

Aus dem Institut für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. M.H. Erhard

Angefertigt unter der Leitung von

Prof. Dr. M.H. Erhard

In Kooperation mit der Max-Planck Forschungsstelle
für Ornithologie in Andechs

**Untersuchungen zur Melatoninrhythmik
beim Hausschwein (*Sus scrofa f. domestica*)
unter Anwendung einer neu entwickelten
HPLC-Methode**

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

von

Christine Engmann

aus Neuendettelsau

München 2004

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. M.H. Erhard
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. A. Höflich

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Literatur	2
1. Melatonin	2
1.1. Ort der Melatoninsynthese	2
1.2. Bildung von Melatonin	3
1.3. Zwischenprodukte der Melatoninsynthese	4
1.4. Regulation und Ausschüttung von Melatonin	9
1.5. Abbau von Melatonin	12
1.6. Abbauprodukte von Melatonin	13
2. Exogene und Endogene Einflüsse	15
2.1. Licht	15
2.1.1. Einfluss der Jahreszeit	15
2.1.2. Einfluss der Tageslänge	16
2.1.3. Einfluss der Lichtintensität	17
2.1.4. Einfluss der Lichtqualität	18
2.2. Weitere Einflussfaktoren	18
2.2.1. Einfluss des Geschlechts	18
2.2.2. Einfluss des Alters	19
2.2.3. Genetischer Einfluss	19
2.2.4. Einfluss von Stress	20
2.2.5. Einfluss der Nahrungsaufnahme	21
3. Nachweismethoden für Melatonin	21
3.1. Chromatographie	21
3.2. Radioimmunoassay	23

III. Material und Methoden	25
1. Tiere und Haltungsbedingungen	25
2. Versuchsaufbau	26
2.1. Lichtprogramm	26
2.2. Stallbelegung	26
2.3. Trainingsphase	27
2.4. Legen des zentralvenösen Gefäßzugangs zur <i>V. jugularis</i>	27
3. Versuchsdurchführung	27
3.1. Gewinnung der Speichelproben	27
3.2. Gewinnung der Blutproben	28
4. HPLC-Analyse	29
4.1. Melatoninextraktion	29
4.2. Melatoninmessung	31
5. Statistische Auswertung	32
6. Definitionen der im Ergebnisteil verwendeten Zeitbegriffe	32
6.1. Allgemeine Definitionen	32
6.2. Probenentnahmezeitpunkte	33
IV. Ergebnisse	34
1. Optimierung der Methode	34
1.1. Optimierung der Extraktions- und Messbedingungen	34
1.2. Inter- und Intraassay-Variationen	35
1.3. Messung der Referenzsubstanzen	39
1.4. Messung der Futterproben	39

2. Anwendung der Methode	40
2.1. Ergebnisse der Plasmamelatoninbestimmung	40
2.1.1. Gesamtgruppe	40
2.1.2. Abhängigkeit vom Geschlecht	42
2.1.3. Abhängigkeit von der Lichtintensität	46
2.1.4. Abhängigkeit vom Geschlecht bei 470 Lux	50
2.1.5. Abhängigkeit vom Geschlecht bei 250 Lux	53
2.1.6. Abhängigkeit vom Geschlecht und der Lichtintensität	56
2.2. Ergebnisse der Speichelmelatoninbestimmung	60
2.2.1. Gesamtgruppe	60
2.2.2. Abhängigkeit vom Geschlecht	62
2.2.3. Abhängigkeit von der Lichtintensität	66
2.2.4. Abhängigkeit vom Geschlecht bei 470 Lux	70
2.2.5. Abhängigkeit vom Geschlecht bei 250 Lux	74
2.2.6. Abhängigkeit vom Geschlecht und der Lichtintensität	78
2.3. Ergebnisse der Plasma/Speichel-Korrelation	81
2.3.1. Gesamtgruppe	81
2.3.2. Abhängigkeit vom Geschlecht	81
2.3.3. Abhängigkeit von der Lichtintensität	82
2.3.4. Abhängigkeit vom Geschlecht und der Lichtintensität	83
V. Diskussion	85
1. Diskussion der Methoden	85
1.1. Experimentelles Design	85
1.1.1. Tierausswahl	85
1.1.2. Haltungsbedingungen	86
1.2. Probengewinnung	87
1.3. HPLC-Methode	88
1.4. Einteilung der Probengewinnungszeitpunkte und der statistischen Auswertung	90

2. Diskussion der Ergebnisse	91
2.1. Plasmamelatoninkonzentrationen	91
2.1.1. Gesamtgruppe	91
2.1.2. Abhängigkeit vom Geschlecht	94
2.1.3. Abhängigkeit von der Lichtintensität	96
2.1.4. Abhängigkeit vom Geschlecht und der Lichtintensität	99
2.2. Speichelmelatoninkonzentrationen	103
2.2.1. Gesamtgruppe	103
2.2.2. Abhängigkeit vom Geschlecht	104
2.2.3. Abhängigkeit von der Lichtintensität	105
2.2.4. Abhängigkeit vom Geschlecht und der Lichtintensität	107
2.3. Plasma/Speichel-Korrelation	109
3. Gesamtdiskussion	112
4. Schlussfolgerungen	117
VI. Zusammenfassung	119
VII. Summary	121
VIII. Literaturverzeichnis	123

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1:	Strukturformel von Melatonin 4
Abb. 2:	Strukturformel von Tryptophan 4
Abb. 3:	Melatoninsynthese und Metabolisierung 5
Abb. 4:	Strukturformel von Hydroxytryptophan 6
Abb. 5:	Strukturformel von Serotonin 6
Abb. 6:	Strukturformel von N-Acetylserotonin 8
Abb. 7:	Neuronale Regulation der Melatoninsekretion 10
Abb. 8:	Noradrenerge Stimulation der Melatoninsynthese 11
Abb. 9:	Strukturformel von Methoxytryptamin 13
Abb. 10:	Strukturformel von Methoxytryptophol 14
Abb. 11:	Strukturformel von Methoxyindolessigsäure 14
Abb. 12:	Belegung des Stalles während des Versuchs 26
Abb. 13 A bis D:	HPLC-Chromatogramme eines externen Standards (A), eines extrahierten Standards (B), einer A. bidest.-Probe (C) und einer Plasmaprobe (D) 37
Abb. 14 A bis D:	HPLC-Chromatogramme eines externen Standards (A), eines extrahierten Standards (B), einer A. bidest.-Probe (C) und einer Speichelprobe (D) 38
Abb. 15:	Plasmamelatoninprofile der Gesamtgruppe 40
Abb. 16 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der Gesamtgruppe unter Einbeziehung (A) und unter Ausschluss der Transitionszeiten (B) 41
Abb. 17:	Plasmamelatonininkonzentrationen der Morgenproben der Gesamtgruppe 42
Abb. 18 A und B:	Plasmamelatoninprofile der männlichen und weiblichen Tiere am 1. (A) und 2. Versuchstag (B) 43
Abb. 19 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) unter Einbeziehung der Transitionszeiten 44
Abb. 20 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) unter Ausschluss der Transitionszeiten 44

Abb. 21 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der Morgenproben der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B)	45
Abb. 22 A und B:	Plasmamelatoninprofile bei 470 und 250 Lux am 1. (A) und 2. Versuchstag (B)	46
Abb. 23 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen bei 470 (A) und 250 Lux (B) unter Einbeziehung der Transitionszeiten	47
Abb. 24 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen bei 470 (A) und 250 Lux (B) unter Ausschluss der Transitionszeiten	48
Abb. 25 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der Morgenproben bei 470 (A) und 250 Lux (B)	49
Abb. 26 A und B:	Plasmamelatoninprofile der männlichen und weiblichen Tiere bei 470 Lux am 1. (A) und 2. (B) Versuchstag	50
Abb. 27 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 470 Lux unter Einbeziehung der Transitionszeiten	51
Abb. 28 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 470 Lux unter Ausschluss der Transitionszeiten	51
Abb. 29 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der Morgenproben der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 470 Lux	52
Abb. 30 A und B:	Plasmamelatoninprofile der männlichen und weiblichen Tiere bei 250 Lux am 1. (A) und 2. (B) Versuchstag	53
Abb. 31 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 250 Lux unter Einbeziehung der Transitionszeiten	54
Abb. 32 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 250 Lux unter Ausschluss der Transitionszeiten	55
Abb. 33 A und B:	Plasmamelatonininkonzentrationen der Morgenproben der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 250 Lux	56
Abb. 34 A und B:	Plasmamelatoninprofile der männlichen Tiere bei 470 und 250 Lux am 1. (A) und 2. (B) Versuchstag	57
Abb. 35 A und B:	Plasmamelatoninprofile der weiblichen Tiere bei 470 und 250 Lux am 1. (A) und 2. (B) Versuchstag	58

Abb. 36:	Speichelmelatoninprofile der Gesamtgruppe	60
Abb. 37 A und B:	Speichelmelatonininkonzentrationen der Gesamtgruppe unter Einbeziehung (A) und unter Ausschluss der Transitionszeiten (B)	61
Abb. 38:	Speichelmelatonininkonzentrationen der Morgenproben der Gesamtgruppe	61
Abb. 39 A und B:	Speichelmelatoninprofile der männlichen und weiblichen Tiere am 1. (A) und 2. Versuchstag (B)	62
Abb. 40 A und B:	Speichelmelatonininkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) unter Einbeziehung der Transitionszeiten	63
Abb. 41 A und B:	Speichelmelatonininkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) unter Ausschluss der Transitionszeiten	64
Abb. 42 A und B:	Speichelmelatonininkonzentrationen der Morgenproben der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B)	65
Abb. 43 A und B:	Speichelmelatoninprofile bei 470 und 250 Lux am 1. (A) und 2. Versuchstag (B)	66
Abb. 44 A und B:	Speichelmelatonininkonzentrationen bei 470 (A) und 250 Lux (B) unter Einbeziehung der Transitionszeiten	67
Abb. 45 A und B:	Speichelmelatonininkonzentrationen bei 470 (A) und 250 Lux (B) unter Ausschluss der Transitionszeiten	68
Abb. 46 A und B:	Speichelmelatonininkonzentrationen der Morgenproben bei 470 (A) und 250 Lux (B)	69
Abb. 47 A und B:	Speichelmelatoninprofile der männlichen und weiblichen Tiere bei 470 Lux am 1. (A) und 2. (B) Versuchstag	70
Abb. 48 A und B:	Speichelmelatonininkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 470 Lux unter Einbeziehung der Transitionszeiten	71
Abb. 49 A und B:	Speichelmelatonininkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 470 Lux unter Ausschluss der Transitionszeiten	72
Abb. 50 A und B:	Speichelmelatonininkonzentrationen der Morgenproben der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 470 Lux	73

Abb. 51 A und B:	Speichelmelatoninprofile der männlichen und weiblichen Tiere bei 250 Lux am 1. (A) und 2. (B) Versuchstag	74
Abb. 52 A und B:	Speichelmelatoninkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 250 Lux unter Einbeziehung der Transitionszeiten	75
Abb. 53 A und B:	Speichelmelatoninkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 250 Lux unter Ausschluss der Transitionszeiten	76
Abb. 54 A und B:	Speichelmelatoninkonzentrationen der Morgenproben der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) bei 250 Lux	77
Abb. 55 A und B:	Speichelmelatoninprofile der männlichen Tiere bei 470 und 250 Lux am 1. (A) und 2. (B) Versuchstag	78
Abb. 56 A und B:	Speichelmelatoninprofile der weiblichen Tiere bei 470 und 250 Lux am 1. (A) und 2. (B) Versuchstag	79
Abb. 57:	Plasma/Speichel-Korrelation der Gesamtgruppe (1. Versuchstag)	81
Abb. 58:	Plasma/Speichel-Korrelation der weiblichen Tiere (1. Versuchstag)	82
Abb. 59:	Plasma/Speichel-Korrelation der weiblichen Tiere bei 470 Lux (1. Versuchstag)	83
Abb. 60 A und B:	Plasma/Speichel-Korrelation der weiblichen Tiere bei 250 Lux am 1. (A) und 2. Versuchstag (B)	84

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammensetzung des Futtermittels LAK	26
Tab. 2:	Volumina der Futterproben und der Chemikalien	30
Tab. 3:	Darstellung der Probenentnahmezeitpunkte	33
Tab. 4 A:	Intraassay-Variation in den Standards der Plasmaextraktionen	35
Tab. 4 B:	Intraassay-Variation in den Standards der Speichlextraktionen	36

Abkürzungsverzeichnis

cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
<i>h</i>	Stunden
HIAA	Hydroxyindole-acetic-acid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HT	Hydroxytryptamin
HTOL	Hydroxytryptophol
HTP	Hydroxytryptophan
HMEL	Hydroxymelatonin
LD	Licht/Dunkel-Rhythmus
(m)M	(milli-) Molar
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
MIAA	Methoxyindole-acetic-acid
MID	Methoxyindol
min	Minuten
mk	männlich-kastriert
MMIAA	Methoxy-methyl-indoleacetic-acid
MT	Methoxytryptamin
MTP	Methoxytryptophan
NAS	N-Acetylserotonin
N	Normal
<i>n</i>	Anzahl
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeit
<i>r</i>	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SEM	Standardfehler
<i>w</i>	weiblich
ZGT	Zeitgeberzeit

I. Einleitung

Bisherige Veröffentlichungen auf dem Arbeitsgebiet der zirkadianen Melatoninrhythmik des Hausschweines basieren ausnahmslos auf radioimmunologischen Nachweismethoden. Hierbei zeigte sich in einer neueren Untersuchung, dass bestimmte Antiseren aufgrund unzureichender Spezifität für die Anwendung am Schwein generell ungeeignet sind. Aus diesem Grund hat sich seither die Anwendung eines G280-Antimelatonin-Antiserums durchgesetzt. Doch auch diese polyklonalen Antikörper wiesen Unterschiede zu der physikalisch-chemischen, gaschromatographischen Referenzmethode auf. Radioimmunologische Methoden unter Verwendung von Antiseren sind stets mit dem Risiko von Kreuzreaktionen der polyklonalen Antikörper mit anderen Probeninhaltsstoffen verbunden, da einige Melatoninvorstufen oder Metaboliten eine dem Melatonin ähnliche chemische Struktur aufweisen.

Mit einer Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) -Methode ist die Unterscheidung zwischen Melatonin und seinen Vorstufen oder Metaboliten möglich. Die Verwendung der HPLC-Methode könnte in zukünftigen Untersuchungen dazu dienen, präzisere Ergebnisse über den Lichtbedarf von Schweinen zur Ausbildung einer Melatoninrhythmik zu erhalten.

Deshalb sollte in dieser Untersuchung die Anwendung einer HPLC-Methode für die Anwendung am Hausschwein etabliert werden. Neben Plasmaproben sollten auch Speichelproben untersucht werden, um die Korrelation der Melatoninkonzentrationen beider Medien vergleichen zu können. Da die Gewinnung von Blutproben nur unter Anwendung von Zwangsmaßnahmen möglich ist und zur Belastung der Tiere führt, die sich negativ auf die Melatoninsekretion auswirken könnte, sollte geklärt werden, ob Plasmaproben zur Melatoninbestimmung in zukünftigen Untersuchungen durch die minimal-invasive Methode der Speichelprobengewinnung ersetzt werden können.

II. Literatur

1. Melatonin

Melatonin wurde 1958 durch LERNER et al. in bovinem Epiphysengewebe entdeckt. Das Auftreten von Melatonin ist jedoch nicht auf die Klasse der Wirbeltiere beschränkt, sondern wurde bereits in den frühen evolutionären Stufen der Prokaryonten gefunden. Melatonin wurde bei den Photosynthese betreibenden Bakterien *Rhodospirillum rubrum* (MANCHESTER et al., 1995), *Erythrobacter longus* (TILDEN et al., 1997) sowie bei verschiedenen eukaryotischen Einzellern (z.B. *Lingulodinium polyedrum*) nachgewiesen (POEGGELER et al., 1991; HARDELAND, 1999) und wurde auch in Pflanzen und Pilzen identifiziert (HATTORI et al., 1995; REITER et al., 2001; VAN TASSEL und O`NEILL, 2001; TAN et al., 2002). Während es bei Bakterien, einzelligen Organismen, Pflanzen und Pilzen keine hormonellen, sondern regulative Funktionen erfüllt (MANCHESTER et al., 2000; VAN TASSEL und O`NEILL, 2001), hat Melatonin im Tierreich verschiedene physiologische Funktionen übernommen, die überwiegend auf seinen hormonellen Eigenschaften beruhen. Dazu zählen bei den Wirbeltieren z.B. die Regulation der jahreszeitlichen Fortpflanzung (REITER, 1991; MALPAUX et al., 1997), die Modulation des Immunsystems (MAESTRONI, 1993; LOPEZ-GONZALEZ et al., 1998) und der zirkadianen (GWINNER et al., 1997) sowie zirkannualen Rhythmen (WEHR, 1997; BERTOLUCCI et al., 2002).

1.1. Ort der Melatoninsynthese

Das im Blutssystem zirkulierende Melatonin wird hauptsächlich in der Epiphyse gebildet. Die Epiphyse (syn. Pinealorgan, Zirbeldrüse) ist ein Teil des Zwischenhirns. Sie entsteht während der Embryonalentwicklung aus einer Ausstülpung des Zwischenhirndaches (CALVO und BOYA, 1981b), die sich durch Epithelfaltungen und der Einwanderung von Pinealoblasten zu einem soliden Organ entwickelt (CALVO und BOYA, 1981a, b; FUJIEDA et al., 1997). Mit Ausnahme der Säugetiere besitzt die Epiphyse photorezeptive Eigenschaften, da die Melatoninproduktion in vitro auch ohne sympathische Innervation rhythmisch bleibt (MEISSL und BRANDSTÄTTER, 1992; TOSINI und MENAKER, 1998; BERTOLUCCI et al., 2003). Bei den Säugetieren werden

dem Pinealorgan durch das sympathische Nervensystem Informationen über die den Organismus treffende Lichtmenge zugeleitet, und sekretorische Zellen (Pinealozyten) bilden dann das Hormon Melatonin (MOORE, 1996).

Die Zirbeldrüse weist eine speziesspezifische Form und Größe auf. Beim Schwein ist sie von roggenkornähnlicher Gestalt mit einer Länge von 10 mm, einer Breite von 5 mm und einem Gesamtgewicht von 50 mg (GUTTE und GRÜTZE, 1979).

Neben der Epiphyse wird Melatonin beispielsweise auch in der Retina gebildet, wo es regulative Aufgaben erfüllt (STEINLECHNER et al., 1995), des weiteren wurde seine Synthese im Gastrointestinaltrakt des Schweines (BUBENIK et al., 1998, 1999, 2000) nachgewiesen. Extrapineal gebildetes Melatonin hat jedoch keinen deutlichen Einfluss auf den zirkadianen Rhythmus des zirkulierenden Melatonins (REITER, 1991; TAN et al., 2003).

1.2. Bildung von Melatonin

Die Ausgangssubstanz der Melatoninsynthese bildet die essentielle Aminosäure Tryptophan, die aus dem Blutsystem in die Pinealozyten gelangt (CARDINALI und WURTMAN, 1975; MINNEMAN und WURTMAN, 1976). In Abb. 3 ist die Melatoninsynthese schematisch dargestellt. In den Pinealozyten wird der Indolring des Tryptophan-gerüsts in C₅-Position durch Aktivität des Enzyms Tryptophanhydroxylase hydroxyliert (SITARAM und LEES, 1978), woraus das Zwischenprodukt 5-Hydroxytryptophan entsteht. Aus 5-Hydroxytryptophan wird nach Abspaltung von Kohlendioxid unter Beteiligung der Aromatischen-L-Aminosäuren-Decarboxylase Serotonin gebildet (CARDINALI, 1981). Der Abbau von Serotonin kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Die Acetylierung von Serotonin erfolgt unter Verbrauch von Acetyl-CoA durch die Aktivität der Serotonin-N-Acetyltransferase (SNAT) und führt zur Bildung von N-Acetyl-Serotonin und Coenzym A. SNAT stellt das Schlüsselenzym in der Melatoninsynthese dar (KLEIN et al., 1970; KLEIN et al., 1997), da es infolge seiner Lichtempfindlichkeit nur nachts aktiv ist und damit sowohl geschwindigkeitsbestimmend als auch konzentrationslimitierend wirkt (KLEIN und WELLER, 1970). Das N-Acetyl-Serotonin wird durch die Aktivität des Enzyms Hydroxyindol-O-Methyl-Transferase (HIOMT) und dem Cosubstrat S-Adenosyl-Methionin methyliert, woraus Melatonin (N-Acetyl-5-Methoxytryptamin) (Abb. 1) gebildet wird (AXELROD und WEISBACH, 1961).

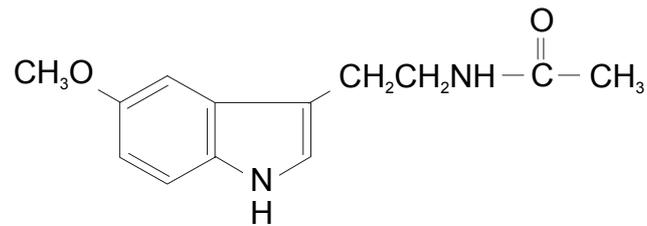


Abb. 1: Strukturformel von Melatonin

1.3. Zwischenprodukte der Melatoninsynthese

Neben Melatonin sind auch dessen Zwischenprodukte im Blut sowie in der Epiphyse nachgewiesen worden (YOUNG und ANDERSON, 1982; MEFFORD et al., 1983; FOOLEY und CAIRNCROSS, 1987).

Tryptophan (Abb.2)

Die essentielle Aminosäure Tryptophan wird über die Nahrung aufgenommen. Ihre Aufnahme aus dem Blutkreislaufsystem in die Pinealozyten stellt den die Serotoninsynthese limitierenden Faktor dar (SUGDEN, 1989). Die pineale Tryptophankonzentration ist sehr hoch

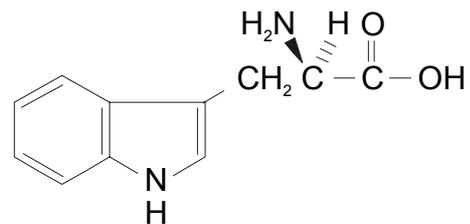


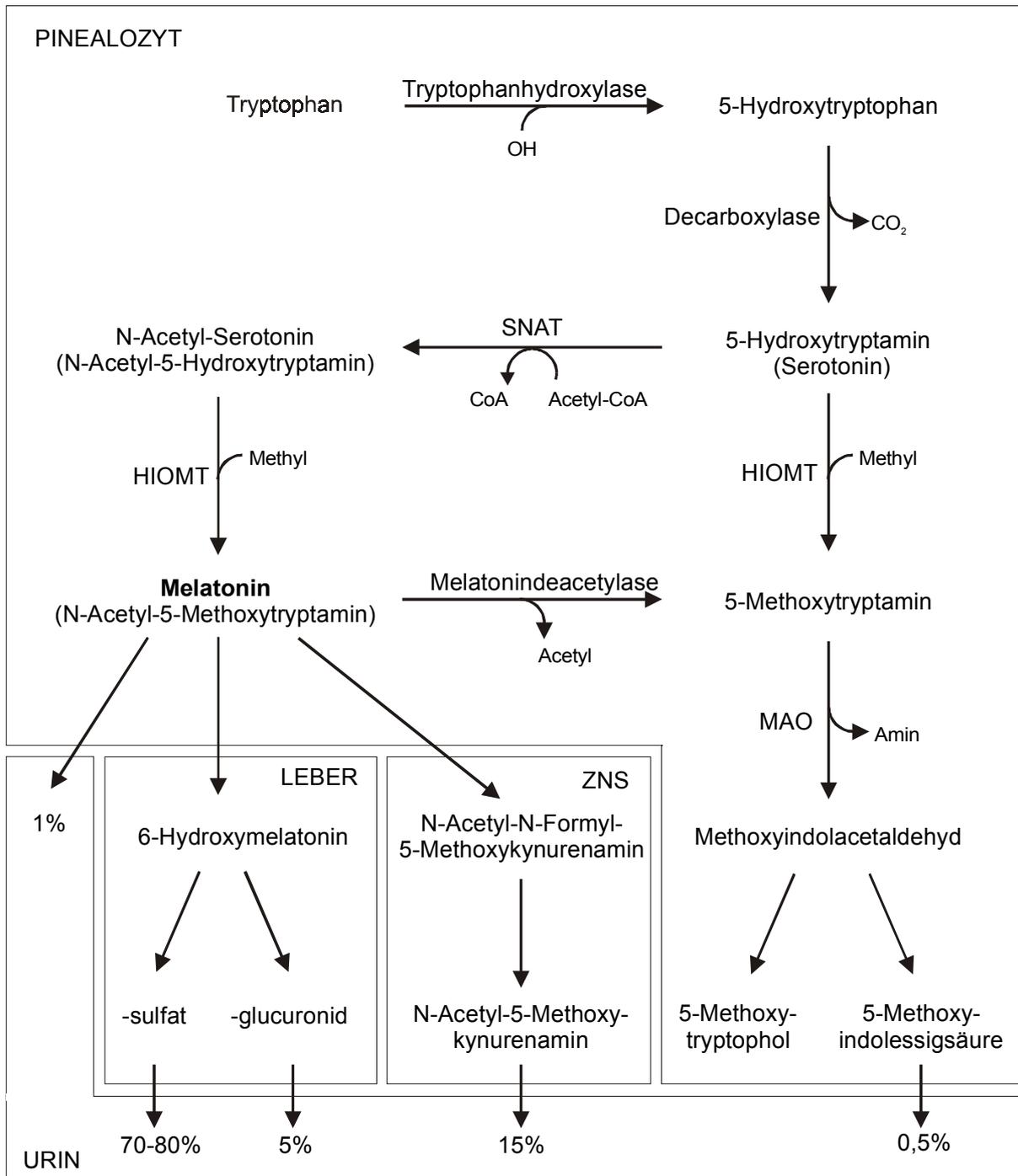
Abb. 2: Strukturformel von Tryptophan

(YOUNG und ANDERSON, 1982; MEFFORD et al., 1983), korreliert jedoch nicht mit der Serum-Tryptophankonzentration (SUGDEN, 1979). Während MEFFORD et al. (1983) bei Ratten keine zirkadianen Unterschiede der Tryptophankonzentration in der Epiphyse feststellten, konnten YOUNG und ANDERSON (1982) einen pinealen Tagesrhythmus mit niedrigen Konzentrationen während der Dunkelheit und hohen Konzentrationen bei Helligkeit nachweisen. Auch nach einer einstündigen Lichtexposition von Ratten während der Nachtphase trat ein Anstieg der pinealen Tryptophankonzentration auf (YOUNG und ANDERSON, 1982).

Tryptophanhydroxylase

Tryptophanhydroxylase ist das limitierende Enzym der Serotoninsynthese (LOVENBERG et al., 1967; JÉQUIER et al., 1969). Sie überträgt eine OH-Gruppe auf das Tryptophanmolekül (SITARAM und LEES, 1978).

Abb. 3: Melatoninsynthese und Metabolisierung



Nach CARDINALI (1981), BECK et al. (1981), SUGDEN (1989), RAYNAUD und PÉVET (1991) modifiziert

Die Aktivität der Tryptophanhydroxylase besitzt z.B. bei Ratten einen zirkadianen Rhythmus und ist nachts um das Doppelte höher als tagsüber (EHRET et al., 1991; BESANÇON et al., 1996). Die pineale Tryptophanhydroxylase-Konzentration kann durch cAMP (EHRET et al., 1991), sowie durch Noradrenalin (SHEIN und WURTMAN, 1971; SITARAM und LEES, 1984) stimuliert werden.

Hydroxytryptophan (Abb. 4)

Pineales Hydroxytryptophan ist der Vorläufer von Serotonin, es kann jedoch auch durch das Enzym HIOMT methyliert werden und somit eine weitere Vorstufe von Melatonin darstellen (CARDINALI, 1981).

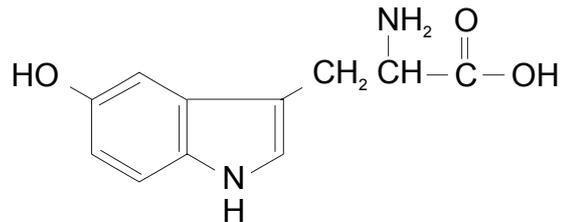


Abb. 4: Strukturformel von Hydroxytryptophan

Aromatische-L-Aminosäuren-Decarboxylase

Das Enzym katalysiert in der Epiphyse die Decarboxylierung von Hydroxytryptophan zu Hydroxytryptamin (Serotonin) (CARDINALI, 1981). Es ist in den meisten Geweben des Körpers vorhanden (RAHMAN et al., 1981) und tritt z.B. im SCN (TILLET et al., 1994; NOWAK und NUNEZ, 1998), wo es an der Dopaminsynthese beteiligt ist, sowie in bestimmten Abschnitten der Hypophyse auf (JOHNSTON et al., 1984).

Serotonin (Abb. 5)

Serotonin besitzt verschiedene Funktionen im Organismus: so stellt es nicht nur einen Melatonin-vorläufer dar, sondern es wirkt auch als Neurotransmitter sowie als Neurohormon. Pineales Serotonin

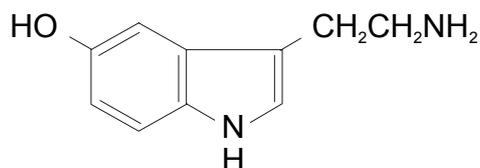


Abb. 5: Strukturformel von Serotonin

(5-Hydroxytryptamin) weist z.B. bei Ratten einen zirkadianen, der Melatoninrhythmik entgegengesetzten Rhythmus mit Maximalkonzentrationen während des Tages auf (YOUNG und ANDERSON, 1982; MEFFORD et al., 1983). FOOLEY und CAIRNCROSS (1987) konnten dagegen in einer Studie an Ratten einen infradianen, episodischen Verlauf der pinealen Serotoninkonzentration mit zwei Peaks während der Nacht- und einem Peak während der Tagphase nachweisen. YOUNG und ANDERSON (1982)

zeigten bei Ratten einen Konzentrationsanstieg der pinealen Melatoninkonzentration nach einstündiger Lichtexposition während der Nachtphase. Pineales Serotonin wird durch eine noradrenerge Stimulation freigesetzt (SUGDEN et al., 1989). Ein zirkadianer Rhythmus der Serotoninfreisetzung ist auch im SCN von Ratten vorhanden, der durch niedrige Tagwerte, einen starken Konzentrationsanstieg zum Zeitpunkt der Tag/Nacht-Transition und Maximalkonzentrationen zu Beginn der Nachtphase gekennzeichnet ist (BARASSIN et al., 2002).

Serotonin-N-Acetyltransferase

Durch die Aktivität des pinealen Enzyms Serotonin-N-Acetyltransferase (SNAT) wird unter Verbrauch von Acetyl-CoA eine Acetylgruppe auf das Serotoninmolekül übertragen, wodurch der direkte Melatoninvorläufer N-Acetyl-Serotonin entsteht (SUGDEN, 1989; KLEIN et al., 1997). Die Acetylgruppe stammt von dem Cosubstrat Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), dessen Konzentration durch das Enzym Acetyl-CoenzymA-Hydrolase reguliert wird (NAMBOODIRI et al., 1979). Die Enzymaktivität wird durch Lichteinfall gehemmt, während die Aktivität nachts in Abwesenheit von Licht durch Noradrenalinfreisetzung ansteigt (KLEIN und WELLER, 1970; SUGDEN, 1989). Das Schlüsselenzym SNAT wirkt damit sowohl geschwindigkeitsbestimmend als auch konzentrationslimitierend auf die Melatoninsynthese (KLEIN et al., 1970). Die Regulation der Enzymaktivität erfolgt über die zirkadiane Noradrenalinfreisetzung aus den sympathischen Nervenendigungen der Epiphyse unter Beteiligung von α_1 - und β -Rezeptoren (SUGDEN, 1989). Die schematische Regulation der Enzymsynthese und Aktivität ist der Abb. 8 zu entnehmen. Schweine weisen den Ergebnissen von REITER et al. (1987) zufolge keinen nächtlichen Anstieg der pinealen SNAT-Aktivität, und unter natürlichen Lichtverhältnissen auch keinen mit der Nachtlänge korrelierenden Unterschied zwischen Frühsommer und Winter auf.

N-Acetylserotonin (Abb. 6)

N-Acetylserotonin (NAS) besitzt infolge der Aktivität des an der Synthese beteiligten lichtsensitiven Enzyms SNAT eine dem Melatonin analoge Rhythmik mit nächtlichem Konzentrationsmaximum. Nachts tritt z.B. in der Epiphyse der Ratte

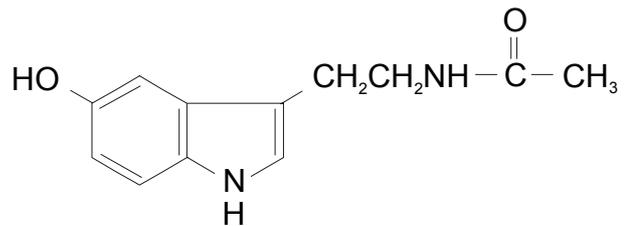


Abb. 6: Strukturformel von N-Acetylserotonin

ein 50-facher Konzentrationsanstieg auf (MEFFORD et al., 1983). Auch YOUNG und ANDERSON (1982) zeigten einen starken Anstieg während der frühen und mittleren Nachtphase, ebenso wie FOLEY und CAIRNCROSS (1987), die einen periodischen Konzentrationsverlauf mit drei nächtlichen NAS-Peaks in Rattenepiphysen nachweisen konnten.

Hydroxyindol-O-Methyl-Transferase

Das Enzym Hydroxyindol-O-Methyl-Transferase (HIOMT) überträgt eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin auf den Melatoninvorläufer N-Acetyl-Hydroxytryptamin (NAS), woraus das Melatoninmolekül (N-Acetyl-Methoxytryptamin) entsteht. GUCHHAIT und MONJAN (1981) sowie auch MCLEOD und CAIRNCROSS (1993) konnten z.B. in der Epiphyse der Ratte einen zirkadianen Rhythmus der HIOMT-Aktivität nachweisen, der in der Mitte der Dunkelphase einen 1,5-fachen Aktivitätsanstieg besitzt. Weitere Methylgruppen-Akzeptormoleküle im Serotonin-metabolismus sind Hydroxytryptophan, Hydroxyindolessigsäure, Hydroxytryptophol, und Hydroxyindolacetaldehyd (CARDINALI, 1981; BECK et al., 1981; SUGDEN, 1989), deren Enzymaffinität jedoch 10-20-fach niedriger sind als für NAS (AXELROD und WEISBACH, 1961). Die Aktivität der pinealen HIOMT unterliegt der adrenergen Regulation und wird durch Noradrenalin gefördert. Ihre Aktivität kann durch das Lichtspektrum beeinflusst werden, wobei rotes Licht die HIOMT-Aktivität nicht beeinflusst und grünes Licht eine Unterdrückung ihrer Aktivität (CARDINALI et al., 1972) bewirkt. Bei Schweinen konnte unter natürlichen Lichtverhältnissen kein nächtlicher Aktivitätsanstieg der pinealen HIOMT-Aktivität beobachtet werden (REITER et al., 1987).

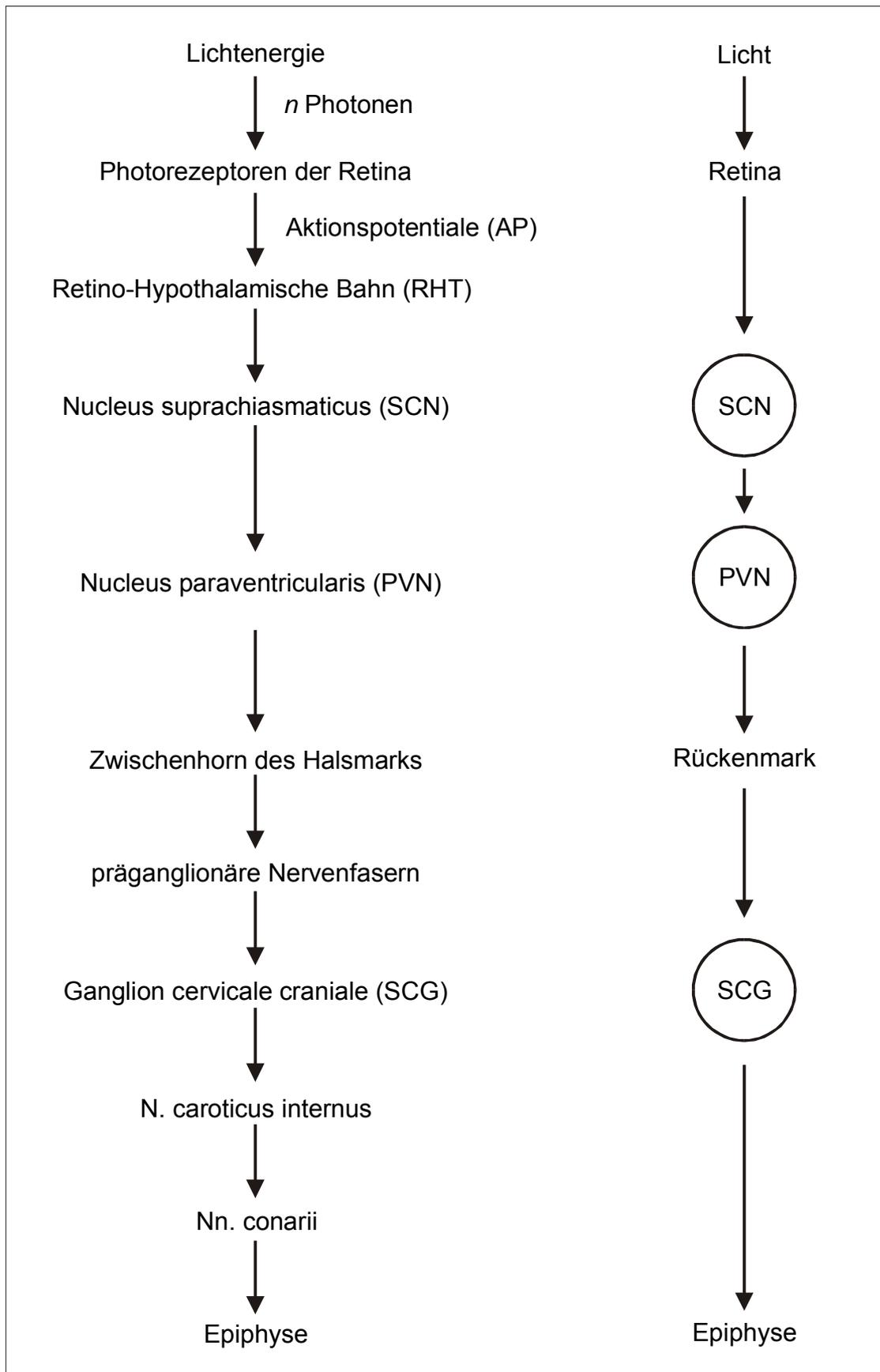
1.4. Regulation und Ausschüttung von Melatonin

Die Melatoninsynthese wird vom Nucleus suprachiasmaticus (SCN) ausgehend gesteuert, der über den Neurotransmitter Noradrenalin die Impulse zur Synthese und Sekretion während der Nacht aussendet (REITER, 1993). Die lichtinduzierte Suppression der Melatoninsynthese ist in Abb. 7 dargestellt und beginnt mit dem Eintreffen eines Lichtreizes auf spezielle Photorezeptoren in der Netzhaut des Auges, die sich in ihrem Absorptionsmaximum sowohl von den retinalen Stäbchen- als auch von den Zapfenzellen unterscheiden (BRAINARD et al., 2001). Die Lichtenergie wird in Form elektrischer Reize mittels Aktionspotentialen über Nervenfasern der Retino-Hypothalamischen-Bahn (RHT), die innerhalb des Sehnerven (N. opticus) verläuft, zum SCN des Hypothalamus geleitet (REITER, 1993). Diese Informationen hindern den SCN daran, Noradrenalin (NA) freizusetzen.

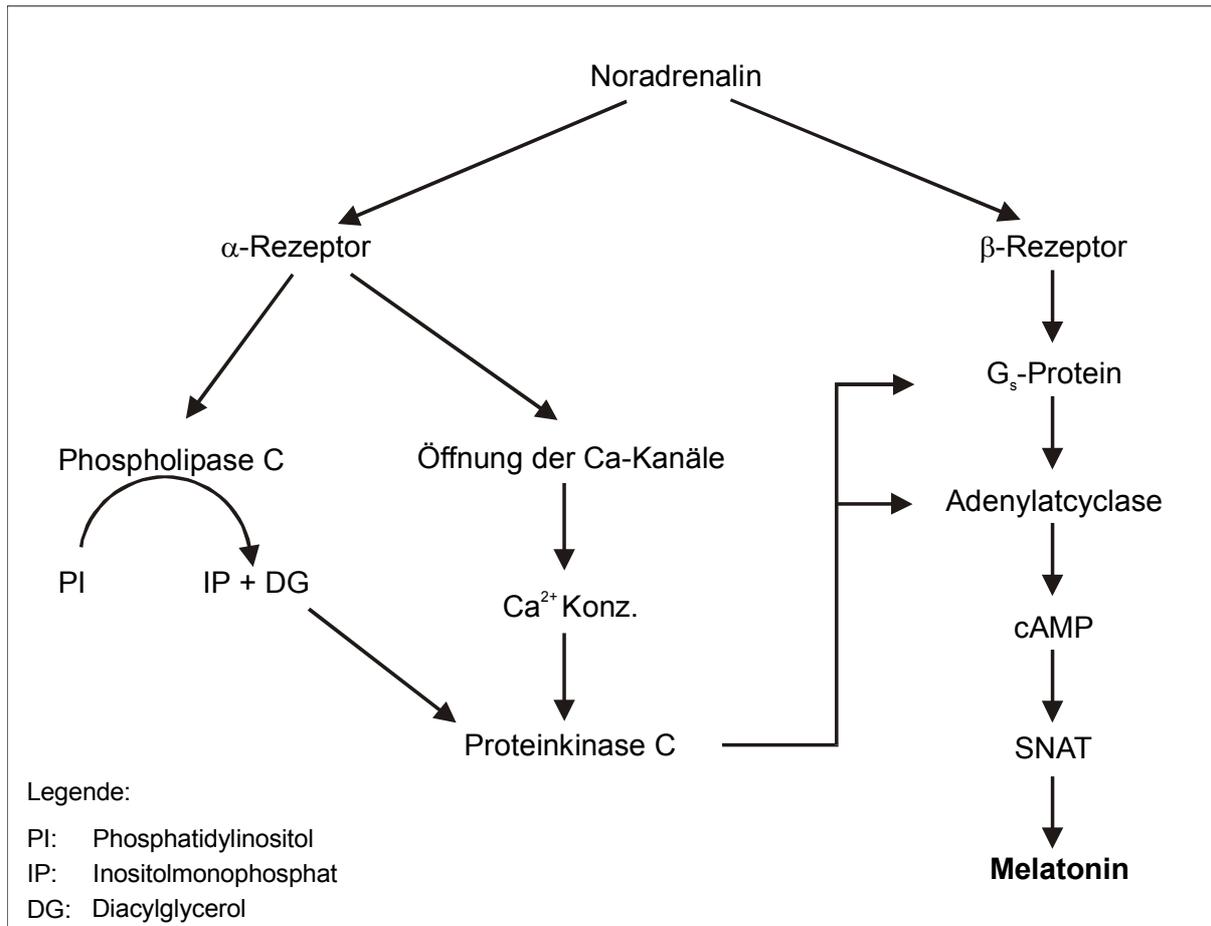
Bei Lichtabwesenheit wird Noradrenalin freigesetzt wodurch die Information zum Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus, und über dessen absteigende Bahnen zum Zwischenhorn des Halsmarks (REITER, 1991, 1993) gelangt. Über die präganglionären Nervenfasern wird der Reiz schließlich in das Ganglion cervicale craniale (SCG) geleitet (REITER, 1993; GEOFFRIAU et al., 1998). Über den N. caroticus internus und die Nervi conarii erfolgt die Noradrenalinausschüttung an den Synapsen zur Epiphyse (GEOFFRIAU et al., 1998).

Die Stimulation der Melatoninsynthese wird durch das an den Synapsen freigesetzte Noradrenalin gefördert. In Abb. 8 ist die Signaltransduktion in den Pinealozyten dargestellt. Noradrenalin bindet an α - und an β -Rezeptoren der Pinealozytenmembran. Die Stimulation der β -Rezeptoren führt über ein G_s -Protein zur Aktivierung des Enzyms Adenylatcyclase und bewirkt einen Anstieg der cAMP-Konzentration, die für die Aktivierung des Schlüsselenzyms SNAT verantwortlich ist (SUGDEN, 1989). Durch Induktion der SNAT-Aktivität, die auf dem Niveau der Transkription wirkt, wird Serotonin zu N-Acetylserotonin acetyliert und anschliessend durch HIOMT zu Melatonin methyliert. Durch cAMP wird die Aktivität von SNAT und HIOMT aufrecht erhalten (KLEIN et al., 1979; SUGDEN und KLEIN, 1983). Die Stimulation der α_1 -Rezeptoren bewirkt einerseits durch Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle einen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg (SUGDEN et al., 1987), andererseits die Spaltung von Phosphoinositol, wobei eines der Produkte, Diacylglycerol, gemeinsam mit Ca^{2+} das Enzym Proteinkinase C aktivieren.

Abb. 7: Neuronale Regulation der Melatoninsekretion



Nach CARDINALI (1981), REITER (1993), GEOFFRIAU et al. (1998) modifiziert

Abb. 8: Noradrenerge Stimulation der Melatoninsynthese

Nach SUGDEN (1989) modifiziert

Proteinkinase C bewirkt eine Potenzierung der β -adrenergen Wirkungen und führt durch eine Phosphorylierung von G_s und von Adenylatcyclase zu einem extrem hohen cAMP-Konzentrationsanstieg (SUGDEN, 1989).

Die Begrenzung der Melatoninsynthese erfolgt auf der Ebene der α - und β -Rezeptoren, sowie des cAMPs. Durch einen negativen Feedback-Mechanismus, an dem wiederum maßgeblich Proteinkinase C beteiligt ist, werden Dauer und Ausmaß des cAMP-Anstieges reguliert: Proteinkinase C phosphoryliert unmittelbar nach Aktivierung des cAMP-Niveaus den α_1 -Rezeptor, der dadurch desensibilisiert und inaktiviert wird (SUGDEN, 1988). Die Dichte der β -Rezeptoren auf der Pinealozytenmembran unterliegt einem Tagesrhythmus. Sie ist zu Beginn der Dunkelheit maximal und sinkt mit zunehmender Stimulationsdauer bzw. Nachtlänge ab (ROMERO et al., 1975; PANGERL et al., 1990). Durch den Noradrenalin-induzierten Anstieg der cAMP-

Konzentration wird die Aktivität des Enzyms cAMP-Phosphodiesterase erhöht, das den Abbau des cAMPs verstärkt (MINNEMAN und IVERSEN, 1976).

Infolge seines hormonellen Charakters und seiner hochlipophilen Eigenschaften ist Melatonin in der Lage, biologische Barrieren (z.B. Blut-Hirn-Schranke) zu durchdringen (PARDRIGE und MIETUS, 1980; REITER, 1993). Die Freisetzung von Melatonin in den Blutkreislauf erfolgt während der Nacht, und zwar unabhängig davon, ob es sich um eine tagaktive oder um eine nachtaktive Tierart handelt (REITER, 1991, 1993). Der Transport zu den Zellen erfolgt zu 60-70% an Albumin gebunden, die restlichen 30% liegen in freier Form vor (CARDINALI et al., 1972; PARDRIGE und MIETUS, 1980). Melatoninbindungsstellen wurden an Membranen des bovinen mediobasalen Hypothalamus, der Großhirn- und Kleinhirnrinde (CARDINALI et al., 1979; GITLER et al., 1990; FERREIRA et al., 1996), im Zytosol von Rattenhypothalamus, Hippocampus, Striatum und Mittelhirn (NILES et al., 1979), sowie in verschiedenen Gehirnregionen anderer Spezies nachgewiesen (BROWN et al., 1980; NILES et al., 1987). Auch in peripheren Organen wie der Harderschen Drüse (GUERRERO et al., 1994), den primären und sekundären lymphatischen Organen (POON et al., 1994; POON und PANG, 1996; CARDINALI et al., 1996), Herz und Lunge (PANG et al., 1996), dem Gastrointestinaltrakt (CHOW et al. 1996), der Niere (SONG et al., 1995), den Nebennieren (BROWN et al., 1994), der Milchdrüse (CARDINALI et al., 1992), sowie den männlichen und weiblichen Geschlechtsorganen (AYRE und PANG, 1994; SHIU et al., 1996) sind Melatoninbindungsstellen vorhanden.

1.5. Abbau von Melatonin

Der Melatoninabbau im Pinealozyten beginnt mit der Abspaltung einer Acetylgruppe durch das Enzym Melatonindeacetylase woraus 5-Methoxytryptamin entsteht (siehe Abb. 3). 5-Methoxytryptamin kann auch durch direkte Methylierung von Serotonin durch HIOMT (CARDINALI, 1981) gebildet werden. Aus Methoxytryptamin entsteht durch oxidative Desaminierung, die von einer Monoaminoxidase (MAO A) (RAYNAUD und PÉVET, 1991) katalysiert wird, das instabile Zwischenprodukt 5-Methoxyindolacetaldehyd. Dieses wird durch eine Alkoholreduktase bzw. eine Alkoholdehydrogenase zu 5-Methoxytryptophol bzw. zu 5-Methoxyindolessigsäure abgebaut.

Im Gehirn wird Melatonin abgebaut, indem es zunächst zu N-Acetyl-N-Formyl-5-Methoxykynurenamin oxidiert und anschließend die Formylgruppe abgespalten wird. Das Endprodukt ist N-Acetyl-5-Methoxykynurenamin, welches in einer Konzentration von bis zu 15% über den Urin ausgeschieden wird (CARDINALI, 1981).

In der Leber konnte ein rascher Abbau der Melatoninkonzentration gezeigt werden, der mit 92% bis 97% einem Single-pass-Effekt unterliegt (PARDRIDGE und MIETUS, 1980). In den Hepatozyten wird Melatonin zu 6-Hydroxymelatonin hydroxyliert (PARDRIDGE und MIETUS, 1980). Nach Konjugation erscheint Melatonin zu 70-80% als 6-Hydroxymelatoninsulfat und zu 5% als 6-Hydroxymelatoninglucuronid im Urin. Bis zu 1% des Melatonins wird in unveränderter Form und bis zu 0,5% als Methoxyindol-essigsäure (PARDRIDGE und MIETUS, 1980) über den Urin ausgeschieden. Melatonin wird auch nach Demethylierung zu seiner Ausgangssubstanz N-Acetylserotonin konjugiert (LEONE und SILMAN, 1985; YOUNG et al., 1985;) und als N-Acetyl-Serotonin-Glucuronid, sowie N-Acetyl-Serotonin-Sulfat ausgeschieden (LEONE et al., 1987).

1.6. Abbauprodukte von Melatonin

Methoxytryptamin (Abb. 9)

Die Konzentration von 5-Methoxytryptamin ist tagsüber erhöht und hat eine dem Serotonin analoge Tagesrhythmik. (RAYNAUD und PÉVET, 1991). FOOLEY und CAIRNCROSS (1987) wiesen jedoch keinen zirkadianen Rhythmus in Rattenepiphysen

nach. Methoxytryptamin wurde in der Epiphyse von Schaf, Rind und Schwein nachgewiesen, wobei das Schwein eine 10 bzw. 20-fach höhere Methoxytryptamin-Konzentration besaß, als das Rind bzw. das Schaf (BECK et al., 1981).

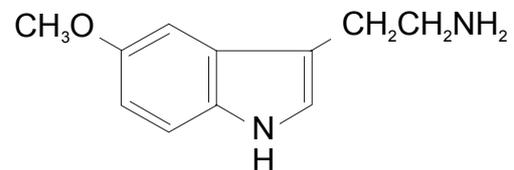


Abb. 9: Strukturformel von Methoxytryptamin

Monoaminoxidase

Durch das Enzym Monoaminoxidase (MAO) wird eine Aminogruppe von Methoxytryptamin abgespalten, woraus das instabile Zwischenprodukt Methoxyindol-acetaldehyd entsteht. In der Epiphyse wurden sowohl MAO Typ-A, als auch Typ-B nachgewiesen, wobei MAO A bei Ratten in den noradrenergen Nervenendigungen lokalisiert ist, während MAO B innerhalb der Pinealzellen auftritt (MASSON-PÉVET und PÉVET, 1989). Methoxytryptamin wird in der Epiphyse und im Plasma von Goldhamstern durch MAO A abgebaut (RAYNAUD und PÉVET, 1991). KING et al. (1982) konnten nach Applikation eines MAO-Inhibitors einen Anstieg der pinealen Melatoninkonzentration infolge der induzierten erhöhten SNAT-Aktivität dokumentieren. In einer Untersuchung über die zirkadiane Rhythmik der MAO A und B, war die Aktivität der MAO A während der Lichtphase erhöht, während die der MAO B einen gegenläufigen Rhythmus zeigte (KAMASE, 1980).

Methoxytryptophol (Abb. 10)

Im Gegensatz zu FOOLEY und CAIRNCROSS (1987) wiesen MEFFORD et al. (1983) in Rattenepiphysen einen zirkadianen Rhythmus mit nächtlichem Konzentrationsrückgang nach. Der Rhythmus dieses Melatoninmetaboliten zeigt einen reziproken Verlauf gegenüber dem des Melatonins. Methoxytryptophol ist in der Epiphyse von Rind, Schaf und Schwein in speziesspezifischen Konzentrationen vorhanden, wobei in Schweinepiphysen nur ca. 1% der beim Rind vorhandenen Konzentration existiert (BECK et al., 1981).

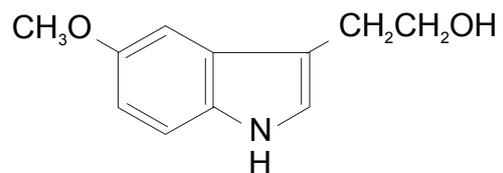


Abb. 10: Strukturformel von Methoxytryptophol

Methoxyindolessigsäure (Abb. 11)

In Rattenepiphysen konnten MEFFORD et al. (1983) und FOOLEY UND CAIRNCROSS (1987) einen zirkadianen Rhythmus nachweisen, der durch einen nächtlichen Konzentrationsrückgang gekennzeichnet ist, und dem Melatoninrhythmus entgegengesetzt verläuft. BECK et al. (1981)

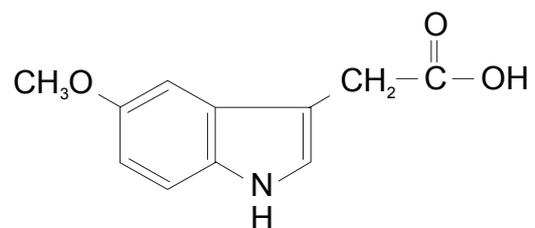


Abb. 11: Strukturformel von Methoxyindolessigsäure

wiesen Methoxyindolessigsäure in den Epiphysen von Schweinen, Rindern und Schafen nach, wobei Schweine eine um mehr als das 10-fache niedrigere Konzentration besaßen als die anderen beiden Spezies.

2. Exogene und Endogene Einflüsse

2.1. Licht

Der wichtigste exogene Einflussfaktor auf die Melatoninsynthese ist das Licht. Unter Anwesenheit von Licht wird die Melatoninsynthese gehemmt, bzw. durch dessen Abwesenheit gefördert. Damit übermittelt die aktuelle Melatoninkonzentration die Information von Tag oder Nacht an die verschiedenen Zielorgane und ermöglicht ein zeitliches Bezugssystem anhand dessen die Stoffwechselfvorgänge abgestimmt werden (MENAHER, 1997).

2.1.1. Einfluss der Jahreszeit

Die sich über den Jahresverlauf ändernde Nachtlänge verursacht Änderungen in der Dauer der Melatoninsekretion, die im Winter länger, und im Sommer kürzer ist. Diese Veränderungen der nächtlichen Sekretionsdauer steuern jahreszeitliche Änderungen im Verhalten und in der Physiologie vieler Tiere. Dazu zählen z.B. die Fortpflanzung, Jungtieraufzucht, Winterschlaf und Zugverhalten (WEHR, 1997).

TAST et al. (2001,a) untersuchten Wildschweine und Hausschweine auf Gemeinsamkeiten des jahreszeitlichen Melatoninprofils und stellten fest, dass beide Arten sowohl ein Tag/Nachtprofil der Melatoninsekretion aufwiesen, als auch, dass die Melatoninsekretion einem Jahresrhythmus unterlag: Die Dauer der erhöhten nächtlichen Melatoninsekretion korreliert sowohl beim Wild- als auch beim Hausschwein mit der jahreszeitlich beeinflussten Nachtlänge, und zeigt bei beiden Arten signifikante Unterschiede zwischen Sommer und Winter. Auch ERIKSON et al. (1998) konnten einen Einfluss der Jahreszeit auf die Melatoninkonzentration in Milch- und Serumproben laktierender Kühe nachweisen.

2.1.2. Einfluss der Tageslänge

Der durch das Licht gesteuerte 24-Stunden Rhythmus der Melatoninkonzentration enthält wichtige chemische Informationen über Sonnenaufgang und Sonnenuntergang für die Organe (REITER, 1993; MENAKER, 1997). Anhand der aktuellen Melatoninkonzentration kann damit sowohl zwischen „Tag“ (niedrige Melatoninkonzentration), und „Nacht“ (hohe Melatoninkonzentration) unterschieden werden, als auch anhand der auftretenden Konzentrationsänderungen zwischen „Abend“ (steigende Melatoninkonzentration) und „Morgen“ (sinkende Melatoninkonzentration) (REITER, 1993).

ANDERSSON et al. (2000) wiesen bei Jungebern unter natürlichen Lichtverhältnissen bei einer Gesamttageslänge von 17-18 Stunden zirkadiane Plasmamelatoninprofile mit nächtlichem Konzentrationsanstieg nach. Unter natürlichen Lichtverhältnissen erfolgte der Anstieg der Melatoninkonzentration nur während der Dunkelheit, d.h. der nächtliche Anstieg trat erst nach dem Ende der Lichtphase sowie nach Sonnenuntergang auf, und endet vor der Morgendämmerung und vor Beginn der Lichtphase. Eine Studie über den Einfluss kontinuierlicher (LL, DD) und diskontinuierlicher (LD 14:10) Helligkeit und Dunkelheit auf Funktion und Morphologie der Epiphyse des Hausschweins von LEWCZUK und PRZYBYLSKA-GORNOWICZ (2000) führte zu dem Ergebnis, dass sowohl bei kontinuierlicher Dunkelheit, als auch bei Tag-Nacht-Lichtregime ein charakteristisches Melatoninprofil mit nächtlicher Maximalsekretion auftrat, jedoch unter kontinuierlicher Helligkeit keine signifikanten tageszeitabhängigen Veränderungen nachweisbar waren. Die Autoren werten dies als Hinweis darauf, dass das Melatoninprofil endogenen Ursprungs ist und vom umweltbedingten exogenen Lichtreiz modelliert wird. Auch MCCONNELL und ELLENDORF (1987) untersuchten die Melatoninprofile adulter weiblicher Schweine unter verschiedenen Lichtregimes und konnten ausschließlich unter äquatorialen Lichtverhältnissen (LD 12:12), nicht jedoch bei Langtag- (LD 16:8) oder Kurztag- (LD 8:16) Lichtbedingungen einen nächtlichen Anstieg der Plasmamelatoninkonzentrationen nachweisen. In einer Untersuchung von GREEN et al. (1996) wurde gezeigt, dass der nächtliche Melatoninkonzentrationsanstieg bei juvenilen sowie adulten weiblichen Schweinen unter äquatorialen Lichtverhältnissen größer war als bei abnehmender Nachtlänge, jedoch kleiner als bei zunehmender Nachtlänge. Somit korrelierte die Dauer der erhöhten Melatoninkonzentration positiv mit der Nachtlänge.

2.1.3. Einfluss der Lichtintensität

Die Lichtintensität hat eine wichtige Bedeutung für die Übermittlung der Tageszeit, da eine ausreichende Lichtenergie auf die Retina treffen muss, um eine Unterdrückung der Melatoninsynthese zu bewirken (AOKI et al., 1998). Die dafür erforderliche Mindestlichtintensität unterscheidet sich zwischen tag- und nachtaktiven Spezies und beträgt z.B. beim Syrischen Hamster weniger als 1 Lux (BRAINARD et al., 1982), während bei tagaktiven Erdhörnchen normales Laborlicht keine Suppression der nächtlichen Melatoninkonzentration auslösen konnte (REITER et al., 1982). Bei Hamstern (TAMARKIN et al., 1979), Schafen (ROLLAG und NISWENDER, 1976) und Affen (PERLOW et al., 1980) war eine Lichtintensität von 500 bis 600 Lux ausreichend, um die Melatoninsekretion zu unterdrücken. Hingegen konnten LEWY et al. (1980) zeigen, dass beim Menschen erst eine Lichtintensität von 2500 Lux ausreicht, die Plasmamelatoninkonzentration zu supprimieren. In einer weiteren Studie von AOKI et al. (1998) am Menschen konnte eine negative Korrelation zwischen der Lichtexpositionsdauer und der zur Suppression der Speichelmelatoninkonzentration erforderlichen Lichtintensität festgestellt werden. Zwei an Schweinen durchgeführte Studien konnten zeigen, dass für diese Tierart eine relativ hohe Lichtintensität notwendig ist, um zwischen Tag und Nacht unterscheiden zu können. GRIFFITH und MINTON (1992) fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass 113 Lux im Gegensatz zu 1783 Lux nicht ausreichend waren, um einen Melatoninrhythmus auszulösen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen MACK und UNSHELM (1997), die nur bei 1300 Lux, nicht jedoch bei 50 Lux eine Suppression der Melatoninsynthese nachweisen konnten. Hingegen konnten TAST et al. (2001,b) bei Schweinen keine Unterschiede der Melatoninkonzentrationen zwischen 40 Lux, 200 Lux und 10 000 Lux feststellen. Die Autoren schließen aus den Ergebnissen, dass ab einem Schwellenwert der Lichtintensität, der bei maximal 40 Lux liegt, ein Melatoninrhythmus bei Schweinen existiert, und dieser auch bei steigender Lichtintensität keine größere Amplitude aufweist. Auch in einer Studie von DIEKMANN und GREEN (1997) unterschieden sich die Melatoninprofile weiblicher Schweine nicht zwischen den Lichtintensitäten von 700 Lux und 50 000 Lux.

2.1.4. Einfluss der Lichtqualität

Der Einfluss der Lichtqualität auf die Melatoninsynthese ist noch nicht ausreichend geklärt. DIEKMAN und GREEN (1997) wiesen bei dem Vergleich der Melatoninkonzentrationen juveniler und adulter weiblicher Schweine, die entweder unter Kunstlichtbedingungen oder unter Freilandbedingungen gehalten wurden, keine Unterschiede hinsichtlich der Wirkung der Lichtqualität auf das Melatoninprofil nach. CARDINALI et al. (1972) untersuchten die spektrale Lichtwirkung verschiedener Lichtquellen auf die Unterdrückung der HIOMT-Aktivität in der Epiphyse bei Ratten. Grünes ($\lambda=530$ nm), blaues ($\lambda=435$ nm) sowie gelbes ($\lambda=590$ nm) Licht bewirkte die am stärksten ausgeprägte Suppression der pinealen HIOMT-Aktivität, während rotes Licht ($\lambda=660$ nm) keine negativen Auswirkungen zeigte, und das UV-Licht die Enzymaktivität stimulierte. Weißes Kaltlicht bewirkte eine stärkere Enzymsuppression als eine Lichtquelle mit einem dem Sonnenlicht ähnlichen Spektrum. Eine Untersuchung von HONMA et al. (1992) zeigte einen Einfluss der Lichtqualität auf die lichtinduzierte nächtliche Melatoninsuppression bei Ratten und stellte fest, dass der pineale sowie der plasmatische Konzentrationsrückgang sowohl von der Wellenlänge als auch von dem Zeitpunkt der nächtlichen Lichtexposition abhängig war. Grünes Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm erwies sich zu beiden Messzeitpunkten als stärker supprimierend auf die pineale und die Plasmamelatoninkonzentration als rotes Licht mit einer Wellenlänge von 660 nm. Rotes Licht wirkte um 4 Uhr stärker supprimierend als um 24 Uhr, wo es die Plasmamelatoninkonzentration nicht beeinflusste und die pineale Konzentration nur vorübergehend sank.

2.2. Weitere Einflussfaktoren

2.2.1. Einfluss des Geschlechts

Geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Existenz einer Melatoninrhythmik konnten bislang in keiner Studie nachgewiesen werden. In den Studien von ANDERSSON et al. (2000) und ANDERSSON (2001) konnten bei Ebern ebenso ein Melatoninprofil gefunden werden, wie in den Untersuchungen von MCCONNELL und ELLENDORFF (1987), BOLLINGER et al. (1997), DIEKMAN und GREEN (1997), TAST et al. (2001b) und ANDERSSON (2001) an weiblichen Schweinen. ANDERSSON (2001) konnte bei geschlechtsreifen Ebern jedoch signifikant höhere

Melatoninkonzentrationen sowohl während des Tages, als auch während der Nacht feststellen, als bei weiblichen juvenilen oder adulten Tieren. Zwischen männlichen und weiblichen Ferkeln bestanden dagegen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (ANDERSSON, 2001). Auch unterschieden sich weibliche geschlechtsreife Schweine in ihrem Melatoninspiegel nicht von weiblichen juvenilen Schweinen (DIEKMAN und GREEN, 1997; ANDERSSON, 2001). Nach DIEKMAN und GREEN (1997) schienen Sexualhormone keinen Einfluss auf die Melatoninsekretion bei Schweinen zu haben. In Untersuchungen an kastrierten männlichen Schweinen konnten GRIFFITH und MINTON (1992) sowie GREEN et al. (1999) ebenfalls Melatoninprofile feststellen. Zwischen den Kastraten und den weiblichen Tieren bestanden keine Unterschiede (GREEN et al., 1999). Im Gegensatz dazu konnten HERNANDEZ et al. (1990) in einem Experiment an männlichen Ratten zeigen, dass die pineale Melatoninkonzentration nach Kastration der Versuchsgruppe geringer war, und der in der Kontrollgruppe vorhandene nächtliche Konzentrationsanstieg fehlte. Des weiteren entfiel nach der Kastration der in der Kontrollgruppe vorhandene Tag/Nachtrhythmus mit nokturnalem Anstieg der pinealen NoradrenalinKonzentration sowie der pinealen Tyrosinhydroxylaseaktivität.

2.2.2. Einfluss des Alters

GREEN et al. (1999) untersuchten weibliche Jungschweine und Kastraten im Alter von 3, 4, 5 und 6 Monaten und konnte in allen Altersgruppen einen nächtlichen Konzentrationsanstieg zeigen. Darüber hinaus war der Prozentsatz der Tiere, die einen nächtlichen Konzentrationsanstieg aufwiesen, im Alter von drei Monaten am größten. Die Melatoninkonzentration stieg zwischen dem 3. und dem 5. Lebensmonat an, und sank im 6. Monat wieder ab. ANDERSSON (2001) stellte in einer Untersuchung der Melatoninkonzentrationen von Ferkeln verschiedener Muttertiere keine Korrelation zwischen dem Trend eines altersabhängigen Konzentrationsanstiegs oder eines Konzentrationsrückgangs fest.

2.2.3. Genetischer Einfluss

ANDERSSON et al. (2000) konnten bei dem Vergleich des Ausmaßes des nächtlichen Melatoninanstiegs im Plasma von Jungebern einen genetischen Einfluss des Vatertieres nachweisen. Die von drei Ebern abstammenden Versuchstiere aus insgesamt sechs Würfen zeigten hinsichtlich der während der Lichtphase messbaren

Melatoninkonzentrationen keinen Unterschied, jedoch wiesen die Plasmaproben bezüglich der nächtlichen Konzentrationsmaxima jedoch einen signifikanten Einfluss des Vatertiers auf. Die großen individuelle Schwankungen im Melatoninprofil der Schweine wurden auf genetische Faktoren mit dem Einfluss des Ebers zurückgeführt. In einer weiteren Studie (ANDERSSON, 2001) an Ferkeln verschiedener Würfe von zwei Ebern war der Effekt des Vatertieres nicht signifikant, während zwischen der nächtlichen Melatoninkonzentration der Ferkel und des Muttertieres eine signifikante Korrelation bestand, und sich die nächtlichen Melatoninkonzentrationen der Ferkel zwischen den verschiedenen Würfen unterschieden. COON et al. (1999) wiesen auch bei Lämmern einen genetischen Einfluss auf das Pinealgewicht, und die damit korrelierende Plasmamelatoninkonzentration nach. Sie zeigten, dass diejenigen Lämmer, deren Elterntiere eine extrem hohe bzw. niedrige Plasmamelatoninkonzentration aufwiesen, eine den Elterntieren entsprechende Plasmamelatoninkonzentration zeigten, die ihrerseits in direktem Zusammenhang mit der Größe und dem Gewicht der Epiphyse stand.

2.2.4. Einfluss von Stress

Neben dem Licht können alle Manipulationen, die mit einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems verbunden sind, den lichtinduzierten inhibierenden Effekt aufheben, und dadurch die Melatoninsynthese stimulieren, wobei hier wahrscheinlich die Catecholamine von Bedeutung sind (Cardinali, 1981). FUNK und AMIR (1999) konnten im Anschluss an eine negative Konditionierung von Ratten das Ausbleiben des erwarteten nächtlichen Anstiegs der Melatoninkonzentration beobachten, da die Melatoninkonzentration während der Tagphase bereits den Nachtwerten entsprach. Bei Ratten, die verschiedenen Stressoren ausgesetzt wurden (Lärm, Eiswasser, fremde Umgebung, Ether), erfolgte durch eine adrenerge Stimulation der Melatoninsynthese ein Anstieg der Melatoninkonzentration innerhalb von 30 Minuten (SEGGIE et al., 1985). PERISSIN et al. (1993) dokumentierten bei weiblichen Mäusen, die in einem Rotationsexperiment der räumlichen Desorientierung ausgesetzt wurden, einen signifikanten Anstieg der nächtlichen Melatoninexkretion über den Urin. In einer Studie von ANDERSSON (2001) wurde die Melatoninkonzentration von Schweinen unterschiedlichen Alters und Geschlechts bestimmt, denen durch Zwangsmaßnahmen fixiert, wiederholt Blut aus der V. jugularis entnommen wurde. Der mit diesen Zwangsmaßnahmen verbundene Stress

zeigte keine negativen Auswirkungen auf die konsekutiven Melatoninkonzentrationen. Eine Untersuchung von ROSOCHACKI et al. (2000) zeigte dagegen einen rassespezifischen Unterschied im Anstieg der Catecholaminkonzentration bei der Immobilisierung von Schweinen. Dabei wiesen Tiere der Rasse Piétrain höhere Konzentrationen der Catecholamine (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin) auf als Tiere der Rasse Duroc.

2.2.5. Einfluss der Nahrungsaufnahme

Die tägliche Futtermittelaufnahme könnte ein wichtiger externer Zeitgeber für den zirkadianen Rhythmus sein (INGRAM und DAUNCEY 1985). SELMAOUI et al. (2001) untersuchten einen Zusammenhang zwischen Futterzusammensetzung, Futterverfügbarkeit, zirkadianem Melatoninrhythmus und pinealer NAT-Aktivität. Dabei lies sich dokumentieren, dass bei Ratten mit der Wahlmöglichkeit zwischen verschiedenen Futterzusammensetzungen, die Serummelatoninkonzentration und die Enzymaktivität bei limitiertem Futterzugang signifikant niedriger war als bei freiem Futterzugang (ad libitum). Bei Ratten, die keine Wahlmöglichkeit hatten, führte die zeitliche Futterverfügbarkeit zu keiner Änderung der Melatoninkonzentration und Enzymaktivität. Ebenso konnte in einer Studie am Menschen gezeigt werden, dass nach einer Mahlzeit die Plasmakonzentration der Catecholamine Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Cortisol anstiegen (KNOLL et al., 1984).

3. Nachweismethoden für Melatonin

Melatonin lässt sich aus biologischen Untersuchungsmaterialien auf physikalisch-chemischer (Chromatographie) oder auf immunologischer Basis (RIA, ELISA) nachweisen.

3.1. Chromatographie

Die Chromatographie basiert auf dem Vergleich der physikalisch-chemischen Eigenschaften einer unbekannt Substanz oder Probe mit jenen einer oder mehrerer bekannter, definierter Referenzsubstanzen unter ebenfalls definierten chromatographischen Verhältnissen. Die Identität einer Substanz wird durch den

zeitgleichen Nachweis mit seiner Referenzsubstanz und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bestätigt. Für den chromatographischen Melatoninnachweis gibt es drei verschiedene Methoden: 1. Festphasenchromatographie (BALEMANS et al., 1983), 2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), 3. Gaschromatographie (BECK et al., 1981; DUBBELS et al., 1995).

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Mittels HPLC bestimmten YOUNG und ANDERSON (1982) die pinealen Tagesrhythmen von Tryptophan, Serotonin, Melatonin, Hydroxytryptophol und Hydroxyindol-essigsäure von Ratten mit Fluoreszenzdetektion sowie Amperometrie bei einem Detektionslimit von $<0,1$ ng/Pinealorgan. MEFFORD et al. (1983) wiesen oxidative und acetylierte Serotoninmetaboliten (u.a. Melatonin) in Pinealorganen von Ratten mit HPLC und elektrochemischer Detektion bei einem Detektionslimit von 5 bis 10 pg pro Pinealorgan nach. In einer Untersuchung von GRADY et al. (1984) wurden die Konzentrationen der pinealen Indole in der Zirbeldrüse der Haustaube (*Columba livia*) mit HPLC und elektrochemischer Detektion bestimmt. Anhand HPLC und elektrochemischer Detektion wiesen RAYNAUD et al. (1993) Melatonin und 6-Hydroxmelatonin aus Plasmaproben von Ratten mit einem Detektionslimit von 10 pg nach. In verschiedenen Organen weiblicher Grillen (*Gyrillus bimaculatus*) analysierten ITOH et al. (1995) Tag-Nachtunterschiede der Melatoninkonzentration über ein HPLC-System mit Fluoreszenz-Detektion. HATTORI et al (1995) bestimmten die Melatoninkonzentrationen in Pflanzen mit Reversed-Phase-HPLC und Fluoreszenzdetektion. Auch MANCHESTER (2000) untersuchte die Melatoninkonzentrationen in verschiedenen Saaten über HPLC mit elektrochemischer Detektion. Eine Untersuchung von CONTI und MAESTRONI (1996) bestimmte die zirkadiane Melatoninproduktion bei verschiedenen Inzucht-Mäusestämmen über HPLC mit elektrochemischer Detektion. BRANDSTÄTTER et al. (2001) bestimmten die Melatoninkonzentration über HPLC und elektrochemischer Detektion beim Haussperling (*Passer domesticus*). Eine Studie von BERTOLUCCI et al. (2003) untersuchte die pineale Melatoninproduktion mittels der HPLC und elektrochemischer Detektion bei einem Detektionslimit von 200 fm an Eidechsen (*Podarcis sicula*). Die HPLC-Methode war auch zum Nachweis der Enzyme Aromatische L-Aminosäuren Decarboxylase (JOHNSTON et al., 1984), Serotonin-N-

Acetyltransferase (THOMAS et al., 1990) und Monoaminoxidase (RAYNAUD und PÉVET, 1991) geeignet.

3.2. Radioimmunoassay

Radioimmunoassays (RIA) basieren auf radioaktiv markierten, heterologen (speziesfremden) Antikörpern, welche an Melatonin binden und es somit nachweisbar machen. VAKKURI (1985) bestimmte die Melatoninkonzentration aus menschlichem Speichel über einen durch HPLC validierten RIA und wies eine zirkadiane Melatoninrhythmik in Speichelproben nach. Auch MCINTYRE et al. (1987) zeigten zirkadiane Melatoninrhythmen in gepaarten Blut- und Speichelproben freiwilliger Testpersonen mittels RIA, und verwiesen in diesem Zusammenhang explizit auf die Auswirkungen einer der Probenahme voraus gegangenen Nahrungsaufnahme durch mögliche Interaktionen zwischen dem RIA-Antikörper und verbliebenen Speiseresten. In einer anderen Studie stellten ILLNEROVA et al. (1993) einen zirkadianen Melatoninrhythmus in menschlicher Muttermilch mit einem direkten RIA fest. Die Spezifität dieses RIAs wurde durch eine Gas-Chromatographie-Massenspektroskopie (GCMS) Methode validiert. Die Evaluierung zweier RIA-Methoden, die bis dato in zahlreichen Untersuchungen an Schweinen verwendet worden waren, und der Vergleich dieser Ergebnisse mit jenen durch GCMS anhand Parallelbestimmung durch KLUPIEC et al. (1997) offenbarte massive Diskrepanzen in den Melatoninkonzentrationen. Das insbesondere in älteren Studien verwendete Guildhay[®]-Antimelatonin-Antiserum, welches aus gegen N-Acetyl-Methoxytryptophan immunisierten Schafen gewonnen wurde, ist bei Schweinen nicht zur Melatoninbestimmung geeignet, da dieser RIA keine ausreichende Spezifität für Melatonin besitzt und dadurch zu falsch-positiven Ergebnissen mit massiver Überbewertung der tatsächlich vorliegenden Melatoninkonzentration führt. In einigen anderen Studien an Schweinen wurde das G280-Antimelatonin-Antiserum verwendet (McCONNELL und ELLENDORF, 1987; ANDERSSON, 2000; ANDERSSON et al., 2001; TAST et al., 2001a,b,c). Das G280-Kennaway Antimelatonin-Antiserum wies keine derartig großen Diskrepanzen zur GCMS auf (KLUPIEC et al., 1997).

Während sich das Kennaway-G280-Antimelatonin-Antiserum (Bühlmann Laboratories AG, Schweiz) laut ANDERSSON (2000) aufgrund ausreichender Sensitivität als geeignet zur Melatoninbestimmung aus Schweineplasma erwies, und mit Hilfe dieses Assays ein zirkadianes Melatoninprofil mit niedrigen oder nicht

nachweisbaren Tageskonzentrationen und hohen Nachtkonzentrationen erkennbar war, lieferte ein zweiter Assay, welcher auf Antimelatonin-Antiserum von gegen Melatonin immunisierten Kaninchen basiert (Nichols Institute Diagnostics BV, Niederlande) keine ausreichende Sensitivität mit zu hohen Melatoninkonzentrationen während der Lichtphase und unspezifischen Reaktionen, die das Melatoninprofil maskierten. Als mögliche Ursache wurde eine unspezifische Bindung an Plasmaproteine wie z.B. Albumin genannt (ANDERSSON, 2000).

III. Material und Methoden

1. Tiere und Haltungsbedingungen

Der Tierversuch wurde unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-62/02 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt, und am Institut für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät der LMU München durchgeführt (August bis Oktober 2002).

Die Schweine wurden als institutseigene Nachzucht geboren. Bei den Elterntieren handelt es sich um eine Sau der Zweirassen-Kreuzung Deutsches Edelschwein und Piétrain, das Vatertier war ein Piétrain-Eber. Die männlichen Ferkel wurden innerhalb der ersten Lebenswoche kastriert. Bis zu ihrem 29. Lebenstag blieben die Ferkel beim Muttertier, anschließend wurden die Tiere vom Muttertier getrennt und bis zu ihrem 75. Lebenstag in Gruppenhaltung mit Stroheinstreu auf einer Grundfläche von 15,0 m² im Versuchsabteil untergebracht. Danach wurden sechs männliche und sechs weibliche Wurfgeschwister zufällig ausgewählt und in Einzelbuchten mit einer Grundfläche von 5,0 m² ohne Einstreumaterial mit Gummiliegematten gehalten. Die Stalltemperatur betrug 20°± 2°C. Die Reinigung der Buchten erfolgte täglich zwischen 9.30 Uhr und 11.30 Uhr.

Das den Tieren angebotene Futter wurde vom Lehr- und Versuchsgut der tierärztlichen Fakultät (LMU) in Oberschleißheim (Deutschland) hergestellt und bezogen. Die Tiere erhielten bereits vor dem Zeitpunkt des Absetzens, sowie nach dem Absetzen bis zum 61. Lebenstag Ferkelstarter über einen Futterautomaten. Vom 61. bis zum 75. Lebenstag erhielten die Tiere das Adultfutter (LAK; Tab. 1) über den Futterautomaten. Ab dem Zeitpunkt der Einzelhaltung wurden die Tiere zweimal täglich um 9.00 Uhr und 17.00 Uhr einzeln mit je 1,0 kg Futter pro Mahlzeit gefüttert. Futterreste wurden nach 20 min vollständig entfernt. Anschließend wurde den Tieren das Maul mit lauwarmem Leitungswasser mittels 20 ml-Einwegspritzen ausgespült, sowie Maulspalte, Kinn, Backenregion und Rüsselscheibe mit Hilfe eines feuchten Schwammes gereinigt. Die Schweine hatten außerhalb der Probenentnahmezeiten stets freien Zugang zu Trinkwasser über Nippeltränken.

Tab. 1:
Zusammensetzung
des Futtermittels
LAK

Inhaltsstoffe	Anteil in %
Weizen	56,5
Soja	16,0
Gerste	13,0
Hafer	10,0
Mineral salvana Premium	3,5
Sojaöl	1,0

2. Versuchsaufbau

2.1. Lichtprogramm

Um den Einfluss des natürlichen Tag/Nacht-Wechsels und des Sonnenlichts auf die Melatoninrhythmik zu verhindern, wurden die Fensterscheiben mit lichtundurchlässiger schwarzer Plastikfolie abgedunkelt. Während der zwölfstündigen Tagphase von 8.00 bis 20.00 Uhr wurde der Stall mittels Leuchtstoffröhren beleuchtet. In einer Stallhälfte wurden die Buchten mittels Leuchtstofflampen (L36W25 Universal-Weiß) und einer Lichtintensität von 470 Lux beleuchtet. In der anderen Stallhälfte kamen Leuchtstofflampen (L36W72 Biolux®, Osram) mit einer Lichtintensität von 250 Lux zum Einsatz. Von 20.00 bis 8.00 Uhr stand den Tieren ein Orientierungslicht von maximal 1,0 Lux zur Verfügung, das auch während der Tagphase in Dauerbetrieb blieb.

2.2. Stallbelegung

Abb. 12: Belegung des Stalles während des Versuches

470 Lux		250 Lux	
Schwein Nr. 356, w	Futtergang	Schwein Nr. 359, mk	Eingang
Schwein Nr. 348, mk		Schwein Nr. 358, w	
Schwein Nr. 357, w		Schwein Nr. 354, mk	
Schwein Nr. 352, mk		Schwein Nr. 351, w	
Schwein Nr. 350, w		Schwein Nr. 353, mk	
Schwein Nr. 361, mk		Schwein Nr. 349, w	

Abkürzungen: mk = männlich-kastriert; w = weiblich

2.3. Trainingsphase

Ab dem 61. Lebenstag wurden die Tiere spielerisch an die Speichelproben-gewinnung gewöhnt, indem die Tiere Gelegenheit hatten, die angebotenen Wattetupfer (Zefa, Deutschland) zu untersuchen und zu zerkauen. Ab dem 75. Lebenstag wurden die Tiere an das Procedere des Maulspülens gewöhnt, indem das Maul spielerisch mit steigenden Mengen (20 bis 100 ml) lauwarmen Leitungswassers (ca. 28°C) mittels 20 ml-Einwegspritzen ausgespült und gereinigt wurde. Die Akzeptanz des Maulspülens war bei allen Probanden sehr hoch und wurde innerhalb von 24 Stunden toleriert. Die Reinigung von Maulspalte, Kinn, Backenregion und Rüsselscheibe mit Hilfe eines feuchten Schwammes wurde ab dem 77. Lebenstag trainiert.

2.4. Legen des zentralvenösen Gefäßzugangs zur Vena jugularis

Um eine häufige und stressarme Blutentnahme zu ermöglichen, wurde den 12 Versuchstieren in Narkose ein zentraler Venenverweilkatheter in die *V. jugularis* gelegt. Das Katheterende wurde im Nacken in eine aus Leukoplast[®] (Beiersdorf, Deutschland) gebildete Tasche gelegt und an der Haut angenäht. Der operative Eingriff wurde freundlicherweise durch Prof. W. Erhardt (TU-München, Klinikum rechts der Isar, Abteilung für Experimentelle Chirurgie) durchgeführt. Präoperativ erfolgte ein 24-stündiger Futterentzug, Trinkwasser stand den Tieren stets uneingeschränkt zur Verfügung.

Die Tiere erhielten eine Neuroleptanästhesie aus Azaperon (2,6 mg/kg; Stresnil[®] Janssen, Deutschland); Ketamin (20 mg/kg; Ursotamin[®], Serumwerk-Bernburg, Deutschland) und Thiamylal (7 mg/kg; Surital[®], Parke-Davis, Deutschland). Postoperativ wurden die Tiere analgetisch versorgt (25 mg/kg Metamizol; Vetalgin[®] Intervet, Deutschland) und intensiv überwacht. In den anschließenden 24 Stunden wurden Rotlicht-Wärmelampen eingesetzt und alle Tiere einmalig antibiotisch versorgt (2,8 mg/kg Enrofloxacin; Baytril[®] 10%, Bayer, Deutschland).

3. Versuchsdurchführung

3.1. Gewinnung der Speichelproben

Die Speichelproben wurden an zwei Tagen über je 24 Stunden entnommen. Zwischen den beiden Untersuchungstagen lag eine 24-stündige Ruhepause ohne

Probenentnahme. Die Probengewinnung erfolgte ab 7.00 Uhr in dreistündigen Intervallen; während der Tagphase um 10.00, 13.00, 16.00 und 19.00 Uhr, und während der Nachtphase um 22.00, 1.00, 4.00 und 7.00 Uhr des darauf folgenden Tages. Jeweils 30 min vor Beginn der Probennahme wurde die Tränkeanlage abgeschaltet und das Restwasser aus den Leitungen entfernt. Unmittelbar vor Entnahme der Speichelproben wurden Rüsselscheibe, Maulspalte, Kinn- und Backenregion der Tiere erneut mit einem feuchten Schwamm gereinigt. Pro Tier und Zeitpunkt wurden vier Speicheltupfer verwendet. Die Tupfer wurden nach der Probengewinnung in stempellose Einwegspritzen gegeben und in Plastikröhrchen lichtgeschützt in einer Tiefkühlbox (0° bis 4°C) eisgekühlt. Im direkten Anschluss an die Probengewinnung erhielt jedes Tier 20 ml Wasser mittels Einwegspritzen. Die Proben wurden innerhalb von 30 bis 40 min nach ihrer Entnahme zentrifugiert (10 min., 5422 x g, Variofuge® 3.2 RS, Heraeus Sepatech). Die zentrifugierten Proben der Einzeltiere wurden makroskopisch auf Verunreinigungen untersucht, und in Portionen von je 250 µl in 1,5 ml „Original eppendorf® safe-lock cups“ bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.2. Gewinnung der Blutproben

Die Entnahme der Blutproben erfolgte aus dem zentralen Venenverweilkatheter (Cavatheter®, Fresenius, Deutschland) der *Vena jugularis* mittels Monovetten® zur Plasmagewinnung (Sicherheits-Monovetten® zur Plasmagewinnung mit Lithium-Heparin, Sarstedt). Vor der Blutentnahme wurde der Katheter mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült und auf seine Durchgängigkeit geprüft. Anschließend wurden 5 ml Blut aspiriert und verworfen, danach erfolgte die Entnahme der Blutprobe von 9 ml. Die Blutproben wurden lichtgeschützt in einer Tiefkühlbox (0° bis 4°C) aufbewahrt. Die Zentrifugation und weitere Verarbeitung erfolgte gemeinsam mit den Speichelproben 30 bis 40 min nach der Entnahme (10 min., 5422 x g, Variofuge® 3.2 RS, Heraeus Sepatech). Die Plasmaproben wurden in Portionen von je 250 µl in 2,0 ml „Original eppendorf® safe-lock cups“ pipettiert und zusammen mit den Speichelproben bei -80°C gelagert.

4. HPLC-Analyse

Nach dem lichtgeschützten Auftauen der Proben bei 4° bis 8°C erfolgte zunächst die Extraktion von Melatonin nach der Methode von SIDIQ (2001) in modifizierter Form.

4.1. Melatoninextraktion

Zusammenfassende Darstellung der Extraktion von Melatonin aus Plasma und Speichel:

1. 200 µl 0,1M Natrium-Acetatpuffer (pH 4,0) in Glasvials (Neolab, Deutschland) pipettieren
2. 200 µl Plasma (oder Speichel), bzw. je 50 µl Methoxyindol-Standard oder Aqua bidest. zugeben
3. Glasvials locker mit Alufolie und Bördel-Kappen (Neolab, Deutschland) verschließen
4. 15 min bei 1200 U/min mischen (IKA Vortex-Maschine)
5. 500 µl reinstes Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) mittels Pfeilpipette (Gilson, Frankreich) zufügen
6. Glasvials mit Alufolie und Bördel-Kappen (Neolab, Deutschland) fest verschließen (Verschlusszange)
7. Proben 30 min bei 1200 U/min mischen (IKA Vortex-Maschine)
8. Proben 15 min zentrifugieren (13371 x g, 6°C, eppendorf® Centrifuge 5810 R)
9. Glasvials öffnen (Öffnungszange) und gesamte organische Phase mittels Pfeilpipette (Gilson, Frankreich) in neue Glasvials (Neolab, Deutschland) abpipettieren (Volumina notieren)
10. Proben für mindestens 3,5 h mittels Wasserstrahlpumpe im Exsikkator evaporieren
11. Pellets in je 200 µl 20 %-igem Acetonitril (Baker HPLC-analyzed, Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande) rekonstituieren
12. Glasvials locker mit Alufolie und Bördel-Kappen (Neolab, Deutschland) verschließen
13. Proben 5 min bei 1200 U/min mischen (IKA Vortex-Maschine)
14. Proben in Injektionsvials (Abimed, Deutschland) umpipettieren
15. Proben bis zur Melatoninmessung bei -80°C lagern

Herstellung der Methoxyindol-Standards

Zur Identifizierung von Melatonin wurden Methoxyindol-Standards hergestellt, die je 1,0 mg MT, MIAA, MTOL und Melatonin (MEL) (Sigma) gelöst in 1 ml Methanol (Baker HPLC-Analyzed, Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande) enthielten. Die Ausgangskonzentration von 1,0 mg/ml wurde mit Aqua bidest. auf eine Konzentration von 10 ng/ml und mit Fluoreszenz-Eluent auf 1 ng/ml verdünnt. Die Messung der Referenzsubstanzen erfolgte sowohl nach Extraktion, als auch in nicht extrahiertem Zustand als externe Standards.

Melatoninextraktion aus Futterproben

Aus dem während der Versuchsphase verfütterten Schweinefutter wurde eine Futtermittelprobe von 1,0 kg entnommen. Zur Extraktion wurden daraus 50 g zermahlen. Die Einwaage zur Extraktion betrug 20 mg, 50 mg, 100 mg und 200 mg. Die Chemikalienvolumina wurden entsprechend erhöht (Tab. 2). Die Extraktionsschritte erfolgten nach demselben Schema wie die zur Extraktion aus Plasma- oder Speichelproben, die Proben wurden nach der Rekonstitution in Acetonitril erneut zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert.

Tab. 2: Volumina der Futterproben und der verwendeten Chemikalien

Futterproben (mg)	20	50	100	200	500	1000
Na-Acetat-Puffer (µl)	200	200	200	400	1000	1000
Chloroform (ml)	0,5	1,25	2,5	5	12,5	25

Nach der Evaporation wurden die Proben in 400 µl Acetonitril rekonstituiert. Davon wurden 200 µl injiziert, die restlichen 200 µl wurden bei -80°C tiefgefroren und in einem Folgeexperiment in zwei Verdünnungsstufen (1:1 und 1:5) mit 20 %-igem Acetonitril erneut gemessen.

Herstellung weiterer externer Standards unter Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel

Zur Identifizierung der zahlreichen im Schweinespeichel auftretenden Peaks, die teilweise einen zirkadianen oder infradianen Konzentrationsverlauf aufwiesen,

wurden die verfügbaren Chemikalien der im Melatoninstoffwechsel auftretenden Vorstufen sowie Melatonin- und Serotonin-Metaboliten und die in physiologischen Systemen nicht auftretenden Substanzen 6-Methoxyindol und 5-Methoxy-2-Methyl-3-Indol-Acetic-Acid bezogen (Sigma). Je 1,0 mg der Referenzsubstanzen wurden in 1,5 ml eppendorf®-cups eingewogen und in Abhängigkeit ihrer Löslichkeit in 1,0 ml Methanol (MEL, MMIAA, MIAA, MID, MT, MTOL, NAS, HIAA, HT, HTOL), bzw. in 1,0 ml 1,0 N Salzsäure (MTP, HTP) oder in 1,0 ml 5 M Natronlauge (HMEL) gelöst. Die Ausgangskonzentration von 1,0 mg/ml wurde mit Aqua bidest. auf eine Konzentration von 10 ng/ml und mit Fluoreszenz-Eluent auf 1 ng/ml verdünnt. Die Messung der externen Referenzsubstanzen erfolgte ohne vorherige Extraktion als Doppelbestimmung von je 2 x 500 µl unter identischen chromatographischen Bedingungen wie die einer mitlaufenden extrahierten Speichelprobe eines Schweines (Zeitpunkt der Probengewinnung: 7.00 Uhr).

4.2. Melatoninmessung

Das verwendete HPLC-System bestand aus einer Pumpe (Bischoff, Deutschland), einem Entgaser (Degasys DG-1310), einem Pulsdämpfer und einem automatischen Injektor (Triathlon) mit einer 200 µl Injektionsschleife und einem Rheodyne Injektionsventil. Die Proben wurden über eine Reversed Phase Sphaerisorb ODS2 Säule (Bischoff; 100 x 4,6 mm; 3 µm) getrennt, die in einem Variotherm Säulenofen (Bischoff) aufbewahrt wurde. Die mobile Phase (pH 4,38) bestand aus 20 %-igem Acetonitril und einem Eluentenpuffer aus 25 mM Zitronensäure, 25 mM Natrium-Acetat und 0,05 mM EDTA. Die Detektion erfolgte mit einem JASCO Fluoreszenzdetektor (Marke FP-1520) bei einer Exzitationswellenlänge von 275 nm und einer Emissionswellenlänge von 340 nm. Die Identifikation von Melatonin in den Proben erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten mit den externen Standards, die je 1 ng/ml 5-Methoxytryptamin, 5-Methoxytryptophol, 5-Methoxyindol-essigsäure und Melatonin enthielten.

Die Chromatogramme wurden mittels Bruker Chromstar® 4.0 Software (Chromstar Chromatography Data and Control System, SCPA GmbH) aufgezeichnet. Nach Integration der Peakfläche (Area Under the Curve; AUC) mittels Chromstar® Software wurde die Melatoninkonzentration der Probe mittels GraphPad Prism® Software (Version 3.00 für Windows, Graph Pad Software, San Diego California, USA, www.graphpad.com) berechnet.

5. Statistische Auswertung

Die statistischen Tests wurden gemäß MOTULSKY (1995) ausgewählt und mit GraphPad Prism[®] Software durchgeführt. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden der unpaired T-Test mit 95 %-igem Vertrauensintervall und der F-Test herangezogen. Beim Vorliegen signifikanter Varianzen ($p < 0,05$) im F-Test wurden die Werte über die Welch'sche Korrektur korrigiert. Die Berechnung der Plasma/Speichel-Korrelationen erfolgte über die lineare Regression anhand des Pearsons-Korrelations-Koeffizienten. Signifikante Unterschiede wurden bei einem $p < 0,05$ akzeptiert.

Zur Berechnung der mittleren Plasmamelatonininkonzentrationen der Tagproben wurden die Probenzeitpunkte 10.00, 13.00, 16.00 und 19.00 Uhr (ZGT +2, +5, +8 und +11) der Einzeltiere, zur Berechnung der Melatonininkonzentration der Nachtproben die Probenzeitpunkte 22.00, 1.00, 4.00 und 7.00 Uhr (ZGT +14, +17, +20, +23 und -1) herangezogen. Zur Beurteilung des Einflusses der Transitionszeiten auf die Tag/Nacht-Unterschiede der Melatonininkonzentrationen wurden für die Berechnung der Melatonininkonzentration der Tagproben die Probenzeitpunkte 10.00, 13.00, und 16.00 Uhr (ZGT +2, +5 und +8) und für die Nachtproben die Probenzeitpunkte 22.00, 1.00 und 4.00 Uhr (ZGT +14, +17 und +20) verwendet. Als Transitionszeiten wurden die 19.00 Uhr - Probe (ZGT +11) als „Abendprobe“ und die 7.00 Uhr - Proben (ZGT -1 und +23) als „Morgenproben“ definiert. Die Tiere wurden je nach zu Grunde liegender Fragestellung als Gesamtgruppe untersucht sowie nach Lichtintensität bzw. Geschlecht aufgeteilt.

6. Definitionen der im Ergebnisteil verwendeten Zeitbegriffe

6.1. Allgemeine Definitionen

Transitionszeit: Als Transitionszeit wird derjenige Zeitpunkt bezeichnet, der dem Übergang (Transition) zwischen unterschiedlichen Lichtbedingungen innerhalb des Lichtregimes um eine Stunde vorausgeht, d.h. vor dem Hell-Dunkel- bzw. Dunkel-Hell-Wechsel liegt.

Zeitgeberzeit: Die Zeitgeberzeit (ZGT) ist die von den Versuchstieren wahrgenommene Zeit. Sie wird ausschließlich durch die An- bzw. Abwesenheit von Licht bestimmt und determiniert die Dauer des experimentellen „Tages“ und der

experimentellen „Nacht“. Der experimentelle Tag beginnt mit dem Einschalten des Lichts zu ZGT 0 (entspricht 8.00 Uhr MEZ) und endet mit ZGT 12 (entspricht 20.00 Uhr MEZ); die experimentelle Nacht dauert vom Ausschalten des Lichtes zu ZGT 12 bis ZGT 24 (entspricht 20.00 Uhr bis 8.00 Uhr MEZ).

6.2. Probenentnahmezeitpunkte

Der chronologische Ablauf und die Probenentnahmezeitpunkte sind in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Darstellung der Probenentnahmezeitpunkte

	Nacht	Tag 12 Stunden				Nacht 12 Stunden			
MEZ	7.00 Uhr	8.00 – 20.00 Uhr				20.00 – 8.00 Uhr			
Zeitgeberzeit (ZGT)	-1	0 - 12				12 - 24			
Probenentnahme- zeitpunkte (MEZ)	7	10	13	16	19	22	1	4	7
Probenentnahme- zeitpunkte (ZGT) mit Transitionszeiten (V)	-1	2	5	8	11	14	17	20	23
Probenentnahme- zeitpunkte (ZGT) ohne Transitionszeiten (KV)		2	5	8		14	17	20	
Transitionszeiten (ZGT) (A / M)	M-A -1				A 11				M-E 23

IV. Ergebnisse

1. Optimierung der Methode

1.1. Optimierung der Extraktions- und Messbedingungen

Das von SIDIQ (2001) etablierte Protokoll zur Melatoninextraktion aus Plasmaproben des Haussperlings wurde durch die Erhöhung des zur Extraktion eingesetzten Probenvolumens von 50 µl auf 200 µl modifiziert, da die dem Melatoninpeak entsprechende Fläche (AUC; area under curve) bei nur 50 µl Volumen zu klein zur Integration der Basislinie und Idealisierung des Kurvenverlaufs (Exponential Skimming) war. Die Zentrifugationsdauer nach der Chloroformzugabe wurde von 10 auf 15 min erhöht, um eine bessere Abtrennung zwischen den sich insbesondere in den Speichelproben zwischen der wässrigen Phase und der organischen, die Methoxyindolamine enthaltenden Phase in einer Trennungsschicht anreichernden Partikel zu erzielen. Die zur Chloroform-Evaporation erforderliche Zeit wurde auf mindestens 3,5 Stunden erhöht. Das Rekonstitutionsvolumen in 20 %-igem Acetonitril wurde aufgrund einer geänderten Injektionstechnik (flushed loop anstelle filled loop) von 120 µl auf 200 µl, und das Injektionsvolumen von 80 µl auf 100 µl erhöht.

Die in den Speichelproben sehr zahlreich vorhandenen Peaks wiesen teilweise eine Retentionszeit von mehr als der im Protokoll definierten 60-minütigen Messzeit einer Probe auf, was eine Verschleppung dieser Peaks in das Chromatogramm der nachfolgend gemessenen Probe nach sich zog. Deshalb erfolgte nach jeder Speichelprobe die Injektion einer Aqua bidest.-Probe, um die Auswaschung dieser Substanzen aus der Trennsäule zu erreichen und dadurch eine Kontamination des nachfolgenden Chromatogramms zu verhindern.

1.2. Inter- und Intraassay-Variationen

Zur Bestimmung der Genauigkeit der Extraktions- und Messmethode wurden die Melatoninkonzentrationen extrahierter und externer, nicht extrahierter Methoxyindolstandards bestimmt. Aus den Melatoninkonzentrationen der extrahierten und der externen Standards wurde die prozentuale Wiederfindungsrate berechnet.

Die mittlere Wiederfindungsrate der Melatoninkonzentrationen der Standards in verschiedenen Extraktionen betrug 84,23 % ($\pm 1,43$ % SEM) mit einem Variations-Koeffizienten von 7,23 %. Bezogen auf die Standards der Plasmaproben lag die mittlere Wiederfindungsrate von Melatonin bei 84,88 % ($\pm 1,91$ % SEM) und bei den Speichelproben bei 83,72 % ($\pm 2,16$ % SEM). Die Variations-Koeffizienten (Interassay) der Plasmaproben betrugen 6,36 %, die der Speichelproben lagen bei 8,16 %.

Die Unterschiede der Wiederfindungsraten der Standards innerhalb der einzelnen Extraktionen sind in Tab. 4A für die Plasmaextraktionen, und in Tab. 4B für die Speichlextraktionen dargestellt.

Tab. 4A: Intraassay-Variation in den Standards der Plasmaextraktionen

Anzahl der Standards pro Extraktion	Mittlere Wiederfindungsrate (%)	Standardfehler SEM (%)	Variations-Koeffizient (%)
6	86,05	1,61	4,59
4	82,09	0,82	2,00
5	76,32	2,22	6,51
5	85,83	1,95	5,08
5	87,50	4,39	11,22
4	90,72	1,59	3,51
4	91,54	2,54	5,56
5	78,96	2,22	6,29

Tab. 4B: Intraassay-Variation in den Standards der Speichalextraktionen

Anzahl der Standards pro Extraktion	Mittlere Wiederfindungsrate (%)	Standardfehler SEM (%)	Variationskoeffizient (%)
4	85,34	3,74	8,76
5	76,27	2,11	6,18
4	91,77	2,12	4,62
5	84,87	2,28	6,00
5	87,14	3,58	9,19
4	72,32	4,23	11,70
4	76,85	6,44	16,75
4	93,23	3,48	7,47
4	87,38	3,62	8,29
4	81,99	1,53	3,74

Unter Anwendung dieser Extraktions- und Messbedingungen konnte in Plasma- und Speichelproben Melatonin identifiziert und quantifiziert werden, wie in den Abb.13A bis D für Plasma, und in den Abb.14A bis D für Speichel dargestellt ist. Als Kontrolle dienten extrahierte Aqua bidest.-Proben, die keine chromatographischen Überlagerungen mit dem Melatoninpeak aufwiesen.

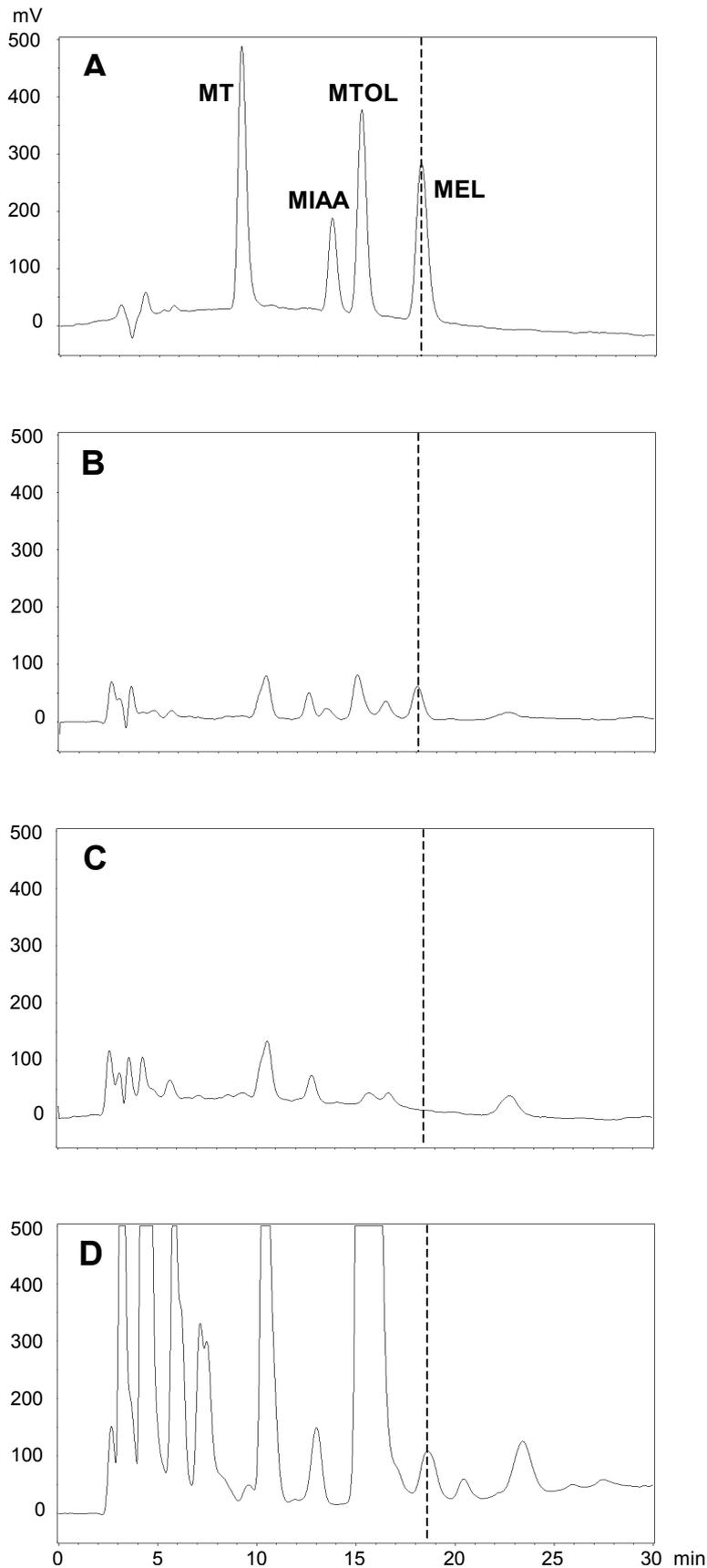


Abb. 14A bis D: HPLC Chromatogramm eines externen Standards (**A**), der authentisches 5-Methoxytryptamin (MT) (1 ng/ml), 5-Methoxytryptophol (MTOL) (1 ng/ml), 5-Methoxyindolacetic acid (MIAA) (1 ng/ml), und Melatonin (MEL) (1 ng/ml) enthält.

(**B**) Chromatogramm eines extrahierten Standards.

(**C**) Chromatogramm einer A.bidest.-Probe.

(**D**) Chromatogramm einer **Plasmaprobe** (ZGT 2 / V 1) des Schweines Nr. 349.

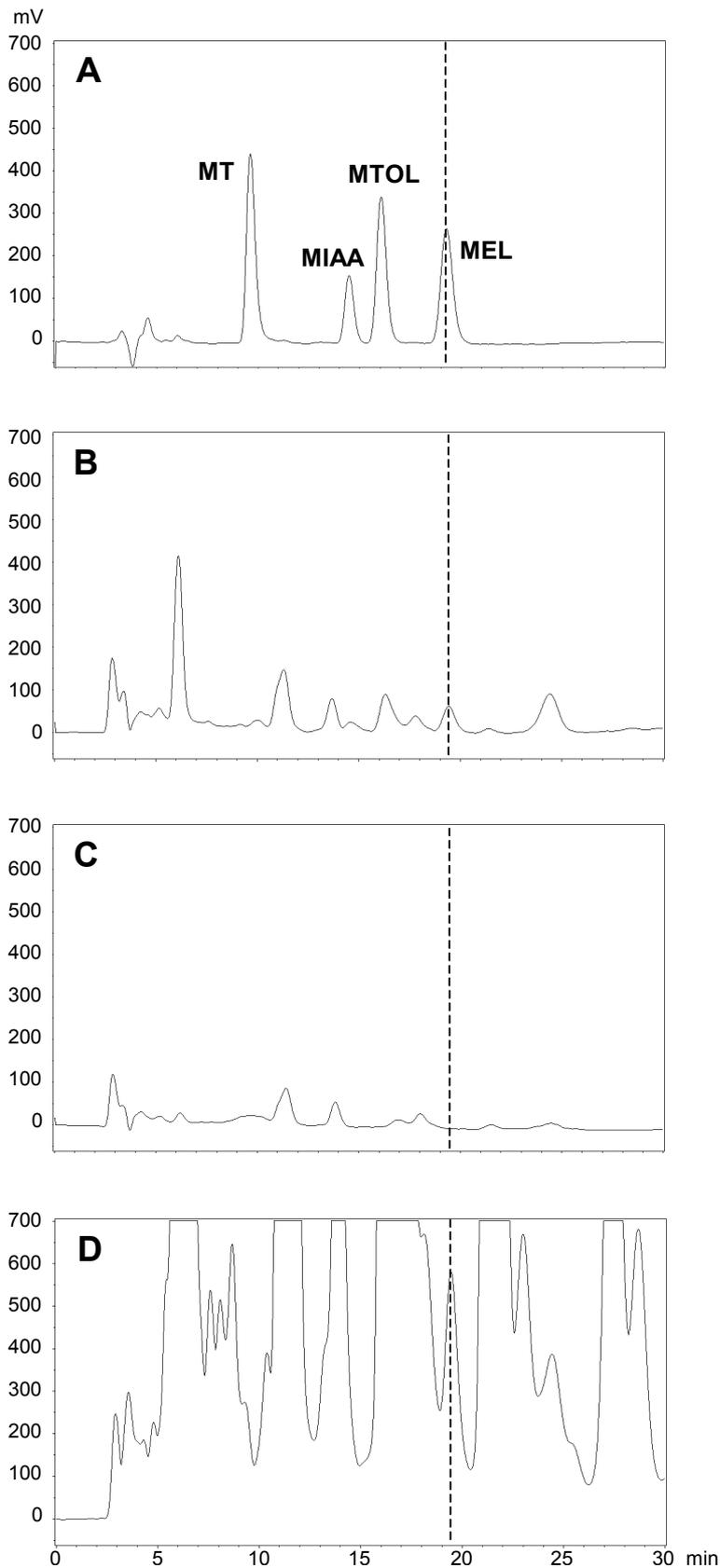


Abb. 14A bis D: HPLC Chromatogramm eines externen Standards (**A**), der authentisches 5-Methoxytryptamin (MT) (1 ng/ml), 5-Methoxytryptophol (MTOL) (1 ng/ml), 5-Methoxyindolacetic-acid (MIAA) (1 ng/ml), und Melatonin (MEL) (1 ng/ml) enthält.

(B) Chromatogramm eines extrahierten Standards.

(C) Chromatogramm einer A.bidest.-Probe.

(D) Chromatogramm einer **Speichelprobe** (ZGT 23 / V 1) des Schweines Nr. 349.

1.3. Messung der Referenzsubstanzen

Zur Identifizierung der zahlreichen im Schweinespeichel auftretenden Peaks wurden die Vorstufen und Metaboliten von Melatonin in einer Konzentration von je 1,0 mg in 1,0 ml Lösungsmittel (Methanol, 1,0 N oder Salzsäure-Lösung 5 M; siehe Material und Methoden) gelöst, und ihre qualitative Bestimmung in einer Endkonzentration von 1 ng/ml als unextrahierte Standards durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass in den Speichelproben unter den gegebenen und zur Methoxyindolamin-Extraktion (MT, MIAA, MTOL, MEL) optimierten chromatographischen Bedingungen, insbesondere der Zusammensetzung des Eluenten, keine routinemäßige simultane Konzentrationsbestimmung weiterer Vorstufen oder Metaboliten möglich ist. Die Retentionszeiten der hydrophilen Hydroxyindolamine sind sehr kurz und kaum sicher voneinander zu unterscheiden. Infolge der Konzentrationsunterschiede zwischen Melatonin und den potentiellen Vorstufen oder Metaboliten in den Plasma- und Speichelproben wären zur Identifikation und Quantifizierung des Weiteren unterschiedliche Probenvolumina und damit mehrere Extraktionen je Probe erforderlich gewesen. Da das primäre Ziel dieser Untersuchung die Bestimmung der Melatoninkonzentrationen war, wurde diese Fragestellung nicht weiter verfolgt.

1.4. Messung der Futterproben

In den Futterproben konnte kein Melatonin identifiziert werden, da sowohl die Extraktions- als auch die Messbedingungen nur für die Melatoninbestimmung aus Plasma und Speichel optimiert wurden. Eine Optimierung zur Melatoninbestimmung aus Futterproben wäre durch weitere zeit- und kostenintensive Experimente, wie der Bestimmung des optimalen Probenvolumens und der Mischungsverhältnisse der Chemikalien, sowie unter Verwendung anderer chromatographischer Trennsäulen, Verdünnungsreihen, und durch Zusatz von synthetischem Melatonin möglich gewesen. Da dies jedoch kein primäres Untersuchungsziel war, wurde auf weitere Untersuchungen der Futterproben verzichtet. Eine definitive qualitative, sowie quantitative Aussage über die Melatoninexistenz und Konzentration ist daher nicht möglich.

2. Anwendung der Methode

2.1. Ergebnisse der Plasmamelatoninbestimmung

2.1.1. Gesamtgruppe

Die Plasmamelatoninkonzentrationen steigen am ersten Untersuchungstag (Abb. 15) zwischen den bei identischer Lichtintensität entnommenen Tag- und Abendproben signifikant an ($p=0,013$), und sinken zwischen den in Lichtabwesenheit entnommenen Nacht- und Morgenproben. Am zweiten Untersuchungstag liegen die Konzentrationen der Tagproben, mit Ausnahme des Konzentrations-einbruches, auf dem Niveau der Nachtproben des ersten Untersuchungstages. Am ersten Untersuchungstag erreicht die Melatoninkonzentration in der ersten Nachtprobe das Konzentrationsmaximum und sinkt über die Nachtphase signifikant ab ($p<0,001$), während die Konzentration am zweiten Untersuchungstag in der fünf Stunden nach Nachtbeginn entnommenen Probe ihr Konzentrationsmaximum erreicht. Der in den Proben des zweiten Untersuchungstages auftretende Standardfehler ist größer als der des ersten Untersuchungstages. Die Melatoninkonzentrationen der innerhalb der einzelnen Untersuchungstage vor und nach der Futteraufnahme gemessenen Plasmaproben unterscheiden sich nicht signifikant. Die Melatoninkonzentration ist an beiden Tagen in den nach der Abendfütterung entnommenen Proben höher als in den ihr vorausgehenden.

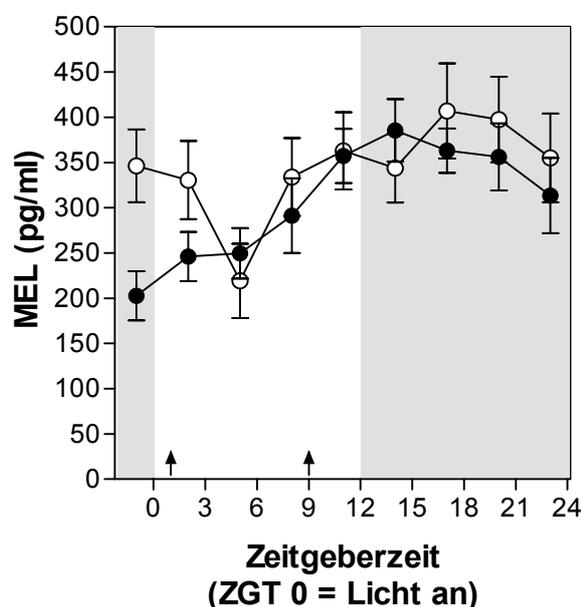


Abb. 15: Plasmamelatoninprofile der Schweine am 1. Versuchstag (gefüllte Symbole) und 2. Versuchstag (offene Symbole). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, $n=12$.

Bei der Einteilung der Proben in „Tag“ und „Nacht“ ist, wie aus Abb. 16A ersichtlich, nur für den Mittelwert über beide Versuchstage ein signifikanter Unterschied zwischen den Tag- und Nachtmelatoninkonzentrationen nachweisbar ($p=0,015$), wobei zumindest am zweiten Untersuchungstag ein tendentieller Unterschied besteht ($p=0,058$). Im Gegensatz dazu sind bei Ausschluss der Transitionszeiten (Abb. 16B) am ersten ($p<0,001$) und zweiten Untersuchungstag ($p=0,020$), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage ($p<0,001$) signifikante Konzentrationsunterschiede vorhanden. Der Konzentrationsanstieg zwischen dem ersten und dem zweiten Untersuchungstag ist sowohl unter Einbeziehung, als auch unter Ausschluss der Transitionszeiten in den Tagproben und in den Nachtproben nicht signifikant; weist in den Nachtproben unter Einbeziehung der Transitionszeiten jedoch eine Tendenz zur Signifikanz auf ($p=0,089$).

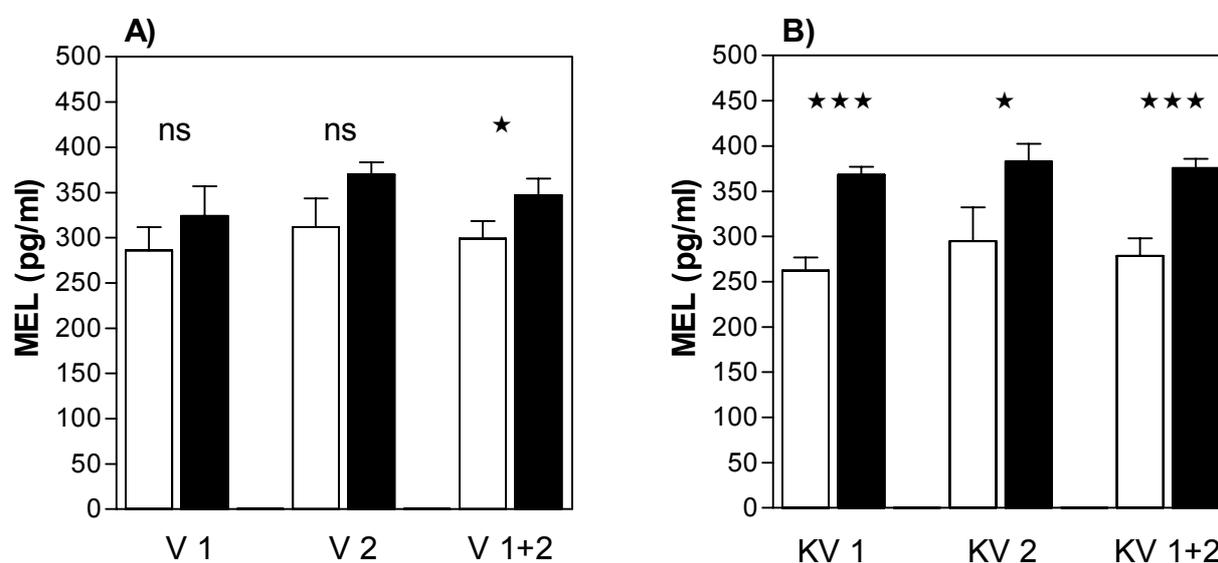


Abb. 16A und **B**: Plasmamelatoninkonzentrationen der Gesamtgruppe unter Einbeziehung (A) und unter Ausschluss der Transitionszeiten (B) am 1. Versuchstag (V 1, KV 1) und 2. Versuchstag (V 2, KV), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2, KV 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, $n=12$, nicht signifikant (ns), $p<0,05$ (*), $p<0,001$ (***)

In Abb. 17 wird deutlich, dass die erste Morgenprobe des ersten Untersuchungstages eine signifikant niedrigere Melatoninkonzentration enthält, als alle anderen zeitgleichen Proben ($p_{(M1-A/M1-E)}=0,036$; $p_{(M1-A/M2-A)}=0,007$; $p_{(M1-A/M2-E)}=0,015$). Auch die mittlere Melatoninkonzentration der Morgenproben des ersten Untersuchungstages ist signifikant niedriger als die des zweiten Untersuchungstages ($p=0,029$).

Die Melatoninkonzentrationen der Abendproben (ZGT 11) unterscheiden sich nicht zwischen den beiden Untersuchungstagen. Die Melatoninkonzentrationen der Morgen- und Abend-Transitionszeiten unterscheiden sich nur am ersten Untersuchungstag signifikant ($p=0,030$).

Die Unterschiede zwischen den Melatoninkonzentrationen der Morgen- und der Tagproben, sowie der Abend- und Nachtproben sind nicht signifikant, während die Unterschiede zwischen Nacht und Morgen in den Mittelwerten über beide Tage signifikante Unterschiede ($p=0,008$) zeigen.

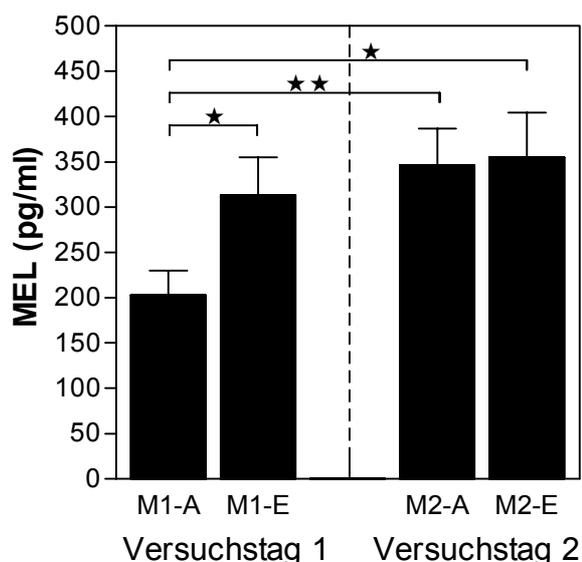


Abb. 17: Plasmamelatoninkonzentrationen der um 7.00 Uhr entnommenen Proben am 1. und 2. Versuchstag (ZGT -1 und 23). Mittelwert \pm SEM, $n=12$, $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**).

2.1.2. Abhängigkeit vom Geschlecht

Das Plasmamelatoninprofil der männlichen Tiere weist am ersten Untersuchungstag einen kontinuierlichen Konzentrationsanstieg über die Tagphase auf, während die Konzentrationen bei den weiblichen Tieren erst ab der zweiten Tageshälfte ansteigen und in der letzten während der Tagphase entnommenen Probe das Niveau der Nachtproben erreicht (Abb. 18A). Im Gegensatz zu den männlichen Tieren tritt bei den weiblichen Tieren in der letzten Nachtprobe ein Konzentrationsrückgang auf. Am zweiten Untersuchungstag (Abb. 18B) liegen die Melatoninkonzentrationen der Tagproben bei den männlichen Tieren auf dem Niveau der Nachtproben und bei den weiblichen Tieren zwischen dem Niveau der Tag- und der Nachtproben des ersten Untersuchungstages. Nur bei den weiblichen Tieren wird der Konzentrationseinbruch von einem signifikanten ($p=0,003$) Konzentrationsanstieg gefolgt. Darüber hinaus kommt es bei den weiblichen Tieren zu einem signifikanten Konzentrationsunterschied ($p=0,049$) zwischen der Abendprobe und den ihr vorausgehenden Tagproben. In der zweiten Nachthälfte erreichen die männlichen Tiere höhere Plasmamelatoninkonzentrationen als die weiblichen Tiere. Die Konzentrations-

unterschiede zwischen den jeweils vor und nach den Fütterungen entnommenen Proben sind bei den männlichen und weiblichen Tieren an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant.

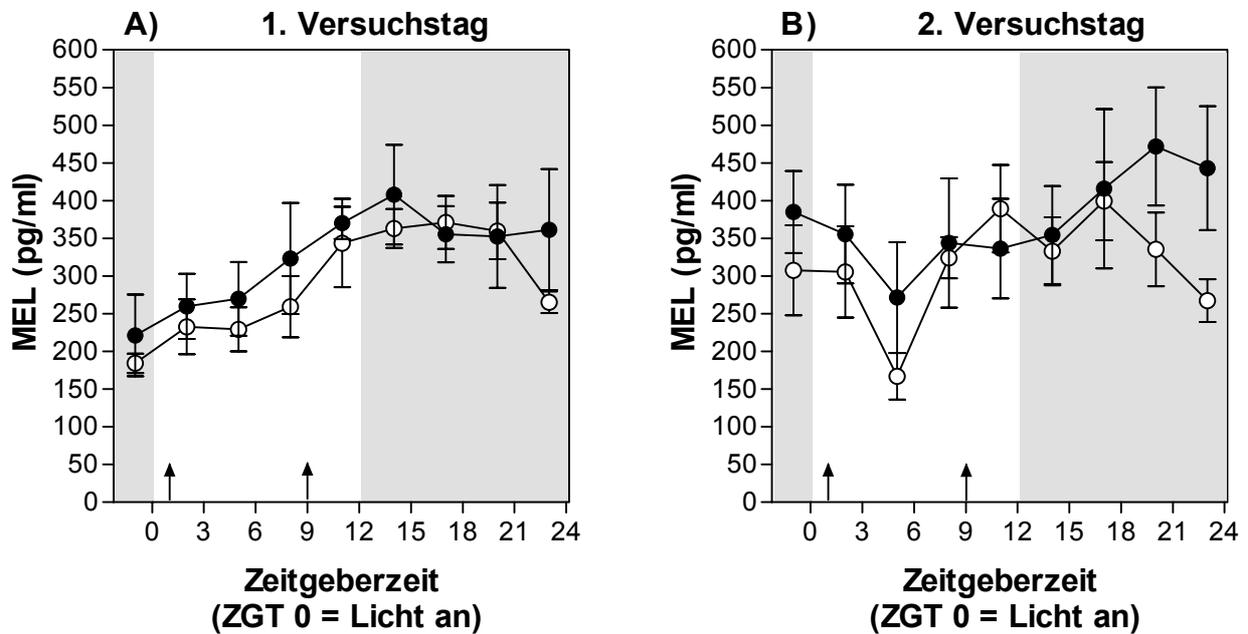


Abb. 18A und B: Plasmamelatoninprofile der männlichen (gefüllte Symbole) und weiblichen Tiere (offene Symbole) am 1. Versuchstag (A) und 2. Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, $n=6$.

Bei den männlichen Tieren sind die Konzentrationsunterschiede zwischen den Tag- und Nachtproben an beiden Untersuchungstagen sowohl unter Einbeziehung (Abb. 19A), wie auch unter Ausschluss der Transitionszeiten nicht signifikant, während sich die Mittelwerte über beide Untersuchungstage signifikant ($p=0,026$) unterscheiden (Abb. 20A). Hingegen liegen bei den weiblichen Tieren am ersten ($p<0,001$) und zweiten Untersuchungstag ($p=0,029$), sowie in den Mittelwerten über beide Untersuchungstage ($p<0,001$) unter Ausschluss der Transitionszeiten signifikante Tag/Nacht-Unterschiede vor (Abb. 20B), jedoch nicht unter Einbeziehung der Transitionszeiten (Abb. 19B).

Zwischen dem ersten und dem zweiten Untersuchungstag tritt sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren ein nicht signifikanter Konzentrationsanstieg in den Tag-, sowie den Nachtproben auf. Die Melatoninkonzentrationen der männlichen Tiere sind an beiden Untersuchungstagen

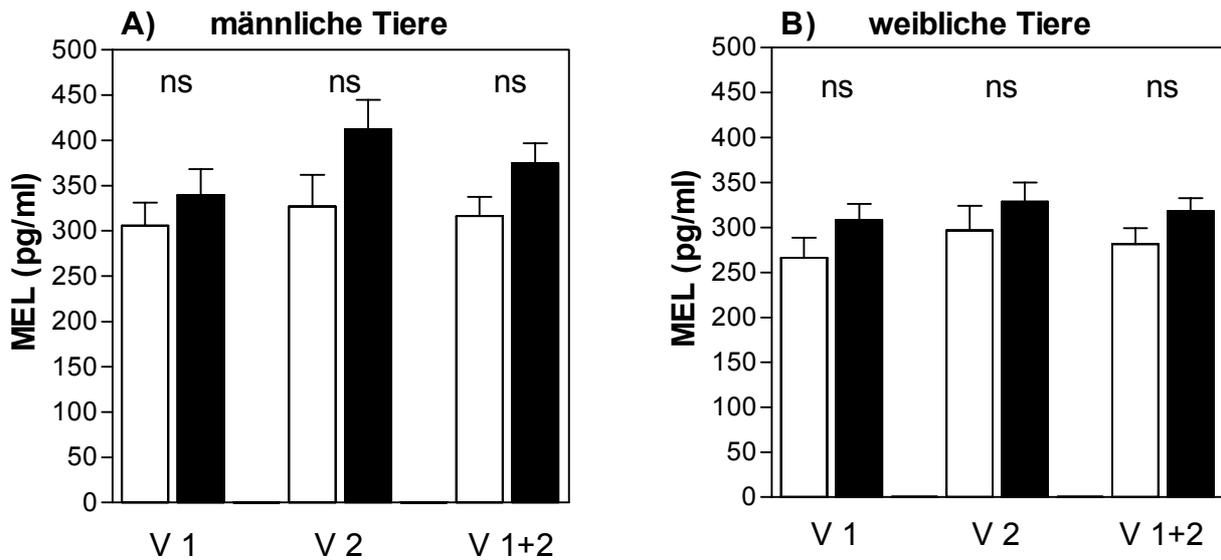


Abb. 19A und B: Plasmamelatoninkonzentrationen der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, n=6, nicht signifikant (ns).

höher als die der weiblichen Tiere und unterscheiden sich unter Einbeziehung der Transitionszeiten über die Nachtphase des zweiten Versuchstages ($p=0,039$), sowie in den Mittelwerten der Nachtphasen über beide Untersuchungstage ($p=0,034$) signifikant von denen der weiblichen Tiere.

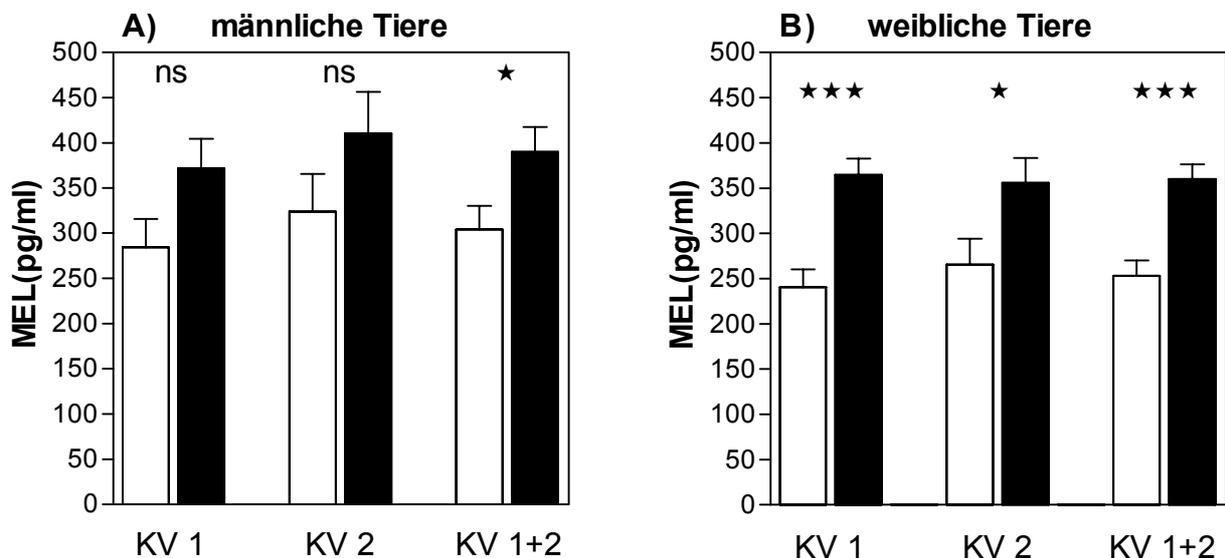


Abb. 20A und B: Plasmamelatoninprofile der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) unter Ausschluss der Transitionszeiten am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, n=6, nicht signifikant (ns), $p<0,05$ (*), $p<0,001$ (***)

Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Konzentrationen unter Ausschluss der Transitionszeiten über die Tagphase des zweiten Untersuchungstages signifikant ($p=0,026$) zwischen den Geschlechtern.

Wie aus Abb. 21A ersichtlich, unterscheidet sich bei den männlichen Tieren die Melatoninkonzentration der ersten Probe des ersten Versuchstages (M1-A) signifikant ($p=0,048$) von der zur gleichen Uhrzeit entnommenen letzten Probe des zweiten Untersuchungstages (M2-E). Bei den weiblichen Tieren (Abb. 21B) steigt die Melatoninkonzentration über den ersten Untersuchungstag signifikant zwischen der ersten und der letzten Plasmaprobe an ($p=0,002$). Die Melatoninkonzentrationen der Morgenproben des ersten Untersuchungstages unterscheiden sich bei den weiblichen Tieren signifikant ($p<0,001$) von der Konzentration der Nachtproben. Am zweiten Untersuchungstag sind die Melatoninkonzentrationen der Morgenproben bei den männlichen Tieren signifikant höher als bei den weiblichen Tieren ($p=0,039$).

Die Melatoninkonzentrationen der Abendproben (ZGT 11) weisen weder geschlechtsspezifische, noch Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Untersuchungstagen auf. Bei den weiblichen Tieren sind die Konzentrationsunterschiede zwischen der mittleren Tag- und den mittleren Abendwerten über beide Untersuchungstage signifikant ($p=0,004$).

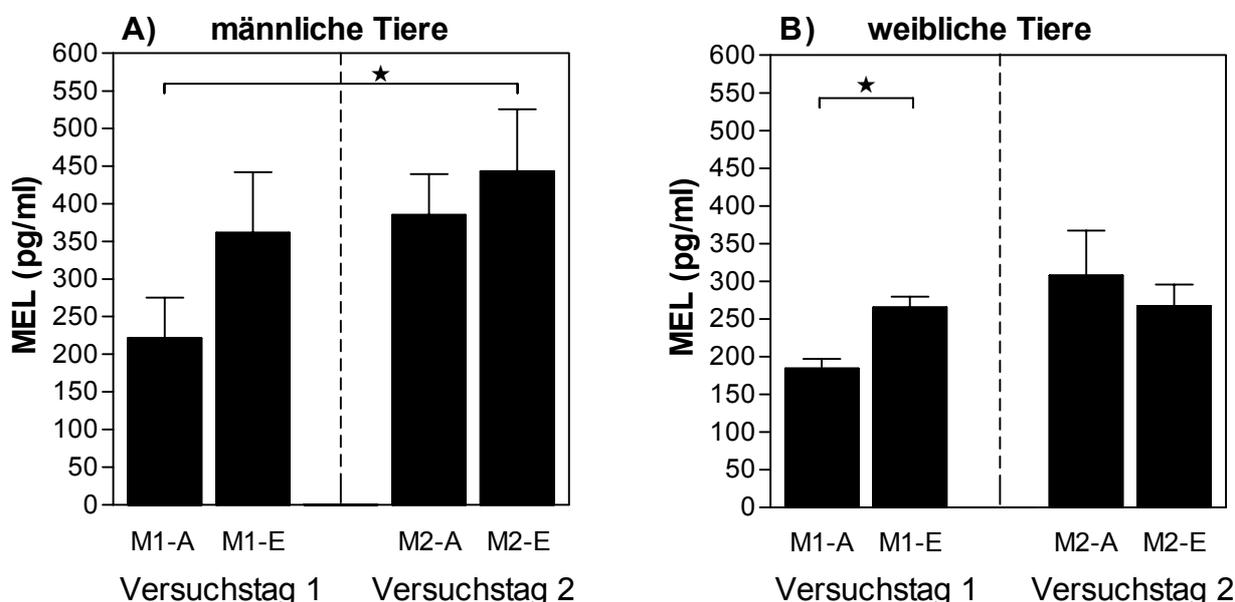


Abb. 21A und B: Plasmamelatoninkonzentrationen der um 7.00 Uhr entnommenen Proben bei männlichen (A) und weiblichen Tieren (B) am 1. und 2. Versuchstag (ZGT -1 und 23). Mittelwert \pm SEM, $n=6$, $p<0,05$ (*).

2.1.3. Abhängigkeit von der Lichtintensität

In der bei 470 Lux Lichtintensität gehaltenen Versuchsgruppe ist am ersten Untersuchungstag, wie in Abb. 22A dargestellt, ein nokturnales Plasmamelatoninprofil mit einem signifikanten ($p=0,032$), dem Nachtbeginn vorausgehenden Konzentrationsanstieg vorhanden, während in den Plasmaproben der 250 Lux Versuchsgruppe kein am Lichtregime orientiertes Melatoninprofil ausgebildet ist. Am zweiten Untersuchungstag (Abb. 22B) liegen die Konzentrationen der Tagproben beider Gruppen nur wenig niedriger als die der Nachtproben des ersten Untersuchungstages. Darüber hinaus kommt es in beiden Versuchsgruppen fünf Stunden nach Tagesbeginn zu einem Konzentrationseinbruch, der in der 250 Lux Gruppe eine Signifikanz ($p=0,004$) aufweist.

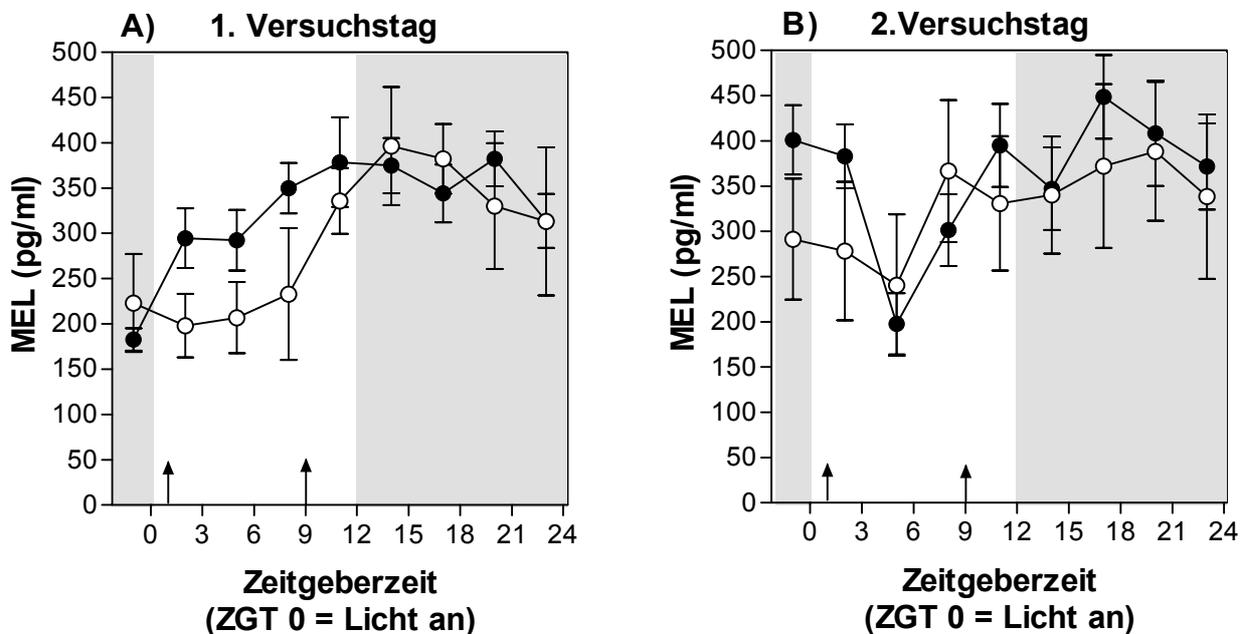


Abb. 22A und B: Plasmamelatoninprofile der bei 470 Lux (offene Symbole) und bei 250 Lux Lichtintensität (gefüllte Symbole) gehaltenen Tiere am ersten (A) und zweiten Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, $n=6$.

Zwischen den jeweils vor und nach der Fütterung entnommenen Plasmaproben sind die Konzentrationsunterschiede am ersten Versuchstag nach der Morgenfütterung in der 250 Lux Gruppe signifikant ($p=0,002$), während sie über den restlichen Untersuchungszeitraum, sowie in der 470 Lux Gruppe nicht signifikant bleiben.

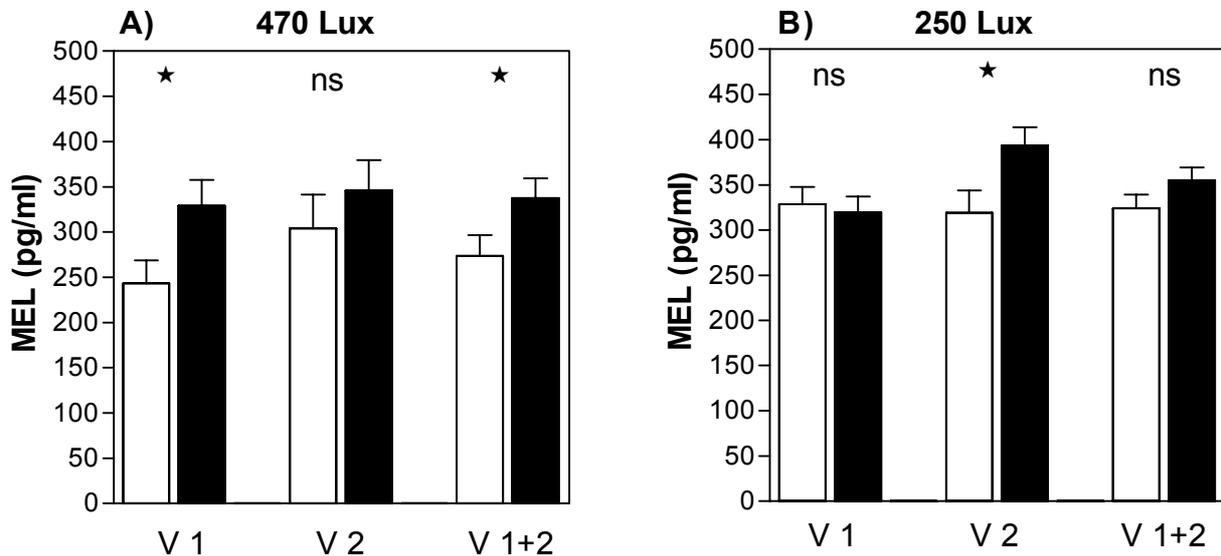


Abb. 23A und B: Plasmamelatonininkonzentrationen der bei 470 Lux (A) und bei 250 Lux Lichtintensität (B) gehaltenen Tiere am ersten Versuchstag (V 1) und zweiten Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, $n=6$, nicht signifikant (ns), $p<0,05$ (*).

In der 470 Lux Gruppe sind, wie in den Abb. 23A und 24A dargestellt, die Tag/Nacht-Unterschiede der Melatonininkonzentrationen am ersten Untersuchungstag und im Mittel über beide Tage sowohl unter Einbeziehung ($p_{V1}=0,034$; $p_{V1+2}=0,047$), als auch unter Ausschluss der zu den Transitionszeiten entnommenen Proben ($p_{KV1}<0,001$; $p_{KV1+2}=0,003$) signifikant, während die Konzentrationsunterschiede am zweiten Untersuchungstag nicht signifikant sind. In der 250 Lux Gruppe kommt es am ersten Untersuchungstag nur unter Ausschluss der Transitionszeiten ($p=0,036$) zu einem signifikanten Tag/Nacht-Unterschied, während am zweiten Untersuchungstag sowohl unter Einbeziehung ($p=0,024$), als auch unter Ausschluss der Transitionszeiten ($p=0,013$) signifikante Tag/Nacht-Unterschiede vorhanden sind (Abb. 23B und 24B). Die Mittelwerte über beide Untersuchungstage weisen nur unter Ausschluss der Transitionszeiten signifikante Tag/Nacht-Unterschiede ($p=0,001$) auf. Die Konzentrationen der Nachtproben steigen zwischen den Versuchstagen in der 250 Lux Gruppe unter Einbeziehung der Transitionszeiten signifikant ($p=0,009$) an.

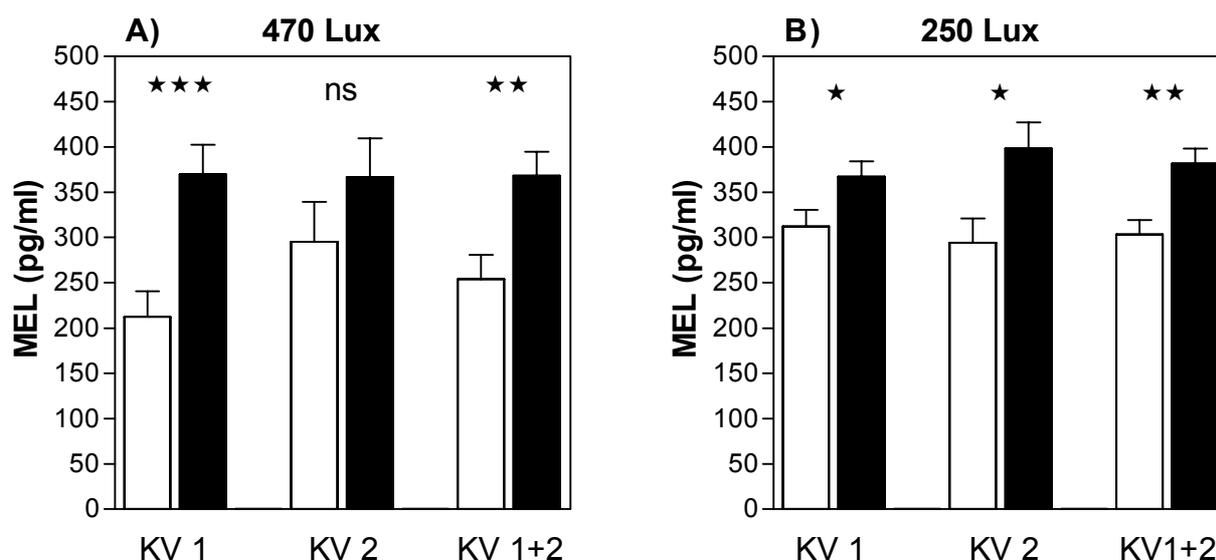


Abb. 24A und B: Plasmamelatoninkonzentrationen der bei 470 Lux (A) und bei 250 Lux Lichtintensität (B) gehaltenen Tiere unter Ausschluss der Transitionszeiten am ersten Versuchstag (KV 1) und zweiten Versuchstag (KV 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (KV 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, n=6, nicht signifikant (ns), $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Die Tagproben der 470 Lux Tiere enthalten sowohl unter Einbeziehung, als auch bei Ausschluss der Transitionszeiten, eine geringere Melatoninkonzentration als die Proben der 250 Lux Gruppe, wobei die Konzentrationsunterschiede der Tagproben am ersten Untersuchungstag sowohl unter Berücksichtigung ($p=0,010$), wie auch unter Ausschluss der Transitionszeiten ($p=0,006$) signifikant sind, während am zweiten Untersuchungstag keine Unterschiede mehr vorhanden sind. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den Nachtproben der beiden Versuchsgruppen bleiben stets nicht signifikant.

In den Morgenproben sind die Konzentrationsunterschiede in der 470 Lux Gruppe sowohl innerhalb eines Untersuchungstages, als auch zwischen den beiden Untersuchungstagen nicht signifikant, wie aus Abb. 25A ersichtlich ist. Im Gegensatz dazu steigt die Melatoninkonzentration in der 250 Lux Gruppe während des ersten Untersuchungstages signifikant ($p=0,007$) an und nimmt bis zu Beginn des zweiten Untersuchungstages weiter zu (Abb. 25B). Der Unterschied zwischen den jeweils ersten Proben beider Untersuchungstage ist signifikant ($p=0,002$). Die Melatoninkonzentration der ersten Probe des ersten Untersuchungstages (M1-A) unterscheidet sich ebenfalls signifikant ($p=0,012$) von der zeitgleich entnommenen letzten Probe des zweiten Untersuchungstages (M2-E).

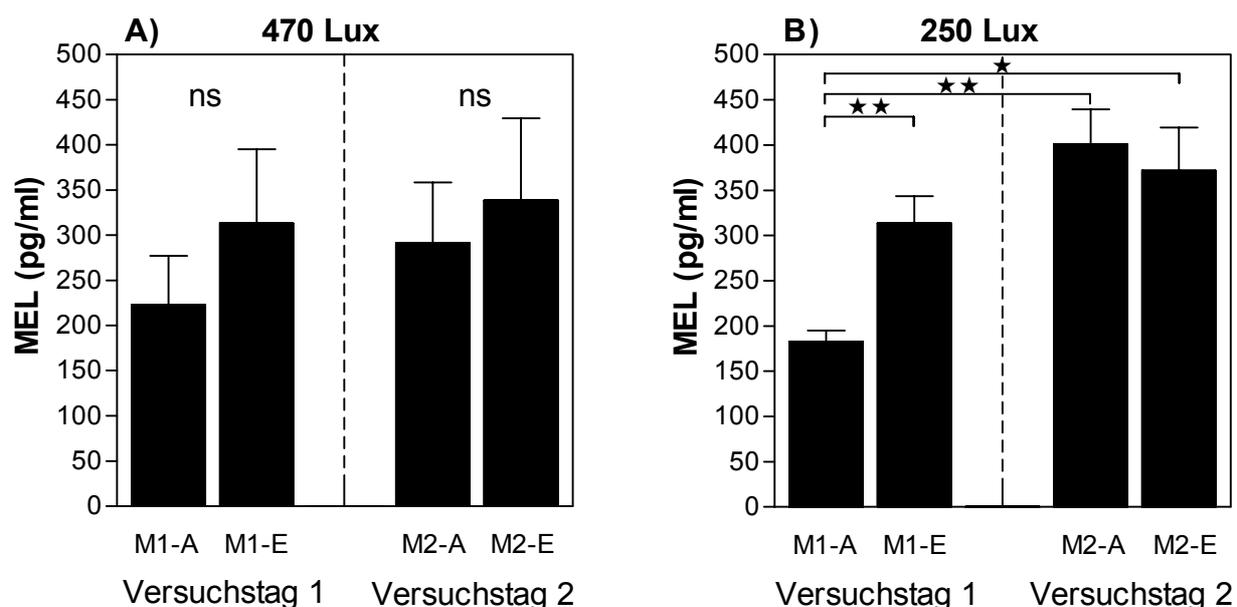


Abb. 25A und B: Plasmamelatoninkonzentrationen der um 7.00 Uhr entnommenen Proben der bei 470 Lux (A) und bei 250 Lux Lichtintensität (B) gehaltenen Tiere am ersten und zweiten Versuchstag (ZGT-1 und 23). Mittelwert \pm SEM, $n=6$, nicht signifikant (ns), $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

Im Gegensatz zur 470 Lux Gruppe, bei der keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den Morgenproben und den Nachtproben, oder zu den bei höherer Lichtintensität entnommenen Tagproben auftreten, unterscheidet sich die Melatoninkonzentration der Morgenproben in der 250 Lux Gruppe am ersten Untersuchungstag sowohl von den bei höherer Lichtintensität entnommenen Tagproben ($p=0,043$), als auch von den bei identischer Intensität entnommenen Nachtproben signifikant ($p < 0,001$). Auch am zweiten Untersuchungstag ist in der 250 Lux Gruppe der Konzentrationsunterschied zwischen den Morgen- und Tagproben signifikant ($p=0,032$). Die mittleren Melatoninkonzentrationen der Morgenproben des ersten Untersuchungstages sind in der bei 250 Lux gehaltenen Gruppe signifikant niedriger ($p=0,002$) als die des zweiten Untersuchungstages. Die Konzentrationsunterschiede der einzelnen Morgenproben sind zwischen der 470 Lux und der 250 Lux Gruppen nicht signifikant. Die Abendproben enthalten an beiden Untersuchungstagen bei den Tieren der 250 Lux Gruppe eine nicht signifikant höhere Melatoninkonzentration als in der 470 Lux Gruppe. Im Gegensatz zu der 250 Lux Gruppe sind die Melatoninkonzentrationen der Abendproben der 470 Lux Tiere am ersten Untersuchungstag ($p=0,032$) signifikant höher als die der bei identischer Lichtintensität entnommenen Tagproben.

2.1.4. Abhängigkeit vom Geschlecht bei 470 Lux

Die Plasmamelatoninprofile der 470 Lux Gruppe weisen bei den männlichen Tieren am ersten Untersuchungstag einen kontinuierlichen Konzentrationsanstieg während der Tagphase und einen diskontinuierlichen Konzentrationsrückgang über die Nachtphase auf. Das Plasmamelatoninprofil der weiblichen Tiere zeigt dagegen, wie aus Abb. 26A ersichtlich ist, am ersten Untersuchungstag ein klares Profil mit nokturnalem Verlauf. Über den Verlauf des zweiten Untersuchungstages (Abb. 26B) ist bei den männlichen Tieren kein lichtabhängiges Tagesprofil mehr vorhanden. Die Tagwerte des zweiten Untersuchungstages liegen bei den weiblichen Tieren auf demselben Niveau wie die des ersten Untersuchungstages. Im Anschluss an den fünf Stunden nach Tagesbeginn auftretenden Konzentrationseinbruch steigt die Melatoninkonzentration ab der zweiten Tageshälfte signifikant an ($p=0,044$) und erreicht das Niveau der nachfolgenden Nachtmelatoninkonzentrationen. Die Melatoninkonzentrationen der männlichen Tiere sind insbesondere während den Tagphasen höher als die der weiblichen Tiere. Darüber hinaus ist der Standardfehler

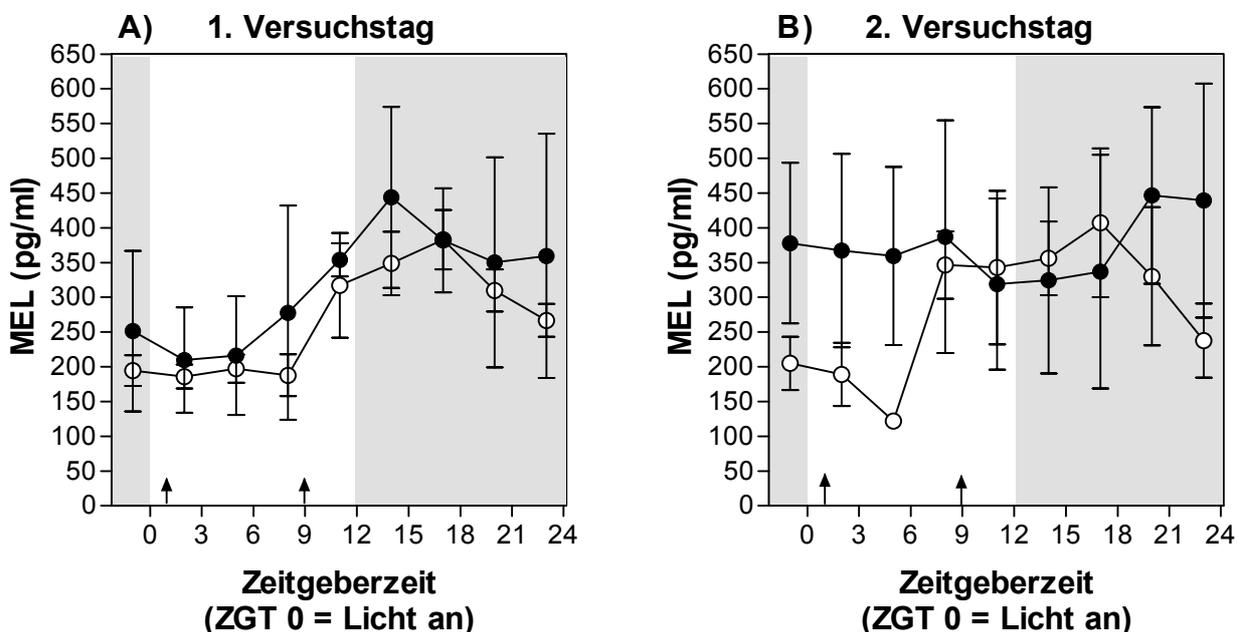


Abb. 26A und B: Plasmamelatoninprofile der bei einer Lichtintensität von 470 Lux gehaltenen männlichen (gefüllte Symbole) und weiblichen Tiere (offene Symbole) an 1. Versuchstag (A) und 2. Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

in der Gruppe der männlichen Tiere stets größer als bei den weiblichen Tieren. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den jeweils vor und nach den Fütterungen entnommenen Proben sind sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant.

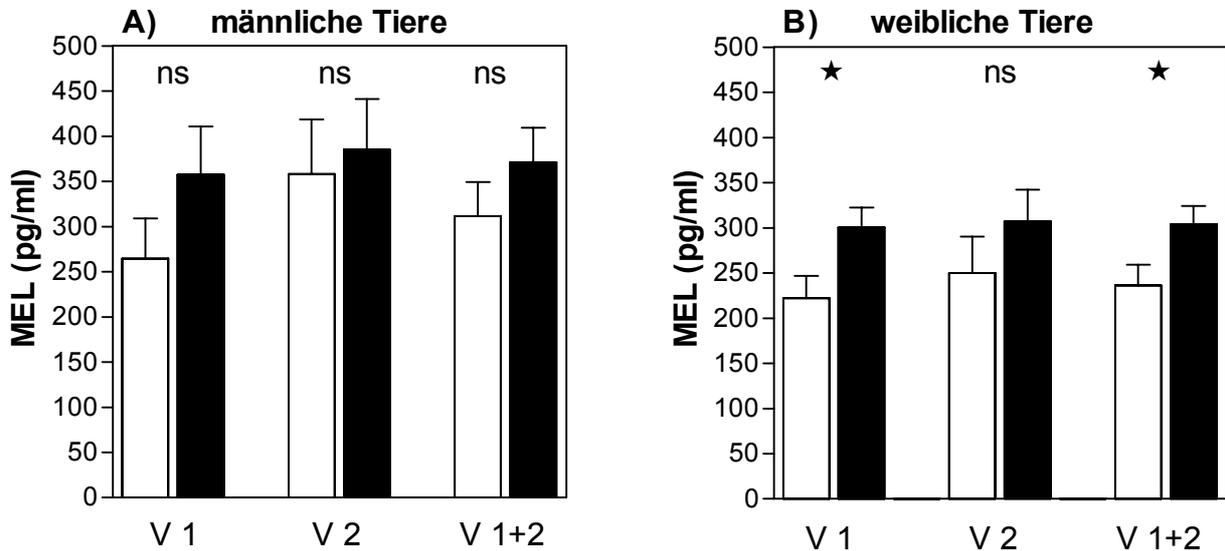


Abb. 27A und B: Plasmamelatoninkonzentrationen der bei einer Lichtintensität von 470 Lux gehaltenen männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Tage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht; Mittelwert \pm SEM, n=3, nicht signifikant (ns), $p < 0,05$ (*).

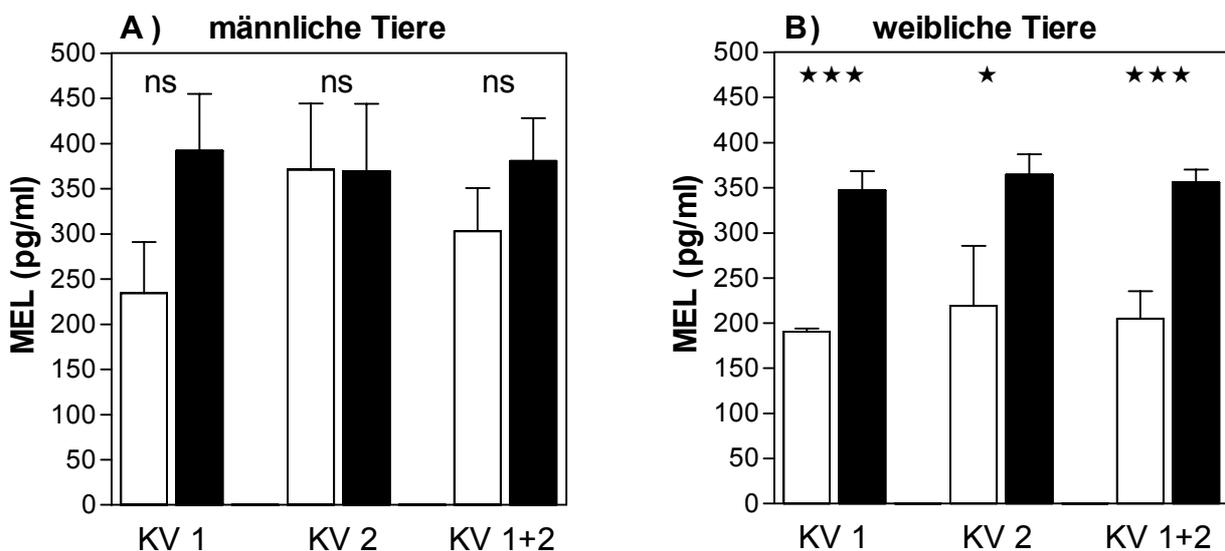


Abb. 28A und B: Plasmamelatoninkonzentrationen der bei einer Lichtintensität von 470 Lux gehaltenen männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) unter Ausschluss der Transitionszeiten am 1. Versuchstag (KV 1) und 2. Versuchstag (KV 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (KV 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht; Mittelwert \pm SEM, n=3, nicht signifikant (ns), $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***)

Die Tag/Nacht-Unterschiede der Plasmamelatoninkonzentrationen sind bei den männlichen Tieren an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant (Abb. 27A und 28A). Im Gegensatz dazu treten bei den weiblichen Tieren, wie in den Abb. 27B und 28B dargestellt, am ersten Untersuchungstag und in den Mittelwerten über beide Untersuchungstage sowohl unter Einbeziehung ($p_{V1}=0,025$; $p_{V1+2}=0,032$), wie auch unter Ausschluss der Transitionszeiten ($p_{KV1}<0,001$; $p_{KV1+2}<0,001$) signifikante Tag/Nacht-Unterschiede auf. Am zweiten Untersuchungstag sind die Tag/Nacht-Unterschiede nur unter Ausschluss der Transitionszeiten signifikant ($p=0,028$).

Die Tagproben weisen unter Ausschluss der Transitionszeiten am zweiten Untersuchungstag ($p=0,090$) und in den Mittelwerten der Tagproben beider Untersuchungstage ($p=0,071$) eine Tendenz zu signifikanten geschlechts-spezifischen Konzentrationsunterschieden auf, während sich die Konzentrationen der Nachtproben stets nicht signifikant unterscheiden.

In den Morgenproben sind weder bei den männlichen (Abb. 29A), noch bei den weiblichen Tieren (Abb. 29B) an beiden Untersuchungstagen über die je 24-stündige Phase der Probengewinnung, sowie zwischen den beiden Untersuchungstagen signifikante Konzentrationsunterschiede vorhanden.

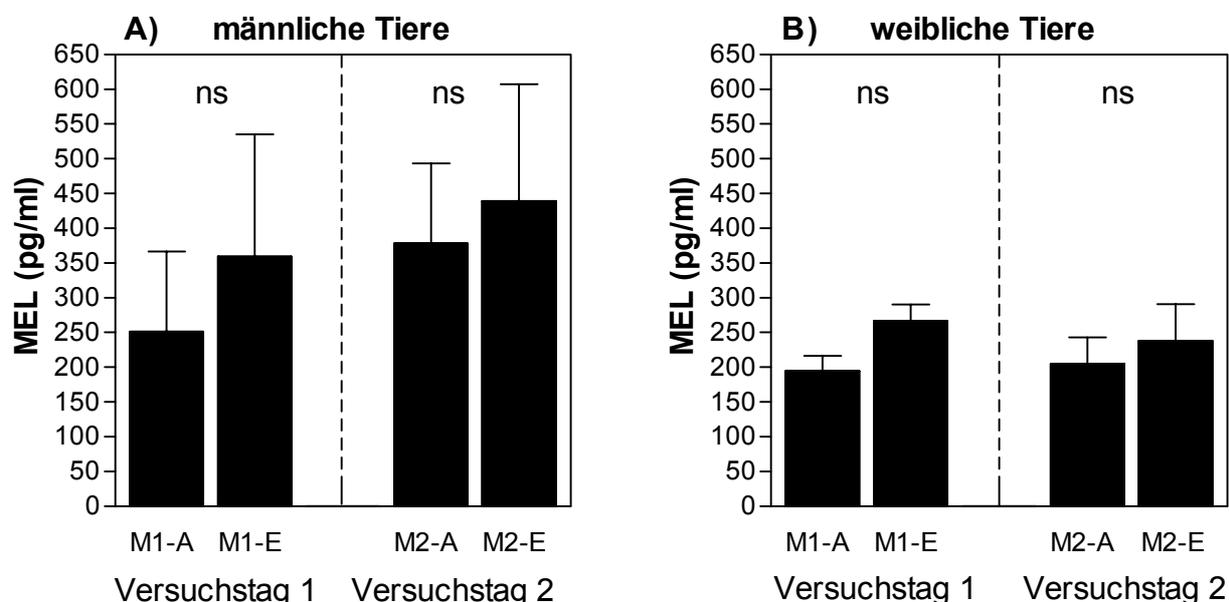


Abb. 29A und B: Plasmamelatoninkonzentrationen der um 7.00 Uhr entnommenen Proben der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) am 1. und 2. Versuchstag (ZGT -1 und 23). Mittelwert \pm SEM, $n=3$, nicht signifikant (ns).

Die geschlechtsabhängigen Unterschiede der Melatoninkonzentrationen in den Abendproben (ZGT 11) sind an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant. Im Gegensatz zu den männlichen Tieren sinkt die Plasmamelatoninkonzentration bei den weiblichen Tieren am ersten ($p=0,004$) und zweiten Untersuchungstag ($p=0,039$), sowie in den Mittelwerten über beide Untersuchungstage ($p<0,001$) signifikant zwischen den Nacht- und Morgenproben.

2.1.5. Abhängigkeit vom Geschlecht bei 250 Lux

Die Plasmamelatoninprofile der männlichen, bei 250 Lux gehaltenen Tiere weisen, wie in Abb. 30A dargestellt ist, über den Verlauf der Tagphase des ersten Untersuchungstages einen kontinuierlichen Konzentrationsanstieg und nahezu identische Melatoninkonzentrationen der Tag- und Nachtproben auf. Bei den weiblichen Tieren kommt es während der Tag- und während der Nachtphase des ersten Untersuchungstages zu einem diskontinuierlichen Konzentrationsanstieg im Plasmamelatoninprofil (Abb. 30A). Am zweiten Untersuchungstag (Abb. 30B) liegen

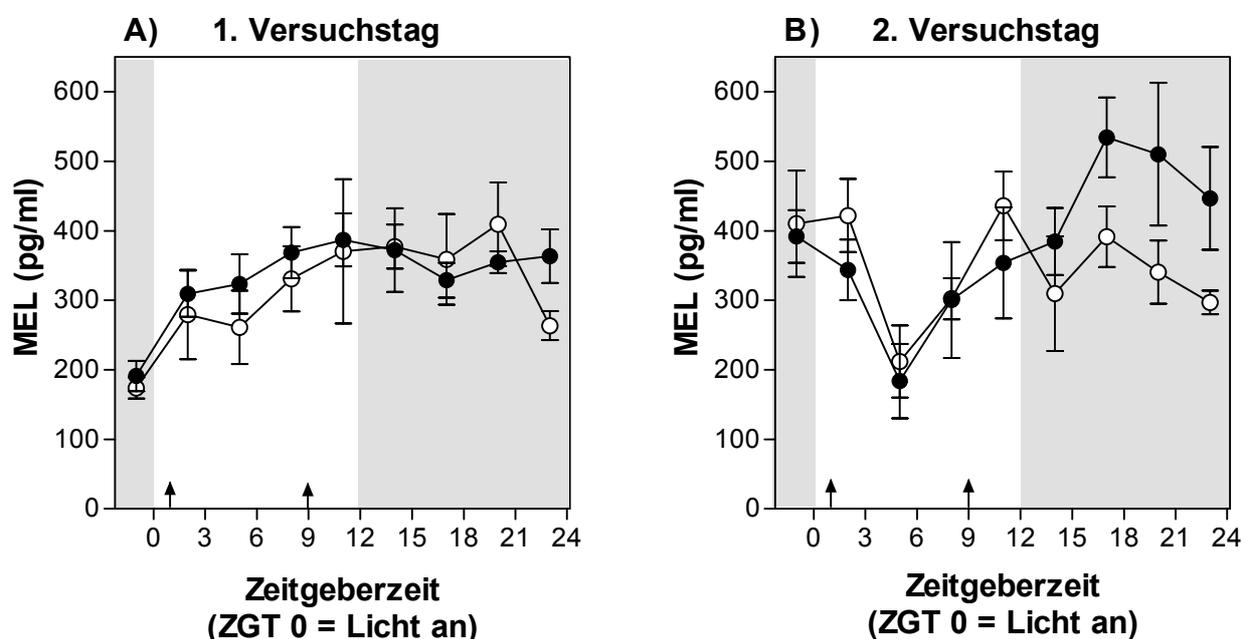


Abb. 30A und B: Plasmamelatoninprofile der bei einer Lichtintensität von 250 Lux gehaltenen männlichen (gefüllte Symbole) und weiblichen Tiere (offene Symbole) am 1. Versuchstag (A) und 2. Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

die Konzentrationen der Tagproben bei den männlichen, sowie bei den weiblichen Tieren, mit Ausnahme des Konzentrationseinbruches, der bei den weiblichen Tieren im signifikanten Bereich liegt ($p=0,046$), auf dem Niveau der Nachtwerte des ersten Untersuchungstages. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den jeweils vor und nach den Fütterungen entnommenen Proben sind bei den männlichen Tieren nach der Morgenfütterung des ersten Untersuchungstages signifikant ($p=0,040$), während sie nach den restlichen Fütterungen sowie bei der weiblichen Versuchsgruppe generell an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant sind.

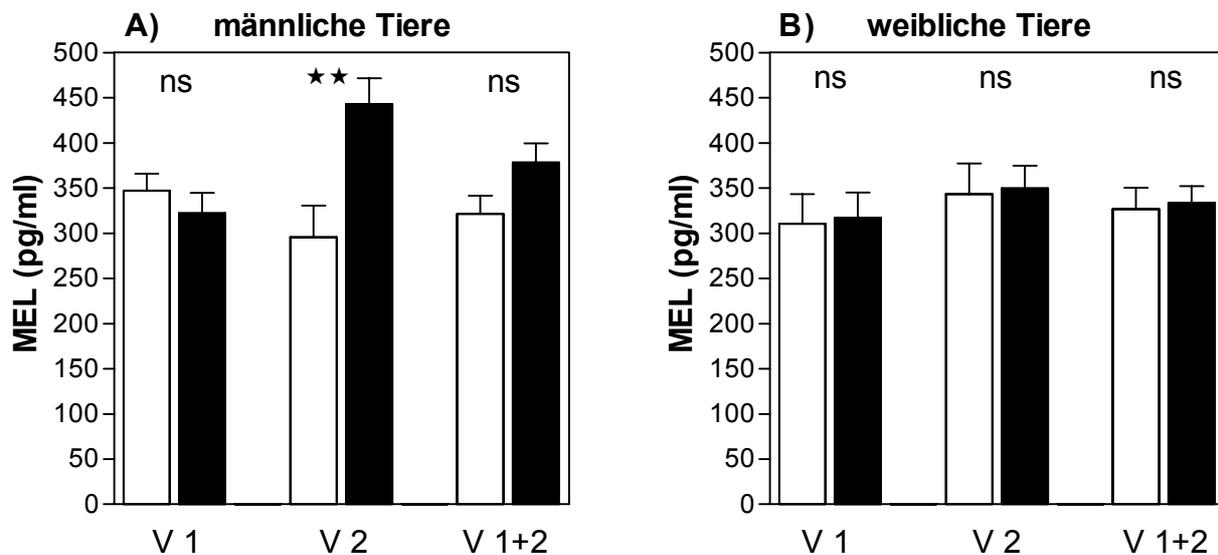


Abb. 31A und B: Plasmamelatoninkonzentration der bei einer Lichtintensität von 250 Lux gehaltenen männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, $n=3$, nicht signifikant (ns); $p<0,01$ (**).

Bei den männlichen Tieren sind die Tag/Nacht-Unterschiede am ersten Untersuchungstag nicht signifikant (Abb. 31A und 32A). Am zweiten Untersuchungstag treten sowohl unter Einbeziehung ($p=0,003$), als auch unter Ausschluss der Transitionszeiten signifikante Tag/Nacht-Unterschiede auf ($p=0,006$). Unter Ausschluss der Transitionszeiten sind bei den männlichen Tieren auch die Tag/Nacht-Unterschiede der Mittelwerte beider Untersuchungstage signifikant ($p=0,008$). Bei den weiblichen Tieren (Abb. 31B und 32 B) ist nur am ersten Untersuchungstag unter Ausschluss der Transitionszeiten ein signifikanter Konzentrationsunterschied vorhanden ($p=0,039$). Zwischen dem ersten und zweiten

Untersuchungstag steigen die Melatoninkonzentrationen der Nachtproben in der Gruppe der männlichen Tiere, im Gegensatz zu den weiblichen Tieren, unter Einbeziehung ($p=0,002$), sowie nach Ausschluss der Transitionszeiten ($p=0,023$) signifikant an. Die Nachtmelatoninkonzentrationen der männlichen Tiere sind am zweiten Untersuchungstag sowohl unter Einbeziehung ($p=0,020$), als auch nach Ausschluss der Transitionszeiten ($p=0,043$), signifikant höher als die der weiblichen Tiere.

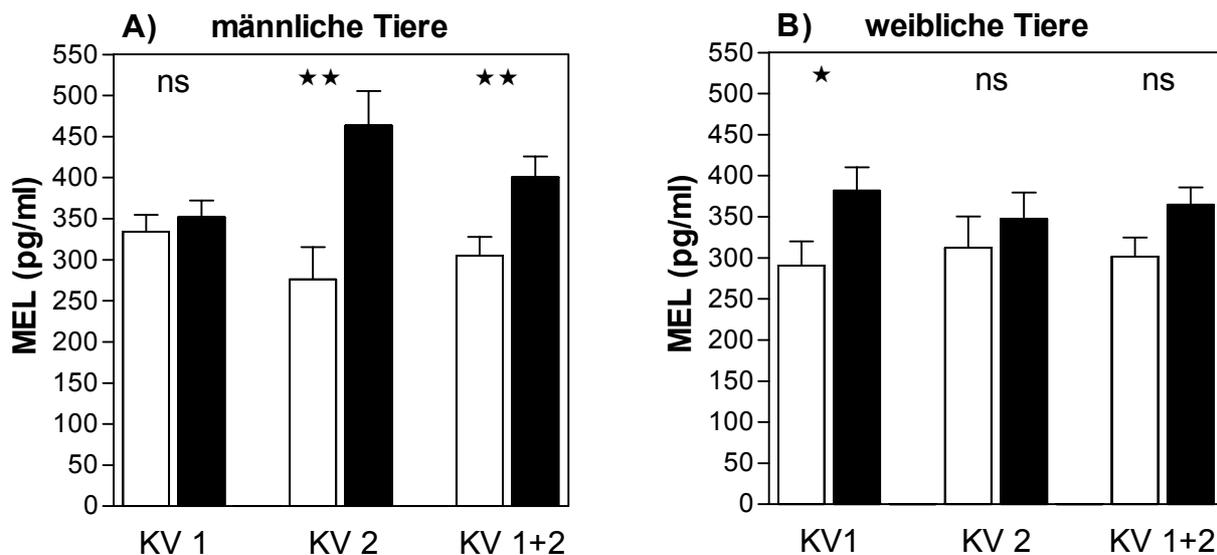


Abb. 32A und B: Plasmamelatoninkonzentrationen der bei einer Lichtintensität von 250 Lux gehaltenen männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) unter Ausschluss der Transitionszeiten am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, $n=3$, nicht signifikant (ns), $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**).

Die Melatoninkonzentrationen der Morgenproben steigt am ersten Untersuchungstag bei den männlichen ($p=0,018$) und bei den weiblichen Tieren ($p=0,035$) signifikant an, wie in den Abb. 33A und B zu sehen ist. Die jeweils ersten Proben beider Untersuchungstage unterscheiden sich nur bei den männlichen Tieren signifikant ($p=0,010$). Die Konzentrationsunterschiede zwischen der ersten Probe des ersten Untersuchungstages und der letzten Probe des zweiten Untersuchungstages sind sowohl bei den männlichen ($p=0,030$), als auch bei den weiblichen Tieren ($p=0,006$) signifikant. Die Mittelwerte der Morgenproben des ersten und zweiten Untersuchungstages unterscheiden sich nur bei den männlichen Tieren signifikant ($p=0,035$). Die Konzentrationsunterschiede der Abendproben (ZGT 11) zwischen den männlichen und den weiblichen Tieren sind an beiden Untersuchungstagen nicht

signifikant. Der Konzentrationsunterschied zwischen den Nacht- und den Morgenproben der weiblichen Tiere ist am ersten Untersuchungstag ($p=0,001$), sowie in den Mittelwerten beider Untersuchungstage ($p=0,039$) signifikant, während er in der Gruppe der männlichen Tiere nicht signifikant ist.

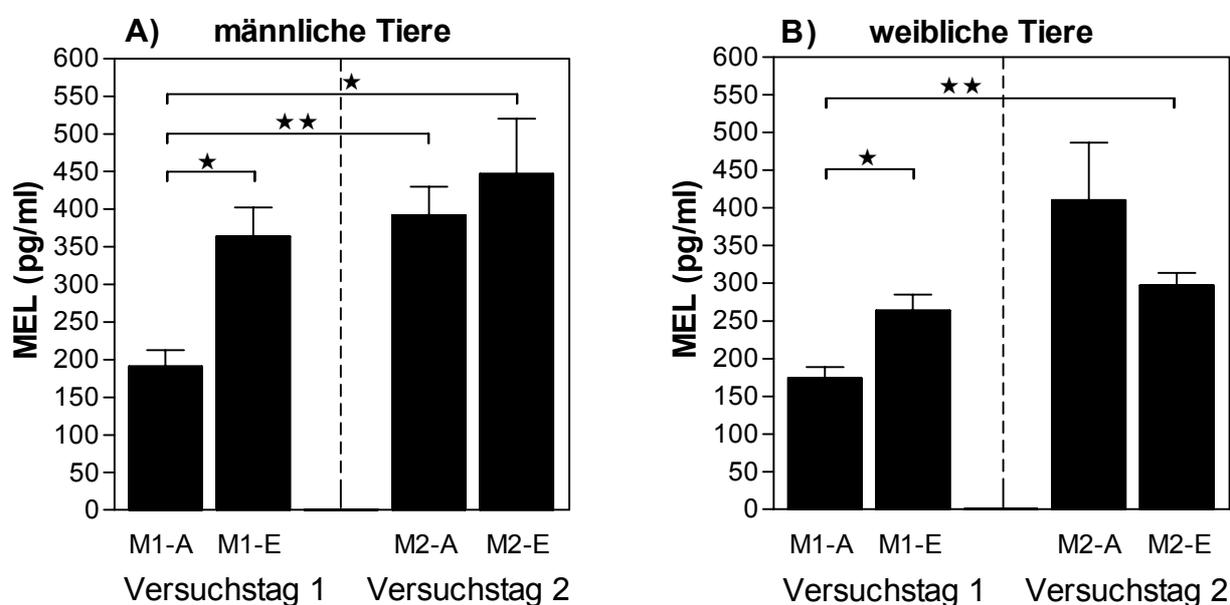


Abb. 33A und B: Plasmamelatonininkonzentrationen der um 7.00 Uhr entnommenen Proben der männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) am 1. und 2. Versuchstag (ZGT -1 und 23). Mittelwert \pm SEM, $n=3$, $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**).

2.1.6. Abhängigkeit vom Geschlecht und der Lichtintensität

Die Plasmamelatoninprofile der männlichen Versuchsgruppen unterscheiden sich am ersten Untersuchungstag im Konzentrationsverlauf der Tagproben (Abb. 34A). Die Konzentration der 470 Lux Gruppe steigt über den Tagesverlauf kontinuierlich an, erreicht jedoch erst in der letzten Tagprobe das Niveau der Nachtproben. Die Melatonininkonzentrationen in der 250 Lux Gruppe bleibt im Anschluss an den signifikanten Konzentrationsanstieg ($p=0,040$) zwischen den vor sowie nach Tagesbeginn entnommenen Proben, gantztägig auf diesem Niveau. Am zweiten Untersuchungstag liegen die Konzentrationen während der Tagphase bei den männlichen 470 Lux Tieren auf dem Niveau der Nachtproben des ersten Untersuchungstages (Abb. 34B).

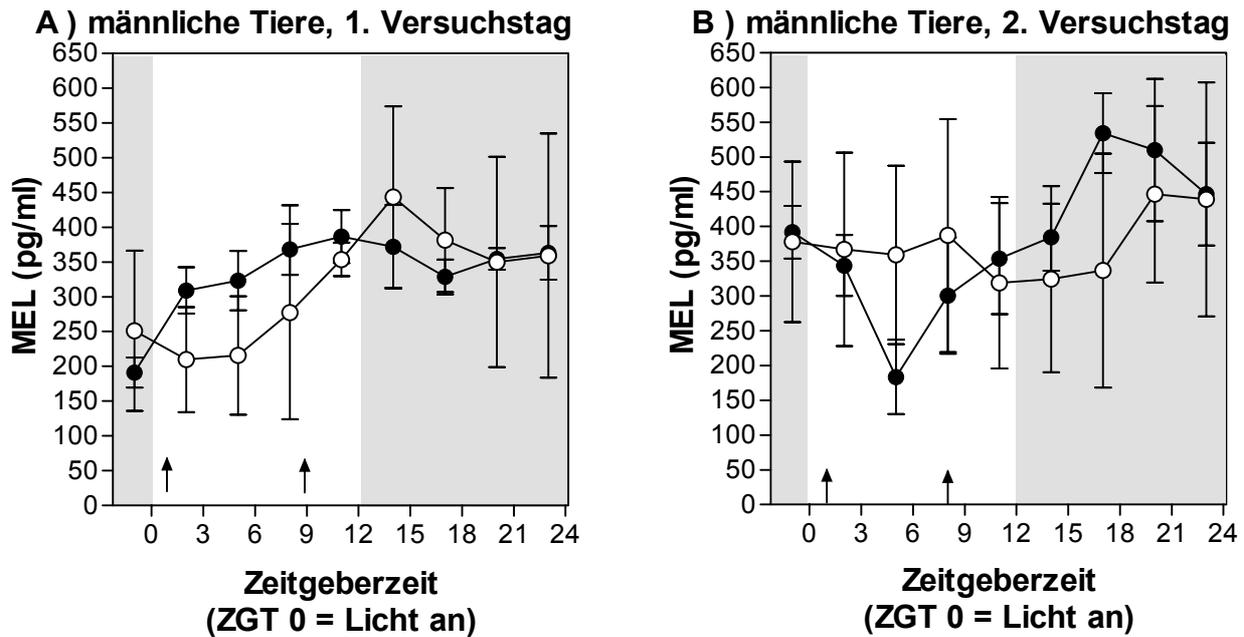


Abb. 34A und B: Plasmamelatoninprofile der männlichen Tiere bei 470 Lux (offene Symbole) und bei 250 Lux (gefüllte Symbole) am ersten Versuchstag (A) und zweiten Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

In der bei 250 Lux Lichtintensität gehaltenen Versuchsgruppe kommt es am zweiten Untersuchungstag zu einem Konzentrationsrückgang während der Tagphase aufgrund des fünf Stunden nach Tagesbeginn auftretenden Konzentrations-einbruches.

Die bei 470 Lux gehaltenen weiblichen Tiere zeigen am ersten Untersuchungstag ein klares nokturnales Konzentrationsprofil mit niedrigen, eine Plateauphase bildenden Tagwerten und einem dem Nachtbeginn vorausgehenden Konzentrationsanstieg, der sich bis zur zweiten Nachthälfte fortsetzt (Abb. 35A). Dagegen erfolgt in der 250 Lux Gruppe am ersten Untersuchungstag ein unregelmäßiger Konzentrationsanstieg, mit einem geringen weiteren Anstieg der nächtlichen Konzentration, wobei sich die Konzentrationen der Nachtproben kaum von den Konzentrationen der Tagproben unterscheiden. Am zweiten Untersuchungstag bleibt das Melatoninprofil in der weiblichen 470 Lux Gruppe erhalten, wobei das Konzentrationsniveau der Nachtproben bereits ab der zweiten Tageshälfte durch einen signifikanten Konzentrationsanstieg ($p=0,044$) erreicht wird (Abb. 35B).

Die Konzentrationsunterschiede zwischen den jeweils vor und nach den Fütterungen entnommenen Proben sind bei den männlichen 250 Lux Tieren nach der

Morgenfütterung des ersten Untersuchungstages signifikant ($p=0,040$), während sie nach den restlichen Fütterungen, sowie bei der 470 Lux Gruppe generell nicht signifikant sind.

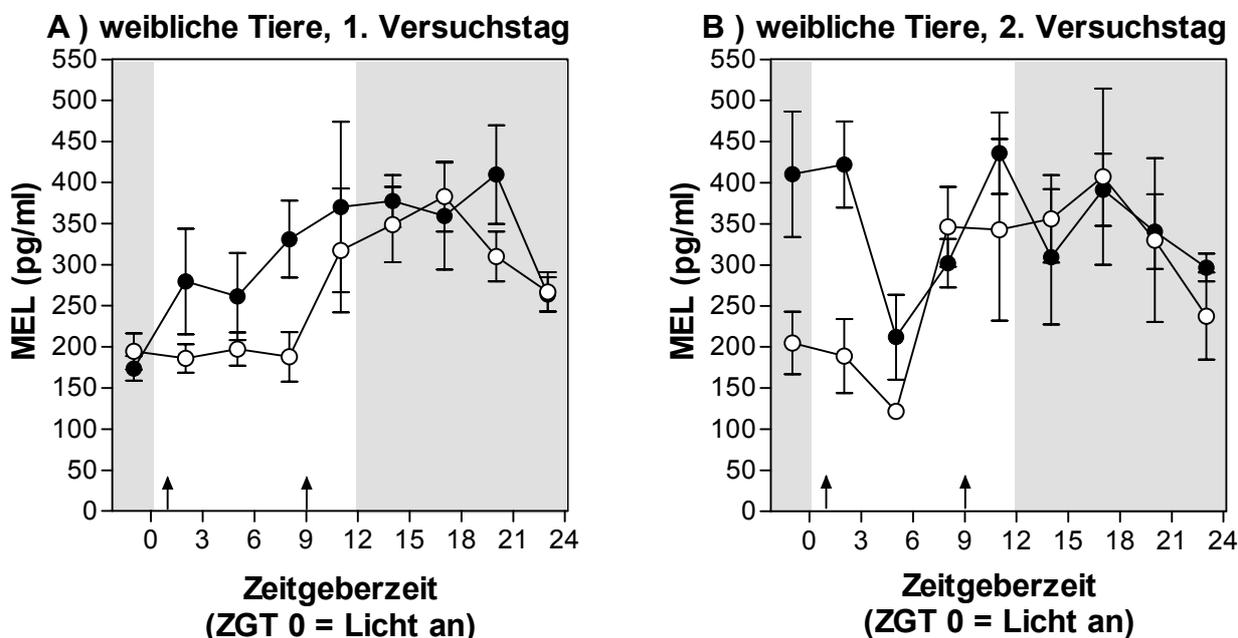


Abb. 35A und B: Plasmamelatoninprofile der weiblichen Tiere bei 470 Lux (offene Symbole) und bei 250 Lux Lichtintensität (gefüllte Symbole) am 1. Versuchstag (A) und 2. Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

Die männlichen Tiere der 470 Lux und der 250 Lux Gruppe unterscheiden sich hinsichtlich der Existenz signifikanter Tag/Nacht-Unterschiede. Während diese in der 470 Lux Gruppe fehlen, sind die Unterschiede in der 250 Lux Gruppe am zweiten Untersuchungstag sowohl unter Einbeziehung ($p=0,003$) als auch unter Ausschluss der Transitionszeiten ($p=0,006$) signifikant (Abb. 31A und 32A). In beiden Gruppen der weiblichen Tiere ist ein signifikanter Einfluss der Lichtintensität auf die Plasmamelatoninkonzentration der Tagproben vorhanden. Unter Einbeziehung der Transitionszeiten sind die Melatoninkonzentrationen in den Tagproben der weiblichen 250 Lux Gruppe am ersten Untersuchungstag ($p=0,042$) und in den Mittelwerten über beide Tagphasen signifikant ($p=0,009$) höher als die der 470 Lux Gruppe. Unter Ausschluss der Transitionszeiten werden die Konzentrationsunterschiede zwischen den Tagproben des ersten Untersuchungstages ($p=0,010$) und den Mittelwerten über die Tagphasen beider Untersuchungstage ($p=0,003$)

zwischen den beiden Gruppen größer. Bei der 470 Lux Gruppe sind unter Einbeziehung der Transitionszeiten am ersten Untersuchungstag ($p=0,025$) und in den Mittelwerten über beide Tage ($p=0,032$) signifikante Tag/Nacht-Unterschiede vorhanden (Abb. 27B), während sie in der 250 Lux Gruppe nicht signifikant bleiben (Abb. 31B). Nach Ausschluss der Transitionszeiten ist in der 250 Lux Gruppe ausschließlich am ersten Untersuchungstag ein signifikanter Unterschied vorhanden ($p=0,039$) (Abb. 32B). Im Gegensatz dazu sind die Tag/Nacht-Unterschiede nach Ausschluss der Transitionszeiten in der 470 Lux Gruppe auch am zweiten Untersuchungstag signifikant ($p=0,028$). Die Melatoninkonzentrationen der Morgenproben unterscheiden sich weder bei den männlichen (Abb. 29A und 33A), noch bei den weiblichen Tieren signifikant zwischen den beiden Lichtintensitäten (Abb. 29B und 33B). Der Mittelwert der Melatoninkonzentration der beiden Morgenproben des ersten Untersuchungstages ist in der weiblichen 470 Lux Gruppe nicht signifikant unterschiedlich zur 250 Lux Gruppe, hingegen ist der Mittelwert am zweiten Untersuchungstag signifikant niedriger als in der 250 Lux Gruppe ($p=0,031$). Die Melatoninkonzentration der Abendproben (ZGT 11) sind sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren der 250 Lux Gruppen an beiden Untersuchungstagen höher als bei den 470 Lux Gruppen, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Bei den weiblichen Tieren sind die Konzentrationsunterschiede zwischen den Nacht- und den Morgenproben am ersten Untersuchungstag ($p_{470lx}=0,004$; $p_{250lx}=0,001$) und in den Mittelwerten über beide Untersuchungstage in beiden Versuchsgruppen signifikant ($p_{470lx}<0,001$; $p_{250lx}=0,039$). Darüber hinaus ist dieser Unterschied in der 470 Lux Gruppe auch am zweiten Untersuchungstag signifikant ($p=0,039$). Bei den männlichen Tieren sind diese Konzentrationsunterschiede nur am zweiten Untersuchungstag und nur in der 250 Lux Gruppe signifikant ($p=0,028$).

2.2. Ergebnisse der Speichelmelatoninbestimmung

2.2.1. Gesamtgruppe

Die Speichelmelatoninkonzentrationen aller Tiere (Abb. 36) weisen am ersten Untersuchungstag einen diurnalen Konzentrationsverlauf mit einem über die Tagphase nahezu kontinuierlichen Anstieg der Melatoninkonzentrationen und einem Konzentrationsmaximum in der letzten Tagprobe auf. Nach Tagesende sowie über die Nachtphase sinken die Melatoninkonzentrationen deutlich gegenüber den Tagwerten ab. Am zweiten Untersuchungstag befinden sich die Konzentrationen der Tagproben auf dem Niveau der Nachtproben des ersten Untersuchungstages. Sie sind jedoch niedriger als die ihnen vorausgegangenen Tagproben. Die Konzentrationsunterschiede sind auf Grund des großen Standardfehlers stets nicht signifikant.

An beiden Untersuchungstagen ist der Konzentrationsunterschied zwischen den jeweils vor und nach den Fütterungen entnommenen Speichelproben ebenfalls nicht signifikant.

Die Speichelproben weisen weder unter Einbeziehung, noch unter Ausschluss der Transitionszeiten signifikante Tag/Nacht-Unterschiede der Melatoninkonzentrationen auf, wie aus den Abb. 37A und B ersichtlich ist. Am ersten Untersuchungstag, sowie in den Mittelwerten über beide Untersuchungstage enthalten die Tagproben unter Einbeziehung, sowie unter Ausschluss der Transitionszeiten eine deutlich höhere Melatoninkonzentration als die Nachtproben. Die Tag/Nacht-Unterschiede sind

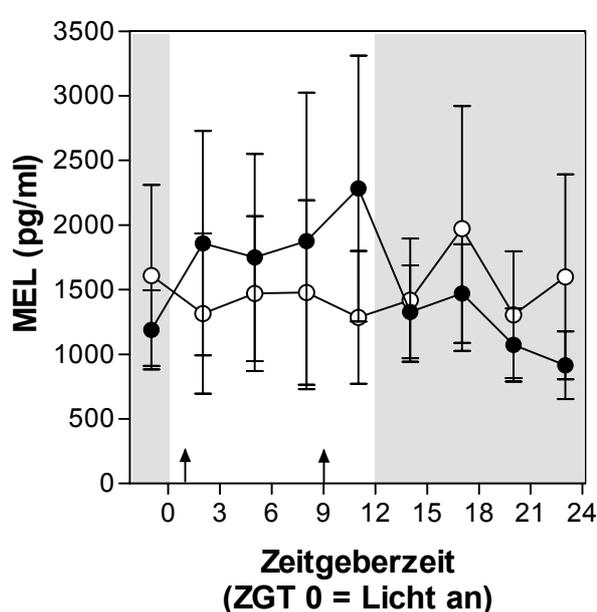


Abb. 36: Speichelmelatoninprofil der Schweine am 1. Versuchstag (gefüllte Symbole) und am 2. Versuchstag (offene Symbole). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, $n=12$.

aufgrund des großen Standardfehlers stets nicht signifikant ($p_{(V1)}=0,142$; $p_{(KV1)}=0,362$).

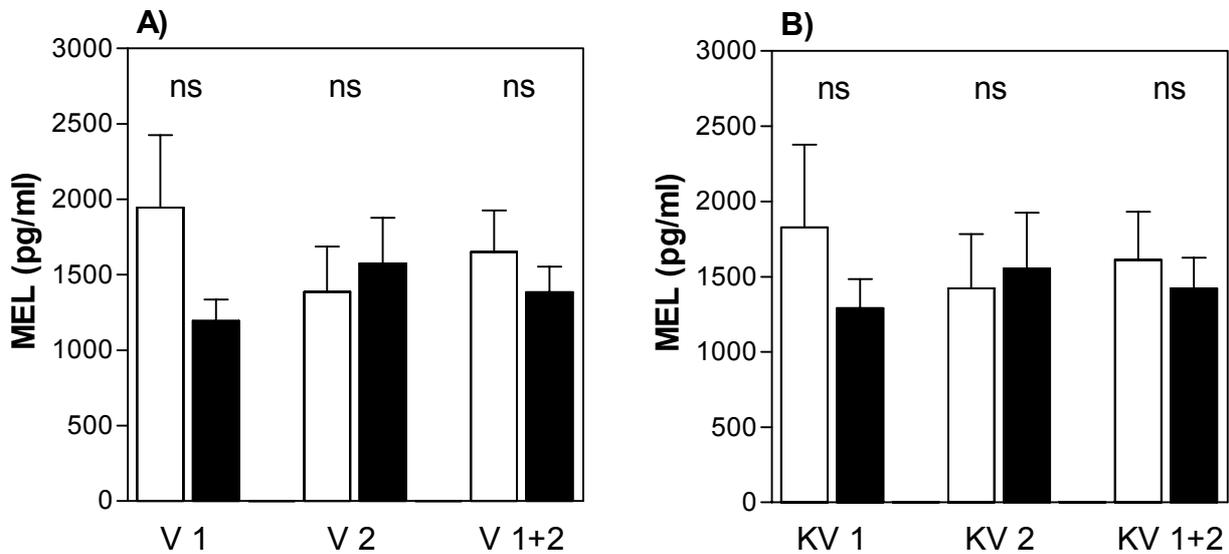


Abb. 37A und **B**: Speichelmelatoninkonzentrationen der Gesamtgruppe unter Einbeziehung (A) und unter Ausschluss der Transitionszeiten (B) am 1. Versuchstag (V 1, KV 1) und 2. Versuchstag (V 2, KV 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2, KV). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, n=12, nicht signifikant (ns).

Die Mittelwerte der Melatoninkonzentrationen weisen ebenfalls keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen dem ersten und zweiten Untersuchungstag auf. In Abb. 38 wird deutlich, dass die Speichelmelatoninkonzentrationen der um 7.00 Uhr (ZGT -1 und 23) entnommenen Proben am ersten Untersuchungstag zwischen der ersten (M1-A) und der letzten Speichelprobe (M1-E) leicht sinkt. Sie steigt bis zu Beginn des zweiten Untersuchungstages (M2-A) jedoch deutlich an und überschreitet die zu Beginn des ersten Untersuchungstages gemessene Konzentration. Am zweiten

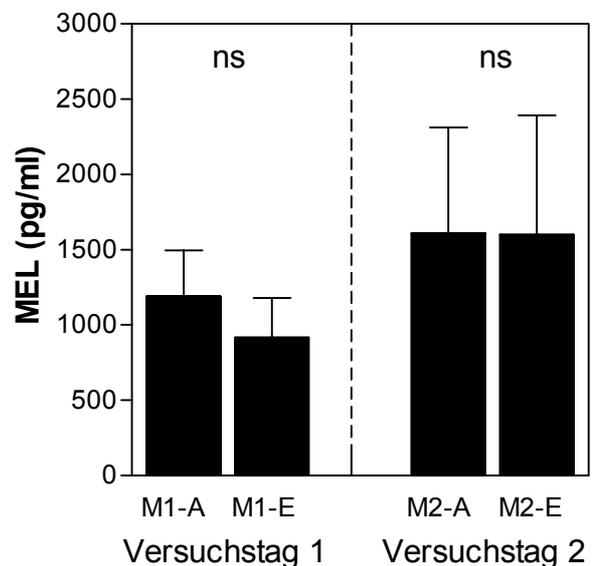


Abb. 38: Speichelmelatoninkonzentrationen der um 7.00 Uhr entnommenen Proben am 1. und 2. Versuchstag (ZGT -1 und 23). Mittelwert \pm SEM, n=12, nicht signifikant (ns).

Untersuchungstag ist die Konzentration der ersten Probe (M2-A) mit der der letzten Probe (M2-E) identisch.

Die Melatoninkonzentration der Abendproben (ZGT 11) ist am ersten Untersuchungstag deutlich höher als am zweiten Untersuchungstag, der Unterschied ist aufgrund der individuellen Unterschiede jedoch ebenfalls nicht signifikant.

2.2.2. Abhängigkeit vom Geschlecht

Die Speichelmelatoninprofile der männlichen und der weiblichen Tiere unterscheiden sich sowohl in ihrem Konzentrationsverlauf, als auch in den Melatoninkonzentrationen. Das Speichelmelatoninprofil der männlichen Tiere weist am ersten Untersuchungstag einen unregelmäßigen Konzentrationsverlauf auf (Abb. 39A). Im Gegensatz dazu weist das Speichelmelatoninprofil der weiblichen Tiere am ersten Untersuchungstag einen diurnalen Konzentrationsverlauf mit einem deutlichen Konzentrationsanstieg nach Tagesbeginn und einem deutlichen Konzentrationsrückgang nach Tagesende auf. Am zweiten Untersuchungstag ist in keiner der beiden Gruppen ein mit dem ersten Untersuchungstag übereinstimmendes

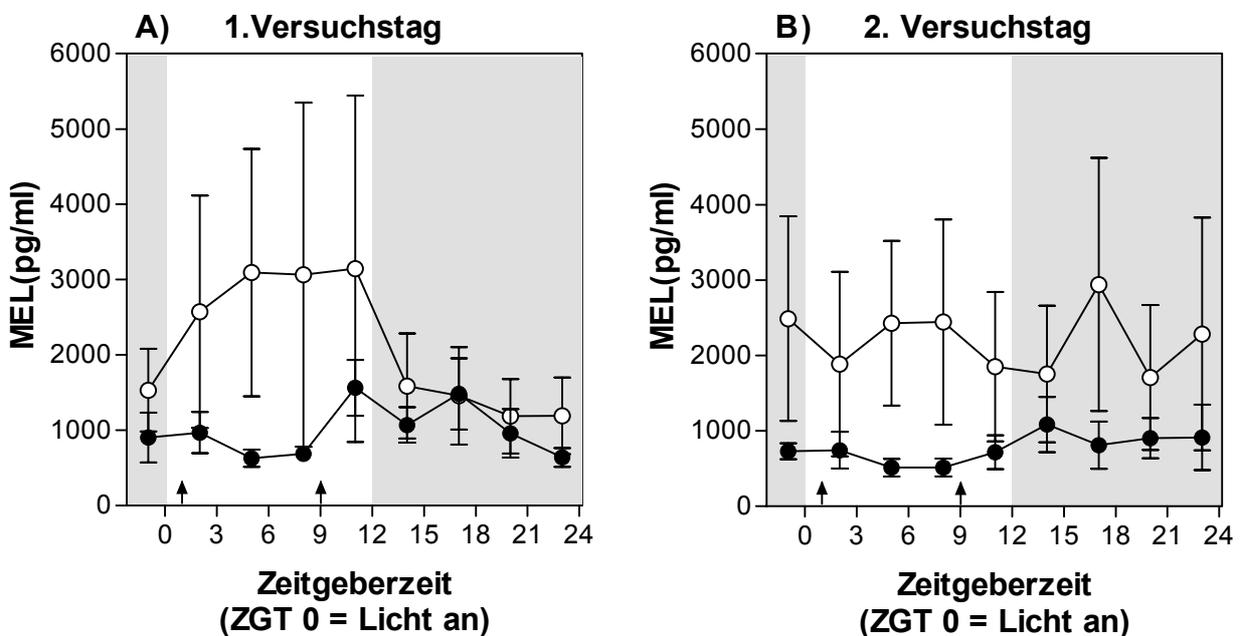


Abb. 39A und B: Speichelmelatoninprofil der männlichen (gefüllte Symbole) und weiblichen Tiere (offene Symbole) am 1. Versuchstag (A) und 2. Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, n=6.

Melatoninprofil ausgebildet, da unregelmäßige Konzentrationsschwankungen auftreten (Abb. 39B). Während die Melatoninkonzentrationen der männlichen Tiere an beiden Untersuchungstagen nach der ersten Tageshälfte sinken, und in den fünf und acht Stunden nach Tagesbeginn entnommenen Proben am geringsten sind, enthalten die fünf und acht Stunden nach Tagesbeginn entnommenen Speichelproben der weiblichen Tiere an beiden Untersuchungstagen die höchsten Konzentrationen der Tagphasen. Die Melatoninkonzentrationen der jeweils vor und nach den Fütterungen entnommenen Proben unterscheiden sich sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant.

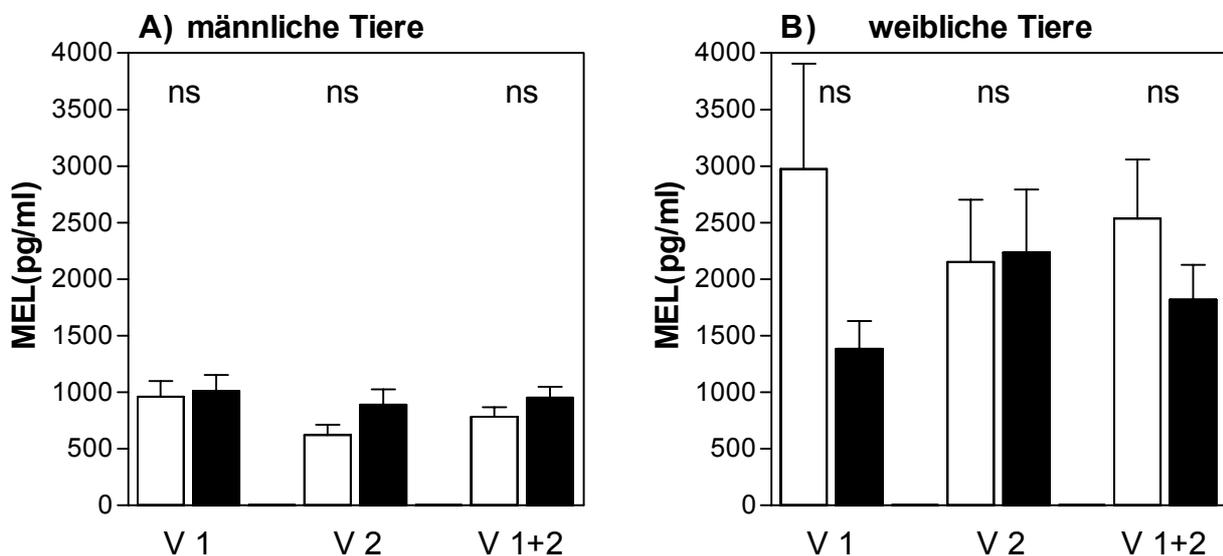


Abb. 40A und B: Speichelmelatoninkonzentrationen der männlich-kastrierten (A) und weiblichen Tiere (B) am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, n=6, nicht signifikant (ns).

Unter Einbeziehung der Transitionszeiten können weder bei den männlich-kastrierten, noch bei den weiblichen Tieren signifikante Tag/Nacht-Unterschiede festgestellt werden. Im Gegensatz zu den männlich-kastrierten Tieren (Abb. 40A), die nachts stets höhere Melatoninkonzentrationen erreichen als tagsüber, sind die Konzentrationen bei den weiblichen Tieren am ersten Untersuchungstag und in den Mittelwerten (Abb. 40B) über beide Untersuchungstage tagsüber deutlich höher. Zwischen den beiden Untersuchungstagen sinkt die Speichelmelatoninkonzentration der Tagproben bei den männlichen Tiere signifikant ($p=0,047$). Die weiblichen Tiere

erreichen an beiden Untersuchungstagen sowohl in den Tag- als auch in den Nachtproben deutlich höhere Speichelmelatoninkonzentrationen als die männlichen Tiere. In den Tagproben sind die Konzentrationsunterschiede zwischen den weiblichen und den männlichen Tieren am ersten Untersuchungstag ($p=0,045$) und am zweiten Untersuchungstag ($p=0,011$) signifikant. In den Nachtproben sind die Konzentrationsunterschiede am ersten Untersuchungstag nicht signifikant, während sie sich am zweiten Untersuchungstag signifikant ($p=0,025$) unterscheiden. Die Mittelwerte über beide Untersuchungstage unterscheiden sich in den Tagproben ($p=0,002$) und in den Nachtproben ($p=0,010$) ebenfalls signifikant.

Unter Ausschluss der Transitionszeiten sind die Tag/Nacht-Unterschiede der männlichen Tiere nur in den Mittelwerten über beide Tage signifikant ($p=0,010$), während am ersten Untersuchungstag eine Tendenz zur Signifikanz ($p=0,059$) auftritt und diese auch am zweiten Untersuchungstag in etwas weniger ausgeprägter Form ($p=0,093$) vorhanden ist (Abb. 41A). Die Melatoninkonzentrationen der Nachtproben sind bei den männlichen Tieren stets höher als die der Tagproben.

Die Tag/Nacht-Unterschiede sind in den Proben der weiblichen Tiere weder unter Einbeziehung (Abb. 40B), noch unter Ausschluss der Transitionszeiten (Abb. 41B) signifikant, wobei die Konzentrationen der Tagproben unter Ausschluss der

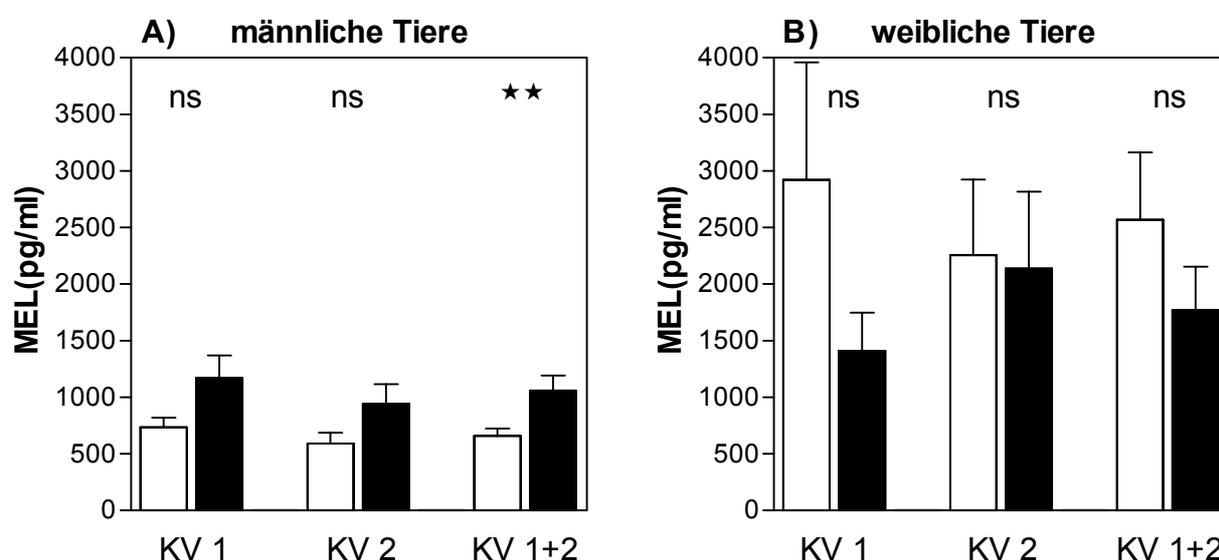


Abb. 41A und B: Speichelmelatoninkonzentrationen der männlichen (A) und der weiblichen Tiere (B) unter Ausschluss der Transitionszeiten am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, $n=6$, nicht signifikant (ns), $p<0,01$ (**).

Transitionszeiten an beiden Untersuchungstagen höher sind als die der Nachtproben.

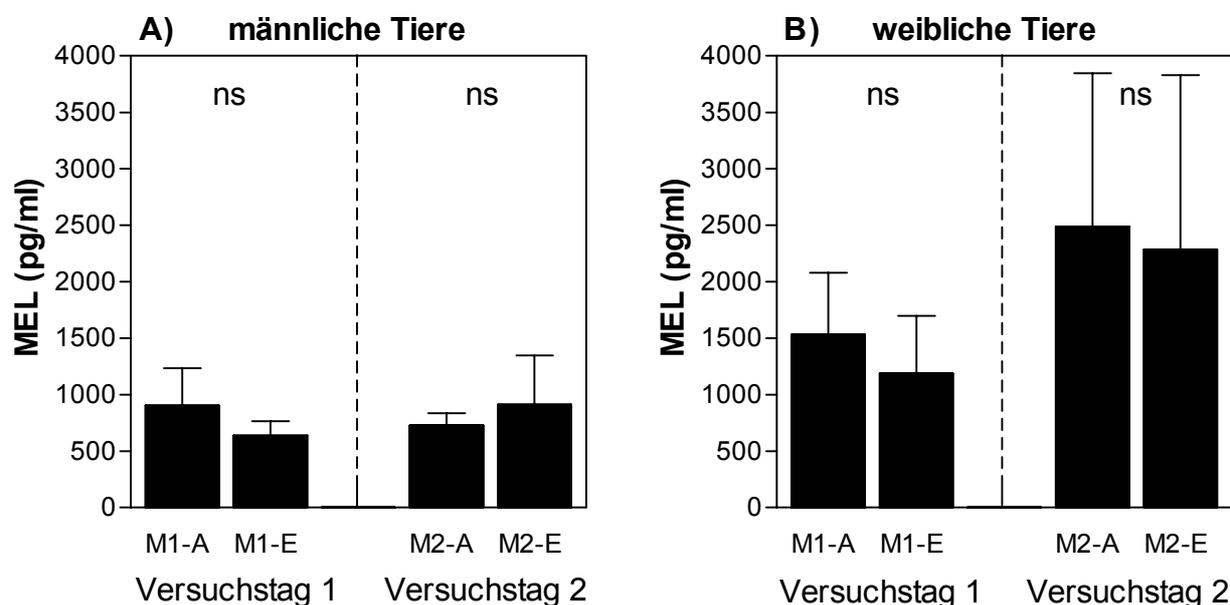


Abb. 42A und B: Speichelmelatoninkonzentrationen der um 7.00 Uhr entnommenen Proben bei männlichen (A) und weiblichen Tieren (B) am 1. und 2. Versuchstag (ZGT -1 und 23). Mittelwert \pm SEM, n=6, nicht signifikant (ns).

Wie aus den Abb. 42 A und B ersichtlich, unterscheiden sich die Melatoninkonzentrationen der Morgenproben an beiden Untersuchungstagen weder bei den männlichen, noch bei den weiblichen Tieren. Die Speichelmelatoninkonzentrationen der Morgenproben sind bei den weiblichen Tieren stets höher als bei den männlichen Tieren, die Konzentrationsunterschiede sind aufgrund der bei den weiblichen Tieren insbesondere am zweiten Untersuchungstag auftretenden individuellen Konzentrationsunterschiede stets nicht signifikant. Die Melatoninkonzentrationen der Abendproben (ZGT 11) sind bei den weiblichen Tieren an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant höher als bei den männlichen Tieren, während die Mittelwerte über die Abendproben beider Untersuchungstage eine Tendenz zu geschlechtsspezifischen Konzentrationsunterschieden aufweisen ($p=0,061$). Bei den männlichen Tieren ist die Melatoninkonzentration der Morgenproben am ersten Untersuchungstag signifikant niedriger ($p=0,041$) als die der Abendproben. Beim Übergang zwischen Tag- und Nachtphase sowie umgekehrt sind die Konzentrationsunterschiede sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren an beiden Untersuchungstagen stets nicht signifikant.

2.2.3. Abhängigkeit von der Lichtintensität

Die Speichelmelatoninprofile der bei 470 Lux und der bei 250 Lux Lichtintensität gehaltenen Tiere unterscheiden sich sowohl in den Melatoninkonzentrationen, als auch in ihrem Konzentrationsverlauf. Das Speichelmelatoninprofil der bei 470 Lux Lichtintensität gehaltenen Versuchsgruppe weist am ersten Untersuchungstag, wie in Abb. 43A dargestellt, einen diurnalen Konzentrationsverlauf mit einem deutlichen, aber nicht signifikanten Konzentrationsanstieg während der Tagphase und einem ebenfalls nicht signifikanten Konzentrationsrückgang nach Tagende auf. Im Gegensatz dazu kommt es im Melatoninprofil der 250 Lux Tiere über die Tagphase zu einem kontinuierlichen Konzentrationsrückgang und zu einem Konzentrationsanstieg in der letzten Tagprobe. Am zweiten Untersuchungstag sind die Profile beider Versuchsgruppen nicht mehr ausgebildet (Abb. 43B). In der 470 Lux Gruppe liegen die Melatoninkonzentrationen der Tagphase über dem Niveau der Nachtwerte, aber noch unter den Tagwerten des ersten Untersuchungstages. In der 250 Lux Gruppe sind die Melatoninkonzentrationen sowohl während der Tag-, als auch während der Nachtphase niedriger als am ersten Untersuchungstag.

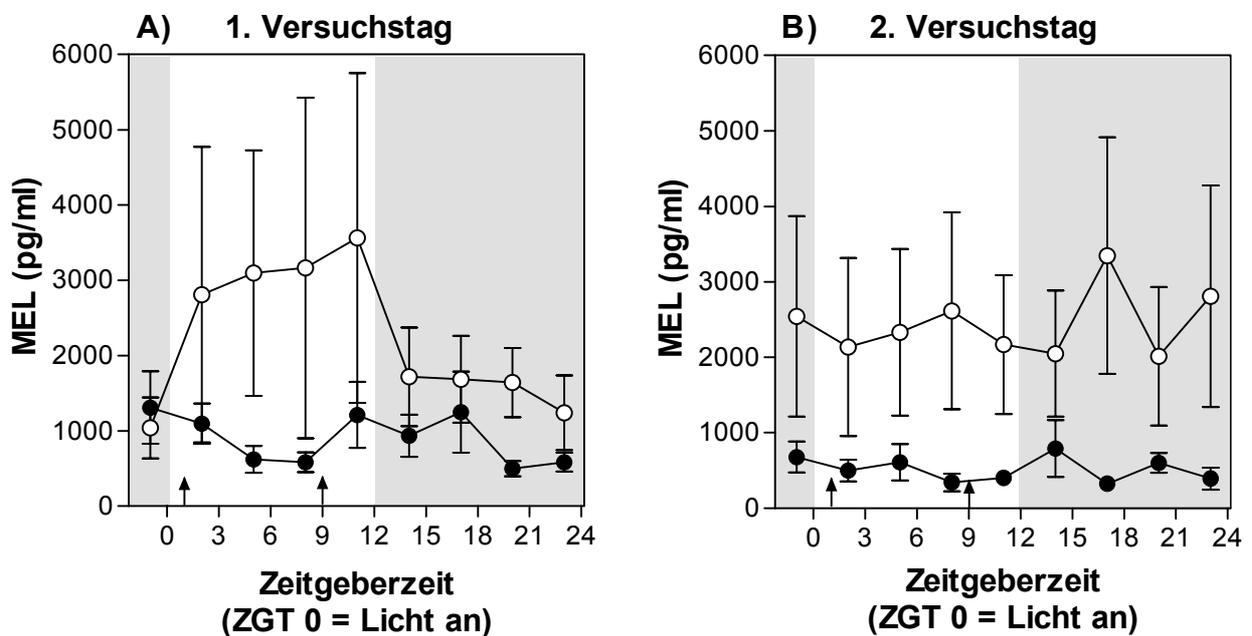


Abb. 43A und B: Speichelmelatoninprofile der bei 470 Lux (offene Symbole) und bei 250 Lux Lichtintensität (gefüllte Symbole) gehaltenen Tiere am 1. (A) und 2. Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, n=6.

Die Melatoninkonzentrationen der jeweils vor und nach den Fütterungen entnommenen Proben unterscheiden sich sowohl in der bei 470 Lux Lichtintensität, als auch in der bei 250 Lux Lichtintensität gehaltenen Tieren an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant.

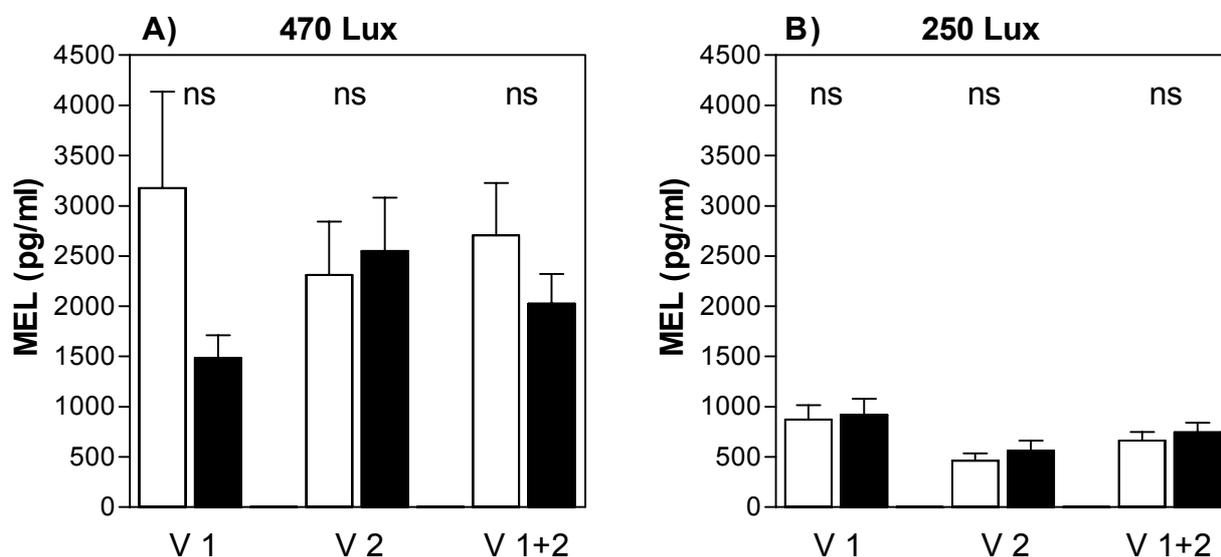


Abb. 44A und B: Speichelmelatoninkonzentrationen der bei 470 Lux (A) und bei 250 Lux (B) gehaltenen Tiere am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, $n=6$, nicht signifikant (ns).

In beiden Versuchsgruppen sind die Tag/Nacht-Unterschiede sowohl bei Einbeziehung, als auch nach Ausschluss der Transitionszeiten nicht signifikant. Während in der bei 470 Lux Lichtintensität gehaltenen Versuchsgruppe, wie in den Abb. 44A und 45A dargestellt, die Melatoninkonzentrationen der Tagphase am ersten Untersuchungstag und in den Mittelwerten über beide Untersuchungstage deutlich, infolge der großen individuellen Konzentrationsunterschiede aber nicht signifikant höher sind als die der Nachtphase, weisen die Speichelproben der 250 Lux Versuchsgruppe an beiden Untersuchungstagen einen geringen nächtlichen Konzentrationsanstieg auf, wie den Abb. 44B und 45B zu entnehmen ist. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Untersuchungstagen sind in den Tagproben der 250 Lux Gruppe unter Einbeziehung der Transitionszeiten signifikant ($p=0,016$) und weisen in den Nachtproben beider Gruppen eine Tendenz zur Signifikanz ($p_{250lx}=0,064$; $p_{470lx}=0,072$) auf.

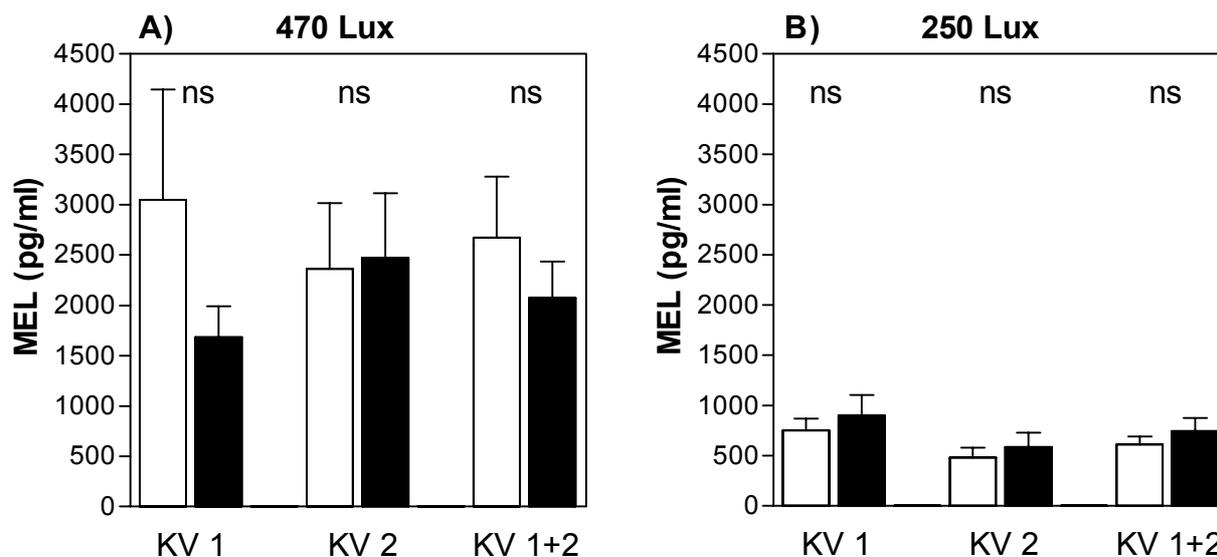


Abb. 45A und B: Speichermelatoninkonzentrationen der bei 470 Lux (A) und bei 250 Lux Lichtintensität (B) gehaltenen Tiere unter Ausschluss der Transitionszeiten am 1. Versuchstag (KV 1) und 2. Versuchstag (KV 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (KV 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, $n=6$, nicht signifikant (ns).

Die während der Tagphase entnommenen Speichelproben der 470 Lux Versuchsgruppe enthalten sowohl unter Einbeziehung, als auch nach Ausschluss der Transitionszeiten deutlich höhere Melatoninkonzentrationen als die Proben der 250 Lux Versuchsgruppe. Während der Tagphase ist die Konzentration am ersten Untersuchungstag unter Ausschluss der Transitionszeiten aufgrund des immensen Standardfehlers nicht signifikant höher ($p=0,056$), während sie unter Einbeziehung der Transitionszeiten signifikant ($p=0,028$) höher ist als in der 250 Lux Gruppe. Während der Tagphase des zweiten Untersuchungstages unterscheiden sich die Konzentrationen zwischen den beiden Versuchsgruppen sowohl unter Einschluss ($p=0,002$), als auch unter Ausschluss der Transitionszeiten ($p=0,011$) signifikant. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den Nachtproben der beiden Versuchsgruppen sind an beiden Untersuchungstagen sowohl unter Einbeziehung ($p_{V1}=0,047$; $p_{V2}<0,001$), als auch unter Ausschluss der Transitionszeiten ($p_{KV1}=0,042$; $p_{KV2}=0,011$) signifikant. Die Mittelwerte über beide Untersuchungstage unterscheiden sich ebenfalls in den Tagproben ($p_{V1+2}<0,001$; $p_{KV1+2}=0,002$) sowie in den Nachtproben ($p_{V1+2}<0,001$; $p_{KV1+2}=0,001$) signifikant zwischen den bei unterschiedlicher Lichtintensität gehaltenen Tieren.

In beiden Versuchsgruppen sind die zwischen den einzelnen Morgenproben auftretenden Konzentrationsunterschiede nicht signifikant (Abb. 46A und B). Die Melatoninkonzentrationen der Morgenproben sind in der 470 Lux Gruppe am zweiten Untersuchungstag ($p=0,046$) sowie in den Mittelwerten aller Morgenproben ($p=0,038$) signifikant höher als in der 250 Lux Gruppe.

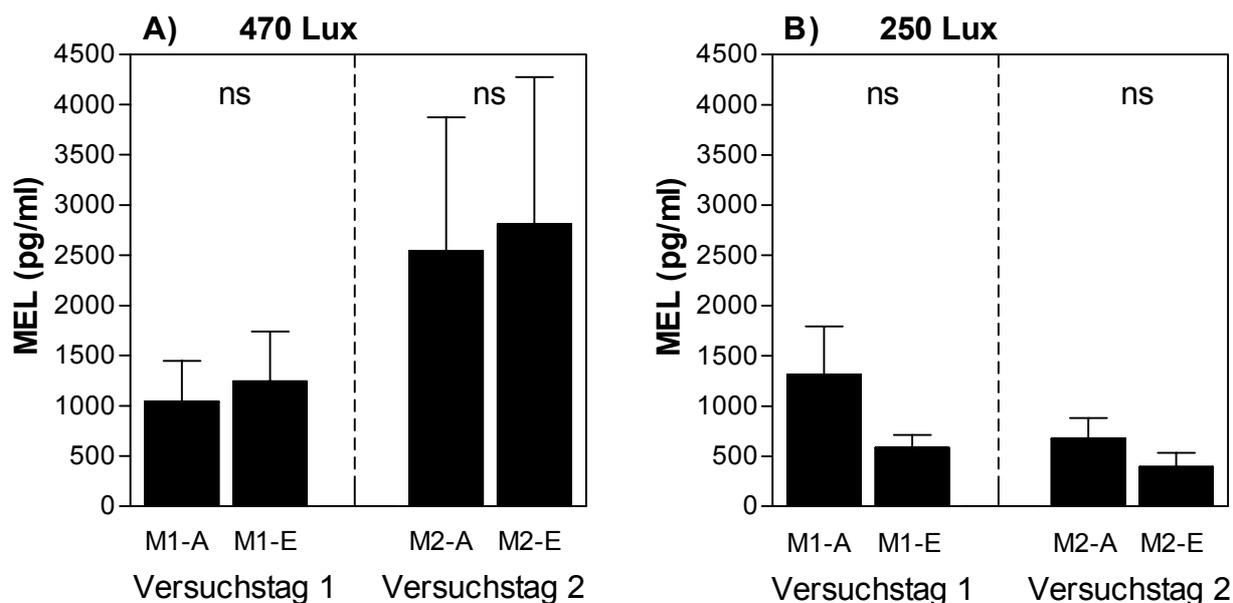


Abb. 46A und B: Speichelmelatoninkonzentrationen der um 7.00 Uhr entnommenen Proben der bei 470 Lux (A) und bei 250 Lux Lichtintensität (B) gehaltenen Tiere am 1. und 2. Versuchstag (ZGT -1 und 23). Mittelwert \pm SEM, $n=6$, nicht signifikant (ns).

Die Melatoninkonzentrationen der Abendproben (ZGT 11) unterscheiden sich in beiden Versuchsgruppen nicht signifikant zwischen dem ersten und dem zweiten Untersuchungstag. Ebenso sind die Konzentrationsunterschiede der Abendproben zwischen den Versuchsgruppen stets nicht signifikant.

2.2.4. Abhängigkeit vom Geschlecht bei 470 Lux

Die Speichelmelatoninprofile der männlichen und weiblichen bei 470 Lux Lichtintensität gehaltenen Tiere unterscheiden sich sowohl in den Melatoninkonzentrationen, als auch in ihrem Konzentrationsverlauf. Während die Melatoninprofile der männlichen Gruppe über beide Untersuchungstage einen ähnlichen Konzentrationsverlauf mit einem Konzentrationsanstieg in den Abendproben und einem Konzentrationsmaximum in den Nachtproben zeigen (Abb. 47A und B), weist das Speichelmelatoninprofil der weiblichen Tiere am ersten Untersuchungstag einen diurnalen Konzentrationsverlauf mit deutlich höheren Konzentrationen in den Tag-, als in den Nachtproben auf. Am zweiten Untersuchungstag ist dieses Profil nicht mehr ausgebildet und die Konzentrationen befinden sich unabhängig vom Lichtregime auf einem zwischen den Konzentrationen der Tag- und der Nachtproben des ersten Untersuchungstages liegenden Niveau. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den vor und nach den Fütterungen entnommenen Speichelproben sind bei den männlichen und den weiblichen Tieren nach beiden Fütterungen der beiden Untersuchungstage nicht signifikant.

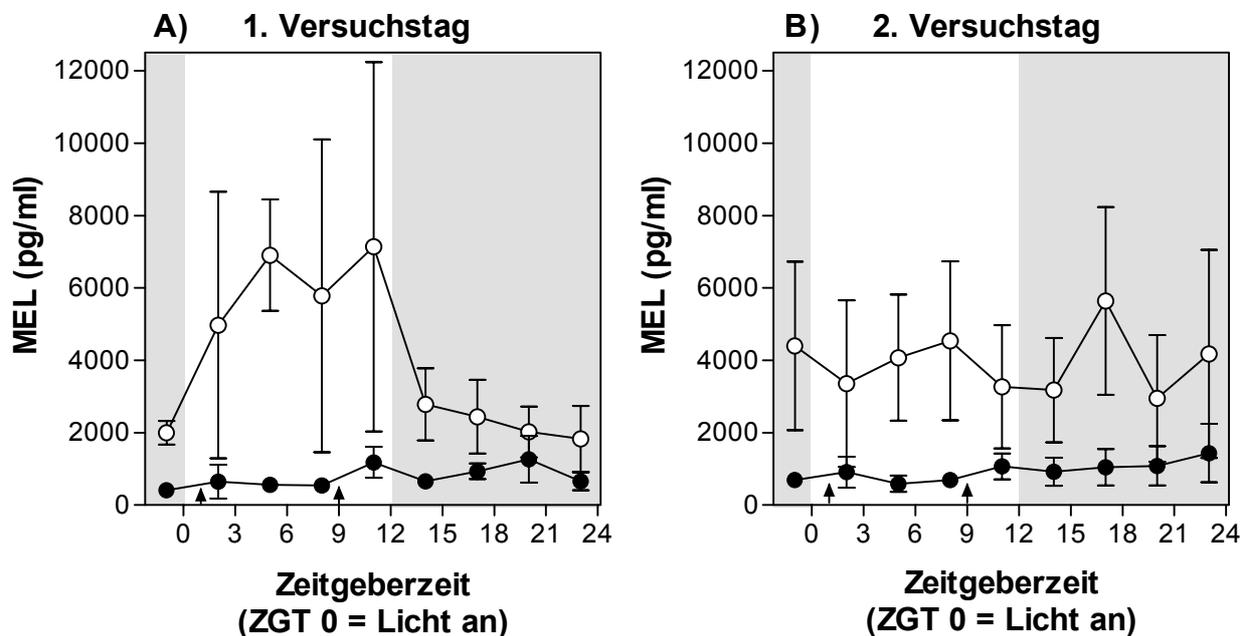


Abb. 47A und B: Speichelmelatoninprofile der bei einer Lichtintensität von 470 Lux gehaltenen männlichen (gefüllte Symbole) und weiblichen Tiere (offene Symbole) am 1. (A) und 2. Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, n=3.

Die Tag/Nacht-Unterschiede sind in beiden Versuchsgruppen sowohl bei Einbeziehung, als auch nach Ausschluss der Transitionszeiten an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant. Wie aus den Abb. 48A und 49A ersichtlich ist, weisen die männlichen Tiere unter Einbeziehung der Transitionszeiten nur am

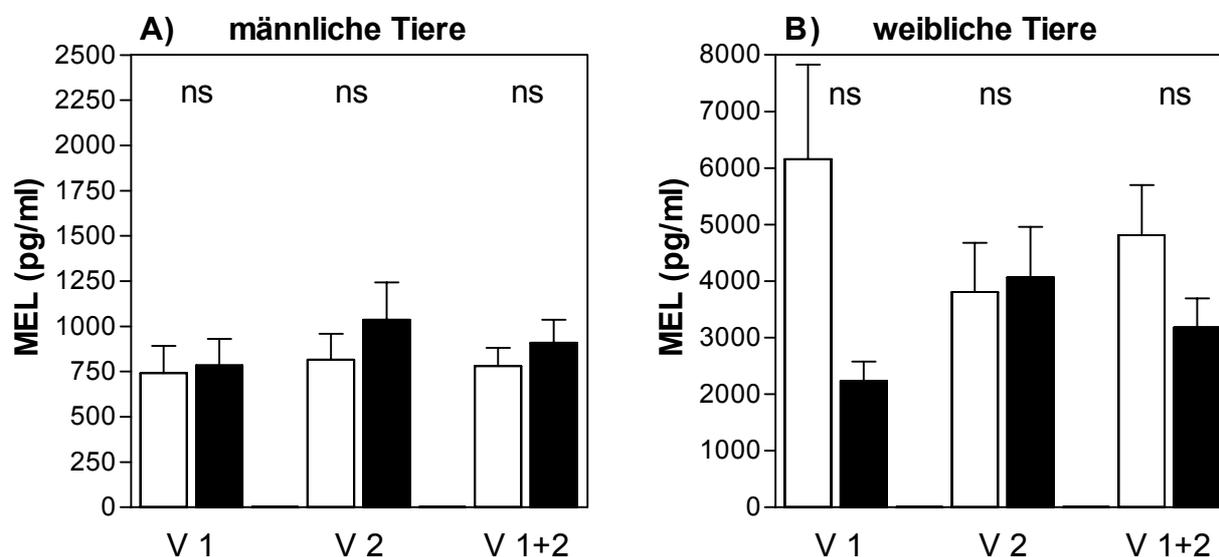


Abb. 48A und B: Speichelmelatoninkonzentrationen der bei einer Lichtintensität von 470 Lux gehaltenen männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Untersuchungstage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht; Mittelwert \pm SEM, $n=3$, nicht signifikant (ns). (Man beachte die unterschiedliche Skalierung.)

zweiten Untersuchungstag einen leichten Anstieg der nächtlichen Melatoninkonzentrationen auf, der nach Ausschluss der Transitionszeiten deutlicher wird und in den Mittelwerten über beide Untersuchungstage eine Tendenz zur Signifikanz erkennen lässt ($p=0,088$). Im Gegensatz zu den männlichen weisen die weiblichen Tieren am ersten Untersuchungstag um ein Vielfaches höhere Tag- als Nachtmelatoninkonzentrationen auf, die unter Einbeziehung der Transitionszeiten (Abb. 48B) knapp neben dem signifikanten Bereich liegen ($p=0,051$). Am zweiten Untersuchungstag gleichen sich die Melatoninkonzentrationen der Tag- und Nachtproben der weiblichen Tiere (Abb. 48B und 49B). Die Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Untersuchungstagen sind in beiden Versuchsgruppen sowohl unter Einbeziehung, als auch unter Ausschluss der Transitionszeiten nicht signifikant.

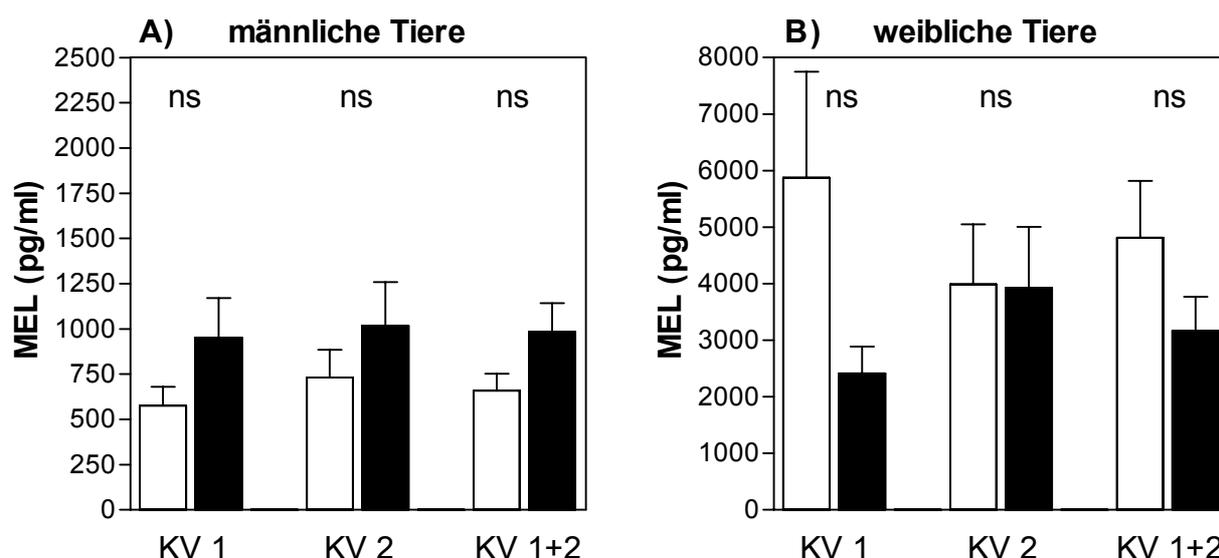


Abb. 49A und B: Speichelmelatoninkonzentrationen der bei einer Lichtintensität von 470 Lux gehaltenen männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) unter Ausschluss der Transitionszeiten am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht; Mittelwert \pm SEM, $n=3$, nicht signifikant (ns). (Man beachte die unterschiedliche Skalierung.)

Die Melatoninkonzentration der Nachtproben weisen unter Einbeziehung der Transitionszeiten bei den weiblichen Tieren eine Tendenz zur Signifikanz auf ($p=0,071$).

Die weiblichen Tiere der bei 470 Lux gehaltenen Gruppe erreichen an beiden Untersuchungstagen sowohl unter Einbeziehung als auch nach Ausschluss der Transitionszeiten in den Tagproben ($p_{V1}=0,012$; $p_{KV1}=0,030$; $p_{V2}=0,006$; $p_{KV2}=0,016$; $p_{V1+2}<0,001$; $p_{KV1+2}=0,001$), und in den Nachtproben ($p_{V1}=0,001$; $p_{KV1}=0,017$; $p_{V2}=0,005$; $p_{KV2}=0,031$; $p_{V1+2}<0,001$; $p_{KV1+2}=0,002$) signifikant höhere Speichelmelatoninkonzentrationen als die männlichen Tiere.

In den Morgenproben treten sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren an beiden Untersuchungstagen nicht signifikante Konzentrationsunterschiede auf, wie in den Abb. 50A und B dargestellt ist. Dabei sind die Konzentrationen der weiblichen Tiere erneut deutlich höher als die der männlichen Tiere. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den Einzelproben der männlichen und weiblichen Tiere bleiben mit Ausnahme der ersten Speichelprobe ($p_{M1-A}=0,009$) nicht signifikant. Die Melatoninkonzentrationen des ersten Untersuchungstages zeigen eine Tendenz zu einem signifikanten geschlechtsspezifischen Konzentrationsunterschied ($p=0,060$) und erreichen im Gesamtmittelwert aller Morgenproben einen

signifikanten Unterschied ($p=0,036$). Die geschlechtsspezifischen Konzentrationsunterschiede in den Abendproben (ZGT 11) sind an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant und sinken sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren vom ersten auf den zweiten Untersuchungstag. Bei den männlichen Tieren sind in den Mittelwerten über beide Untersuchungstage die Melatoninkonzentrationen der Abendproben signifikant ($p=0,041$) höher als die der Tagproben.

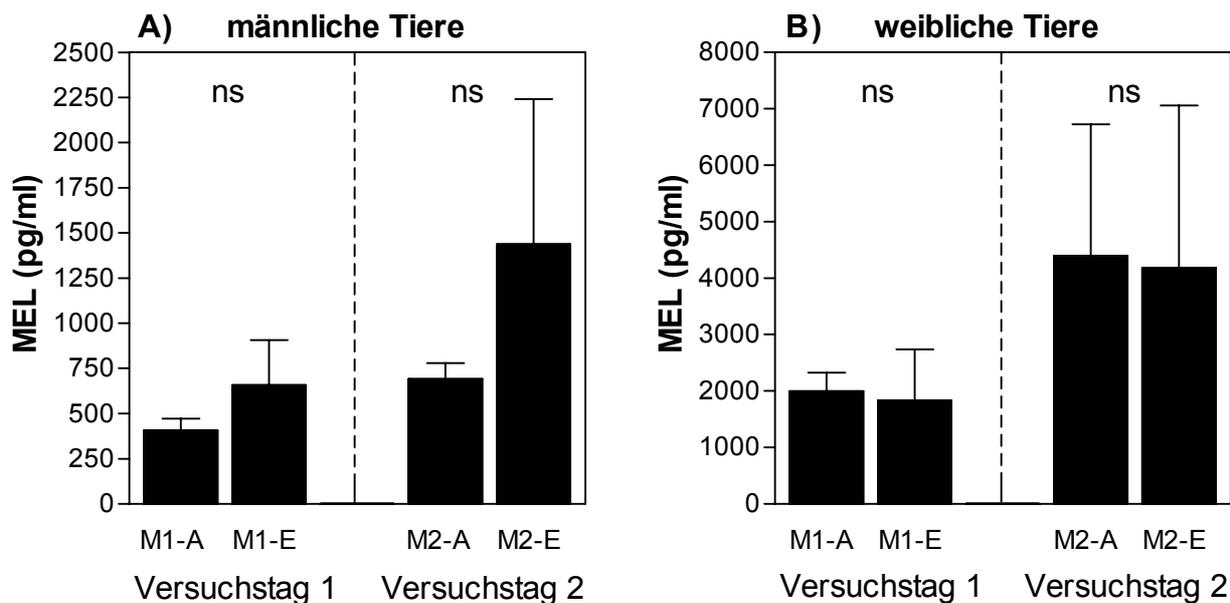


Abb. 50A und B: Speichelmelatoninkonzentrationen der um 7.00 Uhr entnommenen Proben der bei 470 Lux gehaltenen männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) am 1. und 2. Versuchstag (ZGT-1 und 23). Mittelwert \pm SEM, $n=3$, nicht signifikant (ns). (Man beachte die unterschiedliche Skalierung.)

2.2.5. Abhängigkeit vom Geschlecht bei 250 Lux

Die Speichelmelatoninprofile der männlichen, bei einer Lichtintensität von 250 Lux gehaltenen Tiere weisen an beiden Untersuchungstagen über die erste Tageshälfte einen kontinuierlichen Konzentrationsrückgang auf (Abb. 51A und B). Auch die Speichelmelatoninprofile der weiblichen Tiere weisen am ersten Untersuchungstag über die erste Tageshälfte einen kontinuierlichen Konzentrationsrückgang auf. Ab der zweiten Hälfte des ersten Untersuchungstages sowie über die Nachtphase kommt es zu Konzentrationsschwankungen zwischen den sonst auf demselben Konzentrationsniveau liegenden Speichelproben, wie in Abb. 51A deutlich wird.

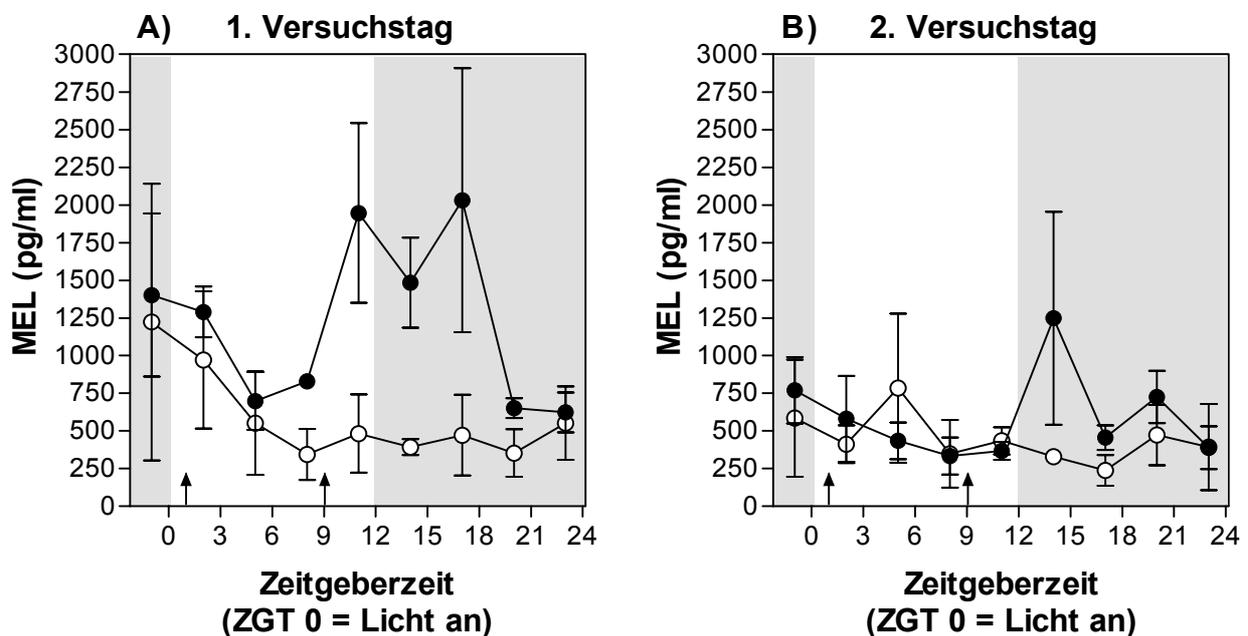


Abb. 51A und B: Speichelmelatoninprofile der bei einer Lichtintensität von 250 Lux gehaltenen männlichen (gefüllte Symbole) und weiblichen Tiere (offene Symbole) am 1. Versuchstag (A) und 2. Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

Zu Beginn des zweiten Untersuchungstages (Abb. 51B) treten leichte Konzentrationsunterschiede auf, ab der zweiten Tageshälfte und während der Nachtphase gleichen die Konzentrationen jenen des ersten Untersuchungstages. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den vor und nach den Fütterungen entnommenen Speichelproben sind bei den männlichen und den weiblichen Tieren an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant.

Die Melatoninkonzentrationen der bei einer Lichtintensität von 250 Lux gehaltenen männlichen, sowie auch der weiblichen Tiere weisen weder unter Einbeziehung (Abb. 52A und B), noch unter Ausschluss der Transitionszeiten (Abb. 53A und B) signifikante Tag/Nacht-Unterschiede auf.

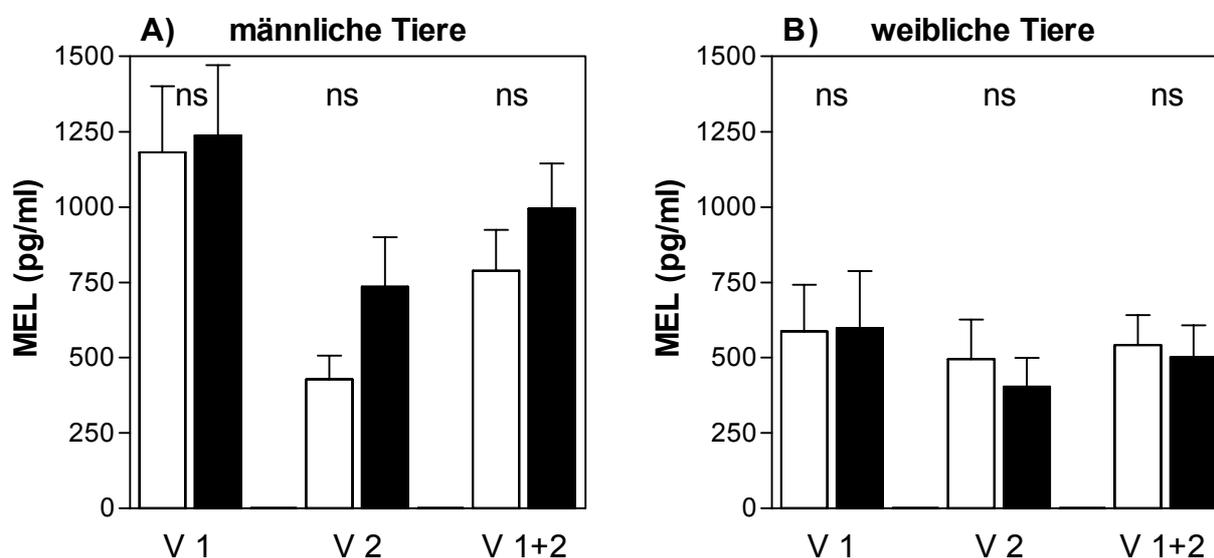


Abb. 52A und B: Speichelmelatoninkonzentration der bei einer Lichtintensität von 250 Lux gehaltenen männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, $n=3$, nicht signifikant (ns).

Im Gegensatz zu den Nachtproben unterscheiden sich die Konzentrationen der Tagproben der männlichen Gruppe unter Einbeziehung ($p=0,007$) sowie nach Ausschluss der Transitionszeiten ($p=0,010$) signifikant zwischen dem ersten und zweiten Untersuchungstag, wie aus den Abb. 52A und 53A ersichtlich ist. Nach Ausschluss der Transitionszeiten weisen die Mittelwerte über beide Untersuchungstage eine Tendenz zu signifikanten Tag/Nacht-Unterschieden auf ($p=0,059$). Im Gegensatz dazu erreichen die weiblichen Tiere nach Ausschluss der Transitionszeiten während der Tagphase höhere Melatoninkonzentrationen als nachts (Abb. 53B). Die Melatoninkonzentrationen der weiblichen Tiere unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den beiden Untersuchungstagen.

Obwohl die Speichelproben der männlichen, wie auch die der weiblichen Tiere am ersten Untersuchungstag unter Einbeziehung der Transitionszeiten identische Tag-, und Nachtmelatoninkonzentrationen enthalten, wie den Abb. 52A und B zu

entnehmen ist, treten hier signifikante geschlechtsspezifische Konzentrationsunterschiede auf: Die Speichelproben der männlichen Tiere enthalten am ersten Untersuchungstag unter Einbeziehung der Transitionszeiten während der Tagphase eine signifikant höhere Melatoninkonzentration ($p=0,036$) wie die der weiblichen Tiere. Auch während der Nachtphase des ersten Untersuchungstages sind die Konzentrationen der männlichen Tiere unter Einbeziehung der Transitionszeiten ($p=0,042$) und nach deren Ausschluss ($p=0,020$) signifikant höher als die der weiblichen Tiere. Am zweiten Untersuchungstag treten keine signifikanten geschlechtsspezifischen Konzentrationsunterschiede auf. In den Mittelwerten über beide Untersuchungstage unterscheiden sich die Konzentrationen der Nachtproben unter Einbeziehung ($p=0,009$), und nach Ausschluss der Transitionszeiten ($p=0,004$) signifikant.

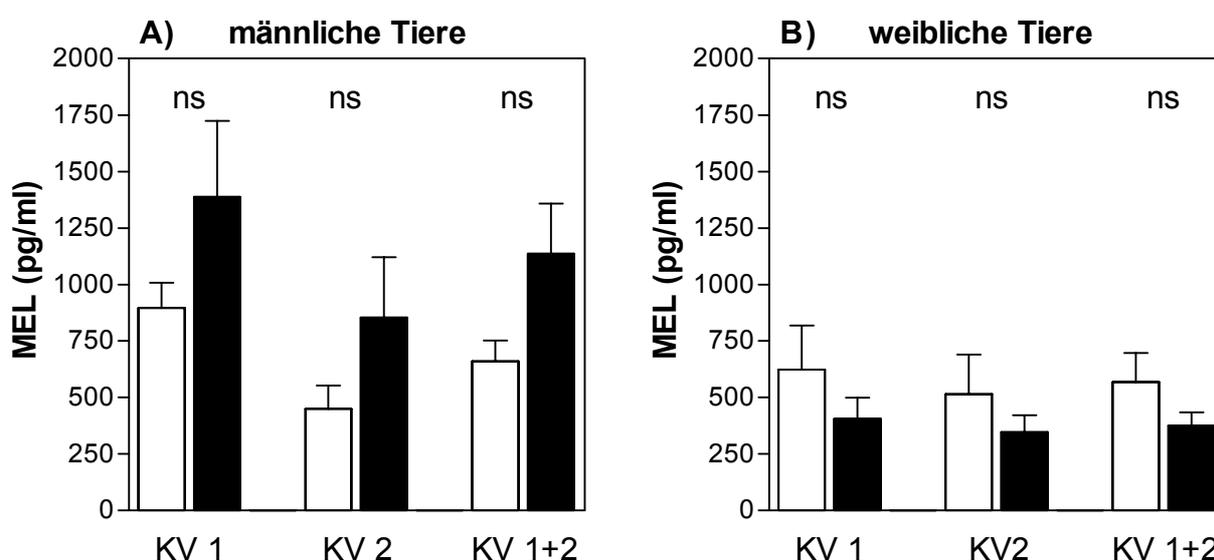


Abb. 53A und B: Speichelmelatoninkonzentrationen der bei einer Lichtintensität von 250 Lux gehaltenen männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) unter Ausschluss der Transitionszeiten am 1. Versuchstag (V 1) und 2. Versuchstag (V 2), sowie im Mittelwert über beide Versuchstage (V 1+2). Helle Balken Tag, dunkle Balken Nacht. Mittelwert \pm SEM, $n=3$, nicht signifikant (ns).

Die Speichelmelatoninkonzentrationen der Morgenproben sinken, wie in den Abb. 54A und B zu sehen ist, bei den männlichen, wie auch bei den weiblichen Tieren der bei 250 Lux gehaltenen Versuchsgruppe jeweils über den Verlauf beider Untersuchungstage, sowie zwischen den Melatoninkonzentrationen des ersten und des zweiten Untersuchungstages. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den

Morgenproben sind, ebenso wie die geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen den Morgenproben, nicht signifikant.

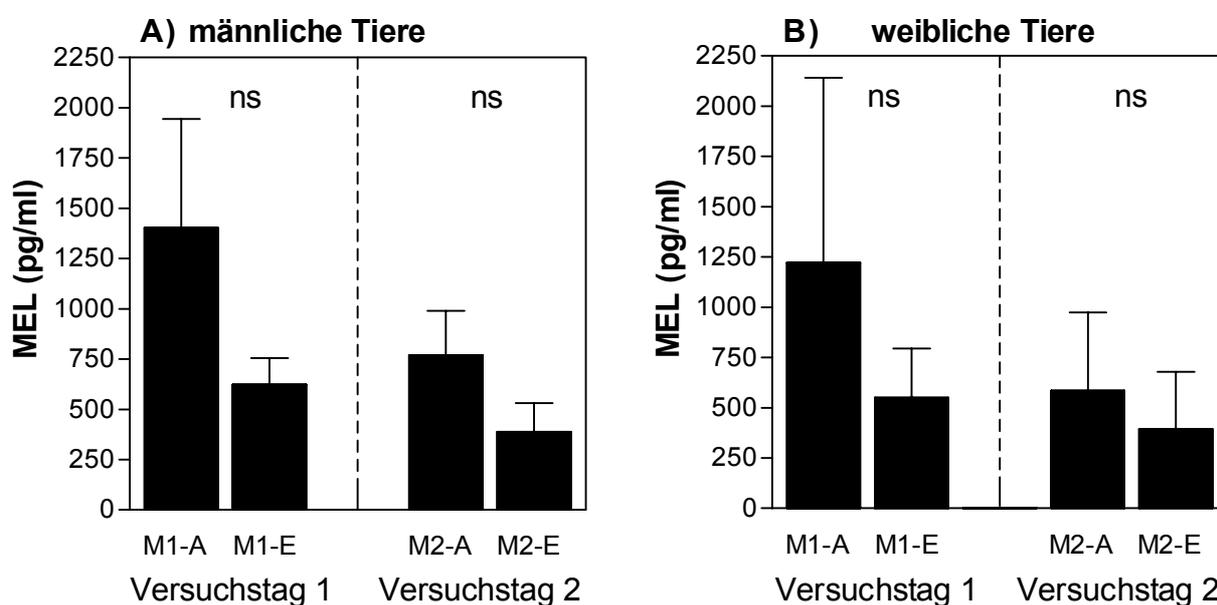


Abb. 54A und B: Speichelmelatoninkonzentration der um 7.00 Uhr entnommenen Proben der bei einer Lichtintensität von 250 Lux gehaltenen männlichen (A) und weiblichen Tiere (B) am 1. und 2. Versuchstag (ZGT -1 und 23). Mittelwert \pm SEM, n=3, nicht signifikant (ns).

In den Abendproben (ZGT 11) sinken die Konzentrationen bei den männlichen und den weiblichen Tieren übereinstimmend nicht signifikant zwischen dem ersten und dem zweiten Untersuchungstag. Die Melatoninkonzentrationen der männlichen Tiere sind nur am ersten Untersuchungstag deutlich, aber nicht signifikant höher als die der weiblichen.

2.2.6. Abhängigkeit vom Geschlecht und der Lichtintensität

Die Speichelmelatoninprofile der männlichen, bei unterschiedlichen Lichtintensitäten von 470 Lux und 250 Lux gehaltenen Tiere zeigen am ersten Untersuchungstag einen ähnlichen Konzentrationsverlauf, der sich, wie aus Abb. 55A ersichtlich ist, nur in Form der deutlich höheren Konzentrationen der bei 250 Lux gehaltenen Tiere zwischen den beiden Gruppen unterscheidet.

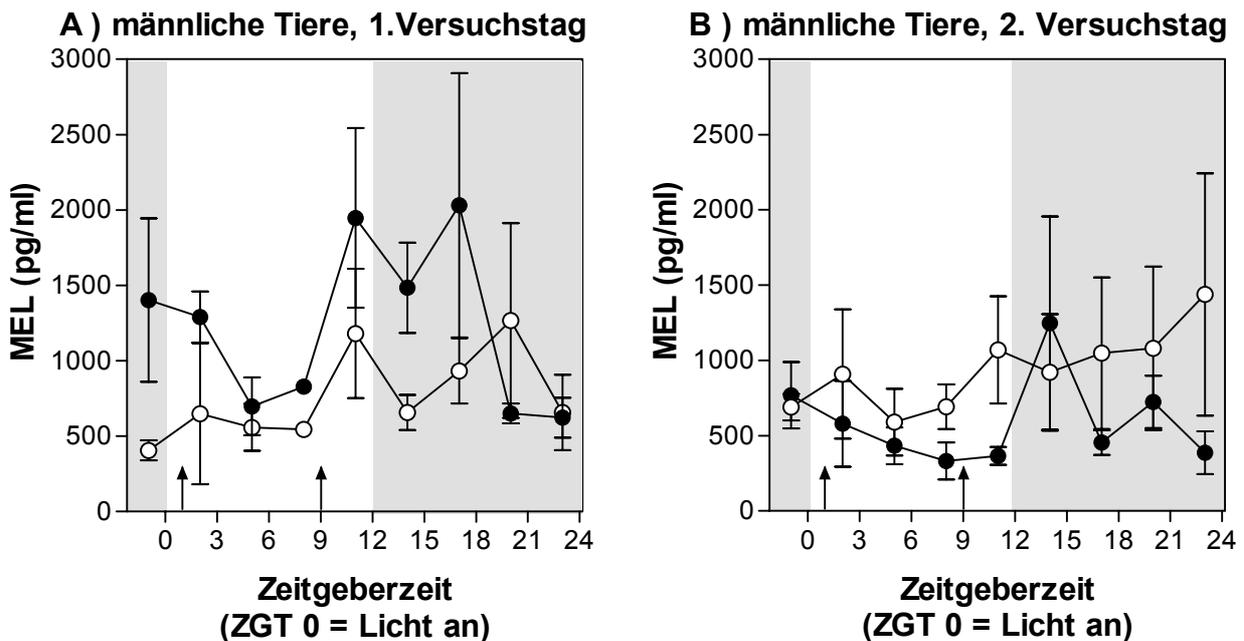


Abb. 55A und **B**: Speichelmelatoninprofile der männlichen Tiere bei einer Lichtintensität von 470 Lux (offene Symbole) und bei 250 Lux (gefüllte Symbole) am 1. Versuchstag (A) und 2. Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, $n=3$.

Die im Tagesverlauf auftretenden Konzentrationsänderungen zeigen bei den männlichen Versuchstieren am ersten Untersuchungstag (Abb. 55A) große Übereinstimmungen zwischen den unterschiedlichen Lichtintensitäten. Im Gegensatz dazu sind am zweiten Untersuchungstag (Abb. 55B) die Speichelmelatonin-konzentrationen in der 470 Lux Gruppe etwas höher als bei 250 Lux. In den beiden Gruppen der weiblichen Tiere ist im Gegensatz zu den männlichen Tieren ein deutlicher Einfluss der Lichtintensität auf das Melatoninprofil zu erkennen, wie in den Abb. 56A und B zu sehen ist.

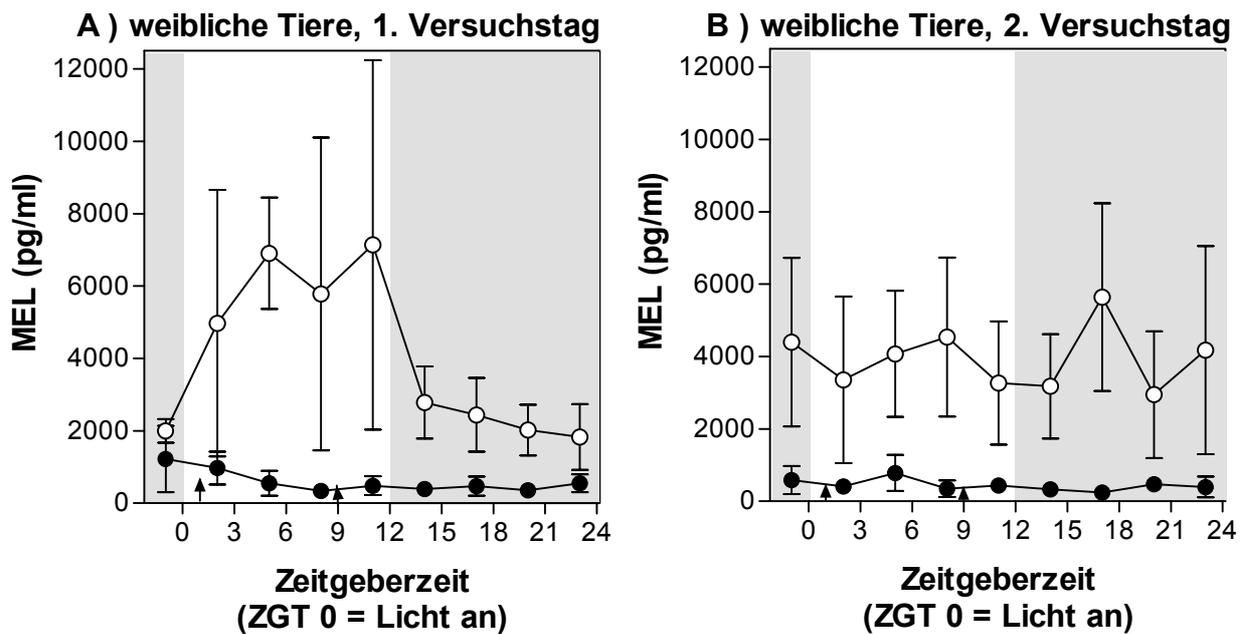


Abb. 56A und B: Speichelmelatoninprofile der weiblichen Tiere bei 470 Lux (offene Symbole) und bei 250 Lux Lichtintensität (gefüllte Symbole) am 1. Versuchstag (A) und 2. Versuchstag (B). Helle Fläche entspricht der Tagphase, schraffierte Fläche entspricht der Nachtphase. Die Fütterungszeiten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mittelwert \pm SEM, n=3.

Die bei 470 Lux gehaltenen weiblichen Tiere erreichen mit Ausnahme der ersten Speichelprobe um ein Vielfaches höhere Melatoninkonzentrationen als die bei 250 Lux gehaltenen Tiere. Die bei 470 Lux gehaltene Versuchsgruppe zeigt am ersten Untersuchungstag ein diurnales Konzentrationsprofil mit hohen Tagwerten und einem deutlichen nächtlichen Konzentrationsrückgang. Die Nachtwerte bilden annähernd ein Plateau. Im Gegensatz dazu sinken die Melatoninkonzentrationen der bei 250 Lux gehaltenen Tiere über die erste Tageshälfte und bilden anschließend, sowie auch über die Nachtphase ein annähernd einheitliches Konzentrationsplateau. Am zweiten Untersuchungstag ist das Profil des ersten Untersuchungstages in der bei 470 Lux gehaltenen Gruppe nicht mehr erkennbar, während das der bei 250 Lux gehaltenen Gruppe ab der zweiten Tageshälfte, sowie über die Nachtphase mit dem Profil des ersten Untersuchungstages identisch ist. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den vor und nach den Fütterungen entnommenen Speichelproben sind unabhängig vom Geschlecht und der Lichtintensität in allen vier Versuchsgruppen stets nicht signifikant.

Im Gegensatz zu den männlichen Tieren, deren Speichelmelatoninkonzentrationen nach Ausschluss der Transitionszeiten sowohl bei 470 Lux, als auch bei 250 Lux an

beiden Untersuchungstagen einen nächtlichen Konzentrationsanstieg aufweisen (Abb. 49A und Abb. 53A), sind in den beiden Gruppen der weiblichen Tiere die Melatoninkonzentrationen nachts niedriger als tagsüber (Abb. 49B und 53B). Dennoch unterscheiden sich die Melatoninkonzentrationen der männlichen, und insbesondere die der weiblichen Tiere deutlich in Abhängigkeit von der Lichtintensität: bei den männlichen Tieren sind die Konzentrationen der Tagproben der 470 Lux Versuchsgruppe am zweiten Untersuchungstag signifikant ($p=0,030$) höher als die der 250 Lux Tiere, und weisen unter Ausschluss der Transitionszeiten am ersten Untersuchungstag eine Tendenz zur Signifikanz auf ($p=0,057$). In den beiden weiblichen Versuchsgruppen sind die Konzentrationen der Tagproben am ersten und zweiten Untersuchungstag sowohl unter Einbeziehung ($p_{V1}=0,011$; $p_{V2}=0,003$), als auch nach Ausschluss der Transitionszeiten ($p_{KV1}=0,032$; $p_{KV2}=0,012$) bei den 470 Lux Tieren signifikant höher als bei den 250 Lux Tieren. Auch die Konzentrationen der Nachtproben sind am ersten und zweiten Untersuchungstag sowohl unter Einbeziehung ($p_{V1}<0,001$; $p_{V2}=0,001$), als auch nach Ausschluss der Transitionszeiten ($p_{KV1}=0,003$; $p_{KV2}=0,011$) bei den 470 Lux Tieren signifikant höher als in der 250 Lux Gruppe. Die Mittelwerte über jeweils beide Untersuchungstage unterscheiden sich sowohl unter Einbeziehung, als auch nach Ausschluss der Transitionszeiten signifikant (jeweils $p<0,001$) zwischen den unterschiedlichen Lichtintensitäten.

Die Melatoninkonzentrationen der Morgenproben steigen über den Gesamtuntersuchungszeitraum sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren der 470 Lux Gruppe vom ersten auf den zweiten Untersuchungstag an, während sie im Gegensatz dazu bei den männlichen sowie den weiblichen Tieren der bei 250 Lux untergebrachten Gruppe vom ersten auf den zweiten Untersuchungstag sinken. Die Gesamtmelatoninkonzentrationen der Morgenproben beider Untersuchungstage sind bei den weiblichen 470 Lux Tieren signifikant höher ($p=0,029$) als bei den 250 Lux Tieren. Die Melatoninkonzentrationen der Abendproben unterscheiden sich stets nicht signifikant zwischen den vier Tiergruppen.

2.3. Ergebnisse der Plasma/Speichel-Korrelation

2.3.1. Gesamtgruppe

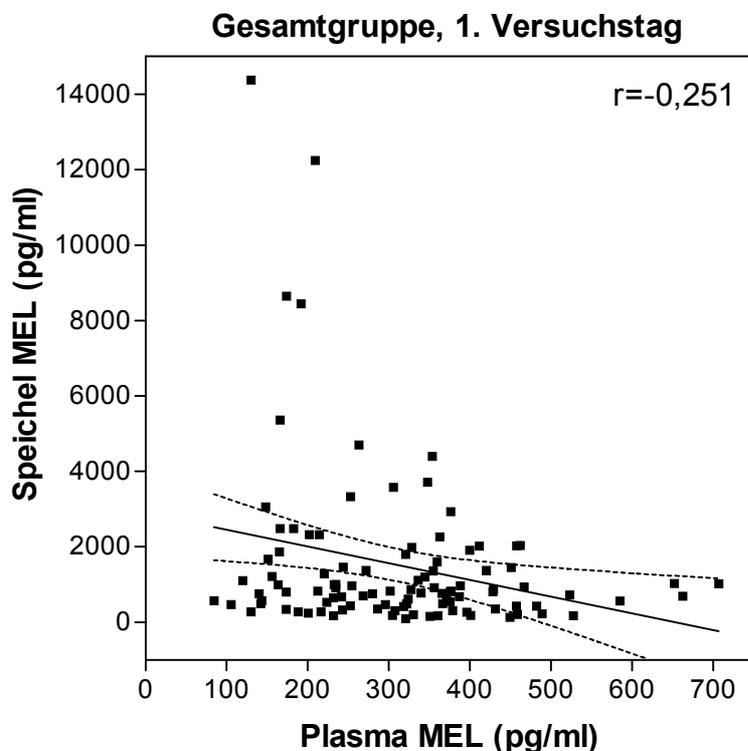


Abb. 57: Korrelation und lineare Regression zwischen Plasma- und Speichelmelatonin der Gesamtgruppe am 1. Versuchstag. Gestrichelte Linien entsprechen dem 95%-igem Vertrauensintervall der Regressionslinie, $n=12$, $p=0,011$.

Die Speichelmelatoninkonzentrationen sind an beiden Untersuchungstagen um ein Vielfaches höher (jeweils $p < 0,001$) als die der zeitgleich entnommenen Plasmaproben. Eine signifikante Korrelation der Melatoninkonzentrationen zwischen Plasma und Speichel besteht am ersten ($p = 0,011$) Untersuchungstag bei gemeinsamer Korrelation der Tag- und der Nachtproben, während am zweiten Untersuchungstag keine signifikante Korrelation auftritt ($p = 0,056$). Die Konzentrationen korrelieren negativ miteinander, wie aus der Abb. 57 ersichtlich ist.

2.3.2. Abhängigkeit vom Geschlecht

Die Speichelmelatoninkonzentrationen sind sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren an beiden Untersuchungstagen signifikant höher als die Plasmamelatoninkonzentrationen (jeweils $p < 0,001$). Während die Melatoninkonzentrationen der Speichel- und Plasmaproben bei den männlichen Tieren weder am ersten, noch am zweiten Untersuchungstag signifikant korrelieren, tritt bei den weiblichen Tieren am ersten Untersuchungstag (Abb. 58) eine signifikante negative

Korrelation zwischen Speichel- und Plasmaproben auf ($p=0,002$). Am zweiten Untersuchungstag ist keine Korrelation vorhanden.

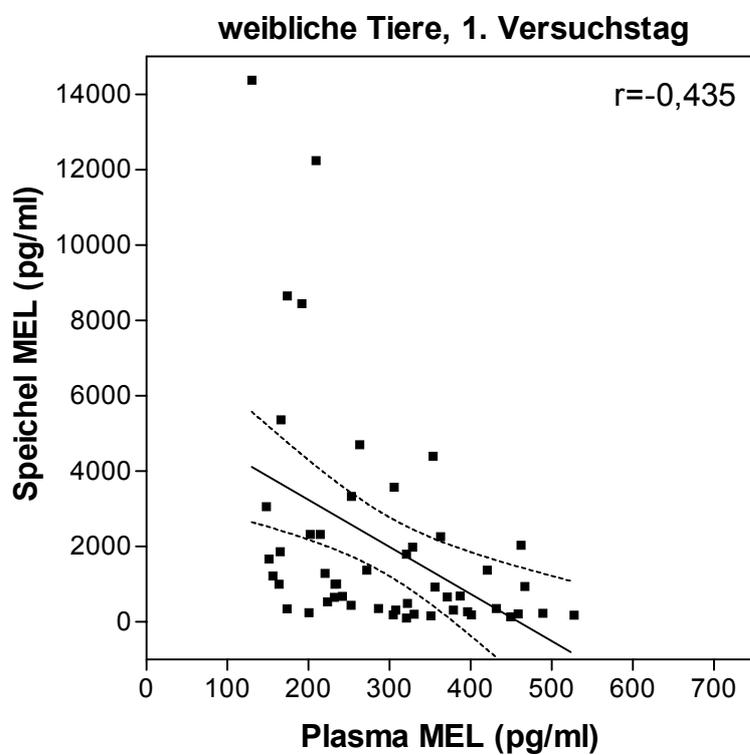


Abb. 58: Korrelation und lineare Regression zwischen Plasma- und Speichelmelatonin der weiblichen Tiere am 1. Versuchstag. Gestrichelte Linien entsprechen dem 95%-igem Vertrauensintervall der Regressionslinie, $n=6$, $p=0,002$.

2.3.3. Abhängigkeit von der Lichtintensität

Die Speichelmelatoninkonzentrationen sind sowohl bei den bei 470 Lux, als auch bei den bei 250 Lux gehaltenen Tieren an beiden Untersuchungstagen signifikant höher als die Plasmamelatoninkonzentrationen ($p_{V1/470lx} < 0,001$; $p_{V2/470lx} < 0,001$; $p_{V1/250lx} < 0,001$; $p_{V2/250lx} = 0,017$). Die Speichel/Plasma-Korrelationen sind unabhängig von der Lichtintensität an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant.

2.3.4. Abhängigkeit vom Geschlecht und der Lichtintensität

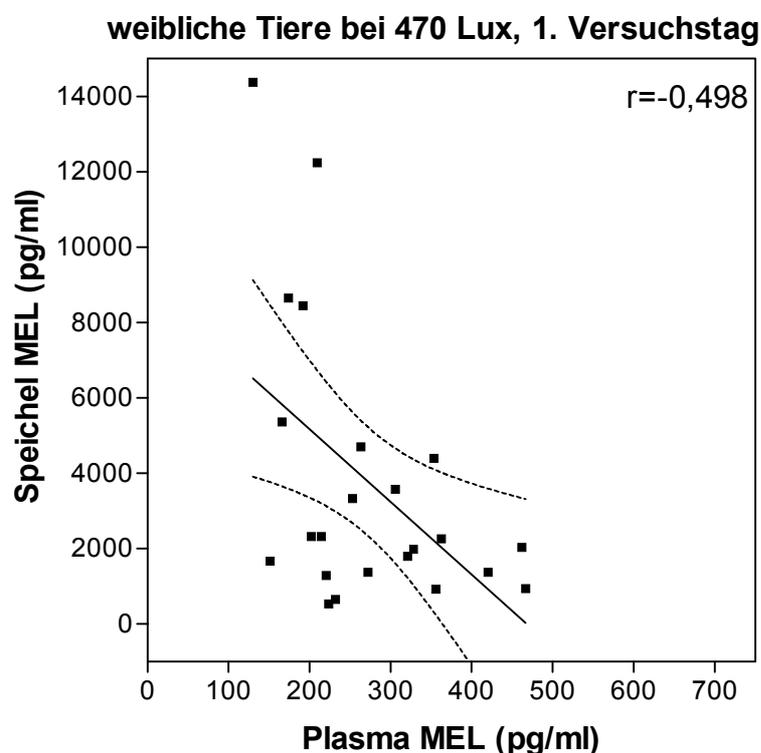


Abb. 59: Korrelation und lineare Regression zwischen Plasma- und Speichelmelatonin der weiblichen, bei 470 Lux gehaltenen Tiere am 1. Versuchstag. Gestrichelte Linien entsprechen dem 95%-igem Vertrauensintervall der Regressionslinie, $n=3$, $p=0,016$.

Die Speichel/Plasma-Korrelationen zeigen einen Einfluss der Lichtintensität auf die zwischen den männlichen und weiblichen Tieren bestehenden geschlechtsspezifischen Unterschiede. Sowohl bei den männlichen, als auch bei den weiblichen Tieren der bei 470 Lux gehaltenen Gruppe sind die Speichelmelatoninkonzentrationen an beiden Untersuchungstagen signifikant höher als die Plasmamelatoninkonzentrationen (jeweils $p < 0,001$). Die Speichel/Plasma-Korrelationen der bei 470 Lux gehaltenen männlichen Tiere sind stets nicht signifikant. Im Gegensatz dazu weisen die weiblichen Tiere der 470 Lux Gruppe am ersten Untersuchungstag eine signifikante negative Korrelation der Plasma- und Speichelmelatoninkonzentrationen auf ($p=0,016$), wie aus Abb. 59 ersichtlich ist.

Auch in der bei 250 Lux gehaltenen Gruppe der männlichen Tiere ist der Konzentrationsunterschied zwischen Speichel- und Plasmaproben an beiden Untersuchungstagen signifikant (jeweils $p < 0,001$). In der Gruppe der weiblichen 250 Lux Tiere sind die Konzentrationen der Speichelproben nur am ersten Untersuchungstag signifikant ($p_{V1W}=0,035$), am zweiten Untersuchungstag hingegen nicht signifikant höher als die der Plasmaproben. Während die Speichel/Plasma-Korrelationen der männlichen Tiere an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant

sind, korrelieren die Speichelmelatoninkonzentrationen der weiblichen, bei 250 Lux gehaltenen Tiere sowohl am ersten ($p=0,001$), als auch am zweiten Tag ($p=0,005$) signifikant negativ mit den Plasmamelatoninkonzentrationen, wie in den Abb. 60A und B dargestellt.

A) weibliche Tiere bei 250 Lux, 1. Versuchstag

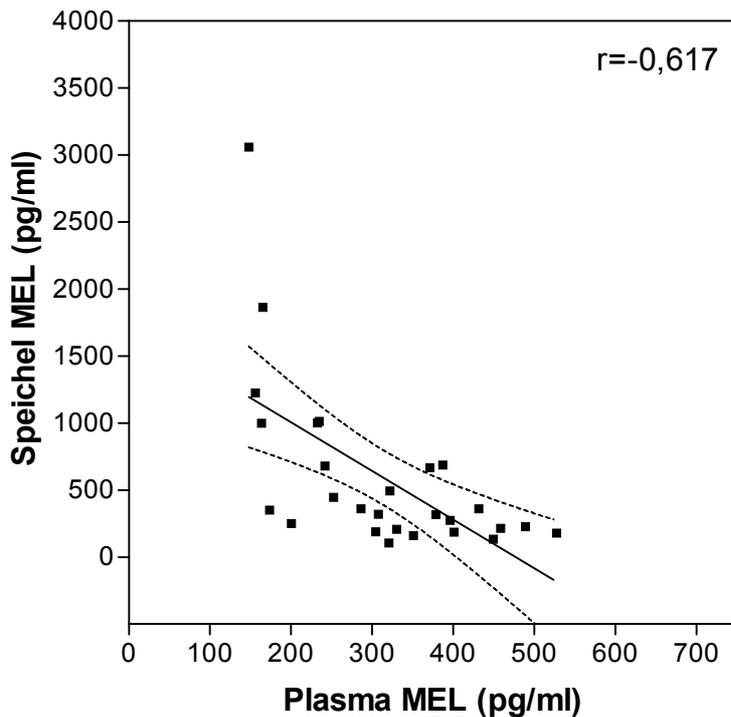
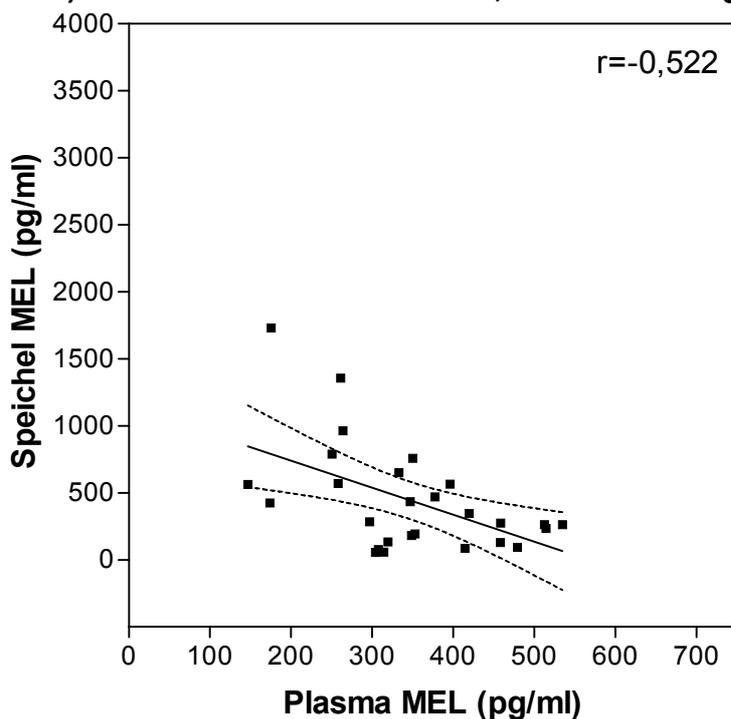


Abb. 60A und **B**: Korrelation und lineare Regression zwischen Plasma- und Speichelmelatonin der weiblichen, bei 250 Lux gehaltenen Tiere am 1. (A) und 2. Versuchstag (B). Gestrichelte Linien entsprechen dem 95%-igen Vertrauensintervall der Regressionslinie, $n=3$, $p_{(A)}=0,001$; $p_{(B)}=0,005$.

B) weibliche Tiere bei 250 Lux, 2. Versuchstag



V. Diskussion

1. Diskussion der Methoden

1.1. Experimentelles Design

1.1.1. Tierauswahl

In der vorliegenden Untersuchung wurden 12 Schweine verwendet, bei denen es sich um Wurfgeschwister handelte. Somit wurde der von ANDERSSON (2001) dokumentierte genetische Einfluss der Muttertiere berücksichtigt und umgangen. In der Versuchsplanung wurde – ebenfalls entsprechend den Ergebnissen aus den Studien von GREEN et al. (1999) und ANDERSSON (2001) – nicht von geschlechtsabhängigen Unterschieden der Plasmamelatoninkonzentration bei juvenilen Tieren dieser Altersgruppe ausgegangen. Die sechs männlichen Ferkel wurden routinemäßig innerhalb der ersten Lebenswoche kastriert. Die Ergebnisse dieser Dissertation weisen jedoch Unterschiede zwischen den weiblich-intakten, und den männlich-kastrierten Tieren auf. Die Verwendung von kastrierten Versuchstieren könnte ein wesentlicher Einflussfaktor auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung darstellen, da die Tiergruppe nicht nur durch die Verwendung verschieden geschlechtlicher (männlicher und weiblicher) Tiere beeinflusst wird, sondern darüber hinaus auch nicht zwischen männlich-kastrierten, und männlich-intakten Tieren unterschieden werden kann. Demzufolge könnten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren nicht unbedingt auf geschlechtsspezifische Unterschiede zurückzuführen sein, sondern könnten auch auf der Kastration beruhen, und damit eher einen Unterschied zwischen kastrierten und intakten Tieren darstellen. Der mögliche Einfluss der Kastration männlicher Ferkel auf die pineale Melatoninsynthese bedarf weiterer Untersuchungen. HERNANDEZ et al. (1990) zeigten in einem Experiment an kastrierten Ratten nicht nur einen Einfluss der Kastration auf die pineale Melatoninkonzentration, sondern auch auf das an der Noradrenalin synthese beteiligte Enzym Tyrosinhydroxylase. Nach der Kastration sank die Melatoninkonzentration unabhängig von den Lichtverhältnissen sowie infolge eines fehlenden nächtlichen Konzentrationsanstieges gegenüber der intakten männlichen Kontrollgruppe. Die Tag-/Nachtrhythmik der pinealen Tyrosin-

hydroxylase-Aktivität und der Noradrenalin-Konzentration verlief in der kastrierten Versuchsgruppe entgegengesetzt zur männlichen Kontrollgruppe. Auch für die direkt an der Melatoninsynthese beteiligten Enzyme (SNAT, HIOMT) und sekundären Botenstoffe (cAMP) konnte ein Einfluss der Kastration nachgewiesen werden (NAGLE et al., 1974; KARASEK et al., 1978; RUDEEN und REITER, 1980).

1.1.2. Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere der vorliegenden Untersuchung wurden aufgrund der Möglichkeit einer gegenseitigen Kathetermanipulation isoliert in Einzelbuchten mit akustischem, sowie visuellem Kontakt zu den Artgenossen gehalten. Ein direkter sozialer Kontakt war jedoch nahezu unmöglich. Laut BARNETT et al. (1981) ist bereits die Isolation der Tiere aus der Gruppe und die zum Schutz der Venenkatheter erforderliche Einzeltierhaltung für die Tiere mit Stress verbunden, sodass möglicherweise die Basis-Melatoninkonzentrationen der Versuchstiere durch die noradrenerge Stimulation der Melatoninsynthese erhöht waren (SEGGIE et al., 1985; BENSON et al., 1986; ROOZEN et al., 1995). Gegen eine mögliche Adaptation an die Einzelhaltung sprechen die Ergebnisse von RAMPACEK et al. (1984), die zwischen Schweinen in Einzelhaltung oder Gruppenhaltung selbst nach einer Adaptationszeit von 100 bis 170 Tagen Unterschiede feststellen konnten.

Zwischen den beiden Buchtenreihen bestanden Unterschiede in der Art der verwendeten Lampen, woraus ungleiche Lichtverhältnisse zwischen den Gruppen resultierten. Die Tiere einer Buchtenreihe (n=6) erhielten eine Lichtintensität von 470 Lux während der zwölfstündigen Tagphase, während den Tieren der zweiten Buchtenreihe (n=6) eine Lichtintensität von 250 Lux angeboten wurde. Dieser Unterschied wurde bei der Versuchsplanung nicht als mögliche Fehlerquelle eingestuft, da die Literatur allgemein der Tageslänge, die in diesem Experiment bei beiden Gruppen identisch war, eine größere Bedeutung beimisst als der Lichtintensität (z.B. TAST et al., 2001b) und andere Untersuchungen bereits bei einer deutlich geringeren Lichtintensität Konzentrationsunterschiede zwischen Tag- und Nachtproben feststellen konnten (GREEN et al., 1999; TAST et al., 2001a, b, c). Auch überschritt die Lichtintensität von 250 Lux die gemäß Schweinehaltungsverordnung (vom 18.02.1994; z. Zt. außer Kraft) vorgeschriebene Lichtintensität von 50 Lux um das Fünffache. Zudem hatten die Ergebnisse der vorangegangenen Dissertation

(TEUBNER, 2002) bei der dieselben Lampen verwendet wurden, keinen Einfluss der Lichtintensität auf die Melatoninkonzentration erkennen lassen.

Die Versuchstiere wurden zweimal täglich mit einer am Bedarf dieser Altersgruppe orientierten Futtermenge versorgt, zu deren Aufnahme ihnen jeweils 20 Minuten zur Verfügung standen. Die tatsächliche Futterraufnahme unterschied sich zwischen den Einzeltieren, sie wurde jedoch nicht dokumentiert. Obwohl die Tiere in der Versuchsvorbereitungsphase über 22 Tage an die Futterrestriktion gewöhnt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies – zumindest von einzelnen Tieren – als Stressor wahrgenommen worden sein könnte; sowie dass die möglicherweise aufgetretene Langeweile der Versuchstiere mangels Manipulations- oder Interaktionsmöglichkeiten mit Artgenossen oder anderen Objekten durch die Futterabwesenheit noch verstärkt wurde. Darüber hinaus könnte möglicherweise auch die einstreulose, reizarme Unterbringung der Tiere einen Einfluss auf den zirkadianen Rhythmus gehabt haben. DEJONG et al. (2000) konnten zeigen, dass Schweine, die unter reizarmen Haltungsbedingungen aufwuchsen, im Vergleich zu Tieren denen eine Beschäftigungsmöglichkeit mit Stroh geboten wurde, einen schwächeren zirkadianen Rhythmus der Speichel-Cortisolkonzentration aufwiesen.

1.2. Probengewinnung

Die Proben wurden im direkten Kontakt des Untersuchungsteams mit den Versuchstieren gewonnen. Im Vorfeld der Probengewinnung hatten die Tiere die tägliche Katheterkontrolle und Spülung zur Thrombusprophylaxe trotz ihnen bekannten Bezugspersonen nicht toleriert, was am ersten Untersuchungstag die Ablenkung der Tiere durch eine zweite Hilfsperson erforderlich machte. Auch die Möglichkeit einer direkten Kontamination der Speichelproben über die in der Maulspalte der Tiere verbliebenen Futterreste von einer vorhergehenden Futterraufnahme, kann trotz der im Anschluss an die Fütterungen sowie im Anschluss an jede Probengewinnung durchgeführten Spülung der Maulhöhle mit Leitungswasser, und der Reinigung der exponierten Gesichtsregionen mit einem Schwamm vor jeder Probengewinnung nicht prinzipiell ausgeschlossen werden. Die Endvolumina der Speichelproben waren trotz der Verwendung von je vier Speicheltupfern pro Tier und Entnahmezeitpunkt individuell sehr unterschiedlich,

sodass das zur Melatoninextraktion erforderliche Probenvolumen – insbesondere nachts – nicht immer ausreichend war.

1.3. HPLC-Methode

Das in vorliegender Untersuchung zur Melatoninextraktion erforderliche Plasma- oder Speichelvolumen ist mit 200 µl sehr gering und unterschreitet das zur radioimmunologischen Melatoninbestimmung erforderliche Volumen. Letztere Methode benötigt ein Probenvolumen von 500 µl (McCONNELL und ELLENDORF, 1987; TEUBNER, 2002) oder sogar von 1000 µl (ANDERSSON, 2001). Derartige Volumina wären hinsichtlich der Messung der Speichelmelatoninkonzentration häufig nicht vorhanden gewesen.

Die Chloroformextraktion von Melatonin aus Plasmaproben des Haussperlings wurde durch SIDIQ (2001) validiert. Die Probenverdünnung beträgt nach Modifikation des Probenvolumens in dieser Methode 1:4,5 (Probe zu Puffer und Chloroform). Ein neuerer und für porcines Plasma durch KLUPIEC et al. (1997) validierter RIA (der Firma Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz) führt in dem von ANDERSSON (2001) angewandten Protokoll dagegen bereits bei der Melatoninextraktion zu einer Probenverdünnung von 1:10. Daraus könnte bei diesem Arbeitsschritt ein Unterschied in der Sensitivität der RIA-Methode, verglichen mit der HPLC-Methode resultieren.

Während die Evaporation des Chloroforms in der Extraktion dieser HPLC-Methode mittels Wasserstrahlpumpe unter Lichtausschluss und maximal bei Raumtemperatur unter dem Abzug erfolgt, wendet ANDERSSON (2001) zur Evaporation des Diethylethers bei der RIA-Methode ein Wasserbad bei 37°C an, wobei dies hinsichtlich der Stabilität von Melatonin bei Körpertemperatur und in Abwesenheit eines Puffers möglicherweise als kritisch zu beurteilen ist. In dem von ANDERSSON (2001) beschriebenen Extraktionsprotokoll erfolgt die Pufferzugabe – und damit das Ende aller eventuellen Abbauvorgänge während der Extraktion – erst nach der Evaporation, während der Puffer in der hier angewendeten Extraktionsmethode den ersten Arbeitsschritt darstellt und die Puffervorlage noch vor der Probenzugabe erfolgt.

Demnach treten bei der HPLC-Methode keine Verluste der originären Melatoninkonzentrationen auf. Darüber hinaus beträgt das zugefügte Puffervolumen

dieser HPLC-Methode nur 200 µl, während MCCONNEL und ELLENDORF (1987) 500 µl, und ANDERSSON (2001) 1000 µl Puffer hinzufügen, was eine weitere Verdünnung nach sich zieht. Im Gegensatz zu dieser HPLC-Methode, die nach der Chloroform-Evaporation und Resuspendierung des Melatoninpellets im HPLC-Eluenten eine sofortige Probeninjektion in das HPLC-System ermöglicht, erfolgt in der RIA-Methode z.B. bei MCCONNEL und ELLENDORF (1987), sowie ANDERSSON (2001) eine Zugabe von Antiserum (Kennaway G280) und markiertem Antikörper (z.B. ³H-Melatonin; ¹²⁵J-Melatonin) mit einer anschließenden Probeninkubation über 16 bis 24 Stunden bei 2° bis 8°C, bzw. bei TEUBNER (2002) über 36 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur. Das Ausmaß der erfolgten Bindung der polyklonalen Antikörper an Melatonin und der Verdrängung von Melatonin durch den Antikörper kann bei der einzelnen Probe nicht nachvollzogen werden, während bei der HPLC-Detektion ein zeitliches Elutionsprofil erscheint, das etwaige Probenkontaminationen, d.h. Überlagerungen des potentiellen Melatonins mit anderen chemisch diesem sehr ähnlichen Substanzen, sowie deren Konzentrationen direkt erkennbar macht, und damit die verlässlichere Methode darstellt. Während der langen Inkubationsdauer der RIA-Methoden ist ein Melatoninverlust durch einen Temperatureinfluss möglich und durch einen Lichteinfluss wahrscheinlich. Selbst bei einer Kreuzreaktivität von unter 0,05% (ANDERSSON, 2001) würden die in vorliegender Untersuchung teilweise sehr hohen und außerhalb des Messbereichs des Fluoreszenzdetektors liegenden Konzentrationen potentiell melatoninverwandter Substanzen bei der über RIA ermittelten Melatoninkonzentration zu einer Überbewertung der Melatoninkonzentrationen führen. MCCONNELL und ELLENDORF (1987) und KENNAWAY et al. (1982) geben die Kreuzreaktivität des von ihnen verwendeten G280 Antiserums mit 0,4% an. Die im RIA-Protokoll (ANDERSSON, 2001) anschließende Applikation des zweiten Antikörpers, die erneute Inkubation und die Versetzung mit destilliertem Wasser stellen weitere potentielle Ursachen für einen Melatoninverlust dar. Der direkte Vergleich zwischen der indirekten Melatoninbestimmung über RIA und der direkten Messung über HPLC zeigt, dass letztere Methode ein weniger zeitintensives Extraktionsprotokoll beinhaltet, wodurch die Wahrscheinlichkeit eines Melatoninverlustes minimiert wird. Der Zeitpunkt des Reaktionsendes liegt durch Pufferzugabe vor Extraktionsbeginn und ein Konzentrationsverlust durch Reaktionsabläufe innerhalb der Extraktionsschritte wird damit verhindert; die erforderlichen Proben- und Chemikalienvolumina sind deutlich geringer und bewirken damit eine geringere

Verdünnung der ursprünglich in der Probe vorhandenen Melatoninkonzentration. Ein negativer Einfluss durch Lichteinfall auf die Melatoninkonzentration wird bei der Anwendung des HPLC-Protokolls konsequent vermieden.

1.4. Einteilung der Probengewinnungszeitpunkte und der statistischen Auswertung

Unter natürlichen Lichtverhältnissen finden Transitionen, d.h. kontinuierliche Lichtänderungen im Verlauf eines Tages am Morgen sowie am Abend statt. Durch eine kontinuierliche Änderung der Lichtintensitäten wird dem Hypothalamus über das Sinken der Lichtintensität am Abend mitgeteilt, dass die Nacht kommt, und über die Zunahme der Intensität am Morgen, dass der Tag anbricht. Diese langsamen Transitionen werden abends durch einen kontinuierlichen Anstieg der pinealen Melatoninsynthese infolge der negativ mit der Lichtintensität korrelierenden Freisetzung von Noradrenalin an den Organismus übersetzt. Morgens sinkt die pineale Melatoninsynthese durch die retinale Wahrnehmung der steigenden Lichtintensität kontinuierlich ab. Der Körper hat somit vier unterschiedliche Möglichkeiten zur zeitlichen Orientierung: niedrige Melatoninkonzentration (Tag), hohe Melatoninkonzentration (Nacht), steigende Melatoninkonzentration (Abend), sinkende Melatoninkonzentration (Morgen) (REITER, 1993). Daher haben die über den SCN auf neuronalem, sowie hormonellem Wege (Melatonin) weitergeleiteten Dämmerungszustände eine wichtige Funktion, den Körper über die Lichtmenge zu informieren (MENAHER, 1997). Da nach LEWCZUK und PRZYBYLSKA-GORNOWICZ (2000) auch bei absoluter Dunkelheit ein Melatoninrhythmus zu beobachten ist, müssen neben dem Licht auch noch andere Faktoren dazu beitragen, die Melatoninkonzentration zu beeinflussen. Der Nachweis unterschiedlicher Melatoninkonzentrationen zwischen den Transitionszeiten und den unter identischen Lichtbedingungen entnommenen vorangehenden Proben deutet darauf hin, dass lichtunabhängige Regulationsvorgänge vorhanden sind. Gleiches gilt für fehlende Konzentrationsunterschiede zwischen den Transitionszeiten und den ihnen anschließenden, bei einer höheren bzw. niedrigeren Lichtintensität entnommenen Proben. Aus diesem Grund könnte den Transitionszeiten im Melatoninrhythmus eine besondere Bedeutung zukommen.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1. Plasmamelatonininkonzentrationen

2.1.1. Gesamtgruppe

Der Vergleich der beiden Untersuchungstage zeigt deutliche Unterschiede in den Melatonininkonzentrationen. Während am ersten Untersuchungstag ein Profil mit niedrigeren Tag- als Nachtwerten ausgebildet ist, so ist am zweiten Untersuchungstag aufgrund höherer Tagkonzentrationen kein deutlicher Tag/Nacht-Unterschied mehr festzustellen. Die Melatonininkonzentration steigt während der Tagphase des ersten Untersuchungstages kontinuierlich an, was gegen die Existenz eines alleine durch das Lichtregime geformten nokturnalen Sekretionsrhythmus spricht (REITER, 1993). Auf das zu Beginn der Nachtphase entstandene Konzentrationsmaximum folgt ein kontinuierlicher Konzentrationsrückgang, der auf einer sinkenden Stimulation der pinealen Melatoninsynthese beruhen könnte, da die Dichte der β -Rezeptoren der Pinealocytenmembran einen eigenen zirkadianen Rhythmus aufweist und über den Verlauf der Nacht abnimmt (ROMERO et al., 1975, PANGERL et al., 1990). Am zweiten Untersuchungstag sind die Melatonininkonzentrationen meist bei jeder Probenentnahme höher als am ersten Tag. Die Steigerung der pinealen Melatoninsynthese während der Tagphase des zweiten Tages könnte auf eine mit der Probengewinnung des ersten Tages verbundenen stressinduzierten Cortisol-, sowie Noradrenalinfreisetzung und der noradrenergen Stimulation der Melatoninsynthese zurückgeführt werden, wie SEGGIE et al. (1985) an Ratten, sowie BENSON et al. (1986) und ROOZEN et al. (1995) an Schweinen zeigen konnten. Dies würde darauf hindeuten, dass die Tiere durch die Probengewinnung des ersten Untersuchungstages so gestresst wurden, dass die mittlere Melatonininkonzentration der Tagproben des zweiten Untersuchungstages, trotz einer 24-stündigen Pause, sich bereits auf dem hohen Konzentrationsniveau der Proben der vorhergehenden, sowie der anschließenden Nachtphase befindet, wodurch der zu erwartende nächtliche Konzentrationsanstieg ausbleibt. Dies könnte wiederum ein Hinweis darauf sein, dass sich die pineale Melatoninsynthese der Schweine bereits während der Tagphase des zweiten Untersuchungstages im Maximalbereich befindet und nachts das Limit der Synthesekapazität erreicht wird. ZARAZAGA et al. (1998a, b), COON et al. (1999) und CHEMINEAU et al. (2002) konnten an Schafen zeigen, dass die

pineale Melatoninsynthesekapazität genetisch determiniert ist und vom Gewicht der Epiphyse abhängig ist. Darüber hinaus kann die Unterdrückung der pinealen Melatoninsynthese durch das Tageslicht während der Tagphase durch aversive Reize unterbunden werden (FUNK und AMIR, 1999), wodurch der hier am zweiten Untersuchungstag in den Tagproben auftretende Konzentrationsanstieg beeinflusst worden sein könnte.

Die Unterschiede im Profil zwischen dem ersten und zweiten Tag zeigen, dass das Plasmamelatoninprofil der Schweine nur unzureichend stabil ist und durch exogene Faktoren beeinflusst werden kann. Nach INGRAM und DAUNCEY (1985) sind die angeborenen Rhythmen der Körperfunktionen (z.B. Körpertemperatur, Stoffwechsel, Aktivität) bei Schweinen sehr schwach ausgeprägt und können leicht durch exogene Faktoren gestört werden. Die Epiphyse scheint unter den hier gewählten Versuchsbedingungen nicht in der Lage zu sein, ein stabiles Sekretionsprofil zu formen. Da zwischen den beiden Untersuchungstagen eine 24-stündige Pause liegt, in der keine Proben gewonnen wurden, können die Ursachen für die Unterschiede zwischen den Profilen nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise war diese 24-stündige Unterbrechung für die Tiere nicht ausreichend, um sich vom Stress der Probennahme zu erholen und den Melatoninspiegel auf das Niveau der ersten Probennahme zu senken.

An keinem der beiden Einzeltage ist ein signifikanter Tag/Nacht-Unterschied der Plasmamelatoninkonzentrationen vorhanden, was den Ergebnissen von REITER et al. (1987) und DIEKMAN und GREEN (1997) entspricht. Hingegen konnten MCCONNELL und ELLENDORF (1987), ANDERSSON et al. (2000), LEWCZUK und PRZYBYLSKA-GORNOWICZ (2000) und TAST et al. (2001a, b, c) in ihren Arbeiten unter Verwendung der RIA-Methode signifikante nächtliche Konzentrationsanstiege feststellen. Der fehlende Tag/Nacht-Unterschied am ersten Untersuchungstag ist darauf zurück zu führen, dass die Konzentration in der zweiten Hälfte der Tagphase kontinuierlich ansteigt, während die Konzentration über die Nachtphase kontinuierlich abnimmt. Am zweiten Untersuchungstag tritt fünf Stunden nach Tagesbeginn ein Einbruch der mittleren Melatoninkonzentration auf, welcher das ansonsten konstant hohe Konzentrationsniveau kurzzeitig unterbricht. Die Ursache für diesen Konzentrations-einbruch bleibt jedoch unklar.

Nach Ausschluss der Transitionszeiten sind die Tag/Nacht-Unterschiede dagegen nun an beiden Untersuchungstagen signifikant. Aus dieser Tatsache und dem

Melatoninprofil des ersten Tages ist ersichtlich, dass die Plasmamelatoninkonzentration und damit die pineale Melatoninsynthese, nicht vollständig mit dem Lichtregime synchronisiert war. Die Bedeutung des Lichtregimes wird in der Arbeit von McCONNELL und ELLENDORF (1987) deutlich, die ausschließlich unter einem äquatorialen Lichtregime (LD 12:12), nicht jedoch unter LD 16:8 oder auch unter LD 8:16 einen signifikanten nächtlichen Konzentrationsanstieg des Plasmamelatoninprofils nachweisen konnten. Alternativ oder auch zusätzlich könnten ein oder mehrere weitere, neben dem Lichtregime als Zeitgeber dienende exogene Einflussfaktoren (INGRAM und DAUNCEY, 1985) oder ein lichtunabhängiger endogener Rhythmus wirksam sein. LEWCZUK und PRZYBYLSKA-GORNOWICZ (2000) erhielten bei Schweinen trotz völliger Dunkelheit (Lichtintensität < 1 Lux) eine Rhythmik der Plasmamelatoninkonzentration, die nach ihrer Meinung jedoch auch durch den Zeitpunkt der täglichen Fütterungen und Reinigung hervorgerufen sein könnte.

Der signifikante Konzentrationsanstieg zwischen der ersten Morgenprobe des ersten Untersuchungstages und allen anderen Morgenproben kann als Hinweis auf die über den Versuchszeitraum zunehmende Stimulation der Melatoninsynthese infolge von Stress interpretiert werden (SEGGIE et al., 1985; BENSON et al., 1986; ROOZEN et al., 1995), die bereits innerhalb des ersten Untersuchungstages erfolgt. Besonders bemerkenswert sind die signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen Tag- und Abendproben, sowie zwischen Nacht- und Morgenproben am ersten Versuchstag, obwohl die Lichtintensität jeweils identisch ist. Hervorzuheben ist auch die Tatsache, dass die Unterschiede zwischen Morgen- und Tag-, sowie zwischen Abend- und Nachtproben nach der Änderung der Lichtintensität keine Signifikanz aufweisen, was in diesem Zusammenhang wiederum für eine fehlende Synchronisation mit dem Zeitgeber „Licht“ spricht. Am zweiten Untersuchungstag kommt es zu keinem derartigen signifikanten Unterschied mehr, da gegenüber dem ersten Untersuchungstag ein genereller Konzentrationsanstieg auftritt.

Dem potentiellen Zeitgeber „Futter“ könnte eventuell ebenfalls eine Bedeutung zukommen. Nach INGRAM und DAUNCEY (1985) kann der Zeitpunkt des Futterangebots, sowie auch die Futteraufnahme per se die Rhythmen der Körperfunktionen beeinflussen. KNOLL et al. (1984) konnten in einer Untersuchung am Menschen zeigen, dass Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Cortisol eine deutliche Abhängigkeit von der Essenseinnahme aufweisen. Dies könnte auch auf das Melatoninsekretionsprofil zutreffen. SELMAOUI et al. (2001) zeigte in einer Studie an

Ratten, dass die Wahlmöglichkeit zwischen kohlenhydratreichem und proteinreichem Futter zu signifikant höheren nächtlichen Melatoninkonzentrationen und Enzymaktivitäten bei den Tieren mit unlimitiertem Futterzugang, verglichen mit den Tieren mit zeitlich limitiertem Zugang führt, während sich die zeitliche Verfügbarkeit von Alleinfutter nicht auf die Melatoninkonzentration auswirkt. In der vorliegenden Arbeit ist aufgrund des angewandten Fütterungsregimes, bei dem den Versuchstieren zwei Mal täglich je 20 min zur Aufnahme von maximal je 1 kg Alleinfutter zur Verfügung standen, somit kein Einfluss der zeitlichen Futterlimitierung auf die Melatoninkonzentration zu erwarten. Die Konzentrationsunterschiede der vor und nach der Fütterung entnommenen Proben sind nicht signifikant. Da aber die Proben morgens und abends in ungleichen Abständen zur Fütterung gewonnen wurden, ist es nicht möglich, eine konkrete Aussage über den Einfluss der Futteraufnahme zu treffen.

2.1.2. Abhängigkeit vom Geschlecht

Zwischen den männlich-kastrierten und den weiblichen Tieren existieren geringe Unterschiede in den Plasmamelatoninprofilen. In der Gruppe der kastrierten Tiere tritt am ersten Untersuchungstag ein kontinuierlicher Konzentrationsanstieg während der Tagphase auf, hingegen steigt die Konzentration bei den weiblichen Tieren erst ab der zweiten Tageshälfte deutlicher an. Die Konzentrationsunterschiede zwischen Tag- und Nachtproben der männlich-kastrierten Tiere sind sowohl unter Einbeziehung, wie auch unter Ausschluss der Transitionszeiten nicht signifikant, weisen im letzteren Falle aber tendenzielle Unterschiede auf. Der fehlende Tag/Nacht-Unterschied zeigt – gestützt durch den kontinuierlichen Konzentrationsanstieg während der Tagphase, – dass die Tiere nicht ausreichend mit dem Lichtregime synchronisiert waren. Dies könnte darauf hinweisen, dass die vorhandene Lichtintensität (250 bis 470 Lux) nicht ausgereicht hat, um einen stabilen pinealen Melatoninsekretionsrhythmus bei kastrierten männlichen Tieren zu formen. HERNANDEZ et al. (1990) zeigten, dass durch die Kastration ein Wegfall der testosteronbedingten Stimulation der Melatoninsynthese resultiert. In seiner Untersuchung führte die Kastration männlicher Ratten zu einem Rückgang des nächtlichen Anstiegs der pinealen Melatoninkonzentration, da die Tag/Nacht-Rhythmik des an der Noradrenalin synthese beteiligten Enzyms, sowie auch die des

Neurotransmitters Noradrenalin selbst, aufgehoben, sowie ihre Konzentrationen während der Tagphase erhöht wurden. Durch anschließende Testosteronapplikation konnten die pinealen Tag/Nacht-Rhythmen von Noradrenalin und Melatonin teilweise wieder hergestellt werden. Weitere Studien (NAGLE et al., 1974; KARASEK et al., 1978; RUDEEN und REITER, 1980) konnten ebenfalls einen Einfluss der Kastration auf die an der Melatoninsynthese beteiligten Enzyme (SNAT, HIOMT) und sekundären Botenstoffe (cAMP) nachweisen.

Bei den weiblichen Tieren sind die Tag/Nacht-Unterschiede der Plasmamelatoninkonzentrationen aufgrund der jeweils vor Änderung des Lichtregimes auftretenden Konzentrationsänderungen nur unter Ausschluss dieser Transitionsproben signifikant. Dies deutet wiederum darauf hin, dass das Plasmamelatoninprofil während der Tagphase nicht völlig mit dem Lichtregime synchronisiert war, während der nächtliche Konzentrationsrückgang den Erwartungen entspricht (ROMERO et al., 1975; PANGERL et al., 1990).

Am zweiten Untersuchungstag stimmt der Verlauf der Plasmamelatoninkonzentrationen weder bei den männlich-kastrierten, noch bei den weiblichen Tieren mit dem des ersten Untersuchungstages überein. Die Melatoninkonzentrationen der männlich-kastrierten sind auch am zweiten Untersuchungstag höher als die der weiblichen Tiere. Diese Ergebnisse widersprechen der Arbeit von GREEN et al. (1999), die keine Unterschiede in den Serummelatoninkonzentrationen der Tag- und der Nachtproben zwischen den juvenilen weiblichen, sowie den kastrierten männlichen Schweinen feststellen konnten. Dagegen fand Andersson (2001) bei Ebern höhere Plasmamelatoninkonzentrationen als bei Sauen und weiblichen Jungschweinen, was den an juvenilen Tieren gewonnenen Ergebnissen dieser Untersuchung entspricht. Der Konzentrationseinbruch am zweiten Untersuchungstag ist bei den weiblichen Tieren stärker ausgeprägt als bei den männlich-kastrierten Tieren. Jedoch liegen die Melatoninkonzentrationen der Tagproben, mit Ausnahme des kurzzeitigen Konzentrationseinbruchs, auf dem Niveau der Nachtproben des ersten Untersuchungstages. Dies deutet darauf hin, dass die noradrenerge Stimulation der pinealen Melatoninsynthese den sie inhibierenden Lichteinfluss überwiegt (FUNK und AMIR, 1999). Zu einem weiteren geschlechtsspezifischen Unterschied kommt es am zweiten Untersuchungstag bei den um jeweils 7 Uhr entnommenen Proben. Während bei den weiblichen Tieren die Melatoninkonzentration in den Morgenproben gegenüber den Nachtproben auch am zweiten

Untersuchungstag leicht sinkt, so bleibt bei den männlich-kastrierten Tieren die Konzentration nahezu auf dem gleich hohen Niveau der Nachtwerte. Man könnte daraus schließen, dass der ursprüngliche Konzentrationsrückgang in den frühen Morgenstunden (ROMERO et al., 1975; PANGERL et al., 1990) bei den kastrierten männlichen Tieren stärker durch eine noradrenerge Stimulation der pinealen Melatoninsynthese gestört wird als bei den weiblichen Tieren, wodurch sich auch der signifikante Konzentrationsunterschied zwischen den Kastraten und weiblichen Tieren in den Morgenproben des zweiten Untersuchungstages erklärt. Eine Studie über die Cortisolrhythmik im Speichel junger Schweine wies keine geschlechtsabhängigen Unterschiede der basalen Cortisolkonzentration nach, jedoch trat bei den männlichen Tieren unter Isolationsstress ein stärkerer Konzentrationsanstieg auf als bei den weiblichen Tieren (RUIS et al., 1997), wodurch obige Hypothese gestützt wird.

Ein potentieller Einfluss der Futteraufnahme auf die Plasmamelatonininkonzentration (KNOLL et al., 1984; SELMAOUI et al., 2001) ist weder für die männlich-kastrierten Tiere, noch für die weiblichen Tiere nachweisbar. Die jeweils vor und nach der Fütterung entnommenen Proben unterscheiden sich nicht signifikant.

2.1.3. Abhängigkeit von der Lichtintensität

Bei Betrachtung der Plasmamelatoninprofile in Abhängigkeit von der während der Tagphase angebotenen Lichtintensität sind deutliche Unterschiede zwischen den Profilen der bei 470 Lux und der bei 250 Lux gehaltenen Tiere erkennbar.

In der bei 250 Lux gehaltenen Tiergruppe ist am ersten Untersuchungstag kein Profil der Plasmamelatonininkonzentration vorhanden. Die Konzentrationen der Tagproben liegen auf demselben Niveau wie die der nachfolgenden Nachtproben. Demnach sind 250 Lux nicht ausreichend, um die Melatoninsynthese während der Tagphase vollständig zu unterdrücken. In der Arbeit von GRIFFITH und MINTON (1992) stellte sich eine Lichtintensität von 113 Lux, im Gegensatz zu 1783 Lux als nicht ausreichend heraus, um einen Tag/Nacht-Unterschied der Plasmamelatonininkonzentrationen zu bewirken. Auch in der Untersuchung von MACK und UNSHELM (1997) waren 50 Lux im Gegensatz zu 1300 Lux nicht ausreichend. Hingegen waren in den Arbeiten von TAST et al. (2001a, b) bereits ab einer Lichtintensität von 40 Lux bis 250 Lux deutliche Tag/Nacht-Unterschiede vorhanden.

Im Gegensatz dazu ist in der bei 470 Lux gehaltenen Gruppe am ersten Untersuchungstag ein nokturnales Melatoninprofil ausgebildet. Nach Beginn der Tagphase sinkt die Konzentration und bleibt während der ersten 9 Stunden auf diesem Niveau, was auf eine lichtinduzierte Suppression der Melatoninsynthese hinweist. In der letzten Probe der Tagphase steigt die Melatonininkonzentration aber bereits bis auf das Niveau der Nachtproben, was zu diesem Zeitpunkt wiederum gegen eine lichtinduzierte Suppression der Melatoninsynthese spricht.

Die Tag/Nacht-Unterschiede sind sowohl unter Ausschluss, als auch unter Einbeziehung der Transitionszeiten in der bei 470 Lux gehaltenen Gruppe signifikant. Dies kann als Synchronisation der Tiere mit dem Lichtregime interpretiert werden. Der signifikante Konzentrationsanstieg zwischen den Abendproben und der mittleren Konzentration der vorhergehenden Tagproben zeigt aber möglicherweise, dass auch eine Lichtintensität von 470 Lux noch nicht ausreicht, um in weitestgehend mit dem Lichtregime synchronisiertem Zustand den Anstieg der pinealen Melatoninsynthese vor Ende der Tagphase zu verhindern. Bei GRIFFITH und MINTON (1992) war das Melatoninprofil bei der Lichtintensität von 1783 Lux vollständig mit dem Lichtregime synchronisiert. Es wäre vorstellbar, dass eine Intensität von über 470 Lux notwendig ist, um ein ausschließlich lichtabhängiges nokturnales Sekretionsprofil der Epiphyse zu induzieren. Der verfrühte Melatoninanstieg in den Abendproben könnte durch die regelmäßige Abendfütterung (KNOLL et al., 1984) und der Erwartung der bevorstehenden Nachtphase hervorgerufen worden sein.

Die Plasmamelatoninprofile der beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich am ersten Untersuchungstag durch die signifikant höheren Melatonininkonzentrationen in den Tagproben der 250 Lux Gruppe. Die in der Nachtphase auftretenden Melatonininkonzentrationen unterscheiden sich dabei nicht. Der fehlende Konzentrationsunterschied zwischen den Nachtwerten, sowie der gegen Nachtende auftretende Konzentrationsrückgang in beiden Versuchsgruppen entspricht den Erwartungen, da die pineale Melatoninsynthese beider Tiergruppen nachts durch eine identische Lichtintensität von 0,1 bis maximal 1,0 Lux stimuliert wurde, und die Wirkung der durch die Dunkelheit induzierten pinealen Stimulation über die Nachtlänge abnimmt (ROMERO et al., 1975; PANGERL et al., 1990). Auch in der Untersuchung von TAST et al. (2001b) unterscheiden sich die nächtlichen Melatonininkonzentrationen bei unterschiedlichen Lichtintensitäten während der Tagphase nicht voneinander.

Am zweiten Untersuchungstag ist in keiner der beiden Gruppen der am ersten Untersuchungstag vorhandene Konzentrationsverlauf wiederzufinden. In der 250 Lux Tiergruppe ist am zweiten Untersuchungstag die Ausgangsmelatonininkonzentration signifikant höher als jene des ersten Tages und liegt auf dem Niveau der Nachtmelatonininkonzentrationen. Der Konzentrationsverlauf des zweiten Untersuchungstages zeigt, dass die Tiere – verstärkt durch die noradrenerge Stimulation der Melatoninsynthese durch das Handling (ROOZEN et al. 1995; RUIS et al., 1997; FUNK und AMIR, 1999; ROSOCHACKI et al., 2000) – keinen lichtinduzierten Rhythmus der Melatoninsekretion aufweisen.

In der bei 470 Lux gehaltenen Tiergruppe könnte am zweiten Untersuchungstag das am ersten Tag vorhandene Profil durch den während der Tagphase früher auftretenden Konzentrationsanstieg überdeckt sein. Die nicht signifikanten Tag/Nacht-Unterschiede des zweiten Untersuchungstages könnten darauf hinweisen, dass das Melatoninprofil der Schweine nur unzureichend stabil ist (INGRAM und DAUNCEY, 1985; LEWCZUK und PRZYBYLSKA-GORNOWICZ, 2000) und durch exogene Faktoren wie die noradrenerge Stimulation der Melatoninsynthese bei der Probengewinnung beeinflusst werden kann. ROSOCHACKI et al. (2000) wiesen während der Fixierung von Schweinen einen Konzentrationsanstieg von Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Cortisol nach, und konnten rassespezifische Unterschiede im Ausmaß des Konzentrationsanstiegs zwischen der auch in vorliegender Untersuchung verwendeten stressempfindlichen Rasse Piétrain und der stressresistenten Rasse Duroc zeigen. Die Melatonininkonzentration sinkt über die erste Tageshälfte kontinuierlich ab, ist jedoch höher als die während der ersten Hälfte des ersten Untersuchungstages gemessene Konzentration. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der stressbedingte Konzentrationsanstieg erst durch eine längere Lichteinwirkung gesenkt werden kann. Auch ist schließlich ein Zusammenwirken exogener (Licht) und endogener Faktoren (Noradrenalin) an der Regulation der pinealen Aktivität möglich (FUNK und AMIR, 1999). Der Verlauf der Plasmamelatonininkonzentrationen des zweiten Untersuchungstages unterscheidet sich zwischen den beiden Tiergruppen deutlicher während der Tag- als während der Nachtphase, was wiederum zeigt, dass die Lichtintensität einen direkten Einfluss auf die Tagesmelatonininkonzentration hat. Dieses Ergebnis steht in direktem Widerspruch zu TAST et al. (2001b), die keinen Einfluss der Lichtintensität während der Tagphase auf die Tagesmelatonininkonzentration feststellen konnten. Die Melatonin-

konzentrationen der 250 Lux Gruppe sind in den Morgenproben des zweiten Untersuchungstages signifikant höher als die der 470 Lux Gruppe, was auf das Zusammenwirken der stressinduzierten Stimulation der Melatoninsynthese mit der bei 470 Lux ausgebildeten Melatoninrhythmik hindeuten könnte. Nach Tagesbeginn sowie über die Nachtphase sind die Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben der unterschiedlichen Lichtintensitäten nicht signifikant, was hinsichtlich der Nachtproben den Erwartungen entspricht.

Ein potentieller Einfluss der Futteraufnahme auf die Plasmamelatonininkonzentration ist weder eindeutig nachweisbar, noch sicher auszuschließen (KNOLL et al., 1984; SELMAOUI et al., 2001). In der bei 250 Lux gehaltenen Gruppe tritt am ersten Untersuchungstag ein signifikanter Konzentrationsanstieg zwischen den vor und nach der Morgenfütterung entnommenen Proben auf. Dies könnte ein möglicher Hinweis auf einen fütterungsbedingten Anstieg sein, und damit erklärt werden, dass bei unzureichender Lichtintensität exogenen Faktoren wie dem Fütterungszeitpunkt eine größere Bedeutung zukommt. Hingegen ist der Unterschied vor und nach der Abendfütterung nicht vorhanden.

2.1.4. Abhängigkeit von der Lichtintensität und dem Geschlecht

Unter Berücksichtigung des Geschlechts treten deutliche Unterschiede zwischen den Melatoninprofilen der bei 470 Lux oder bei 250 Lux Lichtintensität gehaltenen Tiere auf. Aufgrund der geringen Tierzahl (n=3 je Lichtintensität und Geschlecht) sind die Ergebnisse dieses Kapitels vorsichtig zu interpretieren, weisen aber dennoch sehr deutliche Tendenzen auf.

In der Gruppe der weiblichen bei 470 Lux gehaltenen Tiere weist das Melatoninprofil am ersten Untersuchungstag ein klares nokturnales, fast vollständig mit dem Lichtregime synchronisiertes Profil mit einem signifikanten Tag/Nacht-Unterschied auf. Die Existenz dieser Melatoninrhythmik entspricht den Ergebnissen von ANDERSSON (2001), der bei adulten weiblichen Schweinen ebenfalls einen nächtlichen Konzentrationsanstieg feststellte, jedoch betrug die aus einer Kombination von Fensterlicht und zusätzlichem Kunstlicht verwendete Lichtintensität lediglich 150 bis 300 Lux. Dies kann das Fehlen einer deutlichen Melatoninrhythmik in der weiblichen 250 Lux Gruppe nicht erklären. In dieser Gruppe ist nur ein unregelmäßiges Melatoninprofil vorhanden. Die weiblichen 250 Lux Tiere haben im

Gegensatz zu den 470 Lux Tieren unter Einbeziehung der Transitionszeiten an beiden Untersuchungstagen identische Tag- und Nachtmelatoninkonzentrationen. Die Melatoninkonzentration der während der Tagphase entnommenen Proben in der 250 Lux Gruppe sind ebenfalls signifikant höher als die der 470 Lux Gruppe. Aus diesem Grund muss die Lichtintensität von 250 Lux als nicht ausreichend beurteilt werden, was den Ergebnissen von ANDERSSON et al. (2000), TAST et al. (2001a, b, c) und TEUBNER (2002) widerspricht. Am zweiten Untersuchungstag bleibt in der 470 Lux Gruppe der weiblichen Tiere das am ersten Tag ausgebildete Profil ausgenommen des zeitlich früher auftretenden Konzentrationsanstiegs erhalten, während in der 250 Lux Gruppe nur noch ein diskontinuierlicher Konzentrationsverlauf vorhanden ist. Dieser früher auftretende Konzentrationsanstieg in der 470 Lux Gruppe könnte wiederum mit einer noradrenergen Stimulation der Melatoninsynthese (ROOZEN et al., 1995; RUIS et al., 1997; FUNK und AMIR, 1999; ROSOCHACKI et al., 2000) erklärt werden. Aufgrund des erhöhten Stresses durch die Probengewinnung ist die Lichtintensität von 470 Lux möglicherweise nicht mehr ausreichend, um das Melatoninprofil vollständig mit dem Lichtregime zu synchronisieren.

Infolge des signifikanten Einflusses der Lichtintensität auf die Melatoninkonzentration der Tag-, nicht aber der Nachtproben, ist auch die Existenz signifikanter Tag/Nacht-Unterschiede von der Lichtintensität abhängig, wie auch die Arbeit von GRIFFITH und MINTON (1992) zeigt. Somit hat die Lichtintensität in beiden Gruppen der weiblichen Tiere einen deutlichen Einfluss auf die Existenz signifikanter Tag/Nacht-Unterschiede, was die Bedeutung einer ausreichenden Lichtintensität im Hinblick auf die Melatoninrhythmik erneut unterstreicht. Der zu erwartende nächtliche Konzentrationsrückgang zwischen den Nacht- und den Morgenproben (ROMERO et al., 1975; PANGERL et al., 1990) tritt am ersten Untersuchungstag und in den Mittelwerten über beide Untersuchungstage in beiden Gruppen der weiblichen Tiere auf. Am zweiten Untersuchungstag kommt dieser nächtliche Konzentrationsrückgang nur bei den bei 470 Lux gehaltenen weiblichen Tieren vor, was bei der 250 Lux Gruppe mit der kaum ausgebildeten Melatoninrhythmik am ersten Untersuchungstag und der zusätzlich hinzukommenden noradrenergen Stimulation der Melatoninsynthese (ROOZEN et al. 1995; RUIS et al., 1997; FUNK und AMIR, 1999; ROSOCHACKI et al., 2000) am zweiten Tag zusammenhängt. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den vor und nach den Fütterungen entnommenen Proben sind in beiden Gruppen der weiblichen Tiere nicht signifikant, und weisen darauf hin,

dass der potentielle Zeitgeber der Fütterungszeiten (KNOLL et al., 1984) den Zeitgeber des Tag/Nacht-Wechsels (ALI et al., 1992) nicht überwiegt.

In den Gruppen der männlich-kastrierten Tiere weist das Profil der 470 Lux und der 250 Lux Tiere am ersten Untersuchungstag einen kontinuierlichen Konzentrationsanstieg während der Tagphase auf, wobei die Melatoninkonzentrationen der Tagproben in der 250 Lux Gruppe höher sind als die der 470 Lux Tiere. Diese hohen Tagwerte der 250 Lux Gruppe zeigen, dass eine Lichtintensität von 250 Lux die Melatoninsynthese während der Tagphase kaum supprimieren kann (MINTON und CASH, 1990; PATERSON et al., 1992; GRIFFITH und MINTON, 1992; MACK und UNSHELM, 1997). Die Tag/Nacht-Unterschiede sind nur am zweiten Untersuchungstag und auch nur in der 250 Lux Gruppe signifikant, was vor allem durch den Konzentrationseinbruch hervorgerufen wird. Die Tag/Nacht-Unterschiede der 250 Lux Gruppe am zweiten Untersuchungstag, und die Unterschiede zur 470 Lux Gruppe sind aufgrund des diskontinuierlichen Konzentrationsverlaufs durch die noradrenerge Stimulation der Melatoninsynthese (ROOZEN et al. 1995; RUIS et al., 1997; FUNK und AMIR, 1999; ROSOCHACKI et al., 2000) nicht schlüssig zu interpretieren. Da weder die Lichtintensität von 250 Lux, noch die von 470 Lux am ersten Untersuchungstag bei den männlichen Tieren zum Auftreten eines signifikanten Tag/Nacht-Unterschieds führt, scheint für kastrierte männliche Schweine selbst eine Lichtintensität von 470 Lux als noch nicht ausreichend zu beurteilen zu sein, wobei dies auf der Kastration beruhen könnte (HERNANDEZ et al., 1990).

Der nächtliche Konzentrationsrückgang zwischen Nacht- und Morgenproben, der in beiden Gruppen der weiblichen Tiere auftritt, fehlt am ersten Tag jedoch in beiden Gruppen der männlichen Tiere, was durch den kastrationsbedingten Wegfall der testosteroninduzierten Stimulation der Melatoninsynthese (HERNANDEZ et al., 1990) sowie der an der Melatoninsynthese beteiligten Enzyme und sekundären Botenstoffe (NAGLE et al., 1974; KARASEK et al., 1978; RUDEEN und REITER, 1980) bedingt sein dürfte, und von der Lichtintensität unabhängig zu sein scheint. Der nach der Morgenfütterung des ersten Untersuchungstages in der 250 Lux Gruppe der männlich-kastrierten Tiere signifikante Konzentrationsunterschied zwischen den vor und nach der Fütterung entnommenen Proben könnte darauf hinweisen, dass dieser Tiergruppe der Fütterungszeitpunkt als Zeitgeber (KNOLL et al., 1984; INGRAM und DAUNCEY, 1985) gedient hat, und nicht, wie es den Erwartungen entsprochen hätte,

der Tag/Nacht-Wechsel, was wiederum die Vermutung einer unzureichenden Lichtintensität stützt. Die in beiden Gruppen der männlich-kastrierten Tiere über beide Untersuchungstage kontinuierlich ansteigende Melatonininkonzentration der Morgenproben weist ebenfalls auf einen über den Gesamtuntersuchungszeitraum steigenden Stresslevel mit zunehmender noradrenerger Stimulation der Melatoninsynthese (ROOZEN et al. 1995; RUIS et al., 1997; FUNK und AMIR, 1999; ROSOCHACKI et al., 2000) hin.

Die anhand des direkten Vergleichs der bei identischer Lichtintensität von 470 Lux gehaltenen männlichen und weiblichen Tiere gewonnenen Ergebnisse (Kap. 2.1.4) zeigen bei den männlich-kastrierten Tieren insbesondere während der Tagphase höhere Melatonininkonzentrationen als bei den weiblichen Tieren, was erneut auf die fehlende Regulation der Melatoninsynthese unter Lichtenwesenheit infolge des kastrationsbedingten Testosteronmangels (HERNANDEZ et al., 1990; NAGLE et al., 1974; KARASEK et al., 1978; RUDEEN und REITER, 1980) hinweist. Dieser geschlechtsspezifische Unterschied tritt auch in der bei geringerer Lichtintensität von nur 250 Lux gehaltenen Gruppe zwischen den männlich-kastrierten und den weiblichen Tieren auf, jedoch auch hier ohne eine Signifikanz im Vergleich der Tagmelatonininkonzentrationen zu zeigen. Jedoch unterscheiden sich die Nachtmelatonininkonzentrationen des zweiten Tages hier signifikant, was möglicherweise weniger auf der durch den Tag/Nacht-Wechsel induzierten, als auf der stressinduzierten Stimulation der Melatoninsynthese (ROOZEN et al. 1995; RUIS et al., 1997; ROSOCHACKI et al., 2000) beruht. RUIS et al. (1997) konnten zeigen, dass männliche Schweine nach Isolationsstress einen höheren Anstieg der Speichelcortisolkonzentration aufwiesen als weibliche Tiere. Die Melatonininkonzentration der männlich-kastrierten Versuchstiere der 250 Lux Gruppe steigt ab der Tagesmitte kontinuierlich, aber nicht streng lichtabhängig an.

Auch die Unterschiede zwischen den Melatoninprofilen der männlich-kastrierten und der weiblichen bei 470 Lux gehaltenen Tiere zeigen am zweiten Untersuchungstag bei den kastrierten männlichen Tieren insbesondere während der Tagphase deutlich höhere Melatonininkonzentrationen, die den Ergebnissen von RUIS et al. (1997) hinsichtlich eines geschlechtsabhängigen Anstiegs der Cortisolkonzentration als Stressantwort entsprechen.

2.2. Speichelmelatonininkonzentrationen

2.2.1. Gesamtgruppe

Der Vergleich der beiden Untersuchungstage zeigt deutliche Unterschiede in den Melatonininkonzentrationen. Während am ersten Untersuchungstag ein diurnales Profil der Melatonininkonzentrationen vorhanden ist, welches höhere Tag- als Nachtwerte aufweist, so ist am zweiten Untersuchungstag aufgrund niedrigerer Tagkonzentrationen kein Melatoninprofil mehr vorhanden. Diese hohen Melatonininkonzentrationen während der Tagphase und im Gegensatz dazu die niedrigen Melatoninwerte während der Nacht des ersten Untersuchungstages stehen in Widerspruch zu den bisher veröffentlichten Untersuchungen. Das Speichelmelatoninprofil verläuft hier entgegengesetzt zur Lichtintensität, was deutlich gegen eine Synchronisation der Speichelmelatonininkonzentration mit dem Lichtregime spricht. In den Arbeiten von VOULTSIOS et al. (1997), KENNAWAY und VOULTSIOS (1998), ZHOU et al. (2003) und GOONERATNE et al. (2003) konnte jedoch ein klarer nokturnaler Rhythmus der Speichelmelatonininkonzentration bei Menschen verschiedener Altersstufen nachgewiesen werden. Das Fehlen eines signifikanten Tag/Nacht-Unterschiedes trotz deutlicher Konzentrationsunterschiede der Mittelwerte am ersten Untersuchungstag beruht auf den großen individuellen Konzentrationsunterschieden, was darauf hinweisen könnte, dass die Melatoninbestimmung aus Speichelproben bei Schweinen sehr störungsanfällig ist. Als mögliche Einflussfaktoren auf die Speichelmelatonininkonzentration könnten sowohl exogene Einflüsse als auch endogene Faktoren von Bedeutung sein. DEACON und ARENDT (1994) konnten z.B. eine Abhängigkeit der Speichelmelatonininkonzentration von der Körperhaltung feststellen. Eine stehende Körperposition führte bereits nach zehn Minuten zum Anstieg der Speichelmelatonininkonzentration, während der Wechsel in eine liegende Position einen Konzentrationsrückgang bewirkte. Demnach beruht das Speichelmelatoninprofil des ersten Untersuchungstages möglicherweise auf dem Aktivitätsrhythmus der Versuchstiere, der während der Tagphase bei der Probengewinnung höher war als während der nächtlichen Ruhezeiten. Auch der Zeitpunkt der Futteraufnahme sowie der Abstand zur Probengewinnung könnte sowohl die Speichelzusammensetzung, als auch das Speichelvolumen beeinflussen. Obwohl eine unkontrollierte Futteraufnahme durch den zeitlich limitierten Futterzugang verhindert wurde, und eine Kontamination der Speichelproben mit Futterresten darüber hinaus auch durch regelmäßige Reinigung von Maulhöhle und

-umgebung minimiert wurde, ist der Standardfehler in den Tagproben größer als in den Nachtproben. Der am ersten Untersuchungstag auftretende postprandiale Anstieg der Speichelmelatoninkonzentration stimmt mit den Ergebnissen von KNOLL et al. (1984) und RICE et al. (1995) überein. Auch die nach INGRAM und DAUNCEY (1985) mit der Futteraufnahme zeitlich in Verbindung stehende Wasseraufnahme könnte sowohl die Speichelzusammensetzung, als auch das Speichelvolumen beeinflussen, und wurde deshalb 30 min vor jeder Probengewinnung verhindert. Auch eine größere Wasseraufnahme, die das unmittelbar nach jeder Probenentnahme verabreichte Volumen von 20 ml pro Tier überschreitet, ist während der nächtlichen Ruhephase der Schweine selbst bei mehrmaliger Unterbrechung dieser Ruhephasen weniger wahrscheinlich, als eine Wasseraufnahme während der Tagphase. Die geringen Speichelvolumina einzelner Versuchstiere, die in Einzelfällen das zur Melatoninbestimmung erforderliche Probenvolumen von 200 µl unterschritten, könnten auch durch eine verminderte Speichelsekretion während der Schlafphasen und in Stresssituationen hervorgerufen worden sein (GEMBA et al., 1996). Darüber hinaus könnte, wie DAWES (1975), GEMBA et al. (1996) und KANIKOWSKA et al. (2002) in Studien am Menschen feststellten, auch bei Schweinen ein Tagesrhythmus der Speichelflussrate existieren, der nachts, wenn Melatonin aus der Zirbeldrüse freigesetzt wird, variiert; und darüber hinaus – analog zum Menschen – auch durch die Gefühlslage beeinflusst werden könnte (GEMBA et al., 1996).

2.2.2. Abhängigkeit vom Geschlecht

Zwischen den Profilen und den Melatoninkonzentrationen der männlich-kastrierten und weiblichen Tiere bestehen deutliche Unterschiede. Während in der Gruppe der weiblichen Tiere am ersten Untersuchungstag ein deutlicher diurnaler Konzentrationsverlauf mit einem deutlichen Konzentrationsrückgang während der Nachtphase auftritt, fehlt dieses diurnale Profil bei den kastrierten männlichen Tieren gänzlich. Am zweiten Untersuchungstag sind die Profile weder bei den weiblichen, noch bei den männlich-kastrierten Tieren ausgebildet. Sowohl bei den männlich-kastrierten, als auch bei den weiblichen Tieren fehlen signifikante Tag/Nacht-Unterschiede. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass weitere zusätzliche exogene Faktoren einen Einfluss auf den Melatingehalt im Speichel haben könnten, als ausschließlich der Wechsel des Lichtregimes. Deutliche Unterschiede

zeigen sich auch hinsichtlich des zeitlichen Auftretens erhöhter Melatoninkonzentrationen: Während sie bei den männlich-kastrierten Tieren nachts höher sind als tagsüber, was den Erwartungen hinsichtlich einer lichtinduzierten Suppression der Melatoninsynthese entspricht (MCINTYRE et al., 1987; AOKI et al., 1998; KUBOTA et al., 2002), treten in den Speichelproben der weiblichen Tiere tagsüber höhere Werte auf. Dieser Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren steht im Widerspruch zur Arbeit von GOONERATNE et al. (2003), in der beim Menschen kein geschlechtsspezifischer Unterschied im Speichelmelatoningehalt festgestellt wurde. Die niedrigen Speichelmelatoninkonzentrationen der kastrierten männlichen Tiere könnten auch durch den kastrationsbedingten Wegfall der testosteroninduzierten Stimulation der Melatoninsynthese (HERNANDEZ et al. 1990), sowie die ebenfalls kastrationsbedingte Beeinflussung der an der Melatoninsynthese beteiligten Enzyme und sekundären Botenstoffe (NAGLE et al., 1974; KARASEK et al., 1987; RUDEEN und REITER, 1980) hervorgerufen worden sein, während die hohen Werte tagsüber bei den weiblichen Tieren nicht erklärt werden können.

2.2.3. Abhängigkeit von der Lichtintensität

Die Speichelmelatoninkonzentrationen unterscheiden sich deutlich zwischen den beiden Lichtintensitäten. Im Gegensatz zu der bei 470 Lux gehaltenen Gruppe, die am ersten Untersuchungstag ein diurnales Speichelmelatoninprofil mit einem deutlichen Konzentrationsrückgang in der Nachtphase zeigt, sinkt die Speichelmelatoninkonzentration in der bei 250 Lux gehaltenen Gruppe tagsüber und steigt erst in der letzten Tagprobe wieder an. Am zweiten Untersuchungstag treten keine Profile mehr auf. Diese hohen Melatoninkonzentrationen der Tagproben in der bei 470 Lux gehaltenen Gruppe stehen im Widerspruch zur lichtinduzierten Suppression der Melatoninsynthese (MCINTYRE et al., 1987; AOKI et al., 1998; KUBOTA et al., 2002), könnte aber eventuell auf einer höheren individuellen Bewegungsaktivität beruhen (DEACON und ARENDT, 1994). Es zeigt sich, dass hier andere Faktoren für den Melatoningehalt im Speichel verantwortlich sein müssen. KANIKOWSKA et al. (2002) konnten z.B. zeigen, dass die Speichelsekretionsrate durch die Lichtintensität, sowie auch die Tageszeit beeinflusst wird: Während eine Lichtintensität von 3000 Lux morgens eine signifikant höhere Speichelsekretion bewirken konnte als eine Lichtintensität von 100 Lux, war die Speichelproduktion abends bei der geringeren

Lichtintensität signifikant höher. Die Tag/Nacht-Unterschiede sind in beiden Gruppen sowohl unter Einbeziehung, als auch nach Ausschluss der Transitionszeiten an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant. In der bei 250 Lux gehaltenen Gruppe sind die Melatoninkonzentrationen der nachts entnommenen Speichelproben stets höher als tagsüber, wobei diese Konzentrationsunterschiede jedoch minimal bleiben. Dieser nächtliche Anstieg der Speichelmelatoninkonzentration stimmt mit allen bislang veröffentlichten Untersuchungen wie z.B. LAAKSO et al. (1990), KENNAWAY und VOULTSIOS (1998), ZHOU et al. (2003) und GOONERATNE et al. (2003) überein. Dementsprechend stehen die am ersten Untersuchungstag und in den Mittelwerten über beide Untersuchungstage tagsüber höheren Konzentrationen der 470 Lux Gruppe in Widerspruch zur Literatur, während am zweiten Untersuchungstag auch in dieser Tiergruppe ein nächtlicher Konzentrationsanstieg vorhanden ist. Die Melatoninkonzentrationen der zeitgleich entnommenen Speichelproben sind in der bei 470 Lux gehaltenen Gruppe an beiden Untersuchungstagen sowohl während der Tag- als auch während der Nachtphase signifikant höher als in der bei 250 Lux gehaltenen Gruppe. Hingegen stellten RICE et al. (1995) in einer Untersuchung über den Einfluss der spektralen Lichtzusammensetzung auf die Speichelmelatoninkonzentrationen zwischen 18.00 und 24.00 Uhr bei Patienten mit Winterdepressionen keinen Unterschied zwischen Kaltlichtlampen und Lampen, die das natürliche Lichtspektrum abdecken, fest. In dieser Studie betrug die Lichtintensität der Kaltlichtlampen 3013 Lux und die der Lampen mit breiterem Spektrum 2690 Lux. Da die Lichtintensitäten in vorliegender Untersuchung jedoch deutlich geringer waren, ist hinsichtlich der Auswirkungen geringerer Lichtintensitäten, sowie auch über den Einfluss der Lichtintensität auf die Speichelmelatoninkonzentration während der Tagphase keine Aussage möglich. In Untersuchungen über die Speichelmelatoninkonzentration am Menschen wurden bislang nur während der Nachtphase bei einer Lichtintensität von weniger als 50 Lux Proben entnommen (VOULTSIOS et al., 1997; ZHOU et al., 2003; GOONERATNE et al., 2003). In diesen Studien war stets ein nächtlicher Anstieg der Speichelmelatoninkonzentration vorhanden. AOKI et al. (1998) konnten nach einer nächtlichen Lichtexposition eine Suppression der menschlichen Speichelmelatoninkonzentration nachweisen, die mit steigender Lichtintensität sowie steigender Expositionsdauer zunahm. Eine einstündige nächtliche Lichtexposition bei einer Lichtintensität von ca. 3000 Lux führte in einer Untersuchung von MCINTYRE et al. (1987) zur Suppression

der Melatoninkonzentration in Plasma- und Speichelproben. Auch diese Ergebnisse sind nicht auf die vorliegende Untersuchung übertragbar, da die Versuchstiere hier nur während der Tag-, nicht aber während der Nachtphase bei unterschiedlichen Lichtintensitäten gehalten wurden. Demnach kann die Frage, ob die Speichelmelatoninkonzentration durch die Lichtintensität während der Tagphase beeinflusst wird, nicht geklärt werden und bleibt deshalb vorläufig noch unklar.

2.2.4. Abhängigkeit von der Lichtintensität und dem Geschlecht

Unter Berücksichtigung des Geschlechts treten deutliche Unterschiede zwischen den Melatoninprofilen der bei 470 Lux oder bei 250 Lux Lichtintensität gehaltenen Tiere auf. Paradoxe Weise verhalten sich die geschlechtsabhängigen Unterschiede zwischen den beiden Lichtintensitäten entgegengesetzt.

In der Gruppe der weiblichen Tiere weisen nur die bei 470 Lux gehaltenen Tiere am ersten Untersuchungstag einen diurnalen Konzentrationsverlauf auf, während die bei 250 Lux gehaltenen Tiere während der Tagphase einen Konzentrationsrückgang aufweisen. Darüber hinaus sind die Melatoninkonzentrationen der bei 470 Lux gehaltenen weiblichen Tiere – mit Ausnahme der Transitionszeiten – an beiden Untersuchungstagen signifikant höher als die der bei 250 Lux gehaltenen weiblichen Tiere. Obwohl die bei 470 Lux gehaltenen weiblichen Tiere eine höhere Lichtintensität hatten als die bei 250 Lux gehaltenen Tiere, treten höhere Melatoninkonzentrationen im Speichel auf. Dies steht wiederum im Widerspruch zu der allgemeinen Erwartung einer lichtinduzierten Suppression der Melatoninsynthese (MCINTYRE et al., 1987; AOKI et al., 1998; KUBOTA et al., 2002), ließe sich aber eventuell durch eine höhere individuelle Bewegungsaktivität (DEACON und ARENDT, 1994) erklären. Darüber hinaus sind die Speichelmelatoninkonzentrationen nach Ausschluss der Transitionszeiten in beiden Gruppen der weiblichen Tiere während der Tagphase höher als nachts. Demnach unterscheiden sich sowohl das Speichelmelatoninprofil, als auch die absoluten Melatoninkonzentrationen der weiblichen Tiere deutlich zwischen den beiden Lichtintensitäten, während der nächtliche Konzentrationsrückgang zwischen beiden Gruppen übereinstimmt. Welche Faktoren für die hohen Tagwerte der bei 470 Lux gehaltenen weiblichen Tiere verantwortlich sind, kann auch hier nicht eindeutig geklärt werden, wobei sich in dieser Gruppe die individuellen Unterschiede stärker bemerkbar machen, die

wiederum auf einer höheren individuellen Bewegungsaktivität (DEACON und ARENDT, 1994) beruhen könnten.

In der Gruppe der männlich-kastrierten Tiere weisen beide Gruppen am ersten Untersuchungstag ein einander ähnliches Melatoninprofil auf. Ebenso tritt sowohl in der bei 470 Lux, als auch in der bei 250 Lux gehaltenen Gruppe der männlich-kastrierten Tiere ein Konzentrationsmaximum in der Nacht auf. Im Gegensatz zu den weiblichen Tieren erreichen bei den kastrierten männlichen Tieren die bei 250 Lux gehaltenen Tiere am ersten Untersuchungstag eine höhere Melatoninkonzentration als die bei 470 Lux gehaltenen Tiere. Dies steht in Einklang mit AOKI et al. (1998), die nach nächtlicher Lichtexposition eine von der Lichtintensität sowie der Expositionsdauer abhängige Suppression der Speichelmelatoninkonzentration zeigen konnten. Am zweiten Untersuchungstag haben schließlich die bei einer Lichtintensität von 470 Lux gehaltenen männlich-kastrierten Tiere, wie auch die bei entsprechender Lichtintensität gehaltenen weiblichen Tiere eine höhere Speichelmelatoninkonzentration als die bei 250 Lux gehaltenen männlich-kastrierten Tiere. Welche Faktoren für die Umkehrung dieses Verhältnisses verantwortlich sind, kann nicht geklärt werden, jedoch zeigt sich, dass die Melatoninkonzentration im Speichel leicht durch exogene Faktoren und auch durch individuelle Unterschiede beeinflusst werden kann (RICE et al., 1995). In beiden Gruppen der kastrierten männlichen Tiere sind die Speichelmelatoninkonzentrationen nach Ausschluss der Transitionszeiten in der Nacht höher als am Tag. Dies zeigt, dass sich bei den männlich-kastrierten Tieren das Speichelmelatoninprofil sowie die absoluten Melatoninkonzentrationen der Tiere kaum zwischen den beiden Lichtintensitäten unterscheiden und der nächtliche Konzentrationsanstieg zwischen beiden Gruppen übereinstimmt.

Die männlich-kastrierten Tiere zeigen nokturnale Melatoninprofile, während bei den weiblichen Tieren eher eine Tendenz zu diurnalen Profilen vorhanden ist. Des Weiteren weisen die Speichelproben der männlich-kastrierten Tiere unabhängig von der Lichtintensität nach Ausschluss der Transitionszeiten einen nächtlichen Konzentrationsanstieg auf, was den Erwartungen hinsichtlich einer an den Lichtverhältnissen orientierten Melatoninrhythmik entspricht (MCINTYRE et al., 1987; AOKI et al., 1998; KUBOTA et al., 2002), während bei den weiblichen Tieren ebenfalls unabhängig von der Lichtintensität tagsüber höhere Konzentrationen auftreten. Demnach könnten im Speichel der Schweine geschlechtsabhängige Unterschiede in der Ausbildung einer Tag/Nacht-Rhythmik bestehen. Diese Hypothese widerspricht

jedoch den Ergebnissen von GOONERATNE et al. (2003), die in einer Studie an älteren Menschen keinen Einfluss des Geschlechts auf das Speichel/Serum-Verhältnis der Melatoninkonzentration feststellen konnten.

2.3. Plasma/Speichel-Korrelation

Die Speichelmelatoninkonzentrationen der Versuchstiere sind meist signifikant höher als die zugehörigen Plasmamelatoninkonzentrationen. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Widerspruch zu den bisherigen Veröffentlichungen (z.B. VAKKURI, 1985; VAKKURI et al., 1985; MCINTYRE et al., 1987; LAAKSO et al., 1990; DEACON und ARENDT, 1994; VOULTSIOS et al., 1997; KENNAWAY und VOULTSIOS, 1998; GOONERATNE et al., 2003), die in Untersuchungen am Menschen stets höhere Plasma- als Speichelmelatoninkonzentrationen messen konnten. In diesen Studien betrug die Speichelmelatoninkonzentration ca. 30% der in den Blutproben gemessenen Konzentrationen, was dem Anteil des nicht an das Transportprotein Albumin (CARDINALI et al., 1972 b) gebundenen freien Melatonins entspricht. Darüber hinaus korrelierten Plasma-, bzw. Serum-, und Speichelmelatoninkonzentrationen stets signifikant positiv miteinander, während im Gegensatz dazu die Melatoninkonzentrationen hier nur in einzelnen Tiergruppen sowie an einzelnen Untersuchungstagen eine signifikante, aber stets negative Korrelation aufweisen. In der Gesamtgruppe tritt nur am ersten Untersuchungstag eine signifikante Korrelation der Plasma- und Speichelmelatoninkonzentrationen mit einem negativen Verlauf der Regressionslinie auf. Dies zeigt sowohl, dass bei einer niedrigen Plasmamelatoninkonzentration hohe Speichelmelatoninkonzentrationen auftreten können, als auch, dass die Speichelmelatoninkonzentration trotz hoher Plasmawerte niedrig bleibt. Dies stimmt mit den Ergebnissen von LAAKSO et al. (1990) überein, die bei der Korrelation von menschlichen Speichel- und Serummelatoninkonzentrationen feststellten, dass der Anteil der im Speichel messbaren Melatoninkonzentration mit steigenden Serummelatoninkonzentrationen abnimmt. Darüber hinaus treten am ersten Untersuchungstag tagsüber hohe Speichelmelatoninkonzentrationen und niedrige Plasmamelatoninkonzentrationen auf, während nachts niedrige Melatoninkonzentrationen im Speichel und hohe Konzentrationen im Plasma vorhanden sind, was zum Auftreten der negativen Korrelation geführt hat. Somit scheinen die Speichelproben zur Dokumentation einer zirkadianen Melatonin-

rhythmik zumindest unter den hier gewählten Versuchsbedingungen nicht mit Plasmaproben vergleichbar zu sein. Diese Vermutung steht jedoch nach CARDINALI et al. (1981) im Widerspruch zu anatomischen Befunden, da die sympathische Innervation der Epiphyse sowie der Speicheldrüsen über das Ganglion cervicale craniale (SCG) erfolgt, und sich somit alle die Plasmamelatonininkonzentration beeinflussenden Faktoren auch direkt auf die Speichelmelatonininkonzentration auswirken sollten. Bemerkenswerterweise korrelieren Plasma- und Speichelmelatonininkonzentrationen unter der Annahme des am zweiten Untersuchungstag zunehmenden Stresses nicht mehr, sondern nur in dem am ersten Tag weitestgehend ungestörten Zustand. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Schweine aufgrund ihrer Stressanfälligkeit eine wiederholte Probennahme nicht tolerieren. Darüber hinaus könnte sich am zweiten Untersuchungstag z.B. auch der Schlafmangel des ersten Untersuchungstages noch bemerkbar machen, da wie z.B. MISTLBERGER et al. (1997), ANTLE und MISTLBERGER (2000) und CHALLET et al. (2001) feststellten, Schlafentzug den zirkadianen Rhythmus beeinflusst.

Des Weiteren treten Speichelmelatonininkonzentrationen von mehr als 4000 pg/ml nie bei den männlich-kastrierten Tieren auf, woraus sich in der Gesamtgruppe ein deutlicher Einfluss des Geschlechts auf den Verlauf der Regressionslinie ergibt. Auch die in der Gruppe der männlich-kastrierten Tiere fehlende signifikante Korrelation der Speichel- und Plasmamelatonininkonzentrationen zeigt eine Abhängigkeit der Korrelation der Gesamtgruppe von den Plasma/Speichel-Paaren der weiblichen Tiere. Dies könnte infolge der zwischen den kastrierten männlichen und weiblichen Tieren identischen Lichtverhältnisse wiederum auf einen Einfluss der Kastration der männlichen Versuchstiere hinweisen. Geschlechtsspezifische Unterschiede scheinen einen deutlichen Einfluss auf die Korrelationen zu haben, da weder bei der männlich-kastrierten Versuchsgruppe, noch bei den unter unterschiedlichen Lichtintensitäten untergebrachten männlich-kastrierten Tieren signifikante Korrelationen auftreten. Im Gegensatz dazu sind die Speichel/Plasma-Korrelationen der weiblichen Versuchsgruppe, sowie den bei unterschiedlicher Lichtintensität von 470 Lux und 250 Lux gehaltenen weiblichen Tiere am ersten Untersuchungstag signifikant negativ, und in der bei 250 Lux gehaltenen Gruppe der weiblichen Tiere auch am zweiten Untersuchungstag signifikant. Dem gegenüber konnten GOONERATNE et al. (2003) keinen Einfluss des Geschlechts auf die Speichel/Plasma-Relation des Menschen feststellen.

Nur bei hoher Lichtintensität von 470 Lux treten hohe Speichelmelatoninkonzentrationen von 4000 pg/ml auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Speichelmelatoninkonzentration per se unter positivem Lichteinfluss steht. Dennoch tritt weder in der bei 470 Lux, noch in der bei 250 Lux Lichtintensität gehaltenen Gruppe eine signifikante Korrelation der Speichel- und Plasmamelatoninkonzentrationen auf, was darauf hinweist, dass die Lichtintensität hier nur einen dem Geschlecht untergeordneten Einfluss auf die Korrelation zu haben scheint.

Infolge der geringen Tierzahl ($n=3$ je Lichtintensität und Geschlecht) ist der Einfluss einzelner Speichelproben sehr hoch, und die statistische Gesamtaussagekraft der Korrelationen entsprechend eingeschränkt; insbesondere auch deshalb, da die Melatoninkonzentration im Speichel leicht durch exogene Faktoren (DEACON und ARENDT, 1994) sowie auch durch individuelle Unterschiede beeinflusst werden kann (RICE et al., 1995).

3. Gesamtdiskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der HPLC-Methode zur Melatoninbestimmung aus Plasma- und Speichelproben des Hausschweines und die Überprüfung dieser Untersuchungsmedien hinsichtlich der Korrelation ihrer Melatoninkonzentrationen. Ein weiteres Ziel dieser Untersuchung war, die nur unter Anwendung von Zwangsmaßnahmen mögliche Blutprobengewinnung durch die minimal-invasive Methode der Speichelprobengewinnung ersetzen zu können.

Die Vorteile der hier angewandten HPLC-Methode liegen in ihrer hohen Sensitivität, die bei einem Detektionslimit von 200 fm (BERTOLUCCI et al., 2003) die Messung der Melatoninkonzentration in Plasma- und Speichelproben von Schweinen ermöglicht. Weitere Vorteile, die diese HPLC-Methode insbesondere gegenüber der – in den bisher veröffentlichten Studien über das porcine Melatonin angewandten – radioimmunologischen Melatoninbestimmung (RIA) mit häufig mehrtägigem Protokoll aufweist, liegen in dem optimierten und weniger zeitintensiven Extraktionsprotokoll. Die Bearbeitung einer großen Anzahl von Plasmaproben wird dadurch möglich (SIDIQ, 2001). Die Wahrscheinlichkeit eines Melatoninverlustes während der Extraktion wird minimiert, und eine Kreuzreaktion der polyklonalen Antikörper mit dem Melatonin chemisch ähnlichen Substanzen ausgeschlossen. Der Unterschied der Sensitivität zwischen der RIA und HPLC-Methode erklärt möglicherweise auch die deutlichen Unterschiede zwischen den in der Literatur über Hausschweine bekannten, mit RIA gemessenen Plasmamelatoninkonzentrationen, und den in vorliegender Untersuchung über HPLC gemessenen Konzentrationen, sowie möglicherweise auch die in vorliegender Untersuchung festgestellten Einflussfaktoren der Lichtintensität und des Geschlechts bzw. der Kastration.

Die Melatoninprofile im Plasma und Speichel der Versuchstiere unterscheiden sich deutlich zwischen den beiden Untersuchungstagen. Da Melatonin in der Epiphyse nicht gespeichert wird, sondern die Plasmamelatoninkonzentration die aktuelle pineale Syntheserate wiedergibt (CARDINALI, 1981), weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Melatoninsynthese zumindest unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen sehr störungsanfällig ist, und durch exogene, sowie endogene Faktoren beeinflusst werden kann. Die Unterschiede zwischen den Plasmamelatoninprofilen der beiden Untersuchungstage deuten auf einen Einfluss von

Stress und eine Cortisol- und Noradrenalin-induzierte Stimulation der pinealen Melatoninsynthese hin (SEGGIE et al., 1985; BENSON et al., 1986; ROOZEN et al., 1995). Hinzu kommt, dass eine wiederholte Probengewinnung u.a. aufgrund eines möglicherweise genetisch bedingten Unterschieds im stressbedingten Noradrenalinanstieg (BENSON et al., 1986; ROSOCHACKI et al., 2000) unterschiedlich von den Schweinen toleriert wird. Hinsichtlich der Existenz einer Rhythmik der Plasmamelatoninkonzentrationen konnte die Lichtintensität als wesentlicher Einflussfaktor identifiziert werden. Die 250 Lux Versuchsgruppe weist am ersten Untersuchungstag im Gegensatz zu der 470 Lux Versuchsgruppe keinen Tag/Nacht-Unterschied der Plasmamelatoninkonzentration auf, was mit den Ergebnissen von GRIFFITH und MINTON (1992), sowie MACK und UNSHELM (1997) übereinstimmt. Da die Plasmamelatoninkonzentration der Tagproben bei 250 Lux signifikant höher ist als bei 470 Lux, scheint diese Lichtintensität nicht ausreichend für die Stallhaltung von Schweinen zu sein. Da jedoch selbst bei einer Lichtintensität von 470 Lux während der Tagphase keine vollständige Unterdrückung der Melatoninsynthese erfolgt, ist möglicherweise auch diese Lichtintensität noch zu gering. Die Berücksichtigung des Geschlechts der Versuchstiere bei der Beurteilung der Lichtintensität zeigt deutliche Unterschiede hinsichtlich der Existenz eines nokturnalen Melatoninprofils. Demnach weisen ausschließlich die weiblichen bei 470 Lux gehaltenen Tiere ein nokturnales Plasmamelatoninprofil auf, während bei den männlich-kastrierten Tieren kein Melatoninprofil vorhanden ist. Dennoch erfolgt der Konzentrationsanstieg der weiblichen 470 Lux Tiere vor Nachtbeginn, was auf eine unvollständige Synchronisation mit dem Lichtregime hinweist. Daneben sind die Melatoninkonzentrationen der männlich-kastrierten Tiere generell, und insbesondere während der Tagphase höher als die, der bei jeweils identischer Lichtintensität gehaltenen weiblichen Tiere. Dies könnte darauf hinweisen, dass die kastrierten männlichen Tiere nicht mit dem Lichtregime synchronisiert sind, und ihnen somit eine zeitliche Orientierung anhand der Melatoninrhythmik nicht möglich ist. Diese fehlende Rhythmik könnte entsprechend den Ergebnissen von HERNANDEZ et al. (1990) auf der kastrationsbedingten fehlenden Stimulation der pinealen Melatoninsynthese durch Testosteronmangel, sowie der Umkehr der Tag/Nacht-Rhythmik der an der Melatoninsynthese beteiligten Enzyme und sekundären Botenstoffe (NAGLE et al., 1974; KARASEK et al., 1987; RUDEEN und REITER, 1980) und der daraus resultierenden Desynchronisation der Melatoninsynthese von der Nacht beruhen.

Die Frage ob, und falls ja, ab welcher Lichtintensität bei kastrierten männlichen Schweinen ein stabiles nokturnales Melatoninprofil auftritt, kann anhand der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung nicht beantwortet werden, ist aber für eine dem Tierschutz gerecht werdende Schweinehaltung von fundamentaler Bedeutung. Die Forderung, in menschlicher Obhut gehaltenen Tieren anhand geeigneter Lichtverhältnisse im Stall die zeitliche Orientierung zu ermöglichen, ist im Deutschen Tierschutzgesetzes (vom 25.05.1998) sowie der entsprechenden Verordnung (Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung vom 25.10.2001) verankert. Da in vorliegender Untersuchung neun von zwölf Tieren bei äquatorialen Lichtbedingungen keinen nokturnalen Melatoninrhythmus aufweisen, ist eine Lichtintensität von 250 Lux nicht ausreichend. Demzufolge muss auch die in der bisherigen Schweinehaltungsverordnung (vom 18.02.1994) geforderte Mindestlichtintensität von 50 Lux über mindestens acht Stunden täglich als unzureichend beurteilt werden. Da diese Verordnung derzeit außer Kraft gesetzt ist, sollte die Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung, die bislang nur die Haltung und Unterbringung von Kälbern und Legehennen regelt, um den Bereich der Schweinehaltung erweitert werden. Darin sollten dann auch die Anforderungen an die Mindestlichtintensität erneuert werden. Die erforderliche Mindestlichtintensität sollte deshalb in einer zukünftigen Untersuchung mit der HPLC-Methode an einer größeren Tierzahl überprüft werden.

Im Gegensatz zum Plasma konnten die dem Speichelmelatoninprofil zugrunde liegenden Ursachen nicht eindeutig geklärt werden. Auch im Speichel treten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungstagen auf, was darauf hinweist, dass auch das Speichelmelatoninprofil unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht stabil ist und leicht durch exogene (Licht etc.) oder endogene Faktoren (z.B. Catecholamine) beeinflusst werden kann. Der Konzentrationsverlauf des ersten Untersuchungstages zeigt ein der Plasmamelatoninkonzentration entgegengesetztes Profil. Demnach stellt sich die Frage, ob diese beiden Untersuchungsmedien trotz identischer Innervation der beiden Syntheseorte (CARDINALI et al., 1981) ein unterschiedliches Konzentrationsprofil aufweisen dürfen. Hinsichtlich des Speichels bleibt allerdings zu berücksichtigen, dass er – im Gegensatz zum Plasma – in direktem Kontakt zu der Außenwelt steht, und daher zahlreichen exogenen Einflüssen ausgesetzt sein kann. Hierzu zählen unter anderem die Futteraufnahme und die damit verbundene Gefahr, die Speichelproben

durch in der Maulhöhle verbliebene Futterreste zu kontaminieren (McINTYRE et al., 1987), oder die in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme wechselnde Speichelzusammensetzung und dessen Konsistenz (KNOLL et al., 1984). In Bestandteilen des hier verfütterten Mischfutters konnten HATTORI et al. (1995) und TAN et al. (2003) Melatonin nachweisen. Daneben wird die Speichelmenge von der Menge der Wasseraufnahme beeinflusst, welche ihrerseits auch mit dem Aktivitätsrhythmus der Tiere in Verbindung steht (INGRAM und DAUNCEY, 1985). Des Weiteren kann die Speichelsekretion auch durch die Gefühlslage beeinflusst werden (GEMBA et al., 1996). Infolge der Vielzahl an potentiellen, sowohl exogenen, als auch endogenen Einflussfaktoren, die anhand der vorliegenden Daten weder eingegrenzt, noch sicher ausgeschlossen werden können, kann das Speichelmelatoninprofil nicht erklärt werden. Die Profilunterschiede deuten jedoch darauf hin, dass das Speichelmelatoninprofil per se unter positivem Lichteinfluss zu stehen scheint, und dass sich die Profile der männlich-kastrierten, und der weiblichen Tiere deutlich voneinander unterscheiden. Einen weiteren Einfluss auf die Speichelmelatoninkonzentration könnte nach DEACON und ARENDT (1994) auch die Körperhaltung haben. Über die Melatoninrhythmik im Speichel beim Schwein sind bislang noch nicht genügend Informationen vorhanden. Insbesondere die Abwesenheit von Melatonin abbauenden Enzymen, die durch VAKKURI (1985) postuliert wurde, steht im Widerspruch zu der hier dokumentierten Umkehr der Speichelmelatoninrhythmik gegenüber den Plasmaproben. VAKKURI (1985) inkubierte Serum-, Speichel- und Urinproben übernacht bei Raumtemperatur und im Eisbad. Dabei konnte er keine Unterschiede zwischen den Melatoninkonzentrationen der beiden Temperaturen feststellen. Eigene Untersuchungen wiesen nach Inkubation bei Körpertemperatur jedoch auf Konzentrationsunterschiede zwischen Tag- und Nachtproben gegenüber nicht inkubierten Kontrollproben hin, was möglicherweise für die Anwesenheit von Melatonin abbauenden Enzymen, sowie eine von der Tageszeit abhängige enzymatische Aktivitätsrhythmik sprechen könnte. Unter der Annahme der Hypothese eines enzymatischen Melatoninabbaus im Speichel durch Enzym(e) mit in der Nachtphase auftretendem Aktivitätsmaximum wäre der nächtliche Konzentrationsrückgang in den Speichelproben erklärbar. Darüber hinaus könnte der Konzentrationsanstieg während der Tagphase wiederum auf der Anreicherung des in den Speichel gelangenden Melatonins infolge fehlender enzymatischer

Abbauaktivität beruhen. Ob sich diese Hypothese bewahrheitet, muss in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden.

Die Melatoninkonzentrationen der Plasma- und Speichelproben der Versuchstiere weisen größtenteils signifikante Konzentrationsunterschiede auf, die entgegen der bisherigen Veröffentlichungen (VAKKURI, 1985; MCINTYRE et al., 1987; KENNAWAY und VOULTSIOS, 1998; GOONERATNE et al., 2003) höhere Speichel- als Plasma-melatoninkonzentrationen ergaben. Darüber hinaus treten nur in einigen Versuchsgruppen signifikante, sowie stets negative Korrelationen auf, die mit Ausnahme der weiblichen 250 Lux Gruppe stets nur am ersten Untersuchungstag vorhanden sind. Dies zeigt, dass die Speichelmelatoninkonzentration nicht die im Plasma vorhandene Melatoninkonzentration widerspiegelt, und Plasmaproben zur Bestimmung des Lichtbedarfs von Schweinen nicht durch die minimal-invasive Gewinnung von Speichelproben ersetzt werden können, was mit REITER und TAN (2003) übereinstimmt.

4. Schlussfolgerungen

Anhand der hier etablierten HPLC-Methode ist die Bestimmung der Melatoninkonzentrationen aus Plasma- und Speichelproben des Hausschweines, und der Nachweis eines Konzentrationsverlaufes möglich. Diese Methode bietet darüber hinaus auch die Möglichkeit, Melatonin aus Futterproben nachzuweisen und ist damit flexibel einsetzbar.

Bei einer Lichtintensität von 250 Lux während der Tagphase erfolgt keine Unterdrückung der pinealen Melatoninsekretion, wodurch die physiologischen, durch den Tag/Nacht-Wechsel gesteuerten rhythmischen Konzentrationsänderungen der systemischen Hormonkonzentration entfallen, und den Tieren anhand der Stallbeleuchtung keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Tag und Nacht geboten wird. Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass auch eine Lichtintensität von 470 Lux nicht ausreicht, um die Melatonsynthese während der Lichanwesenheit vollständig zu unterdrücken. Da diese Lichtintensitäten mehr als das Fünffache der derzeit außer Kraft gesetzten Schweinehaltungsverordnung (vom 18.02.1994) geforderten Mindestlichtintensität betragen, sollten zukünftige Untersuchungen die tatsächlich erforderliche Mindestlichtintensität an einer größeren Tierzahl mittels HPLC-Methode erneut kritisch überprüfen. Die Mindestlichtintensität bei der Stallhaltung von Schweinen sollte erneuert werden und in die bislang nur die Haltung und Unterbringung von Kälbern und Legehennen regelnde Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung (vom 25.10.2001) integriert werden. Hierbei sollte insbesondere das Geschlecht der untersuchten Tiere berücksichtigt werden, da das Plasmamelatoninprofil sowie die Melatoninkonzentrationen durch die Kastration der männlichen Schweine beeinflusst, sowie vom Lichtwechsel desynchronisiert zu werden scheinen.

Die Melatoninkonzentrationen der Speichelproben sind nicht mit den Melatoninkonzentrationen der Plasmaproben korreliert. Somit kann die bei Schweinen unter Praxisbedingungen nur unter Anwendung von Zwangsmaßnahmen mögliche Blutprobenentnahme zur Melatoninbestimmung nicht durch die minimal-invasive Speichelprobengewinnung ersetzt werden.

Besondere Vorsicht ist in Bezug auf das experimentelle Design zukünftiger Untersuchungen angebracht. Melatoninkonzentrationen und Profile der

Versuchstiere wurden bei der häufigen und mehrtägigen Probengewinnung derartig beeinflusst, dass die Daten der beiden Untersuchungstage nur getrennt analysiert werden konnten. Demnach scheint das Stressgeschehen einen deutlichen Einfluss auf die Melatoninprofile zu haben, was letztlich hinsichtlich der Auswahl reinrassiger und weniger stressempfindlicher Versuchstiere in zukünftigen Untersuchungen zu berücksichtigen wäre. In diesem Zusammenhang wären auch die Bestimmung der Stressparameter (z.B. Cortisol, Noradrenalin, Adrenalin) und die telemetrische Erfassung von Aktivität und Herzfrequenz sinnvoll. Darüber hinaus sollte sowohl der potentielle Nutzen einer Isolation der Tiere durch Einzelhaltung, als auch der eines limitierten Futterzugangs kritisch beurteilt werden, da sie das speziesspezifische Verhalten der Tiere deutlich einschränken.

Die Ergebnisse dieser anhand der HPLC-Methode durchgeführten Untersuchung lieferten Anhaltspunkte dafür, dass eine Lichtintensität von 250 Lux unter dem Aspekt einer lichtsupprimierten nokturnalen Melatoninrhythmik aus Tierschutzgründen als zu gering für die Stallhaltung von Schweinen zu beurteilen ist.

VI. Zusammenfassung

Die Existenz einer Melatoninrhythmik des Hausschweines unter dem Einfluss der Lichtintensität wurde in der Literatur kontrovers diskutiert. Verantwortlich für die unterschiedlichen Ergebnisse dürften die teilweise ungeeigneten RIA-Methoden sein. Bislang existieren keine Untersuchungen, die eine nicht-immunologische Nachweismethode für Melatonin bei Schweinen beschreiben.

Das Ziel dieser Arbeit war deshalb die Etablierung einer HPLC-Methode zur Melatoninbestimmung aus Plasma- und Speichelproben des Hausschweines und die Überprüfung dieser Untersuchungsmedien hinsichtlich der Korrelation ihrer Melatoninkonzentrationen. Ein weiteres Ziel dieser Untersuchung war die bei Schweinen nur unter Anwendung von Zwangsmaßnahmen mögliche Blutprobenentnahme zur Melatoninbestimmung durch die minimal-invasive Speichelprobengewinnung ersetzen zu können.

Die Untersuchungen wurden an zwölf Schweinen im Alter von 14 Wochen durchgeführt, die unter standardisierten Bedingungen bei einem äquatorialen Lichtregime (LD 12:12) einzeln gehalten wurden. Die Lichtintensitäten betragen während der Tagphase 250 Lux bzw. 470 Lux, und während der Nachtphase maximal 1,0 Lux. Blut- und Speichelproben wurden an zwei nicht aufeinander folgenden Untersuchungstagen in dreistündigen Intervallen über je 24 Stunden entnommen. Die Proben wurden nach Chloroformextraktion über ein HPLC-System analysiert und ihre Melatoninkonzentrationen durch den Vergleich der Retentionszeiten mit jenen authentischer Standards mit einer bekannten Melatoninkonzentration bestimmt.

Die HPLC-Methode ist sowohl zur Melatoninmessung in Plasma-, als auch in Speichelproben anwendbar und zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität (Messbereich: 56 pg/ml – 14 400 pg/ml) aus, die eine sichere Melatoninbestimmung auch aus Tagproben ermöglicht. Die Ergebnisse der Plasmamelatoninbestimmung zeigten bei einer Lichtintensität von 250 Lux identische Konzentrationen der Tag- und der Nachtproben, was auf eine fehlende Unterdrückung der pinealen Melatoninsekretion während der Tagphase hinweist. Ein Anstieg der Melatoninkonzentration während der Tagphase konnte auch durch eine Lichtintensität von 470 Lux nicht vollständig unterdrückt werden. Dies bedeutet, dass

die durch den Tag/Nacht-Wechsel gesteuerten Unterschiede der Hormonkonzentration bei einer Lichtintensität von 250 Lux für die Schweine nicht ausreichten, um zwischen Tag und Nacht unterscheiden zu können. Die Ergebnisse zeigten signifikant niedrigere Melatoninkonzentrationen der Tagproben der bei 470 Lux gehaltenen Gruppe, was auf eine stärkere lichtinduzierte Suppression hindeutet, aber aufgrund einer unvollständigen Synchronisation mit dem Lichtregime ebenfalls als noch nicht ausreichend zu beurteilen ist. Die Ergebnisse wiesen darüber hinaus deutliche Unterschiede zwischen den Plasmamelatoninprofilen weiblicher und kastrierter männlicher Tiere auf. Für die Speichelmelatoninkonzentrationen konnte keine Korrelation mit den Plasmamelatoninkonzentrationen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund können Blutproben zur Melatoninbestimmung nicht durch weniger belastende, minimal-invasive Speichelproben ersetzt werden.

In zukünftigen Untersuchungen sollte deshalb unter Anwendung der HPLC-Methode festgestellt werden, bei welcher Lichtintensität Schweine ein mit dem Lichtregime synchronisiertes nokturnales Melatoninprofil ausbilden können, um unter Tierschutzaspekten den Tieren bei ganzjähriger Stallhaltung ausreichende Lichtverhältnisse bieten zu können. Hierbei sollten insbesondere die Auswirkungen eines potentiellen Einflusses der unter anderem mit einer frequenten Probengewinnung verbundenen Stressbelastung der Tiere auf die Stimulation der Melatoninsynthese, sowie potentielle Geschlechtsunterschiede (bzw. der Einfluss einer Kastration) berücksichtigt werden.

VII. Summary

Investigation on the melatonin rhythm of the domestic pig (*Sus scrofa f. domestica*) using a newly developed HPLC-method

The existence of a melatonin rhythm in the domestic pig with respect to the light intensity has been discussed controversially. These controversial results are caused in part by inappropriate RIA methods. Until now, there are no published results describing non-immunological identification of melatonin in the domestic pig.

Therefore, the main-objective of this study was to establish a HPLC method for the determination of melatonin in plasma and saliva samples of domestic pigs and to examine the correlation of the melatonin concentration of these two specimens. A further aim of this study was the possible replacement of blood sampling which requires the restraint of the animal by minimally invasive saliva sampling.

The study was conducted on 12 domestic crossbred pigs aged 14 weeks (6 gilts, 6 barrows), which were housed in single pens under standardized conditions and under an equatorial light regime (LD 12:12). Photophase light intensities were set in two groups with 250 lux and 470 lux, scotophase light intensities were below 1,0 lux. Blood and saliva samples were collected over a period of 24 hours on two non-successive days with sampling intervals of 3 hours. Following chloroform extraction, samples were analyzed by a HPLC system. Identification and quantification of melatonin were achieved by comparing the retention times with those of authentic standards containing a known melatonin concentration.

Results of this study showed that the HPLC method is appropriate for the determination of melatonin concentrations of both plasma and saliva samples and comprises a remarkably high sensitivity, which allows a reliable measurement of melatonin concentrations even in photophase samples. Results revealed identical concentrations of both photophase and scotophase melatonin concentrations at a light intensity of 250 lux, indicating a lack of suppression of pineal melatonin secretion during photophase. This indicates that differences in hormone concentrations driven by day/night-changeovers were not sufficient for pigs to differentiate between day and night at a light intensity of 250 lux. Results also showed significantly lower photophase melatonin concentrations at a light intensity of

470 lux, compared to 250 lux. This indicates a stronger light-induced melatonin suppression, not being able to synchronize melatonin secretion to the light regime completely and therefore may have been assessed as insufficient by the animals. Furthermore, results showed clear differences in the melatonin profiles of castrated male and intact female pigs. There was no correlation of salivary and plasma melatonin concentrations. Therefore blood samples cannot be replaced by minimal-invasive saliva samples.

Further studies should be done to investigate the light intensity, which entrains the synchronization of the melatonin profile to the light regime. This could be done by using this highly sensitive HPLC method to assess the photic demands of domestic pigs kept in indoor piggeries. Particular attention should be given to the consequences of a potential effect of a stress-load on the animals and its stimulating effects on the synthesis of melatonin, as well as potential sex differences induced by gonadectomy.

VIII. Literaturverzeichnis

Ali M.A., Boujard T. und Gerkema M.P. (1992): Terminology in biological rhythms.

In: Rhythms in Fishes., Ali M.A. (ed.), pp. 7-10, Plenum Press, New York

Andersson H. (2001): Plasma melatonin levels in relation to the light-dark cycle and parental background in domestic pigs.

Acta vet. scand. **42**: 287-294

Andersson H., Lillpers K., Rydhmer L. und Forsberg M. (2000): Influence of light environment and photoperiod on plasma melatonin and cortisol profiles in young domestic boars, comparing two commercial melatonin assays.

Dom. Anim. Endocrinol. **19**: 261-274

Antle M.C. und Mistlberger R.E. (2000): Circadian clock resetting by sleep deprivation without exercise in the Syrian hamster.

J. Neurosci. **20**: 9326-9332

Aoki H., Yamada N., Ozaki Y., Yamane H. und Kato N. (1998): Minimum light intensity required to suppress nocturnal melatonin concentration in human saliva.

Neurosci. Lett. **252**: 91-94

Axelrod J. und Weissbach H. (1961): Purification and properties of hydroxyindole-O-methyltransferase.

J. Biol. Chem. **236**: 211-213

Ayre E.A. und Pang S.F. (1994): 2-[¹²⁵J]Jodomelatonin binding sites in the testis and ovary: Putative melatonin receptors in the gonads.

Biol. Signals **3**: 71-84

Balemans M.G.M., Ebels I., Hendriks H.G., van Berlo M. und de Morée A. (1983): The influence of some pteridines on pineal 5-methoxyindole synthesis in male Wistar rats periodically exposed to either white or green light.

J. Neural. Transm. **58**: 121-134

Barassin S., Raison S., Saboureau M., Bienvenu C., Maître M., Malan A. und Pévet P. (2002): Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat. European

J. Neurosci. **15**: 833-840

Barnett J.L., Cronin G.M. und Winfield C.G. (1981): The effects of individual and group penning of pigs on total and free plasma corticosteroids and the maximum corticosteroid binding capacity. *Gen. Comp. Endocrinol.* **44:** 219-225

Beck O., Jonsson G. und Lundman A. (1981): 5-Methoxyindoles in pineal gland of cow, pig, sheep and rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **318:** 49-55

Benson G.J., Langner P.H., Thurmon J.C., Nelson D.R., Neff-Davis C., Davis L.E., Tranquilli W.J. und Gustafsson B.K. (1986): Plasma cortisol and norepinephrine concentrations in castrated male pigs maintained in pairs in outdoor pens and in a confinement finishing house: Assessment of stress. *Am. J. Vet. Res.* **47:** 1071-1074

Bertolucci C., Foà A. und Van't Hof T.J. (2002): Seasonal variations in circadian rhythms of plasma melatonin in ruin lizards. *Hormones and Behavior* **41:** 414-419

Bertolucci C., Wagner G., Foà A., Gwinner E. und Brandstätter R. (2003): Photoperiod affects amplitude but not duration of in vitro melatonin production in the ruin lizard (*Podarcis sicula*). *J. Biol. Rhythms* **18:** 63-70

Besançon R., Simonneaux V., Jouvét A., Belin M.-F. und Fèvre-Montange M. (1996): Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. *Molecular Brain Research* **40:** 136-138

Bollinger A.L., Wilson M.E., Pusateri A.E., Green M.L., Martin T.G. und Diekmann M.A. (1997): Lack of a nocturnal rise in serum concentrations of melatonin as gilts attain puberty. *J. Anim. Sci.* **75:** 1885-1892

Brainard G.C., Hanifin J.P., Greeson J.M., Byrne B., Glicckman G., Gerner E. und Rollag M.D. (2001): Action spectrum for melatonin regulation in humans: Evidence for a novel photoreceptor. *J. Neurosci.* **21:** 6405-6412

Brainard G.C., Richardson B.A., King T.S., Matthews S.A. und Reiter R.J. (1982): The suppression of pineal melatonin content and N-acetyltransferase activity by different light irradiances in the Syrian hamster: A dose-response relationship. *Endocrinology* **113:** 293-296

Brandstätter R., Kumar V., Van't Hof T.J. und Gwinner E. (2001): Seasonal variations of in vivo and in vitro melatonin production in a passeriform bird, the house sparrow (*Passer domesticus*). *J. Pineal Res.* **31:** 120-126

Brown G., Grotta L. und Niles N. (1980): Melatonin: Origin, control of circadian rhythm and site of action.

Adv. Biosci. **29**: 193-196

Brown G.M., Pang C.S. und Pang S.F. (1994): Binding sites for 2-[¹²⁵J]Jodmelatonin in the adrenal gland.

Biol. Signals **3**: 91-98

Bubenik G.A., Ayles H.L., Friendship R.M., Brown G.M. und Ball R.O. (1998): Relationship between melatonin levels in plasma and gastrointestinal tissues and the incidence and severity of gastric ulcers in pigs.

Pineal Res. **24**: 62-66

Bubenik G.A., Hacker R.R., Brown G.M. und Bartos L. (1999): Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract.

J. Pineal Res. **26**: 56-63

Bubenik G.A., Pang S.F., Cockshut J.R., Smith P.S., Grovum L.W., Friendship R.M. und Hacker R.R. (2000): Circadian variation of portal, arterial and venous blood levels of melatonin in pigs and its relationship to food intake and sleep.

J. Pineal Res. **28**: 9-15

Calvo J. und Boya J. (1981a): Ultrastructural study of the embryonic development in the rat pineal gland.

Anat. Rec. **199**: 543-553

Calvo J. und Boya J. (1981b): Embryonic development of the rat pineal gland.

Anat. Rec. **200**: 491-500

Cardinali D.P. (1981): Melatonin. A mammalian pineal hormone.

Endocrine Reviews **2**: 327-346

Cardinali D.P. und Wurtman R.J. (1975): Control of melatonin synthesis in the pineal organ.

In: Frontiers of Pineal Physiology, Altschule M.D. (ed.), pp. 12-41, The MIT Press, Cambridge MA

Cardinali D.P., Bonanni-Rey R.A., Mediavilla M.D. und Sanchez-Barcelo E. (1992): Diurnal changes in cyclic nucleotide response to pineal indoles in murine mammary glands.

J. Pineal Res. **13**: 111-116

Cardinali D.P., Cutrera R.A., Castrillón P. und Esquifino A.I. (1996): Diurnal rhythms in ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholin synthesis of rat submaxillary lymph nodes: Effect of pinealectomy, superior cervical ganglionectomy and melatonin replacement. *Neuroimmunomodulation* **3**: 93-101

Cardinali D.P., Larin F. und Wurtman R.J. (1972a): Action spectra for effects of light on hydroxyindole-O-methyl transferases in rat pineal, retina and Harderian gland. *Endocrinology* **91**: 877-886

Cardinali D.P., Lynch H.J. und Wurtman R.J. (1972b): Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* **91**: 1213-1218

Cardinali D.P., Vacas M.I. und Boyer E.E. (1979): Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* **105**: 437-441

Cardinali D.P., Vacas M.I. und Gejman P.V. (1981): The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers. *J. Neural Transm.* **52**: 1-21

Challet E., Turek F.W., Laute M.A. und van Reeth O. (2001): Sleep deprivation decreases phase-shift responses of circadian rhythms to light in the mouse: role of serotonergic and metabolic signals. *Brain Res.* **909**: 81-91

Chemineau P., Daveau A., Bodin L., Zarazaga L., Gomez-Brunet A. und Malpoux B. (2002): Sheep as a mammalian model of genetic variability in melatonin. *Reproduction (Suppl. 59)*: 181-190

Conti A. und Maestroni G.J.M. (1996): HPLC validation of a circadian melatonin rhythm in the pineal gland of inbred mice. *J. Pineal Res.* **20**: 138-144

Coon S.L., Zarazaga L.A., Malpoux B., Ravault J.P., Bodin L., Voisin P., Weller J.L., Klein D.C. und Chemineau P. (1999): Genetic variability in plasma melatonin in sheep is due to pineal weight, not to variations in enzyme activities. *Am. J. Physiol.* **277 (Endocrinol. Metab. 40)**: E792-E797

Dawes C. (1975): Circadian rhythms in the flow rate and composition of unstimulated and stimulated human submandibular saliva. *J. Physiol. (Lond.)* **244**: 535-548

De Jong I.C., Prelle I.T., van de Burgwal J.A., Lambooj E., Korte S.M., Blokhuis H.J. und Koolhaas J.M. (2000): Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs.

Physiol Behav. **68**: 571-578

Deacon S. und Arendt J. (1994): Posture influences melatonin concentrations in plasma and saliva in humans.

Neurosci. Lett. **167**: 191-194

Diekman M.A. und Green M.L. (1997): Serum concentrations of melatonin in prepubertal or postpubertal gilts exposed to artificial lighting or sunlight.

Theriogenology **47**: 923-928

Ehret M., Pévet P und Maitre M. (1991): Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland.

J. Neurochem. **57**: 1516-1521

Eriksson L., Valtonen M., Laitinen J.T., Paananen M. und Kaikkonen M. (1998): Diurnal rhythm of melatonin in bovine milk: Pharmacokinetics of exogenous melatonin in lactating cows and goats.

Acta vet. Scand. **39**: 301-310

Ferreira S.A., Gimeno M.F., Cardinali D.P. und Vacas M.I. (1996): Pharmacokinetics of extracellular melatonin in Siberian hamster forebrain.

Brain Res. **733**: 318-320

Foley P.B. und Cairncross K.D. (1987): Investigation of circadian rhythms for pineal 5-hydroxytryptophol and other indoles in the rat.

J. Pineal Res. **4**: 107-118

Fujieda H., Sato T., Shi J. und Wake K. (1997): Remodeling of pineal epithelium in the fetal rat as delineated by immunohistochemistry of laminin and cadherin.

Cell Tissue Res. **287**: 263-274

Funk D. und Amir S. (1999): Conditioned fear attenuates light-induced suppression of melatonin release in rats.

Physiol. Behav. **67**: 23-626

Gemba H., Terakana A. und Takemura K. (1996): Influences of emotion upon parotid secretion in humans.

Neurosci. Lett. **211**: 159-162

Geoffriau M., Brun J., Chazot G. und Claustrat B. (1998): The physiology and pharmacology of melatonin in humans.

Horm. Res. **49**: 136-141

Gitler M.S., Zeeberg B.R., John C. und Reba R.C. (1990): Specific in vivo binding of [¹²⁵J]-iodomelatonin to melatonin receptors in the rat brain.

Neuropharmacology **29**: 603-608

Gooneratne N.S., Metlay J.P., Guo W., Pack F.M., Kapoor S. und Pack A.I. (2003): The validity and feasibility of saliva melatonin assessment in the elderly.

J. Pineal. Res. **34**: 88-94

Grady R.K. Jr., Caliguri A. und Mefford I.N. (1984): Day/night differences in pineal indoles in the adult pigeon (*Columba livia*).

Comp. Biochem. Physiol. **78C**: 141-143

Green M.L., Clapper J.A., Andres C.J. und Diekman M.A. (1996): Serum concentrations of melatonin in prepubertal gilts exposed to either constant or stepwise biweekly alteration in scotophase.

Dom. Anim. Endocrinol. **13**: 307-323

Green M.L., Clapper J.A. und Diekman M. (1999): Serum concentrations of melatonin during scotophase and photophase in 3,4,5 and 6 month old gilts and barrows.

Anim. Reprod. Sci. **57**: 99-110

Griffith M.K. und Minton J.E. (1992): Effect of light intensity on circadian profiles of melatonin, prolactin ACTH and cortisol in pigs.

J. Anim. Sci. **70**: 492-498

Gucchait R.B. und Monjan A.A. (1981): Circadian rhythm in pineal methionine S-adenosyltransferase.

J. Neurochem. **36**: 2092-2093

Guerrero J.M., Menendez-Pelaez A., Calvo J.R., Osuna C., Rubio A. und Lopez-Gonzalez M.A. (1994): Melatonin binding sites in the Harderian gland of the rat and the Syrian hamster.

Biol. Signals **3**: 99-106

Gutte G. und Grütze J. (1979): Morphologische Veränderungen an der Epiphysis cerebri von Hausschweinen (*Sus scrofa domesticus*) in Abhängigkeit vom Licht. Arch. Exper. Vet.med. Leipzig

33: 899-907

Gwinner E., Hau M. und Heigl S. (1997): Melatonin: Generation and modulation of avian circadian rhythms.

Brain Res. Bull. **44**: 439-444

Hardeland R. (1999): Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans.

Reprod. Nutr. Dev. **39**: 399-408

Hattori A., Migitaka H., Iigo M., Itoh M., Yamamoto K., Ohtani-Kaneko R., Hara M., Suzuki T. und Reiter R.J. (1995): Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates.

Biochem. Mol. Biol. Int. **35**: 627-634

Hernandez G., Abreu P., Alonso R., Santana C., Moujir F. und Calzadilla C.H. (1990): Castration reduces the nocturnal rise of pineal melatonin levels in the male rat by impairing its noradrenergic input.

J. Neuroendocrin. **6**: 777-782

Honma S., Kanematsu N., Katsuno Y. und Honma K. (1992): Light suppression of nocturnal pineal and plasma melatonin in rats depends on wavelength and time of day.

Neurosci. Lett. **147**: 201-204

Illnerová H., Burešová M. und Presl J. (1993): Melatonin rhythm in human milk.

J. Clin. Endocrinol. Metab. **77**: 838-841

Ingram D.L. und Dauncey M.J. (1985): Circadian rhythms in the pig.

Comp. Biochem. Physiol. **82A**: 1-5

Itoh M.T., Hattori A., Sumi Y. und Suzuki T. (1995): Day-night changes in melatonin levels in different organs of the cricket (*Gryllus bimaculatus*).

J. Pineal Res. **18**: 165-169

Jéquier E., Robinson D.S., Lovenberg W. und Sjoersma A. (1969): Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal.

Biochem. Pharmacol. **18**: 1071-1081

Johnston C.A., Spinedi E. und Negro-Vilar A. (1984): Aromatic *L*-amino acid decarboxylase activity in the rat median eminence, neurointermediate lobe and anterior lobe of the pituitary.

Neuroendocrinology **39**: 54-59

Kamase H. (1980): The diurnal variations of monoamine oxidase activity in discrete nuclei of rat brain.

Folia Psychiatr. Neurol. Jpn. **34**: 481-492

Kanikowska D., Yamabayashi Y., Tsuchida K., Hyun K.J., Tokura H., Gotoh K., Kondo M. und Akimoto T. (2002): Salivary secretion under the influence of bright/dim light exposure in the morning and evening in humans.

Biological Rhythm Research **33**: 129-140

Karasek M., Karasek E. und Stepien H. (1978): Effect of castration on the concentration of adenosine 3',5'-monophosphate in the rat pineal organ.

J. Neural Transm. **42**: 145-149

Kennaway D.J. und Voultsios A. (1998): Circadian Rhythm of free melatonin in human plasma.

J. Clin. Endocrinol. Metab. **83**: 1013-1015

King T.S., Richardson B.A. und Reiter R.J. (1982): Regulation of rat pineal melatonin synthesis: effect of monoamine oxidase inhibition.

Mol. Cell. Endocrinol. **25**: 327-338

Klein D.C. und Weller J.L. (1970a): Indole metabolism in the pineal gland a circadian rhythm in N acetyl transferase.

Science **169**: 1093-1095

Klein D.C., Berg G.R. und Weller J. (1970b): Melatonin synthesis 3'5'AMP and norepinephrine stimulate N acetyl transferase.

Science **168**: 979-980

Klein D.C., Buda M.J., Kapoor C.L. und Krishna G. (1978): Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for 'turnoff'.

Science **199**: 309-311

Klein D.C., Coon S.L., Roseboom P.H., Weller J.L., Bernard M., Gastel J.A., Zatz M., Iuvone P.M., Rodriguez I.R., Begay V., Falcon J., Cahill G.M., Cassone V.M. und Baler R. (1997): The melatonin rhythm-generating enzyme: Molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland.

Recent Progress in Hormone Research **52**: 307-358

Klupiec C., Evans G., Love R.J. und Kennaway D.J. (1997): Clarifying plasma melatonin profiles in domestic pigs: A critical and comparative evaluation of two radioimmunoassay systems.

J. Pineal Res. **22**: 65-74

Knoll E., Müller F.W., Ratge D., Bauersfeld W. und Wisser H. (1984): Influence of food intake on concentrations of plasma catecholamines and cortisol.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **22**: 597-602

Kubota T., Uchiyama M., Suzuki H., Shibui K., Kim K., Tan X., Tagaya H., Okawa M. und Inoué S. (2002): Effects of nocturnal bright light on saliva melatonin, core body temperature and sleep propensity rhythms in human subjects.

Neuroscience Research **42**: 115-122

Laakso M.L., Porkka-Heiskanen T., Alila A., Stenberg D. and Johansson G. (1990): Correlation between salivary and serum melatonin: Dependence on serum melatonin levels.

J. Pineal Res. **9**: 39-50

Leone A.M., Francis P.L. und Silman R.E. (1987): The isolation, purification, and characterisation of the principal urinary metabolites of melatonin.

J. Pineal Res. **4**: 253-266

Leone R.M. und Silman R.E. (1985): An investigation of demethylation in the metabolism of methoxytryptamine and methoxytryptophol.

J. Pineal Res. **2**: 87-94

Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H. und Mori W. (1958): Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes.

J. Am. Chem. Soc. **80**: 2587

Lewczuk B. und Przybylska-Gornowicz B. (2000): The effect of continuous darkness and illumination on the function and the morphology of the pineal gland in the domestic pig. I. The effect on plasma melatonin level.

Neuroendocrinology Letters **21**: 283-291

Lewy A.J., Wehr T.A., Goodwin F.K. Newsome D.A. und Markey S.P. (1980): Light suppresses melatonin secretion in humans.

Science **210**: 1267-1269

Lopez-Gonzalez M.A., Guerrero J.M., Sanchez B. und Delgado F. (1998): Melatonin restores and enhances the human type B tonsillar lymphocyte subset in recurrent acute tonsillitis.

Neurosci. Lett. **247**: 131-134

Lovenberg W., Jéquier E. und Sjoerdsma A. (1967): Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor.

Science **155**: 217-219

Mack A.C. und Unshelm J. (1997): Circadian rhythm of the light-dependent hormone melatonin as an indicator for the photic requirement of domestic pig.

In: Proceedings of the 9th International Congress in Animal Hygiene., Saloniemi H. (ed.), pp. 216-220, Helsinki, Finland

Maestroni G.J.M. (1993): The immunoneuroendocrine role of melatonin.

J. Pineal Res. **14**: 1-10

Malpaux B., Vigié C., Skinner D.C., Thiéry J.C. und Chemineau P. (1997): Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe.

Brain Res. Bull. **44**: 431-438

Manchester L.C., Poeggeler B. und Alveres F.L. (1995): Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote, *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system.

Cell. Mol. Biol. Res. **41**: 391-395

Manchester L.C., Tan D.X., Reiter R.J., Park W., Monis K. und Qi W. (2000): High levels of melatonin in the seeds of edible plants - Possible function in germ tissue protection.

Life Sciences **67**: 3023-3029

Masson-Pévet M. und Pévet P. (1989): Cytochemical localization of type-A and -B monoamine oxidase in the rat pineal gland.

Cell Tissue Res. **255**: 299-305

McConnel S.J. und Ellendorff F. (1987): Absence of nocturnal plasma melatonin surge under long and short artificial photoperiods in the domestic sow.

J. Pineal Res. **4**: 201-210

McIntyre I.M., Norman T.R., Burrows G.D. und Armstrong S.M. (1987): Melatonin rhythm in human plasma and saliva.

J. Pineal Res. **4**: 177-183

McLeod S.D. und Cairncross K.D. (1993): A distinct diurnal rhythm in hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) activity in the male albino rat.

Gen. Comp. Endocrinol. **89**: 214-219

Mefford I.N., Chang P., Klein D.C., Namboodiri M.A.A., Sugden D. und Barchas J. (1983): Reciprocal day / night relationship between serotonin oxidation and N-acetylation products in the rat pineal gland.

Endocrinology **113**: 1582-1586

Meissl H. und Brandstätter R. (1992): Photoreceptive functions of the teleost pineal organ and their implications in biological rhythms.

In: Rhythms in Fishes, Ali M.A. (ed.), pp. 235-254, Plenum, New York.

Menaker M. (1997): Commentary: What does melatonin do and how does it do it?

J. Biol. Rhythms **12**: 532-534

Minneman K.P. und Iversen L.L. (1976a): Diurnal rhythm in rat pineal cyclic nucleotide phosphodiesterase activity.

Nature **260**: 59-61

Minneman K.P. und Wurtman R.J. (1976b): The pharmacology of the pineal gland.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **16**: 33

Mistlberger R.E., Laundry G.J. und Marchant E.G. (1997): Sleep deprivation can attenuate light-induced phase shifts of circadian rhythms in hamsters.

Neurosci. Lett. **238**: 5-8

Moore R.Y. (1996): Neural control of the pineal gland.

Behav. Brain Res. **73**: 125-130

Motulsky H. (1995): Intuitive Biostatistics., Oxford University Press, New York

Nagle C.A., Cardinali D.P. und Rosner J.M. (1974): Effects of castration and testosterone administration on pineal and retinal hydroxyindole-O-methyltransferase of male rats.

Neuroendocrinology **14**: 14-23

Namboodiri M.A.A., Namboodiri M.A., Weller J.L. und Klein D.C. (1979): A comparative study of pineal acetyl-CoA hydrolase and N-acetyltransferase activities.

J. Neurochem. **32**: 31

Niles L.P., Pickering D.S. und Sayer B.G. (1987): HPLC-purified 2-¹²⁵J-iodomelatonin labels multiple binding sites in hamster brain.

Biochim. Biophys. Res. Commun. **147**: 949-956

Niles L.P., Wong Y.W., Mishra R.K. und Brown G.M. (1979): Melatonin receptors in brain.

Eur. J. Pharmacol. **55**: 219-220

Novak C.M. und Nunez A.A. (1998): Tyrosine hydroxylase- and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-containing cells in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*).

Journal of Chemical Neuroanatomy **14**: 87-94

Pang C.S., Tang G.M., Brown G.M., Cheng K.M. und Pang S.F. (1996): Melatonin actions and putative melatonin receptors in the cardiovascular and pulmonary systems.

In: Melatonin: A universal photoperiodic signal with diverse actions., Tang P.L., Pang S.F. Reiter R.J. (eds.), pp. 101-114, Karger, Basel

Pangerl B., Pangerl A. und Reiter R.J. (1990): Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland a review.

J. Neural Transm. **81**: 17-30

Pardridge W.M. und Mietus L.J. (1980): Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier.

J. Neurochem. **34**: 1761-1763

Perissin L., Zorzet S., Rapozzi V. und Giraldi T. (1993): A non-invasive simple method for measurement of urinary excretion of melatonin in undisturbed mice.

J. Pineal Res. **15**: 138-140

Perlow M.J., Reppert S.M., Tamarkin L., Wyatt R.J. und Klein D.C. (1980): Photic regulation of the melatonin rhythm: monkey and man are not the same.

Brain Res. **182**: 211-216

Poeggeler B., Balzer I., Hardeland R. et al. (1991): Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*.

Naturwissenschaften **78**: 268-269

Poon A.M. und Pang S.F. (1996): Pineal melatonin-immune system interactions.

In: Melatonin: A universal photoperiodic signal with diverse actions., Tang P.L., Pang S.F. Reiter R.J. (eds.), pp. 71-83, Karger, Basel

Poon A.M.S., Liu Z.M., Pang C.S., Brown G.M. und Pang S.F. (1994): Evidence for a direct action of melatonin on the immune system.

Biol.Signals **3**: 107-117

Rahman M.K., Nagatsu T. und Kato T. (1981): Aromatic L-amino acid decarboxylase activity in central and peripheral tissues and serum of rats with L-dopa and L-5-hydroxytryptophan as substrates.

Biochem. Pharmacol. **30**: 645-649

Rampacek G.B., Kraeling R.R., Fonda E.S. und Barb C.R. (1984): Comparison of physiological indicators of chronic stress in confined and nonconfined gilts.

J. Anim. Sci. **58**: 401-408

Raynaud F. und Pévet P. (1991): 5-Methoxytryptamine is metabolized by monoamine oxidase A in the pineal gland and plasma of golden hamsters.

Neurosci. Lett. **123**: 172-174

Raynaud F., Mauviard F., Geoffriau M., Claustrat B. und Pévet P. (1993): Plasma 6-hydroxymelatonin, 6-sulfatoxymelatonin and melatonin kinetics after melatonin administration to rats.

Biol. Signals **2**: 359-366

Reiter R.J. (1993): The melatonin rhythm: both a clock and a calendar.

Experientia **49**: 654-664

Reiter R.J. (1991a): Melatonin: the chemical expression of darkness.

Molec. Cell. Endo. **79**: C153-C158

Reiter R.J. (1991b): Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions.

Endoc. Rev. **12**: 151-180

Reiter R.J., Britt J.H. und Armstrong J.D. (1987): Absence of a nocturnal rise in either norepinephrine, N-acetyltransferase, hydroxyindole-O-methyltransferase or melatonin in the pineal gland of the domestic pig kept under natural environment photoperiods.

Neurosci. Lett. **81**: 171-176

Reiter R.J., Hurlbut E.C., Richardson B.A., King T.S. und Wang L.C. (1982): Studies on the regulation of pineal melatonin production in the Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*).

In: The pineal and its hormones., Reiter R.J. (ed.), pp. 57-65, Boca Raton, New York

Reiter R.J. und Tan D.X. (2003): What constitutes a physiological concentration of melatonin?

J. Pineal Res. **34**: 79-80

Reiter R.J., Tan D.X., Burkhardt S. und Manchester L.C. (2001): Melatonin in plants.

Nutr. Rev. **59**: 286-290

Rice J., Mayor J., Tucker H.A. und Bielski R.J. (1995): Effect of light therapy on salivary melatonin in seasonal affective disorder.

Psychiatry Research **56**: 221-228

Rollag M.D. und Niswender G.D. (1976): Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regimens.
Endocrinology **98**: 482-489

Romero J.A., Zatz M., Kebanian J.W. und Axelrod J. (1975): Circadian cycles in binding of ³H-alprenolol to β -adrenergic receptor sites in rat pineal.
Nature **258**: 435-436

Roozen A.W., Tsuma V.T. und Magnusson U. (1995): Effects of short-term restraint on plasma concentrations of catecholamines, beta-endorphin, and cortisol in gilts.
Am. J. Vet. Res. **56**: 1225-1227

Rosochacki S.J., Piekarzewska A.B., Połozynowicz J. und Sakowski T. (2000): The influence of restraint immobilization stress on the concentration of bioamines and cortisol in plasma of Piétrain and Duroc pigs.
J. Vet. Med. A **47**: 231-242

Rudeen P.K. und Reiter R.J. (1980): Depression of nocturnal pineal serotonin N-acetyltransferase activity in castrate male rats.
J. Neural Transm. **48**: 1-8

Ruis M.A.W., Te Brake J.H.A., Engel B., Ekkel E.D., Buist W.G., Blokhuis H.J. und Koolhaas J.M. (1997): The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress.
Physiol. Behav. **62**: 623-630

Seggie J., Campbell L., Brown G.M. und Grotta L.J. (1985): Melatonin and N-acetylserotonin stress responses: Effects of type of stimulation and housing conditions.
J. Pineal Res. **2**: 39-49

Selmaoui B., Oguine A. und Thibault L. (2001): Food access schedule and diet composition alter rhythmicity of serum melatonin and pineal NAT activity.
Physiol. Behav. **74**: 449-455

Shein H.M. und Wurtman R.J. (1971): Stimulation of [14C-] tryptophan 5-hydroxylation by norepinephrine and dibutyl adenosine 3'5'-monophosphate in rat pineal organ cultures.
Life Sci. **10**: 935-940

Shiu S.Y.W., Yu Z.H., Chow P.H. und Pang S.F. (1996): Putative melatonin receptors in the male reproductive tissues.
In: Melatonin: A universal photoperiodic signal with diverse actions., Tang P.L., Pang S.F. Reiter R.J. (eds.), pp. 90-100, Karger, Basel

Sidiq A. (2001): Methodische und verhaltensphysiologische Untersuchungen am circadianen Schrittmachersystem des Haussperlings (*Passer domesticus*).
Diplomarbeit, LMU München

Sitaram B.R. und Lees G.J. (1978): Diurnal rhythm and turnover of tryptophan hydroxylase in the pineal gland of the rat.
J. Neurochem. **31**: 1021-1026

Sitaram B.R. und Lees G.J. (1984): Effects of oxygen on the induction of tryptophan hydroxylase by adrenergic agents in organ cultures of rat pineal glands.
J. Neurochem. **42**: 1183-1185

Song Y., Tam P.C., Poon A.M., Brown G.M. und Pang S.F. (1995): 2-[¹²⁵J]iodomelatonin-binding sites in the human kidney and the effect of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate).
J.Clin. Endocrinol. Metab. **80**: 1560-1565

Steinlechner S., Baumgartner I., Klante G. und Reiter R.J. (1995): Melatonin synthesis in the retina and pineal gland of Djungarian hamsters at different times of the year.
Neurochem Int. **27**: 245-251

Sugden A.L., Sugden D. und Klein D.C. (1987): α_1 -adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx.
J. Biol. Chem. **262**: 741-745

Sugden D. (1989): Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland.
Experientia **45**: 922-932

Sugden D. (1979): Circadian change in rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan.
J. Neurochem. **33**: 811-813

Sugden D. und Klein D.C. (1983): β -adrenergic receptor control of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase.
Endocrinology **113**: 348-353

Sugden D., Ho A.K., Sugden A.L. und Klein D.C. (1988): Negative feedback mechanisms: evidence that desensitization of pineal α_1 -adrenergic responses involves protein kinase C.
Endocrinology **123**: 1425-1432

Tamarkin L., Reppert S.M. und Klein D.C. (1979): Regulation of pineal melatonin in the Syrian hamster.

Endocrinology **104**: 385-389

Tan D.X., Manchester L.C., Hardeland R., Lopez-Burillo S., Mayo J.C., Sainz R.M. und Reiter R.J. (2003): Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin.

J. Pineal Res. **34**: 75-78

Tan D.X., Reiter R.J., Manchester L.C. et al. (2002): Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger.

Curr. Top. Med. Chem. **2**: 181-197

Tast A., Hälli O., Ahlström S., Andersson H., Love R.J. und Peltoniemi O.A.T. (2001a): Seasonal alterations in circadian melatonin rhythms of the european wild boar and domestic gilt.

J. Pineal Res. **30**: 43-49

Tast A., Love R.J., Evans G., Andersson H., Peltoniemi O.A.T. und Kennaway D.J. (2001b): The photophase light intensity does not affect the scotophase melatonin response in the domestic pig.

Animal Reproduction Science **65**: 283-290

Tast A., Love R.J., Evans G., Telsfer S., Giles R., Nicholls P., Voultzios A. und Kennaway D.J. (2001c): The pattern of melatonin secretion is rhythmic in the domestic pig and responds rapidly to changes in daylength.

J. Pineal Res. **31**: 294-300

Teubner H. (2002): Einfluß verschiedener Lichtintensitäten und -qualitäten auf den Melatonin- und IgA-Spiegel im Speichel und auf das Verhalten von Jungschweinen.

Vet. Med. Dissertation, LMU München

Thomas K.B., Zawilska J. und Iuvone P.M. (1990): Arylalkylamine (Serotonin) N-Acetyltransferase Assay using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence or Electrochemical Detection of N-Acetyltryptamine.

Analytical Biochemistry **184**: 228-234

Tilden A.R., Becker M.A., Amma L.L. et al. (1997): Melatonin production in an anaerobic photosynthetic bacterium: an evolutionarily early association with darkness.

J. Pineal Res. **22**: 102-106

Tillet Y., Thibault J. und Krieger M. (1994): Aromatic L-amino acid decarboxylase immunohistochemistry in the suprachiasmatic nucleus of the sheep. Comparison with tyrosine hydroxylase.

Brain Res. **648**: 319-323

Tosini G. und Menaker M. (1998): Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, *Iguana iguana*.

J. Neurosci. **18**: 1105-1114

Vakkuri O. (1985): Diurnal rhythm of melatonin in human saliva.

Acta Physiol. Scand. **124**: 409-412

Vakkuri O., Leppäluoto J. und Kauppila A. (1985): Oral administration and distribution of melatonin in human serum, saliva and urine.

Life Sciences **37**: 489-495

Van Tassel D.L. und O'Neill D. (2001): Putative regulatory molecules in plants: evaluating melatonin.

J. Pineal Res. **31**: 1-7

Voultsios A., Kennaway D.J. und Dawson D. (1997): Salivary melatonin as a circadian phase marker: Validation and comparison to plasma melatonin.

J. Biol. Rhythms **12**: 457-466

Wehr T.A. (1997): Melatonin and Seasonal Rhythms.

J. Biol. Rhythms **12**: 518-527

Young I.M., Leone R.M., Francis P., Stovell P. und Silman R.E. (1985): Melatonin is metabolised to N-acetyl-serotonin and 6-hydroxy-melatonin in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. **60**: 114

Young S.N. und Anderson G.M. (1982): Factors influencing melatonin, 5-hydroxytryptophol, 5-hydroxyindoleacetic acid, 5-hydroxytryptamine and tryptophan in rat pineal glands. Neuroendocrinology **35**: 464-468

Zarazaga L., Malpoux B., Bodin L. und Chemineau P. (1998a): The large variability in melatonin blood levels in ewes is under strong genetic influence.

Am. J. Physiol. **274**: E607-E610

Zarazaga L., Malpoux B., Guillaume D., Bodin L. und Chemineau P. (1998b): Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism.

Am. J. Physiol. **274**: E1086-E1090

Zhou J.N., Liu R.Y., van Heerikhuize J., Hofman M.A. und Swaab D.F. (2003): Alterations in the circadian rhythm of salivary melatonin begin during middle-age.

J. Pineal Res. **34**: 11-16

Danksagung

Herrn Prof. M. Erhard möchte ich für die Überlassung des Themas, die Endkorrektur der Arbeit, und insbesondere für die Bewilligung des großzügigen finanziellen Rahmens der Arbeit danken.

Bei Frau Dr. C. Wöhr möchte ich mich für die Auswahl des Kooperationspartners, die freundliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung sowie die Korrektur der Arbeit bedanken.

In besonders herzlicher Weise bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe über Biologische Rhythmen und Verhalten der Max-Planck-Forschungsstelle für Ornithologie in Andechs: Mein besonderer Dank gilt Dr. Roland Brandstätter für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die Methodik und der unkomplizierten Terminabstimmung für Extraktionen und Probenmessungen mit anderen Untersuchungen. Zusätzlich möchte ich mich für die sehr gute Betreuung der Arbeit, und die Hilfe bei der statistischen Auswertung sowie der Interpretation der Ergebnisse bedanken. Bei Gabriela Wagner möchte ich mich für ihre jederzeit gewährte Hilfe bei methodischen, technischen oder software-bedingten Problemen, sowie ihr offenes Ohr für Latte Macchiato-Pausen bedanken. Christina Wolf danke ich für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die Methode sowie den Vorbereitungen zu den Extraktionen. Ihnen, und allen anderen, nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern dieser Gruppe danke ich für das gute Arbeitsklima.

Dem Direktor der Forschungsstelle, Herrn Prof. E. Gwinner danke ich für die Gastfreundschaft und die Möglichkeit, an der Forschungsstelle übernachten zu können, was die Probenextraktionen und Auswertungen insbesondere an den Wochenenden und nachts erheblich beschleunigte und erleichterte. Mein Dank gilt darüber hinaus allen Mitarbeitern der Max-Planck-Forschungsstelle für Ornithologie in Andechs für die freundliche Aufnahme.

Bei Herrn Prof. W. Erhardt (Klinikum rechts der Isar, Abteilung für Experimentelle Chirurgie, TU München) und seinem Anästhesie-Team möchte ich mich für die Durchführung der Venenkatheterimplantation bedanken.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene, insbesondere für ihre Hilfe bei den OP-Vorbereitungen, sowie allen Freiwilligen für die tatkräftige Unterstützung bei der Probenentnahme.

Ein herzliches Dankeschön geht an Elizabeth Yohannes für die Korrektur des Summarys.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinem Freund Dirk für seine Hilfe bei der graphischen und statistischen Darstellung der Ergebnisse, für die Hilfe bei softwarebedingten Problemen sowie beim Korrekturlesen und die unermüdliche Motivierung nicht nur während des Verfassens dieser Arbeit.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht, und mich jederzeit persönlich und finanziell unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Christine Engmann
Geburtsdatum: 27.07.1973
Geburtsort: Neuendettelsau

Schulbildung:

1980 - 1984 Grundschule Neuendettelsau
1984 - 1993 Laurentius-Gymnasium Neuendettelsau
9. Juli 1993 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

Nov. 1993 - Feb. 2000 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
17. Februar 2000 Abschluss des dritten Abschnitts der tierärztlichen Prüfung
9. März 2000 Approbation als Tierärztin
seit Oktober 2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertation

Berufstätigkeit:

Juli 2000 - Sept. 2003 Vertretungen als amtliche Tierärztin bei der Stadt Ansbach
Sept. 2002 - Nov. 2002 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene der LMU München