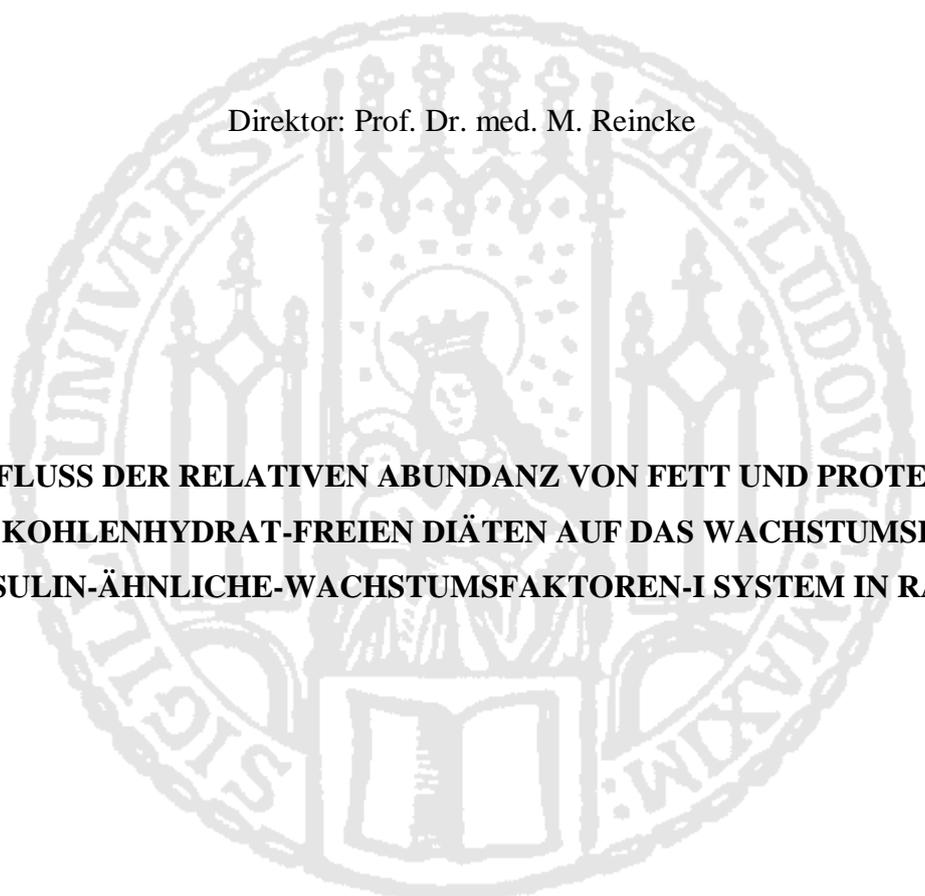


Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke



**"EINFLUSS DER RELATIVEN ABUNDANZ VON FETT UND PROTEIN IN
NAHEZU KOHLENHYDRAT-FREIEN DIÄTEN AUF DAS WACHSTUMSHORMON
UND INSULIN-ÄHNLICHE-WACHSTUMSFAKTOREN-I SYSTEM IN RATTEN"**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

BARBARA JOHANNA MARIA STÖHR
aus Vöckalbruck, Österreich

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Reincke

Mitberichterstatter: PD Dr. med. J. Römmler-Zehrer

Prof. Dr. med. Dr. med. habil. B. Koletzko

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. Bidlingmaier

PD Dr. med. vet. Dr. habil. med. M. Bielohuby

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2014

*„Doch Forschung strebt und ringt,
ermüdend nie,
nach dem Gesetz, dem Grund, Warum und Wie.“*

Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)

Meiner über alles geschätzten Mama.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Adipositas	1
1.1.1 Definition und Grenzwerte.....	1
1.1.2 Sozioökonomische Faktoren	2
1.1.3 Assoziierte Erkrankungen.....	3
1.1.4 Fettgewebsinflammation.....	3
1.2 Ernährungsphysiologische Konzepte	4
1.2.1 Ketogene Diäten	4
1.2.1.1 Biochemische und physiologische Grundlagen.....	4
1.2.1.2 Therapieansatz.....	5
1.3 Makronährstoffe.....	6
1.3.1 Fette.....	7
1.3.2 Kohlenhydrate.....	7
1.3.3 Proteine	8
1.4 Mikronährstoffe	8
1.5 Growth Hormone / Insulin - like growth factor I Achse	9
1.5.1 Growth Hormone (GH)	9
1.5.1.1 Regulation.....	10
1.5.2 Insulin - like growth factor I (IGF-I).....	12
1.5.2.1 Insulin like growth factor binding proteins (IGFBPs)	14
1.5.3 Wirkung	14
1.6 Die Ratte als Tiermodell in Ernährungsstudien	15
1.6.1 Charakteristika des Versuchstieres Ratte	16
2 Arbeitshypothese und Fragestellung	18
2.1.1 Studiendesign.....	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Versuchstiere	20
3.1.1 Futter und Fütterung	21
3.1.2 Lebendgewichtbestimmung	23
3.1.3 Energiestoffwechsel und Kalorimetrie.....	23
3.1.4 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials	24

3.1.4.1	Serienblutentnahme zur Analyse der pulsatilen GH Sekretion	24
3.1.4.2	Probengewinnung im Rahmen der Sektion	25
3.1.5	Proteinbiochemische Methoden zur Serumkonzentrationsbestimmung	29
3.1.6	Molekularbiologische Methoden	32
3.1.6.1	RNA-Isolation	32
3.1.6.2	Spektralphotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	33
3.1.6.3	cDNA Synthese aus RNA	33
3.1.6.4	Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA	34
3.1.6.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
3.1.7	Histologie	37
3.1.7.1	Paraffinhistologie	37
3.1.7.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung des perirenen Fettgewebes	37
3.1.7.3	Immunohistochemie des perirenen Fettgewebes	38
3.1.8	Statistische Analyse	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Phänotyp	41
4.1.1	Körperwachstum und Knochenwachstum	41
4.1.2	Körpergewichtsentwicklung	42
4.1.3	Kalorienaufnahme / Futterkonsum	44
4.2	Kalorimetrie	44
4.3	Körperzusammensetzung und Organgewichte	45
4.3.1	Haut und LBM	45
4.3.2	Gewichte der einzelnen Fettdepots	46
4.3.3	Struktur des perirenen Fettgewebes	48
4.3.4	Organgewichte	49
4.4	GH / IGF-I System	50
4.4.1	GH / IGF-I	50
4.4.2	Regulierende Serum Parameter	51
4.4.3	Expression des Wachstumshormonrezeptors	52
4.4.4	Genexpression von IGF-I im peripheren Gewebe	52
4.4.5	Zentrale Regulation	53
4.5	Fettgewebsinflammation	54

5	Diskussion und Schlussfolgerung	56
5.1	Allgemeine Versuchsbedingungen	56
5.1.1	Rahmenbedingungen.....	56
5.1.2	Lebendgewichtsbestimmung	58
5.1.3	Futter und Fütterung	58
5.1.4	Probenanalyse	60
5.2	Ergebnisse	61
5.2.1	Phänotyp.....	61
5.2.2	Kalorimetrie	65
5.2.3	GH / IGF-I System.....	67
5.2.4	Fettgewebsinflammation.....	73
6	Zusammenfassung	77
7	Summary	81
8	Literaturverzeichnis	85
9	Anhang	104
9.1	Abkürzungsverzeichnis	104
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	107
9.3	Tabellenverzeichnis	108
9.4	Primer	109
9.5	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	110
10	Danksagung	113
12	Eidesstattliche Versicherung.....	1155

1 Einleitung

Zu den aktuell größten Herausforderungen der biomedizinischen Forschung zählen neue Wege zur Bekämpfung der Adipositas. Um der epidemischen Körpergewichtszunahme entgegenzuwirken, bieten sich verschiedene diätetische Interventionen an. Das traditionelle Konzept der Kalorienreduktion wird dabei zunehmend durch Variation der Makronährstoffzusammensetzung in Diäten ergänzt. Beliebte Methoden hierbei sind „low carbohydrate high fat“ (LCHF) Diäten. Trotz der häufigen Verwendung von LCHF sind mögliche Risikofaktoren und Nebenwirkungen bisher unzureichend erforscht. Im Speziellen wurde der Einfluss solcher Diäten auf das Wachstumshormon (Growth Hormone, GH) und Insulin-like growth factor (IGF) System bislang kaum untersucht.

Die vorliegende tierexperimentelle Arbeit erforscht die Auswirkungen unterschiedlicher LCHF-Diäten auf die Körperzusammensetzung und verschiedene endokrinologisch relevante Systeme, im Speziellen auf das GH / IGF-I System.

Nachfolgend werden die für diese Doktorarbeit relevanten Themengebiete vorgestellt.

1.1 Adipositas

1.1.1 Definition und Grenzwerte

Übergewicht beinhaltet eine Zunahme des Körperfettanteils über das Normalmaß hinaus. Dieser Zustand ist per se noch nicht als Krankheit anzusehen. Wenn jedoch ein bestimmtes Maß überschritten wird ($\sigma > 20\%$, $\text{♀} > 30\%$ Anteil der Fettmasse am Körpergewicht) spricht man von Adipositas [1]. Durch den Körper-Massen-Index (Body mass index, BMI) kann die Fettmasse indirekt abgeschätzt werden. Der BMI ist der Quotient aus Gewicht und Körpergröße zum Quadrat (kg/m^2) [1, 2]. Darüber hinaus bestimmt das Fettverteilungsmuster das kardiovaskuläre und metabolische Gesundheitsrisiko, wobei die viszerale Fettmasse besonders eng mit kardiovaskulären Risikofaktoren und Komplikationen korreliert [3]. Ein einfaches Maß zur Beurteilung des viszeralen Fettdepots ist die Messung des Taillenumfangs [4].

Adipositas wurde durch die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) als Krankheit eingestuft, da sie mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität korreliert. Es handelt sich um ein multifaktorielles Krankheitsbild. Ursächlich unterscheidet man zwischen einer primären und einer sekundären Form der Adipositas [1]:

- Die primäre Adipositas (95%) entsteht hauptsächlich durch eine erhöhte Energiezufuhr bei geringem Energieverbrauch, woraus eine positive Energiebilanz resultiert. Auch psychische und genetische Faktoren spielen hierbei eine Rolle.
- Die sekundäre Adipositas (5%) entsteht im Rahmen endokrinologischer Erkrankungen und ist zentral oder iatrogen bedingt.

1.1.2 Sozioökonomische Faktoren

Der kontinuierliche Anstieg der Prävalenz der Adipositas stellt eine enorme gesundheitspolitische Herausforderung dar [5]. Allein in der Bundesrepublik Deutschland kam es in den Jahren zwischen 1985 und 2002 zu einem Anstieg der adipösen Bevölkerung im Alter von 25 Jahren bis 69 Jahren von 16,2% auf 22,9% [6]. Im Zuge dieser Entwicklung kam es dazu, dass die WHO vor einer drohenden Adipositasepidemie im 21. Jahrhundert warnt [2]. Den effektiven Kosten, welche direkt für das Gesundheitssystem durch die Zunahme von Adipositas assoziierten Erkrankungen entstehen sowie die damit verbundenen indirekten Kosten durch Produktivitätsausfälle, sind die immateriellen Kosten gegenüberzustellen. Diese entstehen durch die Beeinträchtigung des psychosozialen Wohlbefindens und durch den Verlust an Lebensqualität. Berechnungen einer amerikanischen Studie zufolge sind die Gesundheitskosten bei übergewichtigen Personen, insbesondere bei einem BMI $\geq 30\text{kg/m}^2$, verglichen mit denen einer Personengruppe mit einem empfohlenen BMI zwischen $20,0\text{kg/m}^2$ und $24,9\text{kg/m}^2$, jährlich um 36% höher [7]. Auch die Gesundheitsausgaben der übergewichtigen Personengruppe mit einem BMI zwischen $25,0\text{kg/m}^2$ und $29,9\text{kg/m}^2$ sind in dieser Gegenüberstellung jährlich um 10% höher [7]. In Deutschland belaufen sich die wirtschaftlichen Schäden auf 3,1% bis 5,5% der jährlichen Gesamtkosten im Gesundheitswesen [8]. Das Risiko von Folgeerkrankungen und deren Kosten korreliert mit der Höhe des BMI. Trotz einer reduzierten Lebenserwartung kommt es nicht zu sinkenden Lebenszeitkosten [8].

1.1.3 Assoziierte Erkrankungen

Übergewicht und Adipositas sind ursächlich für zahlreiche Krankheitsbilder aus verschiedenen medizinischen Bereichen. Neben verminderter körperlicher Belastbarkeit kommt es im Zuge der erhöhten Morbidität zu kardiovaskulären, endokrinologischen und muskuloskelettalen Beschwerden. Die häufigsten Komplikationen sind Diabetes Mellitus Typ II [9-11], kardiovaskuläre Erkrankungen [12-15] und Tumorerkrankungen [16-19]. Auch die Mortalität ist erhöht [20]. Die Sterblichkeitsrate ist bei einer Personengruppe mit einem BMI > 35 kg/m² gegenüber Normalgewichtigen verdoppelt [1].

1.1.4 Fettgewebsinflammation

Das Fettgewebe ist ein endokrines Organ und sezerniert diverse Adipokine, wobei die sekretorische Kapazität der Adipozyten mit deren Größe korreliert [20, 21]. Im Rahmen einer Adipositas verändert sich die Adipokinexpression und die Ausschüttung inflammatorischer Interleukine führt zu einer chronischen Inflammation im Fettgewebe. Typische Entzündungsmarker sind hierbei Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und hochsensitiv gemessenes C-reaktives Protein (CRP). Die systemischen Entzündungsmarker korrelieren sowohl mit Insulinresistenz [21] und -sensitivität [22] als auch mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie z.B. arterieller Hypertonie und erniedrigtem HDL-Cholesterin [23, 24]. Das erhöhte CRP stellt zusätzlich einen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor dar. Darüber hinaus kommt es zu einer negativen Korrelation von Adiponektin, einem antidiabetischen, antiinflammatorischen und antiarteriogenem Gegenspieler der Adipokine, mit dem Ausmaß von Insulinresistenz und der Sekretion inflammatorischer Adipokine und somit zu einer Verschlechterung von Insulinresistenz und Arteriosklerose [25]. Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen Adipositas und dem Auftreten verschiedener Immunzellen, wobei hier Makrophagen und T-Lymphozyten von Bedeutung sind. Für die Makrophagenakkumulation ist die Fettgewebshypoxie ein entscheidender Faktor [26]. Makrophagen werden außerdem durch zugrunde gehende Adipozyten angezogen und stellen sich als sogenannte crown-like-structures dar [26].

1.2 Ernährungsphysiologische Konzepte

Verschiedene Formen von Ernährungsempfehlungen und metabolischen Therapien wurden nicht nur zum Zwecke des Gewichtsverlustes, sondern auch gegen diverse Leiden eingesetzt. Beispiele für Ernährungskonzepte, die einen Gewichtsverlust durch Variation der Nahrungskomponenten im Gegensatz zu einer reduzierten Kalorienaufnahme propagieren, sind low-fat (LF) und low-carbohydrate (LC) Diäten. Die makronutriente Nahrungszusammensetzung divergiert dabei stark.

LF-Diäten sind die von Medizinern am ehesten empfohlene Ernährungsumstellung, da sie nicht nur zur Gewichtsreduzierung beitragen, sondern darüber hinaus auch kardioprotektiv wirken. Beispiele hierfür sind die Ornish und die LEARN (Lifestyle Exercise Attitudes Relationships Nutrition) Diät [27]. LC-Diäten versprechen Gewichtsverlust unter geringen Verzichtsbedingungen. Bei beliebig hohen Mengen an Fett- und Proteingehalt der Nahrung wird lediglich die Kohlenhydrat (KH)-Zufuhr auf ein Minimum reduziert [27, 28]. Beispiele hierfür sind die South Beach Diät, die Zone Diät und die Dr. Atkins Diät Revolution [29].

1.2.1 Ketogene Diäten

Ketogene Diäten (KD) sind eine spezielle Form der LC-Diäten. Hierbei soll der Körper zum Energiegewinn Fett metabolisieren, wobei ein Teil davon im Urin in Form von Ketonkörper ausgeschieden wird. Um dies zu erreichen, werden dem Körper bei der traditionellen LCT-Diät (long-chain triglycerides) bis zu 90% der Nahrungsenergie in Form von Fett verabreicht. Bei der MCT-Diät (medium-chain triglycerides) sind es vergleichsweise nur 60%, da MCT-Fette eine höhere Ketogenität aufweisen und somit das Verhältnis von Fett zu Eiweiß und KH zugunsten der KH verschoben werden kann [30, 31].

1.2.1.1 Biochemische und physiologische Grundlagen

Befindet sich der menschliche Organismus im Hungerzustand, verwertet dieser zuerst die KH-Vorräte und gewinnt anschließend seine Energie durch Lipolyse. Die Biosynthese der Ketonkörper (Acetoacetat, β -Hydroxybutyrat, Aceton) wird bei schlechter KH-Verwertung erhöht. Nur ein geringer Anteil der Ketonkörper entsteht durch den Abbau von FS, der Großteil entsteht durch die Zusammenlagerung von Acetyl-CoA-Molekülen in der Leber [32].

Die energiereichen Verbindungen Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat tragen zur Energieversorgung peripherer Gewebe bei, wohingegen Aceton durch die Decarboxylierung von Acetoaceton als Endprodukt über die Lunge abgeatmet wird [32, 33]. Durch die erhöhte Konzentration von Ketonkörpern im Plasma und Urin und die Notwendigkeit, die im Rahmen der Ketose gebildeten Anionen zu eliminieren, kommt es zu einem diuretischen Effekt [31]. Die Ketogenese wird von Insulin inhibiert und von Glucagon und Adrenalin stimuliert. Hierbei ist das Verhältnis dieser beiden Hormone zueinander wichtig. Ein hoher Glucagon/Insulin-Quotient, wie man ihn im Hungerzustand oder unter einer KD findet, ist Voraussetzung für die Ketogenese. Ein niedriger Glucagon/Insulin-Quotient hingegen wirkt inhibierend auf die Ketogenese. KH haben demzufolge eine antiketogene Wirkung [32, 33].

1.2.1.2 Therapieansatz

KD werden bei verschiedenen Krankheitsbildern zur Therapie eingesetzt. Als Begründung wird die neuroprotektive Wirkung metabolischer Veränderungen aufgeführt, wobei die Mechanismen hierfür weiterhin unklar scheinen [34, 35]. Bekannt ist aber, dass Nährstoffe und metabolische Substrate tiefgreifende Auswirkungen auf die neuronale Plastizität ausüben und neuronale Schaltkreise modifiziert sowie zelluläre Eigenschaften verbessert werden können. Eine mögliche Erklärung ist die Beeinflussung der neuronalen Membranerregbarkeit durch die Blockade spannungsabhängiger Natrium- und Kalium-Kanäle [36]. Ketonkörper selbst haben insofern ein neuroprotektives Potenzial, als sie über eine verbesserte NADH-Oxidation und eine Hemmung der mitochondrialen Permeabilitätsübertragung zu einem Anstieg des ATP- (Adenosintriphosphat) Spiegels und einer verminderten Produktion von Sauerstoffradikalen führen. Des Weiteren wird die mitochondriale Bioenergetik angeregt, was zu einer Stabilisierung der synaptischen Funktion führt [36]. Somit entsteht ein weitreichendes Potenzial für neuartige Anwendungen der KD.

Nachstehend folgt eine Auflistung verschiedener Einsatzmöglichkeiten von KD.

- KD haben ein hohes Sättigungslevel [37].
- Eine gesteigerte Diurese in Verbindung mit der Ausscheidung von Keton und Harnstoff-Stickstoff führt initial zu einem Gewichtsverlust [37].

- KD sind von essenzieller Bedeutung für die Therapie diverser Stoffwechselkrankheiten wie z.B. Pyruvatdehydrogenasemangel [38], Glukose Transporter 1 Defekt [39], Atmungskette - Komplex I Defekt [40] und infantilem Phosphofruktokinase-Mangel [41].
 - KD sind eine seit Langem bekannte und effektive Methode zur ergänzenden Behandlung schwerer zerebraler Anfallsleiden, v.a. bei kindlicher Epilepsie. Die Indikation ist dabei unabhängig von der Anfallsform [42, 43].
 - KD stellen aufgrund der Beeinflussung der Degeneration von neurogenem Gewebe und der mitochondrialen Funktion eine Therapieoption der Alzheimererkrankung dar [39, 40].
 - In vitro Studien und Untersuchungen am Tiermodell weisen darauf hin, dass KD auch bei der Therapie von Schädel-Hirn-Traumata [44, 45] und als ergänzende Therapie bei Parkinson hilfreich sind [46-48]. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Patienten mit Hirntumoren von KD profitieren [30, 49-51]. Auch hinsichtlich anderer neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. der Lafora-Krankheit, der amyotrophen Lateralsklerose und dem Rett Syndrom gibt es bereits Versuche, diese Leiden zusätzlich mit KD zu behandeln [36, 52]. Weitere Studien testen aktuell die Auswirkungen von KD nach Apoplex im Tiermodell [53]. Ebenso werden KD stimmungsstabilisierende Eigenschaften zugesprochen [37]. Zusätzlich wird die Möglichkeit aufgezeigt, dass KD zur Linderung abnormer Verhaltensweisen bei Kindern mit Autismus beitragen könnten [54].
- Ein weiteres Gebiet, in welchem der Einsatz KD, u.a. aufgrund von unzureichenden Behandlungsalternativen, diskutiert werden könnte ist die Migräne [55].

1.3 Makronährstoffe

Die organischen Bestandteile der Nahrung bestehen aus Fett, KH und Protein, wobei einige Aminosäuren (AS) und FS essenziell sind; der Rest dient als Energiequelle. Eine vollwertige Mischkost sollte laut Empfehlungen der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) begrenzte Fettmengen (< 10%) und reichlich KH (> 50%), vorzugsweise Stärke, enthalten. Proteine spielen, wenn sie in ausreichender Form vorhanden sind, für den Energiestoffwechsel eine eher untergeordnete Rolle.

1.3.1 Fette

Von allen Nährstoffen hat Fett mit 38,9kJ/g (9,3kcal/g) den höchsten Brennwert. Nahrungsfette sind mit 30% der Energiezufuhr bei ausgewogener Ernährung ein wichtiger Energielieferant und stellen eine langfristige Reserve dar. Der Bedarf des gesunden Erwachsenen liegt bei 1g/kgKG/d [56].

Fette sind vor allem für die Zufuhr von essenziellen FS und fettlöslichen Vitaminen von Bedeutung. Essenziell sind die zweifach ungesättigte Linolsäure und die dreifach ungesättigte Linolensäure, da Doppelbindungen nach C⁹ nicht eingebaut werden können. Halbessenziell ist die aus eben genannten synthetisierte Arachidonsäure.

Aus dem P/S-Quotienten (Polyunsaturated/Saturated) geht hervor, dass Serumcholesterin durch gesättigte FS stärker beeinflusst wird als durch ungesättigte FS. So kommt es bereits bei einer geringen Erhöhung des Quotienten zu einer Senkung des Cholesteringehalts. Bei Ratten wird ein optimales Wachstum erreicht, wenn der P/S-Quotient etwa 30:70 entspricht. Wird dieses Ziel nicht erreicht, verkürzt sich die Lebensdauer der Tiere [57]. Zur Bestimmung der Qualität der physiologischen Wirkung von Nahrungsfetten ist nicht nur das Verhältnis von ungesättigt zu gesättigt und der Gehalt an kurz- und mittelkettigen FS, sondern auch der Gehalt an unverseifbaren Fettbegleitstoffen (Antioxidantien, Aromastoffe, Geschmacksstoffe, fettlösliche Vitamine) wichtig [33].

Im Hinblick auf die Ernährungsgewohnheiten in Industrieländern ist der überdurchschnittlich hohe Konsum von Fetten problematisch. Dieser ist unter anderem in deren Funktion als Geschmacks- und Aromastoff zu begründen. Die übermäßige Zufuhr, insbesondere an gesättigten FS, hat vor allem Dyslipoproteinämie und Arteriosklerose zur Folge [58-61] und wird darüber hinaus mit einem gesteigertem Risiko für die Entstehung kolorektaler Karzinome [62] in Verbindung gebracht. Die Nebenwirkungen der hochkalorischen Ernährung, welche ursächlich für die Adipositasepidemie ist, stellen wiederum die wesentlichen Risikofaktoren koronarer Herzerkrankungen dar [61, 63, 64].

1.3.2 Kohlenhydrate

Kohlenhydrate haben einen Brennwert von 17,2kJ/g (4,1kcal/g). Diese heterogene Gruppe an Polyhydroxyaldehyden umfasst Poly-, Oligo-, Di- und Monosaccharide, wobei Letztere

gemeinhin als Zucker bekannt sind. Für diätetische Zwecke charakterisiert man kohlenhydrathaltige Lebensmittel nach dem Grad ihrer Glukoseverfügbarkeit. Unter diesem sogenannten glykämischen Index einer gemischten KH-Quelle versteht man die Geschwindigkeit, Höhe und Dauer des Blutzuckeranstiegs im Vergleich zu dem einer äquivalenten Menge reiner Glukose [65]. KH sind keine essenziellen Nährstoffe, dennoch wird zur Vermeidung der Gluconeogenese aus Protein und zur Hemmung der Lipolyse ein Anteil von 50% an der Nahrung empfohlen, da sie als Vitamin- und Mineralstoffträger sowie als unverdauliche Nahrungsbestandteile unentbehrlich sind. Die mindestens erforderliche KH-Menge, um die Entstehung einer Ketose zu verhindern beträgt 1,5-2g/kgKG/d [56].

1.3.3 Proteine

Proteine haben einen Brennwert von 17,6kJ/g (4,2kcal/g). Bei Proteinen handelt es sich um aus AS zusammengesetzte Polymere. Von den insgesamt 21 proteinogenen AS sind 9 essenziell und mit der Nahrung zuzuführen. Im Gesamtmolekül essenziell sind die AS Lysin und Threonin. In ihrem Kohlenstoffgerüst unentbehrlich sind Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin (mit Cystein und Homocystein), Phenylalanin (mit Tyrosin), Tryptophan und Valin. Da allerdings eine Stickstoffbilanz und adäquates Wachstum mit der alleinigen Zufuhr essenzieller AS nicht aufrechterhalten werden kann, muss auch eine ausreichende Gesamtproteinzufuhr gewährleistet werden [66-68].

Der AS-Index bzw. die biologische Wertigkeit ist ein geeigneter Indikator zur Bestimmung der Qualität einer Mahlzeit. Einzelne Nahrungsmittel sind hinsichtlich ihrer AS-Zusammensetzung von unterschiedlicher nutritiver Wertigkeit. Bei Mangel an nur einer einzigen essenziellen AS (z.B. Tryptophan im Mais, Methionin in Kartoffeln, Lysin im Weizen) und damit unausgewogener Ernährung, wird auch die biologische Wertigkeit aller anderen AS und des aus ihnen aufgebauten Proteins limitiert [69]. Die empfohlene Proteinzufuhr liegt bei 0,8g/kgKG/d beim gesunden Erwachsenen [70-72].

1.4 Mikronährstoffe

Mikronährstoffe sind Mineralstoffe, Sekundärmetabolite, Spurenelemente und Vitamine. Im Gegensatz zu den Makronährstoffen sind sie keine Energielieferanten.

1.5 Growth Hormone / Insulin - like growth factor I Achse

1.5.1 Growth Hormone (GH)

GH ist ein einkettiges Polypeptid (191 AS) der Adenohypophyse aus der Familie der Somatotropin/Prolaktin Hormone. Das Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert und umfasst u.a. hypophysäres und plazentares GH, Humanes Chorion-Somatomammotropin, Prolaktin und plazentare Prolaktin-related Proteine, Proliferin und Proliferin-related Proteine und Somatolaktin. Die Hormone dieser Familie weisen eine Homologie hinsichtlich ihrer Genstruktur, bestehend aus 4 Introns und 5 Exons, auf [73, 74]. GH vermittelt seine Wirkung einerseits über den hormonspezifischen GH-Rezeptor (GHR) mit assoziierter Tyrosinkinase (TK) von dem eine trunkierte Form als GH Bindungsprotein (GHRBP) im Blut zirkuliert und andererseits über die Stimulation der Freisetzung von IGF-I und IGF-BPs.

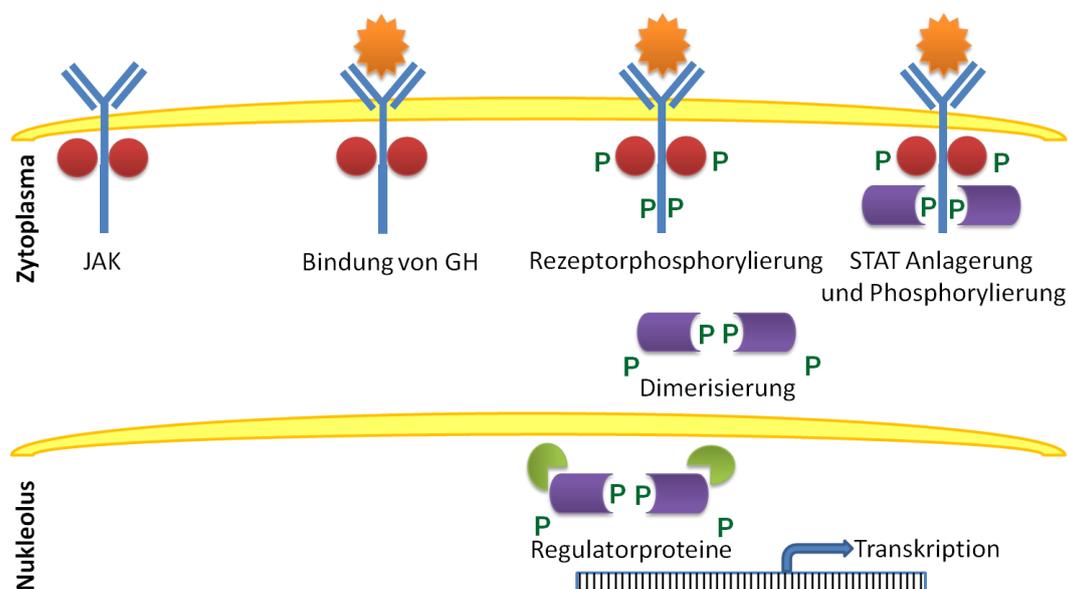


Abb. 1-1 JAK-STAT-Signaltransduktionsweg

Die Bindung des GH führt zu einer Rezeptor-Dimerisierung und einer Aktivierung der Janus ähnlichen Kinasen (JAK) durch Autophosphorylierung. Anschließend kommt es zu einer Bildung von Bindungsstellen am Rezeptor durch Phosphorylierung der Tyrosinreste. Dies ermöglicht es den signal transducers and activators of transcription (STAT)-Proteinen zu binden und nach Wechselwirkung mit JAK durch Phosphorylierung zu dimerisieren. Daraufhin diffundieren diese als Dimere in den Kern, wo sie als Transkriptionsaktivatoren für JAK-STAT regulierte Gene dienen. Weitere wichtige signal-übertragende Phosphoproteine der GH-Wirkkaskade sind die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP) und die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2 [75-77].

1.5.1.1 Regulation

Die pulsatile Sekretion von GH unterliegt hauptsächlich der Kontrolle des Hypothalamus, wird aber auch durch genetische Faktoren und Umweltfaktoren wie Temperatur und Ernährung, teilweise direkt oder indirekt via Growth Hormone releasing hormone (GHRH) und Somatostatin (SRIF) reguliert [78-83]. GH selbst, ebenso wie der GHRH Rezeptor (GHRHR), wird durch hypophysäre Transkriptionsfaktoren wie pituitary specific positive transcription factor 1 (PIT1) in seiner Expression stimuliert.

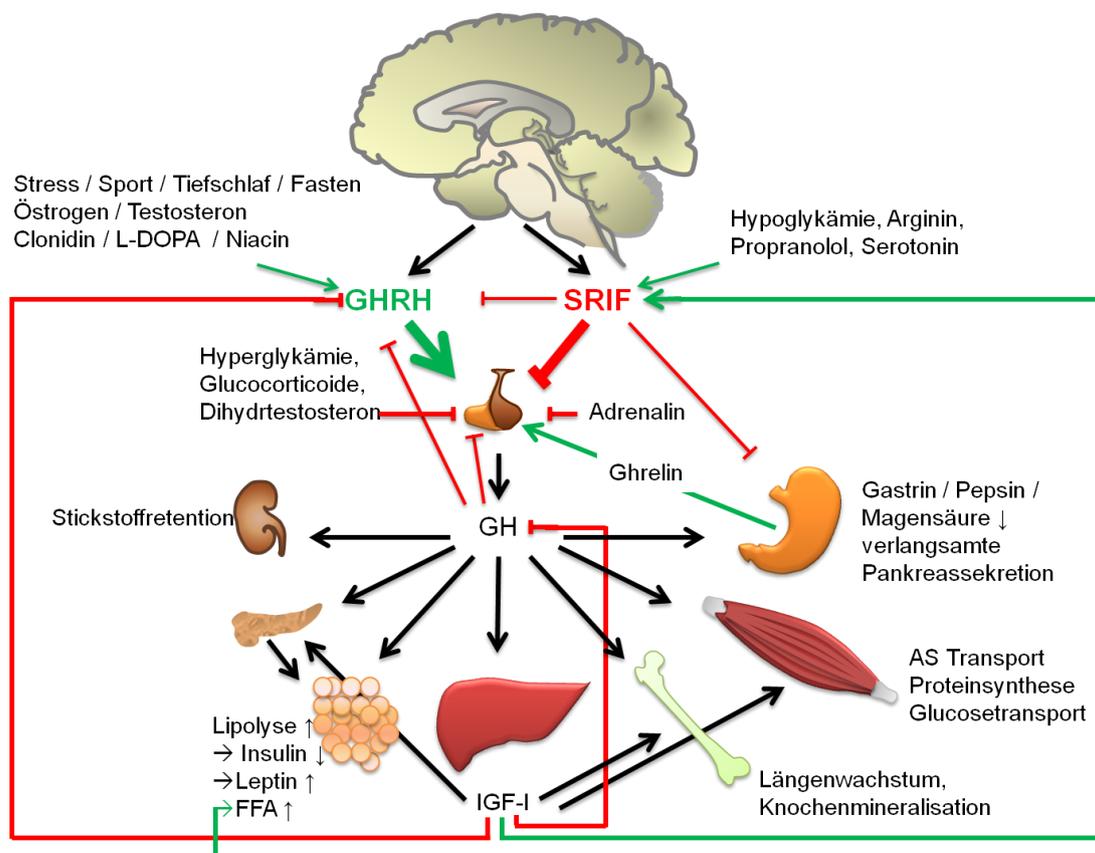


Abb. 1-2 Überblick der Regulation der GH / IGF-I Achse, vereinfachte Darstellung

Hauptregulatoren sind das hypothalamische GHRH und SRIF, welches die GH Ausschüttung aus der Adenohypophyse steuern. GH vermittelt im Weiteren seine Wirkung direkt und über hepatisches IGF-I. Die Sekretion von GH unterliegt außerdem peripheren Hormonen sowie einem Short-Feedback-Loop (GH hemmt GH) und einem Long-Feedback-Loop (GH hemmt GHRH, IGF-I hemmt GH / GHRH und stimuliert SRIF). Anmerkung: Zahlreiche weitere Faktoren sind an der Regulation der GH / IGF-I Achse beteiligt, wurden aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit aufgeführt (z.B.: Geschlecht, Alter, Adipositas, Diabetes mellitus, Arginin, diverse Hormone, Neuromodulatoren u.a.)

PHYSIOLOGISCHE FAKTOREN

Ebenso fördernd auf die GH / IGF-I Achse wirken sich eine Abnahme des Blutglukosespiegels, körperliche Aktivität, Stress und Tiefschlaf aus [33].

GHRH – Growth Hormone Releasing Hormone:

Das Polypeptid GHRH wird in Neuronen des ventromedialen Hypothalamus und im Nucleus arcuatus produziert. Nach Freisetzung in die Eminentia mediana gelangt es über den Portalkreislauf in die Adenohypophyse, wo es die Funktion somatotroper Zellen stimuliert, indem es über vermehrte GH-Gen-Transkription dessen Synthese steigert [84-87]. Des Weiteren hat es einen begünstigenden Effekt auf den Tiefschlaf [88] und findet Verwendung als noch nicht nachweisbares Dopingmittel [89]. GHRH selbst wird über einen Short-Feedback-Loop von GH gehemmt und über einen Long-Feedback-Loop von IGF-I inhibiert.

GHRHR - Growth Hormone Releasing Hormone Rezeptor:

Der GHRHR ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, dessen selektive Expression in der Adenohypophyse [90] durch hypophysäre Transkriptionsfaktoren stimuliert wird [91, 92]. Die Bindung von GHRH führt zur Synthese und Expression von GH. Der GHRHR ist außerdem mitverantwortlich für die absolute Größe des GH-Sekretionspulses. Mutationen des GHRHR führen zu Defekten wie dem Laron-Zwergwuchs [90].

SRIF - Somatostatin:

SRIF ist ein Peptidhormon, welches an mehreren Stellen des peripheren und zentralen Nervensystems, in pankreatischen Inselzellen und im Gastrointestinaltrakt sezerniert wird. Es kann als Universalbremse im Organismus angesehen werden und hemmt die Ausschüttung zahlreicher Hormone des neuroendokrinen und gastrointestinalen Systems sowie die Sekretion von Magensäure und Pankreasenzymen und die Peristaltik des Magens und der oberen Darmabschnitte. SRIF inhibiert die Freisetzung von GH sowohl direkt als auch indirekt über die Hemmung des GHRH [93]. Neben dem hemmenden Einfluss ist der wechselnde SRIF-Tonus verantwortlich für die pulsatile Sekretion des GH.

ZIRKULIERENDE FAKTOREN

GH und IGF-I wirken via negativer Rückkopplung hemmend auf GH-Synthese und Sekretion. Neurotransmitter des cholinergen, adrenergen und dopaminergen Systems beeinflussen die somatotrophen Zellen indirekt, indem sie auf den GHRH- und SRIF-Tonus wirken [94]. Schilddrüsenhormone wirken fördernd auf Sekretion und Synthese des GH [95].

Corticosteroide hingegen weisen je nach Applikationsdauer eine unterschiedliche Wirkung auf die GH Sekretion auf. Bei kurzfristiger Gabe kommt es zu einer Stimulation der Sekretion, wohingegen eine langfristige Verabreichung zu einer Suppression von Synthese und Sekretion führt [96]. Androgene, wie das Testosteron und Östrogen, haben sowohl Einfluss auf die GH Synthese und Sekretion als auch auf geschlechtsspezifische Unterschiede [97]. Freie Fettsäuren (FFA) werden durch GH vermehrt aus TAG freigesetzt, wodurch es zu einem negativen Rückkopplungsmechanismus kommt. Das Peptid Ghrelin vermittelt seinen stimulierenden Effekt auf somatotrope Zellen über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor.

1.5.2 Insulin – like growth factor I (IGF-I)

IGF-I ist ein Hormon, welches ebenso wie Insulin aus dem Proinsulin stammt und daher nicht nur eine starke Strukturähnlichkeit zu diesem aufweist, sondern auch eine insulinähnliche Wirkung induziert. Anders als bei dem homologen Insulin wird bei IGF-I das C-Peptid nicht abgespalten, weshalb IGF-I aus einer einzigen Peptidkette besteht [98, 99]. IGF-I besteht aus 70 AS und hat eine molare Masse von 7,6kDa. Insulin und IGF-I lösen teilweise identische Signalkaskaden aus. IGF-I ist von wesentlicher Bedeutung für das Wachstum, den Metabolismus und die Zellproliferation. Des Weiteren vermittelt dieses Polypeptid eine Vielzahl der GH-Effekte.

Stimuliert	Inhibiert	Weitere
AS-Aufnahme und –Anabolismus Erythropoese Glomeruläre Filtrationsrate Ionenfluss in der Zelle Kohlenhydratstoffwechsel Kreatinin-Clearance Mitogenese in vitro Onkogenese Renaler Blutfluss Synthese von Proteinen / RNA / DNA Zelluläre Differenzierung Zelluläre Glukoseaufnahme in Muskelzellen und Fettzellen via GLUT-4	Apoptose C-Peptid-Sekretion GH-Synthese GH-Sekretion Insulin-Sekretion Lipolyse	Blutzuckersenkend Immunmodulation longitudinales Knochenwachstum

Tab. 1-1 Biologische Effekte von IGF-I und IGF-II [100-105]

Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von IGF:

- IGF-I, welches sowohl für pränatales, als auch für postnatales Wachstum von Bedeutung ist und auf Chromosom 12 lokalisiert ist. Systemisches IGF-I übt eine negative Rückkopplung auf die hypophysäre GH-Sekretion aus und weist eine metabolische Wirkung auf. Lokal in der Wachstumsfuge produziertes IGF-I mit autokriner und parakriner Wirkung ist v.a. für das postnatale Wachstum der Knochen und Skelettmuskulatur entscheidend [100].
- IGF-II, welches v.a. für pränatales Wachstum wichtig ist und auf Chromosom 11 kodiert.

IGF-I und IGF-II binden an den gleichen, ubiquitär exprimierten IGF-I-Rezeptor (IGF-I-R), bei welchem es sich um eine TK, homolog dem Insulinrezeptor, handelt. Daher ist es auch Insulin selbst möglich, in hohen Konzentrationen an diesen zu binden. Veränderungen am IGF-I-R oder seinen Signalübertragungswegen im Sinne einer höheren Expression führen zu einer IGF-I Resistenz [106].

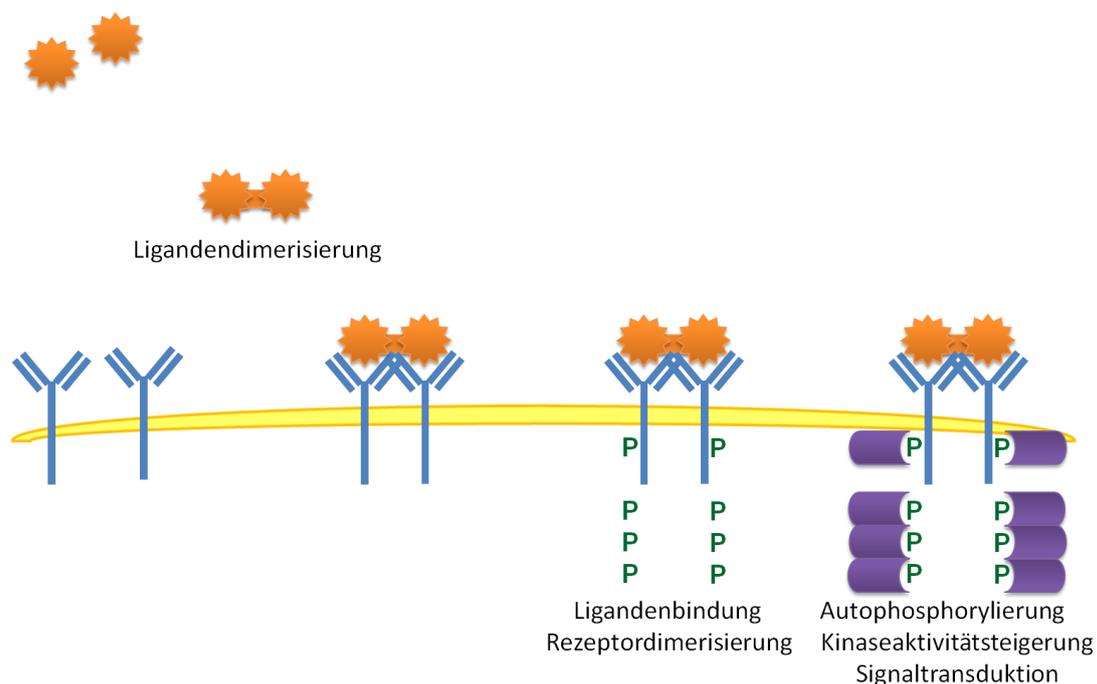


Abb. 1-3 Rezeptortyrosinkinasen Signaltransduktionsweg

Die intrazelluläre TK-Aktivität wird durch extrazelluläre Ligandenbindung aktiviert. Durch die ausgelöste Rezeptordimerisierung kommt es zur Autophosphorylierung, welche die Kinaseaktivität steigert. Dies führt schließlich zur Signaltransduktion über Aktivierung der Mitogen-Activated-Protein (MAP) Kinase und PI3-Kinase und Phosphorylierung der Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) 1-4.

1.5.2.1 Insulin – like growth factor binding proteins (IGFBPs)

Der Großteil an IGF-I wird in der Leber synthetisiert und in die Blutbahn sezerniert, wo es an IGFBPs gekoppelt wird. Die Bindung an IGFBPs ermöglicht es, die ursprünglich kurze Halbwertszeit des IGF-I zu verlängern und die Bioverfügbarkeit zu maximieren. Des Weiteren werden durch die BPs stabile Blutspiegel von IGF-I gehalten, da gebundenes IGF-I gleichmäßig freigesetzt wird. Insgesamt kennt man bis jetzt sechs verschiedene IGFBPs (1-6) [107, 108] und vier weitere IGFBP ähnliche Proteine. Als Wichtigstes hierbei gilt IGFBP-3, welches nicht nur die Halbwertszeit verlängert, sondern in vitro auch die biologische Wirkung des IGF-I verstärkt und darüber hinaus eine IGF unabhängige Wirkung hat [109]. IGFBP-1, -3 und -5 können eine weitere Untereinheit, die säurelabile Untereinheit (acid labile subunit, ALS) binden, wodurch diese als ternärer Komplex vorliegen [110, 111]. Nach der Dissoziation von IGF-I aus dem ternären Komplex ist es diesem möglich, sein Zielgewebe zu erreichen. Eine ausschließliche Messung von gesamt IGF-I würde den Einfluss der IGFBPs auf das IGF-I-Rezeptor Level falsch darstellen. Daher ist der Quotient aus IGF-I und IGFBP-3 interessant. Ist dieser Quotient erhöht, so spricht dies - aufgrund von Komplexbildungen, welche zu einer Reduktion des freien IGF-I führen - am ehesten für eine hemmende Wirkung der IGFBPs auf IGF-I, da es in diesem Falle zu einer verminderten Rezeptorbindung kommt. Im Gegensatz dazu liegt bei einer niedrigeren IGFBP-3 Konzentration mehr bioaktives IGF-I in freier Form vor [112].

1.5.3 Wirkung

Das Wachstum und die Vermehrung von Körperzellen werden durch unterschiedliche Faktoren, sowohl auf endogener Ebene als auch durch Umwelteinflüsse reguliert. Die wichtigsten biologischen Faktoren sind hierbei IGF-I, IGF-II und GH [33, 77]. Das in der Adenohypophyse produzierte GH ist einerseits für das Körperwachstum und andererseits für metabolische Effekte verantwortlich. Der wichtige wachstumsfördernde Effekt wird hauptsächlich indirekt über die Induktion von IGF vermittelt. IGF-I und -II haben aber nicht nur agonistische, sondern zum Teil auch antagonistische Effekte zu GH und regulieren so die Energiehomöostase [77, 113].

Stimuliert	Inhibiert	Weitere
Gluconeogenese IGF-I Synthese und Sekretion Ketogenese Knochenwachstum Lipolyse Proteinsynthese FFA Synthese	Apoptose GH / GHRH	Cholesterinsynthesemodulation Immunmodulation Insulinresistenz Knochendichte Muskelkraft

Tab. 1-2 *Biologische Wirkung von GH*

1.6 Die Ratte als Tiermodell in Ernährungsstudien

Tiermodelle haben sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Erforschung der Pathophysiologie und Therapieentwicklung verschiedener Krankheitsmodelle eine zentrale Bedeutung. In vielen Bereichen ist es trotz alternativer Methoden unumgänglich, auf die Verwendung von Tiermodellen zurückzugreifen, um den biomedizinischen Fortschritt zu gewährleisten. Aus diesem Grund hat in den letzten Jahren der Einsatz von Kleintieren in der experimentellen Forschung deutlich zugenommen. Am weitesten verbreitet ist der Einsatz von Nagern. Die Arbeiten, die in Tiermodellen durchgeführt werden, sind gut reproduzierbar, einfach anzuwenden und können im Hinblick auf genetischen Hintergrund und Umweltbedingungen gut standardisiert werden [114]. Die vergleichsweise unproblematische Zucht und Haltung von Nagern ermöglicht es, eine große Menge an Versuchstieren des gleichen Geschlechts, Stammes und Alters unter vergleichsweise unkomplizierten Bedingungen zu halten und dabei gleichzeitig ein hohes Maß an Standardisierung zu erzielen. Bei der Ratte ist des Weiteren die physiologische Ähnlichkeit ihres Organismus mit dem des Menschen ein wesentlicher Punkt. Auch hinsichtlich ihrer Größe sind Ratten für operative Eingriffe vorteilhaft [115]. Nagermodelle sind von den Zulassungsbehörden anerkannt und können mittels verschiedener Technologien genetisch modifiziert und speziell für eine Fragestellung entwickelt werden. Die Bevorzugung von Tiermodellen gegenüber klinischen Studien liegt u.a. daran, dass eine klinische Studie maßgeblich von der Compliance der Patienten und anderen heterogenen Einflussfaktoren abhängig ist. Ein klinischer Datensatz würde von vielen eventuellen Störfaktoren, wie Begleiterkrankungen und hormonellen Schwankungen, beeinflusst werden. Bei der Ratte ist

besonders Ersteres durch eine starke Widerstandsfähigkeit sowie ein intaktes Immunsystem in seinem Einfluss reduziert [115]. Ein angemessen großes Patientenkollektiv untersuchen zu können, würde einen enormen wirtschaftlichen als auch zeitlichen Aufwand bedeuten. Darüber hinaus wären spätere invasive Untersuchungen, wie sie in dieser Studie angefertigt wurden, ethisch nicht vertretbar und insofern nicht möglich, als eine Bestimmung der Genexpression im Gewebe nur durch eine Probe des selbigen machbar ist. Aufgrund einer fehlenden medizinischen Indikation wäre schon eine Leber- oder Muskelbiopsie in diesem Zusammenhang nicht vertretbar. Eine Probenentnahme aus hypothalamisch-hypophysärem Gewebe wäre ethisch nicht zu rechtfertigen. Aus diesem Grund war es nötig bei dieser Studie ein realitätsnahes Tiermodell zu verwenden. Bei der Auswahl der Tierart ist von wesentlichem Interesse, inwieweit die gewonnenen Ergebnisse der Forschung den physiologischen und pathologischen Vorgängen im Menschen wirklich dienen können. In unserer Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf der somatotropen Achse und dem Verdauungstrakt sowie dem Essverhalten.

1.6.1 Charakteristika des Versuchstieres Ratte

Neben der Maus ist die Ratte das wichtigste und am häufigsten eingesetzte Versuchstier in der biomedizinischen Forschung. Ratten sind Allesfresser, deren Gastrointestinaltrakt dem des Menschen ähnelt. Aufgrund der ähnlichen Anatomie und Physiologie sowie wegen Analogien im Essverhalten stellt diese Tierart ein geeignetes Versuchstier für Ernährungsstudien dar. Multiple Blutentnahmen, welche in unserem Modell zur Erstellung eines GH-Sekretionsprofils erforderlich waren, sind bei der Ratte in einem größeren Umfang möglich als bei der Maus. Diese Gegebenheiten sprachen für den Einsatz der Ratte in dieser Studie. Die in dieser Studie eingesetzten Versuchstiere waren mit zwölf Wochen im jungen Erwachsenenalter.

Aufgrund der guten Anpassungsfähigkeit kann dieses Tiermodell an bestimmte Prozeduren gewöhnt werden, wodurch die Stressbelastung reduziert werden kann. Ein Beispiel hierfür, welches bei unserem Experiment von Bedeutung war, war die tägliche Fütterung und das Wiegen [115].

Bei den in der aktuellen Forschung verwendeten Laborratten handelt es sich fast ausschließlich um Nachfahren der Wanderratte - *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769).

Als Folge ihrer Domestikation unterscheiden sich Laborratten in einigen Punkten von ihren wild lebenden Artgenossen. Sie haben ein geringeres Gesamtkörpergewicht (♀ 400g, ♂ 800g) bei einer Länge von 40-46cm, gemessen von der Nasenspitze bis zur Schwanzspitze, wobei die Schwanzlänge in etwa der Körperlänge entspricht. Mit zunehmendem Lebensalter kommt es zu einem Gewichtsverlust. Auch das Gewicht der inneren Organe von Laborratten ist, abgesehen von Thymus und Hypophyse, im Vergleich zur Wildform geringer [115]. Der Bewegungsdrang der Laborratte ist reduziert und hierfür zuständige Hirnareale sind verkleinert. Die Lebenserwartung liegt zwischen zwei und vier Jahren. Tiere mit limitierter Fütterung haben eine höhere Lebenserwartung verglichen mit solchen, welche ad libitum Zugang zu Nahrung haben oder sogar überfüttert werden. Der Geschmackssinn von Ratten ist gut ausgeprägt. Zudem kontrollieren diese Tiere ihren Futterkonsum und nehmen nur so viel Nahrung zu sich, wie für Wachstum und Erhaltung notwendig ist [115]. Wie bei den meisten Säugetieren wird auch bei der Ratte die Nahrungsaufnahme durch die Energiedichte der Nahrung und durch physiologische Kriterien, wie Füllungszustand des Magens und des Dünndarms, Blutglukose, Lipide, Futterakzeptanz, Umgebungstemperatur und Aktivitätsphase bestimmt [116, 117]. Zu einer übermäßigen Gewichtszunahme kommt es bei einer Dysbalance von Energieaufnahme und Energieabgabe.

Die Ratte hat einen ausgeprägten 24-Stunden-Rhythmus, wobei sie während der Hellphase weitgehend inaktiv ist. Die Futterraufnahme erfolgt in mehreren Fressperioden während der aktiven Phasen in der Dunkelheit. Da die Sehkraft der Ratte nicht sehr gut ausgeprägt ist und langwelliges Licht nicht wahrgenommen wird, können Arbeiten während der Dunkelphase unter Rotlicht durchgeführt werden.

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

In aktuellen Tierstudien wurde belegt, dass es bei LCHF-Diäten zu einer Reduktion der LBM [125, 159] und zu einer Akkumulation von Fettgewebe [125, 139, 151, 161-163] kommt. Bislang unklar ist allerdings, ob dies ein Effekt des Fehlens der Kohlenhydrate per se ist, oder ob dies durch das Verhältnis von Protein und Fett in LCHF-Diäten beeinflusst wird. In dieser Arbeit wollten wir daher zum einen untersuchen, welches Verhältnis der Makronutrienten Zusammensetzung zu einer signifikanten Veränderung der Körperzusammensetzung führt. Weil es in diesem Zusammenhang zu einer Vermehrung des Fettgewebes kommt und weil der Ruheenergieverbrauch u.a. durch die LBM beeinflusst wird [139], sollte untersucht werden, ob die ungünstige Veränderung der Körperzusammensetzung an einem verringerten Energieumsatz der Versuchstiere liegt. Zudem sollte analysiert werden, ob die beschriebene Fettgewebsakkumulation auf eine Hyperplasie und / oder eine Hypertrophie des Fettgewebes zurückzuführen ist. Aufgrund von Entzündungsreaktionen des Fettgewebes bei Adipositas [218, 219] wäre es zudem interessant herauszufinden, ob bereits ein Fütterungszeitraum von 4 Wochen ausreicht um zu einer solchen lokalen Entzündungsreaktion zu führen.

In einem weiteren Teil der dargelegten Arbeit sollten die beschriebenen Wechselwirkungen zwischen der Makronutrienten Nahrungszusammensetzung und dem GH / IGF-I System [118, 119] näher untersucht werden. Nachdem bekannt ist, dass Diäten mit einem hohen Fettgehalt über die Stimulation von Somatostatin die Sekretion von GH und IGF-I inhibieren [122-124], stellte sich die Frage, ob hierfür allein der hohe Fettgehalt der Nahrung verantwortlich ist, oder ob dies durch den niedrigen Protein- oder Kohlenhydratgehalt beeinflusst wird. Es ist beschrieben, dass es im Rahmen einer Fütterung mit hochkalorischen Diäten zu einer Reduktion der Serumkonzentration von GH [122] kommt. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch eine isokalorische Fütterung einer ansonsten hochkalorischen Diät zu vergleichbaren Auswirkungen im GH / IGF-I System führt. Nachdem es sich bei dem GH / IGF-I System um einen endokrinologischen Regelkreis handelt, wurde auch die Hypothese untersucht, inwieweit eine unterschiedliche Nahrungszusammensetzung einen Einfluss auf die verschiedenen Regulationsebenen hat. Wie bereits gezeigt wurde, können LCHF-Diäten zu einer Reduktion von IGF-I im Serum führen [120, 121], weshalb sich als weitere Frage stellte, ob dieser Effekt durch eine reduzierte hypophysäre Sekretion von GH vermittelt wird oder ob möglicherweise eine hepatische GH Resistenz durch die LCHF-Diäten induziert wird.

2.1.1 Studiendesign

Nach einer Akklimatisationszeit von zehn Tagen wurden den Tieren verschiedene LCHF-Diäten nach dem Prinzip der Paarfütterung (3.1.1) über einen Zeitraum von vier Wochen zugeführt. Alle verwendeten Diäten wiesen, mit einem prozentualen Anteil von <2,3%, einen sehr niedrigen KH-Gehalt auf und variierten nur in ihrem relativen Anteil an Protein und Fett.

- Die Kontrollgruppe wird im Weiteren als Chow bezeichnet. Sie wurde mit einem Standardfutter mit regulärer makronutrientier Zusammensetzung gefüttert (Fett 16,7/ Protein 19,0/ KH 64,3 % ME).
- Diejenige Diät mit dem niedrigsten Anteil an KH und Protein und dem höchsten Anteil an Fett, wird im folgenden LC-75 genannt (Fett 92,8/ Protein 5,5/ KH 1,7 % ME).
- Die im weiteren Verlauf als LC-55 bezeichnete Diät hatte den niedrigsten Anteil an Fett und entsprach in ihrem Anteil an Proteinen der Kontrollgruppe (Fett 78,7/ Protein 19,1/ KH 2,2 % ME).
- Die unten stehend als LC-65 benannte Diät liegt in ihrer Zusammensetzung zwischen der LC-75 und LC-55 (Fett 86,3/ Protein 11,8/ KH 1,9 % ME).

Um den Einfluss der Diäten auf die Körpergewichtsentwicklung zu beobachten, wurde jeden zweiten Tag das Gewicht der Versuchstiere bestimmt. In der dritten Woche wurde der Energieumsatz in den verschiedenen Diätgruppen mittels indirekter Kalorimetrie analysiert. Ein Messungszeitraum belief sich dabei auf 24 Stunden. Die Messung startete und endete jeweils um 10:00 Uhr vormittags mit der Fütterung und der Gewichtsbestimmung der Tiere.

Nach drei Wochen auf der jeweiligen Ernährungsform wurden bei $n \geq 4$ Tieren pro Gruppe die Auswirkungen der Diäten auf die pulsatile GH-Ausschüttung durch multiple Blutabnahmen in der Inaktivitätsphase untersucht. In der fünften Woche wurde der Versuch mit der Dekapitation der Versuchstiere beendet. Einzelne Organe, die fettfreie Körpermasse (lean body mass, LBM) und verschiedene Fettdepots sowie die Haut mit anhängendem subkutanem Fettgewebe wurde gewogen. Es wurde eine Längenmessung der verschiedenen Körperabschnitte getätigt. Auch erfolgte eine Probenentnahme der somatotropen Achse der betroffenen Gewebe. So sollten Informationen über die Auswirkung der Diäten auf Körperzusammensetzung, Körperfettanteil, Längenwachstum sowie Zielorgane und Steuerorgane der somatotropen Achse gewonnen werden. Des Weiteren wurden in Serumproben Parameter, welche regulierend auf die GH-Sekretion wirken, quantifiziert.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Bei den im Rahmen dieser Studie eingesetzten Versuchstieren handelte es sich um zwölf Wochen alte, männliche Wistar Ratten (Wistar Unilever Auszucht Ratte, HsdCpb:WU). Es wurde ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes bei der Regierung Oberbayern gestellt und alle beantragten Experimente wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Genehmigungsnummer des Tierversuchsantrags: AZ-55.2-1-54-2531-105-09).

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere für zehn Tage an ihre neue Umgebung sowie an die dortigen Haltungsbedingungen adaptiert und hatten dabei ad libitum Zugriff auf Wasser und Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE). Nach dieser Akklimatisationszeit wurden die Tiere entsprechend ihres Gewichtes in Gruppen mit vergleichbarem Mittelwert (MW) der Gewichte aufgeteilt. Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere zu Beginn des Fütterungsversuches lag bei $361,15 \pm 10,21\text{g}$. Die einzelnen Experimentalgruppen unterschieden sich in den verschiedenen Versuchsreihen bei einer durchschnittlichen Standardabweichung (SD) von 1,62g nur geringfügig.

Gruppe	MW	SD	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Chow	361,02	13,39	345,75	370,75	366,55
LC-75	359,45	11,09	346,80	367,50	364,05
LC-65	355,75	11,26	347,78		363,71
LC-55	369,29	2,81		371,28	367,30
MW \pm SD	361,15	10,21	$346,78 \pm 1,02$	$369,84 \pm 2,05$	$365,40 \pm 1,79$

Tab. 3-1 Ausgangsgewichte der Tiere in Gramm

MW \pm SD am ersten Tag der Fütterung in den verschiedenen Versuchsreihen.

Die Tiere wurden in einem separaten Raum in der Tierhaltung der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV in Einzelhaltung in transparenten Plexiglasboxen mit metallendem Käfigdeckel gehalten. Es herrschten konventionelle Bedingungen, bei $21,5^{\circ}\text{C} \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ Raumtemperatur (RT) und einer relativen Luftfeuchtigkeit (LF) von $59,7\% \pm 10\%$ bei 100% Frischluft-Zufuhr.

Als Einstreu wurden Lignocel Holzfaserstoffe verwendet. Der Hell-dunkel-Rhythmus teilte sich in 12:12 Stunden auf. Um tierexperimentelles Arbeiten auch während der aktiven Phase der Ratten zu ermöglichen, wurde die Dunkelphase um 10:00 Uhr vormittags begonnen. Arbeiten in der Dunkelphase wurden nur unter Rotlicht ausgeführt.

3.1.1 Futter und Fütterung

Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von vier Wochen isoenergetisch mit den jeweiligen Experimentaldiäten (Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Schweiz) gefüttert. Wasser wurde den Tieren während des gesamten Versuchszeitraum über Nippeltränken ad libitum zur Verfügung gestellt. Das Standardfutter und die Chow Diät wurde den Versuchstieren in einer Futterraufe des Makrolonkäfigs (Eurostandard "Typ III hoch", Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, DE) angeboten. Die LCHF-Diäten, welche aufgrund ihres hohen Fettanteils eine pastöse Konsistenz haben, wurden in standsicheren Porzellanschalen im Käfig platziert.

Da die eingesetzten Diäten eine unterschiedliche Energiedichte aufweisen, musste die sogenannte Paarfütterung angewendet werden, um einen isokalorischen Futterkonsum gewährleisten zu können. Bei dieser speziellen Form der Fütterung wird die Futteraufnahme der übrigen Versuchstiere mit der der Kontrollgruppe vereinheitlicht. Im konkreten Fall heißt das, dass die LCHF-Diäten eine quantitativ begrenzte Menge an Energie in Form von Kalorien erhielten. Die Menge der zu konsumierenden Kalorien ergibt sich aus dem errechneten MW des Futterkonsums der Kontrollgruppe Chow, welche als einzige Gruppe ad libitum Zugang zu Nahrung hatte. Zu diesem Zwecke wurde täglich um 10:00 Uhr vormittags, kurz vor Beginn der Dunkelphase, der Futterkonsum der Versuchstiere auf der regulären Chow Diät bestimmt und der MW der aufgenommenen Kalorienmenge errechnet. Dieser wurde dann mengenmäßig auf die unterschiedlichen Experimentaldiätgruppen umgerechnet. Dadurch wurde sichergestellt, dass alle Tiere der verschiedenen Gruppen die äquivalente Menge an Kalorien erhielten.

Wurden an den Tieren der Kontrollgruppe Versuche vorgenommen, welche die Nahrungsaufnahme beeinflussten, wie etwa die Probensammlung zur Bestimmung der GH-Mediane, so wurden diese Tiere am folgenden Tag von der MW-Berechnung ausgeschlossen. So sollten unphysiologische Schwankungen vermieden werden.

Alle Diäten wurden in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik der LMU München entworfen. Sie entsprechen in ihrer Zusammensetzung mindestens den Anforderungen des National Research Council (NRC 1995).

Die Proteinquelle der Kontrollgruppe und der LCHF-Diäten war Natriumcaseinat. Als Kohlenhydratquelle diente Stärke. Die Fettquelle in der Kontrollgruppe bestand zu 50% aus Rindertalg und zu 50% aus Sojaöl. Die Fettquelle in den Experimentalgruppen war ausschließlich Rindertalg. Der geringe Anteil an Kohlenhydraten in den Experimentalgruppen war technisch erforderlich um die Mindestmenge an Mineralien und Vitaminen darzureichen und so Mangelerscheinungen zu verhindern. Hierfür wurde deren Gehalt an die Energiemenge angepasst. Der Anteil an Rohfasern und Rohasche macht 6,7% der Trockenmasse in der Kontrollgruppe und 12% der Trockenmasse in den Experimentaldiäten aus. So kam es in allen Gruppen zu einer gleichen Aufnahme von Kalzium, Zink, Kupfer, Magnesium und v.a. Vitaminen und Mineralien. Um die Daten unabhängig zu kontrollieren, wurden sie an die Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFÄ-ITL GmbH, Kiel, DE) geschickt, wo mittels Weender Analyse die genannte Zusammensetzung bestätigt wurde.

Der Name der unterschiedlichen Experimentalgruppen (LC-75, LC-65, LC-55) leitet sich von dem jeweiligen Anteil an Fett in der Trockenmasse der angebotenen Diät ab. Die LC-75 hat den höchsten Fett- und den niedrigsten Protein- und KH-Anteil. Da der empfohlene Gehalt an Protein in Tiernahrung 8% beträgt, weist die LC-75, welche als einzige Diät ketogen war, einen nicht suffizienten Anteil an diesem Makronährstoff auf. Die LC-55 hat den geringsten Fett- und den höchsten Protein-Anteil, wobei der Anteil an Protein annähernd dem in der regulären Chow gleicht. Die LC-65 liegt zwischen den beiden oben genannten.

Futter		kcal/100g	Fett (%) in TM / ME	Protein (%) in TM / ME	KH (%) in TM / ME
Chow	n = 26	384	8 / 16,7	19,3 / 19,0	66 / 64,3
LC-75	n = 24	721	75 / 92,8	10 / 5,5	3 / 1,7
LC-65	n = 16	668	65 / 86,3	20 / 11,8	3 / 1,9
LC-55	n = 14	617	55 / 78,7	30 / 19,1	3 / 2,2

Tab. 3-2 Zusammensetzung der verwendeten Diäten

Anteil der Makronährstoffe in der Trockenmasse (TM) und an der metabolisierbaren Energie (ME). Chow und LC-55 variieren fast ausschließlich in ihrer Fett und KH-Menge und entsprechen einander hinsichtlich ihres Proteingehalts

3.1.2 Lebendgewichtbestimmung

Um den Gewichtsverlauf unter den verschiedenen Diäten beurteilen zu können, wurden die Versuchstiere jeden zweiten Tag, kurz vor Beginn der Fütterung, in der letzten Stunde der Hellphase gewogen. Um eine möglichst exakte Gewichtsbestimmung zu gewährleisten, wurde hierfür eine Analysenwaage (0,1g – 2.200g Sartorius CP 2201, Sartorius AG, Göttingen, DE) mit dynamischer Wägefunktion (20 aufeinander folgende Messungen in 2 Sekunden mit Errechnung des MW) benutzt. Dadurch konnten etwaige Verfälschungen, welche durch Bewegungen der Versuchstiere während der Messung entstehen, minimiert werden. Die Gewichtsangaben in Gramm (g) wurden auf eine Nachkommastelle genau erfasst.

3.1.3 Energiestoffwechsel und Kalorimetrie

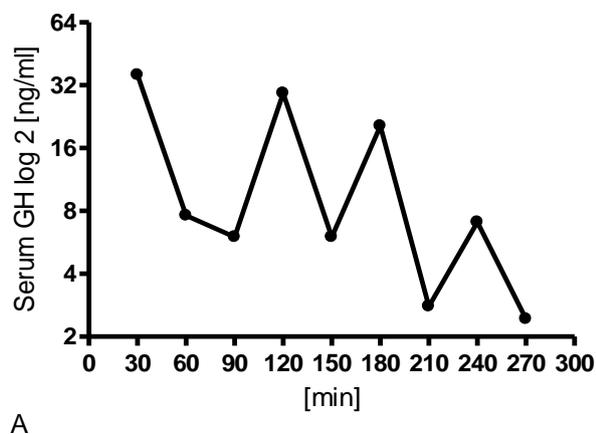
Nach zwei Wochen auf den Diäten wurde der Ruheenergieverbrauch (REE) der Versuchstiere mittels indirekter Kalorimetrie bestimmt. Dazu wurden die Ratten über einen Zeitraum von 24 Stunden in hohen, luftdicht abgeschlossenen Plexiglaskäfigen mit Einstreu, Futter und Wasser gesetzt. Die Makrolonkäfige wurde mit der Messeinheit der indirekten Kalorimetrie (CaloSys Calorimetry System, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, DE) verbunden. Dieses System führt über zwei Öffnungen permanent Raumlufte zu und Käfigluft ab (2–2,5l Luftumsatz/min) und errechnet den Energieumsatz automatisch aus den Messwerten der Atemgasanalyse, basierend auf der Gleichung von Weir [126]. Das offene System wird von der Steuereinheit betrieben, welche über Sensoren für die Konzentrationsermittlung der Gase sowie für die kontinuierliche Luftzufuhr und die Temperaturmessung zuständig ist. Parallel konnten die Werte aus vier verschiedenen Käfigen analysiert werden, wobei die Messungen in den Boxen abwechselnd getätigt werden. In unserem Fall wurden für drei Minuten die Konzentration von O₂ und CO₂ sowie die Zusammensetzung der Raumlufte analysiert. Daraus ergab sich ein Abstand der Messzyklen von 15min. Zur Verbesserung der Messgenauigkeit wurde den mit der Sensoranlage verbundenen Boxen über eine Lufttrocknungseinheit Luftfeuchtigkeit entzogen. So wurde einerseits die Kondensatbildung reduziert und andererseits der Luftstrom zusätzlich gefiltert. Die gewonnenen Werte wurden an einen Computer gesendet. Mit der Software LabMaster CaloSys (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, DE) wurde die Anlage gesteuert, die Daten wurden aufgezeichnet und die abgeleiteten Größen errechnet.

3.1.4 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

Nach vier Wochen auf der jeweiligen Experimentaldiät wurden die Versuchstiere ein letztes Mal gewogen und im Anschluss an eine Fastenzeit von sechs Stunden unter Isofluraninhalationsnarkose (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethy-difluoromethylether, Abbott GmbH & Co.KG, Chicago, Illinois, USA) von Nasenspitze bis Schwanzansatz mittels eines Maßbandes (Hoechstmass Balzer GmbH, Sulzbach, DE) auf 0,1mm genau vermessen und im Folgenden durch Dekapitation getötet. Diese beiden Prozedere erfolgten in zwei getrennten, benachbarten Bereichen des Versuchsterraums.

3.1.4.1 Serienblutentnahme zur Analyse der pulsatilen GH Sekretion

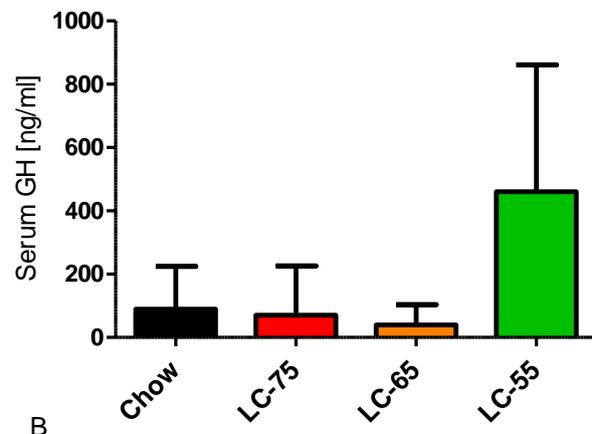
Das in der Hypophyse gebildete GH wird bei der Ratte, wie beim Menschen, pulsatil sezerniert. Aus diesem Grund war es nötig zur Bestimmung eines medianen GH Wertes ein Profil von mehreren Werten zu erstellen, um diesbezüglich repräsentative Daten zu erhalten.



A

Abb. 3-1 GH-Sekretion, pulsatil

Beispielhafte Darstellung der pulsatilen Sekretion von GH bei halbstündiger Messung über einen Zeitraum von 4,5h im Serum eines Tieres der Kontrollgruppe Chow (nach 6h Nahrungskarenz).



B

Abb. 3-2 GH Sekretion, punktuell

Punktuelle Konzentrationsbestimmung von GH aller Tiere an einem zufälligen Zeitpunkt unter identischen Bedingungen (nach 6h Nahrungskarenz) bei Dekapitation

Am Ende der dritten Woche auf den verschiedenen Diäten erfolgten nach einer Nahrungskarenz von sechs Stunden multiple Blutentnahmen in regelmäßigen Abständen. Unter Isofluraninhalationsnarkose wurden die Schwanzgefäße mittels eines Warmwasserbades und einer leichten manuellen Stimulation hyperämisiert. Anschließend wurden in einem Abstand von 30min bis zu zehn verschiedene Blutproben (0 - 30 - 60 - 90 - 120 - 150 - 180 - 210 - 240 - 270min) mittels heparinisierter Mikrokapillare (>0,3ml Plasma) aus den Schwanzvenen gewonnen. Um ein eventuelles Nachbluten so gut wie möglich zu verhindern, wurde die Entnahmestelle umgehend nach Probengewinnung mit kalten Kompressen behandelt. Während des Versuchs wurden die Ratten sowohl von Futter als auch von Wasser gefastet und kontinuierlich überwacht. Die Blutproben wurden anschließend bei 4°C und 12.000 U/min für 4min zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde abpipettiert und bei -20°C gelagert.

Die Analyse von GH in den Proben erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen ELISAs (ACTIVE[®] Mouse/Rat Growth Hormone ELISA, Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, Texas, USA) in einer Doppelwertbestimmung, in der Verdünnung 1:2. Für den Fall, dass zu wenig Serum für einen Doppelwert (DW) vorhanden gewesen wäre, wurde eine Einzelwert-Messung vorgenommen. Gesetz des Falles, dass dieses auch nicht möglich gewesen wäre, wurde ein Einzelwert in der Verdünnung 1:4 gemessen.

3.1.4.2 Probengewinnung im Rahmen der Sektion

Die Dekapitation und Probengewinnung der Versuchstiere erfolgte während der Inaktivitätsphase der Tiere, in den ersten drei Tagen der fünften Woche auf den Experimentaldiäten in der Tierhaltung der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV. Vorausgegangen war eine Fastenzeit von sechs Stunden, in welcher die Tiere lediglich ad libitum Zugang zu Wasser hatten. Anschließend wurden die Ratten in Isoflurannarkose gesetzt, im Weiteren von der Nasenspitze bis zum Schwanzansatz vermessen und schlussendlich mittels Dekapitation getötet. Dazu wurde folgendes Operationsbesteck verwendet:

- Scheren: spitz-spitz gebogen / spitz-stumpf gebogen / spitz-spitz gerade / spitz-stumpf gerade (Bausch Adolf GmbH Medizintechnik, Krailing, DE)
- Pinzette: anatomisch / anatomisch fein / chirurgisch und Klemme gebogen (Medipeel, Sengewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf, DE)
- Knochenzange nach Beyer (Bausch Adolf GmbH Medizintechnik, Krailing, DE)
- Einwegskalpelle (PFM medical AG, Köln, DE).

Serum

Durch die gewählte Tötungsmethode war es möglich, ausreichend Blut für spätere Analysen zu gewinnen. Das Tier wurde direkt nach der Dekapitation über ein Einmal-Trichtersystem platziert und das aus den Aa. Carotides und Halsvenen gewonnene Vollblut in mit Gerinnungsaktivatoren versehenen Monovetten (Blutentnahmesystem S-Monovette[®] Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE) gesammelt. Um die Blutprobe mit dem enthaltenen Gerinnungsaktivator zu vermischen, wurde die verschlossene Monovette mehrmals vorsichtig geschwenkt und anschließend bei Raumtemperatur (RT) bis zur vollständigen Gerinnung für etwa 20min gelagert. In einem weiteren Schritt wurden die Proben für 10min bei 15°C und 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Nunc Röhrchen (Nunc CryoTube[™], Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold, Dänemark) transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden hieraus Parameter gemessen, welche Bestandteile der somatotropen Achse sind (GH, IGF-I, Leptin, total Ghrelin, FFA). Des Weiteren wurde eine Blutprobe zur sofortigen Blutglukosemessung mittels Glukose-Oxidase-Methode gewonnen. Hierfür wurden mittels einer open-end-Kapillare 20µl Vollblut in ein Glucocapil Entnahmesystem mit 1.000µl Hämolyse-Systemlösung transferiert (Ruhrtal Labortechnik, Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital, DE). Die anschließende Messung erfolgte über den automatischen Analysator Super GL Ambulance (Ruhrtal Labortechnik, Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital, DE). Auf die Ergebnisse wird im Abschnitt 4.4 eingegangen.

Organentnahme

Unmittelbar nach der Vollblutgewinnung wurden die ausgebluteten Tiere in Rückenlage verbracht. Es folgte die Eröffnung des Abdomens durch einen ventralen medianen Längsschnitt vom Dekapitationsschnitt cranial nach caudal oberhalb der Peniswurzel.

Nach der Entnahme des Magen-Darm-Traktes wurde die Leber freipräpariert, entnommen und gewogen. Anschließend wurden aus verschiedenen Leberlappen Proben zur Quantifizierung der Expression des Wachstumshormonrezeptors (GHR) und insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF-I) gewonnen. Im Weiteren wurde zunächst das Pankreas, anschließend die Milz, das Herz, die Lungen und die Nieren entnommen. Im Anschluss wurde eine Probe aus dem M. quadriceps femoris (s.u.) entnommen. Danach wurden die Fettgewebeproben gewonnen (s.u.). Zuletzt erfolgte die Entnahme des Gehirns (s.u.)

Leber, Milz, Pankreas, Niere, Herz und Gehirn sowie die verschiedenen Fettpolster (inguinales Fett, perirenales Fett, epididymales Fett, braunes Fett) wurden durch eine Analysenfeinwaage (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, DE) auf 0,1mg genau gewogen. Hierfür wurden die Proben auf Einweg-Wägeschiffchen (VWR International GmbH, Rafnor, Pennsylvania, USA) gelagert. Bei der Niere wurde die rechtsseitig gelegene zur Gewichtsbestimmung entnommen, wohingegen die linksseitige der Probengewinnung diente.

Für die RNA-Isolation wurden die gewonnenen Proben (Leber, Muskel, Fettdepots) unmittelbar auf Trockeneis (TKD Trockeneis und Kohlensäure Distribution GmbH, Fraunberg, DE) gelagert und später bei -80°C in Zellkulturplatten (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) asserviert.

Fettgewebe

Zur Gewinnung des epididymalen Fettgewebes wurde das Skrotum eröffnet und sein Inhalt mobilisiert. Anschließend wurde das Fettgewebe von Hoden und Nebenhoden abpräpariert und der Funiculus Spermaticus entfernt. Daraufhin konnte rechtsseitig das Gewicht des Fettdepots bestimmt und linksseitig die Proben gewonnen werden.

Um das perirenale Fettgewebe zu analysieren, wurde das die Niere umgebende Fettkompartiment von dieser gelöst und im Anschluss daran wurde so verfahren wie beim epididymalen Fettdepot. Zusätzlich wurden weitere Proben für die histologische Untersuchung in Einbettkassetten transferiert und für 12h in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) gelagert.

Des Weiteren wurde das inguinale Fettgewebe als Parameter für die Entwicklung des subkutanen Fettgewebes gewonnen. Um eine möglichst genau Standardisierung zu erreichen, wurde dieses mittels Skalpell von der Innenseite der linken Bauchwand bis auf die Dermis abpräpariert, wobei als caudale Begrenzung die Höhe der Kniegelenke und als craniale Begrenzung die Höhe des Xiphoids definiert wurde. Als seitliche Grenzen dienten einerseits die Wirbelsäule und andererseits die Schnittkante des medianen Bauchschnitts. Das so gewonnene Fettdepot wurde gewogen und anschließend wurden die Proben entnommen.

Die gewonnenen Fettgewebeproben dienten der Analyse der somatotropen Achse in diesem Gewebe sowie der Untersuchung einer Fettgewebsinflammation (4.5).

Für spätere Analysen wurde außerdem das braune Fettgewebe aus der interscapulären Region entnommen und gewogen und auch hiervon Proben zur RNA-Isolation auf Trockeneis gefroren. Ein Teil des Gewebes wurde für die morphologische Untersuchung in 4% igem PFA gelagert.

Peripheres Zielgewebe

Zur Analyse der somatotropen Achse im peripheren Gewebe wurde eine Gewebeprobe aus dem rechten M. quadriceps femoris gewonnen und auf Trockeneis gefroren.

Zentrales Nervengewebe

Im Folgendem wurde das Kranium mit einer Knochenzange von zervikal eröffnet, um den Hypothalamus und die Hypophyse zu entnehmen, welche anschließend in RNase inaktivierender Salzlösung (RNAlater) bei -20°C asserviert wurden. Im Weiteren wurde das Gehirn gewogen (s.o.)

Weiteres Vorgehen

Nach der Entnahme aller Organe und abgeschlossener Probengewinnung wurden die LBM und das Gewicht der Haut, inklusive Fell, auf 0,1g genau bestimmt. Hierfür wurde der muskuläre Korpus der Versuchstiere mittels Skalpell von der Dermis, inklusive dem dazugehörigen subkutanen Fettgewebe, getrennt.

Zuletzt wurde die Länge des Kopfes und der Wirbelsäulensegmente unter Zuhilfenahme einer Schieblehre 0,02-150mm (Emil Lux GmbH & Co. KG, Wermelskirchen, DE) gemessen. Abschließend wurde zur späteren Messung des Knochenwachstums das rechte Hinterbein luxiert und ebenfalls bei -20°C aufbewahrt. Im weiteren Verlauf wurden Femur und Tibia soweit möglich mechanisch vom Weichgewebe getrennt und vermessen.

3.1.5 Proteinbiochemische Methoden zur Serumkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der verschiedenen Serumparameter wurden kommerziell erhältliche Kits verwendet. Vor dem Ansatz der Assays wurden die Serumproben bei RT vollständig aufgetaut und anschließend gevortext. Die genaue Vorgehensweise richtete sich nach den Herstelleranweisungen der Kits.

Der quantitative Nachweis von GH, gesamt Ghrelin und Leptin erfolgte durch Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA). Der quantitative Nachweis für IGF-I erfolgte durch Enzyme immune Assays (EIA) auf vorbeschichteten Platten. Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) wurde als das die Farbreaktion katalysierende Enzym verwendet. Anschließend wurden die Ergebnisse gegen eine Kalibrationskurve aus bekannten Analytkonzentrationen aufgetragen. Die Durchführung geschah nach Anweisung der Hersteller. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Photometers (Tecan Spectra II, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz), welcher die Absorption bei den jeweiligen Wellenlängen und die Umrechnung dieser Werte in Konzentrationen gemäß der Standardkurve durchführte.

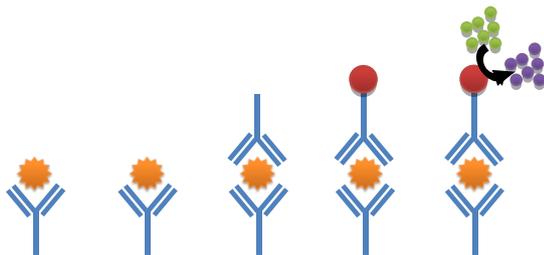


Abb. 3-3 Nicht kompetitiver ELISA

- 1) Coating AK bzw. Primär AK
- 2) AG Zugabe
- 3) Detektions AK bzw. Sekundär AK
- 4) Zugabe und Komplexbildung des Enzym-linked-AK-AG-AK
- 5) Zugabe eines chromogenen Substrates, welches zum Reaktionsprodukt umgesetzt und zur AG-Quantifizierung genutzt wird.

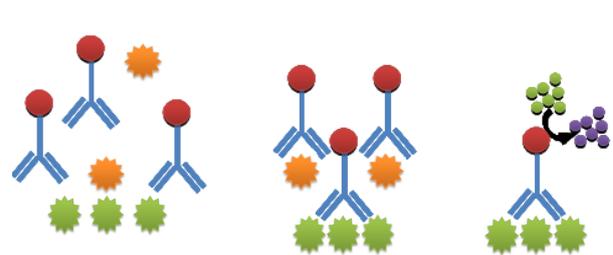


Abb. 3-4 Kompetitiver ELISA

- 1)trägergebundene AK konkurrieren mit Proben um AK
- 2)Bindung des markierten AK an die Probe und / oder den trägergebundenen AK
- 3) Zugabe eines chromogenen Substrates, wodurch das Substrat zum Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Dies entspricht einem indirekten Nachweisverfahren

Um die Standardkurve am Assayreader auszuwerten, wurden die Positionen der Standards mit ihren Konzentrationen gemäß dem Pipettierschema eingegeben. Von den Messwerten, der in unserem Falle Doppel- bis Dreifachbestimmungen, wurden die Mittelwerte gebildet und anschließend wurde mit Hilfe der 4-Parameter-Funktion eine Eichkurve erstellt, um hinterher durch diese die Konzentrationen der Probenlösungen zu ermitteln. Die auf der y-Achse ermittelten Absorptionen der Standards wurden gegen den Logarithmus (\log_{10}) der Standardkonzentrationen auf der x-Achse aufgetragen. Mit Hilfe der so entstandenen Punkte wurde eine Gerade gelegt. Ist im Rahmen der Probenvorbereitung ein Verdünnungsfaktor angegeben, müssen die Messwerte mit diesem multipliziert werden.

GH

Zur Bestimmung der Serumkonzentration von GH wurden Platten aus dem Kit ACTIVE[®] Mouse/Rat Growth Hormone ELISA (Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, Texas, USA) verwendet. Die Serumproben wurden in einer Verdünnung von 1:2 als DW in die beschichtete 96-well-Platte pipettiert. Als Detektions-AK diente mit HRP markiertes Anti-Mouse/Rat GH. Nach einer Inkubationszeit und Waschschritten wurde Tetramethylbenzidine (TMB) zugefügt. Nach einer weiteren Inkubation mit diesem Substrat konnte die enzymatische Farbreaktion durch Zugabe einer sauren Stopplösung beendet werden und die Absorption der gefärbten Lösung bei 450nm/620nm Wellenlänge photometrisch gemessen werden (4.4.1). Laut Herstellerangaben besitzt der Test eine Intra-Assay-Variabilität von 2,23–8,61% und eine Inter-Assay-Variabilität von 3,43–8,95%.

IGF-I

Um die Konzentration von IGF-I im Serum zu bestimmen, wurde der Kit OCTEIA[®] Rat/Mouse IGF-I IEMA (Immunodiagnostic Systems Limited, Boldon, UK) verwendet. Das Serum der Versuchstiere wurde mittels Releasing Reagenz vorbehandelt, um das IGF-I von seinen IGF-BPs zu lösen. Anschließend wurde die Probe mit „dillution buffer“ verdünnt. Die vorbehandelte Probe wurde als DW in die mit anti-Rat IGF-I beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und zusammen mit biotinyliertem rabbit anti-rat IGF-I inkubiert. Nach einem Waschschriff wurde an Avidin gebundene HRP zugegeben, welche an den Biotinkomplex bindet. Nach einem weiteren Waschschriff wurde die Farbreaktion durch Zugabe von TMB gestartet und später mittels 0,5 molarer Salzsäure als Stopplösung beendet. Zum Schluss wurde die Absorption bei einer optischen Dichte (OD) von 450nm/650nm abgelesen (4.4.1). Laut Herstellerangaben besitzt der Test eine Intra-Assay-Variabilität von 4,3–7,3% und eine Inter-Assay-Variabilität von 6,3–8,8%.

IGFBP-3

Zur Quantifizierung der Serumkonzentration von IGFBP-3 wurden Platten aus dem Kit m/rIGFBP-3-ELISA (Mediagnost GmbH, Reutlingen, DE) verwendet. Die Serumproben wurden laut Herstellerangaben in einer Verdünnung von 1:301 als DW in die mit Anti-Mouse/Rat IGFBP-3 beschichtete 96-well-Platte pipettiert. Als Detektions-AK dienten biotinylierte Anti-Maus IGFBP-3 AK. Als Enzymkonjugat ist ein mit HRP markiertes Streptavidin verwendet worden. Nach einer Inkubationszeit und Waschschritten wurde das AK-Konjugat zugefügt. Nach einer weiteren Inkubation mit dem markierten Enzymkonjugat und anschließendem Waschschriff wurde eine Farbreaktion durch Zugabe von TMB gestartet und erneut inkubiert. Anschließend konnte die enzymatische Farbreaktion durch Zugabe einer 0,2 molarer Schwefelsäure als Stopplösung beendet werden und die Absorption der gefärbten Lösung bei 450nm Wellenlänge photometrisch gemessen werden (4.4.2). Laut Herstellerangaben besitzt der Test für IGFBP-3 eine Intra-Assay-Variabilität von 4,6% und eine Inter-Assay-Variabilität von 8,4%.

Leptin

Die Konzentrationsbestimmung von Leptin im Serum erfolgte anhand des m/rLeptin-ELISA Kit (Mediagnost GmbH, Reutlingen, DE). Die Serumproben wurden als DW in einer Verdünnung von 1:5 in die mit Anti-Maus/Ratten-Leptin AK beschichtete 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend mit biotinyliertem Anti-Maus/Rat-Leptin Antiserum inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation mit HRP markiertem Streptavidin erfolgte die Zugabe von TMB-Substrat. Später wurde die Stopplösung hinzugegeben. Im Anschluss daran erfolgte die photometrische Messung der Farbreaktion bei 450nm/620nm (4.4.2). Laut Angaben des Herstellers besitzt der Test eine Intra-Assay-Variabilität von 4,4% und eine Inter-Assay-Variabilität von 4,7%.

Ghrelin gesamt

Eine quantitative Bestimmung von gesamt Ghrelin im Serum erfolgte durch den rat/mouse ghrelin (total) ELISA Kit (Merck Millipore KGaA, Billerica, Massachusetts, USA). Präanalytisch wurde keine Ansäuerung oder andere Behandlungen durchgeführt. Die Serumproben wurden unverdünnt als DW in die mit anti-Rat/Mouse ghrelin IgG beschichtete 96-well-Platte pipettiert und parallel dazu wurde der biotinylierte Ghrelin-AK zugegeben. Nach einem Waschgang wurden erst die HRP und anschließend das TMB-Substrat zugefügt. Nach der Beendigung der Farbreaktion durch die Stopplösung wurde die Absorption der Farbreaktion bei einer OD von 450nm/590nm abgelesen (4.4.2). Laut Herstellerangaben besitzt der Test eine Intra-Assay-Variabilität von 0,69–0,91% und eine Inter-Assay-Variabilität von 1,76–3,34%.

FFA

Zur Quantifizierung der FFA wurde der Free Fatty Acids, Half Micro Test (Roche Diagnostics AG, Risch, Schweiz) verwendet (4.4.2). Bei diesem kolorimetrischen Assay wurden die FFA im Plasma enzymatisch quantifiziert. Laut Angaben des Herstellers besitzt der Test eine Intra-Assay-Variabilität von 5% und eine Inter-Assay-Variabilität von 8%.

3.1.6 Molekularbiologische Methoden

3.1.6.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das SV Total RNA Isolation System (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde für die einzelnen Zentrifugationsschritte eine Geschwindigkeit von 13.000 U/min verwendet. Die Gewebeprobe wurde in 250µl RNA Lysepuffer (RLA) homogenisiert und anschließend mit 500µl Verdünnungspuffer durch mehrmaliges Schwenken vermischt und für 3min bei 70°C im TRIO-Thermoblock (Biotron GmbH, Hilden, DE) inkubiert. Danach wurde die Lösung für 10min zentrifugiert und das gereinigte Lysat wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Dort wurde es mit 286µl 95%igen Ethanol (SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach, DE) vermischt. Das Gemisch wurde auf die Säule pipettiert und 1min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und der Probe wurde anschließend 600µl RNA Waschlösung beigelegt. Danach wurde 1min zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen.

Für den DNase Verdau wurde folgender Inkubations-Mix vorbereitet:

Lösung	Volumen
Yellow core buffer	40µl
MnCl ₂ 0,09M	5µl
DNase I	5µl

Tab. 3-3 DNase Inkubations Mix

Mengenangaben für je eine Gewebeprobe. MnCl₂ = Mangan(II)Chlorid

Yellow core buffer = 22,5mM Tris (pH 7,5), 1,125M NaCl, 0,0025% gelber Farbstoff

50µl des DNase Inkubations Mix wurden auf die Membran pipettiert und 15min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200µl DNase Stopplösung beendet, 1min zentrifugiert und der

Überstand wieder verworfen. Dann wurden 600µl RNase Waschlösung zugegeben, erneut 1min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Ein zweiter Waschschrift mit 250µl RNase Waschlösung und 2min Zentrifugation folgte. Im Anschluss wurden die Säulen 3min trocken-zentrifugiert, um jegliche Spuren von Alkohol zu entfernen. Zur Gewinnung der RNA wurden die Säulen nun auf ein 1,5ml Eppendorfgefäß gesteckt und mit 100µl RNase freiem Wasser 3-4min bei RT inkubiert und durch 1min Zentrifugation eluiert. Bei der Bearbeitung des Hypothalamus-Hypophysen-Gewebes wurde - aufgrund der geringen Menge an RNA, welche erwartet wurde - lediglich 50µl nukleasefreies Wasser beigefügt, um die Verdünnung der RNA so gering wie möglich zu halten. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde unmittelbar danach mittels Spektralphotometer bestimmt. Die Gesamt-RNA wurde anschließend umgehend in cDNA umgeschrieben.

3.1.6.2 Spektralphotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Anhand der Spektralphotometrie wird sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der RNA in einer Probe bestimmt. Hierfür erfolgte photometrisch die Messung der optischen Dichte (OD) bei $\lambda=260\text{nm}$ (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und bei $\lambda=280\text{nm}$ (OD_{280}), dem Absorptionsmaximum von Proteinen.

Die Konzentration der RNA lässt sich durch folgende Formel errechnen:

$$\text{Konzentration} \left[\mu \frac{\text{g}}{\text{ml}} \right] = OD_{260} \times 40 \mu \frac{\text{g}}{\text{ml}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Reinheit der Probe wird durch den Quotienten der Absorption aus OD_{260} und OD_{280} bestimmt, wobei dieser nicht unterhalb 1,8 liegen sollte. In unseren Proben erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit dem Spektralphotometer NanoDrop 1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE).

3.1.6.3 cDNA Synthese aus RNA

Durch das reverse Transkriptase Enzym, eine RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase, wurde die Einzelstrang-RNA in eine intronfreie Doppelstrang-cDNA transkribiert. Hierfür wurde das Superscript III, First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR Kit (Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet und nach folgendem Protokoll gearbeitet:

Die RNA wurde mit Aqua ad iniectabilia (AD) (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE) auf eine einheitliche Konzentration von 500ng/μl gebracht. Anschließend wurde der Reaktionsmix (Tab. 3-4) angefertigt und bei 25°C 10min inkubiert.

Lösung	Volumen
2xRT Reaction Mix	10μl
RT Enzyme Mix	2μl
RNA 500ng/μl	8μl

Tab. 3-4 Reaktionsmix cDNA Synthese

Im nächsten Schritt wurde das Gemisch für 30min bei 50°C und direkt im Anschluss für 5min bei 80°C inkubiert. Nachdem der Mix 2-3min auf Eis stand, wurde 1μl (2U) E. coli RNase H hinzugefügt. Dann wurde er wieder für 20min bei 37°C inkubiert.

Die so erhaltene cDNA wurde anschließend bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

3.1.6.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA

Die Agarosegelelektrophorese dient der Qualitätskontrolle der isolierten RNA. Die von uns verwendete Konzentration des Agarosegels von 1,5%, richtete sich nach der erwarteten Fragmentgröße. Zur Herstellung eines 9x10x0,5cm und 1,5%igen Gels, wurde 1,5g Agarose peqGOLD Universal (Peqlab Biotechnologie GMBH, Erlangen, DE) in 100ml 1x TBE-Puffer gelöst. Das Agarosepulver wurde unter gelegentlichem Schwenken in der Mikrowelle (LG Electronics Inc., Seoul, Südkorea) bei 500W aufgeköcht, bis eine klare und partikelfreie Lösung entstand. Nach dem das Gel ca. 60°C hatte, wurde Ethidiumbromid 1% (5μl/100ml) (Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe, DE) zugegeben, um eine spätere Visualisierung der Banden in der Dunkelkammer zu ermöglichen. Nun wurde das Gel in einen mit einem Taschenformer versetzten Gelträger gegossen. Das polymerisierte Gel wurde in die Gelkammer eingelegt, der Kamm unter Puffer herausgezogen und die RNA Proben (2μl RNA, 5μl nukleasefreies Wasser, 3μl loading dye) wurden in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard diente eine 1kb DNA-Leiter (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA). Die Elektrophorese (Gelelektrophorese Apparatur, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Schweiz) erfolgte für ca. 30min bei einer Spannung von 90V und einer Stromstärke von maximal 150mA. Anschließend wurde das Gel unter 254nm UV-Licht fotografiert (Intas PCI-Gel-Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, DE).

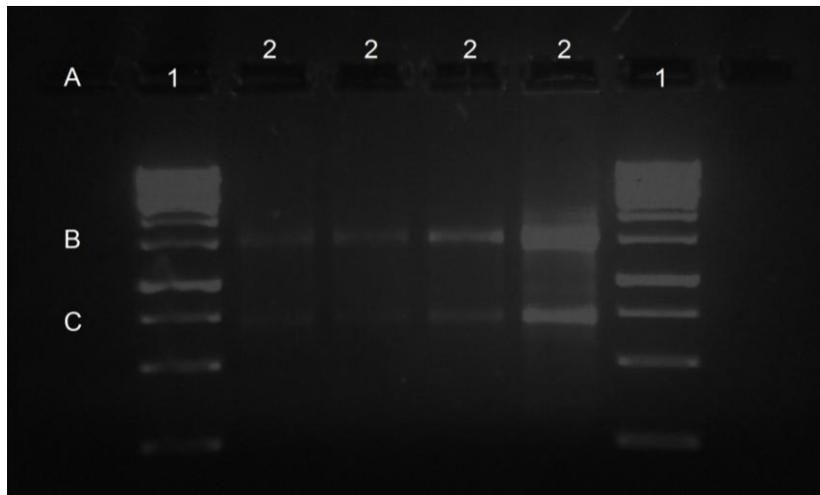


Abb. 3-5 RNA-Banden nach Gelelektrophorese:

1) 1kb DNA Molekulargewichtsstandard 2) Proben aus hypothalamisch-hypophysärem Gewebe.

A) genomische DNA B) 28S-r-RNA-Bande C) 18S-rRNA-Bande.

Wenn die Laufzeit lange genug andauert, wird am unteren Bildrand eine weitere Bande sichtbar, welche der 5S-rRNA entspricht. Das Farbintensitätsverhältnis der 28S- und 18S-RNA-Bande zueinander ist ein Maß für die Intaktheit der isolierten RNA und sollte annähernd im Verhältnis 2:1 stehen [32, 33].

3.1.6.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Als Grundlage der PCR diene folgendes Reaktionsgemisch:

Vol	Lösung	Konz
0,5µl	cDNA	500ng/µl
0,5µl	Primer sense	10pmol/µl
0,5µl	Primer antisense	10pmol/µl
10µl	Eva Green MM	
8,5µl	nukleasefreies H ₂ O	
20µl	Gesamtvolumen	

Vol	Lösung	Konz
1 µl	DNA	500ng/µl
1µl	Primer sense	10µmol
1µl	Primer antisense	10µmol
12,5µl	Go Taq	
9,5µl	nukleasefreies H ₂ O	
25µl	Gesamtvolumen	

Tab. 3-5 Reaktionsgemisch real time quantitative PCR / Reaktionsgemisch reverse Transkriptase PCR

Vol = Volumen, Konz = Konzentration, MM = Mastermix

Das Volumen wurde in unbeschichtete 96-Well PCR-Platten (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE) pipettiert. Diese wurden mit einer optisch klaren, selbstklebenden PCR-Klebefolie (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE) verschlossen, um Verdunstungen zu verhindern. Zusätzlich wurden

diese mit einer Gummiabdeckung verschlossen und dann in einen Thermocycler (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA oder Peqlab Biotechnologie GMBH, Erlangen, DE) gestellt.

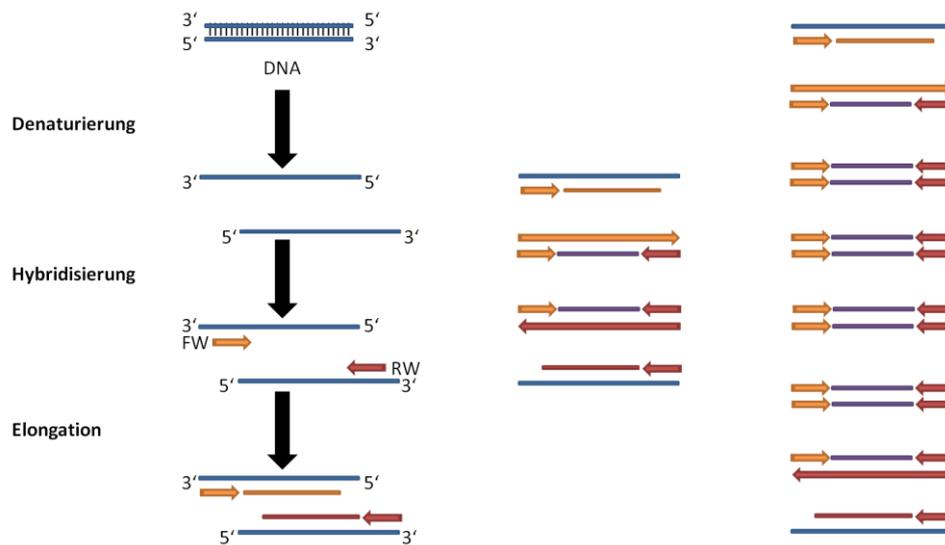


Abb. 3-6 Schematische Darstellung der PCR-Zyklen

1) Denaturierung bei 93°C und damit Auftrennung der beiden komplementären DNA-Stränge

2) Hybridisierung bei 60°C zur dem DNA-Strang komplementären Primeranlagerung

3) Elongation bei 72°C und exponentielles Wachstum des von den Primern eingeschlossenen Bereichs.

Durch ein vielfaches Wiederholen dieser drei Schritte verdoppelt sich jedes Mal wieder die Anzahl an kopierter DNA und man erhält eine hohe Vervielfältigungsrate. [32, 33]

Um eine Quantifizierung der Genexpression der mRNA zu ermöglichen, dienen Housekeeping Gene, in unserem Fall 18sRNA, als interner Standard. Dadurch können Messfehler, wie sie z.B. durch spektralphotometrische Quantifizierung und ungenaues Pipettieren entstehen, ausgeglichen werden. Die 18sRNA ist Teil der rRNA, welche einen Großteil der gesamten RNA ausmacht. Ihre Expression ist relativ konstant, weshalb ihre Anwendung als interner Standard zur Quantifizierung von mRNA empfohlen wird [33]. Am Ende eines Laufs wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR durch interkalierende Farbstoffe erreicht.

3.1.7 Histologie

3.1.7.1 Paraffinhistologie

Nachdem Fettgewebsproben für die histologische Untersuchung entnommen und in Einbettkassetten transferiert wurden, wurden diese für zwölf Stunden in 4% igem PFA gelagert und anschließend in einem Einbettautomat (Microm GmbH, ThermoFisher Scientific, Walldorf, DE) entwässert und fixiert. Die Proben des weißen Fettgewebes (WAT) wurden mit Paraffin in Blöcke gegossen. Nach dem Erkalten wurden die Paraffinblöcke in die Schneidekammer des Mikrotoms gespannt und mittels Rotationsmikrotom (Microm GmbH, ThermoFisher Scientific, Walldorf, DE) in 4µm dicke Schnitte getrimmt, welche in ein Wasserbad (Microm GmbH, ThermoFisher Scientific, Walldorf, DE) gelegt und anschließend auf Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, DE) aufgezogen wurden. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte für zwölf Stunden bei 37°C getrocknet.

3.1.7.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung des perirenal Fettgewebes

Im Anschluss an die Paraffinhistologie und dem Aufziehen der Gewebeschnitte auf die Objektträger wurden diese nach unten stehendem Protokoll bearbeitet (Tab. 3-6). Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Paramount (Microm GmbH, ThermoFisher Scientific, Walldorf, DE) eingedeckt. Unter dem Mikroskop (DM 2500 und EC3 DMIL LED, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE) wurde die Größe der Fettzellen beurteilt. Bei den aufgenommenen Bildern handelt es sich um repräsentative Aufnahmen, welche mit Hilfe eines Zeiss Axioskops Mikroskops mit Photoeinrichtung in einer Vergrößerung um den Faktor 10 durch das Objektiv und nochmals um den Faktor 10 durch das Okular mit Hilfe der Leica Kamera (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE) aufgenommen wurden.

Entparaffinieren und Rehydrieren		
2x	3 min	Xylene
2x	3 min	EtOH 100 %
2x	3 min	EtOH 95 %
1x	2 min	AD
HE Färbung		
1x	3-5 sec	Hämatoxylin (HHS 32, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE)
1x	1 min	Waschen mit H ₂ O
1x	10 sec	Eosin (HT110-2-32, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE)
Dehydrierung		
2x	30 sec	EtOH 95 %
2x	30 sec	EtOH 100 %
2x	30 sec	Xylene (Merck Millipore KGaA, Billerica, Massachusetts, USA)

Tab. 3-6 Protokoll Hämatoxylin-Eosin Färbung perirenales Fettgewebe

3.1.7.3 Immunohistochemie des perirenal Fettgewebes

Das in Paraffin eingebettete perirenale Fettgewebe wurde nach dem Aufziehen auf die Objektträger über eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Um die Schnitte danach zu demaskieren und die Präsentation des Antigens (AG) und seine Reaktivität zu verbessern, verwendeten wir eine thermische Methode. Für die thermische Behandlung wurden die Schnitte mit Citratpuffer gekocht und anschließend wieder abgekühlt. Im nächsten Schritt wurde das Fettgewebe indirekt mit der Avidin Biotin Complex (ABC) Methode (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) gefärbt. Das AG wurde schließlich durch Peroxidase mit Hilfe von Diaminobenzidin (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE) sichtbar gemacht.

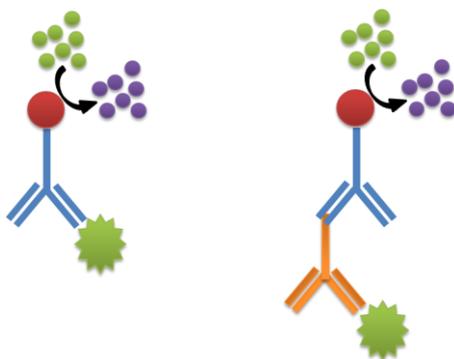


Abb. 3-7 Schematische Darstellung verschiedener Wege der Färbung einer IHC:

Links) Direkt: ein Peroxidase-konjugierter Primär-AK reagiert mit dem AG → Substrat-Chromogenreaktion.

Rechts) Indirekt: ein unkonjugierter Primär-AK bindet an das AG. Anschließend reagiert der Peroxidase gekoppelte Sekundär-AK mit dem FC-Fragment des Primär-AK → Substrat-Chromogenreaktion.

Anhand zahlreicher Verdünnungsreihen wurden diejenigen Verdünnungsstufen ermittelt, bei welchen sich ein Maximum spezifischer Färbung bei gleichzeitig minimaler Hintergrundfärbung erzielen lies. Parallel zu jedem Versuch wurden Negativkontrollen mitgeführt, welche nicht mit Primär-AK beschichtet wurden, um die Spezifität des Sekundär-AK zu kontrollieren. Das von uns benutzte perirenale Fettgewebe wurde nach unten stehendem Protokoll bearbeitet (Tab. 3-7). Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Paramount eingedeckt und unter dem Mikroskop bezüglich des Auftretens von Makrophagen beurteilt. Bei den aufgenommenen Bildern handelt es sich um repräsentative Aufnahmen, welche mit Hilfe eines Zeiss Axioskops Mikroskops mit Photoeinrichtung in einer Vergrößerung um den Faktor 10 durch das Objektiv und nochmals um den Faktor 10 durch das Okular mit Hilfe einer Leica Kamera aufgenommen wurden.

Entparaffinieren und Rehydrieren		
2x	5 min	Xylene
2x	10 min	100 % EtOH
2x	10 min	95 % EtOH
1x	1 min	AD
AG-Demaskierung		
Citratpuffer (CP) 10mM, pH 6,0		
	9ml 0,1M Citronensäure	21g / 1.000ml AD
	41ml 0,1M Natriumcitrat	29,4g / 1.000ml AD
	450ml AD	
Der CP wurde bei 500W aufgeköcht, die Schnitte für 5min bei 70W in den nicht mehr kochenden CP getaucht und weiter erhitzt. Danach wurde das Gewebe im CP ca. 1h abgekühlt.		
Blocking und Primär-AK		
2x	5 min	Phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE)
Gewebe mit Fettstift umranden		
1x	20 min	Blockingbuffer: - 95µl Blocking Solution - 5µl Goat Serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE)
Außer von der Negativkontrolle wird der Blockingbuffer entfernt und der Primär-AK Galectin-3 (H-160) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Kalifornien, USA) zur Detektion inflammatorischer Makrophagen, in einer Verdünnung von 1:50 in Blockingbuffer, aufgetragen. Die Schnitte werden anschließend in einer, mittels Paramount luftdicht abgeschlossener Feuchtkammer, bei 4°C über Nacht inkubiert.		

Waschen und Sekundär-AK		
3x	5 min	PBS
1x	60 min in Feuchtkammer	Sekundär-AK
Der Sekundär-AK goat anti rabbit IgG B (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Kalifornien, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:200 in Blocking Solution verwendet.		
3x	5min	PBS
Visualisierung		
1x	30 min in Feuchtkammer	ABC Solution (30 min vor Gebrauch vorbereiten): - 100µl Blocking Solution - 1µl Avidin - 1µl Biotin
3x	5 min	PBS
1x	5 min	DAB (15 min vor Gebrauch vorbereiten)
2x	5 min	PBS
Gegenfärbung und Dehydrierung		
1x	5 sec	AD
3x	1 sec	Hämatoxylin
3x	2 min	AD
2x	1 min	95 % EtOH
2x	1 min	100 % EtOH
2x	5 min	Xylene

Tab. 3-7 Protokoll Immunhistochemie perirenales Fettgewebe

3.1.8 Statistische Analyse

Die Daten wurden sowohl als absolute als auch als relative Werte zum Körpergewicht übertragen. Gruppenmittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) wurden von GraphPad Prism5 Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) ermittelt. In den Grafiken sind, wenn nicht anders vermerkt, MW ± SD angegeben. Die einzelnen statistischen Berechnungen in den verschiedenen Diätgruppen wurden mittels GraphPad Prism5 durchgeführt. Für den statistischen Vergleich von drei oder mehr Untersuchungsgruppen wurde eine one-way ANOVA (analysis of variance) mit anschließendem Dunnett post-hoc Test durchgeführt. Mit diesem Testverfahren wurden alle Experimentalgruppen gegen die Kontrollgruppe (Chow) auf das Vorliegen signifikanter Unterschiede untersucht. Als Signifikanzgrenze wurden eine Irrtumswahrscheinlichkeit von <5% (*p<0,05) bzw. <1% (**p<0,01) und <0,1% (**p<0,001) festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Phänotyp

4.1.1 Körperwachstum und Knochenwachstum

Alle LCHF-Diäten führten zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtkörperlänge. Bei den beiden Experimentalgruppen mit dem höchsten Fettanteil (LC-75 und LC-65) war dies an einer geringeren Länge von BWS und LWS zu erkennen. Auch die Femurlänge, welche als Beispiel für das Wachstum der langen Röhrenknochen gemessen wurde, war in diesen beiden Gruppen signifikant verkürzt. Die Diät, welche im Proteingehalt an die Kontrollgruppe angepasst war (LC-55), zeigte keine signifikanten Veränderungen einzelner Körperabschnitte.

Die Länge des Schädels, inklusive der HWS sowie die Länge der Tibia, wurden ebenso gemessen. Es konnten hier jedoch keine signifikanten Unterschiede zu Chow festgestellt werden.

	Chow	LC-75	LC-65	LC-55
Körperlänge	247 ± 11	236 ± 8 ***	241 ± 9 *	239 ± 9 **
BWS	6,6 ± 1,0	6,1 ± 0,9 ***	6,1 ± 0,9 ***	6,7 ± 0,4
LWS	8,2 ± 0,3	7,9 ± 0,3 ***	8,0 ± 0,3 *	8,3 ± 0,3
Femur	4,0 ± 0,1	3,5 ± 0,1 **	3,4 ± 0,0 **	3,7 ± 0,0

Tab. 4-1 Längenmessung Körperabschnitte in mm

*MW ± SD. Körperlänge von Nasenspitze bis Schwanzansatz, Wirbelsäulenabschnitte und Länge des Femurs nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$*



Abb. 4-1 Körperlänge

Ratten der Experimentalgruppen unter Isoflurannarkose in der dritten Woche. Von Links nach Rechts: Chow, LC-55, LC-75.

Anmerkung: die Aufnahmen wurden in einer vorangegangenen Studie gemacht [125] und dienen der Illustration.

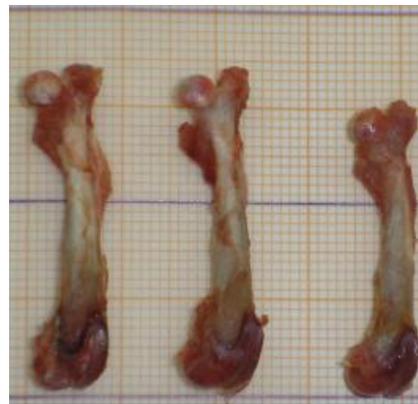


Abb. 4-2 Femurlänge

Femora der Versuchstiere der Experimentalgruppen nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät. Von Links nach Rechts: Chow, LC-55, LC-75.

4.1.2 Körpergewichtsentwicklung

Die isoenergetische Paarfütterung der verschiedenen LCHF-Diäten führte in allen Gruppen zu einer signifikant verringerten KG-Zunahme. Initial (d1-d4) kam es in den Experimentalgruppen zu einem Gewichtsverlust, wohingegen die Kontrollgruppe eine kontinuierliche Gewichtszunahme aufwies. Zur Information sei an dieser Stelle hinzugefügt, dass sich hinsichtlich der KG-Zunahme auch alle Experimentalgruppen untereinander signifikant unterschieden.

Die KG-Zunahme verhielt sich konträr zum Fettanteil in der Nahrung. Je höher der Fettgehalt, desto geringer war die Gewichtszunahme. Dementsprechend unterschied sich LC-75 am stärksten von Chow.

Tag	Chow	LC-75	LC-65	LC-55
1	366,3 ± 13,8	363,2 ± 12,1	362,6 ± 13,7	369,6 ± 9,5
30	421,3 ± 25,7	388,5 ± 19,2 ***	393,2 ± 15,2***	407,4 ± 14,4**

Tab. 4-2 Körpergewicht absolut in Gramm

MW ± SD. Gewogen mit dem ersten Tag der Fütterung und nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

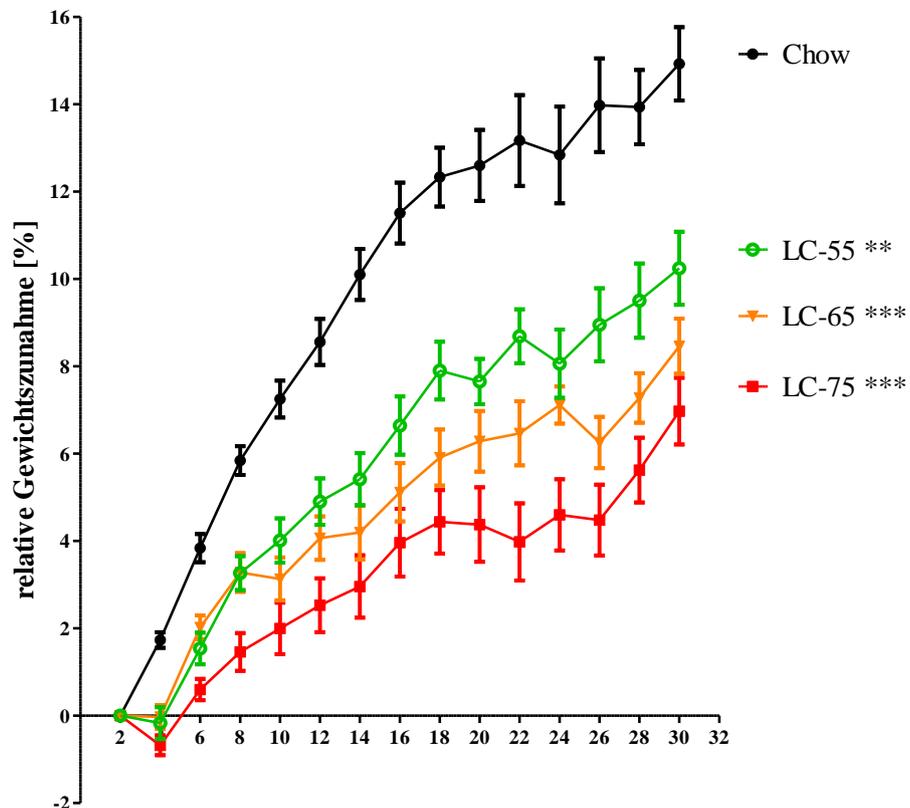


Abb. 4-3 kummulative KG-Zunahme in %, MW \pm SEM

Messung des Körpergewichts jeden zweiten Tag, zu Beginn der Dunkelphase um 10:00Uhr vormittags.

Aufzeichnungszeitraum 30 Tage. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$



Abb. 4-4 Blick auf den eröffneten Situs

Makroskopische Veränderungen nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät mit subjektiv auffälliger intraabdominellen Fettgewebsvermehrung, in der LC-75 rechts im Vergleich zu Chow links.

4.1.3 Kalorienaufnahme / Futterkonsum

Die tägliche Kalorienaufnahme, welche durch Chow vorgegeben wurde, stellte sich relativ konstant dar. Der durchschnittliche Kalorienkonsum war $76,6 \pm 8,2$ kcal. Versuchstiere, welche am Vortag einem gesonderten Experiment ausgesetzt waren, wurden am nächsten Tag aus der Mittelwertberechnung ausgeschlossen, um unphysiologische Schwankungen, welche mit der Versuchsbelastung einhergingen, zu vermeiden.

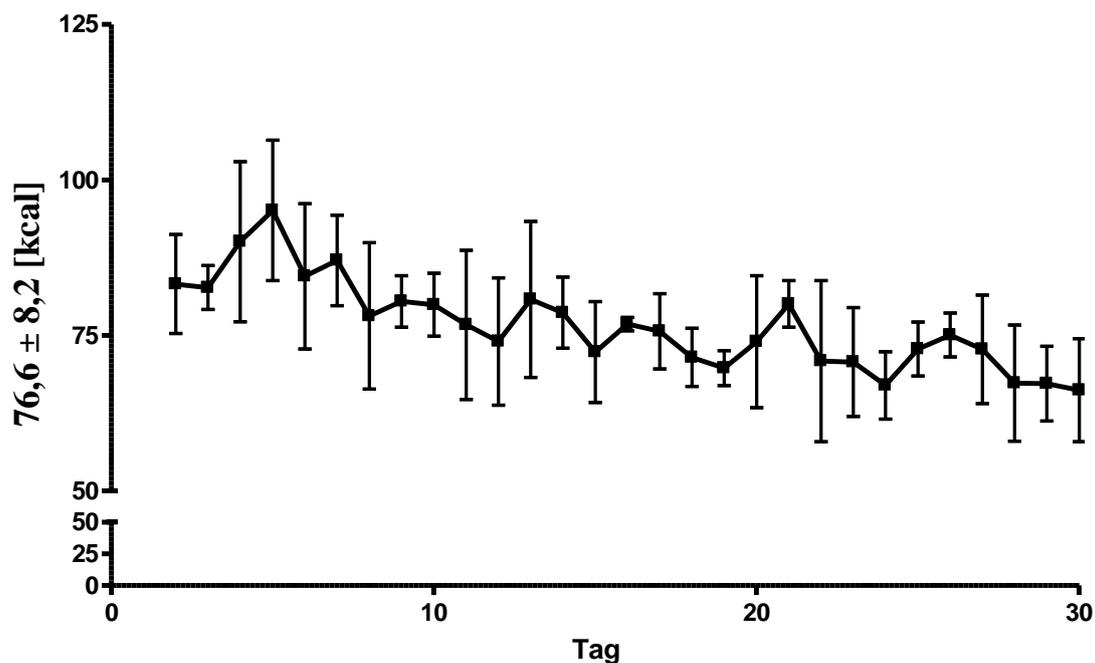


Abb. 4-5 tägliche Kalorienaufnahme der Versuchstiere in kcal

MW \pm SD, über einen Aufzeichnungszeitraum von 30 Tagen. Vorgegeben von der Kontrollgruppe Chow. Messungen durch tägliche Futterkonsumbestimmung dieser Gruppe kurz vor Beginn der Dunkelphase um 10:00 Uhr vormittags. Durchschnittlicher Kalorienbedarf $76,6 \text{ kcal} \pm 8,2 \text{ kcal}$.

4.2 Kalorimetrie

Der Respiratorische Quotient (RQ) war in den Experimentalgruppen, analog der Nahrungszusammensetzung der Diäten, signifikant geringer. Er demonstrierte deutlich das hauptsächlich verstoffwechselte Substrat gemäß stöchiometrischer Vorgaben. Der Energieverbrauch (EE) der verschiedenen Gruppen unterscheidet sich nicht signifikant.

	Chow	LC-75	LC-65	LC-55
Respiratorischer Quotient				
Total	0,96 ± 0,041	0,716 ± 0,04 8***	0,726 ± 0,027 ***	0,724 ± 0,019 ***
Energieverbrauch				
Aktiv	7,1 ± 1,361	5,9 ± 1,503	6,3 ± 1,590	7,3 ± 0,400
Inaktiv	5,9 ± 1,315	5,1 ± 1,300	4,9 ± 1,157	6,0 ± 0,288
Total	7,0 ± 0,439	6,7 ± 0,353	6,6 ± 0,247	6,7 ± 0,336

Tab. 4-3 Indirekte Kalorimetrie: RQ und EE in kcal/h/kgKG

Ergebnisse nach 24h in der indirekten Kalorimetrieanlage. Der Energieverbrauch (EE) bei körperlicher Aktivität (aktiv) und in Ruhe (inaktiv) wird errechnet durch Multiplikation der O₂-Aufnahme mit dem kalorischen Äquivalent der Nahrung. *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05

4.3 Körperzusammensetzung und Organgewichte

4.3.1 Haut und LBM

Die gewogenen Gewichte der Haut - inklusive des anhängenden Fells und des subkutanen Fettgewebes - waren in allen Gruppen signifikant geringer als in Chow. Dies galt sowohl für die relativen als auch für die absoluten Gewichte.

Auch die Gewichte der fettfreien Körpermasse (LBM), das heißt, des Stütz- und Bewegungsapparates (ohne Kopf und ohne innere Organe) waren in allen Gruppen signifikant geringer als in Chow. Dies galt sowohl für die relativen als auch für die absoluten Gewichte. Die durchschnittliche Differenz von Chow zu den verschiedenen Diäten betrug bei LC-75: 17,92g, bei LC-65: 14,18g und bei LC-55: 11,49g.

Haut	Chow	LC-75	LC-65	LC-55
absolut	76,8 ± 7,1	63,1 ± 6,0***	68,0 ± 6,4***	68,6 ± 5,6**
relativ	100,2 ± 5,5	91,8 ± 5,0***	96,5 ± 4,7*	93,0 ± 4,8***

Tab. 4-4 Gewicht der Haut, absolute und relative Werte (relativ zum KG)

MW ± SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät. *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05

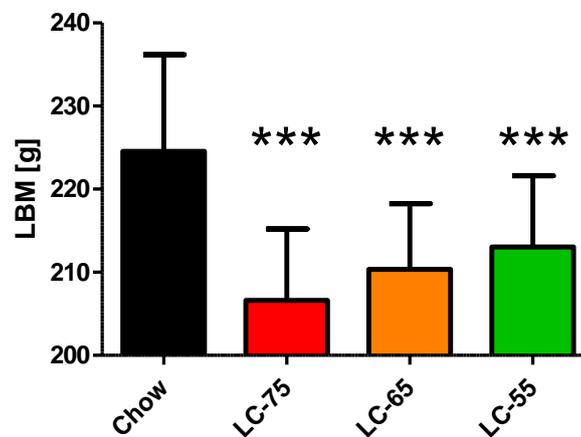


Abb. 4-6 Fettfreie Körpermasse (LBM), absolute Werte in g

Chow: $224,5 \pm 11,7$; LC-75: $206,6 \pm 8,6$; LC-65: $210,4 \pm 7,9$; LC-55: $213,0 \pm 8,6$

MW \pm SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

4.3.2 Gewichte der einzelnen Fettdepots

Die Gewichte der Fettdepots der Tiere, welche mit den LCHF-Diäten gefüttert wurden, entwickelten sich anders als die der Haut und der sogenannten LBM. So waren im Gegensatz zu den davor genannten sowohl die Gewichte des epididymalen als auch die des perirenal Fettgewebes aller Experimentalgruppen signifikant zu Chow erhöht.

Das relative Gewicht des epididymalen Fettgewebes unterschied sich in allen Gruppen signifikant (LC-75: $127,3 \pm 17,4$ / LC-65: $124,4 \pm 17,1$ / LC-55: $107,8 \pm 14,3$) von Chow ($100 \pm 17,8$).

Das relative Gewicht des perirenal Fettgewebes unterschied sich ebenso in allen Gruppen (LC-75: $142,5 \pm 35,8$ / LC-65: $136,9 \pm 25,9$ / LC-55: $119,7 \pm 29,0$) signifikant von Chow ($100 \pm 17,8$).

Das inguinale Fettgewebe war in LC-75 ($118,2 \pm 20,8$) und LC-65 ($116,4 \pm 21,6$) signifikant höher. LC-55 ($85,7 \pm 15,4$) war verglichen mit Chow ($100 \pm 16,0$) nicht signifikant verändert.

Das zur Thermogenese fähige braune Fettgewebe war nur in der LC-75 ($132,9 \pm 34,4$) signifikant höher als Chow ($100 \pm 9,4$). LC-65 ($101,5 \pm 34,4$) und LC-55 ($89,5 \pm 16,6$) wiesen keinen signifikanten Unterschied auf.

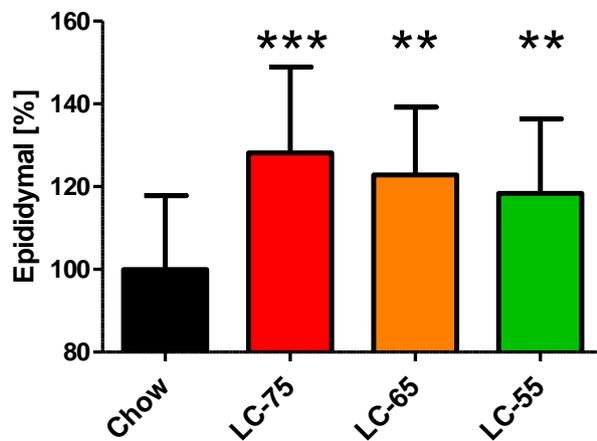


Abb. 4-7 epididymales Fettgewebe, relativ zum KG

einseitig gewogen. MW \pm SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

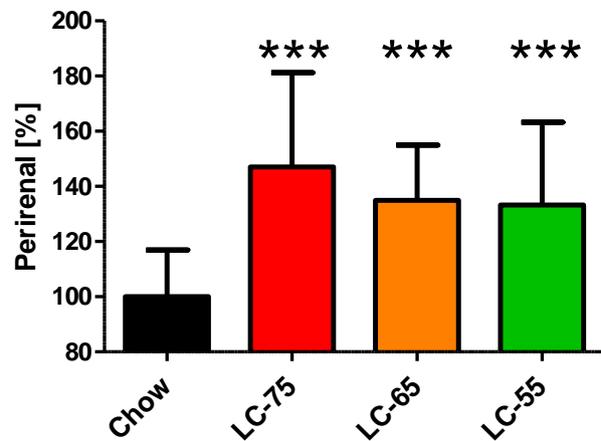


Abb. 4-8 perirenales Fettgewebe, relativ zum KG

einseitig gewogen. MW \pm SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

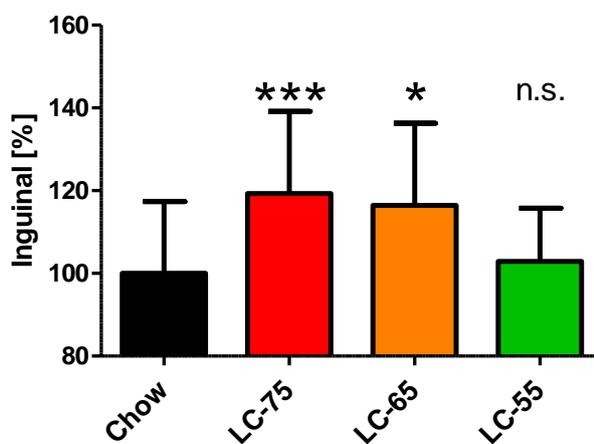


Abb. 4-9 inguinales Fettgewebe, relativ zum KG

einseitig gewogen. MW \pm SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

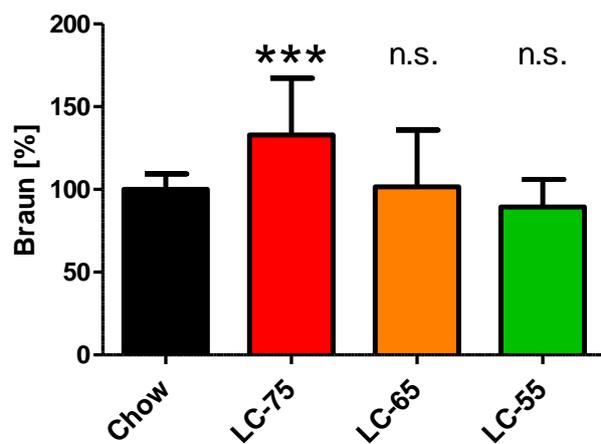


Abb. 4-10 braunes Fettgewebe, relativ zum KG

interscapulär gewonnen. MW \pm SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

4.3.3 Struktur des perirenal Fettgewebes

Wie in Abb. 4-8 gezeigt war das relativ zum Körpergewicht gemessene perirenale Fettgewebe in allen Experimentalgruppen signifikant höher als Chow. Darüber hinaus machte es in der Hämatoxylin - Eosin - Färbung der Paraffinschnitte des perirenal Fettgewebes den Anschein, als seien die Adipozyten der Experimentalgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe Chow vergrößert.

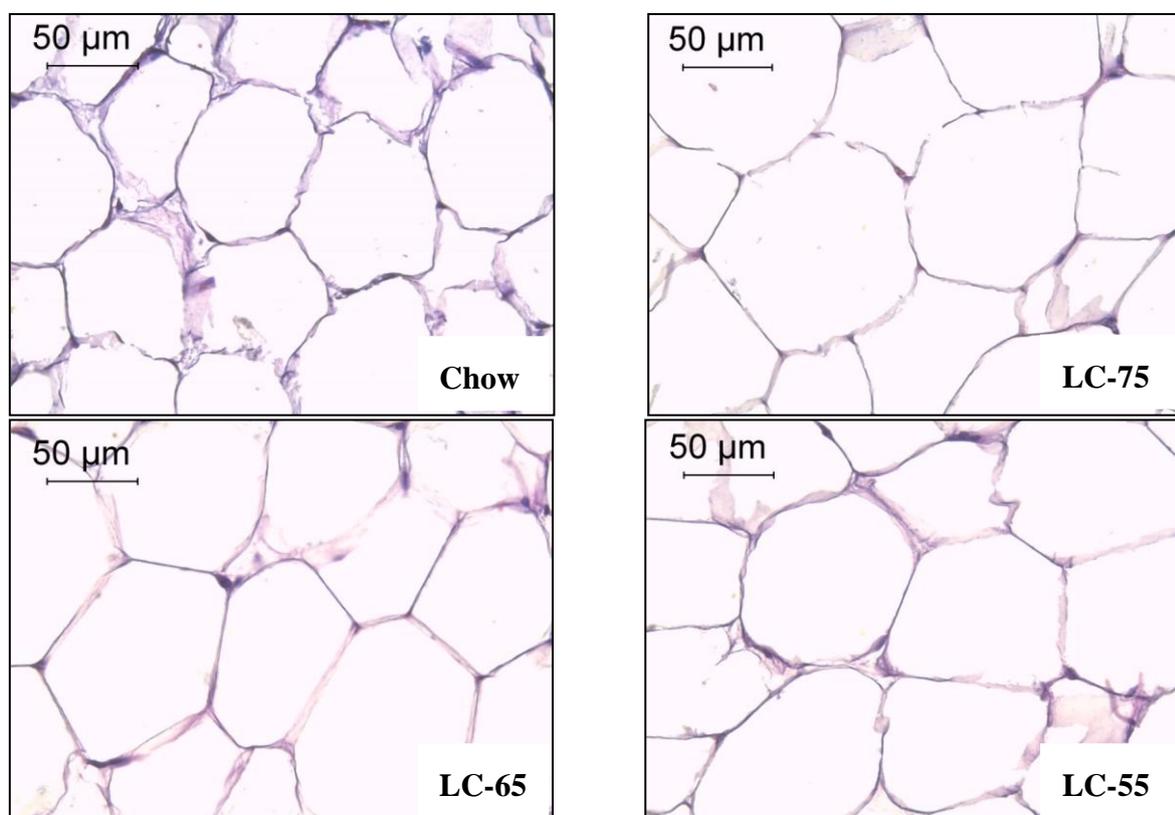


Abb. 4-11 Paraffinschnitte perirenales Fettgewebe, HE Färbung, 40fache Vergrößerung

Nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät erscheinen die interzellulären Räume der Adipozyten der Experimentalgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe vergrößert.

4.3.4 Organgewichte

Die Organgewichte wurden durch die Experimentaldiäten unterschiedlich beeinflusst. Es lässt sich hier kein einheitliches Bild erkennen.

Das relativ zum KG bestimmte Gewicht des Gehirns aller Experimentalgruppen und das von Leber und Herz der LC-75 und LC-65 waren signifikant höher als in Chow. Das absolute Gewicht von Milz und Niere hingegen war in den Gruppen LC-75 und LC-65 signifikant geringer als in Chow.

Organ	Chow	LC-75	LC-65	LC-55
Leber	12,5 ± 1,5	12,1 ± 0,9	12,3 ± 0,9	12,9 ± 1,1
	100,6 ± 6,5	107,2 ± 6,0**	108,5 ± 6,3**	105,8 ± 9,1
Milz	0,745 ± 0,089	0,637 ± 0,061***	0,677 ± 0,099*	0,700 ± 0,048
	98,8 ± 9,7	92,5 ± 9,3	95,7 ± 11,0	96,5 ± 5,8
Niere	1,308 ± 0,117	1,180 ± 0,084***	1,209 ± 0,092**	1,273 ± 0,047
	98,1 ± 8,8	94,9 ± 6,2	94,5 ± 9,2	101,4 ± 4,3
Pankreas	0,776 ± 0,118	0,725 ± 0,103	0,720 ± 0,086	0,790 ± 0,088
	100,0 ± 11,4	102,8 ± 15,6	101,7 ± 9,6	101,9 ± 13,2
Herz	1,224 ± 0,134	1,230 ± 0,087	1,186 ± 0,060	1,168 ± 0,070
	100,0 ± 7,4	110,0 ± 7,0***	105,5 ± 4,8*	96,9 ± 6,4
Gehirn	1,775 ± 0,071	1,793 ± 0,061	1,835 ± 0,070	1,812 ± 0,100
	100,0 ± 6,9	107,7 ± 2,9**	109,2 ± 3,4**	108,4 ± 6,4***

Tab. 4-5 Organgewichte, absolute Werte in g und relative Werte normalisiert auf das KG

MW ± SD nach 30d auf der entsprechenden Diät. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

4.4 GH / IGF-I System

4.4.1 GH / IGF-I

Der mediane GH-Spiegel im Serum, welcher unten durch einen „rank plot“ im Sinne einer Häufigkeitsverteilungsanalyse dargestellt wurde, wurde durch multiple Blutentnahmen in der LC-75 und der LC-55 bestimmt.

Die medianen GH-Werte waren in der zu Chow proteingematchten LC-55 signifikant höher als in der Kontrollgruppe, wohingegen die medianen GH-Werte in der LC-75 nicht signifikant verändert waren.

In allen Experimentalgruppen fand sich signifikant weniger IGF-I im Serum.

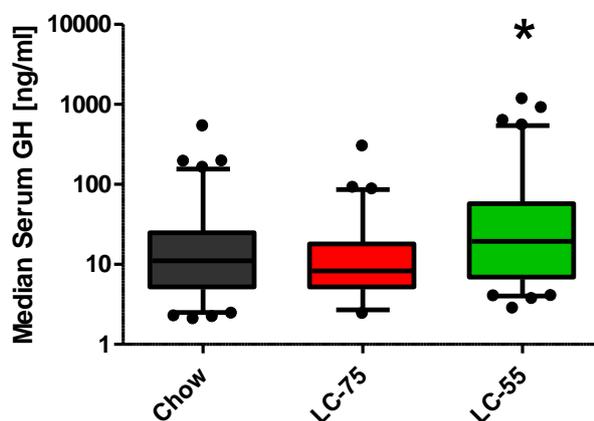


Abb. 4-12 pulsatile GH-Sekretion in ng/ml

Mediane und Range 2,5% – 97,5% nach 2 Wochen auf der entsprechenden Diät.

Halbstündige Messung über einen Zeitraum von 5h

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

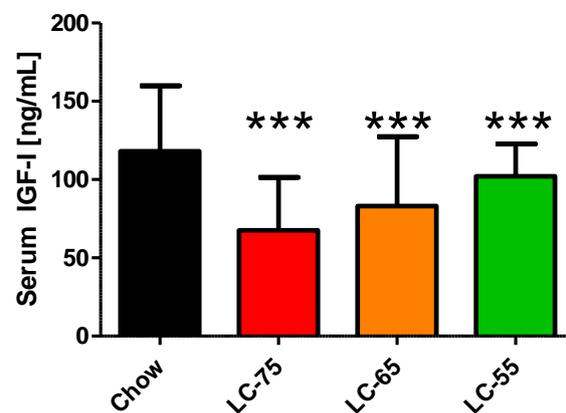


Abb. 4-13 IGF-I in ng/ml

MW \pm SD, nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

4.4.2 Regulierende Serum Parameter

In der ketogenen LC-75 waren gesamt Ghrelin und die FFA signifikant höher, wohingegen Blutglukose und Insulin signifikant geringer waren. Die Blutglukose war auch in allen anderen Experimentalgruppen signifikant niedriger als in Chow.

Leptin war in der proteingematchten LC-55 und der LC-75 signifikant höher.

IGFBP-3 verhielt sich analog zu IGF-I und war in der LC-75 und der LC-55 signifikant reduziert.

Leptin, acyliertes Ghrelin und IGFBP-3 wurden nur in der Kontrollgruppe, LC-75 und LC-55 bestimmt, nicht aber in LC-65.

Hormon	Chow	LC-75	LC-65	LC-55
Leptin [pg/ml]	683,5 ± 315,4	1610,0* ± 1730,3	n.d.	1764,2** ± 1242,2
Ghrelin total [ng/ml]	2,169 ± 0,407	2,622* ± 0,500	2,112 ± 0,553	2,218 ± 0,365
Ghrelin acyliert [ng/ml]	131,9 ± 78,2	128,4 ± 96,1	n.d.	126,6 ± 83,5
FFA [mM]	0,406 ± 0,124	0,548* ± 0,355	0,288 ± 0,096	0,386 ± 0,205
Glukose [mg/ml]	98,0 ± 7,8	85,2*** ± 6,8	89,6** ± 7,7	95,0* ± 4,3
Insulin [ng/ml]	0,686 ± 0,281	0,388*** ± 0,204	0,548 ± 0,261	0,533 ± 0,158
IGFBP-3 [ng/ml]	332,1 ± 57,48	213,6*** ± 33,96	n.d.	280,6* ± 33,96

Tab. 4-6 Regulierende Serumparameter der GH-IGF-I Achse.

MW ± SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät. n.d. = nicht detektiert.

*** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

4.4.3 Expression des Wachstumshormonrezeptors

Die Expression des GHR war in der Leber aller Experimentalgruppen signifikant niedriger (Abb. 4-14). Als Beispiel für die muskuläre Rezeptorexpression wurde das Gewebe des M. quadriceps femoris untersucht. Hier fand sich keine signifikante Veränderung der GHR Expression. Auch im perirenenalen und epididymalen Fettgewebe fand sich, mit Ausnahme einer signifikant größere GHR Expression im perirenenalen Fettgewebe der LC-65, keine weitere signifikante Veränderung der GHR Expression.

Gewebe	Chow	LC-75	LC-65	LC-55
Leber	100,0 ± 38,4	66,3 ± 13,0*	64,4 ± 18,9**	47,6 ± 19,0***
Muskel	100,0 ± 12,3	101,3 ± 12,6	112,0 ± 34,1	90,0 ± 21,5
Epididymal	100,0 ± 19,7	114,5 ± 20,3	141,1 ± 38,2	96,8 ± 10,1
Perirenal	100,0 ± 60,7	127,7 ± 51,8	205,0 ± 106,4*	168,1 ± 62,3

Tab. 4-7 Expression des GHR in verschiedenen peripheren Geweben

... normalisiert auf die Expression des Housekeeping Gens 18s RNA, relativ zu Chow. Die Expression der Kontrollgruppe wurde je auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte wurden als relative Werte dazu dargestellt. MW ± SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

4.4.4 Genexpression von IGF-I im peripheren Gewebe

Die Expression von IGF-I war in der Leber aller Experimentalgruppen signifikant niedriger (Abb. 4-15). Die Expression von IGF-I im Muskelgewebe wies keine Veränderungen auf. Während das epididymale Fettgewebe der LC-75 und LC-65 eine signifikant höhere IGF-I Expression aufwies als die Kontrollgruppe, war im perirenenalen Fettgewebe nur die IGF-I Expression der LC-65 signifikant höher.

Gewebe	Chow	LC-75	LC-65	LC-55
Leber	100,0 ± 29,1	73,7 ± 23,4*	70,6 ± 24,0**	63,2 ± 21,1**
Muskel	100,0 ± 39,1	114,1 ± 63,9	390,8 ± 120,0	148,6 ± 90,0
Epididymal	100,0 ± 22,9	114,3 ± 24,6*	206,5 ± 47,1***	134,9 ± 28,3
Perirenal	100,0 ± 18,4	70,5 ± 21,1	99,2 ± 52,0*	68,4 ± 27,3

Tab. 4-8 Expression des IGF-I in verschiedenen peripheren Geweben,

... normalisiert auf die Expression des Housekeeping Gens 18sRNA, relativ zu Chow. Die Expression der Kontrollgruppe wurde je auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte wurden als relative Werte dazu dargestellt. MW ± SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

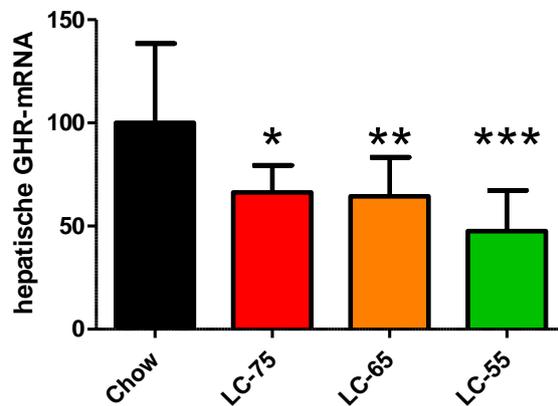


Abb. 4-14 hepatische GHR-mRNA Expression

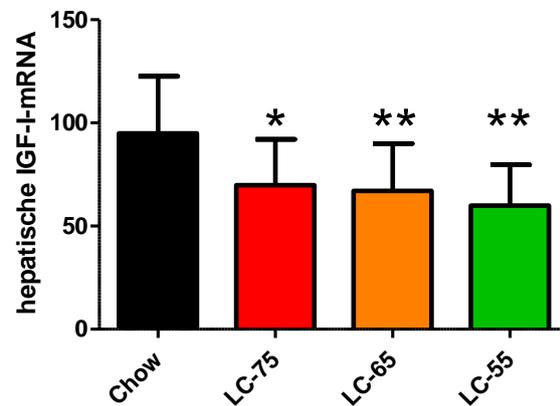


Abb. 4-15 hepatische IGF-I-mRNA Expression

... normalisiert auf die Expression des Housekeeping Gens 18sRNA, relativ zu Chow. Die Expression der Kontrollgruppe wurde je auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte wurden als relative Werte dazu dargestellt. MW \pm SD nach 30 Tagen. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

4.4.5 Zentrale Regulation

Im Rahmen der Analyse der zentralen Regulation der GH / IGF-I Achse zeigte sich eine signifikant erhöhte GH Expression der proteingematchten LC-55 bei signifikant erniedrigter SRIF Expression im Hypothalamus. In der LC-75 wurde eine signifikant höhere GHR Expression detektiert. GHRH, GHRHR sowie die beiden Somatostatinrezeptoren (SST) 2 und 5 wiesen in ihrer mRNA Expression keine signifikanten Unterschiede zu Chow auf.

	Chow	LC-75	LC-65	LC-55
GH	100,0 \pm 42,2	90,5 \pm 45,2	107,3 \pm 78,8	179,1 \pm 60,7***
GHR	100,0 \pm 33,7	168,8 \pm 65,3*	127,4 \pm 52,2	148,1 \pm 50,0
GHRH	100,0 \pm 80,1	115,8 \pm 68,0	130,7 \pm 100,8	92,5 \pm 71,4
GHRHR	100,0 \pm 38,3	101,3 \pm 31,3	86,4 \pm 46,9	122,7 \pm 52,5
SRIF	100,0 \pm 54,6	115,1 \pm 86,5	125,3 \pm 109,5	50,9 \pm 32,6*
SST2	100,0 \pm 46,7	130,3 \pm 52,8	88,7 \pm 48,0	106,8 \pm 40,0
SST5	100,0 \pm 35,4	93,1 \pm 66,3	79,5 \pm 44,2	110,2 \pm 58,8

Tab. 4-9 Zentrale Regulation der GH-IGF-Achse

Hypothalamisch-hypophysäre Genexpression normalisiert auf die Expression des Housekeeping Gens 18s RNA, relativ zu Chow. Die Expression der Kontrollgruppe wurde je auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte wurden als relative Werte dazu dargestellt. MW \pm SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

4.5 Fettgewebsinflammation

Im epididymalen und perirenen Fettgewebe gemessene Parameter, welche auf eine Fettgewebsinflammation hinweisen, waren nicht einheitlich verändert. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte HIF-1 α Expression im epididymalen Fettgewebe der LC-65 und eine signifikant geringere IL-1 β Expression im perirenen Fettgewebe der LC-55, der Gruppe mit dem geringsten Fettanteil und dem zu Chow gematchten Proteingehalt.

	Chow	LC-75	LC-65	LC-55	
HIF-1α	a	100,0 \pm 35,7	138,8 \pm 37,4	171,7 \pm 92,4*	52,4 \pm 13,7
	b	100,0 \pm 63,2	71,4 \pm 15,2	103,8 \pm 68,5	56,7 \pm 22,7
TNF-α	a	100,0 \pm 29,8	122,6 \pm 67,9	131,6 \pm 73,7	121,1 \pm 43,9
	b	100,0 \pm 59,3	81,3 \pm 95,2	79,9 \pm 43,0	94,5 \pm 81,0
IL-1β	a	100,0 \pm 26,8	79,7 \pm 18,7	225,0 \pm 219,4	186,5 \pm 70,6
	b	100,0 \pm 45,8	75,0 \pm 31,0	100,3 \pm 55,5	73,2 \pm 102,3***

Tab. 4-10 Expression diverser Inflammationsparameter im a) epididymalen und b) perirenen Fettgewebe

... normalisiert auf die Expression des Housekeeping Gens 18s RNA, relativ zu Chow. Die Expression der Kontrollgruppe wurde je auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte wurden als relative Werte dazu dargestellt. MW \pm SD nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

Auch die immunhistochemische (IHC) Färbung der Makrophagen des perirenen weißen Fettgewebes, anhand einer Markierung über Galectin-3 (H-160), wies nicht auf eine Fettgewebsinflammation hin. Als Positivkontrolle diente eine ad libitum (AL) gefütterte Gewebeprobe. In dieser erkannte man eine Makrophageneinwanderung (\uparrow).

Das perirene Fettgewebe der Kontrollgruppe Chow und der Experimentaldiäten LC-75 und LC-55 wies scheinbar keine Veränderung hinsichtlich dieses Entzündungszeichens auf.

Auffällig sind auch in dieser Färbung die vergrößert erscheinenden Adipozyten. Zum Vergleich sei hier auf die HE-Färbung des perirenen Fettgewebes (Abb. 4.3.2) hingewiesen.

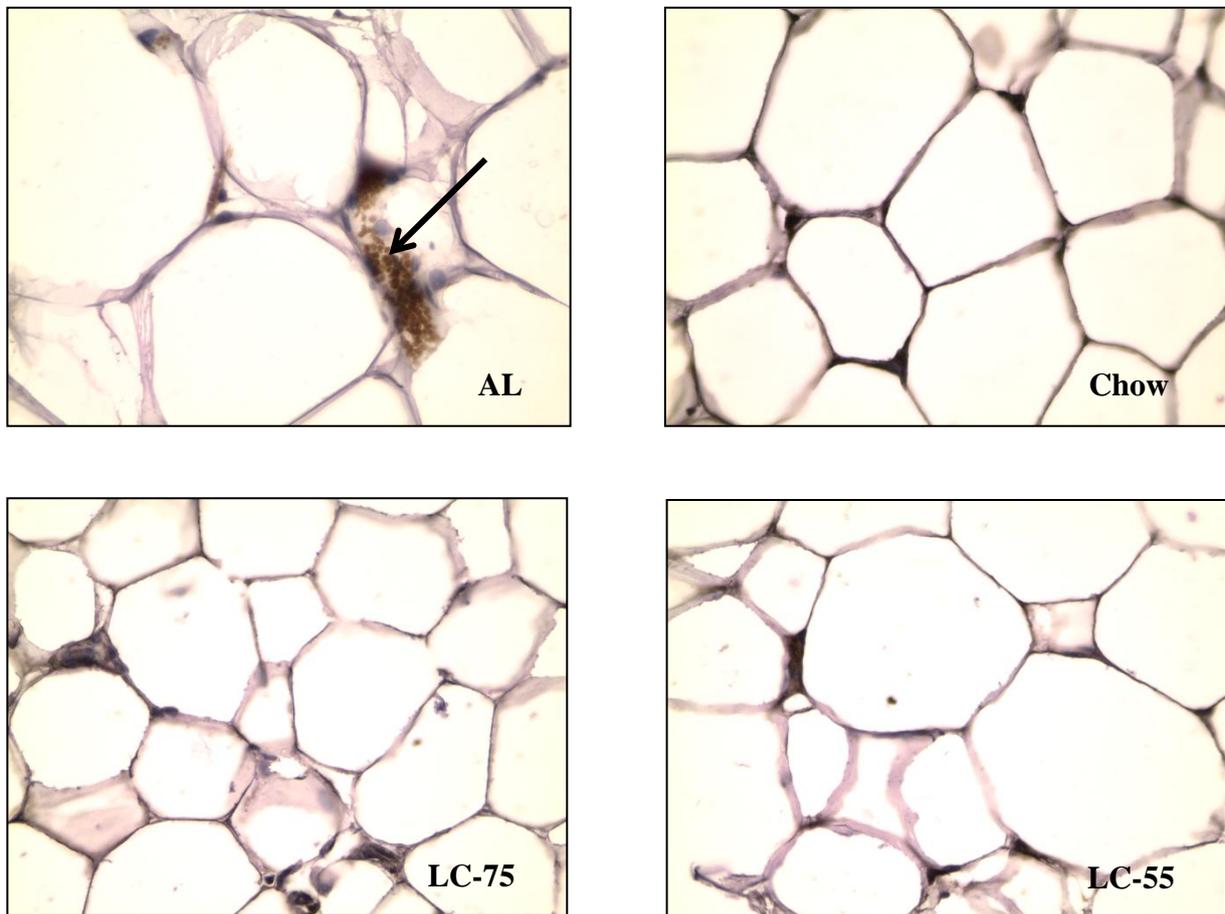


Abb. 4-16 Immunhistochemische Färbung auf Makrophagen als Indikator einer Fettgewebsinflammation

... nach 30 Tagen auf der entsprechenden Diät. Die AL (ad libitum) gefütterten Versuchsgruppe diente als Positivkontrolle. Bei AL war deutlich eine Makrophagenansammlung zu erkennen. Diese wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet (↑). Die Tiere der Kontrollgruppe Chow und die Tiere der Experimentalgruppen LC-75 und LC-55 wiesen keine Makrophageneinwanderung auf.

5 Diskussion und Schlussfolgerung

5.1 Allgemeine Versuchsbedingungen

5.1.1 Rahmenbedingungen

Das in dieser Studie gewählte Tiermodell der Ratte ermöglichte eine haltungstechnisch gute Standardisierung [114]. Die Handhabung dieser Tiere, v.a. bei multiplen Blutentnahmen, erwies sich als praktikabel [115]. Im Gegensatz zum Menschen ist das Tiermodell durch äußere Störfaktoren geringer beeinträchtigt und eine mangelnde Compliance ist nicht zu erwarten. Durch den ernährungsphysiologisch dem Menschen ähnlichen Organismus und das Essverhalten sowie die ähnliche Anatomie ist die Ratte ein geeignetes Tiermodell.

Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass es auch im Rahmen von Diäten zu geschlechtsspezifische Reaktionen kommt [127, 128]. Auch verschiedene Effekte des GH / IGF-I Systems auf die Genexpression sind bekannterweise geschlechtsspezifisch [129]. Daher verwendeten wir ausschließlich männliche Ratten als Versuchstiere. So sollten einerseits möglichst standardisierte Ergebnisse erhalten werden und andererseits eventuelle zyklusabhängige hormonelle Schwankungen sowie der Einfluss von Östrogen verhindert werden. Um zu analysieren, welche unserer Ergebnisse geschlechtsunabhängig sind, wäre es nötig, diese Studie mit weiblichen Ratten zu wiederholen.

Die Aktivität des GH / IGF-I Systems ist altersabhängig und die Sekretion von GH und IGF-I sinkt im Rattenmodell mit steigendem Alter [130] [131]. Darüber hinaus ist bei der Ratte mit zunehmendem Lebensalter ein Gewichtsverlust zu beobachten [132]. Auch die Körperzusammensetzung verändert sich physiologischerweise im Alter [132]. Aus diesen Gründen wurden für diese Studie Ratten im Alter von zwölf Wochen und damit im jungen Erwachsenenalter gewählt. Es ist aber daher keine Aussage möglich, inwiefern sich unsere Ergebnisse auch in jüngeren und älteren Tieren reproduzieren lassen. Ergebnissen einer vorausgegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe an jüngeren Ratten zufolge sind allerdings mit geringerem Alter stärkere Effekte zu erwarten, v.a. hinsichtlich der Auswirkungen solcher Diäten auf die Gesamtkörperlänge und die Knochendichte [133].

Durch transportbedingten Stress wurde bei Versuchstieren ein Anstieg an Corticosteroiden beobachtet, welcher von einem Abfall der Vitalparameter wie Blutdruck und Herzfrequenz sowie der körperlichen Aktivität begleitet wurde [134]. Der Abfall von Blutdruck und Herzfrequenz war in der zitierten Studie als dauerhaft und nach vier Tagen stabil angegeben. Auch eine geringere Gewichtszunahme bis hin zu einem Gewichtsverlust wurde hierbei beobachtet, dies habe sich aber innerhalb einer Woche normalisiert [134]. Um solchen stressbedingten Veränderungen entgegenzuwirken, durchliefen die Ratten unserer Studie vor Versuchsbeginn eine zehntägige Anpassungsphase. Während dieser Akklimatisationszeit konnten sich die Versuchstiere an ihr neues Umfeld sowie die dortigen Haltungsbedingungen anpassen. Auch konnte während dieser Zeit der Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere umgekehrt werden. Dies hatte den Zweck die Arbeiten, in der bei der Ratte aktiven Dunkelphase, zu vereinfachen. Durch eine Umkehr der Lichtverhältnisse kommt es auch zu einer Verschiebung der Aktivitätsphase und einer Reorganisation des biologischen Rhythmus der Ratte [135].

Nach dem oben genannten Anpassungszeitraum von zehn Tagen wurden die Tiere gewogen und in Gruppen mit vergleichbarem Mittelwert der Gewichte aufgeteilt.

Insgesamt wurden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fütterungsstudien auf drei aufeinanderfolgende Versuchsreihen aufgeteilt. Dies war aufgrund einer Diskrepanz zwischen notwendiger Tierzahl und maximaler Belegung des Tierraumes erforderlich. Die Gewichte der einzelnen Experimentalgruppen unterschieden sich in den verschiedenen Versuchsreihen nur geringfügig, aber nicht signifikant (Tab. 3-1). Eine Kontrollgruppe (Chow) wurde in jeder dieser Versuchsreihen mitgeführt, wodurch eventuelle Unterschiede zu der Kontrollgruppe der anderen Versuchsreihen weiter relativiert wurden. Vergleicht man die drei verschiedenen Versuchsreihen hinsichtlich der täglichen durch Chow vorgegebenen Kalorienaufnahme untereinander, so stellt sich diese relativ konstant dar (Abb.: 4-5). Es kam nicht zu einem signifikant unterschiedlichen Futterkonsum. Demnach ist bei einer daraus resultierenden großen Kontrollgruppe diesbezüglich nicht von einer Ergebnisbeeinflussung auszugehen.

In einer Veröffentlichung am Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass hypothalamische Neuropeptide einem gewissen saisonalen Rhythmus unterliegen. Diese Feststellung war dabei unabhängig von der Stabilität der Haltungsbedingungen [136]. Auch wenn die Versuchsreihen

unmittelbar nacheinander durchgeführt wurden, könnte dies die Ergebnisse beeinflussen. Wesentlich ist, dass in der oben zitierten Arbeit die hypothalamische Somatostatin Expression keine signifikanten Veränderungen aufwies [136].

Unter den Haltungsbedingungen stellt sich v.a. die Temperatur in allen drei Versuchsreihen relativ konstant dar. Schwankungen der Luftfeuchtigkeit sind u.a. mit der Tierhaltung (feuchte Stallreinigung), welche jeden zweiten Tag durchgeführt wurde, zu begründen.

5.1.2 Lebendgewichtsbestimmung

Die Tiere wurden jeden zweiten Tag um 10:00 Uhr vormittags zu Beginn der Aktivitätsphase gewogen. Um diese Uhrzeit endete die Inaktivitätsphase der Versuchstiere und es war damit zu rechnen, dass der Futterkonsum vom Vortag bereits abgeschlossen war und es sich um eine annähernde Nüchterngewichtsbestimmung handelte. Durch Letzteres sind die Ergebnisse vergleichbar mit der letztmaligen Gewichtsbestimmung vor Dekapitation nach sechsstündiger Fastenzeit. Aufgrund der guten Anpassungsfähigkeit der Ratte [115] kann von einer Gewöhnung an diese Prozedur ausgegangen werden. Demnach kann mit einer reduzierten Stressbelastung, mit entsprechend unterbliebenen hormonellen Stressreaktionen, gerechnet werden.

Durch das Verwenden einer Analysenwaage mit dynamischer Wägefunktion wurden Verfälschungen durch Bewegungen der Versuchstiere während des Wiegens reduziert.

5.1.3 Futter und Fütterung

Die von uns verwendete Kontrolldiät ähnelte in ihrer Zusammensetzung der Standarddiät wie sie vom „American Institute of Nutrition“ verwendet wird [137]. Um Mangelerscheinungen zu verhindern, wurden die Experimentalgruppen (LC-75, LC-65, LC-55) mit Mineralstoffen und Vitaminen angereichert und auf Kalorien bezogen standardisiert. Der Gehalt an Mikronährstoffen richtete sich dabei ebenfalls nach der oben genannten Referenzdiät [137]. Darüber hinaus erfolgte eine unabhängige Kontrolle der Diäten durch die „Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt“ in Kiel.

Bei Fütterungsstudien eingesetzte ketogene Diäten weisen in der Regel einen hohen Anteil an Fett bei geringen Kohlenhydratanteil und niedrigen Proteinanteil auf [138, 139]. Als

problematisch erweist sich anschließend die Ergebnisinterpretation, wobei es hier zu differenzieren gilt, inwiefern ein Mangel an Kohlenhydraten oder ein Mangel an Proteinen ursächlich für die beobachteten Effekte war. Von Bedeutung hierbei ist v.a. bei Ersteren eine möglicherweise durch Kohlenhydratmangel induzierte Ketose [140]. Um also schließlich den Mangel an Kohlenhydraten in Kombination mit einem Überangebot an Fett als ursächlich zu postulieren, ist es von besonderem Interesse ausreichend Proteingehalt in ketogenen Diäten zu gewährleisten.

Die in dieser Studie eingesetzten LCHF-Diäten (Tab.: 3-2) unterschieden sich nur in der relativen Häufigkeit von Protein und Fett. Der Anteil an Kohlenhydraten (LC-75: 1,7% ME; LC-65: 1,9% ME; LC-55: 2,2% ME) war annähernd gleich.

Eine annähernde Übereinstimmung des Anteils an Protein in der Nahrung der LC-55 (19,1 % ME) und der Kontrollgruppe Chow (19,0 % ME) ist für die spätere Ergebnisinterpretation von Bedeutung. Ein weiterer wesentlicher Punkt bei der Zusammensetzung der Diäten ist der insuffiziente Anteil an Protein in der LC-75 (5,5 % ME) (National Research Council. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. Washington, D C: The National Academic Press, 1995). Des Weiteren sei vermerkt, dass die LC-75 als einzige Diätgruppe ketogen war [141]. Es ist also nicht sicher auszuschließen, dass Veränderungen in dieser Gruppe u.a. auf Proteinmangel und / oder eine Ketose zurückzuführen sind. Die wesentlichen Ergebnisse der Gruppe LC-75 waren mit der LC-65 (ausreichender Proteingehalt) zu reproduzieren. Somit ist dieser Ergebnisteil nicht allein durch einen reinen Proteinmangel und / oder eine Ketose zu erklären. Darüber hinaus wurde noch eine sogenannte LC-70 (ausreichend Proteingehalt) gefüttert, wobei sich auch hier die gezeigten Ergebnisse reproduzieren ließen (die Daten hierzu wurden nicht gezeigt).

Um die Auswirkungen dieser Studie auf die Ernährungszusammensetzung und nicht auf eine unterschiedliche Kalorienaufnahme zurückführen zu können, wurde eine isokalorische Fütterungsform gewählt und das Regime der sogenannten Paarfütterung angewendet.

Um auszuschließen, dass die angewendete Paarfütterung selbst Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung hat, wurde eine kleine Gruppe von Tieren (n=3) mit der Kontrolldiät

paargefüttert. Hierbei konnten wir keine Veränderungen feststellen (die Daten hierzu wurden nicht gezeigt). Tiere der Kontrollgruppe, welche am Vortag einem gesonderten Experiment ausgesetzt waren, wurden am Folgetag aus der Mittelwert-Berechnung zur Futterkonsumbestimmung ausgeschlossen. So konnten unphysiologische, versuchsbedingte Schwankungen reduziert werden.

Des Weiteren wurden nach zwei verschiedenen Fütterungsregimen (Ad Libitum und Paarfütterung), sogenannte „Western Style Diäten“ an einige Versuchstiere verfüttert. „Western Style Diäten“ sind gekennzeichnet durch einen hohen Anteil an Zucker, Salz, Fett und v.a. Proteinen [142]. Dies diente als interne Kontrolle der gewonnenen Ergebnisse, um sicherzustellen, dass es sich bei den gewonnenen Erkenntnissen um Auswirkungen der makronutrienten Zusammensetzung, v.a. den geringen Anteil an Kohlenhydraten, handelt (die Daten hierzu wurden nicht gezeigt).

Ein wesentlicher Aspekt im Hinblick auf weitere Studien sollte sein, dass sich die in dieser Arbeit verwendeten Diäten aus einer einheitlichen Nährstoffquelle zusammensetzen. Die Proteinquelle der Kontrollgruppe und der verschiedenen LCHF-Diäten war Natriumcaseinat. Als Kohlenhydratquelle diente Stärke. Die Fettquelle in der Kontrollgruppe bestand zu 50% aus Rindertalg und zu 50% aus Sojaöl. Zum Vergleich bestand die verwendete Fettquelle in den verschiedenen Experimentaldiäten ausschließlich aus Rindertalg.

In bereits veröffentlichten Studien wird von unterschiedlichen Serumkonzentrationen, u.a. von GH, bei verschiedenen Nahrungsenergiequellen aus Fett und Kohlenhydraten berichtet [143]. Das von uns eingesetzte einheitliche Futterdesign ermöglichte es die beobachteten Effekte auf die spezifische Nahrungszusammensetzung und die dabei verwendete Quelle an Fettsäuren und Aminosäuren zurückzuführen. Es gilt in nachfolgenden Arbeiten herauszufinden, inwieweit sich andere Protein- und Fettquellen auf die Ergebnisse auswirken würden.

5.1.4 Probenanalyse

Bereits in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass verschiedene Messparameter der GH / IGF-I Achse im Rattenmodell durch gewisse präanalytische Methoden beeinflusst werden [144]. Dies betrifft v.a. Immunoassays, wie sie in unserem Fall zur Analyse der im Serum zirkulierenden Hormone eingesetzt wurden.

Bezüglich der Analyse der gewonnenen Proben ist demnach die präanalytische Behandlung derselben ein möglicher Störfaktor. Es erwies es sich als empfehlenswert, IGF-I und IGFBP-3 sowie GH nicht im Blutplasma, sondern im Serum zu bestimmen. Somit wurde das Risiko, falsch niedrige (IGF-I, IGFBP-3) oder falsch hohe (GH) Werte zu erhalten, vermindert [144].

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Phänotyp

Der sich im Rahmen der Studie entwickelnde Phänotyp der Versuchstiere (4.1), welche mit zwölf Wochen im jungen Erwachsenenalter waren, war unabhängig vom jeweiligen Gehalt an Proteinen in der Diät. Der Mangel an Kohlenhydraten führte zu einer signifikanten Verkürzung der Nasen-Schwanz-Länge aller Experimentalgruppen sowie einer signifikant geringerer Gewichtszunahme, welche sich durch inverse Veränderung von Fettgewebe und Magermasse auszeichnete. Die Körperzusammensetzung wies eine Akkumulation von viszeralem Fettgewebe und eine Reduktion von fettfreier Körpermasse auf.

Körpergewichtsentwicklung und Körperzusammensetzung:

Bereits in Studien am Menschen wurden LCHF-Diäten als eine Möglichkeit zum Gewichtsverlust genannt [145]. Der induzierte Gewichtsverlust unterliegt dabei verschiedenen Mechanismen: Zum einen der Ketose bedingt durch die niedrige Zufuhr an Kohlenhydraten, die über eine Ketonurie zu Energieverlust und durch zirkulierende Ketonkörper zu einem verringerten Appetit führt [141]. Zum anderen soll die durch die Diäten induzierte Thermogenese verantwortlich sein [146]. Auch ein höherer Energieverbrauch soll am Gewichtsverlust beteiligt sein [139]. Diese Argumente sind infrage zu stellen [147]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Energieverlust einer Ketonurie bei ketogenen Diäten nur unwesentlich den Energieverbrauch beeinflusst [148]. Darüber hinaus steht der metabolische Zustand einer Ketose selbst nicht in Zusammenhang mit Gewichtsverlust im Menschen [149]. Zusätzlich existieren nahrungsunabhängige Erklärungen für eine reduzierte Gewichtsentwicklung. Im Mausmodell beispielsweise konnte bereits gezeigt werden, dass ein Defekt des GHR zu einer reduzierten Gewichtsentwicklung führt [150].

Auch wir konnten in den Experimentalgruppen eine signifikant geringere Gewichtszunahme (LC-75 < LC-65 < LC-55 < Chow) verzeichnen und damit vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe diesbezüglich bestätigen [125, 151]. In den ersten vier Tagen kam es in den Experimentalgruppen sogar zu einem Gewichtsverlust, wohingegen in der Kontrollgruppe eine kontinuierliche Gewichtszunahme stattfand (Abb. 4-3). Der initiale Gewichtsverlust ist wahrscheinlich auf den Verbrauch von Muskel- und Leberglykogen und einer damit verbundenen höheren Wasserausscheidung zurückzuführen [152]. Da nach Beendigung der Nahrungsumstellung solche Wasserspeicher wieder gefüllt werden, kann dies als ein falsch positiver Effekt angesehen werden. Die anschließende verringerte Gewichtszunahme in allen LCHF-Gruppen war am stärksten in der Diät mit dem höchsten Fettanteil (LC-75) ausgeprägt.

In vorangegangenen Beobachtungen am Menschen wurde der Gewichtsverlust im Rahmen von LC Diäten auf eine reduzierte Kalorienaufnahme bei längerfristiger Nahrungsumstellung zurückgeführt [153]. In der von uns durchgeführten Studie wurde die jeweilige angebotene und paargefütterte isokalorische Futtermenge immer vollständig von den Ratten konsumiert. Des Weiteren kann durch die hier angewandte Methode der isoenergetischen und isokalorischen Paarfütterung davon ausgegangen werden, dass die gezeigten Effekte unabhängig von der Kalorienzufuhr waren. Die Ergebnisse sind demnach abhängig von der Nahrungszusammensetzung.

Nichtsdestotrotz wurde kürzlich gezeigt, dass sowohl Diäten mit einem hohen Kohlenhydratanteil als auch solche mit einem geringen Kohlenhydratanteil bei Übergewichtigen zu Gewichtsverlust führen [154]. Verantwortlich hierfür sind u.a. ein gesteigertes Gesundheitsbewusstsein und eine reduzierte Auswahl an Nahrungsmitteln. In einer über zwei Jahre andauernden Vergleichsstudie verschiedener Diätformen (LC-Diät, LF-Diät, Mittelmeerdiet) am Menschen konnte gezeigt werden, dass der mittlere Gewichtsverlust unter LC-Diäten am höchsten war. Auch war in dieser Gruppe das Sinken von Cholesterin und high-density-lipoprotein am stärksten ausgeprägt [145]. Sowohl in dieser als auch in weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass LC-Diäten vor allem dann zu einem Gewichtsverlust führen, wenn diese Ernährungsumstellung über einen längeren Zeitraum verfolgt wird [155, 156, 157]. Hierbei ist unklar, welcher Aspekt der LC-Diäten den Gewichtsverlust verursacht. Diskutiert wurde neben dem niedrigen Anteil an Kohlenhydraten ein hoher Anteil an Protein und eine Kalorienrestriktion [157, 158, 153].

Der Gewichtsverlust im Rahmen einer LCHF Diät ist im Vergleich zu Diäten mit geringem Fettanteil auf einen Verlust an fettfreier Körpermasse zurückzuführen [125, 159]. Diäten mit einem hohen Proteingehalt hingegen sollen den Gewichtsverlust durch eine Körperfettreduktion bei weniger Verlust an fettfreier Körpermasse verbessern [160].

Auch wir konnten eine signifikante Reduktion der fettfreien Körpermasse in allen Experimentalgruppen (Abb. 4-6) feststellen, wobei sich diese treppenförmig darstellen ließ (LC-75 < LC-65 < LC-55 < Chow). Diesbezüglich sei vermerkt, dass bei der Bestimmung der fettfreien Körpermasse auch das knöcherne Skelett mitgewogen wurde.

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass LCHF-Diäten auch zu einer verringerten Knochendichte und einem geringeren Längenwachstum führten [125]. Da sowohl eine geringere Knochendichte, als auch eine Knochenverkürzung mit einem geringeren Gewicht des knöchernen Skeletts einhergeht, ist dies möglicherweise mitunter eine Erklärung für die signifikant reduzierte Magermasse in den Experimentalgruppen.

Parallel zum oben erwähnten Verlust an fettfreier Körpermasse wird immer wieder eine Akkumulation an viszeralem Fettgewebe berichtet [125, 139, 151, 161-163]. Wir konnten bei signifikant höheren Gewichten von perirenalem (Abb. 4-8) und epididymalen (Abb. 4-7) Fettgewebe die Zunahme von viszeralem Fettgewebe in allen Experimentalgruppen bestätigen. Diese zeigten einen stufenförmigen Verlauf (LC-75 > LC-65 > LC-55 > Chow), wobei das Gewicht der einzelnen Fettdepots umso höher war, je größer der Anteil an Fett in der Nahrung.

Anders verhielt es sich mit dem inguinalen Fettgewebe. Dieses war lediglich in der LC-75 und der LC-65, nicht aber in der LC-55 signifikant erhöht (Abb. 4-9). Nimmt man im Vergleich dazu das Gewicht der Haut mit anhängendem Fell und dem dazugehörigen subkutanem Fettgewebe, war dieses relativiert auf das Körpergewicht in allen LCHF Gruppen sogar signifikant reduziert (Tab.: 4-4). Inwieweit dies allerdings ein verlässliches und vergleichbares Fettdepot darstellt, ist insofern infrage zu stellen, als sowohl die Beschaffenheit des Fells als auch die Dicke der Kutis in die Messung miteinbezogen wurden und hierbei große interindividuelle Unterschiede auch innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen zu erwarten sind.

Hinsichtlich der Entwicklung des metabolisch aktiven braunen Fettgewebes finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Einerseits gibt es Ergebnisse, welche von einer unveränderten Menge an braunem Fettgewebe in HF-Diäten berichten, andererseits gibt es Publikationen, welche von einer erhöhten Menge an braunem Fettgewebe bei energiereichen HF-Diäten berichten [164]. Die von uns bestimmte interscapuläre Menge an braunem Fettgewebe war in der höchstkalorischen Diätgruppe (LC-75) signifikant erhöht (Abb. 4-10). In einer weiterführenden Studie dieses gewonnenen Gewebes konnte gezeigt werden, dass es nicht zu einer Erhöhung der durch braunes Fettgewebe induzierten Thermogenese kam [164]. Demnach ist die niedrigere Gewichtszunahme unter LCHF-Diäten auch nicht auf eine höhere Thermogenese in metabolisch aktiven braunem Fettgewebe zurückzuführen.

Die erwartete signifikant geringere Gewichtszunahme der Diätgruppen (Abb. 4-3) ist auf eine gegenläufige Veränderung der Körperzusammensetzung zurückzuführen. Eine signifikante Reduktion der fettfreien Körpermasse (Abb. 4-6) wurde begleitet von einer signifikanten Akkumulation von viszeralem Fettgewebe (Abb. 4-7 / 4-8). An der signifikant verminderten Gewichtszunahme sind das ebenfalls signifikant reduzierte Gewicht der Haut, inklusive dem anhängenden Fell (Tab.: 4-4) sowie eine signifikant reduzierte Gesamtkörperlänge (Tab.: 4-1) in allen Experimentalgruppen beteiligt.

Ursächlich für diese Entwicklungen ist einerseits die Nahrungszusammensetzung, wobei dies unabhängig vom Proteingehalt war und andererseits die damit verbundene Reduktion des hepatischen GHR Expression und des reduzierten IGF-I Spiegels.

Länge:

Das GH / IGF-I System beeinflusst zusammen mit Steroiden und Parathormon wesentlich das Knochenwachstum [125, 165, 166]. Über das GH / IGF-I System wird die Osteoblastendifferenzierung stimuliert. GH selbst beeinflusst das Knochenwachstum [125, 167]. IGF-I ist für die Knochenmineralsierung, die Induzierung der Chondrozytenproliferation und die Hemmung der Chondrozytenapoptose [125, 168, 169] wichtig. Aktuell gibt es mehrere bekannte genetische Ursachen von Kleinwuchs, welche allein durch niedriges Serum IGF-I bei normaler GH Sekretion charakterisiert sind [170]. Unabhängig von IGF-I wirken

sich die verschiedenen IGF-BPs auf das Knochenwachstum aus [125]. Bereits in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass LCHF-Diäten das Wachstum von langen Röhrenknochen beeinflussen [125]. Das geringere Längenwachstum sei u.a. auf eine reduzierte Osteoblastenaktivität und eine geringere Stammzellendifferenzierung im Knochenmark hin zur Familie der Osteoblasten zurückzuführen [125].

Auch in der präsentierten Arbeit konnten wir eine signifikant verringerte Gesamtkörperlänge (Nasenspitze bis Schwanzansatz) in allen Experimentalgruppen (LC-75, LC-65, LC-55) messen. Das reduzierte Körperlängenwachstum war in der LC-75 und LC-65 sowohl auf signifikant verkürztes Wachstum eines langen Röhrenknochen (Femur) als auch eine signifikant geringerer Länge der BWS und LWS zurückzuführen. In der LC-55 zeigten sich trotz der verkürzten Gesamtkörperlänge keine signifikanten Unterschiede im Wachstum der gemessenen Segmente (Tab.: 4-1). Die Länge der HWS mit Schädel sowie die Länge der Tibia waren in allen Gruppen annähernd gleich.

Inwiefern bei der Längenmessung der Wirbelsäulenabschnitte die Zwischenwirbelräume im Vergleich mit den Wirbelkörpern selbst von einer Höhenminderung betroffen sind, könnte von Interesse sein, insbesondere da beim Menschen durch den aufrechten Gang eine Belastung auf dieses Kompartiment ausgeübt wird.

Leptin reduziert zirkulierendes IGF-I und verringert in hohen Dosen das Knochenwachstum [171]. In einer vorausgegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde spekuliert, dass das damals im Rahmen von LCHF-Diäten erhöht gemessene Leptin mitverantwortlich für das reduzierte Körperlängenwachstum sein könnte [125, 172]. Dies würde auch aktuell eine potenzielle Erklärung sein, da auch die im Rahmen in dieser Arbeit bestimmten Serumleptinspiegel in den Experimentalgruppen (LC-75, LC-55) signifikant höher sind (Tab.: 4-6).

5.2.2 Kalorimetrie

Der Energieumsatz wird wesentlich durch die Körperzusammensetzung - Fettdepots haben eine geringere Stoffwechselrate als Organe - beeinflusst. Entscheidend für die Substratbilanz ist das Verhältnis von oxidativen zu nicht oxidativem Substratstoffwechsel der verschiedenen

Makronährstoffe. Die oxidative Kapazität von Kohlenhydraten und Proteinen ist höher als die der Nahrungsfette, weshalb diese bevorzugt oxidiert werden, wohingegen Nahrungsfette überwiegend gespeichert werden [173]. Dementsprechend hat sich der respiratorische Quotient analog der Nahrungszusammensetzung der Diäten in den Experimentalgruppen signifikant erniedrigt und demonstriert deutlich das hauptsächlich verstoffwechselte Substrat (Fette) gemäß stöchiometrischer Vorgaben (Kohlenhydrate 1; Proteine 0,8; Fette 0,7) (Tab.: 4-3).

Der u.a. von der fettfreien Körpermasse beeinflusste Ruheenergieverbrauch macht den größten Anteil des täglichen Energieverbrauchs aus. Erst kürzlich konnte in einem Mausmodell, welches mit ketogenen Diäten gefüttert wurde, ein höherer Energieverbrauch gezeigt werden. Dies war v.a. bei gesteigerter Aufnahme mehrfach ungesättigter Fettsäuren der Fall [139, 174, 175] und wäre eine mögliche Erklärung für die geringere Gewichtszunahme in den Experimentalgruppen. In den gelisteten Arbeiten konnte dies allerdings auf eine höhere Expression von Thermogenin aus braunem Fettgewebe zurückgeführt werden.

Der Energieverbrauch der inneren Organe ist aufgrund ihrer hohen metabolischen Aktivität mit 60-70% des Ruheenergieverbrauchs wesentlich höher als derjenige der Muskulatur. Daher verhält sich der Energieverbrauch insgesamt invers zur fettfreien Körpermasse [173]. Dennoch kommt es in den Tieren der Experimentalgruppen nicht zu einem höheren Energieverbrauch. Dies ist möglicherweise mit der nahrungsinduzierten Thermogenese zu erklären, welche sowohl von der Nahrungsmenge, als auch von deren Zusammensetzung abhängig ist [173]. Demnach ist also durch die höhere prozentuale Menge an Körperfett und die damit verbundene erhöhte Energiedichte [151] nicht von einem höheren Energieverbrauch auszugehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die geringere Gewichtszunahme in den Experimentalgruppen nicht auf einen signifikant veränderten Energieverbrauch zurückzuführen ist.

5.2.3 GH / IGF-I System

Bereits in früheren Studien wurde beschrieben, dass eine Kalorienrestriktion das GH / IGF-I System beeinflusst [118, 119]. Aufgrund dessen sowie wegen des beschriebenen reduzierten Längenwachstums und der von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen reduzierten Knochendichte [125] in Kombination mit den mit LCHF-Diäten assoziierten reduzierten IGF-I Spiegel [125] war daran zu denken, dass diese Nahrungszusammenstellung das GH / IGF-I System beeinflusst. Es wurde bereits zuvor gezeigt, dass eine ausreichende Proteinzufuhr entscheidend für die reguläre Funktion des GH / IGF-I System ist [176, 177].

Sowohl bei Studien an Mäusen [120] als auch im Rahmen einer Kurzzeitstudie am Menschen [121] wurde im Zuge der Ernährung mit LC Diäten eine Reduktion von IGF-I im Serum beobachtet. Es kam jedoch zu keinem Anstieg von GH. Trotz unverändertem Serum GH kam es aber zu einer erhöhten Expression von muskulärer IGF-I-mRNA.

In einer anderen Arbeit mit Mäusen wurde gezeigt, dass eine ad libitum Fütterung von hochkalorischen Diäten zur Reduktion der Serumkonzentration von GH führt, wobei dies auch im Zusammenhang mit einer Hyperglykämie und Hyperinsulinämie stand [122]. Darüber hinaus wird berichtet, dass Diäten mit einem hohen Gehalt an Fett über die Stimulation von Somatostatin die Sekretion von GH und IGF-I inhibieren [122-124].

Um die GH Sekretion aussagekräftig zu ermitteln, folgten wir einem etablierten Modell der mehrfachen Blutentnahme [178]. Aufgrund des pulsatilen Sekretionsmusters von GH sind Aussagen zu GH-Spiegeln im Blut, welche auf einzelnen Messzeitpunkten basieren nicht zielführend. Anders als in der oben beschriebenen Methode (fünf Minuten Intervall), erfolgte in unserem Fall die Probenentnahme im einem zehn-Minuten-Intervall in der Inaktivitätsphase der Versuchstiere. Hierbei wurden möglicherweise Spitzenwerte verpasst. Die erhaltenen Ergebnisse sind verlässlich, da wir bis zu zehn Blutproben pro Tier gewinnen konnten und sich eine pulsatile GH Freisetzung klar nachweisen lies (Abb. 3-2 / 4-12).

Kurzzeitige Nahrungskarenz führt bei den meisten Spezies, so auch beim Menschen, zu einer gesteigerten GH-Sekretion [179, 180]. Im Gegensatz dazu zeigt die Ratte nach dem Fasten eine geringere Konzentration an GH [181, 182]. Um mögliche Auswirkungen einer

unterschiedlichen Füllung des Gastrointestinaltraktes auf das Sekretionsmuster zu minimieren, wurden die Ratten vor den Blutentnahmen einheitlich sechs Stunden gefastet.

Nach Durchführung einer Häufigkeitsverteilungsanalyse („rank plot“) [122, 183] der jeweiligen GH-Werte konnten wir darüber hinaus zeigen, dass die medianen GH-Spiegel nur in der LC-55 Gruppe signifikant gesteigert waren, wohingegen GH in der LC-75 keine signifikanten Veränderungen aufwies (Abb. 4-12). In der LC-65 erfolgte keine pulsatile GH-Messung. Die genannten Ergebnisse wurden durch eine quantitative real time PCR von hypothalamisch-hypophysären Gewebe bestätigt. Auch auf molekularbiologischer Ebene konnte lediglich in der LC-55 eine höhere GH-mRNA Expression festgestellt werden, nicht jedoch in der LC-65 und LC-75 (Tab.: 4-7). Die gesteigerte Expression von GH in der zu Chow proteingematchten LC-55 ist möglicherweise eine Reaktion auf eine niedrigere hypothalamisch-hypophysäre Somatostatin-mRNA Expression in dieser Gruppe (Tab.: 4-9).

Insgesamt kann vermutet werden, dass der unterschiedliche Effekt der verschiedenen Experimentalgruppen auf die GH-Sekretion auf die unterschiedliche makronutriente Zusammensetzung der LCHF Gruppen zurückzuführen ist und dass sowohl der Proteingehalt als auch der Kohlenhydratanteil an der Nahrung an den Auswirkungen auf die GH / IGF-I Achse beteiligt sind. Die gesteigerte Ausschüttung von GH in der LC-55, welche in ihrem Proteingehalt der Kontrollgruppe Chow gleicht, kann als Reaktion auf signifikant reduziertes IGF-I im Serum und einer daraus resultierenden reduzierten Somatostatinkonzentration interpretiert werden. In der LC-75 und der LC-65 hingegen funktioniert dieser Rückkopplungsmechanismus nicht regelrecht. Die Aminosäure Arginin ist ein weiterer wesentlicher Stimulus der GH Sekretion [184]. Hinsichtlich des niedrigen Proteingehalts, insbesondere in der LC-75 und der LC-65, ist speziell eine möglicherweise zu geringe Aufnahme von Arginin eine potenzielle Begründung für das unzureichende zentrale Feedback.

Da das GH / IGF-I System ein wesentlicher Faktor zur Regulierung von Wachstum, Knochenstoffwechsel, Lipidmetabolismus und Glukosestoffwechsel ist [185-187], könnten die Auswirkungen der LCHF-Diäten auf dieses System den sich entwickelnden, oben beschriebenen Phänotyp erklären (4.1). Das reduzierte Körperlängenwachstum, die Akkumulation von viszeralem Fettgewebe und die Reduktion der fettfreien Körpermasse

waren in allen Experimentaldiätgruppen (LC-74, LC-65, LC-55) signifikant. Dies stimmt mit den Ergebnissen einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe überein [125].

IGF-I ist der wesentliche Regulationsfaktor der GH-Sekretion. Einerseits steigert es die Ausschüttung von Somatostatin und hemmt die Synthese und Sekretion von GHRH und inhibiert somit indirekt die GH-Sekretion. Andererseits hemmt es auch direkt die Synthese und Sekretion von GH [181, 188, 189].

Die Aussagen von Veröffentlichungen über die Auswirkungen von HF Diäten auf zirkulierende IGF-I Spiegel sind uneinheitlich. Es wird hierbei sowohl von gesteigerten [190-192], als auch von unveränderten [122, 193] sowie erniedrigten [194, 195] IGF-I Spiegeln berichtet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden u.a. einige Tiere mit einer sogenannten "Western Style Diät" gefüttert. (Dies diente als eine interne Kontrollgruppe, die Daten hierzu wurden nicht gezeigt). Hierbei konnten keine Veränderungen im IGF-I Spiegel verzeichnet werden, was mit Ergebnissen anderer Veröffentlichungen zu diesem Thema übereinstimmt [122, 193].

Alle in dieser Arbeit eingesetzten LCHF-Diäten (LC-75, LC-65, LC-55) führten zu einer signifikanten Reduktion von IGF-I im Serum (Abb. 4-13). Damit konnten frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, welche ebenso von reduzierten IGF-I Spiegeln im Rahmen von LCHF Ernährung berichten, bestätigt werden [151]. Darüber hinaus konnten wir auch eine Reduktion der peripheren IGF-I-mRNA Expression in der Leber aller mit LCHF-Diäten gefütterten Tiere feststellen, was mit den reduzierten IGF-I Spiegeln in Übereinstimmung steht (Tab.: 4-8). Da auch in der LC-55, welche in ihrem Proteingehalt annähernd mit der Kontrollgruppe übereinstimmt, IGF-I signifikant reduziert ist, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt unabhängig vom Proteingehalt in der Nahrung ist.

Im Plasma sind 95% des in der Leber synthetisierten IGF-I an IGFBP-3 und die säurelabile Untereinheit gebunden [196]. IGFBP-3 ist das wesentliche Trägerprotein des IGF-I und von den sechs bekannten IGFBP's am häufigsten in der Zirkulation zu finden [197]. Es verlängert die Halbwertszeit von ungebundenen IGF-I von ca. 10 Minuten auf 12-15 Stunden [198, 199, 200]. Nicht nur Serum IGF-I Spiegel, sondern auch die damit verbundenen IGFBP-3 Spiegel werden von der Nahrungszusammensetzung beeinflusst [201, 202]. Im Rahmen dieser Arbeit

konnten wir mittels Immunoassays eine signifikante Reduktion von IGFBP-3 in der LC-75 und der LC-55 feststellen (Tab.: 4-6), wobei dies wegen der Korrelation von IGF-I und IGFBP-3 Spiegel zu erwarten war [203]. IGFBP-3 in der LC-65 wurde nicht gemessen. Der ternäre Komplex von IGF-I mit IGFBP-3 und der säurelabilen Untereinheit wird v.a. hinsichtlich der Langzeitregulation von sogenanntem bioaktiven IGF-I als wesentlich diskutiert [204].

Ein weiteres Bindungsprotein für IGF-I ist IGFBP-1 [196]. Dieses scheint eine wichtige Rolle bei der Kurzzeitregulation von bioaktivem IGF-I, speziell bei fastenden Tieren, zu spielen [205]. In weiterführenden Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die reduzierten IGF-I Spiegel auch von reduzierten IGFBP-1 Spiegel begleitet wurden [206].

Ein Teil des IGF-I liegt in freier Form vor [207]. Dieses sogenannte bioaktive IGF-I gilt als wesentlicher Regulationsfaktor im Rückkopplungskreislauf zum GH. Es wurde in weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestimmt und zeigte keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen Ratten, welche mit LCHF-Diäten gefüttert wurden und der Kontrollgruppe [197, 208].

Bereits früher konnte gezeigt werden, dass ein GHR Defekt zu signifikant reduzierten IGF-I und IGFBP-3 Spiegel führt [150]. Auch in dieser Arbeit kam es zu einer Reduktion der GHR-mRNA Expression in der Leber (Tab.: 4-7). Dies wäre eine Erklärung für die reduzierten Spiegel an IGF-I und IGFBP-3. Der hepatische GHR war in allen LCHF Gruppen reduziert und kann demnach am ehesten auf den Mangel an Kohlenhydraten zurückgeführt werden. Zusätzlich konnten wir in weiterführenden Analysen des hepatischen Gewebes die detektierte Reduktion von GHR-mRNA in allen LCHF Gruppen auf Protein-Ebene durch die Anfertigung eines Western Blots bestätigen (die Daten hierzu wurden nicht gezeigt).

Die Expression des IGF-I im peripheren Gewebe verhält sich demnach analog zu den Veränderungen des GHR in der Leber.

Die reduzierte hepatische GHR Expression und die reduzierte basale Expression von Signalproteinen die durch Aktivierung des GHR induziert werden, führt auch zu einer geringeren Aktivierung von JAK/STAT Signalwegen [208]. Demnach reicht ein geringer Anteil an Kohlenhydraten alleine aus, um eine hepatische GH-Resistenz zu verursachen, welche die niedrigen IGF-I Spiegel erklären würde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die niedrigen IGF-I Spiegel im Serum auf eine reduzierte hepatische GHR-Expression und auf eine reduzierte basale Expression von Signalproteinen, die durch GHR Aktivierung induziert werden, zurückzuführen sind und sich in einer Reduktion von IGF-BP-3 widerspiegeln. Des Weiteren ist der niedrige Spiegel an zirkulierendem IGF-I, welcher sich mit absteigendem Proteingehalt in der Nahrung stufenartig nach unten darstellt (Abb.: 4-13), hinweisend darauf, dass der Anteil an Protein in der Nahrung ein wichtiger Faktor für die Regulation der GH / IGF-I Achse ist [176]. Insgesamt führt der Mangel an Kohlenhydraten aber unabhängig vom Protein- und Fettgehalt der Experimentalgruppe, zu einer hepatischen GH-Resistenz.

Zwar ist IGF-I ein wesentlicher Regulationsfaktor von GH [181, 188, 189], allerdings beeinflussen auch andere zirkulierende Hormone, Neurotransmitter und Neuropeptide sowie Stoffwechselsubstrate wie Glukose und freie Fettsäuren die GH Ausschüttung (Abb. 1-2) [181].

Im Mausmodell wurde gezeigt, dass es im Rahmen eines GHR Defekt zu einer Reduktion von Nüchterninsulin und Glukosespiegeln kam, wobei für die Reduktion von Insulin ein komplettes Fehlen von GH erforderlich war [150]. Im Gegensatz dazu stimuliert Insulin selbst die hepatische GHR Synthese [209, 210].

In allen LCHF Gruppen konnten wir reduzierte Glukosespiegel feststellen, welche indirekt inhibierend auf eine GH-Sekretion wirken (Tab.: 4-6). Interessanterweise kommt es zur stufenweisen Reduktion der Serumglukose (Chow > LC-55 > LC-65 > LC-75). Diese Ergebnisse, in Zusammenschau mit dem intakten zentralen Rückkopplungsmechanismus mit reduzierten Somatostatinspiegeln in der LC-55, sprechen dafür, dass die Stimulation von Somatostatin und damit die indirekte Hemmung der GH-Sekretion abhängig vom Ausmaß einer Hypoglykämie ist.

Insulin beeinflusst dosisabhängig die Expression von GHR in der Leber [210-212]. Insulin war lediglich in der LC-75 signifikant geringer, wobei dies nicht durch einen Mangel an GH erklärt werden kann. Die reduzierten Insulinspiegel in der LC-75 können zumindest mitursächlich für die reduzierte GH-mRNA Expression in der Leber sein.

Bei weiterführenden Analysen zeigte sich außerdem eine Ketonurie sowie Ketonkörper im Serum der LC-75 [141]. Dies ist insofern von Interesse, als Ketonkörper im Serum die Funktion neuronaler Zellen im Gehirn beeinflussen [213], was eine weitere denkbare Begründung für die ungenügende hypophysäre GH-Sekretion bei reduziertem IGF-I wäre.

Die beiden letzteren Ergebnisse (reduziertes Nüchtern-Insulin, Ketose) in der LC-75 könnten mitunter die reduzierte IGF-I Sekretion und die beeinflusste Rückkopplung in dieser Gruppe erklären. Eine weitere mögliche Erklärung der beeinträchtigten Rückkopplung der LC-75 könnten auch die gesteigerten Konzentrationen an freien Fettsäuren in dieser Gruppe sein. Freie Fettsäuren hemmen die GH-Sekretion auf verschiedenen Ebenen. Umgekehrt wird die GH-Sekretion bei reduzierten Werten an freien Fettsäuren stimuliert [181, 214-216].

Insgesamt finden sich v.a. in der LC-75 unterschiedliche Faktoren, welche mitunter den gestörten Rückkopplungsmechanismus in dieser Gruppe beeinflussen. Allgemein zeigt sich allerdings kein einheitlich verändertes Bild peripherer Regulationsparameter im Serum, welches eine verlässliche Interpretation derselben zulassen würde.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass der geringe Anteil an Kohlenhydraten in LCHF-Diäten, unabhängig von ihrem Gehalt an Protein, zu einer GH-Resistenz im Lebergewebe mit daraus resultierenden geringeren IGF-I Spiegeln führt.

Unter der Voraussetzung eines ausreichend hohen Proteingehalts ist ein intakter Rückkopplungsmechanismus des GH / IGF-I System zu gewährleisten. Lediglich unter diesen Bedingungen kam es zu einer regulären Reduktion von Somatostatin und einer daraus resultierenden erhöhten Ausschüttung von GH als Reaktion auf die reduzierten IGF-I Serumparameter.

Kohlenhydratanteil gering → hepatische GH-Resistenz

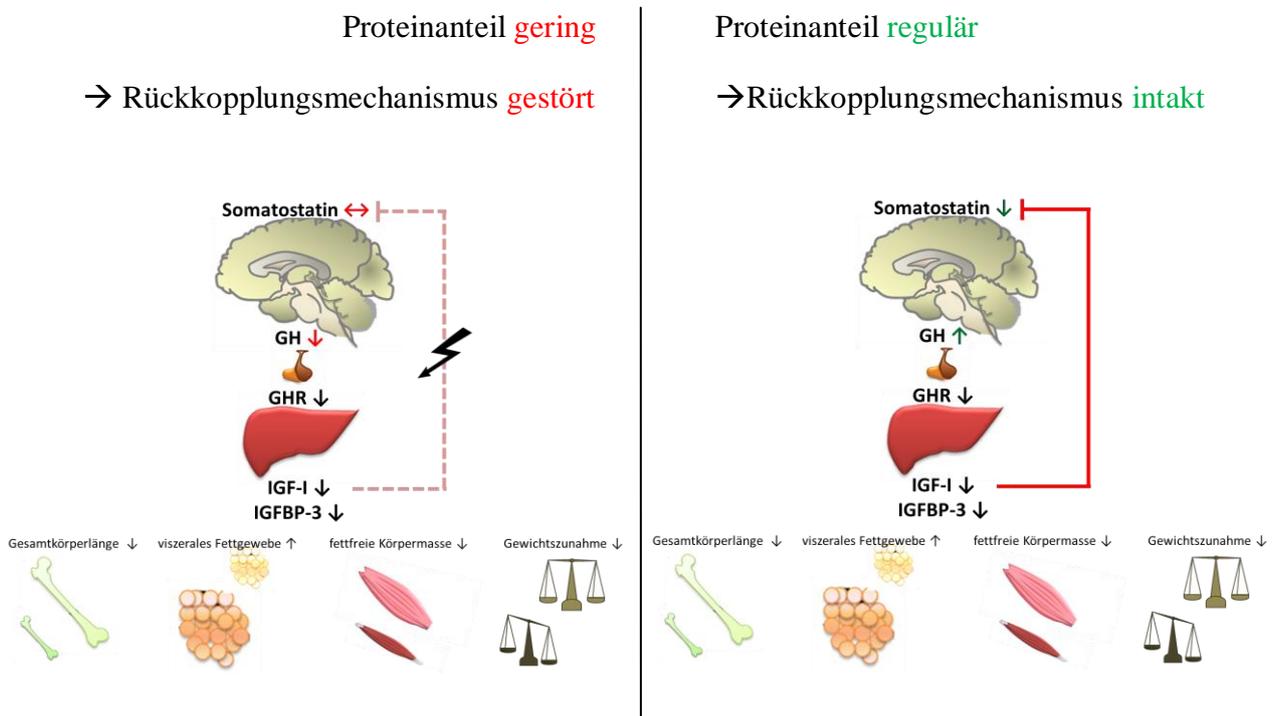


Abb.: 5-1 Vereinfachte Darstellung der Ergebnisse:

- der geringe Kohlenhydratanteil führt zu einer hepatischen GH-Resistenz.
- ein regulärer Proteinanteil weist einen intakten Rückkopplungsmechanismus auf.
- ein zu geringer Proteinanteil führt zu einem gestörten Rückkopplungsmechanismus.

Wir konnten im Zuge dieser Arbeit durch die Fütterung von LCHF-Diäten eine Zunahme an viszeralem Fettgewebe verzeichnen. Des Weiteren machte es in der histopathologischen Beurteilung des perirenal Fettgewebes den Anschein als seien die Adipozyten vergrößert. Darüber hinaus konnte in weiterführenden Studien gezeigt werden, dass es im Rahmen von LCHF-Diäten zu einer Insulinresistenz kommt [217].

Eine chronische Entzündungsreaktion, insbesondere die fettgewebsabhängige Produktion proinflammatorischer Moleküle und verschiedener akute-Phase-Proteine, wird zunehmend als Stoffwechselstörung bei Adipositas betrachtet [218, 219]. Bereits in einem mit HF-Diäten gefütterten Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die unter den Diäten beobachtete Gewichtszunahme zu einer fettgewebsabhängigen Entzündungsreaktion führte [220]. Darüber hinaus konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Plasma-Adiponektionspiegel negativ assoziiert sind mit dem prozentualen Anteil an Körperfett, insbesondere dem Anteil an viszeralem Fettgewebe, sowie den Insulin- und Leptin-Spiegeln [221-223]. Des Weiteren führt die Vergrößerung der Fettzellen zu einer zellulären proinflammatorischen Reaktion [224].

In Zusammenschau mit Untersuchungen, welche von einer Entzündungsreaktion des Fettgewebes unter oben genannten Bedingungen berichten, war es interessant herauszufinden, inwiefern es nach einem Fütterungszeitraum von 4 Wochen mit LCHF-Diäten zu einer solchen Entzündungsreaktion kommen würde.

Fettgewebe hat nicht nur mechanische und Energie spendende Funktion, sondern ist auch ein wichtiges endokrines Organ. Es sezerniert zahlreiche Adipokine, darunter auch IL-6 und TNF- α [225-227]. Eine Überexpression diverser Adipokine bei einem Überschuss an weißem Fettgewebe kann dabei gesundheitliche Folgen haben. Insbesondere da das weiße Fettgewebe bis zu 25% des Körpergewichts beim Menschen einnimmt [228].

Im Rahmen von Adipositas kommt es sowohl zu einer Zunahme der Adipozytenzahl als auch zu einer Zunahme des Adipozytenvolumens [229]. Insbesondere Letzteres ist mit einer Störung der endokrinen Funktion des Fettgewebes assoziiert [230, 231]. Diese wird u.a. durch eine lokale Gewebsentzündung [232, 233] und oxidativen Stress [234] verursacht. Darüber hinaus wurde eine Infiltration des Fettgewebes durch Entzündungszellen, hauptsächlich Makrophagen, beobachtet [233]. Auch die Makrophageninfiltration selbst könnte dabei zu steigenden Konzentrationen diverser Adipokine führen [225, 227]. Insbesondere viszerales

Fettgewebe zeigt eine höhere endokrine Aktivität im Vergleich mit subkutanem Fettgewebe. Es gilt als wesentlicher Risikofaktor für zahlreiche chronische Erkrankungen.

Bei der Untersuchung der Genexpression verschiedener Inflammationsparameter im epididymalen und perirenenalen Fettgewebe, konnten wir keine einheitlichen Veränderungen finden, welche auf eine Fettgewebsinflammation hindeuten würden (Tab.: 4-10). Auch ergab sich kein eindeutiger Hinweis auf oxidativen Stress im viszeralen Fettgewebe.

Als weitere Kontrolle wurde eine immunhistochemische Färbung zur Makrophagendetektion im perirenenalen Fettgewebe durchgeführt. Auch hierbei zeigte sich kein Hinweis auf eine Fettgewebsinflammation. Als Positivkontrolle diente perirenales Fettgewebe einer Gruppe von Ratten, welche über den gleichen Zeitraum ad libitum mit einer sogenannten „Western Style Diät“ gefüttert wurden. Hier konnte deutlich eine Makrophageneinwanderung nachgewiesen werden. Eine laborchemische Untersuchung fand in dieser Gruppe nicht statt. Unabhängig davon machte es jedoch subjektiv den Anschein, als sei das Adipozytenvolumen in den LCHF Gruppen und der Positivkontrolle vermehrt (Abb. 4-14).

Insgesamt kann durch die erfolgreiche Positivkontrolle gesagt werden, dass ein Versuchszeitraum von vier Wochen ausreichend erscheint, um eine Makrophageneinwanderung zu induzieren. Inwiefern dieser Zeitraum hinreichend ist, um auch laborchemische Veränderungen nachzuweisen, müsste weiter untersucht werden. Unter der Voraussetzung einer isokalorischen Fütterung kam es jedoch weder zu einer laborchemisch noch immunhistochemisch nachweisbaren Fettgewebsinflammation unter LCHF-Diäten. Es wäre im Weiteren interessant herauszufinden, inwiefern ein längerer Fütterungszeitraum unter isokalorischen Bedingungen Parameter einer Fettgewebsinflammation induzieren würde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es histopathologisch den Anschein macht als würden sowohl eine ad libitum Fütterung von sogenannten „Western Style Diäten“ als auch eine Paarfütterung von LCHF-Diäten zu einer Volumenzunahme von Adipozyten führen. Durch die uneingeschränkte Fütterung von sogenannten „Western Style Diäten“ konnte darüber hinaus histopathologisch eine Makrophageneinwanderung als Zeichen einer Entzündungsreaktion im Fettgewebe beobachtet werden, wohingegen eine solche Reaktion

unter dem Regime der Paarfütterung mit LCHF-Diäten nicht gefunden wurde. Auch laborchemisch fanden sich in den LCHF Gruppen keine Veränderungen, welche auf eine Entzündungsreaktion hinweisen würden.

Ein wesentliches Einsatzgebiet von LCHF-Diäten ist die Nahrungsumstellung zum Zwecke einer Gewichtsreduktion. Bisherige Arbeiten fokussierten auf den Vergleich unterschiedlicher Diäten, wobei LCHF-Diäten hier vielversprechende Ergebnisse erzielten. Die dadurch erzielte positive Gewichtsentwicklung ist auf einen Verlust an fettfreie Körpermasse bei Zunahme an viszeralem Fettgewebe sowie einer Volumenzunahme der Adipozyten, zumindest im perirenenalen Fettgewebe, zurückzuführen. Trotz dieser adipozytären Volumenzunahme kommt es zu keiner Entzündungsreaktion und / oder Fettgewebsinflammation. Wesentlich ist hierbei eine zu einer regulären Kalorienaufnahme isokalorische Nahrungsaufnahme.

6 Zusammenfassung

Das Wachstumshormon und Insulin – like growth factor System ist ein wesentlicher Faktor in der Regulierung von Wachstum, Fettgewebsmetabolismus, Glukosemetabolismus und Stoffwechselfvorgängen. Die Auswirkungen der Nährstoffzusammensetzung auf Wachstumshormon und dessen Regelkreise sind aktuell noch wenig untersucht. Um die Effekte von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen auf die GH / IGF-I Achse zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene LCHF-Diäten über einen Zeitraum von vier Wochen isoenergetisch an zwölf Wochen alte männliche Wistar Ratten verfüttert. Die Diäten unterschieden sich nur in ihrem Anteil an Protein und Fett, wohingegen der prozentuale Anteil der Kohlenhydrate immer unter 2,3% lag (prozentualer Anteil an Kohlenhydraten / Fett / Protein: Chow: 64,3 / 16,7 / 19,0; LC-75: 1,7 / 92,8 / 5,5; LC-65: 1,9 / 86,3 / 11,8; LC-55: 2,2 / 78,7 / 19,1).

Während des Fütterungszeitraums wurden die Ratten jeden zweiten Tag gewogen. Nach zwei Wochen wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden der Ruheenergieverbrauch der Versuchstiere mittels indirekter Kalorimetrie bestimmt. Nach drei Wochen erfolgte an einigen Versuchstieren eine Serienblutentnahme, um die Auswirkungen der Nahrungszusammensetzung auf das zirkulierende GH zu bestimmen. Die Versuchsreihen wurden nach vier Wochen beendet. Vor Sektion wurden die Gesamtkörperlänge sowie die Länge diverser Körperabschnitte (HWS mit Schädel, BWS, LWS, Femur, Tibia) gemessen. Im Anschluss daran wurde per Dekapitation Vollblut zur Konzentrationsbestimmung von Serumparametern der GH / IGF-I Achse (Leptin, gesamt Ghrelin, acyliertes Ghrelin, FFA, Glukose, Insulin, IGFBP-3) gewonnen. Anschließend wurden während der Sektion verschiedene Organe (Haut, Leber, Milz, Niere, Pankreas, Herz, Gehirn) sowie einzelne Fettdepots (inguinal, renal, epididymal, braun) gewogen. Darüber hinaus wurden Gewebeproben für spätere molekularbiologische Untersuchungen asserviert.

Um die Auswirkungen der LCHF-Diäten auf das GH / IGF-I System im peripheren Gewebe zu untersuchen, wurde Lebergewebe, Muskel (M. quadriceps femoris) und Fettgewebe (epididymal, perirenal, inguinal) asserviert. Hypothalamisches und hypophysäres Gewebe wurden für die Analyse der zentralen Regulation der GH / IGF-I Achse entnommen. Das epididymale und perirenale Fettgewebe wurde zudem auf Parameter der

Fettgewebsinflammation untersucht. Außerdem wurden am perirenal Fettgewebe histologische Untersuchungen durchgeführt.

Im Rahmen der Studie entwickelte sich in allen Experimentaldiätgruppen (LC-75, LC-65, LC-55) ein ähnlicher Phänotyp. Er war charakterisiert durch eine Akkumulation von viszeralem Fettgewebe, welches von einer geringeren LBM und reduziertem Körperlängenwachstum begleitet wurde. Entsprechend den stöchiometrischen Vorgaben führte die sehr fettreiche Ernährung in allen Experimentalgruppen zu einem verringerten RQ.

Zumindest das Körperlängenwachstum war nicht unabhängig vom jeweiligen Gehalt an Proteinen in der Diät. Die Gesamtkörperlänge war in allen Diätgruppen signifikant geringer als die der Kontrollgruppe, allerdings war bei Begutachtung der Längenmessung der einzelnen Körperabschnitte (BWS, LWS, Femur) auffällig, dass lediglich die beiden Gruppen mit dem niedrigsten Protein- und dem höchsten Fettgehalt signifikant reduziert waren. Im Gegensatz dazu waren die einzelnen Körperabschnitte in der zu Chow proteingematchten Diätgruppe (LC-55) nicht signifikant verändert.

Eine grafische Darstellung der Körpergewichtsentwicklung zeigt eine negative Wichtung. Daraus lässt sich schließen, dass Fettgehalt und Gewichtszunahme über die Zeit betrachtet im umgekehrten Verhältnis zueinander stehen. Je höher der Fettgehalt war, desto geringer war der Gewichtsanstieg, wobei bei Betrachtung des Situs makromorphologisch eine Fettgewebsvermehrung nach vier Wochen imponierte. Auch bei der histologischen Begutachtung des perirenal Fettgewebes schien es als sei das Adipozytenvolumen vermehrt. Bestätigt wurde diese Annahme durch signifikant höhere Gewichte des epididymalen und perirenal Fettgewebes in allen Experimentalgruppen. Die LBM, welche in allen Gruppen signifikant reduziert war, verhielt sich komplementär dazu. Die geringere Körpergewichtszunahme, trotz höherer Gewichte der verschiedenen Fettdepots, könnte demnach auf ein reduziertes Längenwachstum und eine geringere LBM zurückzuführen sein.

Durch die Paarfütterung kann davon ausgegangen werden, dass die oben beschriebenen Effekte unabhängig von der Kalorienzufuhr waren. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass die makronutrienten Zusammensetzung der Diäten maßgeblich hierfür war.

In den weiterführenden Untersuchungen wurde schließlich gezeigt, dass die beobachteten Effekte mitunter eine Folge der beeinträchtigten GH / IGF-I Achse waren. Die Auswirkungen

der makronutrienten Zusammensetzung der Diäten auf dieses sensible System zeigten sich uns auf verschiedenen Ebenen.

Unabhängig von dem Protein- und Fettgehalt der jeweiligen Diät führte der Mangel an Kohlenhydraten in allen von uns verwendeten LCHF-Diäten durch die Reduktion der Expression von GHR-mRNA und IGF-I mRNA in der Leber zu einer hepatischen GH-Resistenz. Durch diese Veränderung kam es zu einer Beeinflussung der GHR-Signalisierung. Diese führte wiederum zu einer niedrigeren Konzentration von IGF-I und IGFBP-3 im Serum.

Die Auswirkungen der LCHF-Diäten auf die zentrale Regulation der GH / IGF-I Achse hingegen sind abhängig vom Anteil an Kohlenhydraten und Protein in den jeweiligen Diäten.

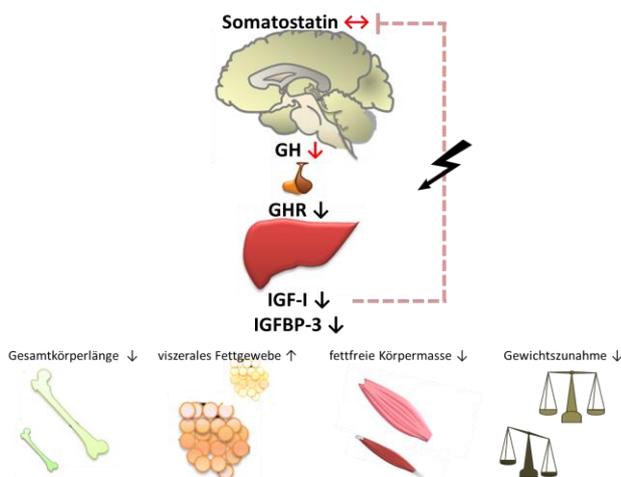
Die Ratten, welche mit der zu Chow proteingematchten LC-55 gefüttert wurden, zeigten einen intakten zentralen Rückkopplungsmechanismus des GH / IGF-I Systems. In dieser Gruppe reagierten die Versuchstiere auf die im Rahmen der LCHF-Diäten entstandenen niedrigen IGF-I Serumspiegel. Über den negativen Rückkopplungsmechanismus kam es zu einer Reduktion von Somatostatin. Das niedrige Somatostatin wiederum führte zu einem Anstieg der hypophysären GH-Sekretion. Aufgrund der oben beschriebenen hepatischen GH-Resistenz hatte dies aber keine weiteren Konsequenzen.

Im Gegensatz dazu war die zentrale Regulation (des GH / IGF-I System) in den Diätengruppen mit dem niedrigen Proteinanteil (LC-75 und LC-65) beeinträchtigt. In diesen Gruppen kam es nicht zur zentralen Hemmung der Somatostatinausschüttung. Eine kompensatorisch gesteigerte GH-Sekretion blieb demnach in diesen Diätgruppen aus.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Mangel an Kohlenhydraten in LCHF-Diäten den Phänotyp der Versuchstiere veränderte. Es machte allerdings den Anschein, als sei zumindest das reduzierte Körperlängenwachstum abhängig vom Proteingehalt der Diäten. Außerdem führte der Kohlenhydratmangel der Experimentaldiäten, unabhängig von der weiteren makronutrienten Zusammensetzung der Diät, zu einer hepatischen GH-Resistenz. Eine adäquate Reaktion auf die daraus resultierenden Veränderungen der Serumparameter war hingegen nur bei einem ausreichend hohen Proteingehalt der Diät gegeben. Nur dann kam es zu einer Reduktion von Somatostatin und in folge dessen zu einem Anstieg der GH-Sekretion. Aufgrund der hepatischen GH-Resistenz blieb dies allerdings ohne Konsequenzen.

Kohlenhydratanteil gering
→ hepatische GH-Resistenz

Proteinanteil **gering**
 → Rückkopplungsmechanismus **gestört**



Proteinanteil **regulär**
 → Rückkopplungsmechanismus **intakt**

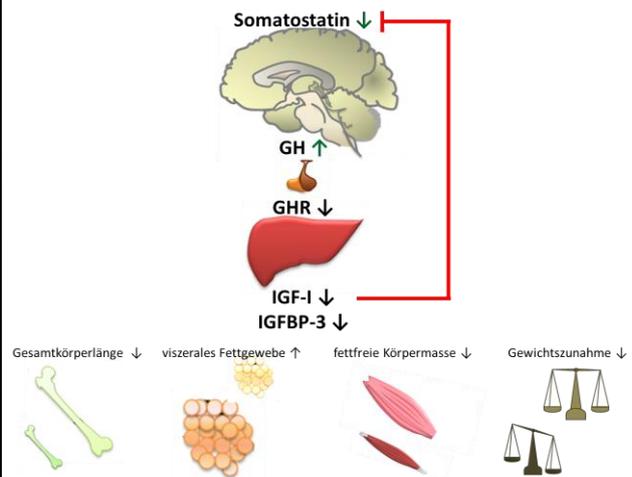


Abb.: 5-1 Vereinfachte Darstellung der Ergebnisse:

- der geringe Kohlenhydratanteil führt zu einer hepatischen GH-Resistenz.
- ein regulärer Proteinanteil weist einen intakten Rückkopplungsmechanismus auf.
- ein zu geringer Proteinanteil führt zu einem gestörten Rückkopplungsmechanismus.

Bei den Untersuchungen des perirenal und epididymalen Fettgewebes der isoenergetisch gefütterten LCHF-Diäten fanden sich keine Hinweise auf eine Fettgewebsinflammation. Auch die immunhistochemische Färbung des perirenal Fettgewebes auf Makrophagen als Indikator einer solchen Reaktion war unauffällig. Gleichwohl scheint jedoch ein Zeitraum von vier Wochen ausreichend zu sein, um zumindest eine Makrophageneinwanderung in das perirenale Fettgewebe zu induzieren. Dieses konnte durch eine Positivkontrolle einer ad libitum gefütterten Vergleichsgruppe gezeigt werden.

7 Summary

The Growth Hormone and Insulin - like growth factor system is a key factor in the regulation of growth, lipid metabolism, glucose metabolism and metabolic processes. The effects of nutrient composition on Growth Hormone and its control circuits are poorly studied. To investigate the impact of carbohydrates, fat and protein on the GH / IGF-I axis, we fed different LCHF-diets to twelve week old male Wistar rats over a period of four weeks, isoenergetically. The diets differed only in their amounts of protein and fat, whereas the percentage of carbohydrates was always below 2.3% (percentage of carbohydrates / fat / protein: Chow: 64.3 / 16.7 / 19.0; LC-75: 1.7 / 92.8 / 5.5; LC-65: 1.9 / 86.3 / 11.8; LC-55: 2.2 / 78.7 / 19.1).

During the feeding period, the test rats were weighed every second day. At two weeks we determined the resting energy expenditure over a period of 24 hours by indirect calorimetry. At three weeks several blood samples were taken sequentially to determine the effect of the nutritional composition to the circulating GH. The series of experiments were terminated after four weeks. The total body length and the length of various body segments (cervical spine including the head, thoracic spine and lumbar spine, femur, tibia) were measured before dissection. This was followed by decapitation with whole-blood sampling to determine the concentration of regulating serum parameters of the GH / IGF -I axis (leptin, total ghrelin, acylated ghrelin, FFA, glucose, insulin, IGFBP-3). Afterwards certain organs (skin, liver, spleen, kidney, pancreas, heart, brain) as well as individual fat pads (inguinal, renal, epididymal, brown) were weighed during dissection. In addition, tissue samples for future molecular genetic studies were taken.

To investigate the effects of LCHF-diets on the GH / IGF -I system in peripheral tissues, samples of liver, muscle (*M. quadriceps femoris*) and adipose tissue (epididymal, perirenal, inguinal) were taken. For analysis of the central regulation of GH / IGF-I axis, hypothalamus and pituitary glands were used.

Samples of epididymal and perirenal adipose tissue were examined for parameters of adipose tissue inflammation. Additional histological investigations were carried out on the perirenal adipose tissue.

The same phenotype was observed in all LCHF-diets (LC-75, LC-65, LC-55), expressed by an accumulation of visceral adipose tissue, which was accompanied by lower LBM and reduced body length growth. According to stoichiometric aspects, the high fat content in the experimental groups led to a reduction of the RQ.

Body length growth was not independent of the amount of protein in the diet. Although total body length was significantly shorter in all diet groups compared to the control group, individual body segments (thoracic and lumbar spine, femur) were only significantly shorter in the two groups with the lowest protein and the highest fat content. In contrast, individual body segments were not significantly changed in the diet-group protein-matched to Chow (LC-55).

Statistical analysis of body weight gain shows a negative weighting. Concluding from this, fat content and weight gain are in inverse proportion to each other. The higher the fat content was, the lower the increase in weight. On close examination of the operative site an increase of adipose tissue was visible to the naked eye after four weeks. Also in the histological assessment of perirenal adipose tissue, the adipocyte volume appeared swollen. This was confirmed by significantly higher weights of epididymal and perirenal adipose tissue in all experimental groups. Complementary to this, LBM was significantly reduced in all groups. The reduced body weight gain, despite higher weights of various fat pads, could be due to a reduced linear growth and lower LBM.

Since pairfeeding was performed, it is safe to assume that the effects stated above were independent of caloric intake. Thereby one might assume that the macronutrient composition of the diets made significant contributions to these results. In further studies we demonstrated that the observed effects were a consequence of the impaired GH / IGF-I axis, among other things. It became evident that the effects of the macronutrient composition of the diets on this sensitive system occurred at various levels. Independent of the protein and fat content of each diet, the lack of carbohydrates in all LCHF-diets induced a state of hepatic GH resistance, by reducing the expression of GHR mRNA and IGF-I mRNA in the liver. This results in an impaired GHR signaling, which in turn led to reduced concentration of IGF-I and IGFBP-3.

However, the effects of LCHF-diets on the central regulation of the GH / IGF -I axis depend on the proportion of carbohydrates and protein in the diets.

The rats fed with the LC-55, which was protein-matched to Chow, showed an intact central feedback mechanism of GH / IGF-I system. In this group, rats responded to the low IGF -I serum levels that appeared in the LCHF-groups. The following negative feedback mechanism led to a suppression of somatostatin, which in turn led to an increase in pituitary GH secretion. Due to the hepatic GH-resistance described above this had no further consequences. In contrast, the central regulation (of the GH / IGF-I system) was impaired in the diet groups fed the LCHF-diets which were lower in their protein content (LC-75, LC-65). In these groups a suppression of central somatostatin expression could not be recorded. Accordingly, a compensatory increased GH secretion did not occur in these diet groups.

In conclusion one might say that the lack of carbohydrates in LCHF-diets altered the phenotype of the animals. It appeared as if at least the reduced body length growth was dependent on the protein content in the diets, among other things. In addition, the carbohydrate deficiency in the experimental diets led to hepatic GH resistance, independent of further macronutrient composition of the diet. An adequate response to the resulting change in serum parameters was only given with a sufficiently high protein content of the diet. Then somatostatin was suppressed and accordingly the GH secretion increased, although this was without consequences due to hepatic GH resistance.

low carbohydrate
→ hepatic GH-resistance

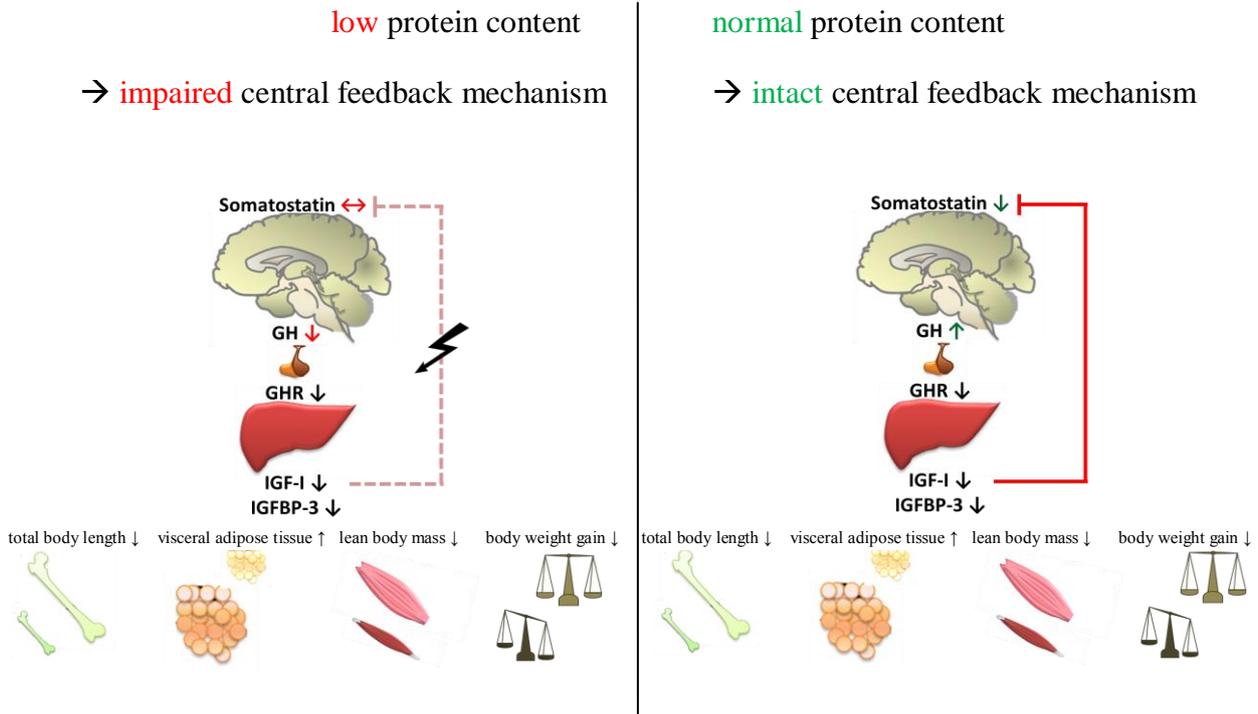


Abb.: 5-1 simplified illustration:

- low carbohydrate content leads to hepatic GH-resistance.
- regular protein content shows an intact central feedback mechanism.
- low protein content leads to an impaired central feedback mechanism

In further studies of epididymal and perirenal adipose tissue samples of isoenergetically fed LCHF-diet groups, there was no evidence of adipose tissue inflammation. Immunohistochemical staining of perirenal adipose tissue for macrophages as an indicator of such a reaction was normal. Nevertheless, a period of four weeks seems sufficient to induce macrophage migration in perirenal adipose tissue. This could be shown in the positive control of an *ad libitum* fed control group.

8 Literaturverzeichnis

1. Herold, G., *Innere Medizin*. 2012, Köln.
2. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. 894: p. i-xii, 1-253.
3. Despres, J.P., I. Lemieux, and D. Prud'homme, *Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients*. *BMJ*, 2001. 322(7288): p. 716-20.
4. Lean, M.E., T.S. Han, and C.E. Morrison, *Waist circumference as a measure for indicating need for weight management*. *BMJ*, 1995. 311(6998): p. 158-61.
5. Hyde, R., *Europe battles with obesity*. *Lancet*, 2008. 371(9631): p. 2160-1.
6. Helmert, U. and H. Strube, *[The development of obesity in Germany in the period from 1985 until 2000]*. *Gesundheitswesen*, 2004. 66(7): p. 409-15.
7. Thompson, D., et al., *Body mass index and future healthcare costs: a retrospective cohort study*. *Obes Res*, 2001. 9(3): p. 210-8.
8. Benecke A, V.H. *Übergewicht und Adipositas*. Robert Koch-Institut; Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2003. 16.
9. *Overweight, obesity, and health risk. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity*. *Arch Intern Med*, 2000. 160(7): p. 898-904.
10. Sjostrom, C.D., et al., *Reduction in incidence of diabetes, hypertension and lipid disturbances after intentional weight loss induced by bariatric surgery: the SOS Intervention Study*. *Obes Res*, 1999. 7(5): p. 477-84.
11. Torgerson, J.S., et al., *XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients*. *Diabetes Care*, 2004. 27(1): p. 155-61.
12. Caterson, I.D., et al., *Prevention Conference VII: Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: Group III: worldwide comorbidities of obesity*. *Circulation*, 2004. 110(18): p. e476-83.
13. Eckel, R.H. and R.M. Krauss, *American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. AHA Nutrition Committee*. *Circulation*, 1998. 97(21): p. 2099-100.

14. Kenchaiah, S., et al., *Obesity and the risk of heart failure*. N Engl J Med, 2002. 347(5): p. 305-13.
15. Brown, C.D., et al., *Body mass index and the prevalence of hypertension and dyslipidemia*. Obes Res, 2000. 8(9): p. 605-19.
16. Pischon, T., et al., *Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC)*. J Natl Cancer Inst, 2006. 98(13): p. 920-31.
17. Bergstrom, A., et al., *Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe*. Int J Cancer, 2001. 91(3): p. 421-30.
18. Huang, Z., et al., *Waist circumference, waist:hip ratio, and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study*. Am J Epidemiol, 1999. 150(12): p. 1316-24.
19. Chow, W.H., et al., *Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men*. N Engl J Med, 2000. 343(18): p. 1305-11.
20. Pi-Sunyer, X., *The medical risks of obesity*. Postgrad Med, 2009. 121(6): p. 21-33.
21. Uysal, K.T., et al., *Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function*. Nature, 1997. 389(6651): p. 610-4.
22. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. 259(5091): p. 87-91.
23. Yudkin, J.S., et al., *C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. 19(4): p. 972-8.
24. Festa, A., et al., *Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS)*. Circulation, 2000. 102(1): p. 42-7.
25. Schwandt P., P.K., *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Vol. 3. 2006: Schattauer.
26. Ye, J., *Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance*. Int J Obes (Lond), 2009. 33(1): p. 54-66.
27. Sears, B., *Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women*. MedGenMed, 2007. 9(3): p. 57; author reply 57.

28. Shai, I., et al., *Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet*. N Engl J Med, 2008. 359(3): p. 229-41.
29. Atkins, R., *Dr. Atkins' New Diet Revolution*. 2009: Harper.
30. Nebeling, L.C. and E. Lerner, *Implementing a ketogenic diet based on medium-chain triglyceride oil in pediatric patients with cancer*. J Am Diet Assoc, 1995. 95(6): p. 693-7.
31. Tisdale, M.J. and R.A. Brennan, *A comparison of long-chain triglycerides and medium-chain triglycerides on weight loss and tumour size in a cachexia model*. Br J Cancer, 1988. 58(5): p. 580-3.
32. J. Rassow, K.H., R. Netzker, R. Deutzmann, *Duale Reihe Biochemie*. 2006: Georg Thieme Verlag KG.
33. J. M. Berg, J.L.T., L. Stryer, *Stryer Biochemie* 2010: Spektrum Akademischer Verlag.
34. Gasior, M., M.A. Rogawski, and A.L. Hartman, *Neuroprotective and disease-modifying effects of the ketogenic diet*. Behav Pharmacol, 2006. 17(5-6): p. 431-9.
35. Maalouf, M., J.M. Rho, and M.P. Mattson, *The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies*. Brain Res Rev, 2009. 59(2): p. 293-315.
36. Stafstrom, C.E. and J.M. Rho, *The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders*. Front Pharmacol, 2012. 3: p. 59.
37. El-Mallakh, R.S. and M.E. Paskitti, *The ketogenic diet may have mood-stabilizing properties*. Med Hypotheses, 2001. 57(6): p. 724-6.
38. Wexler, I.D., et al., *Outcome of pyruvate dehydrogenase deficiency treated with ketogenic diets. Studies in patients with identical mutations*. Neurology, 1997. 49(6): p. 1655-61.
39. Klepper, J., *Glucose transporter deficiency syndrome (GLUT1DS) and the ketogenic diet*. Epilepsia, 2008. 49 Suppl 8: p. 46-9.
40. Hoffmann, G.F., et al., *Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency*. Neuropediatrics, 1996. 27(3): p. 115-23.
41. Swoboda, K.J., et al., *Infantile phosphofructokinase deficiency with arthrogryposis: clinical benefit of a ketogenic diet*. J Pediatr, 1997. 131(6): p. 932-4.

42. Neal, E.G., et al., *The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial*. Lancet Neurol, 2008. 7(6): p. 500-6.
43. Marsh, E.B., et al., *The outcome of children with intractable seizures: a 3- to 6-year follow-up of 67 children who remained on the ketogenic diet less than one year*. Epilepsia, 2006. 47(2): p. 425-30.
44. Prins, M.L., *Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. 28(1): p. 1-16.
45. Appelberg, K.S., D.A. Hovda, and M.L. Prins, *The effects of a ketogenic diet on behavioral outcome after controlled cortical impact injury in the juvenile and adult rat*. J Neurotrauma, 2009. 26(4): p. 497-506.
46. Kim do, Y., J. Vallejo, and J.M. Rho, *Ketones prevent synaptic dysfunction induced by mitochondrial respiratory complex inhibitors*. J Neurochem, 2010. 114(1): p. 130-41.
47. Kashiwaya, Y., et al., *D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(10): p. 5440-4.
48. Vanitallie, T.B., et al., *Treatment of Parkinson disease with diet-induced hyperketonemia: a feasibility study*. Neurology, 2005. 64(4): p. 728-30.
49. Schwartzkroin, P.A., et al., *Does ketogenic diet alter seizure sensitivity and cell loss following fluid percussion injury?* Epilepsy Res, 2010. 92(1): p. 74-84.
50. Linard, B., et al., *Ketogenic diet exhibits neuroprotective effects in hippocampus but fails to prevent epileptogenesis in the lithium-pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy in adult rats*. Epilepsia, 2010. 51(9): p. 1829-36.
51. Zuccoli, G., et al., *Metabolic management of glioblastoma multiforme using standard therapy together with a restricted ketogenic diet: Case Report*. Nutr Metab (Lond), 2010. 7: p. 33.
52. Baumeister, F.A.M., *Ketogene Diät - Ernährung als Therapiestrategie bei Epilepsie und anderen Erkrankungen* Vol. 1. 2012: Schattauer.
53. Tai, K.K., et al., *Ketogenic diet prevents cardiac arrest-induced cerebral ischemic neurodegeneration*. J Neural Transm, 2008. 115(7): p. 1011-7.
54. Evangeliou, A., et al., *Application of a ketogenic diet in children with autistic behavior: pilot study*. J Child Neurol, 2003. 18(2): p. 113-8.

55. Maggioni, F., M. Margoni, and G. Zanchin, *Ketogenic diet in migraine treatment: a brief but ancient history*. *Cephalalgia*, 2011. 31(10): p. 1150-1.
56. *Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation*. FAO Food Nutr Pap, 1998. 66: p. 1-140.
57. Elmadfa, I.L.C., *Ernährung des Menschen*. Vol. 4. 2004: UTB, Stuttgart.
58. Ascherio, A., et al., *Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States*. *BMJ*, 1996. 313(7049): p. 84-90.
59. Hu, F.B., et al., *Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women*. *Am J Clin Nutr*, 1999. 70(6): p. 1001-8.
60. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. *N Engl J Med*, 1989. 320(14): p. 915-24.
61. Abbott, R.D., et al., *High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infarction. The Framingham Study*. *Arteriosclerosis*, 1988. 8(3): p. 207-11.
62. American Institute for Cancer Research, W.C.R.F., *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. 2007: Amer Inst for Cancer Research.
63. Stamler, J., et al., *Low risk-factor profile and long-term cardiovascular and noncardiovascular mortality and life expectancy: findings for 5 large cohorts of young adult and middle-aged men and women*. *JAMA*, 1999. 282(21): p. 2012-8.
64. Siscovick, D.S., et al., *Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest*. *JAMA*, 1995. 274(17): p. 1363-7.
65. Wolever, T.M., et al., *Measuring the glycemic index of foods: interlaboratory study*. *Am J Clin Nutr*, 2008. 87(1): p. 247S-257S.
66. Kies, C., *Comparative value of various sources of nonspecific nitrogen for the human*. *J Agric Food Chem*, 1974. 22(2): p. 190-3.
67. Reeds, P.J. and T.W. Hutchens, *Protein requirements: from nitrogen balance to functional impact*. *J Nutr*, 1994. 124(9 Suppl): p. 1754S-1764S.
68. Young, Z., *Effects of Altering the Proportions of Essential to Nonessential Amino Acids on Growth and Plasma Amino Acid Levels in the Rat*. *J. Nutr*, 1958. 96:21-7.

69. Consultation, J.F.W.E., *Protein Quality Evaluation*. 1991: Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
70. Ernährung, D.G.f., *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. Vol. 1. 2008: Umschau Buchverlag.
71. Millward, D.J., et al., *Physical activity, protein metabolism and protein requirements*. Proc Nutr Soc, 1994. 53(1): p. 223-40.
72. el-Khoury, A.E., et al., *Moderate exercise at energy balance does not affect 24-h leucine oxidation or nitrogen retention in healthy men*. Am J Physiol, 1997. 273(2 Pt 1): p. E394-407.
73. Chantalat, L., Jones, N.D., Korber, F., Navaza, J., Pavlovsky, A.G., *The crystal-structure of wild-type growth-hormone at 2.5 angstrom resolution*. Protein Pept.Lett., 1995. 2: p. 333-340.
74. Gene. *GHI Growth Hormone 1 [Homo sapiens]*. 08.11.2012.
75. Rosenbloom, A.L., et al., *The little women of Loja--Growth Hormone-receptor deficiency in an inbred population of southern Ecuador*. N Engl J Med, 1990. 323(20): p. 1367-74.
76. Rosenfeld, R.G., A.L. Rosenbloom, and J. Guevara-Aguirre, *Growth Hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency*. Endocr Rev, 1994. 15(3): p. 369-90.
77. Jeay, S., et al., *Growth Hormone exerts antiapoptotic and proliferative effects through two different pathways involving nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase*. Endocrinology, 2001. 142(1): p. 147-56.
78. Lipkin, S.M., et al., *Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent Growth Hormone gene expression*. Genes Dev, 1993. 7(9): p. 1674-87.
79. Chen, E.Y., et al., *The human Growth Hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution*. Genomics, 1989. 4(4): p. 479-97.
80. Bodner, M., et al., *The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein*. Cell, 1988. 55(3): p. 505-18.
81. Guillemin, R., et al., *Growth Hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly*. Science, 1982. 218(4572): p. 585-7.

82. Gaylinn, B.D., et al., *Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for Growth Hormone-releasing hormone*. Mol Endocrinol, 1993. 7(1): p. 77-84.
83. Brazeau, P., et al., *Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary Growth Hormone*. Science, 1973. 179(68): p. 77-9.
84. Merchenthaler, I., C.R. Thomas, and A. Arimura, *Immunocytochemical localization of Growth Hormone releasing factor (GHRF)-containing structures in the rat brain using anti-rat GHRF serum*. Peptides, 1984. 5(6): p. 1071-5.
85. Billestrup, N., L.W. Swanson, and W. Vale, *Growth Hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(18): p. 6854-7.
86. Frohman, L.A., T.R. Downs, and P. Chomczynski, *Regulation of Growth Hormone secretion*. Front Neuroendocrinol, 1992. 13(4): p. 344-405.
87. Asa, S.L., et al., *Human fetal adenohypophysis. Histologic and immunocytochemical analysis*. Neuroendocrinology, 1986. 43(3): p. 308-16.
88. Obal, F., Jr. and J.M. Krueger, *The somatotrophic axis and sleep*. Rev Neurol (Paris), 2001. 157(11 Pt 2): p. S12-5.
89. Wu, Z., et al., *Detection of doping with human Growth Hormone*. Lancet, 1999. 353(9156): p. 895.
90. Matsubara, S., et al., *Differential gene expression of Growth Hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues*. Endocrinology, 1995. 136(9): p. 4147-50.
91. Lin, C., et al., *Pit-1-dependent expression of the receptor for Growth Hormone releasing factor mediates pituitary cell growth*. Nature, 1992. 360(6406): p. 765-8.
92. Petersenn, S., et al., *Structure and regulation of the human Growth Hormone-releasing hormone receptor gene*. Mol Endocrinol, 1998. 12(2): p. 233-47.
93. Brazeau, P., et al., *High biological activity of the synthetic replicates of somatostatin-28 and somatostatin-25*. Regul Pept, 1981. 1(4): p. 255-64.
94. Dieguez, C., et al., *Growth Hormone and its modulation*. J R Coll Physicians Lond, 1988. 22(2): p. 84-91.

95. Brent, G.A., et al., *Effects of varying the position of thyroid hormone response elements within the rat Growth Hormone promoter: implications for positive and negative regulation by 3,5,3'-triiodothyronine*. Mol Endocrinol, 1991. 5(4): p. 542-8.
96. Casanueva, F.F., et al., *Acute administration of corticoids: a new and peculiar stimulus of Growth Hormone secretion in man*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. 70(1): p. 234-7.
97. Kerrigan, J.R. and A.D. Rogol, *The impact of gonadal steroid hormone action on Growth Hormone secretion during childhood and adolescence*. Endocr Rev, 1992. 13(2): p. 281-98.
98. Roberts, C.R., RG., *The IGF System: Molecular Biology, Physiology, and Clinical Applications*. 1999, Berlin: Springer.
99. Kruse, K.K., W. , *Pädiatrische Endokrinologie*. 1999, Stuttgart: Thieme Verlag.
100. Ohlsson, C., et al., *The relative importance of endocrine versus autocrine/paracrine insulin-like growth factor-I in the regulation of body growth*. Pediatr Nephrol, 2000. 14(7): p. 541-3.
101. Isaksson, O.G., et al., *Metabolic functions of liver-derived (endocrine) insulin-like growth factor I*. Horm Res, 2001. 55 Suppl 2: p. 18-21.
102. Sjogren, K., et al., *A transgenic model to determine the physiological role of liver-derived insulin-like growth factor I*. Minerva Endocrinol, 2002. 27(4): p. 299-311.
103. Sjogren, K., et al., *A model for tissue-specific inducible insulin-like growth factor-I (IGF-I) inactivation to determine the physiological role of liver-derived IGF-I*. Endocrine, 2002. 19(3): p. 249-56.
104. Sjogren, K., et al., *Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(12): p. 7088-92.
105. Sjogren, K., et al., *Liver-derived IGF-I is of importance for normal carbohydrate and lipid metabolism*. Diabetes, 2001. 50(7): p. 1539-45.
106. Jain, S., et al., *Insulin-like growth factor-I resistance*. Endocr Rev, 1998. 19(5): p. 625-46.
107. Wilson, E.M., Y. Oh, and R.G. Rosenfeld, *Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: identification of 31kD IGFBP-7 in human biological fluids and*

- Hs578T human breast cancer conditioned media*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. 82(4): p. 1301-3.
108. Ballard, J., et al., *On the nomenclature of the IGF binding proteins*. Acta Endocrinol (Copenh), 1989. 121(5): p. 751-2.
109. Klauwer, D., et al., *IGF-I, IGF-II, free IGF-I and IGFBP-1, -2 and -3 levels in venous cord blood: relationship to birthweight, length and gestational age in healthy newborns*. Acta Paediatr, 1997. 86(8): p. 826-33.
110. Baxter, R.C., *Characterization of the acid-labile subunit of the Growth Hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex*. J Clin Endocrinol Metab, 1988. 67(2): p. 265-72.
111. Holman, S.R. and R.C. Baxter, *Insulin-like growth factor binding protein-3: factors affecting binary and ternary complex formation*. Growth Regul, 1996. 6(1): p. 42-7.
112. Conover, C.A., *Regulation and physiological role of insulin-like growth factor binding proteins*. Endocr J, 1996. 43 Suppl: p. S43-8.
113. Kelnar, C.J.H.S., M.O.; Saenger, P.; Cowell, C.T., *Growth Disorders*. 2007: Arnold Publishers.
114. Fink, M.P. and S.O. Heard, *Laboratory models of sepsis and septic shock*. J Surg Res, 1990. 49(2): p. 186-96.
115. J. Weiss, K.B., E. Bernsmann, H. Dietrich, K. Nebendahl, *Tierpflege in Forschung und Klinik*. Vol. 3. 2003, Stuttgart: Enke Verlag.
116. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals* Vol. 4. 1995, Washington, D.C.: National Academies Press.
117. Roe, F.J., et al., *The Biosure Study: influence of composition of diet and food consumption on longevity, degenerative diseases and neoplasia in Wistar rats studied for up to 30 months post weaning*. Food Chem Toxicol, 1995. 33 Suppl 1: p. 1S-100S.
118. Berryman, D.E., et al., *Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: lessons from animal models*. Growth Horm IGF Res, 2008. 18(6): p. 455-71.
119. Redman, L.M., et al., *The effect of caloric restriction interventions on Growth Hormone secretion in nonobese men and women*. Aging Cell, 2010. 9(1): p. 32-9.
120. Wheatley, K.E., et al., *Low-carbohydrate diet versus caloric restriction: effects on weight loss, hormones, and colon tumor growth in obese mice*. Nutr Cancer, 2008. 60(1): p. 61-8.

121. Harber, M.P., et al., *Effects of dietary carbohydrate restriction with high protein intake on protein metabolism and the somatotrophic axis*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. 90(9): p. 5175-81.
122. Luque, R.M. and R.D. Kineman, *Impact of obesity on the Growth Hormone axis: evidence for a direct inhibitory effect of hyperinsulinemia on pituitary function*. Endocrinology, 2006. 147(6): p. 2754-63.
123. Cappon, J.P., et al., *Acute effects of high fat and high glucose meals on the Growth Hormone response to exercise*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. 76(6): p. 1418-22.
124. Poehlman, E.T. and K.C. Copeland, *Influence of physical activity on insulin-like growth factor-I in healthy younger and older men*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. 71(6): p. 1468-73.
125. Bielohuby, M., et al., *Short-term exposure to low-carbohydrate, high-fat diets induces low bone mineral density and reduces bone formation in rats*. J Bone Miner Res, 2010. 25(2): p. 275-84.
126. Weir, J.B., *New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism*. J Physiol, 1949. 109(1-2): p. 1-9.
127. Romero Mdel, M., et al., *Effect of sex and prior exposure to a cafeteria diet on the distribution of sex hormones between plasma and blood cells*. PLoS One, 2012. 7(3): p. e34381.
128. Ong, Z.Y., et al., *Chronic intake of a cafeteria diet and subsequent abstinence. Sex-specific effects on gene expression in the mesolimbic reward system*. Appetite, 2013. 65: p. 189-99.
129. Amador-Noguez, D., et al., *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): p. 1086-100.
130. Lissett, C.A. and S.M. Shalet, *The insulin-like growth factor-I generation test: peripheral responsiveness to Growth Hormone is not decreased with ageing*. Clin Endocrinol (Oxf), 2003. 58(2): p. 238-45.
131. Frutos, M.G., et al., *Insights into a role of GH secretagogues in reversing the age-related decline in the GH/IGF-I axis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 293(5): p. E1140-52.

132. Barzilai, N., et al., *The critical role of metabolic pathways in aging*. Diabetes, 2012. 61(6): p. 1315-22.
133. Pichot, P., [*Epidemiology of depression*]. Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova, 1990. 90(12): p. 82-4.
134. Arts, J.W., et al., *The impact of transportation on physiological and behavioral parameters in Wistar rats: implications for acclimatization periods*. ILAR J, 2012. 53(1): p. E82-98.
135. Pertsov, S.S., *The behavior of rats in response to changes in the light regime and administration of melatonin*. Neurosci Behav Physiol, 2006. 36(7): p. 767-72.
136. Bissette, G., et al., *Apparent seasonal rhythms in hypothalamic neuropeptides in rats without photoperiod changes*. Endocrinology, 1995. 136(2): p. 622-8.
137. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, Jr., *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. J Nutr, 1993. 123(11): p. 1939-51.
138. Bough, K.J. and D.A. Eagles, *A ketogenic diet increases the resistance to pentylenetetrazole-induced seizures in the rat*. Epilepsia, 1999. 40(2): p. 138-43.
139. Kennedy, A.R., et al., *A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 292(6): p. E1724-39.
140. Fagiolo, U., et al., *Immune dysfunction in the elderly: effect of thymic hormone administration on several in vivo and in vitro immune function parameters*. Aging (Milano), 1990. 2(4): p. 347-55.
141. Bielohuby, M., et al., *Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. 300(1): p. E65-76.
142. Odermatt, A., *The Western-style diet: a major risk factor for impaired kidney function and chronic kidney disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. 301(5): p. F919-31.
143. Ropp, J.K., R.H. Raub, and J.E. Minton, *The effect of dietary energy source on serum concentration of insulin-like growth factor-I Growth Hormone, insulin, glucose, and fat metabolites in weanling horses*. J Anim Sci, 2003. 81(6): p. 1581-9.
144. Bielohuby, M., S. Popp, and M. Bidlingmaier, *Influence of pre-analytical conditions on the measurement of components of the GH/IGF axis in rats*. Growth Horm IGF Res, 2013.

145. Shai, I., et al., *Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet*. N Engl J Med, 2008. 359(3): p. 229-41.
146. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. Physiol Rev, 2004. 84(1): p. 277-359.
147. Astrup, A., T. Meinert Larsen, and A. Harper, *Atkins and other low-carbohydrate diets: hoax or an effective tool for weight loss?* Lancet, 2004. 364(9437): p. 897-9.
148. Bielohuby, M., et al., *Predicting metabolisable energy in commercial rat diets: physiological fuel values may be misleading*. Br J Nutr, 2010. 103(10): p. 1525-33.
149. Foster, G.D., et al., *A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity*. N Engl J Med, 2003. 348(21): p. 2082-90.
150. Coschigano, K.T., et al., *Deletion, but not antagonism, of the mouse Growth Hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span*. Endocrinology, 2003. 144(9): p. 3799-810.
151. Caton, S.J., et al., *Low-carbohydrate high-fat diets: regulation of energy balance and body weight regain in rats*. Obesity (Silver Spring), 2009. 17(2): p. 283-9.
152. Adam-Perrot, A., P. Clifton, and F. Brouns, *Low-carbohydrate diets: nutritional and physiological aspects*. Obes Rev, 2006. 7(1): p. 49-58.
153. Bravata, D.M., et al., *Efficacy and safety of low-carbohydrate diets: a systematic review*. JAMA, 2003. 289(14): p. 1837-50.
154. Arras, J.D., *Getting down to cases: the revival of casuistry in bioethics*. J Med Philos, 1991. 16(1): p. 29-51.
155. Stern, L., et al., *The effects of low-carbohydrate versus conventional weight loss diets in severely obese adults: one-year follow-up of a randomized trial*. Ann Intern Med, 2004. 140(10): p. 778-85.
156. Nordmann, A.J., et al., *Effects of low-carbohydrate vs low-fat diets on weight loss and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Arch Intern Med, 2006. 166(3): p. 285-93.
157. Hession, M., et al., *Systematic review of randomized controlled trials of low-carbohydrate vs. low-fat/low-calorie diets in the management of obesity and its comorbidities*. Obes Rev, 2009. 10(1): p. 36-50.

158. Boden, G., et al., *Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes*. *Ann Intern Med*, 2005. 142(6): p. 403-11.
159. Meckling, K.A., C. O'Sullivan, and D. Saari, *Comparison of a low-fat diet to a low-carbohydrate diet on weight loss, body composition, and risk factors for diabetes and cardiovascular disease in free-living, overweight men and women*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(6): p. 2717-23.
160. Layman, D.K., et al., *A reduced ratio of dietary carbohydrate to protein improves body composition and blood lipid profiles during weight loss in adult women*. *J Nutr*, 2003. 133(2): p. 411-7.
161. Axen, K.V. and K. Axen, *Very low-carbohydrate versus isocaloric high-carbohydrate diet in dietary obese rats*. *Obesity (Silver Spring)*, 2006. 14(8): p. 1344-52.
162. Lobley, G.E., et al., *Impact of high-protein diets with either moderate or low carbohydrate on weight loss, body composition, blood pressure and glucose tolerance in rats*. *Br J Nutr*, 2007. 97(6): p. 1099-108.
163. McCargar, L.J., V.E. Baracos, and M.T. Clandinin, *Influence of dietary carbohydrate-to-fat ratio on whole body nitrogen retention and body composition in adult rats*. *J Nutr*, 1989. 119(9): p. 1240-5.
164. Betz, M.J., et al., *Isoenergetic feeding of low carbohydrate-high fat diets does not increase brown adipose tissue thermogenic capacity in rats*. *PLoS One*, 2012. 7(6): p. e38997.
165. Malluche, H.H., et al., *Influence of the parathyroid glands on bone metabolism*. *Eur J Clin Invest*, 2006. 36 Suppl 2: p. 23-33.
166. Riggs, B.L., S. Khosla, and L.J. Melton, 3rd, *Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton*. *Endocr Rev*, 2002. 23(3): p. 279-302.
167. Isgaard, J., et al., *Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats*. *Am J Physiol*, 1986. 250(4 Pt 1): p. E367-72.
168. Wang, Y., et al., *Insulin-like growth factor-I is essential for embryonic bone development*. *Endocrinology*, 2006. 147(10): p. 4753-61.
169. Boudignon, B.M., et al., *Insulin-like growth factor I stimulates recovery of bone lost after a period of skeletal unloading*. *J Appl Physiol*, 2007. 103(1): p. 125-31.

170. Wit, J.M., W. Oostdijk, and M. Losekoot, *Spectrum of insulin-like growth factor deficiency*. *Endocr Dev*, 2012. 23: p. 30-41.
171. Martin, A., et al., *Opposite effects of leptin on bone metabolism: a dose-dependent balance related to energy intake and insulin-like growth factor-I pathway*. *Endocrinology*, 2007. 148(7): p. 3419-25.
172. Caton, S.J., et al., *Low-carbohydrate high-fat diets in combination with daily exercise in rats: effects on body weight regulation, body composition and exercise capacity*. *Physiol Behav*, 2012. 106(2): p. 185-92.
173. Schutz, Y., *On problems of calculating energy expenditure and substrate utilization from respiratory exchange data*. *Z Ernahrungswiss*, 1997. 36(4): p. 255-62.
174. Jornayvaz, F.R., et al., *A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. 299(5): p. E808-15.
175. Sadurskis, A., et al., *Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: increased UCP content and NST capacity*. *Am J Physiol*, 1995. 269(2 Pt 1): p. E351-60.
176. Mejia-Naranjo, W., et al., *Regulation of the splenic somatotropic axis by dietary protein and insulin-like growth factor-I in the rat*. *Growth Horm IGF Res*, 2003. 13(5): p. 254-63.
177. Ammann, P., et al., *Administration of Growth Hormone in selectively protein-deprived rats decreases BMD and bone strength*. *Bone*, 2010. 46(6): p. 1574-81.
178. Tannenbaum, G.S., W. Gurd, and M. Lapointe, *Leptin is a potent stimulator of spontaneous pulsatile Growth Hormone (GH) secretion and the GH response to GH-releasing hormone*. *Endocrinology*, 1998. 139(9): p. 3871-5.
179. Hartman, M.L., et al., *Augmented Growth Hormone (GH) secretory burst frequency and amplitude mediate enhanced GH secretion during a two-day fast in normal men*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992. 74(4): p. 757-65.
180. Maccario, M., et al., *Short-term fasting abolishes the sex-related difference in GH and leptin secretion in humans*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. 279(2): p. E411-6.
181. Giustina, A. and J.D. Veldhuis, *Pathophysiology of the neuroregulation of Growth Hormone secretion in experimental animals and the human*. *Endocr Rev*, 1998. 19(6): p. 717-97.

182. White, J.D., et al., *Localization of prepro-Growth Hormone releasing factor mRNA in rat brain and regulation of its content by food deprivation and experimental diabetes.* Mol Cell Neurosci, 1990. 1(3): p. 183-92.
183. Xu, J., et al., *Exploring endocrine GH pattern in mice using rank plot analysis and random blood samples.* J Endocrinol, 2011. 208(2): p. 119-29.
184. Murray, R.D., et al., *The diagnosis of partial Growth Hormone deficiency in adults with a putative insult to the hypothalamo-pituitary axis.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(5): p. 1705-9.
185. Ohlsson, C., et al., *The role of liver-derived insulin-like growth factor-I.* Endocr Rev, 2009. 30(5): p. 494-535.
186. Ross, R.J., *GH, IGF-I and binding proteins in altered nutritional states.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. 24 Suppl 2: p. S92-5.
187. Stewart, C.E. and P. Rotwein, *Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors.* Physiol Rev, 1996. 76(4): p. 1005-26.
188. Ghigo, E., et al., *Effects of recombinant human insulin-like growth factor I administration on Growth Hormone (GH) secretion, both spontaneous and stimulated by GH-releasing hormone or hexarelin, a peptidyl GH secretagogue, in humans.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(1): p. 285-90.
189. Chapman, I.M., et al., *Recovery of Growth Hormone release from suppression by exogenous insulin-like growth factor I (IGF-I): evidence for a suppressive action of free rather than bound IGF-I.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. 83(8): p. 2836-42.
190. Imrie, H., et al., *Vascular insulin-like growth factor-I resistance and diet-induced obesity.* Endocrinology, 2009. 150(10): p. 4575-82.
191. Ionova-Martin, S.S., et al., *Changes in cortical bone response to high-fat diet from adolescence to adulthood in mice.* Osteoporos Int, 2011. 22(8): p. 2283-93.
192. Iwakura, H., et al., *Effects of ghrelin administration on decreased Growth Hormone status in obese animals.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 293(3): p. E819-25.
193. Wortley, K.E., et al., *Absence of ghrelin protects against early-onset obesity.* J Clin Invest, 2005. 115(12): p. 3573-8.
194. Xiao, Y., et al., *Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity.* Nutrition, 2011. 27(2): p. 214-20.

195. Zhang, Y., et al., *Insulin-like growth factor 1 alleviates high-fat diet-induced myocardial contractile dysfunction: role of insulin signaling and mitochondrial function*. Hypertension, 2012. 59(3): p. 680-93.
196. Rajaram, S., D.J. Baylink, and S. Mohan, *Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions*. Endocr Rev, 1997. 18(6): p. 801-31.
197. Schneider, M.R., et al., *Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth factor-binding proteins*. FASEB J, 2000. 14(5): p. 629-40.
198. Smith, W.J., L.E. Underwood, and D.R. Clemmons, *Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. 80(2): p. 443-9.
199. Twigg, S.M. and R.C. Baxter, *Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit*. J Biol Chem, 1998. 273(11): p. 6074-9.
200. Guler, H.P., et al., *Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates*. Acta Endocrinol (Copenh), 1989. 121(6): p. 753-8.
201. Ketelslegers, J.M., et al., *Nutritional regulation of the Growth Hormone and insulin-like growth factor-binding proteins*. Horm Res, 1996. 45(3-5): p. 252-7.
202. Kaklamani, V.G., et al., *Dietary fat and carbohydrates are independently associated with circulating insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 concentrations in healthy adults*. J Clin Oncol, 1999. 17(10): p. 3291-8.
203. Phillips, L.S., C.I. Pao, and B.C. Villafuerte, *Molecular regulation of insulin-like growth factor-I and its principal binding protein, IGFBP-3*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998. 60: p. 195-265.
204. Chen, J.W., et al., *Free rather than total circulating insulin-like growth factor-I determines the feedback on Growth Hormone release in normal subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. 90(1): p. 366-71.
205. Baxter, R.C., *Insulin-like growth factor binding proteins as glucoregulators*. Metabolism, 1995. 44(10 Suppl 4): p. 12-7.
206. Cingel-Ristic, V., et al., *Administration of human insulin-like growth factor-binding protein-1 increases circulating levels of Growth Hormone in mice*. Endocrinology, 2004. 145(9): p. 4401-7.

207. Chen, J.W., et al., *A highly sensitive and specific assay for determination of IGF-I bioactivity in human serum*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. 284(6): p. E1149-55.
208. Bielohuby, M., et al., *Lack of dietary carbohydrates induces hepatic Growth Hormone (GH) resistance in rats*. Endocrinology, 2011. 152(5): p. 1948-60.
209. Baxter, R.C., J.M. Bryson, and J.R. Turtle, *The effect of fasting on liver receptors for prolactin and Growth Hormone*. Metabolism, 1981. 30(11): p. 1086-90.
210. Leung, K.C., et al., *Insulin regulation of human hepatic Growth Hormone receptors: divergent effects on biosynthesis and surface translocation*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. 85(12): p. 4712-20.
211. Bennett, W.L., et al., *Insulin regulation of Growth Hormone receptor gene expression: involvement of both the PI-3 kinase and MEK/ERK signaling pathways*. Endocrine, 2007. 32(2): p. 219-26.
212. Baxter, R.C. and J.R. Turtle, *Regulation of hepatic Growth Hormone receptors by insulin*. Biochem Biophys Res Commun, 1978. 84(2): p. 350-7.
213. Waltz, E., *Epilepsy controlled by low-carb diet's effect on brain channels*. Nat Med, 2007. 13(5): p. 516-7.
214. Carro, E., et al., *Leptin increases in vivo GH responses to GHRH and GH-releasing peptide-6 in food-deprived rats*. Eur J Endocrinol, 2000. 142(1): p. 66-70.
215. Koutkia, P., et al., *Metabolic regulation of Growth Hormone by free fatty acids, somatostatin, and ghrelin in HIV-lipodystrophy*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. 286(2): p. E296-303.
216. Dieguez, C., et al., *Regulation of somatotroph cell function by the adipose tissue*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. 24 Suppl 2: p. S100-3.
217. Bielohuby, M., et al., *Impaired glucose tolerance in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013.
218. Lumeng, C.N. and A.R. Saltiel, *Inflammatory links between obesity and metabolic disease*. J Clin Invest, 2011. 121(6): p. 2111-7.
219. Satoh, M., et al., *Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance*. PLoS One, 2012. 7(2): p. e30568.

220. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1821-30.
221. Salmenniemi, U., et al., *High amount of visceral fat mass is associated with multiple metabolic changes in offspring of type 2 diabetic patients*. Int J Obes (Lond), 2005. 29(12): p. 1464-70.
222. Ryan, A.S., et al., *Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult women with wide ranges of age and obesity*. Diabetes Care, 2003. 26(8): p. 2383-8.
223. Matsubara, M., S. Maruoka, and S. Katayose, *Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women*. Eur J Endocrinol, 2002. 147(2): p. 173-80.
224. Omran, S.A., et al., *Study of contact activation in endemic hepatosplenomegaly*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1991. 2(5): p. 659-62.
225. Chudek, J., et al., *The adipose tissue as an endocrine organ--a nephrologists' perspective*. Contrib Nephrol, 2006. 151: p. 70-90.
226. Wozniak, S.E., et al., *Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article*. Dig Dis Sci, 2009. 54(9): p. 1847-56.
227. Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg, *Adipose tissue as an endocrine organ*. Mol Cell Endocrinol, 2010. 316(2): p. 129-39.
228. Mariman, E.C. and P. Wang, *Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity*. Cell Mol Life Sci, 2010. 67(8): p. 1277-92.
229. Ailhaud, G., *Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome*. C R Biol, 2006. 329(8): p. 570-7; discussion 653-5.
230. Bahceci, M., et al., *The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults?* J Endocrinol Invest, 2007. 30(3): p. 210-4.
231. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(3): p. 1023-33.
232. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest, 2005. 115(5): p. 1111-9.

233. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1796-808.
234. Furukawa, S., et al., *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2004. 114(12): p. 1752-61.
235. Langouche, L., et al., *Melanocortin peptides stimulate prolactin gene expression and prolactin accumulation in rat pituitary aggregate cell cultures*. J Neuroendocrinol, 2004. 16(8): p. 695-703.
236. Prins, T., M. Fodor, and H.A. Delemarre-van de Waal, *Pituitary mRNA expression of the Growth Hormone axis in the 1-year-old intrauterine growth restricted rat*. J Neuroendocrinol, 2006. 18(8): p. 611-20.
237. Kido, T., et al., *Food deprivation enhances somatostatin and somatostatin receptor subtype expression in rat colon*. Regul Pept, 2003. 114(2-3): p. 167-73.
238. Yeom, M., et al., *Proteomic analysis of nicotine-associated protein expression in the striatum of repeated nicotine-treated rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 326(2): p. 321-8.
239. Lungu, G.F., et al., *In vivo imaging and characterization of hypoxia-induced neovascularization and tumor invasion*. Int J Oncol, 2007. 30(1): p. 45-54.
240. Peinnequin, A., et al., *Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green*. BMC Immunol, 2004. 5: p. 3.
241. Bateman, R.M., et al., *Myocardial hypoxia-inducible HIF-1alpha, VEGF, and GLUT1 gene expression is associated with microvascular and ICAM-1 heterogeneity during endotoxemia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 293(1): p. H448-56.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ad libitum	AL	Growth Hormone releasing hormone	GHRH
Adenosintriphosphat	ATP	Growth Hormone releasing hormone Rezeptor	GHRHR
Aminosäuren	AS		
Antigen	AG	Growth Hormone –Rezeptor	GHR
Antikörper	AK	Halswirbelsäule	HWS
Aqua ad iniectabilia	AD	Hämatoxylin - Eosin	HE
Avidin Biotin Complex	ABC	hypoxie induzierter Faktor	HIF
Body Mass Index	BMI	im Serum	i.S.
Brustwirbelsäule	BWS	Immunhistochemie	ICH
Citratpuffer	CP	Insulin like growth factor	IGF
C-reaktives Protein	CRP	Insulin like growth factor Bindungsprotein	IGFBP
Desoxyribonukleinsäure	DNA	Insulin like growth factor I Rezeptor	IGF-I-R
Diaminobenzidin	DAB	Insulin-Rezeptor-Substrate	IRS
Doppelwert	DW	Interleukine	IL
Einzelwert	EW	Janus ähnlichen Kinasen	JAK
Energieverbrauch	EE	Ketogene Diäten	KD
Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ELISA	Kilodalton	kDa
Ethanol	EtOH	Kohlenhydrat	KH
European Food Safety Authority	EFSA	Komplementäre DNA	cDNA
extrazellulär regulierten Kinasen	ERK	Konzentration	Konz
fettfreie Körpermasse	LBM	Körpergewicht	KG
Fettsäuren	FS	Lendenwirbelsäule	LWS
Freie Fettsäuren	FFA	Lifestyle Exercise Attitudes Relationships Nutrition	LEARN
Glukosetransporter	GLUT	long-chain triglycerides	LCT
Growth Hormone	GH	low carbohydrate high fat	LCHF
Growth Hormone Bindungsprotein	GHBP		

low-carbohydrate	LC	Ribonukleinsäure	RNA
Luftfeuchtigkeit (in %)	LF	Ribonukleinsäure Lysepuffer	RLA
Mangan(II)Chlorid	MnCl ₂	Ribosomale Ribonukleinsäure	rRNA
Mastermix	M	säurelabile Untereinheit	ALS
medium-chain triglycerides	MCT	Signal transducers and activators of transcription	STAT
Meerrettichperoxidase	HRP	Somatostatin	SRIF
messenger Ribonukleinsäure	mRNA	Somatostatinrezeptor	SST
metabolisierbare Energie	ME	Standardabweichung	SD
Mitogen-aktivierte-Proteinkinase	MAP	Tetramethylbenzidine	TMB
Mittelwert	MW	Triacylglycerole	TAG
Musculus	M.	Tumornekrosefaktor α	TNF- α
nicht bestimmt	n.d.	Tyrosinkinase	TK
Nicotinamidadenindinukleotid	NADH	unter anderem	u.a.
Optische Dichte	OD	Volumen	Vol
Phosphate buffered saline	PBS	vor allem	v.a.
pituitary specific positive transcription factor	PIT	weißes Fettgewebe	WAT
Polymerase Kettenreaktion	PCR	Weltgesundheitsorganisation	WHO
Polyunsaturated/Saturated	P/S	zum Beispiel	z.B.
Raumtemperatur (in °C)	RT		
Respiratorischer Quotient	RQ		

Gramm	g	Nanometer	nm
Kilogramm	kg	Pikomol	pmol
Mikroliter	μ l	Sekunde	sec
Mikrometer	μ m	Stunde	h
Milligramm	mg	Tage	d
Milliliter	ml	Volt	V
Millimeter	mm	Watt	W
Millimolar	mM	Wellenlänge (Lambda)	Λ
Miniampere	mA	Zentimeter	cm
Minute	min		

Gramm pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag	g/kgKG/d
Kilojoule pro Gramm	kJ/g
Kilokalorien pro Gramm	kcal/g
Nanogramm pro Milliliter	ng/ml
Umdrehungen pro Minute	U/min

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 JAK-STAT-Signaltransduktionsweg	9
Abb. 1-2 Überblick der Regulation der GH / IGF-I Achse	10
Abb. 1-3 Rezeptortyrosinkinasen Signaltransduktionsweg	13
Abb. 3-1 GH Sekretion pulsatil.....	24
Abb. 3-2 GH Sekretion punktuell	24
Abb. 3-3 Nicht kompetitiver ELISA	29
Abb. 3-4 Kompetitiver ELISA	29
Abb. 3-5 RNA-Banden nach Gelelektrophorese.....	35
Abb. 3-6 Schematische Darstellung der PCR-Zyklen.....	36
Abb. 3-7 Schematische Darstellung verschiedener Wege der Färbung einer IHC:	38
Abb. 4-1 Körperlänge	42
Abb. 4-2 Femurlänge.....	42
Abb. 4-3 KG-Entwicklung relativ zum KG, MW \pm SEM	43
Abb. 4-4 Blick auf den eröffneten Situs.	43
Abb. 4-5 tägliche Kalorienaufnahme der Versuchstiere in kcal	44
Abb. 4-6 Fettfreie Körpermasse (LBM), absolut in g	46
Abb. 4-7 epididymales Fettgewebe, relativ	47
Abb. 4-8 perirenales Fettgewebe, relativ	47
Abb. 4-9 inguinale Fettgewebe, relativ	47
Abb. 4-10 braunes Fettgewebe, relativ	47
Abb. 4-11 Paraffinschnitt perirenales Fettgewebe, HE Färbung, 40fache Vergrößerung	48
Abb. 4-12 pulsatile GH Sekretion in ng / ml	50
Abb. 4-13 freie IGF-I Sekretion in ng / ml	50
Abb. 4-14 hepatische GHR m-RNA Expression.....	53
Abb. 4-15 hepatische IGF-I m-RNA Expression.....	53
Abb. 4-16 Immunhistochemische Färbung auf Makrophagen.....	55
Abb. 5-1 vereinfachte Darstellung der Ergebnisse	73/80/84

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Biologische Effekte von IGF-I und IGF-II	12
Tab. 1-2 Biologische Wirkung von GH.....	15
Tab. 3-1 Ausgangsgewichte der Tiere in Gramm	20
Tab. 3-2 Zusammensetzung der verwendeten Diäten	22
Tab. 3-3 DNase Inkubations Mix	32
Tab. 3-4 Reaktionsmix cDNA Synthese.....	34
Tab: 3-5 Reaktionsgemisch real time quantitative PCR / Reaktionsgemisch reverse Transkriptase PCR.....	35
Tab. 3-6 Protokoll Hämatoxylin-Eosin Färbung perirenales Fettgewebe	38
Tab. 3-7 Protokoll Immunhistochemie perirenales Fettgewebe	40
Tab. 4-1 Längenmessung Körperabschnitte in mm.....	41
Tab. 4-2 Körpergewicht absolut in Gramm	42
Tab. 4-3 Indirekte Kalorimetrie: RQ und EE.....	45
Tab. 4-4 Gewicht der Haut, absolute und relative Werte	45
Tab. 4-5 Organgewichte, absolute Werte in g und relative Werte normalisiert auf das KG	49
Tab. 4-6 regulierende Serumparameter der GH-IGF-Achse.....	51
Tab. 4-7 Expression des GHR in verschiedenen peripheren Geweben.....	52
Tab. 4-8 Expression des IGF-I in verschiedenen peripheren Geweben	52
Tab. 4-9 Zentrale Regulation der GH-IGF-Achse	53
Tab. 4-10 Expression diverser Inflammationsparameter im a) epididymalen und b) perirenales Fettgewebe	544

9.4 Primer

5' – 3'	Sense – FW	Annealing Temp. Quelle / Hersteller
	Antisense – RW	
18s RNA	GGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAAT	60°C Primer 3
	TTGCCCTCCAATGGATCCT	
IGF-I	CCGCTGAAGCCTACAAAGTC	60°C Primer 3
	TGTTTTGCAGGTTGCTCAAG	
GH	CTCGGACCGCGTCTATGAGA	60°C [235]
	TGAGGATCTGCCCAATACGG	
GHR	TGTTGGACGAAAAGTGTTTCAC	60°C Primer 3
	CCAGAATTATCCATCCCTTCAG	
GHRH	TCTGGGTGTTCTTTGTGCT	60°C [131]
	GCCATCTGCTTGTCCTCT	
GHRHR	CTGAAGGATGCTGCTGTCTT	60°C [236]
	GCCAACAGACAGCTCAGGTA	
SRIF	TTCTGCAGAAGTCTCTGGCG	51°C [237]
	ACAGGATGTGAATGTCTTCC	
SST 2	GAACACAGAGAAGCGAGTGC	60°C [236]
	TGCTCAGAGGTCAACTCCAT	
SST 5	CATTGTGGTCAAGGTGAAGG	60°C [236]
	CAGGTTGACGATGTTGACAAT	
ZBP 89	GACAACCAGACCCTTCCAAA	58°C [238]
	CGAAGGTTACCTGTCCATT	
HIF1 α	GTCGGACAGCCTCACCAAACAGAGC	55°C [239]
	GTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG	
TNF α	CACGCTCTTCTGTCTACTGAA	60°C [239]
	GGCTACAGGCTTGTCACCTCGA	
IL 1 β	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	58°C [240]
	GGGTTCATGGTGAAGTCAAC	
GLUT 1	GGTGTGCAGCAGCCTGTGTA	60°C [241]
	GACGAACAGCGACACCACAGT	

9.5 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Veröffentlichungen

Frommelt L, Bielhuby M, Menhofer D, Stoehr BJ, Bidlingmaier M, Kienzle E.

Effects of low carbohydrate diets on energy and nitrogen balance and body composition in rats depend on dietary protein-to-energy ratio.

Nutrition. 2014 Jul-Aug;30(7-8):863-8. doi: 10.1016/j.nut.2013.11.009. Epub 2013 Dec 4.

Frommelt L, Bielhuby 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 Jul-Aug;30(7-8):869-75. doi: 10.1016/j.nut.2013.11.017. Epub 2013 Dec

Bielhuby M, Sisley S, Sandoval DA, Herbach N, Zengin A, Fischereder M, Menhofer D, Stoehr BJ, Stemmer K, Wanke R, Tschöp MH, Seeley RJ and Bidlingmaier M.

Impaired glucose tolerance in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets.

(American Journal of physiology. Endocrinology and metabolism. 2013 Aug 27. [Epub ahead of print])

Bielhuby M, Sawitzky M, Stoehr BJ, Stock P, Menhofer D, Ebensing S, Bjerre M, Frystyk J, Binder G, Strasburger C, Wu Z, Christ B, Hoeflich A and Bidlingmaier M.

Lack of dietary carbohydrates induces hepatic Growth Hormone (GH) resistance in rats.

(Endocrinology. 2011 May;152(5):1948-60. Epub 2011 Mar 22.)

Bielhuby M, Menhofer D, Stoehr BJ and Bidlingmaier M.

Failure of urine dipsticks to detect ketosis in rats.

(Obesity facts, Letter to the Editors, 4:81-82/2011)

Bielhuby M, Menhofer D, Kirchner H, Stoehr BJ, Müller TD, Stock P, Hempel M, Stemmer K, Pfluger PT, Kienzle E, Christ B, Tschöp MH and Bidlingmaier M.

Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein.

(Am J Physiol Endocrinol Metab. 300(1):E65-76/2011)

Sawitzky M, Zeissler A, Langhammer M, Bielhuby M, Stock P, Hammon HM, Görs S, Metges CC, Stoehr BJ, Bidlingmaier M, Fromm-Dornieden C, Baumgartner BG, Christ B, Brenig B, Binder G, Metzger F, Renne U, Hoefflich A.

Phenotype Selection Reveals Coevolution of Muscle Glycogen and Protein and PTEN as a Gate Keeper for the Accretion of Muscle Mass in Adult Female Mice.

(PLoS One. 2012;7(6):e39711. Epub 2012 Jun 29.)

Kongressbeiträge

Stoehr B.J.M., Bielhuby M., Menhofer D. and Bidlingmaier M.

Low-Carbohydrate / High-Fat Diets induce hepatic Growth Hormone (GH) resistance and impair GH secretion in rats

(53th annual meeting of the German society of endocrinology, March 4-7; 2010 Leipzig/Germany)

Stoehr B.J.M., Bielhuby M., Ramisch J., Menhofer D. and Bidlingmaier M.

Effects of low-carbohydrate / high-fat (LCHF) diets on the Growth Hormone (GH) / insulin like growth factor (IGF) system in rats

(5th International Congress of the GRS and the IGF Society; October 3-7, 2010, New York, USA)

Bielhuby M., Menhofer D., Stoehr B.J.M., Kienzle E. and Bidlingmaier M.

Induction of ketosis in rats depends on the relative abundance of fat and protein in low-carbohydrate/high fat diets

(14th congress of the European Society of Veterinary & Comparative Nutrition; September 6-8, 2010, Zürich, Switzerland)

Bielhuby M., Menhofer D., Stoehr B.J.M., Kienzle E. and Bidlingmaier M.

Induction of ketosis and weight loss in rats on low-carbohydrate, high fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein

(11th International Congress on Obesity July 11-15, 2010, Stockholm, Sweden)

Bielhuby M., Menhofer D., Stoehr B.J.M. and Bidlingmaier M.

Low-carbohydrate/high fat diets: Effects on glucose and insulin metabolism in rats

(92nd Congress of the Endocrine Society; June 19-22, 2010, San Diego, USA)

Bielohuby M., Kummann M., Stoehr B.J.M., Menhofer D., Sawitzky M, Chau L., Hoeflich A. and Bidlingmaier M.:

Short-term treatment with Growth Hormone affects body and organ weights and JAK2/Stat5 phosphorylation, but does not change serum IGF-I levels in generic mice

(53th annual meeting of the German society of endocrinology, March 4-7; 2010 Leipzig/ Germany)

Menhofer D., Bielohuby M., Stoehr B.J.M. and Bidlingmaier M.

Metabolic consequences of high-fat cafeteria diets in rats: Comparison of ad libitum and pair feeding settings

(92nd Congress of the Endocrine Society; June 19-22, 2010, San Diego, USA)

Menhofer D., Bielohuby M., Stoehr B.J.M. and Bidlingmaier M.

Low-carbohydrate/high fat diets: Effects on ketosis, glucose and insulin metabolism in rats

(53th annual meeting of the German society of endocrinology, March 4-7; 2010 Leipzig/ Germany)

Betz M.J., Bielohuby M., Mauracher B., Ramisch J., Stoehr B.J.M., Beuschlein F., Bidlingmaier M. and Slawik M.

Cafeteria diet, but not low carbohydrate/high fat feeding induces UCP-1

(11th International Congress on Obesity July 11-15, 2010, Stockholm, Sweden)

10 Danksagung

An dieser Stelle meiner Dissertationsschrift möchte ich mich bei all jenen bedanken, welche mich jederzeit auf verschiedenste Art unterstützt und damit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Rahmen meiner Tätigkeit als Doktorandin durfte ich nicht nur mein Wissen bereichern, sondern glücklicherweise auch viele besondere Menschen kennenlernen und ich bin nicht zuletzt für die dadurch entstandenen Freundschaften dankbar.

Herrn Professor Dr. med. Martin Reincke danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für die Möglichkeit an seiner Klinik zu promovieren. Ich weiß seine wohlwollende Begleitung meines Promotionsverfahrens und sein Interesse an meiner Arbeit zu schätzen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Martin Bidlingmaier für die Inspiration zu diesem Thema, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die jederzeit vorhandene Unterstützung. Seine wertvollen, kritischen und inspirierenden Diskussionsbeiträge bereicherten meine Arbeit. Er nahm sich regelmäßig Zeit für die Besprechung unserer Ergebnisse und gab hinsichtlich der Fortführung konstruktive Beiträge. Des Weiteren gab er mir die einmalige Möglichkeit unsere Ergebnisse auf diversen Kongressen zu präsentieren und die Daten in Fachzeitschriften zu veröffentlichen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. vet. Dr. habil. med. Maximilian Bielohuby für die stetige Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit, seine grenzenlose Geduld und seine Freundschaft. Durch seine hervorragende wissenschaftliche und persönliche Betreuung repräsentiert Herr PD Bielohuby den besten nur vorstellbaren Betreuer. Er beantwortete jederzeit alle inhaltlichen und methodischen Fragen verständlich. Dank seiner professionellen und tatkräftigen Unterstützung konnte ich diese Arbeit zum Erfolg bringen. Nicht nur im Hinblick auf meine fachliche und berufliche Weiterbildung war er bemüht, auch meine persönliche Entwicklung wurde von ihm gefördert.

Ein aufrichtiges Dankeschön gilt der gesamten Arbeitsgruppe Bidlingmaier und der Arbeitsgruppe Beuschlein, welche mich in Ihrem Team willkommen hießen und durch ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft stets für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten. Sie alle trugen zu meiner Einführung in die Laborarbeit bei und standen mir jederzeit hilfreich zur Seite. Durch die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre bereiteten sie mir eine wunderbare Zeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. med. vet. Ellen Kienzle vom Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik der Ludwig-Maximilians-Universität München, mit deren Kooperation die verschiedenen Diätgruppen dieser Studie entstanden.

Nicht zuletzt sei, ganz dem großen Vorbild meines einmaligen Betreuers gefolgt, den stillen Helden der Wissenschaft ein großer Dank ausgesprochen. Die Ratten, meine tierischen Kollaborateure. Sie sind die heimlichen Helden zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten und auch ihnen gilt meine Anerkennung.

Der größte Dank gilt meiner Mama, welche immer an mich glaubte, mich stets ermutigte und die größte Motivation für mein Medizinstudium und damit auch für diese Promotionsarbeit war. Ohne sie läge diese Schrift nicht vor. Aus diesem Grunde sei ihr die vorliegende Arbeit von ganzem Herzen gewidmet.

11 Eidesstattliche Versicherung

Stöhr Barbara Johanna Maria

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**"EINFLUSS DER RELATIVEN ABUNDANZ VON FETT UND PROTEIN IN
NAHEZU KOHLENHYDRAT-FREIEN DIÄTEN AUF DAS WACHSTUMSHORMON
UND INSULIN-ÄHNLICHE-WACHSTUMSFAKTOREN SYSTEM IN RATTEN"**

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

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

München den 03.04.2014

Barbara Stöhr