

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV Campus Innenstadt

Klinik Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Unterschiedliche Effekte von „low-carbohydrate-high-fat“-Diäten bei männlichen und weiblichen Ratten: Veränderungen von Gewicht, Körperzusammensetzung, somatotroper Achse und Leberstoffwechsel

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Larissa Marie
Kavermann
aus Düsseldorf

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Esther M. Maier
apl. Prof. Dr. Uli C. Brödl

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Martin Bidlingmaier
Dr. med. vet. Kirstin Andersen

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2022

Für meinen Opa, der in mir die Frage nach dem „Warum?“ und „Wie?“ erweckte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Adipositas und metabolisches Syndrom	1
1.2	Low-carbohydrate high-fat Diäten	2
1.3	Growth hormone-Insulin-like Growth Factor-I Achse.....	3
1.3.1	Growth hormone (GH) und Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)	3
1.3.2	Regulierung	4
1.3.3	GH-IGF-I Achse in Ratten.....	6
1.4	Leber als zentrales Stoffwechselorgan.....	7
1.4.1	Nicht alkoholische Fettleber Erkrankung	7
1.4.2	Zu untersuchende Parameter bei NAFLD.....	9
1.5	Notwendigkeit der geschlechtsspezifischen Forschung.....	9
1.6	Einordnung der vorgelegten Dissertation in Zusammenhang weiterer Versuchsreihen der Arbeitsgruppe.....	10
2	Arbeitshypothese	12
2.1	Studiendesign	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Versuchstiere.....	13
3.1.1	Futter und Fütterung.....	14
3.1.2	Lebendgewichtbestimmung.....	16
3.1.3	Probengewinnung und Aufbereitung.....	16
3.2	GH und IGF-I ELISA Assays.....	17
3.3	Molekularbiologische Methoden	17
3.3.1	mRNA Isolation.....	17
3.3.2	Spektralphotometrische Bestimmung der RNA Konzentration	18
3.3.3	Gelelektrophorese.....	18
3.3.4	RNA Umschreibung in cDNA.....	19

3.3.5	Design eines Primers	19
3.3.6	Quantitative real time Polymerasekettenreaktion	20
3.3.7	Statistische Auswertung der mRNA Quantität mit Prism 5	21
3.4	Histologie.....	22
3.4.1	Red Oil Färbung	22
3.4.2	Auswertung.....	23
4	Ergebnisse.....	24
4.1	Kennzeichnung der Signifikanz	24
4.2	Phänotyp.....	24
4.2.1	Längenwachstum.....	24
4.2.2	Körpergewicht	26
4.3	Gewicht der Fettdepots.....	28
4.4	GH-IGF-I-Achse	30
4.4.1	GH Serumparameter.....	30
4.4.2	GHRH-Rezeptorexpression in der Hypophyse.....	34
4.4.3	GH-Rezeptorexpression in der Leber.....	35
4.4.4	IGF-I Serumparameter	36
4.5	Untersuchung der Leber hinsichtlich einer möglichen nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung.....	38
4.5.1	Serumchemie.....	38
4.5.2	Lebergewicht	42
4.5.3	Leberhistologie	45
5	Diskussion	48
5.1	Bedingungen.....	48
5.1.1	Tierversuch im Rattenmodell	48
5.1.2	Versuchsumfang	50
5.2	Kritische Betrachtung ausgewählter Methoden	50
5.2.1	Makronährstoffzusammensetzung	50

5.2.2	Molekulargenetische Methoden.....	51
5.3	Betrachtung des Phänotyps im Hinblick auf ausgewählte Aspekte	52
5.3.1	Körpergewicht	52
5.3.2	Längenwachstum	54
5.4	Diskussion der GH-IGF-I-Achse.....	55
5.5	Betrachtung der Leber im Hinblick auf eine mögliche NAFLD	58
6	Zusammenfassung.....	63
7	Danksagung	68
8	Literaturverzeichnis.....	69
9	Abbildungsverzeichnis	76
10	Tabellenverzeichnis	77
11	Anhang.....	78
11.1	Abkürzungsverzeichnis.....	78
11.2	Geräte, Kits und Materialien	79
12	Affidavit	82

1 Einleitung

1.1 Adipositas und metabolisches Syndrom

Adipositas ist ein als Erkrankung anerkannter Zustand von deutlich erhöhtem Körperfettanteil und liegt beim Menschen, laut World Health Organization (WHO), ab einem Body Mass Index (BMI) von 30 kg/m^2 vor (1). Sie ist besonders in Industrieländern weit verbreitet, betrifft jedoch auch zunehmend die Bevölkerungen weniger entwickelter und wohlhabender Länder. Die Entstehung beruht in den meisten Fällen auf hyperkalorischer Ernährung und Bewegungsmangel. Adipositas gilt bekanntermaßen als Risikofaktor für eine Vielzahl von Erkrankungen, dazu zählen Stoffwechsel- und Herz-Kreislaufkrankheiten, sowie muskuloskeletale Erkrankungen und ein erhöhtes Malignom-Risiko (1). Als besonders risikoreich gilt ein hoher Stammfettanteil, sowie eine Verfettung von inneren Organen (2). Zu den schädlichen gesundheitlichen Folgen der Adipositas gehört die zunehmende Insulinresistenz, die wiederum zu einem Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) führen kann. Zusammen mit weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren kann es zu einem sog. metabolischen Syndrom kommen.

Das metabolische Syndrom ist ein Symptomkomplex, der aus den relevanten kardiovaskulären Risikofaktoren besteht. Zu den Kriterien der International Diabetes Federation (IDF) für ein metabolisches Syndrom zählen: das Vorliegen einer bauchbetonten Fettleibigkeit, DMT2, erhöhte Triacylglyceriden (TAGs), erniedrigtes HDL-Cholesterin und erhöhter arterieller Blutdruck (3). Neben den o.g. Kriterien der IDF existieren andere Definitionen von weiteren Organisationen, das metabolische Syndrom ist bisher noch nicht einheitlich definiert.

Da sowohl die Adipositas als auch das metabolische Syndrom in den meisten Fällen mit Überernährung und unzureichender körperlicher Betätigung zusammenhängen, sind eine Anpassung des Lebensstils, mit einer Ernährungsumstellung und Sport, Therapieansätze. Zusätzlich gibt es die Option medikamentös oder sogar mittels bariatrischer Chirurgie zu intervenieren (4). Es besteht ein großes medizinisches und wirtschaftliches Interesse sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz der Adipositas und folglich auch des metabolischen Syndroms zu senken, um gleichermaßen die Gesundheit der Bevölkerung zu verbessern als auch Kosten, die durch die Folgen der Erkrankung entstehen, zu senken (5). Dementsprechend

viel wird in diesem Bereich geforscht. Ein großer Teil der Forschung beschäftigt sich mit der idealen Diät zur Gewichtsreduktion. In den letzten Jahren haben sich die sog. Low-carbohydrate-high-fat (LCHF) Diäten nach Atkins, insbesondere in den USA, als Methode zur Gewichtsreduktion etabliert (6), sie werden jedoch zunehmend kritisch betrachtet.

1.2 Low-carbohydrate high-fat Diäten

Die Idee, Gewicht durch einen deutlich verringerten Kohlenhydratanteil in der Nahrung zu verlieren, entstand in den 1970er Jahren. Ihr Begründer war Robert Atkins. Bei dieser Art von Diät wird der Kohlenhydratanteil in der Nahrung auf unter 20% gesenkt und der Fettanteil auf über 50% angehoben. Als Variante existiert die ketogene Diät, die sich gleichermaßen aus besonders niedrigen Kohlenhydrat- und Proteinanteilen zusammensetzt. Die Theorie der LCHF Diäten besteht darin, den Körper zu einem erhöhten Fettstoffwechsel und Ketogenese zu zwingen und im Resultat Gewicht zu reduzieren. Es konnte festgestellt werden, dass Serumcholesterin und Triglyceride trotz des hohen Fettanteils mittels LCHF Diäten gesenkt werden konnten, sogar deutlicher als in Low-fat Diäten (7). Die ketogene Atkins Diät wird auch bei therapierefraktärer Epilepsie im Kindesalter und neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson als Therapie eingesetzt, da sie die Krampfanfallsrate senken kann und neuroprotektiv wirkt (8, 9). Während anfänglich die Begeisterung aufgrund der hohen Wirksamkeit bzgl. der Gewichtsreduktion und der Verbesserung einiger Serumparmeter, wie Serumcholesterin groß war, wurden im Verlauf die Bedenken einer zu einseitigen Ernährung und die Auswirkungen eines zu hohen Fettanteils in der Nahrung, in Fachkreisen größer (6). Außerdem wird beständig untersucht, ob eine LCHF Diäten stärker zur Reduktion des DMT2 und des kardiovaskulären Risikos beiträgt als Low-fat Diäten (10).

Von unserem Institut wurde in der Vergangenheit besonders der Einfluss von verschiedenen Makronährstoffzusammensetzungen in der Nahrung von Ratten auf die Glucosetoleranz und die Growth hormone-Insulin like Growth Factor-I (GH-IGF-I) Achse untersucht. In unseren Studien konnte dabei gezeigt werden, dass trotz niedrigerer Glucose und Insulinspiegel im Serum, die Glucosetoleranz und Insulinresistenz bei Ratten nicht verbessert werden konnten (11) und dass LCHF Diäten einen supprimierenden Einfluss auf die GH-IGF-I Achse haben (12).

1.3 Growth hormone-Insulin-like Growth Factor-I Achse

1.3.1 Growth hormone (GH) und Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)

Das Growth Hormone (GH), oder auch Somatotropin genannt, ist ein Polipeptid aus 191 Aminosäuren und wird in den somatotropen Zellen der Adenohypophyse synthetisiert und in selbiger in Granula gespeichert (13). Seine Sekretion erfolgt in Pulsen, die während der Nacht eine höhere Amplitude aufweisen als am Tag und unterliegt einer komplexen Regulation, die zu einem späteren Zeitpunkt erläutert wird. Die Plasmahalbwertszeit liegt bei ca. 20 min. Um diese zu verlängern liegt das GH im Plasma etwa zur Hälfte gebunden an ein Bindungsprotein vor und bildet so ein Reservoir im Blut. Bei diesem Bindungsprotein handelt es sich um den löslichen Teil des Growth Hormone Rezeptors (GH-R) (13, 14).

Das GH wirkt entweder direkt über einen GH-R oder indirekt über IGF-I, dessen Synthese es in der Leber stimuliert (15). Der GH-R kommt ubiquitär vor, jedoch ist seine Dichte in der Leber besonders hoch. Er ist ein Glykoprotein mit einer extrazellulären, intrazellulären und einer transmembranösen Domäne. Das GH bindet an zwei GH Rezeptoren, die anschließend intrazellulär eine Janus Kinase 2 (JAK2) binden und so die Wirkung von GH initiieren (14). Gemeinsam mit dem IGF-I wirkt es in der Wachstumsphase auf das Längenwachstum der Knochen stimulierend. Ein GH-Mangel in der Wachstumsphase führt entsprechend zum Zwergwuchs und ein Überschuss zu einem Gigantismus. Außerhalb der Wachstumsphase führt ein Überschuss von GH zu der Erkrankung Akromegalie (13).

Im Allgemeinen kann man das GH als anaboles Hormon bezeichnen, welches die Proteinsynthese steigert und damit zum Aufbau von Muskulatur beiträgt. Auch auf den Kohlenhydratstoffwechsel wirkt es sich aus (13, 16). Zum einen bewirkt es an den Beta-Zellen des Pankreas eine vermehrte Insulinsekretion, gleichzeitig wirkt es auch Insulin antagonistisch, hemmt die Glucoseaufnahme in die Zellen und stimuliert die Gluconeogenese (13).

Am Fettgewebe besitzt GH eine katabole Wirkung und regt zur Lipolyse an (14). Entsprechend dieser Funktionen des GHs ist auch ein Mangel im Erwachsenenalter nicht folgenlos. Er führt zu Problemen beim Muskelaufbau und Fettabbau, sowie zu Mineralisierungsdefiziten der Knochen (17, 18) und begünstigt vermutlich die Entstehung von Atherosklerose(18-20).

IGF-I und IGF-II sind Peptide, die dem Proinsulin in ihrer Struktur teilweise gleichen und die man auch Somatomedine nennt (13, 14). Sie werden von mehreren Geweben produziert, wobei ein Großteil des IGF-I in der Leber synthetisiert wird (21). Während die IGF-I Produktion stark abhängig von GH ist, ist über IGF-II bis jetzt weniger bekannt. Beide wirken über den sog. IGF-I Rezeptor, dessen Struktur homolog zum Insulinrezeptor ist, jedoch eine mitogene/proliferative und keine metabolische Wirkung vermittelt (14). Es existieren sechs verschiedene IGF-Bindungsproteine (IGFBP), die die Wirkung des IGFs entweder verstärken oder hemmen können. Das IGFBP-3 ist das häufigste vorkommende IGFBP im Serum. Es bildet gemeinsam mit dem IGF und einem weiteren Protein namens Acid-labil subunit (ALS) einen Komplex, der die IGF Blutzirkulation aufrechterhält. Die IGFBP-3 Produktion ist genau wie das IGF-I stark vom GH abhängig (14).

Die wichtigste Wirkung des IGF-I ist das Längenwachstum während der Wachstumsphase, doch wirkt es auch an anderen Geweben über den IGF-R mitogen. Zusätzlich bewirkt es eine Phosphat- und Natriumretention in der Niere und es hemmt die Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) Ausschüttung im Hypothalamus.

1.3.2 Regulierung

Wie bereits erwähnt unterliegt die pulsatile GH Sekretion einer komplexen Regulierung. GH freisetzend wirken die Peptide GHRH, auch Somatoliberein genannt und Ghrelin, auf die Adenohypophyse. GHRH Neurone befinden sich im Hypothalamus in der Region des ventromedialen (NVM) und des arcuaten Nucleus (N. arc.), sezerniert wird es aus der Eminentia mediana in den Blutkreislauf. Es wirkt an der Adenohypophyse über einen GPC-heptahelikalen Membranrezeptor (GHRH-R) und wird selbst über eine Feedback-Schleife von GH gesteuert (15). Das Ghrelin wird in endokrinen Zellen des Magens produziert und gelangt über das Blut zur Adenohypophyse. Ausgeschüttet wird es, um den Hunger zu steigern, also besonders in Fastenphasen.

GH inhibierend wirkt das Somatostatin, das ebenfalls aus dem Hypothalamus stammt. Des Weiteren existieren sog. Feedbackschleifen, sodass sowohl IGF-I als auch GH, die GH Sekretion inhibieren. Beide modulieren die GHRH und Somatostatin Sekretion am Hypothalamus, IGF-I interferiert jedoch zusätzlich auch mit der Funktion des GHRHs an der Hypophyse selbst (13, 14).

Zusätzlich gibt es eine Menge weiterer Faktoren, die die GH-Sekretion regulieren. Dazu gehören Schlaf, Stress, Alter, Östrogen und metabolische Signale. Die Ausschüttung verläuft zwar beständig periodisch im Abstand von ca. 2h, jedoch gibt es im Tagesverlauf große Unterschiede bei der Höhe der Amplituden. Das Schlafzentrum ist mit den GHRH sezernierenden Zentren im Hypothalamus verbunden und wirkt dort in der Schlafphase stimulierend (15). Die höchsten Peaks der GH-Ausschüttung können während der IV. Schlafphase gemessen werden (14, 22). Eine weitere Verbindung zu den GHRH sezernierenden Zentren des Hypothalamus hat die Amygdala. Bei Stress wirkt sie stimulierend auf die GHRH-Ausschüttung (15). Körperliche Anstrengung führt außerdem zu hohen GH Amplituden (23-25). Auch Fasten führt zu einer höheren GH-Ausschüttung. Zum einen erhöht Fasten die Ghrelin-Ausschüttung im Magen, zum anderen reagiert der NVM auf eine Hypoglykämie mit der Ausschüttung von GHRH (15), währenddessen eine Hyperglykämie die GH Sekretion inhibieren würde. So kommt es laut Literatur bei Übergewichtigen zu einem niedrigen GH-Spiegel (22). Während die GH-Sekretion und -Sensitivität in der Pubertät bei beiden Geschlechtern hoch ist, lassen sie im Alter gleichermaßen nach (14, 21, 22). Bei Frauen lässt sich ein anderes Sekretionsprofil beobachten als bei Männern, was der Wirkung des Östrogens zugeschrieben wird (14, 15).

Des Weiteren kann auch die GH-Sensitivität die Wirkung regulieren. Dabei ist die GH-R Dichte und Menge von GH-Bindungsprotein (GHBP) im Serum entscheidend (26). GHBP verlängert auf der einen Seite die Halbwertszeit von GH im Blut, auf der anderen Seite konkurriert es mit GH um die GH-R Bindungsstellen und wandelt diese in unproduktive Heterodimere um (14).

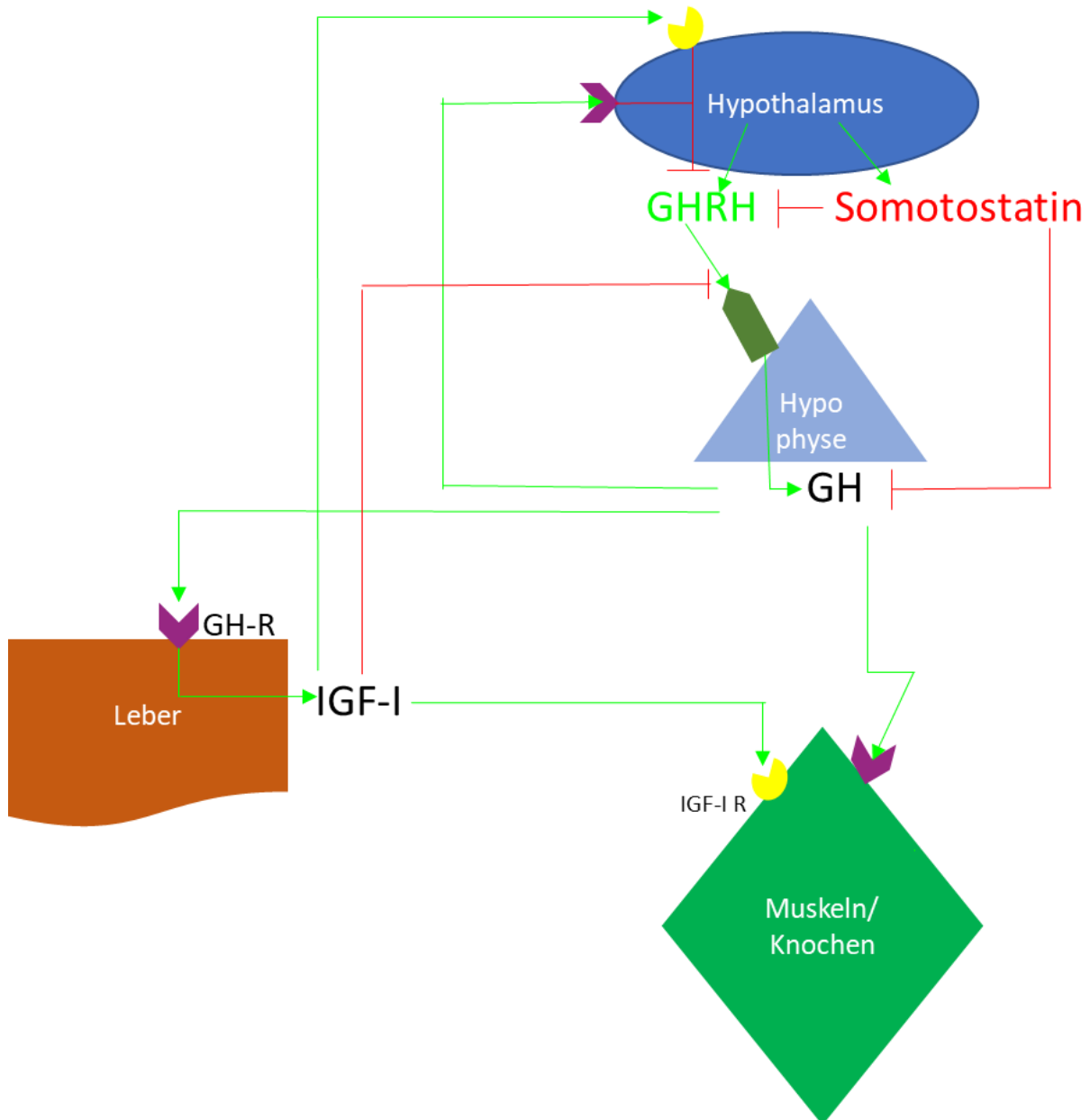


Abb.1: Die GH-IGF-I Achse mit ihren Hauptakteuren und ihrer Feedbackschleife

1.3.3 GH-IGF-I Achse in Ratten

Für diese Studien wurden Ratten als Versuchstiere zur Untersuchung der GH-IGF-I Achse gewählt, da sie im Wesentlichen eine gute Vergleichbarkeit zum Menschen darstellen. Hier soll noch einmal erläutert werden, an welchen Stellen sich die GH-IGF-I Achse der Ratte von der des Menschen unterscheidet und in welchen nicht.

Genau wie beim Menschen erfolgt auch die GH-Sekretion der Ratte pulsatil in Peak-Abständen von ca. 3h. Licht -Dunkelphasen agieren als Zeitgeber, wenn sie auch nicht zur Erhaltung des Basisrhythmus nötig sind (27). Auch bei Ratten existiert ein sexueller Dimorphismus bei der Sekretion des GH, der auf die Wirkung von Östrogen zurückgeführt wird. Zusätzlich lässt sich vermehrt GHRH in den Hypothalami männlicher Ratten feststellen (15).

Im Unterschied zum Menschen entsteht das GHBP nicht als ein Abspaltprodukt des GH-R, sondern beim alternativen splicen des GH-R Gens (14). Bei Menschen konnte bis jetzt kein eindeutiger und konsistenter Zusammenhang zwischen der GH-R und GHBP und der GH-Regulation festgestellt werden, bei der Ratte weiß man jedoch, dass mehr GH auch konsequent mehr GH-R und GHBP bedeutet (14).

1.4 Leber als zentrales Stoffwechselorgan

In dieser Studie wird die Leber besonders genau betrachtet, da sie zum einen ein bedeutendes Organ der GH-IGF-I Achse darstellt und zum anderen das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers ist. Sie bietet somit die wichtige Schnittstelle der untersuchten Faktoren, nämlich der Auswirkung von unterschiedlichen Makronährstoffen in der Nahrung von Ratten auf die GH-IGF-I Achse, auf. (14)

Durch ihre Stellung als zentrales Stoffwechselorgan, wird sie bei Zuständen unangemessener Ernährung oder Medikamenten- und Drogenmissbrauch oft geschädigt. Eine mit der Adipositas und Diabetes oder prädiabetischen Zuständen einhergehende Erkrankung der Leber ist die nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), bei der es zu Fetteinlagerungen in die Leber kommt (28). Ich werde im Verlauf der Studie untersuchen, welche Makronährstoffzusammensetzungen am ehesten das Risiko einer NAFLD erhöhen.

1.4.1 Nicht alkoholische Fettleber Erkrankung

Eine nicht alkoholische Fettleber Erkrankung liegt vor, wenn durch bildgebende Verfahren, wie Ultraschall oder Computer Tomographie (CT), oder durch eine histologische Untersuchung, eine Einlagerung von Fett in der Leber nachgewiesen wurden und als Grund dafür kein Alkoholmissbrauch¹ und keine anderen Begleitumstände, die zu chronischen Lebererkrankungen führen, sowie andere Faktoren, die eine Leberverfettung nach sich ziehen,

¹ Bei Männern > 210 g/Woche, bei Frauen > 140 g/Woche

bestehen (29). 30-40% der NAFLD schreiten fort in eine nicht alkoholische Steatohepatitis (NASH), d.h. eine Verfettung mit zusätzlicher Inflammation. Davon gehen 40-50% in eine Leberzirrhose über, die wiederum ein erhöhtes Risiko für ein Hepatozelluläres Karzinom (HCC) darstellt (30, 31). Gemeinsam mit der Problematik des Übergewichts und des DMT2 ist die NAFLD besonders in westlichen Ländern verbreitet und in ihrer Prävalenz steigend (31-33). Das macht sie in westlichen Ländern zu einem verbreiteten Grund für chronische Lebererkrankungen und es wird davon ausgegangen, dass bis 2030 die NAFLD der häufigste Grund für eine Lebertransplantation in diesen Regionen sein wird (30, 31). Als bekannteste und verbreitetste Risikofaktoren wären ein deutlich erhöhter BMI bzw. ein viszerales Übergewicht, eine hepatische Insulinresistenz und der DMT2 zu nennen (28, 32-35). Des Weiteren existieren noch andere Risikofaktoren für eine NAFLD: Alter > 50 J., erhöhte Ferritin Werte und auf genetischer Ebene ein patatin-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3) 1148M Polymorphismus. In einer Studie zu NAFLD im Kindesalter und Pubertät konnte außerdem festgestellt werden, dass es geschlechtsspezifische Einflüsse gibt, die durch Steroidhormone vermittelt werden. Bei Jungen liegt demnach ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer NASH vor (35).

Beim PNPLA3 1148M Polymorphismus konnte gezeigt werden, dass es zu dem erhöhten Lipidanteil in der Leber nicht durch vermehrte Bildung von Triacylglyceriden (TAG), sondern durch eine verringerte hepatische Lipolyse kommt. Bei den meisten der genannten Risikofaktoren ist jedoch nicht bekannt, auf Grund welcher biochemischen Mechanismen sie das Risiko einer NAFLD erhöhen (30).

Umgekehrt gilt wiederum die NAFLD als Risikofaktor für die Entwicklung einer Vielzahl von Erkrankungen. Dazu gehören DMT2, kardiovaskuläre Erkrankungen, Herzkrankheiten und chronische Nierenkrankheiten (28, 30, 31, 36). Besonders bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, soll die NAFLD eine Rolle spielen (36). Dabei sind besonders die Leberverfettung und die hepatische Insulinresistenz verantwortlich für eine verschlechterte atherogene Dyslipidämie, die wiederum zu vermehrten Kalkablagerungen in den Koronararterien führt (31). Auch hier sind wieder die genauen biochemischen Vorgänge unbekannt (30). Interessanter Weise sind auch die Haupttodesursache bei Patienten mit NAFLD kardiovaskuläre Ereignisse (28, 31).

1.4.2 Zu untersuchende Parameter bei NAFLD

Da eine NAFLD meist im Zusammenhang mit einem metabolischen Syndrom auftritt, ist es sinnvoll auf Anzeichen eines solchen zu achten und zu untersuchen. Bereits der Phänotyp kann Grund sein, ein metabolisches Syndrom und seine Folgeerkrankungen zu vermuten. Das Körpergewicht, das fettfreie Körpergewicht bzw. die lean body mass (LBM) und die Körpergröße, sollten deshalb stets erhoben werden. Untersucht man im Rahmen der Forschung im Tiermodell das metabolische Syndrom, können das Gewicht der einzelnen Fettdepots sowie das Lebergewicht betrachtet werden. Weitere wichtige Parameter kann man im Blut untersuchen. Dazu gehören der Cholesterol-, TAG- und Glucosewert. Diese sind, wie bereits weiter oben erläutert, bei einem metabolischen Syndrom meist krankhaft verändert. Geht man nun spezieller auf die NAFLD ein, so ist es von Interesse die Leberfunktionsparameter zu begutachten, insbesondere die Alanin Aminotransferase (ALT). Diese kann schon bei einer Steatosis und noch vor der Steatohepatitis, erhöht sein(29). Im Tiermodell kann man die Organe der Versuchstiere nach einer Schlachtung zusätzlich noch molekular genetisch analysieren. Dabei untersucht man zum Beispiel die messenger ribonucleic acid (mRNA) Quantität der Akteure des Fettstoffwechsels in der Leber.

Die aussagekräftigste Methode, um eine NAFLD zu erkennen ist eine histologische Untersuchung auf Fetteinlagerungen in das Organ (29, 37). Aus diesem Grund werde ich die Lebern unserer Versuchstiere histologisch betrachten und mit Hilfe einer angemessenen Färbetechnik den Fettgehalt der Leber adäquat darstellen. In der Klinik würde man an dieser Stelle zuerst bildgebende Verfahren wie die Sonographie oder die CT anwenden. Eine anfängliche, geringgradige Verfettung der Leber, lässt sich mit Hilfe dieser Methoden jedoch häufig nicht feststellen. Deshalb kommen auch in der Praxis teilweise Leberbiopsien zur Diagnostik zum Einsatz.

1.5 Notwendigkeit der geschlechtsspezifischen Forschung

Bereits seit einigen Jahren werden die biologisch geschlechtlichen Unterschiede zwischen Mann und Frau in der Forschung zunehmend beachtet. Dabei wird deutlich, dass in vielen Bereichen Forschungsergebnisse, die anhand von Kohorten eines Geschlechts gewonnen wurden, nicht ohne Weiteres auf das andere Geschlecht übertragbar sind (38). Besonders in Stoffwechsel und Hormonhaushalt unterscheiden sich Männer und Frauen voneinander. Der

männliche Körper verfügt über einen höheren Prozentsatz an Muskelmasse, der Weibliche verfügt über einen höheren Fettanteil (39, 40), es ist also anzunehmen, dass für Männer und Frauen nicht dieselben Ernährungsempfehlungen gelten sollten. Die in dieser Arbeit untersuchte GH-IGF-I Achse weist ebenfalls einen geschlechtlichen Dimorphismus auf. Bei beiden Geschlechtern unterliegt die GH Ausschüttung einer pulsatilen Sekretion. Frauen im gebärfähigen Alter haben jedoch eine höhere GH Baseline als Männer (14, 15). Außerdem sind die Pulse bei Frauen unregelmäßiger (14). Diese Unterschiede werden der Wirkung des Östrogens zugeschrieben (41-43), weshalb sich die GH-Sekretion bei postmenopausalen Frauen dem männlichen Sekretionsmuster angleicht (21).

Da in meinem Projekt der Einfluss von unterschiedlichen Makronährstoffzusammensetzungen in der Nahrung von Ratten auf die GH-IGF-I Achse untersucht werden soll, ist es in diesem Falle sinnvoll sich die Ergebnisse im Geschlechtervergleich anzuschauen. Es könnte der weibliche Körper ganz anders als der männliche auf niedrige Kohlenhydrat- und hohe Fettanteile in der Nahrung reagieren.

1.6 Einordnung der vorgelegten Dissertation in Zusammenhang weiterer Versuchsreihen der Arbeitsgruppe

Um den größeren Zusammenhang der im Folgenden beschriebenen Versuche und deren Ergebnisse zu verdeutlichen, möchte ich an dieser Stelle kurz auf bereits durchgeführte und noch geplante Versuchsreihen der Arbeitsgruppe eingehen. Bereits in der Vergangenheit hat die Arbeitsgruppe Bidlingmaier/Bielohuby Experimente zu Kohlenhydratarmen Diäten durchgeführt, die zur Behandlung der Adipositas propagiert werden, ohne dass deren Auswirkungen ausreichend erforscht sind. In den Experimenten wurden Ratten mit Low-Carb-High-Fat Diäten gefüttert und auf Veränderungen in Phänotyp, Körperzusammensetzung und die somatotrope Achse untersucht. Beispielsweise konnte in diesen Versuchsreihen gezeigt werden, dass es bei LCHF gefütterten Ratten zu einem verminderten Längenwachstum mit reduzierter Knochendensität (44), einer Verringerung der fettfreien Körpermasse (lean body mass)(45) und einer Supression der somatotropen Achse kam(12). Die Fütterungsversuche der Gruppe erfolgten stets nach der Methode der isoenergetischen Paarfütterung, um zu zeigen, dass die Ergebnisse auf der unterschiedlichen Makronährstoffzusammensetzung und nicht auf

Unterschiede in der Kalorienzufuhr beruhen. Diese Methode hat sich als bewährt erwiesen und wurde auch in dieser Versuchsreihe wieder angewandt. Eine genaue Erläuterung zur isoenergetischen Paarfütterung folgt im Methodenteil (S. 15).

Was jedoch in den vorangegangenen Versuchsreihen gefehlt hat, war eine Betrachtung beider Geschlechter. Die Versuche mit LCHF Diäten wurden von der Arbeitsgruppe in der Vergangenheit ausschließlich mit männlichen Versuchstieren durchgeführt. Wie ich in Kapitel **1.5.** dieser Dissertation beschrieben habe, ist es jedoch besonders im Hinblick auf Fragestellungen bzgl. Stoffwechsel und Hormonachsen mit geschlechtlichem Dimorphismus, wissenschaftlich sinnvoll, Versuche mit Tieren beider Geschlechter durchzuführen. Außerdem erfolgte in den vorangegangenen Experimenten keine Betrachtung einer „normalen“ westlichen Ernährungsweise, die typischerweise sowohl kohlenhydrat- als auch fettreich ist.

Es folgt deshalb eine weitere Versuchsreihe, in der Auswirkungen von LCHF-Diäten sowohl in männlichen als auch in weiblichen Ratten untersucht werden. Des Weiteren wird dieser Versuchsreihe eine High-Carb-High-Fat-Diät zugefügt, die eine verbreitete westliche Ernährungsweise repräsentiert. In Anlehnung an das, was in der Vergangenheit bereits durch die Arbeitsgruppe an Erkenntnissen gewonnen wurde, wird man auch hier, in allen drei Abschnitten Auswirkungen auf den Phänotyp, die Körperzusammensetzung, Metabolismus und die somatotrope Achse untersuchen.

Die von mir vorgelegte Arbeit behandelt den 1. Teil dieser Versuchsreihe. Bei den Tieren handelt es sich um Gonaden intakte Ratten. Es wird hier herausgestellt, wo es Unterschiede und Gemeinsamkeiten in den Auswirkungen von unterschiedlichen Makronährstoffzusammensetzungen in der Nahrung bei männlichen und weiblichen Tieren gibt. Im 2. Teil der Versuchsreihe wird man wieder männliche und weibliche Tiere verwenden, allerdings mit anteilig kastrierten Tieren, um zu untersuchen, ob es durch eine Kastration zum Angleichen der Ergebnisse kommt. Des Weiteren soll hier herausgearbeitet werden, welche Effekte allein auf die Makronährstoffzusammensetzung und welche auf hormonelle Einflüsse zurückzuführen sind. In einem 3. Teil der Versuchsreihe wird man die Tiere erneut kastrieren und unter Hormonsubstitution beobachten, ob sich hierdurch Effekte der Kastration rückgängig machen lassen.

2 Arbeitshypothese

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnte bereits ein negativer Effekt von LCHF Diäten auf die GH-IGF-I Achse gezeigt werden. Ich möchte in dieser Arbeit diese Ergebnisse weiter stützen, sowie fortführend untersuchen, ob diese Ergebnisse auch bei weiblichen Ratten reproduziert werden können.

Durch die Hinzunahme einer weiteren Diät, die sowohl einen hohen Kohlenhydrat- als auch einen hohen Fettanteil beinhaltet, möchte ich weiter unterstreichen, dass sich die negativen Auswirkungen der LCHF Diäten auf den niedrigen Kohlenhydratanteil begründen und nicht etwa auf den hohen Anteil von Fetten.

Des Weiteren betrachten wir die Leber in ihrer zentralen Stellung als wichtigstes Stoffwechselorgan, sowie Effektor Organ der GH-IGF-I Achse. Es wird untersucht, ob sich die LCHF Diäten in die Richtung einer NAFLD auswirken und die Leberfunktion beeinträchtigen.

2.1 Studiendesign

Zur Untersuchung meiner Hypothese wurde ein Tierversuch im Nagermodell durchgeführt. Für die Ratte entschied man sich, da sie sich in den zu untersuchenden Aspekten relativ wenig vom Menschen unterscheidet und somit als geeignetes Versuchstier gilt. Wegen der sehr aufwendigen Fütterungsmethode und teilweise auch nachts stattfindenden Arbeiten, erfolgte das Handling und die Betreuung der Tiere in enger Kooperation mit weiteren Doktoranden sowie weiteren Arbeitsgruppenmitgliedern. Aus Tierschutzrechtlichen Gründen war außerdem nur eine kleine Anzahl von Tieren pro Fütterungsgruppe möglich.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Vor Beginn der Versuche wurde bei der Regierung Oberbayern ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuch Vorhabens, nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes, gestellt. Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden streng nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Zur Durchführung der Studie im Nagermodell hat man sich für Whistar/HAN Ratten (Charles River-Suzfeld) entschieden, die bei Ankunft in der Tierhaltung der medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwigs-Maximilians-Universität München, im Alter von 10-11 Wochen waren. Jeweils 28 männliche und weibliche Tiere wurden in Einzelhaltung, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, in einem separaten Raum der Tierhaltung, in transparenten Plexiglaskäfigen mit Metallgitterdeckel gehalten. Die Käfige waren mit Lignocell Holzstreu und als Enrichment mit einem roten Unterschlupf ausgestattet. Die Raumtemperatur betrug zwischen 21 und 23 °C, mit einer Luftfeuchtigkeit zwischen 45 und 65%. Im 12h Wechsel wurden die Dunkel- und Hellphasen eingeleitet. In den ersten 14 Tagen nach Ankunft standen den Ratten Wasser und ein Standardfutter ad libitum zur Verfügung. Diese Zeit sollte zur Gewöhnung und Akklimatisierung an die neue Umgebung dienen. Nach 14 Tagen wurden die Tiere einzeln gewogen und es wurden vier Gruppen erstellt, deren Durchschnittsgewicht der Tiere vergleichbar sein sollte. Nach weiteren fünf Tagen begann man mit den Versuchen, d.h. dass die Tiere von nun an ihrer Gruppe entsprechend unterschiedliches Futter erhielten. Dazu teilte man die Tiere in 4 Gruppen ein, deren mittleres Gewicht möglichst ähnlich sein sollte. Einen Tag vor Versuchsbeginn lag bei den weiblichen Tieren der Mittelwert (M) des Gewichts aller Tiere bei $201,95 \pm 0,05\text{g}$, bei den männlichen Tieren bei $342,1 \pm 1,125\text{g}$. Die vier Gruppen waren den Versuchsdiäten entsprechend folgende: Eine Normaldiät im folgenden chow genannt, zwei LC-HF Diäten und eine HCHF Diät. Über die genaue Zusammensetzung der Diäten wird im folgenden Kapitel eingegangen.

Sex	Merkmal	chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
female	Körpergewicht der Gruppe zu Versuchsbeginn in g (M und SD)	202 ± 5,586	201,9 ± 7,019	202 ± 8,315	201,9 ± 5,963
male	Körpergewicht der Gruppe zu Versuchsbeginn in g (M und SD)	341,1 ± 9,67	344 ± 5,957	341,5 ± 8,992	341,8 ± 5,951

Tab. 1: Mittelwert (M) mit Standardabweichung (SD) des Körpergewichts innerhalb der Versuchsgruppen an Tag 1

3.1.1 Futter und Fütterung

Das verwendete Futter wurde ausnahmslos von der Provimi Kliba AG aus der Schweiz bezogen. Gefüttert wurden die vier Gruppen zum Ende der Ruhephase der Tiere, täglich um 8 Uhr morgens. Das Futter wurde, mit Ausnahme der HCHF Diät, die auf Grund ihrer pastösen Konsistenz in Porzellanschälchen im Käfig platziert wurde, in einer Futterraufe angeboten. Wasser stand den Tieren über den gesamten Versuchszeitraum ad libitum über eine Nippeltränke zur Verfügung. Entsprechend des Versuchsziels, dass die Einflüsse unterschiedlicher Makronährstoffzusammensetzungen in der Nahrung der Ratten untersucht werden sollen, bekamen die Gruppen vier unterschiedliche Diäten geboten. Als Kontrollgruppe einer Normaldiät gleichkommend, wurde eine Chowdiät verwendet. Des Weiteren wurden als Experimentaldiäten zwei unterschiedliche Low-Carb-High-Fat Futter eingesetzt: die LCHF 55 (auch LCHF-1) und die LCHF 75 (auch LCHF-2) Diät. Die Namen leiten sich aus dem Fettanteil der Trockenmasse des Futters ab. Unterschiede gibt es außerdem in den Proteinanteilen der Diäten. Die LCHF 75 Diät zählt zu den ketogenen Diäten (geringer Proteinanteil), hingegen die LCHF 55 Diät nahezu denselben Proteinanteil wie die Chowdiät enthält. Als weitere Experimentaldiät wurde ein High-Carb-High-Fat (HCHF) Futter eingeführt, das in seiner Zusammensetzung einer alltäglichen, westlichen Ernährung gleichkommen sollte.

Diät	Energie in kcal/g	% der metabolisierbaren Energie		
		Fett (%)	Protein (%)	Kohlenhydrate (%)
Kontrolldiät/ Chow	3,9	16,7	19,2	64,3
LCHF 55/30 bzw. LCHF-1	6,2	78,7	19,1	2,2
LCHF 75/10 bzw. LCHF-2	7,2	92,8	5,5	1,7
HCHF	5,4	61,9	18,7	19,4

Tab. 2: Energiegehalt der unterschiedlichen Diäten

Als Quelle für Fett wurde im Futter Rindertalg verwendet, für die Kohlenhydrate nahm man Stärke und als Proteinquelle wurde Casein genommen. Während die Makronährstoffe zwischen den Experimentaldiäten variieren, sind Mikronährstoffe wie Magnesium, Kalzium, Kupfer und Zink sowie Vitamine und weitere Mineralien in allen Diäten gleichsam enthalten.

3.1.1.1 Isoenergetische Paarfütterung

Um sicher zu gehen, dass alle Tiere stets dieselbe Energiemenge gefüttert bekamen, hatte nur die Chowgruppe ad libitum Zugang zu ihrem Futter, während die weiteren Gruppen ihr Futter abgewogen und in äquivalenter Energiemenge zu der Kontrollgruppe erhielten. Dies geschah wie folgt: Die Kontrollgruppe erhielt ad libitum Zugang zu einer abgewogenen Menge von Chowfutter, am nächsten Tag wurde gewogen, wie viel jedes Tier gefressen hatte. Für die Gruppe wurde ein Mittelwert in Gramm erstellt und aus diesem wurde anschließend ermittelt, wie viel Energie die Tiere der Kontrollgruppe durchschnittlich zu sich genommen hatten. Dieser wurde als Referenzwert in kcal für die weiteren Diätgruppen genutzt. Sie sollten dieselbe Energiemenge erhalten, wie die Kontrollgruppe. Dazu wurde anhand der Energiemenge und der bekannten Energiemenge pro Gramm des jeweiligen Futters, ein gruppenspezifisches Futtergewicht bestimmt, das jedem Tier zustand. Eine isoenergetische Paarfütterung musste erfolgen, da die verschiedenen Futtersorten unterschiedlich beliebt bei den Tieren sind und unterschiedliche Energiedichten aufweisen. Daher wäre es nicht möglich gewesen eine Vergleichbarkeit der Gruppen zu erstellen, wenn alle Tiere ad libitum Zugang zu Futter erhielten oder nur dieselbe Grammzahl des Futters bekämen.

3.1.2 Lebendgewichtbestimmung

Zum Umfang der Beobachtungen zählte unter anderem die Entwicklung des Phänotyps mit Betrachtung des Gewichts. Dazu wurden die Tiere jeden zweiten Tag noch vor der Fütterung gewogen. Um möglichst genaue Messwerte zu erhalten und Verfälschungen durch Bewegungen der Versuchstiere zu minimieren wurde hierfür eine Analysewaage verwendet, die über eine dynamische Wäge Funktion verfügt.

3.1.3 Probengewinnung und Aufbereitung

Zur Untersuchung der genannten Arbeitshypothesen musste die Betrachtung organischen Materials erfolgen. Dazu erfolgten am 21. Versuchstag Serienblutentnahmen zur Erstellung von GH-Sekretionsprofilen, sowie am 28. Versuchstag die Sektion der Versuchstiere, um Innere Organe sowie Knochen und Muskel für Analysen unterschiedlicher Art zur Verfügung zu haben.

3.1.3.1 *Serienblutentnahme*

Da bei Ratten, wie auch bei Menschen, die GH-Sekretion pulsatil erfolgt, wurde es als sinnvoll erachtet, die GH-Konzentration im Blut nicht nur zu einem definierten Zeitpunkt, sondern über einen längeren Zeitraum hinweg zu betrachten. Es sollte ein GH-Sekretionsprofil entstehen, das genauere Auskünfte und Mittelwerte über die GH-Produktion zulässt. Zu diesem Zweck mussten sog. Serienblutentnahmen erfolgen. Es wurde den Tieren am 21. Versuchstag, um 8 Uhr morgens, zwei Stunden nach Beginn der Hellphase, zehn Mal alle 30 Minuten Blut aus der Schwanzvene abgenommen. Acht Stunden zuvor erfolgte eine strikte Nahrungsrestriktion, das Futter wurde um 24 Uhr des Vortages aus den Käfigen entfernt. Die Blutproben beliefen sich jeweils auf ca. 140µl, die zuerst bei Raumtemperatur geronnen, dann zentrifugiert und für den weiteren Gebrauch bei -20°C eingefroren worden.

Die GH Bestimmung erfolgte mittels des Merck/Millipore ERZMGH-45BK Tests.

3.1.3.2 *Sektion*

Am 28. Versuchstag erhielten die Tiere zunächst, zu Beginn der Dunkelphase um 18 Uhr, eine Stunde lang *ad libitum* Zugang zur Nahrung, danach wurde ihnen das Futter für sechs Stunden, bis 1 Uhr morgens, entzogen und anschließend wurde mit der Schlachtung begonnen. Dazu wurde die Tiere am Isoflurantropf narkotisiert und anschließend wurde der Brustkorb eröffnet. Mit einer Kanüle wurde das Blut aus der V. cava gesogen und anschließend von dort aus mit Formaldehyd perfundiert. Das gewonnene Blut wurde bei 8°C in Serum-Monovetten im

Kühlschrank gelagert. Als Nächstes wurden das Gehirn, die Leber, die Nieren, das Pankreas, braunes Fettgewebe von subscapular, weißes Fettgewebe aus der inguinal, der perirenal und der epidymalen bzw. gonadalen Region, die Muskeln M. quadrizeps und M. gastrocnemicus sowie sechs Knochen, nämlich jeweils der Rechte und Linke Humerus, Femur und die Tibiae, entnommen. Alles wurde einzeln gewogen und die Leber, Nieren, das Pankreas, die Fettdepots und die Muskeln umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und zur weiteren Aufbewahrung in Kunststoffplatten mit runden Vertiefungen gegeben und in einem -80°C Gefrierschrank gelagert. Das Gehirn wurde zunächst für 48h in leicht schwingendem 4%igem Paraformaldehyd (PFA), von einer Temperatur von 4°C, gebadet, danach weitere 48h, erneut bei einer Temperatur von 4°C in 30%iger Sucrose/Phosphat Buffered Saline (PBS). So konnte es anschließend bei -80°C eingefroren werden ohne Schaden zu nehmen.

3.2 GH und IGF-I ELISA Assays

Die Assays wurden jeweils von Medizin technischen Assistenten (MTAs) der Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilian-Universität (LMU) durchgeführt. Für das GH Hormon im Serum wurde folgendes Assay benutzt: Rat Growth Hormone ELISA Kit KRC5311 Thermo Scientific. Beim IGF-I verwendete man: Rat IGF-1 ELISA Kit Nr: ERIGF1 Thermo Scientific Die MTAs hielten sich bei der Durchführung an die Protokolle des Kits.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 mRNA Isolation

Zur Isolation der mRNA aus dem Hypophysen- und Lebergewebe wurde der Promega Maxwell® 16 LEV simplyRNA Purification Kit benutzt. Zur Probenvorbereitung wurden die bei -80°C aufbewahrten Proben in ein 2mL Eppendorfgefäß zu einer gekühlten 1-Thioglycerol/Homogenization Solution (5µL Thioglycerol, 195µL Homogenat) gegeben. Außerdem wurde dem Gemisch eine Quirgen Stanless Steel Beads 5mm Kugel zugesetzt und anschließend in einem Tissueliser eine Minute bei 50 1/s Oscillation homogenisiert. Danach wurde dem Homogenisat 200µL eines Lyse Buffers zu pipettiert, dann wurden die Eppendorfgefäße nach 1-sekündigem vortexen bei Raumtemperatur 2 Minuten bei 14000 RPM zentrifugiert. Das gesamte Lysat, ohne den Zellschrot am Boden, wurde nun abpipettiert und in das entsprechende Well des Carts hinzugegeben.

Ein einzelnes Cart enthielt je 8 Wells in denen die Chemikalien der einzelnen Auswaschschritte zur RNA-Isolation vorgelegt waren. Der Benutzer fügt lediglich das eigene Lysat (in das letzte Well) und 5 (zellarmes Gewebe) oder 10 (zellreiches Gewebe) μL DNase-Lösung (in das vierte Well) hinzu. Die Carts wurden in das gekühlte Reck des Maxwells® gestellt und vor jedem Cart wurde ein Elutionsgefäß mit 70 μL Nuklease freiem Wasser gesteckt. Als Programm im Maxwell® wählte man nun simplyRNA purification.

Direkt im Anschluss an die Isolation wurde die RNA-Konzentration der einzelnen Proben mittels Spektralphotometrie gemessen und anschließend wurden die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.3.2 Spektralphotometrische Bestimmung der RNA Konzentration

Zur Bestimmung der Konzentration und dem Kontaminationsgrad der einzelnen RNA-Isolate, wurde ein Nanodrop 1000 für die Spektralphotometrie verwendet.

Das Gerät maß mit einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$, die optische Dichte (OD260) beim Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren und des Weiteren die OD bei einer Wellenlänge von $\lambda=280\text{nm}$ (OD280), dem Absorptionsmaximum von Proteinen, um aus dem Quotienten OD260/OD280 den Kontaminationsgehalt der Probe bestimmen zu können. Das Verhältnis sollte hierbei zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.3.3 Gelelektrophorese

Um eine Degradation der gewonnenen RNA auszuschließen, wurde zur Qualitätskontrolle eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür erstellte man ein 1%iges Agarose Gel aus 1g Agarosepulver und 100mL TBE Puffer her. Das Gemisch wurde in einer Mikrowelle bei 500 W erwärmt, bis es sich komplett gelöst hatte, dann ließ man es bis ca 60° abkühlen und pipettierte 5 μL Ethidiumbromid hinzu. Das flüssige Gel wurde nun in eine entsprechende Form gefüllt und ein passender Kamm zur Taschenformung eingelegt. Das fertige Gel legte man in die Elektrophoresevorrichtung und übergoss es ausreichend mit Puffer, anschließend pipettierte man in dessen Kammern 2-3 μL RNA Lösung, vermischt mit 5 μL Wasser und 4 μL Loading Dye. Die Elektrophorese lief dann für 25 Minuten bei 90V und höchstens 150mA ab. Zuletzt wurde das Gel unter einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254nm fotografiert.

3.3.4 RNA Umschreibung in cDNA

Die Umschreibung der mRNA in complementary Desoxyribonucleic Acid (cDNA) für die geplanten qPCRs, erfolgte nachfolgendem Protokoll und ausschließlich mit Promega Reagenzien.

In cDNA umgeschrieben wurde jeweils 1µg RNA. Dazu musste mit Hilfe der gemessenen Konzentration einer jeden RNA Lösung ermittelt werden, wie viel µL Lösung man für 1µg RNA benötigte. Im Anschluss wurde mit RNase freiem Wasser auf 12µL aufgefüllt und außerdem 1µL Oligo (dT) 15 Primer hinzugegeben. Das Gemisch wurde anschließend bei 70°C für 5 Minuten im Cycler inkubiert. Für jede Probe wurden zwei Gemische erstellt, da im weiteren Verlauf eine der beiden als Negativkontrolle dienen sollte.

Im zweiten Schritt wurden zwei verschiedene Mixturen erstellt. Zu beiden wurden 1µL RNAsin, 1,25µL dNTPs und 5µL eines Puffers hinzugegeben. Eine der beiden wurde dann mit 4,75µL RNase freiem Wasser aufgefüllt, die andere erhielt nur 3,75µL des Wassers und zusätzlich 1µL M-MLV reversen Transkriptase. Die Mixtur ohne reverse Transkriptase diente als Negativkontrolle um später bei der qPCR ausschließen zu können, dass die Proben mit genomischer DANN verunreinigt waren.

Für jede Probe wurde nun je eine Mixtur mit und eine Mixtur ohne die reverse Transkriptase erstellt und diese wurden im Cycler für 10 Minuten bei 40°C, für 50 Minuten bei 48°C und zum Schluss für 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt und dann bei -20°C aufbewahrt zu werden.

3.3.5 Design eines Primers

Maßgeblich entscheidend für das Gelingen der geplanten real time quantitativen PCR war es zu Beginn, Primer zu designen, die eine möglichst fehlerfreie Amplifikation der zu untersuchenden Gene ermöglichten. Hierzu wurden Funktionen der Webseiten des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und das Programm Primer3 einer Seite des Massachusetts Institute of Technology (MIT) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) benutzt.

Einen effektiven Primer machen mehrere Dinge aus. Zum einen sollte er eine möglichst spezifische Sequenz haben, um nur an den Teil der cDNA zu binden, der amplifiziert werden soll, er sollte zudem keine internen Sekundärstrukturen bilden, wie zum Beispiel

Hairpinstrukturen, die ein Annealing unwahrscheinlicher machen würden und die Primer sollten nicht miteinander Hybridisieren. Es gelten zudem allgemeine Regeln, wie das ein Primer zwischen 18 und 30 Basenpaare haben sollte, dass er auf zwei Exons mit einem dazwischenliegenden Intron liegen sollte und dass am 3'-Ende in den letzten fünf Basen möglichst ein bis zwei Mal Guanidin oder Cytosin vorhanden sein sollten.

Um einen Primer mit diesen optimalen Bedingungen zu erstellen, suchte man zunächst die Sequenz des gewünschten Gens in der Datenbank der NCBI und fügte diese dann auf der bereits genannten Webseite des MIT in Primer3 ein. Im Programm stellte man die gewünschte Produktgröße und die Spezies ein und das Programm zeigte nun mögliche Primerpaare für die gewählte Sequenz an. Um herauszufinden welches Primerpaar das geeignete für die PCR war, mussten die einzelnen Paare auf einer Seite des NCBI auf ihre Gütekriterien überprüft werden. Fand sich ein Paar, welches spezifisch genug für die Sequenz war und zudem über zwei Exons mit einem dazwischenliegenden Intron reichte, musste desweiteren noch überprüft werden, ob der gewählte Abschnitt auf der Sequenz sich für ein Primer Annealing eignete oder ob sich dort evtl. intern Sekundärstrukturen befanden. Zuletzt wurde dann noch die Struktur des Primers auf interne Sekundärstrukturen im Bereich der Enden geprüft. Die Strukturen prüfte man auf der Webseite: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-folding-form>, auf der man folgende Voreinstellungen traf: Natrium Konzentration auf 10mM und Magnesium auf 2,5 mM.

3.3.6 Quantitative real time Polymerasekettenreaktion

Das Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen sollte am Ende eine Quantifizierung der aus den Geweben gewonnenen mRNA sein. Dazu führte man mit den in cDNA umgeschriebenen Proben eine *real time quantitative Polymerasechainreaction* (rt-q-PCR) durch. Das Prinzip einer solchen Form der PCR besteht darin, mittels Fluoreszenz markierter Oligonukleotide in Echtzeit zu messen, wie die Templates sich während der PCR vermehren. Indem man am Ende nun die Fluoreszenzsignale der exponentiellen Amplifikationsphase der PCR wählt und ermittelt nach wie vielen Zyklen diese erreicht werden, erhält man den *cycle threshold* (46). Um anhand des C_T zuverlässige Rückschlüsse auf die Ursprüngliche Templatmenge machen zu können, wurde zuerst eine Standardkurve mit bekannten Templatmengen erstellt. Hierzu wurden Verdünnungsreihen mit 1:10, 1:50, 1:100 und 1:1000 und deren Amplifikationskurven erstellt. Die von diesen Kurven ermittelten C_T -Werte wurden anschließend logarithmisch gegen die bekannten Templatmengen aufgetragen und so ergab

sich die gesuchte Standardkurve, aus der nun ein geeigneter Treshhold für die Amplifikation von unbekannten Templatemengen hervorging.

Als externen Standard wählte man Haushaltsgene (HKG), wie das 18sRNA oder das β -Aktin Gen, die im konstanten Maße in Gewebezellen vorliegen sollten. Die Menge der Testtemplates wurde dann auf die Menge dieser externen Standards bezogen. So konnten Fehler die durch eine ineffiziente cDNA-Synthese oder Probenverunreinigung entstanden ausgeglichen werden(46).

Die für die rt-q-PCRs verwendete Mixtur setzte sich zusammen aus:

Volumen in μL	Reagenz	Konzentration
0,5	Primer sense	10 pmol/ μL
0,5	Primer antisense	10 pmol/ μL
10	Eva Green MM	
8,5	Nuklease freies H_2O	
19,5	Gesamtvolumen	

Tab.3: rt-q-PCR Mixtur

Die Mixtur wurde in 96 Well PCR Platten pipettiert und hinzugegeben wurden jeweils 0,5 μL einer cDNA Probe, wobei jede Probe zwei Mal getestet wurde. Zwei der Wells beinhalteten zusätzlich Volumenansätze ohne eine cDNA Probe, um anschließend eine Verunreinigung der Mixtur ausschließen zu können. Die Platten wurden mit einer durchsichtigen Klebefolie überklebt und im Thermocycler MxPro-Mx3005P zusätzlich mit einer Gummimatte abgedichtet.

3.3.7 Statistische Auswertung der mRNA Quantität mit Prism 5

Um valide Werte für die gemessene Quantität der einzelnen Gene zu erhalten, wurden diese zunächst gemeinsam mit der Effizienz der entsprechenden Primer, sowie der mRNA Quantität der HKG, der jeweiligen Probe und der Primereffizienz des HKGs in einer Exeltabelle aufgetragen und miteinander verrechnet. Die Formel lautete:

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

Die Ergebnisse dieser Kalkulation wurden dann in das Programm Prism5 eingespeist. Für einen übersichtlichen Vergleich zwischen den mRNA Ergebnissen wurde das Säulendiagramm als Format ausgewählt. Um statistische Ausreißer festzustellen und auszusortieren, wurde ein Tool der Website <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm> genutzt. Die statistischen Ausreißer einer jeden Diätgruppe wurden mit der Annahme $\alpha=0,5$ berechnet und aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Anschließend wurde mit dem Programm Graphed Pad Prism 5, Männchen und Weibchen getrennt darauf geprüft, ob eine Normalverteilung in den jeweiligen Gruppen vorlag. Dazu wurde im Programm der Kolmogorov-Smirnov Test, der D'Agostino and Pearson Test und der Shapiro-Wilk Test ausgewählt. Es wurde dann von einer Normalverteilung ausgegangen, wenn die Werte aller vier Diätgruppen eines Geschlechts laut eines Tests normal verteilt waren. Auf eine Gleichheit der Varianzen und statistische signifikante Unterschiede zwischen den Diätgruppen eines Geschlechts, wurde im Falle einer Normalverteilung mit dem Bartlett-Test und dem Dunnett's test of multiple comparison geprüft. Lag hingegen keine Normalverteilung der Werte vor, kamen der Kruskal-Wallis- und der Dunn's- Test zum Einsatz. Wenn über die genannten Tests, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Diätgruppen festgestellt werden konnten, so wurden die in den Säulendiagrammen mit einer Verbindungslinie zwischen den entsprechenden Säulen und die Signifikanz mit Sternchen (*) angegeben. Dabei war $* = p \leq 0,05$ = signifikant, $** = p \leq 0,01$ = sehr signifikant, $*** = p \leq 0,001$ = hoch signifikant.

3.4 Histologie

3.4.1 Red Oil Färbung

Da die Leber histologisch bezüglich ihres Verfettungsgrades beurteilt werden sollte, entschied man sich dafür, eine Red Oil Färbung vorzunehmen. Bei dieser Färbung werden Fetttropfen leuchtend rot angefärbt. Für diese Art der Färbung wurden Gefrierschnitte der Leber in einem Kryomaten angefertigt wurden. Die Schnitte wurden aufbewahrt bei -20°C .

Zur Färbung der Gefrierschnitte wurde zunächst eine 60%ige Thiethylphosphatlösung mit 200mL TEP und 130mL destilliertem H_2O erstellt. Es wurden 1,6g Oil Red Pulver beigemischt. Dieser Stocksolution wurden nach vollständigem Lösen des Oil Red weitere 225mL ad hinzugefügt und die gesamte Lösung wurde mit Hilfe von Filterpapier filtriert, um gröbere, nicht gelöste Partikel des Pulvers rauszufiltern.

Währenddessen ließ man die Gefrierschnitte für 1h bei Raumtemperatur trocknen. Sofort im Anschluss tauchte man sie zunächst zehn Mal in eine 4%ige Formaldehydlösung, dann drei Mal in destilliertes Wasser und schließlich ließ man sie für 1h bei Raumtemperatur in der Red Oil Lösung baden. Im Anschluss daran wurden die Präparate drei Mal für 30 Sekunden mit destilliertem Wasser gewaschen und dann sechs Mal hintereinander in Hämatoxylin Lösung getaucht. Zuletzt ließ man die Schnitte unter fließendem Wasser für eine Minute bläuen.

3.4.2 Auswertung

Da durch die Red Oil Färbung ausschließlich die Fettderivate in der Leber rot angefärbt wurden, konnte man für eine Quantifizierung ein Verfahren verwenden, bei dem das Computerprogramm Image J den Anteil der roten Flächen des Bildes maß. Dazu stellte man sich mit dem Mikroskop bei einer Vergrößerung 400 ein geeignetes Gesichtsfeld ein und fotografierte dieses. Pro Tier gab es 5 Gefrierschnitte, sodass sich am Ende 5 Bilder pro Versuchstier ergaben, die unterschiedliche Ausschnitte der Leber präsentierten. Später wurden die einzelnen Fotos mit dem Programm Image J geöffnet. Dort wurde das Bild zunächst in einzelne Farbkanäle gesplittet. Für die Analyse der roten Flächen eignete sich besonders der blaue Farbkanal. Mit dem Programm legte man anschließend einen roten Filter über das Bild, der die histologisch roten Flächen rot anfärbte, den Treshold konnte man nun noch manuell adjustieren, um möglichst alle roten Fettpunkte auf dem histologischen Bild auch im Analysefenster rot angefärbt zu haben. Anschließend wurde mit dem Programm der Anteil der roten Fläche gemessen. Aus den fünf gemessenen Bildern wurde ein Mittelwert für jedes Tier erstellt. Anhand dieser Mittelwerte wurde zum statistischen Vergleich auch hier ein Säulendiagramm mit Hilfe des Programms Graphed Pad Prism 5 erstellt. Die statistischen Tests wurden genauso angewendet, wie unter 3.3.7 bereits beschrieben und auch für die Markierung der Signifikanz gilt dasselbe wie in 3.3.7. Das Säulendiagramm veranschaulicht, zusätzlich zu den Fotografien der Leberschnitte, den unterschiedlichen Verfettungsgrad der Lebern aus den Diätgruppen und zeigt außerdem objektive statistische Signifikanz.

4 Ergebnisse

4.1 Kennzeichnung der Signifikanz

In den im folgenden Abschnitt gezeigten Graphen, werden zur Veranschaulichung der Signifikanz zwischen den Gruppen, als Symbol Sternchen (*) verwendet. Hierbei gilt immer folgendes: $p < 0,001 = ***$, $p < 0,01 = **$, $p < ,5 = *$

4.2 Phänotyp

4.2.1 Längenwachstum

Bezüglich des Längenwachstums von Nasenspitze bis zum Schwanzansatz der Versuchstiere, war bei keiner der experimentellen Diäten eine signifikante Änderung gegenüber der Referenzdiät zu verzeichnen.

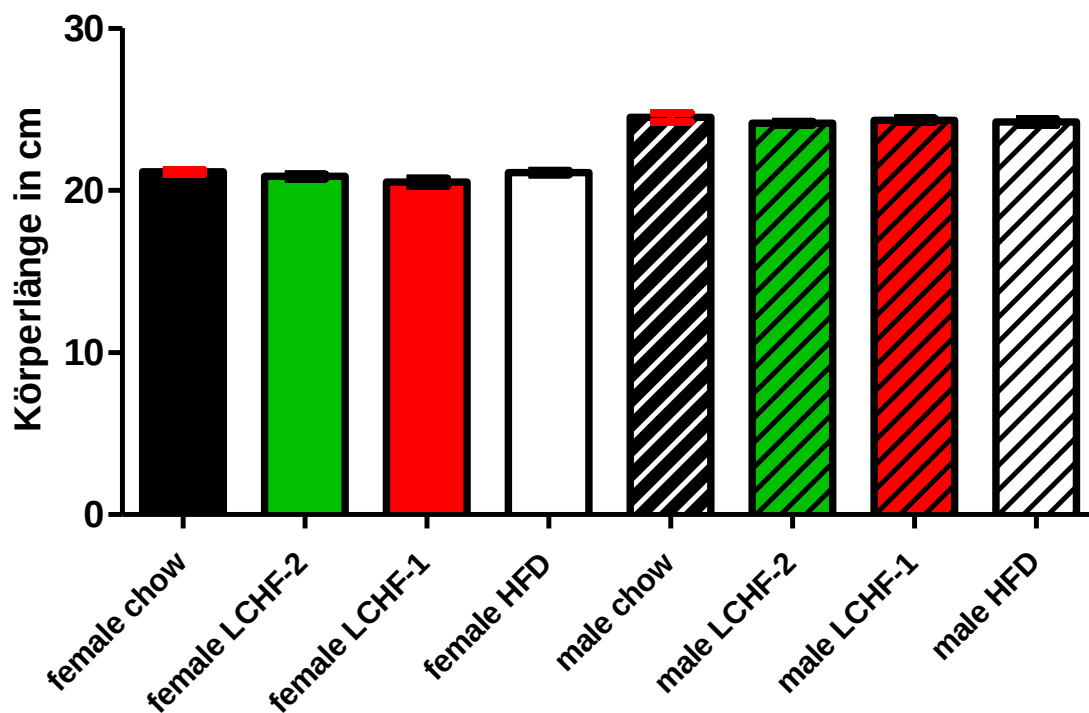


Abb.2: Körperlänge in cm am 28. Versuchtag, Weibchen und Männchen, keine Signifikanz ($p > 0,05$) bei beiden Geschlechtern (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Jedoch konnte bei den weiblichen Tieren eine signifikant verkürzte Femurlänge in der LCHF-1 Diät und bei den männlichen Tieren in beiden LC - Diäten eine signifikant verkürzte Tibialänge nachgewiesen werden.

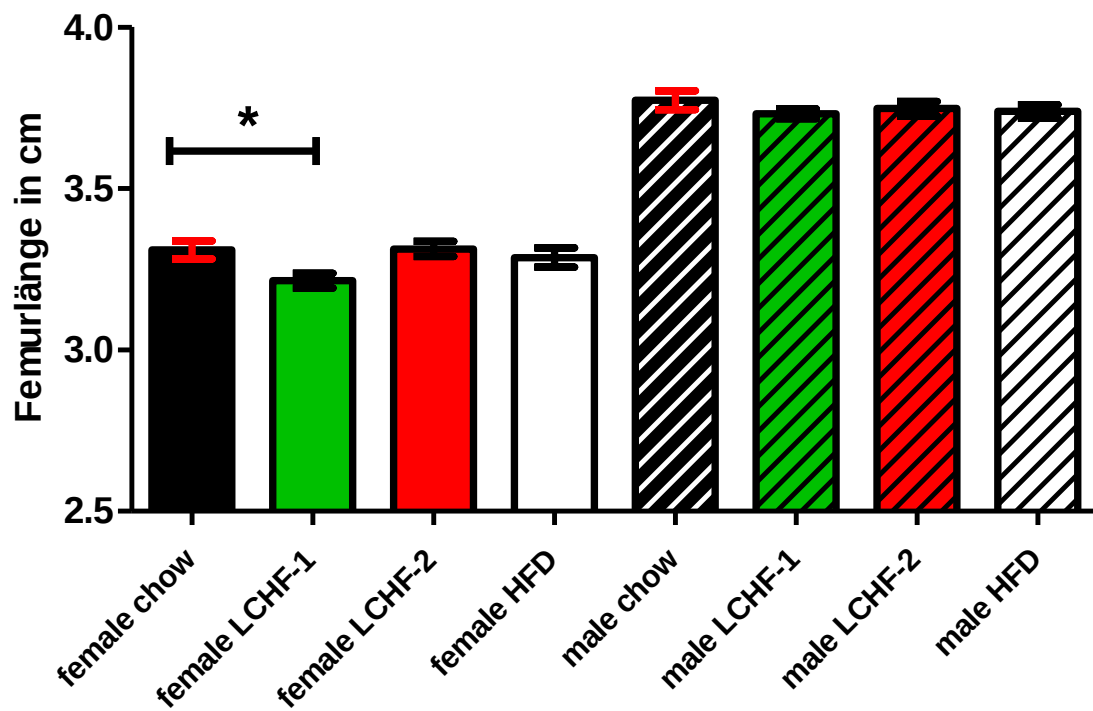


Abb.3: Femurlänge in cm, mit Signifikanz (*) (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Ergebnisse

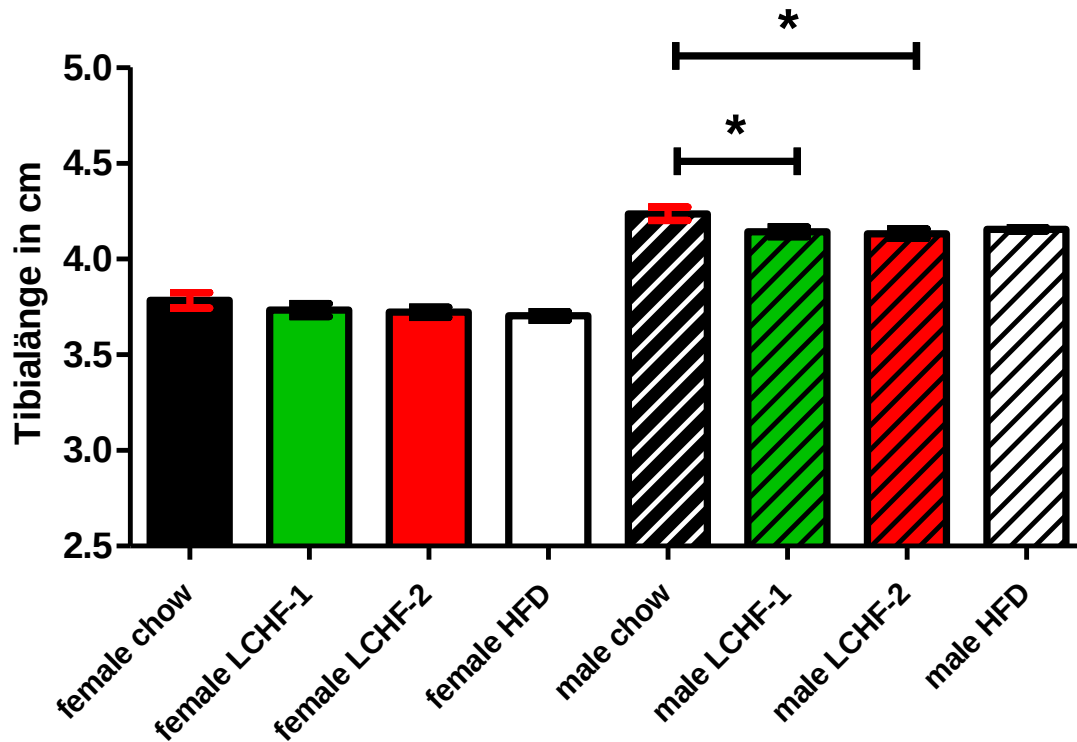


Abb.4: Tibiallänge in cm mit Signifikanzen (*) (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Sex	Merkmal	Chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
Female	Körperlänge (M und SD)	21,14 cm ± 0,378	20,86 cm ± 0,378	20,5 cm ± 0,646	21,1 cm ± 0,346
	Femurlänge (M und SD)	3,31 cm ± 0,074	3,21 cm ± 0,059 *	3,31 cm ± 0,061	3,29 cm ± 0,079
	Tibiallänge (M und SD)	3,78 cm ± 0,107	3,73cm ± 0,091	3,72 cm ± 0,072	3,7 cm ± 0,059
Male	Körperlänge (M und SD)	24,5 cm ± 0,707	24,14 cm ± 0,244	24,33 cm ± 0,258	24,21 cm ± 0,488
	Femurlänge (M und SD)	3,77 cm ± 0,078	3,75 cm ± 0,04	3,73 cm ± 0,055	3,74 cm ± 0,054
	Tibiallänge (M und SD)	4,24 cm ± 0,091	4,14 cm ± 0,067 *	4,13 cm ± 0,061 *	4,15 cm ± 0,021

Tab.4: M und SD für Körper-, Femur- und Tibiallänge mit Signifikanz (*)

4.2.2 Körpergewicht

Alle vier Diät-Gruppen beider Geschlechter nahmen während der 28 Tage erwartungsgemäß an Körpergewicht (KG) zu, die Männchen mehr als die Weibchen. Die sog. lean body mass, die dem fettfreien Anteil des Körpergewichts entspricht, ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede beim absoluten

Körpergewicht am letzten Versuchstag. Jedoch unterschied sich teilweise signifikant wie viel Gewichtszunahme in den Diätgruppen im Vergleich zu der Chowgruppe stattfand. Es nahmen sowohl in der Gruppe der Weibchen als auch in der der Männchen, die Tiere, die mit der Chowdiät gefüttert wurden, das meiste Gewicht zu. Mit absteigendem Kohlenhydrat- und zunehmenden Fettanteil, folgten, bei beiden Geschlechtern, die weiteren Diäten. Die HCHF Diät, die LCHF-1 Diät und mit dem niedrigsten Kohlenhydrat- und dem höchsten Fettanteil, die geringste Gewichtszunahme über 28 Tage, die LCHF-2 Diät. Bei den Männchen war die Gewichtszunahme in allen experimentalen Gruppen signifikant niedriger als in der Chowgruppe. Bei den Weibchen war die Gewichtszunahme nur in den LC Diäten signifikant niedriger als in der Chowdiät.

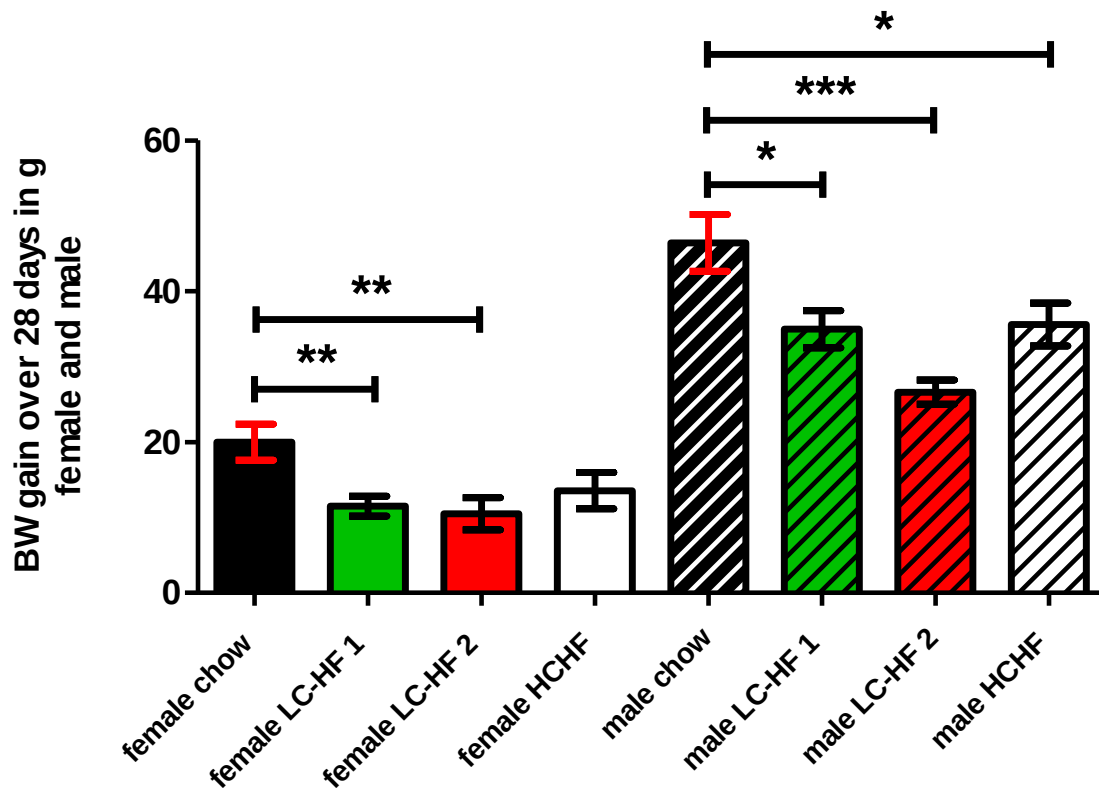


Abb.5: Absolute Gewichtszunahme in g über die 28 Versuchstage mit SD und Signifikanz * bei Weibchen und Männchen (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Sex	Merkmal	Chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
Female	KG über 28 Tage (M und SD)	19,99 g ± 8,539	11,51 g ± 3,713 **	10,48 g ± 6,790 **	13,56 g ± 7,262
Male	KG über 28 Tage (M und SD)	46,4 g ± 11,29	34,96 g ± 7,421 *	26,62 g ± 5,027 ***	35,6 g ± 8,503 *

Tab.5: M und SD für KG mit Signifikanz (*).

4.3 Gewicht der Fettdepots

Es wurden die Fettdepots perirenal, perioverial bzw. epididymal und inguinal bei Versuchsabschluss entnommen und gewogen. Das Gewicht des perirenalen Fettdepot war dabei sowohl in der weiblichen als auch in der männlichen Kohorte in beiden LC-Gruppen, nicht aber in der HCHF-Gruppe, signifikant gegenüber der Kontrollgruppe („Chow“) erhöht. Das Gewicht des periovarialen Fettdepots war bei Weibchen ebenfalls in beiden LC-Gruppen erhöht, jedoch nur in der LCHF 2-Gruppe mit einem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Interessanterweise war dagegen das Gewicht des epididymalen Fettdepots bei den Männchen im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen HF-Diätgruppen erniedrigt. Ein signifikanter Unterschied bestand hierbei zwischen der Kontrollgruppe und der LCHF1 sowie der HCHF-Gruppe. Beim Gewicht des inguinalen Fettdepots zeigte sich allenfalls ein Trend zu höherem Gewicht unter HF-Diäten im Vergleich zur Kontrollgruppe bei beiden Geschlechtern, der jedoch nicht signifikant war.

Ergebnisse

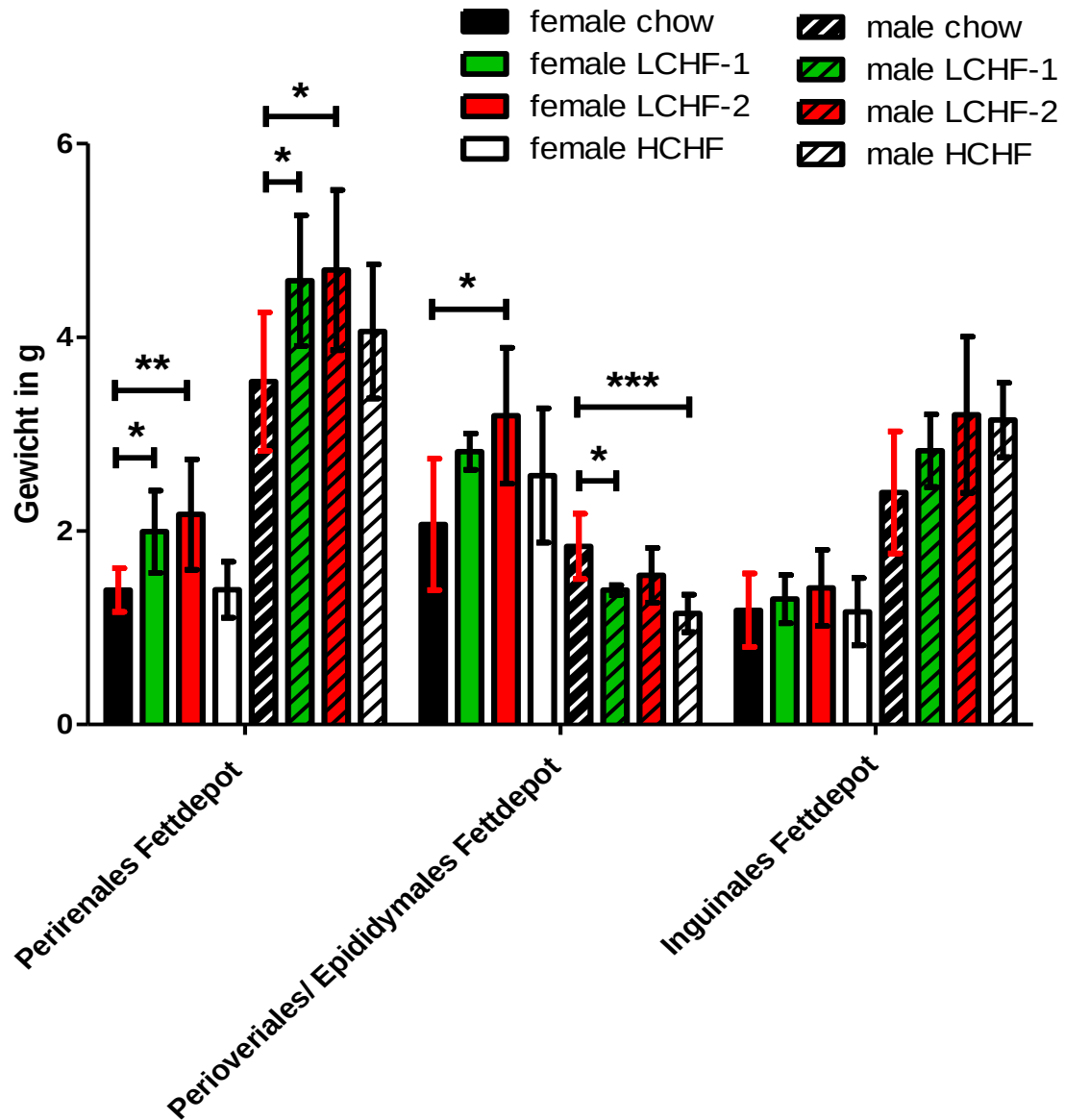


Abb. 6: Gewicht in g der Fettdepots perirenal, periovarial/ epididymal und inguinal mit Signifikanz (*) (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Sex	Merkmal	Chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
Female	Fettdepot perirenal in g (M und SD)	1,390 ± 0,2244	1,992 ± 0,4243 *	2,169 ± 0,5691 **	1,393 ± 0,2882
	Fettdepot perioverial in g (M und SD)	2,068 ± 0,6794	2,819 ± 0,1868	3,190 ± 0,7018 *	2,572 ± 0,6931
	Fettdepot inguinal in g (M und SD)	1,182 ± 0,3787	1,296 ± 0,2493	1,411 ± 0,3941	1,165 ± 0,3487
Male	Fettdepot perirenal in g (M und SD)	3,543 ± 0,7160	4,585 ± 0,6726 *	4,695 ± 0,8273 *	4,061 ± 0,6918
	Fettdepot epididymal in g (M und SD)	1,841 ± 0,3364	1,391 ± 0,0505 *	1,542 ± 0,2816	1,148 ± 0,1951 *
	Fettdepot inguinal in g (M und SD)	2,398 ± 0,6303	2,828 ± 0,3753	3,200 ± 0,8066	3,145 ± 0,3843

Tab.6: M und SD für die angegebenen Fettdepots in g mit Signifikanz (*).

4.4 GH-IGF-I-Achse

4.4.1 GH Serumparameter

Die 10 über 5 Stunden entnommenen Blutproben erlaubten es, GH-Sekretionsprofile zu erstellen. Es zeigte sich generell ein eher pulsatile Sekretionsmuster mit hohen Amplituden und sehr tiefen Tiefpunkten für die Männchen und für die Weibchen eine eher kontinuierliche Sekretion mit höheren Tiefpunkten und niedrigeren Amplituden. Die Abbildungen 7a-d stellen beispielhaft für jede Diätgruppe je ein repräsentatives Profil eines Männchens und eines Weibchens dar.

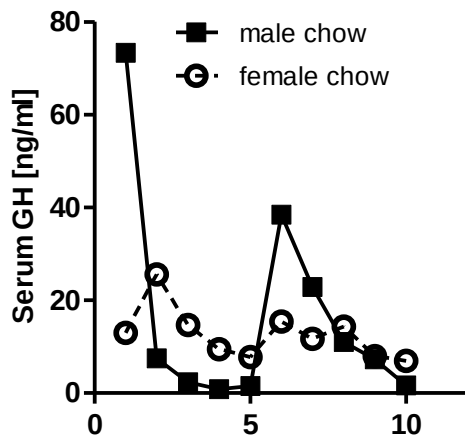


Abb.7a: GH Sekretionsverlauf über 5 h in chow Diät, bei m. u. w.

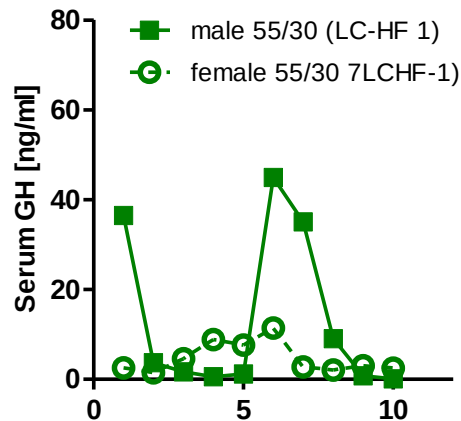


Abb.7b: GH Sekretionsverlauf über 5 h in LCHF-1 Diät, bei m. u. w

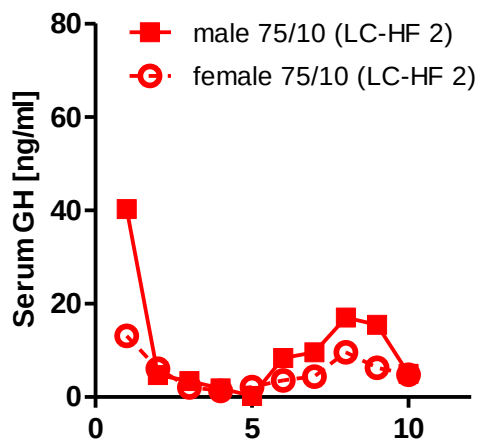


Abb.7c: GH Sekretionsverlauf über 5 h in der LCHF-2 Diät, bei m u. w

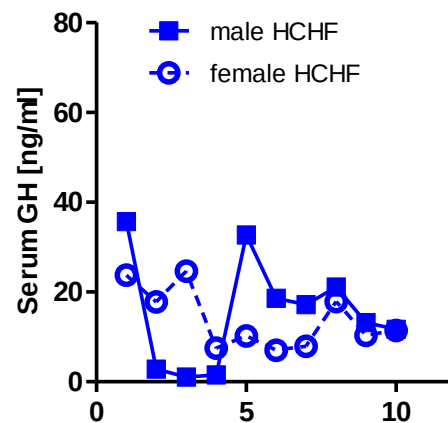


Abb.7d: GH Sekretionsverlauf über 5 h in der HCHF- Diät, bei m u. w.

Der Einfluss der Experimentaldiäten bezog sich nicht auf das Sekretionsmuster, sondern auf die Sekretionsmenge des GH. Aufgrund der nicht-synchronen Sekretionspeaks mit großer Amplitude ist die Auswertung derartiger GH-Profile über Mittelwerte wenig sinnvoll. Stattdessen bediente man sich sogenannter „Rank-Plots“, bei denen alle gemessenen Werte der Höhe nach gereiht („rangiert“) wurden und dann dem Rang nach nebeneinander aufgetragen worden (mit dem niedrigsten Wert auf der linken und dem höchsten auf der rechten Seite) sind. Zunächst bestätigte sich der bekannte Befund, dass bei den Männchen deutlich höhere Einzelwerte gemessen wurden als bei den weiblichen Tieren. Bei den

Ergebnisse

weiblichen Tieren war deutlich zu sehen, dass in den Gruppen mit LC-Diäten über einen weiten Rangbereich jeweils weniger GH sezerniert wurde als in der Chowdiät. In der Gruppe der LCHF-2 Diät ist dies sogar bei den Sekretionsspitzen (Ränge ganz rechts) noch deutlich erkennbar. Interessanterweise war eine vergleichbare Suppression der GH-Sekretion bei der HCHF-Diät (blaue Kurve) nicht zu sehen. Bei den Männchen zeigten sich wenig Differenzen bei den niedrigen Rängen, jedoch wurden unter allen HF Diäten gerade bei den hohen Rängen (rechts) durchwegs weniger hohe GH Werte gemessen als in der Chowdiät.

Die im Folgenden gezeigten Graphen beinhalten die GH-Werte jeweils zweier zusätzlicher Tiere pro Diätgruppe. Diese Tiere wurden mit dem exakt selben Futter und nach der selben Fütterungsmethode gefüttert und waren im selben Alter, gehörten jedoch dem 2. Versuchsteil an. Da auch bei diesen Tieren GH-Serienblutabnahmen nach dem Exakt selben Procedere entnommen wurden wie bei den Tieren des 1. Versuchsteils, konnten die GH-Serumwerte in unseren Graphen miteinfließen. Daher gilt bei den Weibchen in jeder Gruppe n=9, bei den Männchen in allen Gruppen außer LCHF-2 n=9, in LCHF-2 n=8.

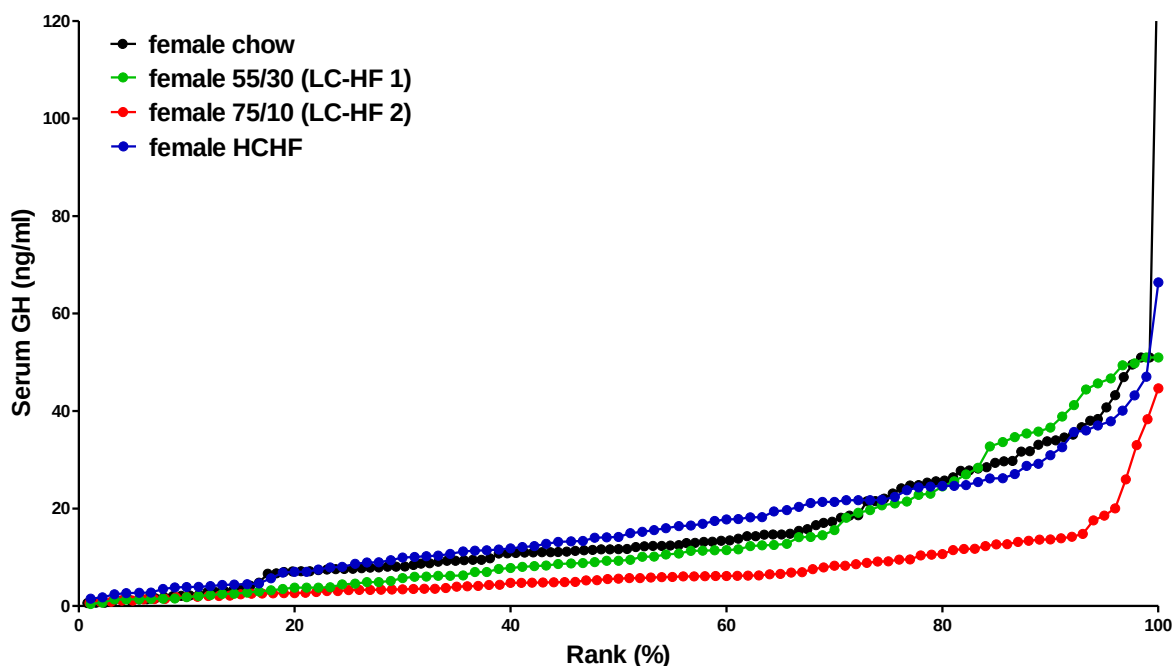


Abb.8a: Sämtliche GH-Werte aller weiblicher Tiere vom jeweils geringsten bis zum jeweils höchsten Wert einer Diätgruppe.

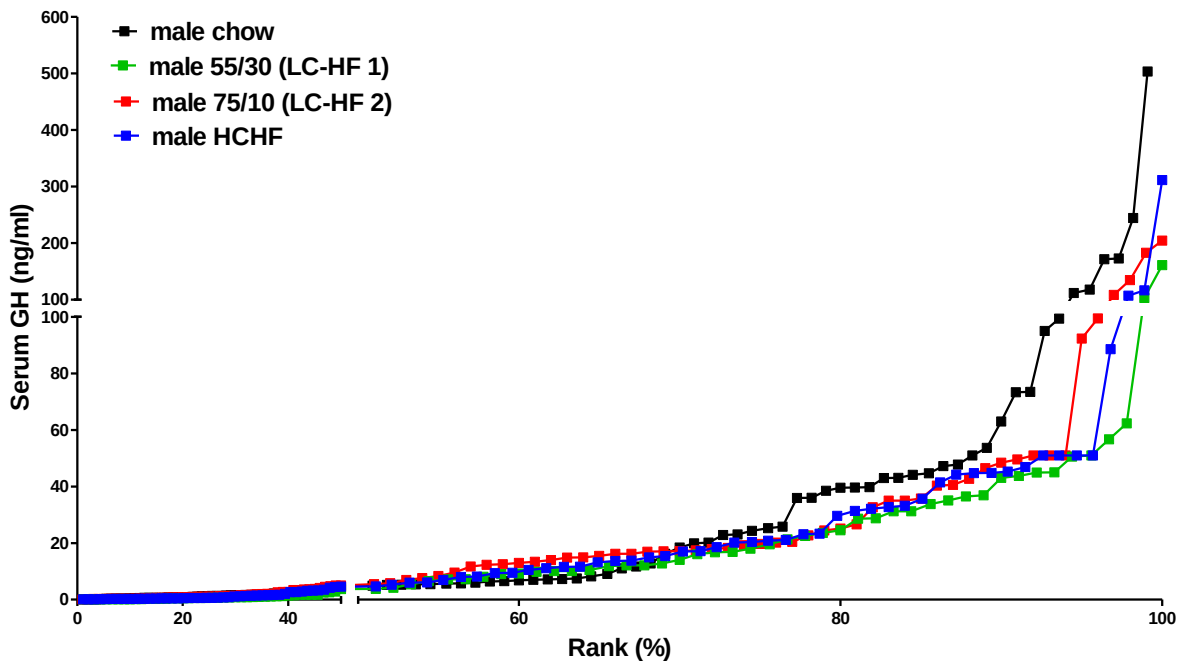


Abb.8b: Sämtliche GH-Werte aller männlichen Tiere vom jeweils geringsten bis zum jeweils höchsten einer Gruppe.

Bei der Betrachtung der AUC der einzelnen Diätgruppen wurden die schon beobachteten Trends weiter bestätigt. In der Chowdiät kam es bei den männlichen Tieren zu deutlich höheren GH-Serumwerten als bei den weiblichen Tieren. Während bei den Männchen alle HF Diäten gegenüber der Chowdiät signifikant erniedrigte GH Werte aufwiesen, war der ebenfalls erkennbare deutliche Trend zu niedrigeren GH-Werten bei den weiblichen Tieren lediglich in der LCHF-2 Diät signifikant.

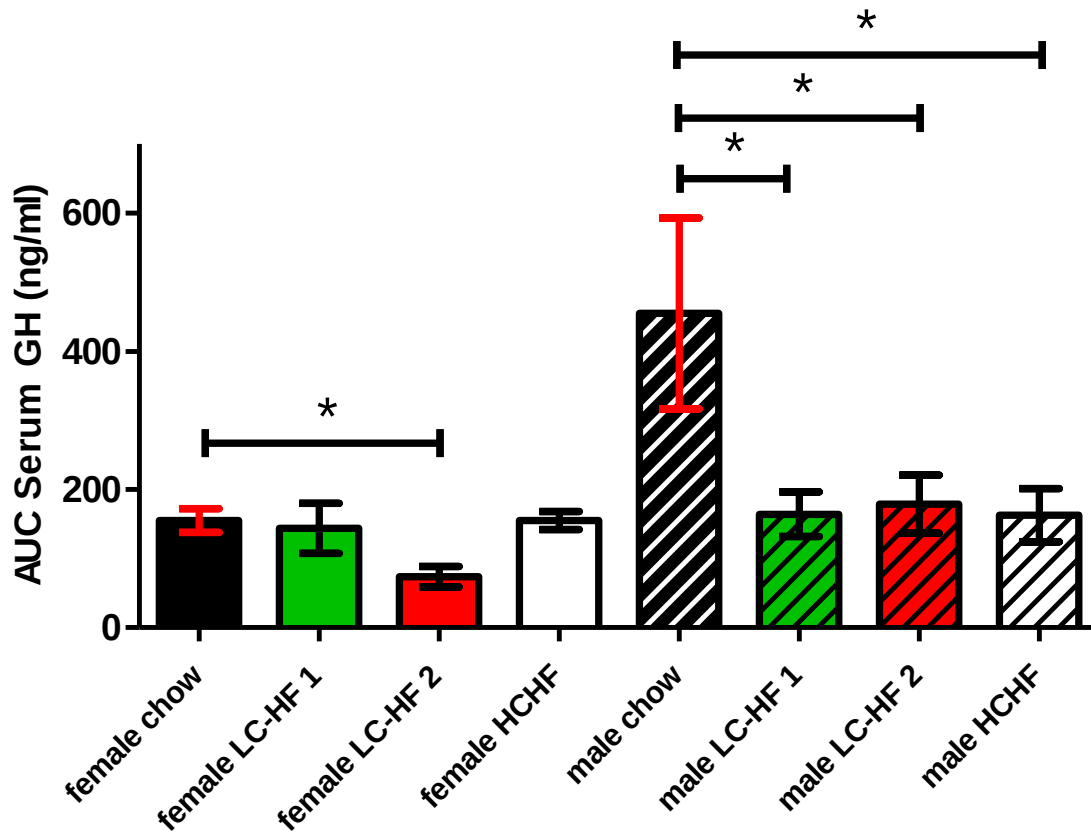


Abb.8c: AUC aus den GH-Rank-Graphen der jeweiligen Diätgruppen. Mit Signifikanz *.

Sex	Merkmal	chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
Female	GH Serum in ng/mL (M und SD)	155,2 ± 51,70	143,7 ± 109,3	73,77 ± 48,45 *	154,9 ± 45,32
Male	GH Serum in ng/mL (M und SD)	455,2 ± 308,8	178,9 ± 126,2 *	164,2 ± 97,07 *	162,7 ± 115,0 *

Tab.7: M und SD für AUC der GH Serum Werte mit Angabe der Signifikanz (*)

4.4.2 GHRH-Rezeptorexpression in der Hypophyse

Bei Weibchen und Männchen war die mRNA Expression des GHRH-R tendenziell unter allen HF Diäten niedriger als unter der Referenzdiät. Signifikant war bei den Weibchen der Unterschied der HCHF-Diät zur Chowdiät und bei den Männchen der Unterschied der ketogenen LCHF-2 Diät zu Chow.

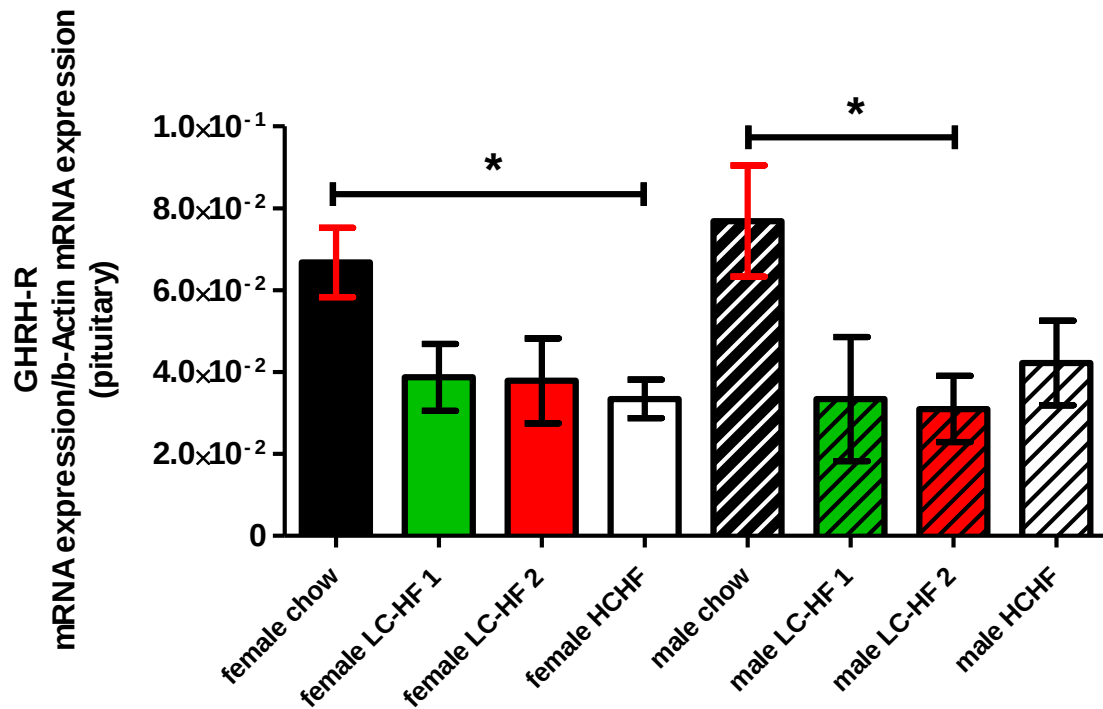


Abb.9: mRNA Expression des GHRH-R Gens in der Hypophyse bei w. u. m. mit Signifikanz (*) (Wegen statistischer Outlier teilweise verändertes n: female chow n=7, female LCHF1 n=6, female LCHF-2=7 female HCHF n=7, male chow n=7, male LCHF-1 n=6, male LCHF-2 n=6, male HCHF n=7)

Sex	Merkmal	Chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
female	GHRH-R der Hypophyse (M und SD)	0,067 ± 0,0224	0,038 ± 0,0232	0,038 ± 0,0217	0,033 ± 0,0124 *
male	GHRH-R der Hypophyse (M und SD)	0,077 ± 0,0360	0,031 ± 0,0213	0,033 ± 0,0262 *	0,042 ± 0,0273

Tab.8: M und SD der GHRH-R Expression in der Hypophyse normalisiert auf das Housekeeping Gen β -Aktin, mit Signifikanz (*)

4.4.3 GH-Rezeptorexpression in der Leber

Die mRNA Expression des GH-Rezeptorgens in der Leber war bei beiden Geschlechtern in allen HF Diäten erniedrigt. Einen signifikanten Unterschied gab es nur zwischen der Chow- und der ketogenen LCHF-2 Diät bei den Männchen.

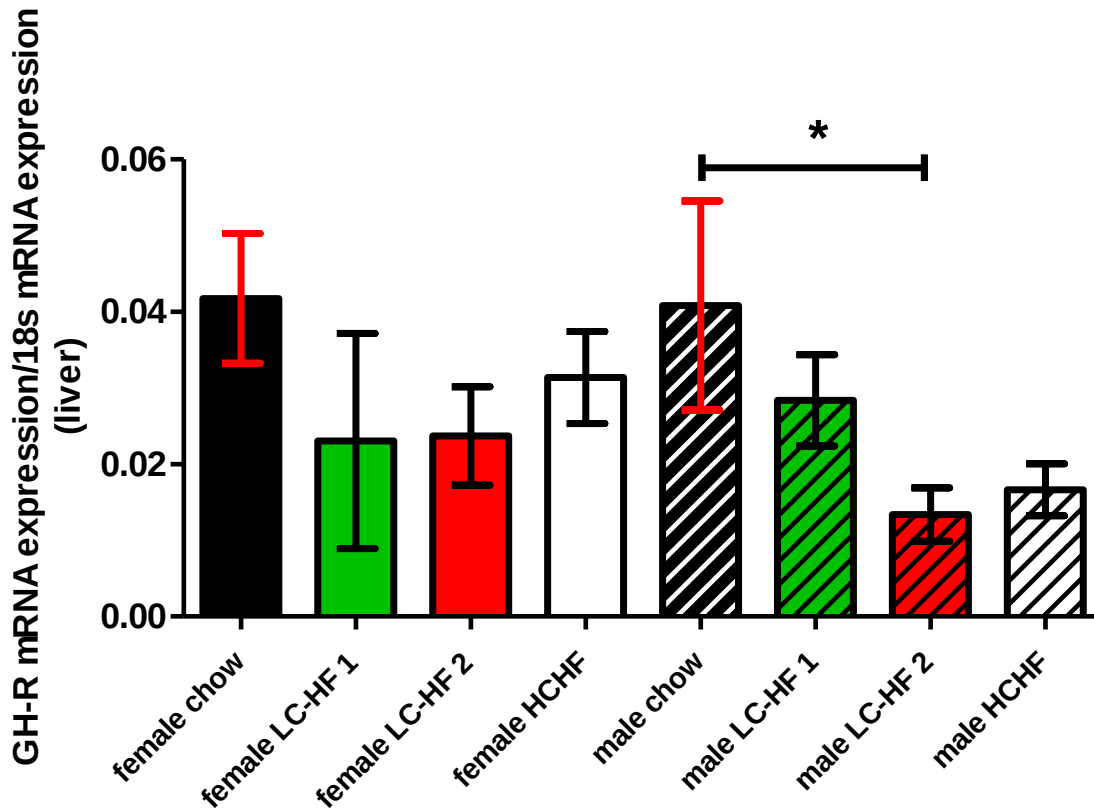


Abb.10: mRNA Expression des GH-Rezeptors in der Leber bei w. u. m. mit Signifikanz (*) Wegen statistischer Outlier teilweise verändertes n: female chow n=7, female LCHF1 n=7, female LCHF-2=6 female HCHF n=7, male chow n=6, male LCHF-1 n=7, male LCHF-2 n=6, male HCHF n=6)

Sex	Merkmal	chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
Female	GH-R der Leber (M und SD)	0,0418 ± 0,02687	0,0231 ± 0,03462	0,0237 ± 0,01826	0,0314 ± 0,01601
Male	GH-R der Leber (M und SD)	0,0408 ± 0,03359	0,0284 ± 0,01339	0,0134 ± 0,00931 *	0,0166 ± 0,00898

Tab.9: M und SD für GH-R m-RNA Expression in der Leber normalisiert auf das Housekeeping-Gen 18s, mit Signifikanz (*).

4.4.4 IGF-I Serumparameter

Das im Serum bestimmte IGF-I war bei beiden Geschlechtern, in allen HF Diäten verglichen zur Referenzdiät erniedrigt. Zudem waren die Werte bei den Männchen stets höher. Damit reflektiert das IGF-I die erniedrigten GH-Serum Spiegel. Ein signifikanter Unterschied bestand

Ergebnisse

bei den Männchen zwischen der Referenzgruppe und allen HF Diätgruppen und bei den Weibchen nur zwischen Referenzgruppe und der ketogenen LCHF-2 Diät.

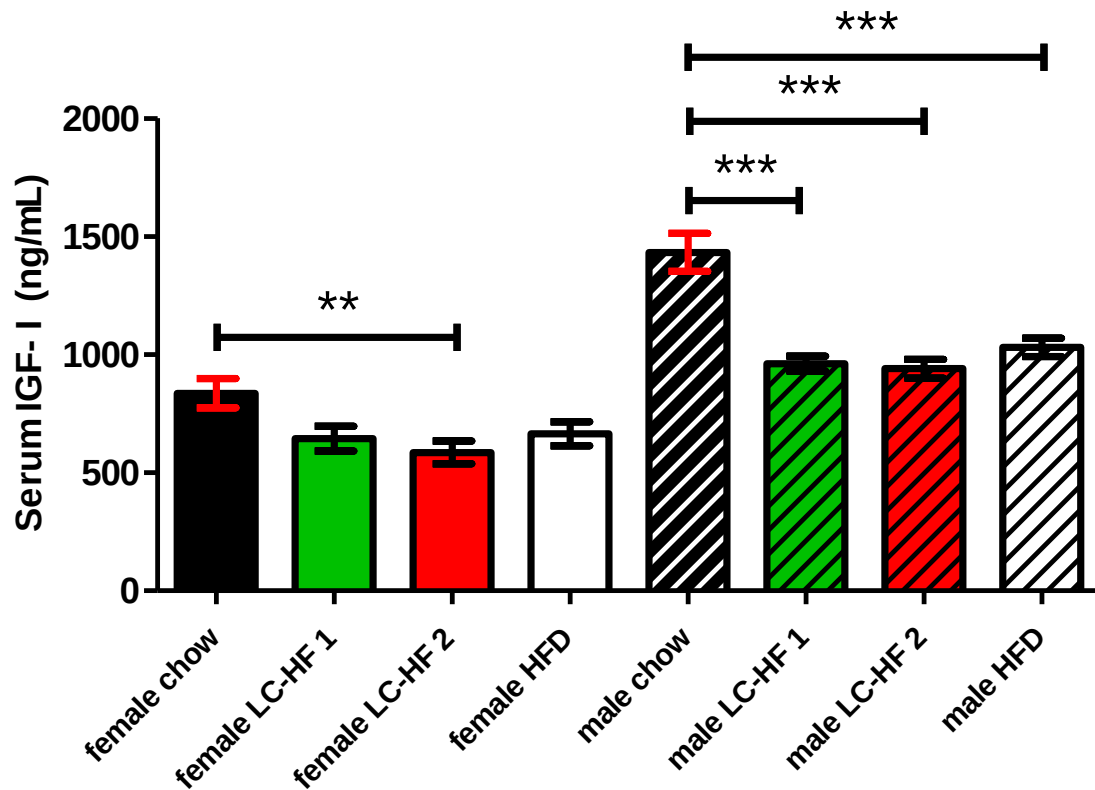


Abb.11: Serum IGF-I Werte in ng/mL für w. u. m. mit Signifikanz (*) (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Sex	Merkmal	chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
female	Serum IGF-I ng/mL(M und SD)	836,1 ± 222,7	643,9 ± 156,4	585,8 ± 173,7 **	664,6 ± 161,1
male	Serum IGF-I ng/mL (M und SD)	1453 ± 242,2	961,9 ± 77,1 ***	940,2 ± 105,5 ***	1030 ± 102,4 ***

Tab.10: M und SD für Serum IGF-I in ng/mL mit Signifikanz (*).

4.5 Untersuchung der Leber hinsichtlich einer möglichen nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung

4.5.1 Serumchemie

Das Serumcholesterol war bei den weiblichen Tieren ohne systematische Abweichung zwischen den Gruppen relativ konstant, allein in der HCHF Diätgruppe zeigten sich zumindest statistisch signifikant etwas niedrigere Werte als in der Chowgruppe. Bei den männlichen Tieren wurden die höchsten Serumcholesterolwerte in der LCHF-1 Diät gemessen, jedoch waren auch hier die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant.

Die Serumtriglyceride waren bei den Männchen in allen Experimentaldiäten mit hohem Fettanteil signifikant gegenüber der Chowgruppe erhöht. Bei den beiden LCHF-Diäten fiel die Signifikanz deutlich bis sehr deutlich aus. Bei den Weibchen hingegen gab es keine signifikanten Unterschiede trotz Trend zu höheren Werten unter LCHF-Diäten.

Ergebnisse

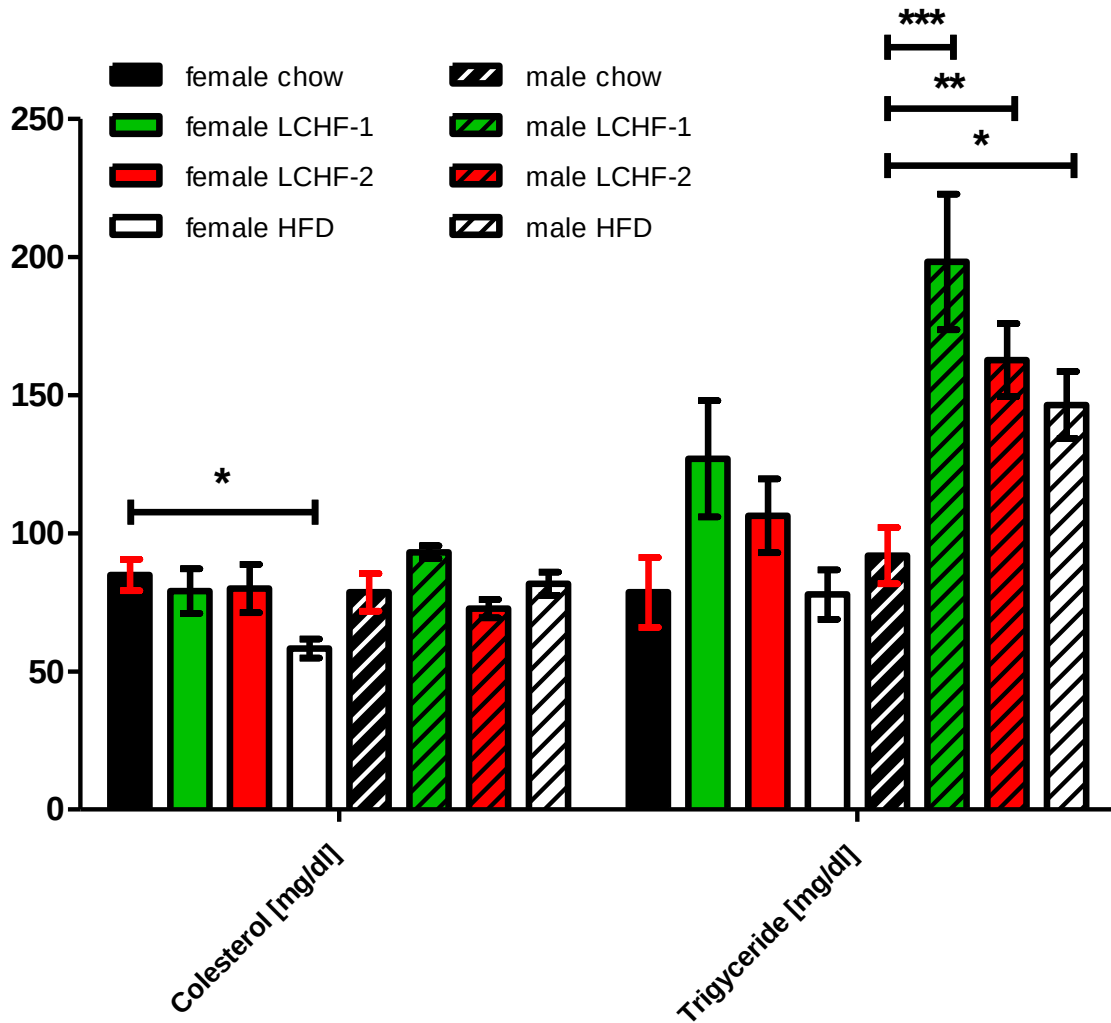


Abb.12: Serumcholesterol und Serumtriglyceride bei Weibchen und Männchen mit Signifikanz (*).

(n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Sex	Merkmal	chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
female	Serumcholesterol mg/dL (M und SD)	84,94 ± 15,10	79,06 ± 21,35	79,95 ± 23,08	58,33 ± 9,118 *
	Serumtriacylglyceride mg/dL (M und SD)	78,63 ± 33,50	127,0 ± 55,56	106,3 ± 35,46	77,84 ± 23,73
male	Serumcholesterol mg/dL (M und SD)	78,63 ± 18,09	79,86 ± 35,59	72,71 ± 8,854	81,74 ± 11,26
	Serumtriacylglyceride mg/dL (M und SD)	91,94 ± 27,03	198,3 ± 60,14 ***	162,7 ± 35,10 **	146,4 ± 32,20 *

Tab.11: M und SD für die Serumparameter Cholesterol und TAGs mit Signifikanz (*)

Das Gesamtprotein war bei beiden Geschlechtern in allen experimentellen HF-Diät-Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt. Bei den Weibchen wurden die niedrigsten Werte in der LCHF-1 Diät gemessen, bei den Männchen in der ketogenen LCHF-2 Diät. Parallel zum Gesamtprotein verhielt sich das Gesamtalbumin, welches in allen experimentellen HF-Diät-

Gruppen erniedrigt war. Statistisch signifikant waren hier die Unterschiede zur Kontrollgruppe bei den Weibchen allerdings nur bei den beiden LCHF-Diäten und bei den Männchen bei der LCHF-1 Diät und der HCHF Diät. Am prozentualen Anteil des Albumins am Gesamtprotein, gab es bei beiden Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Experimentaldiäten.

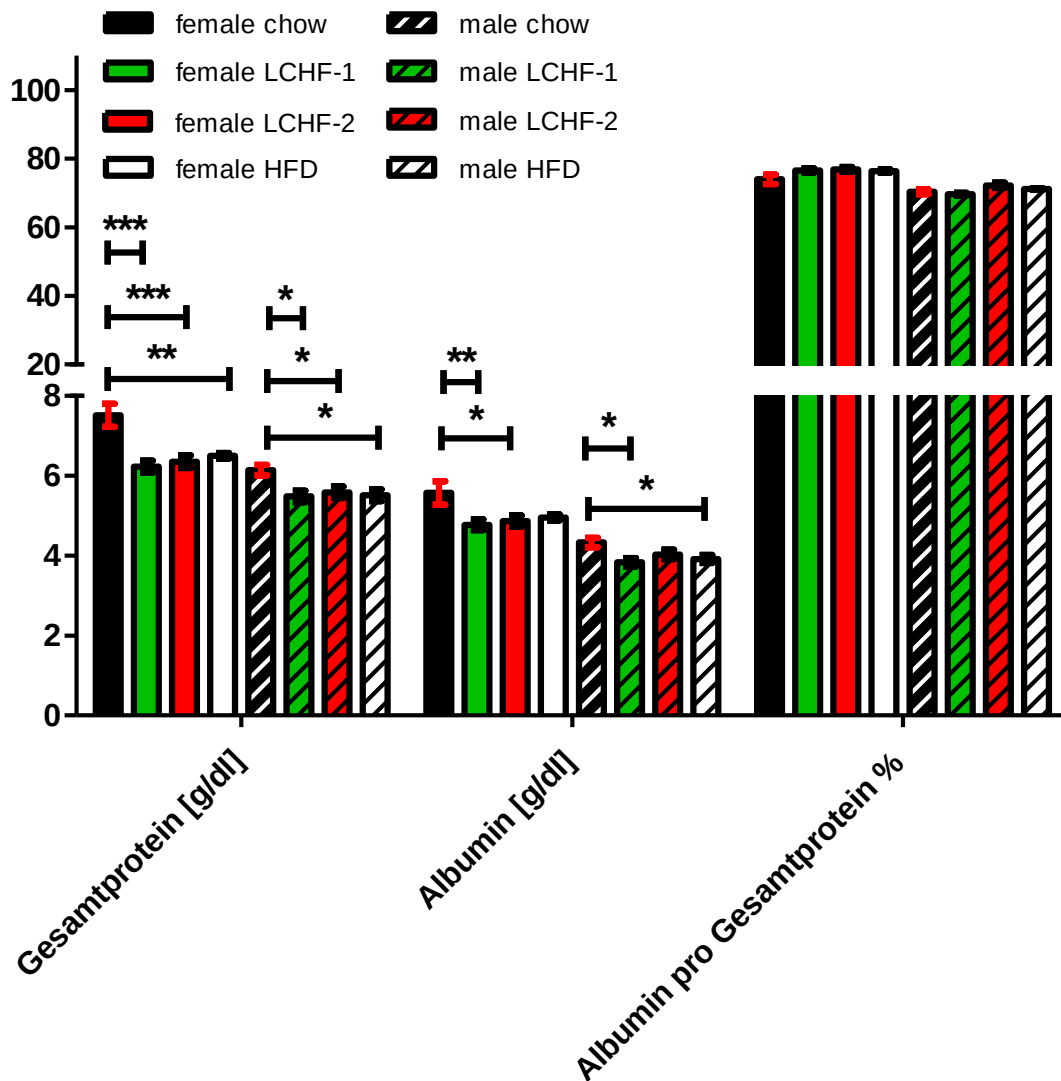


Abb. 13: Überblick über im Serum gemessenes Gesamtprotein und Gesamtalbumin und abschließend den Anteil des Albumins am Gesamtprotein, mit Signifikanz (*). (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Ergebnisse

Sex	Merkmal	chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
female	Serumgesamtprotein g/dL (M und SD)	7,00 ± 0,8155	6,009 ± 0,4826 ***	6,075 ± 0,4413 ***	5,875 ± 0,8081 **
	Serumgesamtalbumin g/dL (M und SD)	5,571 ± 0,7783	4,171 ± 1,866 *	4,771 ± 0,3546 **	4,957 ± 0,1902
	Albuminanteil am Gesamtprotein % (M und SD)	73,97 ± 3,614	76,57 ± 1,645	65,90 ± 29,10	76,37 ± 1,230
male	Serumgesamtprotein g/dL (M und SD)	6,075 ± 0,3770	5,400 ± 0,3916 *	5,430 ± 0,4138 *	5,456 ± 0,3575 *
	Serumgesamtalbumin g/dL (M und SD)	4,329 ± 0,3039	3,833 ± 0,2503 *	4,029 ± 0,3147	3,914 ± 0,2673 *
	Albuminanteil am Gesamtprotein % (M und SD)	70,36 ± 1,930	69,67 ± 0,9668	72,21 ± 2,051	71,17 ± 0,5314

Tab.12: M und SD der Serumparmeter Gesamtprotein und Albumin sowie dem Anteil des Albumins am Gesamtprotein mit Signifikanz (*)

Die Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) wurden ebenfalls im Serum bestimmt. Während die ALT bei beiden Geschlechtern in allen Experimental- und signifikant in beiden LCHF-Diäten erhöht war, war die AST bei beiden Geschlechtern in sämtlichen Gruppen erhöht. Bei den Weibchen am höchsten in der Kontrollgruppe, alle Experimentalgruppen wiesen geringere Werte auf. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der HCHF-Diät war signifikant. Bei den Männchen waren die Werte der Experimentaldiäten höher als die der Kontrollgruppe. Die höchsten wurde in der LCHF-2 Diät gemessen, insgesamt gab es keine signifikanten Unterschiede. Der Referenzbereich für ALT bei Wistarratten liegt bei 35 U/L ± 10 U/L und für AST bei 70 U/L ± 16 U/L.

Ergebnisse

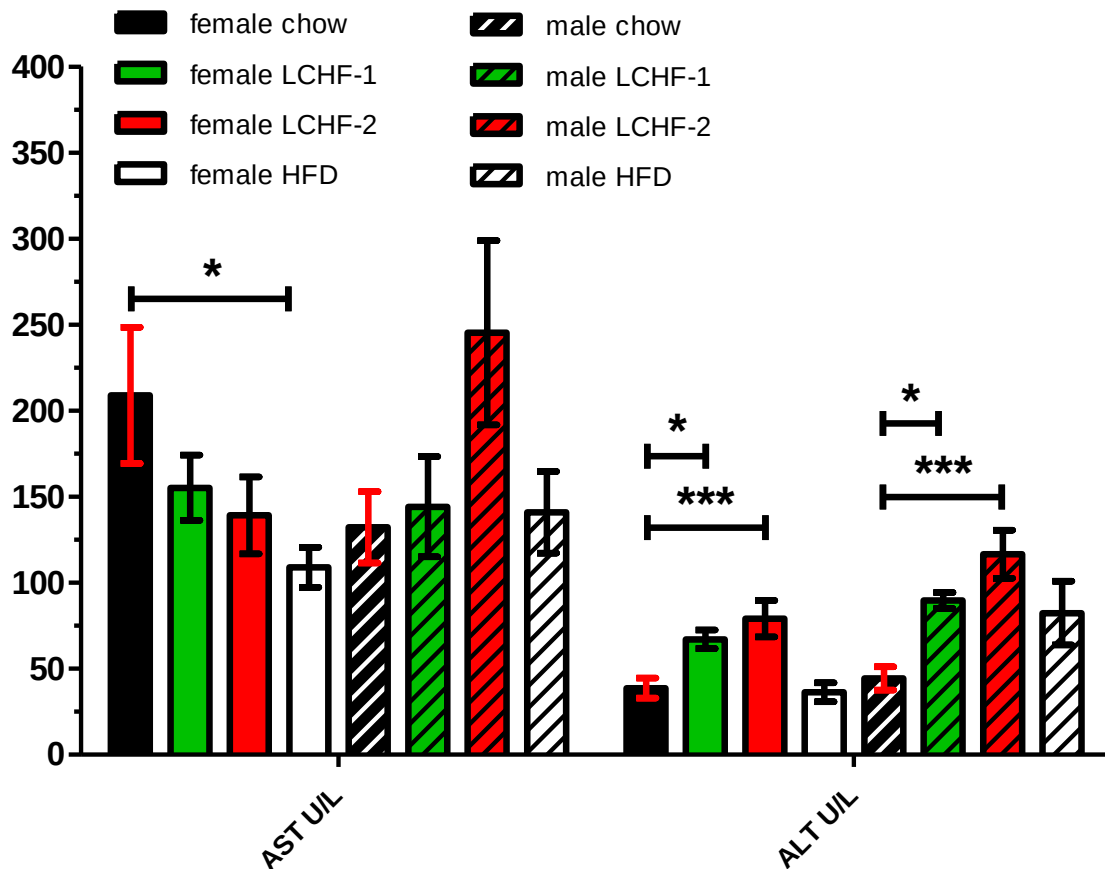


Abb. 14: Die Leberenzyme AST und ALT als U/L im Serum gemessen, mit Signifikanz (*) (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Sex	Merkmal	chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
Female	AST U/L (M und SD)	208,9 ± 142,5	155,2 ± 62,61	150,8 ± 72,11	109,0 ± 38,55 *
	ALT U/L (M und SD)	38,75 ± 19,97	67,09 ± 18,02 *	85,67 ± 31,51 ***	36,33 ± 18,89
Male	AST U/L (M und SD)	132,3 ± 62,26	160,2 ± 81,71 *	245,4 ± 169,4 ***	140,9 ± 67,18
	ALT U/L (M und SD)	44,33 ± 20,23	89,57 ± 13,94	116,6 ± 44,09	82,33 ± 55,47

Tab.13: M und SD der AST und ALT im Serum mit Signifikanz (*)

4.5.2 Lebergewicht

Untersucht wurde zum einen das absolute Gewicht der Leber in Gramm sowie der prozentuale Anteil am KG. Signifikante Unterschiede ließen sich vor allem bei der Betrachtung des zum KG relativiertem Lebergewicht, besonders zwischen den Experimentaldiäten feststellen. Bei den Weibchen war sowohl der prozentuale Anteil des Lebergewichts als auch das absolute Gewicht

in der HCHF Gruppe am niedrigsten. Der relative Anteil am KG war dabei signifikant niedriger gegenüber beider LC-Diäten. Innerhalb der LC Diäten verhielt sich das absolute Gewicht auf dem Niveau der Chowdiät, im prozentualen Bereich war der Anteil bei den LC Diäten zwar tendenziell höher als bei der Chowdiät, jedoch nicht signifikant. Bei den männlichen Tieren war der Trend ähnlich, das Gewicht und der prozentuale Anteil der Leber am Körpergewicht waren tendenziell in den LC Diäten am höchsten und in der Chow- und HCHF Diät am niedrigsten. Ein signifikant höherer Anteil des Lebergewichts am Körpergewicht ergab sich für die LCHF-1 Diät gegenüber der Referenz und der HCHF Diät. Alle anderen Differenzen waren nicht signifikant.

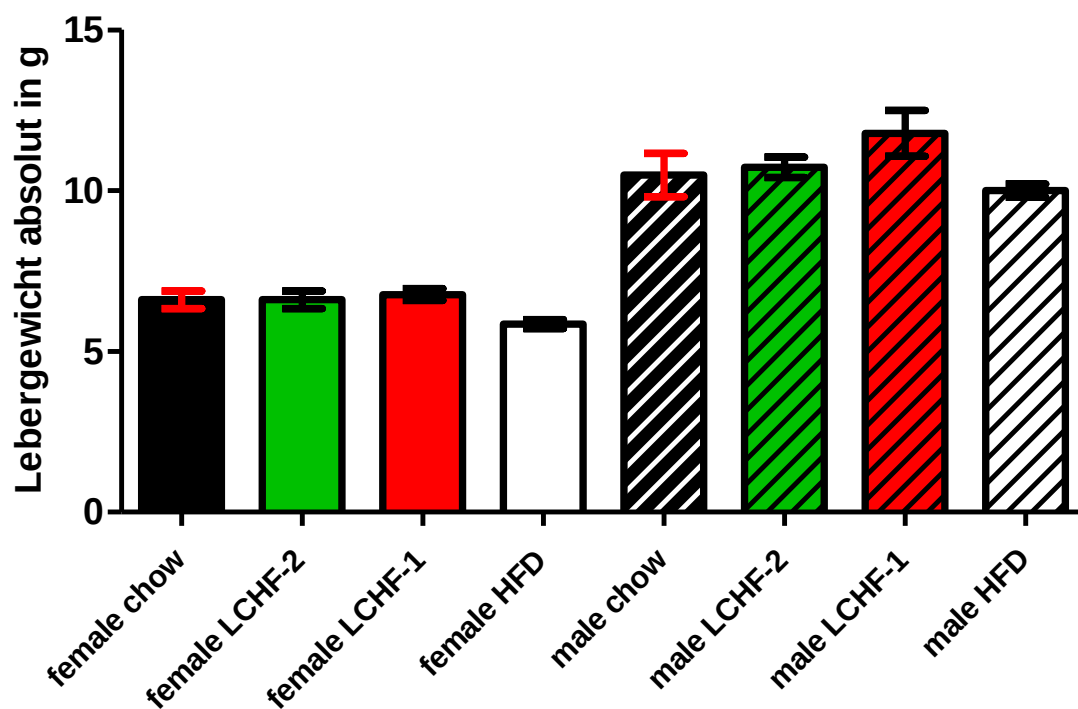


Abb.15a: Lebergewicht in Gramm von Weibchen und Männchen direkt nach der Schlachtung gemessen (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Ergebnisse

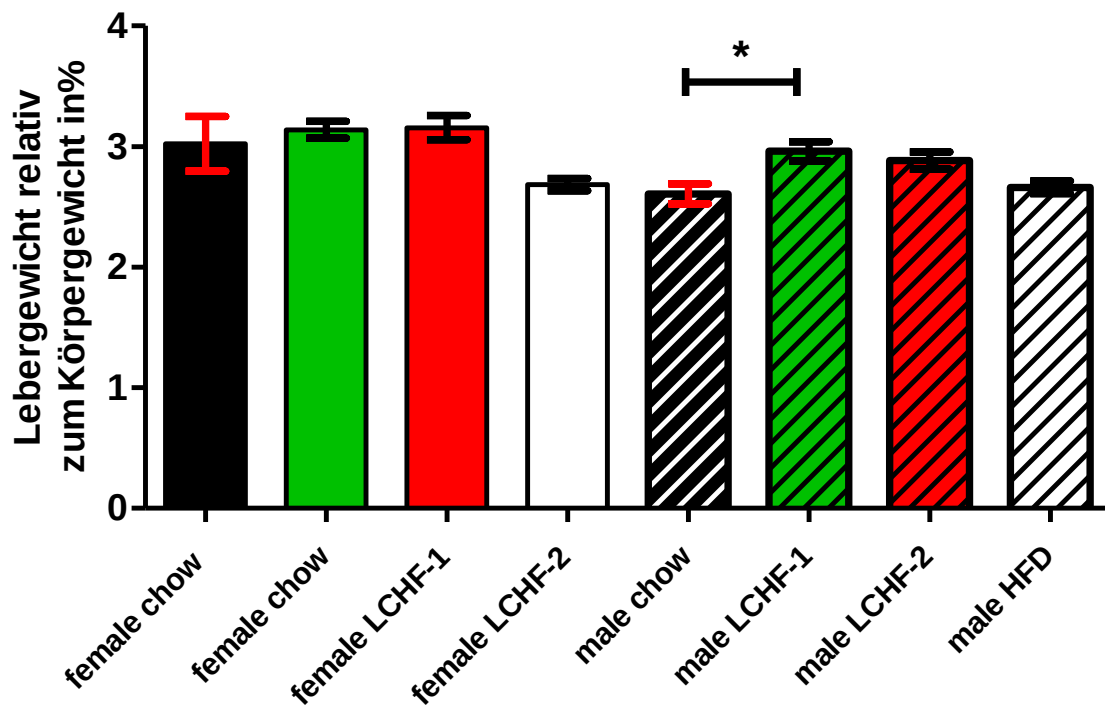


Abb.15b: Zum KG relativiertes Gewicht der Leber in %, mit Signifikanzen * (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Sex	Merkmal	chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
Female	Absolutes Lebergewicht (M und SD)	6,47 g ± 1,314	6,77 g ± 0,485	6,61 g ± 0,736	5,848 g ± 0,370
	Lebergewicht relativ zum KG (M und SD)	3,024 % ± 0,5994	3,139 % ± 0,1820	3,156 % ± 0,2625	2,684 % ± 0,1310
Male	Absolutes Lebergewicht (M und SD)	10,48 g ± 1,779	11,78 g ± 1,746	10,73 g ± 0,842	10,00 g ± 0,534
	Lebergewicht relativ zum KG (M und SD)	2,607 % ± 0,2032	2,960 % ± 0,1765 *	2,884 % ± 0,1848	2,662 % ± 0,1414

Tab.14: M und SD zu absolutem und relativem Lebergewicht mit Kennzeichnung von Signifikanz (*)

4.5.3 Leberhistologie

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Lebern, die mit einer speziellen Fettfärbung behandelt wurden, konnte man bereits optisch feststellen, dass sich bei den Männchen der HF Diätgruppen mehr Fett in der Leber eingelagert hatte als in der Chowgruppe. Bei den Weibchen war die optische Verfettung besonders in der LCHF-2 Gruppe sichtbar. Dies konnte anschließend durch die Auswertung der Computeranalyse bestätigt werden. Bei den Männchen war der Fettanteil in der Leber in allen Diäten erhöht, signifikant gegenüber der Referenzdiät jedoch nur bei den LCHF Diäten. Bei den Weibchen war der Fettanteil lediglich in der LCHF-2 signifikant gegenüber der Chowgruppe erhöht.

Ergebnisse

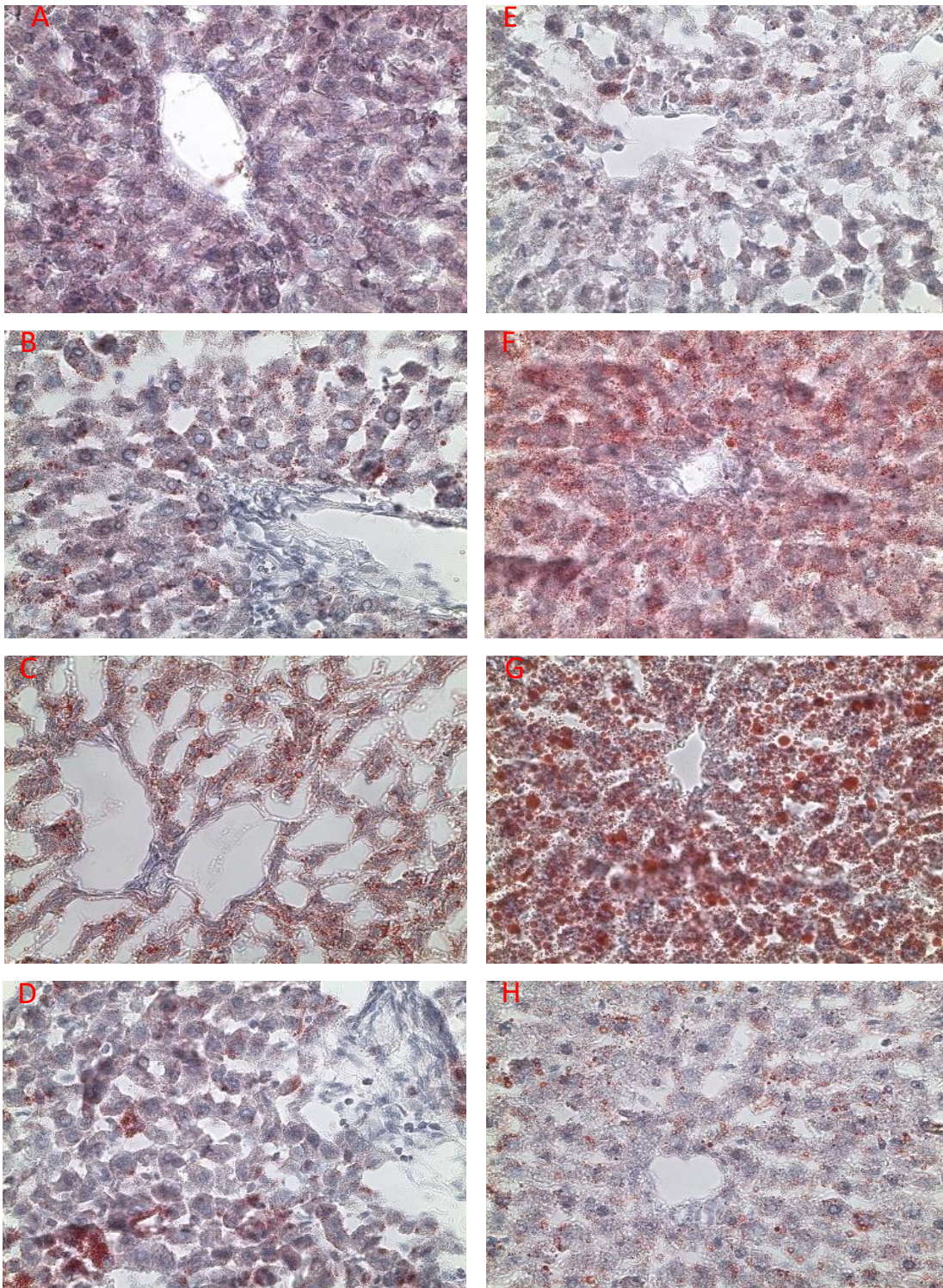


Abb.16 A-D: Bsp. Leberschnitte der weiblichen Tiere, A= Chow, B= LCHF-1, C=LCHF-2, D= HCHF, rote Flecken sind Fetttröpfchen

Abb.16 E-H: Bsp. Leberschnitte der männlichen Tiere, E= Chow, F=LCHF-1, G=LCHF-2, H=HCHF, Rote Bereiche sind Fetttröpfchen

Ergebnisse

Die optischen Beobachtungen konnten anschließend durch die Auswertung der Computeranalyse bestätigt werden. Bei den Männchen war der Fettanteil in der Leber in allen Diäten erhöht, signifikant gegenüber der Referenzdiät jedoch nur bei den LCHF Diäten. Bei den Weibchen war der Fettanteil lediglich in der LCHF-2 signifikant, in der LCHF-1 jedoch auch sichtbar gegenüber der Chowgruppe erhöht.

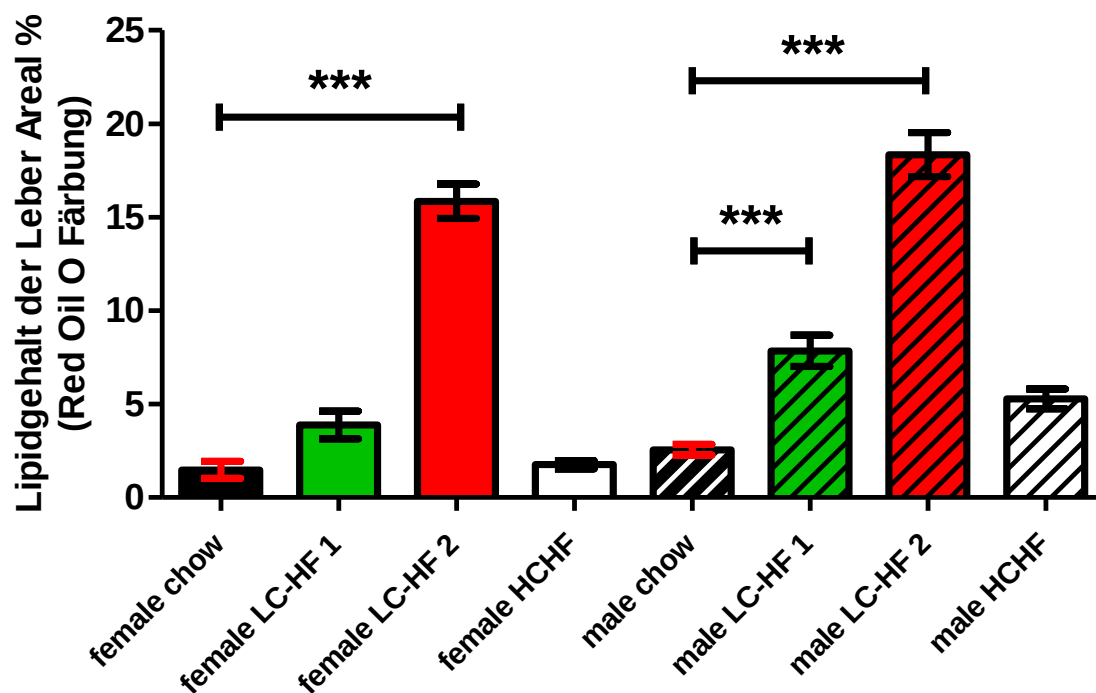


Abb.17: Lipideinlagerung in der Leber als prozentualer Anteil des gemessenen Bereichs, Mittelwerte der Gruppen im Vergleich, mit Signifikanz (*) (n=6 in LCHF-2 der Männchen, alle weiteren Gruppen n=7)

Sex	Merkmal	chow	LC-HF 1	LC-HF 2	HCHF
Female	Lipidgehalt in % (M und SD)	1,48 ± 1,190	3,88 ± 1,979	15,85 ± 2,425 ***	1,76 ± 0,594
Male	Lipidgehalt in % (M und SD)	2,56 ± 0,773	7,85 ± 2,060 ***	18,35 ± 3,096 ***	5,28 ± 1,407

Tab.15: M und SD des Lipidgehalts der Leberhistologie Red Oil Färbung in % mit Signifikanz (*)

5 Diskussion

5.1 Bedingungen

5.1.1 Tierversuch im Rattenmodell

Als Versuchstiere für diese Studie wählte man Ratten, da sie als Versuchstiere etabliert und in der Handhabung und Haltung unkompliziert sind (47-49). Besonders von Vorteil ist die schnelle Anpassungsfähigkeit der Ratte an neue Umgebungen und Umweltbedingungen (49). Dennoch ist vor Versuchsbeginn auf eine ausreichende Gewöhnungsphase zu achten, da der Transport in die neue Umgebung für die Tiere einen Stressfaktor darstellt. Auf diesen reagieren sie mit erhöhten Cortisol-Plasmaspiegeln und erniedrigtem Blutdruck und Puls. Die Parameter erlangen jedoch nach einer Zeit von ca. 7 Tagen wieder stabile Werte(50). Aufgrund dessen wurde für den Versuchsablauf eine Akklimatisierungsphase von 14 Tagen für die Tiere ausgewählt. In dieser Akklimatisierungsphase wurde außerdem der Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere umgekehrt. Da die Ratte ein nachtaktives Tier ist, wären die Arbeitszeiten entsprechend ungünstig für das Personal gewesen. Aus diesen praktischen Gründen entschied man sich, wie auch schon in Versuchen der AG vorher, den Rhythmus und damit auch die Aktivphasen und den Biorhythmus der Tiere umzukehren (45, 51). Die Versuchsreihe wurde zudem nacheinander an männlichen und weiblichen Ratten durchgeführt, d.h. die Tiere wurden nicht gleichzeitig in einem Raum gehalten. Die Ratten zeigten zu keinem Zeitpunkt Verhaltensänderungen wie übermäßiges Lecken, Trägheit, Schlafstörungen oder körperliche Anzeichen wie stumpfes, gesträubtes und dreckiges Fell, Tränenfluss, erhöhte Atemfrequenz o.ä. die auf Stress oder Leid hingewiesen hätten. Zu erwähnen ist jedoch, dass Versuchstier Nr. 43, aus der männlichen LC-HF 1 Gruppe, wenige Tage vor Versuchsabschluss aus unbekannten Gründen tot im Käfig gefunden wurde. Auch dieses Tier zeigte zuvor keine Anzeichen für Krankheit oder erhöhten Stress.

Ein weiterer Vorteil der Ratte ist, dass viele physiologische Vorgänge und biologische Grundlagen denen des Menschen gleichen (50). Wie bereits beschrieben gleicht auch die GH-IGF-I Achse der Ratten, der des Menschen (15, 27). Für diese Studie ist außerdem von besonderer Bedeutung, dass bei Ratten ein geschlechtlicher Dimorphismus im Bereich der GH-

IGF-I Achse vorliegt (15, 52, 53). Da Alter einen supprimierenden Einfluss auf die GH IGF-I Achse der Ratte hat (54) und da ebenfalls der Phänotyp, in Bezug auf unterschiedliches Wachstum beurteilt werden sollte, wählte man für diese Versuchsreihe Tiere, die noch nicht ausgewachsen waren. Bei Ankunft im Stall waren die Ratten 10 Wochen alt, bei Versuchsbeginn fast 13 Wochen und zum Versuchsabschluss hatten sie ein Alter von 17 Wochen erreicht. Die Aktivität der Achse sollte im Wachstumsalter hoch und eventuelle supprimierende Faktoren entsprechend gut zu untersuchen sein. Allerdings beschränkt dies die Aussagekraft unserer Ergebnisse auf dieses spezifische Alter der Tiere.

Auch im Ernährungsverhalten ähnelt die Ratte dem Menschen, da sie ebenfalls ein sog. Allesfresser ist, weshalb ihre Verwendung in Ernährungs- und Stoffwechselstudien verbreitet ist (47). Im Gegensatz zu einem Versuch mit Menschen, konnte im Tierversuch die Nahrungsaufnahme streng kontrolliert und standardisiert werden. Durch die Methode der isoenergetischen Paarfütterung wurde sichergestellt, dass jegliche Unterschiede zwischen den Gruppen nicht aus ungleicher Kalorienaufnahme resultierten. Dabei diente die Gruppe die mit der sog. Chowdiät gefüttert wurde, als Kontrollgruppe. Die Tiere hatten hier ad libitum Zugang zu einem Futter, dass die natürliche Ernährung der Art mimte. Anhand der durchschnittlichen Kalorienzufuhr der Kontrollgruppe konnte die benötigte Futtermenge für die Experimentalgruppe errechnet und davon ausgegangen werden, dass die Tiere aller Gruppen ausreichend Energie erhielten.

Ein weiterer Grund die Versuche im Rattenmodell durchzuführen war, dass in voran gegangenen Studien des Labors bereits Ratten für die Versuche verwendet wurden. Ein Versuchstierwechsel wäre also aus Gründen der Vergleichbarkeit nicht sinnvoll gewesen.

Die Handhabung der Tiere während der Versuchszeit erwies sich wie erwartet als unkompliziert. Das Futter wurde gut angenommen und die Tiere gewöhnten sich schnell an den alle zwei Tage stattfindenden Wägevorgang. Durch die Verwendung einer dynamischen Analysewaage konnten Verfälschungen durch Bewegungen der Ratten während des Wiegens vermieden werden. Das Wiegen erfolgte jedes Mal noch vor der Fütterung und nach der Ruhephase der Tiere. Auch dies geschah, um fehlerhafte Gewichtsmessungen zu vermeiden, da man davon ausgehen konnte, dass die Gewichtsbestimmung nüchtern erfolgte.

5.1.2 Versuchsumfang

In dieser Versuchsreihe gab es sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Versuchstieren in den unterschiedlichen Diätgruppen jeweils 7 Tiere (ausgenommen LCHF 2 der männlichen Tiere mit $n=6$, da ein Tier verstarb). Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit, ist zu beachten, dass mit dieser für den Tierversuch geringen genehmigten Anzahl von Versuchstieren es nur gelingt einen Trend zu zeigen, den es ggf. in Zukunft mit größeren Versuchstierzahlen zu untersuchen lohnt. Die vorliegenden Ergebnisse geben bei verschiedenen Punkten, insbesondere wenn die biologische Variabilität des Untersuchten Parameters groß ist, Hinweise auf mögliche Zusammenhänge und physiologische Abläufe, reichen jedoch nicht für generalisierte Annahmen.

5.2 Kritische Betrachtung ausgewählter Methoden

5.2.1 Makronährstoffzusammensetzung

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob ein stark reduzierter Kohlenhydratanteil in der Nahrung von Ratten zu Veränderungen im Phänotyp, der GH-IGF-I Achse und des Verfettungsgrades der Leber führt. Aus diesem Grund mussten die Diäten sorgfältig durchdacht zusammengestellt werden. Die Beobachtungen sollten möglichst auf erniedrigten Kohlenhydratanteil und nicht etwa auf den hohen Fettanteil oder aber auf niedrige Proteinzufuhr zurückzuführen sein.

Die Kontrollgruppe erhielt ein sog. Chowfutter, welches den Standardfutteranforderungen für Ratten entsprach. Die zwei LC Futtergruppen unterschieden sich in ihrem Protein- und Fettanteil. Während die LCHF-1-Gruppe nahezu denselben Proteinanteil in ihrer Nahrung erhielt wie die Chowgruppe, war dieser bei der LCHF-2-Gruppe stark vermindert (vgl. Tab. 2, S.15). Bei der LCHF-2 Diät handelte dementsprechend um eine ketogene Diät. Insofern gilt bei der Betrachtung der Ergebnisse der LCHF-2 zu differenzieren, ob diese nicht auch aus dem niedrigen Proteinanteil resultieren könnten. Aus diesem Grund hat die LCHF-1 Gruppe besonders die Stellung diese Erwägung zu relativieren, da dort eine ausreichende Proteinzufuhr gewährleistet war. In den meisten Fällen wiesen die beiden LCHF-Diäten vergleichbare Ergebnisse auf und zeigten i.d.R. den gleichen Trend. Dies lässt die Vermutung zu, dass weniger der Proteinmangel, als die Kohlenhydrat Defizienz für unsere Ergebnisse verantwortlich zu machen ist.

In der LCHF-2 Diät war wiederum der Fettanteil höher als in der LCHF-1 Diät (vgl. Tab.2 S.15). Um abschätzen zu können, inwieweit die Ergebnisse auf den hohen Fettanteil der LCHF-Diäten zurückzuführen sind, wurde noch eine vierte Diät hinzugenommen. Diese war eine sog. Western-Style-Diät bei der sowohl der Kohlenhydrat-, als auch der Fettanteil, höher als im Chowfutter waren. Außerdem mimt diese die Ernährungsweise in westlichen bzw. Industrienationen. Die Ergebnisse der HCHF-Diät glichen im Trend in den meisten Fällen denen der LCHF-Diäten. Die Unterschiede zur Kontrollgruppe waren jedoch weniger oft hoch signifikant als die der LCHF-Diäten.

Ein weiterer wichtiger Punkt, um die Auswirkungen von Makronährstoffzusammensetzungen untersuchen zu können, ist sicher zu stellen, dass Veränderungen nicht aus reduzierter Kalorienzufuhr resultieren. Es wird häufig diskutiert, ob eine Gewichtsreduktion unter LC-Diäten nicht eher auf der Tatsache einer reduzierten Energiezufuhr beruht und weniger auf der Energiequellenzusammensetzung (55, 56). Hier sollte jedoch allein die Art der Nahrungszusammensetzung und deren Auswirkungen untersucht werden, ohne dass Beobachtungen auf unterschiedliche Energiezufuhr zurückgeführt werden könnten. Deshalb wurden die Versuchstiere isoenergetisch paargefüttert (siehe Methoden: Fütterung ab S.14).

5.2.2 Molekulargenetische Methoden

Schwerpunkt dieser Arbeit war zu untersuchen, inwiefern unterschiedliche Makronährstoffzusammensetzungen sich auf die GH-IGF-I Achse auswirken. Hierzu wurden nicht nur Konzentrationen der Hormone selbst im Blut gemessen, es wurde auch untersucht, inwiefern deren Produktion auf Zellebene angeregt wurde. Dies geschah in dem entsprechende mRNA mittels realtime quantitative PCR quantifiziert wurde. Die Fehleranfälligkeit dieser Methode bildet sich auf mehreren Ebenen ab. Zum einen handelt es sich bei RNA-Proben um sehr instabiles Probenmaterial. Es war entsprechend wichtig die Gewebeproben direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff zu gefrieren und anschließend stets bei -80°C zu asservieren. Auch bei Versuchsdurchführung bis zur RNA-Extraktion musste stets auf Trockeneis bzw. Flüssigstickstoff gearbeitet werden. Eine Unterbrechung der Kühlkette konnte bereits zur Degradierung der RNA führen (57). Des Weiteren führen ubiquitär vorkommende RNAsen zu Degradierung der RNA. Sämtliche Oberflächen und Instrumente wurden entsprechend zuvor mit RNase free tissues gereinigt, um einer Kontaminierung der Proben vorzubeugen.

Eine weitere Fehlerquelle ergibt sich aus dem Prozess der cDNA-Synthese, da diese sehr unterschiedlich verlaufen kann. Die Effizienz liegt dabei zwischen 5-90%, somit basiert eine Quantifizierung lediglich auf einer Mindestmenge von mRNA im Ansatz (46). Diese Fehlerquelle wird durch das Heranziehen eines externen Standards in Form eines Haushaltsgens adressiert, da man hier annimmt, dass ein solches in konstanter Menge exprimiert wird. Man bezieht die Menge des spezifischen Produkts auf die des Haushaltsgens. Es ist bei der Quantifizierung also nicht von absoluten Mengen auszugehen (58).

Des Weiteren bleibt zu beachten, dass es sich bei einer Betrachtung von mRNA um eine Momentaufnahme handelt. Hierbei kann keine Aussage darüber getroffen werden, in welcher Quantität es zur Translation und Proteinsynthese kommen wird.

5.3 Betrachtung des Phänotyps im Hinblick auf ausgewählte Aspekte

Der Phänotyp der Versuchstiere wurde hinsichtlich ihres Längenwachstums sowie auch der Körpergewichtsentwicklung betrachtet. Im Zusammenhang mit LCHF-Diäten ist schon diskutiert worden, inwiefern sich die Körperfettverteilung verändert (59). Auch dies wurde in die Untersuchungen der Arbeitsgruppe miteinbezogen und die Gewichte einzelner Fettdepots verglichen sowie die Leber hinsichtlich ihres Steatose Grades betrachtet.

5.3.1 Körpergewicht

Wie erwartet, da in der Literatur oft beschrieben (59-61), konnte man in diesem Versuch zeigen, dass es zu unterschiedlichen Gewichtszunahmen in den Gruppen kam. Erwartungsgemäß kam es im Allgemeinen bei den Männchen zu einer deutlicheren Gewichtszunahme als bei den Weibchen. Besonders in den LCHF Gruppen nahmen die Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger KG zu, ebenso zeigte sich auch bei den Tieren der HCHF Diät-Gruppen eine verminderte KG-Zunahme. In der Literatur geht man davon aus, dass eine erhöhte Ketogenese und Glykoneogenese zur KG-Reduktion führen (62). Allerdings wurde bereits beschrieben, dass es nicht unbedingt zur Reduktion der Fettmasse, sondern der fettfreien Körpermasse kommt (59, 62) und dass die Fettmasse teilweise sogar zunimmt (59, 63, 64). Einen signifikanten Unterschied des absoluten KG nach 28 Tagen sowie der lean body mass, konnte man bei der Betrachtung der Mittelwerte der Diätgruppen in unserem Versuch nicht feststellen. Dies scheint zunächst nicht zum unterschiedlichen body-weight-gain, der beobachtet werden konnten, passen zu wollen. Beachtet man jedoch, dass es

sich hier um die Betrachtung von Mittelwerten einer kleinen Gruppe mit $n=7$ handelt und dass die Gruppen hinsichtlich ihres KG zu Beginn des Versuchs gematched wurden, erscheint die Tatsache wieder plausibel. Innerhalb der Gruppen gab es eine große Standardabweichung bzgl. des Gewichts der einzelnen Tiere. So ist auch bei der Betrachtung des Mittelwerts nach 28 Tagen davon auszugehen, dass innerhalb der Gruppe eine große Abweichung vorliegt und somit keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden können. Die Betrachtung dessen, was an Gewicht im Schnitt zugenommen wurde ist hier also sinnvoller. In vorangegangenen Versuchen von Bielhohuby et al. konnte man signifikante Unterschiede beim absoluten Körpergewicht und der lean body mass zeigen. Versuche mit einer höheren Versuchstieranzahl könnten in Zukunft hilfreich sein, um die Gewichtsschwankungen innerhalb gematcheter Gruppen abzuschwächen.

In dieser Arbeit wurden in Kapitel 4.2. das Gewicht einzelner Fettdepots sowie der Leber betrachtet. Während wir auf die Leber zu einem späteren Zeitpunkt zurückkommen werden, lässt sich bei der Betrachtung der Fettdepots feststellen, dass es größten Teils zu einer Gewichtszunahme der Lebern unter LCHF-Diäten kam. Beide Geschlechter wiesen signifikant größere perirenale Fettdepots in beiden LCHF Diäten auf und zeigten denselben, jedoch nicht signifikanten Trend im Bereich des inguinalen Fettdepots. Da die LCHF-1 Diät in ihrem Proteingehalt zur Chowdiät gematched ist, kann man hier davon ausgehen, dass der Effekt auf den reduzierten Kohlenhydratanteil zurückzuführen ist. Bei den weiblichen Tieren kam es ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme des periovarialen Fettdepots, wohingegen das Gegenteil bei den Männchen der Fall war. Dies ist am ehesten damit zu erklären, dass die Entnahme epididymalen Fettgewebes, durch anatomische Gegebenheiten, technisch anspruchsvoller und somit anfälliger für Fehler war.

In einer Tierversuchsstudie von Boozer et al 1995, bei der vier Gruppen von Ratten isoenergetische HF Diäten zu füttern bekamen, konnten bereits ähnliche Resultate gezeigt werden (64). Auch in vorangegangenen Versuchsdurchführungen dieser Arbeitsgruppe, zeigte sich bei reduzierter Gewichtszunahme eine Zunahme der Fettdepots unter LCHF Diäten (12, 45). Die reduzierte Gewichtszunahme der Tiere ist hier also nicht durch eine Reduktion der Fettdepots zu erklären. Für diese Arbeit wurde weiterhin das Längenwachstum der Tiere und exemplarisch der einzelnen Knochen untersucht.

5.3.2 Längenwachstum

Längenwachstum von Knochen entsteht durch Proliferation von Chondrozyten und endochondraler Ossifikation im Bereich der Epiphysen (65). Es ist lange bekannt, dass die Hormone GH und IGF-I sowie die IGFBPe eine entscheidende Rolle für das Längenwachstum von Röhrenknochen spielen und außerdem zur Mineralisierung des Knochens beitragen (65-68). Ihre Wirkorte sind hierbei unterschiedlich. GH selbst generiert Chondrozyten, während IGF-I die von GH aktivierten Zellen zur Proliferation anregt, (67, 69). GH hat dabei sowohl eine IGF-I unabhängige und eine IGF-I abhängige Wirkung (67) auf die Epiphysen. Eine ausreichende Menge zirkulierenden IGF-I, scheint außerdem für die Größe der Wachstumsplatte und deren Proliferationszone entscheidend zu sein (70). Mäuse, bei denen IGF-I sowie außerdem IGFBP und die ALS stark reduziert waren, zeigten eine verschmälerte Wachstumsplatte und reduzierte Dicke der Kortikalis sowie Knochendichte. Nach IGF-I Substitution konnte man die Gesamthöhe der Epiphyse wiederherstellen (70).

Des Weiteren spielen Sexualsteroid, Schilddrüsenhormone und Leptin eine Rolle beim Knochenwachstum. Dabei ist besonders Östrogen sowohl für das Wachstum, als auch für den Erhalt von Knochenmassen und -dichte bei beiden Geschlechtern erforderlich (71).

Einen Hinweis auf eine supprimierte GH-IGF-I Achse durch LCHF-Diäten kann also schon ein verringertes Längenwachstum der Versuchstiere geben. In Vorangegangenen Studien der AG wurden signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und LCHF-Gruppen bei der Längenmessung der Tiere, von Nasenspitze zu Schwanzansatz sowie der langen Beinknochen, Tibia und Femur, festgestellt (44, 45). Es wurde diskutiert, ob als Ursache dafür eine verringerte Osteoblastengenerierung in Frage kommt (44). In dieser Studie wurde die Längenmessung der Tiere ebenfalls bei Versuchsabschluss ohne Beteiligung des Schwanzes, von der Nasenspitze bis zum Schwanzansatz, durchgeführt. Es ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den experimentell gefütterten Gruppen. Hier gilt jedoch zu beachten, dass die Tiere der vorherigen Versuchsreihe von Bielhohuby et al. bei Versuchsbeginn im Schnitt 1-2 Wochen älter waren als die in dieser Studie verwendeten. Es ist möglich, dass die Änderung von Makronährstoffzusammensetzungen in der Nahrung der Nager zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten, unterschiedlich starke Auswirkungen auf das Wachstum der Tiere hat.

Anders verhielt es sich mit der Messung der langen Röhrenknochen Femur und Tibia. Während bei den weiblichen Tieren das Femur in der LCHF-1 Diät als einziges signifikant verkürzt war, war es bei den männlichen Ratten die Tibia, die sowohl in der LCHF-1 und der LCHF-2 Diät signifikant kürzer als in der Kontrollgruppe war. Auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren, lässt sich doch ein allgemeiner Trend erkennen, dass bei beiden Geschlechtern die Körperlänge sowie die Länge von Femur und Tibia am höchsten in der Chowgruppe waren. Auch die HCHF-Diät zeigte im Trend gegenüber der Kontrollgruppe kürzere Röhrenknochen. Dies lässt vermuten, dass nicht unbedingt der reduzierte Kohlenhydratanteil, sondern wahrscheinlicher der hohe Fettanteil der Nahrung für den Effekt verantwortlich ist. Um jedoch die verringerte Gewichtszunahme der LCHF gefütterten Tiere zu erklären, reichen diese Beobachtungen noch nicht aus. Weiterführend sollten die Knochendichte und weitere Knochen hinsichtlich ihres Wachstums betrachtet werden.

5.4 Diskussion der GH-IGF-I-Achse

Der Zusammenhang zwischen Makronährstoffen und der GH-IGF-I Achse wird vermehrt untersucht. Der Einfluss der Wachstumshormon-Achse auf den Stoffwechsel von Makronährstoffen ist dabei sehr weit erforscht. In dieser Arbeit und weiteren wird jedoch auch der umgekehrte Einfluss des Makronährstoffangebots auf die GH-IGF-I Achse untersucht. Dabei konnte bereits durch diese Arbeitsgruppe festgestellt werden, dass es unter deutlich reduziertem Kohlenhydratanteil in der Nahrung von Ratten zu einer GH-Resistenz der Hepatozyten und zu reduzierter Knochendensität kommt (12, 44). Auch andere Arbeiten bezogen sich bereits auf vermindertes Knochenwachstum unter LC-Diäten (72). Snyder et al. beobachteten eine verschlechterte GH-Sensibilität bei Energie defizienten Menschen, die gleichzeitig wenig Kohlenhydrate zur Verfügung hatten (73). Reduzierte IGF-I Serumparameter unter kalorienreduzierter Ernährung (74) sowie unter HF Diäten (75) wurde bereits beschrieben. Auch der Einfluss des Proteingehalts der Ernährung auf die Achse wurde in der Literatur bereits beschrieben und legt nahe, dass es unter einer massiv reduzierten Proteinzufuhr zu einer Reduktion der GH-IGF-I kommt, (76-78).

Zur Betrachtung und Beurteilung der GH-IGF-I Achse zählt u.a. die Betrachtung der GH-Sekretion, die bei Ratten wie auch bei Menschen pulsatil erfolgt. In dieser Arbeit wurde hierzu, wie weiter oben beschrieben, sequenzielle Blut entnommen. In der Kontrollgruppe konnte hierbei das zu erwartende Sekretionsmuster für beide Geschlechter exemplarisch abgebildet

werden (vgl. Abb. 7a, S. 23). Auch die Sekretionsprofile der Experimentalgruppen entsprachen den physiologischen pulsatilen Sekretionsmustern, die bei männlichen Tieren mit höheren Amplituden einhergehen als bei weiblichen (27, 79). Im Vergleich zur Kontrollgruppe verliefen die Kurven jedoch besonders bei den Männchen flacher, d.h. es wurden weniger hohe Spitzenwerte erreicht, also weniger GH ausgeschüttet. Dies lässt sich besonders gut nachvollziehen, wenn man die Abb. 8a und 8b (S. 24 und 25) betrachtet, in denen die einzelnen Messwerte der Geschlechter jeweils, für jede Futtergruppe einzeln, der Größe nach aufgetragen wurden. Die Betrachtung der AUC zeigt bei den männlichen Tieren ganz deutlich, dass die veränderte Makronährstoffzusammensetzung in allen Experimentalgruppen eine geringere GH-Sekretion zur Folge hatte. Bei den weiblichen Tieren gab es nur zwischen der Kontroll- und der LCHF-2 Gruppe einen signifikanten Unterschied. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Veränderungen in der Makronährstoffzusammensetzung, die zentrale GH-Regulation beeinflussen sowie darauf, dass dies bei Männchen und Weibchen in unterschiedlichem Maße geschieht. Auch andere Studien legten bereits nahe, dass Makronährstoffe einen Einfluss auf die zentrale GH-Regulation haben, (12, 16, 75, 80). Dabei gibt es Hinweise, dass High Fat Diäten durch erhöhte Somatostatin Level zu einer GH Reduktion führen könnten (75). Die Vermutung, dass besonders hohe Fettanteile in der Nahrung für eine Reduktion der GH-IGF-I Achse führen, könnte auch in unserem Versuch für die männliche Kohorte gelten, da hier in allen High Fat Gruppen signifikant niedrigere GH-Werte gemessen wurden. Währenddessen weisen Weibchen eine signifikante Sublimierung nur im Bereich der deutlich Kohlenhydratreduzierten LCHF-2 Diät auf, die außerdem die ketogene proteinreduzierte Diät darstellt. Auch sind die Unterschiede zur Kontrollkohorte weniger ausgeprägt, als es bei den männlichen Tieren der Fall ist. Hier wird zum ersten Mal ein deutlicher Unterschied zwischen männlicher und weiblicher Kohorte sichtbar. Gründe für die Beobachtung lassen sich in dieser Arbeit jedoch nicht eindeutig erschließen oder beweisen, hierzu wären weitere Studien nötig. Dennoch waren Unterschiede zu erwarten, da sich männliche und weibliche Ratten ebenso wie Männer und Frauen beim Menschen auf Ebenen des Nährstoffstoffwechsels, der Energiespeicherung und der GH-Sekretion unterscheiden. HF-Diäten scheinen das zentralnervöse Belohnungssystem zu desensibilisieren und die Regulation unterliegt bei den Geschlechtern scheinbar unterschiedlichen Mechanismen zeigte schon Ong et al. (81), des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass sich Männer und Frauen in ihrer Verteilung der Fettdepots und der Beziehung der somatotropen Achse zur fettfreien Körpermasse

unterscheiden (40). Ebenso wurde schon beobachtet, dass die mehr kontinuierliche GH-Sekretion von Frauen anders durch beispielsweise hohe IGF-I Level beeinflusst wird, als es bei Männern der Fall ist (82). Die hier präsentierten Ergebnisse unterstreichen den sexuellen Dimorphismus der GH-IGF-I Achse und deren Regulation, indem sie darauf hinweisen, dass Unterschiede in der Makronährstoffzusammensetzung die GH-Sekretion zwar bei beiden Geschlechtern beeinflussen, deren Ausprägung allerdings variiert.

Ähnlich verhält es sich mit den Serumparametern für IGF-I (vgl. Abb. 11, S. 29). Hier zeigt sich besonders deutlich, dass eine Suppression der GH-IGF-I Achse vorliegt, da in allen HF-Diäten das Serum-IGF-I erniedrigt ist. Besonders deutlich lässt sich der Effekt in der männlichen Kohorte sehen, hier ist der Unterschied von Chowgruppe zu allen HF-Diäten hochsignifikant. Währenddessen liegt bei den Weibchen nur zwischen Chowgruppe und LCHF-2-Gruppe ein signifikanter Unterschied vor. Dies erscheint gut nachvollziehbar, da GH die Produktion von IGF-I bewirkt. Es ist also zu erwarten, dass IGF-I in den Kohorten mit niedrigem GH ebenfalls niedrig ist.

Weiterhin interessant ist die Betrachtung der GH-R mRNA Expression in der Leber. Hier zeigt sich in den Experimentalgruppen eine reduzierte Expression ebendieser. Das lässt eine reduzierte Expression des GH-R in der Leber vermuten. Signifikant ist der Unterschied hier zwar nur zwischen der männlichen Kontrollgruppe und der männlichen LCHF-2 Gruppe, jedoch ist der Trend auch bei den anderen Gruppen und auch bei den Weibchen zwischen Kontroll- und Experimentalgruppen zu sehen. Dies bietet Hinweise auf eine reduzierte GH-Sensibilität der Leber, was wiederum reduzierte IGF-I Spiegel erklären könnte. Eine GH-Resistenz von Hepatozyten unter LC-Diäten konnte, wie bereits erwähnt, schon in vorherigen Studien dieser Arbeitsgruppe für männliche Ratten gezeigt werden (12). Auch hier war der Effekt nur zwischen Chowgruppe und LCHF-2-Gruppe signifikant. Die Tatsache, dass in unserer Versuchsreihe diese Ergebnisse reproduziert und auch für Weibchen gezeigt werden konnten, wenn auch oft nicht signifikant, lässt vermuten, dass der Effekt real ist. Warum die Hepatozyten möglicherweise weniger GH-R exprimieren muss weiter untersucht werden. Dass es bei zirrhotisch verändertem Lebergewebe zu einer reduzierten Expression kommt, zeigte bereits Shen et al. (83). Des Weiteren wurde eine Sublimierung der GH-IGF-I Achse im Zusammenhang mit der NAFLD beschrieben (84, 85). Im Verlauf werde ich auf den Verfettungsgrad der Lebern unserer Versuchstiere eingehen.

Auf Regulatorischer Ebene wurde die GH-IGF-I Achse in dieser Arbeit hinsichtlich einer möglicherweise reduzierten GHRH Sensibilität der Hypophyse untersucht. Es wurde die mRNA-Expression für den GHRH-R in der Hypophyse bestimmt und tatsächlich zeigte sich hier eine verminderte mRNA Expression im Bereich der Experimentalgruppen. Signifikant war der Unterschied bei den männlichen Tieren zwischen der Kontrollgruppe und der LCHF-2 Gruppe und bei den Weibchen zwischen Kontroll- und HFHC-Gruppe. Luque und Kineman et al. untersuchten bereits die Effekte von hohen Glucose- und Insulinspiegeln auf die Hypophyse und deren direkte Auswirkung auf eine supprimierte GH-IGF-I Achse (80). Außerdem wird das GHRH auch mit der Regulation von Nahrungsaufnahme in Verbindung gebracht (86). In dieser Arbeit konnten zwar eine niedrigere GHRH-R mRNA der Hypophyse unter HF-Diäten gezeigt werden und damit die Vermutung nahelegen, dass es unter HF-Diäten zu einer verminderten Expression des GHRH-R in der Hypophyse kommt, der Mechanismus, der hierzu führt, kann in dieser Versuchsreihe jedoch nicht geklärt werden. Hierzu bedarf es weiterer Studien und Versuchsreihen.

In diesem Versuch zeigte sich, dass eine veränderte Makronährstoffzusammensetzung der Nahrung von Ratten keinen Einfluss auf das natürlich pulsatile Sekretionsmuster von GH zu haben scheint. Jedoch hatte die Makronährstoffzusammensetzung bei männlichen Tieren einen hemmenden Einfluss auf die Peakhöhe der GH-Sekretion mit nachfolgend reduzierten IGF-I Serumparametern sowie auf die Expression von GH-R mRNA in den Hepatozyten. Dies lässt eine abgeschwächte Sensibilität der Hepatozyten auf GH vermuten. Bei weiblichen Tieren führte besonders der reduzierte Kohlenhydratanteil in Verbindung mit reduziertem Proteinanteil zu einem supprimierenden Einfluss auf die GH-Achse. Es zeigte sich hier, dass der sexuelle Dimorphismus der GH-IGF-I Achse bei Auswirkungen der Makronährstoffzusammensetzungen in der Nahrung von Ratten von Bedeutung ist.

5.5 Betrachtung der Leber im Hinblick auf eine mögliche NAFLD

Die non alcoholic fatty liver disease stellt, wie weiter oben bereits beschrieben, die Vorstufe der non alcoholic steatohepatitis dar und geht mit erhöhter Triglyceridablagerung in der Leber einher. Eine Verbindung zur GH-IGF-I Achse wurde bereits durch Takahashi et al beschrieben(87). Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass es bei Erwachsenen mit GH Mangel zu

ähnlichen metabolischen Veränderungen kommt, wie bei der NAFLD. Auch in anderen Studien wurde der Zusammenhang zwischen der GH Achse und NAFLD bereits untersucht und gezeigt, dass eine Suppression der GH-IGF-I Achse die Entstehung einer NAFLD fördert(88, 89).

Mediterrane LC-Diäten erwiesen sich in der Literatur häufig als geeignet, um eine NAFLD zu reduzieren (90-92). Es wurde eine verbesserte Insulinsensibilität, Gewichtsverlust auch im Bereich des viszeralen Fetts und verbesserte metabolische Laborwerte beschrieben. Jedoch gibt es auch Arbeiten, die vom Gegenteil ausgehen. Schugar et al. 2012 beispielsweise vermuten, dass eine ketogene Diät auf lange Sicht zur Förderung von Insulinresistenz und NAFLD führt (93).

In dieser Arbeit wurden, die für das metabolische Syndrom und die NAFLD relevanten Serumparameter untersucht. Die Triglyceride zeigten sich bei beiden Geschlechtern in den Experimentalgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, wobei die Unterschiede nur bei den Männchen signifikant waren. In der Literatur werden, besonders unter Kurzzeitexposition, unter LCHF Diäten meist verbesserte Lipoprotein-, Cholesterol- und Triglyceridspiegel beschrieben (7, 94, 95). Im Gegensatz dazu beschrieben Pilis et al. in einer 3-Jahres Follow-Up-Studie auch leicht verschlechterte Lipidprofile unter LCHF-Diäten bei Männern (96). In der Zukunft lohnt es sich, an dieser Stelle weitere Versuche anzustreben, bei denen LCHF-Diäten über einen längeren Zeitraum und mit Geschlechtervergleich gefüttert werden, um anschließend eine differenzierte Blutfettanalyse mit Betrachtung der TAGs aber auch von HDL- und LDL-Cholesterol durchzuführen. Ein wissenschaftliches Interesse besteht hier besonders im Hinblick auf Auswirkungen der Makronährstoffzusammensetzung auf das kardiovaskuläre Risikoprofil. Die Leberenzyme AST und ALT als Prädiktoren für eine beginnende Leberfibrose (97) wurden ebenfalls bestimmt. Bei Wistar-Ratten ist hier von folgenden Normalwerten auszugehen: ALT bei Männchen 35 U/L, bei Weibchen 51U/L und AST bei Männchen 70 U/L und bei Weibchen 113 U/L (98). Hier unterschieden sich die Ergebnisse der weiblichen und männlichen Kohorte. Bei den männlichen Tieren kam es unter den kohlenhydratreduzierten Diäten zu einem signifikanten Anstieg der ALT, über den als normal beschriebenen Bereich hinaus. Auch in der Cafeteria-Diät zeigte sich der gleiche Trend. Betrachtet man die Serumwerte der AST, sieht man auch hier erhöhte Werte in den Experimentalgruppen, allerdings sind die Unterschiede hier nicht signifikant. Da es bei einer Schädigung von Hepatozyten immer erst zu einer Erhöhung der ALT im Blut und erst im Verlauf zur Erhöhung der AST kommt, scheinen

diese Ergebnisse durchaus plausibel. Sie können auf eine beginnende Fibrosierung der Leber bei den männlichen Tieren der LC-Gruppen hinweisen. Bei der weiblichen Kohorte kam es im Bereich der LC-Gruppen ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der ALT. Genau wie bei den Männchen war auch hier der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und der ketogenen LCHF-2 Diät am signifikantesten. Betrachtet man nun die Werte der AST stellt man fest, dass es hier innerhalb der Kontrollgruppe zu den höchsten und auch im Vergleich zu den als normal beschriebenen Werten, zu einer deutlichen Erhöhung kam. Hierfür bietet sich keine Erklärung, dieses Ergebnis wäre mit einer größeren Kohorte zu überprüfen. Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, dass die AST nicht Hepatozyten spezifisch ist. In größerem Maße kommt sie zum Beispiel in Skelettmuskeln, Gehirn und Niere vor und spricht nur bei gemeinsamer Erhöhung mit der ALT für einen größeren Leberschaden.

Die Betrachtung von Gesamtprotein und Albumin im Blut der Tiere erfolgte vor dem Hintergrund, dass diese Parameter bei Patienten mit NAFLD, NASH oder Zirrhose oft reduziert sind und auf die verschlechterte Syntheseleistung der Leber hinweisen (99, 100). Betrachtet man die Ergebnisse unserer Arbeit ließ sich besonders bei den Experimentalgruppen der weiblichen Tiere eine Reduktion von Gesamtprotein und Albumin erkennen. Hier taten sich mit besonders hoher Signifikanz die Unterschiede zwischen der Kontrollkohorte und den LCHF-Gruppen vor. Auch bei den männlichen Tieren ließen sich signifikant niedrigere Gesamtprotein und Albuminwerte im Blut feststellen, jedoch mit geringerer Signifikanz. Der Anteil des Albumins vom Gesamtprotein veränderte sich in den Experimentalgruppen nicht (vgl. Abb. 14, S. 32). Die Ergebnisse sind insofern interessant, dass zumindest die LCHF-1 und HCHF-Diät, Protein-gematched zu der Kontrolldiät waren. Ob die verringerten Werte für Gesamtprotein und Albumin in den Versuchen wirklich auf eine verschlechterte Synthesefunktion der Leber hinweisen, ist kritisch zu betrachten. Es ist möglich, dass es unter den verwendeten HF-Diäten zu einer verschlechterten Resorption von Proteinen kommt. Auch in vorausgegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe wurde bereits eine verschlechterte Resorption von Spurenelementen und Mineralien unter HF-Diäten beschrieben (101). Auch wenn die Frage des Mechanismus an dieser Stelle nicht geklärt werden kann, bleibt es dennoch eine interessante Feststellung, dass zirkulierendes Gesamtprotein und Albumin in LCHF gefütterten Ratten, trotz gematchedem Proteinanteil der Nahrung, reduziert ist

Vor der Zerlegung der Leber für histologische und molekularbiologische Zwecke, wurde das Gewicht bestimmt. Weder bzgl. des absoluten noch des prozentualen Organgewichts ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und Experimentalgruppen. Zur weiteren Untersuchung des Gewebes erfolgte eine Red Oil Färbung der histologischen Leberschnitte, um eingelagerte Lipide unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Rein morphologisch konnte besonders in der männlichen LCHF-2 Gruppe ein besonders beeindruckendes Bild von eingelagerten Lipiden betrachtet werden. Die Lipidtropfen waren hier nicht nur besonders zahlreich, sondern schienen auch größer im Vergleich zu den anderen Gruppen (vgl. Abb. 17g, S. 46). Die Lipideinlagerungen der weiblichen Tiere schienen morphologisch im allgemeinen feintröpfiger als die in den Lebern der männlichen Tiere (vgl. Abb. 17a-d, S.46). Zur Objektivierung des Lipidanteils erfolgte die im Methodenteil beschriebene Messung des prozentualen Rotanteils der einzelnen Bilder. Die Ergebnisse zeigten hier einen deutlich erhöhten Lipidanteil im Lebergewebe der männlichen und weiblichen Tiere, die mit der ketogenen LCHF-2 Diät gefüttert wurden. Während bei den männlichen Tieren der LCHF-1 Gruppe der Lipidanteil ebenfalls signifikant erhöht war, fiel der Vergleich bei den weiblichen Tieren nicht signifikant aus, zeigte jedoch einen ähnlichen Trend. Interessanterweise kam es unter der HCHF-Diät bei beiden Geschlechtern zu keinem deutlich erhöhten Lipidanteil. Diese Beobachtung steht damit konträr zu den oft in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, dass eine HFHC-Diät ein metabolisches Syndrom und NAFLD sowie NASH in der Entstehung fördert (102, 103).

Betrachtet man die im Blut bestimmten TAGs, die ALT und das reduzierte Gesamtprotein sowie Albumin und insbesondere die histologische Morphologie des Lebergewebes, weisen die hier diskutierten Ergebnisse auf einen negativen Einfluss von LCHF- Diäten auf die Entwicklung einer NAFLD hin. Es zeichnet sich außerdem ab, dass männliche Tiere eher auf einen reduzierten Kohlenhydratanteil reagieren als weibliche. Bei den weiblichen Tieren werden die Effekte teilweise erst bei zusätzlich reduzierter Proteinzufuhr signifikant. Eine weitere Erkenntnis bietet der Hinweis, dass eine HFHC-Diät in der Zeitspanne des Versuchs, keine erhöhte Lipideinlagerung in die Leber begünstigt, sofern sie wie in diesem Falle, nicht mit einer hyperkalorischen Ernährung einhergeht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es über einen verlängerten Versuchszeitraum auch in dieser Diätgruppe zu einem erhöhten Lipidanteil in der Leber hätte kommen können.

Dennoch ist zu beachten, dass zum Teil auch nicht konklusive Ergebnisse, wie beispielsweise die erhöhte AST in der weiblichen Kontrollgruppe vorliegen. An dieser Stelle wären Versuche mit größeren Kohorten interessant, um zu sehen, ob dies zu anderen Ergebnissen führen würde.

6 Zusammenfassung

Die Auswirkungen unterschiedlicher Makronährstoffzusammensetzungen in der Nahrung von Ratten auf die GH-IGF-I Achse wurden in der Vergangenheit oft nur bei männlichen Ratten betrachtet, obwohl lange bekannt ist, dass die GH-IGF-I Achse einem geschlechtlichen Dimorphismus unterliegt und man weiß, dass Unterschiede im Makronährstoffwechsel zwischen männlichen und weiblichen Tieren vorliegen. Die Notwendigkeit für geschlechtsspezifische Forschung auf dem Gebiet der GH-Forschung ist somit gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte getestet werden, ob zuvor bei männlichen Tieren beobachtete negative Einflüsse von LC-Diäten auf die GH-IGF-I Achse, bei weiblichen Tieren reproduziert werden können. Zusätzlich wurde eine weitere Diätform, eine sog. Cafeteria-Diät und das Vorliegen einer NAFLD untersucht.

Hierzu sind jeweils 28 männliche und weibliche Tiere im Alter von 12 Wochen untersucht worden, die mit vier, sich in ihrer Makronährstoffzusammensetzung unterscheidenden Diäten gefüttert worden sind. Männliche und weibliche Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Tierhaltung untergebracht. Die Diätgruppen bestanden jeweils aus einer Kontrollgruppe, die mit sog. Chowfutter ad libitum gefüttert wurde, zwei LCHF-Gruppen, die sich vor allem in ihrem Proteinanteil unterschieden und einer HCHF-Gruppe. Die LCHF- und HCHF-Gruppen wurden zur Kontrollgruppe isoenergetisch-paargefüttert, sodass jegliche Ergebnisse allein auf die Makronährstoffzusammensetzung und nicht auf unterschiedliche Energieaufnahme zurückzuführen sind. Die Tiere wurden jeden 2. Tag gewogen und am 21. Versuchstag erfolgten Serienblutentnahmen für die Bestimmung der Serum GH-Werte. Am 28. Versuchstag endete der Versuch und die Tiere wurden geschlachtet und entsprechende Proben von Blut und Organen entnommen. Die einzelnen Proben wurden gewogen und vermessen. Um eine Untersuchung auf mRNA Ebene zu ermöglichen, wurden die Gewebeproben bei -80°C asserviert. Leber und Hypophyse wurden molekularbiologisch im Hinblick auf die GH-IGF-I Achse untersucht und die Leber außerdem histologisch betrachtet.

Gravierende Veränderungen des Phänotyps konnten innerhalb dieses Versuchs nicht festgestellt werden. Die Gewichtszunahme war in den LCHF-Diäten am geringsten, jedoch

konnte innerhalb dieser Diätgruppen auch eine Zunahme viszeraler Fettdepots beobachtet werden. Auch wenn die Ergebnisse an dieser Stelle nicht so eindeutig sind, wie es in vorhergehenden Versuchen der Fall war, zeigt sich ein umgekehrtes Verhältnis von Gewichtszunahme und Zunahme der Fettdepots innerhalb der LCHF-Diäten. Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren, war hierbei der Effekt am deutlichsten in der zusätzlich proteinreduzierten Diätgruppe. Es bieten sich keine signifikanten Unterschiede der Gesamtlänge der Tiere, allerdings gibt es Hinweise auf vermindertes Längenwachstum der langen Röhrenknochen im Bereich von Tibia und Femur unter LCHF-Diäten, bei den Weibchen nur innerhalb der nicht proteinreduzierten LCHF-Diät, bei den Männchen in beiden LC Gruppen. Eine weitere interessante Beobachtung stellt die Tatsache dar, dass die HCHF-Diät sich in ihren Ergebnissen bei Betrachtung des Phänotyps am ähnlichsten zur Kontrollgruppe verhielt, es ist deshalb davon auszugehen, dass die Ergebnisse der LCHF-Gruppen auf den reduzierten Kohlenhydratanteil und nicht auf den erhöhten Fettanteil begründen. Die verminderte Gewichtszunahme trotz zunehmender Fettdepots innerhalb der LCHF-Gruppen könnte sich auf ein vermindertes Längenwachstum von Röhrenknochen begründen.

Bei der histologischen Untersuchung der Leber ergibt sich unter den LCHF- Diäten und besonders unter der proteinreduzierten LCHF-2 Diät das eindruckliche Bild einer deutlich vermehrten Lipideinlagerung im Lebergewebe. Diese Beobachtung wird bei weiblichen und männlichen Tieren gemacht, allerdings zeigt sich bei den männlichen Tieren auch bei der LCHF-1 Diät ein signifikant erhöhter Lipidanteil in der Leber. Im Zusammenhang mit gleichzeitig erhöhter ALT und reduziertem Gesamtprotein/Albumin im Serum ergibt sich, bei beiden Geschlechtern, das Bild einer NAFLD bei den Tieren, die mit der LCHF-2-Diät gefüttert wurden und bei den männlichen Tieren zusätzlich auch in der LCHF-1 Gruppe. Auch in diesem Bereich verhält sich die HCHF-Gruppe der Kontrollgruppe am ähnlichsten. Bei den weiblichen Tieren gibt es besonders beim Lipidanteil der Leber kaum einen Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse zeigen uns, dass bei männlichen Tieren ein stark reduzierter Kohlenhydratanteil in der Nahrung zu vermehrter Speicherung von Lipiden in der Leber führt und dass eine zusätzliche Reduktion der Proteine, diesen Vorgang noch verstärkt, während bei weiblichen Tieren erst die zusätzliche Reduktion von Protein in der Nahrung zu deutlich vermehrter Lipideinlagerung in der Leber führt.

Ursächlich für die genannten Beobachtungen suggerieren die Versuchsreihen eine Beeinträchtigung der GH-IGF-Achse durch LCHF-Diäten. Diese ist sowohl für das Längenwachstum von Röhrenknochen essenziell als auch für den Stoffwechsel von Makronährstoffen. Im Bereich des Lipidstoffwechsels hat sie eine katabole Wirkung und regt zur Lipolyse an. Auswirkungen von LCHF-Diäten werden an verschiedenen Stellen der Achse sichtbar.

Zunächst kann eine verminderte mRNA-Expression des GHRH-R im Bereich der Hypophyse für die experimentell gefütterten Tiere nachgewiesen werden. Auch wenn die Reduktion bei den Weibchen nur in der HCHF- und bei den Männchen nur in der LCHF-2 Gruppe signifikant ist, ist der Trend doch in allen Experimentalgruppen zu sehen. Geht man davon aus, dass die verminderte GHRH-R mRNA Expression auch zu einer verminderten GHRH-R Expression an der Hypophyse führt, wäre an dieser Stelle von einem supprimierenden Einfluss auf die GH- Achse an zentral regulierender Stelle, durch eine verminderte Anregung zur GH-Ausschüttung, auszugehen. Diese Annahme zeigt sich bei Betrachtung der Serum GH-Werte als wahrscheinlich. Hier zeigen sich besonders bei den männlichen Tieren deutlich reduzierte Serum-GH-Werte in allen Experimentalgruppen. Diese zeigen sich im Sekretionsprofil besonders anhand weniger hoher Sekretionspeaks. Dass es zu keiner Beeinflussung des Sekretionsmusters an sich kommt, ist nachvollziehbar, da die maßgeblichen Faktoren der pulsatischen Sekretion Hell-/Dunkel- bzw. Schlaf- und Wachphasen sind. Die Auswirkung der Makronährstoffzusammensetzung betrifft also nur die ausgeschüttete Menge. Dennoch scheint das pulsatile Sekretionsmuster eine Rolle bei der Einflussnahme der Makronährstoffe zu spielen, denn die weiblichen Tiere, bei denen die Sekretion kontinuierlicher erfolgt und mit weniger hohen Peaks einhergeht, weisen eine weniger starke GH-Reduktion auf als die männlichen. Hier ist der Unterschied nur zwischen Kontrollgruppe und proteinreduzierten LCHF-2 Gruppe signifikant. Die GH-Werte der HCHF Gruppe gleichen interessanterweise wieder denen der Kontrollgruppe, obwohl die GHRH-R mRNA bei den Weibchen hier am deutlichsten reduziert ist. Es ist jedoch kein Widerspruch an sich, da die Betrachtung von mRNA nur eine Momentaufnahme bedeutet und über die letztendliche Translation keine Aussage getroffen werden kann. Dennoch sind an dieser Stelle weitere Versuche mit möglichst größeren Kohorten nötig, um Klarheit zu verschaffen.

Eine weitere Stufe der GH-IGF-Achse stellt der GH-R dar, über den die Wirkung des GHs vermittelt wird. Es erfolgte die Messung von GH-R mRNA im Lebergewebe, in dem Organ, wo die IGF-I Produktion stattfindet. An dieser Stelle lässt sich eine reduzierte GH-Sensibilität der Hepatozyten vermuten. In den Experimentalgruppen bildete sich der Trend reduzierter GH-R mRNA Expression ab, der sich auch in verminderter IGF-I Produktion, bei verminderten IGF-I Serumwerten abbildet. Auch auf dieser Ebene zeigt sich wieder, dass männliche Tiere stärker auf Makronährstoffveränderungen reagieren als weibliche, da bei den weiblichen Tieren eine Reduktion bei der zusätzlich proteinreduzierten LCHF-2 Diät wieder am deutlichsten auftritt. Währenddessen ist bei den männlichen Tieren in jeder Experimentalgruppe das Serum-IGF-I reduziert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Veränderungen der Makronährstoffzusammensetzung in der Nahrung von Ratten bei beiden Geschlechtern Auswirkungen auf die GH-IGF-I Achse haben und sich diese auf Phänotyp und die Entwicklung einer NAFLD auswirken. Dabei kann festgehalten werden, dass bei weiblichen Tieren besonders eine gleichzeitige Reduktion von Kohlenhydraten und Proteinen zu entsprechenden Veränderungen führt. Währenddessen stellt man bei männlichen Tieren bereits bei alleinig reduziertem Kohlenhydratanteil signifikante Veränderungen fest. Das Stoffwechselsystem und insbesondere die GH-IGF-I Achse, reagiert bei männlichen Tieren also sensibler auf die Veränderung von Kohlenhydratanteilen in der Nahrung als das weiblicher Tiere, sie neigen entsprechend auch eher zu der Entwicklung einer NAFLD. Weitere Versuche mit größeren Versuchstierzahlen könnten in der Zukunft die präsentierten Resultate stützen und ggf. weitere Erkenntnisse liefern.

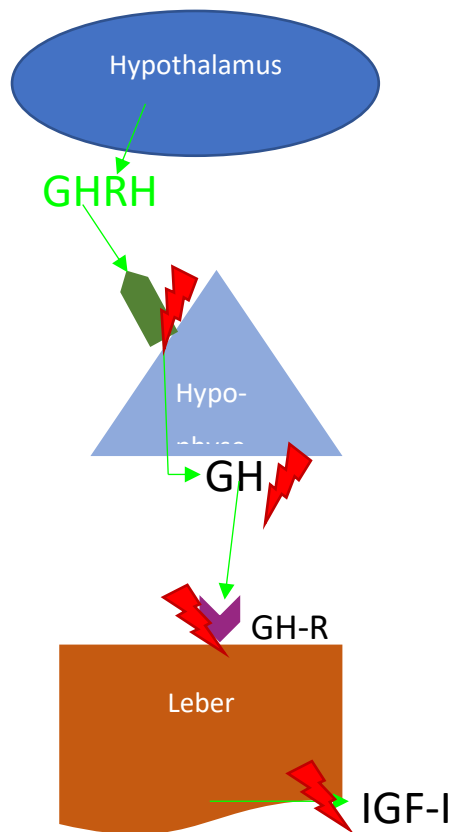


Abb.18: Vereinfachte Darstellung der GH-IGF-I Achse mit durch Blitze gekennzeichnete Bereiche in denen eine Suppression durch LCHF-Diäten gezeigt werden konnte.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Martin Reincke bedanken, dafür dass er mir die hier behandelte Thematik für meine Dissertation überlassen hat. Des Weiteren gilt mein Dank der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Bidlingmaier für die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. Kirstin Andersen, der Projektbetreuerin, für die Konzepterstellung und Durchführung der Tierhaltung und für die freundliche Einweisung bei laborchemischen und molekulargenetischen Untersuchungen sowie statistischer Auswertung. Außerdem Herrn Amon Horngacher für die freundliche Unterstützung bei der Betreuung und Durchführung der beschriebenen Versuche. Außerdem gilt ein besonderes Dankeschön dem Arbeitsgruppenleiter Dr. Martin Bidlingmaier, der für die entsprechenden Rahmenbedingung gesorgt hat und sich für die Korrektur der vorgelegten Arbeit zur Verfügung stellte.

Ein Dankeschön gilt den Personen, die mich mental und emotional auf dem Weg des Studiums und dieser Dissertation begleitet haben. An dieser Stelle sind besonders meine lieben Eltern, die durch ihre Unterstützung mein Studium und damit diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben, zu nennen. Meinem Vater verdanke ich dabei noch mein Interesse in die Medizin und die Entscheidung Ärztin werden zu wollen. Außerdem gilt ein besonderer Dank mein lieber Opa, dem ich diese Arbeit gewidmet habe, für das Erwecken eines naturwissenschaftlichen Interesses bereits in früher Kindheit und seine beharrliche Erinnerung daran, dass Begonnenes stets beendet werden soll.

8 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Obesity and overweight: World Health Organization media centre; 2017 [updated 10. 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. Sato F, Maeda N, Yamada T, Namazui H, Fukuda S, Natsukawa T, et al. Association of Epicardial, Visceral, and Subcutaneous Fat With Cardiometabolic Diseases. *Circulation Journal*. 2018;82(2):502-8.
3. Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Grundy SM, International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome Brussels: International Diabetes Federation; 2006 [Available from: <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome>.
4. Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet (London, England)*. 2010;375(9710):181-3.
5. Yates N, Teuner CM, Hunger M, Holle R, Stark R, Laxy M, et al. The Economic Burden of Obesity in Germany: Results from the Population-Based KORA Studies. *Obesity facts*. 2016;9(6):397-409.
6. Hauner H. Risiken kohlenhydratarmer Diäten. *Dtsch Arztebl International*. 2005;102(11):750-.
7. Volek JS, Phinney SD, Forsythe CE, Quann EE, Wood RJ, Puglisi MJ, et al. Carbohydrate restriction has a more favorable impact on the metabolic syndrome than a low fat diet. *Lipids*. 2009;44(4):297-309.
8. GHAZAVI A, TONEKABONI SH, KARIMZADEH P, NIKIBAKHSH AA, KHAJEH A, FAYYAZI A. The Ketogenic and Atkins diets effect on intractable epilepsy: A comparison. *Iranian journal of child neurology*. 2014;8(3):12.
9. Paoli A, Bianco A, Damiani E, Bosco G. Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases. *BioMed research international*. 2014;2014:474296.
10. Bazzano LA, Hu T, Reynolds K, Yao L, Bunol C, Liu Y, et al. Effects of low-carbohydrate and low-fat diets: a randomized trial. *Annals of internal medicine*. 2014;161(5):309-18.
11. Bielohuby M, Sisley S, Sandoval D, Herbach N, Zengin A, Fischereder M, et al. Impaired glucose tolerance in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2013;305(9):E1059-70.
12. Bielohuby M, Sawitzky M, Stoehr BJ, Stock P, Menhofer D, Ebensing S, et al. Lack of dietary carbohydrates induces hepatic growth hormone (GH) resistance in rats. *Endocrinology*. 2011;152(5):1948-60.
13. Pape H-C, Klinke R, Brenner B. *Physiologie*. Stuttgart: Thieme; 2014.
14. Baumann G. Chapter 12 Growth Hormone and its Disorders. In: Becker KL, editor. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 129-39.
15. Kleine B, Rossmannith W. Protein- und Peptid-Hormone von Vertebraten. *Hormone und Hormonsystem - Lehrbuch der Endokrinologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 19-141.

16. Vijayakumar A, Novosyadlyy R, Wu Y, Yakar S, LeRoith D. Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2010;20(1):1-7.
17. Amato G, Carella C, Fazio S, La Montagna G, Cittadini A, Sabatini D, et al. Body composition, bone metabolism, and heart structure and function in growth hormone (GH)-deficient adults before and after GH replacement therapy at low doses. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1993;77(6):1671-6.
18. Molitch ME, Clemmons DR, Malozowski S, Merriam GR, Vance ML. Evaluation and Treatment of Adult Growth Hormone Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(6):1587-609.
19. Smith JC, Evans LM, Davies JS. Effect of Growth Hormone (GH) Therapy on Endothelial Function in GH-Deficient Adults. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84(12):4749-51.
20. Brabant G. KAPITEL 8 - Hypophysenvorderlappeninsuffizienz und Substitution mit Wachstumshormon. *Praktische Endokrinologie (2 Auflage)*. Munich: Urban & Fischer; 2010. p. 56-65.
21. Southmayd EA, De Souza MJ. A summary of the influence of exogenous estrogen administration across the lifespan on the GH/IGF-1 axis and implications for bone health. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2017;32:2-13.
22. Rozario KS, Lloyd C, Ryan F. Gh and Igf-1 Physiology in Childhood. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
23. Ranabir S, Reetu K. Stress and hormones. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2011;15(1):18-22.
24. Deemer SE, Castleberry TJ, Irvine C, Newmire DE, Oldham M, King GA, et al. Pilot study: an acute bout of high intensity interval exercise increases 12.5 h GH secretion. *Physiological reports*. 2018;6(2).
25. Richmond E, Rogol AD. Endocrine Responses to Exercise in the Developing Child and Adolescent. *Frontiers of hormone research*. 2016;47:58-67.
26. Gevers EF, Wit JM, Robinson IC. Growth, growth hormone (GH)-binding protein, and GH receptors are differentially regulated by peak and trough components of the GH secretory pattern in the rat. *Endocrinology*. 1996;137(3):1013-8.
27. Tannenbaum GS, Martin JB. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. 1976;98(3):562-70.
28. Liu M, Wang J, Zeng J, Cao X, He Y. Association of NAFLD With Diabetes and the Impact of BMI Changes: A 5-Year Cohort Study Based on 18,507 Elderly. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017;102(4):1309-16.
29. Sumida Y, Nakajima A, Itoh Y. Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(2):475-85.
30. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *Journal of hepatology*. 2015;62(1 Suppl):S47-64.

31. Bril F, Sninsky JJ, Baca AM, Superko HR, Portillo Sanchez P, Biernacki D, et al. Hepatic Steatosis and Insulin Resistance, But Not Steatohepatitis, Promote Atherogenic Dyslipidemia in NAFLD. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016;101(2):644-52.
32. Brown GT, Kleiner DE. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism: clinical and experimental*. 2016;65(8):1080-6.
33. Loomis AK, Kabadi S, Preiss D, Hyde C, Bonato V, St. Louis M, et al. Body Mass Index and Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Two Electronic Health Record Prospective Studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016;101(3):945-52.
34. Mehta SR, Godsland IF, Thomas EL, Pavitt DV, Morin SX, Bell JD, et al. Intrahepatic Insulin Exposure, Intrahepatocellular Lipid and Regional Body Fat in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(6):2151-9.
35. Denzer C, Thiere D, Muche R, Koenig W, Mayer H, Kratzer W, et al. Gender-Specific Prevalences of Fatty Liver in Obese Children and Adolescents: Roles of Body Fat Distribution, Sex Steroids, and Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(10):3872-81.
36. Park HE, Kwak M-S, Kim D, Kim M-K, Cha M-j, Choi S-Y. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated With Coronary Artery Calcification Development: A Longitudinal Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016;101(8):3134-43.
37. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2005;41(6):1313-21.
38. Tannenbaum C, Greaves L, Graham ID. Why sex and gender matter in implementation research. *BMC medical research methodology*. 2016;16(1):145.
39. Bredella MA. Sex Differences in Body Composition. In: Mauvais-Jarvis F, editor. *Sex and Gender Factors Affecting Metabolic Homeostasis, Diabetes and Obesity*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 9-27.
40. Nindl BC, Scoville CR, Sheehan KM, Leone CD, Mello RP. Gender differences in regional body composition and somatotrophic influences of IGF-I and leptin. *Journal of Applied Physiology*. 2002;92(4):1611-8.
41. Norman C, Rollene NL, Erickson D, Miles JM, Bowers CY, Veldhuis JD. Estradiol regulates GH-releasing peptide's interactions with GH-releasing hormone and somatostatin in postmenopausal women. *European journal of endocrinology*. 2014;170(1):121-9.
42. Veldhuis JD, Erickson D, Wigham J, Weist S, Miles JM, Bowers CY. Gender, Sex-Steroid, and Secretagogue-Selective Recovery from Growth Hormone-Induced Feedback in Older Women and Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(8):2540-7.
43. Avtanski D, Novaira HJ, Wu S, Romero CJ, Kineman R, Luque RM, et al. Both Estrogen Receptor α and β Stimulate Pituitary GH Gene Expression. *Molecular Endocrinology*. 2014;28(1):40-52.
44. Bielohuby M, Matsuura M, Herbach N, Kienzle E, Slawik M, Hoefflich A, et al. Short-term exposure to low-carbohydrate, high-fat diets induces low bone mineral density and reduces bone formation in rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(2):275-84.
45. Stoehr BJM. Einfluss der relativen Abundanz von Fett und Protein in nahezu kohlenhydrat-freien Diaeten auf das Wachstumshormon und Insulin-aehnliche-Wachstumsfaktoren-I System in Ratten. München: Ludwigs-Maximilians-Universität München; 2014.

46. Muelhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. Heidelberg: Spektrum akademischer Verlag 2009.
47. verstehen IT. Tierarten und ihr Einsatz in der Forschung [web page]. Deutschland: www.tierversuche-verstehen.de; 2019 [
48. Gill TJ, 3rd, Smith GJ, Wissler RW, Kunz HW. The rat as an experimental animal. Science (New York, NY). 1989;245(4915):269-76.
49. Weiss J. Versuchstierkunde: Tierpflege in Forschung und Klinik. Stuttgart: Enke Verlag; 2014. 533 p.
50. Arts JW, Kramer K, Arndt SS, Ohl F. The impact of transportation on physiological and behavioral parameters in Wistar rats: implications for acclimatization periods. ILAR journal. 2012;53(1):E82-98.
51. Pertsov SS. The behavior of rats in response to changes in the light regime and administration of melatonin. Neuroscience and behavioral physiology. 2006;36(7):767-72.
52. Amador-Noguez D, Zimmerman J, Venable S, Darlington G. Gender-specific alterations in gene expression and loss of liver sexual dimorphism in the long-lived Ames dwarf mice. Biochem Biophys Res Commun. 2005;332(4):1086-100.
53. Gleeson HK, Lissett CA, Shalet SM. Insulin-like growth factor-I response to a single bolus of growth hormone is increased in obesity. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2005;90(2):1061-7.
54. Frutos MG, Cacicedo L, Fernandez C, Vicent D, Velasco B, Zapatero H, et al. Insights into a role of GH secretagogues in reversing the age-related decline in the GH/IGF-I axis. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2007;293(5):E1140-52.
55. Bravata DM, Sanders L, Huang J, Krumholz HM, Olkin I, Gardner CD, et al. Efficacy and safety of low-carbohydrate diets: a systematic review. Jama. 2003;289(14):1837-50.
56. Boden G, Sargrad K, Homko C, Mozzoli M, Stein TP. Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes. Annals of internal medicine. 2005;142(6):403-11.
57. Arnold P, Lord N, Smith A, Bybee S. The Effects of Non-Ideal Temperature Regimes on RNA Quality from Samples Stored in RNAlater-like Buffer: An Attempt to Replicate Field Conditions. J Analyt Molecul Tech. 2016;2(1):8.
58. Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögreen B, Linz L, Kubista M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). Biomolecular detection and quantification. 2017;12:1-6.
59. Caton SJ, Yinglong B, Burget L, Spangler LJ, Tschop MH, Bidlingmaier M. Low-carbohydrate high-fat diets: regulation of energy balance and body weight regain in rats. Obesity (Silver Spring, Md). 2009;17(2):283-9.
60. Brehm BJ, Seeley RJ, Daniels SR, D'Alessio DA. A randomized trial comparing a very low carbohydrate diet and a calorie-restricted low fat diet on body weight and cardiovascular risk factors in healthy women. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2003;88(4):1617-23.
61. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, McGuckin BG, Brill C, Mohammed BS, et al. A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. New England Journal of Medicine. 2003;348(21):2082-90.

62. Adam-Perrot A, Clifton P, Brouns F. Low-carbohydrate diets: nutritional and physiological aspects. *Obesity reviews*. 2006;7(1):49-58.
63. Lobley GE, Bremner DM, Holtrop G, Johnstone AM, Maloney C. Impact of high-protein diets with either moderate or low carbohydrate on weight loss, body composition, blood pressure and glucose tolerance in rats. *British journal of nutrition*. 2007;97(6):1099-108.
64. Boozer CN, Schoenbach G, Atkinson RL. Dietary fat and adiposity: a dose-response relationship in adult male rats fed isocalorically. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 1995;268(4):E546-E50.
65. Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Lindahl A, Isgaard J. Hormonal regulation of longitudinal bone growth. *European journal of clinical nutrition*. 1994;48:S150-8; discussion S8-60.
66. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocrine Reviews*. 2008;29(5):535-59.
67. Wang J, Zhou J, Cheng C, Kopchick J, Bondy C. Evidence supporting dual, IGF-I-independent and IGF-I-dependent, roles for GH in promoting longitudinal bone growth. *Journal of Endocrinology*. 2004;180(2):247-56.
68. Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, Jansson J-O, Isaksson O. Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1986;250(4):E367-E72.
69. Olney RC. Regulation of bone mass by growth hormone. *Medical and pediatric oncology*. 2003;41(3):228-34.
70. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu J-L, et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(6):771-81.
71. Grumbach MM. Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2000;13(Supplement):1439-56.
72. Zengin A, Kropp B, Chevalier Y, Junnila R, Sustarsic E, Herbach N, et al. Low-carbohydrate, high-fat diets have sex-specific effects on bone health in rats. *European journal of nutrition*. 2016;55(7):2307-20.
73. SNYDER DK, CLEMMONS DR, UNDERWOOD LE. Dietary carbohydrate content determines responsiveness to growth hormone in energy-restricted humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1989;69(4):745-52.
74. Redman LM, Veldhuis JD, Rood J, Smith SR, Williamson D, Ravussin E, et al. The effect of caloric restriction interventions on growth hormone secretion in nonobese men and women. *Aging cell*. 2010;9(1):32-9.
75. Cappon JP, Ipp E, Brasel JA, Cooper DM. Acute effects of high fat and high glucose meals on the growth hormone response to exercise. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1993;76(6):1418-22.
76. Oster MH, Fielder PJ, Levin N, Cronin MJ. Adaptation of the growth hormone and insulin-like growth factor-I axis to chronic and severe calorie or protein malnutrition. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(5):2258-65.
77. Ammann P, Brennan TC, Mekraldi S, Aubert ML, Rizzoli R. Administration of growth hormone in selectively protein-deprived rats decreases BMD and bone strength. *Bone*. 2010;46(6):1574-81.

78. Mejia-Naranjo W, Yakar S, Bernal R, LeRoith D, Sanchez-Gomez M. Regulation of the splenic somatotrophic axis by dietary protein and insulin-like growth factor-I in the rat. *Growth hormone & IGF research*. 2003;13(5):254-63.
79. Ahmed H, Fayez M, Meites J. Episodic growth hormone secretory pattern in male rats: relationship to gonadal steroid hormones. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 1989;36(1-10):292-8.
80. Luque RM, Kineman RD. Impact of Obesity on the Growth Hormone Axis: Evidence for a Direct Inhibitory Effect of Hyperinsulinemia on Pituitary Function. *Endocrinology*. 2006;147(6):2754-63.
81. Ong ZY, Wanasuria AF, Lin MZ, Hiscock J, Muhlhausler BS. Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system. *Appetite*. 2013;65:189-99.
82. Jaffe CA, Ocampo-Lim B, Guo W, Krueger K, Sugahara I, DeMott-Friberg R, et al. Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(1):153-64.
83. Shen XY, Holt RIG, Miell JP, Justice S, Portmann B, Postel-Vinay M-C, et al. Cirrhotic Liver Expresses Low Levels of the Full-Length and Truncated Growth Hormone Receptors1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1998;83(7):2532-8.
84. Xu L, Xu C, Yu C, Miao M, Zhang X, Zhu Z, et al. Association between serum growth hormone levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *PLoS One*. 2012;7(8).
85. Fan Y, Fang X, Tajima A, Geng X, Ranganathan S, Dong H, et al. Evolution of hepatic steatosis to fibrosis and adenoma formation in liver-specific growth hormone receptor knockout mice. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:218.
86. Veyrat-Durebex C, Gaudreau P, Boghossian S, Alliot J. Effects of peripheral and central administration of GHRH on feeding in aging LOU rats. *Peptides*. 2001;22(12):2119-26.
87. Takahashi Y, Iida K, Takahashi K, Yoshioka S, Fukuoka H, Takeno R, et al. Growth hormone reverses nonalcoholic steatohepatitis in a patient with adult growth hormone deficiency. *Gastroenterology*. 2007;132(3):938-43.
88. Ichikawa T, Hamasaki K, Ishikawa H, Ejima E, Eguchi K, Nakao K. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatic steatosis in patients with adult onset growth hormone deficiency. *Gut*. 2003;52(6):914-.
89. Chishima S, Kogiso T, Matsushita N, Hashimoto E, Tokushige K. The relationship between the growth hormone/insulin-like growth factor system and the histological features of nonalcoholic fatty liver disease. *Internal Medicine*. 2017;56(5):473-80.
90. Tendler D, Lin S, Yancy WS, Mavropoulos J, Sylvestre P, Rockey DC, et al. The effect of a low-carbohydrate, ketogenic diet on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Digestive diseases and sciences*. 2007;52(2):589-93.
91. Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. 2013;59(1):138-43.
92. York LW, Puthalapattu S, Wu GY. Nonalcoholic fatty liver disease and low-carbohydrate diets. *Annual review of nutrition*. 2009;29:365-79.
93. Schugar RC, Crawford PA. Low-carbohydrate ketogenic diets, glucose homeostasis, and nonalcoholic fatty liver disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2012;15(4):374.
94. Crowe T. Safety of low-carbohydrate diets. *Obesity reviews*. 2005;6(3):235-45.

Literaturverzeichnis

95. Forsythe CE, Phinney SD, Fernandez ML, Quann EE, Wood RJ, Bibus DM, et al. Comparison of low fat and low carbohydrate diets on circulating fatty acid composition and markers of inflammation. *Lipids*. 2008;43(1):65-77.
96. Pilis K, Pilis A, Stec K, Pilis W, Langfort J, Letkiewicz S, et al. Three-year chronic consumption of low-carbohydrate diet impairs exercise performance and has a small unfavorable effect on lipid profile in middle-aged men. *Nutrients*. 2018;10(12):1914.
97. Hossain N, Afendy A, Stepanova M, Nader F, Srishord M, Rafiq N, et al. Independent predictors of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009;7(11):1224-9. e2.
98. Zur B. Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse.
99. Koga M, Murai J, Saito H, Mukai M, Kasayama S. Serum glycated albumin levels, but not glycated hemoglobin, is low in relation to glycemia in non-diabetic men with nonalcoholic fatty liver disease with high alanine aminotransferase levels. *Clinical biochemistry*. 2010;43(12):1023-5.
100. Rothschild MA, Oratz M, Zimmon D, Schreiber SS, Weiner I, Van Caneghem A. Albumin synthesis in cirrhotic subjects with ascites studied with carbonate-14 C. *The Journal of clinical investigation*. 1969;48(2):344-50.
101. Frommelt L, Bielohuby M, Stoehr BJ, Menhofer D, Bidlingmaier M, Kienzle E. Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats. *Nutrition*. 2014;30(7-8):869-75.
102. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity*. 2011;19(6):1109-17.
103. de Melo AF, Moreira CCL, Sales CF, Rentz T, Raposo HF, Garófalo MAR, et al. Increase in liver cytosolic lipases activities and VLDL-TAG secretion rate do not prevent the non-alcoholic fatty liver disease in cafeteria diet-fed rats. *Biochimie*. 2018;150:16-22.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite	Titel
Abb.1	6	Schematische Darstellung der GH-IGF-I Achse
Abb. 2	17	Säulendiagramm Gesamtkörperlänge
Abb.3	25	Säulendiagramm Femurlänge
Abb. 4	26	Säulendiagramm Tiabiallänge
Abb.5	27	Säulendiagramm absolute Gewichtszunahme
Abb. 6	29	Säulendiagramme Gewichte der Fettdepots
Abb. 7a-d	31	GH-Sekretionsprofile
Abb. 8a	32	Rank-Plot GH-Serumwerte für die Weibchen
Abb. 8b	33	Rank-Plot GH-Serumwerte für die Männchen
Abb. 8c	34	Säulendiagramm zur AUC GH-Serumwerte
Abb. 9	35	Säulendiagramm GHRH-R mRNA Expression der Hypophyse
Abb. 10	36	Säulendiagramm GH-R mRNA Expression der Leber
Abb. 11	37	Säulendiagramm Serum-IGF-I Werte
Abb. 12	39	Säulendiagramm Serumcholesterin und -triacylglyceride
Abb. 13	40	Säulendiagramm Serumgesamtprotein, -albumin und Anteil des Albumins am Gesamtprotein
Abb. 14	42	Säulendiagramm Serumwerten von ALT und AST
Abb. 15 a	43	Säulendiagramm absolutes Lebergewicht und
Abb. 15 b	44	Säulendiagramm Lebergewicht relativ zum KG
Abb. 16a -d	46	Beispielbilder histologischer Leberschnitte der Weibchen aus den Gruppen a) chow, b) LCHF-1, c) LCHF-2 und d) HCHF
Abb. 16 e-h	46	Beispielbilder histologischer Leberschnitte der Männchen aus den Gruppen e) chow, f) LCHF-1, g) LCHF-2 und h) HCHF
Abb. 17	47	Säulendiagramm zum prozentualen Lipidanteil der histologischen Schnitte
Abb.18	67	Schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Abschnitte der GH-IGF-I Achse

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite	Bezeichnung
Tab. 1	14	Durchschnittliches Körpergewicht der Diätgruppen zu Beginn des Versuchs in g
Tab. 2	15	Energiegehalt der Diäten und prozentualer Anteil der Makronährstoffe am Energiegehalt
Tab.3	21	Mixtur für die rt-q-PCR
Tab. 4	26	M und SD für Gesamtkörper-, Femur- und Tibiallänge in cm
Tab. 5	27	M und SD für die absolute Zunahme des Körpergewichts in g
Tab. 6	30	M und SD für das Gewicht der einzelnen Fettdepots in g
Tab. 7	34	M und SD für AUC der GH-Serumwerte-Rank-Kurven
Tab. 8	35	M und SD für die GHRH-R mRNA Expression/ beta-Aktin mRNA der Hypophyse
Tab. 9	36	M und SD für die GH-R mRNA Expression/ beta-Aktin mRNA in der Leber
Tab. 10	37	M und SD für Serum-IGF-I Werte in ng/mL
Tab.11	39	M und SD für Triacylglyceride und Cholesterol in mg/dL
Tab. 12	41	M und SD für Gesamtprotein, Albumin in mg/dL und prozentualen Anteil des Albumins am Gesamtprotein in g bzw. %
Tab. 13	42	M und SD für Serumwerte der ALT und AST in U/L
Tab. 14	44	M und SD für das Lebergewicht absolut in g und Anteil am KG in %
Tab. 15	47	M und SD für Lipidanteil in untersuchten histologischen Leberschnitten in %

11 Anhang

11.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
ALS	Acid-labil subunit
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMI	Body Mass Index
cDNA	complementary Desoyribonucleic Acid
CT	Computertomographie
C _T	Treshhold
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
GH	Growth Hormone
GH-R	Growth Hormone-Rezeptor
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCHF	High Carbohydrate High Fat
HKG	Housekeeping Gene
IDF	International Diabetes Federation
IGF	Insulin like Growth Factor
IGFBP	Insulin like Growth Factor-Binding Protein
IGF-R	Insulin like Growth Factor-Rezeptor
JAK2	Janus-Kinase 2
KG	Körpergewicht
LCHF	Low Carbohydrate High Fat
LF	Low Fat
M	Mittelwert /Mean
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NAFLD	Non-Alcoholic-Fatty-Liver-Disease
NASH	Non-Alcholic-steatosis-Hepatis
NCBI	National Centre of Biotechnology information
NVM	Nucleus ventromedialis
rt-q-PCR	Real time quantity polymerase chain reaktion
SD	Standard Deviation
Tab.	Tabelle
TAGs	Triacylglycerols

11.2 Geräte, Kits und Materialien

- Elisa:

GH Assay: Merck/Millipore ERZMGH-45BK

Rat IGF-1 ELISA Kit Nr: ERIGF1 Thermo Scientific

Rat Growth Hormone ELISA Kit KRC5311 Thermo Scientific
- RNA Isolation:

Stainless Steel beads, 5mm

Chloroform- Baker Analyzed, J.T. Baker

70% Ethanol, Pan Reac Applichem ITW Reagents

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

Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415R

Tissue Lyser: Quiagen Tissue LyserLT

Nano Drop Spectrophotometer, peQ-Lab

QIAGEN Sample of Assay Technologies - RNaeasy Lipid Tissue Mini Kit
- Umschreiben mRNA in cDNA:

DNA Engine PTC 200 Peltier Thermal Cyclor

Promega dnTP's U1515, M-MLV M3683 (reverse transkriptase RNase, Point Mutant, 5xBuffer, RNasin N2515 (rekombinant RNasin, Ribonuclease Inhibitor), Oligo d(T) C1101
- Agarosegelelektrophorese:

Elektrophoresesystem (Power Pac 300, BioRad

Heizblock (Thermoblock , Haep Labor Consult

Geldokumentationssystem (Gel iX Imager, Intas

Homogenisator (Ultra Turrax T8, IKA®-Werke)

Magnetrührer (RH Basic 2, IKA®-Werke)Bio-RAD SUB-CELL-GT

Agarosepulver (PeqGold Universal Agarose, PeqLab)

Ethidiumbromid (Carl Roth)

TEP (Sigma)

- Quantitative Real Time PCR

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

EvaGreen® Supermix BioRad

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

Thermal Cycler T100 (Life Science, Bio Rad)

- Histologie:

Eindeckmedium auf Wasserbasis (Aqueous mountant Vector Lab.)

Aqua dest. Sigma (sterile filtered Bio Redgent W3500-1l) suitable for cell-culture- Water

TEP (Sigma)

Oil-red O Pulver (Sigma)

Hämatoxin Stammlösung Hämalun (Merck)

Mikroskop: Leica DMRB

Kamera: Leica DC DMC 2900

Waage: Sartorius CPA225D-OCE

Mixer: IKA-Combining RCT

Waage: BP121A, Sartorius

Kryotom Super Frost Menzel

- Software:

Graph Pad Prism (Graph Pad Software, Inc.)

MxPro – Mx3000p v4.01 (Stratagene)

Nanodrop 1000 V.3.6.0 (Thermo Scientific)

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

- Pipettieren

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

Pipettenspitze 10 mL (Combitips®, Eppendorf)

Pipettenspitze 1000 µL (blau, Sarstedt)

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

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

12 Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Kavermann, Larissa Marie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Unterschiedliche Effekte von "low-carbohydrate-high-fat"-Diäten bei männlichen und weiblichen Ratten: Veränderungen von Gewicht, Körperzusammensetzung, somatotroper Achse und Leberstoffwechsel

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.

Frankfurt am Main, 31.05.2022

Ort, Datum

Larissa Kavermann

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

