987). Effect of exogenous corticosterone in genetically fat and lean chickens. *British Poultry Science* **28**(3): 519-528.
- Samols, E., J. M. Tyler and P. Mialhe (1969). Suppression of pancreatic glucagon release by the hypoglycaemic sulphonylureas. *The Lancet* **293**(7587): 174-176.
- Savory, C. J. (1980). Diurnal feeding patterns in domestic fowls: A review. *Applied Animal Ethology* **6**(1): 71-82.
- Savory, C. J. (1987). How closely do circulating blood glucose levels reflect feeding state in fowls? *Comparativ Biochemistry and Physiology Part A Physiology* **88**(1): 101-106.
- Scanes, C. G., G. F. Merrill, R. Ford, P. Mauser and C. Horowitz (1980). Effects of stress (hypoglycaemia, endotoxin, and ether) on the peripheral circulating concentration of corticosterone in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **66**(2): 183-186.
- Seki, Y., K. Sato and Y. Akiba (2005). Changes in muscle mRNAs for hexokinase, phosphofructokinase-1 and glycogen synthase in acute and persistent hypoglycemia induced by tolbutamide in chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **142**(2): 201-208.
- Seki, Y., K. Sato, T. Kono, H. Abe and Y. Akiba (2003). Broiler chickens (Ross strain) lack insulin-responsive glucose transporter GLUT4 and have GLUT8 cDNA. *General and comparative endocrinology* **133**(1): 80-87.
- Seki, Y., K. Sato, T. Kono and Y. Akiba (2006). Two types of phosphofructokinase-1 differentially regulate the glycolytic pathway in insulin-stimulated chicken skeletal muscle.

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **143**(3): 344-350.

Seki, Y., K. Sato, H. Ohtsu and Y. Akiba (2001). Persistent hypoglycemia is induced by tolbutamide administration in broiler chickens fed a low-carbohydrate diet. Domestic Animal Endocrinology **20**(2): 109-122.

Serr, J., Y. Suh and K. Lee (2009). Regulation of adipose triglyceride lipase by fasting and refeeding in avian species. Poultry Science **88**: 2585-2591.

Shiraishi, J.-i., K. Yanagita, R. Fukumori, T. Sugino, M. Fujita, S.-I. Kawakami, J. P. McMurtry and T. Bungo (2011). Comparisons of insulin related parameters in commercial-type chicks: Evidence for insulin resistance in broiler chicks. Physiology and Behavior **103**(2): 233-239.

Sigma-Aldrich (2013). Tolbutamide Retrieved 21.07.2013, from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/t0891?lang=de&region=DE>.

Simon, J. (1980). Effects of acute and chronic ingestion of tolbutamide in the chicken. Hormone and Metabolic Research **12**(10): 489-493.

Simon, J. (1984). Effects of daily corticosterone injections upon plasma glucose, insulin, uric acid and electrolytes and food intake pattern in the chicken. Diabète & métabolisme **10**(3): 211-217.

Simon, J. (1989). Chicken as a useful species for the comprehension of insulin action. Critical reviews in poultry biology **2** (2): 121-148

Simon, J., M. Derouet and C. Gespach (2000). An anti-insulin serum, but not a glucagon antagonist, alters glycemia in fed chickens. Hormone and Metabolic Research **32**(4): 139-141.

Simon, J., P. Freychet and G. Rosselin (1974). Chicken insulin: radioimmunological characterization and enhanced activity in rat fat cells and liver plasma membranes. Endocrinology **95**(5): 1439-1449.

Simon, J., P. Freychet and G. Rosselin (1977). A study of insulin binding sites in the chicken tissues. Diabetologia **13**(3): 219-228.

Simon, J., P. Freychet, G. Rosselin and P. Demeyts (1977). Enhanced binding affinity of chicken insulin in rat liver membranes and human lymphocytes: relationship to the kinetic properties of the hormone-receptor interaction. Endocrinology **100**(1): 115-121.

Simon, J., D. Milenkovic, E. Godet, C. Cabau, A. Collin, S. Métayer-Coustard, N. Rideau, S. Tesseraud, M. Derouet, S. Crochet, E. Cailleau-Audouin, C. Hennequet-Antier, C. Gespach, T. E. Porter, M. J. Duclos, J. Dupont and L. A. Cogburn (2012). Insulin immunoneutralization in fed chickens: effects on liver and muscle transcriptome. Physiological Genomics **44**(5): 283-292.



Simon, J., N. Rideau, M. Taouis and J. Dupont (2011). Plasma insulin levels are rather similar in chicken and rat. *General and Comparative Endocrinology* **171**(3): 267-268.

Simon, J. and G. Rosselin (1978). Effect of fasting, glucose, amino acids and food intake on in vivo insulin release in the chicken. *Hormone and Metabolic Research* **10**(02): 93-98.

Simon, J. and G. Rosselin (1979). Effect of intermittent feeding on glucose-insulin relationship in the chicken. *Journal of Nutrition* **109**(4): 631-641.

Sinsigalli, N. A., J. P. McMurtry, J. A. Cherry and P. B. Siegel (1987). Glucose tolerance, plasma insulin and immunoreactive glucagon in chickens selected for high and low body weight. *Journal of Nutrition* **117**(5): 941-947.

Smith, L. F. (1966). Species variation in the amino acid sequence of insulin. *The American Journal of Medicine* **40**(5): 662-666.

Stangassinger, M. (2010). Regulation der Glucosehomöostase bei Monogastriern und bei Wiederkäuern. *Physiologie der Haustiere*. W. v. Engelhardt. Stuttgart, Enke Verlag: 637-639.

Stangassinger, M. and H.-P. Sallmann (2004). The molecular basis of lactation - metabolism in liver cells. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* **13**.

Stellenwerf, W. A., Jr. and R. L. Hazelwood (1979). Peripheral utilization of a glucose load after alloxan and streptozotocin in the rat and chicken: a comparison. *General and Comparative Endocrinology* **39**(2): 131-140.

Stevens, L. (1996). *Avian Biochemistry and Molecular Biology*. New York, Cambridge University Press.

Stone, D. B. and J. D. Brown (1966). Effect of sulfonylurea drugs on plasma free fatty acid and blood glucose concentrations in man. *Diabetes* **15**(5): 314-318.

Storch, V. W., Ulrich (2004). *Systematische Zoologie*. München, Elsevier GmbH.

Strobel, E., E. Ahrens, G. Hartmann, H. Kluge and H. Jeroch (2001). Gehalt an Inhaltsstoffen von Weizen, Roggen und Hafer bei Anbau unter konventionellen und den Bedingungen des ökologischen Landbaus. *Die Bodenkultur* **52**(4): 221-231.

Sutterlin, G. G. and G. Laverty (1998). Characterization of a primary cell culture model of the avian renal proximal tubule. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **275**(1): R220-R226.

Sweazea, K. L., J. P. McMurtry and E. J. Braun (2006). Inhibition of lipolysis does not affect insulin sensitivity to glucose uptake in the mourning dove. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology* **144**(3): 387-394.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research* **50**(6): 537-546.

- Taouis, M., M. Derouet, B. Chevalier and J. Simon (1993). Corticosterone effect on insulin receptor number and kinase activity in chicken muscle and liver. *General and Comparative Endocrinology* **89**(2): 167-175.
- Tedford, B. L. and A. H. Meier (1993). Daily rhythm of plasma insulin in Japanese quail (*Coturnix c. japonica*) fed ad libitum. *Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Physiology* **104**(1): 143-145.
- Thomsen, J., K. Kristiansen, K. Brunfeldt and F. Sundby (1972). The amino acid sequence of human glucagon. *FEBS Letters* **21**(3): 315-319.
- Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V. (1997). Merkblatt zur tierschutzgerechten Haltung von Versuchstieren - Legehennen; Merkblatt Nr. 31.
- Tinker, D. A., J. T. Brosnan and G. R. Herzberg (1986). Interorgan metabolism of amino acids, glucose, lactate, glycerol and uric acid in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biochemical Journal* **240**: 829-836.
- Tokushima, Y., K. Takahashi, K. Sato and Y. Akiba (2005). Glucose uptake in vivo in skeletal muscles of insulin-injected chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **141**(1): 43-48.
- Tomás, E. V. A., Y.-S. Lin, Z. Dagher, A. Saha, Z. Luo, Y. Ido and N. B. Ruderman (2002). Hyperglycemia and insulin resistance: Possible mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* **967**(1): 43-51.
- Totzke, U., A. Hubinger, G. Korthaus and F. Bairlein (1999). Fasting increases the plasma glucagon response in the migratory garden warbler (*Sylvia borin*). *General and Comparative Endocrinology* **115**(1): 116-121.
- Touchburn, S., J. Simon and B. Leclercq (1981). Evidence of a glucose-insulin imbalance and effect of dietary protein and energy level in chickens selected for high abdominal fat content. *Journal of Nutrition* **111**(2): 325-335.
- Twiest, G. and C. J. Smith (1970). Circadian rhythm in blood glucose level of chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology* **32**(2): 371-375.
- Tzagournis, M. and T. G. Skillman (1970). Glucose intolerance mechanism after starvation. *Metabolism* **19**(2): 170-178.
- Umminger, B. L. (1975). Body size and whole blood sugar concentrations in mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **52**(3): 455-458.
- Unger, R. H. (1957). The standard two-hour oral glucose tolerance test in the diagnosis of diabetes mellitus in subjects without fasting hyperglycemia. *Annals of Internal Medicine* **47**(6): 1138-1153.
- Unger, R. H., A. M. Eisentraut and L. L. Madison (1963). The effects of total starvation upon the levels of circulation glucagon and insulin in man. *Journal of Clinical Investigation* **42**(7): 1031-1039.

van der Wal, P. G., H. G. Reimert, H. A. Goedhart, B. Engel and T. G. Uijttenboogaart (1999). The effect of feed withdrawal on broiler blood glucose and nonesterified fatty acid levels, postmortem liver pH values, and carcass yield. *Poultry Science* **78**(4): 569-573.

Verein Beratung artgerechter Tierhaltung e.V. (2003). Verhalten, artgerechte Haltungssysteme und Stalleinrichtungen für Rind, Schwein und Huhn. Witzenhausen, Gesellschaft für Ökologische Tierhaltung,.

Vives, F., J. Sancho, D. R. Langslow and J. A. Gomez-Capilla (1981). Studies in vivo and in vitro of insulin effect on the metabolism of glucose in different chicken tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **69**(3): 479-485.

Warriss, P. D., S. C. Kestin, S. N. Brown and E. A. Bevis (1988). Depletion of glycogen reserves in fasting broiler chickens. *British Poultry Science* **29**(1): 149-154.

Watford, M., Y. Hod, Y. B. Chiao, M. F. Utter and R. W. Hanson (1981). The unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken. The significance of a cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Journal of Biological Chemistry* **256**(19): 10023-10027.

Wiesner, E. and R. Ribbeck, Eds. (2000). Lexikon der Veterinärmedizin, 4. Auflage. Stuttgart, Enke Verlag.

Wu, G. and J. R. Thompson (1990). The effect of keton-bodies on protein-turnover in isolated skeletal-muscle from the fed and fasted chick. *International Journal of Biochemistry* **22**(3): 263-268.

Yau, J.-C., J. H. Denton, C. A. Bailey and A. R. Sams (1991). Customizing the fatty acid content of broiler tissues. *Poultry Science* **70**(1): 167-172.

Yoshiyama, Y., T. Sugiyama and M. Kanke (2005). Experimental diabetes model in chick embryos treated with streptozotocin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **28**(10): 1986-1988.

Zhao, F. Q. and A. F. Keating (2007). Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current Genomics* **8**(2): 113-128.

Zhao, J. P., H. Lin, H. C. Jiao and Z. G. Song (2009). Corticosterone suppresses insulin- and NO-stimulated muscle glucose uptake in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology* **149**(3): 448-454.

## IX. ANHANG

## 1. Zusammenfassung aller in dieser Untersuchung erhobenen absoluten Werte sowie der Ergebnisse der statistischen Auswertungen

**Tab. A1: Mittlerer tageszeitlicher Verlauf der Konzentrationen (=Profil, Pr) von Metaboliten und Hormonen im Blutplasma der Versuchstiere bei den verschiedenen Versuchsbedingungen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP)**

<b>Glucose [mmol/l]</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
<b>PrN</b>	11,65	11,90	11,80	11,77	12,00	12,38	12,58	12,64
Probenzahl (n)	4	12	8	8	8	8	7	8
Standardfehler	0,26	0,17	0,14	0,23	0,17	0,33	0,25	0,36
<b>PrH</b>	12,20	12,36	12,80	13,08	13,39	13,58	13,25	12,91
Probenzahl (n)	7	13	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	0,20	0,17	0,27	0,61	0,59	0,64	0,53	0,43
<b>PrHP</b>	12,40	13,19	12,05	11,75	11,76	12,56	12,17	11,94
Probenzahl (n)	15	5	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	0,25	0,09	0,28	0,13	0,26	0,38	0,26	0,37

<b>FFS [mmol/l]</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
<b>PrN</b>	0,580	0,683	0,963	0,863	0,865	0,790	0,741	0,711
Probenzahl (n)	4	12	8	8	8	8	7	8
Standardfehler	0,01	0,07	0,05	0,06	0,05	0,03	0,06	0,05
<b>PrH</b>	0,537	0,478	0,658	0,635	0,629	0,656	0,640	0,603
Probenzahl (n)	7	13	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	0,04	0,02	0,06	0,04	0,06	0,07	0,07	0,05
<b>PrHP</b>	0,584	0,540	0,610	0,689	0,838	0,611	0,621	0,571
Probenzahl (n)	15	5	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	0,03	0,03	0,03	0,05	0,10	0,04	0,06	0,06

<b>βHB [mmol/l]</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
<b>PrN</b>	1,30	1,05	1,86	2,26	2,58	2,47	2,36	1,90
Probenzahl (n)	4	12	8	8	8	7	8	8
Standardfehler	0,32	0,17	0,18	0,25	0,30	0,28	0,18	0,15
<b>PrH</b>	2,52	2,04	2,49	2,55	2,14	2,34	2,54	2,60
Probenzahl (n)	7	13	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	0,38	0,13	0,12	0,11	0,21	0,16	0,27	0,29
<b>PrHP</b>	4,30	2,50	6,08	6,98	7,43	7,91	8,48	8,69
Probenzahl (n)	15	5	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	0,41	0,54	1,09	0,83	0,88	1,11	1,25	1,49

<b>Harnsäure [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
<b>PrN</b>	254,3	227,0	223,0	192,8	203,8	184,5	218,8	215,0
Probenzahl (n)	4	12	8	8	8	7	8	8
Standardfehler	18,99	23,16	32,27	22,82	25,04	21,77	15,25	17,16
<b>PrH</b>	324,7	351,5	330,7	352,7	323,9	267,2	284,2	338,6
Probenzahl (n)	7	13	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	48,27	45,43	29,14	41,27	34,49	23,36	24,57	26,64
<b>PrHP</b>	402,9	323,2	406,3	388,0	391,1	379,9	425,2	416,2
Probenzahl (n)	15	5	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	22,60	24,00	36,26	45,77	20,94	31,58	30,66	38,83

<b>Insulin [<math>\mu\text{g/l}</math>]</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
<b>PrN</b>	0,48	0,92	0,56	0,56	0,52	0,53	0,47	0,42
Probenzahl (n)	4	12	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	0,18	0,15	0,19	0,15	0,16	0,18	0,14	0,16
<b>PrH</b>	1,86	1,48	1,45	1,67	1,16	0,90	1,00	1,00
Probenzahl (n)	7	13	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	0,40	0,25	0,16	0,27	0,09	0,14	0,15	0,17
<b>PrHP</b>	0,57	0,61	0,57	0,31	0,19	0,28	0,44	0,34
Probenzahl (n)	15	5	8	8	7	8	8	8
Standardfehler	0,10	0,22	0,16	0,03	0,06	0,09	0,15	0,08

<b>Glucagon [<math>\text{ng/l}</math>]</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
<b>PrN</b>	685,6	553,0	584,7	630,8	487,5	455,3	457,5	399,8
Probenzahl (n)	4	12	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	87,68	52,50	49,77	79,80	59,93	33,09	43,86	25,54
<b>PrH</b>	470,3	481,0	503,8	463,1	498,2	546,8	546,2	576,8
Probenzahl (n)	7	13	8	8	8	7	7	8
Standardfehler	10,46	33,80	28,29	30,10	47,67	30,38	27,62	45,66
<b>PrHP</b>	433,4	506,9	466,7	440,1	552,2	492,9	524,3	562,2
Probenzahl (n)	15	5	8	8	8	8	8	8
Standardfehler	30,16	57,52	51,92	25,04	46,43	26,14	27,00	27,89

<b>AREA UNDER CURVE</b>	<b>Glucose</b>	<b>FFS</b>	<b><math>\beta\text{HB}</math></b>	<b>Harnsäure</b>	<b>Insulin</b>	<b>Glucagon</b>
<b>PrN</b>	121,9	8,2	23,1	2071,8	5,2	5046,6
<b>PrH</b>	132,3	6,4	24,2	3125,5	11,9	5029,0
<b>PrHP</b>	120,4	6,7	76,3	3991,0	3,4	5047,9

**Tab. A2: Mittels ANOVA berechnete Signifikanzen der Unterschiede zwischen den mittleren Tageszeitkonzentrationen von zwei miteinander verglichenen Versuchsbedingungen im Profilversuch („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP)**

<b>Glucose mmol/l</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
PrN vs. PrH	ns	ns	ns	<b>&lt;0,05</b>	ns	ns	ns	ns
PrN vs. PrHP	ns	<b>&lt;0,01</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PrH vs. PrHP	ns	<b>&lt;0,05</b>	ns	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	ns	ns	ns

<b>FFS [mmol/l]</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
PrN vs. PrH	ns	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,05</b>	ns	ns	ns	ns
PrN vs. PrHP	ns	ns	<b>&lt;0,001</b>	ns	ns	ns	ns	ns
PrH vs. PrHP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<b>βHB [mmol/l]</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
PrN vs. PrH	ns	<b>&lt;0,01</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PrN vs. PrHP	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
PrH vs. PrHP	<b>&lt;0,05</b>	ns	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

<b>Harnsäure [μmol/l]</b>								
Zeit [h]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
PrN vs. PrH	ns	<b>&lt;0,05</b>	ns	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	ns	ns	<b>&lt;0,05</b>
PrN vs. PrHP	<b>&lt;0,05</b>	ns	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
PrH vs. PrHP	ns	ns	ns	ns	ns	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,01</b>	ns

<b>Insulin [μg/l]</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
PrN vs. PrH	<b>&lt;0,05</b>	ns	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,01</b>	ns	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>
PrN vs. PrHP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PrH vs. PrHP	<b>&lt;0,001</b>	ns	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,01</b>

<b>Glucagon [ng/l]</b>								
Zeit [h:min]	08:30	9	10	12	14	16	18	20
PrN vs. PrH	<b>&lt;0,05</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<b>&lt;0,01</b>
PrN vs. PrHP	<b>&lt;0,01</b>	ns	ns	<b>&lt;0,05</b>	ns	ns	ns	<b>&lt;0,01</b>
PrH vs. PrHP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<b>AREA UNDER CURVE</b>	<b>Glucose</b>	<b>FFS</b>	<b>βHB</b>	<b>Harnsäure</b>	<b>Insulin</b>	<b>Glucagon</b>
<b>PrN vs. PrH</b>	ns	<b>&lt;0,05</b>	ns	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,01</b>	ns
<b>PrN vs. PrHP</b>	ns	ns	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	ns	ns
<b>PrH vs. PrHP</b>	<b>&lt;0,05</b>	ns	<b>&lt;0,001</b>	ns	<b>&lt;0,001</b>	ns

**Tab. A3: Mittlere Metabolit- und Hormonkonzentration im Blutplasma der Versuchstiere vor und nach einer einmaligen i.v. Injektion (von Glucose (GTT) oder von Kochsalz (K)) bzw. vor und nach einer i.v. Glucosedauerbelastung (GDB) unter verschiedenen Versuchsbedingungen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP)**

Testbedingung	Glucose [mmol/l]					
Zeit p.i. (min)	-15	0	5	10	30	60
<b>GDB N</b>	18,02	12,70	<b>28,65</b>	<b>23,37</b>	<b>13,98</b>	13,00
Probenzahl (n)		12	13	13	13	13
Standardfehler		1,40	6,25	1,87	1,28	0,81
<b>K N</b>		11,86	11,97	12,10	12,65	12,38
Probenzahl (n)		10	9	10	10	10
Standardfehler		0,79	0,86	1,23	0,89	0,99
<b>GTTN</b>		12,14	<b>26,21</b>	<b>22,63</b>	13,09	12,49
Probenzahl (n)		11	11	12	12	12
Standardfehler		0,99	1,50	1,71	1,11	0,66
<b>N K</b>		11,86	11,97	12,10	12,65	12,38
Probenzahl (n)		10	9	10	10	10
Standardfehler		0,79	0,86	1,23	0,89	0,99
<b>GTTH</b>		12,28	<b>28,70</b>	<b>25,29</b>	<b>15,77</b>	13,05
Probenzahl (n)		10	10	10	10	9
Standardfehler		0,73	1,00	0,77	1,28	1,00
<b>H K</b>		12,33	13,17	13,28	12,83	12,86
Probenzahl (n)		10	9	10	10	10
Standardfehler		0,44	0,39	0,48	0,48	0,63
<b>GTTHP</b>		12,55	<b>30,08</b>	<b>26,05</b>	<b>18,29</b>	<b>15,65</b>
Probenzahl (n)		10	10	10	9	10
Standardfehler		0,99	1,91	1,55	2,62	1,78
<b>HP K</b>		12,65	12,96	13,03	13,07	12,89
Probenzahl (n)		10	10	10	10	10
Standardfehler		0,84	0,91	0,69	0,85	0,81

Testbedingung	FFS [mmol/l]		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
<b>GDB N</b>	<b>0,339</b>	<b>0,258</b>	0,591
Probenzahl (n)	12	13	13
Standardfehler	0,05	0,04	0,06
<b>K N</b>	0,691	0,672	0,690
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,09	0,06	0,05
<b>GTTN</b>	0,609	<b>0,318</b>	0,600
Probenzahl (n)	11	12	12
Standardfehler	0,07	0,05	0,08
<b>N K</b>	0,691	0,672	0,690
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,09	0,06	0,05
<b>GTTH</b>	0,515	<b>0,219</b>	<b>0,511</b>
Probenzahl (n)	10	10	9
Standardfehler	0,04	0,08	0,02
<b>H K</b>	0,483	0,448	0,466
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,02	0,03	0,05
<b>GTTHP</b>	0,586	<b>0,346</b>	0,538
Probenzahl (n)	10	9	10
Standardfehler	0,04	0,03	0,04
<b>HP K</b>	0,560	0,515	0,524
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,03	0,03	0,03

Testbedingung	$\beta$ HB [mmol/l]		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
<b>GDB N</b>	<b>0,23</b>	<b>0,34</b>	<b>0,68</b>
Probenzahl (n)	12	13	13
Standardfehler	0,03	0,16	0,07
<b>N K</b>	1,21	1,21	1,32
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,21	0,15	0,16
<b>GTTN</b>	0,91	<b>0,48</b>	<b>0,87</b>
Probenzahl (n)	11	12	12
Standardfehler	0,18	0,08	0,11
<b>N K</b>	1,21	1,21	1,32
Probenzahl (n)	10	10	10



IX. Anhang

Standardfehler	0,21	0,15	0,16
<b>GTTH</b>	2,21	<b>0,56</b>	<b>1,34</b>
Probenzahl (n)	10	10	9
Standardfehler	0,30	0,13	0,18
<b>H K</b>	2,21	2,10	2,25
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,13	0,11	0,16
<b>GTTHP</b>	3,77	<b>2,17</b>	<b>2,48</b>
Probenzahl (n)	10	9	10
Standardfehler	0,45	0,32	0,30
<b>HP K</b>	3,93	3,67	4,10
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,63	0,60	0,60

Testbedingung	Harnsäure [μmol/l]		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
<b>GDB N</b>	<b>180,3</b>	<b>171,0</b>	<b>158,4</b>
Probenzahl (n)	12	13	13
Standardfehler	17,13	12,04	11,08
<b>N K</b>	262,1	236,8	225,1
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	23,35	26,25	26,33
<b>GTTN</b>	214,9	188,0	171,8
Probenzahl (n)	11	12	12
Standardfehler	17,29	13,82	18,18
<b>N K</b>	262,1	236,8	225,1
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	23,35	26,25	26,33
<b>GTTH</b>	400,7	<b>478,6</b>	<b>365,3</b>
Probenzahl (n)	10	10	9
Standardfehler	47,36	49,85	53,89
<b>H K</b>	283,5	268,3	219,6
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	41,16	31,04	29,60
<b>GTTHP</b>	357,2	<b>423,7</b>	304,5
Probenzahl (n)	10	9	10
Standardfehler	31,73	27,01	29,94
<b>HP K</b>	408,7	337,2	308,2
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	20,73	17,25	14,76

Testbedingung	Insulin [ $\mu\text{g/l}$ ]					
Zeit p.i. (min)	-15	0	5	10	30	60
<b>GDB N</b>	1,53	0,48	<b>3,11</b>	<b>2,07</b>	0,40	0,36
Probenzahl (n)		12	13	13	13	13
Standardfehler		0,09	0,33	0,32	0,09	0,07
<b>N K</b>		0,69	0,21	0,25	0,47	0,41
Probenzahl (n)		10	9	10	10	10
Standardfehler		0,21	0,06	0,07	0,17	0,11
<b>GTTN</b>		0,93	<b>4,10</b>	<b>4,06</b>	0,61	0,67
Probenzahl (n)		11	11	12	12	12
Standardfehler		0,14	0,34	0,43	0,10	0,13
<b>N K</b>		0,69	0,21	0,25	0,47	0,41
Probenzahl (n)		10	9	10	10	10
Standardfehler		0,21	0,06	0,07	0,17	0,11
<b>GTTH</b>		1,53	<b>4,61</b>	<b>4,75</b>	1,09	1,09
Probenzahl (n)		10	10	10	10	9
Standardfehler		0,30	0,43	0,44	0,20	0,27
<b>H K</b>		1,69	1,16	1,16	1,06	1,12
Probenzahl (n)		10	9	10	10	10
Standardfehler		0,32	0,21	0,21	0,17	0,18
<b>GTTHP</b>		0,53	<b>3,26</b>	<b>3,96</b>	0,83	0,79
Probenzahl (n)		10	10	10	8	10
Standardfehler		0,11	0,37	0,44	0,10	0,11
<b>HP K</b>		0,63	0,71	0,63	0,87	0,76
Probenzahl (n)		10	10	10	10	10
Standardfehler		0,15	0,11	0,14	0,13	0,15

Testbedingung	Glucagon [ $\text{ng/l}$ ]					
Zeit p.i. (min)	-15	0	5	10	30	60
<b>GDB N</b>	146,4	507,1	<b>248,7</b>	<b>128,3</b>	<b>465,4</b>	<b>481,3</b>
Probenzahl (n)		12	13	13	13	13
Standardfehler		63,84	31,58	13,42	35,70	33,22
<b>N K</b>		626,8	712,3	674,5	666,5	679,7
Probenzahl (n)		10	9	10	9	10
Standardfehler		56,32	41,01	44,92	37,27	43,69
<b>GTTN</b>		547,6	<b>287,4</b>	<b>168,9</b>	<b>509,7</b>	579,5
Probenzahl (n)		11	11	12	11	12
Standardfehler		62,88	35,29	13,79	33,23	37,90
<b>N K</b>		626,8	712,3	674,5	666,5	679,7

# IX. Anhang

Probenzahl (n)		10	9	10	9	10
Standardfehler		56,32	41,01	44,92	37,27	43,69
<b>GTTH</b>		474,6	<b>293,0</b>	<b>184,4</b>	<b>362,9</b>	549,7
Probenzahl (n)		10	10	10	10	7
Standardfehler		32,76	27,30	10,32	35,28	30,85
<b>H K</b>		480,0	517,7	477,9	488,2	500,0
Probenzahl (n)		10	9	10	10	10
Standardfehler		31,02	25,13	19,70	31,55	29,47
<b>GTTHP</b>		442,9	<b>177,3</b>	<b>100,9</b>	<b>257,1</b>	<b>331,6</b>
Probenzahl (n)		10	10	10	9	10
Standardfehler		38,07	11,62	4,38	64,32	41,44
<b>HP K</b>		460,6	493,6	462,2	480,3	459,6
Probenzahl (n)		10	10	10	10	10
Standardfehler		40,19	32,18	40,45	29,33	45,79

AREA UNDER CURVE	Glucose	FFS	βHB	Harnsäure	Insulin	Glucagon
GTTN	948,37	26,19	38,44	11010	97,88	24251
GTTH	1208,40	20,93	67,05	24820	138,4	17957
GTTHP	1036,67	27,78	156,3	22227	101	14661
GDBN	1001,45	21,03	21	9807	57,52	22827

	GDBN Nullwert		NK		HK		HPK	
Parameter	MW ± SE	(n)	MW ± SE	(n)	MW ± SE	(n)	MW ± SE	(n)
Glucose (mmol/l)	12,7 ± 1,4	12	12,19 ± 0,14	5	12,89 ± 0,16	5	12,72 ± 0,19	5
FFS (mmol/l)	0,339 ± 0,054	12	0,684 ± 0,006	3	0,466 ± 0,01	3	0,533 ± 0,014	3
βHB (mmol/l)	0,225 ± 0,025	12	1,25 ± 0,04	3	2,19 ± 0,05	3	3,9 ± 0,13	3
Harnsäure (μmol/l)	180,3 ± 17,1	12	241,3 ± 10,9	3	257,1 ± 19,3	3	351,4 ± 29,9	3
Insulin (μg/l)	0,48 ± 0,09	12	0,41 ± 0,09	5	1,24 ± 0,11	5	0,72 ± 0,04	5
Glucagon (ng/l)	507,1 ± 63,8	12	671,6 ± 13,7	5	492,3 ± 7,4	5	471 ± 6,8	5
Insulin/Glucagon	0,58		0,37		1,53		0,93	

**Tab. A4: Signifikanzen der Unterschiede der mittleren Metabolit- und Hormonkonzentrationen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt zwischen Versuchstieren und Kontrolltieren beim i.v. Glucosetoleranztest unter den gegebenen verschiedenen Versuchsbedingungen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP)**

Testbedingung	Glucose				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
GTTN T-K	ns: p=0,492	<b>s: p&lt;0,0001</b>	<b>s: p&lt;0,0001</b>	ns: p=0,3287	ns: p=0,7581
GTTH T-K	ns: p=0,8368	<b>s: pM-W&lt;0,0001</b>	<b>s: p&lt;0,0001</b>	<b>s: pM-W=0,0002</b>	ns: p=0,6278
GTTHP T-K	ns: p=0,8108	<b>s: pM-W=0,0002</b>	<b>s: pM-W&lt;0,0001</b>	<b>s: pM-W&lt;0,0001</b>	<b>s: pM-W&lt;0,0001</b>
GDBN T-K	ns: pM-W= 0,138	<b>s: pM-W=0,0001</b>	<b>s: p&lt;0,0001</b>	<b>s: p=0,0108</b>	ns: p=0,0688

Testbedingung	FFS		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
GTTN T-K	ns: p=0,4924	<b>s: p=0,0004</b>	ns: p=0,3795
GTTH T-K	ns: pM-W=0,5696	<b>s: pM-W=0,008</b>	ns: pM-W=0,152
GTTHP T-K	ns: p=0,5816	<b>s: p=0,0004</b>	ns: pM-W=1
GDBN T-K	<b>s: p=0,0029</b>	<b>s: p&lt;0,0001</b>	ns: p=0,223

Testbedingung	βHB		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
GTTN T-K	ns: p=0,2907	<b>s: pM-W=0,001</b>	<b>s: p=0,0254</b>
GTTH T-K	ns: p=0,9886	<b>s: pM-W=0,0002</b>	<b>s: pM-W=0,008</b>
GTTHP T-K	ns: p=0,8482	<b>s: p=0,0478</b>	<b>s: p=0,0272</b>
GDBN T-K	<b>s: pM-W=0,0002</b>	<b>s: pM-W=0,001</b>	<b>s: pM-W=0,003</b>

Testbedingung	Harnsäure		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
GTTN T-K	ns: p=0,1164	ns: p=0,1	ns: p=0,1027
GTTH T-K	ns: p=0,0781	<b>s. pM-W=0,001</b>	<b>s: p=0,0261</b>
GTTHP T-K	ns: p=0,1904	<b>s: p=0,0135</b>	ns: pM-W=0,796
GDBN T-K	<b>s: p=0,0092</b>	<b>s: p=0,0225</b>	<b>s: p=0,0188</b>

# IX. Anhang

Testbedingung	Insulin				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
GTTN T-K	ns: p=0,36	s: pM-W=0,0002	s: pM-W=0,0001	ns: pM-W=0,277	ns: p=0,1443
GTTH T-K	ns: p=0,7095	s: pM-W<0,0001	s: pM-W=0,0002	ns: p=0,9208	ns: P=0,9348
GTTHP T-K	ns: p=0,6075	s: pM-W<0,0001	s: pM-W<0,0001	ns: p=0,8303	ns: p=0,3611
GDBN T-K	ns: p=0,3365	s: pM-W=0,0001	s: pM-W<0,0001	ns: pM-W=0,926	ns: p=0,6973

Testbedingung	Glucagon				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
GTTN T-K	ns: p=0,3634	s: pM-W=0,0002	s: pM-W=0,0001	s: p=0,0103	ns: p=0,3104
GTTH T-K	ns: p=0,9062	s: p<0,0001	s: p<0,0001	s: p=0,0164	ns: p=0,2731
GTTHP T-K	ns: p=0,7516	s: pM-W<0,0001	s: pM-W<0,0001	s: pM-W=0,003	s: p=0,0529
GDBN T-K	ns: p=0,1834	s: p<0,0001	s: pM-W<0,0001	s: p=0,0009	s: p=0,0014

AUC	Glucose	FFS	βHB	Harnsäure	Insulin	Glucagon
AUC GTTN T-K	s: p<0,0001	s: p=0,0049	s: p=0,0023	ns: p=0,0587	s: p<0,0001	s: p<0,0001
AUC GTTH T-K	s: pM-W=0,0028	s: p=0,0484	s: p=0,0001	s: p=0,0218	s: p=0,0023	s: p=0,0024
AUC GTTHP T-K	s: pM-W<0,0001	s: p=0,0802	s: p=0,0135	ns: p=0,4852	s: p=0,1252	s: p=0,0001
AUC GDBN T-K	s: p<0,0001	s: p=0,0001	s: pM-W=0,0001	s: p=0,0072	s: p=0,0068	s: p<0,0001

**Tab. A5: Signifikanzen der Unterschiede der mittleren Metabolit- und Hormonkonzentration zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt beim i.v. Glucosetoleranztest zwischen den gegebenen verschiedenen Versuchsbedingungen („nüchtern“ N, „hungernd“ H, „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ HP)**

Testbedingung	Glucose				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
GDBN vs GTTN	ns	ns	ns	ns	ns
GDBN vs GTTH	ns	ns	<b>&lt;0,05</b>	ns	ns
GDBN vs GTTHP	ns	ns	<b>&lt;0,01</b>	<b>pK-W&lt;0,001</b>	<b>pK-W&lt;0,001</b>
GT TN vs GTTH	ns	ns	<b>&lt;0,01</b>	<b>pK-W&lt;0,001</b>	ns
GT TN vs GTTHP	ns	<b>s: pK-W=0,0017</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>pK-W&lt;0,001</b>	<b>pK-W&lt;0,001</b>
GTTH vs GTTHP	ns	ns	ns	<b>pK-W&lt;0,001</b>	<b>pK-W&lt;0,001</b>

Testbedingung	FFS		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
GDBN vs GTTN	<b>&lt;0,01</b>	ns	ns
GDBN vs GTTH	ns	ns	ns
GDBN vs GTTHP	<b>&lt;0,05</b>	ns	ns
GT TN vs GTTH	ns	ns	ns
GT TN vs GTTHP	ns	ns	ns
GTTH vs GTTHP	ns	<b>pK-W&lt;0,05</b>	ns

Testbedingung	βHB		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
GDBN vs GTTN	ns	ns	ns
GDBN vs GTTH	<b>&lt;0,001</b>	ns	<b>&lt;0,05</b>
GDBN vs GTTHP	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,001</b>
GT TN vs GTTH	<b>&lt;0,01</b>	ns	ns
GT TN vs GTTHP	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
GTTH vs GTTHP	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

# IX. Anhang

Testbedingung	Harnsäure		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
GDBN vs GTTN	ns	ns	ns
GDBN vs GTTH	<b>pK-W&lt;0,001</b>	<b>pK-W&lt;0,0001</b>	<b>pK-W&lt;0,0001</b>
GDBN vs GTTHP	<b>pK-W&lt;0,001</b>	<b>pK-W&lt;0,0001</b>	<b>pK-W&lt;0,0001</b>
GT TN vs GTTH	<b>pK-W&lt;0,001</b>	<b>pK-W&lt;0,0001</b>	<b>pK-W&lt;0,0001</b>
GT TN vs GTTHP	ns	<b>pK-W&lt;0,0001</b>	<b>pK-W&lt;0,0001</b>
GTTH vs GTTHP	ns	ns	ns

Testbedingung	Insulin				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
GDBN vs GTTN	<b>pK-W=0,0017</b>	ns	<b>&lt;0,01</b>	ns	ns
GDBN vs GTTH	<b>pK-W=0,0017</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>pK-W=0,012</b>	<b>pK-W=0,006</b>
GDBN vs GTTHP	ns	ns	<b>&lt;0,01</b>	ns	ns
GT TN vs GTTH	ns	ns	ns	ns	<b>pK-W=0,006</b>
GT TN vs GTTHP	ns	ns	ns	ns	ns
GTTH vs GTTHP	ns	ns	ns	ns	ns

Testbedingung	Glucagon				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
GDBN vs GTTN	ns	ns	ns	ns	ns
GDBN vs GTTH	ns	ns	ns	ns	ns
GDBN vs GTTHP	ns	ns	ns	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>
GT TN vs GTTH	ns	ns	ns	ns	ns
GT TN vs GTTHP	ns	ns	<b>pK-W=0,0003</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,001</b>
GTTH vs GTTHP	ns	ns	<b>pK-W=0,0003</b>	ns	<b>&lt;0,001</b>

AREA UNDER CURVE	Glucose	FFS	βHB	Harnsäure	Insulin	Glucagon
GDBN vs GTTN	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GDBN vs GTTH	ns	ns	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	ns
GDBN vs GTTHP	<b>&lt;0,001</b>	ns	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	ns	<b>&lt;0,05</b>
GT TN vs GTTH	ns	ns	ns	<b>&lt;0,001</b>	ns	ns
GT TN vs GTTHP	<b>&lt;0,001</b>	ns	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	ns	<b>&lt;0,05</b>
GTTH vs GTTHP	<b>&lt;0,01</b>	ns	<b>&lt;0,001</b>	ns	ns	ns

AREA UNDER CURVE	Glucose	FFS	βHB	Harnsäure	Insulin	Glucagon
GT TN K vs GTTH K	ns	<b>&lt;0,05</b>	ns	ns	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>
GT TN K vs GTTHP K	ns	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,05</b>	ns	<b>&lt;0,001</b>
GTTH K vs GTTHP K	ns	ns	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,05</b>	ns	ns

**Tab. A6: Konzentrationsmittelwerte von Metaboliten und Hormonen im Blutplasma nach Tolbutamidinjektion (T) bzw. Kochsalzinjektion (K) bei den verschiedenen Versuchsbedingungen („nüchtern“ N, „hungernd“ H)**

Testbedingung	Glucose [mmol/l]				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
<b>TN</b>	11,78	11,88	<b>10,59</b>	<b>6,73</b>	<b>5,92</b>
Probenzahl (n)	11	11	11	11	11
Standardfehler	0,34	0,28	0,20	0,20	0,18
<b>TN K</b>	11,86	11,97	12,10	12,65	12,38
Probenzahl (n)	10	9	10	10	10
Standardfehler	0,79	0,86	1,23	0,89	0,99
<b>TH</b>	12,37	12,87	<b>12,49</b>	<b>9,00</b>	<b>7,13</b>
Probenzahl (n)	11	11	11	11	11
Standardfehler	0,33	0,31	0,32	0,30	0,24
<b>TH K</b>	12,33	13,17	13,28	12,83	12,86
Probenzahl (n)	10	9	10	10	10
Standardfehler	0,44	0,39	0,48	0,48	0,63

Testbedingung	FFS [mmol/l]		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
<b>TN</b>	0,651	<b>0,230</b>	<b>0,463</b>
Probenzahl (n)	11	11	11
Standardfehler	0,06	0,02	0,03
<b>TN K</b>	0,691	0,672	0,690
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,09	0,06	0,05
<b>TH</b>	0,571	<b>0,135</b>	0,360
Probenzahl (n)	11	11	11
Standardfehler	0,04	0,02	0,04
<b>TH K</b>	0,483	0,448	0,466
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,02	0,03	0,05

Testbedingung	$\beta$ HB [mmol/l]		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
<b>TN</b>	1,00	<b>0,50</b>	<b>0,73</b>
Probenzahl (n)	11	11	11
Standardfehler	0,20	0,15	0,10
<b>TN K</b>	1,21	1,21	1,32



# IX. Anhang

Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,21	0,15	0,16
<b>TH</b>	2,39	<b>0,55</b>	<b>0,67</b>
Probenzahl (n)	11	11	11
Standardfehler	0,17	0,06	0,10
<b>TH K</b>	2,21	2,10	2,25
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	0,13	0,11	0,16

Testbedingung	Harnsäure [μmol/l]		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
<b>TN</b>	267,9	257,0	249,0
Probenzahl (n)	11	11	11
Standardfehler	32,36	22,29	19,36
<b>TN K</b>	262,1	236,8	225,1
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	23,35	26,25	26,33
<b>TH</b>	311,0	<b>357,1</b>	<b>319,4</b>
Probenzahl (n)	11	11	11
Standardfehler	26,17	23,54	24,87
<b>TH K</b>	283,5	268,3	219,6
Probenzahl (n)	10	10	10
Standardfehler	41,16	31,04	29,60

Testbedingung	Insulin [μg/l]				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
<b>TN</b>	1,13	<b>2,53</b>	<b>1,57</b>	<b>1,25</b>	0,82
Probenzahl (n)	11	11	11	11	11
Standardfehler	0,24	0,22	0,30	0,29	0,21
<b>TN K</b>	0,69	0,21	0,25	0,47	0,41
Probenzahl (n)	10	9	10	10	10
Standardfehler	0,21	0,06	0,07	0,17	0,11
<b>TH</b>	1,14	<b>2,75</b>	<b>2,09</b>	0,93	0,75
Probenzahl (n)	11	11	11	11	11
Standardfehler	0,14	0,25	0,24	0,13	0,15
<b>TH K</b>	1,69	1,16	1,16	1,06	1,12
Probenzahl (n)	10	9	10	10	10
Standardfehler	0,32	0,21	0,21	0,17	0,18

Testbedingung	Glucagon [ng/l]				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
<b>TN</b>	576,3	<b>304,7</b>	<b>175,2</b>	<b>352,8</b>	<b>507,9</b>
Probenzahl (n)	11	11	11	11	11
Standardfehler	47,33	42,08	25,00	33,54	43,85
<b>TN K</b>	626,8	712,3	674,5	666,5	679,7
Probenzahl (n)	10	9	10	10	10
Standardfehler	56,32	41,01	44,92	37,27	43,69
<b>TH</b>	473,0	<b>257,8</b>	<b>151,8</b>	<b>240,0</b>	442,9
Probenzahl (n)	11	11	11	11	11
Standardfehler	21,75	16,65	9,08	22,66	18,60
<b>TH K</b>	480,0	517,7	477,9	488,2	500,0
Probenzahl (n)	10	9	10	10	10
Standardfehler	31,02	25,13	19,70	31,55	29,47

AREA UNDER CURVE	Glucose	FFS	ßHB	Harnsäure	Insulin	Glucagon
TN	478,2	23,6	40,77	15464	78,74	21593
TH	583,4	18,03	62,52	20168	77,32	17013

**Tab. A7: Signifikanzen der Unterschiede der mittleren Metabolit- und Hormonkonzentration zwischen Testtieren und Versuchstieren zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt beim i.v. Tolbutamidtest unter den gegebenen verschiedenen Versuchsbedingungen („nüchtern“ N, „hungernd“ H)**

Testbedingung	Glucose				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
TN T-K	ns: p=0,8569	ns: p=0,8110	<b>s: p=0,0022</b>	<b>s: p&lt;0,0001</b>	<b>s: p&lt;0,0001</b>
TH T-K	ns: p=0,9250	ns: pM-W=0,4082	s: pM-W=0,072	<b>s: pM-W=0,001</b>	<b>s: p&lt;0,0001</b>

Testbedingung	FFS		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
TN T-K	ns: p=0,7156	<b>s: p&lt;0,0001</b>	<b>s: pM-W=0,0002</b>
TH T-K	ns: p=0,0601	<b>s: p&lt;0,0001</b>	ns: pM-W=0,148

Testbedingung	βHB		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
TN T-K	ns: p=0,4804	s: pM-W=0,003	s: p=0,0046
TH T-K	ns: p=0,4232	s: pM-W=0,0001	s: pM-W=0,0002

Testbedingung	Harnsäure		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
TN T-K	ns: p=0,8882	ns: p=0,5681	ns: p=0,4675
TH T-K	ns: p=0,5724	s: p=0,0326	s: p=0,0176

Testbedingung	Insulin				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
TN T-K	ns: p=0,1907	s: pM-W=0,0002	s: pM-W=0,001	s: pM-W=0,011	ns: p=0,1123
TH T-K	ns: pM-W=0,2453	s: p=0,0002	s: pM-W=0,012	ns: p=0,5450	ns: p=0,1349

Testbedingung	Glucagon				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
TN T-K	ns: p=0,4982	s: p<0,0001	s: pM-W=0,012	s: p<0,0001	s: p=0,0122
TH T-K	ns: p=0,8537	s: p<0,0001	s: pM-W=0,0001	s: p<0,0001	ns: p=0,111

AUC	Glucose	FFS	βHB	Harnsäure	Insulin	Glucagon
AUC TN T-K	s: p<0,0001	s: p<0,0001	s: p=0,0077	ns: p=0,5914	s: pM-W=0,001	s: p<0,0001
AUC TH T-K	s: p<0,0001	s: p=0,0002	s: p<0,0001	ns: p=0,0597	ns: p=0,4294	s: pM-W=0,0002

**Tab. A8: Signifikanzen der Unterschiede der mittleren Metabolit- und Hormonkonzentration zwischen den Versuchsgruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt beim i.v. Tolbutamidtest unter den gegebenen verschiedenen Versuchsbedingungen („nüchtern“ N, „hungernd“ H)**

Testbedingung	Glucose				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
TN vs TH	ns: p=0,2312	s: p=0,027	s: p<0,0001	s: p<0,0001	s: p=0,0006

Testbedingung	FFS		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
TN vs TH	ns: p=0,2739	s: p=0,0013	ns: p=0,0707

Testbedingung	$\beta$ HB		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
TN vs TH	<b>s: p&lt;0,0001</b>	ns: pM-W=0,052	ns: p=0,6961

Testbedingung	Harnsäure		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
TN vs TH	ns: p=0,7674	<b>s: p=0,0058</b>	<b>s: p=0,0372</b>

Testbedingung	Insulin				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
TN vs TH	ns: p=0,9613	ns: p=0,5073	ns: p=0,1902	ns: pM-W=0,4701	ns: p=0,8033

Testbedingung	Glucagon				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
TN vs TH	<b>s: pM-W=0,018</b>	ns: p=0,3116	ns: p=0,3895	<b>s: p=0,0114</b>	ns: p=0,1872

AUC	Glucose	FFS	$\beta$ HBA	Harnsäure	Insulin	Glucagon
TN vs TH	<b>s: p&lt;0,0001</b>	<b>s: p=0,0094</b>	<b>s: p=0,0107</b>	<b>s: p=0,0202</b>	ns: p=0,9242	<b>s: p=0,0228</b>

**Tab. A9: Signifikanzen der Unterschiede der mittleren Metabolit- und Hormonkonzentration zwischen den Versuchsgruppen zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt zwischen i.v. Tolbutamidtest und i.v. GTT unter den gegeben verschiedenen Versuchsbedingungen („nüchtern“ N, „hungernd“ H)**

Testbedingung	Glucose				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
TN-GTTN	ns: pM-W=0,7676	<b>s: p&lt; 0,0001</b>	<b>s: pM-W&lt; 0,0001</b>	<b>s: p&lt; 0,0001</b>	<b>s: p&lt; 0,0001</b>
TH-GTTH	ns: p=0,8265	<b>s: p&lt; 0,0001</b>	<b>s: p&lt; 0,0001</b>	<b>s: pM-W= 0,0001</b>	<b>s: p&lt; 0,0001</b>

Testbedingung	FFS		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
TN-GTTN	ns: p=0,6598	ns: pM-W=0,3711	ns: pM-W=0,1855
TH-GTTH	ns: p=0,3202	ns: p=0,3202	ns: pM-W=0,9718

# IX. Anhang

Testbedingung	$\beta$ HB		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
TN-GTTN	ns: p=0,7511	ns: p=0,9021	ns: p=0,3542
TH-GTTH	ns: p=0,6136	ns: p=0,9974	<b>s: p=0,0029</b>

Testbedingung	Harnsäure		
Zeit p.i. (min)	0	30	60
TN-GTTN	ns: p=0,1641	<b>s: p=0,0140</b>	<b>s: p=0,0084</b>
TH-GTTH	ns: p=0,1053	ns: pM-W=0,062	ns: p=0,4216

Testbedingung	Insulin				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
TN T-K	ns: p=0,4731	<b>s: p=0,0009</b>	<b>s: p=0,0001</b>	<b>s: pM-W=0,0288</b>	ns: p=0,5488
TH T-K	ns: pM-W=0,3598	<b>s: p=0,0011</b>	<b>s: p&lt; 0,0001</b>	ns: p=0,5109	ns: p=0,2593

Testbedingung	Glucagon				
Zeit p.i. (min)	0	5	10	30	60
TN-GTTN	ns: p=0,7187	ns: p=0,7552	ns: p=0,8227	<b>s: p=0,0034</b>	ns: p=0,2311
TH-GTTH	ns: p=0,9676	ns: p=0,2744	<b>s: p=0,028</b>	<b>s: p=0,0076</b>	<b>s: pM-W=0,0025</b>

AUC	Glucose	FFS	$\beta$ HBA	Harnsäure	Insulin	Glucagon
AUC TN-GTTN	<b>s: p&lt; 0,0001</b>	ns: pM-W=0,4234	ns: p=0,7691	<b>s: p=0,0114</b>	<b>s: p=0,0089</b>	ns: p=0,2874
AUC TH-GTTH	<b>s: p=0,0002</b>	ns: p=0,3626	ns: p=0,6921	ns: pM-W=0,2453	<b>s: p=0,0009</b>	ns: p=0,0682

2. Darstellung der mittleren Konzentrationsverläufe von Metaboliten und Hormonen nach i.v.-NaCl-Injektion (K) unter den Versuchsbedingungen „nüchtern“ (N), „hungernd“ (H) und „hungernd und unter Phlorizineinfluss“ (HP)

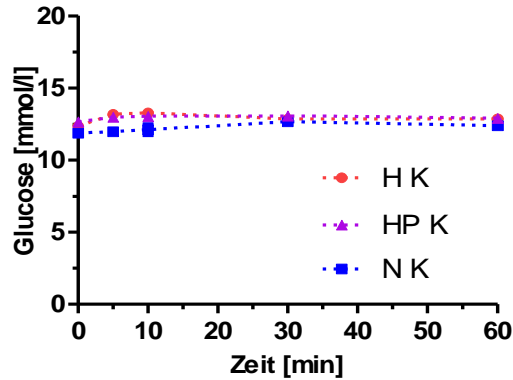


Abb. A1: Mittlere Glucosekonzentration im Blutplasma nach i.v. NaCl-Injektion unter den Versuchsbedingungen "nüchtern", "hungernd" und "hungernd und unter Phlorizineinfluss"

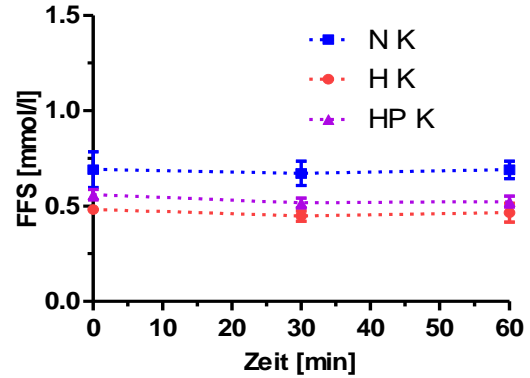


Abb. A2: Mittlere FFS-Konzentration im Blutplasma nach i.v. NaCl-Injektion unter den Versuchsbedingungen "nüchtern", "hungernd" und "hungernd und unter Phlorizineinfluss"

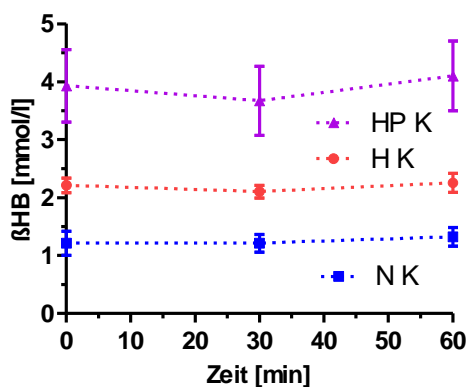


Abb. A3: Mittlere βHB-Konzentration im Blutplasma nach i.v. NaCl-Injektion unter den Versuchsbedingungen "nüchtern", "hungernd" und "hungernd und unter Phlorizineinfluss"

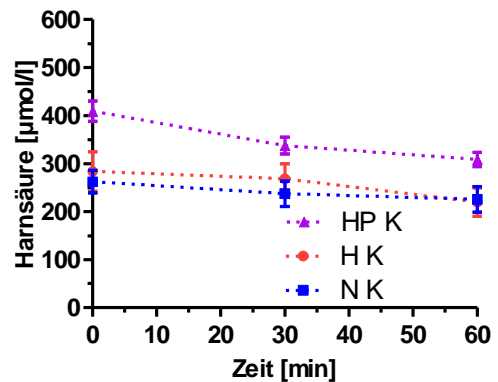


Abb. A4: Mittlere Harnsäurekonzentration im Blutplasma nach i.v. NaCl-Injektion unter den Versuchsbedingungen "nüchtern", "hungernd" und "hungernd und unter Phlorizineinfluss"

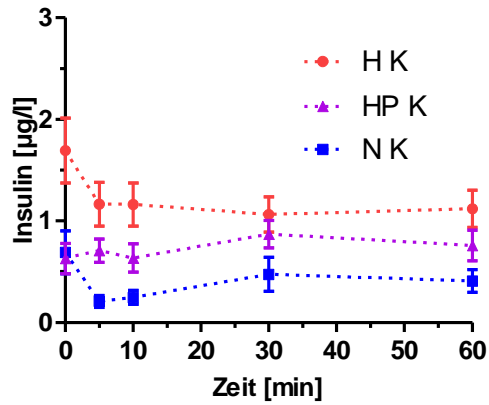


Abb. A5: Mittlere Insulinkonzentration im Blutplasma nach i.v. NaCl-Injektion unter den Versuchsbedingungen "nüchtern", "hungernd" und "hungernd und unter Phlorizineinfluss"

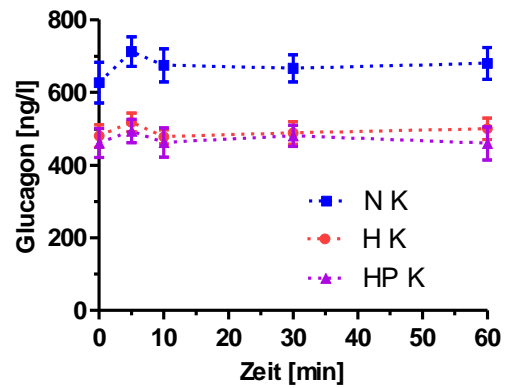


Abb. A6: Mittlere Glucagonkonzentration im Blutplasma nach i.v. NaCl-Injektion unter den Versuchsbedingungen "nüchtern", "hungernd" und "hungernd und unter Phlorizineinfluss"

---

## **X. Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. M. Stangassinger für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation und für die stetigen konstruktiven Anregungen.

Ich danke Frau Dr. Janine Schneider für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Tierversuche und Frau Sieglinde Hirmer für das geduldige Beantworten diverser Fragen rund um die Arbeit im Labor.

Ich danke Prof. John McMurtry (Animal & Natural Resources in Beltsville, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture) für die Bereitstellung des Hühnerinsulins zur Validierung des RIA.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Stein von der Klinik für Vögel für die Lösung aller Probleme rund um Venenverweilkatheter beim Huhn sowie die Bereitstellung der Transportboxen.

Den Laborantinnen der Klinik für Innere Medizin der Kleintiere und der Klinik für Wiederkäuer danke ich für die Durchführung der Analysen von Glucose, FFS,  $\beta$ HB und Harnsäure.

Vielen Dank auch an Herrn Fritz Meggendorfer für die Betreuung der Versuchstiere.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Partner für die stete liebevolle Unterstützung und den festen Glauben daran, dass diese Arbeit fertig gestellt wird.