

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

Angefertigt am Klinikum der Universität München  
Medizinische Klinik und Poliklinik IV Endokrinologie

Mentor: Dr. Martin Bidlingmaier

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Eckhard Wolf

**Auswirkung präanalytischer Einflussgrößen auf die  
Konzentrationen ausgewählter Stoffwechselhormone -  
sowie Einfluss von Alter und Fastendauer auf  
spezifische Stoffwechselhormone bei der Ratte**

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

von

Sarah-Teresa Popp

aus Wiesbaden

München 2015

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Meiner lieben Familie

## INHALTSVERZEICHNIS

I.	<b>EINLEITUNG – BEDEUTUNG VON PRÄANALYTIK IN DER MESSUNG BESTIMMTER STOFFWECHSELHORMONE IM BLUT VON RATTEN .....</b>	<b>1</b>
II.	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
1.	<b>analytische, biologische und präanalytische Variabilität .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Analytische Variabilität.....	4
1.2.	Biologische Variabilität.....	4
1.3.	Präanalytische Variabilität .....	7
1.3.1.	Unterschiedliche Untersuchungsmaterialien.....	7
1.3.2.	Verschiedene Blutentnahmetechniken .....	8
1.3.3.	Einhaltung einer ununterbrochenen Kühlkette.....	8
1.3.4.	Zentrifugation.....	9
1.3.5.	Schutz vor Proteolyse – der Zeitraum von der Blutentnahme bis zum Einfrieren.....	10
1.3.6.	Einfrier-Auftau-Zyklen .....	10
1.3.7.	Detektion von Fehlerquellen in der Präanalytik.....	11
2.	<b>Untersuchte Hormone und deren Hormonsysteme .....</b>	<b>13</b>
2.1.	GH-IGF-System .....	13
2.1.1.	Wachstumshormon.....	13
2.1.2.	IGF-I und IGF-II .....	13
2.1.3.	Insulin-like Growth Factor Binding Proteine -2 und -3 .....	14
2.2.	Inkretineffekt und Inkretinhormone .....	15
2.2.1.	Inkretineffekt .....	15
2.2.2.	Inkretinhormone GIP und GLP-1 .....	16
2.3.	Weitere Stoffwechselhormone .....	17
2.3.1.	Insulin.....	17
2.3.2.	Leptin .....	17
2.3.3.	Ghrelin.....	18
III.	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
1.	<b>Tiermodell und Haltung .....</b>	<b>19</b>
1.1.	Tiermodell und Haltung der Versuchsreihe „präanalytische Varianz“ .....	19

---

1.2.	Tierschutz und Genehmigung .....	19
1.3.	Tiermodell und Haltung der Versuchsreihe „biologische Varianz“ .....	19
<b>2.</b>	<b>Versuchsdurchführung</b> .....	<b>20</b>
2.1.	Versuchsdurchführung der Versuchsreihe „präanalytische Varianz“ .....	20
2.2.	Versuchsdurchführung der Versuchsreihe „biologische Varianz“ .....	20
2.3.	Probenaufbereitung .....	21
2.3.1.	Probenaufbereitung der Versuchsreihe „präanalytische Varianz“ .....	21
2.3.2.	Probenaufbereitung der Versuchsreihe „biologische Varianz“ .....	23
2.4.	Materialien .....	24
2.4.1.	Serum-Plasma .....	24
2.4.2.	Proteaseinhibitoren .....	24
2.4.2.1.	Allgemeine Proteaseinhibitoren .....	24
2.4.2.2.	DPP-4-Inhibitor .....	24
2.4.3.	Salzsäure .....	25
2.5.	Immunassays .....	25
2.5.1.	Ablauf eines Sandwich-Assays .....	26
2.5.2.	Messung von IGF-I .....	27
2.6.	Glukose-Oxidase-Test .....	29
2.7.	Statistische Auswertung .....	29
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>31</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchung verschiedener präanalytischer Einflussgrößen auf ausgewählte metabolische Hormone (Versuchsreihe „präanalytische Varianz“)</b> .....	<b>31</b>
1.1.	Lebendgewichtsmessung .....	31
1.2.	Wachstumshormon .....	32
1.3.	IGF-I .....	33
1.4.	IGF-II .....	35
1.5.	IGFBP-2 .....	36
1.6.	IGFBP-3 .....	37
1.7.	Gesamt-GIP .....	39
1.8.	Aktives GLP-1 .....	41
1.9.	Insulin .....	42
1.10.	Leptin .....	44
1.11.	Gesamt-Ghrelin .....	46

---

1.12.	Acyliertes Ghrelin .....	47
<b>2.</b>	<b>Untersuchung verschiedener biologischer Einflussgrößen auf ausgewählte metabolische Hormone (Versuchsreihe „biologische Varianz“) .....</b>	<b>48</b>
2.1.	Lebendgewichtsmessung .....	50
2.2.	Glukosekonzentration im Blut der Ratten .....	50
2.3.	Insulinkonzentration im Blut der Ratten .....	51
2.4.	IGF-I-Konzentration im Blut der Ratten .....	54
2.5.	Gesamt-Ghrelin-Konzentration im Blut der Ratten .....	56
2.6.	Gesamt-GIP-Konzentration im Blut der Ratten .....	58
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
<b>1.</b>	<b>Auswirkung der Auswahl unterschiedlicher Probenmaterialien auf GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, Gesamt-GIP, aktives GLP-1, Insulin, Leptin und Gesamt-Ghrelin .....</b>	<b>63</b>
<b>2.</b>	<b>Einfluss des Zusatzes von Proteaseinhibitoren zu Blutproben auf GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, Gesamt- GIP, aktives GLP-1, Insulin, Leptin und Gesamt-Ghrelin .....</b>	<b>64</b>
<b>3.</b>	<b>Wirkung von Transport-, Bearbeitungs-, und Aufbewahrungskonditionen auf GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP- 3, Gesamt- GIP, aktives GLP-1, Insulin, Leptin und Gesamt-Ghrelin .....</b>	<b>65</b>
<b>4.</b>	<b>Folgen von mehrfachen Einfrier-Auftau-Zyklen auf GH, IGF-I, IGF- II, IGFBP-2, IGFBP-3, Gesamt- GIP, aktives GLP-1, Insulin, Leptin und Gesamt-Ghrelin .....</b>	<b>66</b>
<b>5.</b>	<b>Auswirkung von Ansäuern des Probenmaterials mit HCl auf GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, Gesamt- GIP, aktives GLP-1, Insulin, Leptin und Gesamt-Ghrelin .....</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Biologische Variabilität.....</b>	<b>69</b>
6.1.	Einfluss der Fastendauer auf Glukose, Insulin, IGF-I, Gesamt-Ghrelin und Gesamt-GIP bei Ratten.....	70
6.2.	Einfluss des Alters auf Glukose, Insulin, IGF-I, Gesamt-Ghrelin und Gesamt-GIP bei Ratten.....	72

---

<b>7.</b>	<b>Kritik der Methoden .....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>74</b>
<b>VI.</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>77</b>
<b>VII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>VIII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>80</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>82</b>
<b>X.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>XI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>86</b>
<b>XII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>103</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ALS	Acid-Labile Subunit (säurelabile Untereinheit)
AUC	Area Under the Curve
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DPP-4	Dipeptidylpeptidase-4
DPP-4-inh.	Dipeptidylpeptidase-4-Inhibitor
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide
GH	Growth Hormone (Wachstumshormon)
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GOD	Glukose-Oxidase
h	Stunden
HCl	Salzsäure
IGF-I	Insulin-like Growth Factor I
IGF-II	Insulin-like Growth Factor II
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IGFBP-2	Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2
IGFBP-3	Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
PPR	Polypropylenröhrchen
Prot	Proteaseinhibitor
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
u.a.	unter anderem

## **I. EINLEITUNG – BEDEUTUNG VON PRÄANALYTIK IN DER MESSUNG BESTIMMTER STOFFWECHSELHORMONE IM BLUT VON RATTEN**

Die Messung von Hormonen dient meist der Erforschung, Diagnostik und Therapiekontrolle von Erkrankungen. Unstimmigkeiten in den Konzentrationen dieser Analyten werden häufig der biologischen Variabilität zugeordnet und die präanalytische Variabilität als Ursache vernachlässigt. In der Humanmedizin wird die Präanalytik als ernstzunehmende Fehlerquelle bereits regelmäßig und mit steigendem Interesse untersucht. In der Veterinärmedizin gab es bereits auch erste Studien diesbezüglich, jedoch nur vereinzelt (BRAUN et al., 2015).

Plebani beschäftigte sich mit präanalytischen Abläufen in Krankenhäusern und führte die meisten Abweichungen in Laboruntersuchungen auf Fehler während prä- und postanalytischen Prozessen und nur zu einem geringen Prozentsatz auf die eigentliche Analytik zurück (PLEBANI, 2006). Im Anschluss an solche Studien wurden Standardprotokolle (SOPs) für Probenentnahme, -vorbereitung, -transport und -aufbewahrung herauszugeben und versucht die Fehlerquote so gering wie möglich zu halten. Nach wie vor halten sich nur wenige Untersucher an diese Vorgaben, da nicht allen bewusst ist, wie stark die Messergebnisse während der Präanalytik beeinflusst werden können (LOEFFEN et al., 2012; SIMUNDIC & LIPPI, 2012). Für Blutentnahmen bei Ratten gibt es von verschiedenen Einrichtungen SOPs (TVT, 2009; JONES, 2012). In diesen Anleitungen wird meist nur auf die richtige Technik der Blutprobenentnahme eingegangen und weniger auf die Vor- und Nachbereitung der Arbeitsmaterialien. So können unter anderem die Auswahl des passenden Gefäßes, Hämolyse oder Lipämie die Konzentration des zu messenden Analyten beeinflussen (SHELL, 2014). Zusätzlichen Faktoren der Präanalytik, die das messbare Ergebnis der Proben auch beeinflussen können, werden in SOPs häufig nicht erwähnt. Deswegen ist es wichtig, auf dem Gebiet der Präanalytik noch mehr Aufklärung zu leisten. Sowohl die Auswahl des Untersuchungsmaterials, als auch dessen Bearbeitung durch Zusätze, stellen potentielle Faktoren dar, die die Konzentration des zu untersuchenden Analyten signifikant beeinflussen können. Andere Prozesse, wie Einfrier-Auftau-Zyklen und die ungekühlte Aufbewahrung des Probenmaterials bis zum Einfrierprozess, sind

ebenfalls einflussnehmende Komponenten.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit intensiv auf die präanalytische Variabilität, im Speziellen in der Messung von Stoffwechselhormonen bei Ratten, eingegangen. Es soll aufgezeigt werden, welchen Einfluss unterschiedliche Untersuchungsmaterialien und Probenbearbeitungen auf die gemessenen Konzentrationen ausgewählter Stoffwechselhormone haben.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. analytische, biologische und präanalytische Variabilität

Die drei Grundbausteine der Versuchsdurchführung sind Präanalytik, Analytik und Postanalytik. Die Präanalytik setzt sich zusammen aus Probenentnahme, -vorbereitung, -transport und -aufbewahrung. Die Analytik umfasst die Messung des zu untersuchenden Analyten und die Postanalytik beschreibt die Datenübertragung, Befunddarstellung und Diskussion der gemessenen Ergebnisse. Die Präanalytik variiert aufgrund biologischer, analytischer und präanalytischer Variabilität. Die Konzentration eines jeden gemessenen Hormons unterscheidet sich durch Divergenzen, die innerhalb dieser drei Variablen auftreten, unabhängig von der Analysemethode. Mit der biologischen Variabilität beschäftigen sich die meisten Studien, da hier das Interesse der Forschungsgruppen am größten ist und auch die Erforschung von Erkrankungen im Vordergrund steht. Die analytische Variabilität wurde in der Vergangenheit bereits umfangreich untersucht, unter anderem in Hinblick auf Kontamination oder Hämolyse von Blutproben (IJAZ et al., 2010; DAVIDSON, 2014).

Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, wie sich diese Faktoren der analytischen Variabilität auf Stoffwechselformone bei der Ratte auswirken. Während der präanalytischen Phase werden aktuell die meisten Unstimmigkeiten detektiert. Schon mehrmals wurde in der Humanmedizin bewiesen, dass bis zu 77% der Messfehler während der präanalytischen Phase entstehen (PLEBANI, 2006; HOOIJBERG et al., 2012; DAVIDSON, 2014) und zusätzlich unterschiedliche Probenvorbehandlungen eine potentielle Fehlerquelle darstellen (BECAN-MCBRIDE, 1999; BONINI et al., 2002; LIPPI et al., 2011). Sowohl die Auswahl des Untersuchungsmaterials, als auch dessen Bearbeitung mit Zusätzen und die nachfolgende Beeinflussung durch Einfrier-Auftau-Prozesse, stellen potentielle Faktoren dar, die die Konzentration des zu untersuchenden Analyten verändern können. Sie werden jedoch selten beachtet.

Um auf das Potential möglicher Quellen für Konzentrationsänderungen von Hormonen aufmerksam zu machen, wurde in dieser Arbeit spezifisch auf die präanalytische Variabilität in der Messung von diversen Stoffwechselformonen im Serum oder EDTA-Plasma von Ratten eingegangen. Es sollte gezeigt werden, welchen Einfluss unterschiedliche Untersuchungsmaterialien und

Probenbearbeitungen auf die gemessenen Konzentrationen spezifischer Stoffwechselhormone haben können.

### **1.1. Analytische Variabilität**

Bisher am intensivsten erforscht ist der Bereich der analytischen Variabilität. Aufgrund unterschiedlicher Analysemethoden, wie Immunassay, Massenspektrometrie oder Western Blot, gibt es Varianzen in den Konzentrationen der gemessenen Analyten. Innerhalb dieser Methoden können wiederum unterschiedliche Arten der Hormonmessung zu verschiedenen Ergebnissen führen, je nachdem auf welche Weise das Hormon in dem jeweiligen Verfahren detektiert wurde. So gibt es zum Beispiel kompetitive und nicht-kompetitive Immunassays. Diese beiden Arten von Immunassays können mit unterschiedlichen Detektionsmöglichkeiten arbeiten, nämlich Radioaktivität, Enzymen, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz (STRASBURGER & BIDLINGMAIER, 2005). Immunassays können sich sowohl innerhalb verschiedener Chargen als auch untereinander unterscheiden (BIELOHUBY et al., 2012; MANOLOPOULOU et al., 2012), weswegen es sinnvoll ist, für die Bestimmung der Parameter einer Versuchsreihe stets denselben Test, der gleichen Firma, aus einer Charge, zu benutzen. Um Pipettier- und Materialfehler ausschließen zu können, werden bei der Durchführung von Immunassays standardmäßig Konzentrationsbestimmung pro Probe doppelt durchgeführt. Der Variationskoeffizient gibt die Ungenauigkeit der Messmethode im Vergleich beider Analysewerte an und ist ein wichtiger Parameter in der Interpretation der Ergebnisse (PERRIG & AUJESKY, 2011). Des Weiteren sollten die Hormonmessungen stets von einem möglichst kleinen Personenkreis durchgeführt werden, um Fehler durch unterschiedliche Arbeitsweisen zu vermeiden (CARRARO & PLEBANI, 2007).

### **1.2. Biologische Variabilität**

Die biologische Variabilität ist die zweite Varianzkomponente in der Probenanalytik. Sie entsteht durch interindividuelle Unterschiede, die durch genetische, epigenetische, andere endogene, sowie exogene Faktoren bedingt sind. Gängige Beispiele der genetischen Komponente stellen die Stoffwechsellage und die genetische Modifikation dar, ein epigenetischer Faktor ist das eigene Verhalten.

Zu den exogenen Komponenten werden die Nahrungsaufnahme, Jahreszeit und der zirkadiane Rhythmus gezählt und zu den endogenen Bedingungen das Alter, Geschlecht und der Zyklusstand (DHAHER et al., 2012; MANOLOPOULOU et al., 2012; RATTO et al., 2012). Laut dem Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz wurden im Jahr 2011 für Tierversuche in Deutschland am häufigsten Mäuse (*Mus musculus*), Ratten (*Rattus norvegicus*) und Fische (*Pisces*), sowie Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) und Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) verwendet. Mäuse werden am häufigsten untersucht, gefolgt von Ratten. Bei Nagern, im Gegensatz zum Menschen, besteht der Vorteil, nahezu gleiche, kontrollierbare Bedingungen schaffen zu können. Variabilität in Messgrößen, die beim Menschen, u.a. durch unterschiedliche Lebens- und Ernährungsweisen, entstehen könnte, kann bei Nagetieren durch Standardisierung der Haltungsbedingungen erheblich reduziert werden. Durch Auswahl bestimmter Labortierstämme kann die genetische Varianz minimiert oder auch bewusst groß gewählt werden. Die Haltung, Ernährung und Probenentnahmen können ohne größeren Aufwand standardisiert ablaufen. Somit werden Nagetiere, aufgrund ihrer Größe, Lebensweise und ihres Lebenszyklus, häufig als Tiermodelle für Fragestellungen der biomedizinischen Forschung verwendet.

Für diese Forschungsarbeit wurden größere Mengen Vollblut als Untersuchungsmaterial benötigt. Das maximal gewinnbare Blutvolumen von Mäusen hätte für diese Arbeit nicht ausgereicht, weswegen Ratten als Versuchstiere ausgewählt wurden. Männliche Ratten wiegen etwa 450-520 g, weibliche 250-300 g. Sie haben ein Blutvolumen von 54-70 ml/kg (WOLFENSOHN & LLOYD, 2003). Es gibt ingezüchtete Rattenstämme, Hybridratten aus Inzuchtlinien, sowie Auszuchtlinien, deren genetische Variabilität mit diesen speziellen Zuchtschemata möglichst groß gehalten wird.

Die am häufigsten verwendeten Auszuchtstämme sind Wistar, Long Evans und Sprague Dawley. Die letzteren beiden stammen von der Wistar Ratte ab (STENGEL et al., 2010; FRAGA et al., 2011; PARADA et al., 2013). Für diese Arbeit wurden ausschließlich Wistar Ratten verwendet, über mögliche stammspezifische Unterschiede kann daher keine Aussage getroffen werden.

Meist werden männliche Ratten als Versuchstiere ausgewählt, da sie geringeren hormonellen Schwankungen unterliegen als weibliche Tiere. Beim Menschen sind bereits viele Hormone mit sexueller Divergenz erforscht worden. Es wurde aufgeklärt, in welchem Ausmaß diese Hormone diverse Abläufe im Körper

beeinflussen können (MURRAY et al., 1975; GOOREN & GILTAY, 2013; MARTEL, 2013). Bei Ratten besteht diesbezüglich für viele Hormone noch Klärungsbedarf, obwohl schon einige untersucht worden sind (RANDS et al., 2012; HAGHIR et al., 2013). Für Versuche, die Einflüsse weiblicher Sexualhormone auf diverse Prozesse im Körper klären sollen, werden zwangsläufig weibliche Ratten verwendet. Oft bleibt von einer solchen Studie Untersuchungsmaterial übrig. Diese Proben könnten für weitere Studien verwendet werden, meist ist aber unklar, ob dieses Material zur Messung weiterer Stoffwechselhormone geeignet ist. Es ist fragwürdig, ob die Ergebnisse, aus Studien mit männlichen Ratten, bedenkenlos mit den Ergebnissen aus Messungen mit weiblichen Ratten oder Mischgruppen verglichen werden könnten (CHANOINE et al., 2006; TAKEO et al., 2009; REIMER et al., 2010; FRAGA et al., 2011).

Einen weiteren Faktor der biologischen Variabilität stellt das Alter der Versuchstiere dar. Für die meisten Studien werden Ratten im Alter von 11-14 Wochen verwendet (KINDEL et al., 2010; FRAGA et al., 2011). Bisher sind in der aktuellen Literatur kaum Hinweise auf altersabhängige Veränderungen von Hormonmesswerten bei Ratten zu finden. Folglich ist unklar, ob Messergebnisse von 11 Wochen alten Ratten, mit denen von 14 Wochen alten und älteren Tieren, bedenkenlos verglichen werden könnten.

Zusammengefasst besteht für das Labortier Ratte noch Aufklärungsbedarf, inwiefern Faktoren der biologischen und experimentell bedingten Variabilität die Messwerte von zirkulierenden Hormonen beeinflussen können.

Für die Messung von Stoffwechselhormonen wird geraten Vollblut von nüchternen Ratten zu gewinnen, um fütterungsbedingte Varianz zu minimieren. Die OECD empfiehlt bei Ratten, zur Messung von verschiedenen Werten, wie Gallensäuren und Harnstoff, als auch anderer Werte der klinischen Chemie, einen Fastenzeitraum von 12-18 Stunden (OECD, 2008). Auch die „Society of Toxicologic Pathology“ hat Leitlinien zur Messung diverser Analyten in Hämatologie, klinischer Chemie und Urinanalyse bei Ratten herausgegeben und hält das Fasten „über Nacht“, das 12 Stunden entspricht, für angemessen (WEINGAND et al., 1992). Im Jahr 2009 haben Kale et al. die Auswirkungen der Fastendauer auf die Hämatologie und Standardwerte der klinischen Chemie bei Ratten untersucht. Sie haben bei den meisten Parametern, wie zum Beispiel Hämoglobin, Glukose und Triglyzeriden, signifikante Veränderungen nach 16-stündiger Fastendauer festgestellt, im Vergleich zum Fastenbeginn. Deswegen empfehlen sie eine Fastendauer von

maximal 16 Stunden für präklinische Studien (KALE et al., 2009).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Empfehlungen bezüglich der Dauer des Fastens von Ratten, sollte, gerade für neu entdeckte Hormone, geklärt werden, welche Fastendauer für die Messung dieser Analyten empfehlenswert ist.

### **1.3. Präanalytische Variabilität**

Die präanalytische Variabilität beschreibt Unterschiede in Messwerten, die durch unterschiedliche Probengewinnung, -vorbehandlung und -aufbewahrung entstehen. Um diese Varianzkomponente zu reduzieren, geben verschiedene Hersteller von Immunassays Empfehlungen zur Probenbearbeitung heraus. Zum Beispiel den Hinweis Einfrier-Auftau-Zyklen zu vermeiden (m/rIGFBB-2 ELISA, Mediagnost, Reutlingen, Deutschland; Rat/Mouse GIP (total), Millipore, Billerica, U.S.A.) oder die Vorschrift, den Blutproben innerhalb von 30 Sekunden DPP-4-Inhibitor zuzusetzen und die Proben anschließend sofort auf Eis kaltzustellen (Rodent Active GLP-1 (7-36) Specific ELISA Kit, Epitope Diagnostics, Inc., San Diego, U.S.A.). Darüber hinaus gibt es keine Angaben über eventuelle zusätzliche nötige präanalytische Schritte und wie sich eine Missachtung der gesetzten Vorgaben auf die Messergebnisse auswirkt. Diese Problematik kommt in Laboratorien auf, die aus vorangegangenen Studien bereits bearbeitetes Probenmaterial besitzen und dieses für weitere Studien verwenden wollen würden.

#### **1.3.1. Unterschiedliche Untersuchungsmaterialien**

Als Untersuchungsmaterialien werden in der Forschung mit Nagetieren in der Regel Serum, Plasma, Liquor, Urin und Gewebe diverser Organe verwendet. Hormone werden bevorzugt in Serum oder Plasma gemessen. Dieses kann auf unterschiedliche Weise vorbehandelt werden, um die Molekülstrukturen der enthaltenen Proteine für die Aufbewahrungsphase zu stabilisieren oder um es für das entsprechende Messverfahren vorzubereiten. Durch Zusatz von Gerinnungshemmern, wie Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA; 1,2-2,0 mg/ml Blut), Natriumfluorid (NaF), Lithiumheparinat (Li-H) oder Natrium-Citrat, entstehen Chelatkomplexe mit Kalziumkationen. Die für die Blutgerinnung nötigen Kalziumkationen werden in Chelatkomplexen gebunden und das Blut kann nicht mehr gerinnen. Das Plasma wird durch Zentrifugation und anschließendes

Separieren vom Blutkuchen gewonnen und ist für viele Untersuchungsmethoden verwendbar. Des Weiteren können andere Stoffe, wie zum Beispiel Proteaseinhibitoren, zugegeben werden, die Proteine vor dem Abbau schützen können. Proteasen spalten verschiedene Proteine und Molekülstrukturen und somit auch Hormone auf. Diese Fragmente können gegebenenfalls von einem Hormontest detektiert werden. Folglich sind die Messwerte höher als die tatsächliche Konzentration des intakten Hormons. Eine Ursache zu gering detektierter Hormonkonzentrationen könnte eine veränderte 3D-Struktur des zu bestimmenden Moleküls sein. Der Immunassay kann folglich das Hormon nicht mehr detektieren. Somit sollte vor der Messung des Analyten bekannt sein, ob und wie sich seine Struktur durch die Probenvorbehandlung verändern könnte.

### **1.3.2. Verschiedene Blutentnahmetechniken**

Einen wichtigen Faktor der Präanalytik stellt die Entnahme des Blutes dar. Die Methode sollte möglichst stressarm und schnell erfolgen, um eine Verfälschung der Hormonkonzentrationen, zum Beispiel durch die Ausschüttung von Stresshormonen, zu vermeiden. Zu den verschiedenen Blutentnahmetechniken bei Nagern zählen die Dekapitation, Entfernung eines kleinen Teils der Schwanzspitze, Inzision oder Punktion der Schwanzvene und Punktion des retrobulbären Venenplexus oder der Vena jugularis (CONYBEARE et al., 1988; DIEHL et al., 2001; TOFT et al., 2005; CHRISTENSEN et al., 2009; TVT, 2009). Je nach Entnahmestelle kann venöses, arterielles oder Mischblut gewonnen werden. Bisher ist noch nicht bekannt, inwieweit sich die Hormonkonzentrationen in venösem, arteriellem oder Mischblut unterscheiden und inwieweit die Messergebnisse, von Hormonen bei Nagetieren, von der Blutentnahmestelle bzw. -technik abhängig sind.

### **1.3.3. Einhaltung einer ununterbrochenen Kühlkette**

Nach der Gewinnung von Serum- und Plasmaproben verweilen diese für gewöhnlich für einen gewissen Zeitraum ungekühlt oder auf Eis. Es ist technisch schwierig die gewonnenen Proben sofort weiterzubearbeiten. Bisher ist unklar, ob es essentiell ist, Probengefäße, für die Messung von Stoffwechselhormonen bei der Ratte, vorzukühlen, um eine möglichst schnelle Abkühlung der Probe zu erreichen. Auch ist strittig, ob das gewonnene Material bis zur sofortigen Weiterverarbeitung

ununterbrochen gekühlt und bei einer möglichst konstanten Temperatur aufbewahrt werden sollte. Es konnte keine entsprechende Studie diesbezüglich gefunden werden. Zusätzlich ist die Temperatur, bei welcher die Zentrifugation von Serum- und Plasmaproben stattfinden sollte, umstritten. Aus der aktuellen Literatur ist zusätzlich nicht herauszulesen, ob das Probenmaterial, für die Messung von Stoffwechselformonen bei der Ratte, bei einer bestimmten Temperatur zentrifugiert werden sollte. In der Humanmedizin gibt es diesbezüglich einige wenige Veröffentlichungen, die die Bedingungen für jedes Hormon einzeln validiert haben (VAN IERSSEL et al., 2010; YAE et al., 2012).

Folglich ist bisher die Priorität einer ununterbrochenen Kühlkette, von der Probenabnahme bis zum Einfrierprozess, in der Hormonforschung bei der Ratte, noch nicht genauer untersucht.

#### **1.3.4. Zentrifugation**

Ein weiteres Thema stellen die Zentrifugationsbedingungen (Drehzahl, Dauer, Temperatur) dar. Für die Messung zirkulierender Hormonenkonzentrationen bei Ratten werden sowohl Serum als auch EDTA-Plasma untersucht. Bezüglich der Zentrifugationsbedingungen des Probenmaterials variieren die Literaturangaben und es scheinen noch keine Leitlinien diesbezüglich veröffentlicht worden zu sein. So geben Kindel et al. die Zentrifugation bei 4000 x g zehn Minuten bei 4°C an, Tseng et al. zentrifugieren ohne Geschwindigkeitsangabe 30 Minuten lang bei 4°C und Stengel et al. beschreiben, dass das Material bei 3000 x g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurde (TSENG et al., 1999; KINDEL et al., 2010; STENGEL et al., 2010). In einem Buch aus der Veterinärmedizin wird, für die Trennung von Serum und Plasma von ihren zellulären Bestandteilen, ein Standardwert von 2000 x g 10 Minuten, ohne Temperaturangabe, angegeben (SIROLIS, 2015).

Für einzelne Hormone gibt es bereits Referenzbereiche für Zentrifugationsbedingungen und Kühlung nach Probenentnahme. Laut diesen Autoren ist es jedoch unerlässlich, diese Referenzbereiche für jedes Hormon einzeln zu validieren (VAN IERSSEL et al., 2010; YAE et al., 2012; SCHAFFER-SOMI et al., 2013). Hieraus wird ersichtlich, dass die Einflüsse der Zentrifugationsbedingungen, für die Hormonmessung bei der Ratte, noch intensiver untersucht werden sollten.

### **1.3.5. Schutz vor Proteolyse – der Zeitraum von der Blutentnahme bis zum Einfrieren**

Der Gesamtzeitraum von der Blutprobenentnahme bis zum Einfrieren des Serums und Plasmas sollte möglichst kurz gehalten werden, um die Proteine vor der Proteolyse zu schützen. Diesbezüglich haben Tvarijonaviciute et al. am Hund herausgefunden, dass acyliertes Ghrelin sehr instabil ist und innerhalb einer Stunde nach Probenentnahme gemessen werden sollte oder das zu untersuchende Material zeitnah einzufrieren sei. Für die Messung von Gesamt-Ghrelin konnten die Proben hingegen, ohne Verfälschung des Messergebnisses, 6 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C aufbewahrt werden (TVARIJONAVICIUTE et al., 2013). Über die Aufbewahrung von Serum und Plasma zur Messung anderer Stoffwechselformone, insbesondere bezüglich der Ratte, weist die aktuelle Literatur Lücken auf. In der Genetik haben Yae et al. unterschiedliche Aufbewahrungskonditionen nach dem Zentrifugieren und ihren Einfluss auf die Messung molekularer Marker von Koagulantien (lösliches Fibrin, Thrombin-Antithrombin-Komplex, Thrombomodulin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Komplex) untersucht. Sie konnten für einige Analyten einen Einfluss durch zu hohe Temperaturen feststellen (YAE et al., 2012).

Folglich ist es wichtig zu wissen, welche Analyten instabil sind und keiner langen Bearbeitungszeit ausgesetzt werden sollten. Es ist anzuraten, die maximale Verweildauer bei Raumtemperatur eines jeden Hormons in Erfahrung zu bringen und inwieweit die messbaren Konzentrationen durch Proteolyse signifikant beeinflusst werden könnten.

### **1.3.6. Einfrier-Auftau-Zyklen**

Nach dem Abtrennen von Serum und Plasma von ihren zellulären Bestandteilen werden Proben nicht immer aliquotiert, sondern teilweise in Einzelgefäße überführt und anschließend aufbewahrt. Bis alle Messungen einer laufenden Studie beendet sind, wird folglich das gleiche Probenmaterial mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen unterzogen. Es ist durchaus möglich, dass die Probe zusätzlichen Einfrier-Auftau-Zyklen unterzogen wird, wenn weitere Studien aus diesem Restmaterial durchgeführt werden. Einige Hersteller von Immunassays geben Empfehlungen heraus, wie oft eine Probe maximal vor der Messung mit ihrem Assay aufgetaut werden sollte, bis sich deren Messergebnisse in diesem Test verändern könnten.

Dies kann jedoch nicht verallgemeinert werden und sollte für jeden Assay einzeln validiert werden. So geben zum Beispiel Mediagnost und Millipore in den Anleitungen ihrer Enzymimmunoassays zur quantitativen Bestimmung von IGFBB-2 bzw. GIP total an, man solle unbedingt wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen vermeiden. Jedoch werden keine genauen Angaben darüber gemacht, ab wie vielen Zyklen das Ergebnis verfälscht wird (m/rIGFBB-2 ELISA, Mediagnost, Reutlingen, Deutschland; Rat/Mouse GIP (total), Millipore, Billerica, U.S.A.). Es gibt aktuell keine auffindbare Literatur, die sich mit Einfrier-Auftau-Zyklen von Stoffwechselformonen bei der Ratte beschäftigt. Lediglich beim Hund haben Tvarijonavičute et al. bezüglich der Untersuchung von Ghrelin herausgefunden, dass zur Messung von Gesamt-Ghrelin, egal, ob Serum, Plasma oder Plasma mit Zusatz von Proteaseinhibitoren, bis zu drei Einfrier-Auftau-Zyklen, keine Verfälschung der Messergebnisse zur Folge hatten (TVARIJONAVIČUTE et al., 2013). Paltiel et al. haben 2008 die Konzentrationsveränderungen von bis zu 100 Einfrier-Auftau-Zyklen mit menschlichem Plasma in großen Blutbildern und klinischer Chemie untersucht. Bis zu zehn Zyklen haben die untersuchten Analyten kaum beeinflusst, ab 30 Einfrier-Auftau-Zyklen traten signifikante Unterschiede in den Messergebnissen von freien Fettsäuren, AST und Triglyceriden auf. Natrium, Cholesterin und Vitamin E blieben stabil (PALTIEL et al., 2008).

Somit ist es ratsam, für jedes Hormon das untersucht werden soll, die maximal mögliche Frequenz von Einfrier-Auftau-Zyklen zu kennen, bis sich dessen Konzentration in einem Immunassay verändert. Ideale Voraussetzungen werden geschaffen, wenn zu Beginn einer Studie geplant wird, wie oft Probenmaterial aufgetaut werden muss und dementsprechend das Serum oder Plasma auf eine bestimmte Anzahl von Probengefäßen verteilt wird.

### **1.3.7. Detektion von Fehlerquellen in der Präanalytik**

In Bezug auf die drei oben genannten Einflussgrößen biologische, analytische und präanalytische Variabilität, ist die Präanalytik bisher mit Abstand am geringsten erforscht. Mit einer Fehlerquote von bis zu 70% (im Vergleich zu Analytik und Postanalytik) in der Humanmedizin hat die Präanalytik einen starken Einfluss auf Messergebnisse und deren Verwertbarkeit in Studien (BIELOHUBY et al., 2012). Seit geraumer Zeit wird die Präanalytik als ernstzunehmender gewichtiger Faktor realisiert und analysiert. Aktuell ist die Fehlerquote im Be- und Verarbeiten von

Probenmaterial nach wie vor hoch, weswegen darauf geschlossen werden kann, dass Vorkehrungen zur korrekten Ausführung der Präanalytik nur mäßig umgesetzt werden (BECAN-MCBRIDE, 1999; LAPOSATA & DIGHE, 2007; GILOR & GILOR, 2011; LIPPI et al., 2011). In der Messung von Hormonen ist diese Problematik bereits als Thema aufgegriffen worden (RAFF & SLUSS, 2008; BELLOMO et al., 2012). Es ist in den letzten Jahren ein verstärktes Bewusstsein für Fehlerquellen in der Präanalytik, insbesondere in der Humandiagnostik, entstanden. Im Forschungsbereich der Nagetiere wurde bislang nur wenig Aufklärung auf diesem Sektor geleistet, obwohl es in jedem Forschungsgebiet die gleiche Priorität einnehmen sollte (CHRISTENSEN et al., 2009). Einheitliche Blutentnahmeprotokolle, vor allem in der Forschung mit Nagern, sind noch nicht in jedem Labor Standard. Es wird Untersuchungsmaterial einer vorhergehenden Studie für Folge- oder Vergleichsstudien verwendet, ohne die Vorbehandlung des Materials in die Ergebnisse der Folgestudie einzubeziehen. Dieses Material ist womöglich unter anderen Bedingungen gewonnen oder bearbeitet worden. Folglich ist es riskant die Ergebnisse von unterschiedlichen Versuchsreihen miteinander zu vergleichen, da signifikante Unterschiede zwischen neu gebildeten Vergleichsgruppen unter Umständen nur auf unterschiedlicher Behandlung der Proben basieren.

Um den Einfluss verschiedener Komponenten der Präanalytik aufzeigen zu können, werden einige mögliche Fehlerquellen dieser Problematik in der vorliegenden Arbeit untersucht. Es wird aufgezeigt, in welchem Ausmaß vorbehandelte Proben und die Verwendung unterschiedlicher Probenmaterialien, Konzentrationen von diversen Analyten bei der Ratte, beeinflussen können.

## **2. Untersuchte Hormone und deren Hormonsysteme**

### **2.1. GH-IGF-System**

Das GH-IGF-System ist ein komplexes Regulationssystem, das auf Wachstum und Zelldifferenzierung gesunder und maligner Zellen einwirkt. Diverse Vorgänge im Körper, wie zum Beispiel Wachstum, Glukose-, Protein- und Triglyzeridstoffwechsel, als auch Elektrolythaushalt, werden durch dieses System beeinflusst (NAWROTH & ZIEGLER, 2013). Die wichtigsten Komponenten des GH-IGF-Systems sind das Wachstumshormon (GH), der Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I), der Insulin-Like Growth Factor-II (IGF-II), Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 bis -6 (IGFBP-1 bis -6), sowie die zwei IGF-Rezeptoren, der IGF-I-Rezeptor (IGF-I-R) und der IGF-II-Rezeptor (IGF-II-R).

#### **2.1.1. Wachstumshormon**

Das Wachstumshormon (Growth Hormone; GH) ist ein Peptidhormon und wird hauptsächlich in den  $\alpha$ -Zellen der Adenohypophyse, unter Einfluss von Growth Hormone Releasing Hormon gebildet und in Vesikeln gespeichert (KLEINE & ROSSMANITH, 2010). Jeglicher Verbrauch von Energie im Körper stellt einen Stimulus für die GH-Produktion dar (NAWROTH & ZIEGLER, 2013), sowie ein erhöhter Laktat Spiegel im Blut bei Ratten (SALGUEIRO et al., 2014). Die Ausschüttung von GH erfolgt pulsatil nach zirkadianer Rhythmik, wobei im Schlaf, vor allem im Tiefschlaf, die größte Ausschüttung stattfindet (DAVIDSON, 1987). Indirekt wirkt GH auf Zellproliferation und –differenzierung, durch Stimulation der IGF-I-Produktion in der Leber (JONES & CLEMMONS, 1995). Ein direkter Einfluss wird über den GH-Rezeptor in bestimmten Zielgeweben, wie Fett, Muskulatur und Knochen vermittelt. Beispielsweise auf Adipozyten wirkt es lipolytisch und bei Mäusen führt ein GH-Mangel zu vermehrter Fetteinlagerung ins Gewebe (BERRYMAN et al., 2011).

#### **2.1.2. IGF-I und IGF-II**

IGF-I und IGF-II wirken als Wachstumsfaktoren auf Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Zirkulierendes IGF-I wird vorrangig durch Stimulation von GH in der Leber gebildet, wohingegen IGF-II von verschiedenen Geweben

produziert wird (KLEINE & ROSSMANITH, 2010). Die IGF-I-Konzentration im Blutkreislauf ist alters- und geschlechtsabhängig, weshalb bei der Auswertung von Tests zur Bestimmung von IGF-I, stets die biologische Variabilität zu beachten ist. Bidlingmaier et al. haben 2014 einen IGF-I-Assay für die Humanmedizin validiert und zusätzlich Referenzwerte diesbezüglich aufgestellt. Frauen hatten über den kompletten Lebenszeitraum hinweg stets niedrigere IGF-I-Konzentrationen als Männer. Die IGF-I-Konzentration nimmt nach der Geburt leicht ab und steigt dann sofort stetig an, bis sie in der Pubertät einen Gipfel erreicht. Anschließend sinkt die IGF-I-Konzentration lebenslang ab (BIDLINGMAIER et al., 2014). IGF-I ist auch am Glukose- und Fettstoffwechsel beteiligt (JONES & CLEMMONS, 1995). Es kann, zusätzlich zum Insulin, die Aufnahme von Glukose in die Zellen, stimulieren. Dadurch wird die hepatische Glukoneogenese vermindert und die Glykogensynthese und Insulinsensitivität gesteigert (ZAPF et al., 1986; CLEMMONS, 2004). IGF-II stimuliert nicht nur Wachstums- und Differenzierungsvorgänge diverser Zellen, es reguliert auch überschießendes Wachstum und Entartung (KLEINE & ROSSMANITH, 2010). Holland et al. fanden 1997 bei Rindern heraus, dass IGF-II vermehrt in der fetalen Phase gebildet wird und ist für eine gesunde Embryonalentwicklung nötig ist (HOLLAND et al., 1997). Bei Mäusen reduziert sich die IGF-II-Konzentration postnatal stetig. In dieser Lebensphase hat IGF-II Einfluss auf diverse endokrinologische Vorgänge in Leber, Niere und Darm und wirkt auf das Organwachstum von Hoden und Nebennieren ein (WOLF et al., 1994). Modi et al. entdeckten 2014 bei Mäusen eine autokrine Regulation der  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Glutamin stimulierte die IGF-II-Synthese und IGF-II-Sekretion, wodurch die Größe und Funktion der  $\beta$ -Zellen direkt gesteuert wurde (MODI et al., 2014).

### **2.1.3. Insulin-like Growth Factor Binding Proteine -2 und -3**

Seit den 1980er Jahren wurden bisher sechs Insulin-like Growth Factor Binding Proteine (IGFBPs) identifiziert. Sie gleichen einander strukturell zu 35% und haben eine hohe Bindungsaffinität für IGF-I und IGF-II. Die IGFBPs hemmen die IGFs, haben aber auch IGF-unabhängige Effekte. Durch Steuerung der Bioverfügbarkeit von IGF-I und -II beeinflussen sie deren Effekte auf diverse Gewebe, abhängig davon in welchem physiologischen oder pathophysiologischen Zustand sich das Gewebe befindet und in welchem Gewebe die IGFs wirken sollen (SHIMASAKI

& LING, 1991; RAJARAM et al., 1997; WOLF et al., 2000). Um die Halbwertszeit der IGFs zu verlängern, werden diese in einem Tertiärkomplex gebunden. Dieser setzt sich meist aus einem IGF, einem IGFBP-3 oder IGFBP-5 und einer säurelabilen Untereinheit (ALS) zusammen. IGFBP-3 ist das wichtigste Bindungsprotein für IGF-I und IGF-II. 75-80% der IGFs werden in so einem Komplex gebunden, bis sie an IGF-Rezeptoren binden oder durch Proteolyse im Extrazellulärraum abgebaut werden (ZAPF et al., 1986; LEROITH, 1996; DAUGHADAY, 2000). Neben ihrer Aufgabe als Bindungsproteine haben die IGFBPs weitere Wirkmechanismen. IGFBP-2 ist ein sensitiver Tumormarker für das Fortschreiten vieler maligner Tumorarten, obwohl die Höhe der Konzentration von IGFBP-2 im Blut keinen Hinweis auf ein erhöhtes Tumorrisiko beim Menschen darstellt (HOEFLICH et al., 2001). Eine hohe IGFBP-2-Konzentration bei Lungenkrebs lässt jedoch auf geringe Überlebenschancen schließen (GUO et al., 2013). IGFBP-3 reguliert die Zellproliferation. Es fördert den apoptotischen Effekt in Krebszellen, entweder durch Sequestrierung von IGF-I und folglich eine verminderte Aktivierung des IGF-I-Rezeptors oder IGFBP-3 bindet direkt an vermeintliche Rezeptoren, die den Zelltod einleiten (SHAHJEE & BHATTACHARYYA, 2014).

## **2.2. Inkretineffekt und Inkretinhormone**

### **2.2.1. Inkretineffekt**

Inkretine sind spezielle Hormone, die auf das endokrine Pankreas wirken und die Insulinausschüttung fördern. Der Inkretineffekt beschreibt die Tatsache, dass nach oraler Glukoseaufnahme die Insulinausschüttung, aus den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln, höher ist als nach einer isoglykämischen intravenösen Glukoseapplikation. Erstmals äußerten Benjamin Moore et al. 1906 die Vermutung, dass auch eine Reaktion in der Darmmukosa eine Insulinausschüttung aus dem Pankreas hervorruft (MOORE et al., 1906). Aktuell sind die zwei Hormone, Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) und Glukagon-Like Peptide-1 (GLP-1), für den Anstieg des Insulinspiegels im Blutkreislauf nach oraler Glukoseaufnahme verantwortlich. Der Anteil des Inkretineffekts an der Insulinausschüttung beträgt 20-80% (SHUSTER et al., 1988; HOLST et al., 2008). Hierbei wird durch GIP, im Gegensatz zum GLP-1, bis zu 75% der

Insulinstimulation beim Menschen ausgelöst (NAUCK et al., 1993).

### **2.2.2. Inkretinhormone GIP und GLP-1**

In den 70er Jahren wurde GIP als erstes Inkretinhormon entdeckt (BROWN et al., 1970). Es wird von den K-Zellen sezerniert, die vor allem in Duodenum und Jejunum vorkommen (BUFFA et al., 1975; ORSKOV et al., 1987). Nach Nahrungsaufnahme steigt die GIP-Konzentration und im Folgenden wird die Insulinausschüttung, aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, angeregt (CLEATOR & GOURLAY, 1975). Neben seiner Wirkung auf die Insulinausschüttung hat GIP auch einen positiven Einfluss auf die Knochenstärke und Kollagenqualität (MIECZKOWSKA et al., 2015).

GLP-1 wurde als weiteres Inkretinhormon erstmals in Anglerfischen entdeckt (GHIGLIONE et al., 1984; SIEGENTHALER & BLUM, 2006). Es wird sowohl aus den A-Zellen des Pankreas als auch den L-Zellen des Ileums, Kolons und Rektums nach Nahrungsaufnahme sezerniert (EISSELE et al., 1992). Es fördert, wie GIP, ebenfalls die Insulinausschüttung aus dem Pankreas (GHIGLIONE et al., 1984). Zusätzlich senkt es die Glukagonsynthese, reduziert die Magensaftsekretion und verzögert die Magenentleerung (ORSKOV, 1992). Nicht nur bei der Nahrungsaufnahme, sondern auch bei der Trinkwasseraufnahme spielt GLP-1 eine Rolle. Bei Ratten reduziert endogenes GLP-1 das Durstgefühl, über die Beeinflussung des Sättigungszentrums. Eine Wasseraufnahme durch Trinken hat einen direkten Einfluss auf die zentrale GLP-1-Bildung, flüssige Futteraufnahme hingegen wirkt auf die zentrale und periphere GLP-1-Genexpression. Folglich können einzelne Elemente des GLP-1-Systems, getrennt voneinander, auf die Verdauung verschiedener Nahrungsmittel unterschiedlich einwirken (MCKAY et al., 2014).

Die kurze Halbwertszeit von zwei bis drei Minuten von GIP und GLP-1 im Blutkreislauf ist bedingt durch deren schnelle Inaktivierung. Während ihrer Passage durch die Leber werden GIP und GLP-1 abgebaut, bis ihre Metaboliten in den Nieren eliminiert werden (SARSON et al., 1982; SCHJOLDAGER et al., 1989; DEACON, 2004).

### **2.3. Weitere Stoffwechselformone**

#### **2.3.1. Insulin**

Insulin wird in den  $\beta$ -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas gebildet und in speziellen Vesikeln, die sich vom Golgi-Apparat abschnüren, gespeichert. Nach Nahrungsaufnahme erfolgt die Insulinausschüttung pulsatil in zwei Phasen. Die erste Phase erstreckt sich etwa über zehn Minuten und verläuft mit einer erhöhten Insulinausschüttung. In der anschließenden Phase erfolgt eine geringere Ausschüttung von Insulin in die Blutbahn, welche hingegen mehrere Stunden andauern kann. Nach der Ausschüttung zerfallen die Insulin-Hexamere in Di- und Monomere, wodurch sie an Insulinrezeptoren binden können (LÖFFLER G. et al., 2007). Die Hauptfunktion des Insulins besteht im Transport der Glukose in die Zellen. Eine weitere Insulin-vermittelte Wirkung ist die Steuerung der Glukoseverwertung in den Skelettmuskeln und dem Fettgewebe. In der Leber steigert Insulin die Glykogensynthese, Lipogenese und Aminosäurebildung sowie in Muskel- und Fettzellen die Bildung von ATP (LÖFFLER G. et al., 2007; KLEINE & ROSSMANITH, 2010). Systemisch betrachtet kann eine akut auftretende hepatische Insulinresistenz zu Hyperglykämie und sogar zu einem sich anschließenden Myokardinfarkt bei Ratten führen (WANG et al., 2015a).

#### **2.3.2. Leptin**

Leptin wird hauptsächlich von Adipozyten synthetisiert, in geringerem Maße auch in Magenschleimhaut, Ovar, Mamma, fetalem Gewebe, Gehirn und Hypothalamus (MORASH et al., 1999; BRANN et al., 2001). Es zirkuliert, größtenteils proteingebunden, in der Blutbahn und wirkt auf Rezeptoren im zentralen Nervensystem, sowie in Pankreaszellen (SINHA et al., 1996). Die Plasmaleptinkonzentration korreliert positiv mit der Masse an Fettgewebe im Körper. Sowohl Fasten als auch Gewichtsverlust führen zu einer Abnahme der Leptinkonzentration im Blutkreislauf (MAFFEI et al., 1995). Eine erhöhte Leptinkonzentration reduziert das Hungergefühl im Sättigungszentrum des Gehirns über Rezeptoren im Hypothalamus (GELDSZUS et al., 1996; BLUM, 1997). Im Tiermodell wurde der Einfluss von Leptin auf neuronale Verknüpfungen untersucht. Leptin ist in der synaptischen Weiterleitung ein entscheidender Faktor für das Auftreten von Angstzuständen. Mit einer Antagonisierung des

Leptinrezeptors konnten Angstzustände bei Ratten vollständig reduziert werden (WANG et al., 2015b).

### **2.3.3. Ghrelin**

Ghrelin wird hauptsächlich in den X/A-ähnlichen endokrinen Zellen der Mukosa des Magenfundus synthetisiert und endokrin sezerniert (DATE et al., 2000; WANG et al., 2002). Die aktive Form ist der acylierte Zustand (acyliertes Ghrelin, active Ghrelin) und die inaktive Form heißt Desacyl-Ghrelin. Sie ist im Gegensatz zur aktiven Form nicht über Serin mit der Oktanoylgruppe verestert (KOJIMA et al., 1999). Eine hohe Ghrelinkonzentration stimuliert die Nahrungsaufnahme und bei Hungerzuständen wird dieses Hormon vermehrt ausgeschüttet. Neben seinen endokrinen Effekten wirkt Ghrelin auch parakrin und führt so zu einer Erhöhung der gastrointestinalen Motilität und zu Sekretion von Magensäure (MASUDA et al., 2000). In der Krebstherapie wurde die Wirkung von menschlichem Ghrelin auf den Gastrointestinaltrakt, nach Ganzkörperbestrahlung von Ratten, getestet. Nach Behandlung mit menschlichem Ghrelin zeigten die Tiere geringere gastrointestinale Schäden und die Sterblichkeitsrate sank im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant (WANG et al., 2015c).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Tiermodell und Haltung

##### 1.1. Tiermodell und Haltung der Versuchsreihe „präanalytische Varianz“

Neun Ratten des Stammes Wistar Han, männliche ( $n = 7$ ) und weibliche ( $n = 2$ ), zwölf Wochen alt (Charles River Germany, Sulzfeld), wurden in der Tierhaltung des Klinikums der Universität München, Medizinische Klinik und Poliklinik VI, gehalten. Die Tiere lebten einzeln in Polykarbonat-Käfigen (Makrolon® Typ 3, Bayer, Leverkusen; Maße: 37 x 21 x 15cm), die Raumtemperatur betrug  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , die Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 10 \%$ . Als Einstreu wurden Sägespäne (Lignocel® Sägespäne, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg) verwendet. Die Ratten hatten pelletiertes Alleinfutter (ssniff® Futtermittel für Ratten und Mäuse, Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Beleuchtungsperiode erstreckte sich von 9<sup>00</sup> bis 21<sup>00</sup> Uhr (MEZ) über zwölf Stunden. Der Akklimatisationszeitraum betrug zwei Wochen.

##### 1.2. Tierschutz und Genehmigung

Alle Tierversuche standen im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und wurden von der Regierung von Oberbayern unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531-105-09 genehmigt.

##### 1.3. Tiermodell und Haltung der Versuchsreihe „biologische Varianz“

Für eine weitere Versuchsreihe wurden männliche Ratten des Stamms Wistar Han gehalten, 16 Tiere im Alter von zwölf Wochen und 16 im Alter von einem Jahr. Auch sie lebten in Einzelhaltung in der Tierhaltung des Klinikums der Universität München, Medizinische Klinik und Poliklinik VI. Die Tiere wurden in Polykarbonat-Käfigen (Makrolon® Typ 3, Bayer, Leverkusen; Maße: 37 x 21 x 15cm) mit einer Raumtemperatur von  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  und Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 10\%$  gehalten. Als Einstreu wurden Sägespäne (Lignocel® Sägespäne, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg) verwendet. Die Ratten hatten pelletiertes Alleinfutter (ssniff®

Futtermittel für Ratten und Mäuse, Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Beleuchtungsperiode erstreckte sich über zwölf Stunden und die Akklimationsperiode betrug zwei Wochen.

## **2. Versuchsdurchführung**

### **2.1. Versuchsdurchführung der Versuchsreihe „präanalytische Varianz“**

Zu Versuchsbeginn wurde den 14 Wochen alten weiblichen ( $n = 2$ ) und männlichen ( $n = 3$ ) Ratten, jeweils sechs Stunden vor der Blutentnahme, das Futter entzogen, die restlichen vier Ratten wurden nicht gefastet. Alle Tiere wurden vor der Blutentnahme gewogen (Sartorius Competence CP2201). Die Narkose wurde per Isofluran-getränkten Baumwolltupfern eingeleitet (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethyl-ether) (Florene Nr. B506, ABBOTT Inhalationsnarkotikum), die in ein Glasgefäß gelegt wurden, in dem sich das Isofluran gasförmig ausbreiten konnte. Das jeweilige Umsetzen der Tiere in die Schale der Waage bzw. in das Glasgefäß, zum Narkotisieren, geschah durch Griff an der Schwanzwurzel. In Narkose wurden die Tiere dekapitiert, das Blut aus den Arteriae carotides mit Hilfe eines Trichter aufgefangen und gleichmäßig auf, in Eis vorgekühlte, Polypropylenröhrchen (PPR) verteilt. Vier PPR für EDTA-Plasma (S-Monovette® 2,7ml K3E, Sarstedt) wurden befüllt und sofort wieder auf Eis gekühlt. Ein PPR mit EDTA-Plasma und ein PPR für Serum (S-Monovette® 4,7ml Z-Gel, Sarstedt, Nümbrecht) wurden ungekühlt vorbereitet, befüllt und bis zum Einfrieren ungekühlt aufbewahrt.

### **2.2. Versuchsdurchführung der Versuchsreihe „biologische Varianz“**

In diesem Versuchsabschnitt sollte ein langer Zeitraum des Fastens untersucht werden. Um eine lange Fastenzeitspanne zu schaffen, wurden Blutentnahmezeitpunkte nüchtern von 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18 Stunden, in wachem Zustand, festgelegt. Den ersten acht Ratten wurde ab dem Zeitpunkt 0 Blut entnommen, den zweiten acht Stück nach einer zehnstündigen Fastenperiode. Diese Aufteilung war nötig, da Ratten ein geringes Gesamtblutvolumen besitzen und eine derartige Anzahl Blutentnahmen auch nicht mit dem Tierschutzgesetz vereinbar sind. Einer Kontrollgruppe mit freiem Zugang zu Nahrung wurde jeweils

zu den gleichen Zeitpunkten Blut entnommen.

Vor Versuchsbeginn wurden die Ratten gewogen (Sartorius Competence CP2201). Die Blutentnahme erfolgte zu den verschiedenen Zeitpunkten jeweils aus der Schwanzvene. Zu jedem Blutentnahmezeitpunkt wurden jeweils 400µl Vollblut in ein vorgekühltes Polypropylenröhrchen mit EDTA gefüllt. Dieses wurde im Anschluss mit 4µl DPP-4-Inhibitor (DPP-IV inhibitor®, Millipore, Billerica, Mass., USA) und 60µl Proteaseinhibitor (complete®, Roche, Schweiz) versetzt und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gekühlt. Beim fünften Blutentnahmezeitpunkt wurden die Tiere, wie schon im ersten Versuch, narkotisiert und anschließend dekapitiert. Das Mischblut wurde in vorgekühlten PPR aufgefangen. Zu jedem Blutentnahmezeitpunkt wurde der Blutglukosespiegel mit Hilfe von Glukose-Oxidase-Test gemessen.

### **2.3. Probenaufbereitung**

#### **2.3.1. Probenaufbereitung der Versuchsreihe „präanalytische Varianz“**

In **Abbildung 1** wird folgende Probenaufbereitung bildlich dargestellt. Ein EDTA-PPR und Serum wurde separiert und ungekühlt bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Die restlichen Proben wurden bis zur Zentrifugation auf Eis gekühlt. Ein EDTA-PPR blieb unbehandelt, zwei weitere EDTA-Plasmen wurden mit Proteaseinhibitor (Prot) (complete®, Roche, Schweiz), zu 15% des Vollblutes, versetzt, dem letzteren Röhrchen wurde zusätzlich DPP-4-Inhibitor (DPP-IV inhibitor®, Millipore, Billerica, Mass., USA) (DPP-4-inh.), zu 1% des Vollblutes, beigefügt.

Zehn Minuten lang wurden die gewonnenen Vollblutproben bei 3000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C zentrifugiert (Heraeus Multifuge X3R Centrifuge, Thermo Scientific Inc., Rochester, U.S.A.) und anschließend mit Hilfe von Pipetten (Eppendorf Reference®, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in Kryoröhrchen zu 1,8ml (Nunc Kryoröhrchen, Thermo Fischer Scientific Inc.) aliquotiert. Das Volumen des gewonnenen Materials wurde gleichmäßig auf zehn PPR aufgeteilt. Folglich wird pro Analyse nur ein Probenröhrchen aufgetaut, um Einfrier-Auftau-Zyklen zu vermeiden. Das mit Prot vorbehandelte EDTA-Plasma aus dem letzten PPR, wurde nach dem Zentrifugieren zusätzlich mit 1-molarer

Salzsäure (HCl) des EDTA-Plasmas und Prot versetzt (20µl HCl / 100µl Plasma). Die Menge des gewonnenen Serums wurde gleichmäßig in zwei Hälften geteilt und darauffolgend jeweils in zehn PPR aliquotiert. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt, wobei der eine Teil des Serums einen Auftau-Einfrier-Zyklus durchlaufen hat. Zehn Mal wurden diese Proben bis auf 22°C Zimmertemperatur aufgetaut und anschließend wieder bei -80°C eingefroren. Bis zum weiteren Gebrauch wurden diese Proben bei -80°C aufbewahrt.

Somit wurden folgende Untersuchungsmaterialien in unterschiedlichen Bedingungen hergestellt:

1. Serum (Serum)
2. Serum nach zehn Mal einfrieren und auftauen (Serum frieren/tauen)
3. EDTA-Plasma, das bis zum Einfrieren ungekühlt aufbewahrt wurde (EDTA ungekühlt)
4. EDTA-Plasma, das während der Bearbeitung ununterbrochen gekühlt wurde (EDTA auf Eis)
5. EDTA-Plasma, welches mit Prot versetzt und ununterbrochen gekühlt wurde (EDTA+Prot)
6. EDTA-Plasma, das mit Prot und DPP-4-inh. versetzt und ununterbrochen gekühlt wurde (EDTA+Prot+DPP-4-inh.)
7. EDTA-Plasma, welches mit Prot und HCl versetzt und ununterbrochen gekühlt wurde (EDTA+Prot+HCl)

Die Zusätze wurden auf folgende Weise gewonnen: Prot wurde durch Lösen einer Tablette complete® mini in 1,5ml destilliertem Wasser hergestellt (150µl / 1ml Vollblut). DPP-4-Inhibitor (DPP-IV inhibitor®, Millipore) war in flüssiger gebrauchsfertiger Form vorhanden (10µl / 1ml Vollblut). 1-molare HCl entstand durch die Verdünnung von 5-molarer HCl (Salzsäure 5mol/l (5N), Apotheke Innenstadt Uni München, München, Germany) mit vier Teilen destilliertem Wasser (aqua ad iniectabilia Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany).



## **2.4. Materialien**

### **2.4.1. Serum-Plasma**

Blutserum, kurz Serum genannt, besteht aus den flüssigen Bestandteilen des Blutes. Durch Zentrifugation von geronnenem Blut wird der Blutkuchen mit den zellulären Bestandteilen, wie Blutplättchen, roten und weißen Blutkörperchen, vom Überstand, dem Serum, getrennt. Das Serum, welches nun kein Fibrin mehr enthält, wird vom Blutkuchen abpipettiert und in ein anderes Gefäß überführt. Es besteht zu 91% aus Wasser (H<sub>2</sub>O). Den Rest bilden unter anderem Proteine, vor allem Albumin und Globuline, Elektrolyte, organische Säuren, Fette, Nährstoffe, Hormone und Stoffwechselendprodukte des Körpers.

Blutplasma enthält im Gegensatz zu Serum noch alle Gerinnungsfaktoren. Es wird durch Zusatz von Gerinnungshemmern zu Vollblut gewonnen. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abpipettiert und zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **2.4.2. Proteaseinhibitoren**

#### **2.4.2.1. Allgemeine Proteaseinhibitoren**

Proteaseinhibitoren dienen der Hemmung von Peptidbindungshydrolyasen, kurz Peptidasen, welche Enzyme sind, die Proteine und Peptide spalten. Plasmaproteine dienen der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Blutkreislauf, als Puffer zur Einstellung des pH-Wertes im Blut und als Transportmedium für Hormone und Enzyme. Proteaseinhibitoren verlangsamen somit die Spaltung der Proteine im Probenmaterial und führen damit zu verlässlicheren Messwerten als bei unbehandelten Proben.

#### **2.4.2.2. DPP-4-Inhibitor**

Der Inhibitor der Dipeptidylpeptidase-4, kurz DPP-4-Inhibitor (DPP-4-inh.), stellt eine spezielle Art von Proteaseinhibitor dar. Er hemmt das Enzym Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4), das regulär das Hormons Glukagon-Like Peptide 1 (GLP-1) abbaut. Solange der DPP-4-Inhibitor mit dem DPP-4 interagiert kann dieses GLP-1 nicht abbauen. Durch Zugabe von DPP4-Inhibitor zu einer Blutprobe direkt nach

dessen Entnahme wird somit die Messung von intaktem GLP-1 aus diesem Material ermöglicht.

### **2.4.3. Salzsäure**

Um in einer Probe acyliertes Ghrelin messen zu können wird aktuell dazu geraten, diese mit Salzsäure (HCl) anzusäuern (LIU et al., 2008). Ghrelin ist ein Peptidhormon, das in seiner aktiven Form an der dritten Aminosäure Serin, bei manchen Tierarten auch Threonin, mit Oktansäure verestert ist. Die Salzsäure verhindert die Abspaltung der Säuregruppe und somit den Übergang in die inaktive Form. Aktives Ghrelin kann folglich nur gemessen werden, wenn das Material angesäuert wurde. Gesamt-Ghrelin sollte nicht in angesäuerten Proben gemessen werden.

## **2.5. Immunassays**

In einem immunchemischen Verfahren wird der Nachweis eines Analyten, wie zum Beispiel eines Hormons oder Proteins, in einer Antigen-Antikörper-Reaktion erbracht.

Antigene sind Substanzen, ab einer Größe von etwa 5000 Dalton, an die sich Antikörper binden können. Auf diesen Antigenen befinden sich Epitope, welche spezifische Bindungsstellen unterschiedlicher räumlicher Struktur auf deren Oberfläche darstellen. An diese Epitope können Antikörper binden. Somit kann für jedes Epitop ein eigener Antikörper vom Immunsystem gebildet werden. Polyklonale Antikörper können an verschiedene, monoklonale nur an genau ein spezifisches Epitop binden.

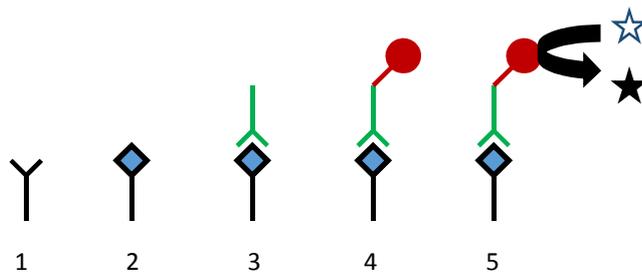
Die praktische Durchführung eines immunchemischen Nachweises kann auf unterschiedliche Arten erfolgen. Häufig wird ein sogenannter kompetitiver Immunassay verwendet, bei dem die Antigene des Untersuchungsmaterials mit markierten Antigenen aus einem Testreagenz um eine limitierte Menge Antikörper konkurrieren. Ein weiteres gebräuchliches Verfahren ist der Sandwich-Assay. Hierbei bindet das Antigen des Probenmaterials an einen festphasegebundenen Antikörper und wird anschließend von einem weiteren markierten Antigen detektiert. Hieraus ergibt sich für einen kompetitiven Assay in der Auswertung durch photometrische Messung eine sinkende Konzentrationskurve und für den

Sandwich-Assay entsprechend eine steigende Konzentrationskurve, bei jeweils steigenden detektierten Analyten.

Jeder Assay hat eine individuelle Standardkurve, anhand der die Konzentration des jeweiligen Analyten in den zu untersuchenden Proben bestimmt wird. Die Standardkurve ergibt sich aus einer Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen, die zu Beginn eines jeden Tests auf der entsprechenden Testplatte neu erstellt wird. Die festgelegten Verdünnungsstufen der Standardkurve ergeben in jedem Testkit geringgradig voneinander abweichende photometrische Messwerte, weshalb für jede Mikrotiterplatte eine neue Verdünnungsreihe angelegt wird. Folglich können Ergebnisse zwar verglichen werden, unterliegen aber einer gewissen Inter-Assay-Varianz, die berücksichtigt werden muss.

### **2.5.1. Ablauf eines Sandwich-Assays**

Wie in **Abbildung 2** dargestellt, wird ein Antikörper auf einer Festphase immobilisiert und anschließend zu untersuchendes Probenmaterial zugegeben. Je höher die Konzentration von Antigen im Untersuchungsmaterial, desto mehr Antigen wird gebunden und später detektiert. Im nächsten Schritt, der Waschung, wird unspezifisch gebundenes Material entfernt und anschließend ein weiterer Antikörper (Tracer) zugegeben, der an die vorhandenen Immunkomplexe bindet. Nach dem Auswaschen des ungebundenen Tracers erfolgt eine Behandlung mit einem Enzym, das an einen weiteren Antikörper gebunden ist. Nach einem weiteren Waschgang wird im nächsten Schritt ein Substrat zugegeben, das vom enthaltenen Enzym umgesetzt wird und eine Farbreaktion auslöst. Diese Reaktion wird nach einem gewissen Zeitraum durch Zugabe einer Säure gestoppt und der gebildete Farbstoff photometrisch gemessen. Die farbliche Intensität wird nach dem Lambert-Beerschen Gesetz interpretiert und korreliert mit der Konzentration des gemessenen Antigens.



- (1) Antikörper, mit dem die Mikrotiterplatte beschichtet wird
- (2) zu detektierende Probe bindet an den Antikörper
- (3) Tracer bindet an Antigen-Antikörper-Komplex
- (4) enzymgebundene Antikörper-Antigen-Antikörper-Bindung
- (5) das Enzym wird von einem Substrat umgesetzt; ein Farbumschlag entsteht

**Abbildung 2:** schematische Darstellung des Ablaufes eines Sandwich-Assays

Für die Untersuchung der verschiedenen Stoffwechselformone wurden folgende Immunassays verwendet:

Untersuchtes Hormon	Hersteller der Immunassays
GH	Mediagnost
IGF-I	IDS
IGF-II	Mediagnost
IGFBP-2	Mediagnost
IGFBP-3	Mediagnost
Gesamt-GIP	Millipore
GLP-1	Epitope Diagnostics
Insulin	ALPCO
Leptin	Mediagnost
Acyliertes Ghrelin	Millipore
Gesamt-Ghrelin	Linco-Research

**Tabelle 1:** Herstellerverzeichnis der verwendeten Immunassays

### 2.5.2. Messung von IGF-I

Als Beispiel für die Messung eines Immunassays wurde ein rat/mouse IGF-I ELISA von der Firma IDS, Boldon, Großbritannien durchgeführt.

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit monoklonalem anti-Rat IGF-I-Antikörper beschichtet.

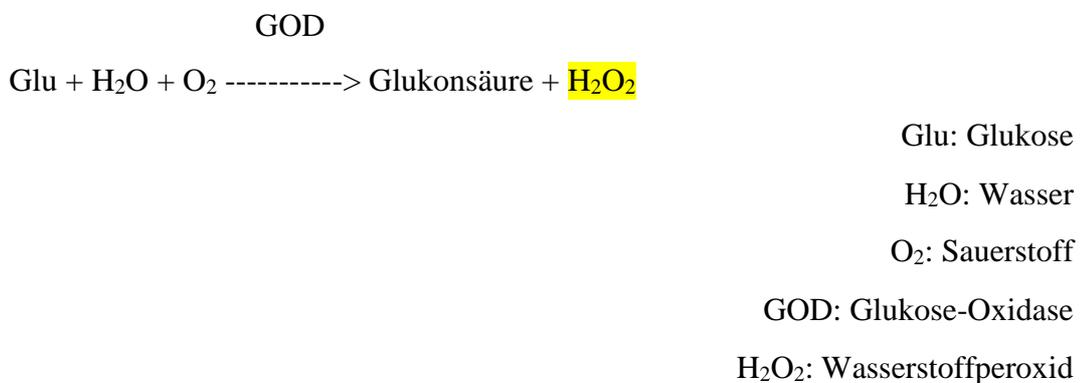
Durchführungsvorschrift:

1. Probenvorbereitung
  - a. Plastik- oder Glasröhrchen bereitstellen und beschriften, jeweils eines für jede Kontrolle (Control) und jede Probe
  - b. 25µl Kontroll- oder Probenflüssigkeit jeweils in die entsprechenden Röhrchen geben
  - c. Jeweils 100µl Lösungsflüssigkeit (Releasing Reagent) in jedes Röhrchen füllen, alle gut mischen und bei 18-28°C 10 Minuten lang inkubieren lassen.
  - d. 1ml Verdünnungsflüssigkeit (Sample diluent) in jedes Röhrchen füllen und wieder alles gut mischen.
2. Alternative Probenvorbereitung bei kleineren Probenmengen von unter 25µl
  - a. Plastik- oder Glasröhrchen bereitstellen und beschriften, jeweils eines für jede Kontrolle (Control) und jede Probe
  - b. 10µl Kontroll- oder Probenflüssigkeit jeweils in die entsprechenden Röhrchen geben
  - c. Die vierfache Menge des Probenvolumens an Lösungsflüssigkeit hinzugeben und alle Röhrchen gut mischen und bei 18-28°C 10 Minuten lang inkubieren lassen.
  - d. Die 40-fache Menge des Probenvolumens an Verdünnungsflüssigkeit zu jedem Röhrchen geben und alles gut mischen.
3. Assaydurchführung
  - a. Jeweils 25µl jedes Standards, jeder Kontrolle und jeder Probe, in doppelter Ausführung, in die mit Antikörper vorbeschichteten Löcher der Mikrotiterplatte pipettieren. (Dies sollte innerhalb von 30 Minuten geschehen, um Fehlerquellen zu minimieren)
  - b. Jeweils 100µl Anti-Ratten-IGF-I-Biotin allen Löchern zufügen.
  - c. Die Mikrotiterplatte mit einer klebenden Folie abdecken und für 2 Stunden bei 18-28°C auf einem Mikrotiterplattenschüttler inkubieren lassen.
  - d. Die Mikrotiterplatte mit 300µl Waschlösung pro Loch 3x waschen und anschließend auf saugfähigem Untergrund abklopfen, um zurückgebliebene Waschlösung zu entfernen.
  - e. Per Multipette 200µl Enzymkonjugat in jedes Loch pipettieren und bei 18-28°C 30 Minuten inkubieren lassen.

- f. Die Waschung wie in Schritt 3 d wiederholen.
- g. Jeweils 200µl TMB-Substrat per Multipette auf die Mikrotiterplatte auftragen und bei 18-28°C 30 Minuten inkubieren lassen.
- h. Jeweils 100µl Stopplösung per Multipette zu jedem Loch zugeben
- i. Photometrische Messung der Absorption eines jeden Lochs bei 450nm innerhalb von 30 Minuten nach Hinzufügen der Stopplösung.

## 2.6. Glukose-Oxidase-Test

Die Glukose wird in diesem Nachweisverfahren enzymatisch bestimmt. Die Glukose-Oxidase (GOD) oxidiert Glukose, unter Sauerstoffaufnahme, zu Glukonsäure und Wasser wird zu Wasserstoffperoxid reduziert (**Abbildung 3**). In einer nachgeschalteten, durch Peroxidase katalysierten, Farbreaktion wird Wasserstoffperoxid wiederum zu Wasser reduziert. Die gebildete Konzentration des Wasserstoffperoxids kann elektrochemisch bestimmt werden, woraufhin Rückschlüsse auf die Höhe der Konzentration der Glukose gezogen werden können.



**Abbildung 3:** schematische Darstellung des Ablaufes des Glukose-Oxidase-Tests

## 2.7. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Immunassays wurden in Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) erfasst. Nach einer entsprechenden Korrektur, um den Verdünnungsfaktor der verwendeten Zusätze, wurden die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe „präanalytische Varianz“ in ng/ml dargestellt (Gesamt-GIP in pM). Zur weiteren statistischen Analyse wurde das Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Version 5, Inc., La Jolla, California, USA) eingesetzt. Jedes

gemessene Hormon wird in einem Liniendiagramm veranschaulicht und absolute Messwerte, eines jeden einzelnen Tieres im jeweiligen Probenbearbeitungszustand, dargestellt. In jedem Diagramm ist der niedrigste messbare Wert, des verwendeten Immunassays, als Detektionsgrenze gekennzeichnet.

Anschließend wurden die Probenbearbeitungszustände der verschiedenen Hormone miteinander verglichen, indem der Mittelwert aller Tiere in Relation zu dem von „Serum“ gesetzt wurde. Dies wurde in Säulendiagrammen dargestellt. Die Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert wurden als Standardabweichung der Mittelwerte („Standard Error of the Mean“, SEM) angegeben.

Nicht-parametrische Mann-Whitney-U Tests wurden zum Vergleich von zwei Probenbearbeitungszuständen verwendet, bei mehreren Untersuchungsgruppen wurden nicht-parametrische Kruskal-Wallis Tests zur statistischen Analyse durchgeführt. Das Ergebnis wurde als signifikant erachtet, wenn  $p < 0,05$  war. In den Grafiken bedeutet \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ .

In der zweiten Versuchsreihe „biologische Varianz“ wurde zusätzlich die Fläche unter der Kurve für jedes Hormon (Area Under the Curve, AUC) bestimmt.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Untersuchung verschiedener präanalytischer Einflussgrößen auf ausgewählte metabolische Hormone (Versuchsreihe „präanalytische Varianz“)

#### 1.1. Lebendgewichtsmessung

Die Ratten waren zum Zeitpunkt der Sektion 14 Wochen alt. Männliche (n = 7) und weibliche (n = 2) Tiere wurden untersucht. In **Tabelle 2** werden die Gewichte der Ratten zum Zeitpunkt der Blutentnahme aufgeführt.

Tier-Nr.	Geschlecht	Fütterungsstatus	Gewicht [g]
Ratte 1	weiblich	6 Stunden gefastet	208,1
Ratte 2	weiblich	6 Stunden gefastet	230,1
Ratte 3	männlich	Fütterung ad libitum	377,6
Ratte 4	männlich	Fütterung ad libitum	354,2
Ratte 5	männlich	Fütterung ad libitum	370,0
Ratte 6	männlich	Fütterung ad libitum	369,6
Ratte 7	männlich	6 Stunden gefastet	333,4
Ratte 8	männlich	6 Stunden gefastet	368,1
Ratte 9	männlich	6 Stunden gefastet	355,5

**Tabelle 2:** Gewichte der Ratten der Versuchsreihe „präanalytische Varianz“ zum Zeitpunkt der Blutentnahme

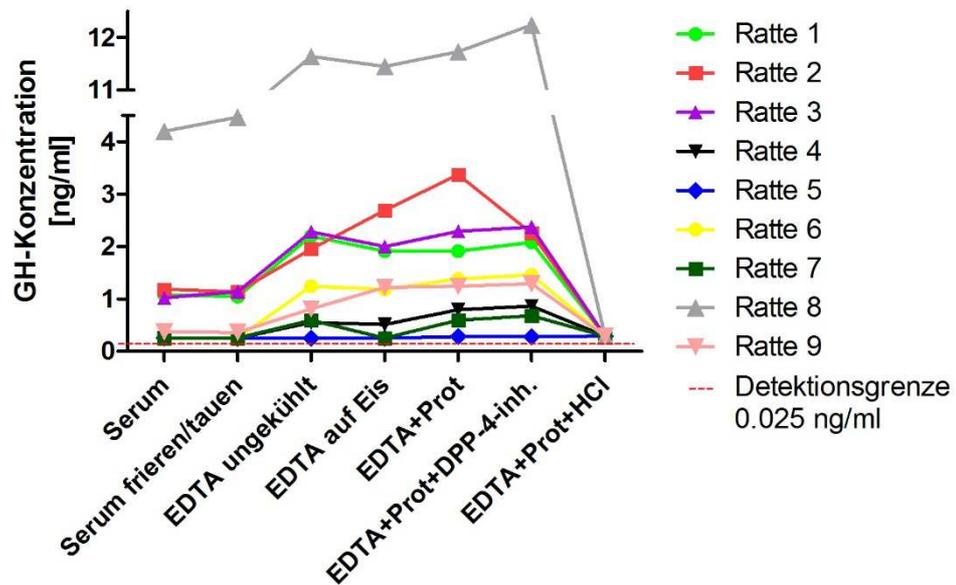
In dieser Versuchsreihe sollte eine möglichst große physiologische Konzentrationsvariabilität der untersuchten Parameter abgedeckt werden. Folglich wurden weibliche und männliche Ratten, die entweder für 6h gefastet wurden oder Fütterung ad libitum erhielten, untersucht. Die weiblichen Ratten wogen im Durchschnitt 219,1 g, die männlichen 361,2 g. Die männlichen Ratten wogen signifikant mehr als die weiblichen Ratten ( $p < 0,001$ ) und gefastete Ratten

unterschieden sich, bezogen auf das Gewicht, nicht signifikant von den Ratten mit ad libitum-Fütterung.

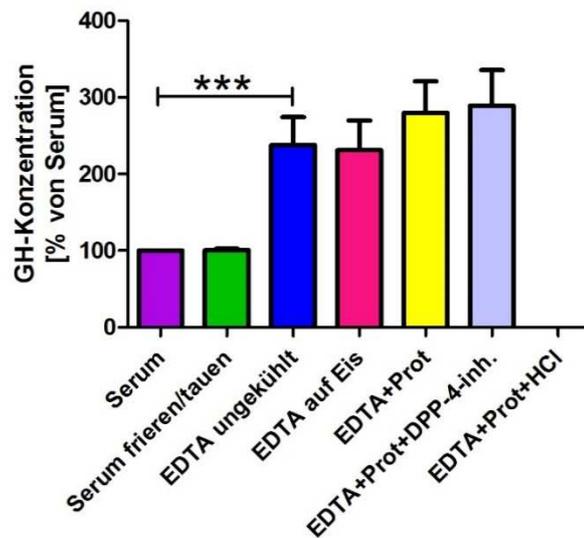
In den folgenden Balkendiagrammen der Versuchsreihe „präanalytische Varianz“ wurde der Serumwert des entsprechenden Hormons auf 100% gesetzt und die restlichen Probenbearbeitungszustände wurden in prozentualer Relation zu diesem Wert dargestellt.

## 1.2. Wachstumshormon

Wie bereits 1976 von Willoughby et al. herausgefunden wurde, wird das Wachstumshormon bei der Ratte pulsatil ausgeschüttet (WILLOUGHBY et al., 1976). Deshalb können die gemessenen Konzentrationen zu individuellen Zeitpunkten stark divergieren. In diesem Fall unterliegt Ratte 8 zum Zeitpunkt der Blutentnahme einem GH-Ausstoß.



**Abbildung 4** GH-Konzentrationen aller Ratten in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen. Die gestrichelte rote Linie stellt das Detektionslimit des Immunassays dar.



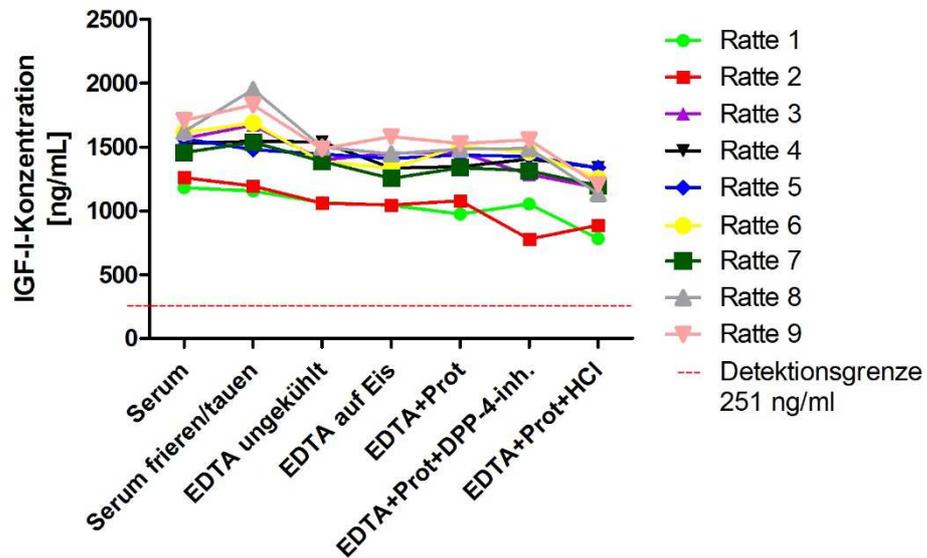
**Abbildung 5:** GH-Konzentrationen im Blut der Ratten unter den verschiedenen präanalytischen Bedingungen in Relation zur Referenzkonzentration von „Serum“. Im Zustand „EDTA ungekühlt“ wurden signifikant höhere GH-Konzentrationen als in „Serum“ gemessen. „EDTA+Prot+HCl“ lag unter der Detektionsgrenze (**\*\*\*p<0,001**, Mittelwerte± SEM).

In **Abbildung 5** werden die GH-Konzentrationen in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in prozentualer Relation zum Referenzwert „Serum“ dargestellt. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen „Serum“ und „Serum frieren/tauen“, aber die GH-Konzentration in der „EDTA ungekühlt“-Gruppe war mehr als doppelt so hoch wie in der „Serum“-Gruppe (**p<0,001**). Innerhalb der Probenbearbeitungszustände von EDTA-Plasma gab es keine signifikanten Unterschiede, jedoch konnte GH, in den mit Salzsäure angesäuerten Proben, nicht gemessen werden.

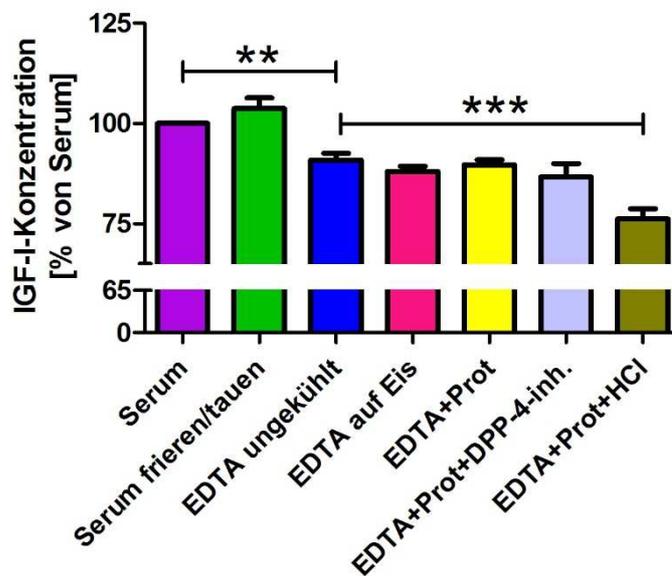
### 1.3. IGF-I

IGF-I ist ein wichtiger Faktor für Wachstums- und Differenzierungsprozesse. Es spielt eine zentrale Rolle in der Zellproliferation und -differenzierung (FRAGO & CHOWEN, 2005) und seine Konzentration sinkt bei Säugetieren im Alterungsprozess (CARTER et al., 2002). Wie in **Abbildung 6** zu sehen ist, lagen die gemessenen Einzelwerte von IGF-I der unterschiedlichen Ratten in den

verschiedenen Probenbearbeitungszuständen nahe beieinander, Ratte 1 und 2 wiesen jedoch allgemein niedrigere Werte als die anderen Ratten auf.



**Abbildung 6:** IGF-I-Konzentrationen aller Ratten in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen. Die gestrichelte rote Linie stellt das Detektionslimit des Immunassays dar.

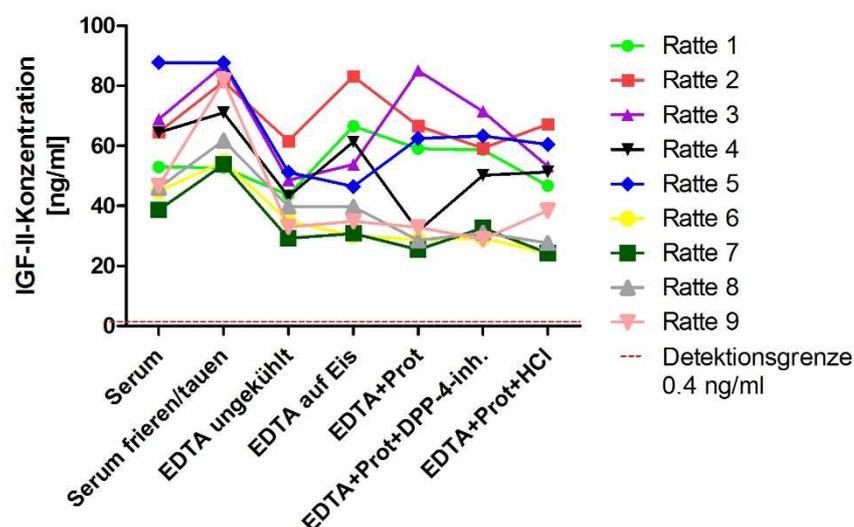


**Abbildung 7:** Vergleich der IGF-I-Konzentrationen in Relation zur Referenzkonzentration „Serum“. Es wurden signifikant höhere Konzentration im Vergleich von „EDTA ungekühlt“ mit „Serum“ (\*\* $p < 0,01$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM) sowie zwischen „EDTA+Prot+HCl“ und „EDTA ungekühlt“ ermittelt (\*\* $p < 0,001$ ; Mittelwerte  $\pm$  SEM)

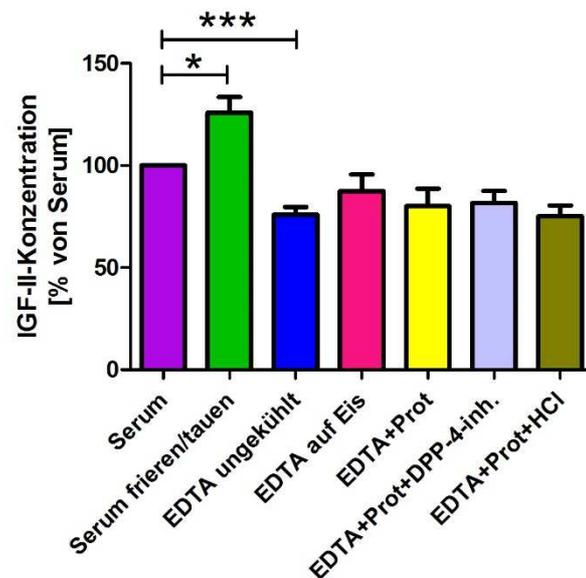
Wie in **Abbildung 7** ersichtlich konnten in „Serum“ signifikant höhere IGF-I-Konzentrationen gemessen werden als in der „EDTA ungekühlt“-Gruppe ( $p<0,01$ ). Ein zehnmaliger Einfrier-Auftau-Zyklus von Serum, wie in der „Serum frieren/tauen“-Gruppe dargestellt, beeinflusste die gemessenen Werte von IGF-I nicht signifikant. Zwischen den verschiedenen Probenbearbeitungszuständen von EDTA-Plasma wurden, bis auf die „EDTA+Prot+HCl“-Gruppe, keine signifikanten Unterschiede detektiert. Diese Gruppe wies jedoch signifikant niedrigere IGF-I-Werte auf als die restlichen EDTA-Plasma-Gruppen auf ( $p<0,001$ ).

#### 1.4. IGF-II

IGF-II ist wichtig für das pränatale Wachstum und eine gesunde Embryonalentwicklung (BAKER et al., 1993; WANG et al., 1994). Zusätzlich kann IGF-II die Zellproliferation über den Insulinrezeptor fördern (MORRIONE et al., 1997). Vergleicht man die IGF-II-Konzentration (**Abbildung 9**) von „Serum“ mit „Serum frieren/tauen“ so sind nach einem zehnmaligen Einfrier-Auftau-Zyklus signifikant höhere IGF-II-Werte ( $p<0,05$ ) gemessen worden. Im Gegensatz dazu wurden signifikant niedrigere Werte im Vergleich von „Serum“ mit der „EDTA ungekühlt“-Gruppe gemessen ( $p<0,001$ ). Innerhalb der Probenbearbeitungszustände von EDTA-Plasma wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.



**Abbildung 8:** IGF-II-Konzentration aller Ratten in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen. Die gestrichelte rote Linie stellt das Detektionslimit des Immunassays dar.

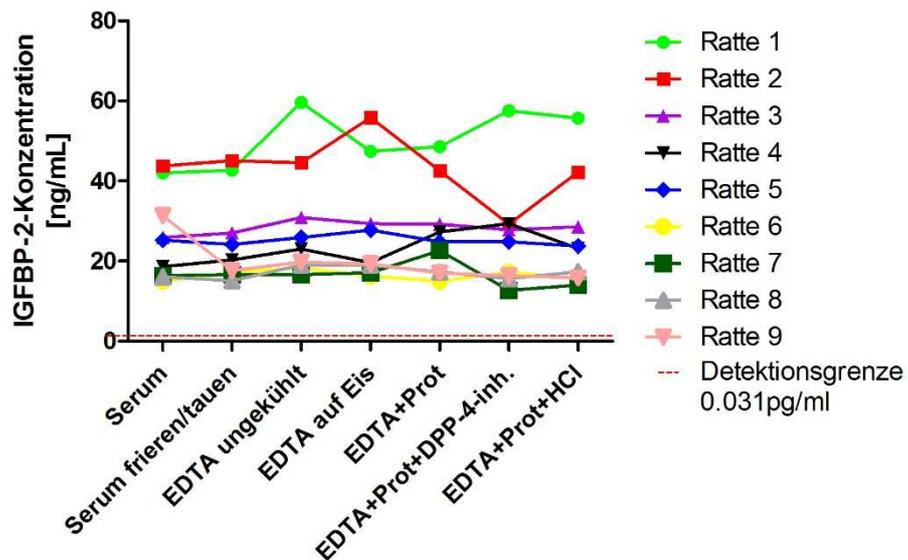


**Abbildung 9:** IGF-II-Konzentration in den verschiedenen Probenbearbeitungszuständen in Relation zum „Serum“-Wert. Es wurden signifikant höhere Konzentrationen von IGF-II in „Serum frieren/tauen“ (\* $p < 0,05$ ) und signifikant niedrigere Werte in „EDTA ungekühlt“ (\*\* $p < 0,001$ ) im Vergleich zu „Serum“ gemessen (Mittelwerte  $\pm$  SEM).

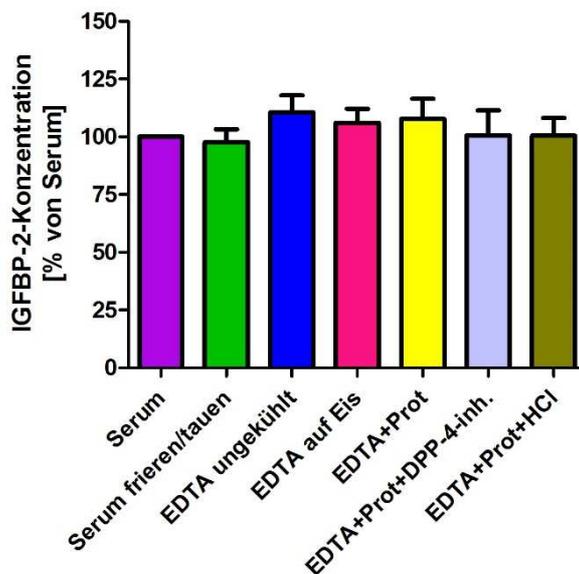
### 1.5. IGFBP-2

IGFBP-2 ist eines der Bindungsproteine für insulinähnliche Wachstumsfaktoren, welches im Blutkreislauf zirkuliert. Bei IGFBP-2-transgenen Mäusen konnte IGFBP-2 als negativer Regulator für das postnatale Wachstum detektiert werden (HOEFLICH et al., 1999).

Wie in **Abbildung 10** zu sehen ist, wiesen weibliche Ratten grundsätzlich eine höhere Konzentration IGFBP-2 auf als männliche. Die Einzelwerte der unterschiedlichen Tiere divergierten nur geringfügig, weswegen von einem konstanten Spiegel im Blutkreislauf auszugehen ist. Vergleicht man die unterschiedlichen Probenbearbeitungszustände von IGFBP-2 (**Abbildung 11**), so stellte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich von „Serum“ mit der „Serum frieren/tauen“-Gruppe dar. Ebenso war kein signifikanter Unterschied zwischen den Materialien „Serum“ und „EDTA ungekühlt“ zu detektieren, sowie innerhalb der Probenbearbeitungszustände von EDTA-Plasma.



**Abbildung 10:** Darstellung der Einzelwerte der IGFBP-2-Konzentrationen aller Ratten. Die gestrichelte rote Linie stellt das Detektionslimit des Immunassays dar.

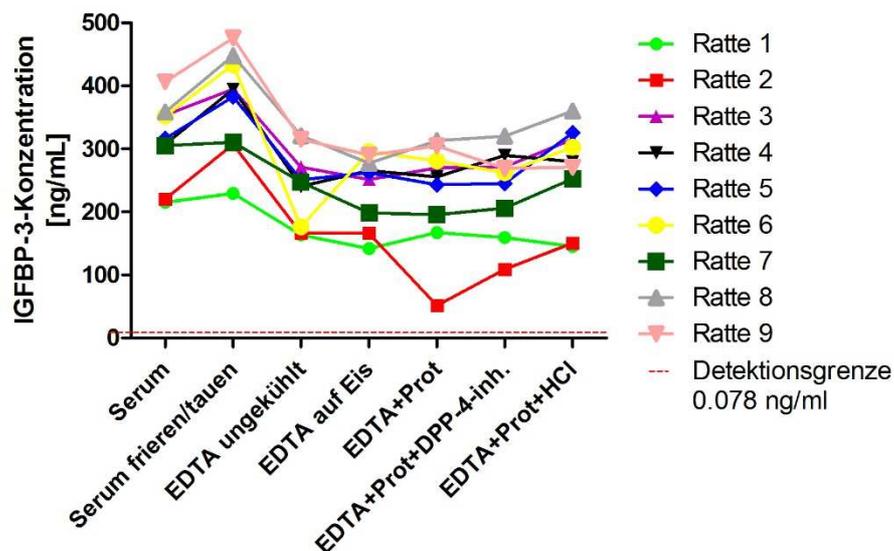


**Abbildung 11:** IGFBP-2-Konzentrationen in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in Relation zu „Serum“ als Referenzkonzentration (Mittelwerte  $\pm$  SEM).

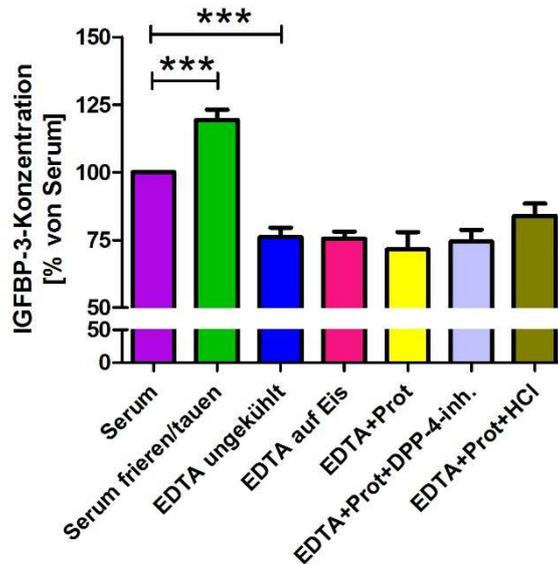
### 1.6. IGFBP-3

Ein weiteres Bindungsprotein der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren ist IGFBP-3. Es bindet, zusammen mit ALS, bis zu 80% der IGFs in einem Komplex und stellt somit deren Hauptspeicher für insulinähnliche Bindungsproteine im

Extrazellularraum dar (ZAPF et al., 1986; LEROITH, 1996; DAUGHADAY, 2000). Bei der Einzelwertbestimmung von IGFBP-3 in **Abbildung 12** divergierten die gemessenen Konzentrationen nur geringfügig, Ratte 1 und 2 hatten geringere Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Ratten. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich von „Serum“ mit „Serum frieren/tauen“ herausstellen. Die gemessenen Werte von IGFBP-3 nach zehn Einfrier-Auftau-Zyklen („Serum frieren/tauen“) waren gegenüber „Serum“ signifikant höher ( $p < 0,001$ ). Ebenfalls mit einer hohen statistischen Signifikanz zeigte sich der Unterschied zwischen „Serum“ und „EDTA ungekühlt“ ( $p < 0,001$ ). Die gemessenen Werte von „Serum“ waren deutlich höher als jene von „EDTA ungekühlt“. Die verschiedenen Probenbearbeitungszustände von EDTA-Plasma („EDTA auf Eis“, „EDTA+Prot“, „EDTA+Prot+DPP-4-inh.“ und „EDTA+Prot+HCl“) zeigten alle signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur „Serum“-Gruppe ( $p < 0,001$ ), jedoch differierten sie untereinander nicht (**Abbildung 13**).



**Abbildung 12:** Darstellung IGFBP-3-Konzentrationen aller Ratten. Die gestrichelte rote Linie stellt das Detektionslimit des Immunassays dar.

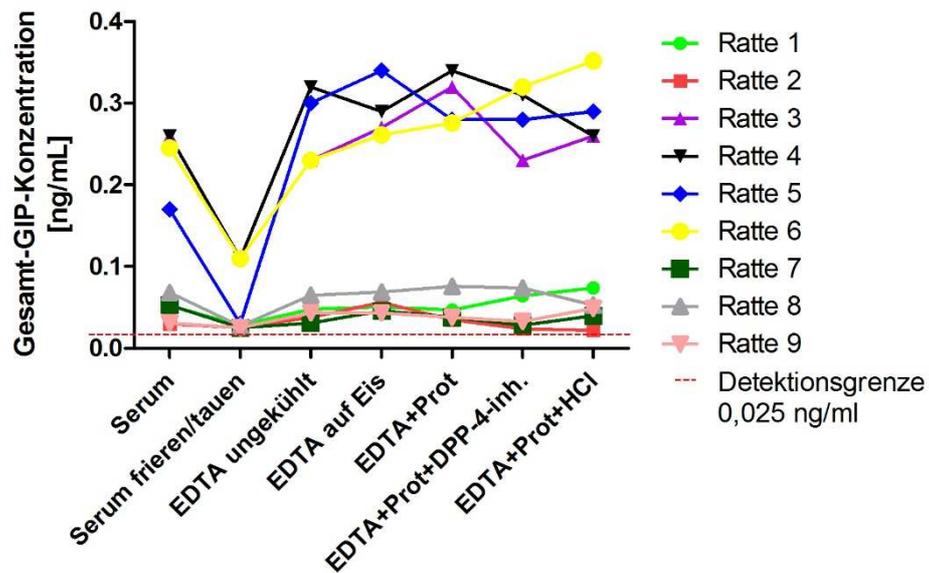


**Abbildung 13:** IGFBP-3-Konzentrationen in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in Relation zur Referenzkonzentration Serum. Es wurden signifikant höhere Konzentrationen von IGFBP-3 in „Serum frieren/tauen“ im Vergleich zu „Serum“ ( $***p<0,001$ ) und signifikant niedrigere Werte in „EDTA ungekühlt“ im Vergleich zu „Serum“ ( $***p<0,001$ ) gemessen (Mittelwerte $\pm$  SEM).

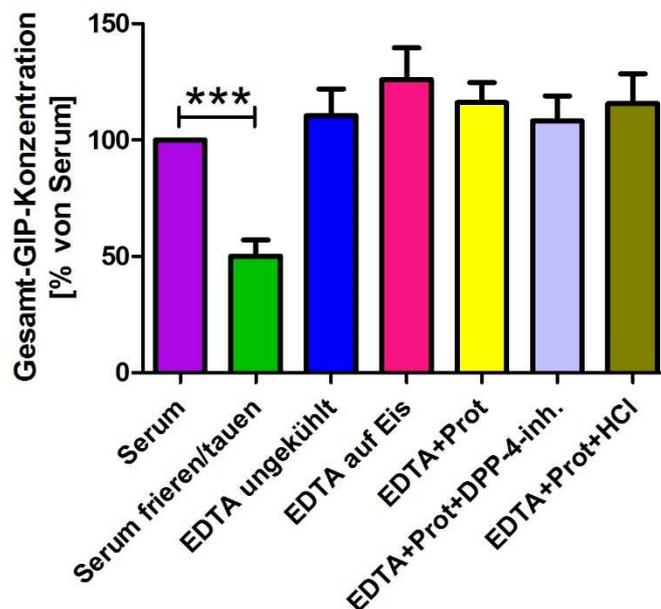
### 1.7. Gesamt-GIP

Wie bereits 1975 von Cleator und Gourlay herausgefunden wurde, ist die Konzentration von GIP abhängig von der Nahrungsaufnahme der Ratte (CLEATOR & GOURLAY, 1975). Im nüchternen Zustand sind die Werte niedriger als nach Nahrungsaufnahme. Bisher konnte nur Gesamt-GIP gemessen werden, da es noch keine verfügbaren Nachweismethoden für aktives GIP gab, jedoch wurde 2011 von Troutt et al. ein Immunassay zur Messung von aktivem GIP validiert (TROUTT et al., 2011). In **Abbildung 14** ist zu sehen, wie die Ratten mit ad libitum-Fütterung deutlich höhere Einzelkonzentrationen vom Gesamt-GIP aufwiesen als nüchterne Tiere. Im Vergleich der Probenbearbeitungszustände (**Abbildung 15**) war eine signifikant geringere GIP-Konzentration nach zehn Einfrier-Auftau-Zyklen von Serum („Serum frieren/tauen“) zu erkennen ( $p<0,001$ ). Des Weiteren ist in **Abbildung 15** ersichtlich, dass es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der „Serum“-Gruppe mit der „EDTA ungekühlt“-Gruppe gab und auch innerhalb der Probenbearbeitungszustände von EDTA („EDTA ungekühlt“, „EDTA auf Eis“, „EDTA+Prot“, „EDTA+Prot+DPP-4-inh.“ und „EDTA+Prot+HCl“) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Messung

von GIP.



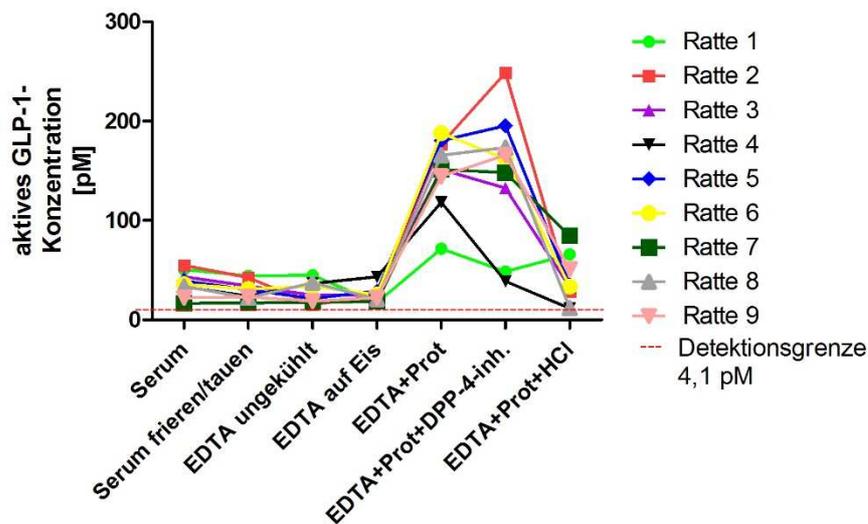
**Abbildung 14:** Darstellung der Gesamt-GIP-Konzentrationen aller Ratten. Die gestrichelte rote Linie stellt das Detektionslimit des Immunassays dar.



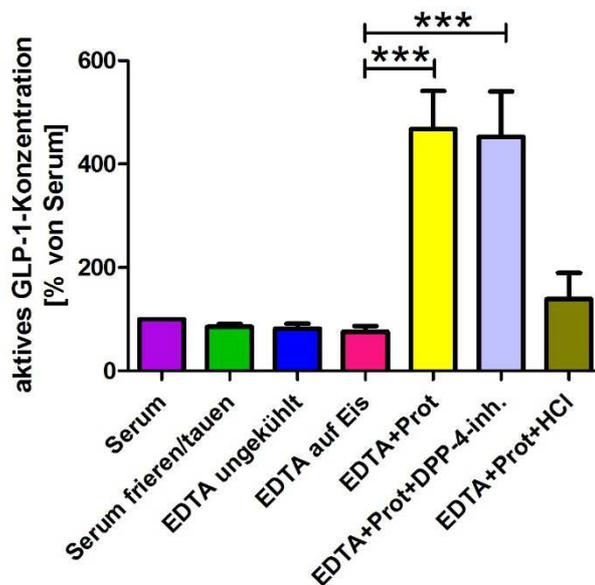
**Abbildung 15:** Gesamt-GIP-Konzentrationen in den unterschiedlichen präanalytischen Zuständen in Relation zur Referenzkonzentration „Serum“. Die GIP-Konzentrationen waren in „Serum frieren/tauen“ signifikant niedriger als in „Serum“ (\*\*\*) ( $p < 0,001$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM). Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich von „Serum“ mit „EDTA ungekühlt“ sowie innerhalb der verschiedenen Probenbearbeitungszustände von EDTA-Plasma („EDTA auf Eis“, „EDTA+Prot“, „EDTA+Prot+DPP-4-inh.“ und „EDTA+Prot+HCl“).

### 1.8. Aktives GLP-1

GLP-1 ist neben GIP das zweite Hormon, das am Inkretineffekt beteiligt ist. Es bewirkt eine verzögerte Magenentleerung und wirkt außerdem appetithemmend (WETTERGREN et al., 1993; TURTON et al., 1996). Im Blutkreislauf hat es nur eine kurze Halbwertszeit von zwei bis drei Minuten, in der es die Insulinsekretion stimuliert (JOHNSON, 1981), bevor es vom Enzym DPP-4 inaktiviert wird (SARSON et al., 1982; DEACON, 2004). Die gemessenen Einzelwerte von aktivem GLP-1 divergierten innerhalb der Individuen kaum, aber es ist schon in **Abbildung 16** zu erkennen, dass durch Zugabe von Proteaseinhibitor, die gemessenen Konzentrationen von diesem Hormon deutlich höher ausfielen als in den anderen Probenbearbeitungszuständen. In **Abbildung 17** wird veranschaulicht, dass durch Zugabe von unspezifischen und spezifischen Proteaseinhibitoren mehr als dreifach so hohe Werte von aktivem GLP-1 gemessen werden konnten, im Vergleich zu Material ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren. Der Vergleich von „Serum“ mit der „Serum frieren/tauen“-Gruppe zeigte keine signifikante Beeinflussung durch Einfrier-Auftau-Zyklen auf die messbaren Werte von GLP-1 und auch beim Vergleich von „Serum“ mit „EDTA ungekühlt“ waren die gemessenen Werte nicht signifikant unterschiedlich zum Vergleichsmaterial. Durch Zusatz von Proteaseinhibitoren zu den verschiedenen Proben konnten signifikant höhere Werte von aktivem GLP-1 in „EDTA+Prot“ und „EDTA+Prot+DPP-4-inh.“ als in „EDTA auf Eis“ gemessen werden ( $p < 0,001$ ), jedoch war es statistisch gesehen nicht relevant, ob zusätzlich zu einem allgemeinen Proteaseinhibitor ein spezieller DPP-4-Inhibitor zugegeben wurde. Das Vorhandensein von HCl in Proben, zusätzlich zum Proteaseinhibitor, reduzierte die messbare Konzentration von aktivem GLP-1 um über die Hälfte.



**Abbildung 16:** Darstellung der Einzelwerte von aktivem GLP-1 aller Ratten. Die gestrichelte rote Linie stellt das Detektionslimit des Immunassays dar.

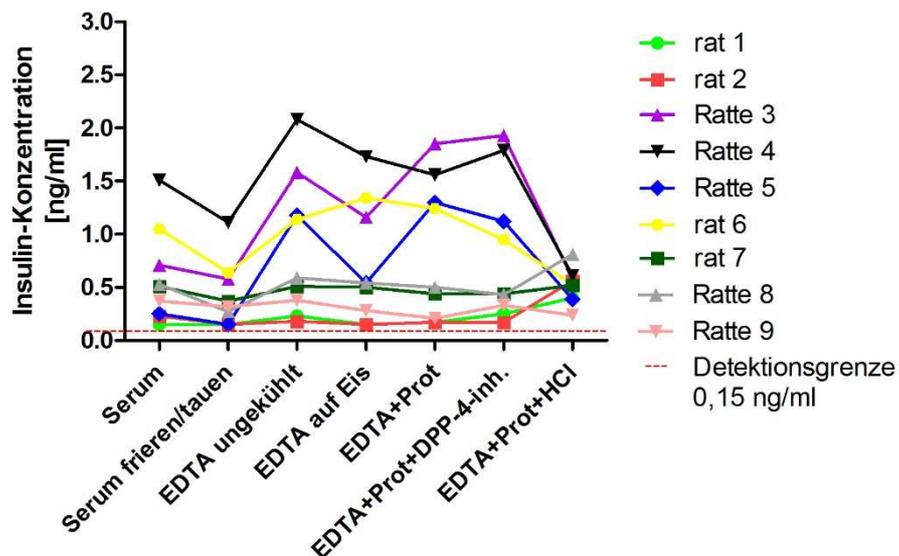


**Abbildung 17:** Konzentrationen von aktivem GLP-1 in den verschiedenen präanalytischen Zuständen in Relation zur Referenzkonzentration „Serum“. Zwischen „Serum“ und „Serum frieren/tauen“ sowie „Serum“ und „EDTA ungekühlt“ wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen. Durch Versetzung des Untersuchungsmaterials mit Proteaseinhibitoren stiegen die Werte der Gruppen „EDTA+Prot“ und „EDTA+Prot+DPP-4-inh.“ signifikant an (\*\*\*) ( $p < 0,001$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM).

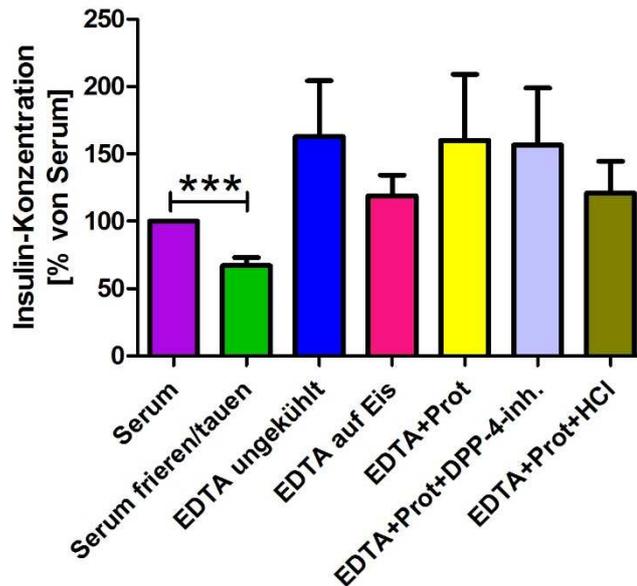
## 1.9. Insulin

Insulin ist essentiell für den Körper, um Glukose aus dem Blutkreislauf in die Zellen aufnehmen zu können. Es wird durch die Anwesenheit verschiedener Hormone, wie

Gastrin, Sekretin, GIP und GLP-1, nach Nahrungsaufnahme pulsatil aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas ausgeschüttet. Seine Halbwertszeit beträgt ca. fünf Minuten und es wird entweder durch dessen Verbrauch in der Zelle oder durch die Glutathion-Insulin-Transhydrogenase gespalten (TOMIZAWA & VARANDANI, 1965). Folglich zeigten Ratten, mit freiem Zugang zu Nahrung, höhere Insulinspiegel, als solche, die einer Nahrungskarenz von sechs Stunden ausgesetzt waren (**Abbildung 19**). Die gemessenen Insulinwerte in „Serum“ waren signifikant höher als in Serum nach zehn Einfrier-Auftau-Zyklen („Serum frieren/tauen“) ( $p < 0,001$ ), jedoch war es statistisch nicht signifikant, ob als Probenmaterial „Serum“ oder EDTA-Plasma („EDTA ungekühlt“) verwendet wurde. Auch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Probenbearbeitungszuständen von EDTA-Plasma.



**Abbildung 18:** Einzelwerte der Insulin-Konzentrationen aller Ratten. Die gestrichelte rote Linie stellt das Detektionslimit des Immunassays dar.

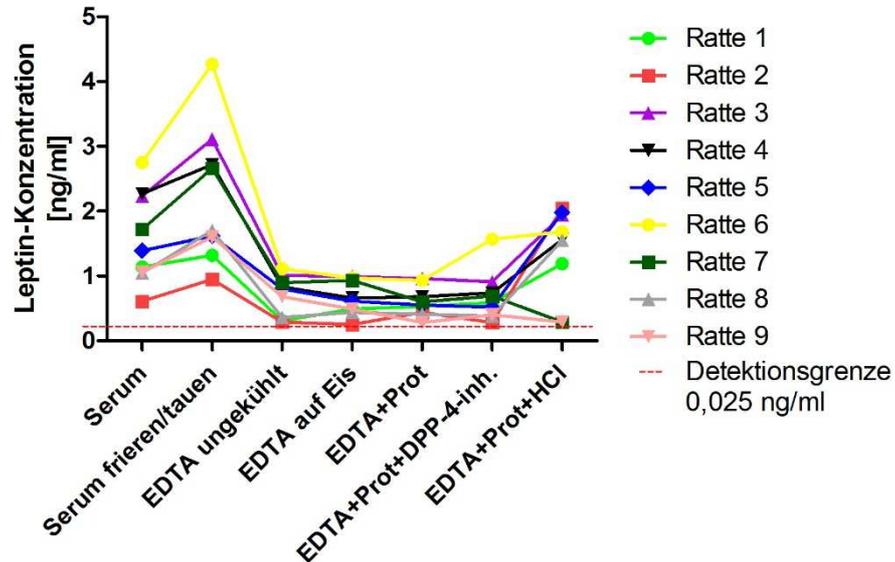


**Abbildung 19:** Darstellung der Insulin-Konzentrationen in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in Relation zu „Serum“. In „Serum frieren/tauen“ wurden signifikant niedrigere Werte von Insulin gemessen als in „Serum“ (\*\*\*) ( $p < 0,001$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM). Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich von „Serum“ mit „EDTA ungekühlt“ sowie innerhalb der verschiedenen Probenbearbeitungszustände von EDTA-Plasma („EDTA auf Eis“, „EDTA+Prot“, „EDTA+Prot+DPP-4-inh.“ und „EDTA+Prot+HCl“).

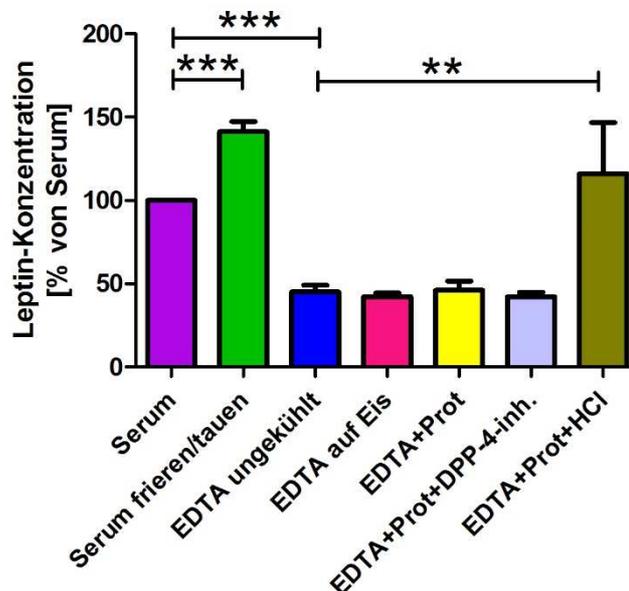
### 1.10. Leptin

Die Leptin-Konzentration im Blut der Ratten korreliert positiv mit der Fettgewebssmasse im Körper, wobei Fasten zu einer Abnahme von Leptin im Blutkreislauf führt (SHIMIZU et al., 1997; WEIGLE et al., 1997). Leptin wirkt auf das Sättigungszentrum im Gehirn und reduziert folglich das Bedürfnis der Ratte nach Nahrungsaufnahme (GELDSZUS et al., 1996). Obwohl die Leptinkonzentration im Blutkreislauf grundsätzlich alters- und geschlechtsabhängig ist, waren in den Untersuchungen dieser Arbeit keine deutlich geringeren Konzentrationen der weiblichen Ratten 1 und 2 im Vergleich zu den anderen Ratten zu erkennen (**Abbildung 20**). Bei genauerer Betrachtung der unterschiedlichen Probenbearbeitungszustände in **Abbildung 21** waren im Vergleich von „Serum“ mit Serum nach zehn Einfrier-Auftau-Zyklen („Serum frieren/tauen“) in „Serum“ signifikant höhere Leptin-Konzentrationen ( $p < 0,001$ ) zu erkennen. Andererseits wurden im Vergleich von „Serum“ mit der „EDTA ungekühlt“-Gruppe in EDTA-Plasma signifikant niedrigere Werte von Leptin als

in „Serum“ gemessen. Innerhalb der Probenbearbeitungszustände von EDTA-Plasma unterschieden sich die Leptin-Konzentrationen nur geringfügig, jedoch wurden signifikant höhere Leptin-Konzentrationen im Untersuchungsmaterial, das mit HCl angesäuert wurde („EDTA+Prot+HCl“), gemessen ( $p < 0,01$ ).



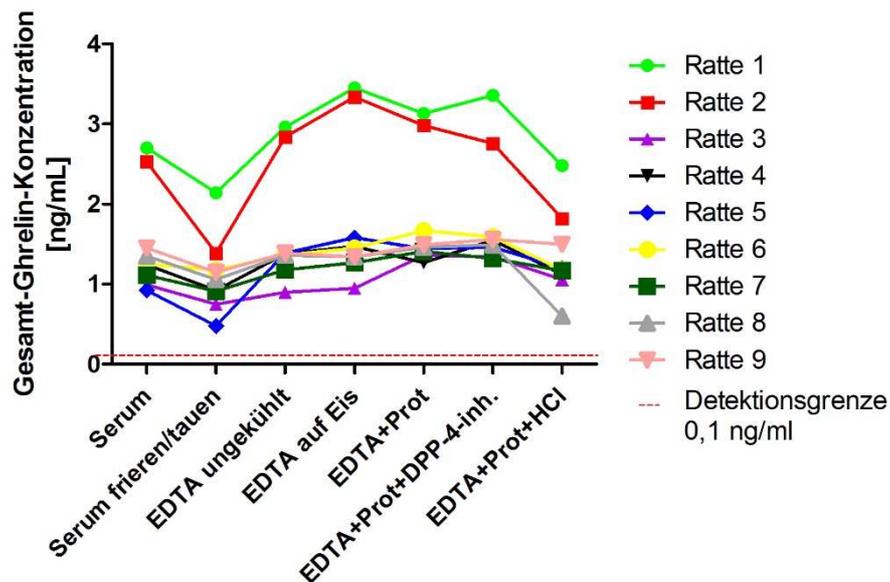
**Abbildung 20:** Einzelwerte der Leptin-Konzentrationen aller Ratten. Die gestrichelte rote Linie stellt das Detektionslimit des Immunassays dar.



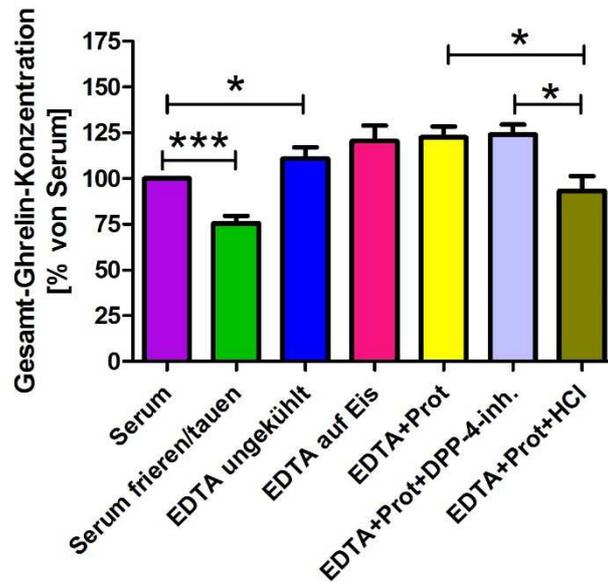
**Abbildung 21:** Darstellung der Leptin-Konzentrationen in den unterschiedlichen präanalytischen Zuständen in Relation zur Referenzkonzentration „Serum“. In „Serum frieren/tauen“ wurden signifikant höhere Werte von Leptin gemessen als in „Serum“ ( $***p < 0,001$ ). In „EDTA ungekühlt“ wurden signifikant niedrigere Werte als in Serum gemessen ( $***p < 0,001$ ). In „EDTA+Prot+HCl“ wurden signifikant höhere Werte von Leptin als in allen anderen Probenbearbeitungszuständen von EDTA-Plasma detektiert ( $**p < 0,01$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM).

### 1.11. Gesamt-Ghrelin

Das Hormon Ghrelin fördert die Nahrungsaufnahme der Ratte durch Stimulation eines Hungergefühls. Folglich haben Ratten in Zeiten von Nahrungskarenz höhere Ghrelinspiegel im Blut, als solche mit freiem Zugang zu Nahrung (MASUDA et al., 2000). In **Abbildung 22** zeigte sich kein Unterschied zwischen Ratten, die sechs Stunden gefastet hatten und solchen mit ad libitum-Fütterung, aber es wurden deutlich höhere Werte Gesamt-Ghrelin bei den weiblichen Tieren gemessen. Im Vergleich der Gesamt-Ghrelin-Konzentrationen in den einzelnen Probenbearbeitungszuständen wurde in „Serum“ ein signifikant höheres Level als in „Serum frieren/tauen“ gemessen ( $p < 0,001$ ) und signifikant niedrigere Werte ergab die Gesamt-Ghrelin-Konzentration von „Serum“ im Vergleich zu „EDTA ungekühlt“ ( $p < 0,05$ ) (**Abbildung 23**). Bei genauerer Betrachtung der Aufarbeitungszustände des EDTA-Plasmas ist durch Ansäuerung mit HCl die messbare Konzentration von Gesamt-Ghrelin in EDTA-Plasma signifikant verringert worden ( $p < 0,05$ ).



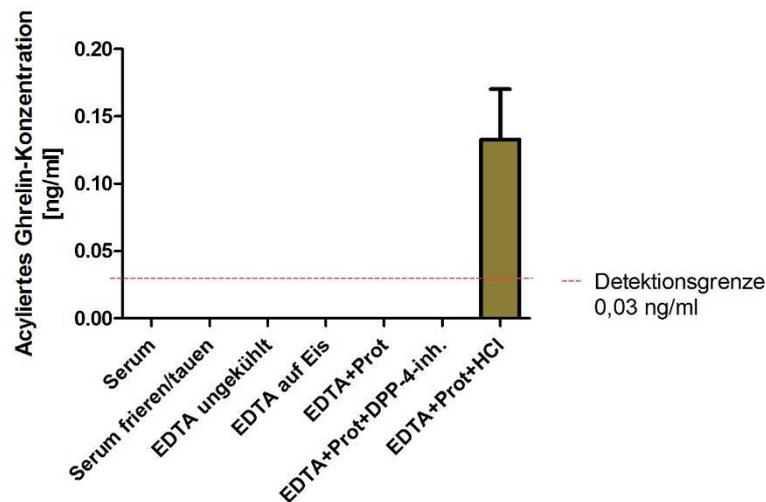
**Abbildung 22:** Einzelwerte der Gesamt-Ghrelin-Konzentrationen aller Ratten. Die gestrichelte rote Linie stellt das Detektionslimit des Immunassays dar.



**Abbildung 23:** Darstellung der Gesamt-Ghrelin-Konzentrationen in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in Relation zu „Serum“. In „Serum frieren/tauen“ wurden signifikant geringere Gesamt-Ghrelin-Werte detektiert (**\*\*\*p<0,001**), wohingegen in „EDTA ungekühlt“ signifikant höhere Werte als in „Serum“ gemessen wurden (**\*p<0,05**). Innerhalb der Probenbearbeitungszustände von EDTA-Plasma konnten in „EDTA+Prot+HCl“ signifikant niedrigere Werte als in „EDTA+Prot“ und „EDTA+Prot+DPP-4-inh.“ gemessen werden (**\*p<0,05**, Mittelwerte± SEM).

### 1.12. Acyliertes Ghrelin

Acyliertes Ghrelin stellt die aktive Form von Ghrelin dar, in welcher es die Freisetzung von GH stimuliert. Durch seine spezielle Molekülstruktur ist es anzuraten, das Material, in dem acyliertes Ghrelin gemessen werden soll, anzusäuern, um seine Molekülstruktur detektieren zu können (LIU et al., 2008). Folglich konnte es nur in „EDTA+Prot+HCl“ gemessen werden. In allen anderen Probenbearbeitungszuständen lag die Konzentration unter der Detektionsgrenze.



**Abbildung 24:** Darstellung der Konzentration von acyliertem Ghrelin in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in Relation zu „Serum“. Acyliertes Ghrelin konnte nur in „EDTA+Prot+HCl“ detektiert werden.

## 2. Untersuchung verschiedener biologischer Einflussgrößen auf ausgewählte metabolische Hormone (Versuchsreihe „biologische Varianz“)

Es gibt diverse biologische Einflüsse auf die Konzentration verschiedener Hormone im Blutkreislauf. Es ist nicht möglich alle diese Einflüsse in einer Studie allein zu untersuchen, weswegen in dieser Versuchsreihe die Faktoren „Langzeitfasten“ und „Altersunterschied“ auf diverse Stoffwechselformone bei der Ratte untersucht wurden. Die Blutentnahmezeitpunkte 8 und 18h wurden aus der Studie exkludiert, da sie durch eine andere Blutentnahmetechnik gewonnen wurden, auf die aber in dieser Versuchsreihe nicht weiter eingegangen werden soll. Des Weiteren war es aus tierschutzrechtlicher Sicht nicht möglich einer einzelnen Ratte zu 10 verschiedenen Zeitpunkten Blut abzunehmen, weswegen zu den Zeitpunkten 0 bis 8h den ersten 16 Ratten und zu den Zeitpunkten 10 bis 18h den zweiten 16 Ratten Blut entnommen wurde. Den Ratten wurden im wachen Zustand das Blut aus der Schwanzspitze, durch Ausstreichen der Schwanzvene (*Vena caudalis mediana*) entnommen.

In dieser Studie ist nicht darauf eingegangen worden in wie weit diese Blutentnahmetechnik bei den Ratten Stress verursacht und wie sich dieser auf die Konzentration der verschiedenen Stoffwechselformone auswirkt.

Alter	Zugang zu Nahrung	Gewicht [g]
jung	Fasten	346,3
jung	Fasten	343,2
jung	Fasten	353,2
jung	Fasten	304,2
jung	Fasten	329,1
jung	Fasten	333,8
jung	Fasten	328,0
jung	Fasten	341,5
jung	Nahrung ad libitum	351,0
jung	Nahrung ad libitum	355,7
jung	Nahrung ad libitum	341,5
jung	Nahrung ad libitum	339,6
jung	Nahrung ad libitum	337,1
jung	Nahrung ad libitum	298,6
jung	Nahrung ad libitum	349,2
jung	Nahrung ad libitum	308,6
alt	Fasten	511,2
alt	Fasten	529,5
alt	Fasten	521,2
alt	Fasten	520,9
alt	Fasten	454,6
alt	Fasten	542,9
alt	Fasten	437,3
alt	Fasten	485,6
alt	Nahrung ad libitum	509,0
alt	Nahrung ad libitum	407,4
alt	Nahrung ad libitum	462,6
alt	Nahrung ad libitum	560,6
alt	Nahrung ad libitum	526,2
alt	Nahrung ad libitum	490,5
alt	Nahrung ad libitum	481,3
alt	Nahrung ad libitum	566,6

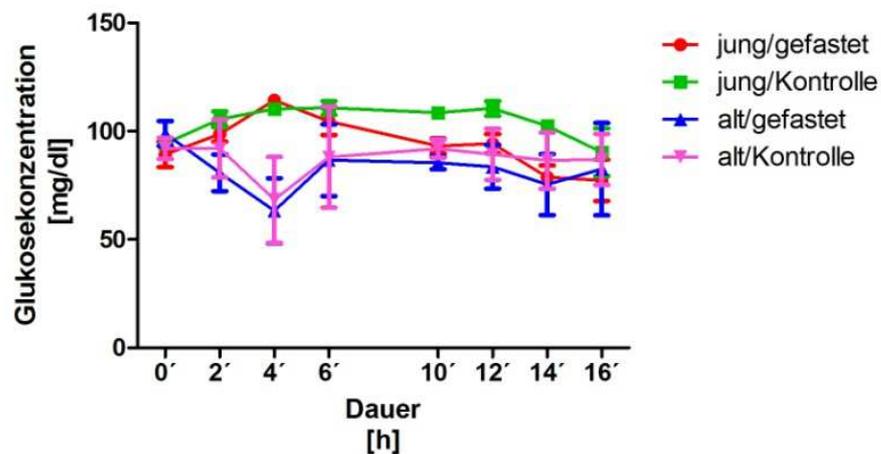
**Tabelle 3:** Gewichte der Ratten der Versuchsreihe „biologische Varianz“

## 2.1. Lebendgewichtsmessung

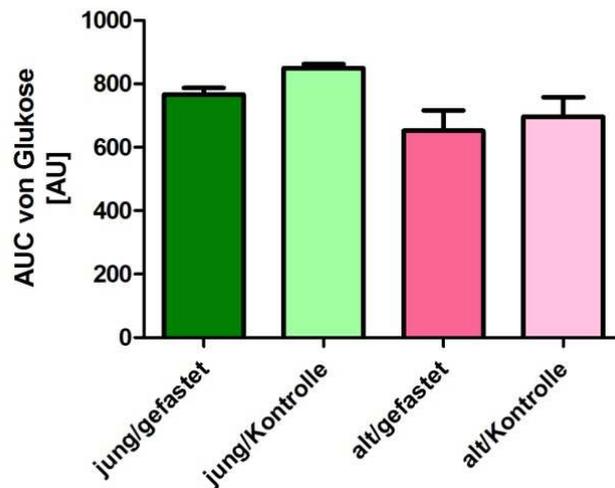
In **Tabelle 3** sind die Gewichte der Ratten des Versuchs „biologische Varianz“ aufgeführt. Die untersuchten Tiere wurden über 18 Stunden gefastet, die Kontrollgruppe hatte jeweils den gesamten Zeitraum über freien Zugang zu Nahrung. Das Durchschnittsgewicht der jungen gefasteten Ratten betrug 334,9 g, das der jungen Ratten mit ad libitum-Fütterung 335,2 g. Bei den alten Ratten betrug das Durchschnittsgewicht der gefasteten Ratten 500,4 g und das derer mit freiem Zugang zu Nahrung 500,5 g.

## 2.2. Glukosekonzentration im Blut der Ratten

Der Glukosespiegel im Blutkreislauf gesunder Ratten ist abhängig von der Nahrungsaufnahme und sinkt stetig, wenn diese keine Nahrung aufnehmen, bis die Glukoneogenese einsetzt (GOLDBLATT, 1929). In **Abbildung 25** wird die Glukosekonzentration der untersuchten Ratten über den untersuchten Zeitraum von 16 Stunden dargestellt.



**Abbildung 25:** Glukosekonzentration im Blut der Ratten zu den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwerte  $\pm$ SEM).

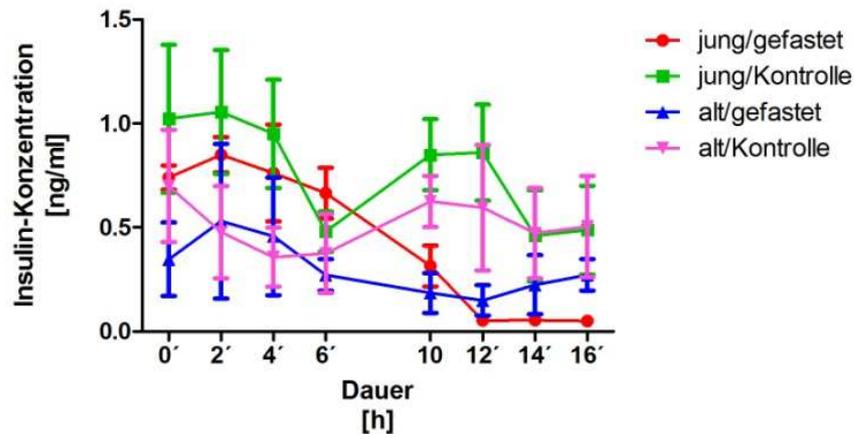


**Abbildung 26:** AUC (Area Under the Curve) der Glukosekonzentration in jungen und alten Ratten über den gesamten Versuchszeitraum. Die AUC-Werte der jungen und alten Ratten im gefasteten und im nicht-gefasteten Zustand wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Tests verglichen (Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM). Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen jungen gefasteten und jungen Kontrolltieren sowie zwischen alten gefasteten und alten Kontrolltieren.

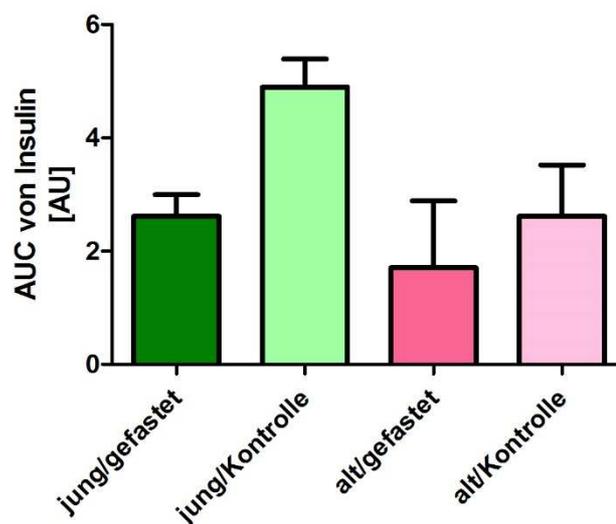
### 2.3. Insulinkonzentration im Blut der Ratten

Nachdem Banting und Best 1921 erstmals Insulin isolieren konnten wurden schnell auch dessen Hauptfunktionen erforscht. Insulin ist nötig, um Glukose in die Zellen aufnehmen zu können. Nach oraler Nahrungsaufnahme und der folgend hohen Glukosekonzentration im Blut haben gefastete Ratten stundenweise fortschreitend stetig geringere Insulinkonzentrationen im Blut als Kontrolltiere mit ad libitum-Fütterung. Auf das Alter bezogen waren zwischen jungen und alten Ratten wie in **Abbildung 27** ersichtlich, keine starken Unterschiede zu erkennen und auch in **Abbildung 28**, im Vergleich des Integrals per AUC (Area Under the Curve), war kein signifikanter Unterschied zwischen jungen gefasteten (jung/gefastet) und alten gefasteten (alt/gefastet) Ratten ersichtlich. Betrachtet man nur die gefasteten Tiere in Bezug auf eine lange andauernde Fastenperiode von 16h (**Abbildung 29**), so ist, im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt, eine signifikant geringere Insulinkonzentration ( $p < 0,01$ ) in jungen langzeitgefasteten Ratten gemessen worden. Im Gegensatz hierzu gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Insulinkonzentration zu Beginn des Experiments im Vergleich zum Zeitpunkt nach der Langzeitfastenperiode bei alten Ratten. Bei genauerer Betrachtung der

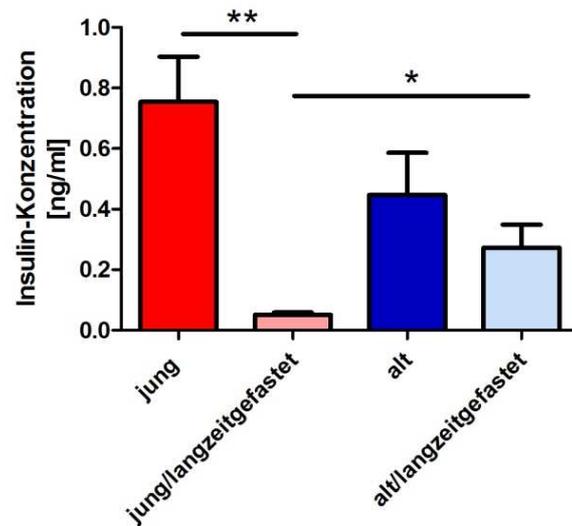
Altersgruppen „jung“ gegenüber „alt“ ließ sich nach 16h eine signifikant höhere Insulinkonzentration in alten Ratten im Gegensatz zu jungen Ratten feststellen. Im Vergleich beider Gruppen (junge und alte Ratten) zusammen, wie in **Abbildung 30** dargestellt, wurde der Zwischenwert nach 6h mit dem Langzeitfastenwert nach 16h verglichen. Es zeigt sich ein signifikantes Absinken der Insulinkonzentration zwischen den Zeitpunkten 6h und 16h ( $p < 0,5$ ).



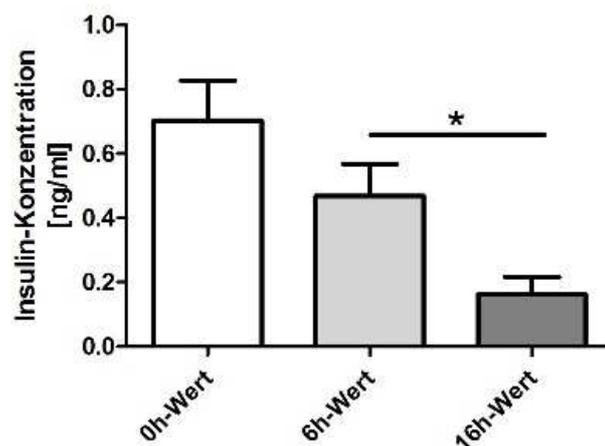
**Abbildung 27:** Insulinkonzentration im Blut der Ratten zu den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwerte  $\pm$ SEM).



**Abbildung 28:** AUC der Insulinkonzentrationen in jungen und alten Ratten über den gesamten Versuchszeitraum. Die AUC-Werte der jungen und alten Ratten im gefasteten und im nicht gefasteten Zustand wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Test verglichen (Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM).



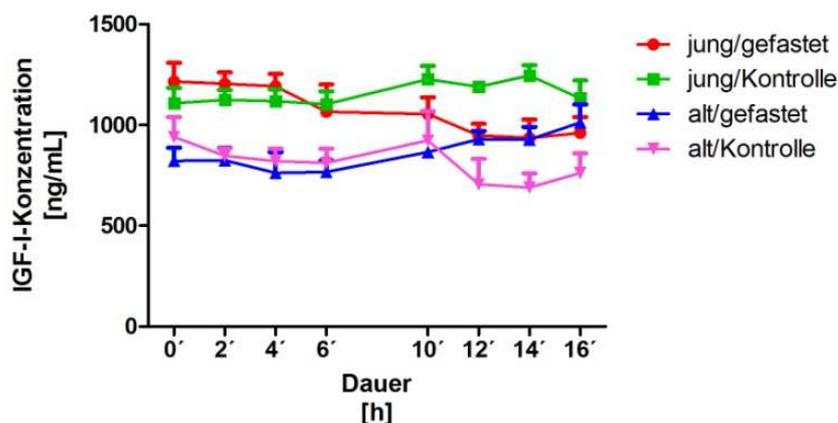
**Abbildung 29:** Insulinkonzentration junger und alter Ratten nach Langzeitfasten (Zeitpunkt 16h) im Vergleich zum Startzeitpunkt (0h). Statistisch signifikant mit  $*p < 0,05$  stellten sich die Gruppen „jung/gefastet“ gegenüber „alt/gefastet“ dar. Es wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen jungen langzeitgefasteten und alten langzeitgefasteten Ratten gefunden ( $*p < 0,05$ ). Die Werte der jungen und alten Ratten wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Tests verglichen (Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM,  $**p < 0,01$ ).



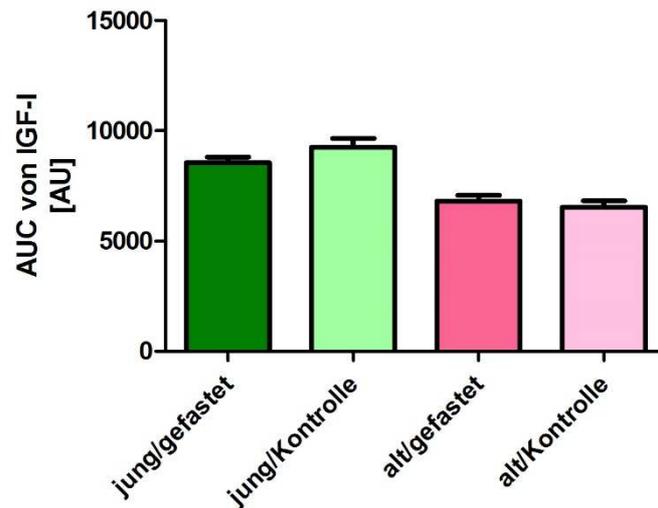
**Abbildung 30:** Insulinkonzentration im Verlauf des Fastens. Der 6' und 16'h-Wert wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Tests verglichen und es ist statistisch signifikant, in Bezug auf den Insulinwert, ob eine Ratte 6 oder 16h gefastet wurde ( $*p < 0,05$ ; Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM).

#### 2.4. IGF-I-Konzentration im Blut der Ratten

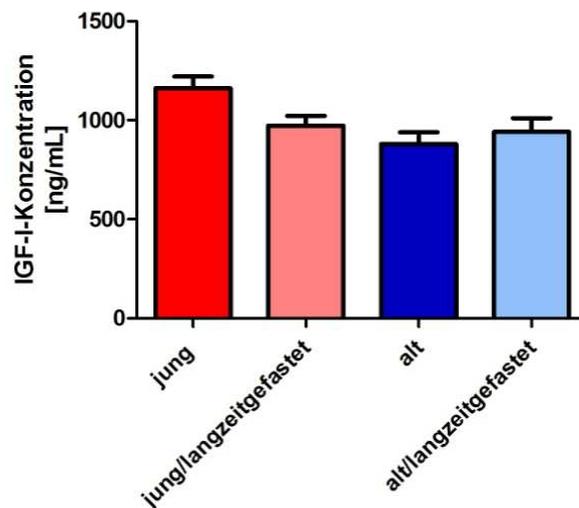
Während einer katabolen Stoffwechsellage, wie in einer andauernden Fastenperiode, kommt es zu einer Resistenz gegenüber GH in den Geweben und folglich zu einer geringeren IGF-I-Ausschüttung (BENTHAM et al., 1993). Des Weiteren stellt IGF-I einen Mediator für GH dar und wird für Zellproliferation, -differenzierung und -funktion benötigt (FRAGO & CHOWEN, 2005). Folglich ist es in der juvenilen Lebensphase in höherer Konzentration im Körper der Ratte vorhanden als im Erwachsenenstadium (**Abbildung 31**). Im Vergleich des Integrals von IGF-I der Gruppen „jung/gefastet“ mit „jung/Kontrolle“ und „alt/gefastet“ mit „alt/Kontrolle“ wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede detektiert. Ob die Tiere gefastet wurden oder freien Zugang zu Nahrung hatten und auch im Vergleich der „jung/gefastet“- mit der „alt/gefastet“-Gruppe konnten keine statistischen Signifikanzen bezüglich des Altersunterschiedes dargestellt werden (**Abbildung 32**). Bei genauerer Betrachtung der langzeitgefasteten Ratten in **Abbildung 33** ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen gefasteten Ratten und solchen mit ad libitum-Fütterung darstellen und auch zwischen jungen und alten Tieren gab es keinen signifikanten Unterschied.



**Abbildung 31:** IGF-I-Konzentration im Blut der Ratten zu den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwerte  $\pm$ SEM)



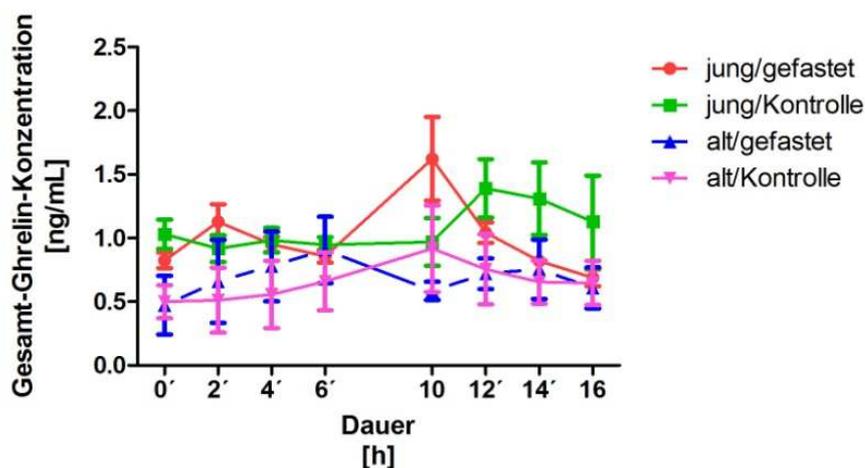
**Abbildung 32:** AUC der IGF-I-Konzentrationen in jungen und alten Ratten über den gesamten Versuchszeitraum. Die AUC-Werte der jungen und alten Ratten im gefasteten und im nicht gefasteten Zustand wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Test verglichen (Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM). Es gab keine statistischen Signifikanzen im Vergleich der vier untersuchten Gruppen.



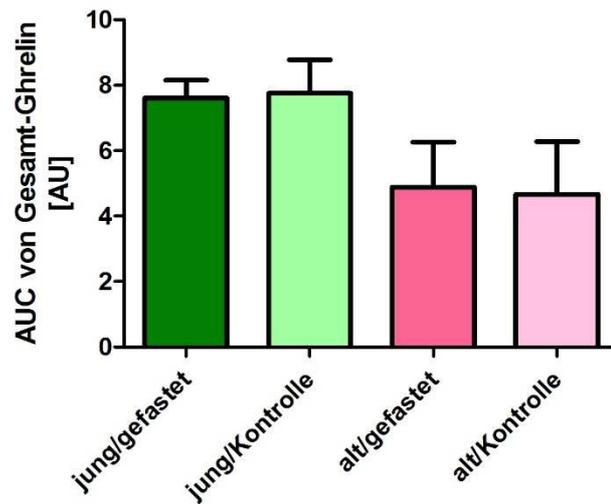
**Abbildung 33:** IGF-I-Konzentration junger und alter Ratten nach Langzeitfasten (Zeitpunkt 16h) im Vergleich mit Kontrolltieren (0h). Die Werte der jungen und alten Ratten wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Tests verglichen (Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen jungen langzeitgefasteten und alten langzeitgefasteten Ratten detektiert.

## 2.5. Gesamt-Ghrelin-Konzentration im Blut der Ratten

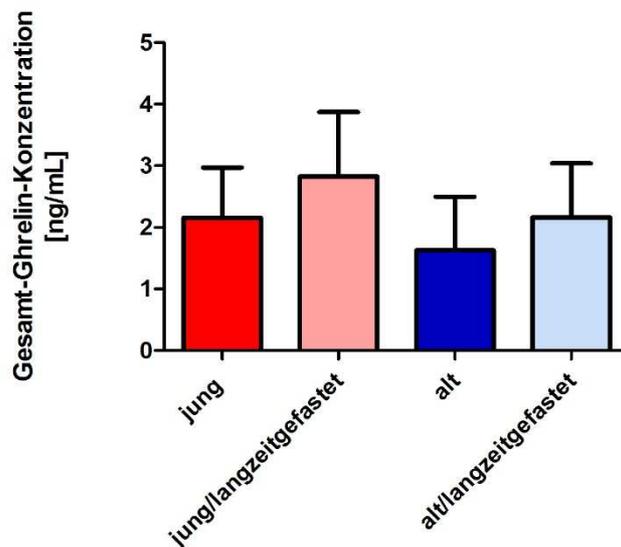
Das appetitanregende Hormon Ghrelin wird in Zuständen des Hungers in der Magenschleimhaut produziert, weswegen Ratten nach einem gewissen Zeitraum der Nahrungskarenz einen höheren Gesamt-Ghrelin-Spiegel im Blut aufweisen als Kontrolltiere mit uneingeschränktem Zugang zu Nahrung (KOJIMA et al., 1999). In **Abbildung 35** sind die Durchschnittswerte der jeweiligen Gruppe zu jedem Blutentnahmezeitpunkt grafisch dargestellt. Im Weiteren werden die AUC der vier Versuchsgruppen einander gegenübergestellt und es wurden keine statistischen Signifikanzen im Vergleich der Gruppen untereinander detektiert. Folglich gab es keinen statistischen Unterschied bezüglich des Alters der Ratten, ihrer Nahrungsaufnahme oder des Fastens. Bei genauerer Betrachtung der Gesamt-Ghrelin-Konzentrationen nach Langzeitfasten war zwar eine Tendenz zu erkennen, dass nach 16h die Gesamt-Ghrelin-Konzentration im Vergleich zur Ausgangssituation im Blut gestiegen ist, aber nicht im signifikanten Bereich (**Abbildung 36**). Des Weiteren konnte in dieser Grafik auch keine statistische Signifikanz bezüglich des Altersunterschiedes der Ratten herausgestellt werden.



**Abbildung 34:** Gesamt-Ghrelin-Konzentration im Blut der Ratten zu den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten



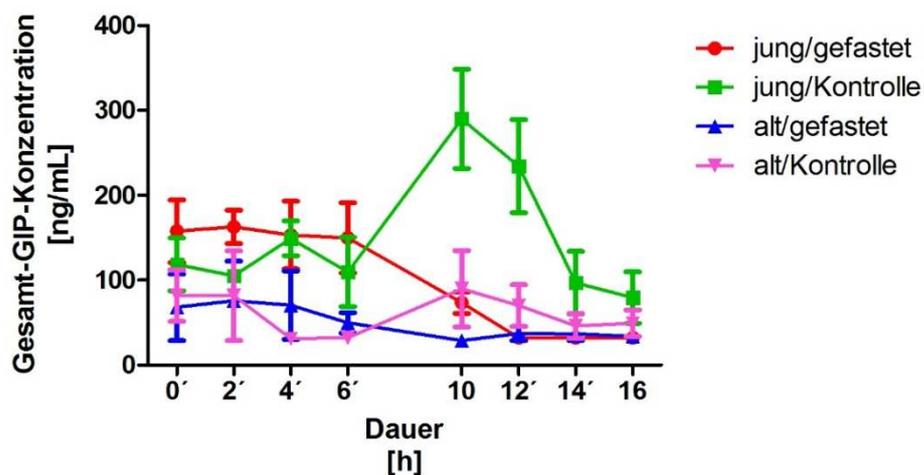
**Abbildung 35:** AUC der Gesamt-Ghrelin-Konzentrationen in jungen und alten Ratten über den gesamten Versuchszeitraum. Die AUC-Werte der jungen und alten Ratten im gefasteten und im nicht gefasteten Zustand wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Test verglichen (Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM). Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen.



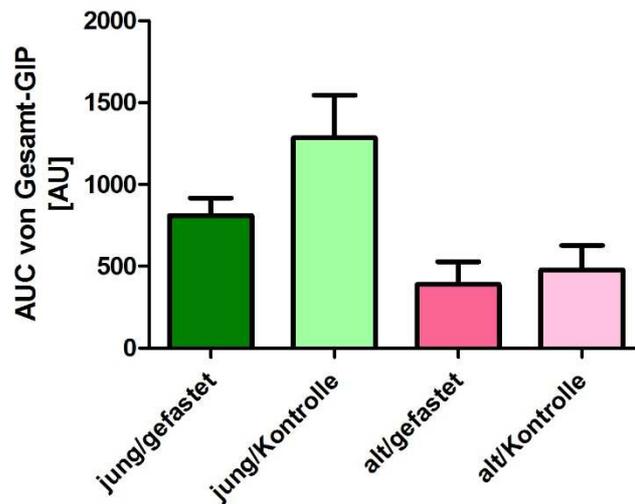
**Abbildung 36:** Gesamt-Ghrelin-Konzentration junger und alter Ratten nach Langzeitfasten (Zeitpunkt 16h) im Vergleich mit Kontrolltieren (0h). Die Werte der jungen und alten Ratten wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Tests verglichen (Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen jungen langzeitgefasteten und alten langzeitgefasteten Ratten detektiert.

## 2.6. Gesamt-GIP-Konzentration im Blut der Ratten

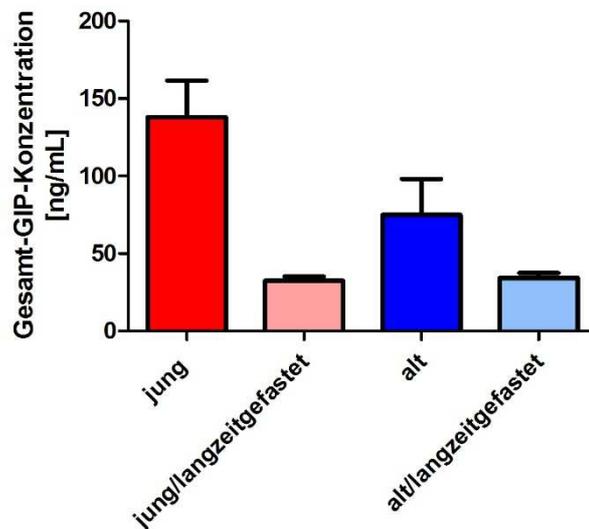
GIP ist ein Hormon, das nach Nahrungsaufnahme im Duodenum ausgeschüttet wird. Es stimuliert die Insulinausschüttung und folglich ist seine Konzentration im Blutkreislauf nach Aufnahme von Nahrung erhöht und in nüchternem Zustand erniedrigt (BROWN et al., 1970; CREUTZFELDT, 1979). Während andauerndem Fasten sank in dieser Studie die Gesamt-GIP-Konzentration der Ratten stetig, wohingegen die Werte der Kontrolltiere mit freiem Zugang zu Nahrung, entsprechend ihrer Nahrungsaufnahme, divergierten (**Abbildung 37**). Im Vergleich der AUC der Gesamt-GIP-Konzentrationen der einzelnen Gruppen ließen sich zwischen jung/gefastet und alt/gefastet, sowie zwischen jung/gefastet und jung/Kontrolle, sowie zwischen alt/gefastet und alt/Kontrolle keine statistisch signifikanten Unterschiede detektieren (**Abbildung 38**). Bei genauerer Betrachtung langzeitgefasteter Ratten ließ sich ein Unterschied im Vergleich von jungen mit jungen langzeitgefasteten Ratten erkennen, der jedoch nicht signifikant war. Im Vergleich alter nicht gefasteter mit alten langzeitgefasteten Ratten war kein Unterschied zu erkennen (**Abbildung 39**). Bei der Messung von Gesamt-GIP machte es einen deutlichen Unterschied, ob Ratten 6 oder 16h gefastet wurden (**Abbildung 40**), da nach 6h die Gesamt-GIP-Konzentration im Blut kaum, aber nach 16h signifikant reduziert war ( $p < 0,05$ ).



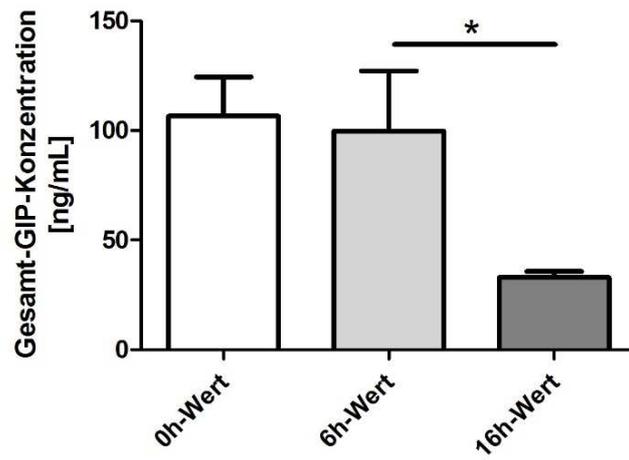
**Abbildung 37:** Gesamt-GIP-Konzentration im Blut der Ratten zu den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten (Mittelwerte  $\pm$ SEM).



**Abbildung 38:** AUC der Gesamt-GIP-Konzentrationen in jungen und alten Ratten über den gesamten Versuchszeitraum hinweg. Die AUC-Werte der jungen und alten Ratten im gefasteten und im nicht gefasteten Zustand wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Tests verglichen (Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM).



**Abbildung 39:** Gesamt-GIP-Konzentration junger und alter Ratten nach Langzeitfasten (Zeitpunkt 16h) im Vergleich mit Kontrolltieren (0h). Die Werte der jungen und alten Ratten wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Test verglichen (Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen jungen langzeitgefasteten und alten langzeitgefasteten Ratten detektiert.



**Abbildung 40:** Gesamt-GIP-Konzentration im Verlauf des Fastens. Der 6 und 16h-Wert wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U Test verglichen und waren statistisch signifikant (\* $p < 0,05$ ; Darstellung: Mittelwerte  $\pm$ SEM).

## V. DISKUSSION

Die Erforschung, Diagnostik und Therapiekontrolle vieler Erkrankungen beinhaltet häufig die Messung verschiedener Hormone. Unterschiede in den Konzentrationen dieser Analyten werden hinsichtlich der biologischen Variabilität ausgewertet. Häufig wird jedoch übersehen, dass nicht nur die biologische Variabilität das Messergebnis beeinflusst, sondern auch weitere Faktoren, nämlich die präanalytische und die analytische Variabilität. In der Humanmedizin wird die Relevanz der Präanalytik als ernstzunehmende Fehlerquelle in der Messung von Hormonen mit steigender Tendenz beobachtet. Plebani untersuchte 2006 in humanmedizinischen Studien präanalytische Abläufe und führte die meisten Abweichungen in Laboruntersuchungen auf Fehler in prä- und postanalytischen Prozessen und nur zu einem geringen Prozentsatz auf die eigentliche Analytik zurück. Bis zu 70% der von Plebani analysierten Fehler fanden in der präanalytischen Phase statt. Als Konsequenz wurde, in den an der Studie teilnehmenden Krankenhäusern, das Personal intensiver geschult, um größere Sorgfalt bei der Probenentnahme und Beschriftung zu erreichen. Durch diesen bewussteren Umgang mit Probenmaterial konnten in einer weiteren Studie, die in der Präanalytik detektierten Fehler innerhalb von zehn Jahren signifikant reduziert werden ( $p < 0,05$ ), jedoch hätten immer noch 73% der aufgedeckten Fehler vermieden werden können (CARRARO & PLEBANI, 2007).

Es gibt in der Literatur Empfehlungen zur Interpretation präanalytischer Bedingungen, jedoch sind diese zum aktuellen Zeitpunkt nur vereinzelt für verschiedene Parameter zu finden (GILOR & GILOR, 2011; LOMBARDI et al., 2012). Für die Veterinärmedizin gibt es schon erste Veröffentlichungen bezüglich Präanalytik (BRAUN et al., 2015). Auch die amerikanische Organisation „D.C. Academy Veterinary Medicine“ hat auf ihrer Internetseite eine Leitlinie veröffentlicht in der Fehlerquellen der Präanalytik wie zum Beispiel Lipämie, Hämolyse und EDTA-Kontamination von Serum beschrieben werden. Die Organisation beschreibt weiter, welchen Einfluss diese Probenveränderungen auf gängige Untersuchungsparameter haben und wie sie vermieden werden können. Zusätzlich haben sie eine Anleitung zur korrekten Probenentnahme der gängigsten Untersuchungsmaterialien herausgegeben (SHELL, 2014). Eine Lipämie kann die Messwerte von diversen Parametern wie Glukose oder Bilirubin falsch erhöhen oder zum Beispiel bei Albumin falsch erniedrigt darstellen. Hämolyse bedingt unter

anderem zu hohe Konzentrationen von Glukose, Hämoglobin oder Bilirubin (LABOKLIN, 2001). Auch die „American Association of Veterinary Laboratory Diagnostic Investigation“ hat nach einer Langzeitstudie in einem Labor für veterinärmedizinisches Probenmaterial eine Leitlinie zur Reduzierung der Fehlerrate während der präanalytischen Phase herausgegeben, jedoch wird in dieser Veröffentlichung nicht auf einzelne Parameter, sondern nur allgemein auf Fehler im Prozessablauf eingegangen (HOOIJBERG et al., 2012). Lippi et al. haben 2007 im Namen der „Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology-Italian Society of Laboratory Medicine-Italian Committee for Standardization of Hematological and Laboratory Methods“ für Italien nationale Richtlinien für die Präanalytik in der Humanmedizin herausgegeben, in denen das Management von fehlerhaftem Probenmaterial erläutert wird (LIPPI et al., 2007). Als beeinträchtigende Faktoren werden von Lippi die Verwendung von ungeeignetem Probenmaterial, Verwechslung von Proben, in vitro Hämolyse, Blutgerinnung, ungeeignetes Probenvolumen, falsche Probengefäße und Kontamination durch Infusionsflüssigkeiten definiert. Diese Fehler können laut Lippi et al. durch adäquate Schulung des Personals verringert werden. Somit ist in der Human- wie auch Veterinärmedizin bereits seit längeren Jahren die Präanalytik als potentielle Fehlerquelle ein Thema, das regelmäßig analysiert wird. Allerdings wurde dieses wichtige Themengebiet bislang in der biomedizinischen Grundlagenforschung, im Speziellen in der Erforschung von Stoffwechselhormonen bei Nagern, kaum und bislang nur unzureichend untersucht. Deswegen sollte in der vorliegenden Arbeit darauf eingegangen werden, wie stark diverse Aspekte der Präanalytik Einfluss auf die messbare Konzentration verschiedener zirkulierender Stoffwechselhormone bei der Ratte haben. Es konnte klar gezeigt werden, dass die Auswahl des Untersuchungsmaterials, dessen Bearbeitung, wie auch die Verwendung von Probenzusätzen die Konzentration des untersuchten Analyten signifikant beeinflussen können.

## **1. Auswirkung der Auswahl unterschiedlicher Probenmaterialien auf GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, Gesamt-GIP, aktives GLP-1, Insulin, Leptin und Gesamt-Ghrelin**

In dieser Studie wurde ein Vergleich von Serum- und EDTA-Plasma-Konzentrationen verschiedener Hormone in der Messung mit demselben Immunassay durchgeführt. Gerinnungshemmer, wie zum Beispiel EDTA, können Komplexe ausbilden, vor allem mit Kalzium und anderen zweiwertige Kationen. Diese Kationen werden von vielen Enzymen zur Spaltung von Proteinen benötigt. Der enzymatische Abbau vieler Proteine in der Plasmaprobe wird somit durch gerinnungshemmende Stoffe, wie EDTA, verlangsamt. Dies hat bei diversen Analyten unterschiedlich hoch gemessene Konzentrationen in Serum und EDTA-Plasma zur Folge. Nach der Auftrennung von Vollblut in Serum und Blutkuchen enthält das Serum, im Gegensatz zu EDTA-Plasma, noch Gerinnungsfaktoren und hat deswegen einen höheren Proteinanteil. Immunassays können sensibel auf diesen unterschiedlichen Proteingehalt in der Probe reagieren und abweichende Messwerte für Hormone ergeben (BIELOHUBY et al., 2012). In der bisherigen Literatur wurde die Beobachtung unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Stoffwechselhormone in direktem Vergleich von Serum zu EDTA-Plasma bereits beschrieben (YU et al., 1999; JAFRI et al., 2014). Bei Haustieren hat sich für die Messung gängiger Hormonwerte die Untersuchung von Serum etabliert. In der Forschung, gerade bei neu entdeckten Hormonen, wurden oft noch keine Standards entwickelt, aus welchem Probenmaterial diese Hormone gemessen werden sollen. Des Weiteren gibt es in der Forschung mit Nagetieren limitierte Blutentnahmemengen pro Tier und folglich häufig eingeschränkte Möglichkeiten unterschiedliches Probenmaterial zu gewinnen und zu untersuchen (WOLFENSOHN & LLOYD, 2003; IDEXX LABORATORIES, 2013; SYNLAB\_LABORDIENSTLEISTUNGEN, 2013). In den Ergebnissen dieser Arbeit ist ein messbarer Unterschied der absoluten Konzentrationen zwischen EDTA-Plasma und Serum verschiedener Stoffwechselhormone zu erkennen. Es ist somit anzuraten keinen Vergleich der Hormone GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, GLP-1 und Leptin aus Serum zu solchen aus EDTA-Plasma anzustellen, da in dieser Studie signifikante Unterschiede in den Konzentrationen dieser Hormone zwischen Serum und EDTA-Plasma festgestellt wurden. Es kann empfohlen

werden in fortlaufenden Studien oder beim Vergleich zweier Studien darauf zu achten, stets das gleiche Untersuchungsmaterial zur Hormonanalytik bei der Ratte zu verwenden, um Konzentrationsabweichungen zu vermeiden, die durch Materialdivergenz bedingt sind.

## **2. Einfluss des Zusatzes von Proteaseinhibitoren zu Blutproben auf GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, Gesamt- GIP, aktives GLP-1, Insulin, Leptin und Gesamt-Ghrelin**

Durch sofortige Zugabe von Proteaseinhibitoren zu Vollblut nach der Blutentnahme werden im Probenmaterial enzymatische Abbauprozesse begrenzt (AYACHE et al., 2006). Proteaseinhibitoren dienen der Hemmung von speziellen Enzymen, den Peptidbindungshydrolyasen, kurz Proteasen, die Proteine und Peptide spalten. Es gibt vier Klassen von Proteasen (Serin-, Cystein-, Metallo- und Aspartatproteasen), die durch unterschiedliche Proteaseinhibitoren, wie zum Beispiel Aprotinin, EDTA oder Leupeptin, gehemmt werden können. Sie haben einen voneinander abweichenden Aufbau und unterschiedliche aktive Zentren. Der DPP4-Inhibitor, stellt eine spezielle Art von Proteaseinhibitor dar, da er den Abbau von Glukagon-like Peptide 1 (GLP-1) durch das Enzym Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) hemmt. Es nimmt den Platz des GLP-1 im aktiven Zentrum des DPP-4 ein und hemmt somit kompetitiv die Spaltung von GLP-1. Durch Proteaseinhibitoren werden folglich Spaltungsprozesse im Plasma aufgehalten und der Abbau der Proteine verlangsamt. Ayache et al. haben Plasmaproben von Menschen über zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt bevor sie weiter bearbeitet wurden. Die Immunassays dieser Versuchsreihe detektierten höhere Konzentrationen der meisten untersuchten Proteine als gewöhnlich. Zusätzlich konnte Probenmaterial, das mit Proteaseinhibitoren versetzt worden war, über einen längeren Zeitraum hinweg bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, ohne dass sich die Messergebnisse signifikant veränderten (AYACHE et al., 2006). Eine andere Arbeitsgruppe beschrieb in ihrer Studie den Einfluss von Proteaseinhibitoren, wie zum Beispiel Sulfonylhalogene, auf die Gelelektrophorese in der Bestimmung von Apolipoprotein und die daraus resultierenden falsch hohen Werte (SCHUCHARD et al., 2005). Für geplante Studien werden die zu verwendenden Proteaseinhibitoren entsprechend

ausgewählt, um möglichst geringe Abweichungen der Konzentration der zu untersuchenden Analyten zu erhalten. Vergleicht man die Ergebnisse von Ayache et al. und Schuchard et al. mit den Ergebnissen in dieser Studie, so kann die Notwendigkeit von Proteaseinhibitoren zur Messung ausgewählter Proteine bestätigt werden. Bei Betrachtung der von uns gemessenen Hormone in Ratten ist nur für die Messung von aktive GLP-1 die Zugabe von Proteaseinhibitoren nötig, um die Proteolyse der GLP-1-Moleküle durch DPP-4 zu reduzieren. Laut den Ergebnissen dieser Studie ist ein spezieller DPP-4-Inhibitor nicht nötig, um aktives GLP-1 messen zu können. Das spricht für einen gleichwertigen Ersatz des allgemeinen Proteaseinhibitors im aktiven Zentrum des DPP-4, wodurch DPP-4 nicht nur durch den DPP-4-Inhibitor gehemmt werden kann. Der in dieser Studie verwendete allgemeine Proteaseinhibitor complete® (Roche, Schweiz) wird laut Hersteller zur Hemmung von Pankreasextrakt, Pronase, Thermolysin, Chymotrypsin, Trypsin und Papin eingesetzt (ROCHE, 2014). Es gab keinen signifikanten Unterschied der Konzentrationen zwischen den Probenmaterialien, die mit allgemeinem Proteaseinhibitor versetzt waren (EDTA+Prot) und solchen, die zusätzlich noch mit DPP-4-Inhibitor behandelt wurden (EDTA+Prot+DPP-4-inh.). Da die Proteaseinhibitoren die Konzentrationen der anderen gemessenen Hormone nicht beeinflusst haben, ist es zu empfehlen, diese bei jeder Probenentnahme vorsorglich zuzufügen.

### **3. Wirkung von Transport-, Bearbeitungs-, und Aufbewahrungskonditionen auf GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, Gesamt- GIP, aktives GLP-1, Insulin, Leptin und Gesamt-Ghrelin**

Diese Studie hat sich in einem weiteren Punkt mit der Beeinflussung von Zimmertemperatur, im Gegensatz zu Kühlung, von Blutproben auf Eis, im Zeitraum von der Probenentnahme bis zum Einfrierprozess, auf EDTA-Plasma beschäftigt. Es ist bekannt, dass die Proteolyse durch Kühlung der Blutproben verlangsamt wird. Jedoch war bisher noch unklar, ob sich während einer gängigen Bearbeitungsdauer von Blutproben die Konzentrationen verschiedener Stoffwechselformone bei der Ratte signifikant verändern können. Im Vergleich von gekühltem zu ungekühltem Material konnte in den gemessenen

Konzentrationen in dieser Studie kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die enzymatische Aktivität in zimmerwarmen Proben hat die von gekühlten Proben nur geringfügig überstiegen, weswegen der Zeitraum des Bearbeitens des Materials in unserem Fall vernachlässigt werden konnte, aufgrund der schnellen Bearbeitung. Yae et al. haben die unterschiedlichen Aufbewahrungskonditionen nach dem Zentrifugieren und ihren Einfluss auf die Messung molekularer Marker von Koagulantien untersucht. Diese haben nach vier Stunden aus Plasma, welches unter den Bedingungen „ungekühlt“, „auf Eis“, „auf Eis nach dem Zentrifugieren“ und „Einfrieren nach dem Zentrifugieren“ gehalten wurde, verschiedene molekulare Marker der Koagulanzen (lösliches Fibrin, Thrombin-Antithrombin-Komplex, Thrombomodulin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Komplex) gemessen. Sie konnten für mehrere molekulare Marker einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Bedingungen herausfinden. Die Messung anderer Marker blieb jedoch von den unterschiedlichen Aufbewahrungskonditionen unbeeinflusst. Als optimale Vorbereitung der Proben wird von Yae et al. direktes Einfrieren nach dem Zentrifugieren empfohlen (YAE et al., 2012). Folglich ist es anzuraten Proben zur Messung von Hormonen zügig zu bearbeiten, um den Temperatureinfluss als präanalytischen Faktor möglichst gering zu halten.

#### **4. Folgen von mehrfachen Einfrier-Auftau-Zyklen auf GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, Gesamt- GIP, aktives GLP-1, Insulin, Leptin und Gesamt-Ghrelin**

Der Effekt von Einfrier-Auftau-Zyklen auf Serum und Plasma wurde mit der Einführung von Plasma- und Serumbanken in der Humanmedizin genauer untersucht. In diesem Zusammenhang ergab sich erstmals die Fragestellung, wie oft humanes Serum und Plasma einem Einfrier-Auftau-Zyklus unterzogen werden kann, ohne eine Beeinflussung der Messergebnisse von gängigen Analyten zu erfahren. Die Untersuchung von geschlechtsspezifischen Hormonen von Comstock et al. in Serum, wurde weniger stark durch Einfrier-Auftau-Zyklen beeinflusst als in Plasma. Des Weiteren konnte durch eine Messung nach drei, sechs und zehn Einfrier-Auftau-Zyklen eine stetige Reduktion der Konzentration diverser Spurenelemente, Sexualhormone und anderer Analyten nachgewiesen werden. Cholesterol stellte die einzige Ausnahme dar. Seine Konzentration blieb bis zum

zehnten Auftauvorgang stabil (COMSTOCK et al., 2008).

Die Gruppe um Paltiel hat 2008 in einer Studie die Konzentrationsveränderungen bei bis zu 100 Einfrier-Auftau-Zyklen von menschlichem Plasma untersucht. Bis zu zehn Zyklen haben die untersuchten Analyten kaum beeinflusst, ab 30 Einfrier-Auftau-Zyklen sind jedoch signifikante Unterschiede bei den Messergebnissen von freien Fettsäuren, AST und Triglyceriden aufgetreten, wohingegen Natrium, Cholesterin und Vitamin E stabil blieben (PALTIEL et al., 2008). Tvarijonaviciute et al. haben eine Gegenüberstellung von den Gesamt-Ghrelin-Konzentrationen in Serum, EDTA-Plasma, EDTA-Plasma mit Proteaseinhibitor und Plasma mit zugesetztem Heparin nach drei Einfrier-Auftau-Zyklen beim Hund untersucht und konnten während dieser drei Zyklen keine signifikanten Veränderungen detektieren (TVARIJONAVICIUTE et al., 2013). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Studie „analytische Variabilität“ nach zehnmaligen Einfrier-Auftau-Zyklus eine gesunkene Konzentration von Gesamt-Ghrelin im Serum der Ratten gemessen werden. Ebenso haben sich in der Humanmedizin Yu et al. mit dem Einfluss von fünf Einfrier-Auftau-Zyklen auf die EDTA-Plasmalevel von IGF-I, IGF-II und IGFBP-3 sowie Livesey et al. mit GH, Insulin und weiteren anderen Hormonen beim Menschen beschäftigt (LIVESEY et al., 1980; YU et al., 1999). Es konnte kein signifikanter Einfluss wiederholter Einfrier-Auftau-Zyklen auf die gemessenen Konzentrationen der untersuchten Hormone festgestellt werden, lediglich auf Insulin (LIVESEY et al., 1980; YU et al., 1996). Vergleicht man die Arbeiten von Livesey et al. und Reyna et al. haben beide eine Reduktion der Konzentration von Insulin nach zehn Einfrier-Auftau-Zyklen gemessen, Livesey et al. in EDTA-Plasma und Reyna et al. in Serum (LIVESEY et al., 1980; REYNA et al., 2001). In dieser Studie „präanalytische Variabilität“ konnten die Ergebnisse von Livesey et al. und Reyna et al. bezüglich der reduzierten Insulinkonzentration nach zehn Einfrier-Auftau-Zyklen ebenfalls bestätigt werden. Für IGF-II, IGFBP-3 und Leptin wurden in dieser Studie nach zehn Einfrier-Auftau-Zyklen höhere Konzentrationen der Analyten im Vergleich zum unbehandelten Serumwert gemessen. Eine mögliche Ursache ist die Bildung von Proteinfragmenten, hervorgerufen durch das regelmäßige Auftauen der Proben. Im Immunassay könnten Molekülfragmente als ganze Moleküle detektiert werden und folglich falsch hohe Hormonkonzentrationen gemessen werden. Des Weiteren ist zu überprüfen, ob das Untersuchungsmaterial aus Serum oder EDTA-Plasma bestand, da zusätzlich matrixspezifische Unterschiede hinzukommen können (YU et al.,

1996; TVARIJONAVICIUTE et al., 2013). Die Matrix ist das Medium, in dem die zu untersuchende Variable gelöst ist. Es gibt verschiedene physiologische Eigenschaften der Matrix, wie Viskosität, pH-Wert, mineralische und molekulare Zusammensetzung, die sich in den unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien, wie zum Beispiel Vollblut im Gegensatz zu Urin, unterscheiden. Matrixeffekte sind Störeffekte, die durch verschiedenen Komponenten in der Probe ausgelöst werden können. Die Konzentration des zu messenden Hormons wird zum einen in der quantitativen Bestimmung beeinflusst, zum anderen können Matrixeffekte auch die Molekülstruktur des Analyten verändern oder auf dessen Stabilität in der 3D-Struktur des Moleküls einwirken (BIELOHUBY et al., 2012).

## **5. Auswirkung von Ansäuern des Probenmaterials mit HCl auf GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, Gesamt- GIP, aktives GLP-1, Insulin, Leptin und Gesamt-Ghrelin**

Um acyliertes Ghrelin mittels Immunassay messen zu können wird stark empfohlen das Probenmaterial direkt nach dessen Entnahme mit HCl anzusäuern, um den pH-Wert zu senken (LIU et al., 2008). Dadurch wird die Abspaltung der Acylgruppe vom restlichen Ghrelin-Molekül verhindert und das Molekül bleibt aktiv. Andere Hormone benötigen diese Art der Probenvorbereitung nicht. Falls dennoch aus vorangegangenen Ghrelin-Messungen Probenmaterial übrig bleibt, war bisher unklar, ob dieses Material noch für die Messungen anderer Analyten verwendet werden kann. Bisher gibt es kaum Literatur diesbezüglich, weswegen in dieser Studie untersucht wurde, ob es möglich ist aus diesen speziell angesäuerten Plasmaproben weitere Hormone zu messen. IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3 und Gesamt-GIP konnten neben acyliertem Ghrelin ohne signifikante Konzentrationsveränderungen aus angesäuertem EDTA-Plasma gemessen werden. Die Arbeitsgruppe um Tvarijonaviciute hat sich 2013 mit dem Einfluss von HCl auf die Stabilität von Blutproben für die Messung von Gesamt-Ghrelin und acyliertem Ghrelin beschäftigt. Sie haben keinen positiven Einfluss von HCl auf die Messung von Gesamt-Ghrelin detektieren können, es reduzierte stattdessen die messbare Konzentration von Gesamt-Ghrelin. Es konnte ebenfalls ein Einfluss von HCl auf die Messung von Gesamt-Ghrelin festgestellt werden, da die gemessenen Konzentrationen nach HCl-Zugabe geringer waren (TVARIJONAVICIUTE et al.,

2013).

## 6. Biologische Variabilität

Physiologische und pathologische Prozesse werden oft in Ratten untersucht, weswegen für diese Studie Ratten verwendet wurden. Bei Mäusen wäre aufgrund des, im Vergleich zu Ratten, geringeren Blutvolumens eine Untersuchung in dieser Ausführlichkeit nicht möglich gewesen. Viele Hormone sind bereits bei der Ratte und dem Menschen erforscht, jedoch werden immer wieder neue Hormone entdeckt und häufig kommen neue Fragestellungen in Bezug auf verschiedene Krankheiten auf. Deswegen ist es elementar zu wissen, welche Besonderheiten es in der Physiologie der Ratte gibt und welche Auswirkungen diese auf verschiedene Stoffwechselformone haben. In dieser Arbeit wurde im Speziellen auf zwei Aspekte der biologischen Variabilität eingegangen, nämlich das Alter und das Fasten. Es wurde untersucht wie sich diese beiden physiologischen Parameter auf die zirkulierenden Konzentrationen von Insulin, IGF-I, Gesamt-Ghrelin, und Gesamt-GIP auswirken können. Die biologische Variabilität beschreibt interindividuelle Schwankungen genetischen, exogenen und endogenen Ursprungs, weswegen in Studien für gewöhnlich Versuchsgruppen mit Kontrollgruppen verglichen werden, um spezielle Unterschiede gegenüber Referenzgruppen zu ermitteln. Beim Menschen ist bekannt, dass verschiedene Hormone, wie zum Beispiel IGF-I und IGF-II, in verschiedenen Lebensabschnitten in unterschiedlich hoher Konzentration vorliegen, weswegen bereits Referenzwerte für bestimmte Altersklassen vorliegen (HOLLAND et al., 1997; JUUL, 2003; ERTL et al., 2014). In der Forschung mit Ratten, insbesondere bei der Erforschung neuerer Hormone, gibt es häufig nur wenige oder keine Referenzbereiche für die entsprechenden Altersklassen. Empfehlungen, Ratten welchen Alters für bestimmte Studien untersucht werden sollten existieren kaum. In der aktuellen Literatur sind verschiedene Studien auffindbar, die für die Erforschung von Stoffwechselformonen bei der Ratte unterschiedliche Altersgruppen von Ratten verwenden. Verschiedene Angaben zwischen „neun Wochen“ und „adult“ sind aufzufinden. Im Vergleich mehrerer dieser Studien ist unklar, ob Differenzen in den beobachteten Hormonkonzentrationen altersbedingt oder durch das jeweilige Experiment zustande gekommen sind (PRIEGO et al., 2003; KALE et al., 2009;

KINZIG et al., 2010).

Eine Nahrungsaufnahme verändert im Stoffwechsel die Konzentration vieler zirkulierender Hormone, wie zum Beispiel Insulin oder Ghrelin, weswegen für einen besseren Vergleich solcher Hormone, Werte im nüchternen Zustand der Ratten gemessen werden. Die physiologische Verdauungszeit beim Menschen beträgt im Durchschnitt 24-72 Stunden, bei der Ratte sind es 6 bis 11 Stunden, je nach Alter des Tieres (SCHLUG, 2005; KONG & SINGH, 2008). Deswegen sollten Ratten entsprechend lange und standardisiert gefastet werden, um adäquat vergleichbare Werte zu erhalten.

### **6.1. Einfluss der Fastendauer auf Glukose, Insulin, IGF-I, Gesamt-Ghrelin und Gesamt-GIP bei Ratten**

In dieser Studie wurden Ratten über einen Zeitraum von bis zu 16 Stunden gefastet und es wurde untersucht welchen Einfluss ein unterschiedlicher Fastenzeitraum auf die zirkulierenden Konzentrationen von Insulin, IGF-I, Gesamt-Ghrelin und Gesamt-GIP bei der Ratte hat. Leitlinien der OECD empfehlen bei Ratten für eine geeignete Messung von verschiedenen Parametern wie Natrium, Kalium, Bilirubin, Gallensäuren, Glukose, Cholesterin, Harnstoff, Kreatinin und diversen anderen Enzymen einen Fastenzeitraum von 12-18 Stunden bzw. „über Nacht“ (OECD, 2008). Auch die Society of Toxicologic Pathology hat Leitlinien zur Messung diverser Analyten in Hämatologie, klinischer Chemie und Urinanalyse herausgegeben und hält das Fasten „über Nacht“ für angemessen, das bei einem regulären zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus zwölf Stunden fasten entspricht (WEINGAND et al., 1992). Die Gesellschaft für Versuchstierkunde und die tierärztliche Vereinigung für Tierschutz empfehlen grundsätzlich für Blutentnahmen bei der Ratte keinen zeitlichen Abstand zur Futtermittelaufnahme entstehen zu lassen. Falls jedoch die experimentelle Erfordernis gegeben ist, dürfen die Ratten zu Versuchszwecken gefastet werden. Eine Angabe bezüglich der Fastendauer geben sie jedoch nicht (TVT, 2009). Kale et al. haben 2009 die Auswirkungen der Fastendauer auf Hämatologie und Standardwerte der klinischen Chemie bei Ratten untersucht. Sie haben bei den in Serum untersuchten Parametern für Glukose und Triglyceride in beiden Geschlechtern, als auch für Cholesterin und High-density Lipoprotein (HDL) nur in weiblichen Ratten, signifikante Veränderungen nach 16-stündiger Fastendauer festgestellt. Deswegen empfehlen

Kale et al. eine Fastendauer von 16 Stunden für präklinische Studien und die Messung klinischer pathologischer Analyten (KALE et al., 2009). Kale et al. haben zusätzlich eine Verringerung der Glukosekonzentration im Blut der Ratten ab 16 Stunden Fasten festgestellt, ein Zeitrahmen, der ebenfalls in dieser Studie („biologische Varianz“) bestätigt werden konnte. Auch Nowland et al. haben sich 2011 mit dem Fasten von Ratten und deren Auswirkung auf Blutchemie, CBC Analyse und Corticosteron beschäftigt. Sie empfehlen ebenfalls eine maximale Fastendauer von 16 Stunden (NOWLAND et al., 2011). Zwar ist die Verringerung der Glukosekonzentration im Blut der Ratten nicht stetig sinkend gewesen und auch nicht signifikant niedriger als zum Beginn des Versuchs zum Blutentnahmezeitpunkt „0 Stunden“, jedoch fördert das Fasten die Produktion des Stresshormons Cortisol, welches die Glukoneogenese in der Leber anregt. Es werden Pyruvat, Oxalacetat und Dihydroxyacetonphosphat mobilisiert und entsprechend in Glukose umgesetzt, um den Kreislauf des Tieres aufrechtzuerhalten (HILGERS, 2010). Bei einer Fastendauer die 16 Stunden übersteigt, verändern sich die Organgewichte der Ratten und Dehydratation, ernährungsbedingtes Ungleichgewicht und ein veränderter Metabolismus stellen sich ein (MATSUZAWA, 1994; KALE et al., 2009). Es wird folglich bei einer länger als 16 Stunden andauernden Fastenzeit schwer zu unterscheiden, ob die beobachteten Konzentrationsveränderungen der Analyten aufgrund der Fastendauer entstanden sind oder wie eigentlich gewünscht, sich aufgrund der entsprechenden Versuchsdurchführung verändert haben. Es wird von verschiedenen Autoren empfohlen Ratten für die Messung von Stoffwechselformonen über einen Zeitraum von mindestens zwölf Stunden zu fasten, jedoch nicht länger als 16 Stunden. Basierend auf den Ergebnissen der Studie „biologische Varianz“ ließen sich bei einer Fastendauer von bis zu 16 Stunden fasten keine signifikanten Effekte auf die im Stoffwechsel zirkulierenden Konzentrationen von Glukose, IGF-I und Gesamt-Ghrelin finden, wohingegen es bei Insulin und Gesamt-GIP einen signifikanten Unterschied machte, ob die Ratten 6 oder 16h gefastet wurden. Deswegen empfehlen wir ebenfalls eine Fastendauer von 16 Stunden für die Untersuchung von Stoffwechselformonen bei Ratten.

## **6.2. Einfluss des Alters auf Glukose, Insulin, IGF-I, Gesamt-Ghrelin und Gesamt-GIP bei Ratten**

In dieser Studie wurden die Hormonwerte von Insulin, IGF-I, Gesamt-Ghrelin und Gesamt-GIP junger ausgewachsener, 14 Wochen alter Ratten (jung) mit zwölf Monate alten Ratten (alt) verglichen. Zwischen jungen und alten Ratten mit ad libitum-Fütterung ergab sich für Glukose, IGF-I, Insulin, Gesamt-Ghrelin und Gesamt-GIP keinen signifikanter Unterschied, auch wenn für alle diese Hormone die Tendenz einer erhöhten Konzentration bei den jungen Ratten zu erkennen war. Gong et al. konnten 2014 diesbezüglich, bei operativer Unterbrechung der GH/IGF-I-Achse von Nagern, einen lebenslangen Anstieg der entsprechenden Hormone feststellen. Beim Menschen hat die Konzentration von IGF-I ihren Höhepunkt während der Pubertät und fällt danach langsam mit dem Alter ab (BIDLINGMAIER et al., 2014; GONG et al., 2014). Gong et al. haben am Modellversuch mit Nagetieren, durch eine fehlende GH/IGF-I-Achse, nicht unterscheiden können, ob die Auswirkungen von GH und IGF-I auf die Gesundheit der Tiere entwicklungs- oder altersbedingt waren. Bis ins hohe Alter der Nagetiere konnte die essentielle Aufgabe der GH/IGF-I-Achse für eine gesunde Knochenstruktur und der Einfluss einer erhöhten GH-Konzentration im Blut auf Erkrankungen der Knochenstruktur nachgewiesen werden (GONG et al., 2014). Auch Willis et al. haben sich 2014 mit dem Einfluss von Alter und Geschlecht auf bestimmte Faktoren und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Gesundheit von Pavianen beschäftigt. In ihrer Studie sank die Konzentration von IGF-I mit steigendem Alter, wobei männliche Tiere um 30% höhere Konzentrationen im Blut hatten als weibliche Tiere. IGFBP-3 zeigte hingegen keine Konzentrationsveränderungen im Vergleich von Jungtieren mit älteren Pavianen (WILLIS et al., 2014). Es konnte ein Zusammenhang zwischen Alter und Konzentration verschiedener Hormone bei den Pavianen dargestellt werden. In unserer Studie „biologische Varianz“ wurden unterschiedlich hohe Hormonkonzentrationen für Insulin, aber nicht für IGF-I in Bezug auf das Alter der Ratten festgestellt. Deswegen ist es wichtig bei Studien mit Ratten auch das Alter als biologische Varianz mit einzubeziehen, da einige Hormone altersbedingten Varianzen unterliegen.

## 7. Kritik der Methoden

Seit Jahrzehnten ist die Messung per Immunassay eine gängige und etablierte Methode zur Konzentrationsbestimmung von Hormonen. Daher wurden auch in dieser Studie Hormone mittels Immunassays gemessen. Die Assays wurden so ausgewählt, dass ein möglichst geringes Probenvolumen für den jeweiligen Test benötigt wird. Es wurde in dieser Studie außerdem darauf geachtet bei jedem Analyten Immunassays derselben Charge zu verwenden, um herstellungsbedingte Konzentrationsabweichungen der Hormone zu vermeiden. Im Vergleich von „Serum“ zu „EDTA ungekühlt“ wurden in dieser Arbeit signifikante Unterschiede bei GH, IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, Leptin und GLP-1 und im Vergleich von „Serum“ mit „Serum frieren/tauen“ bei IGF-II, IGFBP-3, Gesamt-GIP, Insulin, Leptin, Gesamt-Ghrelin und GLP-1 festgestellt. Diese Werte könnten in einem anderen Assay aufgrund von Matrixeffekten oder unterschiedlichen verwendeten Substraten anders aussehen, wie es auch Shanson et al. 1990 festgestellt haben, als sie drei verschiedene Immunassays zur Bestimmung des HIV-Antigens miteinander verglichen haben (SHANSON et al., 1990). Folglich kann keine Aussage darüber getroffen werden wie sich die Konzentrationen der gemessenen Hormone in unterschiedlichen Assays verschiedener Hersteller darstellen. Es besteht eine so große Vielfalt an Immunassays von verschiedenen Herstellern, dass diese nicht alle in diese Studie einbezogen werden konnten. Es bietet sich jedoch Raum Folgestudien diesbezüglich anzuschließen.

Eine alternative Möglichkeit zur Messung der Konzentration von Hormonen bei der Ratte stellt die Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie, kurz LC-MS/MS, dar. Durch die Hintereinanderschaltung von mehreren Massenspektrometern ergibt sich eine Kopplung, welche zusätzlich an ein chromatographisches Trennsystem gekoppelt ist und somit schon kleinste Mengen von Molekülen qualitativ und quantitativ bestimmen kann, egal ob die Substanz in Reinform oder als Substanzgemisch vorliegt. Diese Methode ist im Gegensatz zu Immunassays auf dem Markt noch wenig etabliert, wird aber durch ihre stetige Verbesserung immer praktikabler (BECKER & HOOFNAGLE, 2012). 2001 haben Lawrence et al. Microcystine aus Algenprodukten per LC-MS/MS, ELISA und Phosphatase-Assay nachgewiesen und diese drei Methoden dabei verglichen. Sowohl ELISA, als auch LC-MS/MS und der Phosphatase-Assay erbrachten übereinstimmende Ergebnisse (LAWRENCE et al., 2001). Eine weitere,

ebenfalls noch junge Methode zur Messung von Hormonen stellt der Western Liganden Blot dar, mit welchem sowohl qualitativ als auch quantitativ Proteine nachgewiesen werden können. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine werden diese auf ein Trägergel übertragen, welches mehrfach repliziert werden kann und das im Anschluss mit diversen Antigenen reagieren kann. Diese Methode benötigt nur geringste Mengen der nachzuweisenden Proteine und wird auch regelmäßig für die qualitative und quantitative Messung diverser Hormone angewandt (CATANIA et al., 2000; METZGER et al., 2011). Folglich wäre es interessant zu sehen in wie weit LC-MS/MS und der quantitative Western Liganden Blot sich durch Matrixeffekte und verschiedene Probenvorbehandlungen beeinflussen lassen. Dieser Vergleich wäre ein mögliches Thema für eine weitere Arbeit, da es die Kapazitäten der aktuellen Studie übersteigt. Es ist anzunehmen, dass die präanalytische Variabilität ebenfalls eine Rolle für die Messung von Hormonen mittels LC-MS/MS spielt.

Aktuell ist der Immunassay die gängigste Methode Hormonkonzentrationen bei der Ratte zu messen. Es ist durchaus möglich, dass Abweichungen von der realen Hormonkonzentration in anderen Analyseverfahren nicht aufgetreten wären. Andere Methoden zur Konzentrationsbestimmung von Hormonen könnten durch präanalytische Varianzen auf andere Arten beeinflusst werden. Dieser Vergleich müsste in anschließenden Studien weiter untersucht werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Immunassay als Analyseverfahren ein gängiges und wichtiges Werkzeug der Forschung ist, dessen Beeinflussung durch präanalytische Varianzen jedoch nicht unterschätzt werden sollte.

## **8. Schlussfolgerung**

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und in Bezug auf die bisherige Literatur zur Präanalytik, wird der Fokus auf die Vielfalt der Fehlerquellen der Präanalytik und ihren signifikanten Einfluss auf Messergebnisse weiter geschärft. Gerade bei neu erforschten Hormonen ist es schwierig das richtige Probenmaterial abzunehmen und entsprechend vorzubehandeln. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie wird empfohlen, jeweils Serum und EDTA-Plasma abzunehmen und das EDTA-Plasma mit allgemeinen Proteaseinhibitoren zu versetzen. Im Anschluss daran ist es sinnvoll die Proben zu aliquotieren, um möglichst wenige Einfrier-Auftau-Zyklen

entstehen zu lassen. Ohne das entsprechende Wissen über potentielle Einflussgrößen auf die Konzentration eines Analyten könnten möglicherweise Messergebnisse falsch interpretiert werden. In **Tabelle 4** wird schematisch dargestellt wie sich die Konzentrationen der untersuchten Hormone durch Auswahl von Serum oder EDTA-Plasma und nach zehn Einfrier-Auftau-Zyklen verändern. Lediglich IGFBP-2 und aktives GLP-1 konnten konstant unter allen Bedingungen gemessen werden, alle anderen Hormone wurden durch präanalytische Faktoren signifikant beeinflusst. In anderen Studien werden aktuell noch einige Effekte fälschlicherweise gewissen Behandlungen zugeschrieben, obwohl sie der präanalytischen Variabilität zugehörig sind. Deswegen sollte stets versucht werden möglichst konstante Arbeitsbedingungen einzuhalten und die Proben entsprechend gleichen Vorbehandlungen zu unterziehen, um möglichst einheitliche Grundvoraussetzungen zu schaffen und das Risiko von präanalytischen Einflüssen so gering wie möglich zu halten. Es gibt viele einzelne Faktoren, die die Messergebnisse von Hormonen beeinflussen können, jedoch müssen diese präanalytischen Bedingungen für jedes einzelne Hormon getestet und anschließend beachtet werden. Es können keine Rückschlüsse von der Auswirkung präanalytischer Bedingungen eines Hormons auf die Konzentration eines anderen Hormons gezogen werden.

Deswegen ist anzuraten beim Vergleich von Studien, oder wenn Folgestudien angeschlossen werden, stets mit möglichst derselben Methodik die Proben zu entnehmen, zu bearbeiten, zu analysieren und aufzubewahren.

Als Faktoren der biologischen Varianz wurden die Fastendauer und das Alter der Tiere zu zwei Zeitpunkten untersucht. Bezüglich beider Untersuchungskriterien konnte ein starker Einfluss auf verschiedene Stoffwechselformone bei der Ratte detektiert werden. Es wird angeraten zu Beginn einer Studie, entsprechend der zu untersuchenden Hormone bei der Ratte die Fastendauer und das Alter in die Vorbereitungen mit einzubeziehen oder entsprechend bei der Auswertung der Messergebnisse diese biologischen Einflussgrößen zu beachten.

	Serum	Serum frieren/tauen	EDTA-Plasma
GH	100%		
IGF-I	100%		
IGF-II	100%		
IGFBP-2	100%		
IGFBP-3	100%		
Gesamt-GIP	100%		
Aktives GLP-1	100%		
Insulin	100%		
Leptin	100%		
Gesamt-Ghrelin	100%		

**Tabelle 4:** Auswirkung von 10 Einfrier-Auftau-Zyklen auf Serum; Vergleich der Messergebnisse von Serum zu EDTA-Plasma in Bezug zu Serum gesetzt. Gelbe Pfeile stellen keinen Konzentrationsunterschied dar, grüne eine erhöhte Konzentration und rote eine verminderte Konzentration des entsprechenden Hormons im Vergleich zu Serum.

## VI. VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

**Popp S.**, Bielohuby M., Meurer S., Horngacher A., Wolf E. und Bidlungmaier M.  
*Analysis of different blood sample pre-treatment conditions on hormone concentrations in rats*

55. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 2012

Mannheim/ Germany

**Popp S**, Bielohuby M, Meurer S, Horngacher A, Bidlingmaier M, Wolf E  
*Impact of pre-analytical conditions on measured concentrations of compounds of the GH/IHG-system in rats*

6th International Congress of the GRS and IGF Society, 2012

Munich/ Germany

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

Bielohuby M, **Popp S**, Bidlingmaier M

*Influence of pre-analytical conditions on the measurement of components of the GH/IGF axis in rats.*

Growth Horm IGF Res. 2013 Oct;23(5):141-148

Bielohuby M, **Popp S**, Bidlingmaier M.

*A guide for measurement of circulating metabolic hormones in rodents: Pitfalls during the pre-analytical phase.*

Molecular Metabolism 2012; Aug 9;1(1-2):47-60

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die biochemische Analyse von Hormonen wird durch drei Variablen beeinflusst – die präanalytischen, analytischen und postanalytischen Variabilität. Bezüglich der analytischen und biologischen Variabilität wurden für Nager schon zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, jedoch ist die Präanalytik in der Untersuchung von Blutproben von Ratten, in Bezug auf die Hormonanalytik, bislang kaum beachtet worden. Deswegen wurden in dieser Arbeit einige Aspekte der Präanalytik bei der Hormonmessung in Ratten genauer untersucht; auch um Anhaltspunkte zu geben, in wie weit vorbehandelte Blutproben von Ratten zur Messung unterschiedlicher Hormone genutzt werden können und wie sich die Verwendung unterschiedlicher Probenmaterialien, als auch Einfrier-Auftau-Zyklen, auf die Messergebnisse verschiedener Stoffwechselhormone auswirken können. In Bezug auf die biologische Variabilität wurde der Einfluss von Alter und Fasten auf ausgewählte Stoffwechselhormone bei der Ratte genauer untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, in Analyseprozessen insbesondere auf den Faktor „Präanalytik“ einzugehen und aufzuzeigen, in welchem Ausmaß Ergebnisse in der Messung von Hormonen mittels Immunoassays beeinflusst werden können.

Im Vergleich zu reinem Serum waren die gemessenen Konzentrationen von IGF-I (+9,2%,  $p < 0,001$ ), IGF-II (+24,0%,  $p < 0,001$ ), IGFBP-3 (+24,0%,  $p < 0,001$ ) und Leptin (+54,9%,  $p < 0,0001$ ) in EDTA-Plasma signifikant niedriger, GH (-137,8%,  $p < 0,001$ ) und Gesamt-Ghrelin (-10,8%,  $p < 0,05$ ) zeigten erhöhte Werte, für IGFBP-2, Gesamt-GIP, aktives GLP-1, Insulin und Gesamt-Ghrelin zeichneten sich keine Differenzen ab. Nach zehn Einfrier-Auftau-Zyklen von Serum blieben die Konzentrationen von GH, IGF-I, IGFBP-2 und aktivem GLP-1 unverändert, bei Gesamt-GIP (+49,8%,  $p < 0,001$ ), Insulin (+32,9%,  $p < 0,001$ ) und Gesamt-Ghrelin (+24,6%,  $p < 0,001$ ), konnte eine geringere Menge detektiert werden und bei IGF-II (-25,9%,  $p < 0,01$ ), IGFBP-3 (-19,3%,  $p < 0,001$ ) und Leptin (-41,3%,  $p < 0,001$ ) wurden höhere Werte gemessen. EDTA-Plasmaproben, die ab dem Moment der Abnahme von der Ratte bis zum gefrorenen Aufbewahren ununterbrochen gekühlt wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zu solchen Proben, die bei Raumtemperatur bis zum Einfrierprozess aufbewahrt wurden. Die Zugabe von Proteaseinhibitoren, im Speziellen von DPP-4-Inhibitor, ist für die Bestimmung von Inkretinhormonen angezeigt. In dieser Studie wurde keine erhöhte Variabilität durch den Zusatz der Proteaseinhibitoren auf die Messung von Gesamt-GIP und

aktivem GLP-1 gefunden. Für die Messung von acyliertem Ghrelin ist eine Ansäuerung des Probenmaterials mit HCl empfehlenswert. IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, Gesamt-GIP und Insulin konnten mit dieser Probenvorbehandlung bedenkenlos gemessen werden. Für Leptin (-73,91%,  $p < 0,05$ ) wurden erhöhte Konzentrationen detektiert, IGF-I (+11,9%,  $p < 0,001$ ) und Gesamt-Ghrelin (+27,1%,  $p < 0,05$ ) zeigten hingegen verringerte Werte.

In Bezug auf die biologische Variabilität konnte ebenfalls ein signifikanter Einfluss des Alters und Fastens auf Ratten detektiert werden. Jungtieren hatten einen deutlicher niedrigeren Insulinspiegel (+0,22%,  $p < 0,05$ ) im Blut, bei einer Fastendauer von 16 Stunden, im Vergleich zu wesentlich älteren 1-Jahr alten Ratten. Im Vergleich der Insulinwerte zwischen 6 und 16 Stunden des Fastens konnten signifikant niedrigere Werte nach 16 Stunden festgestellt werden (+30,7,  $p < 0,05$ ). Bei jungen Ratten reduzierte sich die Gesamt-GIP-Konzentration (+105,9%,  $p < 0,01$ ) während des Fastens stärker als bei alten Tieren, aber bei diesem Hormon ist, bei Langzeitfasten aller Tiere, eine signifikante Reduktion der Gesamt-GIP-Konzentration (66,8%,  $p < 0,05$ ) im Vergleich von 6 zu 16 Stunden zu verzeichnen gewesen. Bei IGF-I und Gesamt-Ghrelin veränderten sich die Konzentrationen der zirkulierenden Hormone im Blut trotz einer Fastendauer von 16 Stunden nicht signifikant.

Es konnten in dieser Arbeit einige Faktoren der Präanalytik, im Speziellen in der Messung von Hormonen mittels Immunassays bei Ratten, untersucht werden, jedoch sind auf diesem Themengebiet noch zahlreiche weitere Fragestellungen, wie zum Beispiel der Einfluss von Einfrier-Auftau-Zyklen auf EDTA-Plasma oder der Einfluss von Matrixeffekten auf Western Liganden Blot, noch nicht näher untersucht, weswegen es sinnvoll erscheint diesbezüglich weitere Studien anzuschließen.

## VIII. SUMMARY

### **Impact of preanalytical factors on the concentration of specific metabolic hormones and effect of age and fasting on specific metabolic hormones in rats**

Biochemical analysis of hormones is influenced by three factors – preanalytical, analytical and postanalytical variability. For analytical and biological variability many studies have been published, but the preanalytical measurement of hormones is less examined for blood samples in rats. Therefore we investigated in some issues of preanalytical hormone measurement, to give evidence, if pretreated blood samples also can be used for measuring different hormones and how the usage of different blood sample materials (serum or EDTA-plasma) can affect the measured concentrations of different metabolic hormones. Furthermore the influence of freeze and thawing cycles on the concentrations of different metabolic hormones has been studied. We also investigated in two compounds of the biological variability: the influence of age and fasting on specific metabolic hormones in rats. With this study we aimed to point out the factor “preanalytic“ in the analytical processes and we were able to show how much the results of hormone measurement, detected by immunoassays, can be influenced by these components. In relation to plain serum the concentrations of IGF-I (+9.2%,  $p<0.001$ ), IGF-II (+24.0%,  $p<0.001$ ), IGFBP-3 (+24.0%,  $p<0.001$ ) and leptin (+54.9%,  $p<0.0001$ ) had significantly lower levels in EDTA-plasma whereas GH (-137.8%,  $p<0.001$ ) and total Ghrelin (-10.8%,  $p<0.05$ ) showed significant higher levels and for IGFBP-2, total GIP, active GLP-1, insulin and total Ghrelin there has been no significant difference. After ten freezing and thawing cycles of serum the concentrations of GH, IGF-I, IGFBP-2 and active GLP-1 have not changed, however lower concentrations have been detected for total GIP (+49.8%,  $p<0.001$ ), insulin (+32.9%,  $p<0.001$ ) and total Ghrelin (+24.6%,  $p<0.001$ ). For IGF-II (-25.9%,  $p<0.01$ ), IGFBP-3 (-19.3%,  $p<0.001$ ) and leptin (-41.3%,  $p<0.001$ ) higher concentrations have been measured after ten freezing and thawing cycles. Comparing blood samples, kept at room temperature during treatment until getting frozen for long-time storage, to those blood samples, which have been stored on ice until long-time storage there have no significant differences been detected. The

addition of protease inhibitors, especially the addition of DPP-4-inhibitor, is advised for the measuring of incretins. In this study no higher variability in case of adding protease inhibitors to blood samples has been detected in the measurement of total GIP and active GLP-1. The addition of HCl to blood samples is recommended for measuring active Ghrelin, but IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, total GIP and insulin can also be measured from this pretreated blood samples without deviation in their hormone concentrations. After addition of HCl for leptin (-73.91%,  $p < 0.05$ ) higher concentrations have been detected and for IGF-I (+11.9%,  $p < 0.001$ ) and total Ghrelin (+27.1%,  $p < 0.05$ ) lower concentrations have been measured.

As a component of the biological variability, there has also been a significant influence of age and fasting in rats. Young rats (14 weeks old) had lower levels of insulin (0.22%,  $p < 0.05$ ) after fasting for 16h in relation to one year old rats. When comparing insulin concentrations after 6 and 16h of fasting there have been significant lower levels after 16h (+30.7%,  $p < 0.05$ ). While fasting, the concentration of total GIP (+105.9%,  $p < 0.01$ ) was more reduced in young rats than in old ones. Furthermore there was a significant reduction of total GIP after 6 to 16h of fasting (66.8%,  $p < 0.05$ ). For IGF-I and total Ghrelin there was no difference in fasting the rats for 6 or 16h.

In this study we investigated some aspects of preanalytic, especially in the measurement of circulating metabolic hormones by immunoassay in rats. However there are still much more topics to be researched, like the influence of freezing and thawing cycles on hormone concentrations in EDTA-plasma or the impact of matrix effects on Western ligand blot.

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> bildliche Darstellung der Probenvorbereitung der Versuchsreihe „präanalytische Varianz“ .....	23
<b>Abbildung 2:</b> schematische Darstellung des Ablaufes eines Sandwich-Assays .....	27
<b>Abbildung 3:</b> schematische Darstellung des Ablaufes des Glukose-Oxidase-Tests .....	29
<b>Abbildung 4:</b> GH-Konzentrationen aller Ratten in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen .....	32
<b>Abbildung 5:</b> GH-Konzentrationen im Blut der Ratten unter den verschiedenen präanalytischen Bedingungen in Relation zur Referenzkonzentration von Serum .....	33
<b>Abbildung 6:</b> IGF-I-Konzentrationen aller Ratten in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen .....	34
<b>Abbildung 7:</b> Vergleich der IGF-I-Konzentrationen in Relation zur Referenzkonzentration „Serum“ .....	34
<b>Abbildung 8:</b> IGF-II-Konzentration aller Ratten in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen .....	35
<b>Abbildung 9:</b> IGF-II-Konzentration in den verschiedenen Probenbearbeitungszuständen in Relation zum Serum-Wert .....	36
<b>Abbildung 10:</b> Darstellung der Einzelwerte der IGFBP-2-Konzentrationen aller Ratten .....	37
<b>Abbildung 11:</b> IGFBP-2-Konzentrationen in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in Relation zu Serum als Referenzkonzentration .....	37
<b>Abbildung 12:</b> Darstellung IGFBP-3-Konzentrationen aller Ratten .....	38
<b>Abbildung 13:</b> IGFBP-3-Konzentrationen in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in Relation zur Referenzkonzentration Serum .....	39
<b>Abbildung 14:</b> Darstellung der Gesamt-GIP-Konzentrationen aller Ratten .....	40
<b>Abbildung 15:</b> Gesamt-GIP-Konzentrationen in den unterschiedlichen präanalytischen Zuständen in Relation zur Referenzkonzentration „Serum“ .....	40
<b>Abbildung 16:</b> Darstellung der Einzelwerte von aktivem GLP-1 aller Ratten .....	42
<b>Abbildung 17:</b> Konzentrationen von aktivem GLP-1 in den verschiedenen präanalytischen Zuständen in Relation zur Referenzkonzentration „Serum“ .....	42
<b>Abbildung 18:</b> Einzelwerte der Insulin-Konzentrationen aller Ratten .....	43

<b>Abbildung 19:</b> Darstellung der Insulin-Konzentrationen in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in Relation zu „Serum“ .....	44
<b>Abbildung 20:</b> Einzelwerte der Leptin-Konzentrationen aller Ratten.....	45
<b>Abbildung 21:</b> Darstellung der Leptin-Konzentrationen in den unterschiedlichen präanalytischen Zuständen in Relation zur Referenzkonzentration „Serum“ .....	45
<b>Abbildung 22:</b> Einzelwerte der Gesamt-Ghrelin-Konzentrationen aller Ratten..	46
<b>Abbildung 23:</b> Darstellung der Gesamt-Ghrelin-Konzentrationen in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in Relation zu „Serum“ .....	47
<b>Abbildung 24:</b> Darstellung der Konzentration von acyliertem Ghrelin in den unterschiedlichen Probenbearbeitungszuständen in Relation zu „Serum“ .....	48
<b>Abbildung 25:</b> Glukosekonzentration im Blut der Ratten zu den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten.....	50
<b>Abbildung 26:</b> AUC der Glukosekonzentration in jungen und alten Ratten über den gesamten Versuchszeitraum.....	51
<b>Abbildung 27:</b> Insulinkonzentration im Blut der Ratten zu den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten.....	52
<b>Abbildung 28:</b> AUC der Insulinkonzentrationen in jungen und alten Ratten über den gesamten Versuchszeitraum.....	52
<b>Abbildung 29:</b> Insulinkonzentration junger und alter Ratten nach Langzeitfasten im Vergleich zum Startzeitpunkt.....	53
<b>Abbildung 30:</b> Insulinkonzentration im Verlauf des Fastens.....	53
<b>Abbildung 31:</b> IGF-I-Konzentration im Blut der Ratten zu den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten.....	54
<b>Abbildung 32:</b> AUC der IGF-I-Konzentrationen in jungen und alten Ratten über den gesamten Versuchszeitraum.....	55
<b>Abbildung 33:</b> IGF-I-Konzentration junger und alter Ratten nach Langzeitfasten im Vergleich mit Kontrolltieren.....	55
<b>Abbildung 34:</b> Gesamt-Ghrelin-Konzentration im Blut der Ratten zu den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten.....	56
<b>Abbildung 35:</b> AUC der Gesamt-Ghrelin-Konzentrationen in jungen und alten Ratten über den gesamten Versuchszeitraum.....	57
<b>Abbildung 36:</b> Gesamt-Ghrelin-Konzentration junger und alter Ratten nach Langzeitfasten im Vergleich mit Kontrolltieren.....	57
<b>Abbildung 37:</b> Gesamt-GIP-Konzentration im Blut der Ratten zu den jeweiligen Blutentnahmezeitpunkten.....	58

---

<b>Abbildung 38:</b> AUC der Gesamt-GIP-Konzentrationen in jungen und alten Ratten über den gesamten Versuchszeitraum hinweg.....	59
<b>Abbildung 39:</b> Gesamt-GIP-Konzentration junger und alter Ratten nach Langzeitfasten im Vergleich mit Kontrolltieren.....	59
<b>Abbildung 40:</b> Gesamt-GIP-Konzentration im Verlauf des Fastens.....	60

## X. TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b> Herstellerverzeichnis der verwendeten Immunassays.....	27
<b>Tabelle 2:</b> Gewichte der Ratten der Versuchsreihe „präanalytische Varianz“ zum Zeitpunkt der Blutentnahme.....	31
<b>Tabelle 3:</b> Gewichte der Ratten der Versuchsreihe „biologische Varianz“.....	49
<b>Tabelle 4:</b> Auswirkung von 10 Einfrier-Auftau-Zyklen auf Serum.....	76

## XI. LITERATURVERZEICHNIS

Ayache S, Panelli M, Marincola FM, Stroncek DF. Effects of storage time and exogenous protease inhibitors on plasma protein levels. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 174-84.

Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993; 75: 73-82.

Becan-McBride K. Laboratory sampling. Does the process affect the outcome? *Journal of intravenous nursing* 1999;

Becker JO, Hoofnagle AN. Replacing immunoassays with tryptic digestion-peptide immunoaffinity enrichment and LC-MS/MS. *Bioanalysis* 2012; 4: 281-90.

Bellomo G, Sulas MG, Mairate E, Bardone MB, Rolla R. Hemolysis is a major cause of variability in insulin measurement during oral glucose tolerance test in children. *Clin Lab* 2012; 58: 67-74.

Bentham J, Rodriguez-Arno J, Ross RJ. Acquired growth hormone resistance in patients with hypercatabolism. *Horm Res* 1993; 40: 87-91.

Berryman DE, List EO, Sackmann-Sala L, Lubbers E, Munn R, Kopchick JJ. Growth hormone and adipose tissue: beyond the adipocyte. *Growth Horm IGF Res* 2011; 21: 113-23.

Bidlingmaier M, Friedrich N, Emeny RT, Spranger J, Wolthers OD, Roswall J, Korner A, Obermayer-Pietsch B, Hubener C, Dahlgren J, Frystyk J, Pfeiffer AF, Doering A, Bielohuby M, Wallaschofski H, Arafat AM. Reference intervals for insulin-like growth factor-1 (igf-i) from birth to senescence: results from a multicenter study using a new automated chemiluminescence IGF-I immunoassay conforming to recent international recommendations. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 1712-21.

Bielohuby M, Popp S, Bidlingmaier M. A guide for measurement of circulating metabolic hormones in rodents: Pitfalls during the pre-analytical phase. *Molecular Metabolism* 2012;

Blum WF. Leptin: the voice of the adipose tissue. *Horm Res* 1997; 48 Suppl 4: 2-8.

Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD. Leptin and reproduction *Steroids* 2001;

Braun JP, Bourges-Abella N, Geffre A, Concordet D, Trumel C. The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. *Vet Clin Pathol* 2015; 44: 8-25.

Brown JC, Mutt V, Pederson RA. Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity. *J Physiol* 1970; 209: 57-64.

Buffa R, Polak JM, Pearse AG, Solcia E, Grimelius L, Capella C. Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. *Histochemistry* 1975;

Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem* 2007; 53: 1338-42.

Carter CS, Ramsey MM, Sonntag WE. A critical analysis of the role of growth hormone and IGF-1 in aging and lifespan. *Trends Genet* 2002; 18: 295-301.

Catania VA, Luquita MG, Sanchez Pozzi EJ, Mottino AD. Quantitative and qualitative gender-related differences in jejunal glutathione S-transferase in the rat effect of testosterone administration. *Life Sci* 2000; 68: 467-74.

Chanoine JP, Wong AC, Barrios V. Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. *Horm Res* 2006; 66: 81-8.

Christensen SD, Mikkelsen LF, Fels JJ, Bodvarsdottir TB, Hansen AK. Quality of

plasma sampled by different methods for multiple blood sampling in mice. *Lab Anim* 2009; 43: 65-71.

Cleator IG, Gourlay RH. Release of immunoreactive gastric inhibitory polypeptide (IR-GIP) by oral ingestion of food substances. *Am J Surg* 1975; 130: 128-35.

Clemmons DR. Role of insulin-like growth factor in maintaining normal glucose homeostasis. *Horm Res* 2004; 62 Suppl 1: 77-82.

Comstock GW, Burke AE, Norkus EP, Gordon GB, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Effects of repeated freeze-thaw cycles on concentrations of cholesterol, micronutrients, and hormones in human plasma and serum. *Am J Epidemiol* 2008; 168: 827-30.

Conybeare G, Leslie GB, Angles K, Barrett RJ, Luke JS, Gask DR. An improved simple technique for the collection of blood samples from rats and mice. *Lab Anim* 1988; 22: 177-82.

Creutzfeldt W. The incretin concept today. *Diabetologia* 1979;

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans. *Endocrinology* 2000;

Daughaday WH. Growth hormone axis overview--somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 537-40.

Davidson DF. A survey of some pre-analytical errors identified from the Biochemistry Department of a Scottish hospital. *Scott Med J* 2014; 59: 91-4.

Davidson MB. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocr Rev* 1987; 8: 115-31.

Deacon CF. Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res* 2004; 36: 761-5.

Dhaher R, McConnell KK, Rodd ZA, McBride WJ, Bell RL. Daily patterns of ethanol drinking in adolescent and adult, male and female, high alcohol drinking (HAD) replicate lines of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2012;

Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 15-23.

Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Göke B. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats, pig and man. *European Journal of Clinical Investigation* 1992;

Ertl DA, Gleiss A, Sagmeister S, Haeusler G. Determining the normal range for IGF-I, IGFBP-3, and ALS: new reference data based on current internal standards. *Wien Med Wochenschr* 2014; 164: 343-52.

Fraga MC, Moura EG, Silva JO, Bonomo IT, Filgueiras CC, Abreu-Villaca Y, Passos MC, Lisboa PC, Manhaes AC. Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 100: 165-73.

Frago LM, Chowen JA. Basic physiology of the growth hormone/insulin-like growth factor axis. *Adv Exp Med Biol* 2005; 567: 1-25.

Geldszus R, Mayr B, Horn R, Geithovel F, von zur Muhlen A, Brabant G. Serum leptin and weight reduction in female obesity. *Eur J Endocrinol* 1996; 135: 659-62.

Ghiglion M, Uttenthal LO, George SK, Bloom SR. How glucagon-like is glucagon-like peptide-1? *Diabetologia* 1984; 27: 599-600.

Gilor S, Gilor C. Common laboratory artifacts caused by inappropriate sample collection and transport: how to get the most out of a sample. *Topics in Companion Animal Medicine* 2011;

Goldblatt MW. Insulin and gluconeogenesis. *Biochem J* 1929; 23: 243-55.

Gong Z, Kennedy O, Sun H, Wu Y, Williams GA, Klein L, Cardoso L, Matheny RW, Jr., Hubbard GB, Ikeno Y, Farrar RP, Schaffler MB, Adamo ML, Muzumdar RH, Yakar S. Reductions in serum IGF-1 during aging impair health span. *Aging Cell* 2014; 13: 408-18.

Gooren LJ, Giltay EJ. Men and women, so different, so similar: observations from cross-sex hormone treatment of transsexual subjects. *Andrologia* 2013;

Guo C, Lu H, Gao W, Wang L, Lu K, Wu S, Pataer A, Huang M, El-Zein R, Lin T, Roth JA, Mehran R, Hofstetter W, Swisher SG, Wu X, Fang B. Insulin-like growth factor binding protein-2 level is increased in blood of lung cancer patients and associated with poor survival. *PLoS One* 2013; 8: e74973.

Haghir H, Rezaee AA, Nomani H, Sankian M, Kheradmand H, Hami J. Sexual dimorphism in expression of insulin and insulin-like growth factor-I receptors in developing rat cerebellum. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33: 369-77.

Hilgers A. Neuroendokrine Stressachse. Hilgers Arnold 2010: <http://arnold-hilgers-institute.com/tl/neuroendokrine-stressachse.html>.

Hoeflich A, Wu M, Mohan S, Foll J, Wanke R, Froehlich T, Arnold GJ, Lahm H, Kolb HJ, Wolf E. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinology* 1999; 140: 5488-96.

Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or

promoter? *Cancer Res* 2001; 61: 8601-10.

Holland MD, Hossner KL, Williams SE, Wallace CR, Niswender GD, Odde KG. Serum concentrations of insulin-like growth factors and placental lactogen during gestation in cattle. I. Fetal profiles. *Domest Anim Endocrinol* 1997; 14: 231-9.

Holst JJ, Vilsboll T, Deacon CF. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2008;

Hooijberg E, Leidinger E, Freeman KP. An error management system in a veterinary clinical laboratory. *J Vet Diagn Invest* 2012; 24: 458-68.

IDEXX Laboratories DmvUB (2013) Leistungsverzeichnis IDEXX Vet Med Labor

Ijaz A, Maqsood ul H, Khan IM, Saeed F, Tariq KM. EDTA contamination in laboratory specimens-effect of an awareness campaign. *J Coll Physicians Surg Pak* 2010; 20: 405-7.

Jafri L, Khan AH, Azeem S. Ionized calcium measurement in serum and plasma by ion selective electrodes: comparison of measured and calculated parameters. *Indian J Clin Biochem* 2014; 29: 327-32.

Johnson DG. Identification of enteric hormones with insulin-releasing activity. *Life Sci* 1981; 28: 1841-9.

Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34.

Jones K (2012) Blood collection from the lateral saphenous vein in mice and rats. The University of British Columbia

Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res* 2003; 13: 113-70.

Kale VP, Joshi GS, Gohil PB, Jain MR. Effect of fasting duration on clinical pathology results in Wistar rats. *Vet Clin Pathol* 2009; 38: 361-6.

Kindel TL, Yoder SM, D'Alessio DA, Tso P. The effect of duodenal-jejunal bypass on glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in Wistar rats. *Obes Surg* 2010; 20: 768-75.

Kinzig KP, Honors MA, Hargrave SL. Insulin sensitivity and glucose tolerance are altered by maintenance on a ketogenic diet. *Endocrinology* 2010; 151: 3105-14.

Kleine B, Rossmanith W (2010) *Hormone und Hormonsystem*

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;

Kong F, Singh RP. Disintegration of solid foods in human stomach. *J Food Sci* 2008; 73: R67-80.

Laboklin. Präanalytik praxisbezogene Tipps und Hinweise.  
[http://www.laboklin.de/pdf/de/news/laboklin\\_aktuell/lab\\_akt\\_0101.pdf](http://www.laboklin.de/pdf/de/news/laboklin_aktuell/lab_akt_0101.pdf) (30.11.214  
16:58): 2001:  
[http://www.laboklin.de/pdf/de/news/laboklin\\_aktuell/lab\\_akt\\_0101.pdf](http://www.laboklin.de/pdf/de/news/laboklin_aktuell/lab_akt_0101.pdf).

Laposata M, Dighe A. "Pre-pre" and "post-post" analytical error: high-incidence patient safety involving the clinical laboratory. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2007;

Lawrence JF, Niedzwiadek B, Menard C, Lau BP, Lewis D, Kuper-Goodman T, Carbone S, Holmes C. Comparison of liquid chromatography/mass spectrometry, ELISA, and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. *J AOAC Int* 2001; 84: 1035-44.

LeRoith D. *Insulin-like growth factor receptors and binding proteins*. Baillieres

Clin Endocrinol Metab 1996; 10: 49-73.

Lippi G, Banfi G, Buttarello M, Ceriotti F, Daves M, Dolci A, Caputo M, Giavarina D, Montagnana M, Miconi V, Milanese B, Mosca A, Morandini M, Salvagno GL. Recommendations for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. Clin Chem Lab Med 2007; 45: 728-36.

Lippi G, Chance JJ, Church S, Dazzi P, Fontana R, Giavarina D, Grankvist K, Huisman W, Kouri T, Palicka V, Plebani M, Puro V, Salvagno GL, Sikaris K, Watson I, Stankovic AK, Simundic AM. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. 2011;

Liu J, Prudom CE, Nass R, Pezzoli SS, Oliveri MC, Johnson ML, Veldhuis P, Gordon DA, Howard AD, Witcher DR, Geysen HM, Gaylinn BD, Thorner MO. Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin acylation and secretion in healthy young men. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93: 1980-7.

Livesey JH, Hodgkinson SC, Roud HR, Donald RA. Effect of time, temperature and freezing on the stability of immunoreactive LH, FSH, TSH, growth hormone, prolactin and insulin in plasma. Clin Biochem 1980; 13: 151-5.

Loeffen R, Kleinegris MC, Loubele ST, Pluijmen PH, Fens D, van Oerle R, ten Cate H, Spronk HM. Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. J Thromb Haemost 2012; 10: 2544-54.

Löffler G., P. P, P. H (2007) Biochemie und Pathobiochemie

Lombardi G, Lanteri P, Colombini A, Banfi G. Blood biochemical markers of bone turnover: pre-analytical and technical aspects of sample collection and handling. 2012;

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1995;

Manolopoulou J, Alami Y, Petersenn S, Schopohl J, Wu Z, Strasburger C, Bidlingmaier M. Automated 22-kD Growth Hormone-Specific Assay without Interference from Pegvisomant. 2012;

Martel MM. Sexual Selection and Sex Differences in the Prevalence of Childhood Externalizing and Adolescent Internalizing Disorders. *Psychol Bull* 2013;

Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;

Matsuzawa TS, M. Effects of Fasting on Haematology and Clinical Chemistry Values in the Rat and Dog. *Comp Haematol Int* 1994: 4:152-6.

McKay NJ, Galante DL, Daniels D. Endogenous glucagon-like peptide-1 reduces drinking behavior and is differentially engaged by water and food intakes in rats. *J Neurosci* 2014; 34: 16417-23.

Metzger F, Sajid W, Saenger S, Staudenmaier C, van der Poel C, Sobottka B, Schuler A, Sawitzky M, Poirier R, Tuerck D, Schick E, Schaubmar A, Hesse F, Amrein K, Loetscher H, Lynch GS, Hoeflich A, De Meyts P, Schoenfeld HJ. Separation of fast from slow anabolism by site-specific PEGylation of insulin-like growth factor I (IGF-I). *J Biol Chem* 2011; 286: 19501-10.

Mieczkowska A, Bouvard B, Chappard D, Mabileau G. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) directly affects collagen fibril diameter and collagen cross-linking in osteoblast cultures. *Bone* 2015; 74c: 29-36.

Modi H, Cornu M, Thorens B. Glutamine stimulates biosynthesis and secretion of insulin-like growth factor 2 (IGF2), an autocrine regulator of beta cell mass and function. *J Biol Chem* 2014; 289: 31972-82.

Moore B, Edie W, Abraham JH. On the treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membrane. *Biochemical Journal* 1906;

Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. Leptin Gene Expression in the Brain and Pituitary Gland. *Endocrinology* 1999;

Morrione A, Valentinis B, Xu SQ, Yumet G, Louvi A, Efstratiadis A, Baserga R. Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3777-82.

Murray MA, Bancroft JH, Anderson DC, Tennent TG, Carr PJ. Endocrine changes in male sexual deviants after treatment with anti-androgens, oestrogens or tranquillizers. *J Endocrinol* 1975; 67: 179-88.

Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R, Creutzfeldt W. Additive Insulinotropic Effects of Exogenous Synthetic Human Gastric Inhibitory Polypeptide and Glucagon-Like Peptide-1 Amide Infused at Near-Physiological Insulinotropic Hormone and Glucose Concentrations. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1993;

Nawroth P, Ziegler R (2013) *Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel*

Nowland MH, Hugunin KM, Rogers KL. Effects of short-term fasting in male Sprague-Dawley rats. *Comp Med* 2011; 61: 138-44.

OECD (2008) Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD Publishing

Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS, Kirkegaard P. Pancreatic and intestinal processing

of proglucagon in man. *Diabetologia* 1987;

Orskov C. Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis. *Diabetologia* 1992; 35: 701-11.

Paltiel L, Ronningen KS, Meltzer HM, Baker SV, Hoppin JA. Evaluation of Freeze Thaw Cycles on stored plasma in the Biobank of the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *Cell Preserv Technol* 2008; 6: 223-30.

Parada M, Jafari N, Pfaus JG. Sexual experience blocks the ability of clitoral stimulation to induce a conditioned place preference in the rat. *Physiol Behav* 2013; 119: 97-102.

Perrig M, Aujesky D (2011) Interpretation von Laborwerten

Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2006;

Priego T, Granado M, Ibanez de Caceres I, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Endotoxin at low doses stimulates pituitary GH whereas it decreases IGF-I and IGF-binding protein-3 in rats. *J Endocrinol* 2003; 179: 107-17.

Raff H, Sluss P. Pre-analytical issues for testosterone and estradiol assays. *Steroids* 2008;

Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 1997; 18: 801-31.

Rands VF, Seth DM, Kobori H, Prieto MC. Sexual dimorphism in urinary angiotensinogen excretion during chronic angiotensin II-salt hypertension. *Gend Med* 2012; 9: 207-18.

Ratto M, Leduc Y, Valderrama X, van Straaten K, Delbaere L, Pierson R, Adams G. The nerve of ovulation-inducing factor in semen. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;

Reimer RA, Maurer AD, Lau DC, Auer RN. Long-term dietary restriction influences plasma ghrelin and GOAT mRNA level in rats. Physiol Behav 2010; 99: 605-10.

Reyna R, Traynor KD, Hines G, Boots LR, Azziz R. Repeated freezing and thawing does not generally alter assay results for several commonly studied reproductive hormones. Fertil Steril 2001; 76: 823-5.

Roche D. complete.  
<http://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay?catalogId=10001&tab=Application&partNumber=3.2.7.1.35.2> 29.12.2014 (18:23 Uhr):  
2014:

Salgueiro RB, Peliciari-Garcia RA, do Carmo Buonfiglio D, Peroni CN, Nunes MT. Lactate activates the somatotrophic axis in rats. Growth Horm IGF Res 2014; 24: 268-70.

Sarson DL, Hayter RC, Bloom SR. The pharmacokinetics of porcine glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) in man. Eur J Clin Invest 1982; 12: 457-61.

Schafer-Somi S, Frohlich T, Schwendenwein I. Measurement of alkaline phosphatase in canine seminal plasma--an update. Reprod Domest Anim 2013; 48: e10-2.

Schjoldager BT, Mortensen PE, Christiansen J, Orskov C, Holst JJ. GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. Dig Dis Sci 1989; 34: 703-8.

Schlug K. Untersuchungen zur Energiebewertung von Standardmischfuttermitteln für Ratten. 2005;

Schuchard MD, Mehigh RJ, Cockrill SL, Lipscomb GT, Stephan JD, Wildsmith J, Valdes-Camin R, Kappel WK, Rai AJ, Scott GB. Artifactual isoform profile modification following treatment of human plasma or serum with protease inhibitor, monitored by 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Biotechniques* 2005; 39: 239-47.

Shahjee HM, Bhattacharyya N. Activation of various downstream signaling molecules by IGFBP-3. *J Cancer Ther* 2014; 5: 830-5.

Shanson DC, Brown KE, Goonesekera S, Gazzard B, Coates AR. Blind comparison of Abbott and Dupont HIV antigen ELISA tests for detecting antigenaemia in asymptomatic human immunodeficiency virus antibody positive homosexual men. *J Clin Pathol* 1990; 43: 420-3.

Shell L (2014) Making Your Job Easier: Sample Collection Guidelines, <http://www.dcavm.org/12novtechnotes.pdf> (abgerufen am 09.07.2014)

Shimasaki S, Ling N. Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res* 1991; 3: 243-66.

Shimizu H, Shimomura Y, Hayashi R, Ohtani K, Sato N, Futawatari T, Mori M. Serum leptin concentration is associated with total body fat mass, but not abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21: 536-41.

Shuster LT, Go VL, Rizza RA, O'Brien PC, Service FJ. Potential incretins. *Mayo Clinic Proceedings* 1988;

Siegenthaler W, Blum HE (2006) *Klinische Pathophysiologie*

Simundic A-M, Lippi G. Preanalytical phase - a continuous challenge for laboratory professionals. *Biochem Med (Zagreb)* 2012;

Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heimann ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF. Evidence of free and bound Leptin in Human Circulation *The American Society for Clinical Investigation* 1996;

Siroliis M (2015) *Laboratory Procedures for Veterinary Technicians*. Elsevier Mosby, Saint Louis

Stengel A, Goebel M, Luckey A, Yuan PQ, Wang L, Tache Y. Cold ambient temperature reverses abdominal surgery-induced delayed gastric emptying and decreased plasma ghrelin levels in rats. *Peptides* 2010; 31: 2229-35.

Strasburger C, Bidlingmaier M. How robust are laboratory measures of growth hormone status? *Horm Res* 2005;

synlab\_Labordienstleistungen. Leistungsverzeichnis synlab. vet. 2013; 22.10.2014 15:14: <http://synlab.com/de/tier/analysen/#c1510>.

Takeo C, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Identification of Igf2, Igfbp2 and Enpp2 as estrogen-responsive genes in rat hippocampus. *Endocr J* 2009; 56: 113-20.

Toft MF, Petersen MH, Dragsted N, Hansen AK. The impact of different blood sampling methods on laboratory rats under different types of anaesthesia. *Laboratory Animals* 2005; 40: 261-74.

Tomizawa HH, Varandani PT. GLUTATHIONE-INSULIN TRANSHYDROGENASE OF HUMAN LIVER. *J Biol Chem* 1965; 240: 3191-4.

Troutt JS, Siegel RW, Chen J, Sloan JH, Deeg MA, Cao G, Konrad RJ. Dual-monoclonal, sandwich immunoassay specific for glucose-dependent insulinotropic peptide1-42, the active form of the incretin hormone. *Clin Chem* 2011; 57: 849-55.

Tseng CC, Zhang XY, Wolfe MM. Effect of GIP and GLP-1 antagonists on insulin release in the rat. *Am J Physiol* 1999; 276: E1049-54.

Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak A, Edwards CMB, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JPH, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR. A role of glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 1996;

Tvarijonaviciute A, Martinez-Subiela S, Ceron JJ. Influence of different storage conditions and anticoagulants on the measurement of total and acylated ghrelin in dogs: a preliminary study. *Vet Rec* 2013; 172: 289.

TVT GfVAfTidG-SuAid (2009) Empfehlungen zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren

van Ierssel SH, Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, Jorens PG, Hoymans VY. Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied. *Thromb Res* 2010; 125: 332-9.

Wang G, Lee HM, Englander E, Greeley GHJ. Ghrelin-not just another stomach hormone. *Regulatory Peptides* 2002;

Wang J, Liu B, Han H, Yuan Q, Xue M, Xu F, Chen Y. Acute hepatic insulin resistance contributes to hyperglycemia in rats following myocardial infarction. *Mol Med* 2015a;

Wang W, Liu SL, Li K, Chen Y, Jiang B, Li YK, Xiao JL, Yang S, Chen T, Chen JG, Li JG, Wang F. Leptin: A Potential Anxiolytic by Facilitation of Fear Extinction. *CNS Neurosci Ther* 2015b;

Wang Z, Yang WL, Jacob A, Aziz M, Wang P. Human ghrelin mitigates intestinal injury and mortality after whole body irradiation in rats. *PLoS One* 2015c; 10:

e0118213.

Wang ZQ, Fung MR, Barlow DP, Wagner EF. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *Igf2/Mpr* gene. *Nature* 1994; 372: 464-7.

Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR, Kuijper JL. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 561-5.

Weingand K, Bloom J, Carakostas M, Hall R, Helfrich M, Latimer K, Levine B, Neptun D, Rebar A, Stitzel K, et al. Clinical pathology testing recommendations for nonclinical toxicity and safety studies. AACC-DACC/ASVCP Joint Task Force. *Toxicol Pathol* 1992; 20: 539-43.

Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ. Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 665-73.

Willis EL, Wolf RF, White GL, McFarlane D. Age- and gender-associated changes in the concentrations of serum TGF-1beta, DHEA-S and IGF-1 in healthy captive baboons (*Papio hamadryas anubis*). *Gen Comp Endocrinol* 2014; 195: 21-7.

Willoughby JO, Martin JB, Renaud LP, Brazeau P. Pulsatile growth hormone release in the rat: failure to demonstrate a correlation with sleep phases. *Endocrinology* 1976; 98: 991-6.

Wolf E, Kramer R, Blum WF, Foll J, Brem G. Consequences of postnatally elevated insulin-like growth factor-II in transgenic mice: endocrine changes and effects on body and organ growth. *Endocrinology* 1994; 135: 1877-86.

Wolf E, Lahm H, Wu M, Wanke R, Hoeflich A. Effects of IGFBP-2 overexpression in vitro and in vivo. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 572-8.

Wolfensohn S, Lloyd M (2003) Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 3. Auflage edn

Yae M, Sueishi M, Mikami Y, Kinoshita M, Hirano S, Nakamura K, Futata Y, Kawashima H, Ohkubo K, Ishikura H, Matsunaga A. [Influence of pre-analytical storage conditions on four plasma coagulation molecular markers measured using a STACIA automatic coagulation analyzer]. *Rinsho Byori* 2012; 60: 1139-44.

Yu H, Mistry J, Nicar MJ, Khosravi MJ, Diamandis A, van Doorn J, Juul A. Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. *J Clin Lab Anal* 1999; 13: 166-72.

Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of Leptin in hypothalamic-pituitary function *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996;

Zapf J, Hauri C, Waldvogel M, Froesch ER. Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulinlike growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. *J Clin Invest* 1986; 77: 1768-75.

## XII. DANKSAGUNG

Nach Jahren intensiver Arbeit ist meine Dissertation beendet. Folglich möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich in dieser spannenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben.

Zu besonderem Dank bin ich meinem Professor Dr. Eckhard Wolf für die Vertretung der Arbeit vor der Tierärztlichen Fakultät und seinen fachlichen Rat verpflichtet.

Ich danke Dr. Martin Bidlingmaier, dass ich in seiner Abteilung (Endokrinologisches Labor der Poliklinik München IV der LMU) ein Forschungsprojekt übernehmen durfte, um die Möglichkeit zu bekommen diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Ohne ihre wertvollen akademischen Ratschläge und hervorragende Betreuung wäre diese Arbeit nicht entstanden. Zusätzlich danke ich für die aufwendige Finanzierung meiner Arbeit und der Möglichkeit an Kongressen teilnehmen zu dürfen.

Des Weiteren bin ich PD Dr. Maximilian Bielohuby für seine exzellente und engagierte Betreuung zu ganz besonderem Dank verpflichtet. Ich wurde stets fachlich kompetent eingearbeitet, betreut und in allen Fragen beraten. Durch seine einzigartige Persönlichkeit hat er mir die Forschung in einer kompetenten und sehr liebenswürdigen Art näher gebracht.

Ebenso geht mein Dank an alle Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bidlingmaier, insbesondere Sarina Meurer und Amon Horngacher, die mich in die Arbeitstechniken einführten, mit mir zusammen Versuche durchführten und mir bei Fragen immer mit einem offenen Ohr zur Seite standen.

Mein Dank gilt ebenso der Firma Bio Medical Systems für die finanzielle Unterstützung während der Anfertigungszeit dieser Arbeit.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nehmen meine Freunde und Familie ein, ohne Ihre liebevolle Fürsorge und Mithilfe wäre diese Arbeit nicht zu dem Werk geworden, das sie heute ist.