

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV Campus Innenstadt

Klinikum der Universität  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Geschlechtsspezifische Auswirkungen von „low-carbohydrate-high-fat“  
Diäten – Skelettmuskulatur, Triacylglyceridmetabolismus und  
Veränderungen der somatotropen Achse**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Korbinian Beil  
aus München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Berthold Koletzko  
Prof. Dr. med. Susanna Hofmann

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

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2022

Meinen Eltern & meinen Großeltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Adipositas in der Gesellschaft	1
1.2 Energiegehalt von Makronährstoffen und Energieverbrauch unterschiedlicher Organe	2
1.3 Thermogenese der unterschiedlichen Makronährstoffe	4
1.4 Low-carbohydrate high-fat- Diäten und deren heute bekannte Effekte auf den Organismus	5
1.5 Triglyzeride und Grundlagen des Fettstoffwechsels	7
1.6 Energiestoffwechsel in der Skelettmuskulatur	9
1.7 Die Rolle von Somatotropin (Wachstumshormon, growth hormone (GH)) und dem insulinartigen Wachstumsfaktor I (insulin-like growth-factor I, IGF-I) im Energiestoffwechsel und in der Ernährungsphysiologie	9
1.8 Verschiedene Teilprojekte innerhalb von seriellen Experimenten	12
1.9 Abkürzungsverzeichnis	13
<b>II. Zielsetzung dieser Doktorarbeit</b>	<b>14</b>
<b>III . Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1 Rattenmodell, Haltungsbedingungen und Probengewinnung	16
3.1.1 Einführung und Haltung GHB I	16
3.1.3 Diäten	18
3.1.4 Paarfütterung und Wiegen	18
3.1.5 Kastration	19
3.1.5.1 Ovariectomie der weiblichen Tiere	20
3.1.5.2 Orchidektomie der männlichen Tiere	21
3.1.5.3 Postoperative Medikation	21
3.1.5.4 Fadenzug und Komplikationen	22
3.1.6 Serienblutentnahme beim nüchternen Tier zur GH Bestimmung	22

3.1.7 Versuchsabschluss	23
3.5 Molekularbiologische Methoden	24
3.5.1 Grundlagen der RNA Handhabung.	24
3.5.2 RNA Isolation	24
3.5.3 RNA Quantifizierung durch Nano Drop	26
3.5.4 Reinheitsüberprüfung mit der Agarosegelelektrophorese	26
3.5.5 Umschreiben der RNA in complementary DNA mit Hilfe der reversen Transkriptase	28
3.5.6 Primer für die PCR	28
3.5.7 Housekeeping	29
3.5.8 „Real time-PCR“	29
3.6 Laborchemische Methoden	30
3.6.1 Grundlagen der Triglyzeridextraktion in der Skelettmuskulatur	30
3.6.2 Triacylglycerid-Extraktion aus dem Skelettmuskel	30
3.6.3 Triacylglycerid-Quantifikation aus dem Skelettmuskel	31
3.6.5 GH und IGF-I Bestimmung	33
3.7 Statistische Auswertung	33
<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1 Phänotypische Ergebnisse im Geschlechtervergleich.	35
4.1.1 Lebendgewichte bei Versuchsabschluss	35
4.1.3 Muskelgewicht (Musculus gastrocnemius)	40
4.1.3 Fettfreie Masse	42
4.2 Laborchemische Ergebnisse im Serum	44
4.2.1 GH im Serum	44
4.2.2 IGF-I im Serum	47
4.2.3 Triacylglyceride im Serum	50
4.3 TAG-Quantifizierung in der Skelettmuskulatur	53
4.4. Ergebnisse der quantitativen PCR aus Skelettmuskulatur	55
4.4.1 Expression von GH-Rezeptor in der Skelettmuskulatur	55

4.4.2 Expression von IGF-I-Rezeptor in der Skelettmuskulatur	57
4.4.3 Expression von CPT1B in der Skelettmuskulatur	60
4.4.4 Expression von Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) in der Skelettmuskulatur	61
<b>V. Diskussion</b>	<b>64</b>
5.1 Kritische Vorbemerkungen zur verwendeten Methodik	64
5.2 Keine Veränderung des Körpergewichts sowie der fettfreien Masse durch erhöhten Anteil an Fetten in der Nahrung	66
5.3 Muskelverlust durch fehlendes Testosteron sowie mutmaßliche Fettverwertungsstörung nach Kastration unbeeinflusst durch GH.	67
5.4. Gewichtszunahme und Zunahme der fettfreien Masse nach Ovariectomie durch erhöhte IGF-I Sekretion.	69
5.5 Geschlechtsabhängige Suppression der GH Sekretion durch LCHF-Diäten	70
5.6 Geschlechtsunabhängige Suppression der IGF-I Konzentration unter LCHF-Diäten.	72
5.7 Hoher Anteil von Nahrungsfetten führt zu Hypertriglyceridämie	72
5.8 Keine Veränderung der Expression von CPT1B und ATGL durch Diäten oder den gonadalen Status.	74
<b>V. Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>VII. Material &amp; Herstellerverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>VII. Referenzen</b>	<b>81</b>
<b>VIII. Danksagung</b>	<b>86</b>

# I. Einleitung

## 1.1 Adipositas in der Gesellschaft

Adipositas (aus dem lateinischen „adiposus“ = fett) bezeichnet nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) den Zustand, bei dem der Körper eine so große Menge an Fettgewebe angelegt hat, dass es sich negativ auf die Gesundheit auswirken kann [1]. Neben sozialen Folgen z.B. durch Diskriminierung bei Kindern und Erwachsenen, die auch zu Depressionen führen kann, ist Adipositas ein Risikofaktor für die Entstehung von diversen organischen Erkrankungen. Die Bandbreite reicht dabei von Herzinfarkt und Schlaganfall über Diabetes Mellitus Typ II zu Gallensteinen und sogar zu einigen Formen von Krebs [2]. Diese negativen Auswirkungen sind schon länger bekannt. Trotzdem steigt die weltweite Prävalenz von Adipositas und Übergewicht weiter an. Daher wurde die Adipositas 1997 von der World Health Organisation als Epidemie bezeichnet [3]. Im Jahr 2000 wurde der Punkt erreicht, an dem erstmals gleich viele Menschen auf der Erde mit Übergewicht und mit Untergewicht leben [4]. 2012 veröffentlichte Daten zeigen, dass in den USA mehr als ein Drittel der erwachsenen Bevölkerung übergewichtig ist und sogar 17% der Kinder/Jugendlichen betroffen sind [5].

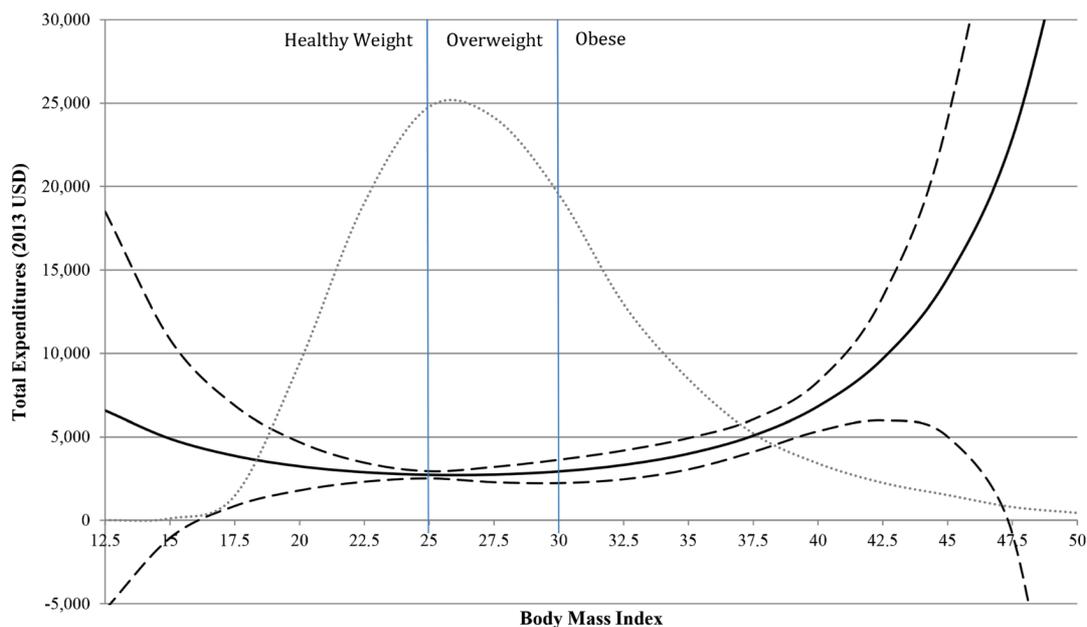


Abbildung 1 (kurz: Abb.): Vorhergesagte Ausgaben im Medizinsektor in USD als durchgezogene Linie, die gepunktete Linie zeigt die Verteilung des BMI in der Bevölkerung in den USA. Die Daten entstammen dem MEPS (Medical Expenditure Panel Survey).

Neben den klar sichtbaren Nachteilen für das Individuum stellt diese Entwicklung auch das Gesundheitssystem vor eine gewaltige finanzielle Herausforderung. So nahmen die mit Adipositas assoziierten Ausgaben in den Vereinigten Staaten von 2005 bis 2010 um 48,7% von 212,4 Milliarden auf 315,8 Milliarden US-Dollar zu. [6]

Auch wenn die Entstehung von Adipositas teilweise mit Medikamenteneinnahme, psychischen Störungen und endokrinologischen Erkrankungen verbunden ist, so spielt die wichtigste ursächliche Rolle weiterhin die Ernährung bzw. das Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch [7].

## 1.2 Energiegehalt von Makronährstoffen und Energieverbrauch unterschiedlicher Organe

Ernährung ist jedoch nicht gleich Ernährung. Grundlauge unseres Essens sind Nährstoffe, welche unabdingbar für die Aufrechterhaltung unseres Organismus sind. Eingeteilt werden diese in Makro und Mikronährstoffe. Mikronährstoffe umfassen alle Vitamine, Spurenelemente sowie Mineralstoffe, und sind rein kalorisch betrachtet irrelevant. Unter Makronährstoffen versteht man die Nahrungsbestandteile Fette, Proteine (Eiweiße) sowie Kohlehydrate, welche die Energieträger darstellen. Dabei gibt es Unterschiede im Energiegehalt, Fette haben eine ungefähr doppelt so hohe Energiedichte wie Kohlehydrate und Proteine.

	<b>Energiegehalt in kJ/g</b>	<b>Energiegehalt in kcal/g</b>
<b>Kohlehydrate</b>	17,2	4,1
<b>Fette</b>	39	9,3
<b>Protein</b>	17,2	4,1

Tabelle: 1 (kurz: Tab.): Nährwerte von Makronährstoffen

Wenn dem Organismus mehr Energie zugeführt wird, als er verbraucht, so wird die überschüssige Energie in Form von Depots angelegt und der Organismus nimmt an Gewicht zu. Wird weniger Energie als benötigt zugeführt, werden die Depots

angebrochen um Energie bereitzustellen. Wird über längere Zeit mehr verbraucht als zugeführt, nimmt das Gewicht des Organismus ab. Eine näherungsweise Bestimmung des täglichen Grundumsatzes, also des Grundverbrauches ohne besondere körperliche Aktivität, bietet die Formel von Harris & Benedikt [8].

Männer:  $66,5 + (13,75 \times \text{Gewicht in kg}) + (5,003 \times \text{Größe in cm}) - (6,755 \times \text{Alter in Jahren})$

Frauen:  $655,1 + (9,563 \times \text{Gewicht in kg}) + (1,850 \times \text{Größe in cm}) - (4,676 \times \text{Alter in Jahren})$

Abb 2: Berechnung des Grundumsatzes nach Harris & Benedikt

Für junge Männer (25 Jahre) mit einem Gewicht von 85 Kilogramm und einer Größe von 185cm errechnet sie so ein Grundumsatz von 1.986kcal. Für Frauen desselben Alters mit einem Gewicht von 65 Kilogramm und einer Größe von 170cm errechnet sich 1.468kcal. Die Formel bildet auch heute noch die Grundlage für viele Ernährungswissenschaftler, Ernährungsberater und Sportmediziner, stößt jedoch an Grenzen und wird ungenauer bei Individuen mit einer großen Menge an fettfreier Masse [9]. Dies kommt daher, dass die fettfreie Masse durch Training deutlich vergrößert werden kann, die Organgewichte jedoch unverändert bleiben. Die Aufrechterhaltung von mehr Muskulatur verbraucht mehr Energie. Der Grundumsatz steigt. In folgender Tabelle werden die sogenannten „K-Werte“ unterschiedlicher Organe und Gewebe aufgezeigt. Bei dem K-Wert handelt es sich um eine Konstante, welche den Grundumsatz eines Gewebes in kcal/kg beschreibt. Besonders hoch ist der Verbrauch von Leber und Gehirn. Vergleichsweise zu vernachlässigen der von Fettgewebe. Multipliziert mit dem Gesamtgewicht des Organs im jeweiligen Individuum kann der Anteil des Grundumsatzes durch einzelne Organe genau bestimmt werden [10].

	<b>Leber</b>	<b>Gehirn</b>	<b>Skelettmuskel</b>	<b>Fettgewebe</b>
K-Wert in kcal/ kg Organ	200	220	13	4,5

Tab 2: K-Wert ausgewählter Organe;

Auch wenn der Wert für Skelettmuskulatur vergleichsweise gering und unbedeutend wirkt, ist nicht zu vernachlässigen wie groß der Anteil an Skelettmuskulatur im Körper

ist. Umgekehrt trägt z.B. das Gehirn trotz hohen K-Werts nur relativ wenig zum Grundumsatz bei.

Neben dem Grundumsatz stellen die körperliche Aktivität und die Thermogenese der Nahrungsbestandteile selbst die wichtigsten Determinanten des täglichen Energieumsatzes dar. Dabei beträgt der Anteil der körperlichen Aktivität ca. 30% und der der Thermogenese ca. 10% am gesamten Energieverbrauch des Organismus [11]. Diese Gesamtheit wird auch als Leistungsumsatz zusammengefasst. Sportler mit einer großen Muskelmasse und mit täglicher sportlicher Aktivität können ihren Umsatz dabei leicht verdoppeln. Ein Marathonläufer mit einem Gewicht von 85kg verbraucht für die 42,195km zum Beispiel ungefähr 3587kcal [12].

### 1.3 Thermogenese der unterschiedlichen Makronährstoffe

Unter der postprandialen Thermogenese versteht man die Energie die aufgewendet wird, um die Nährstoffe in der Nahrung aufzubrechen, zu verwerten und zu speichern. Diese ist nicht für alle Nährstoffe gleich. Für Fette wurde ein Wert von 0% bis 3% gemessen, das bedeutet, dass nur 0% - 3% der aufgenommenen Energie gleich wieder für deren Verwertung aufgewendet werden müssen. Für Kohlehydrate liegt der Wert bei 5% - 10% und für Proteine bei 20% - 30% [13]. Eine besonders fettreiche Ernährung beinhaltet also sowohl eine deutlich höhere Energiedichte als auch eine verminderte postprandiale Thermogenese im Vergleich zu Diäten mit hohen Anteilen an Kohlehydraten oder Proteinen. Gleichzeitig wird einer erhöhten postprandialen Thermogenese ein stärkeres Sättigungsgefühl zugesprochen [14]. Insgesamt scheint eine fettreiche Diät also eher kontraproduktiv zu sein, wenn es um das Ziel des Gewichtsverlustes oder zumindest des Haltens des Gewichtes geht. Trotzdem haben sich in der heutigen Zeit viele sogenannte „high-fat“-Diäten etabliert. In aller Regel wird dabei der Fettanteil der Nahrung zu Lasten der Kohlehydrate gesteigert, weshalb diese Diäten „low carbohydrate/high fat-Diäten“ (im weiteren Text „LCHF“ abgekürzt) genannt werden. Ein bekannter Vertreter dieser Diäten ist die Atkins Diät, welche bereits in den frühen 70er Jahren von dem Kardiologen Robert Atkins propagiert wurde, in jüngerer Zeit jedoch erneut sehr populär geworden ist.

## 1.4 Low-carbohydrate high-fat- Diäten und deren heute bekannte Effekte auf den Organismus

Verbraucher in den Vereinigten-Staaten geben jährlich zusammen 33 Milliarden US-Dollar für Mittel zum Abnehmen aus. Ein großer Anteil dieses Geldes fließt in Produkte für eine low-carb Diät [15]. Die Definition, ab wann sich eine Diät low-carb Diät nennen darf, ist im stetigen Wandel. In der nachfolgenden Tabelle findet sich ein in der Literatur häufig verwendetes Schema aus der Forschergruppe um Richard D. Feinman zur Differenzierung der low-carb-Diäten [16].

<b>Bezeichnung der Diät</b>	<b>Anteil der Kohlehydrate an den Gesamtkalorien</b>
very-low carb	<10%
low carb	10-26%
medium carb	26-45%
high carb	>45%

Tab 3: Differenzierung von low-carb Diäten nach Feinman

Die restlichen Kalorien werden jeweils durch die beiden anderen Makronährstoffe gedeckt. Wichtig ist, dass von Protagonisten dieser Diätformen gerade fetthaltige Nahrungsmittel nicht als Tabu angesehen werden, sondern der Verbraucher sogar dazu ermutigt wird diese zu verzehren. Als geeignete Nahrungsmittel bieten sich dann vor allem alle Sorten von Fleisch und Fisch, Käse, Nüsse, Samen, Eier und kohlehydratarmes Gemüse wie Kohl, Spinat und Mangold an. Allen voran soll damit ein schnellerer und effektiverer Gewichtsverlust als durch andere Diäten erreicht werden. Aus neuen Studien ist allerdings bekannt, dass eine LCHF-Diät einer low-fat Diät hinsichtlich des langfristigen Gewichtsverlustes nur marginal - ca 1kg mehr Gewichtsreduktion unter LCHF-Diät - überlegen ist. Zu Beginn der Ernährungsumstellung tritt der Effekt der Gewichtsreduktion jedoch schneller in Kraft, welches für viele Probanden eine subjektive Überlegenheit suggeriert. [17]. Dabei darf

nicht außer Acht gelassen werden, dass die Probanden dabei auch deutlich fettfreie Masse verloren, die an sich positiv für den Organismus ist. Hier müssten zukünftige Studien noch zeigen, ob eine LCHF-Diät gepaart mit sportlicher Betätigung diesen negativen Effekt eventuell kompensieren können [18]. Auch bei der Betrachtung von kardiovaskulären Risikofaktoren scheint eine LCHF Diät nicht unbedingt rein förderlich, da sie zu erhöhten Serum-LDL Spiegel führen kann. Gleichzeitig zeigen Probanden, welche über längere Zeit eine LCHF Diät verzehren, erhöhtes Serum-HDL und erniedrigte Triglyzeride (kurz: TAG) [19]. Hier muss also klar abgewogen werden, ob die Diät dem Patienten einen Vorteil oder einen Nachteil bringt. Auch ist nicht geklärt ob die Erhöhung des Serum-LDL abhängig von der Art der verzehrten Fette abhängig ist (gesättigte/ungesättigte Fettsäuren). Der Blutdruck, ein anderer, wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor, wird durch eine derartige Diät nicht beeinflusst [20]. Auf Laienforen im Internet wird eine LCHF-Diät auch häufig als positiv für Patienten mit Diabetes Mellitus Typ II bezeichnet. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit Hilfe einer LCHF-Diät ihren HBA1C-Wert verringern konnten [21]. Prinzipiell kann die reine Menge der verzehrten Kohlehydrate in einer Diät jedoch nicht mit der Entstehung eines Diabetes Mellitus Typ 2 in Verbindung gebracht werden. Hierbei spielen eher andere Faktoren wie der glykämische Index der verzehrten Kohlehydrate eine Rolle [22]. Bei Ratten zeigten kontrollierte Fütterungsversuche zudem ein völlig anderes Ergebnis, die Tiere entwickelten eine Insulinresistenz [23]. Zuletzt haben sich ketogene Diäten, also Diäten mit einem minimalen Anteil an Kohlehydraten, welche den Körper in einen Zustand der Ketose versetzen, für junge Patienten mit therapierefraktären Epilepsien etabliert. So bietet die Ernährung eine non-medikamentöse, non-chirurgische Option zur Therapie von schweren Epilepsien im Kindesalter [24].

Es wird klar, dass LCHF-Diäten eine Vielzahl an Effekten auf die unterschiedlichsten Organsysteme haben können. Gut untersucht sind allem voran der Einfluss auf Insulin und das Körpergewicht allgemein. Dabei wird jedoch selten ein Unterschied zwischen den Geschlechtern gemacht.

## 1.5 Triglyzeride und Grundlagen des Fettstoffwechsels

Die mit der Nahrung aufgenommenen Fette müssen erst aufgespalten werden um an ihrem Resorptionsort, dem Dünndarm, resorbiert werden. Hierfür bedient sich der Körper verschiedener Lipasen. Wichtige Lipasen sind dabei die pankreatische Lipase und die Magenlipase. Die pankreatische Lipase wird für dieses Zweck direkt über den ductus pancreaticus in den Dünndarm sezerniert [25]. Dort katalysieren sie die Zersetzung eines der häufigsten Lipide, der Triglyzeride. Bei Triglyzeriden handelt es sich um einen Ester aus Glycerin und drei beliebigen Fettsäuren. Nach deren Hydrolyse, können die Fettsäuren durch die Enterozyten aufgenommen werden [26]. Nachdem die Fettsäuren die Zellwand des Enterozyten passiert haben, werden sie dort wieder zu Triglyzeriden und mit anderen Lipiden und Proteinen zu amphiphilen Chylomikronen zusammengebaut. Dieser Zusammenschluss zu einem amphiphilen Molekül erlaubt den Transport der Lipide durch die Blutbahn. Die einzelnen Bestandteile zeigt die untenstehende Tabelle [27, 28].

<b>Bestandteil</b>	TAG	Phospholipide	Cholesterin	Proteine
<b>Anteil</b>	85 – 92%	6 – 12%	1-3 %	1-2%

Tab 4: Bestandteile des Chylomikronen

Im Gegensatz zu resorbierten Kohlehydraten, welche über die Pfortader direkt zur Leber transportiert werden, gelangen die Chylomikronen (auch VLDL, very-low-density-lipoprotein genannt) über die Lymphbahnen direkt in die Blutstrom und von dort zu den verschiedensten Organen. An den Endothelzellen der Kapillaren befindet sich wiederum das Enzym LPL (Lipoproteinlipase), welches TAG aus den Lipoproteinen abspalten kann [29]. Innerhalb der Zelle kann das Glycerin aus dem Triglyzerid zur Energiegewinnung in die Glykolyse eingeschleust werden. Die Fettsäuren jedoch können nicht direkt als Substrat der Glykolyse verwendet werden. Bevor die Fettsäuren durch Betaoxidation zur Energiegewinnung verwendet werden können, müssen sie erst aktiviert werden. Dies geschieht im ersten Schritt durch das

Enzym Acyl-CoA-Synthetase. Dabei werden die Fettsäuren mit Coenzym A zu Acyl-CoA verbunden. [30]. Da die Betaoxidation im Inneren der Mitochondrienmembran stattfindet und das Acyl-CoA nicht einfach durch die Membran diffundieren kann, wird die Acyl-Gruppe mit Carnitin verbunden. Diese Reaktion wird durch das Enzym Carnitin-Acyltransferase 1 (CPT1) katalysiert [31], welches ein wichtiges und geschwindigkeitsbestimmendes Enzym für den Fettstoffwechsel ist. Das Acyl-Carnitin gelangt nun über eine Translokase ins Innere des Mitochondriums. Dort wird das Carnitin wieder von der Acylgruppe durch CPT2 entfernt. Das Carnitin wird wieder in das Zytosol der Zelle geschleust und die Acyl-Gruppe in der Betaoxidation verwendet.

Es existieren verschiedene Isoformen von CPT1. CPT1A (auch L-CPT1 mit L für „liver“) findet sich vor allem in der Leber, jedoch auch in Fibroblasten, im Darm, im weißen Fettgewebe und anderem Gewebe [32]. CPT1C ist eine erst kürzlich entdeckte Isoform, welche im ZNS vorkommt. Die wichtige Isoform für uns war CPT1B (auch M-CPT1 mit M für „muscle“). Diese Isoform ist vor allem in der Skelettmuskulatur aktiv, weswegen in unseren Versuchen ausschließlich diese Isoform betrachtet wird [33].

Ein weiteres wichtiges Enzym im Fettstoffwechsel des menschlichen Organismus, welches vor allem im Fettgewebe, aber auch in der Herz und Skelettmuskulatur vorkommt ist die Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL). Das intrazellulär gelegene Enzym spaltet freie Fettsäuren von Triglyceriden ab. ATGL ist vor allem in der katabolen Phase des Organismus aktiv und stellt Fettsäuren für die Energiegewinnung bereit. Neben der hormon sensitiven Lipase (HSL) gehört ATGL zu den beiden wichtigsten Enzymen der Lipolyse [34, 35].

Veränderungen des Lipidstoffwechsels können verschiedene Krankheiten auslösen. Eine Hypertriglyceridämie wird ebenso wie die Hypercholesterinämie als ein Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose betrachtet mit den Folgen von Herzinfarkt, Schlaganfall, vaskulärer Demenz und ähnlichen Erkrankungen [36]. Gleichzeitig kann eine sehr ausgeprägte Hypertriglyceridämie in Verbindung mit einer akuten Pankreatitis gebracht werden [37].

## 1.6 Energiestoffwechsel in der Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur welche ungefähr 40% der Körpermasse eines Erwachsenen Menschen ausmacht ist - wie im oben im Kapitel 1.2 schon angeschnitten - für ca. 30% des Grundumsatzes verantwortlich [38, 39]. Daneben werden in der Muskulatur etwa viermal so viel Glykogen wie in der Leber gespeichert [40]. Zur Energiegewinnung kann die Muskulatur, je nach Belastung, aus einer breiten Auswahl von Substraten zurückgreifen. Bei kurzer, sehr starker Intensität greift die Muskulatur vor allem auf direkt gespeichertes Adenosintriphosphat (ATP), Creatinphosphat (CP) und auf das gespeicherte Glykogen zurück [41]. Bei langanhaltender Anstrengung unterhalb des Leistungsmaximums werden vor allem freie Fettsäuren und Glukose aus dem Blut verwendet. Dafür besteht die Möglichkeit zur Lipolyse intramuskulärer TAG zur Bereitstellung von freien Fettsäuren [42]. Im Ruhezustand wird Energie ausschließlich über Fettoxidation gewonnen [43]. Körperliche Aktivität beeinflusst die Art der Energiegewinnung in der Muskulatur also maßgeblich.

1963 schlug Sir Philip Randle vor, dass die Muskulatur jedoch - unabhängig von körperlicher Aktivität - die Fähigkeit besitzt, frei zwischen der Oxidation von Lipiden und Glukose zu wechseln, je nach der relativen Verfügbarkeit der Substrate. Randle nannte dies den „glucose - fatty acid cycle“. Mit der Oxidation von Fettsäuren kommt es zu einem Anstieg an intrazellulärem Acetyl-Coenzym-A (Acetyl-CoA). Acetyl-CoA selbst, als auch Metabolite wie Citrat, hemmen wichtige Enzyme des Glukosestoffwechsels (Pyruvatdehydrogenase, Phosphofruktokinase, Hexokinase). Umgekehrt führt ein Überschuss an Glukose zur Hemmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Fettoxidation - CPT1 [44][45].

## 1.7 Die Rolle von Somatotropin (Wachstumshormon, growth hormone (GH)) und dem insulinartigen Wachstumsfaktor I (insulin-like growth-factor I, IGF-I) im Energiestoffwechsel und in der Ernährungsphysiologie

Eines der wichtigsten Hormone für das Wachstum, aber auch den Metabolismus insgesamt ist das Peptidhormon Somatotropin, welches in der Wissenschaft mit GH (growth hormone) abgekürzt wird. Das Hormon besteht aus 191 Aminosäuren und wird von den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens im Gehirn gebildet und gespeichert. Die pulsatile Sekretion wird dabei vor allem von zwei weiteren Peptiden gesteuert. Somatoliberin (auch mit GHRH für „growth hormone releasing hormone“ abgekürzt) stimuliert die Sekretion, Somatostatin inhibiert diese und moduliert die Amplitude der Sekretion [46].

Die Wirkung von GH wird dabei über den growth-hormone-Rezeptor (GH-Rezeptor oder GHR) vermittelt. Der GH-Rezeptor ist ein transmembranöser Rezeptor aus der Klasse I der Zytokin-Rezeptor Familie. Eine Familie zu denen zum Beispiel auf der Prolaktinrezeptor, der Erythropoetinrezeptor und die Rezeptoren für die Interleukine 6 und 7 gehören [47]. Durch die Bindung von GH an seinem zugehörigen Rezeptor kommt er zur Aktivierung der Janus-Kinase 2 (JAK2) welche wiederum die Transkriptionsfaktoren 1,3 und 5 (STAT) aktiviert [48]. Eine Dysregulation dieser Signalkaskade ist mit der Entwicklung von Neoplasien in Verbindung gebracht worden [49].

Neben einem direkten Einfluss von GH auf verschiedene Systeme wirkt es auch über seinen Mediator: den insulinartigen Wachstumsfaktor I (kurz IGF-I). Dieses Peptidhormon, welches vor allem in der Leber synthetisiert wird, wird nach Aktivierung des GH-Rezeptors synthetisiert und sezerniert. An fast allen Zellen im Körper befinden sich IGF-I Rezeptoren. Auch beim IGF-I-Rezeptor handelt es sich um ein transmembranöses Protein. Die Wirkung wird hier jedoch nicht über eine Janus-Kinase vermittelt sondern über die Tyrosinkinase im intrazellulären Anteil des Rezeptors. Neben IGF-I bindet auch noch IGF-2 an den Rezeptor. Ist die Insulinkonzentration im Organismus sehr hoch, kann auch dieses Hormon an den Rezeptor binden, wobei die Affinität zu IGF-I deutlich höher ist [50, 51]. Ähnlich wie der GHR ist auch der IGF-I Rezeptor an der Entstehung von Tumoren beteiligt, wie zum Beispiel dem kleinzelligen Bronchialkarzinom [52].

Eine der Wirkungen der GH/IGF-I Achse ist die Bereitstellung von Substraten zur Energiegewinnung während dem Fasten. Bereits 1962 konnte Raben zeigen, dass synthetisches GH, welches Menschen substituiert wurde zu einem starken Anstieg von freien Fettsäuren im Serum führte [53]. Der gegenteilige Effekt - niedrige freie Fettsäuren - zeigte sich direkt postprandial [54]. In mutmaßlicher Korrelation dazu lassen sich postprandial supprimierte Serum-GH-Konzentrationen messen, welche während dem Fasten wieder ansteigen [55]. Diese bereits vor mehr als 60 Jahren aufgestellten Postulationen haben sich bis heute gehalten und konnten vielfach bestätigt werden [56]. Die bereitgestellten Fettsäuren können dann mittels Beta-Oxidation zur Energiegewinnung benutzt werden.

Neben dem katabolen Effekt - der Induktion von Lipolyse - hat GH mit seinem Mediator IGF-I jedoch auch anabole Effekte. Nach der Bindung an seinen Rezeptor kommt es über mehrere Phosphorylierungen zur Aktivierung des Phosphoinosid-3-Kinase / Protein-Kinase-B (auch Akt) Signalweges (kurz: PI3K/Akt) welcher eine wichtige Rolle in der Hypertrophie von Myotuben spielt [57]. Weiter unten an der Signalkaskade kommt es zur Phosphorylierung und somit zur Inhibition der Glykogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK3B). Dies führt zur einer vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors beta-Catenin [58]. Beta-Catenin ist maßgeblich an der Differenzierung von Satelliten-Zellen (Progenitor-Zellen in der Entstehung von Skelettmuskulatur) beteiligt und schützt vor Muskelatrophie [59, 60].

Aus diesem Grund werden GH und IGF-I als Dopingmittel im Sport verwendet, beide Substanzen stehen auf der Liste der verbotenen Substanzen der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA).

Durch das Fehlen oder durch Überaktivität der Hormone können sich jedoch auch Krankheiten entwickeln können. Bei der Akromegalie, einem durch exzessive GH-Sekretion charakterisierten, meist durch ein Hypophysenadenom verursachten Krankheitsbild, fallen Patienten, bei denen die Krankheit vor der Pubertät auftritt, durch einen Riesenwuchs auf. Bei Patienten nach der Pubertät kommt es noch zum Wachstum der knöchernen Akren wie Hände, Füße oder auch Teilen des Gesichts wie Kiefer und Stirn. Gleichzeitig besteht bei Patienten mit Akromegalie häufig ein erhöhte

Insulinresistenz oder sogar ein Diabetes Mellitus. Auf der anderen Seite gibt es das Krankheitsbild des Wachstumshormonmangels. Bei oft angeborenen Auftreten im Kindesalter steht der Minderwuchs im Vordergrund, tritt der Wachstumshormonmangel jedoch erst im Erwachsenenalter z.B. aufgrund einer traumatisch erworbene Hypophyseninsuffizienz auf, kommt es vor allem zu ungünstigen metabolischen Veränderungen (Adipositas, Dyslipidämie).

### 1.8 Verschiedene Teilprojekte innerhalb von seriellen Experimenten

Die Doktorarbeit wurde im Rahmen von seriellen Experimenten geschrieben, die - wie in Material und Methoden ausführlich erwähnt - mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden waren. Die aufwändige Fütterung der Tiere, die Operationen im zweiten Versuch, die Gabe der Antibiotika und letzten Endes der Versuchsabschluss waren technisch und aus Gründen des Arbeitsschutzes (Wochenend- und Nachtarbeit) alleine nicht durchführbar. Letzten Endes war es auch aus Gründen des Tierschutzes nicht möglich für jedes Teilprojekt eigene Tiere zur Verfügung gestellt zu bekommen.

Deshalb waren - neben mir - noch zwei weitere Doktoranden an den Experimenten in der Arbeitsgruppe beteiligt mit denen ein enger Austausch bestand. So beschäftigen sich alle drei Arbeiten grundsätzlich mit der Frage nach geschlechtsspezifischen Auswirkungen von LCHF-Diäten auf die somatotrope Achse, jede Arbeit beleuchtet dabei jedoch eigene Schwerpunkte. Der Schwerpunkt meiner Arbeit liegt in der Skelettmuskulatur und dem Triglyceridstoffwechsel. Die grundlegenden Daten wie Gewichte sowie die Ergebnisse zu IGF-I und GH werden dabei jedoch von allen Doktoranden verwendet, ebenso finden sich daher Überschneidungen im Bereich „Material & Methoden“, gerade im Hinblick auf die Tierhaltung und den Versuchsaufbau.

## 1.9 Abkürzungsverzeichnis

Abb: Abbildung

Acetyl-CoA: Acetyl-Coenzym-A

Akt: Protein-Kinase-B

ATGL: Adipozyten-Triglycerid-Lipase

ATP: Adenosintriphosphat

Carb: Carbohydrates/Kohlehydrate

chow: Referenzdiät

CP: Creatinphosphat

DMII: Diabetes mellitus Typ II

fem: female

GH-R: Growth Hormone Rezeptor

GH: Growth-hormone / Somatotropin

GHRH: Groth-hormone-realeasing-hormone

GSK3B: Glykogen-Synthase-Kinase 3 Beta

HFD: High fat Diet

IGF-I-R: Insulin like growth faktor I Rezeptor

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

JAK2: Janus Kinase 2

LCHF-1: Low-carb-high-fat Diät Nummer 1

LCHF-2: Low carb high fast Diät Nummer 2

LPL: Lipoproteinlipase

m.gast.med: Musculus gastrocnemius medialis

ORX: Orchiektomie

OVX: Ovariektomie

PI3K: Phosphoinosid-3-Kinase

STAT: Signal Transducer And Activator Of Transcription

Tab: Tabelle

TAG: Triglyzeride

VLDL: very-low-density-lipoprotein

## II. Zielsetzung dieser Doktorarbeit

Unsere westliche Gesellschaft befindet sich an einem Punkt, an dem anders als in früherer Zeit die Nahrungsaufnahme weniger Mittel zum Zweck - Versorgung mit Energie - ist, als vielmehr ein Lifestyleangebot. Kochbücher, Foodblogs und Youtube-Kanäle, die sich einzig und allein dem Essen widmen, sprießen aus dem Boden. Dort werden verschiedenste Diäten oft ohne wissenschaftlichen Hintergrund oder mit pseudowissenschaftlichen Theorien propagiert. Doch sind Diäten nicht immer ungefährlich und können natürlich schädliche Effekte mit sich ziehen und sogar Krankheiten auslösen. Daher besteht weiterhin großer Bedarf an detaillierten und fundierten Daten zum Einfluss unterschiedlicher Diäten auf Organsysteme und physiologische Regulationsmechanismen. Die reine Konzentration von Makronährstoffen scheint hier verantwortlich für die Beeinflussung eines Hormonsystems, sowie für krankhafte Veränderungen.

Wie oben beschrieben wurden von unserer Arbeitsgruppe in vorangegangenen Experimenten und Studien bereits Effekte von LC-HF-Diäten im Rattenmodell insbesondere in Bezug auf die GH-IGF-I-Achse untersucht. Allerdings wurden alle bisherigen Experimente ausschließlich an männlichen Tieren durchgeführt. Die vorliegende Arbeit soll hier einen Schritt weiter gehen. Erstmals sollte nicht ein Geschlecht alleine untersucht werden, sondern die Einflüsse der Diäten auf beide Geschlechter verglichen werden, um etwaige sexuelle Dimorphismen beschreiben zu können. Um eventuell sichtbare Geschlechtsunterschiede hinsichtlich ihrer hormonellen Grundlage verstehen zu können, sollten zudem in einem zweiten, klassisch endokrinologischen Experiment Tiere ohne die geschlechtstypische physiologische Geschlechtshormonsekretion aus den Gonaden, nämlich nach Kastration untersucht werden. Ein weiterer Unterschied zu den vorangegangenen Studien in unserer Arbeitsgruppe ist, dass Tiere nicht nur mit einer Standarddiät und zwei verschiedenen Low-carb-high-fat Diäten gefüttert wurden, sondern zusätzlich auch noch mit einer klassischen „Hochfettdiät“, bei der ein hoher Fettanteil mit gleich hohen Anteilen von Kohlehydraten und Proteinen kombiniert wird. Letztere Diät entspricht am ehesten einer ungesunden, westlichen Fastfood-Diät. In unserem Experiment sollte damit ein besserer

Vergleich der Effekte einer fettreichen Diät mit und ohne Kohlehydrate ermöglicht werden.

Ein zentraler Punkt der durchgeführten Experimente war dabei, dass alle 4 verwendeten Diäten absolut isokalorisch verfüttert wurden. Dadurch kann sichergestellt werden, dass eventuell zu beobachtende Unterschiede allein auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Makronährstoffe, nicht aber auf zufällige Unterschiede in der Fressmenge oder aber der Kaloriendichte zurückzuführen sind.

Neben der Erfassung augenscheinlicher Auswirkungen auf fettfreie Masse und Organengewichte sollte dabei ein besonderes Augenmerk auf die Skelettmuskulatur, beispielhaft erfasst über die Analyse des Musculus gastrocnemius, gelegt werden. Hierbei waren die Hauptfragestellungen: Wie verändert sich der Stoffwechsel in der Muskulatur, wenn keine oder nur sehr wenig Glucose bereitsteht? Wie verändert sich der Gehalt an Triglyzeriden in der Muskulatur als Depot für alternative Energiegewinnung zum Glucosestoffwechsel? Welche Gene, die Muskel- und Glukosestoffwechsel regulieren, werden durch die Diäten beeinflusst? Zeigen sich unter den verschiedenen Diäten geschlechtsspezifische Unterschiede in der Regulation der Hormone GH und IGF sowie deren Rezeptoren?

### III . Material und Methoden

Angaben zu Herstellern der verwendeten Materialien sowie Laborgeräte werden am Ende gesondert aufgelistet.

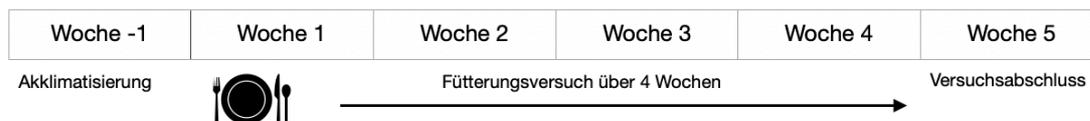
#### 3.1 Rattenmodell, Haltungsbedingungen und Probengewinnung

Insgesamt beinhaltet die Doktorarbeit zwei ähnliche, nacheinander abgelaufene Fütterungsversuche, welche wir intern mit dem Akronym GHB I und GHB II abkürzten (growth hormone brain). Im ersten Versuch (GHB I) wurden gonadal intakte Tiere untersucht. Im zweiten (GHB II) wurden die Tiere zunächst kastriert. Nach Kastration wurde analog wie bei GHB I vorgegangen. Der Ablauf beider Experimente ist schematisch in Abbildung 3 gegenübergestellt. Details werden im Folgenden beschrieben.

##### 3.1.1 Einführung und Haltung GHB I

Weibliche sowie männliche Ratten der Zuchtreihe „Wistar“ wurden bei Charles River bestellt (Sulzfeld, Germany). Die Unterbringung erfolgte in einem separaten Raum mit eigener Lüftung und Schleuse innerhalb des Tierstalls der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV. Zum Zeitpunkt der Einstellung waren die Tiere 12 Wochen alt und aus einem spezifisch-pathogenfreien Umfeld, sie waren also auf bestimmte Erreger negativ getestet. Weil eine kontrollierte Nahrungsaufnahme Voraussetzung für das Experiment ist, wurden die Ratten einzeln in Käfigen untergebracht. Über die gesamte Dauer des Experimentes blieben die Haltungsbedingungen gleich: Die durchschnittliche Temperatur wurde bei 21°C +/- 1,6°C gehalten, bei einer Luftfeuchtigkeit von 55% +/- 11%. Aufgrund des Einflusses von Schlaf auf Nahrungszunahme bzw. Gewichtsverlust [61] wurde ein strikter, von einer Schaltuhr überwachter Hell/Dunkel-Zyklus (12 Stunden hell, 12 Stunden dunkel) eingehalten. Jegliche Arbeit an den nachtaktiven Versuchstieren, die während ihrer Wachphase stattfand – wenn das Licht also ausgeschaltet war - wurde unter Rotlicht durchgeführt. Da Augen von Ratten Licht einer Wellenlänge von über 580nm nicht wahrnehmen können, wurde so ihr Wach/

## Versuch 1 ohne Kastration



## Versuch 2 (mit Kastration)

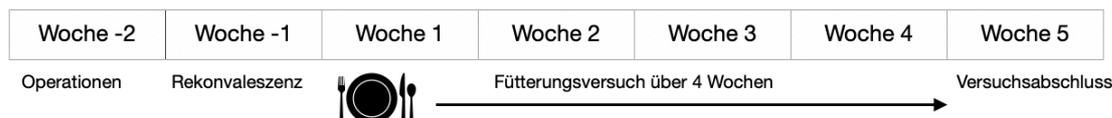


Abb 3: zeitliche Gegenüberstellung der beiden Versuche GHB I und GHB II. Der zweite Versuch dauerte aufgrund der Kastrationen eine Woche länger.

Schlafrhythmus nicht gestört. Zusätzlich stand den Tieren ein aus rotem Plexiglas gefertigter Unterschlupf als Enrichment zur Verfügung.

Bevor der Fütterungsversuch gestartet wurde, hatten die Tiere eine Woche Zeit, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Während dieser Eingewöhnungsphase stand ihnen Wasser und Futter ad libitum zur Verfügung. Die erfolgreiche Eingewöhnung wurde durch ein normales Futter und Sozialverhalten sowie durch die zu erwartende Gewichtszunahme bestätigt. Nach der ersten Woche wurden alle Tiere erneut gewogen und so auf vier verschiedene Gruppen aufgeteilt, dass das Durchschnittsgewicht in allen Gruppen gleich war („weightmatching“). Jegliches übrige Futter wurde aus den Raufen entfernt und die Tiere in frische Käfige gesetzt. Über die nächsten 30 Tage wurde den Tieren täglich neues Futter bereitgestellt. Darauf folgte unmittelbar der Versuchsabschluss mit Euthanasie und Sektion zur Probenentnahme.

### 3.1.2 Einführung und Haltung GHB II

Der einzige Unterschied zwischen den beiden Versuchen betraf die Kastration und die damit verbundenen postoperativen Maßnahmen, für die ungefähr eine Woche eingeplant wurden. Um bei Versuchsabschluss Tiere des gleichen Alters zu untersuchen, waren die

Tiere des Versuchs GHB II eine Woche jünger, also 11 Wochen, bei Einschleusung in das Versuchstierlabor.

Die Kastration mit ihren Folgen und Komplikationen wird in einem späteren Kapitel noch einmal ausführlich beleuchtet.

### 3.1.3 Diäten

Zur Fütterung der Tiere wurden vier verschiedene Diäten eingesetzt. Eine Referenzdiät (im folgenden „chow“ genannt), zwei Diäten mit sehr hohen Anteilen an Fett und niedrigen Anteilen an Kohlehydraten (LCHF-1 LCHF-2), und eine Diät mit einem hohen Anteil an Fett und gleichen Teilen von Eiweiß und Kohlehydraten (HFD). Die Diäten stammten vom Tiernahrungsproduzenten „Provini Kliba AG“ aus der Schweiz. Eine genaue Auflistung der Makronährstoffe wird in Tabelle 5 beschrieben. Die Fette stammten aus Rindertalg, die Kohlehydrate aus Stärke und die Proteine aus Casein, dem Milchprotein. Trotz unterschiedlicher Makronährstoffe enthielten alle Diäten die gleiche Menge an Spurenelementen und Mikronährstoffen, um Metabolismus und Organfunktionen nicht durch Mangelerscheinungen zu beeinträchtigen.

	<b>Kohlehydrate in %</b>	<b>Fett in %</b>	<b>Protein in %</b>	<b>kcal/g</b>
<b>Chow</b>	64,3	16,7	19,2	3,9
<b>LCHF-1</b>	2,2	78,7	19,1	6,2
<b>LCHF-2</b>	1,7	92,8	5,5	7,2
<b>HFD</b>	19,4	61,9	18,7	5,4

Tab 5: Zusammensetzung und Energiegehalt der Experimentaldiäten

### 3.1.4 Paarfütterung und Wiegen

Ein sehr wichtiger Aspekt des Versuchsaufbaus ist die Paarfütterung. Sie garantiert, dass alle Tiere eine gleiche Menge an Kalorien zu sich nehmen und so die einzelnen Diäten besser verglichen werden können. Als Basis der Berechnung der Futtermenge diente die Referenzgruppe „chow“, welche zu jeder Zeit Zugang zu Nahrung in ihrer eigenen Futterraufe hatte. Jeden Morgen wurde die Futterraufe von „chow“ gewogen und berechnet wie viel die Ratte über die letzten 24 Stunden gefressen hat. Da die Kaloriendichte sämtlicher Diäten bekannt ist konnte so ermittelt werden wie viel Futter die Experimentaldiäten gefüttert bekommen müssen. Damit die Nahrung sich nicht mit dem Einstreu der Käfige mischt wurde das Futter in kleine Porzellantassen gefüllt und diese in den Käfig gestellt. Wasser stand den Tieren auch während des Experimentes weiterhin ununterbrochen zu Verfügung. Neben dem Füttern wurden die Tiere jeden Morgen gewogen und das Gewicht notiert. Dabei wurde Gebrauch von der dynamischen Wiegefunktion gemacht. Dabei wird in kürzester Zeit 20 mal gewogen und dann der Mittelwert angezeigt. Somit können Ungenauigkeiten durch natürliche Bewegung der Tiere ausgeglichen werden.

### 3.1.5 Kastration

Zur Inhalationsnarkose wurden zunächst 10ml Isofluran auf Zellstofftücher in einer Glasglocke gegeben und gewartet bis die Flüssigkeit vollständig verdampft ist. Jetzt wurden die Ratten kurz in das Gefäß gesetzt und nach Eintreten der Narkose sofort herausgenommen. Bevor die Tiere wieder aufwachten, wurde ihnen eine Injektionsnarkose in die Oberschenkelmuskulatur der Hinterläufe gegeben. (Dosierung siehe Tabelle 6). Bis zum Eintreten des Narkosestadium III (die Schutzreflexe wurden durch einen Schmerzreiz der Zehenzwischenräume getestet), lagerten die Tiere in individuellen Käfigen, die mittels einer Wärmematte von unten beheizt wurden. Diese präoperative Aufwärmphase ist besonders wichtig, um eine intraoperative Hypothermie zu vermeiden, welche Komplikationen wie Wundheilungsstörungen oder kardiale Problematiken mit sich ziehen kann. [62] Nach vollständig eingeleiteter Narkose wurden die Tiere auf eine sterile Unterlage gelegt, welche ebenfalls durch eine darunter liegende Wärmematte aufgewärmt wurde. Das weitere Vorgehen ist von den jeweiligen Geschlechtern abhängig. Um die Zeit in Narkose zu verkürzen erhielten die Tiere

unmittelbar nach vollzogener Kastration eine Antagonisierung der Narkose mittel intramuskulärer Injektion (siehe Tabelle 7).

<b>Medikament</b>	<b>Dosierung</b>
Medetomedin	0,15 mg/kg KG
Midazolam	2,0 mg/kg KG
Fentanyl	0,005 mg/kg KG

Tab 6: Dosierung der Narkosemittel

<b>Medikament</b>	<b>Dosierung</b>
Atipamezol	2,5 mg/kg KG
Flumazenil	0,5 mg/kg KG
Naloxon	1,2 mg/kg KG

Tab 7: Dosierung der Antagonisten

### 3.1.5.1 Ovariectomie der weiblichen Tiere

Nach Lagerung der Tiere in Bauchlage wurden die Flanken beidseits mit einer Rasierklinge von Haaren befreit und der OP-Bereich mit einem sterilen Lochtuch abgeklebt. Die Hautdesinfektion erfolge mit einer Kondanlösung (Schülke & Mayr). Nach einem Hautschnitt mit einem Einmalskalpell (Feather) wurde die Rückenmuskulatur vorsichtig durchtrennt und das Peritoneum eröffnet. Mit einem stumpfen Haken wurde vorsichtig nach ventrolateral gefischt um die Tuba uterina mit dem anhängenden Ovar zu bergen. Nach erfolgreicher Bergung wurde die Tube proximal mit einem Klemmchen abgeklemmt um ein Zurückrutschen zu vermeiden. Mit einem dicken Haltefaden der Stärke 3-0 (Braun) wurde die Tube nun an zwei aneinander liegenden Stellen im mittleren Drittel der Tube abgebunden. Nachdem sich vergewissert wurde, dass beide Fäden fest genug sind, wurde die Tube mit einer Schere zwischen beiden Knoten durchtrennt und das Ovar vorsichtig entnommen und gewogen. Das Klemmchen wurde nun eröffnet und der Tubenstumpf wieder in die Bauchhöhle befördert. Die Subkutannaht zum Verschließen der Muskulatur erfolge mit einem

resorbierbaren Faden der Stärke 5-0 (Braun), die Hautnaht mit einem nicht resorbierbaren Material gleicher Stärke (Braun). Um eine Nahtinsuffizienz zu vermeiden, erfolgte eine zusätzliche Sicherung der Adaption mit einem Hautkleber. Nachdem die eine Seite vollständig verschlossen wurde, wurde mit der kontralateralen Seite gleich vorgegangen. Kastrierte Weibchen werden in Folge mit der Abkürzung OVX (Ovarektomie) bezeichnet.

### 3.1.5.2 Orchidektomie der männlichen Tiere

Die Kastration der männlichen Tiere erfolgte - anders als bei den weiblichen Tieren - in Rückenlagerung. Nach Rasur, Desinfizieren und sterilem Abdecken wurde der erste Hoden am kaudalem Pol mit einem Einmalskalpell inzidiert. Nach vollständiger Durchtrennen der Hautschichten wurde auch das Periorchium eröffnet und mit Haltefaden fixiert. Mit leichtem Druck auf das Skrotum wurde der Hoden aus dem Skrotalfach mobilisiert. Nach zweimaliger Ligatur des ductus deferens wurde dieser durchtrennt und der Hoden entfernt. Zum Wundverschluss wurde erst das Periorchium und dann die Skrotalhaut vernäht. Beide Nähte folgten in Einzelknopftechnik mit den gleichen Fäden wie schon bei den Weibchen. Auch hier wurde die Naht gegen eine mögliche Insuffizienz durch Hautkleber verstärkt. Analog dazu wurde auf der Gegenseite verfahren. Kastrierte Männchen werden in Folge mit der Abkürzung ORX (Orchidektomie) bezeichnet.

### 3.1.5.3 Postoperative Medikation

Um eine postoperative Wundinfektion und Stress bei den Tieren zu vermeiden, welche sich auf Größe und Gewicht auswirken kann, wurden die Tiere bis sieben Tage nach den Operationen antibiotisch sowie analgetisch behandelt [63]. Hierfür wurden die Tiere je einmal Morgens und einmal Abends aus ihren Käfigen genommen. Die Injektion der Medikamente erfolgte subkutan nach Fixierung durch eine zweite Person. Um eine Vernarbung zu vermeiden wurden bei jeder Punktion unterschiedliche Orte gewählt. Zusätzlich erhielten die Tiere zur Volumensubstitution Kochsalzlösung als Depot. Die Dosierung und Medikation kann der unten stehenden Tabelle entnommen werden.

<b>Medikament</b>	<b>Dosierung</b>
Amoxicillin	0,2 mg/kg Körpergewicht
Gentamicin	0,1 mg/kg Körpergewicht
Kaprofen	0,03 mg/kg Körpergewicht
Kochsalzlösung 0,9%	2 ml

Tab 8: Medikation und Dosierung postoperativ

#### 3.1.5.4 Fadenzug und Komplikationen

Trotz sorgfältigem und hygienischen Umgang während der Operationen und einer Infektionsprophylaxe litten einige wenige Tiere unter typischen Zeichen von Stress. Gleichzeitig schafften es einige Tiere - hauptsächlich in der Gruppe der Männchen - ihre Nähte aufzubeißen. Diese Komplikationen waren in aller Regel vorübergehend. Trat jedoch eine fortschreitende Infektion auf, wurden die Tiere aus dem Versuch ausgeschlossen und euthanasiert. Allen anderen Tieren wurden am siebten Tag nach der Operation die Fäden gezogen.

#### 3.1.6 Serienblutentnahme beim nüchternen Tier zur GH Bestimmung

Eine Woche vor Versuchsabschluss fand eine Serienblutentnahme statt um die GH-Sekretion zu messen. Eine einzige Abnahme ist für GH sehr ungenau, da es in der Hypophyse pulsatil ausgeschüttet wird. Um den Einfluss einer direkt zuvor erfolgten Nahrungsaufnahme zu minimieren wurden die Tiere in der Nacht vor der Abnahme in neue Käfige überführt und am Morgen der Abnahme nicht gefüttert. Statt der Fütterung wurde den Tieren über einen Zeitraum von fünf Stunden alle 30 Minuten Blut aus dem Schwanz entnommen. Dafür wurde der Schwanz mit einer Schere kopiert und die austretenden Blutstropfen mit dünner Kapillare aufgefangen worüber sie in eine Serum-Monovette liefen. Die Blutproben mit einem Volumen von jeweils circa 140µl wurden nach Gerinnung zentrifugiert und das Plasma bei -20°C zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.1.7 Versuchsabschluss

Nach der vierwöchigen Fütterung folgte der Versuchsabschluss mit Euthanasie der Tiere. Angesichts der großen Anzahl an Tieren wurde die Sektion an vier darauffolgenden Tagen durchgeführt. Immer eine Versuchsgruppe wurde so an einem Tag euthanasiert. Damit die Tiere für die Euthanasie nüchtern waren, wurde am letzten Tag auf eine Fütterung verzichtet und die Käfige der Tiere ausgetauscht. Die Anästhesie sowie die Dosierung der Medikamente erfolgte analog zur Kastration. Auf eine kurze Inhalationsnarkose mit Isofluran folgte die intramuskuläre Injektion von Medetomidin, Midazolam und Fentanyl. Nach vollständiger Anaesthetie wurden die Tiere durch eine Laparotomie längs eröffnet. Mit einer Kanüle wurde die vena cava inferior punktiert und die Ratte mit einer Spritze entblutet. Nachdem nahezu alles Blut entnommen wurde, wurden die Tiere über die selbe Kanüle mit einer Formalinlösung perfundiert. Es wurde sich bewusst gegen eine Dekapitation entschieden um eine Verunreinigung der Proben mit Blut zu vermeiden. Das entnommene Blut wurde in beschriftete Serum-Monovetten gefüllt und bis zur Zentrifugation im Kühlschrank gelagert. Nach vollständiger Gerinnung wurden die Proben im Verlauf zentrifugiert das Plasma abpipetiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die zellulären Bestandteile wurden verworfen. Den ausgebluteten Tieren wurden nun die Organe entnommen und diese gewogen. Danach wurden Fettdepots entfernt und gewogen und den Tieren das Fell abgezogen. Bevor den Tieren einzelne Muskulatur entfernt wurde konnte jetzt durch Wiegen die fettfreie Masse bestimmt und notiert werden. Als letzter Schritt wurde den Tieren der Unterschenkel amputiert und dortige Muskulatur vom Knochen präpariert. Alle gewonnenen Proben von Organen, Fett und Muskulatur wurden unmittelbar in Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Wiegen der Organe, Karkassen und sonstiger Proben erfolgte mit Sartorius Competence CP2201 auf 0,1 genau.

### 3.1.8 Tierschutz

Alle Experimente wurden nach Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern ist unter folgendem Geschäftszeichen dokumentiert: Az. 55.2-1-54-2531-47-05

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1 Grundlagen der RNA Handhabung.

Als geeignete Methode um Genexpression darzustellen hat sich die qPCR oder auch rt-PCR bewährt. Als Matritze für die PCR dient cDNA, eine DNA-Form die mit Hilfe von mRNA und einer reversen Transkriptase hergestellt werden kann. Dafür muss als erstes die RNA aus dem jeweiligen Gewebe isoliert werden. Da die einzellsträngige RNA sehr vulnerabel ist und leicht durch ubiquitär vorkommenden RNAsen zerstört werden kann, müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Diese RNAsen werden auch durch Autoklavieren nicht vollständig inaktiviert, da sie im Verlauf in der Lage sind zu renaturieren. [64] Die Aktivität jedoch kann durch Temperatur stark herabgesetzt werden, weshalb die Proben außerhalb des Gefrierschranks stets auf Eis gehalten wurden. Eine starke Gefahr der RNase-Kontamination geht von den Händen aus, weshalb jederzeit Handschuhe getragen werden. Alle benutzten Pipettenspitzen und Reagiergefäße wurden vor Gebrauch autoklaviert. Sämtliche restliche Arbeitsmaterialien wurden sorgfältig mit RNase-Inhibitoren behandelt. (Ambion RNase Zap Wipes).

Die erfolgreiche Isolierung von RNA aus tierischen Geweben erfordert eine effiziente Homogenisierung des Materials. Daher wurde die Muskulatur erst mit Hilfe eines Mörsers pulverisiert. Diesbezüglich wurde ein kälteresistentes Gefäß (Bell-Art Products) mit flüssigem Stickstoff gefüllt und der kesselförmige Einsatz aus Edelstahl vorsichtig eingelegt. Das vorher auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gefrorene Muskelstück kam nun in das Edelstahlgefäß und konnte - durch die extreme Kälte von  $-196^{\circ}\text{C}$  hart gefroren - sehr einfach mit einem Mörser pulverisiert werden. Das Pulver wurde im Anschluss in sterile Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung in einem  $-80^{\circ}\text{C}$  kaltem Gefrierschrank aufbewahrt

#### 3.5.2 RNA Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des Kits „RNeasy Lipid Tissue Mini Kit“ von Quiagen durchgeführt. Alle unter diesem Abschnitt erwähnten Reagenzien stammen aus

diesem Kit. Einige Reagenzien wurden vor Verwendung wie im Herstellerprotokoll vermerkt verdünnt oder anderweitig vorbereitet. Zunächst wurden die jeweiligen pulverisierten Proben mit 1ml des auf Eis vorgekühlten Qiazol Reagenz aufgefüllt. Zumal Bestandteile des Qiazol Reagens Phenole enthalten, die stark toxisch bei Kontakt mit Haut oder bei Inspiration sind, wurden nahezu jegliche Schritte unter dem Abzug und unter Verwendung von Nitril Handschuhen ausgeführt. In jedes Reaktionsgefäß kam nun eine kleine Metallkugel. Um eine vollständige Zerstörung der Zellgrenzen zu erreichen kommen die Reaktionsgefäße augenblicklich in den TissueLyser LT (Qiagen) - ein Gerät, welches die Proben mit einer Frequenz bis 50Hz schüttelt und damit durch die darin befindliche Metallkugel das Probenmaterial noch weiter zerkleinert. Eine zu lange Verweildauer im Gerät würde die RNA jedoch zerstören weshalb eine Zeit von 30 Sekunden nicht überschritten werden darf. Zu der Suspension werden augenblicklich 600µl Chlorform gefüllt, die Proben kurz durchgeschüttelt und bei Raumluft für 6min inkubiert. Zur Trennung der Bestandteile kommen die Gefäße nun für 15min bei 13200 Umdrehungen pro Minute (rounds per minute, rpm) in die Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415R). Auch während der Isolation sollten die Proben nicht aufwärmen, weshalb die Kühlfunktion der Zentrifuge genutzt wurde und die Proben auch während des Zentrifugieren auf vier Grad gehalten werden. Nach erfolgreichem Zentrifugieren kann die oberste wässrige Phase, welche die RNA enthält, vorsichtig 350µl abpipetiert werden und in ein neues steriles Gefäß überführt werden. Zu der wässrigen Phase werden im nächsten Schritt 350µl reines Ethanol gegeben (PanReac Applichem). Für jede Probe die isoliert wird, wird nun eines der Säulchen aus dem Kit entnommen und auf einem Ständer vorbereitet. Die Säulchen enthalten in ihrer Mitte eine Membran an welcher die RNA aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften beim Zentrifugieren hängenbleibt. Die eben angefertigte Mischung aus Ethanol und der wässrigen Phase wird nun vorsichtig auf die Membran pipetiert ohne sie zu berühren. Die Reaktionsgefäße mit den Säulchen werden nun bei Raumtemperatur für 15 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert. Die durch die Membran zentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Jetzt erfolgten mehrere Waschgänge mit verschiedenen Puffern um die Reinheit der RNA zu verbessern. Nach jedem Waschgang wurde der Unterstand verworfen.

Waschgang 1: 700µl RW1 Puffer	15 Sekunden bei 10000rpm und RT
Waschgang 2: 500µl RPE Puffer	15 Sekunden bei 10000rpm und RT
Waschgang 3: 500µl RPE Puffer	15 Sekunden bei 10000rpm und RT

Tab 9:Waschgänge zur RNA Purifizierung

Um die purifizierte RNA zu erhalten wurden nun 30µl RNase freien Wassers auf die Membran pipettiert und die Gefäße ein letztes Mal für eine Minute bei 10000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Wasser löst die RNA aus der Membran und die erhaltene Lösung kann bei -20° gelagert werden.

### 3.5.3 RNA Quantifizierung durch Nano Drop

Nach der erfolgreichen Extraktion der RNA aus dem Geweben musste im nächsten Schritt die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Zuerst musste dafür aber die Konzentration und Reinheit der RNA Mittels Spektrophotometrie bestimmt werden. Zum Eichen des Gerätes wurde zuerst 1µl sterilen Wassers auf die Messplatte des Spektrometers gegeben und das Gerät so auf Null geeicht. Jetzt können die einzelnen Proben untersucht werden. Hierfür wird 1,5µl der weiterhin auf Eis gekühlten RNA auf die Messplatte pipetiert und der Messfühler aufgesetzt. Innerhalb kurzer Zeit zeigt das Gerät die Konzentration der gelösten RNA in ng/µl an. Neben der Konzentration bietet diese Methode auch die Möglichkeit Verschmutzungen durch Proteine oder DNA zu erkennen. Der hierbei entscheidende Parameter ist der Quotient der Konzentration bei 280nm Wellenlänge und 260nm Wellenlänge. Das Optimum liegt im Bereich zwischen 0,8 - 1,2. Höhere Werte sprechen für Kontamination mit DNA. Niedrigere Werte für Verschmutzung durch Proteine.

### 3.5.4 Reinheitsüberprüfung mit der Agarosegelelektrophorese

Zur weiteren Qualitätsüberprüfung kann die RNA in einem Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Zur Herstellung des Gel werden je 100ml TBE Puffer mit 1g der Agarose in einem 500ml Glaszylinder (Schott) gemischt. Um ein homogenes

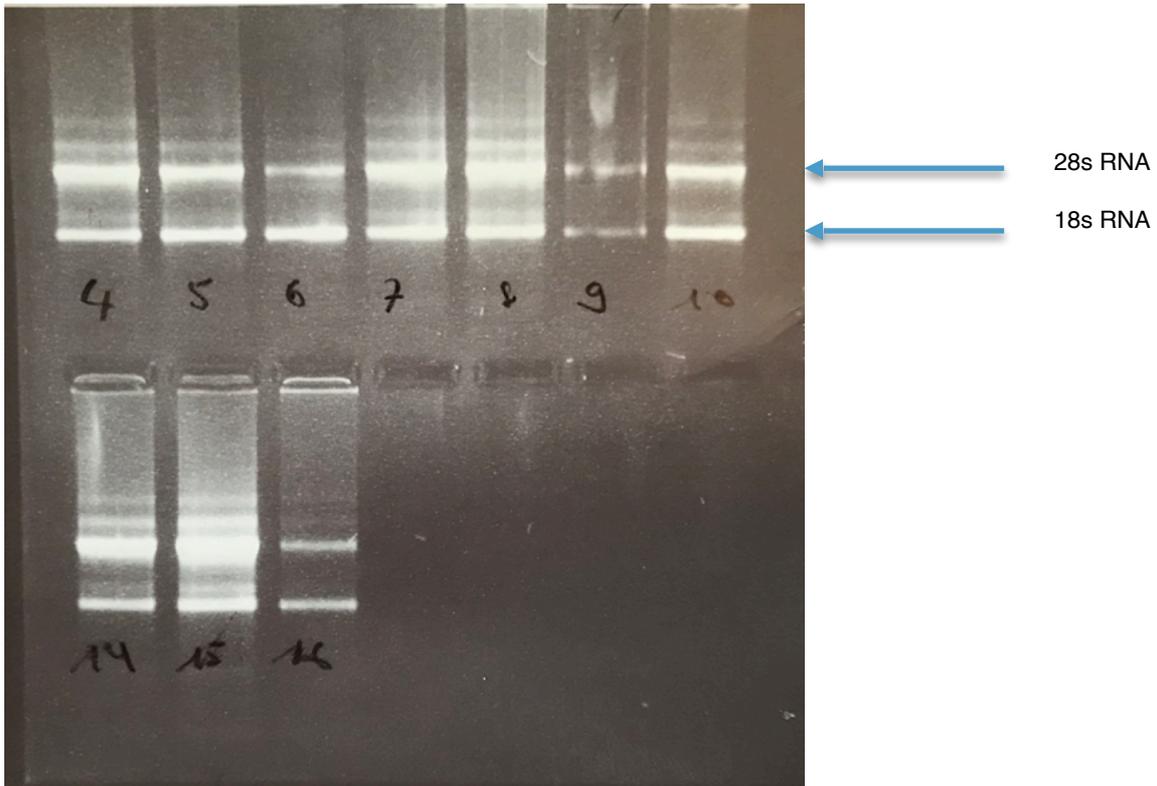


Abb 2 : Fotografie der Agarosegelelektrophorese. Zu sehen sind die für RNA typische Doppelbandenbildung (siehe Pfeile). Die Nummerierung wurde hier nachträglich zur Identifikation der Proben hinzugefügt.

Gemisch herzustellen wird der Zylinder für ein paar Minuten in der Mikrowelle erhitzt und anschließend für 20 Minuten mit einem Magnetrührer durchgerührt. Bevor die Temperatur zu weit absinkt werden pro 100ml des Gels 4 $\mu$ l des Phenanthridin Farbstoffes Ethidiumbromid hinzugefügt. Da es sich bei Ethidiumbromid um ein starkes Mutagen handelt war eine sorgfältige Arbeit unter dem Abzug und mit Nitrilhandschuhen erforderlich. [65] Jegliches Material, welches mit dem giftigen Stoff in Berührung kam, musste in einem speziellen Abfall entsorgt werden um Kontamination zu vermeiden. Nachdem der Farbstoff vollständig eingerührt ist, kann das Gel in eine Vorrichtung aus Plastik gegossen werden in der sich ein spezieller Kamm befindet. Während der Aushärtung wird die eingefrorene RNA aufgetaut und jeweils 2 $\mu$ l der RNA mit 5 $\mu$ l sterilem Wasser und 3 $\mu$ l eines Farbstoffes vermischt. Der „loading dye“ spielt für die Anfärbung der RNA keine Rolle hilft jedoch beim Pipetieren der Proben in die kleinen Taschen. Wenn das Gel vollständig ausgehärtet ist wird es in den Elektrophoreseblock gestellt und vollständig mit TBE Puffer bedeckt. Nun werden in jede Tasche 10 $\mu$ l der zu untersuchenden Probe gegeben. Im Anschluss

erfolgt die Elektrophorese bei 90V für 25 Minuten. Nach vollständiger Auftrennung kann die Integrität der RNA mittels UV-Fotographie dokumentiert werden.

### 3.5.5 Umschreiben der RNA in complementary DNA mit Hilfe der reversen Transkriptase

Im nächsten Schritt wird die RNA in cDNA umgeschrieben. Dies erreicht man mit Hilfe einer reversen Transkriptase, also einer RNA abhängigen DNA Polymerase. Das dabei am häufigsten Verwendete Enzym wird rekombinant in E.coli Bakterien hergestellt und stammt aus dem „Moloney Murine Leukemia Virus“ (im folgenden nur MMLV genannt). Das eigentliche Umschreiben erfolgte in einem Thermo-Cycler. Dieses Gerät heizt sich auf voreingestellte Temperaturen auf und kann diese konstant halten um ein optimales Reaktionsmileau zu schaffen. In einem ersten Schritt wurde je nach Konzentration (anhand der Photospektrometrie) eine kleine Menge an destiliertem RNase freien Wasser, Oligo-dt Primer und der RNA in ein Reaktionsgefäß gegeben. Bei Oligo-dt Primern handelt es sich um Primer welche am Poly-A Schwanz der RNA binden und so den Startabschnitt für die reverse Transkriptase markieren. Nun wurde die Reaktionsgefäße nach kurzem vermischen im Vortex in den Thermocycler gegeben. In dem ersten Durchgang erreicht man so ein Binden der Primer an die gewünschte Position. Während des Durchganges wurde ein „Master-Mix“ aus „RNAsin“ (ein RNase Inhibitor), dNTPs (Bausteine als Vorstufe der Nukleinsäuren) und der rekombinaten reversen Transkriptase angemischt. Jetzt wurde zu jedem Reaktionsgefäß die gleiche Menge an MasterMix gegeben und erneut ein Durchlauf im Thermo-Cycler gestartet. Nach erfolgreichem Umschreiben wurden die Proben mit Wasser 1:10 verdünnt und bis zum Gebrauch bei der PCR bei -20°C gekühlt. Zusätzlich dazu wurde parallel zu den Positivproben noch für jede Probe eine Negativkontrolle (ohne reverse Transkriptase) als Qualitätskontrolle erstellt.

### 3.5.6 Primer für die PCR

Passende Primer stammten entweder aus der Literatur oder wurden mit Hilfe des Online-Programms „Primer3“ designed. Auch waren einige Primer schon durch

vorangegangene Experimente in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Die Primer wurden bei der Firma Metabion bestellt und bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.5.7 Housekeeping

Um eine in der PCR erhaltene Expression vergleichbar zu machen benötigt man ein Referenz-Gen welches unabhängig und nicht reguliert in allen Zellen ungeachtet der äußeren Einflüsse exprimiert wird. Für die Muskulatur wurde dafür 18s ribosomale RNA (rRNA) verwendet, welche bekannt für ihre hohe Expression in Geweben ist. Bei der Auswertung der PCR konnte die erhaltene Expression durch die Expression von 18s geteilt werden um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten.

### 3.5.8 „Real time-PCR“

Als letztes folgt der endgültige Schritt der Amplifizierung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (im folgenden PCR genannt). Eine spezielle Methode der PCR erlaubt die gleichzeitige Amplifikation und Erfassung der Produkte in Echtzeit. Dies wird auch Real time-PCR oder quantitative PCR genannt und soll im folgenden mit RT-PCR oder qPCR abgekürzt werden. Um die Produkte durch ein Photometer erkenntlich zu machen wurde bediente man sich den Fluoreszenzfarbstoff „Eva-Green“. In jede Vertiefung der PCR-Platte (im folgenden „well“ genannt) wurde folgende Mischung gegeben.

<b>Eva-Green</b>	<b>forward Primer</b>	<b>reverse Primer</b>	<b>Aqua dest.</b>
6 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$

Tab 9: Reagenzien für qPCR

Jetzt wurde in jedes well 2 $\mu\text{l}$  der hergestellten cDNA pipettiert. Dabei wurden immer zwei nebeneinander liegende wells für eine Probe verwendet. Eine Positivprobe für die Auswertung und eine Negativprobe zur Kontrolle. Die PCR-Platte wurde vorsichtig mit einer Plastikfolie überzogen und in einer auf  $8^{\circ}\text{C}$  gekühlten Zentrifuge für 1 Minute bei 6000rpm abzentrifugiert. Danach wurde die Platte in das qPCR Gerät gestellt und der Vorgang gestartet. Die Daten wurden direkt an einen Computer übertragen und mit dem

Programm MxPro ausgewertet. Sobald bei einer Negativprobe DNA amplifiziert werden konnte, die Probe also verunreinigt war, wurde diese verworfen, die Positivprobe erstmal nicht verwendet und neue RNA isoliert und umgeschrieben. Die Daten wurden dann in Excel übertragen und dort mit dem Housekeeping-Gen verglichen.

### 3.6 Laborchemische Methoden

#### 3.6.1 Grundlagen der Triglyzeridextraktion in der Skelettmuskulatur

Zur Quantifizierung der Triglyzeride in der Muskulatur wurde ein photometrisches Assay verwendet. Hierbei wird die Probe von Licht einer bestimmten Wellenlänge durchstrahlt und die Extinktion durch die Probe gemessen. Die gemessene Extinktion kann nun mit den bekannten Konzentrationen von Standards verglichen werden und auf die Probe umgerechnet werden. Wie bereits oben erwähnt musste die Skelettmuskulatur vorher pulverisiert werden. Aus dem Pulver konnten dann in einem nächsten Schritt die lipophilen Bestandteile extrahiert werden. Die eingedampften TAGs können dann mit einem Reagenz zusammengeführt und im Assay ausgemessen werden.

#### 3.6.2 Triacylglycerid-Extraktion aus dem Skelettmuskel

Im ersten Schritt wird die Muskulatur analog wie oben bei der RNA-Isolation beschrieben pulverisiert. Dabei nicht pulverisiertere Bestandteile wie Faszien mussten mittels einer feinen Pinzette entfernt werden um das Gewicht nicht zu verfälschen. Danach wurde das Pulver gewogen und das Gewicht notiert. Auch jetzt wurde das Pulver mit Hilfe des TissueLyzers zerkleinert. Zu dem Pulver wurde neben der Metallkugel 1ml einer 2:1 Chloroform/Methanol Mischung gegeben. Jetzt wurden die Proben bei 50Hz für 60 Sekunden geschüttelt. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße bei Raumtemperatur für 4 Stunden bei 700rpm auf dem Thermoshaker inkubiert. Mit einer Pinzette wurde nun vorsichtig die Metallkugel entfernt. Auf jede Probe wurde jetzt 300µl ein-molare Schwefelsäure pipettiert. Um die Phasen aufzutrennen werden die Proben bei Raumluft und 10000rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Ohne die Reaktionsgefäße viel zu bewegen wurde jetzt die unterste Phase

mit einer dünnen Insulinspritze abgesaugt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang wurde mit erneuten 300µl der Schwefelsäure wiederholt. Wieder wird die unterste Phase vorsichtig abgezogen und in das entgültige Reaktionsgefäß überführt. Diese wässrige Lösung wurde jetzt mit Hilfe der SpeedVac bei 30°C für 30 Minuten und 400rpm eingetrocknet. Die so erhaltene Probe wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 3.6.3 Triacylglycerid-Quantifikation aus dem Skelettmuskel

Die Quantifizierung erfolgte nach Protokoll und mit Reagenzien von Thermo Scientific (Triglycerides Reagents Infinity Triglycerides Liquid). Die Standardreihe wurde von Verichem Labs geliefert. (Verichem labs matrix plus chemistry reference kit)

Anfangs wurden die isolierten Triglyzeride aufgetaut, das eingedampfte Substrat mit 300µl der Chloroform-/Methanolmischung aufgelöst und unter dem Abzug bis zur weiteren Verwendung beiseite gestellt. Aus dem gelieferten Standard wurde nun eine Verdünnungsreihe hergestellt. Für die Verdünnung wurde ausschließlich steriles Wasser verwendet (AQ dest Sigma, sterile filtered Bio Reagent W3500). Als Kontrolle dienten die mitgelieferten Standards A (1:4 Verdünnung) und C (1:2 Verdünnung). Auf je 40µl der zu messenden Proben, der Verdünnungsreihe sowie der beiden Standards wurden jetzt 360µl des TAG-Reagens gegeben und die Reaktionsgefäße bei 37°C für genau fünf Minuten in den Thermocycler gestellt. Schon jetzt wurde der Farbumschlag, der später mittels Photometrie quantifiziert wurde, deutlich sichtbar. Nun wurden Standards, Proben und Kontrollen auf eine PCR-Platte pipettiert und im Anschluss photometrisch auf ihre Extinktion untersucht. Die Ergebnisse wurden Mittels Tabellenkalkulation (Microsoft Excel) mit dem anfänglichen Probengewicht verglichen und auf dieses genormt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Konzentration in mg/dl</b>	<b>Herstellung</b>
<b>a)</b>	245	Standard Lösung B
<b>b)</b>	50	60µl a) + 234µl H <sub>2</sub> O
<b>c)</b>	25	100µl b) + 100µl H <sub>2</sub> O
<b>d)</b>	12,5	100µl c) + 100µl H <sub>2</sub> O

<b>Bezeichnung</b>	<b>Konzentration in mg/dl</b>	<b>Herstellung</b>
<b>e)</b>	6,25	100µl d) + 100µl H <sub>2</sub> O
<b>f)</b>	3,13	100µl e) + 100µl H <sub>2</sub> O
<b>g)</b>	1,55	100µl f) + 100µl H <sub>2</sub> O

Tab 10: Verdünnungsreihe für den Standard.

### 3.6.4 Triacylglyceridbestimmung im Serum

Das bei Versuchsabschluss gewonnene Serum wurde für verschiedene laborchemische Bestimmungen herangezogen. Die Bestimmung der Triglyzeride im Serum erfolgte mit Hilfe des Triglyceride Assay Kit von Abcam. Zur Vorbereitung wurden die Standards frühzeitig aus dem Kühlschrank genommen, auf Raumtemperatur gebracht und mit dem Vortexgerät homogenisiert. Der mitgelieferte Enzym-Mix und die gelieferte Lipase wurden mit jeweils 220µl des Assay-Puffers gemischt und während der gesamten Bestimmung auf Eis gekühlt. An jedem Tag einer Bestimmung wurde analog ein frischer Ansatz der Standards nach Herstellerangaben hergestellt. In einem ersten Schritt wurden 50µl der Standards und 5µl Proben in die Vertiefungen der PCR-Platte pipettiert. Die Proben wurden mit 45µl des mitgelieferten Puffers auf 50µl aufgefüllt. Zusätzlich zu jeder Probe wurde eine nicht reaktive Leerkontrolle pipettiert. In den Standard und in die zu untersuchende Probe nicht jedoch in die Blindprobe wurden nun 2µl der Lipase pipettiert. Die Blindprobe erhielt 2µl des Puffers. Jetzt wurden die Platten bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Die pipettierte Lipase spaltet nun die Triglyzeride in freie Fettsäuren und Glycerin auf. Während der Inkubation wurde ein Mastermix für die Reaktion aus 46µl Puffer, 2µl des Enzym Mixes und 2µl der mitgelieferten TAG Probe hergestellt. Nach Inkubation wurde in jedes Well 50µl des Mastermixes pipettiert und die Platte erneut für 60 Minuten unter Ausschluss von Licht inkubiert. Nach erfolgreicher Reaktion wurden die Extinktion der einzelnen Platten photometrisch untersucht.

### 3.6.5 GH und IGF-I Bestimmung

Die Bestimmung der GH- und IGF-I-Konzentrationen wurde standardisiert mit validierten Methoden im Endokrinologischen Labor der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV durchgeführt. Beide Parameter wurden mittels Enzymimmunoassay (ELISA) bestimmt. Für IGF-I wurde der „Rat IGF-I ELISA Kit Nr: ERIGF1“, für GH der „Rat Growth Hormone ELISA Kit KRC5311“. Beide Assays stammten von Merck. Beide Kits wurden im Labor schon bei früheren Experimenten verwendet. Durch das Mitführen von Qualitätskontrollproben und Pools wurde sichergestellt, dass die Ergebnisse mit früheren vergleichbar sind. Befanden sich Werte – wie insbesondere beim pulsatil ausgeschütteten Wachstumshormon auch erwartbar - unterhalb der Nachweisgrenze der Messmethoden (limit of quantification, LoQ), wurden diese für Berechnungen arbiträr auf die Hälfte des LoQ gesetzt. Dieses Verfahren findet sich auch häufig in der Literatur [66].

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware „Graph Pad Prism“ der GraphPad Software Inc. in der Version Prism 8. Um Ausreißer zu erkennen, wurde auf die freie Onlinefunktion auf <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm> zurückgegriffen. Ausreißer wurden hiernach mit einem Konfidenzintervall von 5% nach Grubbs-Test identifiziert und von der weiteren Statistik ausgeklammert.

Innerhalb einer Kohorte (z.B GHB I Männchen) wurden die Diäten mittels eines „one-way-ANOVA“ untersucht. Als Voraussetzung dafür wurden die Werte in einzelnen Gruppen erst auf mittels des D’Agostino & Pearson Test Normalverteilung überprüft. Als post-Test bei signifikanten Unterschieden wurde der Dunett-Test gewählt. Wurden zwei Gruppen aus der verschiedenen Kohorten verglichen (z.B. male chow und male chow ORX) wurde ein Zweistichproben-t-Test verwendet. Auch hier wurde analog wie beim ANOVA vorher auf eine gleiche Varianz geachtet. Bei ungleicher Varianz wurden die beiden Proben ebenfalls mit einem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Die Ergebnisse wurden wo möglich graphisch einheitlich in Säulendiagrammen dargestellt. Zusätzlich wurde für eine bessere Übersicht ein einheitlicher Farbcode für die verschiedenen Diäten und die beiden Versuche gewählt. Signifikante Unterschiede

wurden mit kleinen Sternchen markiert. In den Ergebnissen werden bei signifikanten Ergebnissen der Mittelwert (mean) sowie die dazugehörige Standardabweichung mit „+/-“ angegeben.

graphische Darstellung	In Worten	Konfidenzintervall
*	signifikant	$p < 0,033 > 0,002$
**	sehr signifikant	$p < 0,002 > 0,001$
***	hoch signifikant	$p \leq 0,001$

Tab 11: graphische Darstellung der statistischen Signifikanz

## IV. Ergebnisse

### 4.1 Phänotypische Ergebnisse im Geschlechtervergleich.

Zunächst sollen die Ergebnisse zur Auswirkung der Diäten auf phänotypische Charakteristika wie Körper- und Organgewichte präsentiert werden im Vergleich der Diät- und Geschlechtsgruppen gezeigt werden, später folgen die Ergebnisse der laborchemischen und molekularbiologischen Methoden. Gemäß den Hauptfragestellungen der Arbeit werden die Ergebnisse unter den verschiedenen Diäten jeweils in zwei unterschiedlichen Gruppierungen dargestellt: Zunächst werden die Ergebnisse beider Geschlechter nebeneinander, aber getrennt für Tiere vor bzw. nach Kastration angeordnet, danach die Ergebnisse jeweils eines Geschlechts vor und nach Kastration nebeneinander. Dies soll es vereinfachen, einerseits grundlegende Unterschiede zwischen den Geschlechtern, andererseits geschlechtsspezifische Effekt der Kastration nachzuvollziehen.

#### 4.1.1 Lebendgewichte bei Versuchsabschluss

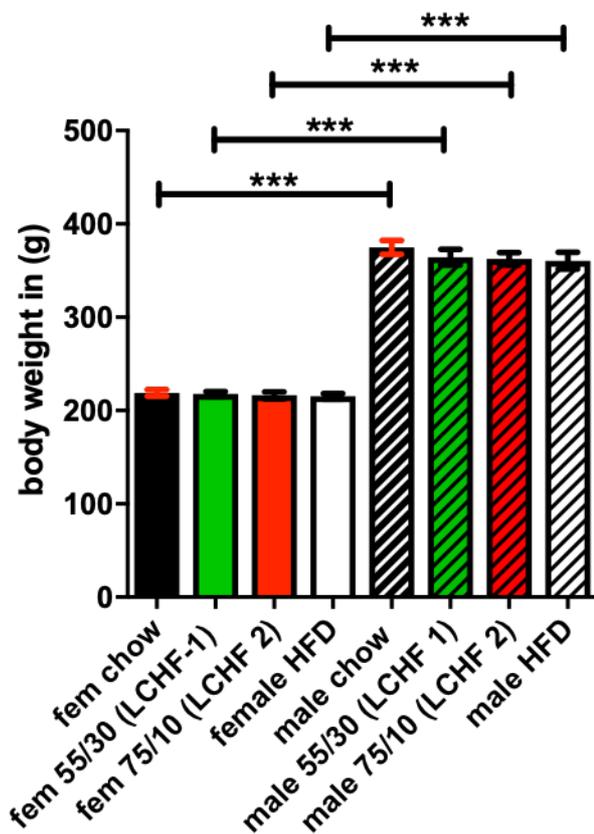


Abb 4: Körpergewichte der unkastrierten Weibchen und Männchen. Deutlich höhere Gewichte der Männchen. Typisch für die Art

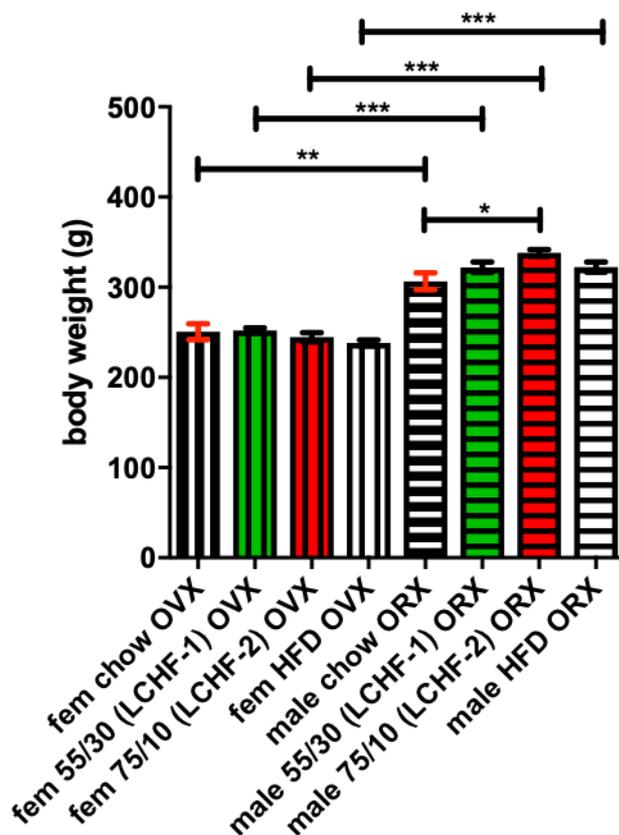


Abb 5: Körpergewichte der Weibchen und Männchen GHB II. Weiterhin höhere Gewichte bei den Männchen jedoch Annäherung an die Weibchen nach Kastration

Direkt vor der Euthanasie wurden die Tiere erneut gewogen und das Gewicht notiert. Hierbei zeigte sich in beiden Versuchen ein hoch signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Unter sämtlichen Diäten hatten die Männchen – die physiologischer Weise ja bereits zu Versuchsbeginn schwerer waren - auch nach der Fütterungsphase ein höheres Körpergewicht als die Weibchen. Die Unterschiede erreichten stets eine hohe statistische Signifikanz, waren jedoch im ersten Versuch (Tiere ohne Operation/Kastration, Abbildung 4) wesentlich deutlicher als in zweiten Versuch (kastrierte Tier, Abbildung 5). Bei den nicht operierten Tieren des ersten Versuchs fanden sich in den Diätgruppen sich folgende Endgewichte: Chow - female: 219,1g +/- 13,2g vs. male: 374,8g +/- 23,4g; LCHF-1 - female: 217,8g +/- 9,7g vs. male: 364,4 +/- 25,6g; LCHF-2 - female: 216,4g +/- 13,5g vs. male: 362,5g +/- 20,8g; HFD - female: 215,3g +/- 10,6g vs. male: 360,6g +/- 28,0g;  $p < 0,001$  für alle Geschlechtsvergleiche. Bei den kastrierten Tieren waren die Endgewichte wie folgt: Chow – female OVX: 250,8g +/- 23,3g vs. male ORX: 306,6g +/- 23,0g,  $p = 0,01$ ; LCHF-1 – female OVX: 252,1g +/- 6,5g vs. male ORX: 322,1g +/- 14,1g,  $p < 0,001$ ; LCHF-2 – female OVX: 244,6g +/- 13,8g vs. male ORX: 338,1g +/- 8,3g,  $p < 0,001$ ; HFD – female OVX: 238,2g +/- 8,2g vs. male ORX: 322,4g +/- 13,8g  $p < 0,001$ .

Zwischen den 4 Diäten zeigte sich hinsichtlich des Endgewichts ein signifikanter Unterschied nur innerhalb der Gruppe der Männchen aus dem 2. Versuch mit Kastration. Hierbei zeigten die Männchen mit der extremen ketogenen Diät LCHF-2 gegenüber der Gruppe unter Referenzdiät (chow) ein höheres Endgewicht (siehe Abbildung 4, male chow ORX: 306,6g +/- 23,0g vs. male LCHF-2 ORX: 338,1g +/- 8,3g  $p = 0,05$ ).

Auch im Vergleich der beiden Versuche zeigten sich signifikante Unterschiede bei Individuen mit gleichem Geschlecht. Weibliche Tiere im Versuch nach Kastration (GHB II) waren schwerer als ihre Artgenossen im Versuch ohne Kastration. Nachdem die Gruppen hinsichtlich des Gewichts zu Versuchsbeginn ja vergleichbar (gematcht) waren, nahmen die kastrierten weiblichen Tiere also während des Versuches mehr an Gewicht zu (siehe Abbildung 6: fem chow: 219,1g +/- 13,2g vs. fem chow OVX 250,8g

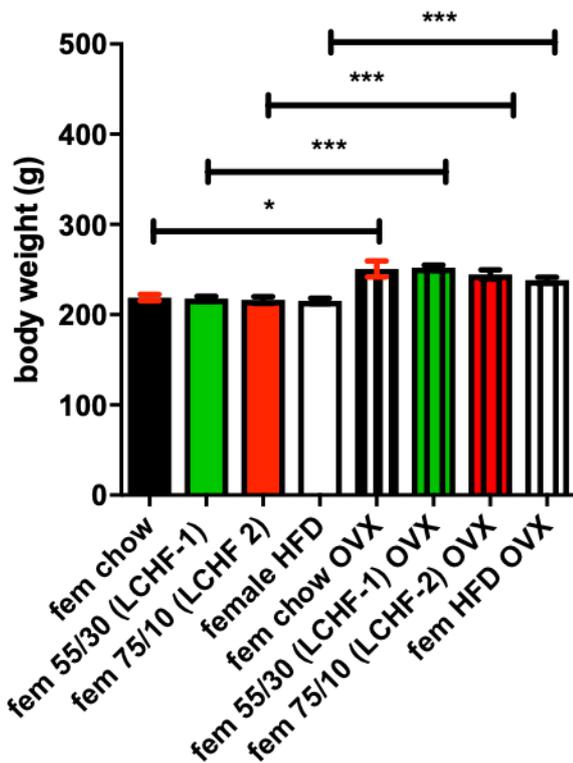


Abb 6: Körpergewichte der Weibchen GHB I und GHB II. Zunahme der Weibchen nach Kastration

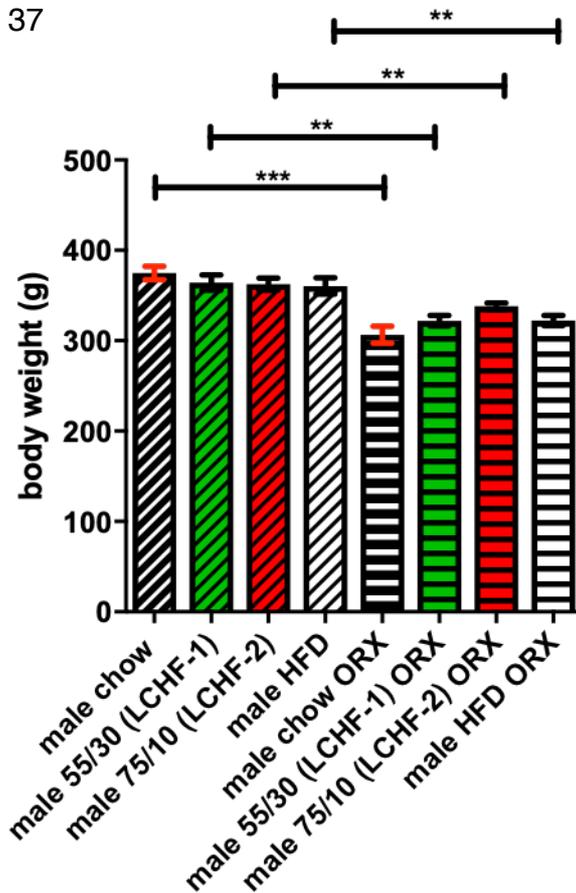


Abb 7: Körpergewichte der Männchen GHB I und GHB II. Abnahme der Männchen nach Kastration

+/- 23,3g,  $p=0,01$ ; (fem LCHF-1: 217,8g +/- 9,7g vs. fem LCHF-1 OVX: 252,1g +/- 6,5g,  $p<0,001$ ; fem LCHF-2: 216,4g +/- 13,5g vs. fem LCHF-2 OVX: 244,6g +/- 13,8g,  $p<0,001$ ; fem HFD: 215,3g +/- 10,6g vs. fem HFD OVX: 238,2g +/- 8,2g,  $p<0,001$ ).

Männliche Tiere aus dem nach Kastration waren hingegen leichter als ihre Artgenossen aus dem ersten Versuch. Sie nahmen also nach Kastration unter allen Diäten weniger Gewicht zu (siehe Abbildung 7: male chow: 374,8 +/- 23,4g vs. male chow ORX: 306,6 +/- 23,0g,  $p<0,001$ ; male LCHF-1: 364,4 +/- 25,6g vs. male LCHF-1 ORX: 322,1 +/- 14,1,  $p=0,001$ ; male LCHF-2: 362,5 +/- 20,8g vs. male LCHF-2 ORX: 338,1 +/- 8,3g,  $p=0,007$ ; male HFD: 360,6 +/- 28,0 vs. male HFD ORX: 322,4 +/- 13,8,  $p=0,003$ ).

#### 4.1.2 Kumulative Gewichtszunahme

Da die Tiere täglich gewogen wurden konnte eine tägliche Gewichtszunahme dokumentiert werden. Für die kumulative Gewichtszunahme wurde die Gewichtszunahme der einzelnen Tage zusammengerechnet.

Bei gonadal intakten Weibchen und Männchen zeigten sich signifikante Unterschiede signifikante Unterschiede. Sowohl innerhalb des Geschlechtes unter unterschiedlicher

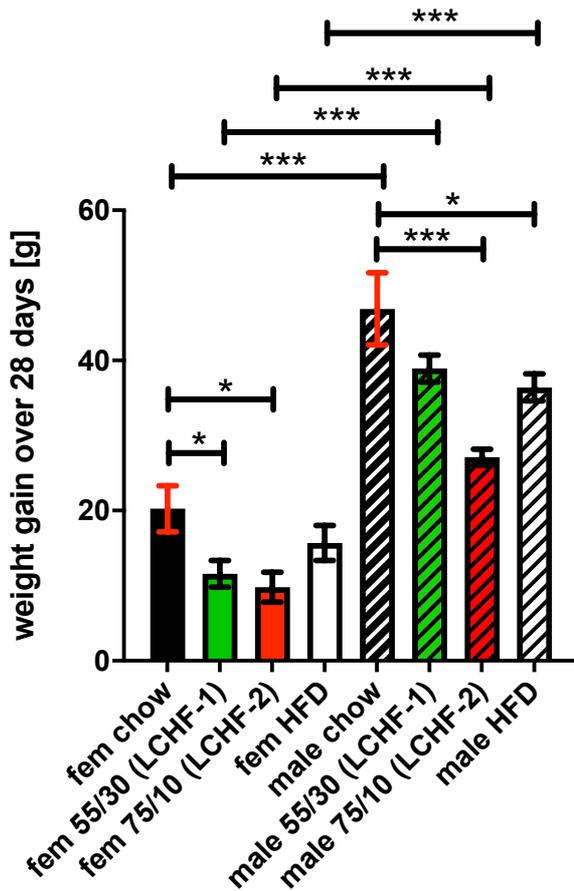


Abb 8: Gewichtszunahme bei unkastrierten Männchen und Weibchen. Männchen nahmen deutlich mehr Gewicht zu. Weniger Gewichtszunahme v.a. unter LCHF-2, bei beiden Geschlechtern

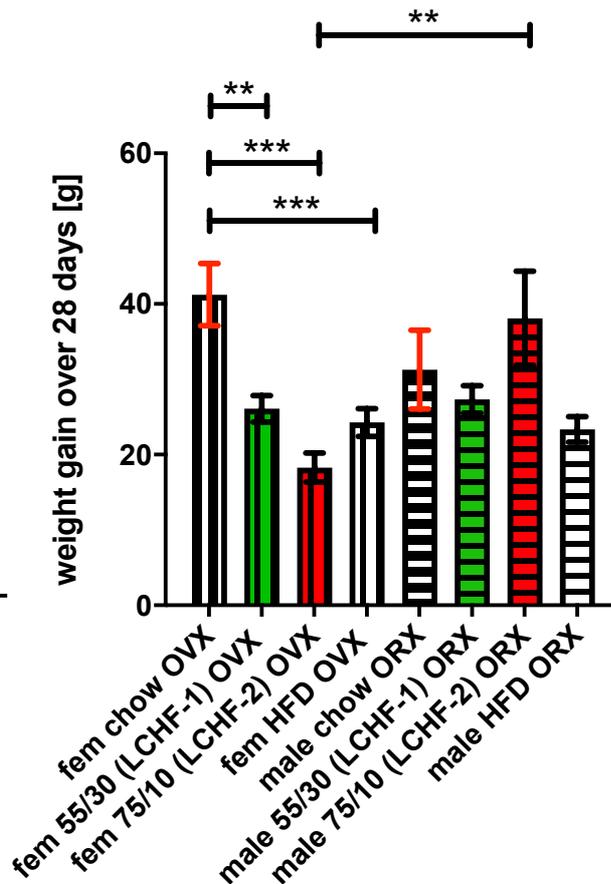


Abb 9: Gewichtszunahme bei kastrierten Männchen und Weibchen. Kaum mehr Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Diät, als auch zwischen den beiden Geschlechtern bei gleicher Diät. Männliche Tiere nahmen hoch signifikant mehr an Gewicht zu als die Weibchen (Siehe Abb 8. fem chow: 20,24g +/- 8,13g vs. male chow: 46,87g +/- 12,72g) (fem LCHF-1: 11,59g +/- 4,75g vs. male LCHF-1: 38,88g +/- 4,39g) (fem LCHF-2: 9,80g +/- 5,23g vs. male LCHF-2: 27,10g +/- 2,85g) (fem HFD: 15,69g +/- 6,20g vs. male HFD: 36,41g +/- 4,72g p jeweils < 0,001).

Weibchen nahmen unter den beiden LCHF Diäten signifikant weniger zu als unter der Referenzdiät. Männchen nahmen unter der LCHF-2 und der HFD weniger zu (Siehe Abb 9. fem chow: 20,24g +/- 8,13g vs. fem LCHF-1: 11,59g +/- 4,75g) (fem chow: 20,24g +/- 8,13g vs. fem LCHF-2: 9,80g +/- 5,23g p jeweils 0,033) (male chow: 46,87 +/- 12,72g vs. male LCHF-2: 27,10g +/- 2,85g p < 0,001 ) (male chow: 46,87 +/- 12,72g vs. male HFD: 36,41g +/- 4,72g p= 0,002).

Nach Kastration waren die Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern nur noch unter der LCHF-2 Diät ein signifikant (Siehe Abbildung 10 fem LCHF-2 OVX: 18,29g +/- 5,13g vs. male LCHF-2 ORX: 38,10g +/- 13,95g p = 0,006). Innerhalb der kastrierten Weibchen war die Gewichtszunahme aller Experimentaldiäten signifikant weniger im Vergleich zur Referenzdiät (Siehe Abbildung 11 fem chow OVX: 41,23g +/- 10,93g vs. fem LCHF-1 OVX: 26,08g +/- 4,30g p = 0,002) (fem chow OVX 41,23g +/- 10,93g vs. fem LCHF-2 OVX: 18,29g +/- 5,13g p = 0,001) (fem chow OVX: 41,23g +/- 10,93g vs. fem HFD OVX: 24,27g +/- 4,51g p = 0,001).

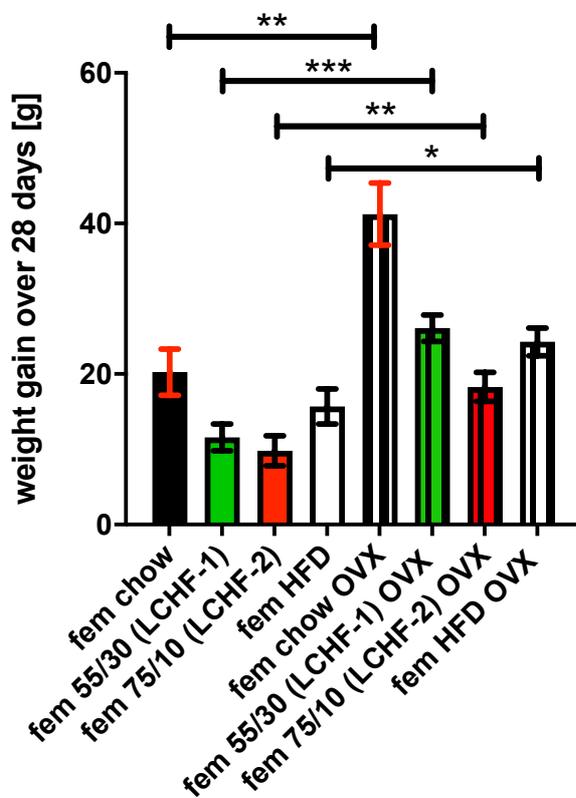


Abb 10: Vergleich zwischen unkastrierten und kastrierten Weibchen. Mehr Gewichtszunahme nach Kastration.

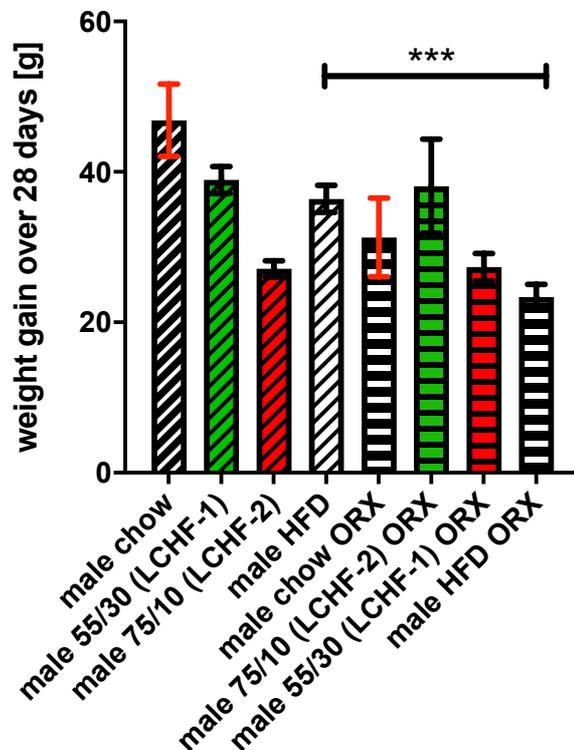


Abb 11: Vergleich zwischen unkastrierten und kastrierten Männchen. Unterschiede nur unter der HFD-Diät.

Nach Kastration bestand bei allen Weibchen unter allen Diäten eine größere Gewichtszunahme über die Fütterungsperiode (siehe Abbildung 10. fem chow: 20,24g +/- 8,13g vs. fem chow OVX: 41,23g +/- 10,93g  $p = 0,002$ ) (fem LCHF-1: 11,59g +/- 4,75g vs. fem LCHF-1 OVX: 26,08 +/- 4,30  $p < 0,001$ ) (fem LCHF-2: 9,80 +/- 5,24g vs. fem LCHF-2 OVX: 18,29 +/- 5,13g  $p = 0,01$ ) (fem HFD: 15,69 +/- 6,20 vs. fem HFD OVX: 24,27 +/- 4,50  $p = 0,02$ )

Bei den Männchen hatte die Kastration weniger Effekt auf die Gewichtszunahme über die Fütterungsperiode. Einzig bei der HFD-Diät kam es zu einer hoch signifikant niedrigeren Gewichtszunahme. (Siehe Abbildung 11. male HFD: 36,41g +/- 4,72g vs. male HFD ORX: 23,35g +/- 4,12g  $p < 0,001$ )

#### 4.1.3 Muskelgewicht (Musculus gastrocnemius)

Nach Versuchsabschluss wurden die Organe und die Muskulatur gewogen. In den Abbildung 8 und 9 ist das Gewicht des Musculus gastrocnemius aus den Versuchen aufgezeigt.

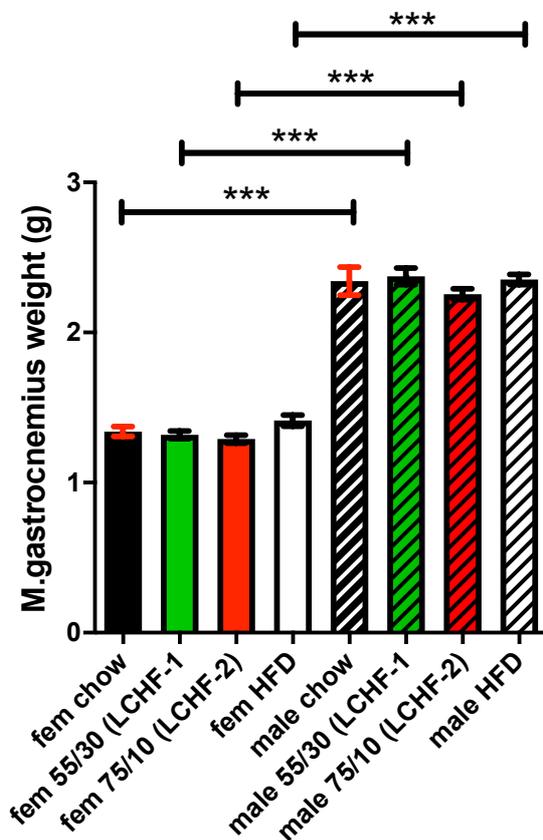


Abb 11: Muskulaturgewicht m.gast.med im Versuch ohne Kastration. Schwerere Muskulatur der Männchen, artentypisch

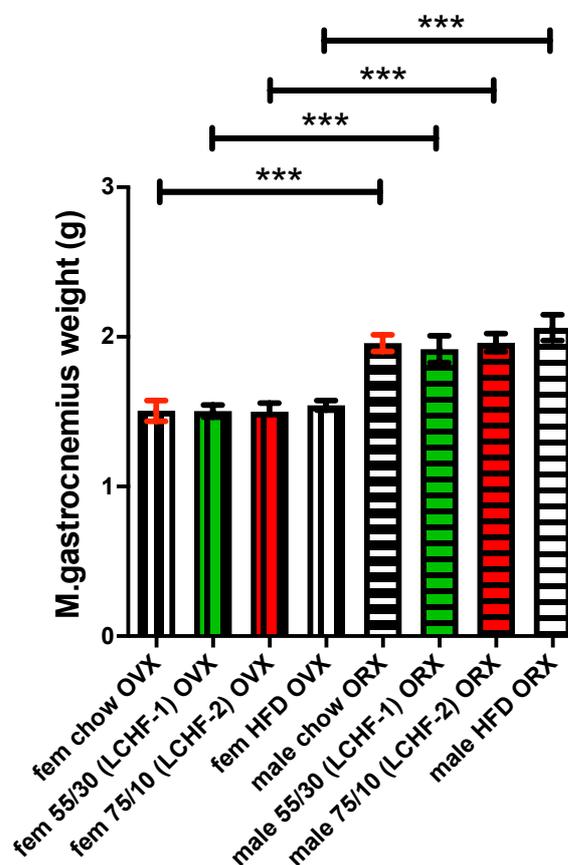


Abb 12: Muskulaturgewicht m.gast.med im Kastrationsversuch. Schwerere Muskulatur der kastrierten Männchen.

Ohne Kastration zeigte sich bei allen Diäten ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen sowie den männlichen Individuen der Versuchsreihe ( $p < 0,001$ ). Demnach haben die Männchen bei Versuchsabschluss ein höheres Muskulaturgewicht als die Weibchen. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der Geschlechter zwischen den jeweiligen Diäten zeigte sich nicht, trotz unterschiedlicher Nahrungszusammensetzung blieben die Muskelgewichte vergleichbar (Abbildung 11. fem chow: 1,34g +/- 0,11g vs. male chow: 2,34g +/- 0,25g) (fem LCHF-1: 1,31g +/- 0,08g vs. male LCHF-1: 2,37g +/- 0,17g) (fem LCHF-2: 1,29g +/- 0,08g vs. male LCHF-2: 2,26g +/- 0,09g) (fem HFD 1,41 +/- 0,12 vs. male HFD 2,35g +/- 0,09g).

In der Versuchsreihe mit Kastration zeigte sich ebenfalls ein hoch signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen Männchen und Weibchen, dieser fiel allerdings deutlich geringer aus als vor Kastration (siehe Abbildung 12. fem OVX chow 1,51g +/- 0,17g vs. male ORX chow 1,96g +/- 0,14g) (fem OVX LCHF-1 1,50g +/- 0,10g vs. male ORX LCHF-1 1,92g +/- 0,22g) (fem OVX LCHF-2 1,50g +/- 0,15 vs. male ORX LCHF-2 1,96g +/- 0,14g) (fem OVX HFD 1,54g +/- 0,08g vs. male ORX HFD 2,06g +/- 0,21g).

Der unterschiedliche Einfluss der Kastration auf das Muskelgewicht bei weiblichen und männlichen Tieren ist nochmals in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt. Weibliche Tiere entwickelten nach Kastration unter allen Diäten ein höheres Muskulaturgewicht (fem chow: 1,34g +/- 0,11g vs. fem OVX chow: 1,51g +/- 0,17g,  $p < 0,05$ ; fem LCHF-1: 1,31g +/- 0,08g vs. fem OVX LCHF-1: 1,50g +/- 0,10g,  $p = 0,004$ ; fem LCHF-2: 1,29g +/- 0,08g vs. fem OVX LCHF-2: 1,50g +/- 0,15,  $p = 0,009$ ; fem HFD 1,41 +/- 0,12 vs. fem OVX HFD 1,54g +/- 0,08g,  $p = 0,02$ ). Bei männlichen Tieren hingegen waren die Muskelgewichte bei kastrierten Tieren geringer als bei nicht-operierten (male chow: 2,34g +/- 0,25g vs. male ORX chow: 1,96g  $p = 0,006$ ; male LCHF-1: 2,37g +/- 0,14g vs. male ORX LCHF-1: 1,92g +/- 0,22g  $p = 0,002$ ; male LCHF-2:

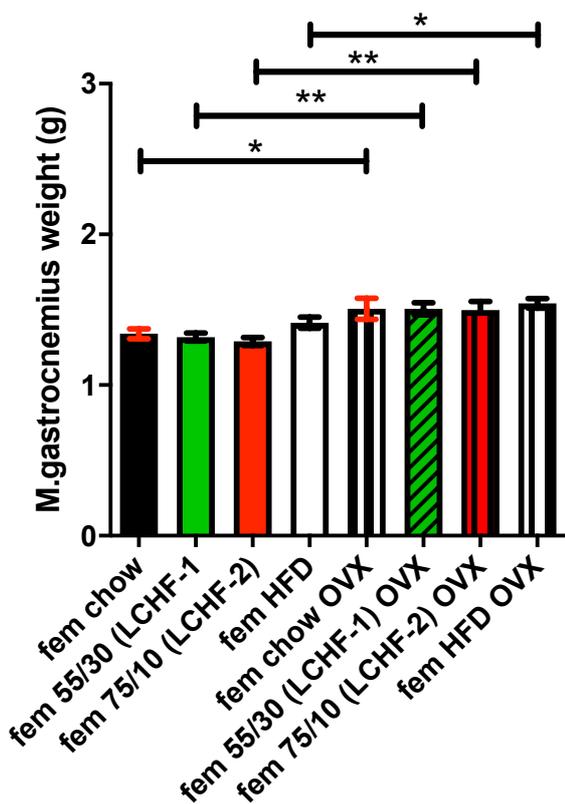


Abb 13 : Muskulaturgewicht m.gast.med bei unkastrierten und kastrierten Weibchen. Schwerere Muskulatur nach Kastration

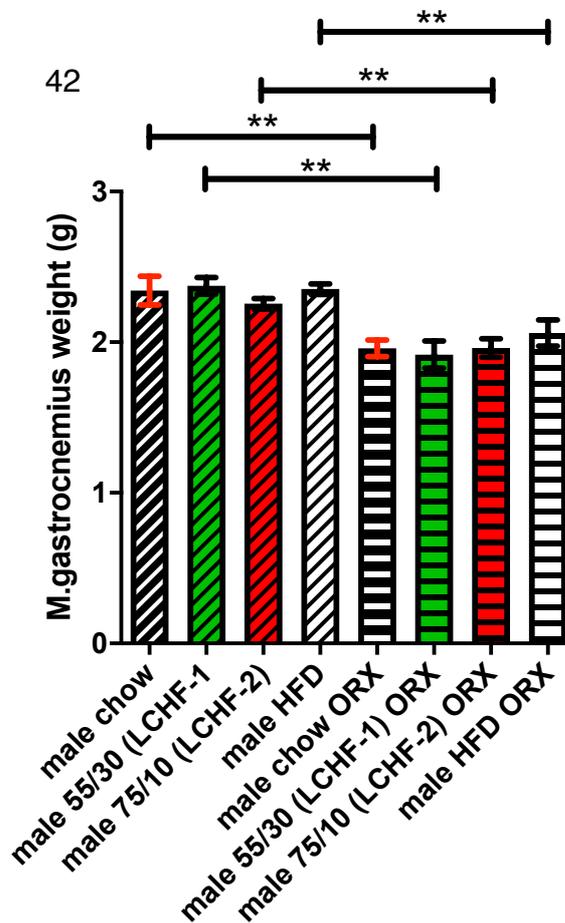


Abb 14: Muskulaturgewicht m.gast.med bei unkastrierten und kastrierten Männchen. Leichtere Muskulatur nach Kastration

2,26g +/- 0,09 vs. male ORX LCHF-2: 1,96g +/- 0,14g p=0,0012 ; male HFD: 2,35g +/- 0,09g vs. male ORX HFD 2,06g +/- 0,21g p=0,007). Insgesamt näherten sich Muskelgewichte bei Männchen und Weibchen also nach Operation aneinander an.

#### 4.1.3 Fettfreie Masse

Im Versuch ohne Kastration zeigten sich eine hoch signifikant höhere fettfreie Masse bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen (siehe Abbildung 15. fem chow: 120,5g +/- 8,9g vs. male chow: 201,8g +/- 9,5g ; fem LCHF-1: 118,1g +/- 5,4g vs. male LCHF-1: 200,8g +/- 8,2g ; fem LCHF-2: 116,3g +/- 7,1g vs. male LCHF-2: 194,7g +/- 6,9g ; fem HFD: 122,4g +/- 3,8g vs. male HFD 199,9g +/- 3,5g; p jeweils <0,001).

Auch im Kastrationsversuch zeigten sich Ergebnisse analog zum Versuch ohne Kastration mit hoch signifikant höheren Gewichten bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen. Bei Beiden finden sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der

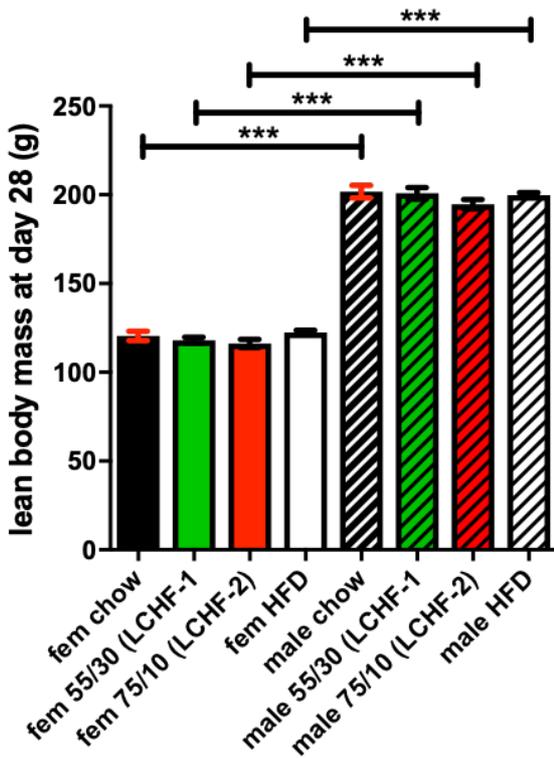


Abb 15: Fettfreie Masse der Tiere im Versuch GHB I. Höhere Fettfreie Masse als Ausdruck der Gesamtmuskulatur bei den Männchen. Artentypisch

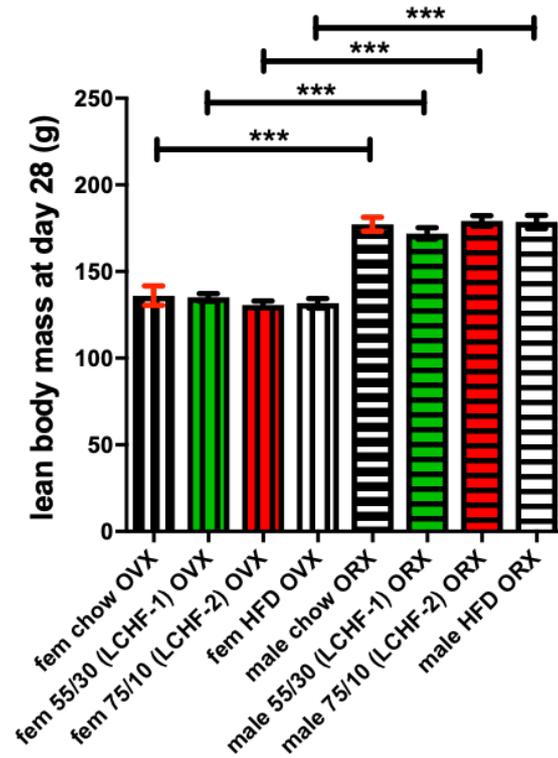


Abb 16: Fettfreie Masse der Tiere im Versuch GHB II. Weiterhin höhere fettfreie Masse als Ausdruck der Gesamtmuskulatur bei den Männchen.

Geschlechter zwischen den einzelnen Diäten (siehe Abbildung 16. fem chow OVX: 136,1g +/- 14,7g vs. male chow ORX 177,3g +/- 9,8g ; fem LCHF-1 OVX: 135,1g +/- 5,0g vs. male LCHF-1 ORX: 171,8g +/- 8,2g ; fem LCHF-2 OVX: 130,6g +/- 6,5g vs. male LCHF-2 ORX: 179,1g +/- 6,8g ; fem HFD OVX: 131,7g +/- 6,7g ; male HFD ORX: 178,6g +/- 9,3g).

In den folgenden Abbildungen werden wieder nicht beide Geschlechter verglichen, sondern die Unterschiede innerhalb eines Geschlechts durch die Kastration verdeutlicht. Hierbei zeigt sich ein signifikanter bis hoch signifikanter Unterschied. Die kastrierten weiblichen Tiere hatten nach Versuchsabschluss mehr fettfreie Masse als die umkastrierten Tiere. (siehe Abbildung 17. fem chow: 120,5g +/- 8,9g vs. fem OVX chow 136,1g +/- 14,7g  $p=0,01$  ; fem LCHF-1: 118,1g +/- 5,4g vs. fem OVX LCHF-1: 135,1g +/- 4,9g  $p<0,001$  ; fem LCHF-2: 116,3g +/- 7,1g vs. fem OVX LCHF-2: 130,6g +/- 6,5g  $p<0,001$  ; fem HFD: 122,4g +/- 3,8g vs. fem OVX HFD: 131,7g +/- 6,7g  $p=0,003$ ). Die kastrierten männlichen Tiere hatten hingegen nach Versuchsabschluss weniger fettfreie Masse als die umkastrierten Männchen. (siehe Abbildung 18. male

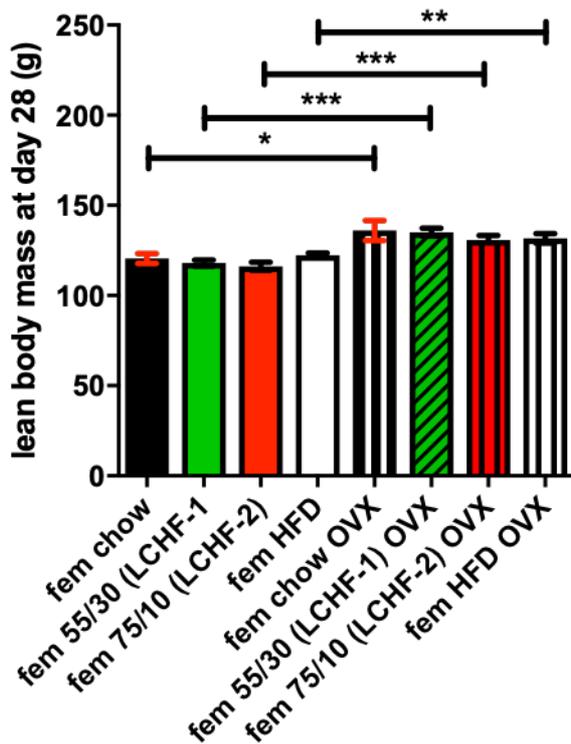


Abb 17: Fettfreie Masse der Weibchen ohne und nach Kastration

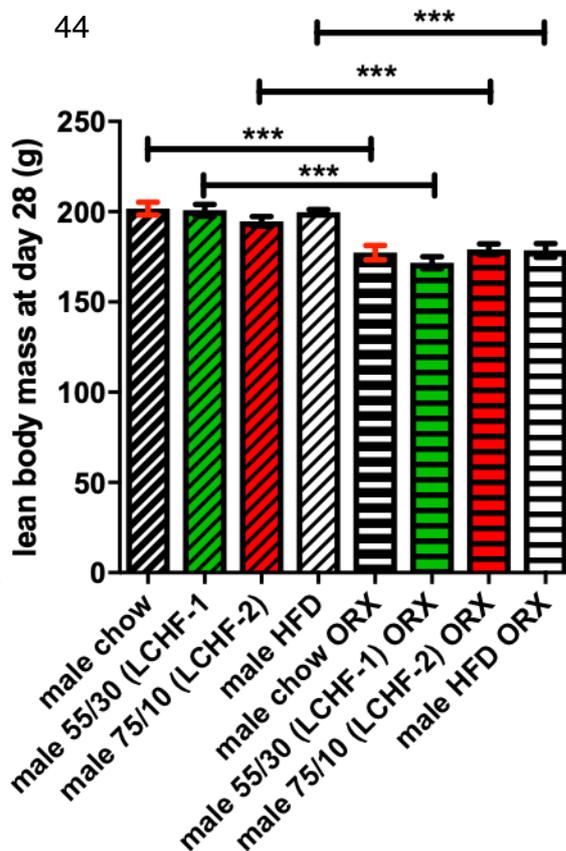


Abb 18: Fettfreie Masse der Männchen ohne und nach Kastration

chow: 201,8g +/- 9,5g vs. male ORX chow: 177,3g +/- 9,8g  $p < 0,001$  ; male LCHF-1: 200,8g +/- 8,2g vs. male ORX LCHF-1: 171,8g +/- 8,2g  $p < 0,001$  ; male LCHF-2: 194,7g +/- 6,9g vs. male ORX LCHF-2: 179,1g +/- 6,8g  $p = 0,003$  ; male HFD: 199,9g +/- 3,5g vs. male ORX HFD: 178,6g +/- 9,3g  $p < 0,001$ ).

Für das Körpergewicht, die Muskulatur und die fettfreie Masse zeigen sich hier sehr plausible Ergebnisse, welche der normalen Physiologie der Ratte und anderer Säugetiere entsprechen [67]. Erklärungsbedürftig ist jedoch der entgegengesetzte Effekt der Kastration bei beiden Geschlechtern.

## 4.2 Laborchemische Ergebnisse im Serum

### 4.2.1 GH im Serum

Anders als die bisherigen Werte können die Ergebnisse unserer GH Serienblutentnahmen nicht als einfacher Mittelwert aller Messwerte mit seiner Standardabweichung dargestellt werden. Die Sekretion von GH erfolgt pulsatil

abhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit seiner Stimulatoren bzw. Inhibitoren [68]. Eine einzelne Messung ist deshalb nicht repräsentativ für den Sekretionsstatus. Eine Möglichkeit, die zunächst zufällig erscheinenden einzelnen GH-Konzentrationen der Tiere vergleichbar zu machen und auch aussagekräftig graphisch darzustellen, wurde von einer Pariser Arbeitsgruppe vorgeschlagen [69]. Dabei werden alle Messwerte aus einer Gruppe aufsteigend sortiert und mit einem Rang versehen (daher Rank plot). Zur Vereinheitlichung wird nicht die Gesamtzahl der Messwerte als Rank verwendet, sondern alle Gruppen auf 100 Ranks genormt. Die Ranks werden dann in einem XY-Plot gegen die jeweiligen Messwerte aufgetragen. Eine statistische Interpretation der Analyse ist äußerst kompliziert und selbst für erfahrene Statistiker eine Herausforderung, die Darstellung eignet sich jedoch zumindest für eine deskriptive Charakterisierung von Gruppenunterschieden.

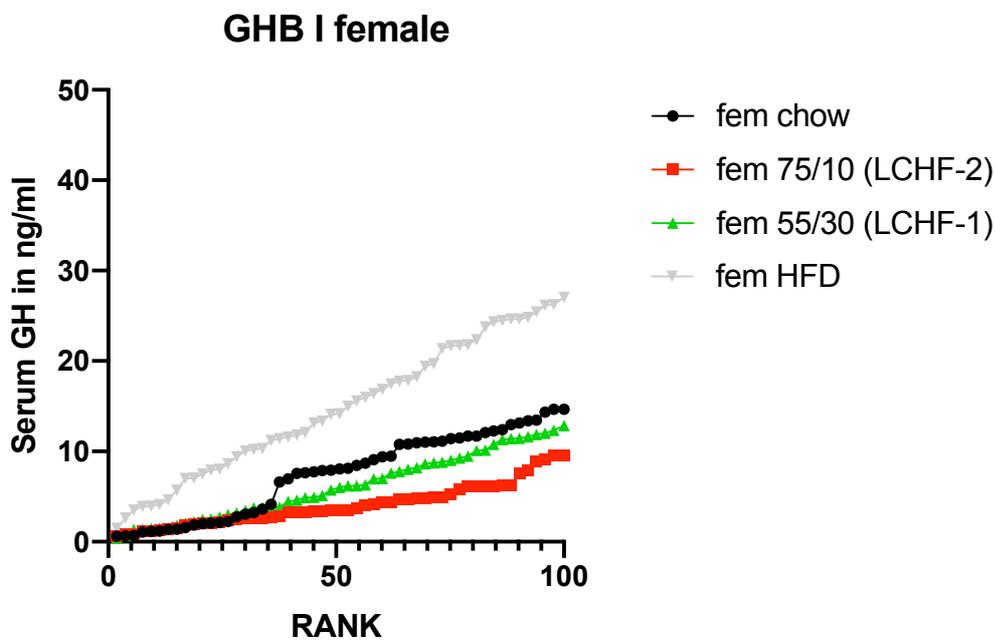


Abb 19: GH im Serum in ng/ml der Weibchen aus dem Versuch GHB I. Scheinbare Suppression der GH Sekretion unter LCHF Diäten. V.a unter LCHF-2

Bei unkastrierten (siehe Abbildung 19) Weibchen erkennt man ein höheres GH im Serum unter der HFD-Diät. Die niedrigsten Kurven gehören zu den „low carb“-Diäten mit hohem Fettanteil. Das Serum-GH scheint abhängig von den Kohlehydraten in der Nahrung und wird bei hohem Fettgehalt supprimiert.

### GHB I male

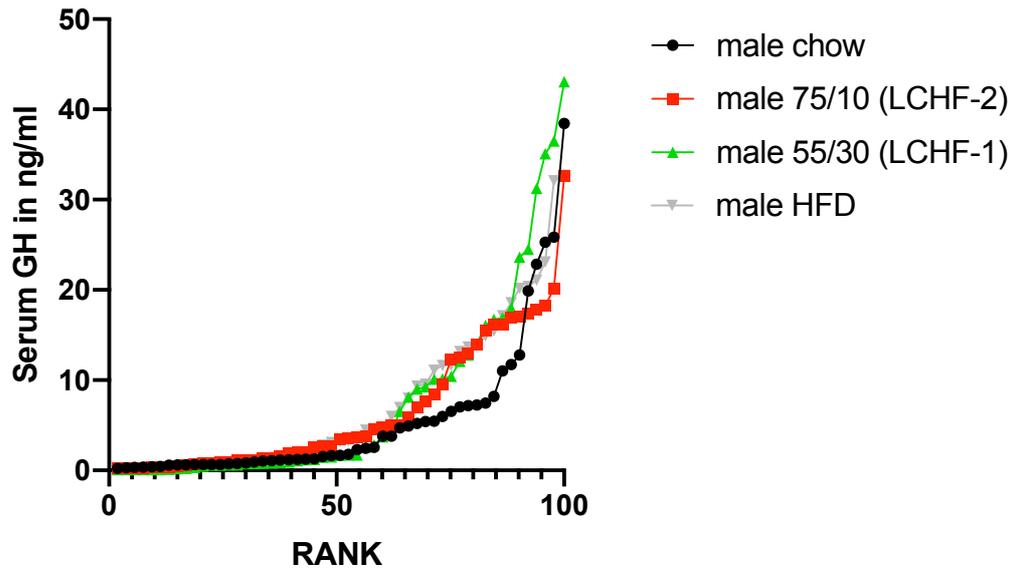


Abb 20: GH im Serum in ng/ml der Männchen aus dem Versuch GHB I. Scheinbar keine Unterschiede in der GH Sekretion durch verschiedene Diäten bei den Männchen.

Anders verhält es sich bei den unkastrierten Männchen. Hier wird kein klarer Unterschied ersichtlich und die Diäten scheinen sich nicht auf die GH Sekretion auszuwirken. (siehe Abbildung 20)

### GHB II female

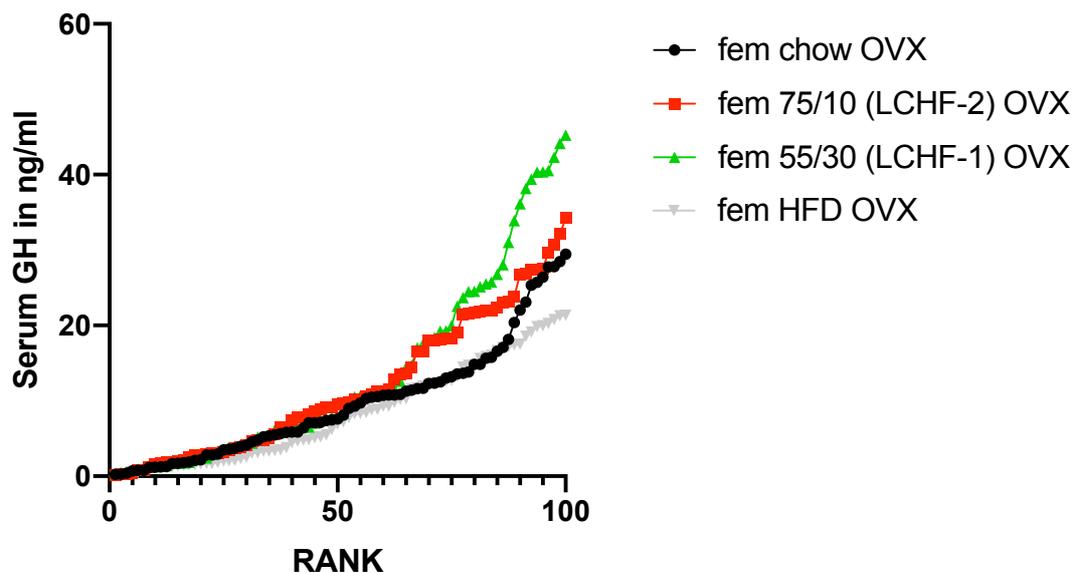


Abb 21: GH im Serum in ng/ml der Weibchen aus dem Versuch GHB II. Nach Kastration kein Unterschied mehr in der GH Sekretion. Keine Suppression mehr durch LCHF-Diäten.

Nach Kastration zeigt sich auch bei den Weibchen kein klarer Unterschied mehr in der Serumkonzentrationen von GH. Die unterschiedlichen Diäten scheinen keine Auswirkung (siehe Abbildung 21) mehr zu haben.

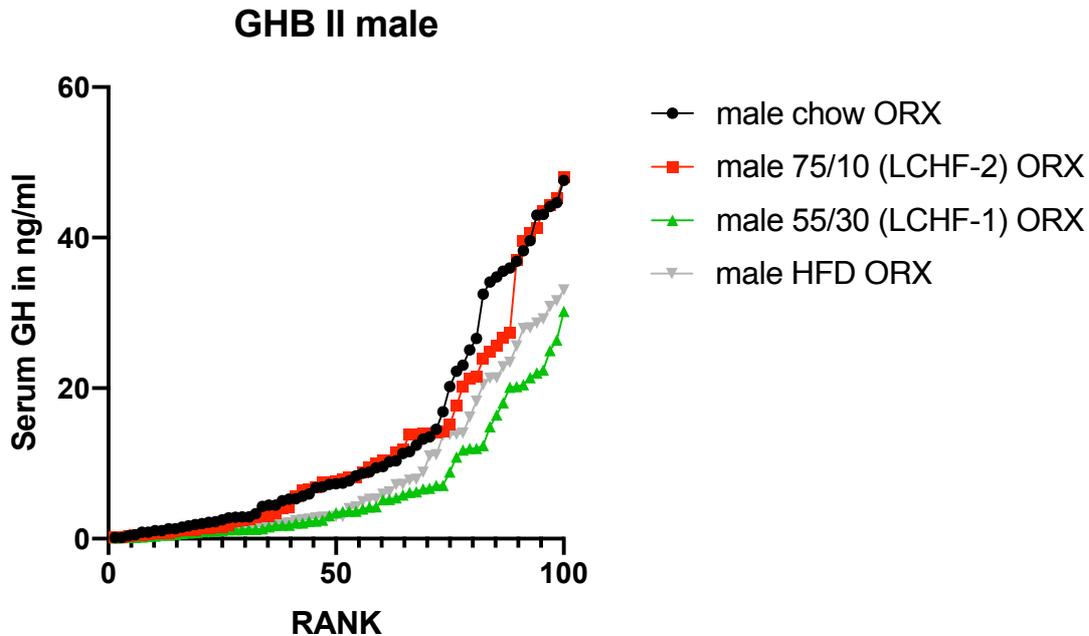


Abb 22: GH im Serum in ng/ml der Männchen aus dem Versuch GHB II. Wie schon bei den umkastrierten Tieren, kein Unterschied in der GH Sekretion.

Bei den kastrierten Männchen zeigt sich ein ähnliches Bild mit sehr nah aneinander laufenden Kurven, es finden sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Diätgruppen.

#### 4.2.2 IGF-I im Serum

Generell waren die IGF-I-Konzentrationen in allen Diätgruppen bei Männchen signifikant höher als bei Weibchen. Dieser Geschlechtsunterschied blieb auch nach Kastration bestehen (female chow: 745,7 +/- 144,1ng/ml vs. male chow: 1433 +/- 242,2ng/ml  $p < 0,001$  ; female LCHF-1: 643,9 +/- 156,4ng/ml vs. male LCHF-1: 1125 +/- 258,1ng/ml  $p < 0,001$  ; female LCHF-2: 524,5 +/- 144,3ng/ml vs. male LCHF-2:

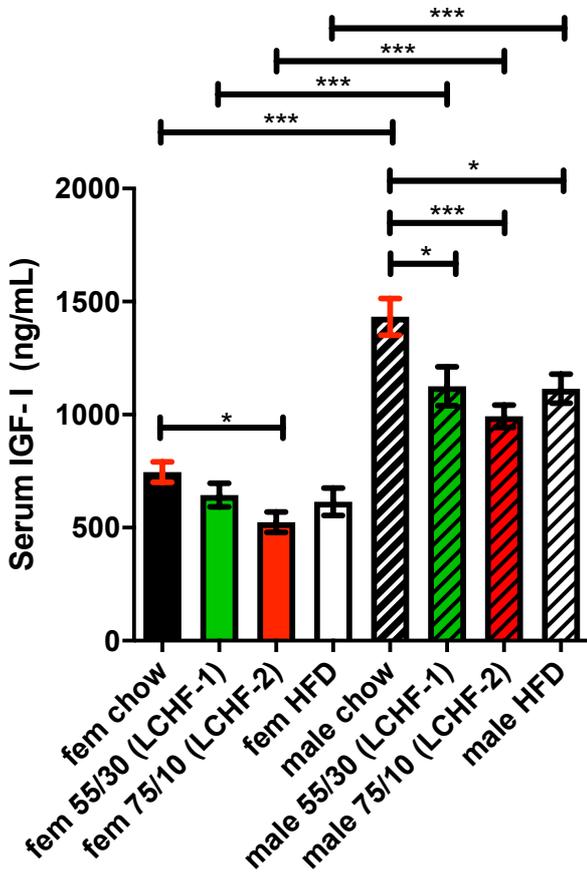


Abb 23: Serum IGF-I im Versuch GHB I. Abnahme der IGF-I Konzentration durch hohe Anteile von Fett in der Nahrung. Bei Männchen stärker ausgeprägt als bei Weibchen.

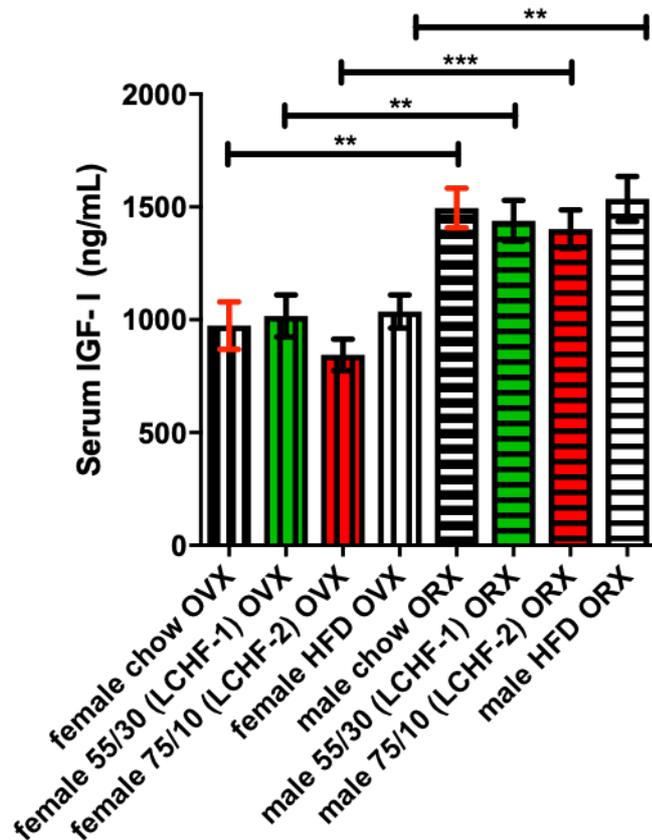


Abb 24: Serum IGF-I im Versuch GHB II. Keine Unterschiede mehr bei den verschiedenen Diäten nach Kastration der Tiere

992,6 +/- 147,6ng/ml  $p < 0,001$  ; female HFD: 615,1 +/- 192,8ng/ml vs. male HFD: 1115 +/- 193,5ng/ml  $p < 0,001$ ) Abbildungen 23 und 24).

Vor Kastration scheint die Serumkonzentration von IGF-I bei beiden Geschlechtern unter den fett- bzw. kalorienreicheren Diäten niedriger zu sein als unter der Chow-Diät. Bei Weibchen wird dieser Unterschied allerdings nur zwischen der Referenzdiät chow und der LCHF-2-Diät statistisch signifikant (siehe Abbildung 23. female chow: 745,7 +/- 144,1ng/ml vs. female LCHF-2: 524,5 +/- 144,3ng/ml  $p = 0,01$ ). Bei den Männchen waren die Diäteneffekte deutlich ausgeprägter. Zwischen der Referenzdiät und allen 3 Experimentaldiäten zeigten sich signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 23. male chow: 1433 +/- 242,2ng/ml vs. male LCHF-2: 992,6 +/- 147,6ng/ml  $p < 0,001$  ; male chow: 1433 +/- 242,2ng/ml vs. male LCHF-1: 643,9 +/- 156,4  $p = 0,01$  ; male chow: 1433 +/- 242,2ng/ml vs. male HFD: 1115 +/- 193,5 ng/ml  $p = 0,01$ ).

Nach Kastration (siehe Abbildung 24) waren die IGF-I-Konzentrationen zwischen den Diätgruppen innerhalb eines Geschlechtes nicht mehr signifikant unterschiedlich. Die Werte bei den Männchen waren zwar nach wie vor höher, jedoch zeigt sich der Trend, dass sich die IGF-I-Konzentrationen von Männchen und Weibchen einander annähern. (female chow OVX: 974,2 +/- 278,9 ng/ml vs. male chow ORX: 1495 +/- 213,6 ng/ml  $p=0,003$  ; female LCHF-1 OVX: 1017 +/- 227,6 ng/ml vs. male LCHF-1 ORX: 1439 +/- 221,6 ng/ml  $p=0,009$  ; female LCHF-2 OVX: 844,5 +/- 184,6 ng/ml vs. male LCHF-2 ORX: 1402 +/- 190,6  $p<0,001$  ; female HFD OVX: 1037 +/- 180,5 ng/ml vs. male HFD ORX: 1536 +/- 243,6 ng/ml  $p=0,002$ )

Betrachtet man die Geschlechter einzeln und vergleicht die beiden Versuche untereinander zeigen sich hier deutliche Unterschiede zwischen kastrierten und nicht kastrierten Tieren (siehe Abbildungen 25 & 26). Bei den Weibchen zeigen sich unter allen Diäten signifikant bis hoch signifikant höhere IGF-I Konzentrationen nach Kastration, wobei die Differenz bei der Chow-Diät am geringsten, bei der HF-Diät am deutlichsten war (female chow: 745,7 +/- 144,1ng/ml vs. female chow OVX: 974,2 +/-

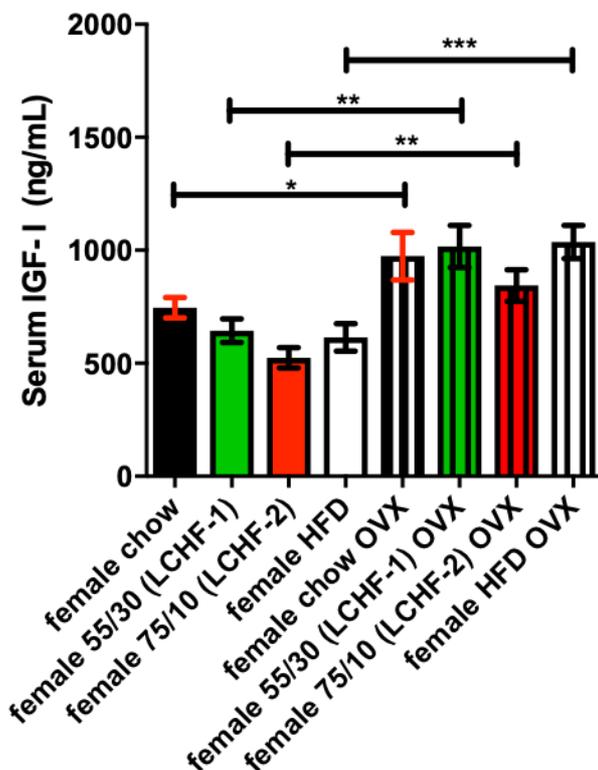


Abb 25: Serum IGF-I der Weibchen in den Versuchen GHB I/II.  
Anstieg der IGF-I Konzentrationen nach Kastration.

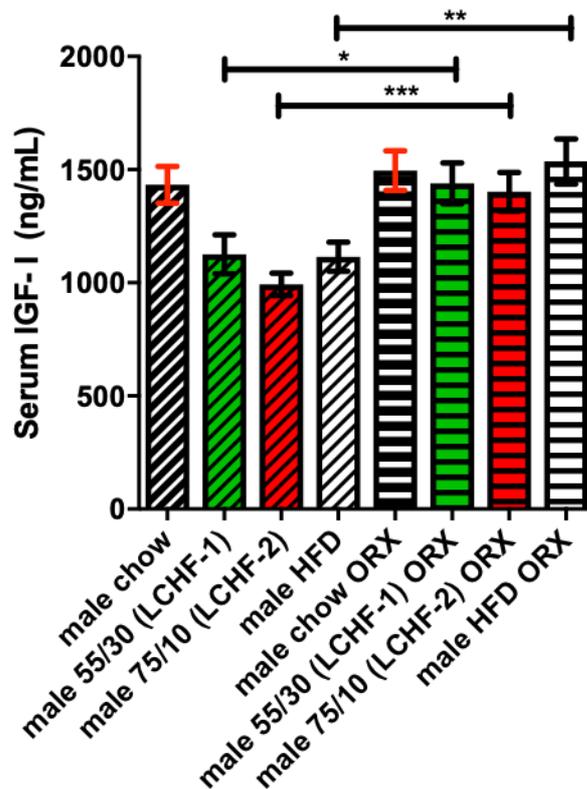


Abb 26: Serum IGF-I der Männchen in den Versuchen GHB I/II.  
Anstieg der IGF-I Konzentrationen nach Kastration zwischen den  
Experimentaldiäten

278,9ng/ml  $p=0,04$  ; female LCHF-1 643,9 +/- 156,4ng/ml vs female LCHF-1 OVX: 1017 +/- 227,6ng/ml  $p=0,001$  ; female LCHF-2: 524,5 +/- 144,3ng/ml vs. female LCHF-2 OVX: 844,5 +/- 184,6  $p=0,002$  ; female HFD: 615,1 +/- 192,8ng/ml vs. female HFD OVX: 1037 +/- 180,5  $p<0,001$ ).

Bei den Männchen zeigte sich bei den 3 Experimentaldiäten ein Unterschied zwischen den Versuchen mit einer Zunahme der IGF-I Konzentrationen. Die Werte bei der chow-diät blieben fast gleich. Der deutlichste Unterschied war bei der LCHF-2 Diät zu sehen (male LCHF-1:1125 +/- 258,1ng/ml vs. male LCHF-1 ORX: 1439 +/- 221,6ng/ml  $p=0,03$  ; male LCHF-2: 992,6 +/- 147,6 vs. male LCHF-2 ORX: 1402 +/- 190,6  $p<0,001$  ; male HFD: 1115 +/- 193,5ng/ml vs. male HFD ORX: 1536 +/- 243,6ng/ml  $p=0,003$ ).

#### 4.2.3 Triacylglyceride im Serum

Ein weiterer wichtiger Serumparameter stellten die Triglyzeride dar. Diese wurden wie unter Material und Methoden beschrieben aus dem beim Versuchsabschluss entnommenen Blut bestimmt.

Bei den unkastrierten Tieren (siehe Abbildung 27) zeigte sich bei den Weibchen kein signifikanter Unterschied in der TAG Konzentration im Serum zwischen den Diäten. Wie in Abbildung 27 erkennbar scheint die Konzentration von TAG zwar in den beiden LCHF-Diäten höher - mit der höchsten Konzentration in der extremen LCHF-2-Diät -, die Unterschiede erreichen dabei aber keine statistische Signifikanz. Bei den Männchen hingegen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Referenzdiät und allen Experimentaldiäten (siehe Abbildung 27. male chow: 85,9 +/- 27,3 mg/ml vs. male LCHF-1: 161,7 +/- 74,3mg/ml  $p=0,004$ ) (male chow: 85,9 +/- 27,4 mg/ml vs. male LCHF-2: 151,6 +/- 37,7mg/ml  $p=0,01$ ) (male chow: 85,9 +/- 27,4 mg/ml vs. male HFD: 147,8 +/- 32,0mg/ml  $p=0,02$ ) Insgesamt waren die TAG-Konzentrationen dabei in allen

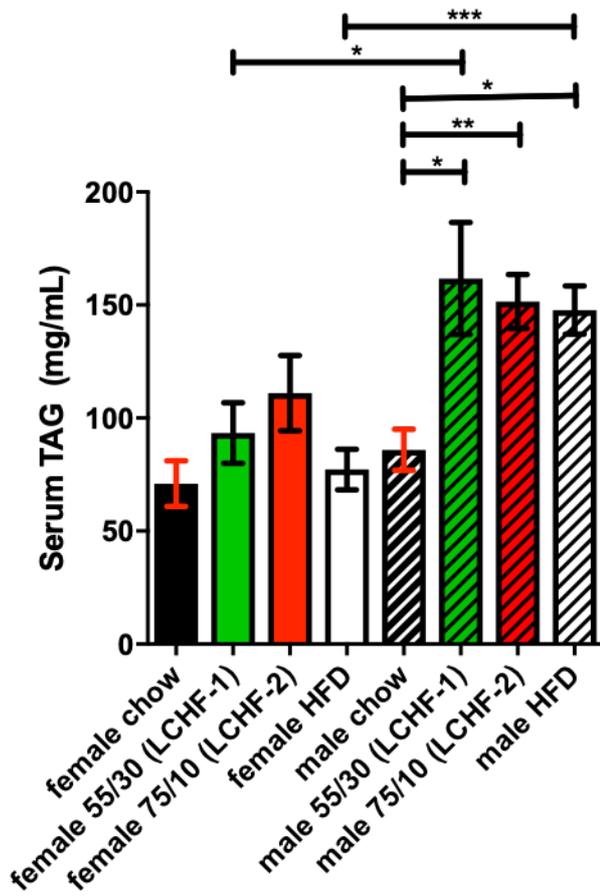


Abb 27: Serum TAG der Tiere im Versuch GHB I. Deutlich höhere TAG-Werte Männchen unter Experimentaldiät. Geschlechterunterschiede unter LCHF-1 und HFD

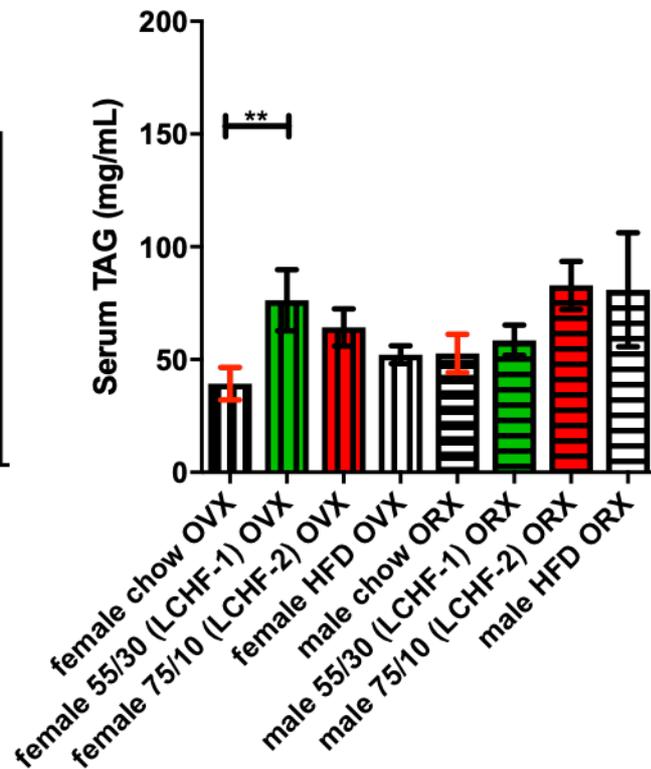


Abb 28: Serum TAG der Tiere im Versuch GHB II. Keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

Experimental-diäten höher als in der Referenzdiät. Gleichzeitig zeigten sich höhere TAG-Konzentrationen bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen in der LCHF-1 und der HFD-Gruppe (female LCHF-1: 93,38 +/- 40,15 mg/ml ; male LCHF-1: 161,7 +/- 74,34 mg/ml  $p=0,03$  ; female HFD: 77,23 +/- 28,35 mg/ml ; male HFD: 147,8 +/- 31,97 mg/ml  $p<0,001$ ).

Im Kastrationsversuch (siehe Abbildung 28) waren sowohl die Unterschiede zwischen den Diäten als auch die Unterschiede zwischen den Geschlechtern deutlich weniger zu sehen. Die Werte bewegten sich alle auf einem ähnlichen Niveau. In der Gruppe der Weibchen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Referenzdiät und der LCHF-1 (female chow ORX: 39,3 +/- 17,7 mg/ml vs. female LCHF-1 ORX:

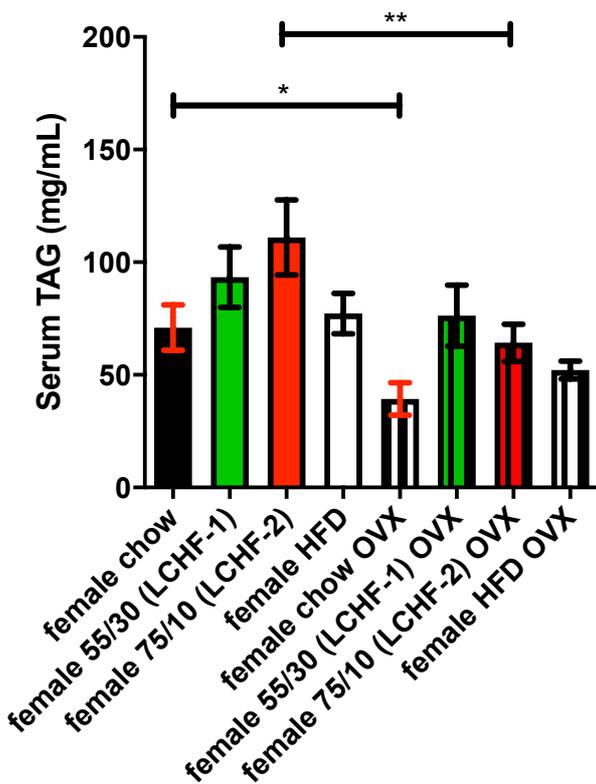


Abb 29: Serum TAG der Weibchen in den Versuchen GHB I/II. Signifikante Abnahme der TAG unter der Referenzdiät und der LCHF-2

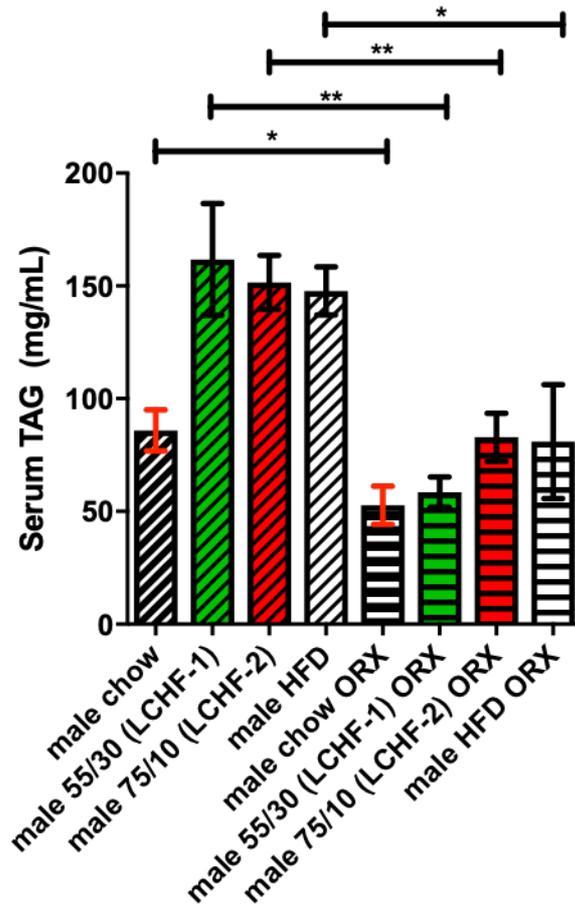


Abb 30: Serum TAG der Männchen in beiden Versuchen. Drastische Abnahme der TAG nach Kastration.

101,3 +/- 60,9 mg/ml  $p=0,01$ ). Die restlichen Diäten unterschieden sich nicht voneinander. Auch bei den kastrierten Männchen zeigte sich zwischen den einzelnen Diäten keine Unterschiede.

Vergleicht man die Männchen (siehe Abbildung 30) vor Kastration mit denen nach Kastration, zeigt sich bei allen Diäten ein mindestens signifikanter Unterschied. Bei allen Diätgruppen sind die TAG-Konzentration nach Kastration deutlich niedriger als bei normalen Tieren. Diese ist besonders bei den Experimentaldiäten sehr ausgeprägt, doch auch noch bei der Referenzdiät zu sehen (male chow: 85,9 +/- 27,4 mg/ml vs. male chow ORX: 52,72 +/- 20,87 mg/ml  $p=0,03$  ; male LCHF-1: 161,7 +/- 74,3mg/ml vs. male LCHF-1 ORX: 58,52 +/- 16,45mg/ml  $p=0,0057$  ; male LCHF-2: 151,6 +/- 37,7mg/ml vs. male LCHF-2 ORX: 82,92 +/- 23,83  $p=0,0028$  ; male HFD: 147,8 +/- 32,0mg/ml vs. male HFD ORX: 80,92 +/- 61,85  $p=0,0160$ ).

Bei den Weibchen (siehe Abbildung 29) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Tieren vor und nach Ovariectomie nur unter der Referenz- und der LCHF-2-Diät. Unter den beiden anderen fettreichen Diäten zeigte sich zwar ebenfalls eine Tendenz zu geringeren TAG-Konzentrationen nach Kastration, jedoch war dies statistisch nicht signifikant (female chow: 70,99 +/- 32,01mg/ml vs. female chow OVX: 39,27 +/- 17,68mg/ml  $p=0,044$  ; female LCHF-2: 111,0 +/- 52,51mg/ml vs. female LCHF-2 OVX: 64,23 +/- 21,73mg/ml  $p=0,043$ ).

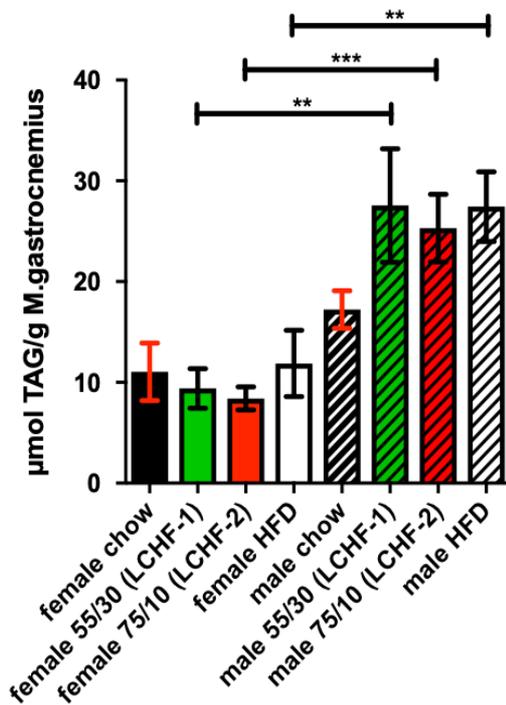


Abb 31: TAG in der Muskulatur im Versuch ohne Kastration.  
Höherer TAG Gehalt in der Muskulatur der Männchen unter den Experimentaldiäten

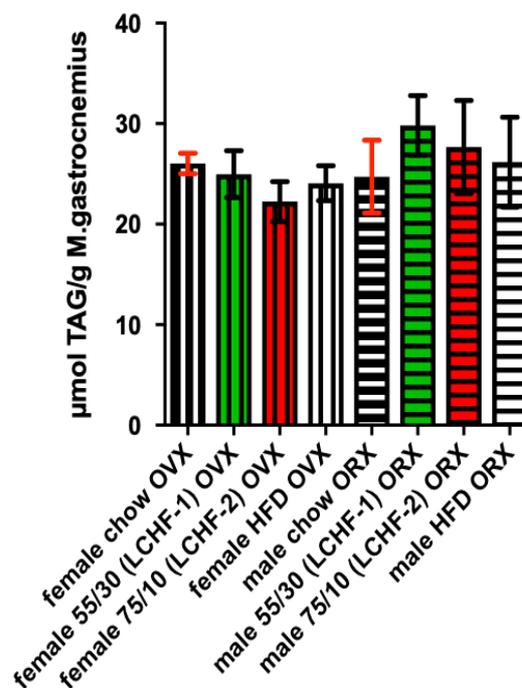


Abb 32: TAG in der Muskulatur im Kastrationsversuch.  
Keine Unterschiede in dem TAG Gehalt der Muskulatur.

### 4.3 TAG-Quantifizierung in der Skelettmuskulatur

Neben den Triglyzeriden im Serum wurden diese auch in der Skelettmuskulatur bestimmt. Wie im Methodenteil bereits beschrieben werden hierbei die Konzentrationen der Triglyzeride (in  $\mu\text{mol}$ ) auf das Gewicht der Skelettmuskulatur (in g) bezogen.

Im Versuch ohne Kastration (GHB I) (Abbildung 31) zeigten sich sowohl bei den Weibchen als auch bei den Männchen keine Unterschiede durch die einzelnen Diäten bezogen auf die Referenzdiät. Wenn man jedoch die Konzentrationen von gleichen Diäten der unterschiedlichen Geschlechter vergleicht zeigen sich bei allen Experimentaldiäten signifikante Unterschiede. Die Konzentration war in allen Diäten bei den Männchen deutlich höher mit mindestens doppelt so hohen bis dreifach so

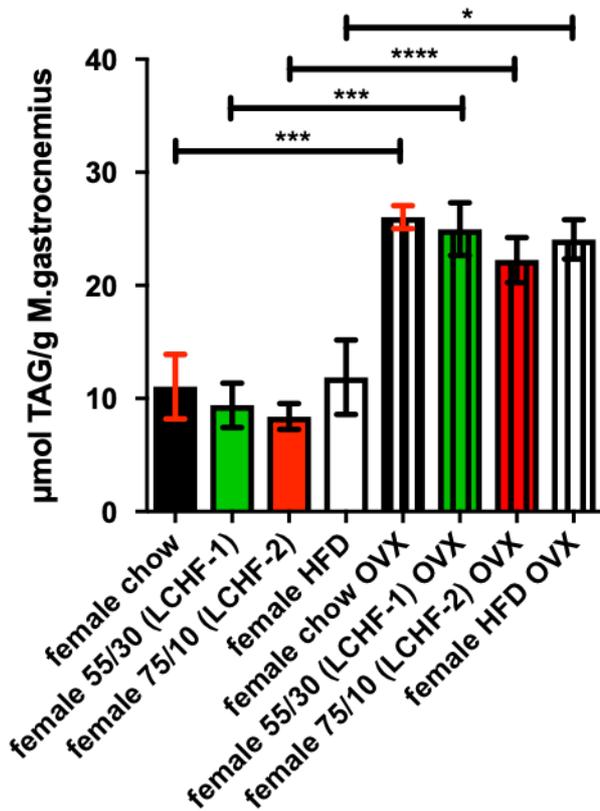


Abb 33: Gegenüberstellung der TAG in der Muskulatur bei Weibchen ohne und mit Kastration. Deutliche Zunahme der TAG in der Muskulatur nach Kastration

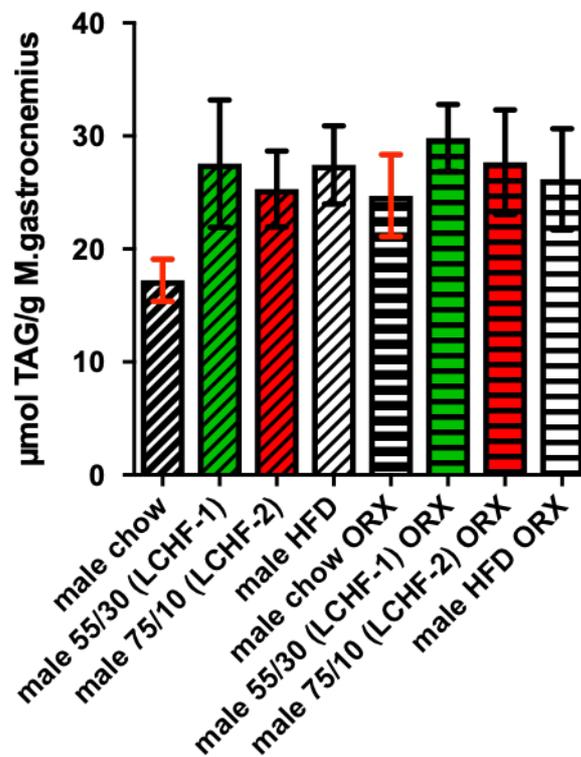


Abb 34: Gegenüberstellung der TAG in der Muskulatur bei Männchen ohne und mit Kastration.

hohen Werten (female LCHF-1:  $9,4 \pm 5,9 \mu\text{mol/g}$  vs. male LCHF-1  $27,6 \pm 13,8 \mu\text{mol/g}$   $p=0,0035$  ; female LCHF-2:  $8,4 \pm 3,6 \mu\text{mol/g}$  vs. male LCHF-2  $25,3 \pm 10,6 \mu\text{mol/g}$   $p=0,0002$  ; female HFD:  $11,87 \pm 10,40 \mu\text{mol/g}$  vs. male HFD:  $27,45 \pm 9,151 \mu\text{mol/g}$   $p=0,0061$ ).

Nach Kastration (Abbildung 32) waren weder Unterschiede zwischen den Diäten noch zwischen den Geschlechtern bei gleicher Diät zu sehen. Die im Versuch GHB I bestehenden Unterschiede zwischen den Geschlechtern waren aufgehoben.

Im Vergleich innerhalb eines Geschlechts zeigten sich bei den Weibchen nach Kastration sowohl in der Referenzdiät als auch in den Experimentaldiäten mindestens doppelt so hohe Werte wie bei den Tieren mit intakten Ovarien (siehe Abbildung 33. female chow: 11,1 +/- 9,0  $\mu\text{mol/g}$  vs. female chow OVX: 26,0 +/- 2,7  $\mu\text{mol/g}$   $p=0,0007$  ; female LCHF-1: 9,4 +/- 5,9  $\mu\text{mol/g}$  vs. female LCHF-1 OVX: 25,0 +/- 5,2  $\mu\text{mol/g}$   $p=0,0003$  ; female LCHF-2 8,4 +/- 3,6  $\mu\text{mol/g}$  vs. female LCHF-2 OVX: 22,2 +/- 5,3  $\mu\text{mol/g}$   $p<0,0007$  ; female HFD: 11,9 +/- 10,4  $\mu\text{mol/g}$  vs. female HFD OVX: 24,1 +/- 4,3  $\mu\text{mol/g}$   $p=0,0169$ ). Bei männlichen Tieren hingegen hatte die Kastration keinen statistisch signifikanten Einfluß auf den TAG-Gehalt der Muskulatur, siehe Abbildung 34).

#### 4.4. Ergebnisse der quantitativen PCR aus Skelettmuskulatur

##### 4.4.1 Expression von GH-Rezeptor in der Skelettmuskulatur

Bei gonadal intakten Tieren (Abbildung 35) war bei Weibchen die mRNA Expression unter der HFD deutlich höher als unter der Referenzdiät (female chow: 0,014 +/- 0,0085 vs. female HFD 0,045 +/- 0,028  $p=0,0256$ ). In Gegensatz dazu war die Expression bei den Männchen unter der HFD deutlich geringer als unter der Referenzdiät (male chow: 0,022 +/- 0,020 vs. male HFD: 0,0028 +/- 0,0059  $p=0,0445$ ). Vergleicht man beide Geschlechter, waren die Expression unter der HFD bei den Männchen signifikant geringer als bei den Weibchen (female HFD 0,045 +/- 0,028 vs. male HFD: 0,0028 +/- 0,0059  $p=0,0049$ )

Nach Entnahme der Gonaden (Abbildung 36) zeigte sich bei den Weibchen unverändert eine deutliche höhere Expression der GH-R-mRNA in der HFD (female chow OVX: 0,0091 +/- 0,0016 vs. female HFD OVX: 0,023 +/- 0,0069  $p=0,0062$ ). Dasselbe Muster zeigte sich nun auch bei den kastrierten Männchen (male chow ORX: 0,042 +/- 0,011 vs. male HFD ORX: 0,065 +/- 0,0088  $p=0,0287$ ). Bei beiden Geschlechtern war nach Kastration die GHR-mRNA unter den low-carb-Diäten tendenziell niedriger als unter Referenzdiät und HFD. Statistisch signifikant war dieser Effekt nur bei den Männchen

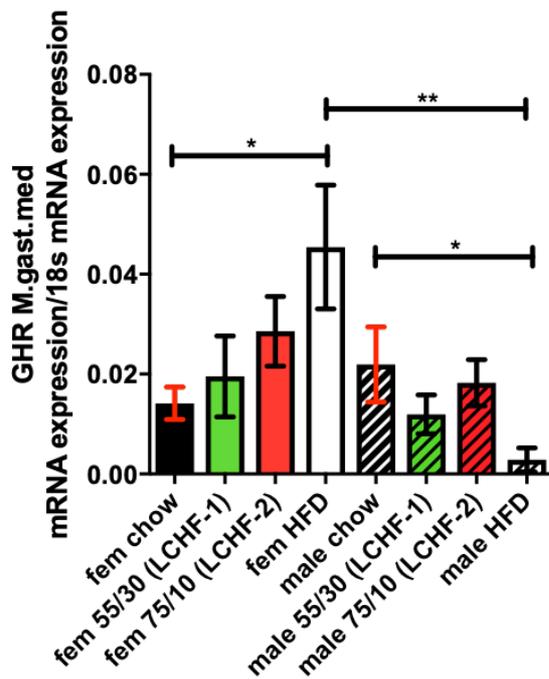


Abb 35: mRNA Expression für GHR bei unkastrierten Tieren.

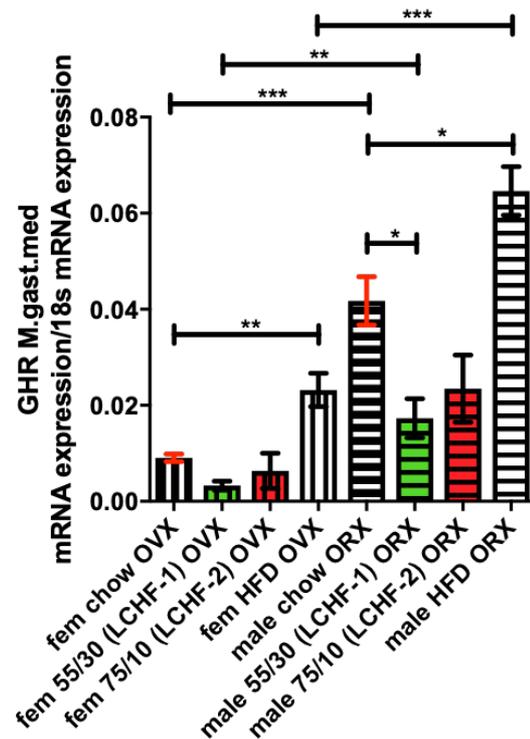


Abb 36: mRNA Expression für GHR bei Kastraten.

(male chow ORX: 0,042 +/- 0,011 ; vs. male LCHF-1 ORX: 0,017 +/- 0,0081  $p=0,012$ ). Insgesamt lag nach Gonadektomie das Expressionsniveau der GHR-mRNA bei den Männchen höher als bei den Weibchen. Signifikante Unterschiede bestanden dabei zwischen Tieren unter der Referenzdiät, der LCHF-1-Diät und der HFD (female chow OVX: 0,0091 +/- 0,0016 vs. male chow ORX: 0,042 +/- 0,011  $p<0,001$  ; female LCHF-1: 0,0033 +/- 0,0023 vs. male LCHF-1 ORX: 0,017 +/- 0,0081  $p=0,0034$  ; female HFD OVX: 0,023 +/- 0,0069 vs. male HFD ORX: 0,065 +/- 0,0088  $p<0,001$ )

Vergleicht man die Expression von GHR-mRNA bei Weibchen vor und nach Ovariectomie (Abbildung 37), so deutet sich eine Reduktion der Expression nach Ovariectomie an, die Unterschiede erreichen dabei aber keine statistische Signifikanz.

Bei den Männchen (Abbildung 38) zeigte sich ein gegensätzliches Bild mit höheren GHR-mRNA-Werten nach Kastration. Dieser Unterschied erreichte beim Vergleich der Tiere unter HFD eine hohe Signifikanz (male HFD: 0,0028 +/- 0,0058 vs. male HFD OVX: 0,065 +/- 0,0088  $p<0,001$ ).

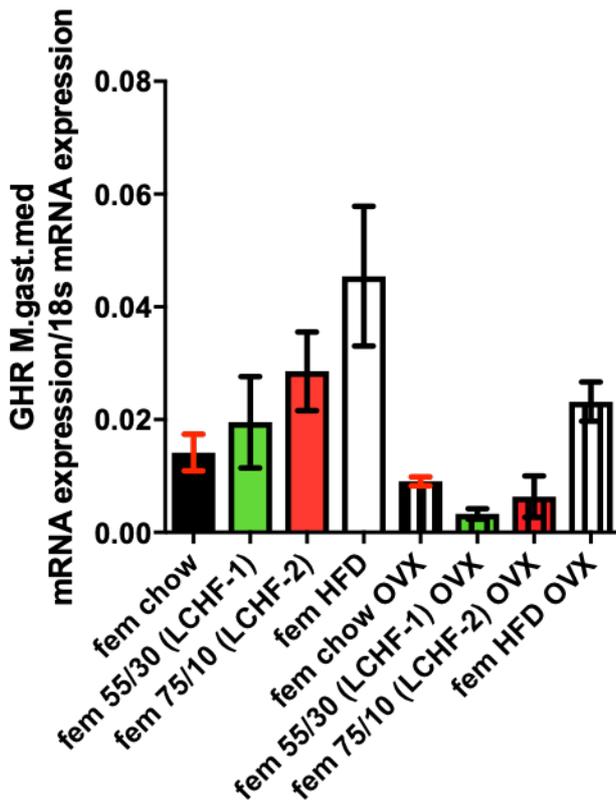


Abb 37: mRNA Expression für GHR bei Weibchen aus beiden Versuchen nebeneinander gestellt

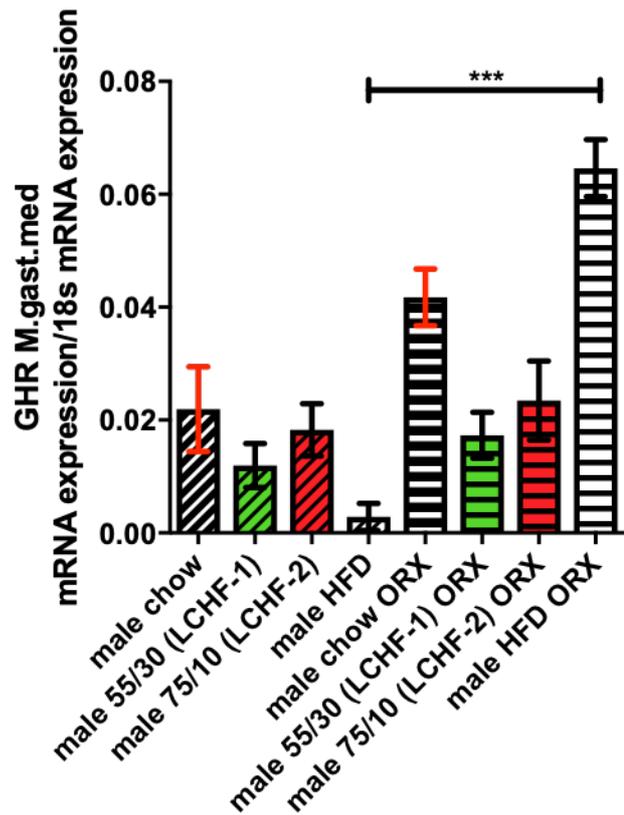


Abb 38: mRNA Expression für GHR bei Männchen aus beiden Versuchen.

#### 4.4.2 Expression von IGF-I-Rezeptor in der Skelettmuskulatur

Bei umkastrierten Tieren (Abbildung 39) zeigten sich innerhalb eines Geschlechts keine signifikanten Unterschiede in der Expression der IGF-I-Rezeptor-mRNA in der Skelettmuskulatur zwischen den mit unterschiedlichen Diäten gefütterten Tieren. Auch die bei den Männchen unter allen fettreichen Diäten zu beobachtende Tendenz zu niedrigerer Expression (Abbildung 39) erreichte keine statistische Signifikanz. Im Vergleich der Geschlechter zeigt sich bei den mit der Referenzdiät gefütterten Tieren eine höhere Expression bei den Männchen (female chow:  $9,450e-005 \pm 0,0001201$  vs. male chow:  $0,0005326 \pm 0,0003421$   $p=0,003$ ). Die restlichen Experimentaldiäten zeigten keine Unterschiede.

Nach Kastration (Abbildung 40) zeigte sich bei den Weibchen ein signifikanter

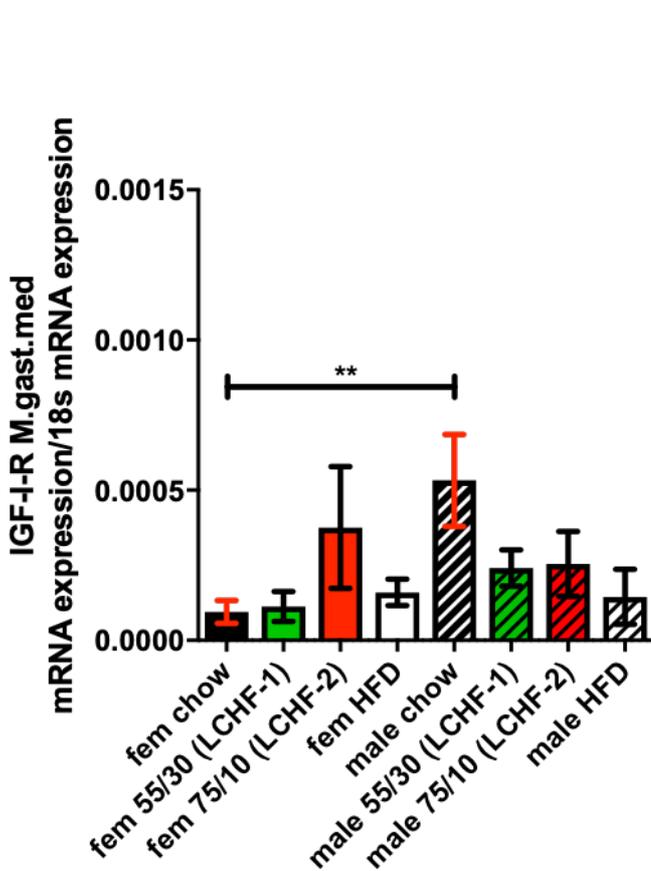


Abb 39: mRNA Expression für IGF-I-R im Versuch GHB I

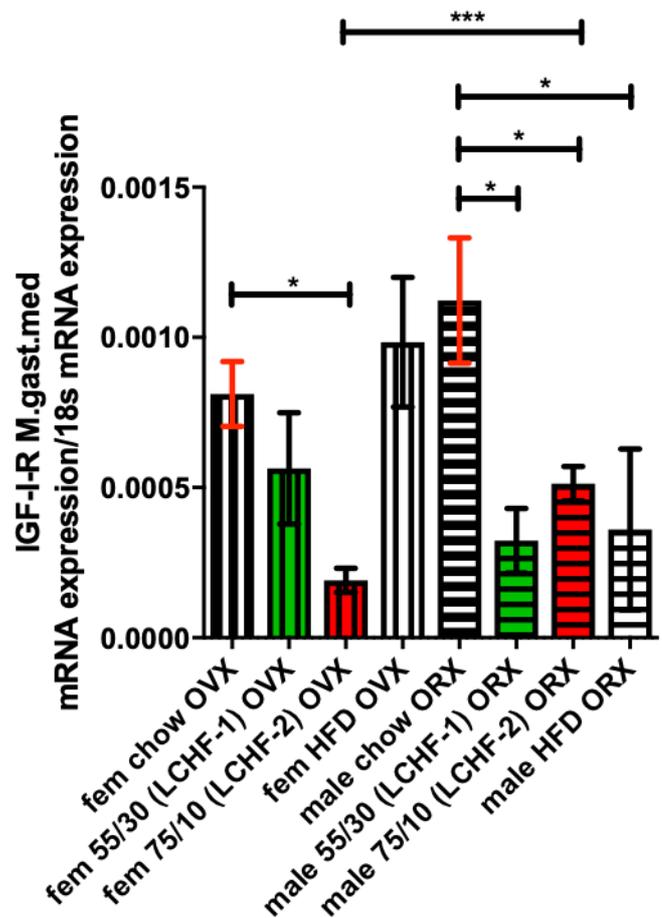


Abb 40: mRNA Expression für IGF-I-R im Versuch GHB II

Unterschied in der IGF-I-Rezeptor-mRNA in der Muskulatur nur zwischen den mit Referenzdiät und den mit LCHF-2 gefütterten Tieren bei deutlich geringerer Expression in der LCHF-2-Gruppe. (female chow OVX: 0,00081 +/- 0,00026 vs. female LCHF-2 OVX: 0,00019 +/- 0,00011 p=0,01). Bei den kastrierten Männchen hingegen zeigte sich bei allen fettreichen Experimentaldiäten eine signifikant niedrigere Expression im Vergleich zur Referenzdiät (male chow ORX: 0,0011 +/- 0,00051 vs. male LCHF-1 ORX: 0,00032 +/- 0,00021 p=0,01 ; male chow ORX: 0,0011 +/- 0,00051 vs. male LCHF-2 ORX: 0,00051 +/- 0,00013 p=0,05 ; male chow ORX: 0,0011 +/- 0,00051 vs. male HFD ORX: 0,00036 +/- 0,00046 p=0,03). Im Vergleich der beiden Geschlechter nach Kastration war einzig die Expression in der LCHF-2 bei den Männchen signifikant höher als bei den Weibchen (female LCHF-2 OVX: 0,00019 +/- 0,00011 vs. male LCHF-2 ORX: 0,00051 +/- 0,00013 p<0,001)

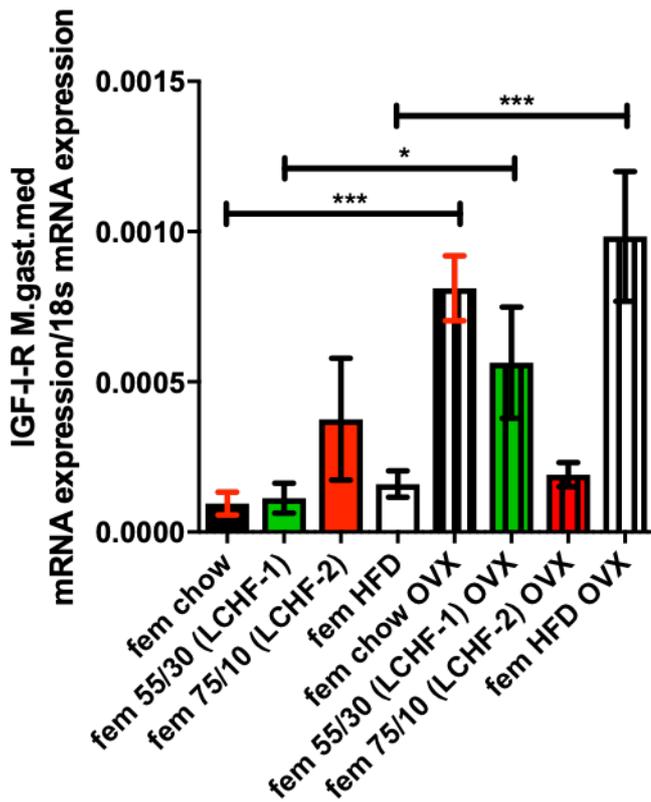


Abb 41: mRNA Expression für IGF-I-R der Weibchen in den Versuchen

GHB I/II

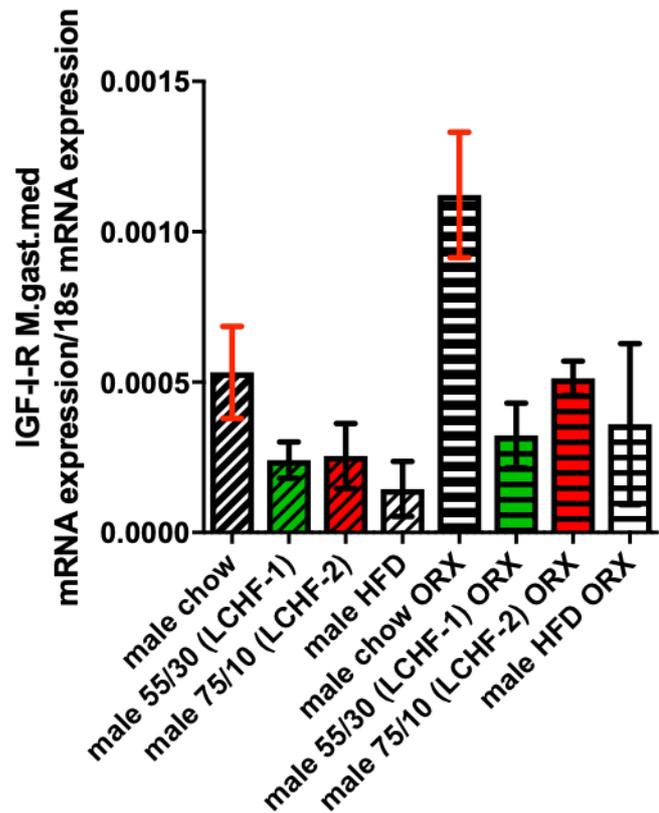


Abb 42: mRNA Expression für IGF-I-R der Männchen in den Versuchen

GHB I/II

Bei gonadektomierten Weibchen (Abbildung 41) war die Expression der IGF-I-Rezeptor-mRNA in der Skelettmuskulatur höher als bei den gonadal intakten Tieren unter derselben Diät. Der Unterschied war beim Vergleich der mit chow, LCHF-1 und HFD gefütterten Weibchen hoch signifikant (female chow:  $9,450e-005 \pm 0,0001201$  vs. female chow OVX:  $0,00081 \pm 0,00026$   $p < 0.001$ ; female LCHF-1:  $0,00011 \pm 0,00014$  vs. female LCHF-1 OVX:  $0,00056 \pm 0,00045$   $p = 0,02$ ; female HFD:  $0,00016 \pm 0,00013$ ; female HFD OVX:  $0,00098 \pm 0,00048$   $p < 0.001$ ).

Bei den Männchen hingegen sind die Unterschiede in der Expression der IGF-I-Rezeptor-mRNA bei Tieren unter derselben Diät vor und nach Kastration nicht signifikant (siehe Abbildung 42).

#### 4.4.3 Expression von CPT1B in der Skelettmuskulatur

Bei unkastrierten Tieren (Abbildung 43) zeigten sich hinsichtlich der CPT1b-mRNA-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren unter Referenzdiät und den Experimentaldiäten innerhalb eines Geschlechts. Auch im Vergleich beider Geschlechter waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen.

Bei kastrierten Tieren (Abbildung 44) zeigt sich bei den Weibchen eine höhere Expression im Vergleich zur Referenzdiät nur unter der HFD (female chow OVX: 0,010 +/- 0,0042 vs. female HFD OVX: 0,026 +/- 0,012 p=0,03). Bei den Männchen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren unter Referenzdiät und unter den Experimentaldiäten. Im Vergleich von Weibchen und Männchen zeigte sich eine höhere

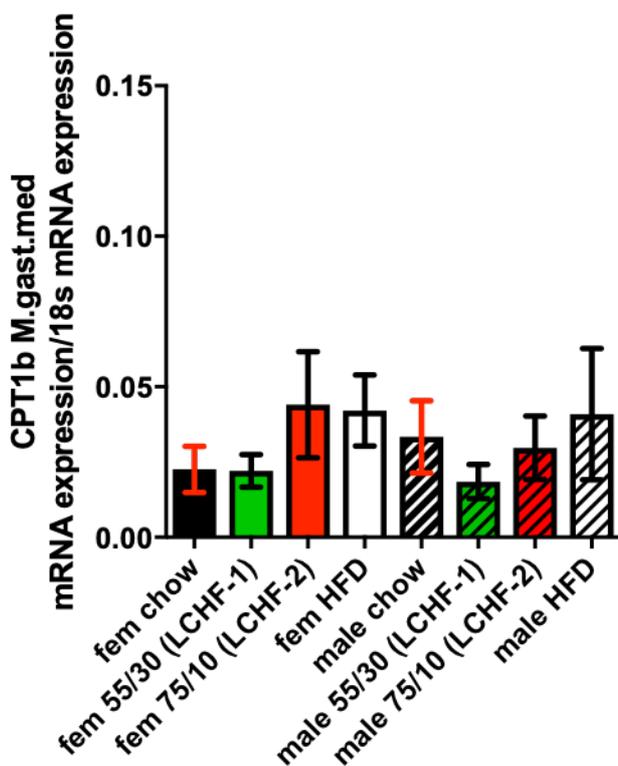


Abb 43: mRNA Expression für CPT1b im Versuch GHB I

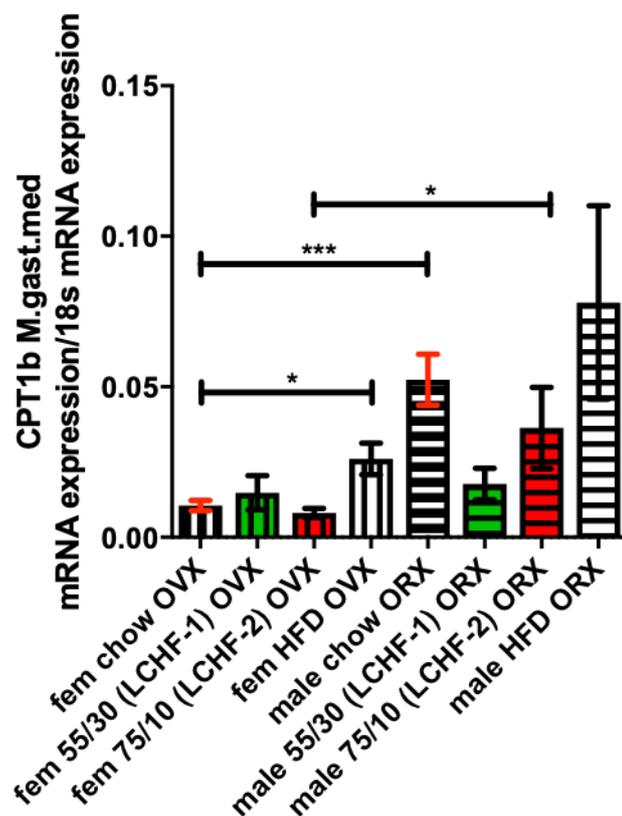


Abb 44: mRNA Expression für CPT1b im Versuch GHB II

Expression der CPT1b-mRNA bei den Männchen unter den Diäten „chow“ und

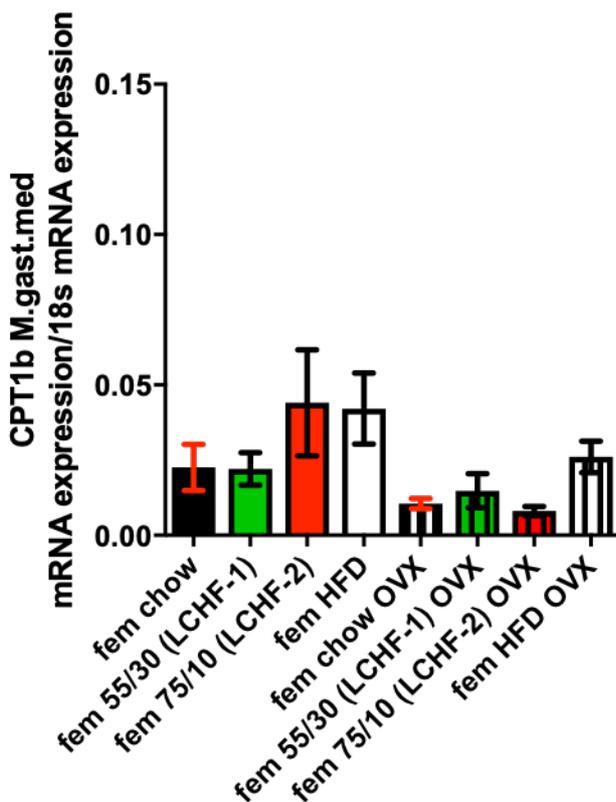


Abb 45: mRNA Expression für CPT1b bei den Weibchen im Versuch

GHB I/II

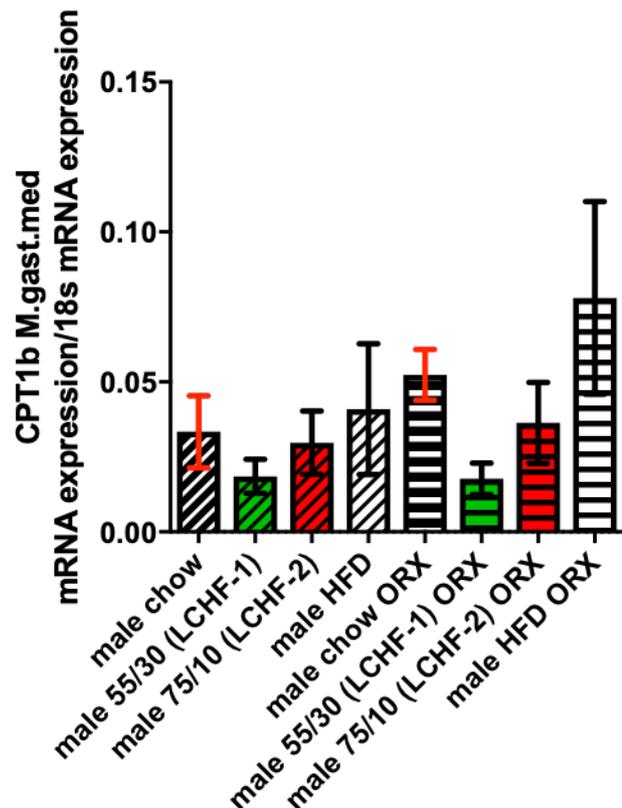


Abb 46: mRNA Expression für CPT1b bei den Männchen im Versuch

GHB I/II

LCHF-2 (female chow OVX: 0,010 +/- 0,0042 vs. male chow ORX: 0,052 +/- 0,020  $p < 0.001$  ; female LCHF-2 OVX: 0,0080 +/- 0,0041 vs. male LCHF-2 ORX: 0,036 +/- 0,030  $p = 0,03$ ).

Weder bei den Männchen noch bei den Weibchen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression der CPT1b-mRNA unter gleichen Diäten vor und nach Kastration. (Abbildungen 45 und 46)

#### 4.4.4 Expression von Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) in der Skelettmuskulatur

Im ersten Versuch (ohne Kastration) (Abbildung 47) waren bei den Weibchen keine signifikanten Unterschiede in der Expression der ATGL-mRNA unter den verschiedenen Diäten zu beobachten. Bei den Männchen hingegen lag die Expression der ATGL-mRNA unter allen fettreichen Diäten niedriger als unter chow, wobei der Unterschied

bei Tieren unter der HFD auch statistisch signifikant war (male chow: 0,081 +/- 0,072 vs. male HFD: 0,015 +/- 0,028 p=0,03). Zwischen den beiden Geschlechtern zeigte sich bei gleichen Diäten kein Unterschied, das Expressionsniveau war bei Männchen und Weibchen durchwegs vergleichbar.

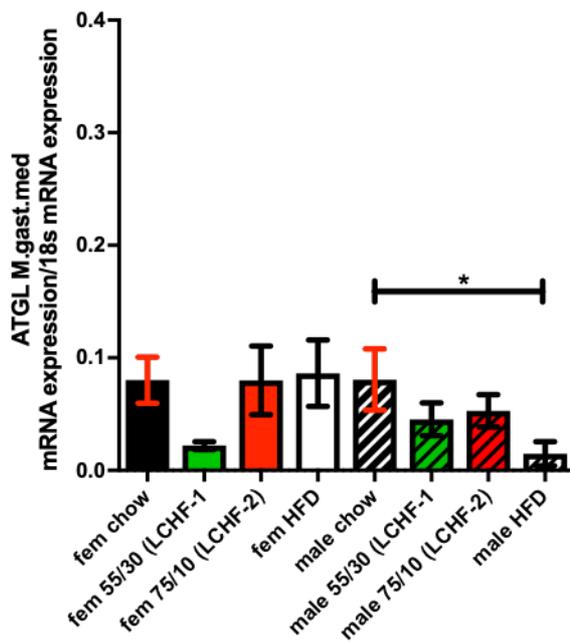


Abb 47: mRNA Expression für ATGL im Versuch GHB I

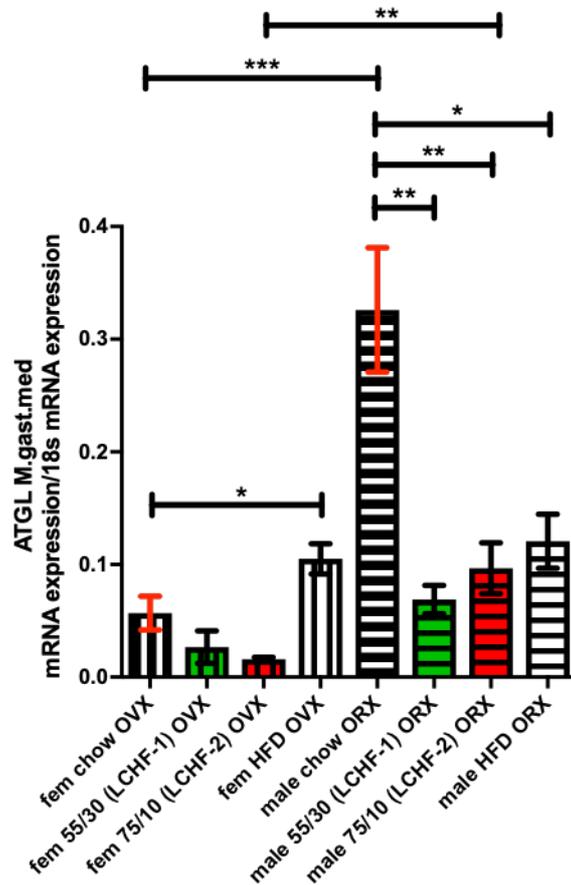


Abb 48: mRNA Expression für ATGL im Versuch GHB II

Im zweiten Versuch (nach Kastration) (Abbildung 48) zeigte sich bei den Weibchen eine signifikant höhere Expression von ATGL in der mit HFD gefütterten Gruppe im Vergleich zur Referenzdiät, im Übrigen war das Expressionsniveau dem vor Gonadektomie vergleichbar (female chow OVX: 0,057 +/- 0,037 vs. female HFD OVX: 0,11 +/- 0,03 p=0,03). Bei den Männchen zeigte sich ein klarer und signifikanter Unterschied zwischen der mRNA-Expression unter der Referenzdiät und unter allen Experimentaldiäten. Im Gegensatz zu den Weibchen ist die Expression hier jedoch in allen Experimentaldiäten deutlich niedriger und nicht höher (male chow ORX: 0,33 +/- 0,14 vs. male LCHF-1 ORX: 0,069 +/- 0,025 p=0,002 ; male chow ORX: 0,33 +/- 0,14 vs. male LCHF-2 ORX: 0,097 +/- 0,045 p=0,004 ; male chow ORX: 0,33 +/- 0,14 vs.

male HFD ORX: 0,12 +/- 0,042 p=0,02). Im Vergleich von männlichen und weiblichen Tieren nach Kastration unter gleicher Diät lag die ATGL-mRNA-Expression unter chow- und LCHF-2-Diät bei Männchen signifikant höher (female chow OVX: 0,057 +/- 0,037 vs. male chow ORX 0,33 +/- 0,14 p<0.001 ; female LCHF-2 OVX: 0,016 +/- 0,0042 vs. male LCHF-2 ORX: 0,097 +/- 0,045 p=0,002).

Betrachtet man nur die Weibchen (Abbildung 49) aus beiden Versuchen, so lag die Expression in der LCHF-2 vor Kastration geringfügig, wenn auch statistisch signifikant höher (female LCHF-2: 0,08 +/- 0,068 vs. female LCHF-2 OVX: 0,016 +/- 0,0042 p=0,04). Bei den übrigen Diäten zeigten sich keine Unterschiede.

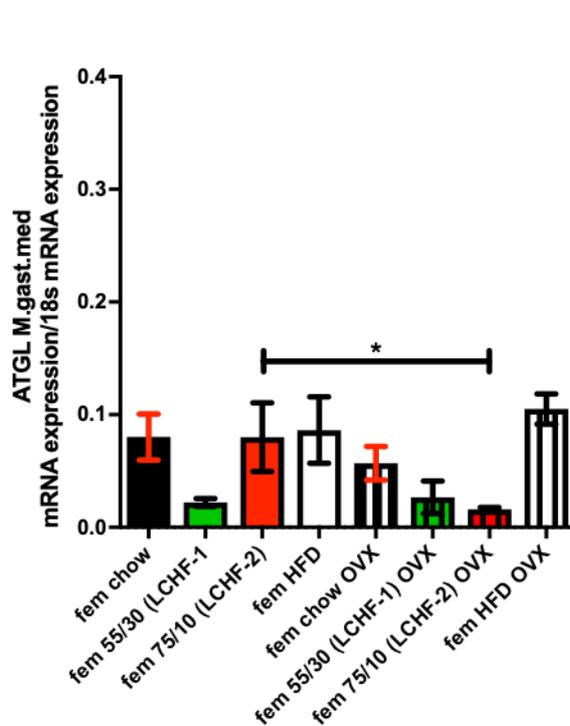


Abb 49: mRNA Expression für ATGL bei den Weibchen im Versuch GHB I/II

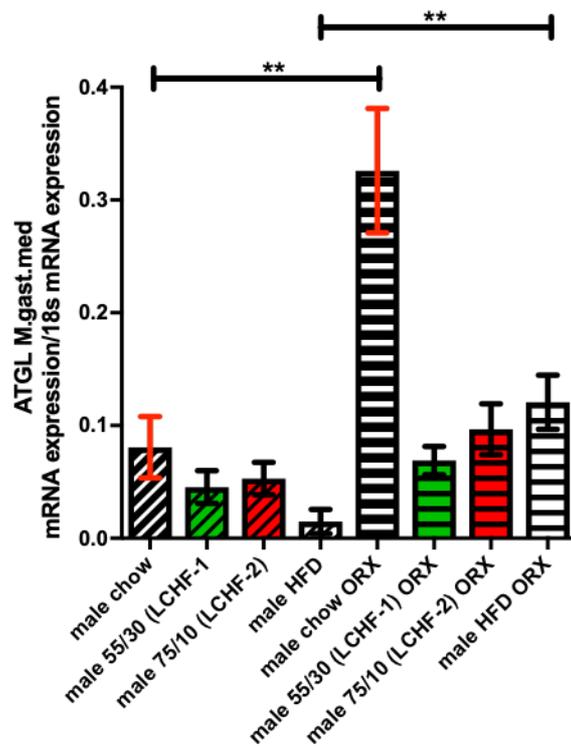


Abb 50: mRNA Expression für ATGL bei den Männchen im Versuch GHB I/II

Bei den Männchen (Abbildung 50) fällt eine nach Kastration deutlich höhere Expression in der chow- und der HFD-Gruppe auf (male chow: 0,081 +/- 0,072 vs. male chow ORX: 0,33 +/- 0,14 p=0,002 ; male HFD: 0,015 +/- 0,028 vs. male HFD ORX: 0,12 +/- 0,042 p=0,001).

## V. Diskussion

### 5.1 Kritische Vorbemerkungen zur verwendeten Methodik

Ein zentraler Punkt der Arbeit war die Untersuchung möglicher Effekte der Makronährstoffzusammensetzung der Diäten auf metabolische und endokrine Endpunkte. Nachdem unterschiedliche Makronährstoffe sich hinsichtlich der kalorischen Dichte ja stark unterscheiden, müssen solche direkten Effekte der Nährstoffzusammensetzung von rein kalorisch bedingten Effekten unterschieden werden. Eine Möglichkeit hierfür ist das auch in unserem Experimenten genutzte „Pairfeeding“, welches trotz unterschiedlicher Nährstoffzusammensetzung eine isokalorische Nahrungszufuhr für alle Diätgruppen gewährleistet. Ein damit einhergehender und unvermeidbarer Unterschied für Tiere unter Referenzdiät und Tiere unter den Experimentaldiäten ist jedoch, dass die Tiere aus der Gruppe unter Referenzdiät ihr Futter ad libitum zu Verfügung haben, während den Tieren aus den Gruppen unter Experimentaldiäten das über die Fressmenge der Referenzgruppe isokalorisch definierte Futter nur einmal am Tag gegeben wurde. Aufgrund der sehr hohen kalorischen Dichte von Fett war auch die Futtermenge in Gramm natürlich niedriger als in der Referenzgruppe, und meist fraßen die Tiere dies auch sofort auf. Die damit notwendig verbundenen Unterschiede in Fressgeschwindigkeit und Verteilung der Nahrungszufuhr über den Tag bzw. die längere Zeit ohne Nahrungsaufnahme in den Gruppen mit Hochfettdiäten könnten für sich – unabhängig von der Makronährstoffzusammensetzung – Effekte auf einige der untersuchten Parameter haben. So ist z.B. bekannt, dass Fütterung und Nahrungsaufnahme akut zu verminderten GH-Konzentrationen im Plasma führen [70]. Um diesem Einfluss entgegen zu wirken und die Messungen in den Serienblutentnahme nicht zu verfälschen, wurde allen Tieren am Abend vor der Blutentnahme das Futter entzogen. Dennoch könnte sich natürlich die GH-Sekretion bereits durch die Unterschiede in der Nahrungsaufnahme während der Fütterungsphase verändert haben. Es ist nicht auszuschließen, dass solche Veränderungen der somatotropen Achse während des Gesamtversuchs sich auch auf andere Parameter ausgewirkt haben.

Neben Ernährung spielt körperliche Betätigung eine wichtige Rolle für die Gewichtsregulation und den Kampf gegen Adipositas. Diese Variable konnte in unseren Versuchen auf Grund des Studienmodelles nicht berücksichtigt werden konnte. Größere Käfige mit Möglichkeiten zur Bewegung (z.B. Laufräder) konnten aus Platzgründen nicht in Erwägung gezogen werden. Das Zusammenlegen von mehreren Käfigen und damit die Möglichkeit sozialer Interaktion mit Bewegung war ebenfalls nicht realisierbar, da die isokalorische Ernährung eine individuelle Zurechnung der konsumierten Futtermengen erfordert. Da Effekte von Bewegung und sozialer Interaktion auf Appetit, Fressverhalten und Fressmenge beschrieben sind [71], müssen unsere Ergebnisse mit wenig aktiven Tieren sicher vorsichtig interpretiert werden. Zudem sind die Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragbar, da sich dieser allein durch seine Arbeit und seine Hobbys vermutlich deutlich kontinuierlicher und mehr bewegt als Labortiere.

Um die Expression von verschiedenen Genen darzustellen, ist die Untersuchung der mRNA mittels qPCR eine Standardmethode, welche leicht zu erlernen und verhältnismäßig günstig ist. Zudem erlaubt sie die Erfassung von sehr geringen Mengen von Nukleinsäuren. Gerade bei Versuchen an kleinen Labortieren, bei denen man auf sehr geringe Mengen an Material zurückgreifen muss, ist diese Methodik daher sehr verbreitet [72]. Auch ist die PCR eine sehr schnelle Methode. Da wir in unseren Versuchen insgesamt Proben von mehr als 100 Tieren untersucht haben, spielt auch das eine wichtige Rolle. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Quantifizierung der mRNA zwar Rückschlüsse auf Genaktivität zulässt, diese jedoch nicht identisch sein muss mit tatsächlich physiologisch relevanter Proteinexpression. Daher sind mRNA-Analysen grundsätzlich Momentaufnahmen und anfällig für kurzfristige Veränderungen. Dies erklärt sicher einige der wenig systematischen Gruppenunterschiede in der Expression auch in den vorgestellten Experimenten. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die mRNA-Analyse Mechanismen wie die posttranslationale Regulation nicht erfassen kann [73]. Es wäre sicherlich notwendig, angedeutete interessante Mechanismen in zukünftigen Versuchen mittels Techniken wie Western Blot auch auf Proteinebene darzustellen.

Nicht zuletzt sollten auch die für die Kastration notwendigen Operationen der Tiere im 2. Versuch als möglicher Einflussfaktor erwähnt werden. Derartige Operationen mit teilweise halbstündiger Anästhesie und postoperativer Gaben von Medikamenten (Analgesie, antibiotische Therapie) setzen die Tiere einem enormen Stress aus, welcher zu reduzierter Nahrungsaufnahme führen kann und so die Ergebnisse beeinflussen kann [74]. Um hier eine Standardisierung der Bedingungen zwischen erstem und zweitem Experiment (vor/nach Kastration) zu erreichen, wurde die einwöchige Rehabilitationsphase postoperativ eingehalten. Die Gewichte der Männchen nach OP waren zwar, wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben, geringer als die der gonadal intakten Männchen im ersten Versuch. Bei den Weibchen war diese Tendenz nach OP jedoch nicht zu sehen. Nachdem die Ovariectomie operationstechnisch sicherlich die belastendere Prozedur gegenüber der Orchiectomie darstellt, gehen wir davon aus, dass die bei den Männchen beobachteten Gewichtsveränderungen weniger auf die Operation als auf die hormonellen Veränderungen nach Kastration zurückzuführen sind.

## 5.2 Keine Veränderung des Körpergewichts sowie der fettfreien Masse durch erhöhten Anteil an Fetten in der Nahrung

In Versuchen von anderen Arbeitsgruppen, aber auch in Vorexperimenten aus unserer Arbeitsgruppe, wurden die LCHF-Diäten in Zusammenhang mit einem niedrigerem Gewicht bei Versuchsabschluss gebracht [75, 76]. Dort zeigte sich nach einer 4-wöchigen Fütterungsperiode bei den Tieren, die eine LCHF-Diät zu sich nahmen, ein niedrigeres Körpergewicht als bei den Tieren der Referenzgruppe. Bei ähnlichem Versuchsaufbau zeigen die Tiere unter einer LCHF-Diät in unseren Experimenten zwar tendenziell geringere Gewichte im Vergleich zu Tieren unter der Referenzdiät, die Unterschiede sind jedoch deutlich geringer als in den anderen Arbeiten und erreichen auch keine statistische Signifikanz. Somit bestehen Zweifel, ob eine isokalorisch gefütterte LCHF-Diät per se den bei Adipositas gewünschten Effekt der Gewichtsreduktion erzielen kann. Unsere dritte Experimentaldiät, die klassische HFD mit mehr Kohlehydraten, wirkte sich ebenfalls nicht deutlich auf die Gewichte bei Versuchsabschluss aus. Nachdem es sich hierbei um die klassische,

„ungesunde“ „western diet“ mit viel Fett und Kohlehydraten handelt, bestätigten unsere isokalorisch durchgeführten Experimente, dass für eine darunter vielleicht zu vermutende Gewichtszunahme eher die Kalorienmenge als die Makronährstoffzusammensetzung selbst relevant sind. Zur genaueren Untersuchung der Unterschiede der Befunde aus Experimenten verschiedener Gruppen sollte sicherlich die gesamte Körperzusammensetzung betrachtet werden. Wichtig ist auch zu beachten, dass für unsere aktuellen Versuche die Nahrung der Tiere von einem anderen Hersteller bezogen wurde als in den Vorexperimenten. Dies geschah bewusst, da der neue Hersteller über bessere Möglichkeiten der Kontrolle der genauen Quellen der Makronährstoffe vor allem beim Fett verfügte. Es ist bekannt, dass Unterschiede in der Fettquelle – z.B. der Unterschied zwischen pflanzlichen oder tierischen Fetten – die Fressmenge und somit die Gewichtsentwicklung beeinflussen kann. In der Tat wiesen die neuen Diäten bei formal gleicher Makronährstoffzusammensetzung z.B. eine deutlich andere, pastösere Konsistenz auf als die in den Vorexperimenten [23, 76-78]. Allein diese veränderte Konsistenz kann die Schmackhaftigkeit der Diät beeinflussen (in der englischsprachigen Literatur als „palatability“ bezeichnet) und als ein Grund für unterschiedliches Fressverhalten der Tiere und daher unterschiedliche Ergebnisse herangezogen werden.

Unsere aktuellen Ergebnisse sprechen jedenfalls eher dagegen, dass LCHF-Diäten für sich (ohne Reduktion der Kalorienmenge) ein geeignetes Mittel zur Gewichtsreduktion sind. Dies wurde jedoch initial bereits von Herrn Atkins, später auch in einigen publizierten Studien an Menschen behauptet. Die Mehrzahl der Publikationen berichtet aber, dass auch beim Menschen LCHF-Diäten anderen Diäten in Punkto Gewichtsreduktion nicht überlegen sind [79]

### 5.3 Muskelverlust durch fehlendes Testosteron sowie mutmaßliche Fettverwertungsstörung nach Kastration unbeeinflusst durch GH.

In unseren Versuchen zeigt sich eine drastische Abnahme von fettfreier Masse bei den männlichen kastrierten Tieren. Die Abnahme von Skelettmuskulatur nach einem Wegfall von Testosteron ist ein bekannter, auch bei Menschen beobachteter Effekt [80].

Durch unsere Experimente wird die Rolle des Testosterons für Muskelwachstum und Masse gerade in einem heranwachsenden Organismus noch einmal sehr deutlich, gerade während der Pubertät, wo es zu einem normalerweise ca. 30 fachen Anstieg der Testosteronproduktion kommt [81].

Wie in der Einleitung erwähnt spielt Muskulatur eine wichtige Rolle für den Grundumsatz. Mehr Muskulatur führt zu einem höheren Grundumsatz und unterstützt so eigentlich das Abnehmen, sofern die Kalorienzufuhr konstant bleibt. Hieraus geben sich neue Therapieansätze zur Therapie der Adipositas mit Hilfe von Testosteron. Die Substitution mit Testosteron bei Bodybuildern und Sportlern ist als illegales Dopingmittel schon länger verbreitet. Im medizinischen Setting kommt es in Studien mit adipösen erwachsenen Männern bei langfristiger Testosteronapplikation zur Reduktion von Fettmasse und einem verbesserten Management von Übergewicht [82]. In einem anderen Versuch zeigt sich ein positiver Effekt von Androgenen auf das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [83]. Doch die Therapie mit Androgenen ist nicht ungefährlich und verlangt stetiges klinisches Monitoring, vor allem im Hinblick auf die Entwicklung von Prostatakarzinomen [84].

Zusätzlich dazu zeigt sich bei uns eine klare Gewichtszunahme kastrierter Ratten unter LCHF-2-Diät im Vergleich zur chow-Diät. Diese Beobachtung konnten wir bei gonadal intakten Tieren nicht machen. 2016 untersuchten Harada et al. den Einfluss von hochfett-Diäten auf Körpergewicht und Fettmasse vor und nach Kastration und kam zu einem ähnlichen Bild. Da Harada einen Zusammenhang mit dem intestinalen Mikrobiom vermutete, ging er noch einen Schritt weiter und gab den Tieren in einem zweiten Versuch eine orale Antibiotikamischung während des Fütterungsversuchs. Nach Antibiotikagabe war kein Unterschied mehr zwischen Hoch-Fett-Diät und der Referenzdiät in Hinblick auf das Körpergewicht zu sehen. Haradas Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Hypogonadismus eine Veränderung des Mikrobioms, abhängig von den zugeführten Makronährstoffen, induziert, wodurch wiederum das Gewicht beeinflusst wird [85]. 2020 konnten die Ergebnisse bei Androgen-Rezeptor-knockout-Mäusen in der selben Arbeitsgruppe reproduziert werden [86]. Denkbar wäre, dass das veränderte Mikrobiom die hepatische Metabolisierung der Fette negativ beeinflusst und

mehr Fette als Depot gespeichert werden. Hierfür wäre in der Zukunft die Untersuchung der einzelnen Fettdepots interessant.

In unseren Molekularbiologischen Untersuchungen hinsichtlich des GH-Rezeptors an der Muskulatur zeigen sich keine systematischen Unterschiede. Weder im Bezug auf die Diäten noch im Bezug auf die Geschlechter und den gonadalen Status. Somit kommen wir zu dem Schluss, dass die oben diskutierten Veränderungen wahrscheinlich eher nicht GH abhängig sind. Kritisch muss zu diesem Zeitpunkt jedoch erneut gesagt werden, dass - wie schon zu Beginn der Diskussion erwähnt - eine PCR Diagnostik immer nur eine Momentaufnahme darstellt.

Hier wird deutlich, dass Diätempfehlungen nicht unabhängig vom Geschlecht gemacht werden sollten. Gleichzeitig sollte Rücksicht auf spezielle Patientenkollektive genommen werden (z.B. Patienten unter Therapie mit Antiandrogenen), bei denen die Diäten gegensätzliche Effekte - in diesem Fall sogar Gewichtszunahme - bewirken könnten.

#### 5.4. Gewichtszunahme und Zunahme der fettfreien Masse nach Ovariectomie durch erhöhte IGF-I Sekretion.

In unseren Versuchen zeigte sich in allen Diätgruppen ein höheres Gewicht nach Ovariectomie. Das fehlende Östrogen wirkt sich scheinbar negativ auf das Körpergewicht aus. Dieser Effekt wurde auch schon bei postmenopausalen Frauen beobachtet, welche ein höheres Risiko Übergewicht zu entwickeln und ebenso ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse haben [87]. Der genaue Mechanismus dahinter ist nicht bekannt, man geht jedoch davon aus, dass auch hier das fehlende Östrogen ursächlich ist [88]. Die Effekte des fehlenden Östrogens scheinen jedoch nicht unabhängig von der Art der Ernährung. So fanden Ludgero-Correia et al 2012 Anhaltspunkte dafür, dass eine Hochfettdiät die Effekte einer Ovariectomie auf Metabolismus und Fettstoffwechsel verschlimmert [89]. In unseren Experimenten spielte die genaue Makronährstoffzusammensetzung der Experimentaldiäten jedoch

prima vista keine Rolle, zumindest nicht für die Gewichtszunahme an sich: Alle Tiere waren nach Ovariectomie im Durchschnitt gleich schwer, jedoch alle schwerer als die Tiere ohne Ovariectomie. Ein interessanter Gesichtspunkt wäre hier noch eine mögliche, zwischen den Diätgruppen unterschiedliche Verteilung der Körperfettdepots. Dieser Aspekt wird aktuell durch ein anderes Projekt aus der Arbeitsgruppe näher beleuchtet.

Zusätzlich zu dem erhöhten Gesamtkörpergewicht konnte bei weiblichen Tieren nach Kastration unter allen Diäten eine erhöhte fett-freie Masse gemessen werden. Bei postmenopausalen Frauen wird eher das Gegenteil - ein Verlust von Skelettmuskulatur, der auch Sarkopenie genannt wird - beobachtet [90]. Ob dies jedoch durch erniedrigte Östrogenspiegel alleine verursacht wird ist stark diskutiert. Van Geel et al. berichten von dem positiven Effekt von Serum-Östrogenwerten auf die fettfreie-Masse von Frauen [91]. In einer anderen Arbeitsgruppe wiederum konnten Östrogenwerte nicht in Verbindung mit fettfreier Masse gebracht werden [92]. Der Mechanismus scheint weniger bei den Sexualhormonen direkt als in den Wachstumshormonen zu liegen. Sämtliche weibliche Tiere hatten in unseren Versuchen höhere Serum-IGF-I Werte. Gleichzeitig konnte man eine erhöhte Expression der IGF-I-mRNA verzeichnen. Vermutlich gibt es noch nicht beschriebene Kompensationsmechanismen, welche nach der Kastration aktiv werden. Unsere Daten an adoleszenten ovariectomierten Ratten sind wahrscheinlich schlecht mit denen von postmenopausalen Frauen vergleichbar, jedoch bieten sich hier weitere interessante Punkte für die weitere Forschung auf dem Gebiet der Sarkopenie.

### 5.5 Geschlechtsabhängige Suppression der GH Sekretion durch LCHF-Diäten

In unseren Versuchen zeigt sich, dass eine LCHF-Diät bei gonadal intakten Weibchen zu niedrigeren Serum-GH-Konzentrationen führt. Bei unkastrierten Männchen hingegen waren die GH-Konzentrationen unter LCHF-Diäten nicht supprimiert. Schon 1992 stellte Vance et al. die Vermutung auf, dass GH Sekretion abhängig von der Ernährung ist [93]. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass GH Spiegel tatsächlich durch fettreiche Ernährung supprimiert werden können, was auf gleichzeitig hohe gemessene Spiegel an zentralnervösem Somatostatin, einem starken Inhibitor der GH-Sekretion, zurückgeführt wird [94].

Doch nicht nur Fett, sondern auch Proteine haben einen Einfluss auf die GH-Konzentration. Dieser Effekt wird sich u.a. in der Pädiatrie zu Nutze gemacht, wo zur Diagnose eines Wachstumshormonmangels ein Arginin Stimulationstest gemacht wird. Bei unseren Weibchen zeigt sich zwischen Tieren unter LCHF-1-Diät und denen unter LCHF-2-Diät ein kleiner Unterschied in den GH-Konzentrationen. Die LCHF-2 Diät welche deutlich geringere Mengen an Proteinen enthält zeigt noch niedrigere GH Spiegel, als die LCHF-1 Diät. Hier wird nochmal deutlich, dass Proteine eine wichtige Rolle bei der GH Sekretion spielen wie beispielsweise auch Mejia-Naranjo et al. und Ammann et al. gezeigt haben [95, 96].

Es bleibt die Frage warum Weibchen und Männchen unterschiedlich von der GH Suppression durch die jeweiligen Diäten betroffen sind. Wie schon in der Einleitung erwähnt ist die GH-Sekretion per se vom Geschlecht abhängig. Bei Individuen weiblichen Geschlechts erreicht die GH Sekretion weniger hohe Amplituden als bei Männchen dafür ist die „Basis-Sekretion“ (engl. „baseline“) höher. Dies liegt an dem Sexualhormon Östrogen, welches eine hepatische GH-Resistenz induziert und Weibchen somit mehr GH benötigen um gleichviel IGF-I zu produzieren [97, 98]. Denkbar wäre, dass sich eine LCHF-Diät negativ auf die Östrogenproduktion auswirkt. Weniger zirkulierendes Östrogen würde zu einer geringeren GH-Resistenz der Leber führen und Weibchen somit weniger GH benötigen. In Folgeversuchen wäre hier interessant auch die Sexualhormone der Tiere zu bestimmen. Für diese Hypothese spricht auch, dass in unserem zweiten Versuch (bei kastrierten Tieren) keine geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich GH-Suppression mehr nachzuweisen waren.

Diese Erkenntnisse wirft weitere Kritikpunkte an LCHF-Diäten auf. Wie im Kapitel über Testosteron und in der Einleitung schon beschrieben, ist Muskelmasse ein wichtiger Punkt zur Erhöhung des Grundumsatzes und somit eine Hilfe beim Abnehmen. GH wirkt direkt auf die Aufnahme von Aminosäuren und anabol auf die Proteinbiosynthese, beides essenzielle Parameter beim Aufbau von Muskulatur [99]. Es erscheint fraglich, ob ausgerechnet eine GH-supprimierende LCHF-Diät metabolisch und kardiovaskulär vorteilhaft sein kann.

## 5.6 Geschlechtsunabhängige Suppression der IGF-I Konzentration unter LCHF-Diäten.

Doch nicht nur die GH-Konzentrationen wurden durch die Zusammensetzung der Makronährstoffe beeinflusst. Wir konnten zeigen, dass die IGF-I-Konzentrationen ebenfalls beeinflusst werden. Eine LCHF-Diät führt hier auch zu einer Suppression der Konzentration im Serum. Besonders stark sind hiervon männliche Tiere betroffen. IGF-I scheint also – anders als bei Weibchen, bei denen der Effekt offenbar sekundär über die fettinduzierte Reduktion der GH-Sekretion zustande kommt - bei Männchen unabhängig von GH durch den hohen Fett- oder den niedrigen Kohlehydrat-/Proteinanteil der LCHF-Diäten supprimiert zu werden. Ca. 75% des IGF-I wird GH abhängig von der Leber sezerniert, der Rest kann auch von anderen Geweben parakrin (z.B. in Skelettmuskulatur, in Fettgewebe, in den Nieren) gebildet werden [100]. Eine LCHF-Diät scheint die Sekretion von IGF-I in einem der anderen Organe negativ zu beeinflussen. Da männliche Individuen von Natur aus einen höheren Anteil an fettfreier Masse [101] besitzen und Männchen stärker als Weibchen von der IGF-I Suppression betroffen sind, wäre denkbar, dass LCHF-Diäten hier vor allem die Sekretion der Skelettmuskulatur beeinflussen.

Nach Kastration verschwindet der Effekt der LCHF-Diäten bei beiden Geschlechtern. Der genaue Mechanismus hierbei bleibt unklar und bietet Ansatzpunkte für zukünftige Studien.

## 5.7 Hoher Anteil von Nahrungsfetten führt zu Hypertriglyceridämie

Auch wenn TAG nicht so kritisch wie LDL oder das Gesamtcholesterin betrachtet werden, so sind Triglyzeride trotzdem an der Entstehung von Arteriosklerose beteiligt [36]. Wir können klar zeigen, dass eine LCHF-Diät bei männlichen Tieren zu deutlich erhöhten Triglyzeriden im Blut führt. Der Effekt war nicht nur bei beiden LCHF-Diäten

sichtbar, sondern auch bei der klassischen Hochfett-Diät. Unsere Experimentaldiäten weisen alle einen Fettgehalt von mindestens 60% auf. Die Referenzdiät lediglich ca. 17%. Um genau zu sagen, ab welchem Anteil von Fetten in der Nahrung der Effekt auftritt, müsste man den Versuch um weitere Diäten mit enger abgestufter Fettmenge erweitern

Kim et al. untersuchten 2008 die Auswirkung von Diäten mit einem niedrigen Anteil von Kohlehydraten an erwachsenen Ratten und zeigte eine Abnahme von Triglyzeriden im Serum. Der große Unterschied bestand dort jedoch bei der Fütterung. Die Tiere wurden hauptsächlich mit Pferde- und Rindfleisch gefüttert, erhielten also eine große Menge an Proteinen. Dies bestärkt unsere Annahme, dass die TAG stark abhängig sind von der Menge der zugeführten Fette und nicht von den Kohlehydraten [102]. Anscheinend wirkt sich ein hoher Anteil an Proteinen protektiv gegen eine TAG-Erhöhung im Serum aus. Dieser Effekt wurde bei übergewichtigen Männern, die eine proteinreiche Diät zu sich nahmen, ebenfalls beobachtet. Hier zeigt sich eine Abnahme der TAG im Serum nach 12-wöchiger proteinreicher Diät [103].

Interessanterweise nehmen die Serum TAG-Konzentrationen in den hier beschriebenen Experimenten bei den kastrierten Männchen extrem ab und nähern sich dadurch denen der Weibchen an. Der sexuelle Dimorphismus verschwindet also. Wie oben schon erwähnt, wirkt sich Testosteron – zumindest nach einigen Studien am Menschen – eigentlich positiv auf kardiovaskuläre Risikoprofile. Dies wurde jedoch an Menschen gezeigt und nicht an Ratten [104, 105]. Bei männlichen Ratten vom Typ Wistar hingegen führte die Kastration in einem Versuch von Cinci G et al im Jahr 2000 zu einem gleichen Ergebnis wie bei uns - einer deutlichen Abnahme der TAG-Konzentration nach Kastration [106].

Es ist beim Menschen bekannt, dass die Menopause mit steigendem kardiovaskulären Risiko und mit erhöhten Serumkonzentrationen von TAG einhergeht [107]. In unseren Experimenten an Ratten zeigte sich jedoch ein anderes Bild. Die Serumkonzentrationen von TAG nahmen bei weiblichen Tieren ohne Östrogene wie schon bei den Männchen ohne Testosteron ab. Unsere Tiere kamen jedoch nicht aus Altersgründen spontan in die Menopause, sondern wurden in einem sehr jungen Alter ovariectomiert. Befunde bei

ovarektomierten jungen Frauen sind wenig publiziert. Jedoch konnte Jenicek et al. zeigen, dass die Serumlipide bei ovarektomierten jungen Frauen unverändert bleiben [108].

#### 5.8 Keine Veränderung der Expression von CPT1B und ATGL durch Diäten oder den gonadalen Status.

Um das alles besser zu verstehen wurden Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels in der Muskulatur untersucht. Es bestand die Hypothese, dass die beiden Enzyme erklären könnten wieso die TAG in der Muskulatur geschlechts- und diätabhängig sind. Die Ergebnisse lassen dazu jedoch keine klare Aussage zu. Wie in der Einleitung erwähnt propagierte Sir Philip Randle, dass ein Überfluss an Fetten den Fettstoffwechsel der Skelettmuskulatur positiv beeinflusse und den Glukosestoffwechsel unterdrücke. Anscheinend sind hier jedoch andere Mechanismen ursächlich und weniger die Aktivität der beiden Enzyme CPT1B und ATGL. Hier bieten sich Ansatzpunkte für Folgearbeiten, die auf unseren Ergebnissen aufbauen.

## V. Zusammenfassung

Die Zunahme der Prävalenz von Adipositas wird in westlichen Industrienationen immer mehr zum Problem. Die Rolle von Diäten wird in Zeiten der Lebensstiloptimierung immer größer. Insbesondere LCHF-Diäten geraten mit ihrer kontrovers diskutierten, radikalen Versprechung, durch viel Fett in der Ernährung abzunehmen, immer mehr in den Fokus. Doch stellt sich die gewünschte Gewichtsabnahme wirklich unabhängig von der Kalorienzufuhr, rein wegen der veränderten Makronährstoffzusammensetzung ein? Welche Auswirkungen haben diese Diäten überhaupt auf den Fettstoffwechsel, insbesondere auch in der Muskulatur? Wie verändert sich die metabolisch wichtige somatotrope Achse unter diesen Diäten? Und wie beeinflusst das Geschlecht bzw. die Sexualhormonkonzentration mögliche Effekte der Diäten?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden für die vorliegende Arbeit 80 männliche sowie 80 weibliche Ratten über 4 Wochen isokalorisch mit verschiedenen, hinsichtlich der Makronährstoffzusammensetzung klar definierten Diäten gefüttert. Verglichen wurden Befunde an Tieren unter einer Referenzdiät mit im Nagermodell „normalem“ Anteil an Fett, Kohlehydraten und Proteinen mit denen an Tieren, die eine von 2 LCHF-Diäten mit extrem niedrigem Kohlehydrat-, aber unterschiedlich hohem Fett- und Proteinanteil oder eine klassische Hochfettdiät mit höherem Anteil an Kohlehydraten erhalten hatten. Die Experimente wurden zunächst als reiner Fütterungsversuch mit 40 Männchen und 40 Weibchen, die allesamt gonadal intakt waren, durchgeführt. Anschließend wurde das identische Fütterungsexperiment mit kastrierten Tieren wiederholt, um die spezifische Rolle der Sexualhormone zu verstehen. Vor, während und nach der 4-wöchigen Fütterungsperiode wurde das Körpergewicht bestimmt, nach Versuchsabschluss verschiedene Organe sowie Blutproben entnommen. Im Serum wurde IGF-I, GH sowie TAG bestimmt. Aus der Muskulatur wurden TAG und RNA isoliert. Der muskuläre TAG-Gehalt wurde mittels spektrometrischem Assay quantifiziert. Die muskuläre RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Expression von verschiedenen Genen des Fettstoffwechsels mittels qPCR quantifiziert.

Es zeigten sich bei strikt isokalorischer Fütterung keine unterschiedlichen Auswirkung der untersuchten Diäten auf die Zunahme des Körpergewichts, weder bei gonadal intakten noch bei kastrierten Tieren. Die Kastration führte bei den Männchen – unabhängig von der gefütterten Diät - zu einer Abnahme von fettfreier Masse, bei den

Weibchen kam es nach Gonadektomie zu einer Zunahme des Körpergewichts und der fettfreien-Masse. Die Zunahme der fettfreien Masse nach Kastration kann durch eine Hochregulation der IGF-I Sekretion erklärt werden. Bei den Weibchen wurde die GH-Sekretion durch einen höheren Fettanteil – und besonders in Kombination mit niedrigen Kohlehydraten - supprimiert. Dieser Effekt war bei den Männchen nicht zu sehen. IGF-I wurde in beiden Geschlechtern durch LCHF-Diäten supprimiert. Bei kastrierten Tieren verschwand der sexuelle Dimorphismus hinsichtlich der somatotropen Achse, es zeigten sich keine Unterschiede mehr bei der GH- und IGF-I-Sekretion.

Die Triglyceride im Blut steigen bei Männchen unter allen Experimentaldiäten stark an. Bei den Weibchen ist dies nicht zu sehen. Nach Kastration fällt der Effekt der Diäten bei den Männchen weg. Insgesamt nähern sich nach Kastration die Werte beider Geschlechter stark aneinander an.

In der Muskulatur, einem für den Energieverbrauch ja zentralen, durch anabole Hormone stark beeinflussten Organ, zeigten sich uneinheitliche Veränderungen in der Expression von für den Fettstoffwechsel wichtigen Enzymen. Diese ließen leider kein einfaches, schlüssiges Muster hinsichtlich der Variablen Diät und Veränderungen der somatotropen Achse erkennen. Auch der Effekt der Kastration war bei diesen Enzymen nicht eindeutig zu erkennen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Auswirkungen von Diäten mit unterschiedlichem Fett-, Protein- und Kohlehydratanteil auf die reine Gewichtsentwicklung im Wesentlichen durch die Kalorienmenge und weniger durch die Makronährstoffzusammensetzung bedingt sind. Dies gilt für beide Geschlechter und auch unabhängig vom gonadalen Status. Zugleich jedoch konnten klare Unterschiede hinsichtlich der Auswirkungen der Diäten auf Parameter des Fettstoffwechsels und der GH-IGF-I-Achse zwischen den Geschlechtern gezeigt werden. LCHF-Diäten, welche oft als Mittel zum Abnehmen propagiert werden, gehen bei beiden Geschlechtern - insbesondere jedoch bei weiblichen Tieren - mit einer starken Suppression der somatotropen Achse einher. Dieser Effekt ist stärker als bei einer klassischen Hochfettdiät und geht durch Kastration nahezu komplett verloren. Auch wenn unsere Daten im Rattenmodell erhoben und nur bedingt auf die Situation beim Menschen übertragbar sind, scheint bei der Empfehlung von LCHF-Diäten insbesondere bei Patienten mit besonderen Hormonstatus (z.B bei Zustand nach Ovariectomie oder

postmenopausal oder unter Therapie mit Antiandrogenen) Vorsicht geboten. Unsere Befunde illustrieren, dass ein großer Unterschied zwischen den Effekten von Diäten bei den Geschlechtern bestehen kann. Ziel zukünftiger Studien zur Bekämpfung der Adipositas muss daher sein, geschlechtsspezifische Aspekte zu berücksichtigen und entsprechend individualisierte Diättempfehlungen unter Berücksichtigung des Sexualhormonstatus zu entwickeln.

## VII. Material & Herstellerverzeichnis

Tierversuche:

Polykarbonat-Käfige: Makrolon® Typ 3 (Bayer, Leverkusen, Deutschland)

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

Inhalationsnarkotikum: Isofluran (CP Pharma, Burgdorf, Deutschland)

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

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

Faden resorbierbar: Vicryl 5-0 (Ethicon, Somerville, USA)

Faden nicht resorbierbar: Prolene 5-0, (Ethicon, Somerville, USA)

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

Eingabekanüle mit Knopf (Eickemeyer, Tuttlingen, Deutschland)

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

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

Labor:

Destiliertes Wasser: sterile filtere Bio Reagens W3500 (Merck, Darmstadt, Deutschland) & Aqua dest. for molecular use only, (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)

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

Ethidiumbromid: (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

TEP (Technischer Puffer): (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Pipettenspitze Combitips ® Plus 10 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Pipettenspitze 200 µl mit Filter Biosphere ® Filter Tip (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Pipettenspitzen 20µl epT.I.P.S. Standard/Bulk 0,5-20µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Pipettenspitzen 200µl gelb (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Pipettenspitzen 1000µl blau (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)

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

Fluoreszierstoff: EvaGreen® Supermix (BioRad, Hercules, USA)

PCR-Platten: 96b Multiply® PCR Platte natur (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)

Chloroform: (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

70% Ethanol: (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

QIAGEN Sample of Assay Technologies - RNaeasy Lipid Tissue Mini Kit

Assays:

GH-Assay: ERZMGH-45BK (Merck/Millipore, Burlington, USA)

IGF-I Assay: Rat IGF-I ELISA Kit Nr: ERIGF1

TAG: Triglycerides Reagents Infinity Triglycerides Liquid

Verwendete Geräte:

Heizblock: Thermoblock (Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland)

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

Tissue Lyser: Tissue LyserLT (Quiagen, Hilden, Deutschland)

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

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

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

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

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

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

Waage: Competence CP2201 (Göttingen, Sartorius, Deutschland)

Verwendete Software:

Pages macOS Version 10.2 (Apple Inc. , Cupertino, USA)

Microsoft Excel Version 2018/2019 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

Graph Pad Prism Version 7 & 8 (Graph Pad Software Inc. , San Diego, USA)

MxPro – Mx3000p Version 4.01 (Stratagene, La Jolla, USA)

Nanodrop 1000 Version 3.6.0 (Thermo Scientific, La Jolla, USA)



## VII. Referenzen

1. WorldHealthOrganisation. *Obesity and Overweight*. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. Saxena, I. and M. Kumar, Obesity discrimination in healthcare. *Eur J Intern Med*, 2017. **46**: p. e29-e30.
3. Caballero, B., The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev*, 2007. **29**: p. 1-5.
4. Gardner G, H.B., Underfed and overfed: the global epidemic of malnutrition, (Worldwatch paper no. 150). 2000: Washington DC, Worldwatch Institute.
5. Ogden, C.L., et al., Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA*, 2014. **311**(8): p. 806-14.
6. Biener, A., J. Cawley, and C. Meyerhoefer, The High and Rising Costs of Obesity to the US Health Care System. *J Gen Intern Med*, 2017. **32**(Suppl 1): p. 6-8.
7. Bleich, S., et al., Why is the developed world obese? *Annu Rev Public Health*, 2008. **29**: p. 273-95.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Rapoport, B.I., Metabolic factors limiting performance in marathon runners. *PLoS Comput Biol*, 2010. **6**(10): p. e1000960.
13. Westerterp, K.R., Diet induced thermogenesis. *Nutr Metab (Lond)*, 2004. **1**(1): p. 5.
14. Westerterp-Plantenga, M.S., The significance of protein in food intake and body weight regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003. **6**(6): p. 635-8.
15. Last, A.R. and S.A. Wilson, *Low-carbohydrate diets*. *Am Fam Physician*, 2006. **73**(11): p. 1942-8.
16. 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.
17. Schwartz, M.W., et al., Obesity Pathogenesis: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev*, 2017. **38**(4): p. 267-296.
18. Tinsley, G.M. and D.S. Willoughby, Fat-Free Mass Changes During Ketogenic Diets and the Potential Role of Resistance Training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2016. **26**(1): p. 78-92.
19. Mansoor, N., et al., Effects of low-carbohydrate diets v. low-fat diets on body weight and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr*, 2016. **115**(3): p. 466-79.
20. Bazzano, L.A., et al., Effects of low-carbohydrate and low-fat diets: a randomized trial. *Ann Intern Med*, 2014. **161**(5): p. 309-18.
21. Tay, J., et al., Comparison of low- and high-carbohydrate diets for type 2 diabetes management: a randomized trial. *Am J Clin Nutr*, 2015. **102**(4): p. 780-90.
22. Carbohydrates and Health, Scientific Advisory Council on Nutrition, P.H. England, Editor. 2015.
23. 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.
24. Schoeler, N.E., et al., Ketogenic dietary therapies for adults with epilepsy: feasibility and classification of response. *Epilepsy Behav*, 2014. **37**: p. 77-81.
25. Pelley, J., Elsevier's Integrated Review Biochemistry. 2011: Elsevier/Mosby.

26. Voet D, V.J., Pratt CW, Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level (Fourth ed.). 2013: John Wiley & Sons Inc.
27. Hussain, M.M., A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*, 2000. **148**(1): p. 1-15.
28. Jo, Y., et al., Regulation of Lipid Metabolism and Beyond. *Int J Endocrinol*, 2016. **2016**: p. 5415767.
29. Feingold, K.R. and C. Grunfeld, *Introduction to Lipids and Lipoproteins*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
30. Lehninger AL, N.D., Cox MM, Lehninger Principles of Biochemistry (3rd ed.). 2000: Worth Publishers.
31. Jeremy M. Berg, J.L.T., Gregory J. Gatto Jr, Lubert Stryer, *Biochemistry 7th Edition*. 2011, New York: W.H. Freeman & Company, Kate Ahr Parker.
32. Brown, N.F., et al., Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes. *Biochem J*, 1997. **327 ( Pt 1)**: p. 225-31.
33. Lavrentyev, E.N., S.G. Matta, and G.A. Cook, Expression of three carnitine palmitoyltransferase-I isoforms in 10 regions of the rat brain during feeding, fasting, and diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **315**(1): p. 174-8.
34. Sitnick, M.T., et al., Skeletal muscle triacylglycerol hydrolysis does not influence metabolic complications of obesity. *Diabetes*, 2013. **62**(10): p. 3350-61.
35. Schreiber, R., H. Xie, and M. Schweiger, Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018.
36. Nordestgaard, B.G. and A. Varbo, Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet*, 2014. **384**(9943): p. 626-635.
37. Berglund, L., et al., Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(9): p. 2969-89.
38. Zurlo, F., et al., Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J Clin Invest*, 1990. **86**(5): p. 1423-7.
39. Egan, B. and J.R. Zierath, Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*, 2013. **17**(2): p. 162-84.
40. Wasserman, D.H., *Four grams of glucose*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **296**(1): p. E11-21.
41. Withers, R.T., et al., Muscle metabolism during 30, 60 and 90 s of maximal cycling on an air-braked ergometer. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1991. **63**(5): p. 354-62.
42. Hargreaves, M., Skeletal muscle metabolism during exercise in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000. **27**(3): p. 225-8.
43. Jeukendrup, A.E., Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **967**: p. 217-35.
44. Sugden, M.C., In appreciation of Sir Philip Randle: the glucose-fatty acid cycle. *Br J Nutr*, 2007. **97**(5): p. 809-13.
45. Randle, P.J., et al., The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
46. Kawabe, T. and C.R. Morgan, Multiple effects of growth hormone on insulin release from isolated pancreatic islets. *Metabolism*, 1983. **32**(7): p. 728-31.
47. Waters, M.J. and A.J. Brooks, JAK2 activation by growth hormone and other cytokines. *Biochem J*, 2015. **466**(1): p. 1-11.
48. Dekhoda, F., et al., The Growth Hormone Receptor: Mechanism of Receptor Activation, Cell Signaling, and Physiological Aspects. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 35.
49. Brooks, A.J. and M.J. Waters, The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol*, 2010. **6**(9): p. 515-25.
50. Hawsawi, Y., et al., Insulin-like growth factor - oestradiol crosstalk and mammary gland tumourigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1836**(2): p. 345-53.

51. Jan Behrends, J.B., Rainer Deutzmann, *Duale Reihe Physiologie, 3. Auflage*. 2016: Thieme.
52. Warshamana-Greene, G.S., et al., The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(4): p. 1563-71.
53. Raben, M.S., Growth hormone. 1. Physiologic aspects. *N Engl J Med*, 1962. **266**: p. 31-5.
54. Raben, M.S. and C.H. Hollenberg, Effect of growth hormone on plasma fatty acids. *J Clin Invest*, 1959. **38**(3): p. 484-8.
55. Roth, J., et al., Hypoglycemia: a potent stimulus to secretion of growth hormone. *Science*, 1963. **140**(3570): p. 987-8.
56. 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.
57. Rommel, C., et al., Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(11): p. 1009-13.
58. Yoshida, T. and P. Delafontaine, Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells*, 2020. **9**(9).
59. Schakman, O., et al., Role of Akt/GSK-3beta/beta-catenin transduction pathway in the muscle anti-atrophy action of insulin-like growth factor-I in glucocorticoid-treated rats. *Endocrinology*, 2008. **149**(8): p. 3900-8.
60. Rudolf, A., et al., beta-Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair. *Cell Rep*, 2016. **15**(6): p. 1277-90.
61. 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.
62. 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.
63. Brennan, M.P., et al., Correlation between body weight changes and postoperative pain in rats treated with meloxicam or buprenorphine. *Lab Anim (NY)*, 2009. **38**(3): p. 87-93.
64. 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.
65. Haines, A.M., et al., Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 2015. **36**(6): p. 941-4.
66. Pleil, J.D., Imputing defensible values for left-censored 'below level of quantitation' (LoQ) biomarker measurements. *J Breath Res*, 2016. **10**(4): p. 045001.
67. J. Niethammer, F.K., *Handbuch der Säugetiere Europas. Band 1: Rodentia*. 1978: I. Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden.
68. Takahashi, Y., D.M. Kipnis, and W.H. Daughaday, *Growth hormone secretion during sleep*. *J Clin Invest*, 1968. **47**(9): p. 2079-90.
69. Xu, J., et al., Exploring endocrine GH pattern in mice using rank plot analysis and random blood samples. *J Endocrinol*, 2011. **208**(2): p. 119-29.
70. Nishihara, K., et al., Post-prandial decrease in plasma growth hormone levels is not related to the increase in plasma insulin levels in goats. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2017. **30**(12): p. 1696-1701.
71. Cavalcanti-de-Albuquerque, J.P., et al., Intense physical exercise potentiates glucose inhibitory effect over food intake of male Wistar rats. *Exp Physiol*, 2018. **103**(8): p. 1076-1086.
72. Klein, D., Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med*, 2002. **8**(6): p. 257-60.
73. Valasek, M.A. and J.J. Repa, *The power of real-time PCR*. *Adv Physiol Educ*, 2005. **29**(3): p. 151-9.
74. Varma, M., et al., Effect of operative stress on food intake and feeding pattern in female rats. *Nutrition*, 1999. **15**(5): p. 365-72.

75. Jornayvaz, F.R., et al., A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **299**(5): p. E808-15.
76. 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.
77. Betz, M.J., et al., Isoenergetic feeding of low carbohydrate-high fat diets does not increase brown adipose tissue thermogenic capacity in rats. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e38997.
78. Frommelt, L., et al., Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats. *Nutrition*, 2014. **30**(7-8): p. 869-75.
79. Brouns, F., Overweight and diabetes prevention: is a low-carbohydrate-high-fat diet recommendable? *Eur J Nutr*, 2018. **57**(4): p. 1301-1312.
80. Kelly, D.M. and T.H. Jones, *Testosterone and obesity*. *Obes Rev*, 2015. **16**(7): p. 581-606.
81. Nottelmann, E.D., et al., Developmental processes in early adolescence: relationships between adolescent adjustment problems and chronologic age, pubertal stage, and puberty-related serum hormone levels. *J Pediatr*, 1987. **110**(3): p. 473-80.
82. Traish, A.M., Testosterone and weight loss: the evidence. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2014. **21**(5): p. 313-22.
83. Chasland, L.C., et al., Higher circulating androgens and higher physical activity levels are associated with less central adiposity and lower risk of cardiovascular death in older men. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2019. **90**(2): p. 375-383.
84. Gaylis, F.D., et al., Prostate cancer in men using testosterone supplementation. *J Urol*, 2005. **174**(2): p. 534-8; discussion 538.
85. Harada, N., et al., Castration influences intestinal microflora and induces abdominal obesity in high-fat diet-fed mice. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 23001.
86. Harada, N., et al., Relationship between gut environment, feces-to-food ratio, and androgen deficiency-induced metabolic disorders. *Gut Microbes*, 2020. **12**(1): p. 1817719.
87. Della Torre, S., et al., Energy metabolism and fertility: a balance preserved for female health. *Nat Rev Endocrinol*, 2014. **10**(1): p. 13-23.
88. Clegg, D.J., Minireview: the year in review of estrogen regulation of metabolism. *Mol Endocrinol*, 2012. **26**(12): p. 1957-60.
89. 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.
90. Messier, V., et al., Menopause and sarcopenia: A potential role for sex hormones. *Maturitas*, 2011. **68**(4): p. 331-6.
91. van Geel, T.A., et al., Measures of bioavailable serum testosterone and estradiol and their relationships with muscle mass, muscle strength and bone mineral density in postmenopausal women: a cross-sectional study. *Eur J Endocrinol*, 2009. **160**(4): p. 681-7.
92. Baumgartner, R.N., et al., Predictors of skeletal muscle mass in elderly men and women. *Mech Ageing Dev*, 1999. **107**(2): p. 123-36.
93. Vance, M.L., M.L. Hartman, and M.O. Thorner, *Growth hormone and nutrition*. *Horm Res*, 1992. **38 Suppl 1**: p. 85-8.
94. 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.
95. Mejia-Naranjo, W., et al., Regulation of the splenic somatotrophic axis by dietary protein and insulin-like growth factor-I in the rat. *Growth Horm IGF Res*, 2003. **13**(5): p. 254-63.
96. 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.
97. Jansson, J.O., S. Eden, and O. Isaksson, Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr Rev*, 1985. **6**(2): p. 128-50.

98. Ho, K.Y., et al., Sex-related differences in GH secretion in rat using reverse hemolytic plaque assay. *Am J Physiol*, 1986. **250**(6 Pt 1): p. E650-4.
99. Sheridan, M.A., *Hormonal control of reproduction and growth: endocrinology of fish growth*. in: Farrell, A.P. (Ed.), *Encyclopedia of fish physiology: from genome to 1241 environment Vol 2*. Academic Press, San Diego, 2011. **Vol 2**: p. pp. 1483-1489.
100. Gunawardane, K., et al., *Normal Physiology of Growth Hormone in Adults*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
101. Abe, T., C.F. Kearns, and T. Fukunaga, Sex differences in whole body skeletal muscle mass measured by magnetic resonance imaging and its distribution in young Japanese adults. *Br J Sports Med*, 2003. **37**(5): p. 436-40.
102. Kim, J.Y., et al., Effects of very-low-carbohydrate (horsemeat- or beef-based) diets and restricted feeding on weight gain, feed and energy efficiency, as well as serum levels of cholesterol, triacylglycerol, glucose, insulin and ketone bodies in adult rats. *Ann Nutr Metab*, 2008. **53**(3-4): p. 260-7.
103. Clifton, P.M., K. Bastiaans, and J.B. Keogh, High protein diets decrease total and abdominal fat and improve CVD risk profile in overweight and obese men and women with elevated triacylglycerol. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009. **19**(8): p. 548-54.
104. Fernandez-Miro, M., J.J. Chillaron, and J. Pedro-Botet, [Testosterone deficiency, metabolic syndrome and diabetes mellitus]. *Med Clin (Barc)*, 2016. **146**(2): p. 69-73.
105. Mohler, E.R., 3rd, et al., The Effect of Testosterone on Cardiovascular Biomarkers in the Testosterone Trials. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018. **103**(2): p. 681-688.
106. Cinci, G., et al., Fatty acid composition of phospholipids, triglycerides and cholesterol in serum of castrated and estradiol treated rats. *Life Sci*, 2000. **66**(17): p. 1647-54.
107. Maynar, M., et al., Menopause-induced changes in lipid fractions and total fatty acids in plasma. *Endocr Res*, 2001. **27**(3): p. 357-65.
108. Jenicek, J., M. Bendova, and A. Dohnalova, [Changes in lipid profiles in women after surgical castration during the fertile age]. *Ceska Gynekol*, 2001. **66**(4): p. 236-9.

## **VIII. Danksagung**

Zuallererst bedanke ich mich bei Herrn Professor Martin Reincke für die Überlassung des Themas.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Doktor Bidlingmaier für die herzliche und professionelle Betreuung auch in Zeiten von Personalwechsel in der Arbeitsgruppe sowie für die Bereitstellung der Räumlichkeiten in seinem Labor.

Einen besonderes Dankeschön geht an Frau Juliane Ramisch und Herrn Amon Horngacher, welche mich zu jeder Tag und Nachtzeit im Versuchstierlabor unterstützt und mich in die Assays eingearbeitet haben.

Danke auch an Katharina Schilbach und Michael Haenelt für die netten Gespräche im Büro, die Hilfe bei der statistischen Auswertung sowie die wohltuenden Kaffeepausen.

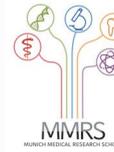
Zuletzt gilt mein Dank meinen Mitdoktoranden Sophia Diesch und Larissa Kavermann, und natürlich auch allen nicht einzeln genannten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die schöne Zeit im Labor. Besonders hervorzuheben ist dabei Frau Sophia Diesch welche mich bei jeder Schaffenskrise geschafft hat erneut zu motivieren.

# Eidesstattliche Versicherung

**LMU**

LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



Beil, Korbinian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

## Geschlechtsspezifische Auswirkungen von „low-carbohydrate-high-fat“ Diäten – Skelettmuskulatur, Triacylglyceridmetabolismus und Veränderungen der somatotropen Achse

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 09.05.2022

Ort, Datum

Korbinian Beil

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand