

Aus der Medizinischen Klinik IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Geschlechtsspezifische Auswirkungen von LC-HF-Diäten auf den Fett-,  
Glukose-, Leberstoffwechsel und auf die GH/IGF-I Achse von Ratten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians Universität zu München

vorgelegt von

Sophia-Theresa Diesch

aus Ulm

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Faußner

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Martin Bidlingmaier

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2022

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Adipositas und Metabolisches Syndrom	5
1.2 Einführung in Diäten und die Makronährstoffe	6
1.2.1 Diätbeispiele und deren Einfluss auf den menschlichen Körper	8
1.3 Fettstoffwechsel der Leber	9
1.3.1 NAFLD (nicht-alkoholische-Fettlebererkrankung) und NASH (nicht-alkoholische-Steatohepatits)	10
1.4 Fettgewebe	11
1.4.1. Stoffwechsel des Fettgewebes	15
1.5 Somatotropin (GH)	18
1.5.1 Sekretionsmechanismus GH	19
1.5.2 Molekulare Wirkung von GH	19
1.6 Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs)	20
1.6.1 Molekulare und metabolische Wirkung von IGFs	21
1.7 Positionierung der vorgelegten Dissertation als ein Teilprojekt innerhalb von seriellen Experimenten der Arbeitsgruppe	22
2. Zielsetzung	23
3. Material und Methoden	25
3.1 Versuchsaufbau	25
3.2 Tiermodell und Haltungsbedingungen der Versuchsreihe „gonadal intakt/ gonadal nicht intakt“ (GHB-I und GHB-II)	25
3.3 Paar-Fütterungsmodell und Gewichtskontrolle	26
3.3.1 Versuchsdiäten	28
3.4 Operatives Verfahren der Kastration	29
3.4.1 Ovariectomie der weiblichen Ratten	30
3.4.2 Orchidektomie der männlichen Ratten	31
3.4.3 Postoperative Antibiotikaprohylaxe und Schmerzmedikation	31
3.5 Versuchsabschluss	32

3.6 Tierschutz	33
3.7 Histologische Aufarbeitung der Leber	34
3.7.1 Schneiden der Präparate	34
3.7.2 Fettfärbung Oil red O	34
3.7.3 Auswertung der histologischen Schnitte	35
3.8. Molekularbiologische Methoden	36
3.8.1 Grundlage der RNA-Gewinnung	36
3.8.2. RNA-Isolation	36
3.8.3 Reinheitsprüfung der RNA mittels Agarosegelelektrophorese	38
3.8.4 Transkription RNA in cDNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase	39
3.8.5 Primer Design	40
3.8.6 Housekeeping	41
3.8.7 Real-Time-PCR (RT-PCR)	41
3.8.8 Statistische Auswertung	41
3.9 Hormonmessungen	42
3.9.1. ELISA-Leptin Serum	42
3.9.2 ELISA-Insulin Serum	43
3.9.3 ELISA-IGF-I Serum	44
3.9.4 ELISA-GH Serum	44
3.9.5 GH Bestimmung /Serienblutabnahme	44
4. Ergebnisse	46
4.1 Körpergewicht Tiere	46
4.2. Kumulative Gewichtszunahme über 28 Tage Fütterung	48
4.3 Gewicht subkutanen Fettgewebe in Relation zum Körpergewicht	51
4.4 Gewicht Leber in Relation zum Körpergewicht	54
4.5 Ergebnisse der mRNA Expression einzelner Gene im subkutanen Fettgewebe	57
4.5.1 mRNA Expression Leptin im subkutanen Fettgewebe	57
4.5.2 mRNA Expression Lipoproteinlipase (LPL) im subkutanen Fettgewebe	59
4.5.3 mRNA-Expression der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) im subkutanen Fettgewebe	61

4.5.4 mRNA-Expression des Fettsäure-Synthase-Gen (FASN) im subkutanen Fettgewebe	64
4.5.5 mRNA-Expression des Growth Hormon Rezeptor (GHR)/Somatotropin Rezeptor im subkutanen Fettgewebe	66
4.5.6 mRNA-Expression von Adiponektin (AdipoQ) im subkutanen Fettgewebe	68
4.6 Serum-Konzentration von Leptin	69
4.7 Serum-Insulin Assay	72
4.8 Serum-IGF-I Assay	73
4.9 Serum-GH Assay	76
4.10 Leberhistologie (Red-Oil-Färbung)	79
5. Diskussion	85
5.1 Bewertung der angewandten Methoden	85
5.1.1 Tierhaltung	85
5.1.2 Molekularbiologische Methoden	86
5.2 Zunahmen des subkutanen Fettgewebes unter LC-HF-Diäten	87
5.3 Aufhebung des sexuellen Dimorphismus des Körpergewichts durch Kastration	89
5.4 Verstärkung der nicht alkoholischen Steatohepatitis (NASH) durch LC-HF-Diäten unabhängig von der Kalorienzufuhr	91
5.5 Sexueller Dimorphismus der Leberverfettung bei LC-HF-Diäten	92
5.6 Zunahme des Lebergewichts in Abhängigkeit der Leberverfettung und die daraus resultierende NASH und deren direkte diätische Therapie	93
5.7 LC-HF-Diäten führen zur Zunahme des subkutanen Fettgewebes und zur Zunahme der Serum-Leptin-Konzentration	94
5.8 Ausbleibende Veränderung der GH-Rezeptor-Expression im subkutanen Fettgewebe	95
5.9 Gewichtszunahme der Weibchen nach Ovariectomie	96
5.10 Sexueller Dimorphismus der Suppression der GH-IGF-I Achse unter LC-HF-Diäten	97
5.11 Metabolische Effekte von Testosteron in gonadal intakten und gonadal nicht intakten männlichen und weiblichen Ratten	98

6. Zusammenfassung	100
6.1 Einleitung	100
6.2 Methoden	100
6.3 Ergebnisse	101
6.4 Schlussfolgerung	102
7. Abkürzungsverzeichnis	103
8. Material und Herstellerverzeichnis	105
8.1 Tierversuche	105
8.2 Histologie	105
8.3 Molekularbiologische Methoden	106
8.3.1 Pulverisierung der Präparate	106
8.3.2 RNA-Isolation	106
8.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	107
8.3.4 Umschreiben von RNA in cDNA	107
8.3.5 Quantitativ-Real-Time PCR	107
8.3.6 Primer Design	107
8.3.7 ELISA Assays	108
8.4 Software	108
9. Quellenverzeichnis	109

## 1. Einleitung

### 1.1 Adipositas und Metabolisches Syndrom

Adipositas hat sich in den letzten Jahren in den Industrienationen zu einem zunehmenden Problem entwickelt. Mehr als 20% aller Menschen in Industrieländern leiden an Adipositas [1]. Diese Fettleibigkeit führt zu einer sinkenden Lebenserwartung, multiplen Folgeerkrankungen und zu enormen Mehrkosten für das Gesundheitssystem [2]. Weit verbreitete Folgeerkrankungen betreffen dabei die unterschiedlichsten Organsysteme, wie zum Beispiel das Herz-Kreislauf-System, die Verdauungsorgane und sogar den Bewegungsapparat [3]. Eine weitere Folge der Adipositas ist eine periphere Insulinresistenz, die letztlich zu einem Diabetes Mellitus Typ II (DM-2) werden kann. Die Notwendigkeit der Forschung auf dem Gebiet von Ernährung und Adipositas ist daher unumgänglich.

Adipositas ist eine von der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) anerkannte Erkrankung und definiert sich durch einen Body-Mass-Index von über  $30\text{kg/m}^2$  (Tabelle 1) [3]. Die Gründe für eine so starke Gewichtszunahme sind fast immer eine hyperkalorische Nahrungsaufnahme in Kombination mit zu geringer körperlicher Aktivität. Mikroskopisch kommt es hier zu einer Zellhypertrophie durch Zunahme der Lipidtröpfchen innerhalb einer Zelle und zum anderen zu einer Neubildung von Adipozyten [4]. Den Symptomkomplex aus kardiovaskulären Risikofaktoren, Stammfettsucht, erhöhten Nüchternblutglukosewerten (DM-2), erhöhte n Triglyceriden, erniedrigtem HDL-Cholesterin und arteriellem Hypertonus beschreibt man als Metabolisches Syndrom [2]. Methoden der Gewichtsreduktion sind neben einer Ernährungsumstellung und Lifestyle-Veränderung auch medikamentöse Therapieansätze.



Kategorie	BMI	Risiko für Begleiterkrankungen
Untergewicht	<18,5	Niedrig
Normalgewicht	18,5-24,9	Durchschnittlich
Übergewicht	≥ 25,0	Gering erhöht Erhöht Hoch Sehr hoch
Präadipositas	25,0-29,9	
Adipositas Grad I	30,0-34,9	
Adipositas Grad II	35,0-39,9	
Adipositas Grad III	≥ 40	

Tabelle 1: Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen anhand des BMI nach WHO 2000[5]

## 1.2 Einführung in Diäten und die Makronährstoffe

Eine von der Gesellschaft häufig verwendete Möglichkeit, der Adipositas entgegenzuwirken, sind Diäten, welche in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus gerückt sind. Zudem ist neben dem sich stetig verändernden Schönheitsideal der westlichen Gesellschaft der Drang nach Perfektion und Selbstoptimierung enorm. Dies spiegelt sich auch in der Rate an Menschen wider, die im Laufe ihres Lebens eine Diät versucht haben. Jeder dritte Deutsche hat bereits eine Diät gemacht und jeder zweite Deutsche würde gerne abnehmen [5]. Diät bedeutet dabei, eine spezielle Auswahl an Lebensmitteln zu sich zu nehmen, seine tägliche Kalorienaufnahme zu restringieren und bestimmte Makronährstoffe den anderen vorzuziehen. Eine reine Gewichtsabnahme steht hier nicht zwingend im Vordergrund. Viele Diäten sollen auch dazu dienen, Krankheiten, wie beispielsweise eine Laktoseintoleranz, positiv zu beeinflussen.

Diät ist dennoch nicht gleich Diät. Für die Aufrechterhaltung des Organismus sind multiple Nährstoffe essentiell. Diese Nährstoffe teilt man in Makro- und Mikronährstoffe ein. Makronährstoffe sind Nahrungsbestandteile, wie Fett, Proteine und Kohlenhydrate, welche die Energieträger der Nahrung darstellen. Mikronährstoffe hingegen sind Spurenelemente, Mineralstoffe und Vitamine, die keinen Energieträger darstellen. Der Energiegehalt der Makronährstoffe unterscheidet sich stark. Fette

beispielsweise weisen eine fast doppelt so hohe Energiedichte wie Kohlenhydrate und Proteine auf (Tabelle 2).

	Energiegehalt in kcal/g	Energiegehalt in kJ/g
Proteine	4,1	17,2
Fette	9,3	39
Kohlenhydrate	4,1	17,2

Tabelle 2: Energiegehalt der Makronährstoffe

Der Energiebedarf von Männern und Frauen unterscheidet sich deutlich. Eine Bestimmung dieses täglichen Grundumsatzes kann mit der in Tabelle 3 angeführten Formel nach Harris und Benedikt berechnet werden [6].

Geschlecht	Formel zur Berechnung des Grundumsatzes
Frauen	$655,1 + (9,563 \times \text{Gewicht in kg}) + (1,850 \times \text{Größe in cm}) - (4,676 \times \text{Alter in Jahren})$
Männer	$66,5 + (13,75 \times \text{Gewicht in kg}) + (5,003 \times \text{Größe in cm}) - (6,755 \times \text{Alter in Jahren})$

Tabelle 3: Formel nach Harris und Benedikt zur Berechnung des täglichen Grundumsatzes bei Männern und Frauen

Wir der tägliche Energiebedarf durch zu viel Nahrungsaufnahme überschritten, so kommt es zur Formung von Depots zur Energiespeicherung und somit zur Gewichtszunahme. In Zeiten, in denen weniger Energie dem Organismus zugeführt wird, kommt es hingegen zum Abbau dieser Depots.

Die oben aufgeführte Formel nach Harris und Benedikt dient als Grundlage für Ernährungsberater und Sportmediziner. Bei Individuen mit athletischem Körperbau und demnach hohem Muskelanteil und hoher fettfreier Masse wird diese Formel allerdings ungenauer [7]. Da zur Aufrechterhaltung von Muskulatur mehr Energie benötigt wird, steigt der Grundumsatz von athletischen Individuen. Da die Körperzusammensetzung und der Anteil der fettfreien Masse nicht in der Formel nach Harris und Benedikt abgebildet ist, wird diese ungenau.

Der K-Wert ist eine Konstante, welche den Grundumsatz der verschiedenen Arten von Gewebe in kcal/kg beschreibt [8] (Tabelle 4). Da der Anteil der Skelettmuskulatur im Verhältnis zur gesamten Körpermasse groß ist, ist der K-Wert der Skelettmuskulatur relevant, auch wenn er zunächst sehr gering erscheint.

	Leber	Skelettmuskulatur	Fettgewebe	Gehirn
K-Wert in kcal/kg Organ	200	13	4,5	220

Tabelle 4: K-Werte von Gehirn, Leber, Fettgewebe und Skelettmuskulatur in kcal/kg Organgewicht

Der Grundumsatz wird neben der körperlichen Aktivität durch die Thermogenese bestimmt. Dabei beträgt der Energieverbrauch durch körperliche Aktivität 30% und der der Thermogenese 10% am gesamten Energieverbrauch [9].

### 1.2.1 Diätbeispiele und deren Einfluss auf den menschlichen Körper

Eine typisch westliche Ernährung besteht aus über 50% Kohlenhydraten, 15% Proteinen und ca. 35% Fett [10]. Solch eine Diät ist demnach sehr kohlenhydratreich. Daneben haben sich jedoch viele kohlenhydratarme Diäten entwickelt. Allen voran so genannte Low-Carb-High-Fat-Diäten wie zum Beispiel die Atkins-Diät. Durch den Mangel an Kohlenhydraten wird so der Metabolismus gezwungen, seine Energie nicht mehr aus Glukose, sondern nur aus einem erhöhten Fettstoffwechsel zu beziehen. Dieses führt somit zu einer Imitation des Hungerstoffwechsels, der Ketose. Das gegessene Fett wird von der Leber zu Ketonkörpern metabolisiert, welche nun als Energielieferant dienen. Die Indikation für eine ketogene Diät ist neben dem Wunsch nach Gewichtsreduktion auch die diätische Therapie von kindlichen Epilepsien, Glukosetransportstörungen und bei neurodegenerativen Erkrankungen. Bei Krampfleiden senkt die Ketose nachweislich die Krampfanfallsrate und wirkt zusätzlich neuroprotektiv [11, 12] [13]. Neben einem Gewichtsverlust kommt es bei einer ketogenen Diät stärker als bei einer Low-Fat-Diät zur Senkung des Serumcholesterin und der Triglycerid-Konzentration im Serum [14].

Ein bekannter, negativer Effekt der Atkins-Diät ist ein Verlust an Muskelmasse [15] [16].

In Tabelle 5 findet sich die in der Literatur am häufigsten verwendete Einteilung der Low-Carb-Diäten nach Feinmann et al. [17]

Diät Bezeichnung	% Anteil Kohlenhydrate an Gesamtkalorien
Very-Low Carb	<10%
Low Carb	10-26%
Medium Carb	26-45%
High Carb	>45%

Tabelle 5: Differenzierung von Low-Carb-Diäten nach Feinmann [18]

### 1.3 Fettstoffwechsel der Leber

Beim Fettstoffwechsel des menschlichen Körpers wird zwischen einem endogenen und einem exogenen Abbauweg unterschieden. Der Fettstoffwechsel findet hauptsächlich in der Leber, aber auch im Muskel, dem Darm und dem Fettgewebe statt.

Der exogene Fettstoffwechsel beschreibt die Fette, die direkt aus der Nahrung resorbiert werden. Um diese Nahrungsfette dem Organismus zur Verfügung stellen zu können, müssen sie in emulgierter Form im Magen-Darm-Trakt resorbiert werden. Bereits im Mund beginnt die Verdauung durch Lipasen, welche einzelne Fettsäuren von Triglyceriden abspalten. Die so entstandenen freien Fettsäuren, Glycerin, Mono- und Diglyceride werden dann im Dünndarm resorbiert. Die resorbierten Nahrungsfette werden wieder zu TAG (Triacylglyceriden) zusammengefügt und durch Chylomikronen gebunden. An die Chylomikronen gebunden, gelangen sie mit Cholesterin in den Blutkreislauf und zur Leber. Am Gefäßendothel der Adipozyten und der Muskulatur befinden sich Lipoproteinlipasen (LPL), welche in der Lage sind, lipolytisch das TAG in einzelne freie Fettsäuren und Glycerin abzubauen. Die so erlangte freien Fettsäuren können nun im Muskel direkt zur Energiegewinnung oder zur Lipogenese in den

Adipozyten verstoffwechselt werden. Die so entleerten Chylomikronen-Remnants gelangen nun über den Blutkreislauf zur Leber und werden dort verstoffwechselt und zum Aufbau körpereigener Lipide verwendet.

Der endogene Fettstoffwechsel beschreibt den Stoffwechsel der körpereigenen synthetisierten Lipoproteine. Insulin und kohlenhydratreiche Nahrung stimulieren die Lipogenese der Leber und ermöglichen so eine tägliche Synthese von 1-2 g Fettsäuren. Glukagon und ungesättigte Fettsäuren wirken hingegen hemmend auf die Fettsäuresynthese.

Die Leber sezerniert VLDL (very-low-density Lipoproteine), die neben TAG auch Cholesterol enthalten. Diese VLDL gelangen nun durch den Blutkreislauf an LPL (Lipoproteinlipasen), von denen sie wie beim exogenen Fettstoffwechsel in einzelne Fettsäuren und Glycerin gespalten werden und so den Zellen zur Energiegewinnung oder Verstoffwechselung zur Verfügung stehen. Aus den VLDL wird nun IDL (intermediate-density Lipoprotein), die weniger TAG besitzen. Ein Teil der IDL wird wieder von der Leber aufgenommen, ein anderer in LDL (low-density Lipoprotein) umgewandelt. Das LDL ist nun mit viel Cholesterol und wenig TAG beladen. Das LDL wird nun durch den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen. Das Cholesterol dient beispielsweise für den Aufbau von Membranen und zur Synthese von Steroidhormonen[18]. Die nun überbliebenen LDL-remnants werden als HDL (high-density Lipoproteine) bezeichnet, welche nun mit wenig Cholesterol beladen sind. Diese HDL Lipoproteine gelangen nun zur Leber rezeptorvermittelt zurück. Die verbliebenen TAG können nun zur Betaoxidation in den Leberzellen verwendet und über die Atmungskette vollständig abgebaut werden [19-21].

### 1.3.1 NAFLD (nicht-alkoholische-Fettlebererkrankung) und NASH (nicht-alkoholische-Steatohepatits)

Eine NAFLD entsteht durch eine Störung des Lipidstoffwechsels der Leber und kann multiple Ursachen haben. Besonders ein stetiges Überangebot an Nahrung und eine damit assoziierte Adipositas und Hyperlipoproteinämie können zur Fetteinlagerungen in der Leber führen. Weitere Risikofaktoren sind neben einem erhöhten BMI eine viszerale Fettsucht, die hepatische Insulinresistenz, ein Diabetes Mellitus Typ II und das

metabolischen Syndrom [22, 23]. Eine nicht alkoholische Leberverfettung kann auch durch Krankheiten, wie einem Morbus Wilson oder als Medikamentennebenwirkung, auftreten [24]. Eine NAFLD liegt vor, wenn radiologisch in der Leber Fetteinlagerungen nachgewiesen werden, der tägliche Alkoholkonsum bei Männern aber unter 40g und bei Frauen unter 20g liegt. Solch eine NAFLD kommt bei ca. 1% der Bevölkerung vor [24]. Im Gegensatz zur alkoholtoxischen Steatohepatitis tritt bei der nicht alkoholischen Fettlebererkrankung kein Ikterus auf [ 25], 40% der nicht alkoholischen Fettlebererkrankung schreiten fort und werden zu einer NASH (nicht-alkoholische-Steatohepatits), sprich einer chronischen Entzündung der Leber zusätzlich zur Verfettung. Diese NASH wird zu 50% zu einer manifesten Leberzirrhose [26, 27]. Aufgrund der stetig zunehmenden Rate an Adipositas und Diabetes Mellitus Typ II ist die NAFLD und NASH eine Krankheit, deren Prävalenz besonders in den westlichen Ländern steigt [28]. Die genaue Kausalität, wie es auf Grund der Risikofaktoren zu einer Leberverfettung kommt, ist bisher nicht geklärt. Sekundär führt die NAFLD zu multiplen Folgeerkrankungen, wie hepatische Insulinresistenz und kardiovaskuläre Erkrankungen [27, 29].

#### 1.4 Fettgewebe

Fettgewebe zählt zum Bindegewebe und befindet sich an multiplen Stellen im Körper. Es hat neben metabolischen auch strukturelle Aufgaben. Weißes Fettgewebe dient in der Form von viszeralem Fett als Energiespeicher und organumgebende Stütze und als subkutanes Fettgewebe zur thermischen Isolation des Körpers. Des Weiteren befindet sich weißes Fettgewebe im Knochenmark, epikardial und umgibt Nerven und Gefäße.

Braunes Fettgewebe hingegen befindet sich an genauer definierten Stellen, wie beispielsweise am Rücken auf Höhe der oberen Brustwirbelsäule, entlang der Wirbelsäule, seitlich den Hals entlang und an den Schultern. Bei Säuglingen ist der Anteil von braunem Fett deutlich höher als bei Erwachsenen, da ihre Thermoregulation noch nicht vollständig ausgereift ist. Bei Säuglingen befindet sich das braune Fett besonders an Hals und Brust.

Der Anteil von Fett am Körpergewicht variiert im Laufe des Lebens. Bei einer 20-jährigen Frau ist beispielsweise ein Körperfettanteil von 21-33% normal, bei einem 20-

jährigen Mann liegt ein normaler Fettanteil bei 8-20%. Je älter der Mensch wird, desto höher wird auch der normale Körperfettanteil. Bei einem 40 bis 59-jährigen Mann beläuft sich dieser auf 11-22%, bei einer 40 bis 59-jährigen Frau auf 23-34% [30, 31]. Ein Grund, wieso Frauen generell mehr Fett als Männer aufweisen, ist dass sie besonders in der Schwangerschaft und Stillzeit mehr Energie benötigen.

Das Fettgewebe des Körpers lässt sich in drei verschiedenen Arten von Fettgewebe aufteilen:

Es gibt braunes, zur Thermogenese fähiges Fettgewebe, beiges, ebenso zur Thermogenese fähiges Fettgewebe und weißes Fettgewebe, welches als Depotfett und Energielieferant dient [32]. Der Unterschied dieser Fettarten besteht in deren Zusammensetzung (Tabelle 6). In den Lipidtröpfchen, welche sich im Zytoplasma der Adipozyten befinden, werden Triacylglycerid gespeichert. Je nach Stoffwechsellage, Fettspeicherung (anabol), oder Lipolyse (katabol), können die Lipidtröpfchen an Größe zu- oder abnehmen. Des Weiteren befinden sich in Adipozyten Nervenzellen, Mitochondrien und Gefäße. Die Farbe des braunen und beigen Fettgewebes begründet sich durch die Menge an in Mitochondrien erhaltenem Cytochrom C und Blutgefäßen, die sich in diesen Adipozyten befinden. Alle drei Arten von Fettzellen entstammen den selben Vorläuferzellen [33] [4, 34].

Merkmal	Braunes Fettgewebe (BAT)	Beiges Fettgewebe (Brite)	Weißes Fettgewebe (WAT)
Lokalisation	perirenal, subscapular, zervical, axillär	Nacken, Brust	ubiquitär
Funktion	adaptive Thermogenese	Thermogenese und Energiespeicher	Energiespeicher
Fettsäurestoffwechsel	Oxidation	Oxidation, Speicherung	Speicherung, Abgabe ins Blut
Aufbau	Nukleus zentral, Zytoplasma, über die gesamte Zelle verteilt	Zytoplasma, über die gesamte Zelle verteilt, Nukleus zentral	Nukleus randständig (Siegelringform)
Adipozyten/ Fettvacuolen	multiple Lipidtröpfchen (plurvaculär)	multiple Lipidtröpfchen	ein Lipidtröpfchen (univaculär)
Mitochondrienanzahl	viele Mitochondrien	einige Mitochondrien	wenige Mitochondrien
Thermogenin	viel Thermogenin (UCP1)	geringere Mengen an Thermogenin als in BAT	kein UCP1
Vaskularisation	dichte Blutversorgung	viel Blutversorgung	geringe Blutversorgung
Wachstum	$\beta$ 3-adrenerge Stimulation	$\beta$ 3-adrenerge Stimulation und Kalorienüberschuss	Kalorienüberschuss
Hormonsekretion			Leptin, Adiponektin, Asprosin
Vorkommen Mann und Frau	Männer 3% Körpermasse Frauen 12% Körpermasse		Männer 12% Körpermasse Frauen 15% Körpermasse

Tabelle 6: Gegenüberstellung von braunem, beigen und weißem Fettgewebe, Funktion und Zusammensetzung



Weißes Fettgewebe wird, wie bereits erwähnt, in viszerales, subkutanes und epikardiales Fett unterteilt. Viszerales Fett befindet sich vorwiegend intraabdominell und umgibt die Bauchorgane. Es wird in folgende Untergruppen unterteilt: mesenteriales-, epididymales-, weißes- und perirenales-Fett.

Ein „Bierbauch“ ist demnach auf die Zunahme des viszeralen Fetts zurückzuführen und nicht auf die Zunahme des subkutanen Fettgewebes. Zunahme des viszeralen Fetts begünstigt zudem die Entstehung von Diabetes Mellitus Typ II, peripherer Insulinresistenz und Entzündungsprozesse [35-38]. Die spezifische Menge des viszeralen Fetts ermöglicht zudem eine genauere Aussage über die Adipositas bedingte Mortalität als der BMI (Body-Mass-Index). Besonders Männer neigen hormonbedingt zur Zunahme des viszeralen Fetts. Frauen nehmen hingegen Östrogen bedingt besonders an subkutanem Fett zu. Mit der Menopause kommt es durch die Abnahme des Östrogenspiegels zur relativen Fettverlagerung an Hüfte und Abdomen. Eine weitere Gruppe des viszeralen Fetts stellt das epikardiale Fettgewebe dar. Es umgibt das Herz und hat neben Schutz und Baufunktion auch eine metabolische Wirkung [39].

Das subkutane Fettgewebe befindet sich unter der Dermis in der so genannten Hypodermis. Im Gegensatz zu viszeralem Fettgewebe korreliert die Menge an subkutanem Fett nicht mit Adipositas assoziierten Erkrankungen, wie Malignomen, Apoplex und cardio-vasculäre Erkrankungen.

Neben seiner isolierenden und polsternden Funktion sezerniert das subkutane Fettgewebe ebenso das Hormon Leptin und hat somit zudem eine endokrinologische Funktion [40].

Braunes Fettgewebe besteht aus plurivacuolären Fettzellen, welche in der Lage sind, Wärme zu erzeugen. Diesen Vorgang nennt man Thermogenese. Besonders Neugeborene sind auf die Thermogenese angewiesen, da sie auf Grund ihrer geringen Größe in Relation zur Körpermasse viel Wärme verlieren und noch über eine insuffiziente Thermoregulation verfügen. Die Thermogenese funktioniert, wie folgt beschrieben: Braunes Fettgewebe wird durch den Abfall der Körpertemperatur durch sympathische Nerven aktiviert. Noradrenalin bindet an einen G-Protein gekoppelten Beta-Rezeptor auf den Adipozyten. Durch diese Bindung kommt es zur Aktivierung einer Adenylatcyclase, wodurch cAMP gebildet wird. cAMP aktiviert nun die Proteinkinase-A, welche Lipase phosphoryliert, so die Lipolyse anstößt und zur Transkription von Thermogenin (UCP1=Entkopplungs-Protein 1) führt. Durch die Beta-

Oxidation und die Atmungskette kommt es im intermembranösen Raum der Mitochondrien zur Akkumulation von Protonen und somit zur Bildung eines Konzentrationsgradienten von inter- nach intrazellulär. Thermogenin wird nun als Uniporter in die innere Mitochondrien-Membran eingebaut und ermöglicht so den Einstrom der Protonen in den Intrazellulärraum unter Umgehung der ATP-Synthase. So wird kein ATP, sondern Wärme erzeugt. Die Menge und Aktivität des braunen Fettgewebes wird durch die PGC-1-alpha (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator) Aktivität beeinflusst, welche selbst durch einen Kältereiz stimuliert wird [41].

Beiges Fettgewebe unterscheidet sich vom braunem Fettgewebe besonders durch eine geringere Menge an Thermogenin. Durch eine sympathische Stimulation bei Kälte kommt es zur Ausschüttung von Irisin. Irisin ist ein durch die Skelettmuskulatur sezerniertes Hormon, welches die weißen Adipozyten zur vermehrten Synthese von Mitochondrien und zur Synthese von Thermogenin anregt und diese so in beige Adipozyten umwandelt. Neben der Anzahl an Mitochondrien nimmt auch die Menge der Lipidtröpfchen von weißem zu beigem Fettgewebe zu. Besonders schlanke Menschen besitzen in Nacken und an der Brust ein Vorkommen an beigem Fettgewebe [42].

#### 1.4.1. Stoffwechsel des Fettgewebes

Der Stoffwechsel der Adipozyten ist abhängig von der Nahrung, die wir zu uns nehmen, von hormonellen Einflüssen und genetischer Prädisposition. Zudem ist das Stoffwechselverhalten der Adipozyten geschlechterspezifisch verschieden und unterscheidet sich zusätzlich noch innerhalb der verschiedenen Arten von Adipozyten. Viszerales Fettgewebe hat beispielsweise eine höhere lipolytische Aktivität als subkutanes Fettgewebe. Dies bedingt sich durch die verschieden starke Wirkung von Insulin,  $\alpha 2$ -Rezeptoren und  $\beta 1/2$ -adrenerge Rezeptoren auf die Fettzellen. Die Wirkung von Insulin und  $\alpha 2$ -Rezeptoren ist besonders bei viszeralem Fettgewebe deutlich geringer als bei subkutanem Fettgewebe. Hingegen ist die Wirkung von  $\beta 1/2$ -adrenergen Rezeptoren besonders bei viszeralem Fettgewebe hoch [43]. Diese Unterschiede sind besonders bei Frauen stark ausgeprägt. Dies bedingt sich durch die

verschiedene Rezeptordichte und verschieden starker Genexpression der Proteine, welche an der Lipolyse beteiligt sind.

Die Hauptfunktion des Fettgewebes ist es, Energie aus Nährstoffen zu speichern, was als anabole Stoffwechsellage bezeichnet wird. So können beim Fasten die gespeicherten Energiereserven mobilisiert werden, was einer katabolen Stoffwechsellage entspricht. Eine nicht zu vernachlässigende Aufgabe der Adipozyten ist es zudem, als Puffer Fettsäuren aus der Nahrung aufzunehmen. Hier gibt es erneut einen geschlechterspezifischen Unterschied, da Frauen in etwa doppelt so viele Fettsäuren in das subkutane Fettgewebe postprandial aufnehmen als Männer. Mit der Verdauung der Nahrung beginnt die postprandiale Phase, welche durch den Anstieg der Blutglukosewerte die  $\beta$ -Zellen des Pankreas stimuliert, welche so Insulin sezernieren. Gegenspieler des Insulins sind besonders Glukagon, Adrenalin und Noradrenalin. Diese drei Hormone werden in Phasen des Fastens (präprandial) ausgeschüttet. Postprandial gelangen kurze Fettsäuren direkt, an Albumin gebunden, ins Blut. Die Lipolyse wird durch Insulin, Glucocorticoide und kohlenhydratreiche Mahlzeiten inhibiert. Stimulierend wirken neben körperlichem Training und Fasten auch Glukagon.

Genauer werden die Triacylglyceride (TAG) durch hormonsensitive Lipasen (HSL), wie die Lipoproteinlipase (LPL) und ATGL (Adipozyten-spezifische Triglycerid-Lipase), in freie Fettsäuren und Glycerin gespalten.

Die Lipoproteinlipase (LPL) ist ein in der Leber und den Fettzellen synthetisiertes wasserlösliches Protein. Es entfaltet seine Funktion am Kapillarendothel von Leber- und Muskelzellen. Hier hydrolysiert es in Chylomikronen oder VLDL (very-low-density lipoprotein) gebundenes Triacylglycerid. Genauer hydrolysiert es eine an Glycerin gebundene Fettsäure. Durch diese hydrolytische Spaltung werden Triacylglyceride (TAG), zu zweifachen-Diacylglyceriden (DAG) und einfachen Monoacylglyceriden (MAG) [44, 45]. Die hierbei entstandenen einzelne freie Fettsäuren können nun durch das Endothel durch Diffusion und durch Translokasen (CD36 (scavenger Rezeptor)) in die Adipozyten gelangen und dort zur Lipogenese verwendet werden. Das entstandene freie Glycerin wird durch Aquaporin-7 Kanäle zur Niere oder Leber transportiert, wo es in die Glykolyse und Gluconeogenese eingeschleust wird. Die LPL sichert demnach den Nachschub an freien Fettsäuren für die Lipogenese in den Fettzellen. Die Konzentration der LPL im Fettgewebe ist abhängig vom Ernährungszustand. Postprandial stimulieren hohe Blutglukose-konzentrationen die Freisetzung von Insulin

aus dem Pankreas. Insulin bewirkt daraufhin neben einer Steigerung der Glukoseaufnahme in die Zellen den Fettstoffwechsel, indem es die Sekretion von LPL bewirkt [46].

Bei der basalen Lipolyse spielt besonders ATGL eine wichtige Rolle, während bei der stimulierten Lipolyse HSL der Angriffspunkt von inhibierenden und stimulierenden Hormonen ist [47].

ATGL ist ein weiteres Protein des Fettstoffwechsels, das durch die HSL (Hormonsensitive Lipase) und die Proteinkinase A (PKA) katalysiert wird. ATGL spaltet so in der Fettzelle TAG in DAG, wobei eine freie Fettsäure entsteht. Die so entstandene freie Fettsäure wird nun an das Blut abgegeben und kann von der Leber resorbiert und verstoffwechselt werden. Das durch die Lipolyse entstandene freie Glycerin kann ebenso durch die Leber zur Gluconeogenese oder Fettsäuresynthese wiederverwendet werden. Insulin wirkt anabol (Hemmung Lipolyse) und Adrenalin katabol (Stimulierung Lipolyse) auf die Hormonsensitive Lipase (HSL), die so die Funktion des ATGLs hormonabhängig beeinflusst. Adrenalin führt demnach, bei steigendem Energiebedarf der Zelle, zur Mobilisation der Energie aus den Fettspeichern. Es aktiviert die Adenylatzyklase in der Fettzelle, welche aus ATP cAMP bildet. cAMP dient nun als second messenger und führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). PKA führt nun durch Phosphorylierung zur Aktivierung der HSL, welche wiederum die ATGL vermittelte Lipolyse katalysiert [48]. Das anabol wirkende Insulin wird bei steigendem Angebot an Energieträgern im Blut sezerniert. Insulin führt durch die Aktivierung der Phosphodiesterase in den Adipozyten zum Abbau von cAMP und somit zur Hemmung der HSL und final zur Hemmung der Lipolyse. Zudem führt Insulin zu einem Aufbau der TAG in den Adipozyten.

Leptin oder Adipozytokin ist ein durch das Fettgewebe sezerniertes Protein, welches die Leerung der Fettspeicher bewirkt. Ihre Wirkung entfaltet es durch die Bindung an den LPL-Rezeptor im Hypothalamus. Leptin hemmt den Appetit, stimuliert den Energieumsatz und die Betaoxidation. Die Leptinproduktion ist abhängig von der Menge der gespeicherten Triacylglyceride. Fastet ein Patient, wodurch wenige TAG-Reserven vorhanden sind, nimmt die Leptinkonzentration ab und die Liponeogenese zu. Isst ein Patient hingegen, sind viele TAG in den Zelle vorhanden, wodurch die Leptin Konzentration ansteigt, so die Lipolyse induziert und die Liponeogenese hemmt. Leptin

wirkt demnach auf Fett katabol. Die Leptinsekretion wird zudem durch Glukose, Insulin, Östrogen und Glucocorticoide stimuliert [49].

Bei dem Peptidhormon Adiponektin (AdipoQ) handelt es sich um ein Protein, das in Fettzellen gebildet wird und im Zusammenspiel mit Leptin und Insulin das Hungergefühl stimuliert und so die Nahrungsaufnahme beeinflusst. Es handelt sich um ein exklusiv von Adipozyten ausgeschüttetes Fettgewebshormon [50-52]. Seinen Hauptwirkungsort hat Adiponektin an Muskeln und Leber, welche es durch den Blutkreislauf erreicht. Dort bindet es an spezifische Adiponektin-Rezeptoren und initiiert so die Beta-Oxidation und die Glukose-Bereitstellung. So führt es letztendlich zu einer Energiebereitstellung und zur Abnahme des Fettgewebes. Außerdem verbessert es die Insulinsensibilität der Leber und Muskulatur, wodurch weniger Insulin benötigt wird, um die selbe Menge an Blutzucker aufzunehmen. Adiponektin wirkt wie Leptin anti-hyperglykämisch und moduliert so die Wirkung des Insulins. Bei adipösen Patienten liegt Adiponektin in geringeren Dosen als bei Normalgewichtigen vor. Zudem ist Adiponektin bei Patienten mit Diabeste-Mellitus Typ II verringert [53].

Fatty-Acid-Synthase (FAS) ist ein Protein des Fettstoffwechsels, welches durch das FASN-Gen kodiert wird [54-56]. Das FAS-Protein ist ein Multi-Enzym-Protein-Komplex. Die Hauptaufgabe des FAS-Proteins ist es, die Synthese von Palmitat, einer langkettigen, gesättigten Fettsäure, zu katalysieren. Diese langkettigen, gesättigten Fettsäuren werden aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in der Anwesenheit von NADPH als Energielieferant gebildet [56].

### 1.5 Somatotropin (GH)

GH/ Somatotropin (growth hormone) ist ein Wachstumshormon, welches sowohl das Körperwachstum als auch den Metabolismus beeinflusst. Es wird in den azidophilen Zellen der Adenohypophyse gebildet und als Granula in dieser gespeichert. Das Sekretionsmuster von GH ist individuell unterschiedlich, hat allerdings nachts sein Maximum und ist pulsatil [57]. Um die Plasmahalbwertszeit von GH (20min) zu erhöhen und die Oszillationen durch die pulsatile Sekretion zu mindern, wird GH im

Blut an GHBP (GH-Bindungsprotein) gebunden, welches der extrazellulären Domäne des GH-Rezeptors entspricht [58].

### 1.5.1 Sekretionsmechanismus GH

Die Sekretion von GH wird primär durch das im Hypothalamus synthetisierte Growth-Hormon-Releasing-Hormon (GHRH, stimulierend), das ebenfalls aus dem Hypothalamus kommende Somatostatin (inhibierend) und teilweise auch durch das im Magen produzierte Ghrelin (stimulierend) gesteuert. Zudem gibt es verschiedene hormonelle Regulatoren (Östrogen, Testosteron und Schilddrüsenhormone), aber auch multiple sonstige Faktoren, wie Stress, Hunger, Fasten, Hypoglykämie, körperliche Aktivität und Tiefschlaf, die die Sekretion beeinflussen. Stress führt demnach GH-vermittelt zu einer Mobilisation von Energiereserven [59]. Neben der Inhibition durch Somatostatin hemmt sich GH auch selbst durch den Mechanismus der negativen Rückkopplung. Fettsäuren, die GH-vermittelt aus Triacylglyceriden freigesetzt werden, hemmen ebenso im Sinn einer negativen Rückkopplung die GH-Sekretion [60, 61].

### 1.5.2 Molekulare Wirkung von GH

Peripher entfaltet GH seine Wirkung, indem es das an den Zielorganen befindliche GHR (GH-Rezeptoren) bindet. Dieser Rezeptor ist ein Zytokin-Rezeptor, welcher in der Leber und im Muskel synthetisiert wird. Er befindet sich unter anderem auf der Zelloberfläche von Adipozyten und ermöglicht dort die Bindung des Wachstumshormons Somatotropin/GH. Durch die Bindung von GH an den Rezeptor dimerisiert dieser und aktiviert so die mit dem Rezeptor assoziierte Tyrosinkinase Janus-Kinase (JAK-2). Diese Tyrosinkinase phosphoryliert die Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptordomäne. Diese phosphorylierten Rezeptordomänen können nun STAT-5 binden (signal transducer and activator of transcription 5). Durch diese Bindung kommt es final zur Transkription von GH-abhängigen Genen.

Ein wichtiger Effekt ist hier die Transkription des Insulin ähnlichen Wachstumsfaktors IGF-I in der Leber. Das Wachstumshormon GH vermittelt somit seinen Effekt zum einen direkt durch GH, zum anderen indirekt über die Synthese von IGF- I. GH wirkt vor allem anabol, indem es die Proteinbiosynthese und somit das Wachstum der

Muskeln, Knochen und aller Organe stimuliert [62]. An der Niere führt GH zur Wasserretention. An den  $\beta$ -Zellen des Pankreas stimuliert GH die Insulinsekretion. Auf den Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel wirkt GH antagonistisch zu Insulin [62].

Es hemmt die Glykolyse und die Glukoseaufnahme in die Zellen und stimuliert die Gluconeogenese, wodurch es zum Anstieg des Blutglukosespiegels kommt (diabetogene Wirkung) und die Insulinresistenz zunimmt [60]. Kinder mit einem GH-Mangel neigen somit nachts zu Hypoglykämie. An den Adipozyten führt GH zur Lipolyse und stimuliert die  $\beta$ -Oxidation. Patienten mit einem GH-Mangel neigen somit zu Adipositas. Der Adipogene-Effekt von GH zeigt sich besonders bei Patienten, die an einem isolierten GH-Mangel leiden. Sie weisen hypertrophe Adipozyten und somit vergrößerte Fettdepots auf. Trotz Zunahme der Fettdepots ist die Zahl der Adipozyten bei Patienten mit einem GH-Mangel reduziert [62].

Die Wirkung von GH verändert sich mit dem Alter der Menschen. Postnatal fördert es das Längenwachstum und das Wachstum der Organe und Muskelmasse. Nachdem das Längenwachstum abgeschlossen ist, beeinflusst GH vor allem die Gewebekomöostase und Regenerationsprozesse. Ein postnataler GH-Mangel führt somit zu Zwergwuchs, ein Überschuss zu Gigantismus. Kommt es im Erwachsenenalter, beispielsweise durch eine autonome Funktionsstörung, zur Übersekretion von GH, kommt es zur Erkrankung Akromegalie. Hier werden Fazies, Akren und Zunge überproportional groß [60, 61].

## 1.6 Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs)

„Insulin-like growth-factors“ (IGFs) wurden früher auch als Somatomedine bezeichnet und werden in Form von IGF-I und IGF-II gebildet. IGFs sind strukturell ähnlich dem Insulin. Postnatal spielt beim Menschen im Wesentlichen IGF-I eine Rolle und wird hauptsächlich durch GH reguliert: Ca. 75% des im Blut zirkulierenden IGF-I wird in der Leber GH-abhängig synthetisiert. Im Gegenteil zu Insulin liegt IGF-I im Plasma zu über 99% an IGF-Bindungsproteine gebunden vor. Diese Bindung ermöglicht eine Erhöhung der Plasma-Halbwertszeit von Minuten auf Stunden. Seine Wirkung entfalten IGF-I an IGF-Rezeptoren, die homolog zum Insulin-Rezeptor sind, an welchen somit auch Insulin binden kann. IGF-I vermittelt ähnliche Stoffwechselprozesse wie Insulin. Die Serumwerte in Blut von IGF-I sind stark altersabhängig, über kürzere Zeiträume jedoch

relativ konstant. Im Laufe des Lebens zeigt sich zunächst ein hoher peri-pubertärer Sekretionsgipfel, danach nimmt der IGF-I-Spiegel zunehmend ab. Bis zur Pubertät sind die IGF-I-Konzentrationen tendenziell bei Mädchen niedriger als bei Jungen, nach der Pubertät spielt das Geschlecht eine untergeordnete Rolle.

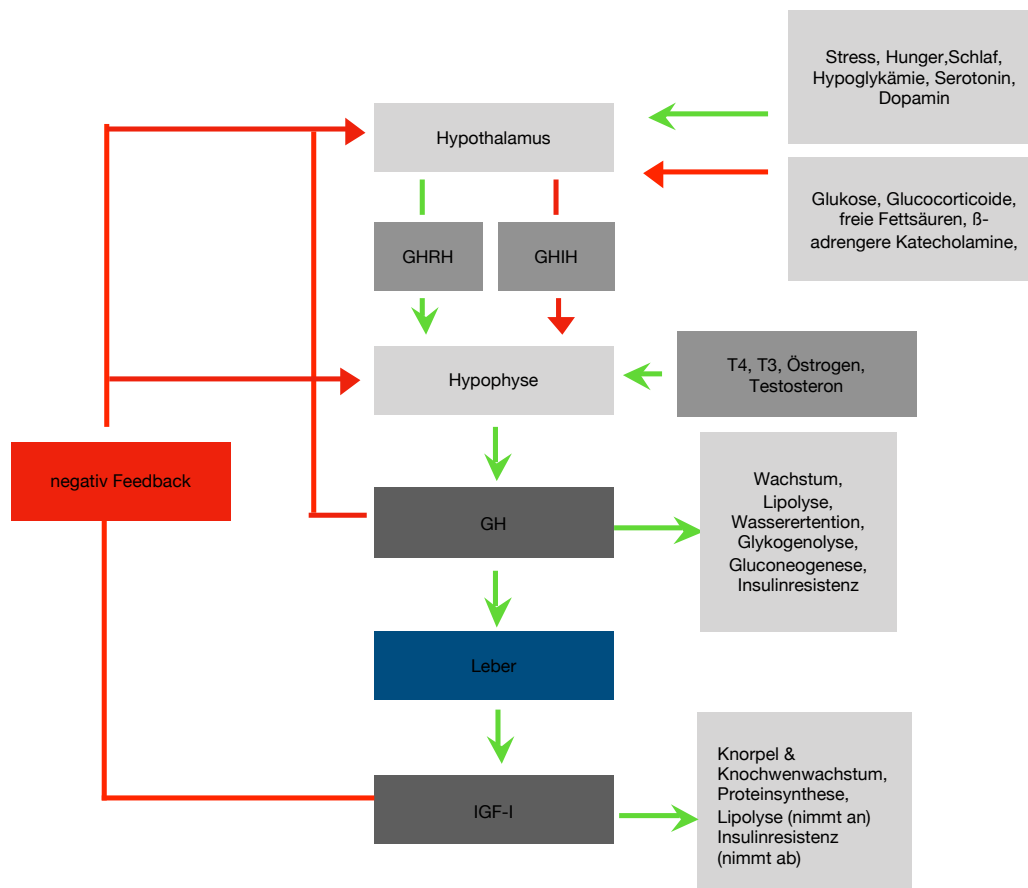


Schaubild 1: Sekretionsmechanismus und periphere Wirkung von GH/IGF-1.

### 1.6.1 Molekulare und metabolische Wirkung von IGFs

IGF-I hat wie GH anabole Wirkungen auf den Organismus. Das Längswachstum der Knochen wird GH-vermittelt stimuliert, indem an der Wachstumszone der Knochen IGF-I gebildet wird, welches seinerseits das Knochenwachstum parakrin fördert. Mit dem Ende der Pubertät sistiert die Wirkung auf das Längswachstum der Knochen. Ab



dem Erwachsenenalter wirken GH und IGF-I somit vor allem positiv auf die Knochendichte. Die durch GH induzierte Zunahme der Muskelmasse wird ebenso überwiegend durch IGF-I vermittelt.

Neben dem Organwachstum ist IGF-I analog zu GH ebenso an der Gewebemöostase und an Regenerationsprozessen beteiligt. Seine meist anabole, metabolische Wirkung entfaltet GH durch IGF-I, vermittelt auf parakrine, autokrine und endokrine Weise.

IGF-I führt so durch die vermehrte Aufnahme von Aminosäuren in die Zellen zur Stimulation der Proteinbiosynthese. Im Fettgewebe unterscheiden sich die Wirkungen von GH, das eindeutig lipolytisch wirkt, und IGF-I, das eher lipogen wirkt [62].

### 1.7 Positionierung der vorgelegten Dissertation als ein Teilprojekt innerhalb von seriellen Experimenten der Arbeitsgruppe

Die Thematik der Doktorarbeit umfasst ein Teilprojekt von seriellen Experimenten, die durch die Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Auf Grund der Komplexität des Versuchsaufbaues und großen Arbeitsaufwandes, wie in „Material und Methoden“ erwähnt, wurde die vorliegende Dissertation im Rahmen von seriellen Experimenten geschrieben. Eine alleinige Durchführung des gesamten Versuches mit den verschiedenen Versuchsgruppen (GHB I und GHB II, männlich, weiblich, gonadal intakt, gonadal nicht intakt), wäre technisch als auch aus Gründen des Arbeitsschutzes (Nachtarbeit und tägliche Pflege und Fütterung der Tiere) alleine über einen Zeitrahmen von 2 Jahren nicht durchführbar gewesen. Auch aus Gründen des Tierschutzes konnten so multiple Organsysteme und Gewebe nur innerhalb eines Teilversuches betrachtet werden.

Die Teilprojekte wurden durch gesamt drei Doktoranden durchgeführt, die eng zusammengearbeitet haben. Alle drei Arbeiten beschäftigen sich mit der geschlechterspezifischen Wirkung von Low-Carb-High-Fat-Diäten auf den Stoffwechsel, die Körperzusammensetzung und die somatotrope Achse, wobei jede Arbeit eigene Schwerpunkte untersucht. Grundlegende Daten, wie Körpergewicht, weight-gain, als auch Ergebnisse zu GH und IGF-I werden in allen Dissertationen betrachtet. Der Fokus meiner Arbeit liegt auf dem Fettstoffwechsel als auch der Leberhistologie.

## 2. Zielsetzung

In unserer Gesellschaft, in der Essen nicht mehr nur zur Deckung des Grundumsatzes dient, sondern viel mehr zum Lifestyle geworden ist, bedarf es einer fundierten wissenschaftlichen Aufklärung über verschiedene Diäten. Besonders mögliche Risiken und gesundheitsschädliche Effekte durch spezielle Diäten sollten genauer beleuchtet werden.

Trotz dem Wunsch, Gewicht abzunehmen, schlanker, gesünder und fitter zu werden, sollte dem Verbraucher auch klar sein, welchen Gesundheitsrisiken er sich durch eine spezielle Diät aussetzt. Diäten, die besonders in Essensblogs, Youtube-Videos, Print Medien oder durch Kochbücher propagiert werden, beleuchten oftmals keine oder nur sehr unzureichend mögliche negative Folgen für den Organismus. Dem Verbraucher ist oftmals nicht klar, welche drastischen Stoffwechselveränderungen eine starke Veränderung der Makronährstoffe mit sich bringt. Bisher gelten Diätempfehlungen uniform für beide Geschlechter. In Anbetracht unterschiedlicher Körperzusammensetzungen zwischen Mann und Frau halten wir diese Empfehlungen für überholt.

Auf Grund dessen bedarf es einer fundierten Forschung und wissenschaftlicher Arbeiten, die den Einfluss verschiedener Diäten auf den Stoffwechsel und die Organsysteme geschlechterspezifisch untersuchen.

In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe am Rattenmodell konnte bereits gezeigt werden, dass ein Mangel an Kohlenhydraten einer Diät zu einer Glukose-Intoleranz und Insulin-Resistenz führt [63]. Ferner konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an Kohlenhydraten in Low-Carb-High-Fat-Diäten zu einer hepatischen GH-Resistenz führen kann. Neben einer GH-Resistenz der Leber konnte zudem eine Beeinträchtigung des zentralen Feedbackmechanismus der GH/IGH-I-Achse durch Low-Carb-High-Fat-Diäten nachgewiesen werden [64].

Ein Unterschied zu den vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe ist, dass neben einer Standard-Diät und zwei Low-Carb-High-Fat-Diäten eine „klassische“ High-Fat-Diät, bei der ein hoher Fettanteil mit einem gleichhohen Anteil an Proteinen und Kohlenhydraten kombiniert wird, hinzugenommen wurde. Diese zusätzlich

hinzugefügte Diät, entspricht am ehesten einer westlichen Fastfood-Diät. Diese Diäten ermöglichen in unseren Versuchen eine genauere Untersuchung der Effekte von fettreichen Diäten mit und ohne Kohlenhydratzusatz. Da alle Tiere isokalorisch gefüttert wurden, konnte sichergestellt werden, dass mögliche Ergebnisse allein auf der Veränderung der Makronährstoffe zurückzuführen sind.

Da die vorangegangenen Versuche an ausschließlich männlichen Tieren durchgeführt wurden, liegen keine Daten zu möglichen geschlechterspezifischen Unterschieden vor.

Die vorliegende Arbeit soll nun mögliche geschlechterspezifische Unterschiede des Stoffwechsels durch verschiedene Makronährstoffzusammensetzung der Diäten untersuchen und hierbei insbesondere Auswirkungen auf das subkutane und hepatische Fett sowie die Adipokine analysieren. Da in unserem Versuchsaufbau männliche und weibliche Tiere vor und nach Kastration untersucht werden, ist es möglich, Einflüsse der Sexualhormone auf den Stoffwechsel, die Körperzusammensetzung, die fettfreie Masse, die Organgewichte und die Leberhistologie unter den verschiedenen Diäten zu untersuchen. Unserer Arbeitsgruppe untersuchte nun erstmalig in einer Reihe von Experimenten die Auswirkungen des sexuellen Dimorphismus auf verschiedene Organsysteme und Gewebe. In der hier vorliegenden Arbeit wird dabei insbesondere untersucht, wie sich eine Kastration bei beiden Geschlechtern auf die Diäteneffekte auf Adipozyten und Fettdepots auswirkt. Ein besonderes Augenmerk wird hierbei auf mögliche Stoffwechselveränderungen der Adipozyten und Veränderungen der Fettdepots als auch histologische Veränderungen der Leber durch verschiedene Diätzusammensetzungen gelegt. Hierzu werden für den Fettstoffwechsel relevante Hormone, wie beispielsweise GH, LDL, Leptin, Insulin und Adiponektin, untersucht.

Neben den Adipozyten werden wir im Rahmen dieser Arbeit Veränderungen der Hepatozyten und des hepatischen Stoffwechsels nach Kastration geschlechterspezifisch begutachten. Hier wird besonders die histologische Zusammensetzung der Leber untersucht, um beispielsweise eine durch Veränderungen der Makronährstoffe induzierte Leberverfettung erkennen zu können. Nachdem wie beschrieben GH und IGF-I wichtige Regulatoren der Lipolyse sind, werden auch mögliche Veränderungen von Komponenten der GH/IGF-Achse im Fettgewebe untersucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchsaufbau

Die erste Versuchsgruppe, welche gonadal intakt und nicht kastriert war, umfasste jeweils 40 männliche und 40 weibliche Ratten, die gewichtsgematched vier verschiedenen Diätgruppen zugeteilt wurden (LC-chow, LC-HF 1, LC-HF 2 und HCHF), (genaue Erläuterung dieser Diät-Gruppen unter: 3.2.1). Zur Abkürzung dieser Versuchsgruppe wurde das Akronym GHB-I eingeführt. Die zweite Versuchsgruppe bestand aus gonadal nicht intakten orchidektomierten und ovariectomierten Ratten und umfasste ebenso 40 männliche und 40 weibliche Ratten. Diese Versuchsgruppe wurde mit dem Akronym GHB-II abgekürzt.

Nach erfolgter Kastration wurden die Tiere nach einer Erholungsphase von einer Woche mit den selben vier Diäten wie die gonadal intakten Tiere (GHB-I) über 30 Tage gefüttert. Nach der jeweiligen 30-tägigen Fütterungsphase wurden die Tiere, wie in 3.4 beschrieben, euthanasiert.

#### 3.2 Tiermodell und Haltungsbedingungen der Versuchsreihe „gonadal intakt/ gonadal nicht intakt“ (GHB-I und GHB-II)

In der für den Versuchsaufbau vorgesehenen Tierhaltung wurde eine konventionelle Tierhaltung im Tierstall der Universität München, Campus Innenstadt, betrieben. Die weiblichen und männlichen Ratten der Zuchtreihe „Wistar“ wurden bei der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bestellt. Zum Zeitpunkt der Ankunft in unserem Labor waren die Tiere zwölf Wochen alt und aus einem spezifisch pathogenfreien Umfeld.

Um eine kontrollierte Nahrungsaufnahme zu gewährleisten, war die Einzelhaltung der Ratten in separaten Käfigen von 37x21x15 cm zwingend erforderlich. Nur so war eine iso-energetische Paarfütterung möglich. Die Käfige wurden jedoch nebeneinander in den Regalen platziert, wodurch sich die Ratten in Geruchs-, Sicht- und Hörweite ihrer Artgenossen befanden. Als Enrichmentmaßnahme war jeder Käfig mit Nagehölzern,

einem Rattentunnel als Versteck, Sägespänen als Einstreu und mit Holzwolle zum Nestbau ausgestattet. Vor Versuchsbeginn wurden die Ratten zunächst 10-14 Tage an die neue Umgebung und Haltebedingungen gewöhnt und in diesem Zeitraum mit einem pelettierten Standardfutter der Firma "Sniff und Wasser" ad libitum gefüttert. Die Haltungsbedingungen im Tierstall wurden über die gesamte Dauer des Versuches konstant gehalten: Die durchschnittliche Temperatur wurde bei  $21,5^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$  gehalten bei einer Luftfeuchtigkeit von  $10\% \pm 15\%$  und 100% Frischluftzufuhr. Die Beleuchtung des Raumes erfolgte durch künstliches Licht, wodurch der Tag/Nacht-Rhythmus der Tiere auf 12/12 Stunden (Hell/Dunkel) reguliert wurde. Diese Unterteilung musste strikt eingehalten werden, da die Schlafdauer der Tiere Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und somit auf die Körpergewichtsveränderung hat [65]. Da Ratten nachtaktive Tiere sind, mussten Arbeiten im Stall während der Wachphase der Tiere (bei Dunkelheit) gemacht werden. Da für die Pfleger der Tiere trotzdem Licht nötig war, wurde der Stall mit Rotlicht (580 nm) ausgeleuchtet. Rotlicht ist auf Grund seiner Wellenlänge über 580 nm für Ratten nicht sichtbar, wodurch ihr Schlaf/Wach-Rhythmus so nicht gestört wurde.

Nach der Eingewöhnungsphase der Tiere wurden diese nach Gewicht in vier gleich verteilte Gruppe aufgeteilt. Dieses „weightmatching“ hat zum Ergebnis, dass alle der vier Gruppen das gleiche Durchschnittsgewicht hatten. Um das Diätmodell zu beginnen, wurden alle Tiere in neue Käfige mit leeren Raufen umgesetzt und über die kommenden 30 Tage täglich isoenergetisch gefüttert.

### 3.3 Paar-Fütterungsmodell und Gewichtskontrolle

Um eine isoklaorische Fütterung der Tiere über die nächsten 30 Tage zu gewährleisten, war eine Paarfütterung unumgänglich. Hierbei diente die Futtermenge der Kontrollgruppe „chow“ (Sartorius Competence CP2201), welcher eine nicht limitierte Futtermenge zur Verfügung stand, als Kontrollgruppe. Die Futterraufen der Kontrollgruppe „chow“ wurden jeden Morgen gewogen und aus der gefressenen Futtermenge die genau gefressene Nahrungsmenge/Kalorienmenge im Mittel bestimmt. Da die Kaloriendichte und genaue Nahrungszusammensetzung jeder Diät bekannt war, konnte nun isokalorisch die Futtermenge für die drei weiteren Experimental-Diät-Gruppen

(LC-HF 1, LC-HF 2, HCHF) bestimmt werden. Die so berechnete Futtermenge wurde in Porzellantassen gefüllt und in die Käfige gestellt.

Wasser stand den Tieren auch während des Experimentes weiterhin unbegrenzt zu Verfügung. Bei der täglichen Fütterung wurde zudem jedes Tier gewogen und das Gewicht notiert. Somit konnte eine genaue Entwicklung des Phänotyps unter den Diäten verfolgt werden. Da die Tiere nicht ruhig auf der Wage blieben, wurde Gebrauch von einer dynamischen Wiegefunktion gemacht. Diese dynamische Wiegefunktion ermittelt aus 20, kurz hintereinander erfassten Gewichten, einen Mittelwert. Auf die 30-tägige Fütterung folgte unmittelbar der Versuchsabschluss mit Euthanasie und Sektion der Tiere zur Probenentnahme. Da pro Tag nur eine Diätgruppe euthansaiert werden konnte, wurde die Futterumstellung zu Beginn pro Diätgruppe mit jeweils einem Tag Abstand begonnen.

Versuchsgruppe gonadal intakt (GHB-I):		Versuchsgruppe gonadal nicht intakt (GHB-II):	
Woche 1	Akklimatisierung der Tiere	Woche 1	Operation
Woche 2	Beginn Fütterung ↓	Woche 2	R e k o n v a l e s z e n z / Akklimatisierung
Woche 3	Fütterung über 4 Wochen	Woche 3	Beginn Fütterung
Woche 4		Woche 4	↓
Woche 5		Woche 5	Fütterung über 4 Wochen
Woche 6	Versuchsabschluss	Woche 6	
		Woche 7	Versuchsabschluss

Tabelle 7: Gegenüberstellung beider Versuchsgruppen gonadal intakt und gonadal nicht intakt. Der Kastrationsversuch mit den gonadal nicht intakten Tieren dauerte auf Grund der aufwendigen Operationen eine Woche länger.

### 3.3.1 Versuchsdiäten

Die verschiedenen experimentellen Diäten wurden von der Firma „Provimi Kliba Nafag“ hergestellt und so konzipiert, dass trotz veränderter Nahrungsbestandteile keine diätischen Mangelerscheinungen auftreten konnten. Einer normalen, alltäglichen Diät gleichkommend und so ideal als Kontrolldiät verwendbar, war die chow-Diät. Zudem wurden als Experimental-Diät-Gruppen zwei weitere Low-Carb-High-Fat-Diäten verwendet. Diese beiden Diäten unterschieden sich lediglich im Fettanteil der Trockenmasse wie folgt: LC-HF 1 (55/30) (55% Fettanteil im Verhältnis zur Trockenmasse) und LC-HF 2 (75/10) (75% Fettanteil im Verhältnis zur Trockenmasse). Die LC-HF 2 (75/10)-Diät wird auf Grund ihres geringen Proteinanteils auch als ketogene Diät bezeichnet, während die LC-HF 1 (55/30) auf Grund ihres höheren Proteinanteils eher einer chow-Diät ähnelt. Des Weiteren wurde eine High-Carb-High-Fat-Diät „HCHF“ gewählt, welche einer in westlichen Industrieländern typischen fettreichen Diät entspricht. Als Proteinquelle der Diäten wurde Casein, als Fettquelle Rindertalg und als Kohlenhydratquelle Stärke verwendet. Die Mikronährstoffe der Diäten, wie Magnesium, Zink, Kalzium und Kupfer, waren in allen Diäten gleichermaßen enthalten und haben nicht wie die Makronährstoffe variiert.

Diät	% Aufteilung der metabolischen Energie der Diäten			Energie in kcal/g
	Fett %	Protein %	Kohlenhydrate %	
chow	16,7	19,2	64,3	3,9
LC-HF1 (55/30)	78,7	19,1	2,2	6,2
LC-HF2 (75/10)	92,8	5,5	1,7	7,2
HCHF	61,9	18,7	19,4	5,4

Tabelle 8: Energiegehalt der verwendeten Versuchsdiäten chow, LC-HF 1 (55/30), LC-HF 2 (75/10), HCHF

### 3.4 Operatives Verfahren der Kastration

In der Versuchsgruppe der gonadal nicht intakten Tiere wurden die männlichen und weiblichen Tiere nach Ankunft im Tierstall ovar- und orchidektomiert. Vor Beginn des Fütterungsversuches konnte die Tiere eine Woche zur Rekonvaleszenz und Akklimatisation nutzen. Zur Inhalationsnarkose wurden zunächst 10ml Isofluran auf Zellstofftücher in eine Glasglocke gegeben, wobei abgewartet werden musste, bis die Flüssigkeit vollständig verdampft war. Danach wurden die Ratten kurz in das Gefäß gesetzt und nach Eintreten der Narkose sofort herausgenommen. Nun konnte bei den narkotisierten Tieren die Injektionsnarkose sicher injiziert werden. Hierfür wurden die Ratten mit dem „Nackengriff“ fixiert, wobei der Kopf nach kranial flektiert wurde. Durch die so erreichte Körperhaltung der Tiere wurden die Bauchorgane aus dem Injektionsgebiet mobilisiert, wodurch eine intraperitoneale Injektion risikoarmer wurde. Daraufhin wurde die Injektionsnarkose, welche gewichtsadaptiert aufgezogen wurde, intraperitoneal in den rechten unteren Quadranten in einem Winkel von ca. 30° injiziert. Bis zum Eintreten des gewünschten Narkosestadiums wurden die Tiere wieder in ihren Käfig gelegt, welcher auf einer Wärmematte stand. Die durch die Wärmematte erfolgte präoperative Aufwärmphase der narkotisierten Tiere half dabei, eine intraoperative Hypothermie zu vermeiden [66]. Solch eine Hypothermie führt zu Komplikationen, wie Wundheilungsstörungen oder kadio-pulmonalen Problemen [67]. Die gewünschte Narkosetiefe, welche einem chirurgischen Toleranz- und Anästhesiestadium IIIa entsprechen sollte, wurde mittels des Zwischenzehenreflexes überprüft. Hierzu wurde an den Hinterbeinen im Zwischenzehenraum ein Schmerzreiz gesetzt. Zuckten die Tier ehierbei noch, war die Narkosetiefe noch nicht erreicht, woraufhin noch etwas gewartet werden oder gegebenenfalls mehr Narkosemix verabreicht werden musste. Nach dem Erreichen der gewünschten Narkosetiefe wurden die Tiere auf eine sterile Unterlage gelegt, welche ebenfalls durch eine darunter liegende Wärmematte gewärmt wurde. Das weitere operative Vorgehen unterschied sich zwischen den jeweiligen Geschlechtern und wird im folgenden Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben. Nach beendeter Operation wurde den Tieren ein Antagonistenmix (Tabelle 9) subkutan injiziert. Bis zum vollständigen Erwachen wurden die Tiere erneut auf der Wärmematte in ihren Käfigen gelagert, um so eine post-operative Hypothermie zu vermeiden.



Narkosemix intraperitoneale Injektion		Antagonistenmix subkutane Injektion	
Medetomidin/ Domitor	0,15mg/kg KG	Atipamezol/ Antisedan	2,5mg/kg KG
Midazolam / Dormicum	2mg/kg KG	Flumazenil/ Anexante	0,5mg/kg KG
Fentanyl	0,005mg/kg KG	Naloxon	1,2mg/kg KG

Tabelle 9: Narkosemix und Antagonistenmix für die Ovar- und Orchidektomie der Männchen und Weibchen

### 3.4.1 Ovariectomie der weiblichen Ratten

Zur Durchführung der Ovariectomie wurden die Tiere in Bauchlage auf eine Wärmematte gelagert. Anschließend wurde das Operationsfeld beidseits lateral an den Flanken mittels einer Rasierklinge von Haaren befreit, gesäubert und desinfiziert. Die sterile Hautdesinfektion wurde mittels einer Kodan-Lösung durchgeführt. Nun wurde ein steriles Lochtuch auf eine Seite aufgeklebt. Der Hautschnitt erfolgte ca. 2 cm lang mittels eines sterilen Einmalskalpells entlang der Flanke. Nach erfolgtem Hautschnitt wurde die Rückenfaszie eröffnet und die Rückenmuskulatur vorsichtig stumpf durchtrennt. Das so sichtbare Peritoneum wurde mittels einer spitzen Schere, ca. 3 mm, eröffnet. Nun wurde mit einem stumpfen Haken unter geringer Sicht nach ventrolateral sondiert, um die Tuba Uterina mit dem damit verbundenen Ovar zu bergen. Die Tuben wurden aus dem Bauchraum luxiert und proximal und distal mit einem Klemmchen abgeklemmt. An jeder der beiden Klemmen wurde mittels eines Vicryl 5-0 Fadens (resorbierbares Nahtmaterial) eine Ligatur der Tuba uteri durchgeführt. Durch die Ligatur wurde so die arterielle und venöse Versorgung des Ovars unterbunden, um einer Blutung beim Durchtrennen entgegenzuwirken. Nun konnte das Ovar abgesetzt werden. Der verbliebende Tubenstumpf wurde in den Bauchraum reponiert. Der Wundverschluss erfolgte mehrschichtig. Zuerst wurde das Peritoneum und dann die Muskulatur mit Faszie mittels eines Vicryl 5-0 Faden (resorbierbares Nahtmaterial) in Einzelknopftechnik verschlossen. Danach wurde das subkutane Fettgewebe erneut mit Vicryl 5-0 genäht. Zuletzt wurde die Hautnaht ebenso in Einzelknopftechnik mit Prolenen 5-0 (nicht resorbierbares Nahtmaterial) verschlossen. Um eine sekundäre

Nahtinsuffizienz zu vermeiden, wurde die Wunde zusätzlich mit einem Hautkleber verschlossen. Nachdem die zuerst operierte Seite vollständig verschlossen war, wurde die kontralaterale Seite analog operiert.

#### 3.4.2 Orchidektomie der männlichen Ratten

Die männlichen Ratten wurden in Rückenlagerung auf den Wärmematten positioniert und die Hoden inklusive des umliegenden Areals mit Kodan-Spray desinfiziert und steril abgedeckt. Nach erfolgter Vorbereitung wurde der erste Hoden am caudalen Ende ca. 1 cm lang mit einem Einmalskalpell inzidiert. Nach dem vollständigen Durchtrennen der Haut und Subkutis wurde das Periorchium mit einer feinen, anatomischen Pinzette nach angehoben und inzidiert. Das so eröffnete Periorchium wurde mit einem Haltefaden (Prolene 5-0) fadenfixiert, um es später einfacher zunähen zu können. Daraufhin wurde mit leichtem Druck das Scrotum von kranial aus dem Scrotalfach mobilisiert. Nun wurde mit einer doppelten Fadenligatur (Prolene 5-0) der ductus deferens proximal und distal ligiert und die Hoden abgesetzt. Blutstillung war hier keine nötig, da die Ligatur die Gefäße bereits verschlossen hat. Nun folgte die Naht des Periorchiums mit resorbierbaren Fäden (Vicryl 5-0) in Einzelknopfnahntechnik. Danach wurde die Haut mit Prolene 5-0 ebenso in Einzelknopftechnik verschlossen und zusätzlich zur Nahtsicherung mit Hautkleber (Dermabond) versiegelt. Nachdem die zuerst operierte Seite vollständig wieder verschlossen war, wurde die kontralaterale Seite analog operiert.

#### 3.4.3 Postoperative Antibiotikaphylaxe und Schmerzmedikation

Die postoperative Antibiotikaphylaxe und Schmerzmedikation wurde gewichtsadaptiert subkutan in den Nacken für sieben Tage jeweils morgens und abends verabreicht. Die erste Gabe erfolgte unverzüglich postoperativ. Die Medikamente wurden nach den gängigen Empfehlungen der GV-Solas verabreicht und gewichtsadaptiert dosiert. Die operierten Tiere wurden nach einer einwöchigen Rehabilitationsphase gewichtsgemacht der Diätgruppe zugeteilt. In der folgenden Tabelle 10 werden die einzelnen Medikamente und ihre jeweilige Dosierung aufgeführt.

Medikament	Dosierung
Nacl Depot (Braun, Kochsalz)	2ml
Amoxiclavulansäure	0,2mg/kg KG
Gentamycin	0,1mg/kg KG
Caprofen	0,03mg/kg KG

Tabelle 10: postoperative Antibiotika Prophylaxe mg/kg KG

### 3.5 Versuchsabschluss

Nach der 30-tägigen Fütterungsphase der Ratten folgte der Versuchsabschluss mittels Euthanasie der Tiere. Um am Tag der Schlachtung eine nüchtern Serum-Blutabnahme zu gewährleisten, wurde den Tieren am Morgen ihr Futter entfernt. Um sicher zu gehen, dass sie kein Futter im Einstreu übrig hatten, wurden sie zudem in neue Käfige umgesetzt. Da die Fütterung der Tiere mit jeweils einem Tag Abstand begonnen wurde, konnte pro Nacht eine ganze Diätgruppe euthanasiert werden, ohne die Diätdauer von 30 Tagen zu beeinflussen.

Die Inhalationsanästhesie erfolgte, wie schon bei der Kastration, mit einer mit Isofluran gefüllten Glasglocke. Nachdem die Tiere in die Glasglocke gelegt wurden und narkotisiert waren, wurde ihnen ein Narkosemix aus Medetomedin (= Domitor), Midazolam (=Dormicum) und Fentanyl mit einer 23G-Kanüle intraperitoneal in den rechten unteren Quadranten gespritzt. (GV-Solas Standard [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/ana\\_schmerzen.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/ana_schmerzen.pdf)). Die genaue Dosierung des Narkosemixes für den Versuchsabschluss ist in Tabelle 11 dargestellt.

Medikament	Dosierung zur intraperitonealen Injektion
Midazolam	2,0 mg/kg i.p.
Fentanyl	0,005 mg/kg i.p.
Medetomedin	0,15 mg/kg i.p.

Tabelle 11: Medikamente und Dosierung des Narkosemixes für den Versuchsabschluss. Angaben in mg/kg. Injektion intraperitoneal (i.p.)

Um pharmako-kinetische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Narkotika zu vermeiden, durfte der Narkosemix erst zur Einleitung der Narkose gemischt werden. Nach vollständiger Anästhesie wurden die Tiere in Rückenlage durch eine Längslaparotomie auf der gesamten Bauchlänge, ca. 10 cm lang, eröffnet. Nach Aufsuchen der vena cava inferior wurde diese mit einer Kanüle punktiert und die Ratte mit einer 20ml-Spritze ausgeblutet. Das abgezogene Blut wurde in den den jeweiligen Tieren zugeordnete Serum-Monovetten gefüllt und bis zur Zentrifugation im Kühlschrank bei 8°C gelagert. Nach der vollständigen Gerinnung der Blutprobe wurde sie zentrifugiert und das sich separierte Plasma in neue Gefäße abpipettieren und bei -20°C eingefroren. Es wurde sich bewusst gegen eine sonst übliche Dekapitation entschieden, um einer Einblutung in die zu entnehmenden Organe zu vermeiden. Dem ausgebluteten Tier wurden nun alle Organe entnommen, gewogen und schnellstmöglich auf Trockeneis gelagert, um einem Zellerfall entgegenzuwirken. Nach der Entnahme aller Organe wurden die verschiedenen Fett-Depots (subkutan, visceral, braunes Fett) der Tiere entnommen, gewogen und ebenfalls auf Trockeneis gelagert.

Um die entnommenen Fettmengen vergleichen zu können, haben wir das subkutane Fettgewebe auf Höhe der Leiste entnommen. Das sich hier befindende subkutane Fettgewebe ist ein uniformes und genau umschriebenes Fettdepot. Zudem liefert es genügend Masse, um es mehrfach analysieren zu können. Zuletzt wurde den Karkassen das Fell abgezogen und erneut gewogen, um so die „Fettfreie Masse“ der Tiere zu bestimmen. Alle entnommenen Gewebeproben wurden in extra Gefäßen, tierspezifisch zugeordnet und bei -80°C gelagert.

### 3.6 Tierschutz

Der gesamte Versuchsaufbau mit den daraus resultierenden Experimenten wurden nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt und durch die Regierung Oberbayern genehmigt. Die Genehmigung der Versuche ist unter folgendem Aktenzeichen dokumentiert: Az. 55.2-1-54-2531-47-05

### 3.7 Histologische Aufarbeitung der Leber

#### 3.7.1 Schneiden der Präparate

Um die Leberproben histologisch verarbeiten zu können, wurden diese auf Trockeneis gelagert und einem Mikrotom SuperFrost (Firma Menzel) auf eine Schnittdicke von 10µm geschnitten. Die so erhaltenen histologischen Schnitte wurden direkt auf einen Objektträger aufgezogen und erneut bei -20 Grad bis zur Färbung gelagert. Pro Tier wurden jeweils fünf Schnitte angefertigt.

#### 3.7.2 Fettfärbung Oil red O

Um die Leberschnitte zu färben, wurden vier verschiedene Lösungsansätze hergestellt:

60% Triethylphosphat (TEP)	Oil red O-Stammlösung (stock solution) 0,48%	Oil red O-Arbeitslösung (working solution) 0,28%	Hämatoxinlösung 1:3 verdünnt
200ml TEP (Sigma)	1,6g Oil Red O Pulver (Sigma)	330ml Oil red O-Stock Stammlösung	100ml kommerzielle Stammlösung Mayers Hämalan (Merck)
130ml Aqua dest. (Sigma)	330ml 60% TEP	225 ml Aqua dest. (Sigma)	150ml Aqua dest. (Sigma)
	bei 60°C auflösen des Pulvers	vor Gebrauch filtrieren	vor Gebrauch filtrieren

Tabelle 12: Herstellung der einzelnen Lösungsansätze zur Oil Red- Fettfärbung der Leberpräparate

Alle Schritte der histologischen Färbung fanden bei Raumtemperatur unter einem Abzug statt. Um alle Schritte der Färbung machen zu können, wurden die einzelnen Objektträger auf Metallständer positioniert und mit diesen in die einzelnen Lösungsansätze getaucht. So wurde eine gleichmäßige Benetzung und Färbung der Präparate garantiert.

Zuerst wurden die Schnitte mit 4% Formaldehydlösung durch zehnmaliges Eintauchen fixiert. Dann dreimal in jeweils frisches destilliertes Wasser (Aqua dest.) für jeweils 30 Sekunden getaucht. Die so gespülten Schnitte wurden nun für eine Stunde in Oil red O-Arbeitslösung getaucht. Nach der abgelaufenen Zeit wurden die Schnitte erneut in Gefäße mit destilliertem Wasser (Aqua dest) für jeweils 30 Sekunden getaucht, um den Überschuss der Red-Oil-Lösung abzuspielen. Danach wurden die Präparate fünfmal in Hämatoxylin-Lösung eingetaucht. Um das überschüssige Hämatoxylin zu entfernen, wurden die Objektträger erneut in Aqua dest. für 30 Sekunden getaucht. Zuletzt wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser „gebläut“. Nach beendeter Färbung wurde auf die Schnitte ein Tropfen eines Eindeckmediums (auf Wasserbasis) gegeben und mit einem dünnen Glas bedeckt. Die so entstandenen fertigen histologischen Schnitte der Leber konnten so bis zur weiteren Auswertung bei RT gelagert werden.

### 3.7.3 Auswertung der histologischen Schnitte

Die zuvor angefertigten histologischen Präparate wurden nun unter einer 400-fachen Vergrößerung mikroskopiert (Leica DMRB). Pro Präparat wurde ein Bildausschnitt mit einer Kamera (Leica DC DMC 2900) fotografiert. Die Auswertung dieser fotografierten histologischen Präparate wurde mit dem Computerprogramm „Image J“ vorgenommen. Das Programm „Image J“ ermöglicht es, die durch die Red-Oil-Färbung rot angefärbten Fettderivate zu erkennen und deren Quantität zu messen. Die detektierten „roten Flächen“ konnten so in Relation zur Fläche des gesamten Bildausschnittes gesetzt werden, wodurch man den Fettanteil durch Fläche in % erhielt. Aus den so erhaltenen Werten konnte man pro Tier einen Mittelwert berechnen. Die Mittelwerte der Tiere wurden in den Diätgruppe mit dem Programm Graph Pad Prism 5 als Säulendiagramme zur Veranschaulichung dargestellt. Die statistische Auswertung wurde analog zu der Beschreibung in 3.8.8 vorgenommen.

### 3.8. Molekularbiologische Methoden

#### 3.8.1 Grundlage der RNA-Gewinnung

Um aus festen Gewebeproben RNA zu isolieren, musste zunächst das Gewebe, welches bisher bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefroren war, fein homogenisiert werden. Hierzu wurde das subkutane Fett in gefrorenem Zustand mit Hilfe eines Mörsers pulverisiert. Der Behälter, in dem die Proben mit dem Metallmörser gestampft wurden, war mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Um Verunreinigungen der Proben zu vermeiden, wurde nach jeder Gewebeprobe Mörser und Schüssel mit 90% Ethanol gewaschen. Nach der Pulverisierung wurde das gewonnene Material in sterilisierte Eppendorfgläser überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Da einzelsträngige RNA sehr instabil ist und einfach durch ubiquitär vorkommende RNAsen zerschnitten werden kann, musste bei allen Arbeitsschritten besonders sauber gearbeitet werden. Die Autoklavierung der verwendeten Gefäße führt zu keiner vollständigen Eradikation der RNAsen, da sich diese im Verlauf wieder renaturieren können [68]. Einzig die Kühlung der Proben, stetige Lagerung auf Eis außerhalb des Gefrierschranks, Autoklavierung der verwendeten Trägergefäße und Pipettenspitzen, das Tragen von Handschuhen und das Verwenden von RNase-Inhibitoren setzt die Aktivität der RNAsen herab und ermöglichten so ein möglichst präzise Arbeiten.

#### 3.8.2. RNA-Isolation

Die Isolation der RNA wurde mit dem RNeasy-Tissue-Mini-Kit der Firma „Qiagen“ unter dem Abzug durchgeführt. Da das verwendete Phenol stark toxisch ist, mussten zudem permanent Nitril-Handschuhe getragen werden. Das fertige Versuchskit beinhaltet bereits alle nötigen Reagenzien, die zum Teil, wie im Folgenden angegeben, verdünnt wurden.

Als Erstes wurden die zuvor pulverisierten Proben in den jeweiligen Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert und mit jeweils 1ml vorgekühltem Qiazol-Reagenz und einer Metallkugel (Beads) befüllt. Diese so vermischten Proben wurden nun, um eine vollständige Zerkleinerung der Zellen zu gewährleisten, in den Tissue Lyser gestellt. Der Tissue Lyser ist ein Gerät, welches die Proben durch die zugefügten Metallkugeln

mit einer Schüttelfrequenz von 35Hz über 90 Sekunden zerkleinert. Nach der Zerkleinerung musste das so entstandene Homogenat für fünf Minuten auf Eis inkubieren. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße zusätzlich mit 200µl Chloroform befüllt und für 15 Sekunden manuell geschüttelt. Nach dem Schütteln mussten die Proben erneut bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubieren. Als nächstes wurden die Proben in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (Zentrifuge 5415R, Eppendorf) für 15 Minuten mit 12000rpm zentrifugiert. Danach wurde die oberste wässrige Phase, welche die RNA enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß abpipettiert (350µl) und mit jeweils 350µl 70% Ethanol verdünnt und geschüttelt. Nun wurden die Säulchen aus dem Kit genommen und auf die Membran der Säulchen 700µl der soeben vermischten Lösung pipettiert. Die so befüllten Säulchen wurden anschließend bei Raumtemperatur für 15 Sekunden mit 10000rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der entstandene Überstand abpipettiert und die Säulchen mit 700µl RW1-Puffer befüllt. Danach wurden diese erneut für 15 Sekunden bei RT mit 10000rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde erneut abpipettiert und die Säulchen mit 500µl RPE-Puffer befüllt. Nach der erneuten Befüllung der Säulchen wurden sie für 15 Sekunden bei RT und mit 10000rpm zentrifugiert. Dieser letzte Schritt der Zentrifugation wurde anschließend wiederholt. Danach wurde in die Säulchen 500µl RPE-Puffer gegeben und die Mischung mit 10000rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Um die nun auf der Membran der Säulchen befindliche RNA zu gewinnen, wurden die Säulchen in ein neues Trägergefäß gestellt und für eine Minute mit 12000rpm „trocken“ zentrifugiert. Zuletzt wurden auf die Säulchen 30µl RNase freies Wasser gegeben, was für eine Minute inkubiert und dann ein letztes Mal für eine Minute mit 10000rpm zentrifugiert wurde. Der sich nun im Eppendorf-Gefäß befindliche Rest war die gewonnene RNA. Um die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA zu quantifizieren, wurden die gewonnenen Proben auf Eis gekühlt und mit dem Nano Drop Spectrophotometer gemessen. Hierzu musste das Gerät zunächst mit 1µl sterilem Wasser geeicht werden. Dann wurden jeweils 1,5µl jeder einzelnen RNA-Probe auf das Spectrophotometer aufgetragen und gemessen. Die gemessene RNA-Konzentration wurde in ng/µl angegeben. Neben der Menge an RNA konnte auch deren Reinheit bestimmt werden, da das Gerät Verschmutzung durch andere Proteine erkennen kann. Die Reinheit wurde durch den Quotienten der Konzentration bei 280nm Wellenlänge und 260nm Wellenlänge angegeben. Das Reinheitsoptimum lag bei



0,8-1,2. Höhere Werte sprachen für eine Kontamination der Probe durch DNA, kleinere Werte für eine Kontamination durch Proteine.

### 3.8.3 Reinheitsprüfung der RNA mittels Agarosegelelektrophorese

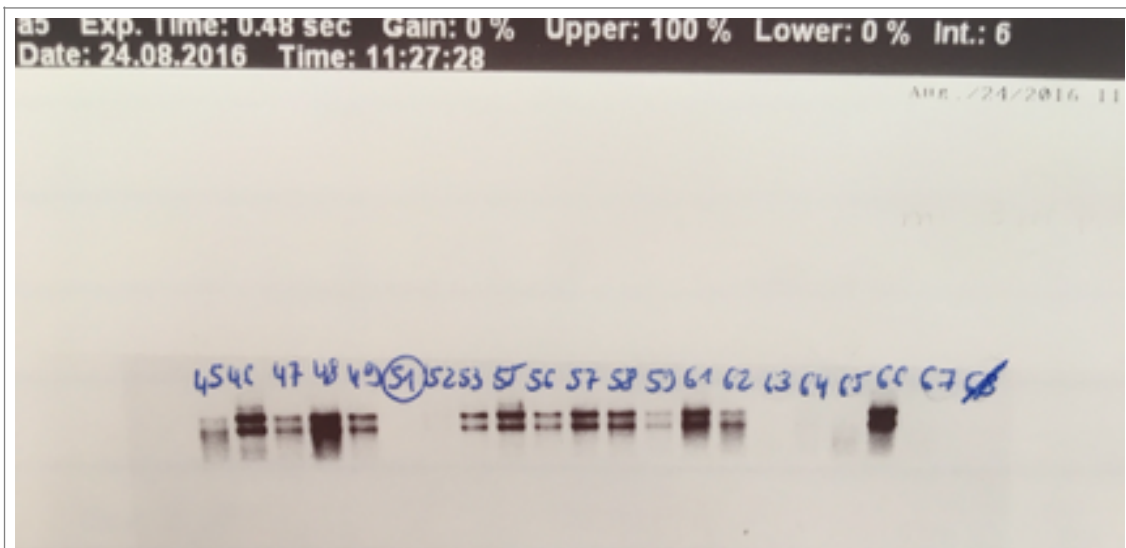


Abbildung 1 Photographie der Gelelektrophorese: elektrophoretisch aufgetrennte RNA- Proben: für ribosomale RNA typische Doppelbanden als Zeichen der molekularen Integrität

Um die Degradation der gewonnenen RNA-Proben auszuschließen, wurden diese im nächsten Schritt auf ein Agarosegel aufgetragen. Das hierfür benötigte Gel wurde wie folgt hergestellt: 100ml TBE-Puffer und ein Gramm der Agarose wurden in einem Glaszylinder gemischt. Um die vollständige Dilution des Agarosepulvers zu gewährleisten, wurde der Zylinder für zwei Minuten in der Mikrowelle erhitzt und anschließend 20 Minuten mit einem Magnetrührer durchmischt. Daraufhin wurden pro 100ml der gewonnenen Flüssigkeit 4µl des Phenanthridin-Farbstoffes Ethidiumbromid hinzugefügt und erneut vermischt. Da Ethidiumbromid hoch mutagen ist, mussten alle Schritte stets mit Nitril-Handschuhen und unter dem Abzug gemacht werden [69]. Die Flüssigkeit wurde nun in eine Elektrophorese Form aus Plastik gegossen. Auf der Seite der Anode wurde zudem ein Kamm aus Plastik eingesetzt, wodurch die Kammern für die einzelnen RNA Proben geformt wurden. Nach vollständigem Aushärten des Gels wurden 2µl der RNA mit 5µl sterilem Wasser und 3µl Loading Dye vermischt. Die Loading Dye wurde dem Gemisch beigefügt, um das Einpipettieren in das Gel zu vereinfachen, da es so optisch sichtbar dunkelblau angefärbt wurde. Das ausgehärtete

Gel wurde nun aus der Gussform herausgenommen und in einen Elektrophorese-Block gestellt. Diese Elektrophoreseform wurde nun mit TEP-Puffer 1 cm hoch bedeckt. Anschließend wurden die einzelnen Kammern mit je 10µl der jeweiligen vorher präparierten RNA Proben befüllt. Danach konnte die Elektrophorese bei 90V über 25 Minuten gestartet werden. Die nun vollständig aufgetrennte RNA konnte mit einer UV-Kamera fotografiert und dokumentiert werden (siehe Abbildung 1). Idealerweise stellen sich hierbei jeweils zwei gleiche Doppelbanden dar. Dies spricht für die Integrität der ribosomalen RNA.

#### 3.8.4 Transkription RNA in cDNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase

Die durch die Isolation gewonnene RNA wurde nun in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben. Dieses wurde durch die Anwendung einer reversen Transkriptase möglich. Eine reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche sich an ein RNA-Fragment anlagert und dieses Stück in cDNA translatiert. Dieser gesamte Ablauf wird durch einen Thermocycler vollautomatisch in zwei Abschnitten durchgeführt. Die Schritte waren wie folgt: Zunächst kam es zur Denaturierung der RNA, anschließend zur Primerhybridisierung und zuletzt zur Elongation.

Die zuvor gewonnene RNA wurde auf Eis aufgetaut. In vorgefertigte 0,25ml-Eppendorfgefäße wurde ein Mix aus Aqua dest., Oligonucleotid (dOligo) und der aufgetauten RNA für jede Probe in jeweils zwei Eppendorfgefäße pro Probe einpipettiert und mit einem +/- beschriftet (Tabelle 13). Die Menge des jeweiligen Mixes wurde auf Basis der Konzentration der RNA berechnet. Nun wurden die Eppendorfgefäße für zwei Sekunden abzentrifugiert und danach in den Cyler gestellt. Während die RNA mit dem dazugegebenen Mix den ersten Durchgang im Cyler machte, wurde der Mastermix, wie in der nächsten Tabelle beschrieben, angemischt (die angegebenen Mengen mussten mit der Zahl der Proben X multipliziert werden).

Nachdem der erste Durchgang des Cyclers abgeschlossen war, wurde den Proben die jeweils spezifische Menge des Mastermixes, jeweils in die + und - Gefäße mit dem jeweiligen Mastermix (+&-) beigefügt. Der Unterschied der beiden + und - Mixe bestand darin, dass in dem - Ansatz die Polymerase fehlte. So wurde nur in der RNA-Probe, die mit dem + Mastermix vermischt wurde, die RNA in cDNA umgeschrieben. Die nun fertig befüllten Eppendorfgefäße wurden erneut zentrifugiert und in den Cyler

gestellt. Nach Abschluss des letzten Cycler-Durchgangs wurde zu den Proben jeweils 225µl destilliertes Wasser hinzugefügt und somit die gewonnene cDNA(25µl) 1:10 verdünnt und wieder bei -20°C eingefroren.

Mastermix + [(µl) für eine Probe (X=1)]		Mastermix - [(µl) für eine Probe (X=1)]	
RNAsin	1	RNAsin	1
dNTPs	1,25	dNTPs	1,25
Puffer	5	Puffer	5
RNase free water	3,75	RNase free water	3,75
M-MLV (reverse Polymerase)	1	-	-

Tabelle 13: Mastermix-Kalkulation für das Umschreiben der RNA in cDNA für jeweils eine Probe RNA.

### 3.8.5 Primer Design

Um die Arbeitshypothese zu untersuchen, mussten zunächst für die Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) passende Protein-Primer hergestellt werden. Diese spezifisch designten Primer ermöglichen eine fehlerfreie Amplifikation der gesuchten Gensequenz. Als Informationsquelle dienten die im Anhang unter Primer Design aufgelisteten Internetseiten, auf denen man Angaben zur Gensequenz der Primerspezifisch nachschauen konnte. Ein so speziell zugeschnittener Primer war hoch spezifisch für eine genau bestimmte Gensequenz der cDNA, was das Annealing bei der RT-PCR hoch wahrscheinlich machte. Annealing beschreibt hier die Anlagerung des Primers an die RNA. Wichtige Kriterien für die Güte eines Primers sind, dass er zwei Exons, mit einem sich dazwischen befindlichen Intron aufweist und die Gesamtlänge sich auf 18-30 Basenpaare beläuft. Um sicher auszuschließen, dass die vorgeschlagenen Sequenz keine Sekundärstrukturen ausbildet, konnte man diese auf folgender Webseite nachprüfen: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-folding-form>. War die Gensequenz passend, konnte der Primer bei der Firma „Primer3 System“, bestellt werden.

### 3.8.6 Housekeeping

Um die durch die RT-PCR erhaltenen Werte der Genexpression der einzelnen Proteine vergleichbar zu machen, benötigt man ein Referenz-Gen. Dieses Referenz-Gen wird nicht reguliert und somit immer gleichsam exprimiert. Für die Genexpression des subkutanen Fettgewebes wurde das Gen  $\beta$ -Aktin als Housekeeping-Gen verwendet.

### 3.8.7 Real-Time-PCR (RT-PCR)

Die im vorherigen Schritt gewonnene cDNA wurde nun im letzten Schritt primer-spezifisch amplifiziert und die gewonnenen Produkte in Echtzeit erfasst. Dieser Schritt wird in der Polymerase-Ketten-Reaktion oder Real-Time-PCR zusammengefasst (RT-PCR). Um die verschiedenen amplifizierten DNA-Fragmente für das Photometer aufzubereiten, wurden diese mit einem fluoreszierenden Farbstoff (EvaGreen) vermischt. Hierfür wurden pro vorgefertigter PCR-Platte in jede Kammer 6  $\mu$ l EvaGreen gegeben. Zudem wurden 0,5  $\mu$ l reverse Primer, 0,5  $\mu$ l forward Primer des jeweils gesuchten Primers und 3  $\mu$ l Aqua dest. auf die Platten pipettiert. Zu diesem Mix wurden nun jeweils 2  $\mu$ l der zuvor generierten + und - cDNA-Proben gegeben. Die so fertig pipettierten Platten wurden nun mit einer Plastikfolie versiegelt, abzentrifugiert und in das Gerät MX-Pro zur RT-PCR gestellt. Dieser Schritt der quantifizierten RT-PCR konnte beliebig oft für diverse Primer durchgeführt werden. Die so erhaltenen Rohdaten wurden nun in einer Exceltabelle mit der Effizienz jedes Primers, der mRNA Quantität, dem Housekeeping-Gen (HKG), der jeweiligen Probe und der Effizienz des HKGs in einer Tabelle verrechnet. Die hierfür verwendete Formel lautet:

$$\frac{(1 + \text{Primereffizienz HKG})^{\text{Quantität HKG mRNA}}}{(1 + \text{Primereffizienz Experimentalgen})^{\text{Quantität Experimentalgen mRNA}}}$$

### 3.8.8 Statistische Auswertung

Die in allen Methoden erhaltenen Daten wurden in Prism übertragen und als Säulendiagramme dargestellt. Um nun statistisch Ausreißer zu finden, wurde der folgende Link verwendet: [www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1.cfm](http://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1.cfm) Mit dem Programm hinter dem Link wurden die statistischen Ausreißer mit der Annahme

Alpha=0,5 berechnet und ausgeschlossen. Anschließend wurde die Normalverteilung der Männchen und Weibchen der Versuchsgruppen gonadal intakt (GHB I) & gonadal nicht intakt (GHB II) jeweils separat geprüft. Hierfür wurde im Graph-Pad-Programm der statistische Kolmogorov-Smirnov-Test, der D'Agostino & Pearson-Test und der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Von einer Normalverteilung konnte man dann ausgehen, sobald einer der Tests bei allen Diätgruppen eines Geschlechts die Normalverteilung bestätigte. Wenn die Werte normal verteilt waren, wurden der Bartlett-Test und der Dunnett's-Test angewandt, um unter den Diätgruppen eine Gleichheit der Varianz und statistisch signifikante Unterschiede zu überprüfen. Waren die Werte nicht normal verteilt, wurden sie mit Dunn's-Test und Kruskal-Wallis-Test geprüft. Konnten nun mittels dieser Tests Signifikanzen zwischen den einzelnen Diätgruppen erkannt werden, so wurden diese in den Diagrammen mit einem Sternchen \* markiert Hierbei variierte die Anzahl der Sternchen abhängig von dem errechneten p Wert, wie in Tabelle 14 zu sehen ist.

*	$p = \leq 0,05 = \text{signifikant}$
**	$p = \leq 0,01 = \text{sehr signifikant}$
***	$p = \leq 0,001 = \text{hoch signifikant}$

Tabelle 14: Statistische Auswertung der Signifikanzen

### 3.9 Hormonmessungen

#### 3.9.1. ELISA-Leptin Serum

Zur Quantifizierung des Leptins in den Serumproben wurde ein Enzymimmunoassay verwendet. Hierzu wurden Leptinstandards, Kontrollen und die Serumproben der Tiere in die einzelnen Vertiefungen (Wells) einer Mikrotiterplatte pipettiert, die bereits mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen Ratten-Leptin beschichtet waren.

Daraufhin wurde die Well-Platte über Nacht bei 4°C inkubiert und nach 12 h gewaschen. Dies wurde mit einem Mikrotiterplatten-Washer der Firma „Thermo Fisher“ durchgeführt. Als nächstes wurde der HRP-konjugierte Detektionsantikörper (Anti-Ratten-Leptin) (100 µL) der Platte hinzugefügt, welcher sich an die am Beschichtungsantikörper gebundenen Leptinmoleküle anlagerte. Nach der Zugabe des Konjugats wurde die Platte erneut bei RT für eine Stunde inkubiert und danach erneut gewaschen. Als nächstes wurden jedem Well 100 µL Substratlösung zugegeben und nochmals 30 Minuten inkubiert. Die Substratlösung reagiert nun mit dem Enzy-Antikörper-Target-Komplex, wodurch es zu einem Farbumschlag und somit einem messbaren Signal kommt. Als letzter Schritt wurden je 100µL Stop-Lösung hineinpipettiert und die Farbintensität in jedem Well photometrisch, bei Wellenlängen von 450nm und 630nm gemessen, quantifiziert. Die gemessene Extinktion ist proportional zur Leptinkonzentration in der Probe und kann durch Vergleich mit der Extinktion der auf derselben Platte gemessenen Leptin-Standards des Hersteller quantifiziert werden.

### 3.9.2 ELISA-Insulin Serum

Zur Quantifizierung des Insulins aus den Serum-Proben wurde analog zur Bestimmung des Leptin ein photometrischer Assay verwendet. Hierzu wurden Wells verwendet, die bereits mit einem speziell markierten Insulin-monoklonalen Ratten-Antikörper beschichtet waren. Zunächst wurde der Well-Platte ein Standard Lysat 95µL hinzugefügt, welches sich an die Antikörper gebunden hat. Nun wurden die jeweiligen Serumproben der Platte zugegeben, welche sich an die Lysat-Antikörper-Komplexe gebunden haben. Daraufhin wurde die Well-Platte über Nacht bei 4°C inkubiert und nach 12 h gewaschen. Als nächstes wurden HRP-konjugierte Anti-Ratten-Antikörper (100 µL) beigefügt, welche sich an die Serum-Lysat-Antikörper-Komplexe anlagerten. Nach der Beigabe des Konjugats wurde die Platte erneut bei RT für eine Stunde inkubiert und danach erneut gewaschen. Als nächstes wurde dem Well 100 µL Substratlösung beigefügt, welche 30 min inkubierte. Die Substratlösung führte durch einen Reaktion mit dem Enzym-Antikörper-Target-Komplex zu einem messbaren Farbumschlag. Als letzter Schritt wurde den Wells 100µL Stoplösung hinzugefügt. Diese so geschaffenen Komplexe konnten nun photometrisch bei einer Wellenlänge von

450nm/630nm gemessen werden. Die so gemessene Extinktion konnte nun mit einem Insulinstandard des Herstellers verglichen und statistisch ausgewertet werden.

### 3.9.3 ELISA-IGF-I Serum

Zur Messung von IGF-I im Serum wurde ein Enzymimmunoassay verwendet (Rat IGF-I ELISA Kit Nr: ERIGFI Thermo Scientific). Die Messung wurde durch technische Assistentinnen des endokrinologischen Labors der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des LMU-Klinikums nach Kit-Anleitung durchgeführt.

### 3.9.4 ELISA-GH Serum

Zur Messung des Growth Hormons (GH) im Serum wurde ebenfalls ein Enzym-Immunoassay verwendet (Rat Growth Hormone ELISA, Kit KRC5311, Thermo Scientific). Die Messung wurde durch technische Assistentinnen des Endokrinologischen Labors der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des LMU-Klinikums nach Kit-Anleitung durchgeführt.

### 3.9.5 GH Bestimmung /Serienblutabnahme

Da bei Ratten ebenso wie bei Menschen die GH-Sekretion pulsatil erfolgt, wurde die GH-Sekretion mit seriellen Blutentnahmen über einen längeren Zeitraum bestimmt [70, 71]. Somit war es möglich, ein GH-Sekretions-Profil der Ratten unter den verschiedenen Diäten zu erstellen. Eine Woche vor dem Versuchsabschluss wurde mit den Serienblutabnahmen begonnen.

Hierfür wurden die Ratten am Abend vor der Blutabnahme in neue Käfige ohne Futter umgesetzt. Wasser blieb ihnen weiterhin ad libitum zur Verfügung. Hierdurch soll verhindert werden, dass die GH-Konzentrationen durch direkt vor der Blutabnahme aufgenommene Nahrung beeinflusst wird. Am Tag der Blutabnahme wurden die Tiere in der Frühe nicht mehr gefüttert. Die Blutabnahmen wurden dann ab 8:00 Uhr morgens, zwei Stunden nach Beginn der Dunkel-Phase (Wach-Phase der Tiere), zehn Mal alle 30 Minuten durchgeführt. Hierfür wurden die Rattenschwänze kupiert und das Blut aus der Schwanzvene abgenommen. Die pro Blutabnahme gewonnenen Proben beliefen

sich jeweils auf ca. 140 $\mu$ l. Die Proben wurden zuerst bei RT geronnen, dann abzentrifugiert und das Serum bei -20 Grad Celsius eingefroren. Die GH-Bestimmung erfolgte mittels eines photometrischen Assays der Firma Merck/Millipore ERZMGH-45BK und wurde ebenfalls durch das Personal des Labors der Medizinischen Klinik und Poliklinik, LMU, durchgeführt und ausgewertet.



## 4. Ergebnisse

## 4.1 Körpergewicht Tiere

Die Tiere wurden, wie im Versuchsaufbau 3.2. beschrieben, gefüttert und am Tage des Versuchsabschlusses gewogen. Die hier gewonnenen Werte werden in folgenden Abbildungen gezeigt (Körpergewicht in Gramm). Die weiblichen Tiere aller Diätgruppen im Experiment an gonadal intakten Tieren waren signifikant leichter als die mit derselben Diät gefütterten männlichen Tiere (Abbildung 2,  $p < 0.0001$ ). Derselbe Trend zeigte sich zwischen den weiblichen und den männlichen gonadal nicht intakten Kastraten. Zudem war zu sehen, dass die Männchen durch die Kastration an Gewicht verloren haben, die Weibchen hingegen durch die Kastration leicht zugenommen haben.

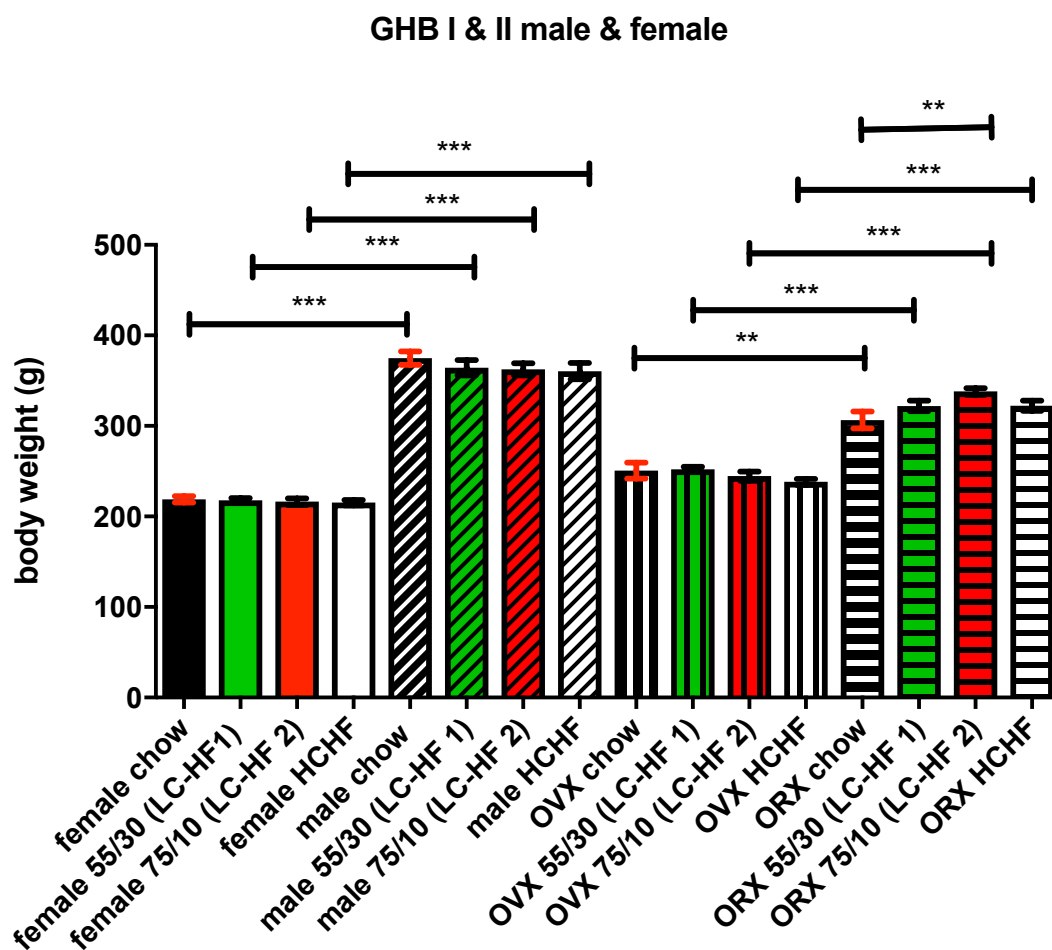


Abbildung 2: Körpergewicht in Gramm (g) der Versuchstiere GHB I und II männlich und weiblich. Alle Werte sind als Mittelwerte +/- STD angegeben.

Zwischen kastrierten und nicht kastrierten weiblichen Tieren unter identischer Diät zeigten sich jeweils signifikante Unterschiede (Abbildung 3).

Die gonadal intakten Weibchen unter chow-Diät waren signifikant leichter als die kastrierten Weibchen derselben Diätgruppe ( $p=0,01$ ) (female chow 219,1g +/- 13,15g) vs. (OVX chow 250,8 g +/- 23,32g). Dasselbe gilt für die Weibchen in der Diätgruppe 55/30 (LC-HF 1). Auch hier waren die kastrierten Weibchen signifikant schwerer als die nicht kastrierten Weibchen ( $p<0,001$ ) (female 55/30 [LC-HF 1] 217,8g +/- 9,704g) vs. (OVX 55/30 [LC-HF ] 252,1g +/- 6,537g).

In der Diätgruppe 75/10 zeigte sich erneut eine signifikante Gewichtszunahme nach der Kastration der Weibchen ( $p<0,001$ ) (female 75/10 [LC-HF 2] 216,4g +/- 13,48g) vs. (OVX 75/10 [LC-HF 2] 244,6g +/- 13,82g). Zuletzt nahmen auch die Weibchen der Diätgruppe HCHF durch die Kastration signifikant an Gewicht zu ( $p<0,001$ ) (female HCHF 215,3g +/- 10,60g) vs. (OVX HCHF 238,2g +/- 8,183g). Zusammenfassend waren die weiblichen Kastraten aller Diätgruppen signifikant schwerer als die nicht kastrierten Weibchen.

Anders als die Weibchen waren die kastrierten Männchen in allen vier Diätgruppen signifikant leichter als die nicht kastrierten männlichen Tiere (Abbildung 4). Die Männchen der Diätgruppe chow waren signifikant schwerer als die Kastraten chow ( $p<0,001$ ) (male chow 374,8g +/- 23,42g) vs. (ORX chow 306,6 g +/- 22,96g). Dasselbe galt auch für die Diätgruppe 55/30. Hier waren die gonadal nicht intakten Kastraten erneut signifikant leichter als die nicht kastrierten Männchen ( $p=0,001$ ) (male 55/30 [LC-HF 1] 364,4g +/- 25,55g) vs. (ORX 55/30 [LC-HF 1] 322,1g +/- 14,07g). Auch in der Diätgruppe 75/10 zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier waren die gonadal nicht intakten Männchen erneut leichter als die gonadal intakten Männchen ( $p=0,007$ ) (male 75/10 [LC-HF 2] 362,5g +/- 20,78g) vs. (ORX 75/10 (LC-HF 2) 338,1g +/- 8,288g). Zuletzt waren die gonadal nicht intakten der Diätgruppe HCHF ebenso signifikant leichter als die Männchen der gonadal intakten Versuchsgruppe ( $p=0,003$ ) (male HCHF 360,6g +/- 28,02g) vs. (ORX HCHF 322,4g +/- 13,82g).

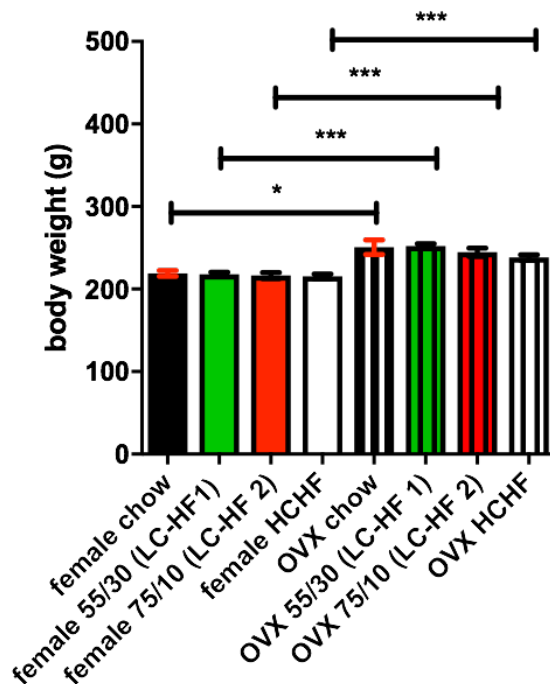


Abbildung 3: Körpergewicht in Gramm (g) Weibchen GHB I und GHB II. Die Werte sind als Mittelwerte +/- STD angeben. Es zeigt sich in allen Diätgruppen eine Zunahme des Körpergewichts durch die Kastration.

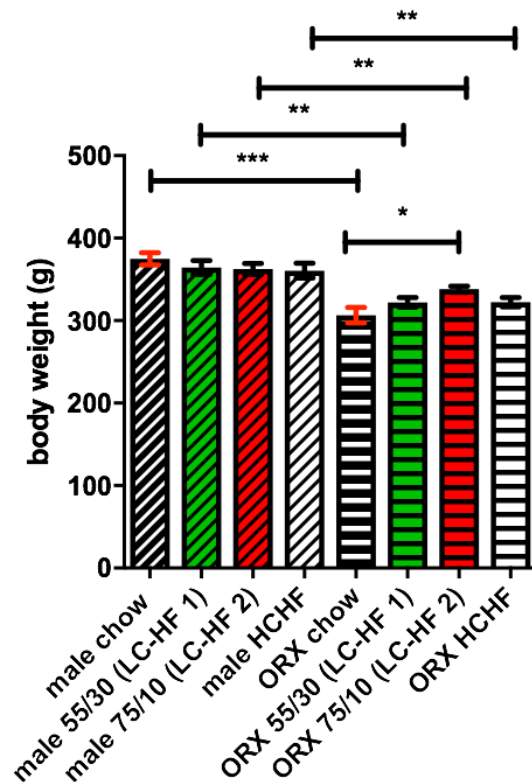


Abbildung 4: Körpergewicht in Gramm (g) Männchen GHB I und Männchen GHB II. Die Werte sind als Mittelwerte +/-STD angegeben. Kastraten mit signifikant geringerem Körpergewicht in allen Diätgruppen

#### 4.2. Kumulative Gewichtszunahme über 28 Tage Fütterung

Die Tiere wurden täglich gewogen, wodurch eine tägliche Gewichtszunahme erfasst werden konnte. Aus diesen täglich erfassten Gewichten wurde eine kumulative Gewichtszunahme errechnet. Zusammengefasst nahmen alle Tiere aller Diätgruppen über den Zeitraum von 28 Tagen zu. Dennoch waren zwischen den Männchen und Weibchen signifikante Unterschiede zu erkennen.

Wie in Abbildung 5 zu sehen, nahmen alle weiblichen Tiere aller Diätgruppen nach Kastration signifikant an Gewicht zu: (female chow: 20,24g +/- 8,13g) vs. (OVX chow: 41,23g +/- 10,93g) ( $p = 0,002$ ), (female LC-HF 1: 11,59g +/- 4,75g) vs. (OVX LC-HF 1: 26,08 +/- 4,30) ( $p < 0,001$ ), (female LC-HF 2: 9,80 +/- 5,24g) vs. (OVX LC-HF 2:

18,29 +/- 5,13g) ( $p = 0,01$ ), (female HCHF: 15,69 +/- 6,20) vs. (OVX HCHF: 24,27 +/- 4,50) ( $p = 0,02$ ).

Wie in Abbildung 6 zu sehen, hatte bei den Männchen die Kastration einen geringeren Effekt auf die Gewichtszunahme im Vergleich zu den Weibchen. Bei den Männchen hatte die Kastration weniger Effekt auf die Gewichtszunahme über die Fütterungsperiode. Einzig bei der HCHF-Diät kam es zu einer hoch signifikant niedrigeren Gewichtszunahme: male HCHF: 36,41g +/- 4,72g vs. male ORX HCHF: 23,35g +/- 4,12g ( $p < 0,001$ ).

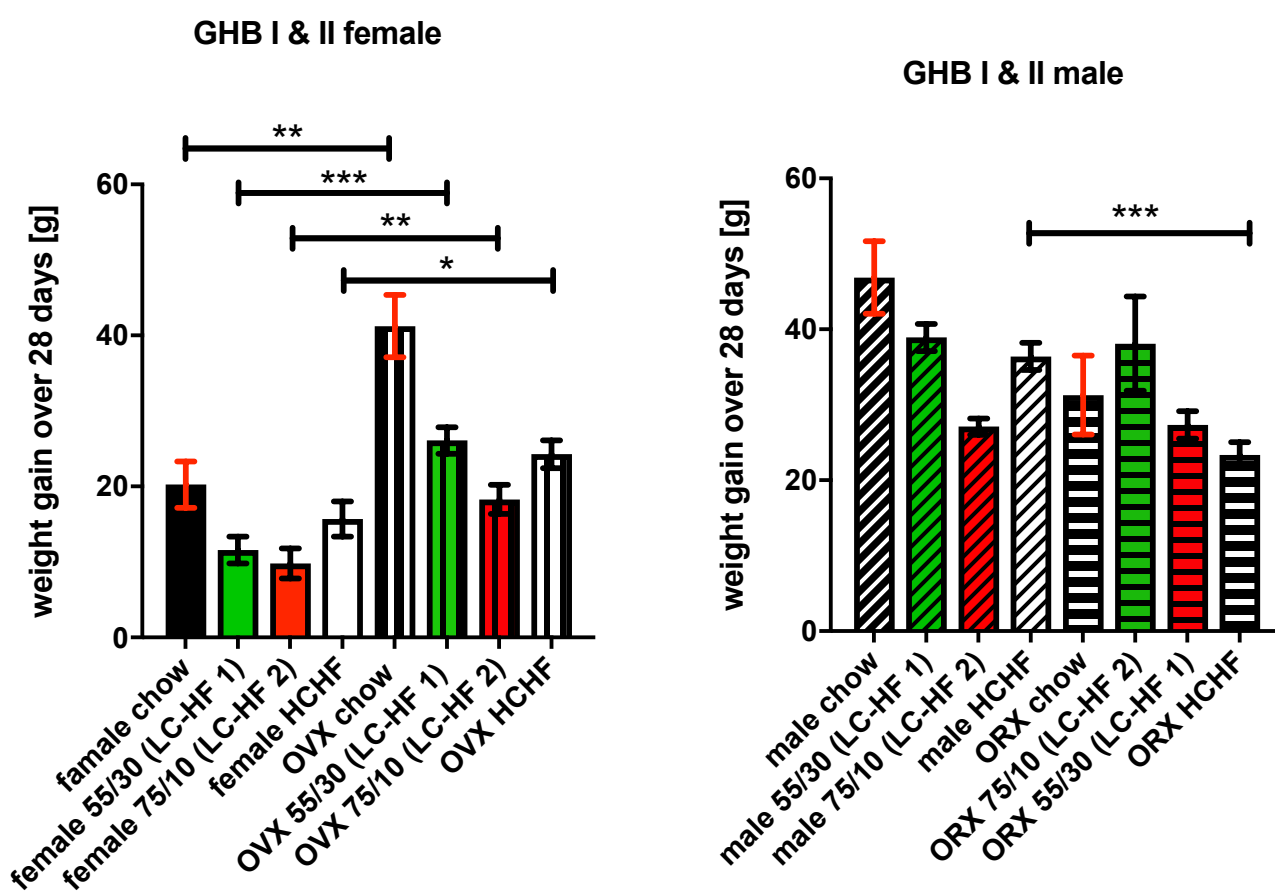


Abbildung 5.: Kumulative Gewichtszunahme in g über die 28 Versuchstage mit SD und Signifikanz \* Weibchen GHB I und GHB II. Die Werte sind als Mittelwerte +/- STD angegeben. Es zeigt sich in allen Diätgruppen eine Zunahme der kumulativen Gewichtszunahme durch die

Abbildung 6: Kumulative Gewichtszunahme in g über die 28 Versuchstage mit SD und Signifikanz \* Männchen GHB I und GHB II. Die Werte sind als Mittelwerte +/- STD angegeben. In der HCHF-Diät kam es nach Kastration zu einer signifikant geringeren Gewichtszunahme.

Wie in Abbildung 7 zu erkennen, zeigte sich bei gonadal intakten Männchen aller Diätgruppen, mit jeweils  $p < 0,001$ , eine signifikant größere Gewichtszunahme als bei gonadal intakten Weibchen aller Diätgruppen: (fem chow: 20,24g +/- 8,13g) vs. (male chow: 46,87g +/- 12,72g), (fem LC-HF 1: 11,59g +/- 4,75g) vs. (male LC-HF 1: 38,88g +/- 4,39g), (fem LC-HF 2: 9,80g +/- 5,23g) vs. (male LC-HF 2: 27,10g +/- 2,85g), (fem HCHF: 15,69g +/- 6,20g) vs. (male HCHF: 36,41g +/- 4,72g).

Zudem zeigten beide Geschlechter bei denselben Diätgruppen einen Anstieg der kumulativen Gewichtszunahme. Die gonadal intakten Weibchen nahmen unter den beiden LC-HF-Diäten signifikant weniger Gewicht zu als unter den Referenzdiäten. Selbes Bild zeigte sich bei den Männchen: (fem chow: 20,24g +/- 8,13g) vs. (fem LC-HF 1: 11,59g +/- 4,75g) ( $p = 0,033$ ), (fem chow: 20,24g +/- 8,13g) vs. (fem LC-HF 2: 9,80g +/- 5,23g) ( $p = 0,033$ ), (male chow: 46,87 +/- 12,72g) vs. (male LC-HF 2: 27,10g +/- 2,85g) ( $p < 0,001$ ), (male chow: 46,87 +/- 12,72g) vs. (male HCHF: 36,41g +/- 4,72g) ( $p = 0,002$ ).

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, kam es zwischen den Geschlechtern der gonadal nicht intakten Tiere lediglich in der Diätgruppe LC-HF 2 zu einem signifikanten Unterschied der Gewichtszunahme: (OVX LC-HF 2: 18,29g +/- 5,13g) vs. (ORX LC-HF 2: 38,10g +/- 13,95g) ( $p = 0,006$ ).

Unter den kastrierten Weibchen war die Gewichtszunahme aller Experimentaldiäten signifikant. Wie in Abbildung 8 zu erkennen, war die kumulative Gewichtszunahme der gonadal nicht intakten Weibchen aller Experimentaldiäten signifikant geringer als die der Referenzdiät: (OVX chow 41,23g +/- 10,93g) vs. (OVX LC-HF 1: 26,08g +/- 4,30g) ( $p = 0,002$ ), (OVX chow 41,23g +/- 10,93g) vs. (fem LC-HF 2 OVX: 18,29g +/- 5,13g) ( $p = 0,001$ ), (OVX chow: 41,23g +/- 10,93g) vs. (OVX HCHF: 24,27g +/- 4,51g) ( $p = 0,001$ ).

Bei den gonadal nicht intakten Männchen war solch ein Trend nicht zu erkennen.

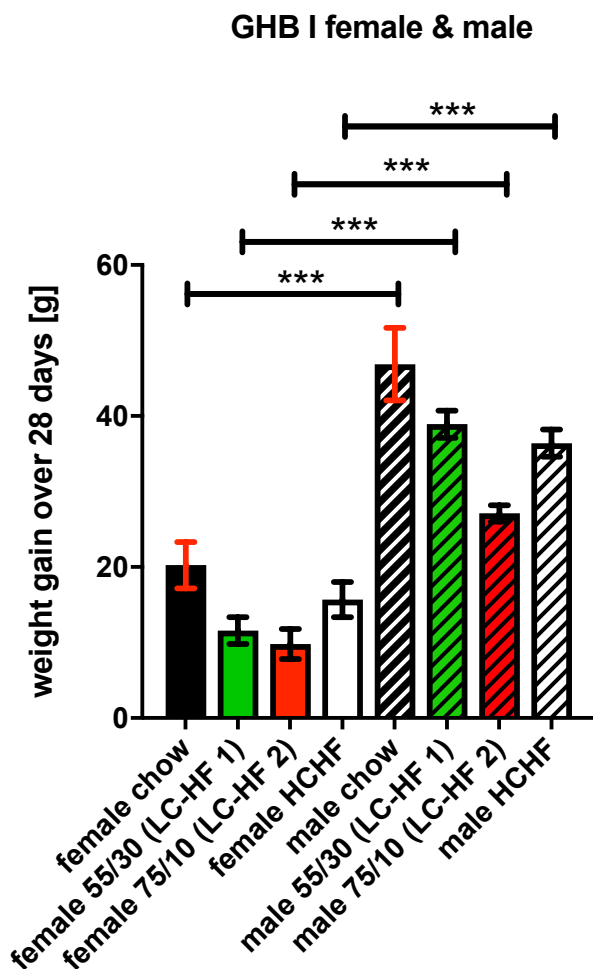


Abbildung 7: Kumulative Gewichtszunahme in g über die 28 Versuchstage mit SD und Signifikanz \* GHB I Weibchen & Männchen. Die Werte sind als Mittelwerte +/- STD angeben. In allen Diätgruppen zeigten die Männchen eine signifikant größere kumulative Gewichtszunahme

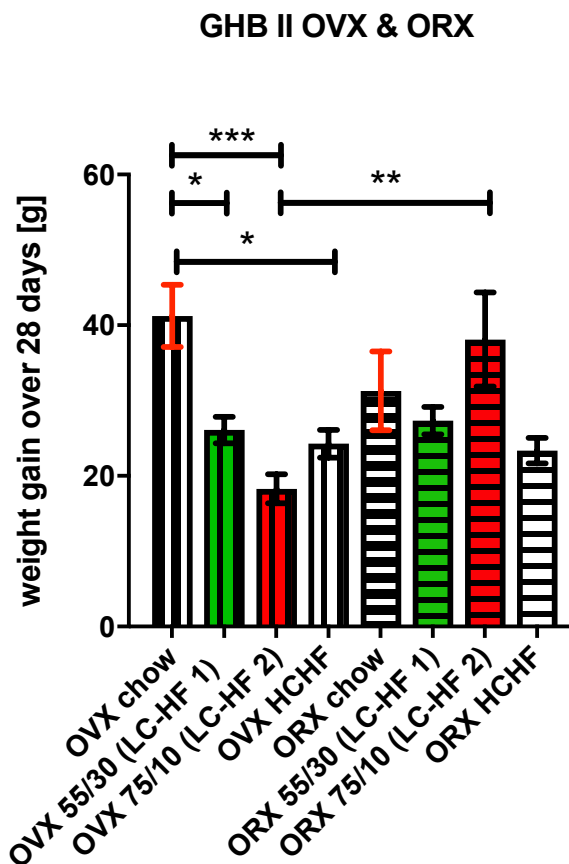


Abbildung 8: Kumulative Gewichtszunahme in g über die 28 Versuchstage mit SD und Signifikanz \* GHB II OVX & ORX. Die Werte sind als Mittelwerte +/- STD angeben. Nur die LC-HF 2-Diät zeigte eine signifikante Gewichtszunahme zwischen den Geschlechtern der gonadal nicht intakten Tiere.

#### 4.3 Gewicht subkutanes Fettgewebe in Relation zum Körpergewicht

Neben den Lebern wurde zudem das subkutane Fettgewebe entnommen und gewogen. Das so erhaltene Organgewicht in Gramm (g) wurde in Relation zum Körpergewicht jedes einzelnen Tieres gesetzt (g/%BW). Hier zeigte sich, dass die Männchen sowohl der gonadal intakten Gruppe als auch der gonadal nicht intakten Gruppe kein signifikant höheres Gewicht des subkutanen Fettgewebes aufwiesen als die Weibchen derselben Versuchsgruppe. In der Gruppe der gonadal intakten Weibchen (Abbildung 9) zeigte

sich, dass das subkutane Fettgewebe der Diätgruppe chow signifikant ( $p = 0,0177$ ) geringer war, als das der Diätgruppe (75/10 LC-HF 2): (female chow  $0,4823g, \pm 0,2438g$  STD) vs. (female 75/10 [LC-HF 2]  $0,7068g, \pm 0,1510g$  STD).

Zudem zeigte sich folgender Trend: Das Gewicht des subkutanen Fettgewebes der gonadal intakten Weibchen nahm von der Diätgruppe chow zur Diätgruppe 55/30 zu. (female chow  $0,4823g, \pm 0,2438g$  STD) vs. (female 55/30 [LC-HF 1]  $0,6252g \pm 0,1314g$  STD). Ebenso von der Diätgruppe 55/30 zur Diätgruppe 75/10 (female 55/30 [LC-HF 1]  $0,6252g \pm 0,1314g$  STD) vs. (female 75/10 [LC-HF 2]  $0,7068g, \pm 0,1510g$  STD). Hier zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. In der Versuchstiergruppe der gonadal nicht intakten Weibchen zeigte sich kein solcher Trend. Hier waren lediglich die Gewichte der Diätgruppe 55/30 und 75/10 leicht höher als die der chow- und HCHF-Gruppe, allerdings ohne Signifikanzen aufzuweisen: (OVX chow  $0,7127g \pm 0,1687g$  STD) vs. (OVX 75/10 [LC-HF 2]  $0,7914 \pm 0,1432g$  STD), (OVX 55/30 [LC-HF 1]  $0,8105g \pm 0,1709g$  STD) vs. (OVX HCHF  $0,7205g \pm 0,07899g$  STD). Zudem war das Gewicht des subkutanen Fettgewebes der gonadal intakten Weibchen insgesamt niedriger, als das der gonadal nicht intakten Weibchen.

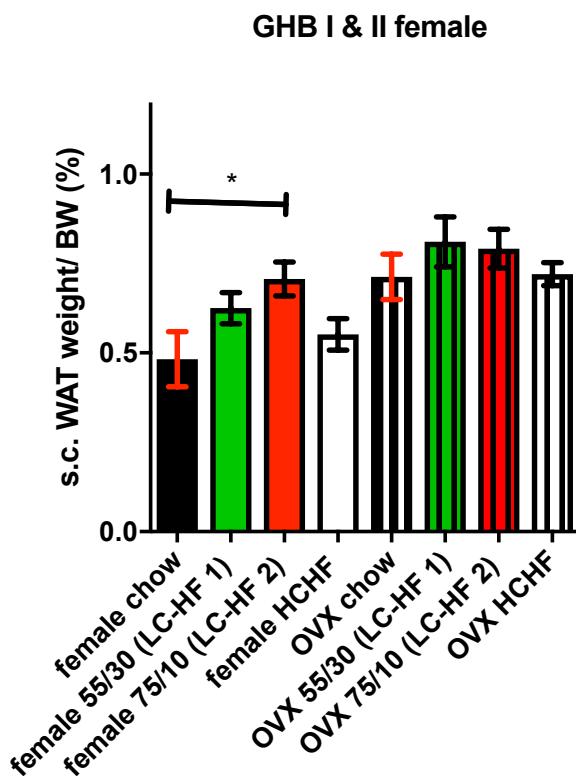


Abbildung 9: Gewicht des subkutanen Fettgewebes in Relation zum Körpergewicht GHB I & II Weibchen als Mittelwert  $\pm$  STD. Zunahme des s.c. Fetts nach Ovarektomie der Weibchen.

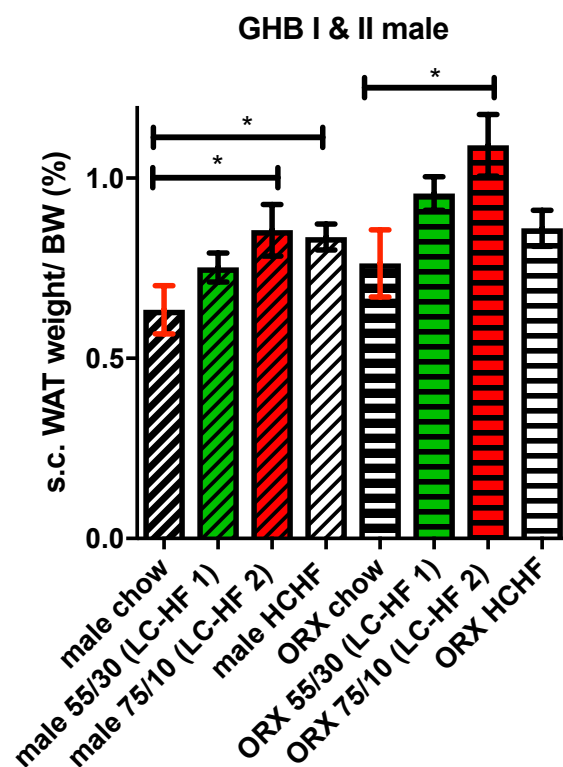


Abbildung 10: Gewicht des subkutanen Fettgewebes in Relation zum Körpergewicht GHB I & II Männchen als Mittelwert  $\pm$  STD. Zunahme des s.c. wat. nach Kastration der Männchen.

Wie in Abbildung 10 zu sehen, verhielt sich das Organgewicht des subkutanen Fettgewebes der Männchen ähnlich dem der Weibchen. Es war in allen vier Diätgruppen vor Kastration tendenziell geringer als das der jeweiligen kastrierten Gruppen, auch wenn die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant waren. Das Gewicht des subkutanen Fettgewebes der gonadal intakten chow-Männchen, war signifikant ( $p = 0,03$ ) geringer als das der gonadal intakten Diätgruppe 75/10 (male chow  $0,6344\text{g} \pm 0,1773\text{g STD}$ ) vs. (male 75/10 [LC-HF 2]  $0,8554\text{g} \pm 0,1889\text{g STD}$ ). Ebenso war das subkutane Fettgewebe der Männchen der Gruppe chow signifikant ( $p = 0,05$ ) leichter als das der Männchen der Diätgruppe HCHF (male chow  $0,6344\text{g} \pm 0,1773\text{g STD}$ ) vs. (male HCHF  $0,8366\text{g} \pm 0,09480\text{g STD}$ ). Ein ähnlicher Trend zeigte sich bei den gonadal nicht intakten Männchen der Gruppe chow. Hier war das subkutane Fettgewebe der Diätgruppe chow ORX signifikant ( $p = 0,01$ ) leichter als das der Diätgruppe 75/10 ORX: (chow ORX  $0,7637\text{g} \pm 0,2286\text{g STD}$ ) vs. (ORX 75/10 [LC-HF ]  $1,091\text{g} \pm 0,1906\text{g STD}$ ).

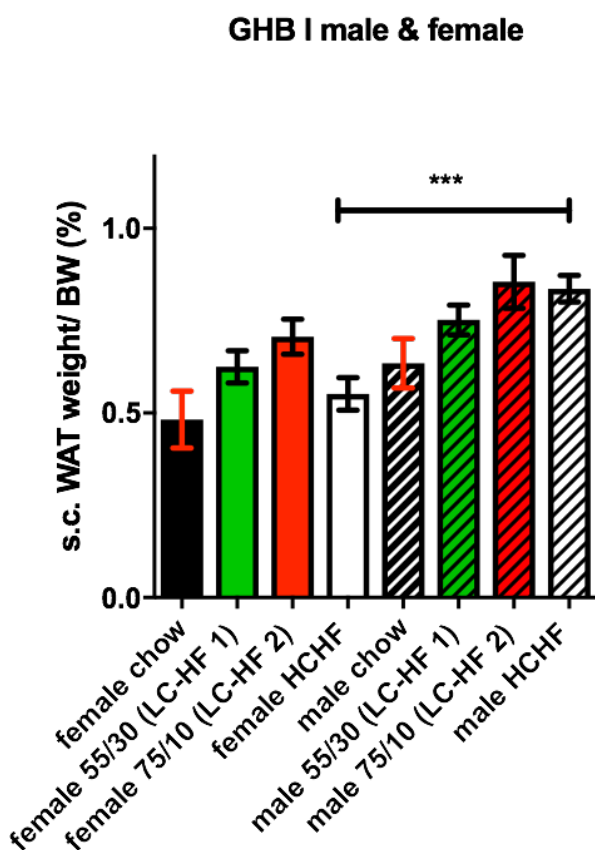


Abbildung 11: Gewicht des subkutanen Fettgewebes in Relation zum Körpergewicht GHB I Weibchen & Männchen als Mittelwert  $\pm$  STD. Signifikant geringerer Anteil des subkutanen Fettgewebes der Weibchen in Relation zum Körpergewicht der Diätgruppe 75/10 und HCHF im Gegensatz zu den Männchen.

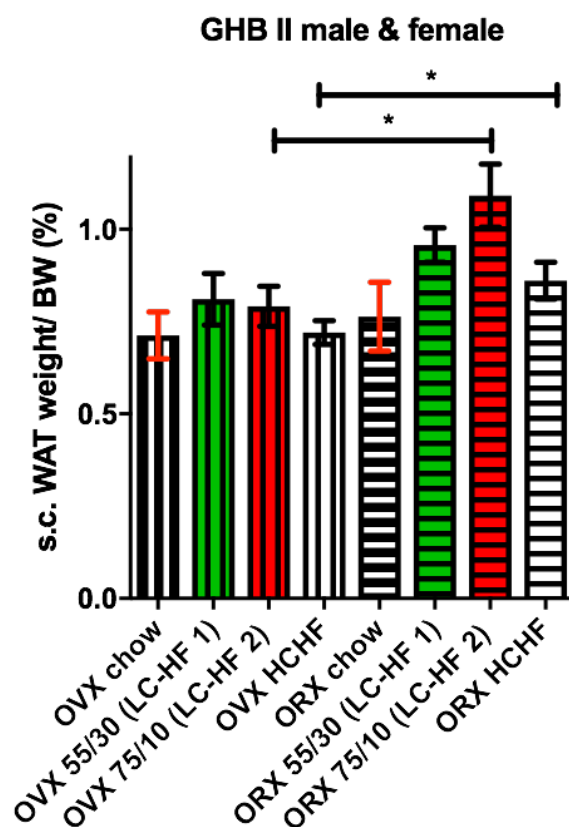


Abbildung 12: Gewicht des subkutanen Fettgewebes in Relation zum Körpergewicht GHB II Weibchen & Männchen als Mittelwert  $\pm$  STD. Signifikant geringerer Anteil des subkutanen Fettgewebes der Weibchen in Relation zum Körpergewicht der Diätgruppe 75/10 und HCHF im Gegensatz zu den Männchen.



Die Abbildungen 11 und 12 stellen zur bessern Veranschaulichung das Gewicht des subkutanen Fettgewebes der Männchen und Weibchen der jeweiligen Versuchsgruppen gegenüber. Hier ist zu sehen, dass die Gewichte des subkutanen Fettgewebes der Weibchen in beiden Versuchsgruppe (gonadal intakt und gonadal nicht intakt) nicht geringer waren als das der Männchen. Das subkutane Fettgewebe der Weibchen HCHF (gonadal intakt) war signifikant ( $p < 0,001$ ) leichter als das subkutane Fettgewebe der Männchen HCHF (gonadal intakt) (female HCHF 0,5521 +/- 0,1394 STD) vs. (male HCHF 0,8366 +/- 0,09480 STD) Abbildung 11. Des Weiteren war das subkutane Fettgewebe der weiblichen Kastraten der Diätgruppe 75/10 signifikant ( $p = 0,02$ ) geringer als das der männlichen Kastraten derselben Diätgruppe 75/10 (OVX 75/10 [LC-HF 2] 0,7914 +/- 0,1432 STD) vs. (ORX 75/10 [LC-HF 2] 1,09 +/- 0,1906 STD). Ein weiterer signifikanter Unterschied im Gewicht des subkutanen Fettgewebes bestand zwischen den gonadal nicht intakten Männchen und Weibchen der Diätgruppe HCHF. Hier war der Anteil des subkutanen Fettgewebes in Relation zum Körpergewicht der weiblichen Kastraten signifikant ( $p = 0,04$ ) geringer als das der Männchen (OVX HCHF 0,7205 +/- 0,07899 STD) vs. (ORX HCHF 0,8610 +/- 0,1226 STD).

#### 4.4 Gewicht Leber in Relation zum Körpergewicht

Nach der Fütterungsphase wurden die Ratten euthanasiert und die verschiedenen Gewebe entnommen (siehe Versuchsaufbau 3.2). Die entnommenen Lebern wurden mehrfach gewogen und aus den so ermittelten Gewichten ein Mittelwert gebildet. Dieses absolute Organgewicht wurden nun in Relation zum Körpergewicht gesetzt (g/%BW).

Die weiblichen Tiere der gonadal intakten Diätgruppe chow waren signifikant leichter als die weiblichen Tiere der Diätgruppe 55/30 ( $p < 0,05$ ): (female chow 2,749g +/- 0,1839g) vs. (female 55/30 [LC-HF 1] 3,151g +/- 0,1951g) (Abbildung 13). Ebenso waren die gonadal intakten weiblichen Tiere der Diätgruppe chow signifikant leichter als die Tiere der Diätgruppe 75/10 ( $p < 0,05$ ) (female chow 2,749g +/- 0,1839g) vs. (female 75/10 [LC-HF 2] 3,214g +/- 0,2365g).

Dasselbe zeigte sich zwischen den weiblichen Tieren der gonadal nicht intakten Gruppe chow, die signifikant ( $p < 0,05$ ) leichter waren als die gonadal nicht intakten weiblichen

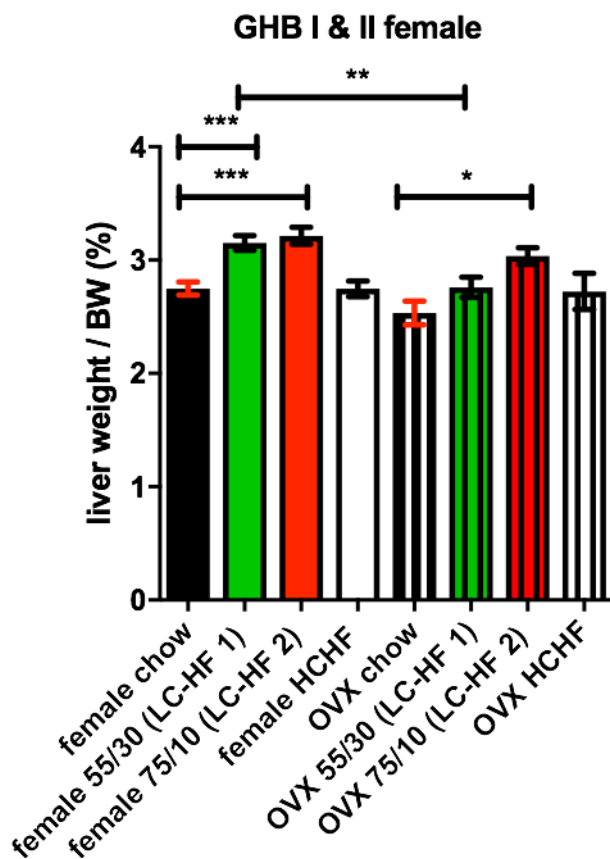


Abbildung 13: Gewicht der Lebern in Relation zum Körpergewicht GHB I & II Weibchen als Mittelwert  $\pm$  STD in Relation zum Körpergewicht. Relatives Organgewicht Lebern.

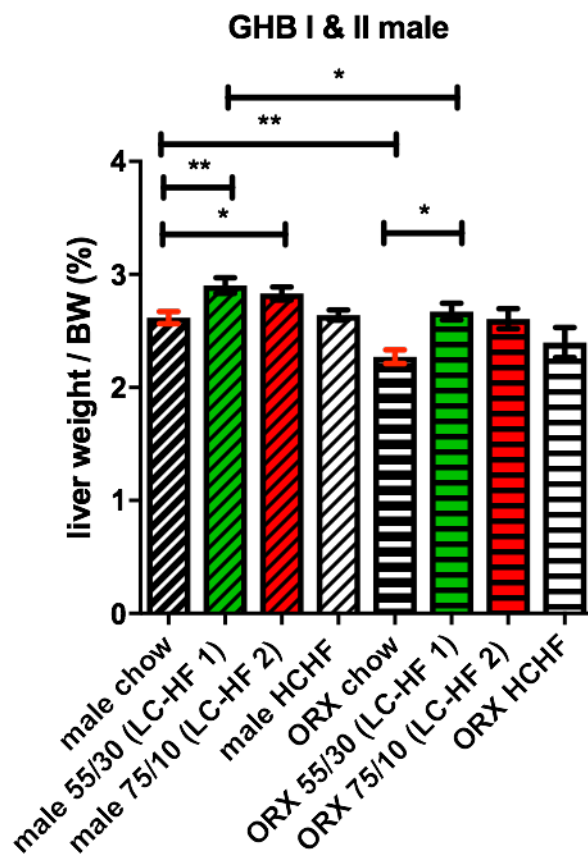


Abbildung 14: Gewicht der Lebern in Relation zum Körpergewicht GHB I & II Männchen als Mittelwert  $\pm$  STD in Relation zum Körpergewicht. Relatives Organgewicht Lebern.

Tiere 75/10 (OVX chow 2,533g  $\pm$  0,2744g) vs. (OVX 75/10 [LC-HF 2] 3,036g  $\pm$  0,1775g). Zudem waren die Weibchen der gonadal intakten Versuchsgruppe 55/30, signifikant ( $p = 0,007$ ) schwerer als die gonadal nicht intakten Weibchen 55/30 (female 55/30 [LC-HF 1] 3,151g  $\pm$  0,1951g) vs. (OVX 55/30 [LC-HF 1] 2,759g  $\pm$  0,1989g). Bei den männlichen Tieren (Abbildung 14) war ein ähnlicher Trend wie bei den Weibchen zu erkennen. Hier waren die Männchen der gonadal intakten Versuchsgruppe Diät chow signifikant ( $p < 0,05$ ) leichter als die Männchen der Diät 55/30 (male chow 2,618  $\pm$  0,1800g) vs. (male 55/30 [LC-HF 1] 2,903g  $\pm$  0,1962g). Dasselbe galt auch für die gonadal intakte Diätgruppe 75/10, deren Männchen ebenso signifikant schwerer waren ( $p < 0,05$ ) als die Männchen der chow-Diät Gruppe (male chow 2,618  $\pm$  0,1800g) vs. (male 75/10 [LC-HF 2] 2,832g  $\pm$  0,1833g).

Analog zeigte sich dieser Trend bei den gonadal nicht intakten Männchen der Versuchsgruppe: Auch hier waren die mit der chow-Diät gefütterten Tiere signifikant leichter ( $p < 0,05$ ) als die Tiere der Diätgruppe 55/10 (ORX chow 2,271g +/- 0,1356g) vs. (ORX 55/30 [LC-HF 1] 2,672g +/- 0,1774g). Zwischen den beiden Versuchsgruppen gonadal intakt und gonadal nicht intakt zeigte sich bei den Männchen der Diätgruppe 55/30 ebenso ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,04$ ). Hier waren die kastrierten Männchen deutlich leichter als die nicht kastrierten (male 55/30 [LC-HF 1] 2,903g +/- 0,1962g) vs. (ORX 55/30 [LC-HF 1] 2,672g +/- 0,1774g).

Das Lebergewicht der Weibchen der Diätgruppe 55/30 war signifikant ( $p = 0,02$ ) schwerer als das der Männchen der Diätgruppe 55/30 (Abbildung 15) (female 55/30 [LC-HF 1] 3,151g +/- 0,1951g vs. (male 55/30 [LC-HF 1] 2,903g +/- 0,1962g). Dasselbe bei den Tieren der Diätgruppe 75/10, in der die Weibchen ebenso signifikant schwerer waren als die Männchen ( $p < 0,001$ ) (female 75/10 [LC-HF 2] 3,214g +/- 0,2365g) vs. (male 75/10 [LC-HF 2] 2,832g +/- 0,1833g).

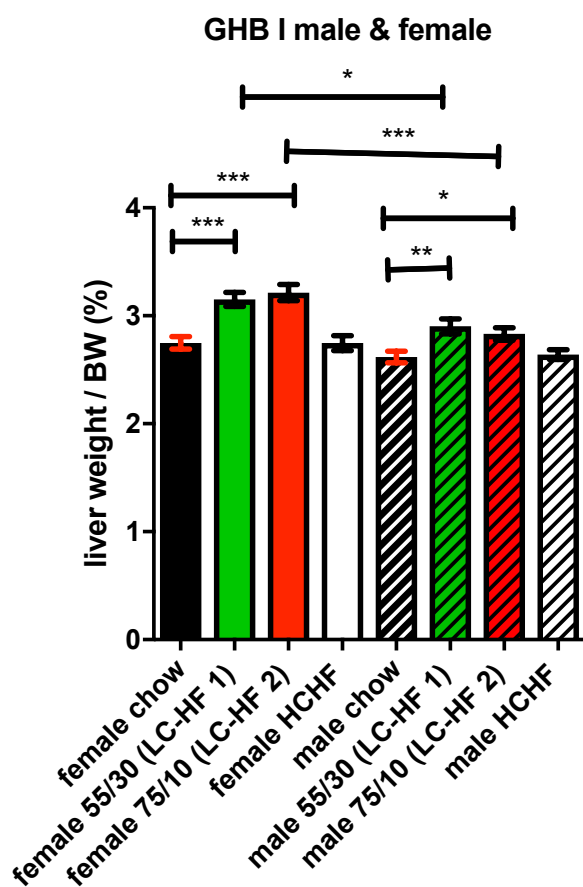


Abbildung 15: Gewicht der Lebern in Relation zum Körpergewicht GHB I Männchen und Weibchen als Mittelwert +/- STD in Relation zum Körpergewicht. Relatives Organgewicht Lebern.

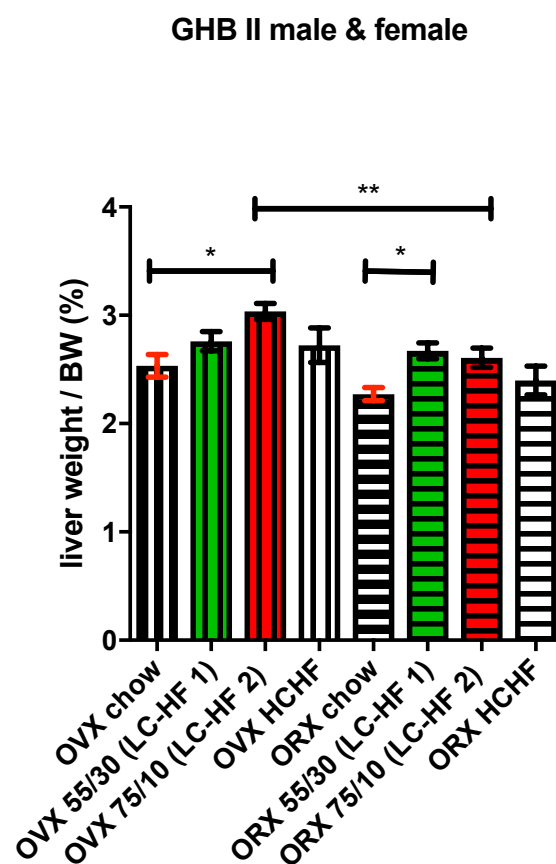


Abbildung 16: Gewicht der Lebern in Relation zum Körpergewicht GHB II Männchen und Weibchen als Mittelwert +/- STD in Relation zum Körpergewicht. Relatives Organgewicht Lebern.

Bei der gonadal nicht intakten Versuchsgruppe (Abbildung 16) zeigte sich, ähnlich wie in der gonadal intakten Gruppe, dass die Lebern der kastrierten Weibchen der Diätgruppe 75/10 in Relation zum Körpergewicht signifikant ( $p = 0,006$ ) schwerer waren als die Lebern der kastrierten Männchen der Diätgruppe 75/10.

#### 4.5 Ergebnisse der mRNA Expression einzelner Gene im subkutanen Fettgewebe

##### 4.5.1 mRNA Expression Leptin im subkutanen Fettgewebe

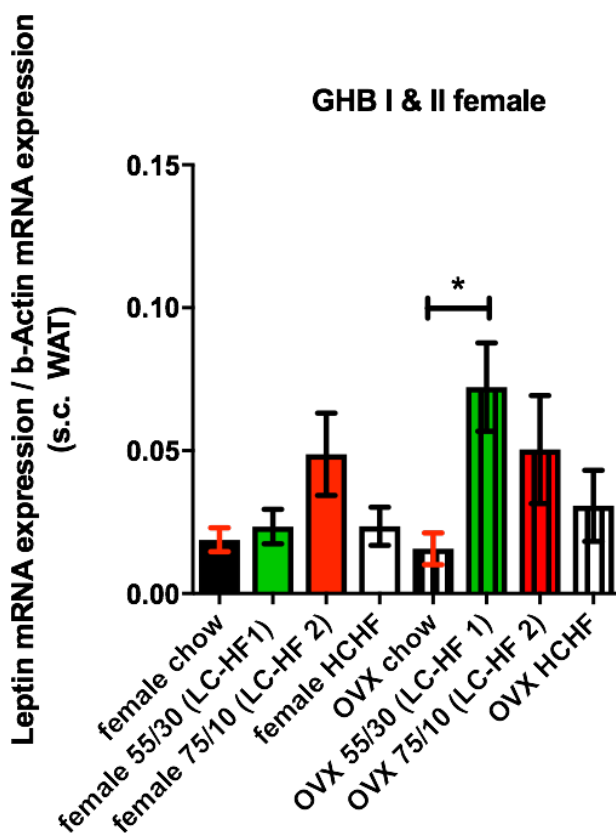


Abbildung 17: Leptin mRNA Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I & II

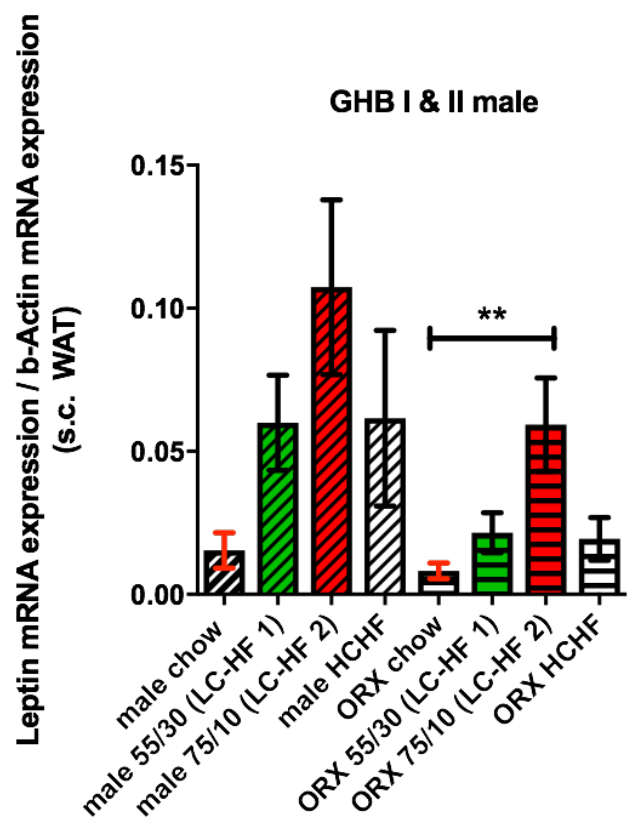


Abbildung 18: Leptin mRNA Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I & II

Im Folgenden wird die mRNA-Expression von Leptin im subkutanen Fettgewebe, vergleichend zwischen den einzelnen Diätgruppen bei gonadal intakten und gonadal nicht intakten Tieren beschrieben.

Unter den gonadal intakten Weibchen zeigten sich die höchsten Leptin-Werte in der Gruppe 75/10, allerdings ohne signifikant zu sein (Abbildung 17). In den anderen drei

Diätgruppen der gonadal intakten Weibchen zeigten sich ebenso keine signifikanten Unterschiede. Unter den weiblichen Kastraten wies die Diätgruppe 55/30 im Vergleich zur chow-Diät signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Werte auf (OVX chow 0,01569 +/- 0,0135 STD) vs. (OVX 55/30 [LC-HF 1] 0,07223 +/- 0,03086 STD).

Die Leptin-Werte der gonadal intakten Männchen (Abbildung 18) wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Hier war allerdings erneut ein Trend zu erkennen. Es kam zu einer stetigen Zunahme der Leptin-Expression von der chow über die 55/30 zur 75/10 Diätgruppe (male chow 0,01536 +/- 0,01378 STD) vs. (male 55/30 [LC-HF 1] 0,05999 +/- 0,04988 STD) vs. (male 75/10 [LC-HF 2] 0,1074 +/- 0,09649 STD).

Ein ähnlicher Trend zeigte sich bei den gonadal nicht intakten Männchen. Hier zeigte sich ebenso eine Zunahme der Leptin-mRNA-Expression, beginnend bei der chow-Gruppe über die 55/30 zur 75/10 Diätgruppe. Zwischen den Diätgruppen chow und 75/10 war dieser Unterschied bei den gonadal nicht intakten Tieren mit ( $p < 0,05$ ) signifikant: (ORX chow 0,008180 +/- 0,006184 STD) vs. (ORX 75/10 [LC-HF 2]) 0,05936 +/- 0,03259 STD).

Die Abbildungen 19 und 20 veranschaulichen den Unterschied zwischen Männchen und Weibchen der einzelnen Versuchsgruppen. Zwischen den gonadal intakten Männchen und gonadal nicht intakten Weibchen gab es keine signifikanten Unterschiede. Wie in Abbildung 20 zu sehen, war die Leptin-mRNA-Expression der gonadal nicht intakten Weibchen der chow-Diätgruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) geringer als die der Diätgruppe 55/30: (OVX chow 0,01569 +/- 0,01359 STD) vs. (OVX 55/30 [LC-HF 1] 0,07223 +/- 0,03086 STD).

Zwischen den Geschlechtern der gonadal nicht intakten Tiere gab es ebenfalls signifikante Unterschiede (Abbildung 20). Hier war die Leptin mRNA Expression der weiblichen Kastraten der Diätgruppe 55/30 signifikant höher als die der männlichen Kastraten derselben Diätgruppe ( $p = 0,0243$ ): (OVX 55/30 [LC-HF 1] 0,07223 +/- 0,03086 STD) vs. (ORX 55/30 [LC-HF 1] 0,02154 +/- 0,01398 STD).

Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigte sich innerhalb der Gruppe der kastrierten Männchen: Hier war die Leptin-mRNA-Expression in der chow-Diätgruppe (ORX chow) signifikant geringer als in der Gruppe unter der extremen, ketogenen Diät (ORX 75/10 ( $p < 0,05$ ): (ORX chow 0,008180 +/- 0,006184 STD) vs. (ORX 75/10 [LC-HF 2] 0,05936 +/- 0,03259 STD).

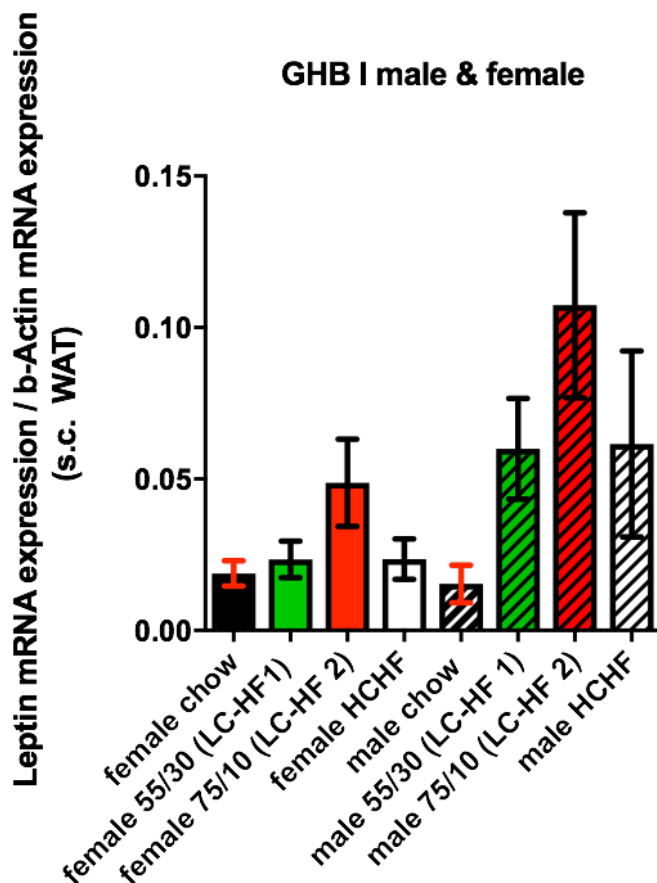


Abbildung 19: Leptin-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Hauskeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I Männchen & Weibchen

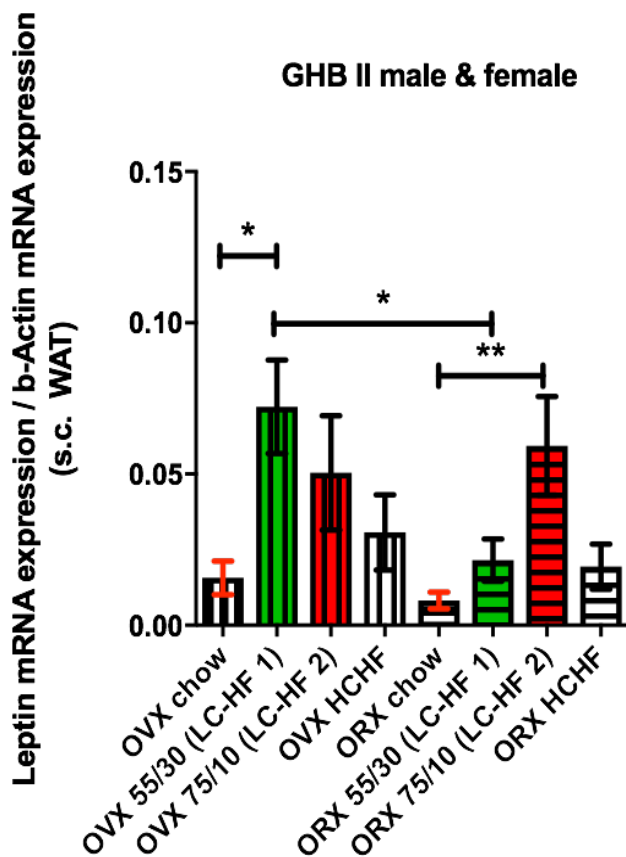


Abbildung 20: Leptin-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Hauskeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB II Männchen &

#### 4.5.2 mRNA Expression Lipoproteinlipase (LPL) im subkutanen Fettgewebe

Im Folgenden wird die mRNA-Expression der Lipoproteinlipase beschrieben.

Wie in Abbildung 21 zu sehen, besteht ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression zwischen den weiblichen Kastraten der Diätgruppe chow und den weiblichen Kastraten der Diätgruppe 55/30. Hier ist die Genexpression der mit der LC-HF-1 Diät gefütterten Tiere deutlich höher als die der chow-Diät ( $p < 0,05$ ): (OVX chow  $0,1678 \pm 0,1373$  STD) vs. (OVX 55/30 [LC-HF 1]  $0,7861 \pm 0,5887$  STD). Sonst zeigten sich bei den weiblichen Tieren keine weiteren signifikanten Unterschiede. Bei den gonadal nicht intakten Männchen der Diätgruppe (Abbildung 22) zeigte sich ein

signifikanter Unterschied in der Expression der Lipoproteinlipase. Die Werte der Diätgruppe 75/10 (LC-HF 2) sind hier deutlich höher als die Werte der chow-Diät ( $p < 0,05$ ): (ORX chow 0,1502 +/- 0,1495 STD) vs. (ORX 75/10 [LC-HF 2] 0,8363 +/- 0,6616 STD).

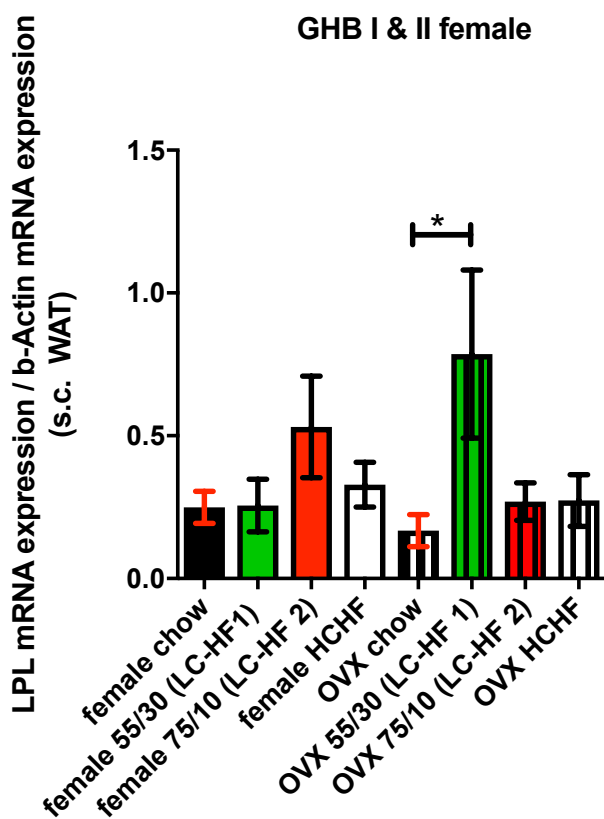


Abbildung 21: LPL mRNA Expression des subkutanen Fettgewebes Houskeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I & II Weibchen

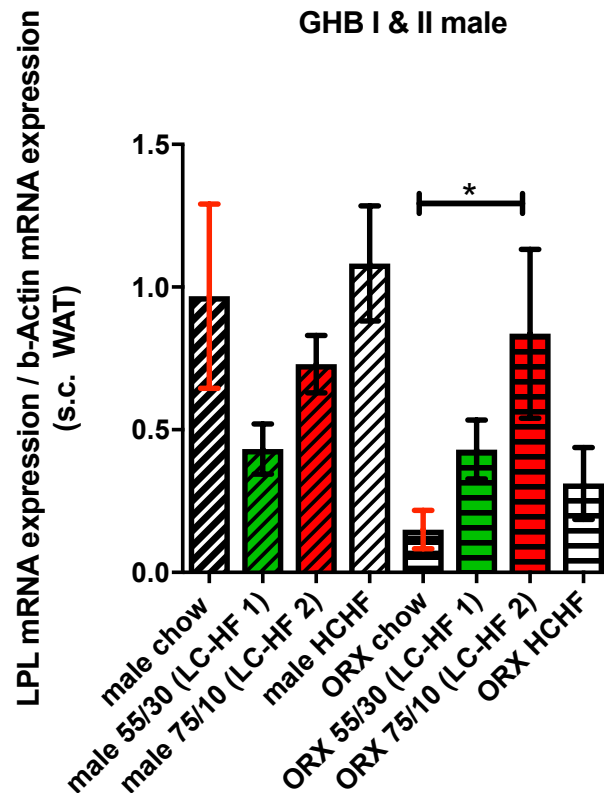


Abbildung 22: LPL mRNA Expression des subkutanen Fettgewebes Houskeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I & II Männchen

Abbildung 23 und 24 vergleichen nun die Ergebnisse der LPL-Expression zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den gonadal intakten Weibchen und Männchen der Diätgruppe chow. Die Expression der Lipoproteinlipase war hier bei den Männchen signifikant höher als bei den Weibchen ( $p = 0,0263$ ): (female chow 0,2495 +/- 0,1868 STD) vs. (male chow 0,9682 +/- 0,9687 STD). In der Diätgruppe HCHF war ein ähnlicher Trend zu erkennen. Hier war die LPL Expression der Männchen HCHF signifikant höher als die der Weibchen HCHF

( $p = 0,0046$ ): (female HCHF  $0,3287 \pm 0,2204$  STD) vs. (male HCHF  $1,083 \pm 0,6049$  STD). In der gonadal nicht intakten Versuchsgruppe (Abbildung 24) zeigte sich kein signifikanter Unterschied der LPL-mRNA-Genexpression zwischen den Geschlechtern.

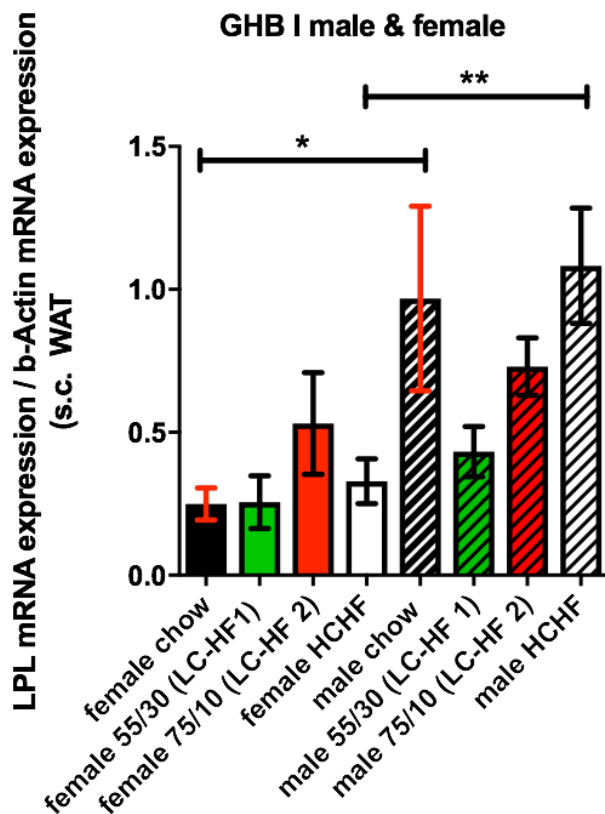


Abbildung 23: LPL-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I Männchen & Weibchen. Signifikant höhere LPL-Expression der Männchen in den Diätgruppen chow und HCHF.

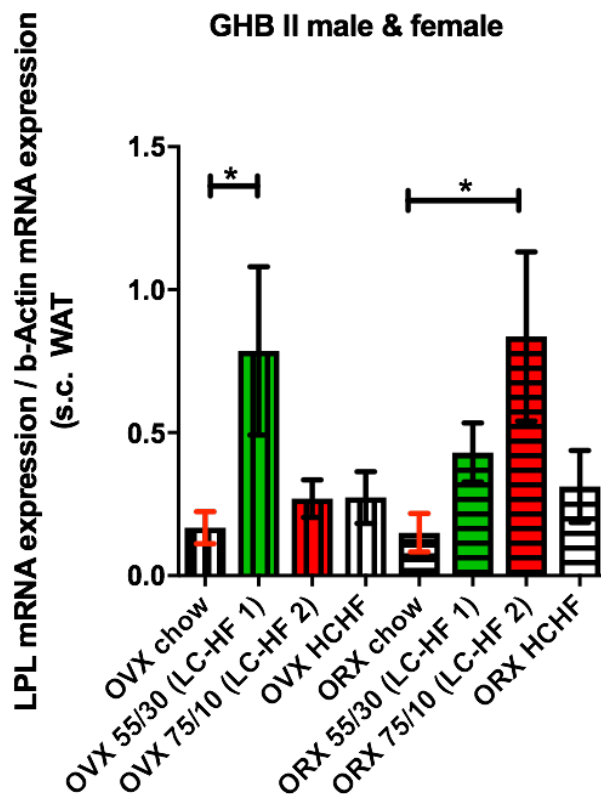


Abbildung 24: LPL-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB II Männchen & Weibchen. Kein signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen und männlichen Kastraten.

#### 4.5.3 mRNA-Expression der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) im subkutanen Fettgewebe

Die mRNA-Expression von ATGL zeigte in beiden Versuchsgruppen folgende Ergebnisse:

Wie in Abbildung 25 zu sehen, kam es bei den gonadal intakten sowie gonadal nicht intakten Weibchen zu keinen signifikanten Unterschieden in der ATGL Expression



zwischen den verschiedenen Diätgruppen. In der gonadal intakten Versuchsgruppe exprimierte die 75/10 Diät nicht signifikant mehr ATG als die drei weiteren Diätgruppen (female chow 0,2271 +/- 0,1670 STD) vs. (female 75/10 [LC-HF 2] 0,4304 +/- 0,3280 STD) vs. (female 55/30 [LC-HF 1] 0,1461 +/- 0,04029 STD) vs. (female HCHF 0,1984 +/- 0,1850 STD).

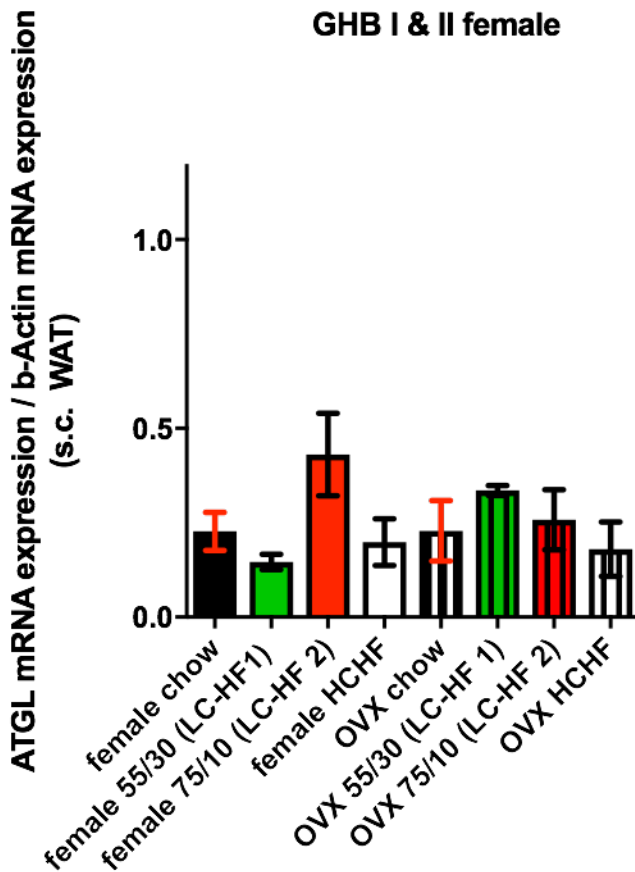


Abbildung 25: ATGL-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I & II Weibchen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der ATGL Expression zwischen den Versuchsgruppen GHB I und GHB II.

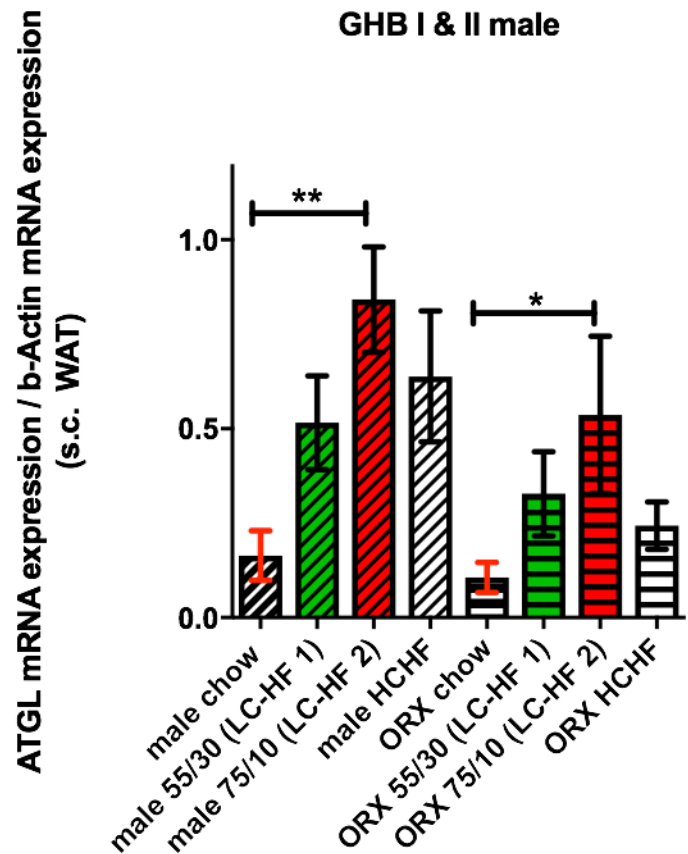


Abbildung 26: ATGL-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I & II Männchen. Zwischen den Kastraten und nicht kastrierten Männchen zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

Bei den gonadal intakten Männchen (Abbildung 26) kam es in der Diätgruppe 75/10 zu einer signifikant höheren ATGL-Expression als in der Diätgruppe chow ( $p < 0,05$ ): (male chow 0,1643 +/- 0,1734 STD) vs. (male 75/10 [LC-HF 2] 0,8418 +/- 0,4815 STD). Derselbe Trend zeigte sich bei den männlichen Kastraten. Hier war die ATGL-Expression der Diätgruppe 75/10 erneut signifikant höher als die der chow-Diätgruppe ( $p < 0,05$ ) (ORX chow 0,1062 +/- 0,09666 STD) vs. (ORX 75/10 [LC-HF 2] 0,5364 +/- 0,4168 STD).

Im Folgenden wird nun auf die Unterschiede innerhalb jeder Versuchsgruppe zwischen den Geschlechtern eingegangen. (Abbildung 27) In der gonadal intakten Diätgruppe 75/10, war die ATGL-Expression der Männchen signifikant höher als die der Weibchen ( $p = 0,0402$ ): (male 75/10 [LC-HF 2]  $0,8418 \pm 0,4815$  STD) vs. (female 75/10 [LC-HF 2]  $0,4304 \pm 0,3280$  STD). Dasselbe zeigte sich zwischen den Weibchen und Männchen der Diätgruppe HCHF. Hier war die Expression von ATGL bei den Männchen erneut signifikant höher als bei den Weibchen ( $p = 0,0241$ ) (male HCHF  $0,6384 \pm 0,4902$  STD) vs. (female HCHF  $0,1984 \pm 0,1850$  STD).

In der gonadal nicht intakten Versuchsgruppe (Abbildung 28) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

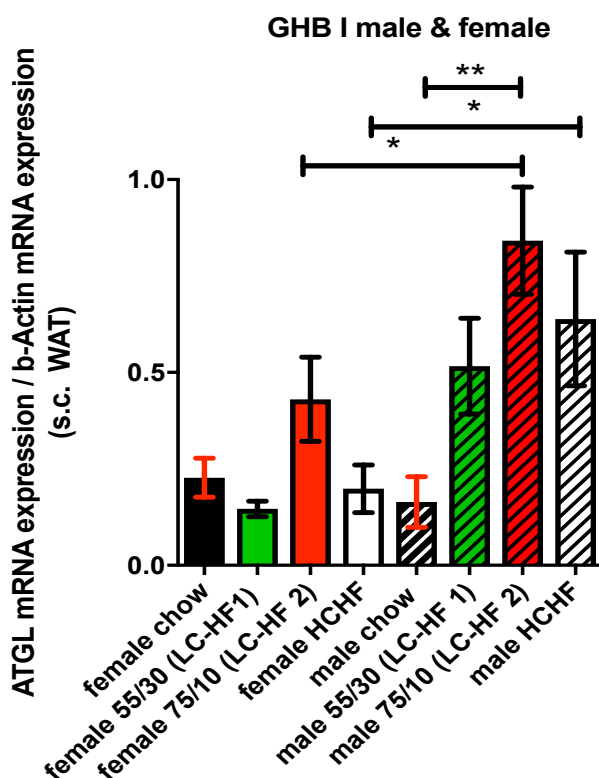


Abbildung 27: ATGL-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I Männchen & Weibchen. Signifikant höhere ATGL-Expression der Männchen im Vergleich zu den Weibchen der Diätgruppen 75/10 und HCHF.

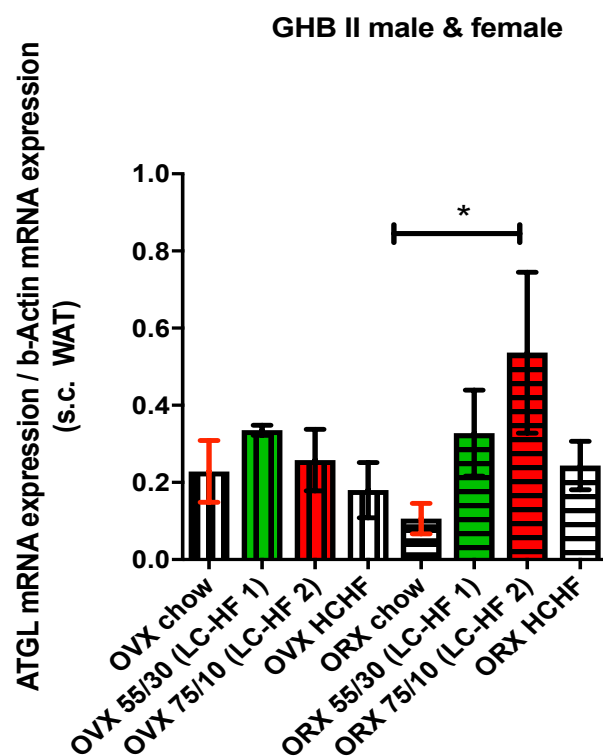


Abbildung 28: ATGL-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB II Männchen & Weibchen. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen der Versuchsgruppe GHB II.

#### 4.5.4 mRNA-Expression des Fettsäure-Synthase-Gen (FASN) im subkutanen Fettgewebe

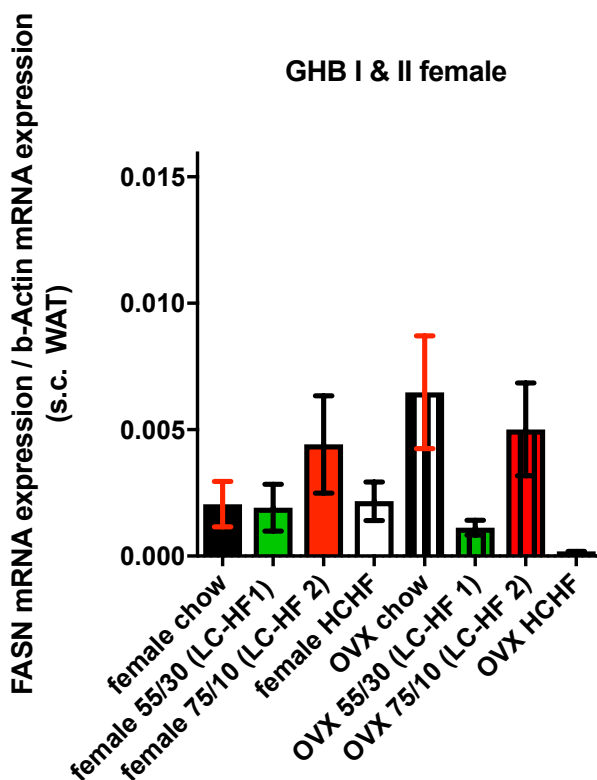


Abbildung 29: FASN-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I & II Weibchen. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

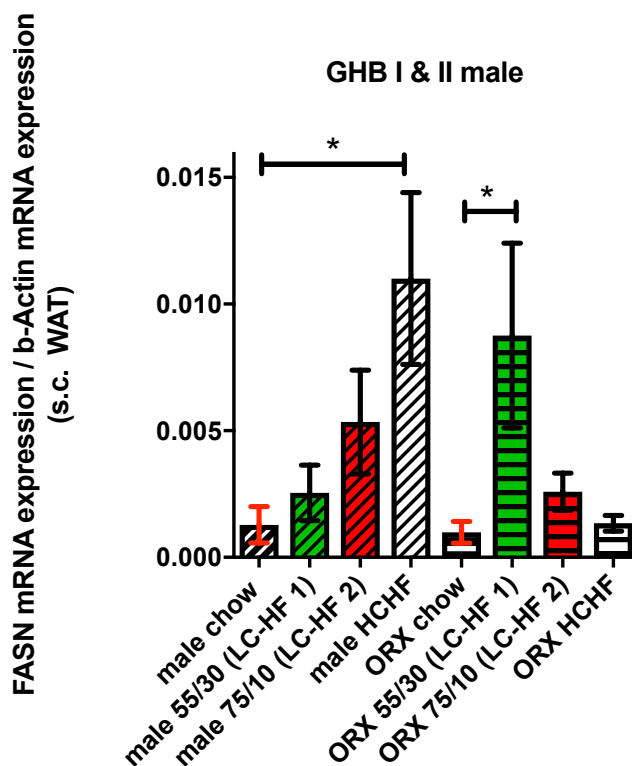


Abbildung 30: FASN-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I & II Männchen. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen GHB I und GHB II

Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, gibt es zwischen den Weibchen der verschiedenen Diät- und Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede in der FASN-Expression. Die gonadal intakten Männchen der Diätgruppe chow haben eine signifikant geringere FASN Expression als die gonadal intakten Männchen der Diätgruppe HCHF ( $p < 0,05$ ) (male chow  $0,001273 \pm 0,001758$  STD) vs. (male HCHF  $0,01101 \pm 0,01016$  STD). Zwischen den Kastraten zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied der Genexpression von FASN. Die Männchen der Diätgruppe 55/30 ORX hatten eine signifikant höhere FASN Expression als die Männchen der Diätgruppe chow ORX

( $p < 0,05$ ): (ORX chow 0,0009880 +/- 0,0009719 STD) vs. (ORX 55/30 [LC-HF 1] 0,008755g +/- 0,007290 STD) (Abbildung 30).

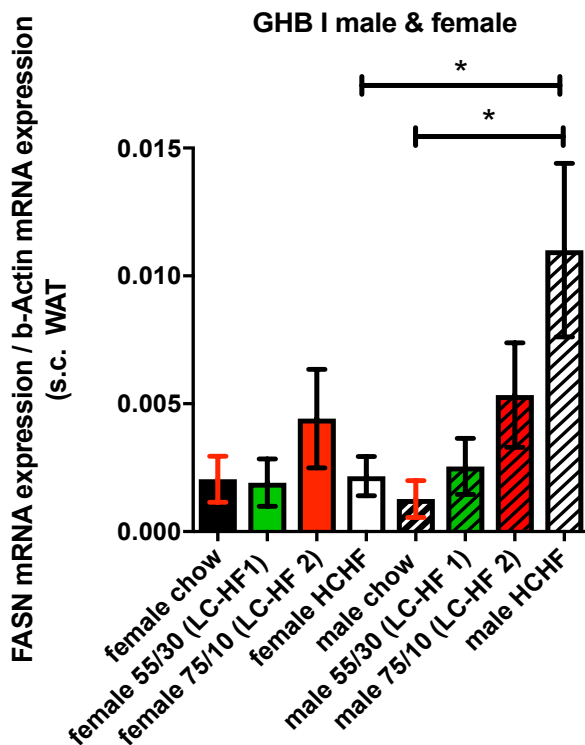


Abbildung 31: FASN-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I Männchen & Weibchen. Signifikant höhere FASN Expression der Männchen der Diätgruppe HCHF im Vergleich zu den Weibchen.

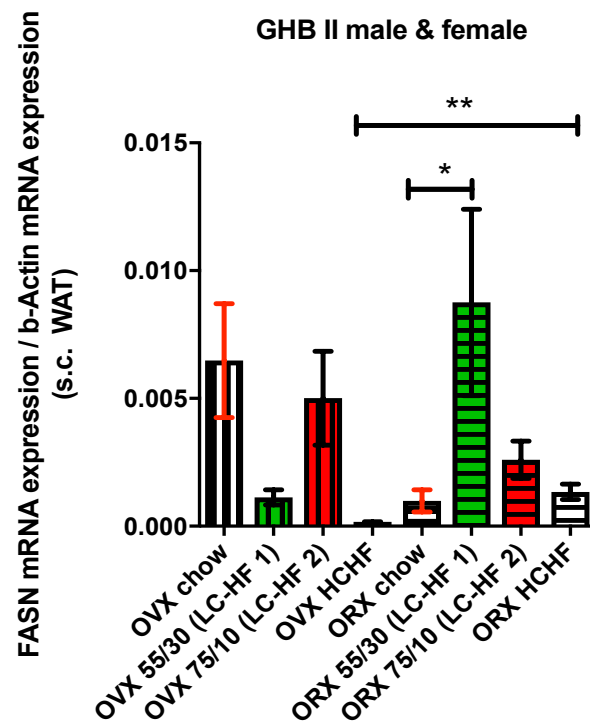


Abbildung 32: FASN-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB II Männchen & Weibchen. Signifikant höhere FASN-Expression der Männchen ORX der Diätgruppe HCHF im Vergleich zu den Weibchen OVX

Zwischen den gonadal intakten Männchen und Weibchen zeigten sich folgende Unterschiede (Abbildung 31). Die Genexpression der Weibchen der Diätgruppe HCHF war signifikant geringer als die der Männchen der Diätgruppe HCHF. Zwischen den gonadal intakten Männchen und Weibchen zeigten sich folgende Unterschiede. Die Genexpression der Weibchen der Diätgruppe HCHF war signifikant geringer als die der Männchen der Diätgruppe HCHF ( $p = 0,0296$ ): (male HCHF 0,01101 +/- 0,01016 STD) vs. (female HCHF 0,002169 +/- 0,002166 STD).

Wie in Abbildung 32 zu sehen, war die gemessene FASN-Genexpression bei den gonadal intakten Männchen der Diätgruppe HCHF signifikant höher als bei den

kastrierten Weibchen der Diätgruppe HCHF ( $p = 0,0045$ ): (OVX HCHF  $0,0001440 \pm 7,635e-005$  STD) vs. (ORX HCHF  $0,001344 \pm 0,0006834$  STD).

#### 4.5.5 mRNA-Expression des Growth Hormon Rezeptor (GHR)/Somatotropin Rezeptor im subkutanen Fettgewebe

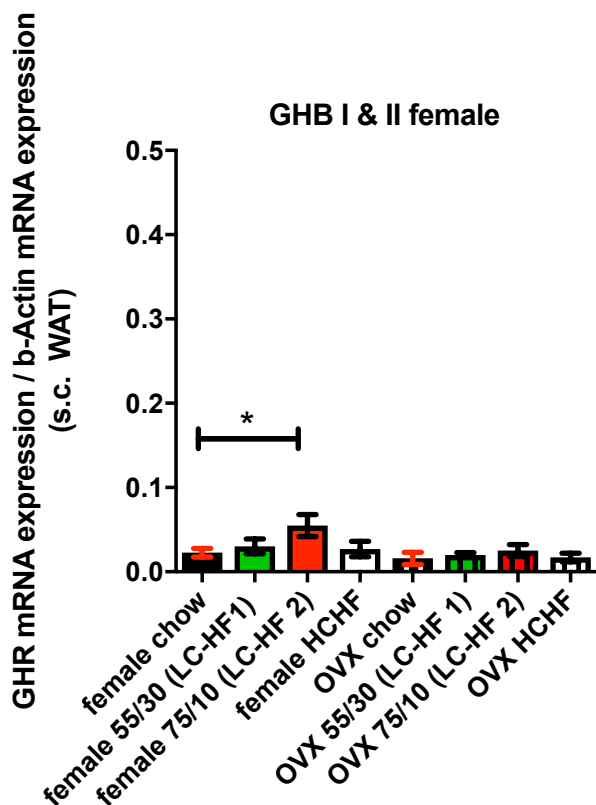


Abbildung 33: GHR-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I & II Weibchen. Kein signifikanter Unterschied zwischen den kastrierten und nicht kastrierten Weibchen.

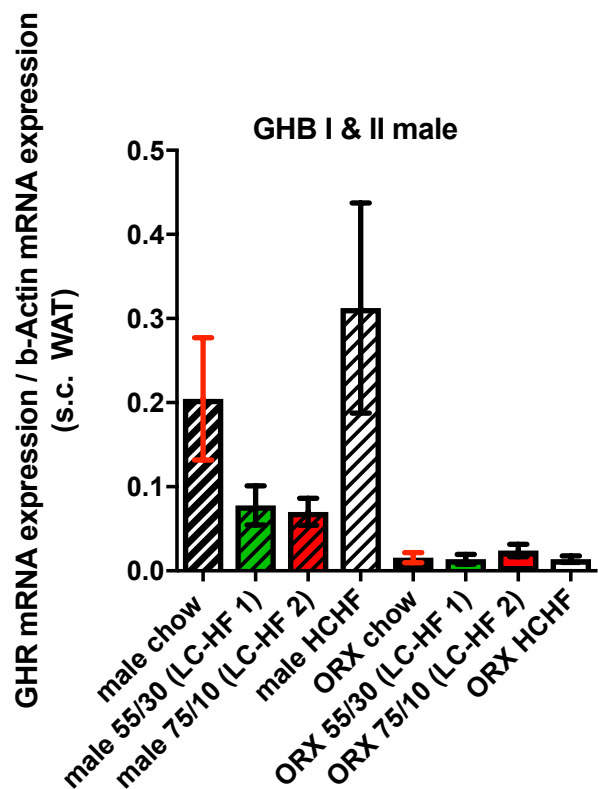


Abbildung 34: GHR-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I & II Männchen. Kein signifikanter Unterschied zwischen den ORX und Männchen.

Zwischen den gonadal intakten und den kastrierten Weibchen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Genexpression des GHR (Abbildung 33). Lediglich die gonadal intakten Weibchen der Diätgruppe 75/10 haben eine signifikant höhere Genexpression als die gonadal intakten Weibchen der Diätgruppe chow ( $p < 0,05$ ):

(female 55/30 [LC-HF 1] 0,03025 +/- 0,02488 STD) vs. (female chow 0,02269 +/- 0,01603 STD).

Zwischen den gonadal intakten und gonadal nicht intakten männlichen Tieren sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abbildung 34). Hier ist lediglich zu erkennen, dass die Genexpression von GHR in der gonadal nicht intakten Versuchsgruppe geringer war als die der gonadal intakten Gruppe.

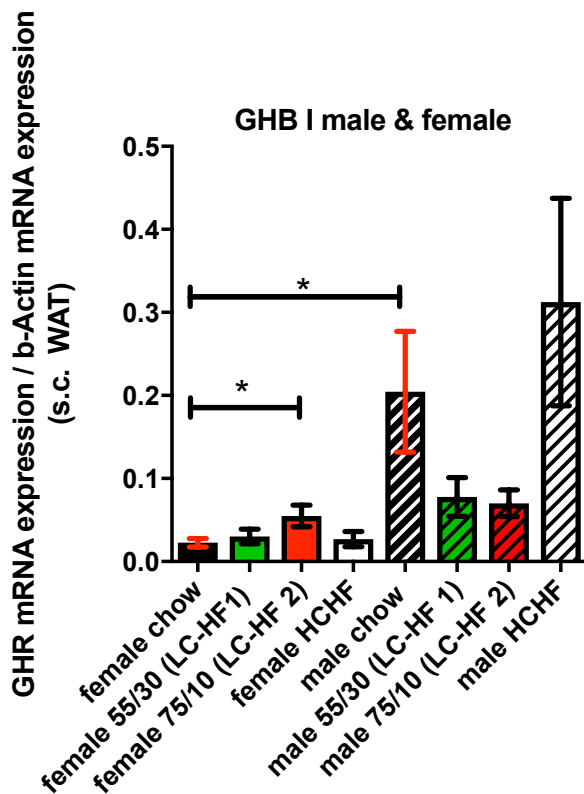


Abbildung 35: GHR-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I Männchen & Weibchen. Signifikant höhere GHR-Expression der Männchen im Vergleich zu den Weibchen der Diätgruppe chow.

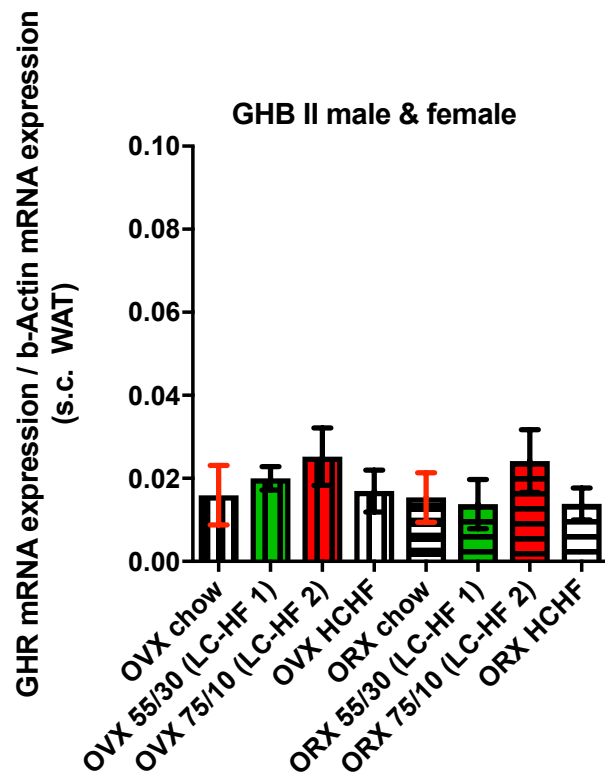


Abbildung 36: GHR-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB II Männchen & Weibchen. Keine signifikanten Unterschiede in der GHR-Expression zwischen den ORX und OVX.

In den Abbildungen 35 und 36 werden männliche und weibliche Tiere unter den verschiedenen Diäten vor bzw. nach Kastration (Abbildung 36) verglichen. Abbildung 35 zeigt, dass die Genexpression von GHR der Männchen der Diätgruppe chow signifikant höher ist als die der Weibchen derselben Diätgruppe ( $p = 0,0227$ ): (male chow 0,0245 +/- 0,2301 STD) vs. (female chow 0,02269 +/- 0,01603 STD). Abbildung

36 veranschaulicht erneut deutlich den Unterschied der Genexpression zwischen den gonadal intakten und den gonadal nicht intakten Tieren. Betrachtet man die Skalierung der Y-Achse, sieht man, dass die Expression des gesuchten Gens bei der Versuchsgruppe nach Kastration immens kleiner war als bei gonadal intakten Tieren. Zwischen den gonadal nicht intakten Tieren (Abbildung 36) zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede der Genexpression.

#### 4.5.6 mRNA-Expression von Adiponektin (AdipoQ) im subkutanen Fettgewebe

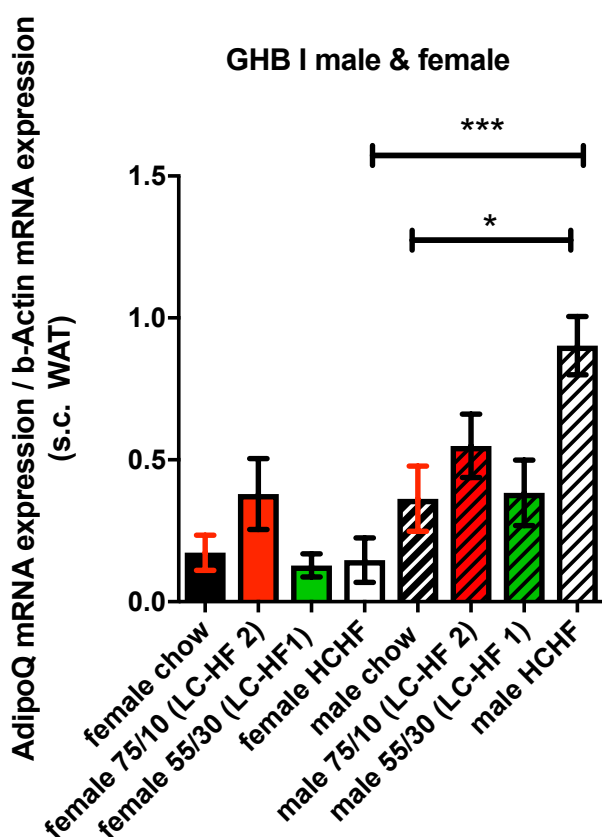


Abbildung 37: AdipoQ-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB I Männchen & Weibchen. Signifikant höhere AdipoQ-Expression der Männchen im Vergleich zu den Weibchen der Diätgruppe HCHF.

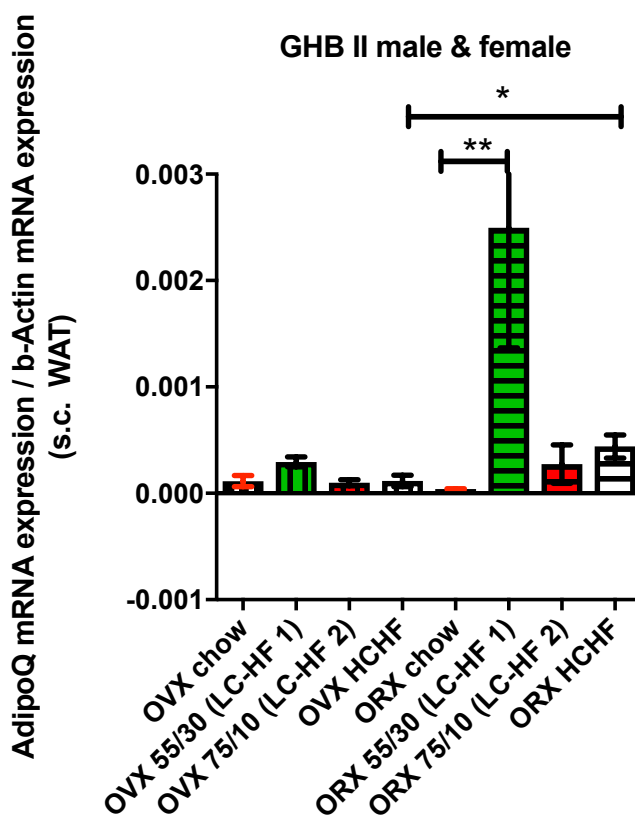


Abbildung 38: AdipoQ-mRNA-Expression des subkutanen Fettgewebes Housekeeping Gen beta-Aktin, Versuchsgruppe GHB II Männchen & Weibchen. Signifikant höhere AdipoQ-Expression der ORX im Vergleich zu den OVX der Diät HCHF.

Wie in Abbildung 37 zu sehen, ist die Genexpression von AdipoQ der gonadal intakten Weibchen der Diätgruppe HCHF signifikant geringer als die der gonadal intakten Männchen derselben Diätgruppe ( $p < 0.0001$ ): (male HCHF 0,9022 +/- 0,2906 STD) vs. (female HCHF 0,1464 +/- 0,2480 STD). Innerhalb der gonadal intakten Männchen zeigt sich ein signifikanter Unterschied der zwischen den Diätgruppen chow und HCHF. Hier ist die Genexpression von AdipoQ in der HCHF-Gruppe signifikant höher ( $p < 0,05$ ): (male chow 0,3628 +/- 0,3243 STD) vs. (male HCHF 0,9022 +/- 0,2906 STD). Wie in Abbildung 38 zu sehen, war die Nachweisgrenze für AdipoQ in der gonadal nicht intakten Versuchsgruppe deutlich geringer als in der gonadal intakten.

Besonders die Genexpression von AdipoQ der kastrierten Weibchen hat stark abgenommen. Es konnten dennoch signifikante Unterschiede der Genexpression zwischen den Diätgruppen HCHF der gonadal nicht intakten Weibchen und Männchen festgestellt werden. Hier war die Genexpression der Männchen signifikant höher als die der Weibchen ( $p = 0,0286$ ): (ORX HCHF 0,0004400 +/- 0,0002439 STD) vs. (OVX HCHF 0,0001160 +/- 0,0001203 STD). Zudem konnte innerhalb der männlichen Kastraten ein signifikanter Unterschied zwischen der Diätgruppe chow und 55/30 festgestellt werden ( $p < 0,05$ ): (ORX chow 2,800e-005 +/- 3,564e-005 STD) vs. (ORX 55/30 [LC-HF 1] 0,002495 +/- 0,002258 STD).

#### 4.6 Serum-Konzentration von Leptin

In folgender Abbildung (Abbildung 39) wurden nun die Serumwerte für Leptin untersucht. Hier zeigten sich folgende Unterschiede:

Als Trend war zu erkennen, dass vor allem die männlichen Kastraten niedrigere Leptin-Konzentrationen aufwiesen als die nicht kastrierten Tiere. Dasselbe hat sich bereits bei der mRNA-Konzentration von Leptin gezeigt. Innerhalb der Geschlechtergruppen waren folgende signifikante Unterschiede zu sehen:

Die Serum Leptin-Konzentration der gonadal intakten Weibchen der Diätgruppe chow waren signifikant geringer als die Tiere der Gruppe 55/30 (chow vs. 55/30 mit  $p < 0,05$ ), 75/10 (chow vs. 75/10 mit  $p < 0,05$ ) und (chow vs. HCHF mit  $p < 0,05$ ): (female chow 925,3 pg/ml +/- 411,2 pg/ml STD) vs. (female 75/10 [LC-HF 2] 2083 pg/ml +/- 1079



pg/ml STD) vs. (female 55/30 [LC-HF 1] 2313 pg/ml +/- 998,4 pg/ml STD) vs. (female

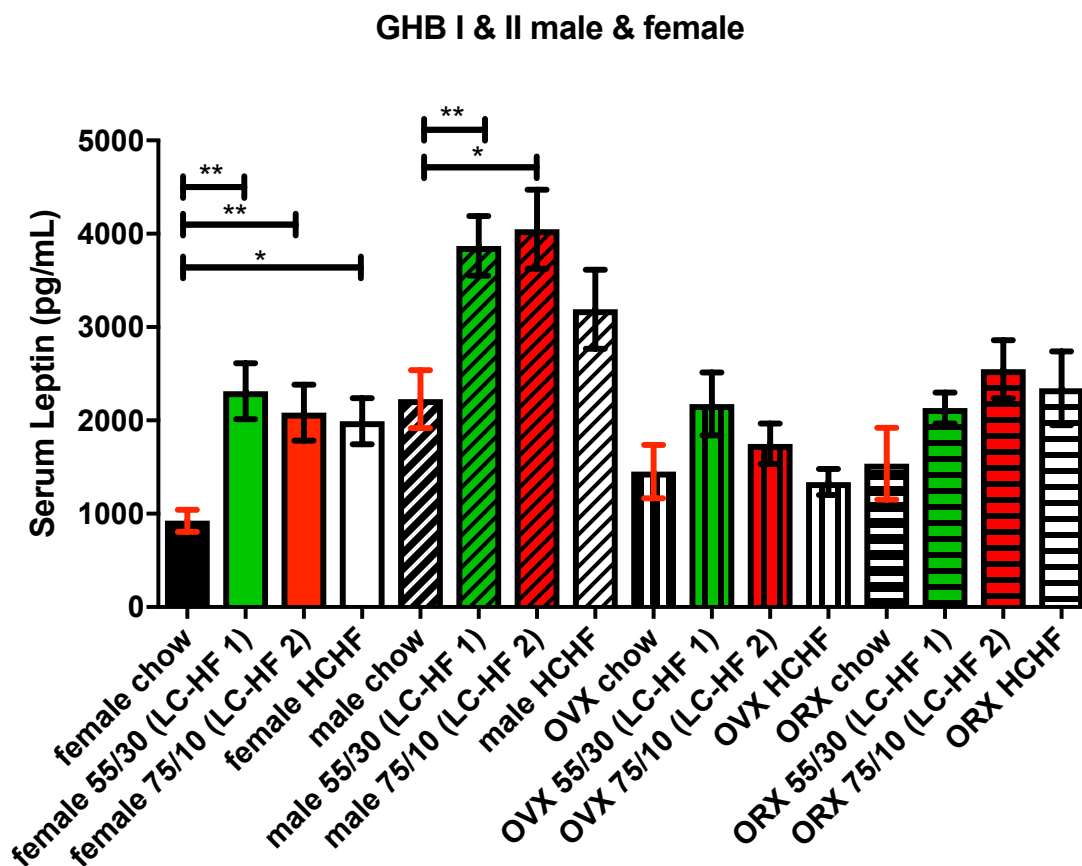


Abbildung 39: Serum-Leptin-Konzentration in (pg/ml) Versuchsgruppen GHB I Männchen & Weibchen, GHB II Männchen & Weibchen.

HCHF 1992 pg/ml +/- 858,2 pg/ml STD).

Die gonadal intakten Männchen zeigten folgende Unterschiede in der Serum-Leptin-Konzentration. Die Männchen der Diätgruppe chow wiesen eine signifikant geringere Leptin-Konzentration im Serum als die Männchen der Diätgruppe 55/30 auf

$p = 0,0058$ ): (male chow 2228 pg/ml +/- 1031 pg/ml STD) vs. (male 55/30 [LC-HF 1] 3870 pg/ml +/- 1060 pg/ml STD). Dasselbe war zwischen den beiden Diätgruppen chow und 75/10 zu sehen. Hier war die Leptin-Konzentration des Serums der mit 75/10 gefütterten Tiere signifikant höher als das der Männchen der chow Diät ( $p = 0,05$ ): (male chow 2228 pg/ml +/- 1031 pg/ml STD) vs. (male 75/10 [LC-HF 2] 4050 pg/ml +/- 1464 pg/ml STD). Zwischen den kastrierten Männchen und Weibchen waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

Innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen (vor Kastration/nach Kastration) zeigten sich folgende Unterschiede (Abbildung 40 und 41):

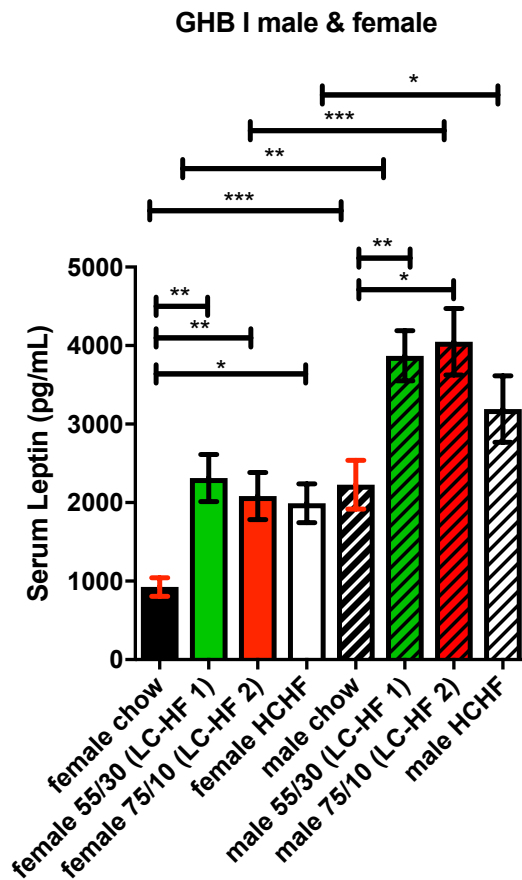


Abbildung 40: Serum-Leptin-Konzentration in pg/ml GHB I Weibchen & Männchen; signifikant höhere Leptin-Konzentration aller Diätgruppen der Männchen im Vergleich zu den Weibchen.

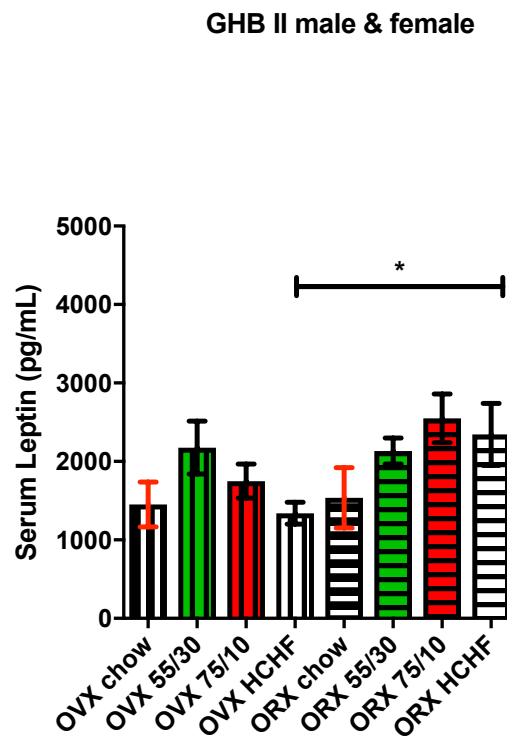


Abbildung 41: Serum-Leptin-Konzentration in pg/ml GHB II Weibchen & Männchen; signifikant höhere Leptin-Konzentration der ORX im Vergleich zu den OVX der Diät HCHF.

Die Leptin-Konzentration der gonadal intakten Männchen unter chow-Diät war signifikant höher als die der gonadal intakten Weibchen derselben Diätgruppe ( $p < 0,001$ ): (female chow 925,3 pg/ml +/- 411,2 pg/ml STD) vs. (male chow 2228 pg/ml +/- 1031 pg/ml STD). Dasselbe war bei der Diätgruppe 55/30 zu sehen. Hier war die Serum-Leptin-Konzentration der Weibchen erneut signifikant geringer als die der Männchen ( $p = 0,002$ ): (female 55/30 [LC-HF 1] 2313 pg/ml +/- 998,4 pg/ml STD) vs. (male 55/30 [LC-HF 1] 3870 pg/ml +/- 1060 pg/ml STD). In der Diätgruppe 75/10 war die Serum-Leptin-Konzentration der Weibchen erneut signifikant geringer als die der

Männchen ( $p < 0,001$ ): (female 75/10 [LC-HF 2] 2083 pg/ml +/- 1079 pg/ml STD) vs. (male 75/10 [LC-HF 2] 4050 pg/ml +/- 1464 pg/ml STD).

Zuletzt war auch die Serum-Leptin-Konzentration der Männchen der Diätgruppe HCHF signifikant geringer als die der Weibchen ( $p = 0,02$ ): (female HCHF 1992 pg/ml +/- 858,2 pg/ml STD) vs. (male HCHF 3192 pg/ml +/- 1407 pg/ml STD).

Wie in Abbildung 41 zu sehen, gab es nur einen signifikanten Unterschied der Serum-Leptin-Konzentration zwischen den männlichen und weiblichen Kastraten der Diätgruppe HCHF. Hier war die Serum-Leptin-Konzentration der Männchen signifikant höher als die der Weibchen ( $p = 0,04$ ), (OVX HCHF 1340 pg/ml +/- 341,5 pg/ml STD;) vs. (ORX HCHF 2346 pg/ml +/- 967,7 pg/ml STD).

#### 4.7 Serum-Insulin Assay

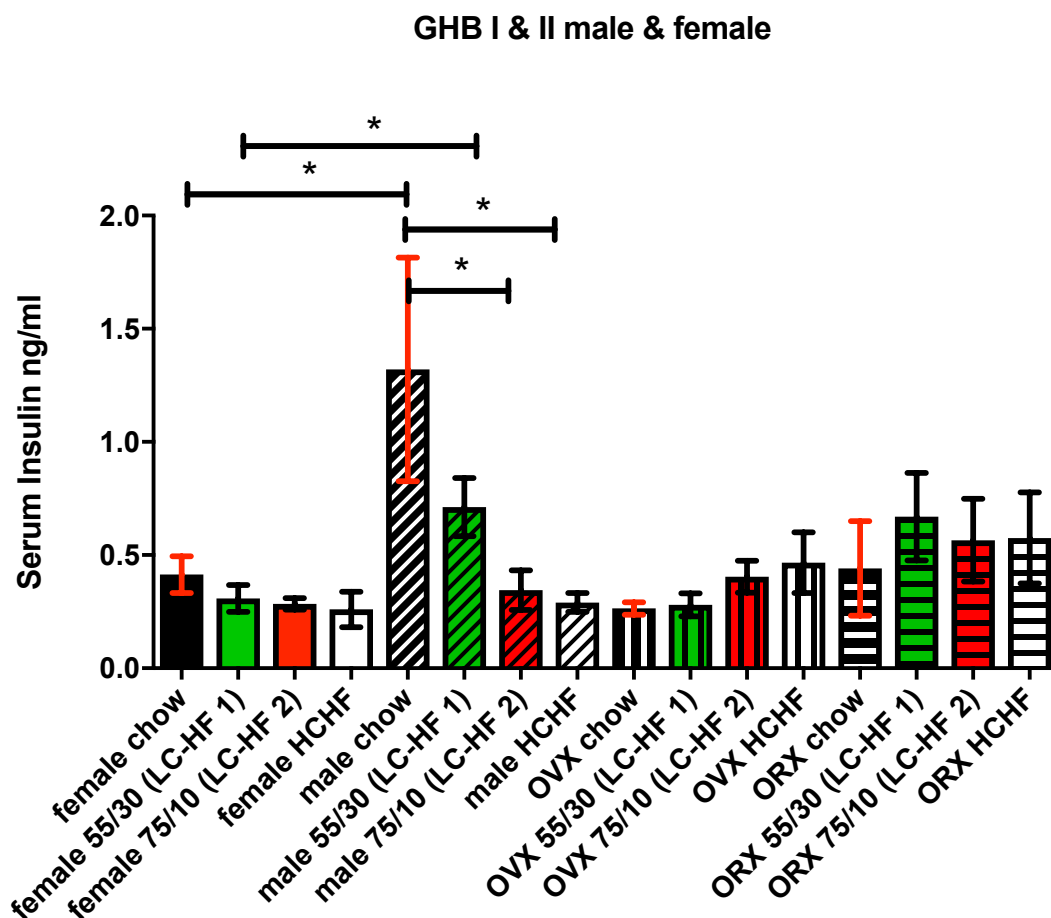


Abbildung 42: Serum-Insulin-Konzentration in (ng/ml) Versuchsgruppen GHB I Männchen & Weibchen, GHB II Männchen & Weibchen; Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kastraten OVX und ORX. Signifikant höhere Serum-Insulin-Werte der Männchen im Vergleich zu den Weibchen der Diätgruppen chow und 55/30.

Im Folgenden werden die Serumkonzentrationen des Insulins beschrieben. Aufgrund des Versuchsaufbaus sind die Werte annähernd an Nüchternwerte (Nahrungskarenz über 12 Stunden).

Wie in Abbildung 42 zu sehen, bestehen zwischen den kastrierten Tieren keine signifikanten Unterschiede.

In der gonadal intakten Versuchsgruppe ist die Serum-Insulin-Konzentration der weiblichen chow-Tiere signifikant geringer als die der männlichen chow-Tiere

( $p = 0,04$ ): (female chow 0,4140 ng/ml +/- 0,1985 ng/ml STD) vs. (male chow 1,321 ng/ml +/- 0,9880 ng/ml STD). Dasselbe gilt für die weiblichen Tiere der Diätgruppe 55/30.

Deren Insulin-Serum-Konzentration ist signifikant geringer als die der Männchen der Diätgruppe 55/30 ( $p = 0,03$ ): (female 55/30 [LC-HF 1] 0,3088 ng/ml +/- 0,1331 ng/ml STD) vs. (male 55/30 [LC-HF 1] 0,3446 ng/ml +/- 0,1958 ng/ml STD). Innerhalb der gonadal intakten Männchen gab es folgende signifikante Unterschiede. Die männlichen Tiere der chow-Diät wiesen signifikant höhere Serum-Insulin-Konzentrationen als die der Diätgruppe 75/10 auf ( $p = 0,05$ ): (male chow 1,321 ng/ml +/- 0,9880 ng/ml STD) vs. (male 75/10 [LC-HF 2] 0,3446 ng/ml +/- 0,1958 ng/ml STD). Analog war die Serum-Insulin-Konzentration der Diätgruppe male chow signifikant höher als die der Diätgruppe HCHF ( $p = 0,05$ ): (male chow 1,321 ng/ml +/- 0,9880 ng/ml STD) vs. (male HCHF 0,2905 ng/ml +/- 0,08268 ng/ml STD).

#### 4.8 Serum-IGF-I Assay

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Serum-IGF-I-Konzentration (ng/ml) besprochen.

Wie in Abbildung 43 zu sehen, gab es zwischen den nicht kastrierten und kastrierten Weibchen signifikante Unterschiede in der IGF-I-Konzentration im Serum. Die Tiere der Diätgruppe chow wiesen eine signifikant geringere IGF-I-Konzentration im Serum auf als die Kastraten ( $p = 0,04$ ): (female chow 745,7 ng/ml +/- 144,1 ng/ml STD) vs. (OVX chow 974,2 ng/ml +/- 278,9 ng/ml STD). Dasselbe war bei den Weibchen der Diätgruppe 55/30 zu sehen. Hier wiesen die kastrierten Weibchen eine signifikant höhere IGF-I-Konzentration, als die nicht kastrierten Weibchen mit 55/30 auf

( $p = 0,002$ ): (female 55/30 [LC-HF 1] 643,9 ng/ml +/- 156,4 ng/ml STD) vs. (OVX 55/30 [LC-HF 1] 1017 ng/ml +/- 227,6 ng/ml STD). Die IGF-I-Konzentration der kastrierten Diätgruppe 75/10 war erneut signifikant höher als die der nicht kastrierten Weibchen ( $p = 0,001$ ): (OVX 75/10 [LC-HF 2] 844,5 ng/ml +/- 184,6 ng/ml STD) vs. (female 75/10 [LC-HF 2] 524,5 ng/ml +/- 144,3 ng/ml STD). Zuletzt war die IGF-I-Konzentration der Kastraten der Diätgruppe HCHF auch signifikant höher als die der nicht kastrierten Weibchen HCHF ( $p < 0,001$ ): (female HCHF 615,1 ng/ml +/- 192,8 ng/ml STD) vs. (OVX HCHF 1037 ng/ml +/- 180,5 ng/ml STD).

Zusammenfassend war die gesamte IGF-I-Serumkonzentration der kastrierten Weibchen signifikant höher als die der nicht kastrierten Weibchen zwischen denselben Diätgruppen.

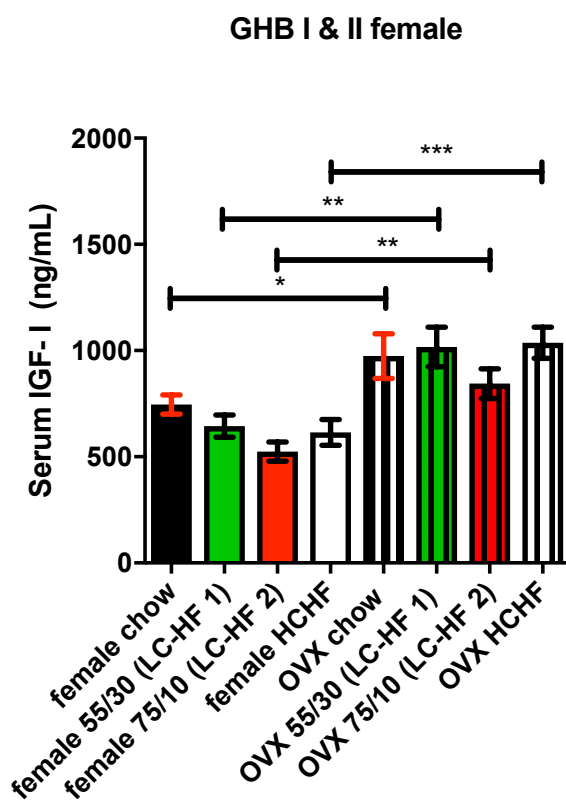


Abbildung 43: Serum IGF-I-Konzentration in ng/ml GHB I & GHB II Weibchen; signifikant höhere Serum-IGF-I-Konzentrationen aller OVX gegenüber den Weibchen.

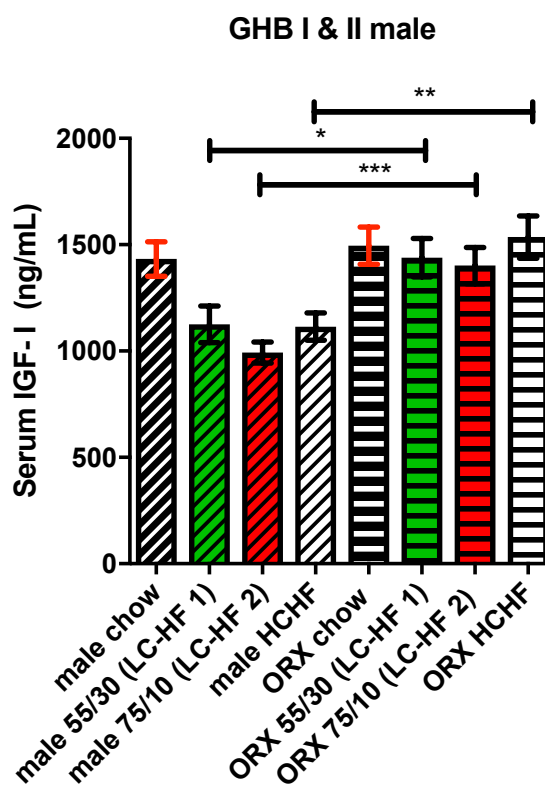


Abbildung 44: Serum IGF-I-Konzentration in ng/ml GHB I & GHB II Männchen; signifikant höhere Serum-IGF-I-Konzentrationen der ORX gegenüber den Männchen in den Diätgruppen 55/30, 75/10, HCHF.

Wie in Abbildung 44 zu sehen, gab es zwischen gonadal intakten und den gonadal nicht intakten Männchen den Versuchsgruppen signifikante Unterschiede. Die Serum-IGF-I-Konzentration der gonadal intakten Männchen der Diätgruppe 55/30 war signifikant geringer als die der kastrierten Männchen 55/30 ( $p = 0,03$ ): (male 55/30 [LC-HF 1] 1125 ng/ml +/- 258,1 ng/ml STD) vs. (ORX 55/30 [LC-HF 1] 1439 ng/ml +/- 221,6 ng/ml STD). Dasselbe zeigte sich bei den Tieren der Diätgruppe 75/10. Hier wiesen die Kastraten signifikant höhere Serum-IGF-I-Konzentrationen als die nicht kastrierten Männchen auf ( $p < 0.001$ ): (male 75/10 [LC-HF 2] 992,6 ng/ml +/- 147,6 ng/ml STD) vs. (ORX 75/10 [LC-HF 2] 1402 ng/ml +/- 190,6 ng/ml STD). Zwischen den Versuchsgruppen kam es auch in der Diätgruppe HCHF zu signifikanten Unterschieden. Hier war die IGF-I-Konzentration der Kastraten (ORX) signifikant höher als die der gonadal intakten Männchen ( $p = 0,003$ ): (male HCHF 1115 ng/ml +/- 193,5 ng/ml STD) vs. (ORX HCHF 1536 ng/ml +/- 243,6 ng/ml STD).

In Abbildung 45 wurden die Ergebnisse der Serum-IGF-I-Konzentration der gonadal intakten Männchen und Weibchen gegenübergestellt. Hier war zu sehen, dass gonadal intakte Männchen eine in jeder Diätgruppe höhere Baseline als die Weibchen hatten. Innerhalb der gonadal intakten Weibchen wies die Diätgruppe chow eine signifikant höhere Serum-IGF-I-Konzentration als die Diätgruppe 75/10 auf ( $p = 0,01$ ):

(female chow 745,7 ng/ml +/- 144,1 ng/ml STD) vs. (female 75/10 [LC-HF 2] 524,5 ng/ml +/- 144,3 ng/ml STD). Bei den gonadal intakten Männchen wies die Diätgruppe chow signifikant höhere Serumkonzentrationen von IGF-I im Vergleich mit den Diätgruppen 55/30; 75/10 und HCHF auf: (chow vs. 55/30 mit  $p = 0,01$ ): (male chow 1433 ng/ml +/- 242,2 ng/ml STD) vs. (male 55/30 [LC-HF 1] 1125 ng/ml +/- 258,1 ng/ml STD); (chow vs. 75/10 mit  $p < 0.001$ ): (male chow 1433 ng/ml +/- 242,2 ng/ml STD) vs. (male 75/10 [LC-HF 2] 992,6 ng/ml +/- 147,6 ng/ml STD); (chow vs. HCHF mit  $p = 0,010$ ): (male chow 1433 ng/ml +/- 242,2 ng/ml STD) vs. (male HCHF 1115 ng/ml +/- 193,5 ng/ml STD).

Wie in Abbildung 46 zu sehen, kam es innerhalb der Geschlechter der kastrierten Versuchsgruppe zu keinen signifikanten Unterschieden der Serum-IGF-I-Konzentration. Es war dennoch zu sehen, dass die Baseline der IGF-I-Konzentration der Männchen höher war als die der Weibchen.

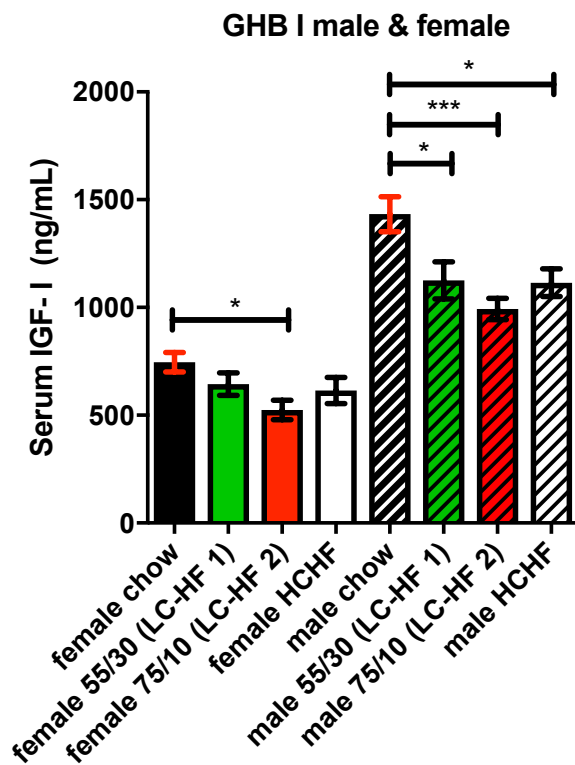


Abbildung 45: Serum IGF-I-Konzentration in ng/ml GHB I Männchen & Weibchen. Geringere Serumkonzentration von IGF-I der Weibchen vs. Männchen.

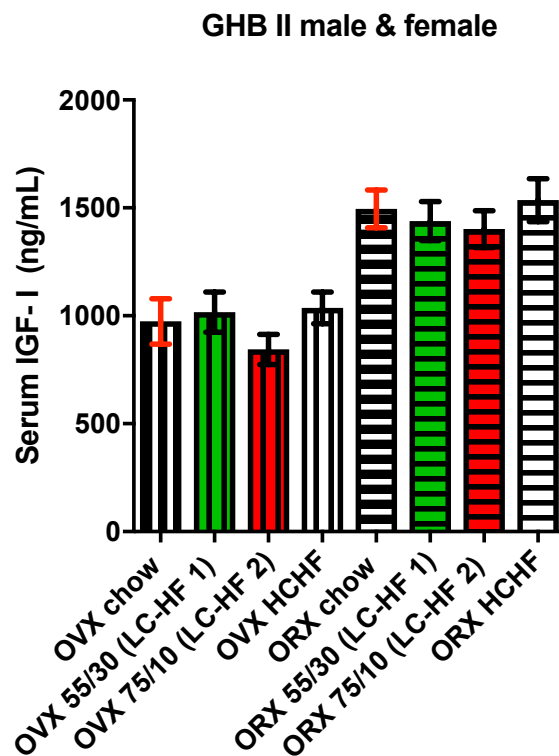


Abbildung 46: Serum IGF-I-Konzentration in ng/ml GHB II Männchen & Weibchen. Geringere Serum-IGF-1-Konzentration der OVX vs. ORX.

#### 4.9 Serum-GH Assay

Im Gegensatz zu den bisher erhobenen Serum Parametern können die GH-Serienblutabnahmen als Mittelwerte aller Messwerte nicht sinnvoll dargestellt werden. Die GH-Sekretion erfolgt wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, pulsatil und abhängig von Stimulatoren bzw. Inhibitoren [72]. Einzelne Messwerte sind daher nicht repräsentativ, um die GH-Sekretion abzubilden. Die beste Möglichkeit der graphischen Darstellung bietet ein sogenannter Rank-Plot. In diesem werden alle Werte einer Gruppe aufsteigend sortiert und mit einem Rang versehen. Um die Darstellung zu veranschaulichen, wurden nicht alle totalen Zahlen auf den Rank aufgetragen, sondern alle Gruppen auf 100 Rängen genormt. So lassen sich nun in einem XY-Schaubild die Ranks gegen die Messwerte anzeigen. Die statistische Interpretation solch einer solchen Rank-Skala ist komplex und wird auch in der Literatur selten beschrieben. Für die

eigentliche Fragestellung dieser Arbeit – große Unterschiede zwischen den Diät- und Geschlechtsgruppen - wurde sich für eine rein deskriptive Darstellung entschieden.

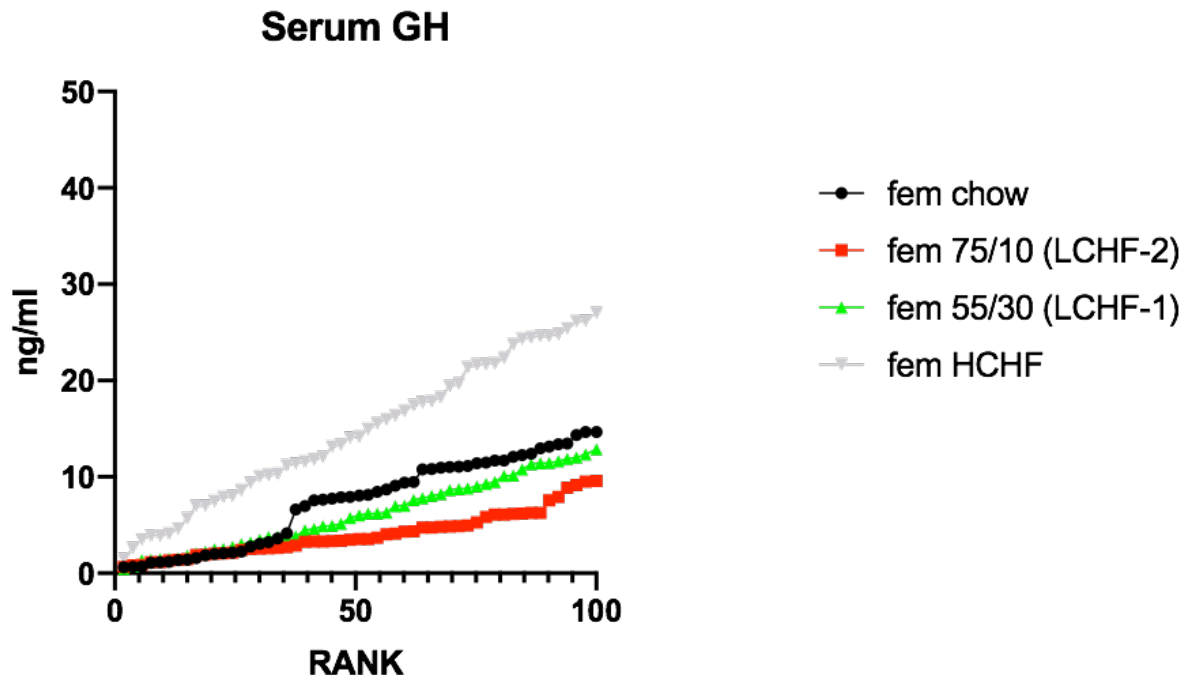


Abbildung 47: GH im Serum in ng/ml der Weibchen der Versuchsgruppe GHB I. Deutlich geringere Serum-GH-Werte in den beiden LC-HF-Diäten (rot/grün). Hingegen bei den kohlenhydratreichen Diäten HCHF und chow-Diät, höhere Serum GH Werte.

Bei den in Abbildung 47 dargestellten gonadal intakten Weibchen liegen die GH-Werte in den Diätgruppen mit höherem Kohlenhydratanteil (chow, HCHF) durchwegs über denen in den mit LC-HF-Diäten gefütterten Tieren. Die zweithöchsten Serum-GH-Konzentrationen weisen die Weibchen unter chow-Diät auf. Die Höhe der Serum-GH-Konzentrationen ist offensichtlich abhängig von dem Kohlenhydratanteil der Nahrung. Betrachtet man die geringen Serum-GH-Konzentrationen der Diätgruppen 75/10 und 55/30, scheint die GH Sekretion zudem durch einen hohen Fettanteil der Nahrung supprimiert zu werden.

Anders verhält es sich bei den gonadal intakten männlichen Tieren (Abbildung 48). Hier scheinen sich die verschiedenen Diäten nicht auf die GH Sekretion auszuwirken.

Bei männlichen und weiblichen Tieren nach Kastration zeigt sich, wie in Abbildung 49 und 50 ersichtlich, kein eindeutiger Unterschied in der GH-Sekretion zwischen den einzelnen Diätgruppen.



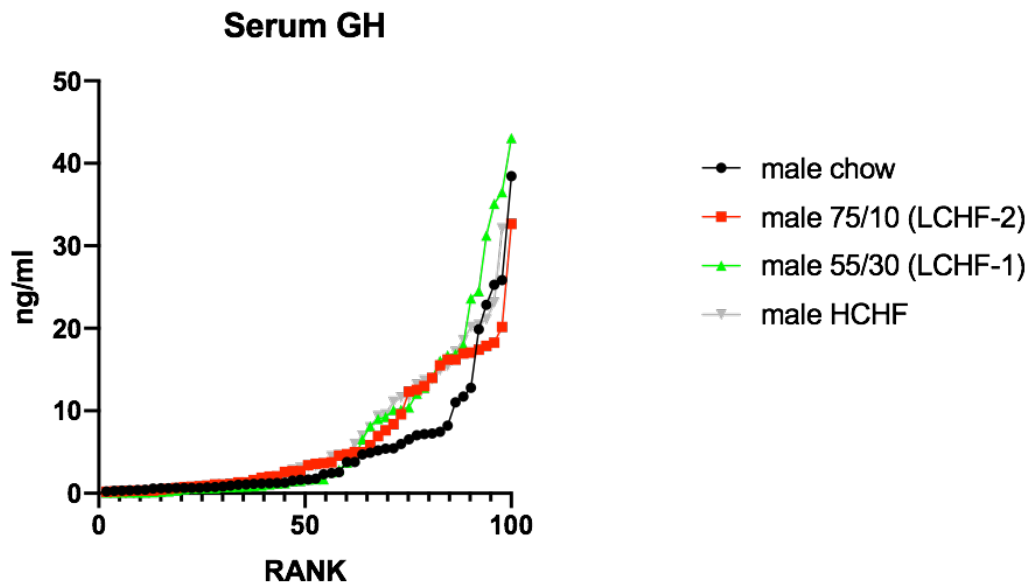


Abbildung 48: GH im Serum in ng/ml der Männchen aus dem Versuch GHB I. Scheinbar keine Unterschiede der GH Sekretion unter den verschiedenen Diätgruppen

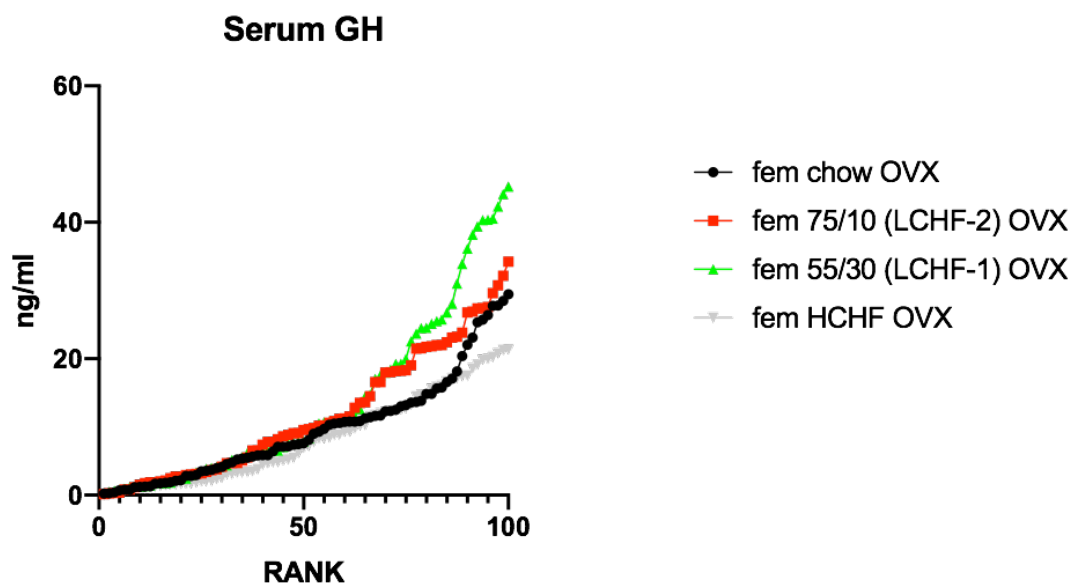


Abbildung 49: GH im Serum in ng/ml der Weibchen aus dem Versuch GHB II. Nach Kastration kein Unterschied mehr in der GH-Sekretion. Keine Suppression mehr durch LCHF Diäten.

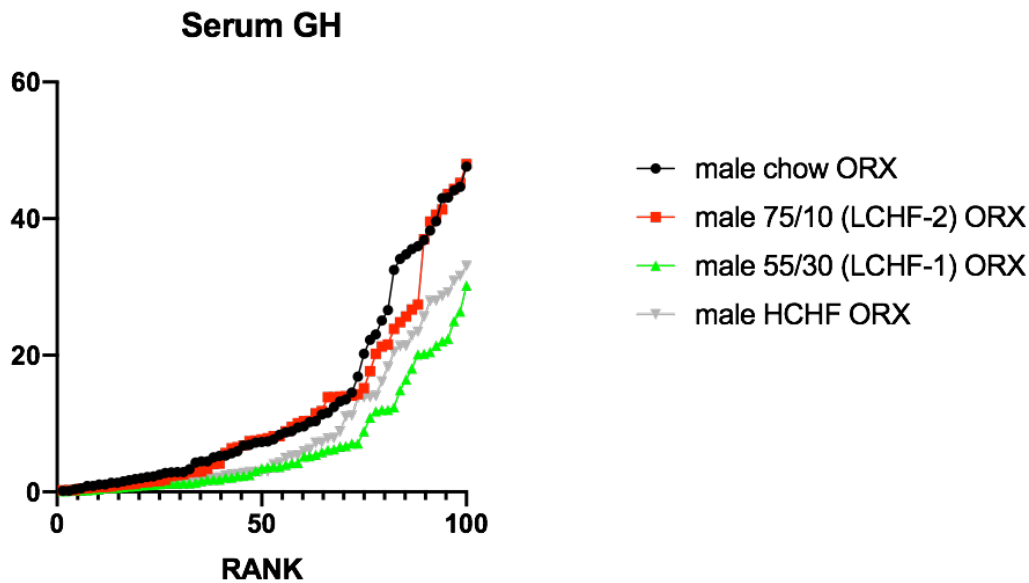
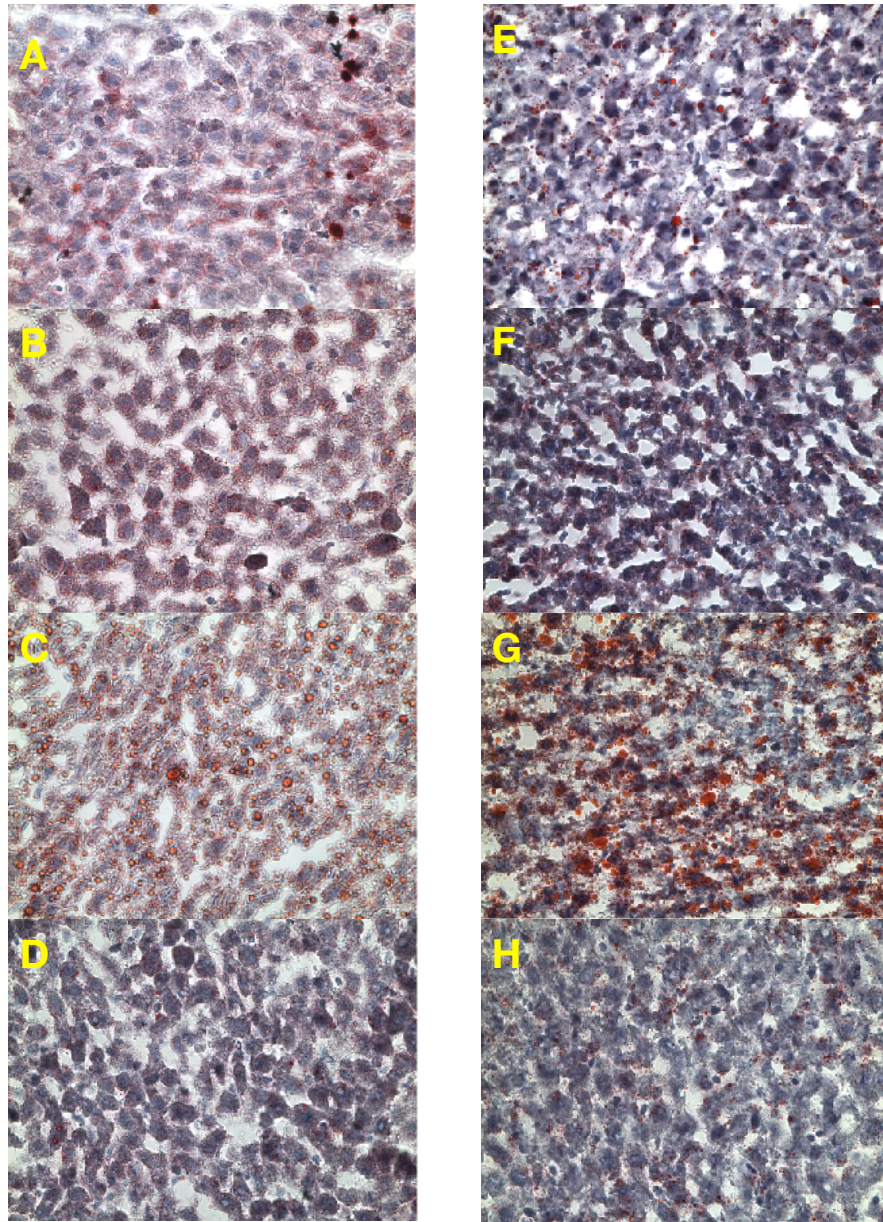


Abbildung 50: GH im Serum in ng/ml der Männchen aus dem Versuch GHB II. Wie schon bei den umkastrierten Tieren kein Unterschied in der GH-Sekretion.

#### 4.10 Leberhistologie (Red-Oil-Färbung)

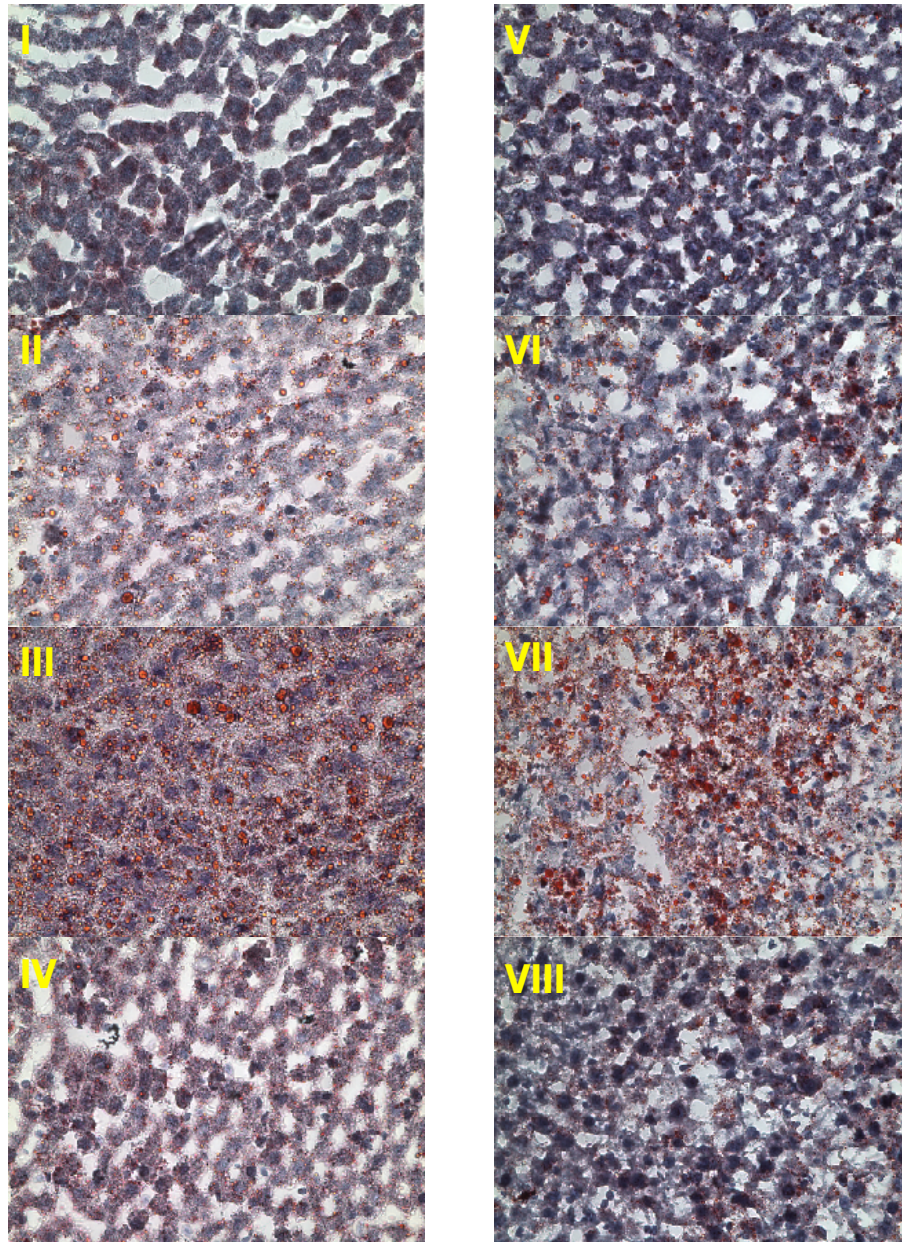
Wie in Kapitel 3.7 beschrieben, wurden die Lebern histologisch gefärbt und analysiert. Im Folgenden werden zunächst die Fotografien der einzelnen Präparate gezeigt, dann die statistische Auswertung beschrieben. Die Methodik der statistischen Auswertung anhand repräsentativer Schnitte wurde in Kapitel 3.8.8 beschrieben. **A** bis **D** entspricht den Diäten female chow, female 55/30 (LC-HF 1), female 75/10 (LC-HF 2) und female HCHF. **E** bis **H** den korrespondierenden Diäten aus dem Versuch nach Kastration: OVX chow, OVX 55/30 (LC-HF 1), OVX 75/10 (LC-HF 2), OVX HCHF.

**I** bis **IV** entsprechen den Diäten male-chow, male 55/30 (LC-HF 1), male 75/10 (LC-HF 2) und male HCHF, **V** bis **VIII** den korrespondierenden Diäten aus dem Versuch nach Kastration: ORX chow, ORX 55/30 (LC-HF 1), ORX 75/10 (LC-HF 2), ORX HCHF.



Abbildungen A-D: histologische Leberpräparate der Weibchen GHB I  
Abbildungen E-H: histologische Leberpräparate Weibchen OVX GHB II  
Die rot angefärbten Bereiche entsprechen den durch die Red-Oil-Färbung angefärbten  
Deutlich verstärkte Anfärbung der Präparate C und G.





Abbildungen I-IV: histologische Leberpräparate der Männchen GHB I

Abbildungen V-VIII: histologische Leberpräparate Männchen ORX GHB II

Die rot angefärbten Bereiche entsprechen den durch die Red-Oil-Färbung angefärbten Adipozyten. Deutlich erhöhte Färbung der Präparate III und VII.

Abbildung 51 zeigt die Ergebnisse der Leberhistologie der weiblichen Tiere vor und nach Ovariectomie. In beiden Versuchsgruppen beobachtet man eine signifikante Zunahme des Fetts von der chow-Diätgruppe zur 75/10-Diätgruppe. Die Leberpräparate der gonadal intakten Diätgruppe chow weisen signifikant weniger Fett als die Leberpräparate der Diätgruppe 75/10 auf ( $p < 0,0001$ ): (female chow  $1,334\% \pm 0,9234\%$  STD) vs. (female 75/10 [LC-HF 2]  $12,79\% \pm 4,703\%$  STD). Dasselbes ist

auch in der Versuchsgruppe, der ovariectomierten Weibchen, zu erkennen. Hier ist der prozentuale Fettanteil der Leberpräparate Diätgruppe chow signifikant geringer als der prozentuale Fettanteil der Diätgruppe 75/10 ( $p < 0,0001$ ): (OVX chow 2,686%  $\pm$  0,9599% STD) vs. (OVX 75/10 [LC-HF 2] 13,72%  $\pm$  1,566% STD).

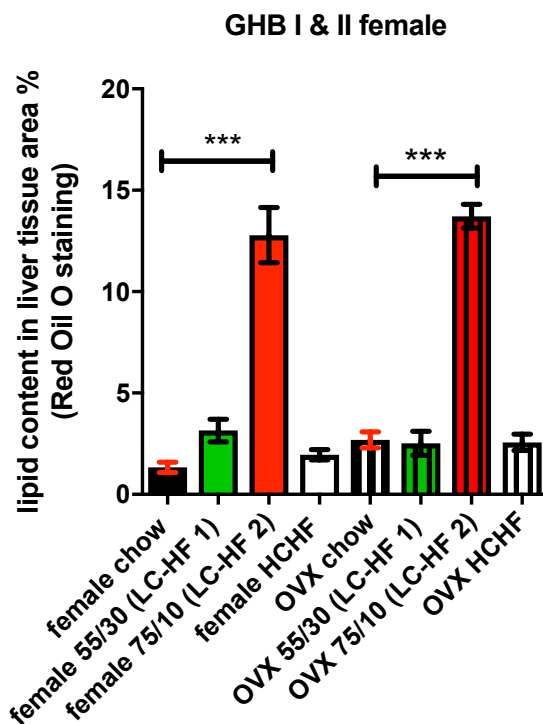


Abbildung 51: Prozentualer Fettanteil der Leberpräparate mit Red-Oil-Färbung in %

Versuchsgruppe GHB I & GHB II  
Weibchen: Höchster Fettanteil des Lebergewebes bei der Diätgruppe 75/10, als auch der OVX Tiere derselben Gruppe.

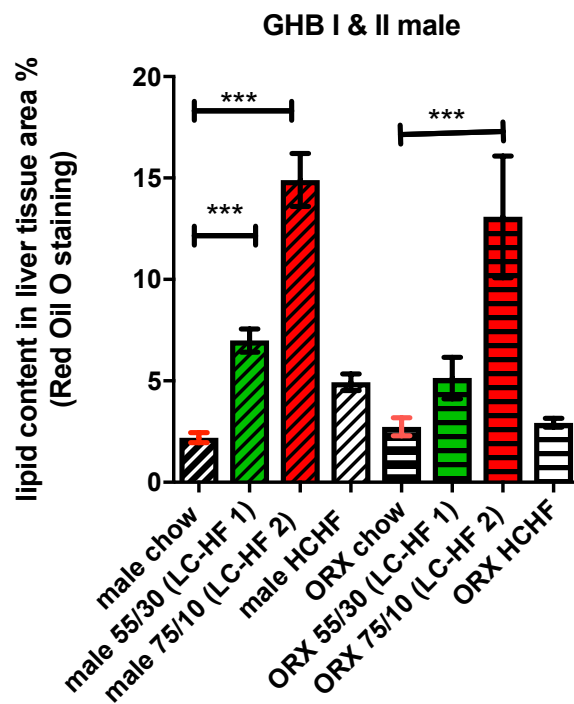


Abbildung 52: Prozentualer Fettanteil der Leberpräparate mit Red-Oil-Färbung in %

Versuchsgruppe GHB I & GHB II  
Männchen: Höchster Fettanteil des Lebergewebes bei den Männchen und ORX der Diätgruppe 75/10.

Abbildung 52 vergleicht die männlichen Tiere vor und nach Kastration. Hier ist wie bereits bei den Weibchen, erneut zu sehen, dass der prozentuale Fettanteil der Leberpräparate der Diätgruppe 75/10 sowohl bei den Kastraten als auch nicht kastrierten Männchen signifikant am höchsten ist. Die gonadal intakten Männchen der Diätgruppe chow weisen einen signifikant geringeren Fettanteil der Lebern auf als die gonadal intakten Männchen der Diätgruppe 75/10 ( $p < 0,0001$ ): (male chow 2,200%  $\pm$  0,8282% STD) vs. (male 75/10 [LC-HF 2] 14,90%  $\pm$  4,689% STD). Ebenso ist der

Fettanteil der Leberpräparate der Diätgruppe 55/30 signifikant höher als die der Diätgruppe chow ( $p = 0,0002$ ): (male chow 2,200%  $\pm$  0,8282% STD) vs. (male 55/30 [LC-HF 1] 6,987%  $\pm$  1,972% STD). In der Versuchsgruppe der Kastraten, zeigt sich folgendes Ergebnis: Die männlichen Kastraten der Diätgruppe chow weisen einen signifikant geringeren prozentualen Fettanteil der Leber auf als die Kastraten der Diätgruppe 75/10 ( $p = 0,0002$ ): (ORX chow 2,734%  $\pm$  1,082% STD) vs. (ORX 75/10 [LC-HF 2] 13,09%  $\pm$  6,709% STD).

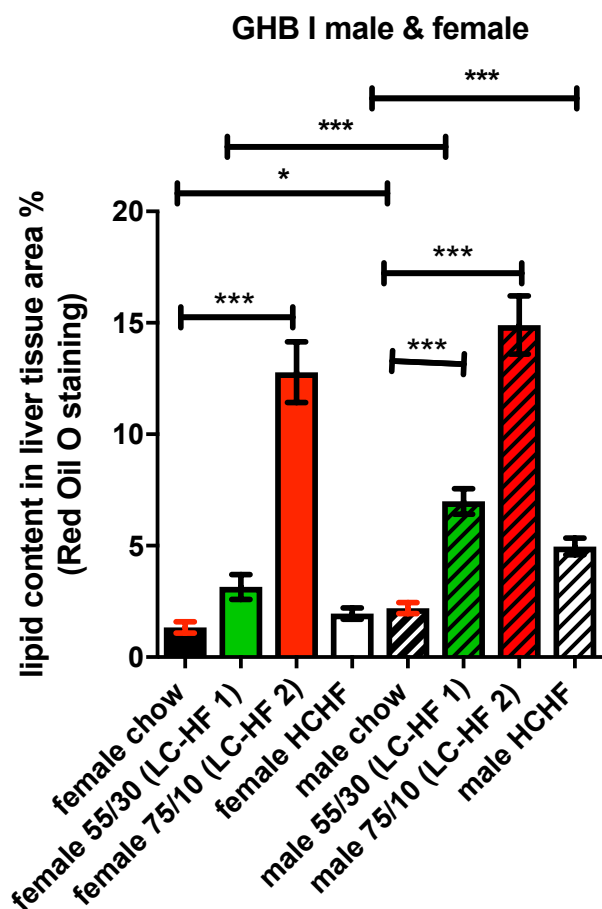


Abbildung 53: Prozentualer Fettanteil der Leberpräparate mit Red-Oil-Färbung in % Versuchsgruppe GHB I Männchen & . Signifikant höherer prozentualer Leberfettanteil der Männchen gegenüber den Weibchen in den Diätgruppen chow, 55/30, HCHF.

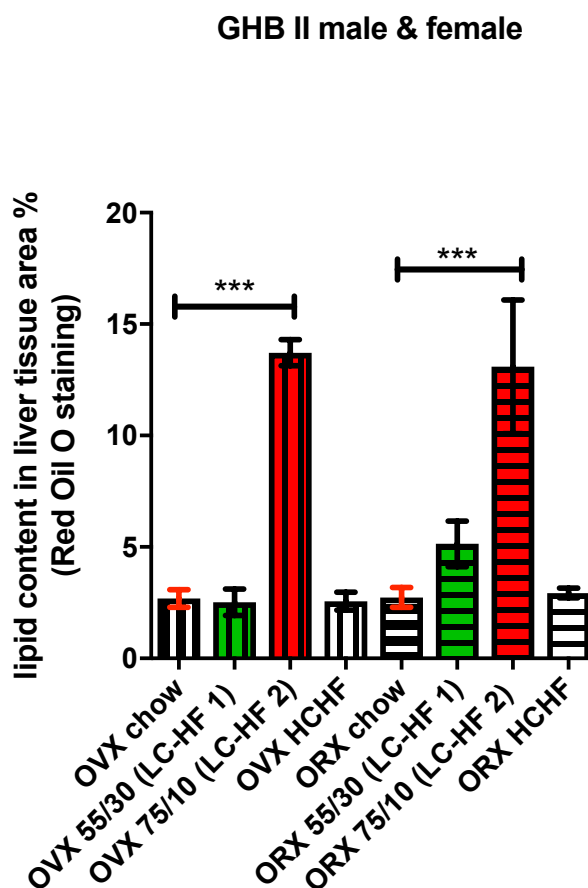


Abbildung 54: Prozentualer Fettanteil der Leberpräparate mit Red-Oil-Färbung in % Versuchsgruppe GHB II Männchen & Weibchen. Kein signifikanter Unterschied zwischen den OVX und ORX Tieren.

Die oben gezeigten Abbildungen 53 und 54 beschreiben die Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen innerhalb einer Versuchsgruppe.

Wie in Abbildung 53 zu sehen, gibt es auch zwischen den Geschlechtern der gonadal intakten Versuchsgruppe signifikante Unterschiede. Der Leberfettanteil der Weibchen der Diätgruppe chow war signifikant geringer als der der männchen Diätgruppe chow ( $p = 0,0254$ ): (female chow 1,334% +/- 0,9234% STD) vs. (male chow 2,200% +/- 0,8282% STD). Der Fettanteil der Lebern der männchen Diätgruppe 55/30 war signifikant geringer als der der Weibchen 55/30 ( $p < 0,0001$ ): (female 55/30 [LC-HF 1] 3,149% +/- 1,846% STD) vs. (male 55/30 [LC-HF 1] 6,987% +/- 1,972% STD). Ein erneut signifikanter Unterschied des Leberfettanteils zeigte sich zwischen den Männchen und Weibchen der Diätgruppe HCHF. Hier war der prozentuale Fettanteil der Lebern bei den Weibchen (HCHF) signifikant geringer als bei den Männchen HCHF ( $p < 0,001$ ): (female HCHF 1,954% +/- 0,8971% STD) vs. (male HCHF 4,919% +/- 1,289% STD).

Wie in Abbildung 54 zu sehen, gab es zwischen den Geschlechtern der Kastraten keine signifikanten Unterschiede des Leberfettanteils.

## 5. Diskussion

### 5.1 Bewertung der angewandten Methoden

#### 5.1.1 Tierhaltung

Zunächst gehe ich auf die Tierhaltung und den Versuchsaufbau ein.

Die kastrierten Tiere waren bei Ankunft im Stall genauso alt wie die nicht kastrierten Tiere. Durch die Kastration und die danach eingefügte einwöchige Erholungsphase waren die Tiere daher zum Zeitpunkt der Fütterungsexperimente ca. Zwei Wochen älter. Es ist nicht ausgeschlossen, dass dieser Altersunterschied von zwei Wochen die Ergebnisse beeinflusst hat. Allerdings waren alle Tiere zum Zeitpunkt der Experimente sicher postpubertär, so dass mögliche altersbedingte Änderungen in diesem kurzen Zeitraum sehr wahrscheinlich gegenüber dem drastischen Effekt der Kastration eine untergeordnete Rolle spielen.

Des Weiteren zeigten sich bei der ad libitum-Fütterung der Kontrollgruppe (chow) teilweise starke Schwankungen in der aufgenommenen Futtermenge. Ratten reagieren besonders sensibel auf Schwankungen der Luftfeuchtigkeit und Temperatur. Bei zu hoher oder zu stark schwankende Luftfeuchtigkeit geht die Wasser- und Futteraufnahme zurück. Bei einer zu geringen Luftfeuchtigkeit kommt es hingegen zur Zunahme der Wasser- und Nahrungsaufnahme [73]. Dasselbe gilt für Temperaturschwankungen. Ratten essen durchschnittlich mehr bei kalten Temperaturen als bei thermoneutralen Temperaturen [74]. In unserem Stall lag die täglich gemessene Durchschnittstemperatur bei  $21,5^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ , bei einer Luftfeuchtigkeit von  $55\% \pm 11\%$ . Die Temperaturschwankungen von  $1,5^{\circ}\text{C}$  und die Schwankung der Luftfeuchtigkeit von 11% sind sehr gering. Es ist anzunehmen, dass der Einfluss dieser Schwankungen auf das Futterverhalten der Tiere nur gering war, da in vorangegangenen Studien Auswirkungen der Temperatur erst bei unter  $19^{\circ}\text{C}$  und über  $29^{\circ}\text{C}$  bemerkbar waren [74].

Des Weiteren spielt auch das Fressverhalten jedes einzelnen Tieres eine Rolle. Dies kann neben der Einzeltierhaltung auch durch Stress, welcher durch das Handling der



Tiere verursacht wird, beeinflusst werden. Zudem handelt es sich bei den Wistar-Ratten um Auszuchttiere. Auszuchttiere sind Tieren, die keinen einheitlichen Gencode aufweisen und so eine größere Variabilität abbilden [75]. Der Genotyp dieser Tiere ist somit verschieden, wodurch die Aussage über Charakteristika immer für eine Tiergruppe und nicht für jedes einzelne Tier gilt. Dies führt zu einer bedeutenden Schwankung im Futterverhalten der Tiere der Kontrollgruppe, was sich teilweise in der starken Streuung in den Graphen widerspiegelte. Diese Variabilität übertrug sich auf Grund der Paarfütterung auf alle weiteren Diätgruppen. Grundsätzlich ist die experimentelle Technik der Paarfütterung zwar notwendig, um bei Diäten stark unterschiedlicher kalorischer Dichte eine isokalorische Nahrungszufuhr sicherzustellen und somit Effekte der Makronährstoffe jenseits der rein kalorischen Unterschiede zu erforschen. Trotzdem muss berücksichtigt werden, dass nur die Tiere der Kontrollgruppe (chow) ad libitum Zugang zu Nahrung hatten, während die anderen Gruppen zu bestimmten Zeitpunkten eine bestimmte, abgewogene und aufgrund der hohen kalorischen Dichte der Hochfettdiäten gewichts- und volumenmäßig relativ geringe Nahrungsmenge bekamen. Vermutlich wird dies von den betroffenen Tieren eher als Nahrungsknappheit empfunden, das Fressverhalten ist jedenfalls sicher nicht natürlich.

### 5.1.2 Molekularbiologische Methoden

Die quantitative Real-Time PCR ist heute eine etablierte Standardmethode, um Genexpression in verschiedenen Geweben zu quantifizieren. Dennoch müssen insbesondere in der präanalytischen Phase Fehler, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können, vermieden werden. In unserem Versuchsmodell war hier besonders die Phase der Probenentnahme sensibel; es galt, eine Degradierung der Proben zu vermeiden. RNAsen, die ubiquitär vorkommen, zersetzen RNA, wodurch eine falsch-niedrige Gen-Expression vorgetäuscht werden kann. Bei der Probenentnahme war es deshalb wichtig, zunächst alle Oberflächen mit Tüchern zum Entfernen der RNase (RNase wipes) zu säubern und die Proben nach der Entnahme schnellstmöglich auf Trockeneis zu lagern.

Grundsätzlich muss man sich bewusst sein, dass es sich bei Ergebnissen der PCR nur um eine Momentaufnahme der zellulären Expression handelt, die zudem keine posttranslationalen Regulationsmechanismen betrachtet [76, 77].

## 5.2 Zunahmen des subkutanen Fettgewebes unter LC-HF-Diäten

Wie in den Ergebnissen in Kapitel 4.1 zu sehen ist, kam es innerhalb der Tiere eines Geschlechts jeweils vor oder nach Kastration durch die unterschiedlichen Diäten zu keinen signifikanten Gewichtsunterschieden.

Es zeigten sich aber einerseits zwischen den Männchen und Weibchen der jeweiligen Versuchsgruppen (gonadal intakt und gonadal nicht intakt) signifikante Unterschiede im Körpergewicht. Andererseits zeigten sich auch je nach Geschlecht unterschiedliche Effekte einer Kastration – bei Weibchen zeigte sich nach Kastration eine Zunahme des Körpergewichtes, bei Männchen eine Abnahme.

Bisher ist aus vorangegangenen Studien bekannt, dass ein hoher Fettanteil der Nahrung in Kombination mit fehlenden Kohlenhydraten – in unserem Experimenten entsprechend den LC-HF-Diäten 55/30 bzw. 75/10 - eher zu einer Gewichtsreduktion bei männlichen Tieren führt [78]. Bei uns war dies nicht der Fall.

Das subcutane Fettgewebe nahm in unserer Studie tendenziell (auch wenn statistisch meist nicht signifikant) bei beiden Geschlechtern unter isokalorischer LC-HF-Diät zu, nicht aber bei einer normalen HCHF. Dieser Effekt ist unabhängig vom gonadalen Status deutlich sichtbar. Demnach scheint es sich um einen LC-Effekt zu handeln. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte sein, dass die Makronährstoffzusammensetzung (wie auch beim Lebergewicht zu sehen) bestimmt, in welche Depots die überschüssige Energie geht. Demnach geht unter LC-Diäten viel Energie in subkutanes Fett.

Die Ursache für die durch andere Studien beschriebene Gewichtsreduktion bei einer Ernährung mit High-Fat-Diäten wurde in der Ketogenese gesucht. In weiteren Studien wurde zudem beschrieben, dass durch den Mangel an Kohlenhydraten der Körper gezwungen wird, seine Energie aus den Glykogenspeichern zu beziehen. Neben dem Abbau der Glykogenspeicher kommt es so zusätzlich zu einem Verlust von Wasser, da pro Gramm Glykogen drei Gramm Wasser im Interstitium gespeichert werden [79].

Der Diäteeffekt von LC-HF-Diäten wurde bereits in mehreren Studien auch am Menschen beschrieben. Die Studie Samaha et al. (2003) zeigt, dass Patienten, die eine

Low-Carb-Diät zu sich nehmen, nach sechs Monaten einen signifikant höheren Gewichtsverlust aufweisen als Menschen, die sich von einer High-Carb-Low-Fat-Diät ernähren [80]. Des Weiteren zeigt die Studie Shai et al. (2008), dass Probanden, die sich von einer Low-Carb-High-Fat-Diät (LC-HF) ernähren, keine Kalorienbeschränkung einhalten müssen und trotzdem im Vergleich zur Low-Fat-Diät Gewicht abnehmen [81]. Nach diesen Beobachtungen hätte man – anders als es unsere Ergebnisse zeigen - eine stärkere Gewichtszunahme der chow- und HCHF-Diätgruppen im Gegensatz zu den High-Fat-Gruppen (LC-HF 1 und LC-HF 2) erwartet. Der Grund für die in unserem Experiment fehlenden Gewichtsunterschiede zwischen den Diätgruppen könnte auf einer Veränderung der Körperzusammensetzung der Tiere beruhen. Betrachtet man das subkutane Fettgewebe, so sieht man, dass bei allen Tieren (Weibchen und Männchen, gonadal intakt und gonadal nicht intakt) das subkutane Fettgewebe in Relation zum Körpergewicht bei den LC-HF-Diätgruppen 75/10 und 55/30 am stärksten zunahm. Die Tiere der Diätgruppe chow und HCHF wiesen dagegen eine geringere Zunahme des subkutanen Fettgewebes auf. Diese Veränderung der Körperzusammensetzung könnte in unserer Studie eine nach den Vorexperimenten erwartete Gewichtsabnahme kompensiert haben. Jedenfalls war in unseren Experimenten der Einfluss der unterschiedlichen Makronährstoffzusammensetzung der Diäten auf die Körperzusammensetzung ausgeprägter als der auf das Gesamtgewicht. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch die Studie von Caton et al. (2009). Hier wurde beobachtet, dass sich in der Wachstumsphase befindende Wistar-Ratten, die mit einer etwas anderen, jedoch unserer 75/10 Diät ähnelnden LC-HF-Diät (94% Fett; 4,2% Protein; 1,3% Kohlenhydrate; 7,5 kcal/g) gefüttert wurden, in der Wachstumsphase kein Gewicht verloren hatten, jedoch der Fettanteil zunahm [82]. Zudem kam es zu einer Abnahme der fettfreien Masse. Bei erwachsenen Tieren war dies nicht mehr der Fall. Erwachsene Tiere nahmen, wie im Experiment von Bielohuby et al. gezeigt werden konnte, durch eine Low-Carb-High-Fat-Diät an Gewicht ab.

Auch die Studie von Lobley et al. (2007) kam zu einem vergleichbaren Ergebnis. In der Studie wurden 19 Tage alte männliche Ratten mit einer High-Fat-Diät gefüttert. Hier kam es im Vergleich zur High-Carb-Diät zu einer stärkeren Zunahme der Fettmasse [83]. Dass LC-HF-Diäten zu einer Abnahme der fettfreien Masse führt, konnte bereits in mehreren Studien bewiesen werden [79, 84]. Demnach führt die sehr populäre Atkins-

Diät zu einer nur scheinbaren Gewichtsabnahme auf Kosten der fettfreien Masse, wie Muskeln, zudem zu einer Zunahme an Fettdepots.

Dass Ratten unter einer High-Fat-Diät eine zu Gunsten des Fettanteils veränderte Körperzusammensetzung aufweisen, zeigt auch die Studie von West et al. (1998). Da in diesem Versuch ebenso isokalorisch gefüttert wurde, wie in unseren Experimenten, kann eine Gewichtszunahme und Änderung der Körperzusammensetzung nicht durch eine reine Hyperphagie mit höherer Kalorienaufnahme erklärt werden. Es scheinen besonders genetische Faktoren die im Fettstoffwechsel beteiligt sind, eine Schlüsselrolle zu spielen [85].

Zusätzlich konnten wir eine Zunahme des subkutanen Fetts unter allen Diäten nach Kastration bei beiden Geschlechtern nachweisen. Es scheint sich hier um einen Steroideffekt (Sexualhormoneffekt) zu handeln. Demnach führt ein Östrogen-/Testosteron-Mangel zu einer Zunahme des subkutanen Fetts. Dies erscheint auch klinisch plausibel. Mögliche Gründe dafür, dass bei männlichen Ratten dieser Effekt ausgeprägter ist als bei weiblichen Ratten könnte an Veränderungen der lean-body-mass liegen, da das subkutane Fettgewebe in Relation zur lean-body-mass beurteilt wird.

### 5.3 Aufhebung des sexuellen Dimorphismus des Körpergewichts durch Kastration

Es lassen sich deutliche Veränderungen der gonadal intakten männlichen und weiblichen Ratten im Vergleich mit den gonadal nicht intakten Tieren aufzeigen.

Sowohl die gonadal intakten Weibchen als auch die weiblichen Kastraten sind in allen Diätgruppen signifikant leichter als die männlichen Tiere derselben Versuchsgruppe. Dieser sexuelle Dimorphismus begründet sich durch die geschlechterspezifischen Wachstumsraten. Diese Wachstumsunterschiede sind vor allem durch Testosteron bedingt. Dies zeigte sich auch bei uns, da die männlichen Tiere nach Gonadektomie signifikant weniger wogen im Vergleich zur nicht kastrierten Versuchsgruppe. Das Gewicht der männlichen Kastraten glich sich so eher den Weibchen an. Bei den weiblichen Tieren war keine Gewichtsabnahme nach Ovariectomie zu erkennen, die weiblichen Kastraten wurden sogar in allen Diätgruppen signifikant schwerer im Vergleich zu den nicht kastrierten Weibchen. Demnach hat die Diät keinen direkten Einfluss auf das Körpergewicht, welches vor allem durch Sexualhormone beeinflusst

wird. Dagegen, wurde in den Vorexperimenten von Bielohuby et al, gezeigt, dass Ratten bei Low-Carb-High-Fat-Diäten weniger Gewicht zunahmten als Ratten, welche mit einer chow-Diät gefüttert wurden [78]. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass die Nährstoffzusammensetzung der verwendeten Diäten nicht identisch waren und verschiedene Makronährstoffquellen aufwiesen.

Die Kastration führt unabhängig von der Diät dazu, dass Männchen abnehmen und Weibchen zunehmen. Dies könnte daran liegen, dass weibliche Tiere durch die Ovariectomie geringere Mengen an Östrogen haben. Das durch die Ovarien sezernierte Östrogen führt offenbar zu einem geringeren Wachstum und somit einem geringeren Körpergewicht der Ratten. Diese Hemmung entfällt nach Ovariectomie. Das durch Östrogen und Testosteron beeinflusste Wachstum führt so zu den Geschlechts-abhängigen Unterschieden der Körperlänge und Körpermasse, ein Effekt, der unter anderem durch Slob et al. (1975) auch beschrieben wurde [86]. Allerdings muss zumindest diskutiert werden, ob die Gewichtszunahme der Weibchen nach der Kastration nicht auch durch Stress durch Handling und post-operative Schmerzen bedingt sein könnte. Der operative Eingriff zur Ovariectomie der Weibchen hat wesentlich länger gedauert und war komplikationsreicher als die Orchiektomie bei den Männchen. Dies könnte sekundär zu erhöhtem Stress, weniger Bewegung und parallel zu einem Anstieg des Serumcortisols geführt haben. Die Kombination dieser Effekte könnte auch eine Gewichtszunahme bei den kastrierten Weibchen erklären. In mehreren Studien wurde beschrieben, dass Ratten nach Stresssensation deutlich mehr gegessen haben und höhere Glukokortikoidkonzentrationen aufwiesen als Tiere in der Kontrollgruppe, die keinem Stress ausgesetzt waren und ein geringes Serumcortisol aufwiesen [87]. Hier wäre es lohnend, in zukünftigen Experimenten, z.B. durch Messung von Glukokortikoiden, den vermuteten Effekt unter den Diäten zu validieren.

#### 5.4 Verstärkung der nicht alkoholischen Steatohepatitis (NASH) durch LC-HF-Diäten unabhängig von der Kalorienzufuhr

Je höher der Fettgehalt der Diät, desto stärker war der Grad der nicht alkoholischen Steatohepatitis. Dieser Effekt war bei isokalorischer Fütterung eindeutig unabhängig von der Kalorienzufuhr. Bei der 75/10-Diät war in unserem Versuchsaufbau die Leberverfettung am stärksten ausgeprägt. Bei der LC-HF 1-Diät (55/30), welche 78,7% Fett enthält, war der Grad der Leberverfettung geringer als bei der 75/10-Diät. Da bei der HCHF-Diät der Grad der Leberverfettung in allen Versuchsgruppen zwar stärker ausgeprägt war als bei der fettarmen chow-Diät, jedoch deutlich geringer als bei beiden Low-Carb-High-Fat-Diäten, lässt sich folgern, dass der Grad der Leberverfettung einerseits abhängig vom Fettgehalt der Nahrung ist, andererseits aber auch vom Kohlenhydratgehalt. Das Fehlen von Kohlenhydraten scheint demnach zu einer stärkeren Verfettung der Leber zu führen.

Yuka Kurosaka et al. (2017) konnte unter einer Low-Carb-High-Fat-Diät ebenso eine Zunahme der Leberverfettung nachweisen [88]. In dieser Studie wurden vier Wochen alte Sprague-Dawley-Ratten zufällig einer Kontroll- und einer Low-Carb-High-Fat-Diätgruppe zugeteilt und ad libidum gefüttert. Wie bei uns kam es in dieser Studie zu keinen signifikanten Gewichtsunterschieden der Ratten zwischen den beiden Diätgruppen. Neben einer Zunahme der Leberverfettung durch Low-Carb-High-Fat-Diäten, was mikroskopisch durch eine Zunahme an Lipidtröpfchen in den Hepatozyten nachgewiesen wurde, kam es zu einer Suppression von Proteinen, die in der De Novo Lipogenese beteiligt sind, und zur Zunahme von Serum-Leptin-Werten [88]. Dies war bei uns auch der Fall. Neben der mikroskopisch nachgewiesenen Zunahme der Leberverfettung durch Low-Carb-High-Fat-Diäten kam es auch zu einem signifikanten Anstieg der Serum-Leptin-Werte unter Low-Carb-High-Fat-Diäten. Die positive Korrelation lässt sich dadurch erklären, dass die Serum-Leptin-Konzentration mit steigender Menge der gespeicherten TAG zunimmt. Betrachtet man nun die Serum-Leptin-Werte unsers Versuches, sieht man, dass besonders bei den beiden High-Fat-Diäten 75/10 und 55/30 die Leptin-Konzentration im Vergleich zu den LC-HF-Diäten in Korrelation zum steigenden Fettgehalt der Diäten erhöht war.

Eine weitere Studie, die einen Zusammenhang zwischen Leberverfettung und High-Fat-Diäten aufzeigt, ist von Picchi MG et al. (2011). In dieser Studie wurden 14 männliche

Wistar-Ratten, die 21 Tage alt waren, in zwei gleich große Gruppen gewichtsgematched aufgeteilt und für vier Wochen gefüttert. Die Diäten ähnelten in ihrer Zusammensetzung unserer chow-Diät und der LC-HF 1 (55/30)-Diät. Wie bei uns kam es hier bei der High-Fat-Diätgruppe zu keiner Gewichtszunahme im Vergleich zu der Kontroll-Diät-Gruppe aber zu einer deutlichen Zunahme der Leberverfettung [89].

### 5.5 Sexueller Dimorphismus der Leberverfettung bei LC-HF-Diäten

Sowohl bei männlichen als auch weiblichen Tieren führte eine LC-HF-Diät (75/30 LC-HF 2) zu einer Lipid-Akkumulation in der Leber. Die „milderer“ protein-gematchte 55/30 LC-HF 1-Diät zeigte diesen Effekt bei den Weibchen nicht, bei den Männchen aber vor Kastration schon. Nach Kastration ist der Effekt der LC-HF 2-Diät auf die Leberverfettung auch bei Männchen nicht mehr signifikant.

Diese Daten deuten darauf hin, dass Östrogen als Sexualhormon leberprotektiv wirkt, bzw. Testosteron einen negativen Einfluss auf die Leberverfettung hat.

Die Studie von Zhang et al. 2011 zeigte bereits, dass die menschliche Leber über 1000 Gene abhängig von Sexualhormonen geschlechterspezifisch exprimiert [90].

Wie in unseren Versuchen bereits gezeigt, führt ein Mangel an Östrogen zu einer Fettakkumulation in der Leber. Dasselbe konnte in der Studie von Venetsanaki et al. 2019 gezeigt werden. Ein Östrogenmangel verschlechterte hier eine NASH und führte zu einer Zunahme der Fettakkumulation in der Leber. Dieser sexuelle Dimorphismus der Leber ist auch der Grund dafür, dass Frauen nach der Menopause zunehmend eine Fettakkumulation in der Leber aufweisen [91].

Dass die Ovariectomie im Rattenmodell zu einer Akkumulation von Triglyceriden in der Leber führt und eine Re-Substitution der Sexualhormone eine Leberverfettung verhindern kann, konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden [92, 93].

Aus diesen Ergebnissen, sollten Diäteneffekte folglich immer geschlechterspezifisch untersucht und können nicht pauschalisiert werden.

## 5.6 Zunahme des Lebergewichts in Abhängigkeit der Leberverfettung und die daraus resultierende NASH und deren direkte diätische Therapie

Das Lebergewicht in Relation zum Körpergewicht ist direkt abhängig vom Grad der Leberverfettung. Tiere, die in unserem Versuchsaufbau die Diäten mit dem höchsten Fettanteil erhalten haben (55/30 und 75/10), hatten in Relation zum Körpergewicht die schwersten Lebern (liver weight/BW %). Dieser Trend war unabhängig vom Geschlecht oder der Kastration der Tiere. Demnach determiniert der Kohlenhydratanteil der Diät, wohin die überschüssige Energie als Fett eingelagert wird. Die Sexualhormone scheinen hier keinen direkten Einfluss auf die reine Gewichtszunahme der Leber zu haben. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Studie von von Jian-Gao Fan et al. (2003). In dieser Studie wurden 29 Sprague-Dawley-Ratten in drei Gruppen zufällig unterteilt. Die Tiere in der Kontrollgruppe wurden mit einer Standarddiät und die in der NASH-Gruppe High-Fat-Diät für zwölf Wochen gefüttert. Die Tiere in der LCD-Gruppe wurden nach einer zehnwöchigen Fütterung mit einer High-Fat-Diät für zwei Wochen mit einer Low-Carb-Diät gefüttert. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Tiere, die mit der High-Fat-Diät gefüttert wurden, ein höheres Lebergewicht aufwiesen. Zudem führte bei der LCD-Diätgruppe eine nur zwei Wochen lange Fütterung mit der High-Fat-Diät zur deutlichen Zunahme der Leberverfettung. Die Tiere, die mit der LCD-Diät gefüttert wurden hatten wie bei uns die geringsten Lebergewichte. Demnach ist der Grad der Leberverfettung und das Lebergewicht direkt abhängig vom Fettanteil der Nahrung. Demnach führen High-Fat oder auch ketogene Diäten, wie beispielsweise die viel propagierte Atkins-Diät, über einen längeren Zeitraum zu einer konsekutiv fortschreitenden Leberverfettung. Die daraus resultierenden Folgen sind bisher kaum publiziert. Die so in der Absicht, Gewicht zu verlieren, durchgeführte High-Fat-Diät verursacht neben einer Leberverfettung auch noch weitere teils irreversible Folgeerkrankungen. Durch die Verfettung der Leber kommt es zu chronischen Entzündungsprozessen, welche sekundär zur irreversiblen Leberzirrhose durch eine Fibrose des Parenchyms führen. Des Weiteren nehmen kardiovaskuläre Erkrankungen zu. Positiv ist, dass besonders die Leberverfettung teilweise durch recht einfache Maßnahmen reversibel ist. Die Studie von Jian-Gao Fan et al. (2003) stellt zudem fest, dass der Grad der Leberverfettung durch Diäten ebenfalls teilweise reversibel ist. Die Studie bewies, dass eine einwöchige Low-Carb-Diät, bereits zu einer deutlichen



Reduktion des Lebergewichts, dem Grad der Leberverfettung und dem Körpergewicht führte [94]. Demnach besteht eine positive Korrelation zwischen der Reduktion des Körpergewichts, dem Gewicht der Lebern und dem Schweregrad der Leberverfettung.

Zur selben Erkenntnis kam die Studie Perito E. et al. (2013). Sie bewies, dass ein Gewichtsverlust von 5-10% bereits den Schweregrad der NASH verbessert. Die ausschlaggebenden diätischen Faktoren für die Besserung sind neben einer hypokalorischen Ernährung die Reduktion von Fruktose und Fettsäuren [95].

Trotz der Abnahme der Leberverfettung durch Diäten ist eine sekundär entstandene Fibrose nicht rückgängig. Dies zeigte auch die Studie von Kittichai Promrat et al. (2011). Hier wurden 31 Probanden, die alle einen BMI zwischen 25-40 kg/m<sup>2</sup> und eine mit Biopsie gesicherte NASH aufwiesen, in eine Kontroll- und eine Interventionsgruppe unterteilt. Die Interventionsgruppe unterzog sich 48 Tage einer Kombination aus Diät, Sport und Lifestyleänderung mit dem Ziel, 7-10% des Körpergewichts zu verlieren. Es war eindeutig, dass Leberverfettung und Körpergewicht in der Interventionsgruppen abnahmen. Dennoch konnte durch eine erneute Biopsie gezeigt werden, dass weder chronische Entzündungsprozesse des Leberparenchyms noch die Leberfibrose positiv beeinflusst werden konnten und somit irreversibel waren. Demnach limitiert sich der Effekt der Gewichtsreduktion und Diätumstellung auf die Leberverfettung und hat keinen Einfluss auf die Fibrose [96].

### 5.7 LC-HF-Diäten führen zur Zunahme des subkutanen Fettgewebes und zur Zunahme der Serum-Leptin-Konzentration

Wie vorangegangen erläutert, nimmt die Menge des subkutanen Fettgewebes in Relation zum Körpergewicht bei High-Fat-Diäten deutlich mehr zu als bei Low-Fat-Diäten. Da Fett- und Leptin-Konzentration korrelieren, kommt es bei den High-Fat-Diäten zu einem Anstieg der Leptin-Konzentration im Serum und den Adipozyten.

Die Tiere, welche mit der 75/10-Diät gefüttert wurden, haben sowohl im Serum und in den Adipozyten noch höhere Leptin-Konzentrationen als die Tiere der 55/30-Diätgruppe.

Diese positive Korrelation zwischen High-Fat-Diäten und Leptin-Konzentrationen wurde bereits in mehreren Studien gezeigt. Die Studie von Hellström et al. (2000) [97]

zeigte, dass die Leptin-Konzentration direkt von der Menge des subkutanen Fettgewebes abhängig ist. Diese Studie wies an jeweils 32 Männern und 63 Frauen nach, dass zwischen Männer und Frauen mit demselben BMI, die Serum-Leptin und Leptin-Sekretionsraten der Adipozyten positiv mit dem Körperfettanteil bei beiden Geschlechtern korreliert. In der Studie wiesen die Frauen zweifach höhere Serum-Leptinwerte als Männer auf, hatten aber auch mehr Körperfett als die männlichen Tiere. Da in unserem Versuch die Weibchen weniger subkutanes Fettgewebe als die Männchen aufwiesen, lassen sich auch die geringeren Serum-Leptin und mRNA-Leptin-Konzentrationen der Weibchen im Gegensatz zu den Männchen erklären. Die Studie von Handijeva-Darlenska et al. (2009) kam zum selben Ergebnis [98]. In dieser Studie, wurden zwanzig männliche Wistar-Ratten, mit einer chow- und einer High-Fat-Diät für elf Wochen ad libitum gefüttert. Bei den Ratten, die mit der High-Fat-Diät gefüttert wurden, kam es zu einer deutlichen Hyperlipidämie. Zudem konnten sie eine positive Korrelation zwischen Plasma-Leptin-Werten und der Menge an epididymalem Fett, dem Herz und Leber Gewicht nachweisen [98].

Demnach steigt über die reine Gewichtszunahme die Leptin-Konzentration. Da bei den HCHF-Diäten dieses nicht zu sehen war, ist der niedrige Kohlenhydratanteil der LC-HF-Diäten für die o.g. Veränderungen verantwortlich.

#### 5.8 Ausbleibende Veränderung der GH-Rezeptor-Expression im subkutanen Fettgewebe

Die Expression des GH-Rezeptors im subkutanen Fettgewebe zeigt weder in Bezug auf die Geschlechter (männlich, weiblich, gonadal intakt und gonadal nicht intakt) noch zwischen den Diäten signifikante Unterschiede. Entgegen unserer Ergebnisse, hätte man bei einer Zunahme der Fettmasse (hier subkutanes Fettgewebe) eine Veränderung der GH-Sensitivität und GHR-Expression erwartet. Normalerweise würde man bei Veränderung der Fettmasse eine Veränderung der GH-Sensitivität als auch der GH-Rezeptorzahl erwarten [99]. Es gilt zu diskutieren, ob die Ergebnisse auf Grund der Methodik (mRNA-Expression) nicht reliabel sind, da die gemessene mRNA-Expression nur einer Momentaufnahme entspricht. Zudem könnte der Diäteinfluss auf die zentrale Regulation der GH/IGF-I-Achse wichtiger sein als der lokale Effekt im Fettgewebe.

## 5.9 Gewichtszunahme der Weibchen nach Ovariectomie

Wie in Kapitel 4.1 bereits aufgezeigt, nehmen die Weibchen aller Diätgruppen nach der Ovariectomie deutlich an Körpergewicht zu. Das Fehlen der weiblichen Sexualhormone Östrogen und Gestagen scheinen somit einen negativen Einfluss auf das Körpergewicht zu haben.

Denselben Effekt kann man bei postmenopausalen Frauen beobachten, welche auf Grund des Mangels an Sexualhormonen ein höheres Risiko für Übergewicht aufweisen [100]. Der genaue Zusammenhang zwischen Gewichtszunahme und Menopause ist dennoch nicht vollständig geklärt.

Es konnte allerdings ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der Fettmasse bei einer Östrogen und Östrogen-Progesteron-Therapie nachgewiesen werden. Zudem kommt es hierbei zur Verbesserung der Insulin-Sensibilität [100].

Die Tiere unserer Versuchsgruppen wiesen keinen Unterschied der relativen Gewichtszunahme nach Ovariectomie auf. Demnach scheint die verschiedene Diätzusammensetzung keinen Einfluss auf das Körpergewicht postmenopausal zu haben. Im Gegensatz hierzu wurde in der Studie von Ludgero-Correia et al. (2012) herausgefunden, dass unter einer High-Fat-Diät sich die Auswirkungen einer Ovariectomie auf den Metabolismus und die Körperfettzusammensetzung zusätzlich verstärken [101].

Interessanterweise, wie in Abbildung 9 Kapitel 4.3 dargestellt, kam es auch in unserem Versuch zu einer Zunahme des subkutanen Fettgewebes in Relation zum Körpergewicht bei Weibchen nach Ovariectomie. Diese positive Korrelation zwischen Hormonmangel und Zunahme des subkutanen Fettgewebes wurde auch durch die Studie von Poehlman et al. (1995) aufgezeigt [102].

## 5.10 Sexueller Dimorphismus der Suppression der GH-IGF-I Achse unter LC-HF-Diäten

Wie bereits in Kapitel 4.5.3. und 4.5.4 beschrieben, zeigte sich im Rahmen unserer Versuche, dass eine fettreiche Diät bei weiblichen Tieren zu einem erniedrigten Serum - GH-Spiegel führt. Dieser Trend war allerdings bei den männlichen Tiere nicht festzustellen. Dass die GH-Sekretion durch verschiedene Nahrungsbestandteile modellierbar ist, wurde bereits beispielsweise in der Studie von Cappon et al. (1993) beschrieben [103]. In derselben Studie konnte zudem gezeigt werden, dass GH-Serum Spiegel tatsächlich durch High-Fat-Ernährung supprimiert werden. Dieser Effekt war im Rahmen der Studie auf erhöhte Somatostatin-Serum-Werte zurückzuführen. Somatostatin wirkt hier als Inhibitor der GH Sekretion [103].

Neben Fett beeinflusst zudem eine proteinreiche Ernährung die GH-Sekretion und somit die Serum-GH-Spiegel. Dies zeigt sich im Rahmen unserer Studie, da sich zwischen der LC-HF 1- und LC-HF 2-Diät, welche sich in ihrem Proteinanteil unterscheiden, ein kleiner Unterschied in der GH-Sekretion aufzeigt. Die LC-HF 2-Diät, weist einen deutlich geringeren Proteinanteil auf. Unter dieser Diät zeigten sich ebenso niedrigere GH-Serum-Spiegel. Dass Proteine eine wichtige Rolle in der GH-Sekretion spielen, wurde bereits in der Studie von Meija-Naranjo et al. (2003) gezeigt [104]. Zu derselben Erkenntnis kam die Studie von Amann et al. (2010) [105]. Neben den diätischen Veränderungen der GH-Spiegel kam es im Rahmen der Studie ebenso zu einer Diät abhängig Veränderung der IGF-I-Spiegel. Diese veränderten sich gleichermaßen wie GH. Bei den Low-Carb-High-Fat-Diäten kam es hier ebenso zu einer Suppression der IGF-I-Spiegels im Serum.

Als weiterer Effekt von GH ist die durch IGF-I vermittelte Lipolyse zu beleuchten. Hier führt IGF-I über das Hormon ATGL zur Induktion der Lipolyse [106]. Wie wir jedoch in unserer Studie zeigen konnten, führt eine Low-Carb-High-Fat-Diät zu geringeren GH-Spiegeln und müsste demnach beim Wunsch der Gewichtsreduktion eher kontraproduktiv sein. Diese Aussage, kann man im Rahmen unserer Studie, allerdings nur für die weiblichen Tiere treffen, da es bei männlichen Tieren trotz reduzierter GH-Expression zu einer erhöhten Expression von ATGL kam.

Dies sollte einem erneut aufzeigen, dass Diät ratgeber, Aussagen über Hormone nur geschlechterspezifisch treffen sollten. Auf Grund des sexuellen Dimorphismus sollte hieraus keine allgemeine Empfehlung abgeleitet werden.

## 5.11 Metabolische Effekte von Testosteron in gonadal intakten und gonadal nicht intakten männlichen und weiblichen Ratten

Bei Männern wird Testosteron größtenteils in den Leydig-Zellen des Hodens produziert. Neben den Hoden bildet die Nebennierenrinde ebenso geringe Mengen an Androgenen. Deshalb führt eine bilaterale Orchidektomie zu keiner hundertprozentigen Reduktion des Serum-Testosteron-Spiegels.

Bei Frauen produzieren die Ovarien und die Nebennierenrinde ebenso geringere Mengen an Testosteron. Die Serumkonzentration von Testosteron ist bei Männern zwischen 12-40 nmol/L, bei Frauen hingegen bei nur 0,4-2,0 nmol/L [107, 108].

Die Lipolyse spielt im Stoffwechsel und der Energiebereitstellung eine essentielle Rolle.

Sie wird durch die folgenden drei Schlüsselenzyme vermittelt: HSL, ATGL und MGL [109]. Der genaue Mechanismus, wie Testosteron die Lipolyse beeinflusst, ist bisher nicht genau geklärt. In einigen Publikationen wird berichtet, dass Testosteron die Synthese von ATGL und HSL reduziert [110]. Andere Publikationen beschreiben hingegen eine Testosteron vermittelte Steigerung der ATGL-Synthese [111].

Eine Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch Testosteron könnte eine mögliche Erklärung der Stoffwechselveränderungen bei Patienten mit Hypogonadismus liefern.

In unserer Studie führte die Kastration der Weibchen durch Ovariectomie zu keinem signifikanten Unterschied in der Expression von ATGL. Dies könnte an der ohnehin niedrigen Serum-Testosteron-Konzentrationen der Weibchen liegen [108]. Bei den männlichen Tieren hingegen war eine deutlich positive Korrelation zwischen Testosteron und ATGL zu erkennen. Die Orchidektomie führte bei den männlichen Tieren zu einer deutlichen Reduktion der ATGL-Expression, wohingegen gonadal intakte Männchen eine höhere ATGL-Expression aufwiesen. Demnach ist die ATGL-Expression klar geschlechtsabhängig. Zum selben Ergebnis kam die Studie von Madi Almajwa et al. (2019) [112], welche analog zu unserem Versuch an gonadal intakten und gonadal nicht intakten Wistar-Ratten durchgeführt wurde. Hier konnte ebenso gezeigt werden, dass zwischen dem Serum-Testosteron-Spiegel und der Expression von ATGL eine positive Korrelation besteht.

Des Weiteren konnte wir eine Steigerung der ATGL-Expression in Korrelation zum Fettgehalt der gefütterten Nahrung erkennen.

Die Diätgruppe LC-HF 2, mit dem höchsten Fettanteil von 92,8% , wies eine deutlich höher ATGL-Expression im Vergleich zu den Diäten mit geringerem Fettanteil auf.

In der Gruppe der gonadal nicht intakten Tiere war diese Korrelation ebenso zu erkennen, allerdings bei deutlich geringeren ATGL-Expressions-Leveln. Bei den Weibchen zeigte sich kein Diäteneffekt. Demnach ist die Regulation von ATGL durch verschiedene Diäten teilweise von Testosteron abhängig.

In der Studie von Harold et al. (2010) konnte bereits gezeigt werden, dass Probanden, die über einen Zeitraum von zwei Wochen mit einer High-Fat-Diät ernährt wurden, eine deutlich gesteigerte Lipolyse und ATGL-Expression aufwiesen [113]. Dies lässt sich mit der Funktion von ATGL erklären. Bei einem hohen Angebot an TAG kommt es zur gesteigerten Lipolyse und somit zur Zunahme der Genexpression von ATGL [109].

## 6. Zusammenfassung

### 6.1 Einleitung

Adipositas und daraus resultierende multiple Folgeerkrankungen als auch die enorme finanzielle Belastung für für das Gesundheitssystem, spielen eine zunehmend wichtige Rolle: Mit der Zunahme der Adipositas und dem gesellschaftlichen Trend der Selbstoptimierung rücken zudem verschiedene Diättheorien in den Vordergrund. Beispielhaft ist hier die Atkins-Diät zu nennen, welche eine Low-Carb-High-Fat-Diät zur Gewichtsreduktion propagiert. Welche Auswirkungen diese teils radikalen Diätansätze auf den menschlichen Organismus haben, ist allerdings häufig nicht bekannt. Ob es wie erhofft zu einer wirklichen Gewichtsreduktion kommt, ist zudem fraglich.

### 6.2 Methoden

Über einen Zeitraum von vier Wochen wurden 80 männliche und 80 weibliche Ratten mit vier verschiedenen Diäten nach dem Paarfütterungsmodell gefüttert. Die Diäten setzten sich aus einer Referenzdiät mit hohem Kohlenhydratanteil, zweier LC-HF-Diäten und einer HCHF-Diät zusammen. Für die erste, gonadal intakte, Versuchsgruppe wurden jeweils 40 Männchen und Weibchen gewichtsgematched den Diätgruppen zugeteilt und über vier Wochen gefüttert. Für die zweite, gonadal nicht intakte, Versuchsgruppe wurden die Tiere (40 Männchen, 40 Weibchen) erneut gewichtsgematched den Diätgruppen zugeteilt, wobei die Männchen und Weibchen kastriert (ovarektomiert und orchidektomiert) wurden.

Über den Ablauf des Fütterungsversuches erfolgten zudem wiederholt Blutabnahme zur Hormonbestimmung unter anderem von Insulin, GH, Sexualhormonen und IGF-I.

Im Rahmen des Versuchsabschlusses wurden die Tiere gewogen und verschiedene Organe und Gewebe entnommen. Die gewonnenen Leberproben wurden nun mittels Red-oil-Färbung gefärbt, eingedeckt und mikroskopiert. Zudem wurde aus dem gewonnenen s.c Fettgewebe RNA isoliert. Die gewonnene RNA wurde in cDNA

umgeschrieben und die Expression verschiedener Gene des Fettstoffwechsels mittels qPCR quantifiziert. Zudem wurden spektrometrische Assays zur Quantifizierung von Insulin, GH, IGF-I und AdipoQ durchgeführt.

### 6.3 Ergebnisse

Es kam innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen (gonada intakt und gonadal nicht intakt, jeweils männlich und weiblich) zu keinen signifikanten Gewichtsunterschieden unter den verschiedenen Diäten.

Es zeigte sich lediglich zwischen den Männchen und Weibchen der Versuchsgruppen nicht kastriert und kastriert ein deutlicher Gewichtsunterschied. Die kastrierten Männchen nahmen im Vergleich zu den nicht kastrierten Männchen an Gewicht ab. Die ovariectomierten Weibchen hingegen nahmen postoperativ an Gewicht zu.

Betrachtete man das subkutane Fettgewebe in Relation zum Körpergewicht, wiesen die Männchen nach Kastration signifikant mehr subkutanes Fettgewebe als die ovariectomierten Weibchen auf.

Demnach haben die verschiedenen Diäten keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere. Lediglich die Sexualhormone scheinen Einfluss auf das Körpergewicht zu haben. Im Gegensatz zum Körpergewicht führen High-Fat-Diäten wie unsere LC-HF 1- und LC-HF 2-Diät zu einer signifikanten Zunahme des Lebergewichtes in Relation zum Körpergewicht. Zusätzlich war das Lebergewicht der gonadal intakten und gonadal nicht intakten Männchen unter den beiden High-Fat-Diäten (LC-HF 1 und LC-HF 2) signifikant geringer als das der Weibchen derselben Diät- und Versuchsgruppe.

Vergleicht man die Lebergewichte, die mittels Red-Oil-Färbung angefärbten histologischen Leberpräparate, scheint die Zunahme des Lebergewichts in direktem Zusammenhang mit der Leberverfettung zu stehen. Hier zeigte sich besonders bei der LC-HF 2-Diät eine signifikant höhere Leberverfettung im Vergleich zu den Diäten mit geringerem Fettanteil. Dies war sowohl bei den gonadal intakten sowie gonadal nicht intakten Männchen und Weibchen zu sehen.

Des Weiteren betrachteten wir die GH-Sekretion unter den verschiedenen Versuchsdiäten. Bei den gonadal intakten Weibchen war die GH-Sekretion eindeutig durch einen hohen Fettanteil der Diät supprimiert. Bei den gonadal nicht intakten



Männchen und Weibchen kam es zu keinem eindeutigen Effekt der Diäten auf die GH-Sekretion.

#### 6.4 Schlussfolgerung

Mittels unseres Versuchsaufbaus wurden die Auswirkungen von LC-HF-Diäten auf die Körperzusammensetzung, den Fettstoffwechsel, die GH/IFG-I-Sekretion als auch die Leberverfettung untersucht. Durch den Versuchsaufbau konnte ein besonderes Augenmerk auf den sexuellen Dimorphismus gelegt werden. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die propagierten LC-HF-Diäten beispielsweise eine Atkins-Diät, mit negativen Veränderungen für den Organismus einhergehen. Neben einer eindeutig fehlenden Gewichtsreduktion sowohl der Männchen als auch der Weibchen führt eine LC-HF-Diät zu einer signifikanten Zunahme der Leberverfettung. Demnach bringen LC-HF-Diäten keinen Vorteil gegenüber anderen Diätmethoden, viel mehr führen sie durch die Leberverfettung zu einer Gesundheitsbeeinträchtigung.

Durch diese Studie konnte zudem gezeigt werden, dass Sexualhormone einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf den Stoffwechsel haben. Demnach sollten Diäten und Ernährungsempfehlungen nie generalisiert ausgesprochen werden, sondern auf das weibliche und männliche Geschlecht spezifisch zugeschnitten sein. Zudem zeigt die Studie, dass eine reine Veränderung der Makronährstoffzusammensetzung keinen positiven Einfluss auf die Körperzusammensetzung hat und auch das Körpergewicht nicht reduziert. Demnach ist eine ganzheitliche Lebensstiländerung beim Wunsch des Gewichtsverlusts eindeutig einer reinen Diätumstellung überlegen.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb. - Abbildung

ATGL - Adipozyten-Triglycerid-Lipase

AdipoQ - Adiponectin

BMI - Body-Mass-Index

CHOW - Referenzdiät

Carb. - Carbohydrates/Kohlenhydrate

cDNA - complementary DNA

DAG - Diacylglycerid

DM I - Diabetes Mellitus Typ I

DM II - Diabetes Mellitus Typ II

FASN - Fettsäure Synthase Gen

FAS - Fatty Acid Synthase

GH-R - Growth Hormone Rezeptor

GHRH - Groth-hormone-realeasing-hormone

GH - Growth-hormone / Somatotropin

GHB I&II - Growth-Hormone-Brain Versuch I&II (selbstgewählte Bezeichnung der Versuche)

HSL - Hormonsensitive Lipase

HF - High-Fat-Diet

HCHF - High-Carb-High-Fat-Diät

IGF-I-R - Insulin-like-growth-factor 1 Rezeptor

IGF-I - Insulin-like-growth-factor 1

IGF - Insulin-like-growth-factor

LPL – Lipoproteinlipase

LC-HF – Low-Carb-High-Fat-Diät

LC-HF 1 - Low-Carb-High-Fat-Diät (55/30)

LC-HF 2 - Low-Carb-High-Fat-Diät (75/10)

MAG - Monoacylglycerid

NAFLD - nicht-alkoholische-Fettlebererkrankung

NASH - nicht-alkoholische-Steatohepatits

ORX - Orchidektomie

OVX - Ovariectomie

PKA - Proteinkinase A

qPCR - Quantitative real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion

RT-PCR - real time Polymerase chain reaktion

RT - Raumtemperatur

STD - Standardabweichung

TAG - Triacylglycerid

wat.sc. - subkutanes Fettgewebe.

## 8. Material und Herstellerverzeichnis

### 8.1 Tierversuche

Desinfektionslösung: Kodan-Tinktur forte farblos (Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland)

Einstreu: Sägespäne (Lignocel®, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg)

Enrichement: Nagehölzer (Ssniff, Soest, Deutschland), Rattentunnel (Firma Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland)

Einmalskalpelle: Disposable Scalpell #22 Feather (VWR International, Radnor, USA)

Eingabekanüle mit Knopf (Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland)

Einwegspritze 2ml (Injekt ®, B. Braun, Melsungen, Deutschland)

Einwegskalpell (Disposabel Scalpell Nr. 22, Feather)

Futter: chow Diät: Sartorius Competence CP2201

Fadenmaterial Vicryl 5-0 (Ethicon, Somerville, USA), Prolene 5-0, (Ethicon, Somerville, USA)

Hautkleber - Dermabond HVD mini topisch Ampullen- Johnson & Johnson

Inhalationsnarkotikum: Burgdorf, Germany, 1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethyl-ether

Isofluran (Abbott)

Kodan-Tinktur Forte, Farblos, Schülke & Mayr

Medikamente: Bezug über die Versuchstierleitung der Medizinischen Klinik und Poliklinik Innenstadt mit wechselnden Herstellern

NaCl 0,7% Kochsalz Lösung - Braun

Pellet Alleinfutter (ssniff®, Spezialdiäten GmbH, Soest)

Polykarbonat-Käfigen (Makrolon® Typ 3, Bayer, Leverkusen)

Prolene 5-0 Braun - Ethicon

Vicryl 5-0 Braun - Ethicon

### 8.2 Histologie

Aqua dest. Sigma (sterile filtere Bio Reagens W3500 (Merck, Darmstadt, Deutschland) suitable for cell-culture

Eindeckmedium auf Wasserbasis (Aqueous mountant Vector Lab.)

Hämatoxin Stammlösung Hämalan Merck

Kamera: Leica DC DMC 2900

Kryotom Super Frost Menzel

Mikroskop: Leica DMRB

Mixer: IKA-Combining RCT

Oil-red O Pulver Sigma

Wage: Sartorius CPA225D-OCE

Waage (BP121A), Sartorius (Göttingen, Sartorius, Deutschland)

Water TEP (Sigma)

### 8.3 Molekularbiologische Methoden

Pipettenspitze, 200 µl (Sarstedt)

Pipettenspitze (Combitips® Plus 10 ml, Eppendorf)

Pipettenspitze, 200 µl (Biosphere® Filter Tip, Sarstedt)

Pipettenspitzen 20µl: epT.I.P.S. Standard/Bulk 0,5-20µl L, Eppendorf,, Deutschland

Pipettenspitzen 200µl: Pipettenspitze 200µl gelb, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Pipettenspitze 1000µl blau, Sarstedt Deutschland

Pipetten Eppendorf Reference® (2-20µl, 10-100µl, 50-200µl, 100-1000µl), Deutschland

RNaseZap™ RNase Decontamination Wipes

Qiagen, RNeasy Lipid Tissue Mini Kit

Zentrifuge ( Centrifuge 5415R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

#### 8.3.1 Pulverisierung der Präparate

CryoThem-Apollo

Homogenisator: Ultra Turrax T8 (IKA®-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland)

TissueLyser LT (Quiagen, Hilden, Deutschland)

Vortex: Vortex-Genie® 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)

#### 8.3.2 RNA-Isolation

Aqua dest. for molecular use only, Pan Reac Applichem, ITW Reagents

Chloroform- Baker Analyzed, J.T. Baker

Nano Drop Spectrophotometer, , (peQ-Lab, Erlangen, Deutschland)

QIAGEN Sample of Assay Technologies - RNaeasy Lipid Tissue Mini Kit

Stainless Steel beads, 5mm

Tissue Lyser: Quiagen Tissue LyserLT

Vortex: Vortex-Genie® 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)

Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415R

70% Ethanol, Pan Reac Applichem ITW Reagents, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

### 8.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosepulver (PeqGold Universal Agarose, PeqLab/VWR International, Radnor, USA)

Elektrophoresesystem (Power Pac 300, BioRad (Hercules, USA)

Ethidiumbromid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Geldokumentationssystem (Gel iX Imager, Intas

Heizblock (Thermoblock , Haep Labor Consult

Homogenisator (Ultra Turrax T8, IKA®-Werke)

Magnetrührer: RH Basic 2 (IKA®-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland)

TEP (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Vortex: Vortex-Genie® 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)

### 8.3.4 Umschreiben von RNA in cDNA

Thermo Cycler: Thermal Cycler T100 (Life Science, Bio Rad, Hercules, USA)

Promega dnTP's U1515, M-MLV M3683 (reverse transkriptase RNase, Point Mutant)

Buffer Promega

RNAsin N2515 (rekombinant RNAsin, Ribonuclease Inhibitor) Promega

Oligo d(T) C1101 Promega

### 8.3.5 Quantitativ-Real-Time PCR

EvaGreen® Supermix BioRad (Hercules, USA)

MX300P-Strategen , MXPro, Zentrifuge 5810R Eppendorf, Deutschland

PCR-Platte (96b Multiply ® PCR Platte natur, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Thermal Cycler T100, Lief Science, Bio Rad

### 8.3.6 Primer Design

<http://bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

<http://ensemble.org/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-folding-form>,

### 8.3.7 ELISA Assays

GH Assay: Merck/Millipore ERZMGH-45BK

Rat Leptin ELISA Kit CATALOG# 90040 Crystal Chem

Rat Insulin ELISA Kit CATALOG# 900103 Crystal Chem

Rat IGF-I ELISA Kit Nr: ERIGFI Thermo Scientific

Rat Growth Hormone ELISA Kit KRC5311 Thermo Scientific

Victor 3 1420-012 Multilabel Counter, Perkin Elmer precisely, Wallac,

Washer Tecan - hydro Flex

### 8.4 Software

Image J public domain, Open Source

Geldokumentationssystem (Gel iX Imager, Intas)

Graph Pad Software, Inc. (La Jolla, USA)

Microsoft Excel 2018/2019 (Microsoft)

MxPro – Mx3000p v4.01 (Stratagene)

Nanodrop 1000 V.3.6.0 (Thermo Scientific)

Pages macOS (Apple)

Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research) Windows Microsoft Excel V6.0

(Microsoft)

## 9. Quellenverzeichnis

1. Flegal, K.M., et al., Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2013. **309**(1): p. 71-82.
2. Alberti, G., et al. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. 2006 [cited 2018 february]; Available from: <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome>.
3. World Health Organization. *Obesity and overweight*. 2017 10. 2017 [cited 2018 02]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
4. Kingsbury, K.J., et al., The fatty acid composition of human depot fat. *Biochem J*, 1961. **78**: p. 541-50.
5. 11022, I.U., Fast jeder zweite Deutsche würde gerne abnehmen - 38 Prozent haben schon einmal eine Diät gemacht -, in INSTITUT FÜR DEMOSKOPIE ALLENSBACH. 10. April 2014.
6. Harris, J.A. and F.G. Benedict, A Biometric Study of Human Basal Metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1918. **4**(12): p. 370-3.
7. Mifflin, M.D., et al., A new predictive equation for resting energy expenditure in healthy individuals. *Am J Clin Nutr*, 1990. **51**(2): p. 241-7.
8. Wang, Z., et al., Evaluation of specific metabolic rates of major organs and tissues: comparison between nonobese and obese women. *Obesity (Silver Spring)*, 2012. **20**(1): p. 95-100.
9. Grattan, B.J., Jr. and J. Connolly-Schoonen, Addressing weight loss recidivism: a clinical focus on metabolic rate and the psychological aspects of obesity. *ISRN Obes*, 2012. **2012**: p. 567530.
10. Last, A.R. and S.A. Wilson, *Low-carbohydrate diets*. *Am Fam Physician*, 2006. **73**(11): p. 1942-8.
11. Paoli, A., et al., Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *Eur J Clin Nutr*, 2013. **67**(8): p. 789-96.
12. Sharma, S., et al., Seizure control and biochemical profile on the ketogenic diet in young children with refractory epilepsy--Indian experience. *Seizure*, 2009. **18**(6): p. 446-9.



13. Cai, Q.Y., et al., Safety and tolerability of the ketogenic diet used for the treatment of refractory childhood epilepsy: a systematic review of published prospective studies. *World J Pediatr*, 2017. **13**(6): p. 528-536.
14. Volek, J.S., et al., Carbohydrate restriction has a more favorable impact on the metabolic syndrome than a low fat diet. *Lipids*, 2009. **44**(4): p. 297-309.
15. Hauner, H., *Risiken kohlenhydratarmer Diäten*. *Dtsch Arztebl International*, 2005. **102**(11): p. 750-.
16. Miller, B.V., et al., An evaluation of the atkins' diet. *Metab Syndr Relat Disord*, 2003. **1**(4): p. 299-309.
17. Feinman, R.D., et al., Dietary carbohydrate restriction as the first approach in diabetes management: critical review and evidence base. *Nutrition*, 2015. **31**(1): p. 1-13.
18. Kimelberg, D.P.M.C.H., Role of cholesterol in membranes effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 30 November 1973,. **Volume 330**,(Issue 1): p. Pages 8-26.
19. Community, L.S.T.R., *Leber und Fettstoffwechsel*  
. *Medizinische Physiologie der Leberfunktionen*  
.
20. Kane, C.R.P.J.P., *Lipid and Lipoprotein Metabolism*. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, 15 September 2006.
21. LEVY, S.E.R.I., *Lipoprotein Metabolism*. *Advances in Lipid Research*  
, 1975. **Volume 13**: p. Pages 1-89.
22. Brown, G.T. and D.E. Kleiner, Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism*, 2016. **65**(8): p. 1080-6.
23. Denzer, C., et al., Gender-Specific Prevalences of Fatty Liver in Obese Children and Adolescents: Roles of Body Fat Distribution, Sex Steroids, and Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009. **94**(10): p. 3872-3881.
24. Singh, S.P., et al., Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) without insulin resistance: Is it different? *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015. **39**(4): p. 482-8.
25. Johannes Weiß, M.R., Andreas Geie, Nichtalkoholische Fettlebererkrankung Epidemiologie, Verlauf, Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt.*, 27. Juni 2014. **Jg. 111**(Heft 26).

26. Byrne, C.D. and G. Targher, *NAFLD: a multisystem disease*. J Hepatol, 2015. **62**(1 Suppl): p. S47-64.
27. Bril, F., et al., Hepatic Steatosis and Insulin Resistance, But Not Steatohepatitis, Promote Atherogenic Dyslipidemia in NAFLD. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2016. **101**(2): p. 644-652.
28. Loomis, A.K., et al., Body Mass Index and Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Two Electronic Health Record Prospective Studies. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2016. **101**(3): p. 945-952.
29. Park, H.E., et al., Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated With Coronary Artery Calcification Development: A Longitudinal Study. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2016. **101**(8): p. 3134-3143.
30. Denis M Medeiros, R.H.F., Denis M Medeiros, Robert E. C. Wildman, *Advanced Human Nutrition*. 2013: Jones & Bartlett Publishers.
31. al., G.e., *Healthy percentage body fat ranges*. American Journal of Clinical Nutrition , Sept. 2000. **Vol. 72**.
32. Kimbal, J.W. *Adipose Tissue*. 15.12.2018; Available from: <http://www.biology-pages.info/A/AdiposeTissue.html>.
33. Wu, J., et al., Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. Cell, 2012. **150**(2): p. 366-76.
34. EE, K., *Adipose tissue as an endocrine organ*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, June 2004. **89**.
35. Montague, C.T. and S. O'Rahilly, The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. Diabetes, 2000. **49**(6): p. 883-8.
36. Kern, P.A., et al., Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(5): p. E745-51.
37. Marette, A., Molecular mechanisms of inflammation in obesity-linked insulin resistance. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27 Suppl 3**: p. S46-8.
38. Mokdad, A.H., et al., Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. JAMA, 2003. **289**(1): p. 76-9.
39. Mazurek, T., et al., Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. Circulation, 2003. **108**(20): p. 2460-6.

40. Pezeshkian M, N.M., Najjarpour-Jabbari H, Abolfathi A, Darabi M, Darabi M, Shaaker M, Shahmohammadi G, *Fatty acid composition of epicardial and subcutaneous human adipose tissue*. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 2009. 7.
41. Liang, H. and W.F. Ward, PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*, 2006. **30**(4): p. 145-51.
42. Harms, M. and P. Seale, Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*, 2013. **19**(10): p. 1252-63.
43. Moro, C., et al., Differential regulation of atrial natriuretic peptide- and adrenergic receptor-dependent lipolytic pathways in human adipose tissue. *Metabolism*, 2005. **54**(1): p. 122-31.
44. <https://de.wikipedia.org/wiki/Lipoproteinlipase>, *Lipoproteinlipase*.
45. Barbagallo, C.M., et al., Transient chylomicronemia preceding the onset of insulin-dependent diabetes in a young girl with no humoral markers of islet autoimmunity. *Eur J Endocrinol*, 2004. **150**(6): p. 831-6.
46. Ginsberg, H.N., *Lipoprotein physiology*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998. **27**(3): p. 503-19.
47. A., W., *Adipositas Ätiologie, Folgekrankheiten, Diagnose, Therapie*. 2008: Springer. 422.
48. Heinrich, P.C., Mueller, Matthias, Graeve, Lutz (Hrsg.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2014.
49. Park, H.K. and R.S. Ahima, Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism*, 2015. **64**(1): p. 24-34.
50. *Adiponectin funktion Insulin*. Available from: [http://qsystem.gblifesciences.com/GND\\_ADIPOQ\\_obesity.html](http://qsystem.gblifesciences.com/GND_ADIPOQ_obesity.html).
51. Claudia Menzaghi<sup>1</sup>; Vincenzo Trischitta<sup>1</sup>, A.D., Genetic Influences of Adiponectin on Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Cardiovascular Disease. *DISCLOSURES Diabetes*, (2007;56(5):1198-1209.).
52. Ghoshal, K. and M. Bhattacharyya, Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity. *World Journal of Diabetes*, 2015/02/15(10.4239/wjd.v6.i1.151).
53. Lihn, A.S., S.B. Pedersen, and B. Richelsen, Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*, 2005. **6**(1): p. 13-21.

54. *FASN*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=2194>.
55. Jayakumar A., T.M.-H., Huang W.-Y., Al-Feel W., Hsu M., Abu-Elheiga L., Chirala S.S., Wakil S.J., *Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning*.
56. Jayakumar, A., et al., Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(19): p. 8695-9.
57. Rossmannith, B.K.W., *Hormone und Hormonsystem – Lehrbuch der Endokrinologie*. Vol. 3. Springer Spektrum.
58. (Hrsg.), S.P., *Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik*. Müller-Seifert. Vol. 73. Springer.
59. Ganong, W.F., *Lehrbuch der Medizinischen Physiologie: Die Physiologie des Menschen für Studierende der Medizin und Ärzte*. 2013: Springer, Berlin/ Heidelberg. 352.
60. Kurtz, L., Müller, Pedain, Rettig, Wagner, *Duale Reihe Physiologie*. Thieme Verlag.
61. Pape, H.-C., R. Klinke, and B. Brenner, *Physiologie*. 2014, Stuttgart: Thieme.
62. Vijayakumar, A., et al., Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth Horm IGF Res*, 2010. **20**(1): p. 1-7.
63. Bielohuby, M., et al., Impaired glucose tolerance in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013. **305**(9): p. E1059-70.
64. Bielohuby, M., et al., Lack of dietary carbohydrates induces hepatic growth hormone (GH) resistance in rats. *Endocrinology*, 2011. **152**(5): p. 1948-60.
65. Barf, R.P., et al., Increased food intake and changes in metabolic hormones in response to chronic sleep restriction alternated with short periods of sleep allowance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012. **302**(1): p. R112-7.
66. Bidlingmaier, M., et al., Reference intervals for insulin-like growth factor-1 (igf-i) from birth to senescence: results from a multicenter study using a new automated chemiluminescence IGF-I immunoassay conforming to recent international recommendations. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014. **99**(5): p. 1712-21.
67. Galvao, C.M., et al., A systematic review of the effectiveness of cutaneous warming systems to prevent hypothermia. *J Clin Nurs*, 2009. **18**(5): p. 627-36.

68. Sela, M., C.B. Anfinsen, and W.F. Harrington, The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochim Biophys Acta*, 1957. **26(3)**: p. 502-12.
69. Haines, A.M., et al., Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 2015. **36(6)**: p. 941-4.
70. Tannenbaum, G.S., W. Gurd, and M. Lapointe, Leptin is a potent stimulator of spontaneous pulsatile growth hormone (GH) secretion and the GH response to GH-releasing hormone. *Endocrinology*, 1998. **139(9)**: p. 3871-5.
71. Veldhuis, J.D., et al., Gender, sex-steroid, and secretagogue-selective recovery from growth hormone-induced feedback in older women and men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96(8)**: p. 2540-7.
72. Takahashi, Y., D.M. Kipnis, and W.H. Daughaday, *Growth hormone secretion during sleep*. *J Clin Invest*, 1968. **47(9)**: p. 2079-90.
73. Weiss, J., *Tierpflege in Forschung und Klinik*. Vol. Vol. 3. 2009: Enke Verlag .
74. Refinetti, R., Effects of food temperature and ambient temperature during a meal on food intake in the rat. *Physiol Behav*, 1988. **43(2)**: p. 245-7.
75. Reinhart Kluge, P.-R., Dirk Wedekind, Hannover, Fachinformation- Aus dem Ausschuss für Genetik und Labortierzucht- Auszuchtstämme. GV Solas- Gesellschaft für Versuchstierkunde, Feb. 2016.
76. Bustin, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 2000. **25**: **169-193**.
77. Pfaffl, M.W.H., M., Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 2001. **23**: **275-282**.
78. Bielohuby, M., et al., Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **300(1)**: p. E65-76.
79. Adam-Perrot, A., P. Clifton, and F. Brouns, Low-carbohydrate diets: nutritional and physiological aspects. *Obes Rev*, 2006. **7(1)**: p. 49-58.
80. Samaha, F.F., et al., A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N Engl J Med*, 2003. **348(21)**: p. 2074-81.

81. Shai, I., et al., Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med*, 2008. **359**(3): p. 229-41.
82. Caton, S.J., et al., Low-carbohydrate high-fat diets: regulation of energy balance and body weight regain in rats. *Obesity (Silver Spring)*, 2009. **17**(2): p. 283-9.
83. Lobley, G.E., et al., Impact of high-protein diets with either moderate or low carbohydrate on weight loss, body composition, blood pressure and glucose tolerance in rats. *Br J Nutr*, 2007. **97**(6): p. 1099-108.
84. Westman, E.C., et al., Effect of 6-month adherence to a very low carbohydrate diet program. *Am J Med*, 2002. **113**(1): p. 30-6.
85. West, D.B. and B. York, Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr*, 1998. **67**(3 Suppl): p. 505S-512S.
86. Slob, A.K. and J.J. Van der Werff Ten Bosch, *Sex differences in body growth in the rat*. *Physiol Behav*, 1975. **14**(3): p. 353-61.
87. Badiani, A., et al., Sensitization of stress-induced feeding in rats repeatedly exposed to brief restraint: the role of corticosterone. *Brain Res*, 1996. **710**(1-2): p. 35-44.
88. Kurosaka, Y., et al., Characterization of fat metabolism in the fatty liver caused by a high-fat, low-carbohydrate diet: A study under equal energy conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **487**(1): p. 41-46.
89. Picchi, M.G., et al., A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. *Acta Cir Bras*, 2011. **26 Suppl 2**: p. 25-30.
90. Zhang, Y., et al., Transcriptional profiling of human liver identifies sex-biased genes associated with polygenic dyslipidemia and coronary artery disease. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23506.
91. Venetsanaki, V. and S.A. Polyzos, Menopause and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review Focusing on Therapeutic Perspectives. *Curr Vasc Pharmacol*, 2019. **17**(6): p. 546-555.
92. Cote, I., et al., Liver fat accumulation may be dissociated from adiposity gain in ovariectomized rats. *Climacteric*, 2012. **15**(6): p. 594-601.
93. Barrera, J., et al., Bazedoxifene and conjugated estrogen prevent diet-induced obesity, hepatic steatosis, and type 2 diabetes in mice without impacting the reproductive tract. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014. **307**(3): p. E345-54.

94. Fan, J.G., et al., Effects of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J Gastroenterol*, 2003. **9**(9): p. 2045-9.
95. Perito, E.R., L.A. Rodriguez, and R.H. Lustig, *Dietary treatment of nonalcoholic steatohepatitis*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013. **29**(2): p. 170-6.
96. Promrat, K., et al., Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2010. **51**(1): p. 121-9.
97. Hellstrom, L., et al., Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. *J Intern Med*, 2000. **247**(4): p. 457-62.
98. Handjieva-Darlenska, T. and N. Boyadjieva, The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. *J Physiol Biochem*, 2009. **65**(2): p. 157-64.
99. Kopchick, J.J., et al., The effects of growth hormone on adipose tissue: old observations, new mechanisms. *Nat Rev Endocrinol*, 2020. **16**(3): p. 135-146.
100. Davis, S.R., et al., Understanding weight gain at menopause. *Climacteric*, 2012. **15**(5): p. 419-29.
101. Ludgero-Correia, A., Jr., et al., Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. *Nutrition*, 2012. **28**(3): p. 316-23.
102. Poehlman, E.T., M.J. Toth, and A.W. Gardner, Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. *Ann Intern Med*, 1995. **123**(9): p. 673-5.
103. Cappon, J.P., et al., Acute effects of high fat and high glucose meals on the growth hormone response to exercise. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. **76**(6): p. 1418-22.
104. Mejia-Naranjo, W., et al., Regulation of the splenic somatotropic axis by dietary protein and insulin-like growth factor-I in the rat. *Growth Horm IGF Res*, 2003. **13**(5): p. 254-63.
105. Ammann, P., et al., Administration of growth hormone in selectively protein-deprived rats decreases BMD and bone strength. *Bone*, 2010. **46**(6): p. 1574-81.
106. Yang, H.L., et al., Effect of suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) on fat metabolism induced by growth hormone (GH) in porcine primary adipocyte. *Mol Biol Rep*, 2012. **39**(9): p. 9113-22.

107. Eberhard Nieschlag, H.M.B., Susan Nieschlag, *Andrologie: Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer, Heidelberg 2009. **3. Auflage**: p. S. 119–121.
108. Kanakis, G.A., C.P. Tsametis, and D.G. Goulis, *Measuring testosterone in women and men*. *Maturitas*, 2019. **125**: p. 41-44.
109. Noland, R.C., *Exercise and Regulation of Lipid Metabolism*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015. **135**: p. 39-74.
110. McInnes, K.J., et al., Deletion of the androgen receptor in adipose tissue in male mice elevates retinol binding protein 4 and reveals independent effects on visceral fat mass and on glucose homeostasis. *Diabetes*, 2012. **61**(5): p. 1072-81.
111. Karbowska, J. and Z. Kochan, Fat-reducing effects of dehydroepiandrosterone involve upregulation of ATGL and HSL expression, and stimulation of lipolysis in adipose tissue. *Steroids*, 2012. **77**(13): p. 1359-65.
112. Ali Abulmeaty, M.M., et al., Metabolic Effects of Testosterone Hormone Therapy in Normal and Orchiectomized Male Rats: From Indirect Calorimetry to Lipolytic Enzymes. *Int J Endocrinol*, 2019. **2019**: p. 7546385.
113. Howe, H.R., 3rd, et al., Increased adipose tissue lipolysis after a 2-week high-fat diet in sedentary overweight/obese men. *Metabolism*, 2011. **60**(7): p. 976-81.





LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



**Eidesstattliche Versicherung**

Diesch, Sophia-Theresa

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Geschlechtsspezifische Auswirkungen von LC-HF-Diäten auf den Fett-, Glukose-,  
Leberstoffwechsel und auf die GH/IGF-I Achse von Ratten**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Regensburg, 17.01.2022

Sophia-Theresa Diesch

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand