

**Die postnatalen Veränderungen
der Gesamt-Leptinserumkonzentration
bei Lämmern innerhalb der ersten 24 Lebensstunden**

Etablierung eines ovinen Gesamt-Leptin-Radioimmunoassays
und Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schilling, Jutta, geb. Carus
aus Hamburg

Gießen 2015

Aus dem Steroid- und Peptidhormonlabor der Abteilung für Allgemeine
Pädiatrie und Neonatologie der Kinderklinik der Justus-Liebig-Universität
Gießen (Leiter des Steroid- und Peptidhormonlabors Herr Prof. Dr. S.A. Wudy)

Gutachter: Prof. Dr. Wudy

Gutachter: PD. Dr. Karrasch

Tag der Disputation: 10.05.2016

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

1. Historische Aspekte
2. Struktur des Leptins
3. Regulation
4. Physiologische Bedeutung

II. ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN

1. Ziel: Entwicklung eines Assays zur Leptinbestimmung bei Schafen

Fragestellung zur Methode:

2. Sind die in dieser neu entwickelten radioimmunologischen Methode gemessenen (Gesamt-) Leptinserum-konzentrationen höher als in bisher gemessenen Untersuchungen und ist eine physiologische Bedeutung erkennbar?

Ziele: Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung mit folgenden Fragestellungen:

3. Wie ist der Verlauf der Leptinwerte bei neugeborenen Lämmern innerhalb der ersten 24 Lebensstunden?
4. Sind die Merkmale Geschlecht und Wurfgröße für den Leptinserumspiegel ausschlaggebend?
5. Sind der Gesamt-Leptinserumspiegel und seine Veränderungen direkt vom Körpergewicht abhängig?
6. Gibt es einen proportionalen Zusammenhang zwischen den Umgebungstemperaturen und der Leptinkonzentration im Serum der neugeborenen Lämmer?

7. Inwiefern kann der postnatale Abfall der Körpertemperatur mit dem Leptinserumspiegel in Verbindung gebracht werden und liegt ein proportionaler Verlauf im Verhältnis zu der Körpertemperatur über die ersten 24 Stunden vor?
8. Wie ist die Leptinkonzentration im Vergleich zu den Blutfetten zu beurteilen?
9. Kommt es bei niedrigen Blutzuckerspiegeln postnatal zu konsekutiv niedrigen Leptinspiegeln und ist eine positive Korrelation bezüglich des Verlaufs zu beobachten?
10. Sind steigende β -Hydroxybutyratspiegel durch Glucosemangel mit niedrigen Leptinserumspiegeln assoziiert?

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien
2. Geräte
3. Radioimmunoassay
 - 3.1. Testlösungen
 - 3.2. Antiserum
 - 3.2.1. Herstellung des Antiserums
 - 3.2.2. Austestung des Antiserums
 - 3.2.3. Optimierung der Antikörperbindung
 - 3.2.3.1. Abhängigkeit der maximalen Bindung vom pH-Wert des Puffers
 - 3.2.3.2. Optimierung der Verdünnung des 2. Antikörpers und der Konzentration des γ -Globulins
 - 3.2.3.3. Optimierung der Inkubationszeiten und der Inkubationstemperatur
 - 3.2.3.4. Optimierung der Vorinkubationszeit
 - 3.3. Herstellung des Standards
 - 3.4. Herstellung des Tracers
 - 3.4.1. Gebrauchslösungen

- 3.4.2. Jodierung des Proteins
 - 3.4.3. Abtrennung von freiem I¹²⁵
 - 3.4.4. Austestung des Tracers
 - 3.5. Antigen
 - 3.6. Durchführung des RIAs
 - 3.7. Qualitätskriterien
 - 3.7.1. Empfindlichkeit
 - 3.7.2. Präzision
 - 3.7.3. Spezifität
 - 3.7.4. Stabilität der Proben
- 4. Western-Blot
 - 4.1 . Prinzip des Western-Blots
 - 4.2 . Testlösungen
 - 4.3 . Durchführung (SDS-Page und Western-Blot)
 - 4.4 . Di- und Trimerbildung
 - 4.5 . Veränderung der Laufeigenschaft durch Serumzugabe
- 5. Untersuchungen in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen
 - 5.1. Untersuchungsmethoden
 - 5.2. Gruppeneinteilung
 - 5.3. Stalltemperaturmessungen
 - 5.4. Körperliche Untersuchungen des Lamms
 - 5.5. Blutprobenentnahme und –bearbeitung
 - 5.6. Bestimmung der Plasmatriglyceridwerte
 - 5.7. Bestimmung der Plasmacholesterinwerte
 - 5.8. Bestimmung der Blutglucosewerte
 - 5.9. Bestimmung der β -Hydroxybutyratkonzentration
- 6. Statistische Auswertung

IV. ERGEBNISSE

1. Darstellung der Leptinserumkonzentrationen aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten
2. Einfluss von Geburtstyp (Wurfgröße), Geschlecht und Rasse auf die Leptinkonzentration
3. Einfluss des Körpergewichts auf die Leptinkonzentration
4. Einfluss der Umgebungstemperatur unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit auf die Leptinkonzentration
5. Einfluss der Körpertemperatur auf die Leptinkonzentration
6. Einfluss der Differenz aus Körper- und Umgebungstemperatur auf die Leptinkonzentration
7. Einfluss des Plasmatriglyceride auf die Leptinkonzentration
8. Einfluss des Plasmacholesterins auf die Leptinkonzentration
9. Einfluss des Blutzuckers auf die Leptinkonzentration
10. Einfluss des Plasma- β -Hydroxybutyrats auf die Leptinkonzentration

V. DISKUSSION

VI. ZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

LITERATURVERZEICHNIS

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

DANKSAGUNG

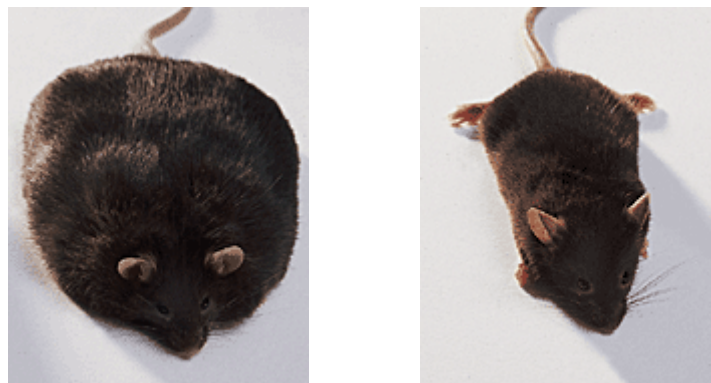
I. EINLEITUNG *

Die Geburt ist für ein Säugetier ein einschneidendes Ereignis. Die plötzliche Anpassung des intrauterinen Lebens an die extrauterine Umwelt geschieht durch das sofortige Einsetzen der Atmung, die Lungengefäße dilatieren und der Blutkreislauf wird zum Teil umgekehrt. Aber die Plazenta gewährleistet intrauterin nicht nur die Sauerstoffzufuhr. Das zu beobachtende Saugbedürfnis der Neugeborenen ist bei der unterbrochenen umbilikalen-plazentären Nahrungszufuhr überlebenswichtig und unterstützt die Energieversorgung, die nur noch durch die Glykogenspeicher und das braune Fettgewebe aufrecht erhalten werden kann. Die energiekonsumierende Wärmeproduktion des Neugeborenen ist besonders bei einer hohen prä- zu postnatalen Temperaturdifferenz stark erhöht. Der Organismus gerät somit bei ungünstigen Umwelteinflüssen in einen Konflikt zwischen Energiekonservierung und Energieverbrauch. Leptin ist ein Hormon, das in dieser Notwendigkeit der Energiehomöostase als Vermittler fungiert (Gautron & Elmquist, 2011; Jequier, 2002). Es scheint somit auch einen Einfluss auf die Wärmeregulierung zu haben, die sich bei neugeborenen Nestflüchtern innerhalb von kurzer Zeit über die Verbrennung von braunem Fettgewebe anpasst. Beim neugeborenen Menschen als Nesthocker ist diese Fähigkeit zur Homoiothermie postnatal jedoch noch nicht voll entwickelt. Leptin wird beim erwachsenen Säugetiere hauptsächlich von Adipo-zyten synthetisiert, und dadurch wird ihm eine die Energiereserven anzeigende Botenrolle zugedacht (Kieß *et al.*, 1998b; Jequier, 2002). Es gibt jedoch kaum Untersuchungen über die kurzfristigen Veränderungen des Leptinspiegels eines Säugetieres in den ersten postnatalen 24 Stunden und über den Zusammenhang zu anderen Stoffwechselfparametern und Umwelteinflüssen in dieser Zeit. Beim Lamm zeigt sich die frühe neonatale Adaptationsphase als besonders vulnerabel, da es innerhalb der ersten 36 Stunden zu einer hohen Lämmersterblichkeit (Everett-Hincks & Dodds, 2008) aufgrund von Thermoregulationsstörungen und erhöhten Hypoglykämieraten kommt (Purvis *et al.*, 1985). Daher wurde zur Klärung des postnatalen Einflusses von Leptin beim neugeborenen Lamm in dieser Dissertation ein Radioimmunoassay etabliert, der das gebundene und ungebundene Leptin (Gesamt-Leptinserumkonzentration) in postnatal gewonnenen Schafseren bestimmt.

(*Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht unter: Schilling *et al.*, 2015)

1. Historische Aspekte

Ende 1994 gelang es, bei der Maus das obese-Gen zu identifizieren (Zhang *et al.*, 1994), das hauptsächlich in Adipozyten synthetisiert wird und dessen Mutation die Fettsucht bei der autosomal rezessiven ob/ob-Mausmutante hervorruft. Das Genprodukt, Leptin genannt (griechisch: leptos = dünn), besteht aus 167 Aminosäuren, dessen terminale Aminosäuren-sequenz während der Sekretion abgespalten wird und als ein 146 Aminosäuren zählendes Protein zirkuliert (Halaas *et al.*, 1995). Die Aminosäuresequenz weist keine Homologien zu bisher bekannten Proteinen auf. Die Struktur (siehe Kapitel I.2) zeigt Analogien zu den Cytokinen (Interleukin-2) und zum Wachstumshormon (Madej *et al.*, 1995). Die Synthese des funktionalen Proteins Leptin ist bei der ob/ob-Mausmutation gestört. Die autosomal rezessive obese (ob/ob-) Mausmutante zeigt im Phänotyp ein Vielfaches ihres normalen Körper-gewichtes (siehe Abbildung I.1.), Diabetes mellitus, Hypothermie sowie Infertilität der Weibchen. Appliziert man der ob/ob-Maus das fehlende Leptin, so kommt es zu einer kompletten Remission der körperlichen Symptome (Halaas *et al.*, 1995) . Weitere Untersuchungen ergaben, dass Leptin außer im Fettgewebe in weiteren Geweben synthetisiert wird und in vielen verschiedenen Hormonregelkreisläufen eine Rolle spielt (siehe Kapitel I.3).



© 2001 KAY CHERNUSH - All rights reserved

Abbildung I.1. links: Maus mit Mutation ob/ob, rechts: Wildtyp Maus
Mit dem fünffachen Gewicht im Vergleich zur Schwester (rechts) fehlt der
adipösen Maus (links) das Gen für das Protein Leptin (ob)
aus: www.hhmi.org/genesweshare/d130.html, Bilder mit freundlicher
Genehmigung von Kay Chernush

2. Die Struktur des Leptins

Leptin (ob) der Spezies *Ovis aries* (Schaf) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 16 kD und besteht in seiner zirkulierenden Form aus 146 Aminosäuren (Primärstruktur) mit folgender Aminosäuresequenz (Dyer *et al.*, 1997) (internationale Kennbuchstaben der Aminosäuren s. Kapitel Abkürzungen):

```
1 VPIRKVQDDT KTLIKTIVTR INDISHTQSV SSKQRTVGLD FIPGLHPLLS LSKMDQTLAI  
61 YQQILASLPS RNVIQISNDL ENLRDLLHLL AASKSCPLPQ VRALESLESL GVVLEASLYS  
121 TEVVALSRLQ GSLQDMLRQL DLSPGC
```

Es wurden 4 allele Polymorphismen im Schafleptingen mit 3 Aminosäureveränderungen gefunden (Zhou *et al.*, 2009). Die Tertiärstruktur bildet sich durch Disulfidbrücken (s. Abb. I.2).

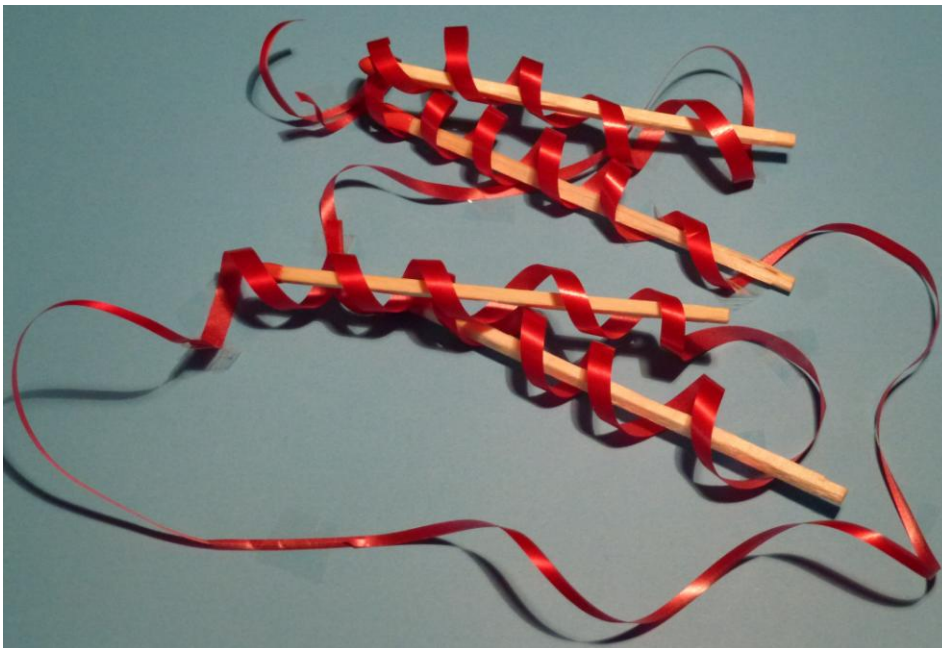


Abbildung I.2. Modell der 3-D (Tertiär-)Struktur des Leptins; das rote Band stellt die Aminosäuresequenz dar mit Bildung der Sekundär- und Tertiärstruktur. Die hellbraunen Stäbchen verdeutlichen die vier α -Helices der Sekundärstruktur;

Eigens erstelltes Modell in Anlehnung an Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 1997) und The National Center for Biotechnology Information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3. Regulation

Die Regulation des Leptins hängt von vielen Parametern ab. Leptin dient zum einen als Indikator für die Menge der Fettreserven. Die Leptinkonzentration wird an verschiedenen Lokalisationen im ZNS im Hypothalamus durch die Leptinrezeptoren als Signal an den Hirnstamm und an efferenten Systeme, das sympathische und das parasympathische Nervensystem (German *et al.*, 2009) weitergeleitet. Diese steuern zur Erhaltung der Energiebalance über die Regulation der Energieaufnahme und des Energieverbrauchs bei (Gautron & Elmquist, 2011; Jequier, 2002). So senkt die Applikation von Leptin die Futteraufnahme und führt zu einer Gewichtsabnahme bei der Wildtyp- und der ob/ob-Maus, wobei diese Regulationen bei der db/db-Maus mit einem Leptinrezeptordefekt nicht beobachtet werden konnte (Halaas *et al.*, 1995; Pellemounter *et al.*, 1995; Campfield *et al.*, 1995). Diese Appetitverminderung geschieht auch über eine durch das Leptin verminderte Expression des Neuropeptid Y (NPY) (Stephens *et al.*, 1995; Ahima *et al.*, 1996). Das Glukagon-Like Peptide 1 (GLP-1) im Hypothalamus wird ebenso vom Leptin reguliert. Peripher interagiert Insulin und das Wachstumshormon mit Leptin. Stresshormone (Adrenalin) und das zyklische AMP (cAMP) hemmen die Leptinfreisetzung, während Infektionen und Glucocorticoide die Leptinkonzentration erhöhen (Kamohara *et al.*, 1997; Greer *et al.*, 2009; O'Connor *et al.*, 2007). Zudem zeigt sich bei der db/db-Mausmutation eine Störung der Hämatopoese, so dass auch hier eine Regulation durch das Leptin vorzuliegen scheint (Bennett *et al.*, 1996). Fasten senkt und fettreiche Nahrung erhöht den Leptinspiegel, wobei beim Fasten keine nennenswerte Abnahme des Körperfettmasse vorliegt (s. Tab. I.4.) (Altmann *et al.*, 2006).

Leptin ↑	Leptin ↓
Hohe Fett- (Energie-) Zufuhr	Fasten
Hohe Körperfettmasse	Niedrige Körperfettmasse
Glucocorticoide	Kälte
Hyperinsulinämie	Fettsäuren, cAMP
Östrogene, Progesteron	Katecholamine, Androgene
Hyperglykämie	Hypoglykämie

Tabelle I.4. positive und negative Einflüsse auf die Konzentration des Serumleptins

Bei einem Überangebot an Nahrung steigt die Körpertemperatur von gesunden Mäusen leicht an. Bei der ob/ob-Maus mit dem Fehlen des funktionellen Leptins kommt es jedoch zu keiner Temperaturveränderung. Der Leptinspiegel im Serum ist zudem bei kalten Außentemperaturen ($< 4^{\circ}\text{C}$) niedriger als bei Temperaturen von 20°C . Leptin selbst fördert die Glucoseresorption im Darm und stimuliert die Lipolyse. Die gesteigerte Lipolyse führt wiederum zu erhöhten freien Fettsäuren, die mit einer erhöhten β -Oxidation einhergehen. Leptin hemmt die Insulinfreisetzung, führt jedoch durch die negative Rückkopplung erneut zu einer verminderten Leptinsekretion.

4. Physiologischen Bedeutung

Die physiologische Bedeutung des Leptins liegt in seiner Funktion als einer der Regulatoren vieler Stoffwechselkreisläufe. Leptin wird zum großen Teil in den Adipozyten synthetisiert und die im Fettgewebe nachweisbare Expression von Leptin mRNA und die Höhe des Leptinspiegels im Serum verändert sich bei Säugetieren direkt proportional zur Fettmasse (Blum *et al.*, 1997c; Hamilton *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1996; Maffei *et al.*, 1995; Blum *et al.*, 1997b). Leptin spielt für die Regulation des Körpergewichts durch die Inhibierung der Futteraufnahme und Stimulation des Energieverbrauchs eine wichtige Rolle (Halaas *et al.*, 1995; Flynn *et al.*, 1998; Licinio *et al.*, 2007; Wetzler *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte die mRNA des ob-Gens auch im

braunen Fettgewebe, in der Mucosa des Magenfundus, in den Ovarien, in der Plazenta, im Epithel des Magens sowie in der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden (Cinti *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 1997; Konturek *et al.*, 1999; Senaris *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Zamorano *et al.*, 1997). Somit lässt sich die Funktion des Leptins nicht nur auf die Regulation der Fettspeicherung reduzieren, sondern es konnten auch Funktionen für die Regulation der Körpertemperatur, des Blutzuckerspiegels, der Reproduktion, der Immunabwehr, der Angiogenese und der Hämatopoese nachgewiesen werden (Fujikawa *et al.*, 2010; German *et al.*, 2009; Kamohara *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010). Bei Neugeborenen sind die Temperaturregulation, der Saugreflex und das Hungergefühl überlebenswichtig. Das Dilemma zwischen Energiekonservierung versus Energieverbrauch ist beim Lamm unter niedrigen Temperaturen besonders deutlich (Fettreserve und Isolierung vs. Energieaufnahme). Bei Untersuchungen der Leptinkonzentration im Serum von Lämmern und Nagetieren bei Geburt und am 3. bzw. 5. Tage postnatal konnten bisher nur widersprüchliche Aussagen getroffen werden (McFadin *et al.*, 2002; Bellone *et al.*, 2004; Ertl *et al.*, 1999; Cottrell *et al.*, 2010). Beim menschlichen Neugeborenen konnte ein Anstieg der Leptinserumkonzentration von Geburt bis zur 4. Lebensstunden gemessen werden (Schubring *et al.*, 1999), über die ersten 72 Stunden sank jedoch der gesamte Leptin-, freie Leptin- und gebundene Leptinspiegel (Hytinantti *et al.*, 2001). Zusätzlich ist auch eine Geschlechtsabhängigkeit hinsichtlich der Leptinkonzentrationen besonders in der Pubertät beim Menschen bekannt (Blum *et al.*, 1997c; Klein *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1997b). Die Untersuchungen beim neugeborenen Säugetier ergaben jedoch zum Teil widersprüchliche Ergebnisse (Bellone *et al.*, 2004; Ertl *et al.*, 1999; Bellone *et al.*, 2004; Cetin *et al.*, 2000; McFadin *et al.*, 2002). Die Wurfgröße kann bei Säugetieren zu einem veränderten Körpergewicht der einzelnen Neugeborenen aufgrund eines nicht ausreichenden plazentaren Nahrungsangebots führen. Eine darauf zurückzuführende Verminderung des Leptinspiegels ist daher denkbar. Bei Wühlmäusen fand sich keine Veränderung der Leptinserumkonzentration in Abhängigkeit zu der Wurfgröße (Zhang *et al.*, 2008). Leptin wird eine Rolle bei der Regulation der Wärmebildung zugesprochen, da es auch in dem wärmebildenden Gewebe (braunes Fettgewebe) vorkommt und bei kälteexponierten Säugetieren eine verminderte Leptinsekretion verursacht (Hardie *et al.*, 1996; Puerta *et al.*, 2002; Ricci *et al.*, 2000). Die Körpertemperatur der ob/ob-Maus, der durch eine Mutation das biologisch aktive Leptin fehlt, ist niedriger als bei der Wildtyp-Maus, und eine Leptinsubstitution erhöht

die Körpertemperatur beider Maustypen (Pelleymounter *et al.*, 1995; Stehling *et al.*, 1996). Interessanterweise wird auch bei neugeborenen Lämmern durch eine Leptinsubstitution ein postnataler Temperaturabfall verhindert (Mostyn *et al.*, 2002). Die physiologische Konzentration des Serumleptins innerhalb der ersten 24 Stunden wurde in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Bei den Untersuchungen der Energieerhaltung geht es nicht nur um den Energieverbrauch, auch die Energieaufnahme spielt beim Neugeborenen eine tragende Rolle. Nach der ersten Nahrungsaufnahme steigen die Blutfettwerte als Energieträger steil an (Meyer & Kamphues, 1990; Haave & Innis, 1991). Leptin erhöht die Lipolyse (Wang *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 1996; Siegrist-Kaiser *et al.*, 1997; Sarmiento *et al.*, 1997), die eine Auftrennung der Triglyceride in freie Fettsäuren mit einem verstärkten Fettsäureabbau (β -Oxidation) zur Folge hat. Somit kann Energie z.B. in Form von Wärme oder kinetischer Energie frei werden. Wenn eine hohe Konzentration an Substrat der Lipolyse vorhanden ist, kann diese für die weitere Energieaufnahme (Trinken = Muskularbeit) gekoppelt mit Aufrechterhaltung der optimalen Körpertemperatur, genutzt werden und ein Überleben des Neugeborenen sichern. Andersherum ist eine erhöhte Fettspeicherung zum Zwecke der Isolation ebenfalls bei niedrigeren Temperaturen sinnvoll. Bei neugeborenen Lämmern steigen nach Nahrungsaufnahme neben den Blutfetten auch die Kohlenhydrate im Blut über die Zeit an. Der Blutzucker steht in seinen stoffwechselaktiven Formen direkt zur Energiegewinnung zur Verfügung, und ein niedriger Blutglucosespiegel kann fatale Folgen für den Organismus haben. Der Blutzuckerspiegel wird somit von mehreren Hormonen (u. a. Insulin, Katecholamine, Glucagon, Glucocorticoide) reguliert, und der Blutzucker wirkt zusätzlich direkt proportional auf den Serumleptinspiegel (Kauter *et al.*, 2000) (Kadokawa *et al.*, 2003); (Ostlund, Jr. *et al.*, 1996)(Fujikawa *et al.*, 2010; Kamohara *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010). Hohe Leptinspiegel gehen wiederum mit einer erhöhten Glucoseverwertung einher (Siegrist-Kaiser *et al.*, 1997). Andere Autoren beschreiben die stimulierende Wirkung des Insulins auf den Leptinspiegel, das ja durch den Blutzucker reguliert wird (Malmstrom *et al.*, 1996; Clapham *et al.*, 1997). Die Wirkung der Leptinkonzentration auf die Insulinsekretion ist jedoch gegenläufig (Celi *et al.*, 2003). Für das neugeborene Säugetier ist die Blutglucose als schnellverfügbare Energie überlebenswichtig, eine lebensbedrohliche Hypoglykämie gilt es jedoch zu vermeiden.

II. ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN

1. Ziel: Entwicklung eines Assays zur Leptinbestimmung bei Schafen

Das erste Ziel war die Entwicklung eines Assays zur Leptinbestimmung bei Schafen.

Die Wahl der für diese Untersuchung geeigneten Spezies fiel aus folgenden Gründen auf das Schaf:

- Es gibt bereits Untersuchungen zu postnatalen Stoffwechselregulationen beim Lamm.
- Die vielen Blutentnahmen lassen sich relativ problemlos bei einem Lamm durchführen, ohne dass es zu hypovolämischen Komplikationen kommt.
- Schafe sind eine Spezies, die im fetalen Leben durch Magerkeit charakterisiert sind und sich intrauterin durch eine Unempfindlichkeit gegenüber der maternalen Leptinserumspiegel auszeichnen. Somit sind die Veränderungen der Serumleptinspiegel des Lamms postnatal hauptsächlich von äußeren Bedingungen abhängig.

Fragestellung zur Methode:

2. Sind die in dieser neu entwickelten radioimmunologischen Methode gemessenen (Gesamt-) Leptinserum-konzentrationen höher als in bisher gemessenen Untersuchungen und ist eine physiologische Bedeutung erkennbar?

Proteine kommen im Serum häufig in gebundener und in freier Form vor. Leptin ist im Blut ebenfalls an verschiedene Bindungsproteine und lösliche Rezeptoren gebunden (Sinha *et al.*, 1996b; Hytinen *et al.*, 2001). Neben den Untersuchungen zum messbaren Leptin im Serum sind auch zunehmend die Funktionen der Bindungsproteine untersucht worden (Patel *et al.*, 1999; Birkenmeier *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1996; Tartaglia *et al.*, 1995; Kratzsch *et al.*, 2005; Skoczen *et al.*, 2011). Bisher konnte jedoch keine Messmethode etabliert werden, die den ungebundenen und an Bindungsproteine gebundenen Anteil des Serumleptins nachweist („gesamtes Serumleptin“). Ungeklärt ist zudem, ob die Konzentration des gesamten Serumleptins höher ist im Vergleich zu den Serumkonzentrationen anderer Messmethoden und inwiefern sich eine physiologische Bedeutung daraus ableiten lässt.

Ziele: Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung (wie unter Kapitel I.4. beschrieben) mit folgenden Fragestellungen:

3. Wie ist der Verlauf der Leptinwerte bei neugeborenen Lämmern innerhalb der ersten 24 Lebensstunden?

Die bisherigen Untersuchungen legten postnatal unterschiedliche Verläufe der Leptinkonzentrationen bei verschiedenen Spezies dar.

4. Sind die Merkmale Geschlecht und Wurfgröße für den Leptinserumspiegel ausschlaggebend?

Hinsichtlich der Abhängigkeit des Geschlechts auf die Leptinkonzentrationen ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse, eine Untersuchung zur Wurfgröße wies keine Beziehung nach.

5. Sind der Gesamt-Leptinserumspiegel und seine Veränderungen direkt vom Körpergewicht abhängig?

Können die bereits angegebenen Zusammenhänge zwischen den Serumleptinspiegeln und der Fettmasse bei Säugetieren in dieser Untersuchung bestätigt werden?

6. Gibt es einen proportionalen Zusammenhang zwischen den Umgebungstemperaturen und der Leptinkonzentration im Serum der neugeborenen Lämmer?

Wenn Leptin auch eine Rolle in dem Konflikt zwischen Energieerhaltung und -verlust beim neugeborenen Lamm spielt, ist ein Zusammenhang denkbar.

7. Inwiefern kann der postnatale Abfall der Körpertemperatur mit dem Leptinserumspiegel in Verbindung gebracht werden und liegt ein proportionaler Verlauf im Verhältnis zu der Körpertemperatur über die ersten 24 Stunden vor?

Wenn die Außentemperatur zu einer Veränderung des Leptinspiegels führt, um eine Homoio-thermie des Organismus aufrechtzuerhalten, könnte dies auch für eine Hypothermie gelten.

8. Wie ist die Leptinkonzentration im Vergleich zu den Blutfetten zu beurteilen?

Bisher gibt es keine Untersuchung zu den Blutfettwerten und ihren Konzentrationsveränderungen im Serum im Verhältnis zum (Gesamt-) Leptin bei neugeborenen Säugetieren.

- 9. Kommt es bei niedrigen Blutzuckerspiegeln postnatal zu konsekutiv niedrigen Leptinspiegeln und ist eine positive Korrelation bezüglich des Verlaufs zu beobachten?**

Welche Rolle Leptin in der Regulation von Glucose in den ersten 24 Stunden eines neugeborenen Lamms spielt, wurde bisher noch nicht untersucht.

- 10. Sind steigende β -Hydroxybutyratspiegel durch Glucosemangel mit niedrigen Leptinserumspiegeln assoziiert?**

Im Zusammenhang mit den Hypoglykämien spielt eine alternative Energieversorgung z.B. durch Ketonkörper für das neugeborene Säugetier eine wichtige Rolle. Ein erhöhter β -Hydroxybutyrat ist somit Ausdruck eines Energiemangels. Sollte Leptin auch beim Neugeborenen mitverantwortlich für den Energieverbrauch sein, könnte in Zeiten erhöhter β -Hydroxybutyratspiegel die Leptinsekretion sinken.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

Die verwendeten Materialien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Material	Hersteller, Ort
Acrylamid 30 % (Gel 30 rotiphoese)	Roth, Karlsruhe
bovines Serumalbumin, Fraktion 5 (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aqua dest. (Reinstwasseranlage, Milli-Q PF Plus)	Millipore, Molsheim, Frankreich
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloramin T	Merck, Darmstadt
1.4 Dithio-L-threitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Ethylendinitrilotetraethansäure Dinatriumsalz	
Dihydrat ($\text{EDTA-Na}_2+2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycoltetraethansäure (EGTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100 % ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Merck, Darmstadt
Gelatine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	Merck, Darmstadt
Glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Merck, Darmstadt
Hydrogenchlorid in Wasser gelöst = Salzsäure 1N (HCl in H_2O)	Merck, Darmstadt
Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)	Merck, Darmstadt
	Hartmann Analytics,
Jod-125 / Iod-125 (I-125)	Braunschweig
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Laemmli-Puffer (Fertiglösung)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laufpuffer Western-Blot T10/Glycine/SDS	BioRad, München

Lumiglo Reagent A	Cell Signaling
Magermilchpulver, Instant	Frema Reform (Reformhaus)
Beta-Mercaptoethanol 0,71 ml (100mM)	Merck, Darmstadt
Methanol (CH ₄ O)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat Trihydrat (CH ₃ COONa * 3 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfit (Na ₂ S ₂ O ₅)	Merck, Darmstadt
NatriumdDodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natronlauge 2 N (Lösung von Natriumhydroxid (NaOH) in Wasser (H ₂ O))	Merck, Darmstadt
Orthophosphorsäure 85 % (H ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Peroxidase Reagent B	Cell Signaling
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Boehringer, Ingelheim
Polyethylenglycol 6000 (PEG)	Merck, Darmstadt
Ponceau S 0,5 g	Serva, Heidelberg
Sephadex G100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sephadex G75	Amersham, Freiburg
Tetramethylethyldiamin (Temed) 99 % (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (C ₂ HCl ₃ O ₂)	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (Tris, C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton® X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20 (Polysorbat 20)	Merck, Darmstadt
GammaY-gGlobulin (Kaninchen)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Proteine:

Ovines Leptin (o-ob) 10 µg lyophilisiert	DSL, Sinsheim
o-ob Peptidsequenz	Rapp Polymere, Tübingen
peQ GOLD Protein-Marker IV	peQLab, Erlangen
Biotinylated Protein Ladder Detection Pack # 7727	Cell Signaling, U.S.A.

Antiseren:

Rabbit HPR anti –rabbit Antibody HRP linked (H+L)	Cell Signaling, U.S.A.
Anti Biotin Antibody	Cell Signaling, U.S.A.
Anti o-ob Antibody	Pineda, Berlin
Goat anti-Rabbit second Antibody	Pineda, Berlin

2. Geräte

Die neben der normalen Geräteausrüstung eines biochemisch arbeitenden Labors benutzten Geräte wurden bei der Beschreibung ihrer Anwendung näher spezifiziert.

3. Radioimmunoassay

Testprinzip:

Radioaktiv markiertes („heißes“) Antigen und das zu messende in der Serumprobe vorhandene („kalte“) Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen spezifischer Antikörper (1.Ak). Die Menge an gebundenem markiertem Antigen verhält sich umgekehrt proportional zu der Menge an unmarkiertem Antigen. Die entstehenden löslichen Antigen-Antikörper-Komplexe werden mit einem zweiten Antiserum (2.Ak) präzipitiert, welches gegen den Fc-Teil des Antigen-spezifischen Antikörpers (1.Ak) gerichtet ist. Nach dem Verwerfen des Überstandes wird die Radioaktivität des Niederschlags gemessen. Die Messwerte der Proben werden mit denen bekannter Antigen-Konzentrationen (Standardkurve) verglichen, und auf diese Weise wird die unbekannte Antigenmenge bestimmt.

3.1. Testlösungen

Für den Radioimmunoassay wurden die folgenden Lösungen hergestellt:

Puffer: „Tris HCl Puffer pH 8“

0,486 %	Tris(hydroxymethyl)aminomethan („Tris“)
0,017 M	HCl
0,1 %	BSA
0,1 %	Triton® X-100
in Aqua dest.	

4 % „PEG“

4 %	Polyethylenglykol (PEG)
in Aqua dest.	

0,1 % Triton® X-100

0,1 %	Triton® X-100
in Aqua dest.	

Denaturierungslösung: „DSE 1:1000“

0,08 mM	DTT
0,002 %	SDS
2 µM	EDTA
in Tris HCL Puffer pH 8	

3.2. Antiserum

3.2.1. Herstellung des Antiserums

Die Firma Rapp Polymere GmbH, Ernst-Simon-Str. 9 in 72072 Tübingen stellte zwei Peptide her: 10 mg eines Peptids (Peptid 1) der Partialsequenz des Schafleptins der Aminosäuren 31-44 (Aminosäuresequenz: SSKQRVTGLDFIPG) und 10 mg eines Peptids (Peptid 2) der Partialsequenz des Schafleptins Aminosäuren 96-107 (Aminosäuresequenz: CPLPQVRALESL) her. Eine Homologie zu einem anderen Protein konnte mit Hilfe des BLAST Programms (Protein Datenbank Suchprogramm) nicht gefunden werden (Altschul *et al.*, 1997). An die in Position 1 des Peptids 1 stehende Aminosäure Serin wurde für die Antikörperproduktion noch ein Cysteinrest (C) angefügt. An die in Position 12 des Peptids 2 stehende Aminosäure Leucin wurde ein Glutaminsäurerest (E) angefügt. Die Reinheit wurde mit 86,11 % angegeben (HPLC).

Diese Peptide wurden an Hämocyanin (*Limulus polyphemus*) gekoppelt und als Antigene für die Antikörperproduktion in jeweils 3 Kaninchen (A1, B1, C1, A2, B2, C2) verwendet. Am 61., 90. und 120. Tag nach der Impfung wurde Blut abgenommen, Serum gewonnen und bei -80°C aufbewahrt. Die Antikörperproduktion wurde durch die Firma Pineda durchgeführt.

3.2.2. Austestung des Antiserums

Die Austestung der Antiseren erfolgte mittels RIA:

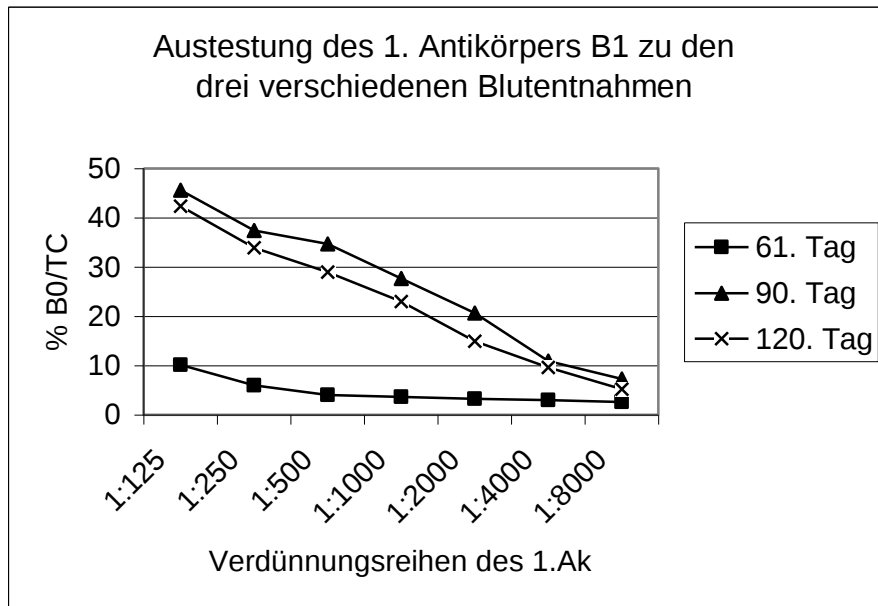


Abbildung III.3.2.a) Austestung des 1.Ak B1: 61., 90. und 120.Tag
Nicht abgebildet sind die Austestungen des 1.Ak A1, A2, B2, C1 und C2

Die Antiseren des Peptid 2 (A2, B2, C2) ergaben keine ausreichenden Bindungen. Die maximale totale Bindung des Antikörpers B1 an den Schafleptin-Tracer nach 24 h-Inkubation bei RT betrug zwischen 45,6 % und 2,6 % Bindung (Abb. III.3.2.a). Daraufhin wurden die Antikörper mit der höchsten Bindung bei höchstmöglicher Verdünnung (A1, 120.Tag 1:3000 und B1, 90.Tag 1:1000) hinsichtlich der Verdrängung des oob-Standards (höchste Konzentration 40 ng/ml) geprüft.

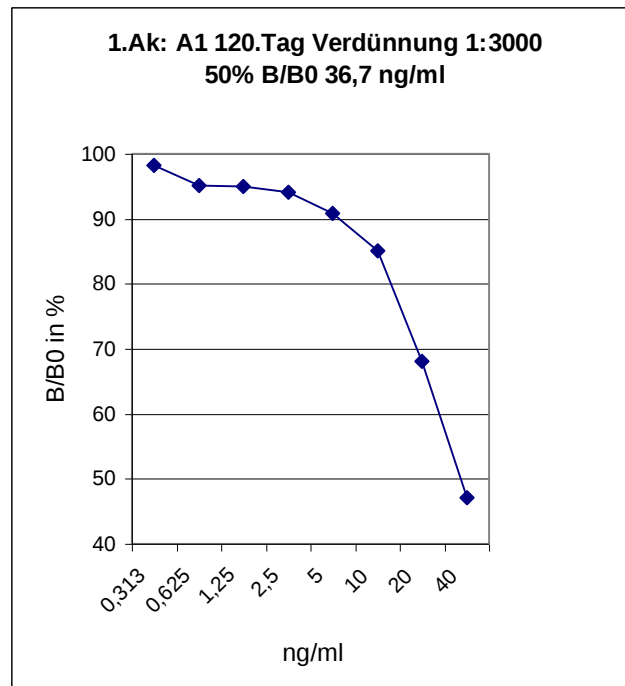


Abbildung III.3.2.b) Tracerverdrängung durch die Standards (40 ng/ml-0,313 ng/ml, B/B0) bei der Testung des 1.Ak A1, 120.Tag, Verdünnung 1:3000

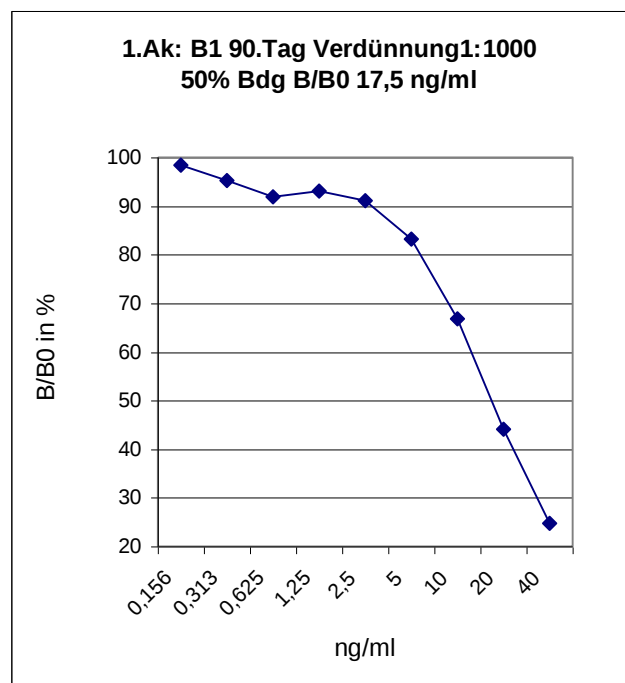


Abbildung III.3.2.c) Tracerverdrängung durch die Standards (40 ng/ml-0,313 ng/ml, B/B0) bei der Testung des 1.Ak B1, 90.Tag, Verdünnung 1:1000

Der Antikörper A1, 120.Tag in der Verdünnung 1:3000 ergab eine 50 % Bindung B/B₀ von 36,7 ng/ml. Die maximale Verdrängung des Standards 40 ng/ml B/B₀ lag bei 47,02 % (Abb. III.3.2.b). Der Antikörper B1, 90.Tag in der Verdünnung 1:1000 ergab eine 50 % Bindung B/B₀ von 17,5 ng/ml. Die maximale Verdrängung des Standards 40 ng/ml B/B₀ lag bei 24,78 % (Abb. III.3.2.c). Somit ergab der Antikörper B1, 90.Tag eine höhere Sensitivität als der Antikörper A1, 120.Tag. Eine weitere Verdünnung der Antikörper auf 1:2000 (B1) bzw. 1:4000 (A1) ergaben Bindungen B₀/TC < 20 %, so dass in dieser Hinsicht keine Möglichkeiten zur Erhöhung der Sensitivität gegeben war.

3.2.3. Optimierung der Antikörperbindung

3.2.3.1. Abhängigkeit der maximalen Bindung vom pH-Wert des Puffers

Eine weitere Erhöhung der maximalen Bindung (B₀/TC) des Antikörpers besteht in der Austestung des optimalen pH-Werts des verwendeten Puffers. Jedes Protein hat eine für sich spezifische optimale Funktion bei einem für ihn spezifischen pH-Wert. Es wurden 8 verschiedene Puffersysteme mit pH-Werten von pH 3 bis pH 10 der folgenden Rezepturen hergestellt:

pH 3: 0,1 M Glycin-HCl Puffer

0,081 mol/l	Glycin
0,081 mol/l	NaCl
0,019 mmol/l	HCl
0,1 %	BSA
0,1 %	Triton® X-100

in Aqua dest.

pH 4: 0,1 M Acetatpuffer

0,1 mol/l	Essigsäure
1,78 mmol/l	Natriumacetat
0,1 %	BSA
0,1 %	Triton® X-100

in Aqua dest.

pH 5: 0,1 M Acetatpuffer

0,1 mol/l	Essigsäure
17,8 mmol/l	Natriumacetat
0,1 %	BSA
0,1 %	Triton® X-100

in Aqua dest.

pH 6: Citronensäure-Citrat-Puffer

0,06 mol/l	Na ₂ H-Citrat
0,064 mol/l	NaOH
0,1 %	BSA
0,1 %	Triton® X-100

in Aqua dest.

pH 7,4: Natriumphosphatpuffer

0,05 mol/l	Na ₂ HPO ₄
0,05 mol/l	NaH ₂ PO ₄
0,1 mol/l	NaCl
0,05 %	NaN ₃
0,1 %	BSA
0,1 %	Triton® X-100

in Aqua dest.

pH 8: Tris HCl Puffer

0,486 %	Tris(hydroxymethyl)aminomethan („Tris”)
17 mmol/l	HCl
0,1 %	BSA
0,1 %	Triton® X-100

in Aqua dest.

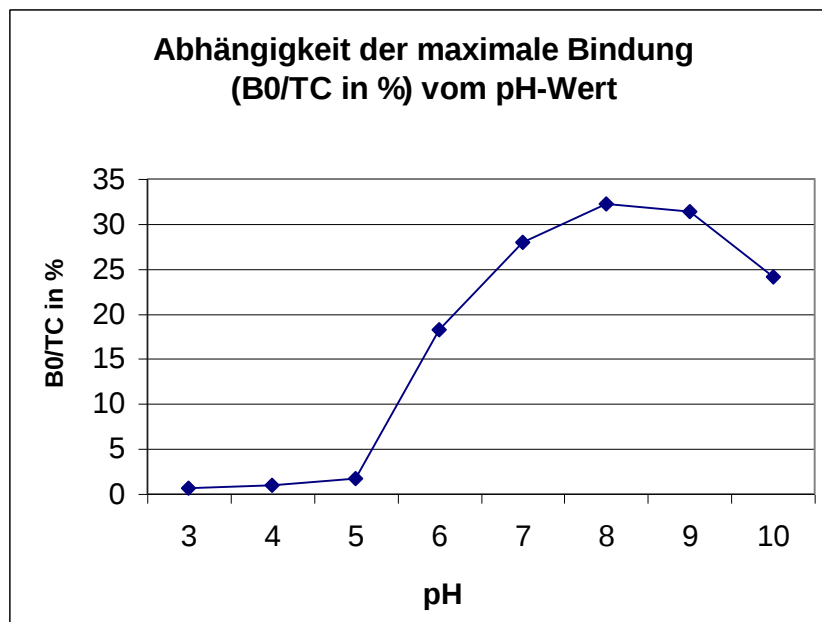
pH 9 (8,9): Tris HCl Puffer

0,486 % Tris(hydroxymethyl)aminomethan („Tris”)
3,8 mmol/l HCl
0,1 % BSA
0,1 % Triton® X-100
in Aqua dest.

pH 10: Glycin-Natronlauge Puffer

0,063 mol/l Glycin
0,063 mol/l NaCl
0,037 mol/l NaOH
0,1 % BSA
0,1 % Triton® X-100
in Aqua dest.

Der 1.Ak wurde jeweils mit den acht Puffern 1:1000 verdünnt und mit 150 µg Kaninchen-γ-Globulin/ml versetzt. Die Bindungen nahmen bis zu dem pH-Optimum von pH 8 zu und bei einem weiter ansteigendem pH-Wert wieder ab (s. Abb.III.3.2.d).



**Abbildung III.3.2.d) Bestimmung des pH Optimums des 1. Antikörper B1 90. Tag,
Verdünnung 1:1000 (+150 µg Kaninchen-γ-Globulin/ml)**

3.2.3.2. Optimierung der Verdünnung des 2. Antikörpers und der Konzentration des γ -Globulins

Wegen der sehr geringen Konzentration an Antigen-Antikörper-Komplex im Teströhrchen ist es notwendig, für die Doppelantikörperbildung Träger- γ -Globulin zuzugeben, um die Präzipitationsreaktion zu vervollständigen. Wesentliche Voraussetzung einer erfolgreichen Trennung von freiem und gebundenem Antigen ist, dass das Verhältnis von Kaninchen- γ -Globulin zu 2. Antikörper so gewählt wird, dass eine quantitative Präzipitation von Tracer-1.Antikörper-Komplex erfolgt. Ein Überschuss an 2.Antikörper oder eine unzureichende Menge davon führen zu einer unvollständigen Fällung.

Daher wurden folgende Testreihen durchgeführt:

Zur Optimierung des Verhältnisses des 2. Antikörpers zum 1. Antikörper wurde das Serum des 2.Antikörpers in den Konzentrationen 1:75, 1:100, 1:150, 1:200 und 1:300 mit PEG 4 % verdünnt. Dem 1. Antikörper wurden in geometrischer Verdünnungsreihe von 10 bis 640 μg Kaninchen- γ -Globulin/ml zugefügt. Der 1.Ak (B1, 90.Tag, 1:1000) und Tracer inkubierten 24 h bei 4°C. Der 2.Ak inkubierte in allen Konzentrationen 1 h bei 4°C. Die Austestung der Konzentration des 2. Antikörpers und des Kaninchen- γ -Globulins ergab eine optimale Bindung bei erhaltener Sensitivität bei einer Serumverdünnung des 2. Antikörpers von 1:150 mit Zugabe von 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kaninchen- γ -Globulin zu dem 1. Ak (B1, 90.Tag, 1:1000).

3.2.3.3. Optimierung der Inkubationszeiten und der Inkubationstemperatur

Für die Optimierung der Inkubationszeit (1-48 h) und die Inkubationstemperatur (4°C und 20°C) wurden in 2 Ansätzen jeweils in Doppelbestimmungen 100 μl 1.Ak (B1, 90.Tag, 1:1000, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kaninchen- γ -Globulin) und 100 μl Tracer über 1 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h und 48 h bei 4°C und bei 20°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 500 μl 2.Ak (1:150 in PEG 4 %) und eine Inkubation von beiden Ansätzen über 1 h bei 4°C. Wie in der Abbildung III.3.2.e) zu erkennen nimmt die Bindung proportional zur Inkubationszeit zu. Die Bindung bei 20°C ist im Mittel um 30 % (8,6 % - 52 %) höher

als bei 4°C. Bei einer langen Inkubationszeit von 48 h ist eine stärkere Bindung unter der Inkubationstemperatur von 4°C zu verzeichnen (-11,7 %).

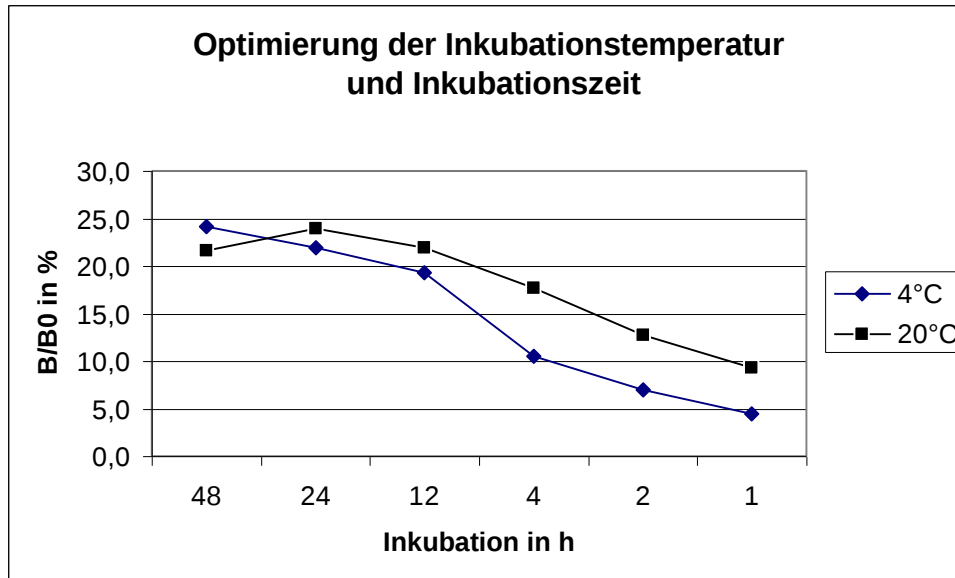


Abbildung III.3.2.e) Optimierung der Inkubationszeiten und der Inkubationstemperatur bei gleichem Auftragszeitpunkt des 1. Antikörpers und des Tracers

3.2.3.4. Optimierung der Vorinkubationszeit

Des Weiteren wurde bei einer 50 % Bindung B/Bo von 17,5 ng/ml eine Steigerung der Sensitivität durch „kalte Vorinkubation“ untersucht. Bisher wurden alle Versuche als Gleichgewichtsassays durchgeführt. Das bedeutet, dass die Inkubation des 1. Antikörpers mit Standard oder Probe und mit Tracers dieselbe Zeitspanne umfassen. Inkubiert man jedoch zunächst den 1. Ak mit Standard (Probe) und setzt später Tracer hinzu, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer Antikörperbindung an das „kalte“ Antigen und somit der Sensitivität. Zusätzlich wird durch eine Inkubation bei kälteren Temperaturen die Antigen-Antikörper-Komplexbildung verlangsamt und die Bindungsstärke (Avidität) steigt an (s. Abb. III.3.2.e). Ein Ausdruck für die erhöhte Sensitivität ist die Senkung der 50 % Bindung (B/B0) die in Abb. III.3.2.f) dargestellt ist.

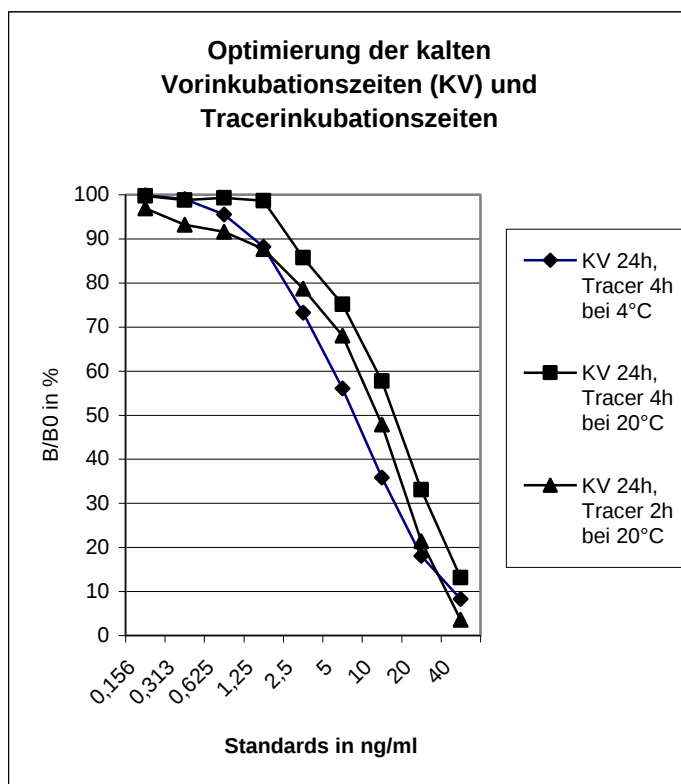


Abbildung III.3.2.f) Kalte Vorinkubation (KV) bei 20°C über 24 h, Tracerinkubationszeit 2-4 h bei 4°C und 20°C.

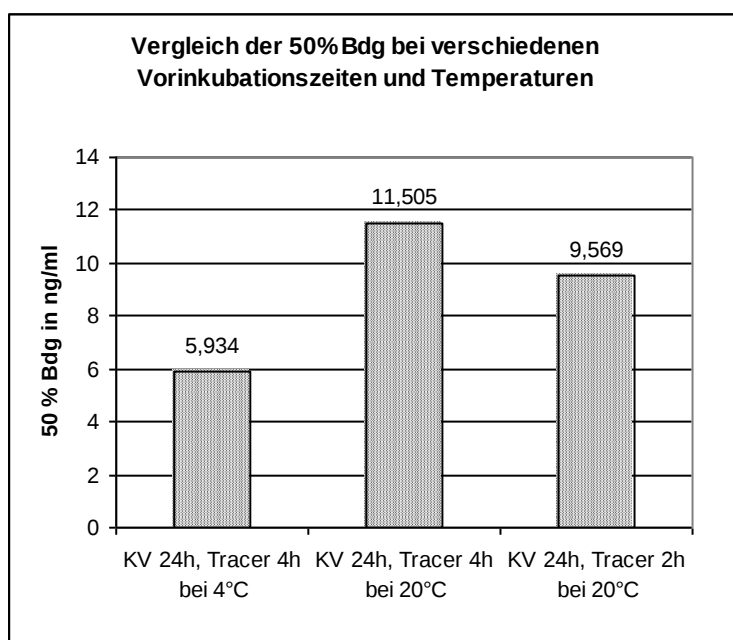


Abbildung III.3.2.g) Vergleich der Sensitivität bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und -temperaturen des Tracers nach einer kalten Vorinkubation des 1.Ak von 24 h bei 20°C

Es zeigte sich, dass nach einer kalten Vorinkubation von 24 Stunden (20°C) und einer Tracerinkubation von 4 Stunden bei 4°C die Sensitivität auf 5,9 ng/ml gesenkt werden konnte, so dass anstatt eines Gleichgewichtsassays ein Nichtgleichgewichtsassay (nonequilibrium assay) durchgeführt wurde.

3.3. Herstellung der Standards

Schafleptin wird recombinant von der Firma DSL hergestellt und lyophilisiert vertrieben.

Die Aminosäuresequenz entspricht der unter I.2 beschriebenen. 10 µg oob werden mit 10 µl Aqua dest aufgelöst. Für die Jodierung werden Aliquote à 2 µg/2 µl H₂O abgefüllt. Die Aufbewahrung erfolgt bei -80°C. Für die Standardherstellung wird ein Aliquot für die Jodierung (2 µg/2 µl H₂O) 1:20000 mit Tris-HCl-Puffer pH 8 verdünnt, in 0,5 ml (c=100 ng/ml) aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Für den Radioimmunoassay wird ein 0,5 ml Aliquot (c=100 ng/ml) mit der Denaturierungslösung (DSE 1:1000, s. Kapitel III.3.1.) 1:2 verdünnt (Standard 8), alle weiteren Standards werden mit der Lösung A (Denaturierungslösung (DSE 1:1000) 1:2 verdünnt mit Tris HCL Puffer pH 8, s. Kapitel III.3.6) als geometrische Verdünnungsreihe angesetzt.

Konzentrationen der Standardreihe:

Standard 8:	50	ng/ml in DSE 1:1000
Standard 7:	25	ng/ml in DSE 1:1000
Standard 6:	12,5	ng/ml in DSE 1:1000
Standard 5:	6,25	ng/ml in DSE 1:1000
Standard 4:	3,125	ng/ml in DSE 1:1000
Standard 3:	1,563	ng/ml in DSE 1:1000
Standard 2:	0,781	ng/ml in DSE 1:1000
Standard 1:	0,391	ng/ml in DSE 1:1000

3.4. Herstellung des Tracers

Schafleptin wird recombinant von der Firma DSL hergestellt und lyophilisiert vertrieben.

Die Aminosäuresequenz entspricht der unter I.2 beschriebenen. 10 µg oob werden mit 10 µl Aqua dest aufgelöst. Aliquote à 2 µg/2 µl H₂O für die Jodierung werden abgefüllt und bei -80°C aufbewahrt.

Die Markierung mit dem radioaktiven Jod¹²⁵ (¹²⁵I, reiner γ-Strahler, Halbwertszeit = 60,14 Tage) erfolgt in Anlehnung an die von Hunter and Greenwood beschriebenen Methode mit Chloramin-T (Hunter & Greenwood, 1962). Das Prinzip der Reaktion beruht auf einer Oxidation der Jodid-Ionen und einer anschließenden elektrophilen Substitution am Phenolring von Tyrosin. Als Oxidationsmittel dient die sich in wässriger Lösung aus dem Chloramin-T bildende hypochlorige Säure. Im schwach basischen Bereich (pH 7,5) wird das Jodid-Anion (I⁻) zum Jod-Kation (I⁺) oxidiert. Dieses tritt dann in Position 3 bzw. 5 in den Phenolring von Tyrosin ein. Überschüssiges Chloramin-T und die restlichen I⁻-Ionen werden dann mit Natriumdisulfit reduziert (Sokolowski & Wood, 1981).

3.4.1. Gebrauchslösungen

0,5 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,5

23,389 g NaH₂PO₄ x H₂O

58,826 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

in 1 l Aqua dest.

Na-I¹²⁵-Lösung (100mCi/ml)

Chloramin-T-Lösung

20mg Chloramin T

in 0,1 l Aqua dest.

Natriumdisulfit-Lösung

60 mg Natriumdisulfit
in 0,1 l Aqua dest.

Transferlösung

50 ml PBS-Puffer
0,5 g BSA
50 mg Kaliumjodid
50 mg Bromphenolblau

BSA-Puffer

14,2 g Na_2HPO_4
2,7 g NaH_2PO_4
11,66 g NaCl
1 g NaN_3
4 g BSA
2 ml Triton® X-100
in 2 l Aqua dest.

Sephadex-Säulen

PD-10 G-25 M (Amersham, Freiburg) gespült mit 3 x 3,5 ml BSA-Puffer

3.4.2. Jodierung des Proteins

In ein Eppendorfcup (1 ml) mit der Proteinlösung $c=2 \mu\text{g}/2 \mu\text{l H}_2\text{O}$ wurden die Reagenzien in folgender Reihenfolge pipettiert:

- 10 μl 0,5 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5
- 5 μl Na-I^{125} -Lösung (0,5 mCi)
- 10 μl Chloramin-T-Lösung

90 sec Inkubation

- 200 μl Natriumdisulfit-Lösung
- 100 μl Transferlösung

3.4.3. Abtrennung von freiem I^{125}

Zur Abtrennung des nichtgebundenen I^{125} vom radioaktiv markierten Antigen wurde eine Ausschlusschromatographie über Sephadex G-25 durchgeführt. Hierfür erwiesen sich PD-10-Fertigsäulen von Amersham wegen ihrer sehr guten Reproduzierbarkeit und problemlosen Handhabung als besonders geeignet. 200 μ l Transferlösung und das Reaktionsgemisch wurde auf die Säule aufgetragen und mit 3,6 ml BSA-Puffer in das Gel eingewaschen. Die erste Fraktion à 2,5 ml wurde verworfen, die folgende Fraktion à 1,6 ml wurde mittels Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt. Hierfür wurde die Gelfiltrationssäule von Amersham (Superdex 75 prep grade, HiLoad 16/60, Amersham, Freiburg) und das Flüssigkeits-Chromatographie-Kontrollgerät (LCC-501 Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. 20 ml BSA-Puffer wurden vorgespült und danach das Proteingemisch (1,6 ml) aufgetragen. Die Fraktionen à 2 ml konnten mit dem Fraktionssammler (Frac 100, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gesammelt und je 10 μ l im γ -Strahlungszähler (Szintillationszählgerät LB 2111, Berthold EG&G, Bad Wildbad) gemessen. Die Fraktionen mit > 50.000 cpm wurden erhalten.

3.4.4. Die Austestung des Tracers

Die Austestung der gesammelten Fraktionen à 2 ml wurde wie folgt durchgeführt: Aus jeder Fraktion erfolgte ein Ansatz mit dem Tracer 20.000 cpm/100 μ l in 700 μ l TrisHCl Puffer pH 8 (s. II.3.1), der in 6 Teströhrchen à 100 μ l pipettiert wurde. In 2 Teströhrchen (NSB) waren zusätzlich jeweils 100 μ l TrisHCl Puffer pH 8 mit 150 μ g γ -Globulin (Kaninchen)/ml bzw. in 2 Teströhrchen (B0) war der 1. Antikörper (B1, 90.Tag, 1:1000 mit 150 μ g γ -Globulin(Kaninchen)/ml). Es folgte eine Inkubationszeit von 24 h bei 4°C und 1 h Inkubationszeit des 2.Ak 1:150 in PEG 4 %. Die Röhrchen NSB und B0 wurden 15 Minuten mit 3800 U/min bei 4°C zentrifugiert (Hettich Zentrifuge, Tuttlingen) und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 500 μ l Triton® X-100 0,1 % folgte eine Zentrifugation à 5 min mit 3800 U/min bei 4°C mit dem anschließenden Verwerfen des Überstands. Das erhaltene Pellet konnte nun im γ -Zähler (LB 2111, Berthold EG&G, Bad Wildbad) gemessen werden.

Die Tracerfraktionen mit einer Bindung (B0) > 25 % und einer nichtspezifischen Bindung (NSB) < 5 % wurden gemischt und als Pool bei -20°C aufbewahrt. Der Tracer

kann ca. 5 Wochen verwendet werden, danach nimmt die spezifische Bindung soweit ab, dass eine weitere Verwendung nicht mehr sinnvoll ist.

3.5. Antigen

Als Antigen fand das recombinante Schafleptin der Firma DSL (Sinsheim) Verwendung. Die Struktur ist unter Kapitel I.2. angegeben. Dieses Protein wurde für die Herstellung des Tracers (eingesetzte Menge 2 µg) und des Standards (c= 100 ng/ml in TrisHCl Puffer pH 8, -80°C) verwendet.

3.6. Durchführung des Radioimmunoassays (RIA)

Testlösungen (s. Kapitel III.3.1. Testlösungen):

Lösung A: Denaturierungslösung (DSE 1:1000) 1:2 verdünnt mit Tris HCL Puffer pH 8:
0,04 mM DTT, 0,001 % SDS, 0,001 mM EDTA in Tris HCL Puffer pH 8

Lösung B: 1. Antikörper (B1, 90.Tag) mit Tris HCL Puffer pH 8 1:1000 verdünnt und Zusatz von 150 µg Kaninchen γ-Globulin/ml

Lösung C: Tracer mit Tris HCL Puffer pH 8 auf 20.000 cpm/100 µl verdünnt

Lösung D: 2. Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin) 1:150 mit 4 % Polyethylenglykol (PEG) verdünnt

Lösung E: 0,1 % Triton® X-100 eiskalt

Lösung F: 150 µg Kaninchen γ-Globulin/ml Tris HCL Puffer pH 8

Alle Lösungen wurden am Tag ihrer Verwendung hergestellt.

Lösung A diente zur Verdünnung (1:30=20 µl Serum + 580 µl Lsg. A) der Lämmerserumproben (Dilutor Microlab 500, Hamilton, Darmstadt).

Im Heizblock (3401 Thermostat, Fa. Eppendorf, Hamburg) erfolgte die Erhitzung auf 90°C über 7 Minuten mit anschließender Abkühlung im Eisbad und Durchmischung 30 Sekunden über Kopf (Multi Tube Vortexer, Fa. Baxter, München). Anschließend wurden zweimal 100 µl in zwei konische Polystyrolröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert (Eppendorfpipette 100 µl, Hamburg).

Die Verdünnung (1:2) eines Standardaliquots (0,5 ml) des rekombinanten Schafleptins ($c=100$ ng/ml, -80°C) erfolgte mit der doppelt konzentrierten Lösung A per Hand in ein Safelock-Röhrchen (1,5 ml, Fa. Eppendorf). Für die geometrische Verdünnungsreihe mit jeweils 300 µl Standardlösung wurden 300 µl der Lösung A verwendet (Eppendorf Varipette, Fa. Eppendorf, Hamburg). Im Heizblock (3401 Thermostat, Fa. Eppendorf, Hamburg) wurden alle Standards bei 50°C über 2 Minuten erhitzt und im Eisbad aufbewahrt, um eine möglichst gleiche Behandlung der Standards und der Proben zu gewährleisten. In Vergleichsuntersuchungen der Standardreihen ohne Erhitzen und mit Erhitzen bis 50°C (nicht dargestellt) zeigte sich kein unterschiedliches Bindungsverhalten. Eine Durchmischung erfolgte 30 Sekunden über Kopf (Multi Tube Vortexer, Fa. Baxter, München). Aus jedem Standard wurden zweimal 100 µl (Doppelbestimmung) in zwei konische Polystyrolröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert.

Zweimal 100 µl Tracer in zwei konischen Polystyrolröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) ohne Zugabe von weiteren Testlösungen ergab die gesamte Traceraktivität (total counts = TC).

Zur Bestimmung der maximalen Bindung (B_0) und der unspezifischen Bindungen (non specific binding = NSB) wurde anstelle der Serumprobenverdünnungen 100 µl Lösung A verwendet, der NSB enthielt zusätzlich anstelle von Lösung B Lösung F.

Die Testlösungen wurden jeweils in Doppelbestimmungen in folgender Reihenfolge pipettiert (eine Ausnahme bildete nur TC mit 100 µl Volumen ohne weitere Zusätze):

Probe, Standard, B0, NSB:	100 µl
Lösung B (Probe, Standard, B0):	100 µl
Lösung F (nur NSB):	100 µl

Inkubationszeit 18 h bei 20°C

Lösung C:	100 µl
-----------	--------

Inkubationszeit 4 h bei 4°C

Lösung D:	500 µl
-----------	--------

Inkubationszeit 1 h bei 4°C

Zentrifugation 15 Minuten bei 4°C, 3800 rpm (Hettich Zentrifuge, Tuttlingen)

Präzipitatbildung und Dekantieren des Überstands

Lösung E:	1 ml
-----------	------

Zentrifugation 5 Minuten bei 4°C, 3800 rpm

Dekantieren des Überstands 5 Minuten über Kopf

Die Radioaktivität der Röhrchen wurde dann in einem γ -Zähler (LB 2111, Berthold EG&G, Bad Wildbad) gemessen, der aus den Messdaten mit Hilfe eines integrierten Rechners anhand der Standardkurve die Hormonmenge pro Röhrchen direkt berechnete. Hierfür wurden die Variablen des Testsystems einer logit-log-Transformation unterworfen. Die abhängige Variable ist dabei folgendermaßen definiert: $y = \text{logit } B/B_0 = \ln(B/B_0/(1-B/B_0))$, wobei B die Radioaktivität der Probe nach Subtraktion der unspezifischen Tracerbindung (NSB) darstellt. B₀ ist der entsprechende Wert des Nullstandards. Die unabhängige Variable ist $x = \log \text{ Dosis}$. Durch diese Transformation wird die Standardkurve über einen weiten Konzentrationsbereich nahezu linearisiert (Rodbard *et al.*, 1969).

3.7. Qualitätskriterien

3.7.1. Empfindlichkeit

Unter der Empfindlichkeit versteht man die kleinste Menge an Hormon, dessen Messwert sich statistisch signifikant vom Nullstandard unterscheidet. Man erhält sie, indem man nach Mehrfachmessung den mittleren B_0 -Wert und die 3-fache Standardabweichung bestimmt (B_0-3s). Diese beträgt 6 %. Aus der interpolierten Standardkurve erhält man den zugehörigen Dosiswert (Hunter & Greenwood, 1964; Sokolowski & Wood, 1981), der somit bei 94 % Bindung B/B_0 liegt ($c=0,4$ ng/ml).

Um eine sichere Hormonbestimmung zu gewährleisten, wurden jedoch nur Konzentrationen unterhalb des zweiten Standards ($c=0,781$) mit der mittleren % Bindung B/B_0 von 87 % gewertet. Bei Werten oberhalb der Bindung des zweiten Standards wurde die Messung in einer niedrigeren Verdünnung wiederholt.

3.7.2. Präzision

Aufgrund der unvermeidbaren zufälligen Fehler bei der Testdurchführung ergeben sich bei Mehrfachbestimmungen der gleichen Probe mehr oder weniger große Abweichungen vom erwarteten Wert. Die Interassayvarianz konnte anhand von zwei verschiedenen Proben mit den Mittelwerten 65,7 bzw. 42,5 ng/ml mit 2,4 % bzw. 2,6 % ermittelt werden. Die Parallelitätsbestimmung ergab eine mittlere Standardabweichung von 5,1 % in den Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80. Die Wiederfindungsrate wurde mittels Herstellung eines Gemisches aus Schafserum (Verdünnung 1:40) und verschiedenen Standardkonzentration (25ng/ml bis 3,125 ng/ml in einer geometrischen Verdünnungsreihe) ermittelt und ergab 96,2 %.

3.7.3. Spezifität

Ein Radioimmunoassay ist spezifisch, wenn eine Substanz in Anwesenheit anderer, chemisch ähnlicher Substanzen richtig bestimmt werden kann. Die Spezifität eines

Testsystems ist vor allem von dem verwendeten Antiserum und der Konzentration an kreuzreagierenden Substanzen in der zu messenden Probe abhängig. Die Überprüfung der Spezifität wird mit Hilfe eines Verdünnungstestes von Standard und unbekannter Probe durchgeführt. Es wurde ein Serum in der Verdünnung 1:160 mit den Standardkonzentrationen (25 ng/ml bis 3,125 ng/ml in einer geometrischen Verdünnungsreihe) eingesetzt. Die berechnete Konzentration ergab 55 ng/ml und lag bei 84 % des in einer Verdünnung von 1:40 gemessenen Wertes (65,5 ng/ml) (Sokolowski & Wood, 1981).

3.7.4. Stabilität der Proben

Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen von Serumproben (bis zu sechsmal) ergaben keine erhöhten Interassayvarianzen. Jedoch ist immer zu bedenken ist, dass durch jede starke Temperaturänderung die Qualität der Eiweiße sinkt.

Stark mit Feststoffen versetzte Proben (Gerinnsel) ergaben eine hohe Inter- und Intraassayvarianz von bis zu 40 %, so dass hier eine Bestimmung sehr ungenau wird. Erneute Zentrifugation ergaben keine deutlichen Verbesserungen und diese Proben konnten in die Auswertung nicht miteinbezogen werden.

4. Western-Blot

4.1. Prinzip des Western-Blots

Der Western-Blot (auch: Protein-Blot) ist die Bezeichnung für eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter, z.B. Nitrocellulose, übertragen werden. Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf den Filtern immobilisiert werden. Das ursprünglich im Gel enthaltende Trennmuster der Proteinmoleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, so dass man eine exakte Replik des ursprünglichen Gels bekommt. Unter geeigneten Bedingungen bleibt beim Transfer die Immunreaktivität unverändert. Da die Proteine nach dem Transfer für die Behandlung mit Antikörpern zugänglich sind,

erlaubt der Einsatz der Blotting-Technik eine Identifikation einzelner Proteine in einem komplexen Gemisch anderer Proteine. Die Bindung der Antikörper an die immobilisierten Proteine kann auf verschiedene Weise nachgewiesen werden. Bei der hier durchgeführten indirekten Nachweismethode wird der bereits gebundene und spezifische Antikörper durch einen Sekundärantikörper nachgewiesen, der seinerseits mit einem Enzym markiert ist. Das Enzym reagiert mit einem zugegebenen chemilumineszierenden Reagenz, und das emittierte Licht des destabilisierten Reagenz wird anschließend auf Röntgenfilm aufgenommen.

Die Bezeichnung Western-Blot ist von einer ursprünglich für den Transfer von DNS-Molekülen auf Trägermembrane entwickelten Methoden abgeleitet, die nach ihrem Erfinder, Edwin Southern, als Southern-Technik bezeichnet wurde. Sein Name gab die Anregung, Verfahren für den Transfer anderer Molekülarten nach Richtungsbezeichnungen der Windrose zu benennen.

4.2. Testlösungen

Lösung a) 15 % Trenngel:

1,575 ml	Aqua dest.
2,475 ml	„unterer“ Puffer: Tris 90,8 g, SDS 2 g, EDTA 5,96 g in 500 ml Aqua dest. lösen pH 8,8
4,95 ml	Acrylamid 30 %
0,825 ml	Glycerol 50 %: Glycerol 50 ml + Aqua dest. 50 ml
4 µl	Tetramethylethyldiamin (Temed): 99 %
75 µl	Ammoniumpersulfat (APS) 10 %: 100 mg APS in 1ml Aqua dest.

Lösung b) Sammelgel

2,4 ml	Aqua dest.
0,99 ml	„oberer“ Puffer: Tris 12,2 g + SDS 0,8 g in 200ml Aqua dest. lösen
0,61 ml	Acrylamid 30 %
3,2 µl	Temed
19,2 µl	APS 10 %

Lösung c) Laufpuffer

100 ml	Fertiglösung von Biorad T10/Glycine/SDS
900 ml	Aqua dest

Lösung d) Transferpuffer (Blotpuffer)

3 g	Tris
14,5 g	Glycin
200 ml	Methanol

auf 1000 ml auffüllen mit Aqua dest.

Lösung e) Blockpuffer mit Magermilchpulver

0,01 M	Tris/HCl pH 7,5
0,15 M	NaCl
5 % (w/v)	Magermilchpulver
5 %	BSA

Lösung f)

5 ml	Lösung e)
5 µl	Kaninchenserum Anti-Peptid 1 (1.Ak B1, 90.Tag, s. Kapitel II.3.)

Lösung g) Waschpuffer

0,05 M	Tris/HCl pH 7,5
0,25 M	NaCl
3 mM	EDTA
0,05 % (w/v)	Tween 20

Lösung h)

10 ml	Lösung e)
5 µl	2. Antikörper Anti-Kaninchen v. Cell Signaling Rabbit HRP (horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase, anti-rabbit Antibody HRP linked (H+L))
10 µl	Anti Biotin Antibody

Lösung i)

4,5 ml	Aqua dest.
250 µl	Lumiglo Reagent A (Cell Signaling)
250 µl	Peroxide Reagent B (Cell Signaling)

4.3. Durchführung (SDS-PAGE und Western-Blot)

Die Proteinauftrennung wird zunächst durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erzielt und der Proteinnachweis erfolgt durch den Western-Blot.

SDS-PAGE:

Es wird ein 15 % Trenngel (Lösung a) gegossen und mit 70 % Isopropanol luftdicht abgeschlossen (Halterung von BioRad, München). Nach 30 Minuten kann das Sammelgel (Lösung b) aufgetragen werden. Die Gele werden dann in Lösung c) transferiert. Die Proben (10 µl Hammelserum, $c=40$ ng/ml) und das oob-Antigen (0,1 µg/5 µl) werden im Verhältnis 1:4 bzw. 1:2 mit Laemmli-Puffer (Sigma) verdünnt und 7 Minuten bei 90°C erhitzt. Die Probe (10 µl) und der oob-Standard (5 µl) werden jeweils einmal einzeln und einmal gemischt (Verhältnis oob-Standard zur Probe 1:2) in die Sammeltaschen pipettiert. Als Standards werden 5 µl peQ GOLD Protein-Marker IV (peQLab) und 5 µl Standard Proteine (Biotinylated Protein Ladder von Cell Signaling, Marker bei 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 140 und 200 kD) aufgetragen. Die Probe (5 µl) wird zusätzlich mit 5 µl der Biotinylated Protein Ladder (Cell Signaling) vermischt und ebenfalls auf das Gel appliziert.

Die Elektrophorese wird zunächst für 10 Minuten bei 100 Volt gestartet (Elektrophoreseapparatur von BioRad, München), die Voltzahl erhöht sich dann für weitere 60 Minuten auf 180 Volt.

Western-Blot:

Zwischen jeweils drei mit Lösung d) (Transferpuffer) befeuchtete Whatman-Membranen wird das Elektrophorese-Gel auf eine ebenfalls mit Lösung d) befeuchtete Nitrocellulose-Membran platziert (Semi-Dry Transfer Cell, Trans Blot SD, BioRad,

München). Bei 15 Volt und 0,46 Ampere werden die Proteine über 25 Minuten auf die Nitrocellulose-Membran transferiert („blot“). Die Nitrocellulose-Membran inkubiert über 18 Stunden in Lösung e) (Blockpuffer) bei Raumtemperatur (RT). Darauf folgt eine weitere Inkubation mit dem 1. Antikörper in Lösung f) über 24 Stunden bei 4°C. Die Inkubation wird durch dreimaliges Waschen der Membran à 5 Minuten mit Lösung g) beendet. Der 2. Antikörper in Lösung h) inkubiert über eine Stunde bei RT und wird erneut durch dreimaliges Waschen der Membran à 5 Minuten mit Lösung g) gestoppt. Die chemilumineszierenden Reagenzien werden mittels Lösung i) zugegeben, und nach einer Minute bei RT wird das Röntgenfilmmaterial über eine Minute durch das emittierende Licht belichtet (s.Abb.III.4.3.).



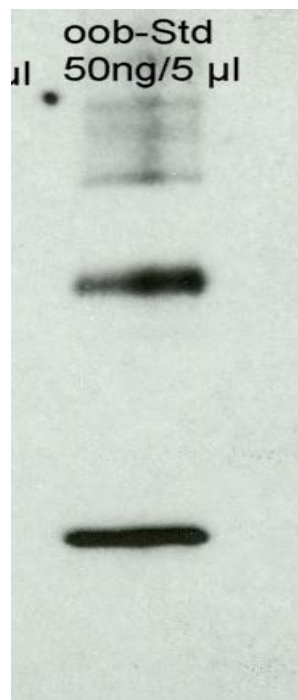
Abbildung III.4.3. Western-Blot

**Proben von links nach rechts: Marker, Hammelserum (10 µl, c=40 ng/ml),
Lösung aus Hammelserum und oob-Standard (1:2), oob-Standard (5 µl, c=10
µg/ml), Lösung aus Marker und Hammelserum (5 µl)**

Man erkennt im reinen Schafleptin (oob-Standard) mehrere Banden, die im Vergleich mit der Lösung des Standards mit dem Hammelserum verschoben erscheinen. Ebenfalls verschoben zeigen sich die Banden des Markers (10-30 kD). Die Erklärung dafür könnte in einer Di- und Trimerbildung liegen (siehe Kapitel III.4.4), auch könnte es zu einer Verschiebung der Laufeigenschaften der Proteine bei niedrigen Serumverdünnungen kommen (siehe Kapitel III.4.5).

4.4. Di- und Trimerbildung

Der reine ovine Leptinstandard (oob) zeigt eine deutliche Bande bei der erwarteten Proteingröße von 16 kD (S. Abb. III.4.4.). Jedoch sind weitere Banden im Bereich von 32 kD und 48 kD zu sehen, so dass von einer Dimer-, Trimer- bzw. Oligomerbildung ausgegangen werden muss. Dieses Phänomen der Dimer- und Oligomerbildung im Western-Blot wurden auch von Lammert et al. beschrieben (Lammert *et al.*, 2001). Delavaud et al. sowie Gertler et al. fanden bei der Gelfiltration des rekombinanten Schafleptins ca. 10 % Dimerbildung (Delavaud *et al.*, 2000; Gertler *et al.*, 1998), Blache et al fand bei der Gelfiltration des rekombinanten Rinderleptins ca. 5 % Dimerbildung (Blache *et al.*, 2000). In der Serumprobe kann man bei starker Kontrastierung gleichartige Banden erkennen, so dass auch hier von einer Oligomerbildung ausgegangen werden kann.



**Abbildung III.4.4. 50 ng/5 µl oob Standard mit Bildung mehrerer Banden
(unterste und erste Bande 16 kD, zweite Bande von unten ca. 32 kD,
dritte Bande von unten ca. 48 kD, weitere Banden zwischen 60 und 80 kD)**

4.5. Veränderung der Laufeigenschaft des Markers durch Serumzugabe

Das Serum hat einen hohen Proteingehalt und ist dadurch von den Standards, die im Gegensatz zu dem Serum eine sehr niedrige Proteinkonzentration aufweisen, auch hinsichtlich der Laufeigenschaft in der Gelelektrophorese zu unterscheiden. Um dieses Phänomen darzustellen, wurde das Hammelserum mit dem oob-Standard und mit der Markerproteinlösung (Cell Signaling) gemischt. Es ergab sich eine verlangsamte Laufgeschwindigkeit (Shift Effect) mit einer Verschiebung aller Banden. Somit konnte das Molekulargewicht der Serumbanden anhand der mit Serum versetzten Standards ermittelt werden und ergaben eine deutliche Bande bei 16 kDa sowie schwächere Banden bei den für die o.g. Di- und Trimerbildung spezifischen Molgewichten (~32 kDa und ~48 kDa, s. Abb.III.4.5.).

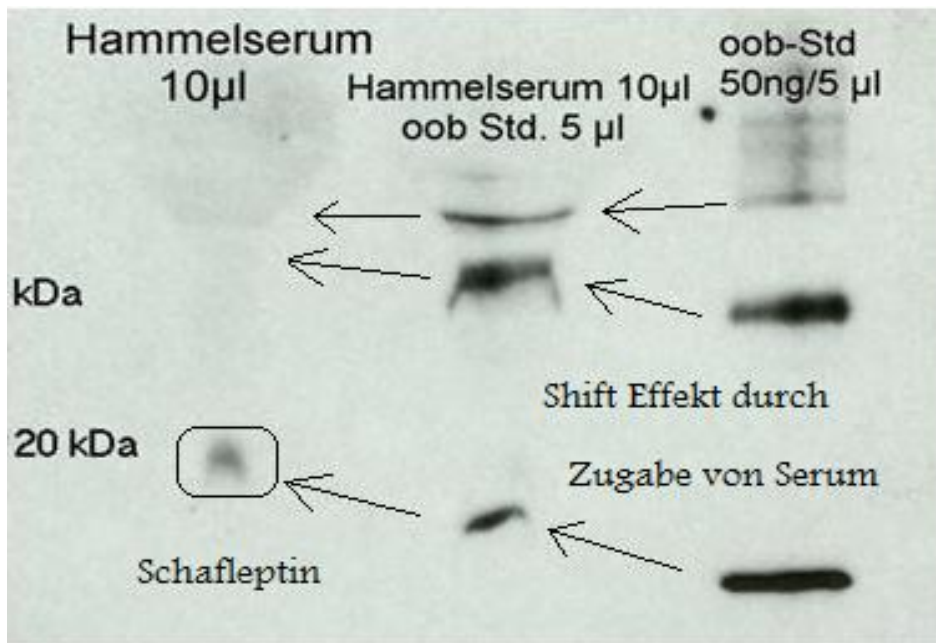


Abbildung III.4.5. Darstellung der Verschiebung der Banden (Shift Effekt) nach Zugabe der Hammelserumprobe (Ausschnitt aus der Abb. III.4.3)

5. Untersuchungen in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen

5.1 Untersuchungszeitraum und -objekte

Die Untersuchungen wurden in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen im Zeitraum von Januar 1998 bis März 1999 durch Gönen Kaya unter der Betreuung von Prof. Dr. Dr. h.c. H. Bostedt und PD Dr. R. Hospes durchgeführt (Kaya, 2001). 49 Mutterschafe gebaren insgesamt 85 Lämmer, davon waren 17 Einlinge, 56 Zwillinge mit acht tot geborenen bzw. kurz nach der Geburt verstorbenen Tieren und 12 Drillinge mit drei tot geborenen Lämmern. Unter den verbliebenen 74 neugeborenen untersuchten Lämmern waren 40 männlichen und 34 weiblichen Geschlechts. Sie gehörten den Rassen Merinolandschaf (n=51) und Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf (n=23) an. Die mittlere Lämmerzahl pro Geburt betrug 1,70 (Merinolandschaf) und 1,64 (Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf).

5.2 Gruppeneinteilung

Es wurden vier verschiedene Umgebungstemperaturbereiche unterhalb der Thermoneutralität geschaffen, in denen die Lämmer ihre ersten 24 Stunden erlebten, auch um die Auswirkungen verschieden hoher Energieverbräuche beim neugeborenen Lamm zu untersuchen. Entsprechend der Geburtsart und Umwelttemperatur wurde eine Einteilung in vier Gruppen, A bis D, vorgenommen. Eine Spontangeburt ohne exogene Hilfe lag in den Gruppen A bis C vor. In der Gruppe D konnte die Geburt nur durch eine Sectio caesarea beendet werden.

Die Stalltemperaturen der Gruppe A (n=20) lag zwischen 12 und 25°C, in der Gruppe B (n=20) zwischen 1 und 11°C, in der Gruppe C (n=20) von -8°C bis -1°C und in der Gruppe D (n=14) von 17°C bis 22°C.

Die Lämmerzähl pro Ablammung betrug bei den Gruppen A und B jeweils 1,67, bei der Gruppe C 1,40 und bei der Gruppe (Sectio) D 2,33.

5.3 Stalltemperaturmessungen

Die Temperaturmessungen wurden zweistündlich anhand von fest installierten Quecksilberthermometern im Stall in 30 cm Höhe durchgeführt.

In der Gruppe A war der arithmetische Mittelwert bei Geburt mit $18,0 \pm 3,7$ °C (min. 12°C, max. 23°C) am niedrigsten und zur 24. Stunde postnatal (pn.) mit $18,8 \pm 4,3$ °C (min. 12°C, max. 25°C) am höchsten.

In der Gruppe B betrug der arithmetische Mittelwert bei Geburt $5,8 \pm 2,2$ °C (min. 2°C, max. 8°C) und war somit am niedrigsten, der höchste Wert war zur 12. Lebensstunde mit $6,9 \pm 2,6$ °C (min. 1°C, max. 11°C) zu verzeichnen.

Bei der Gruppe C betrug der arithmetische Mittelwert bei Geburt $-4,5 \pm 2,0$ °C (min. -8°C, max. -2°C) und war ebenfalls am niedrigsten, der höchste Wert ergab sich zur 24. Lebensstunde mit $-1,9 \pm 1,6$ °C (min -8°C, max. -1°C).

Bei der Gruppe D betrug der niedrigste arithmetische Mittelwert zur 12. Stunde pn. $19,1 \pm 1,4$ °C (min. 17°C, max. 21°C) und der höchste Wert war zur Geburt $19,4 \pm 1,1$ °C (min. 18°C, max. 21°C).

5.4 Körperliche Untersuchungen

Das neugeborene Lamm wurde körperlich untersucht und gewogen sowie in Bezug auf die freie Atmung, Herz-Kreislaufsystem, Stehversuche und Trinkverhalten

gegebenenfalls versorgt. Die Körperinnentemperatur wurde anhand eines Digitalfieberthermometers (Fa. Hartmann) und das Körpergewicht zum Zeitpunkt 0 h, 12 h und 24 h postnatal mit einer Digitalwaage (Fa. Rhewa 802) bestimmt.

5.5 Blutprobenentnahme und -bearbeitung

Die Blutproben wurden innerhalb der ersten zwei Minuten postnatal, sowie zu den Zeitpunkten 1 h, 3 h, 6 h, 12 h und 24 h aus der Vena jugularis mittels einer sterilen Einmalkanüle (Sterican, 0,90x38mm, Fa. B.Braun, Melsungen) gewonnen und in für die jeweilige Untersuchung geeignete Monovetten (Fa. Sarstedt, Art. Nr. 02264) umgefüllt. Die Proben für die Leptinbestimmungen wurden über 10 Minuten bei 3000 rpm/min zentrifugiert, das überstehende Plasma abpipettiert und bei -20°C eingefroren. Die Blutfettwerte konnten unmittelbar nach der Probengewinnung bestimmt werden.

5.6 Bestimmung der Plasmatriglyceridwerte

Die Plasmatriglyceride konnten anhand des Verfahrens nach Wahlefeld bestimmt werden (Wahlefeld, 1974). Das durch die enzymatische Spaltung des Triglycerids entstehende Glycerin wird phosphoryliert und das über die Pyruvatkarboxylase entstehende Pyruvat mittels $\text{NADH} + \text{H}^+$ hydriert (Substrate der Fa. Boehringer, Mannheim). Das verbrauchte NADH ist äquivalent zu dem Glycerin und zu dem messende Reagenz (Photometer Modell EPAC 6140; Fa. Eppendorf; Wellenlänge 546 nm).

5.7 Bestimmung der Plasmacholesterinwerte

Die Cholesterinbestimmung erfolgte nach der Methode von Siedel (Siedel *et al.*, 1981). Nach Spaltung des Cholesterinesters entsteht durch die Cholesterinoxidase unter anderem Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dieses bildet mittels des Enzyms Peroxidase

zusammen mit 4-Aminophenazon und Phenol einen mit dem Photometer (Modell EPAC 6140; Fa. Eppendorf, Wellenlänge 546 nm) zu messenden roten Farbstoff, der proportional zu der Cholesterinkonzentration im Serum ist (Substrate der Fa. Boehringer, Mannheim).

5.8 Bestimmung der Blutglucosewerte

Die Blutglucosekonzentration wurde direkt im Anschluss an die Blutentnahme mit dem Schnellmessgerät Reflolux ® S (Boehringer, Mannheim) bestimmt. Hierzu wurden die Haemo-Glukotest ® 20-800 R-Teststreifen (Boehringer, Mannheim) zur spezifischen Bestimmung von Glucose im Blut verwendet.

Die Glucosebestimmung beruht auf der spezifischen Glucoseoxidase-Peroxidase-Reaktion. Die β -D-Glucose wird in Gegenwart von Luftsauerstoff durch das katalytische Enzym Glucoseoxidase (GOD) zu δ -D-Gluconoalacton oxidiert. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert mit Hilfe des Katalysators Peroxidase (POD) die Indikatoren. Die entstehende Farbstoffentwicklung der oxidierten Indikatoren wird im Messgerät Reflolux ® S bei einer Wellenlänge von 950 nm reflexphotometrisch gemessen und in Wertegruppen zwischen 10 und 500 mg/dl angezeigt.

Als Referenzmethode kam das Verfahren nach Schmidt in Form der Hexokinase-Methode (Substrate der Fa. Boehringer, Mannheim; Glucoquant ® Glucose / HK) zur Anwendung (Schmidt, 1973). Glucose und Adenosintriphosphat (ATP) wird hier durch die Hexokinase zu Glucose-6-Phosphat und Adenosindiphosphat (ADP) phosphoryliert. Durch das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wird dann Glucose-6-Phosphat und NADP zu Gluconat-6-Phosphat und $NADPH + H^+$. Die entstandene Menge an NADPH ist äquivalent zu der Glucosekonzentration und kann photometrisch (Photometer Modell EPAC 6140; Fa. Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen werden.

Die Übereinstimmung der beiden Methoden wurde mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0,993$ ($p < 0,0001$) berechnet und die Regressionsgleichung der beiden Methoden

ist $y=1,016 \cdot x + 0,004$. Für die unter Kapitel III. dargestellten Ergebnisse wurden die Werte der Glucosebestimmungen durch den Reflolux ® S (Boehringer, Mannheim) mit den Haemo-Glukotest ® 20-800 R-Teststreifen (Boehringer, Mannheim) verwendet.

5.9 Bestimmung der Plasma- β -Hydroxybutyratwerte

Für die Bestimmung der Plasma- β -Hydroxybutyratwerte lag das enzymatische Verfahren nach Williamson (Substrate der Fa. Sigma Diagnostics, 310-UV) zugrunde (Williamson *et al.*, 1962). β -Hydroxybutyrat wird durch das Enzym β -Hydroxybutyratdehydrogenase zu Acetoacetat oxidiert. Gleichzeitig wird äquimolar NAD zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert, welches photometrisch bei der Wellenlänge 340 nm erfasst werden kann (Photometer Modell EPAC 6140; Fa. Eppendorf).

6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte auf den Rechnern des lokalen Rechnernetzwerkes (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Verwendung des Statistik-Programmpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993).

Die Beschreibung der Daten geschah tabellarisch mit Hilfe des Programms BMDP1D. Bei angenäherter Normalverteilung wurden die arithmetischen Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Minima (min), Maxima (max) und Stichprobenumfänge (n) berechnet. Rechtsschief verteilte Merkmale wurden für die statistische Auswertung logarithmisch transformiert.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde unter Berücksichtigung der Faktoren „Gruppe“, „Zeit“, „Rasse“, „Geschlecht“ und „Geburstyp“ bei den Lämmern durchgeführt. Bei annähernd normalverteilten Datensätzen wurde dementsprechend eine fünffaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor „Zeit“ mit dem Programm BMDP2V durchgeführt.

Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern erfolgte für die quantitativen Merkmale mit Hilfe von Korrelationsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Korrelationskoeffizienten, der Signifikanz (p) und in einigen Fällen der Regressionsgeraden ($y=m*x+b$).

Das Signifikanzniveau wurde folgendermaßen definiert:

$p \leq 0,0001$	hoch signifikant
$p \leq 0,01$	signifikant
$p \leq 0,05$	schwach signifikant
$p \geq 0,05$	nicht signifikant

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den Messgrößen und den Umgebungsparametern erfolgte nach Überprüfung der Linearität mit der multiplen linearen Regression unter Verwendung des Programms BMDP1R. Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse wurden mit dem Programm Excel Microsoft Office XP erstellt.

IV ERGEBNISSE

Alle Untersuchungen bis auf die Leptinbestimmungen wurden, wie bereits unter dem Kapitel III.5 beschrieben, in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen durch Gönen Kaya unter der Betreuung von Prof. Dr. Dr. h.c. H. Bostedt und PD Dr. R. Hospes durchgeführt (Kaya, 2001).

1. Darstellung der Leptinserumkonzentrationen aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten

Es konnten von 74 Lämmern der vier Gruppen zu sechs verschiedenen Zeitpunkten 398 Bestimmungen durchgeführt werden (89,6 %). Bei 12 der fehlenden 46 Proben reichte das Material nicht aus (2,7 %), und bei 34 Seren (7,7 %) war ein hoher Feststoffanteil (Blut- oder Fibringerinnsel) vorhanden, und es konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse aufgrund einer erhöhten Intra- und Interassayvarianz erzielt werden.

Die Anzahl der Leptinbestimmungen zu den verschiedenen Zeitpunkten setzt sich wie folgt zusammen:

Zeitpunkt in h	Leptinbestimmungen (n=)	Bestimmungen in %
0	73	98,6
1	65	87,8
3	66	89,2
6	57	77,0
12	69	93,2
24	68	91,9

Tabelle IV.1.a) Anzahl der Leptinbestimmungen zu den sechs Zeitpunkten

Die Leptinbestimmungen ergaben Werte zwischen 4,8 und 500 µg/l (s. Tab. IV.1.b). Der arithmetische Mittelwert zur Geburt lag bei 26,7 µg/l mit einer Standardabweichung von 22,8 und einem Standardfehler (Std.f.) von 2,7 µg/l. Das

Minimum und Maximum zur Geburt (Stunde 0) betrug 8,1 bzw. 150 µg/l. Der Mittelwert (MW) stieg innerhalb der nächsten Stunde nur gering an auf 27,0 µg/l (SD: 39,3 µg/l, Std.f.: 4,9 µg/l) und sank danach in der 3. Stunde pn. auf den geringsten Mittelwert von 25,4 µg/l (SD: 23,7 µg/l, Std.f.: 2,9 µg/l). Die niedrigsten absoluten Werte waren in der ersten postnatalen Stunde (h pn.) 5,9 µg/l und in der dritten postnatalen Stunde 5,1 µg/l. Die maximalen Werte (max) waren in der ersten Stunde pn. ebenfalls höher als zur 3. Stunde pn. mit 284,2 µg/l bzw. 174,5 µg/l. Das Minimum der Leptinwerte aller Lämmer maß in der 6. Stunde pn. 4,8 µg/l (max. 217,5 µg/l) bei einem deutlich angestiegenem Mittelwert von 38,9 µg/l (SD: 35,6 µg/l, Std.f. : 4,7 µg/l). Innerhalb der folgenden 6 und 18 Stunden lag der Mittelwert bei 58,3 µg/l (SD: 52,3 µg/l, Std.f. : 6,3 µg/l) bzw. 81,5 µg/l (SD: 84,9 µg/l, Std.f. : 10,3 µg/l). Auch die Minima und Maxima stiegen wieder an auf 8,3 µg/l (min 12h), 6,9 µg/l (min 24h) bzw. 248,5 µg/l (max 12h) und 500,0 µg/l (max 24h). Zur Darstellung und Veranschaulichung der Verteilung, der Schiefe und des Streuungsmaßes wurden die Tabelle IV.1.b) und Abbildung IV.1a) zusammengestellt.

Leptinkonzentrationen in µg/l aller Gruppen (A-D) zu den 6 Zeitpunkten

Zeitpunkt	MW	SD	Std.f.	min	max	Median	Q .25	Q .75
0h	26,7	22,8	2,7	8,1	150,0	20,9	11,1	34,9
1h	27,0	39,3	4,9	5,9	284,2	15,0	9,3	31,4
3h	25,4	23,7	2,9	5,1	174,5	22,7	10,6	32,4
6h	38,9	35,6	4,7	4,8	217,5	23,0	19,8	50,5
12h	58,2	52,3	6,3	8,3	248,5	44,1	25,6	63,8
24h	81,4	84,9	10,3	6,9	500,0	52,7	35,4	92,8

Tabelle IV.1.b) Leptinkonzentrationen in µg/l aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min), Maximum (max), Median, unteres und oberes Quartil (Q .25; Q .75)

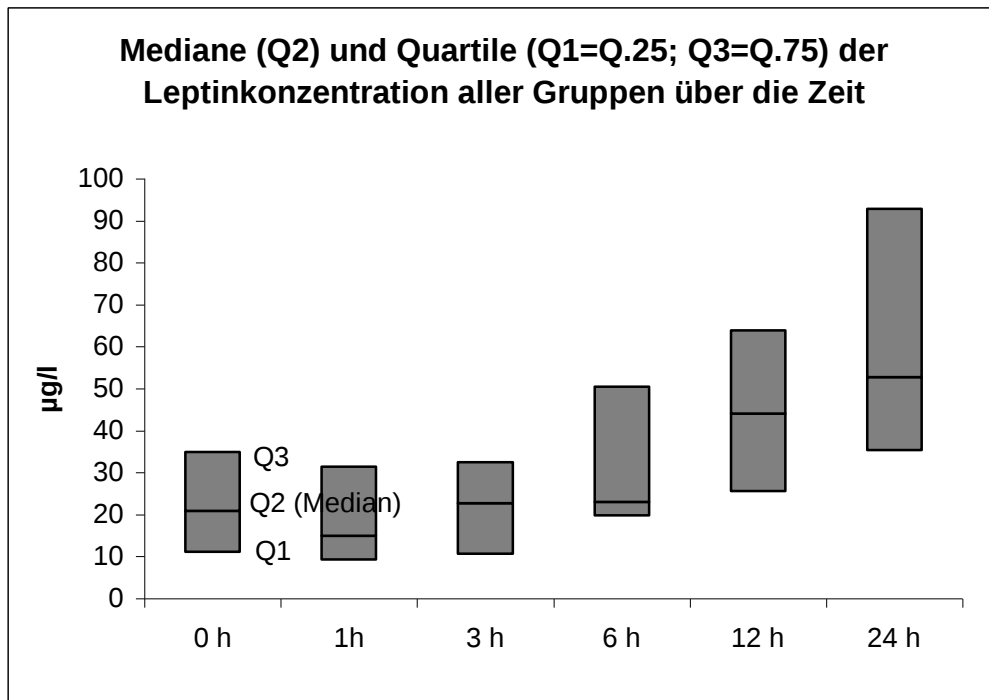


Abbildung IV.1.a) Mediane und Quartile zur Darstellung des Streuungsmaßes der Leptinkonzentrationen in µg/l aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten

Es ergab sich eine rechtsschiefe Verteilung (Median < MW), so dass für die Darstellung und die Korrelationsanalyse die Logarithmen der Leptinkonzentrationen angegeben wurden. Die Logarithmen der Leptinkonzentrationen (lg Leptin) sind als Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Standardfehler (Std.f.), sowie als Minimum (min) und Maximum (max) in der folgenden Tabelle ausgewiesen.

Logarithmus der Leptinkonz. (MW) aller Gruppen (A-D) zu den 6 Zeitpunkten					
Zeitpunkt	MW	SD	STD.F.	MIN	MAX
0h	1,32	0,29	0,03	0,91	2,18
1h	1,26	0,34	0,04	0,77	2,45
3h	1,29	0,30	0,04	0,71	2,24
6h	1,46	0,34	0,05	0,68	2,34
12h	1,63	0,35	0,04	0,92	2,40
24h	1,75	0,38	0,05	0,84	2,70

Tabelle IV.1.c) Logarithmen der Leptinkonzentrationen aller Bestimmungen zu den sechs Zeitpunkten Leptinkonzentrationen mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

Für die Logarithmen der Leptinkonzentrationen aller Gruppen ergab sich ein signifikanter Anstieg über die Zeit mit $p < 0,000$ in der Varianzanalyse:

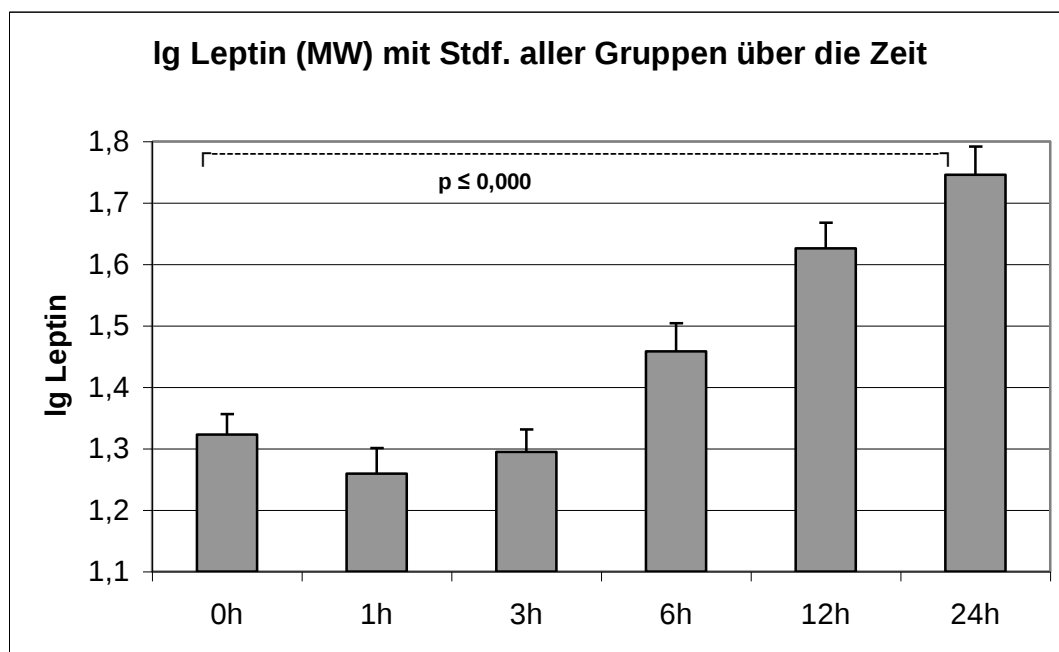


Abbildung IV.1.b) Mittelwerte der lg Leptinkonzentrationen mit Standardfehler (Std.f.) zu den sechs Zeitpunkten

Die weitere Analyse der Daten ergab signifikante Unterschiede hinsichtlich der Leptinkonzentrationen zwischen den 4 Gruppen mit $p = 0,004$. Des Weiteren hatte die Gruppe in Wechselwirkung mit der Zeit als Wiederholungsfaktor (Varianzanalyse) auch einen deutlich signifikanten Einfluss auf die Logarithmen der Leptinkonzentrationen mit $p = 0,000$.

Die Gruppeneinteilung der Gruppen A-C erfolgte aufgrund der Umgebungstemperatur: Gruppe A: 12-25°C, Gruppe B: 1-11°C, Gruppe C: -8 bis -1°C. Die Entbindung der Lämmer der Gruppe D erfolgte per Kaiserschnitt mit der konstantesten Umgebungstemperatur von 17-22°C. Die Anzahl der Lämmer (n) war in den Gruppen A-C konstant mit je $n = 20$ Tieren. Innerhalb des angegebenen Zeitraums waren 14 Lämmer per Kaiserschnitt geboren und bildeten die Gruppe D. Demzufolge gab es deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, die nun ausführlicher beschrieben werden.

So betrug der arithmetische Mittelwert der Logarithmen der Leptinkonzentrationen ($\lg$ Leptin) in Gruppe A zur Geburt 1,38 mit einer Standardabweichung (SD) von 0,25 und einem Standardfehler (Std.f.) von 0,06. Der Mittelwert ($\lg$ Leptin) von Gruppe C lag hingegen nur bei 1,19 (SD: 0,27, Std.f.: 0,06). Sowohl die Minima (min) als auch die Maxima (max) waren in Gruppe C mit 0,91 (min) bzw. 2,04 (max) niedriger als in Gruppe A mit 0,99 (min) bzw. 2,18 (max).

Die Logarithmen der Leptinwerte der Gruppe B zur Geburt waren im Mittel niedriger mit 1,34 (SD: 0,32, Std.f.: 0,07) und die der Gruppe D waren die höchsten mit 1,39 (SD: 0,28, Std.f.: 0,08), wobei der niedrigste und höchste Wert im Vergleich zu den Gruppen A-C im unteren Niveau waren (min: 0,91, max: 1,74). Der Abfall der arithmetischen Mittelwerte ($\lg$ Leptin) in der ersten Stunde war in Gruppe D mit 0,28 am deutlichsten. In den Gruppen A und B kam es nur zu einer Absenkung von 0,02 auf 1,36 in Gruppe A und um 0,01 auf 1,33 in der Gruppe B. In Gruppe C sank der Mittelwert ebenfalls nur um 0,01 auf 1,18 (SD: 0,27, Std.f.: 0,06). Der niedrigste Wert in der 1. Stunde postnatal kam mit 0,77 in der Gruppe B vor, dessen Maximum von 2,45 genauso hoch war wie in Gruppe A. Die Differenz zwischen Maximum und Minimum ($\lg$ Leptin) war in der Gruppe C in der 1. Stunde

am niedrigsten mit 0,79 (min: 0,89, max: 1,68) und lag auch in Gruppe D unter 1 mit 0,85 (min: 0,95, max: 1,80). In Gruppe D war die Differenz der höchsten und der niedrigsten Werte im Mittel (0,91) niedriger als in Gruppe A, B und C mit einer mittleren Differenz von 1,30 (Gruppe A), 1,40 (Gruppe B) und 1,12 (Gruppe C).

Von der 3. bis zur 6. Stunde stiegen in den Gruppen A bis C die mittleren Werte (lg Leptin) an mit dem deutlichsten Anstieg in Gruppe A auf 1,61 (SD: 0,43, Std.f.: 0,11, min: 0,85 und max: 2,34). Der zweithöchste arithmetische Mittelwert wurde in Gruppe B mit 1,58 in der 6. Stunde erreicht (SD: 0,18, Std.f.: 0,04, min: 1,30 und max: 2,34). Der geringste Anstieg um 0,13 auf einen Mittelwert von 1,37 (lg Leptin) war in Gruppe C zur 6. Stunde zu verzeichnen. Die Standardabweichung betrug zu diesem Zeitpunkt 0,26 und der Standardfehler 0,07 bei einem Minimum von 0,88 und einem Maximum von 1,86. In Gruppe D kam es zu keiner Veränderung hinsichtlich der arithmetischen Mittelwerte der Logarithmen der Leptinkonzentrationen (lg Leptin) von 1,18 zwischen der 3. und 6. Stunde (SD: 0,28 bzw. 0,34, Std.f.: 0,09 bzw. 0,11). Die zwei niedrigsten Werte wurden zu diesen beiden Zeitpunkten erreicht mit 0,71 bzw. 0,68 (lg Leptin) und demzufolge sind auch die maximalen Werte eines niedrigen Wertebereichs mit 1,66 bzw. 1,71 nicht so hoch wie die der anderen Gruppen.

Ab der 6. Stunde war in allen Gruppen ein Anstieg der mittleren lg Leptinkonzentrationen zu erkennen. Der steilste Anstieg war mit 0,33 in Gruppe A auf den Mittelwert 1,94 (SD: 0,33, Std.f.: 0,08) zu sehen. Den geringsten Anstieg maß mit 0,05 die Gruppe B (MW lg Leptin: 1,63; SD: 0,25, Std.f.: 0,06). Die Mittelwerte (lg Leptin) der Gruppen C und D lagen sehr nah beieinander mit 1,45 bzw. 1,44. Die Standardabweichungen waren zu diesem Zeitpunkt 0,25 bzw. 0,33 und der Standardfehler beträgt in Gruppe C 0,06 und in Gruppe D 0,09. Obwohl der Anstieg der mittleren Logarithmen der Leptinkonzentrationen in Gruppe A zum letzten gemessenen Zeitpunkt nach 24 Stunden nicht mehr so deutlich war mit einer Differenz von 0,16 auf einen Wert von 2,10 (SD 0,32, Std.f.: 0,07), war dieser Mittelwert der höchste aller Gruppen. Auch das Minimum und das Maximum war zu diesem Zeitpunkt am höchsten mit 1,46 (min) bzw. 2,70 (max); dieser letzte Wert war auch der maximale Werte der Gruppe B nach 24 Stunden. Die 24 h-Mittelwerte (lg Leptin) der Gruppen B und D waren sehr ähnlich mit 1,66 und 1,64

(SD: 0,34 bzw. 0,26 und Std.f.: 0,08 bzw. 0,07). Auch in Gruppe D wird zu diesem Zeitpunkt der für diese Gruppe höchste Wert mit 1,95 (lg Leptin) erreicht. Nur in Gruppe C ist das Maximum zur 24. Stunde niedriger als 21 Stunden zuvor (2,21 bzw. 2,24). Der Mittelwert der lg Leptinkonzentration dieser Gruppe lag bei 1,52 und ist der niedrigste Mittelwert aller Gruppen (SD: 0,30, Std.f.: 0,08). Die Daten sind in Tabelle IV.1.d) wiedergegeben und zur Veranschaulichung in Abbildung IV.1.c) dargestellt.

Logarithmen der Leptinkonzentrationen der Gruppen A bis D zu den 6 Zeitpunkten							
Zeitpunkt	Gruppe	MW	SD	STD.F.	MIN	MAX	entlogMW
0 h	A	1,38	0,25	0,06	0,99	2,18	23,99
1 h		1,36	0,44	0,11	0,93	2,45	22,91
3 h		1,33	0,27	0,06	0,92	2,24	21,38
6 h		1,61	0,43	0,11	0,85	2,34	40,74
12 h		1,94	0,33	0,08	1,33	2,4	87,10
24 h		2,1	0,32	0,07	1,46	2,7	125,89
0 h	B	1,34	0,32	0,07	0,92	2,18	21,88
1 h		1,33	0,3	0,07	0,77	2,45	21,38
3 h		1,38	0,36	0,08	0,78	1,94	23,99
6 h		1,58	0,18	0,04	1,3	2,34	38,02
12 h		1,63	0,25	0,06	0,92	2,4	42,66
24 h		1,66	0,34	0,08	0,93	2,7	45,71
0 h	C	1,19	0,27	0,06	0,91	2,04	15,49
1 h		1,18	0,3	0,07	0,89	1,68	15,14
3 h		1,24	0,26	0,06	0,94	2,24	17,38
6 h		1,37	0,26	0,07	0,88	1,86	23,44
12 h		1,45	0,25	0,06	1,04	2,19	28,18
24 h		1,52	0,3	0,08	0,84	2,21	33,11
0 h	D	1,39	0,28	0,08	0,91	1,74	24,55
1 h		1,11	0,24	0,07	0,95	1,8	12,88
3 h		1,18	0,28	0,09	0,71	1,66	15,14
6 h		1,18	0,34	0,11	0,68	1,71	15,14
12 h		1,44	0,33	0,09	0,92	1,85	27,54
24 h		1,64	0,26	0,07	1,09	1,95	43,65

Tabelle IV.1.d) Logarithmen der Leptinkonzentrationen der vier Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max), zur Veranschaulichung wurde der entlogarithmierte Mittelwert der Leptinkonzentration hinzugefügt (entlogMW)

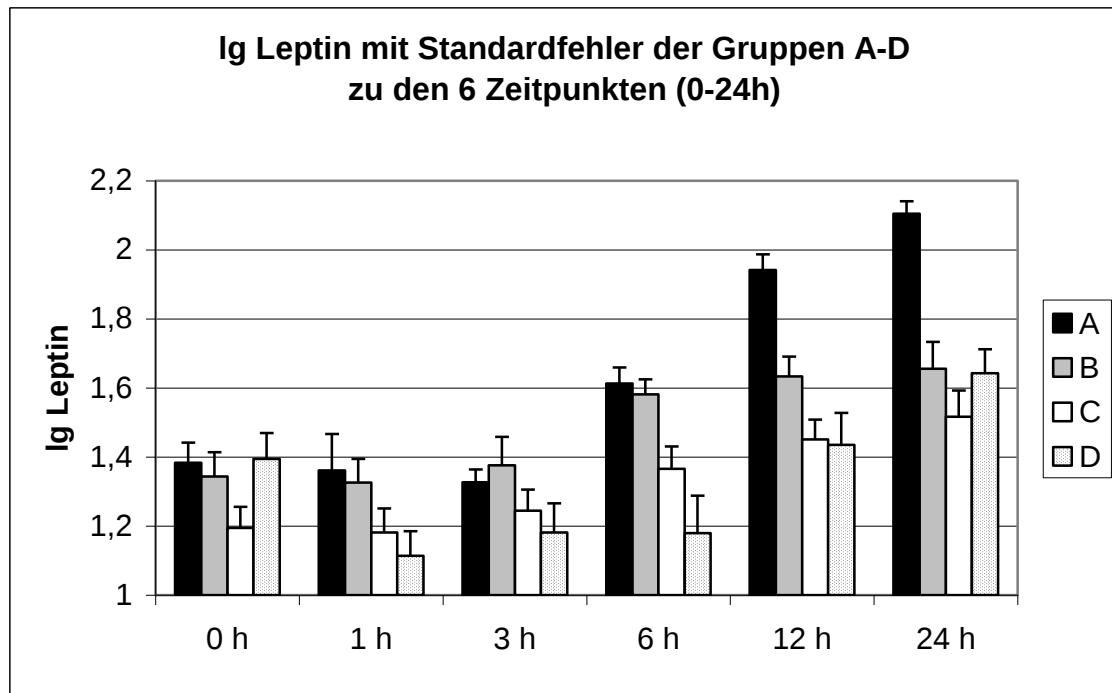


Abbildung IV.1.c)

**Mittelwert und Standardfehler der Ig
Leptinkonzentrationen der vier Gruppen zu den
sechs Zeitpunkten**

Der Einfluss der für die Gruppenbildung Ausschlag gebenden
Umgebungstemperatur ist genauer durch die Korrelationsanalyse in Kapitel IV.5.
dargestellt.

2. Einfluss von Geburtstyp (Wurfgröße), Geschlecht und Rasse auf die Leptinkonzentration

Von den 74 Lämmern waren 19 Einlinge und 55 Mehrlinge (Geburtstyp). Das Geschlecht setzte sich aus 54 % männlichen Tieren und zu 46 % weiblichen Tieren zusammen:

Gruppe	männlich (n=)	weiblich (n=)
A	9	11
B	9	11
C	13	7
D	9	5
Gesamt	40	34

Tabelle IV.2.a) Verteilung der Geschlechter in den vier Gruppen (A bis D)

Der Rasse Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf (DSK) gehörten 31 % der Lämmer an und der Rasse Merinolandschaf (MLS) 69 %. Innerhalb der Gruppen ergaben sich folgende Verteilungen:

Gruppe	Rasse DSK	MLS
A	7	13
B	10	10
C	0	20
D	6	8
Gesamt	23	51

Tabelle IV.2.b) Verteilung der Rassenzugehörigkeit in den vier Gruppen

Die fünffaktorielle Varianzanalyse ohne Wechselwirkungen zwischen den Gruppierungsfaktoren mit Messwiederholungen im Faktor Zeit ergaben, dass weder die Rasse ($p=0,760$) oder das Geschlecht ($p=0,660$) noch der Geburtstyp (Einling oder Mehrling, $p=0,072$) einen Einfluss auf die Leptinkonzentration hatten.

3. Einfluss des Körpergewichts auf die Leptinkonzentration

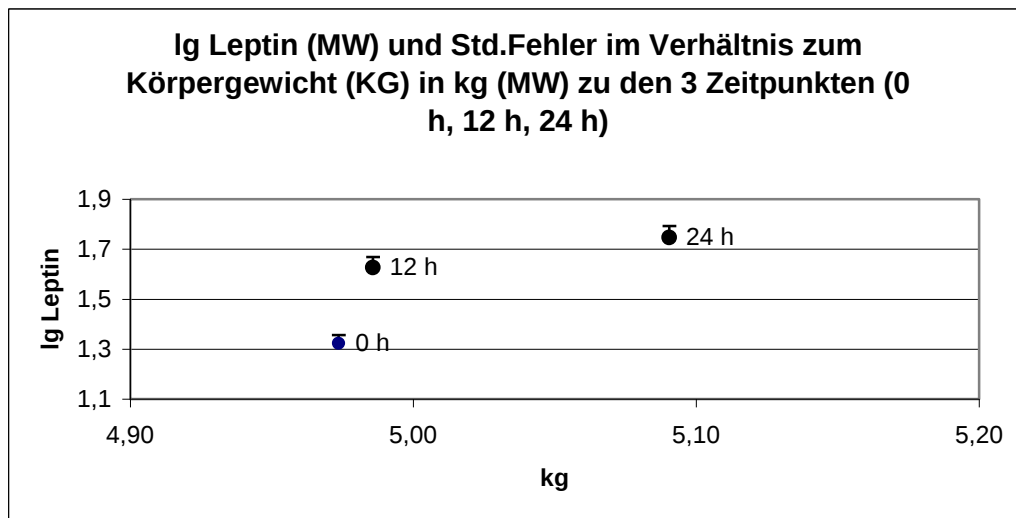
Das Körpergewicht der Lämmer betrug im Mittel zur Geburt 4,97 kg ($\pm 0,88$ kg), stieg zur 12. Stunde postnatal auf 4,99 kg ($\pm 0,90$ kg) und bis zur 24. Stunde 5,09 kg ($\pm 0,92$ kg, s. Tab. III.3.a). Die lg Leptinkonzentrationen erhöhten sich demgegenüber von 1,32 ($\pm 0,29$) zur Geburt auf 1,63 ($\pm 0,35$) zur 12. Stunde postnatal und schließlich auf 1,75 ($\pm 0,38$) 24 Stunden postnatal an. Zu keinem der bestimmten Zeitpunkte (0 h, 12h und 24 h) konnte ein Einfluss auf den Logarithmus der Leptinkonzentration (lg Leptin) deutlich gemacht werden mit Signifikanzen $p > 0,2$ (s. Tab. IV.3.b und Abbildung IV.3.a).

Zeitpunkt	Körpergewicht				
	in kg (MW)	SD	Std.f.	min	max
0 h	4,97	0,9	0,1	2,95	6,90
12 h	4,99	0,9	0,1	3,00	6,90
24 h	5,09	0,9	0,1	3,05	7,00

Tabelle IV.3.a) Körpergewicht der Lämmer zu den Zeitpunkten 0, 12 und 24 Stunden postnatal mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

Zeitpunkt	Lg Leptin (MW)	SD	Std.f.	Min	Max	p=
0 h	1,32	0,29	0,03	0,91	2,18	0,277
12 h	1,63	0,35	0,04	0,92	2,40	0,903
24 h	1,75	0,38	0,05	0,84	2,70	0,761

Tabelle IV.3.b) Lg Leptinkonzentrationen der Lämmer zu den Zeitpunkten 0, 12 und 24 Stunden postnatal mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)



**Abbildung IV.3.a) Mittelwerte und Standardfehler (Std.f.) der
lg Leptinkonzentrationen im Verhältnis zu den Mittelwerten
des Körpergewichts aller Lämmer zu den drei Zeitpunkten**

Bei einer Aufschlüsselung der Daten hinsichtlich der Gruppenaufteilung konnte jedoch eine deutliche Differenz der Geburtsgewichte erkennbar werden. So waren die Geburtsgewichte der Gruppen B und C mit 5,27 kg bzw. 5,26 kg ($\pm 0,54$ kg bzw. 0,92 kg) am höchsten und das der Gruppe D am niedrigsten mit 4,57 kg ($\pm 1,12$ kg). Das mittlere Endgewicht war in Gruppe B am höchsten mit 5,41 kg ($\pm 0,66$ kg), der zugehörige mittlere lg Leptinwert war demgegenüber jedoch nur 1,66 ($\pm 0,34$). Die Gegenüberstellung der Mittelwerte der Körpergewichte und der lg Leptinkonzentrationen der vier Gruppen ist in Tab. IV.3.c) und in der Abbildung IV.3.b) dargestellt.

Gruppe	Zeitpunkt	KG in kg (MW)	SD	Std.f.	Ig Leptin (MW)	SD	Std.f.
A	0 h	4,68	0,8	0,2	1,38	0,25	0,06
	12 h	4,80	0,8	0,2	1,94	0,33	0,08
	24 h	4,96	0,8	0,2	2,10	0,32	0,07
B	0 h	5,27	0,5	0,1	1,34	0,32	0,07
	12 h	5,28	0,6	0,1	1,63	0,25	0,06
	24 h	5,41	0,7	0,2	1,66	0,34	0,08
C	0 h	5,26	0,9	0,2	1,19	0,27	0,06
	12 h	5,23	0,9	0,2	1,45	0,25	0,06
	24 h	5,29	0,9	0,2	1,52	0,30	0,08
D	0 h	4,57	1,1	0,3	1,39	0,28	0,07
	12 h	4,49	1,1	0,3	1,44	0,33	0,09
	24 h	4,55	1,1	0,3	1,64	0,26	0,07

Tabelle IV.3.c) Mittelwerte der Körpergewichte und Lg Leptinkonzentrationen mit Angabe der Standardabweichungen (SD) und Standardfehler (Std.f.)

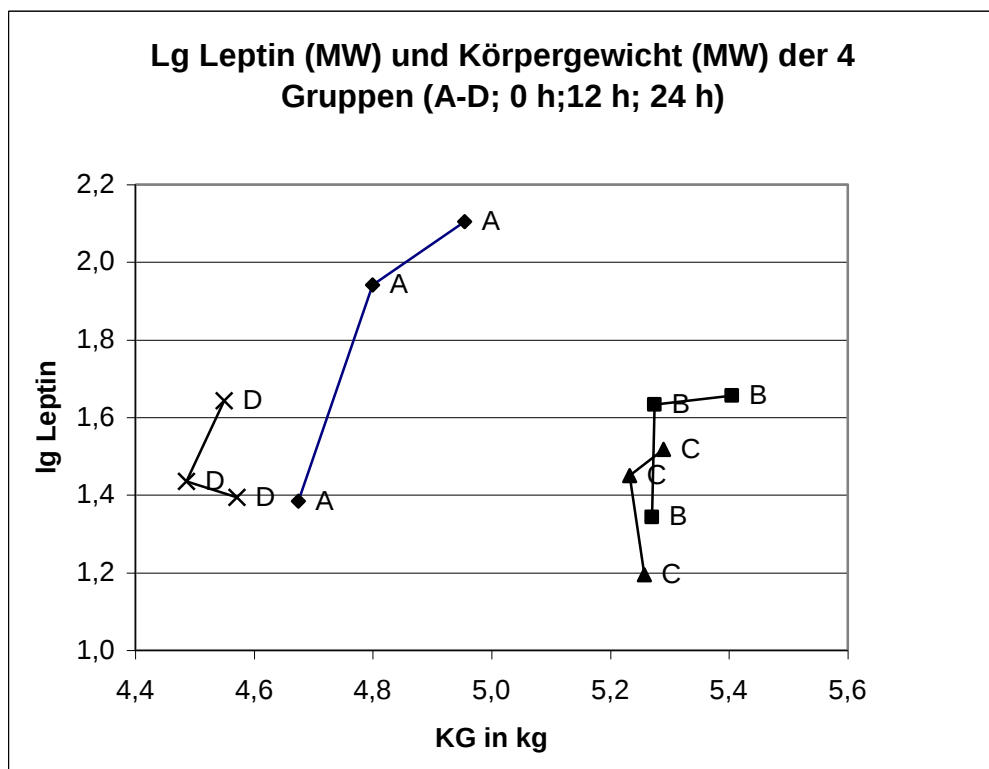


Abbildung IV.3.b) Mittelwerte der Körpergewichte (KG) und Ig Leptinkonzentrationen der vier Gruppen zu jeweils 3 Zeitpunkten (s. Tab. IV.3.c)

4. Einfluss der Umgebungstemperatur unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit auf die Leptinkonzentration

Die durchschnittliche Umgebungs- oder Stalltemperatur, die 30 cm über dem Boden gemessen wurde, bewegte sich in der Gruppe A zwischen $18,0 \pm 3,7^{\circ}\text{C}$ und $18,8 \pm 4,3^{\circ}\text{C}$ mit einer minimalen Temperatur von 12°C über die ersten 24 Stunden und einer maximalen Temperatur von $25,0^{\circ}\text{C}$ zur 24. Stunde postnatal. In der Gruppe B wurde eine mittlere Stalltemperatur unmittelbar postnatal von $5,8 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$ gemessen sowie ein höchster Mittelwert der Stalltemperatur zur 12. Stunde postnatal von $6,9 \pm 2,6^{\circ}\text{C}$. In der Gruppe C wurden die niedrigste mittlere Temperatur direkt zur Geburt und in der 1. Stunde ($-4,5 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) ermittelt und die niedrigsten absoluten Temperaturwerte von $-6,0$ bis $-8,0^{\circ}\text{C}$ innerhalb der ersten 24 Stunden, während die höchste mittlere Temperatur der Gruppe C nach 24 Stunden $-1,9 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ betrug. Von allen Gruppen am wärmsten war die Umgebung der Sectio-Gruppe D mit der niedrigsten Durchschnittstemperatur von $19,1 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$ zur 12. Stunde postnatal und der höchsten durchschnittlichen Temperatur von $19,4 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$ in den ersten 6 Stunden wie die folgende Tabelle (Tabelle IV.4.a) zeigt:

Gruppe	Zeitpunkt (h)	MW (°C)	SD	Std.f.	T min (°C)	T max (°C)
A	0	18,0	3,7	0,8	12,0	23,0
	1	18,1	3,7	0,8	12,0	23,0
	3	18,2	4,0	0,9	12,0	24,0
	6	18,1	3,8	0,9	12,0	24,0
	12	18,4	3,6	0,8	12,0	23,0
	24	18,8	4,3	1,0	12,0	25,0
B	0	5,8	2,2	0,5	2,0	8,0
	1	6,0	2,2	0,5	2,0	8,0
	3	6,7	2,8	0,6	2,0	11,0
	6	6,2	2,7	0,6	1,0	10,0
	12	6,9	2,6	0,6	3,0	11,0
	24	6,8	2,6	0,6	2,0	10,0
C	0	-4,5	2,0	0,4	-8,0	-2,0
	1	-4,5	2,0	0,4	-8,0	-2,0
	3	-3,7	1,3	0,3	-6,0	-2,0
	6	-3,8	1,6	0,4	-8,0	-2,0
	12	-2,4	1,3	0,3	-6,0	-1,0
	24	-1,9	1,6	0,4	-8,0	-1,0
D	0	19,4	1,1	0,3	18,0	21,0
	1	19,4	1,1	0,3	18,0	21,0
	3	19,4	1,1	0,3	18,0	21,0
	6	19,4	1,1	0,3	18,0	21,0
	12	19,1	1,4	0,4	17,0	21,0
	24	19,2	1,5	0,4	17,0	22,0

Tabelle IV.4.a) Umgebungstemperatur der Lämmer zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (T min) und Maximum (T max)

Die dazu korrelierten lg Leptinkonzentrationen sind in der Tabelle IV.1.d) dargestellt. Die Korrelationsanalyse getrennt nach Zeitpunkten ergab zum Zeitpunkt der Geburt einen schwach signifikanten Einfluss der Umgebungstemperatur auf die lg Leptinwerte ($p=0,018$). In den folgenden 12 Stunden war dieser Einfluss aufgehoben ($p > 0,050$). Jedoch ergab sich zur 12. Stunde pn. eine schwache Signifikanz mit $p = 0,024$, die nach weiteren 12 Stunden noch deutlicher wurde mit $p=0,004$ (s. Tabelle IV.4.b) und

Abbildung IV.4.a) und IV.4. b) (Streudiagramm). Zum Zeitpunkt 24 Stunden postnatal ergab sich eine Regressionsgeradengleichung mit $y=1,60 + 0,014 x$.

Zeitpunkt	r =	p=	Signifikanzniveau
0	0,28	0,018	schwach signifikant
1	0,05	0,690	nicht signifikant
3	0,06	0,637	nicht signifikant
6	0,01	0,956	nicht signifikant
12	0,27	0,024	schwach signifikant
24	0,34	0,004	Signifikant

Tabelle IV.4.b) Analyse der Korrelation der Umgebungstemperaturen mit den lg Leptinspiegeln aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

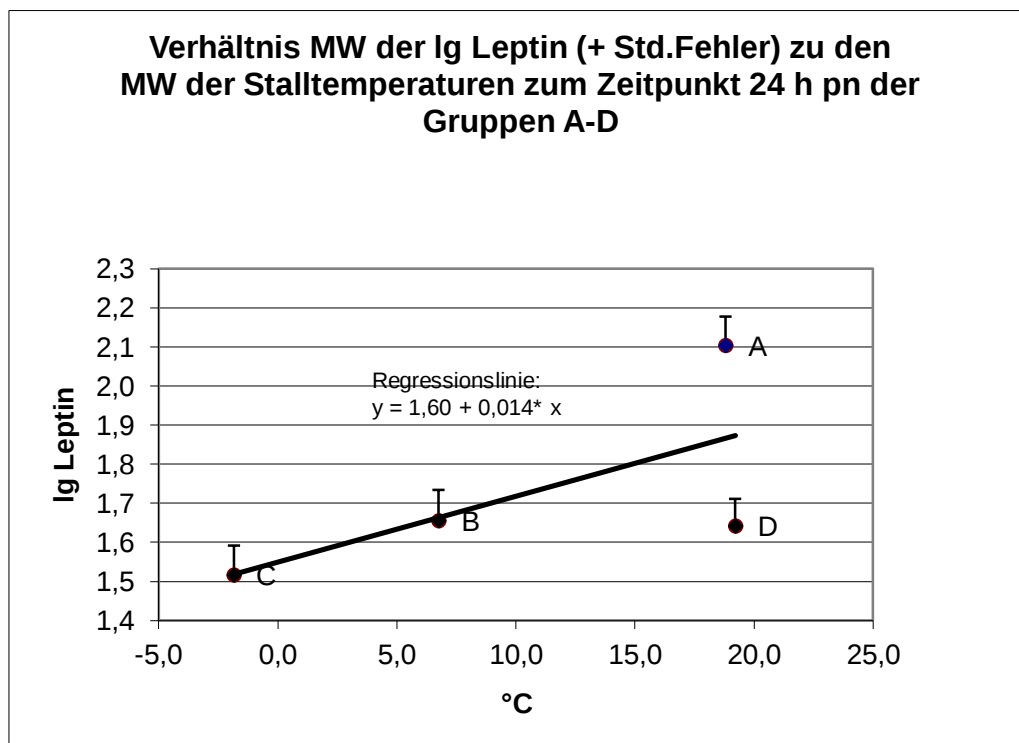


Abbildung IV.4.a) Darstellung der Korrelation zwischen der Umgebungstemperatur (Stalltemperatur) und den lg Leptinkonzentrationen sowie der Mittelwerte und Standardfehler (Lg Leptin) zum Zeitpunkt 24 h pn. und Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden

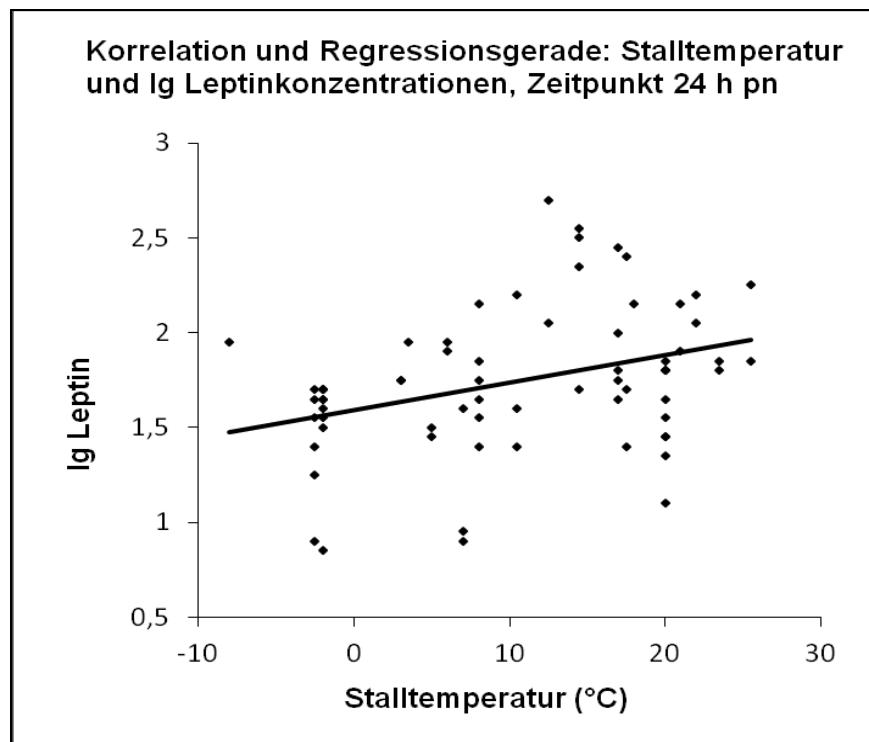


Abbildung IV.4.b) Darstellung der Korrelation und der Regressionsgerade zwischen der Umgebungstemperatur (Stalltemperatur) und den lg Leptinkonzentrationen als Streudiagramm zum Zeitpunkt 24 h pn

5. Beziehung zwischen Körpertemperatur und Leptinkonzentration

Die Körpertemperatur lag bei Geburt bei den Lämmern der Gruppe A bis C im Durchschnitt bei $39,9 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ bis $40,3 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ und in der Gruppe D bei $39,5 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$. Zur Geburt wurden zudem die höchsten absoluten Körpertemperaturwerte bestimmt mit 41°C in Gruppe B und C. Danach sanken die Körpertemperaturen bei allen Lämmern bis zur ersten Lebensstunde signifikant ab ($p \leq 0,000$; s. Abbildung IV.5.a) auf die mittleren Temperaturen von $39,4 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ bis $39,6 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ (Gruppe A-C) und bei Gruppe D auf $38,5 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$; dieses war gleichzeitig der niedrigste Mittelwert aller Gruppen. Der niedrigste absolute Temperaturwert ist ebenfalls zu diesem Zeitpunkt bestimmt worden mit $34,6^{\circ}\text{C}$. Die mittleren Körpertemperaturen in Gruppe A bis C erreichten ihren niedrigsten Wert in der 6. Stunde (Gruppe C: $39,3 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$) bzw. 12.

Stunde (Gruppe A: $39,1 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$; Gruppe B: $39,2 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$). Danach blieben die Körpertemperaturen ziemlich konstant mit Differenzen zwischen dem Minimum und dem Maximum von $0,9$ bis $1,3^{\circ}\text{C}$, wie die folgende Tabelle zeigt:

Zeitpunkt						
Gruppe	(h)	MW ($^{\circ}\text{C}$)	SD	Std.f.	T min ($^{\circ}\text{C}$)	T max ($^{\circ}\text{C}$)
A	0	39,9	0,2	0,1	39,5	40,4
	1	39,5	0,5	0,1	38,5	40,5
	3	39,4	0,3	0,1	38,8	40,1
	6	39,2	0,5	0,1	38,1	39,8
	12	39,1	0,2	0,1	38,7	39,7
	24	39,3	0,2	0,1	38,8	39,7
B	0	40,2	0,4	0,1	39,7	41,0
	1	39,6	0,3	0,1	39,0	40,2
	3	39,5	0,2	0,1	39,1	39,8
	6	39,3	0,2	0,1	38,8	39,9
	12	39,2	0,2	0,1	38,8	39,7
	24	39,4	0,3	0,1	38,6	39,8
C	0	40,3	0,3	0,1	39,6	41,0
	1	39,4	0,2	0,1	39,0	40,0
	3	39,3	0,3	0,1	38,9	39,9
	6	39,3	0,3	0,1	38,4	39,8
	12	39,4	0,3	0,1	39,0	39,9
	24	39,4	0,3	0,1	39,0	39,9
D	0	39,5	0,7	0,2	37,6	40,2
	1	38,5	1,3	0,4	34,6	39,6
	3	38,8	0,8	0,2	36,6	39,6
	6	38,9	0,4	0,1	38,2	39,5
	12	39,1	0,6	0,2	38,0	39,8
	24	39,3	0,4	0,1	38,3	39,6

Tabelle IV.5.a) Körpertemperatur der Lämmer der vier Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (T min) und Maximum (T max)

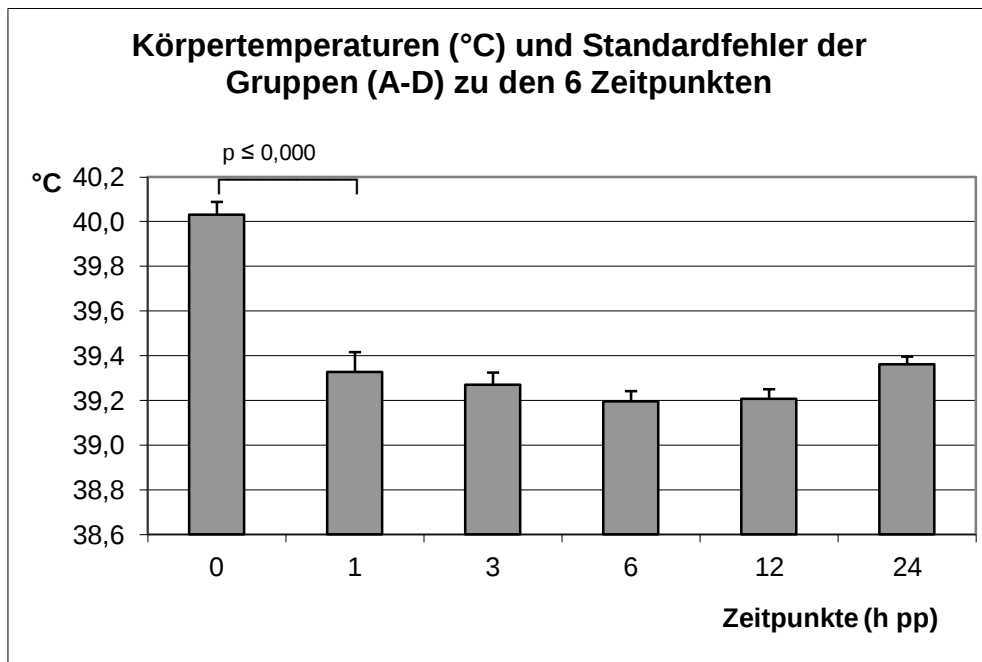


Abbildung IV.5.a) Mittelwert der Körpertemperatur aller Lämmer zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Eine positive Korrelation zum Logarithmus der Leptinwerte ergab sich nur zur 1. Lebens-stunde mit $p = 0,031$ (s. Abbildung IV.5.b). Die deutliche Absinken der Körpertemperatur von der Geburt bis zur 1. Lebensstunde hatte jedoch keinen Einfluss auf die Höhe der Leptinspiegel (Differenz zwischen der Stunde 0 und der ersten Stunde pn.) der neugeborenen Lämmer ($p = 0,533$).

Eine negative Korrelation mit $p = 0,015$ war zur 12. Stunde pn. gegeben, also genau zu dem Zeitpunkt der niedrigsten mittleren Körpertemperatur der Gruppen A und B (s. Abbildung III.5.c). Zu allen anderen Zeitpunkten ergab sich keine Korrelation zwischen der Körpertemperatur und den Logarithmen der Leptinserumspiegeln (s. Tab. IV.5.b)

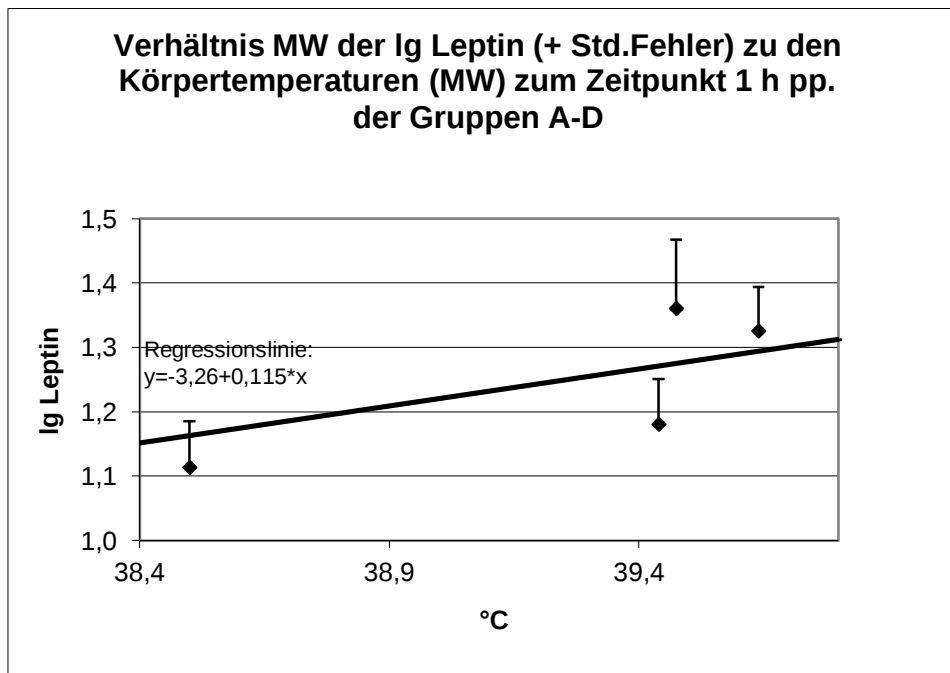


Abbildung IV.5.b) Darstellung der Korrelation zwischen der Körpertemperatur und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 1 h pn. und die Gleichung der Regressionsgeraden

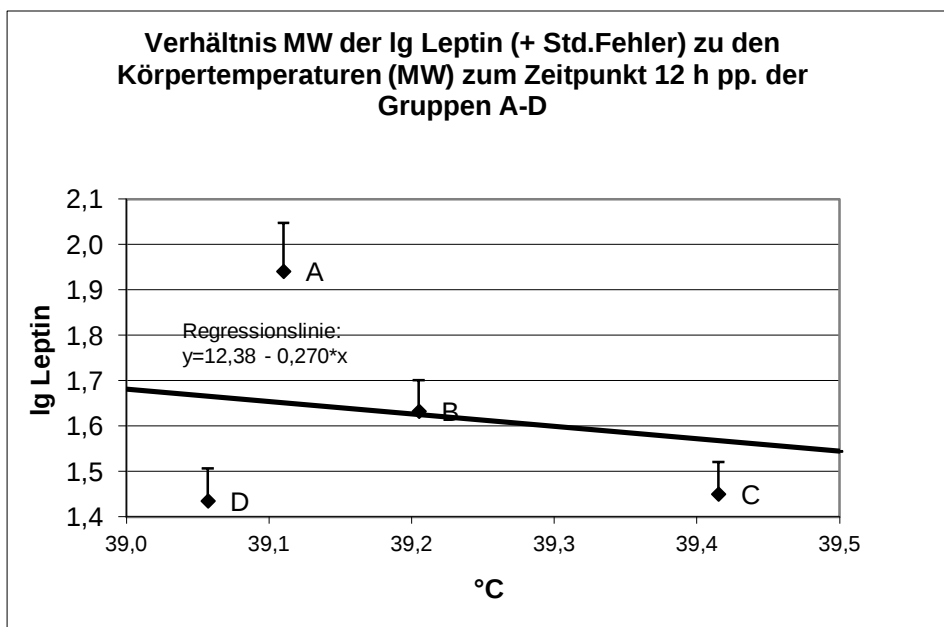


Abbildung IV.5.c) Darstellung der Korrelation zwischen der Körpertemperatur und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 12 h pn. mit Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden

Zeitpunkt	r =	p =	Signifikanzniveau
0	-0,11	0,365	nicht signifikant
1	0,27	0,031	schwach signifikant
3	0,19	0,137	nicht signifikant
6	0,19	0,164	nicht signifikant
12	-0,29	0,015	schwach signifikant
24	0,07	0,588	nicht signifikant

Tabelle IV.5.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der Körpertemperaturen aller Gruppen zu den 6 Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

6. Beziehung zwischen Differenz aus Körper- und Umgebungstemperatur und Leptinkonzentration

Deutlicher wurde die Korrelation zwischen den Leptinwerten und der Differenz aus der Körpertemperatur und der Umgebungstemperatur. Diese Differenz kann auch als Wärmeproduktion bezeichnet werden, die für die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur eine zentrale Rolle spielt. Es zeigte sich, dass es bereits zur Geburt und in der 12 h pn. zu einer schwach signifikanten (negativen) Korrelation kam und sich das Signifikanzniveau nach weiteren 12 Stunden mit $p = 0,005$ deutlich hob (s. Tab. III. 6.a). Veranschaulicht zeigt sich diese Korrelation als Vergleich der Korrelationsgleichungen und –geraden (s. Tab. IV.6.b und Abbildung IV.6.a).

Zeitpunkt	r =	p =	Signifikanzniveau
0	-0,26	0,024	schwach signifikant
1	-0,03	0,822	nicht signifikant
3	-0,05	0,692	nicht signifikant
6	-0,00	0,998	nicht signifikant
12	-0,28	0,020	schwach signifikant
24	-0,34	0,005	signifikant

Tabelle IV.6.a) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der Differenz aus Körper- und Umgebungstemperatur aller Gruppen zu den 6 Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

Zeitpunkt	Gleichung
0 h	$y = 1,56 - 0,008 \cdot x$
1 h	$y = 1,29 - 0,000 \cdot x$
3 h	$y = 1,34 - 0,002 \cdot x$
6 h	$y = 1,46 - 0,000 \cdot x$
12 h	$y = 1,94 - 0,011 \cdot x$
24 h	$y = 2,15 - 0,014 \cdot x$

Tabelle IV.6.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der Differenz aus Körper- und Umgebungstemperatur aller Gruppen mit Angabe der Gleichungen der Regressionslinien der sechs Zeitpunkte

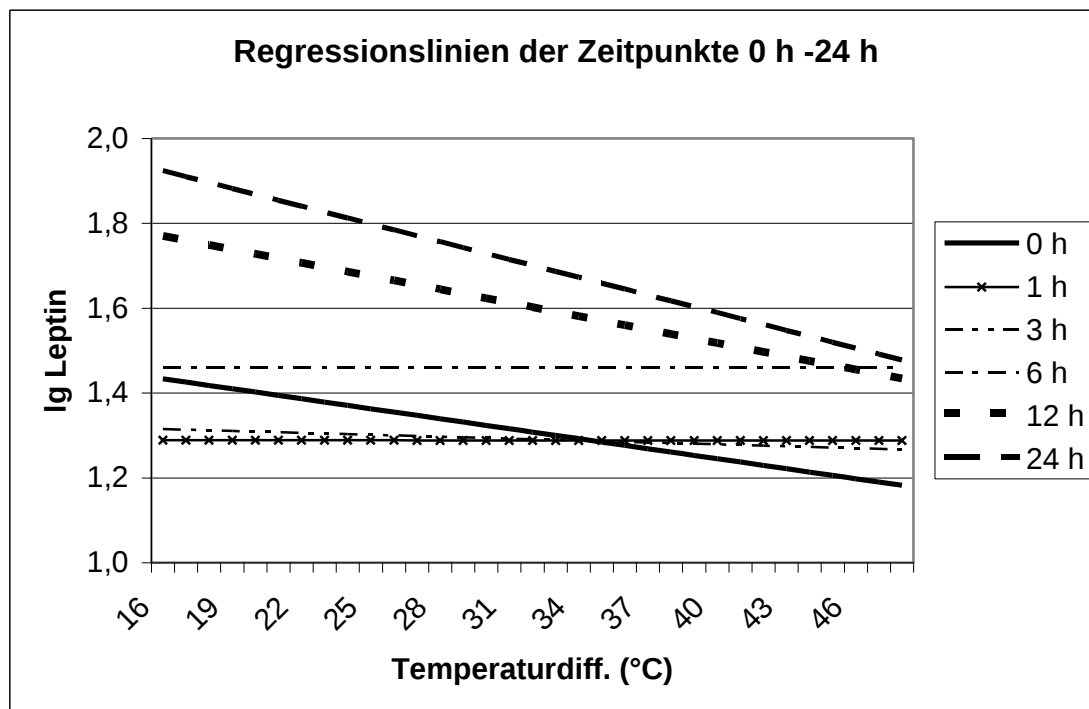


Abbildung IV.6.a) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der Differenz aus Körper- und Umgebungstemperatur aller Gruppen mit Darstellung der Geraden der Regressionsgleichungen der sechs Zeitpunkte

7. Beziehung zwischen Triglyceriden und Leptinkonzentration

Die Triglyceridwerte (in mmol/l angegeben) wurden zur Geburt (0 h) sowie zur 12. und zur 24. Stunde postnatal (12 h pn. und 24 h pn.) bestimmt. Die durchschnittlichen Triglyceridwerte lagen zur Geburt bei allen Gruppen bei 0,4 mmol/l mit einem Minimum von 0,1 und einem Maximum von 1,0 mmol/l. Die Standardabweichung und der Standardfehler betrugen 0,2 bzw. 0,0. Zur 12. Stunde postnatal stieg der Mittelwert auf 0,7 mmol/l an mit einem Minimum (min) von 0,1 und einem Maximum (max) von 2,1 mmol/l und erreichte zur 24. Stunde den höchsten Mittelwert mit 0,8 mmol/l (min: 0,3 mmol/l, max: 2,2 mmol/l). Die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (Std.f.) betrugen zur 12. h pn. 0,4 bzw. 0,0 und zur 24. Stunde 0,5 (SD) und 0,1 (Std.f.). Dies veranschaulicht die Abbildung IV.7.a).

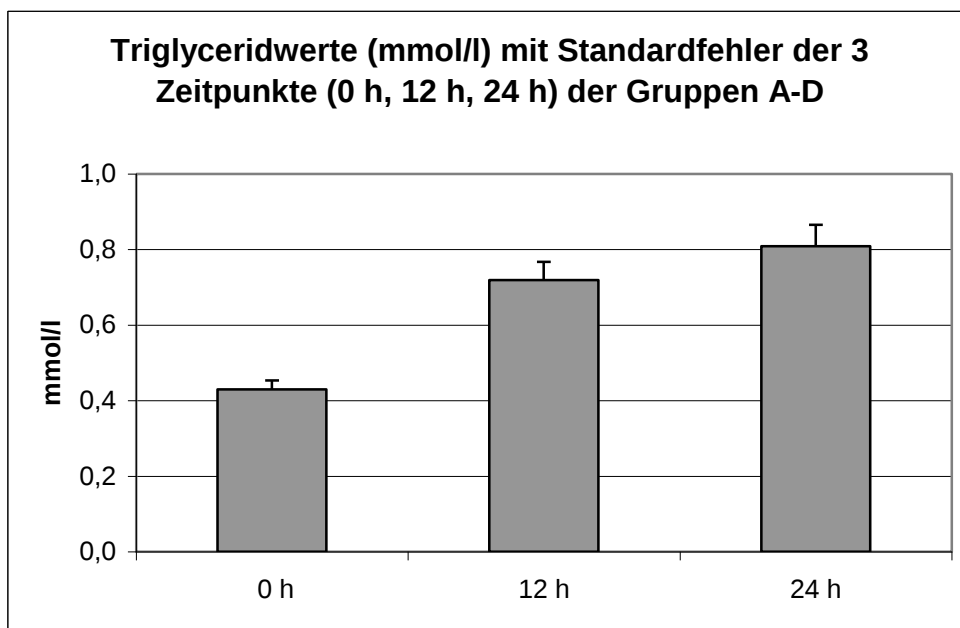


Abbildung IV.7.a) Mittelwerte der Triglyceridwerte in mmol/l aller Lämmer zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Innerhalb der Gruppen waren die Verläufe jedoch differenzierter, wie die Tabelle III.7.a) zeigt. In der Gruppe A war der durchschnittliche Wert bei der Geburt 0,5 mmol/l mit der Standardabweichung von $\pm 0,2$ und einem Standardfehler von 0,0 ($SD \pm 0,2$; Std.f. 0,0) bei einem Minimum von 0,2 und einem Maximum von 0,7 mmol/l. Innerhalb der folgenden 12 Stunden stieg der Mittelwert auf 1,2 ($SD \pm 0,5$; Std.f. 0,1) mit einem Minimum von 0,4 und einem Maximum von 2,1 mmol/l. Der maximale

durchschnittliche und absolute Triglyceridwert aller Gruppen wurde in Gruppe A zur 24. Stunde pn. mit 1,4 (MW, SD $\pm$ 0,5; Std.f. 0,1) und 2,2 (max.) mmol/l erreicht. Das Minimum lag bei 0,3 mmol/l und war somit niedriger als der Wert der 12. Stunde.

In Gruppe B lag der arithmetische Mittelwert bei der Geburt bei 0,3 mmol/l (SD $\pm$ 0,2; Std.f. 0,0) mit einem Minimum von 0,1 und einem Maximum von 0,6 mmol/l, alle Werte lagen somit deutlich unter den Werten der Gruppe A. Auch im Verlauf unterschieden sich die Gruppen. In der 12. Stunde lag der Mittelwert der Triglyceride in Gruppe B bei 0,6 (SD $\pm$ 0,2; Std.f. 0,0) mmol/l mit einem Minimum von 0,2 und einem Maximum von 0,9. Auch hier stiegen die Werte bis zur 24. Stunde pn. weiter an auf 0,6 (MW, SD $\pm$ 0,2; Std.f. 0,0) mmol/l mit einem Minimum und Maximum von 0,3 bzw. 1,0.

Die Gruppe C hatte zwar den höchsten Mittelwert zur Geburt mit 0,5 (SD $\pm$ 0,3; Std.f. 0,1) mmol/l (min: 0,2 und max 1,0 mmol/l), der Anstieg über die Zeit war jedoch weniger stark ausgeprägt als in Gruppe A und B mit einem Mittelwert zur 12. Stunde von 0,6 (SD $\pm$ 0,1; Std.f. 0,0) mmol/l (min: 0,4 und max.: 0,9 mmol/l) und zur 24. Stunde von 0,6 (SD $\pm$ 0,1 mmol/l; Std.f. 0,0 mmol/l) mmol/l (min: 0,4 mmol/l und max.: 0,9 mmol/l). Die Gruppenunterschiede von A im Vergleich zu B und C waren hoch signifikant mit $p \leq 0,000$.

In Gruppe D war der mittlere Triglyceridwert zur Geburt bei 0,3 mmol/l (SD $\pm$ 0,1 mmol/l; Std.f. 0,0 mmol/l) mit einem Mini- und Maximum von 0,1 und 0,5 mmol/l. Zur 12. Stunde stieg auch hier der mittlere Wert auf 0,4 mmol/l (SD $\pm$ 0,2 mmol/l; Std.f. 0,1 mmol/l) an mit einem maximalen Wert von 0,6 mmol/l und einem Minimum von 0,1 mmol/l, der gleichzeitig der niedrigste Wert aller Gruppen darstellt. 24 Stunden nach der Geburt waren die Triglyceridwerte im Mittel bei 0,5 mmol/l (SD $\pm$ 0,2 mmol/l; Std.f. 0,0 mmol/l) mit dem niedrigsten Wert von 0,3 mmol/l und dem höchsten Wert von 0,9 mmol/l.

Gruppe	Zeitpunkt	MW (mmol/l)	SD	Std.f.	Min	max
A-D	0 h	0,4	0,2	0,0	0,1	0,1
	12 h	0,7	0,4	0,0	0,1	0,15
	24 h	0,8	0,5	0,17	0,3	0,3
A	0 h	0,5	0,2	0,0	0,2	0,7
	12 h	1,2	0,5	0,1	0,4	2,1
	24 h	1,4	0,5	0,1	0,3	2,2
B	0 h	0,3	0,2	0,0	0,1	0,6
	12 h	0,6	0,2	0,0	0,2	0,9
	24 h	0,6	0,2	0,0	0,3	1,0
C	0 h	0,5	0,3	0,1	0,2	1,0
	12 h	0,6	0,1	0,0	0,4	0,9
	24 h	0,6	0,1	0,0	0,4	0,9
D	0 h	0,3	0,1	0,0	0,1	0,5
	12 h	0,4	0,2	0,1	0,1	0,6
	24 h	0,5	0,2	0,0	0,3	0,9

Tabelle IV.7.a) Triglyceridwerte in mmol/l der vier Gruppen zu drei Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

Der Anstieg der Triglyceridwerte von 0 h bis 24 h sind nur in den Gruppen A, B und D signifikant ($p \leq 0,000$). Der Anstieg der Werte der Gruppe C bleibt unterhalb des Signifikanzniveaus, wie die folgende Abbildung IV.7.b) zeigt:

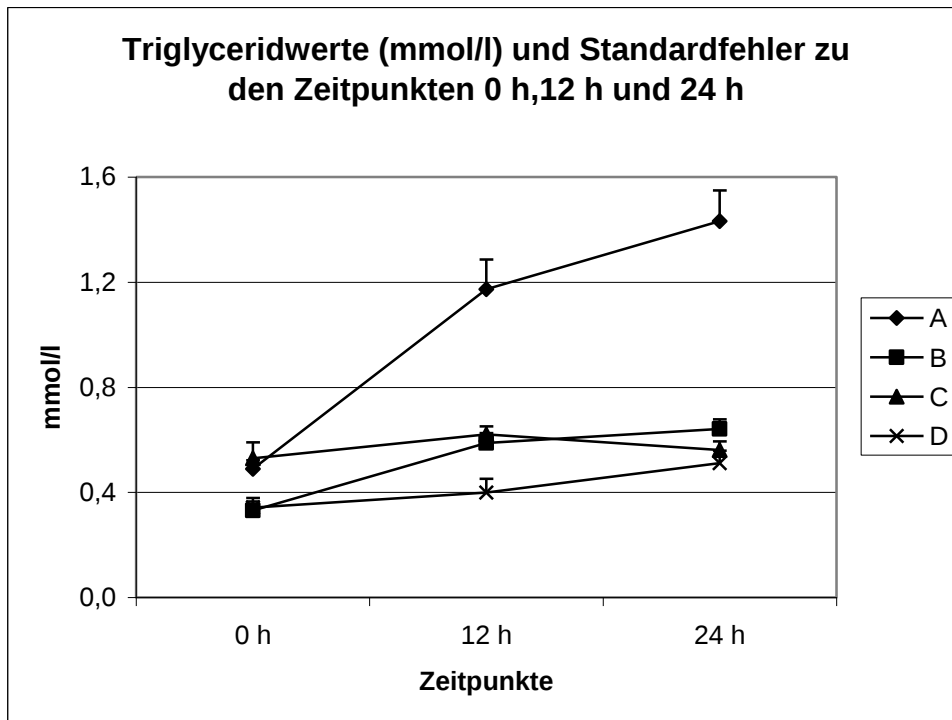


Abbildung IV.7.b) Mittelwerte der Triglyceridwerte in mmol/l der vier Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Die Logarithmen der Leptinwerte (s. Tab. IV.1.d) im Verhältnis zu den Triglyceridwerten (logarithmiert) sind in der Korrelationsanalyse zum Zeitpunkt der Geburt nicht signifikant ($p = 0,572$). Das Signifikanzniveau steigt jedoch zum Zeitpunkt 12. Stunde pn. auf $p = 0,029$ und ist nach 24 Stunden nach der Geburt deutlich signifikant mit $p < 0,001$ (s. Tab. IV. 7.b). Zum Zeitpunkt 24 Stunden pn. wird die Abhängigkeit der Parameter durch die Gleichung der Regressionslinie mit $y = 1,87 + 0,823 \cdot x$ deutlich. Zwecks Übersichtlichkeit wurden der arithmetische Mittelwert und der Standardfehler der lg Leptin der Gruppen ebenfalls mit aufgezeigt (s. Abbildung IV.7.c) und zusätzlich als Streudiagramm dargestellt (s. Abbildung IV.7.d).

Zeitpunkt	r =	p =	Signifikanzniveau
0	-0,07	0,572	nicht signifikant
12	0,26	0,029	schwach signifikant
24	0,50	< 0,001	Signifikant

Tabelle IV.7.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der lg Triglyceridwerte aller Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

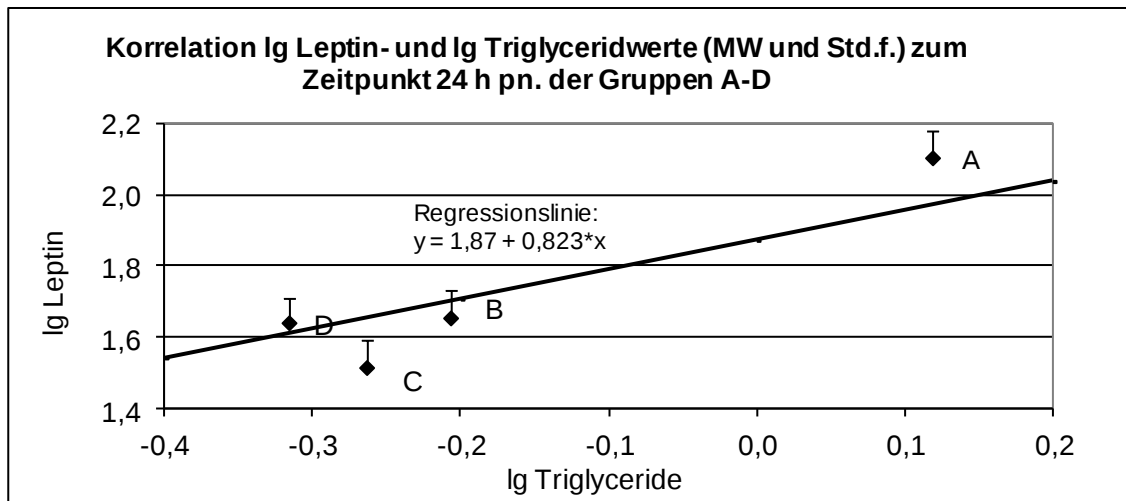


Abbildung IV.7.c) Korrelationsanalyse zwischen den lg Triglyceridwerten und den lg Leptinkonzentrationen unter Angabe der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 24 h pn. und der Gleichung der Regressionsgeraden

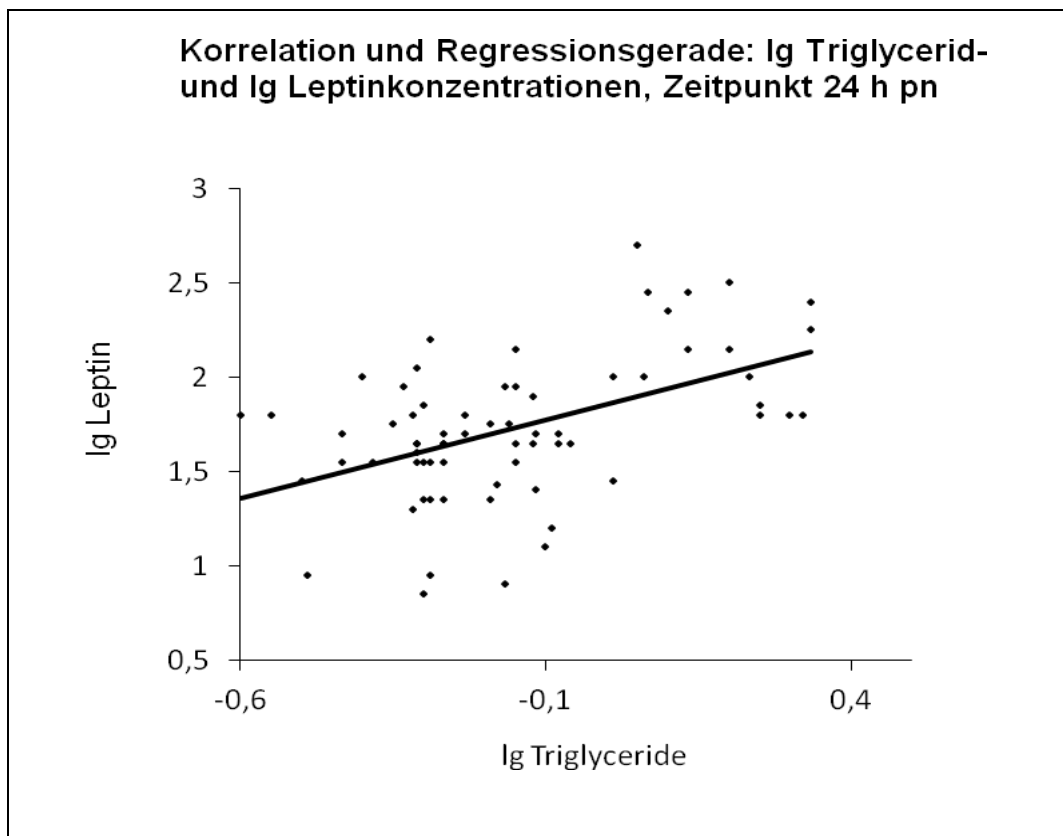


Abbildung IV.7.d) Darstellung der Korrelation und der Regressionsgerade zwischen den lg Triglyceridwerten und den lg Leptinkonzentrationen als Streudiagramm zum Zeitpunkt 24 h pn

8. Beziehung zwischen Plasmacholesterin und Leptinkonzentration

Die Cholesterinwerte (in mmol/l angegeben) wurden zur Geburt (0 h) sowie zur 12. und zur 24. Stunde postnatal (12 h und 24 h) bestimmt. Die durchschnittlichen Cholesterinwerte lagen zur Geburt bei allen Gruppen bei 0,7 mmol/l mit einem Minimum von 0,3 und einem Maximum von 1,3 mmol/l. Die Standardabweichung und der Standardfehler betragen 0,2 bzw. 0,0. Zur 12. Stunde postnatal steigt der Mittelwert auf 1,2 mmol/l mit einem Minimum (min) von 0,4 und einem Maximum (max) von 3,0 mmol/l und erreicht zur 24. Stunde den höchsten Mittelwert mit 1,4 mmol/l (min: 0,5 mmol/l, max: 3,2 mmol/l). Die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler

(Std.f.) betragen zur 12. h und zur 24. h pn. jeweils 0,5 bzw. 0,1 wie die folgende Abbildung IV.8.a) zeigt:

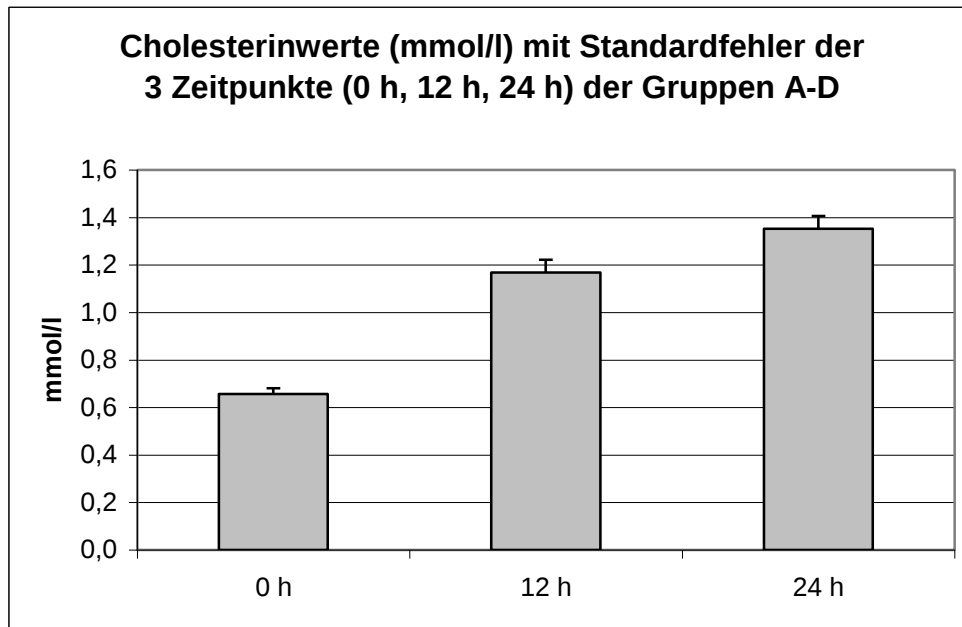


Abbildung IV.8.a) Mittelwerte der Cholesterinwerte in mmol/l aller Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Die Tabelle IV.8.a) zeigt, dass die Verläufe der Cholesterinwerte innerhalb der Gruppen differenzierter sind. In der Gruppe A war der durchschnittliche Wert bei Geburt 0,8 mmol/l mit einer Standardabweichung von $\pm 0,2$ und einem Standardfehler von 0,0 ($SD \pm 0,2$; Std.f. 0,0) bei einem Minimum von 0,4 und einem Maximum von 1,3 mmol/l. Innerhalb der folgenden 12 Stunden stieg der Mittelwert auf 1,6 ($SD \pm 0,6$; Std.f. 0,1) mit einem Minimum von 0,7 und einem Maximum von 3,0 mmol/l. Der maximale durchschnittliche und absolute Cholesterinwert aller Gruppen wurde in Gruppe A zur 24. Stunde pn. mit 1,7 (MW, $SD \pm 0,6$; Std.f. 0,1) und 3,2 (max.) mmol/l erreicht. Das Minimum lag bei 0,7 mmol/l und war somit gleich dem Wert der 12. Stunde.

In Gruppe B war der arithmetische Mittelwert bei der Geburt 0,7 mmol/l ($SD \pm 0,2$; Std.f. 0,0) mit einem Minimum von 0,3 mmol/l, dies ist gleichzeitig der niedrigste Wert aller Gruppen und Zeitpunkte. Das Maximum lag bei 1,1 mmol/l und insgesamt lagen

die Werte unter denen der Gruppe A. Auch der Anstieg der Werte war nicht so steil wie in Gruppe A. In der 12. Stunde lag der Mittelwert der Cholesterinwerte in Gruppe B bei 1,1 (SD $\pm$ 0,2; Std.f. 0,1) mmol/l mit einem Minimum von 0,8 und einem Maximum von 1,7. Auch hier stiegen die Werte bis zur 24. Stunde pn. weiter an auf 1,2 (MW, SD $\pm$ 0,3; Std.f. 0,1) mmol/l mit einem Minimum und Maximum von 0,8 bzw. 1,9.

Die Gruppe C hatte den niedrigsten Mittelwert zur Geburt mit 0,6 (SD $\pm$ 0,1; Std.f. 0,0) mmol/l (min: 0,4 und max 0,9 mmol/l), der Anstieg über die Zeit war ähnlich dem von Gruppe B mit einem Mittelwert zur 12. Stunde von 1,1 (SD $\pm$ 0,3; Std.f. 0,1) mmol/l (min: 0,7 und max.: 1,9 mmol/l) und zur 24. Stunde von 1,3 (SD $\pm$ 0,3; Std.f. 0,1) mmol/l (min: 0,9 und max.: 1,9 mmol/l). Die Gruppenunterschiede bezüglich des Cholesterins waren im Vergleich von Gruppe A zu B und C hoch signifikant mit $p \leq 0,000$ (s. Abbildung IV.8.b).

In Gruppe D war der mittlere Cholesterinwert bei 0,6 (SD $\pm$ 0,2; Std.f. 0,0) mmol/l und das Minimum und Maximum bei 0,3 und 1,0 mmol/l. Zur 12. Stunde stieg auch hier der mittlere Wert auf 0,9 (SD $\pm$ 0,2; Std.f. 0,1) mmol/l an mit einem maximalen Wert von 1,2 und einem Minimum von 0,4 mmol/l, der gleichzeitig der niedrigste Wert aller Gruppen nach 12 Stunden pn. ist. 24 Stunden nach der Geburt waren die Cholesterinwerte im Mittel bei 1,1 (SD $\pm$ 0,47; Std.f. 0,1) mmol/l mit dem niedrigsten Wert von 0,5 und dem höchsten Wert von 1,7 mmol/l (s. Tab. IV.8.a und Abbildung IV.8.b).

Gruppe	Zeitpunkt	MW (mmol/l)	SD	Std.f.	Min	Max
A-D	0 h	0,7	0,2	0,0	0,3	1,3
	12 h	1,2	0,5	0,1	0,4	3,0
	24 h	1,4	0,5	0,1	0,5	3,2
A	0 h	0,8	0,2	0,0	0,4	1,3
	12 h	1,6	0,6	0,1	0,7	3,0
	24 h	1,7	0,6	0,1	0,7	3,2
B	0 h	0,7	0,2	0,0	0,3	1,1
	12 h	1,1	0,2	0,1	0,8	1,7
	24 h	1,2	0,3	0,1	0,8	1,9
C	0 h	0,6	0,1	0,0	0,4	0,9
	12 h	1,1	0,3	0,1	0,7	1,9
	24 h	1,3	0,3	0,1	0,9	1,9
D	0 h	0,6	0,2	0,0	0,3	1,0
	12 h	0,9	0,2	0,1	0,4	1,2
	24 h	1,1	0,4	0,1	0,5	1,7

Tabelle IV.8.a) Cholesterinwerte in mmol/l der vier Gruppen zu drei Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

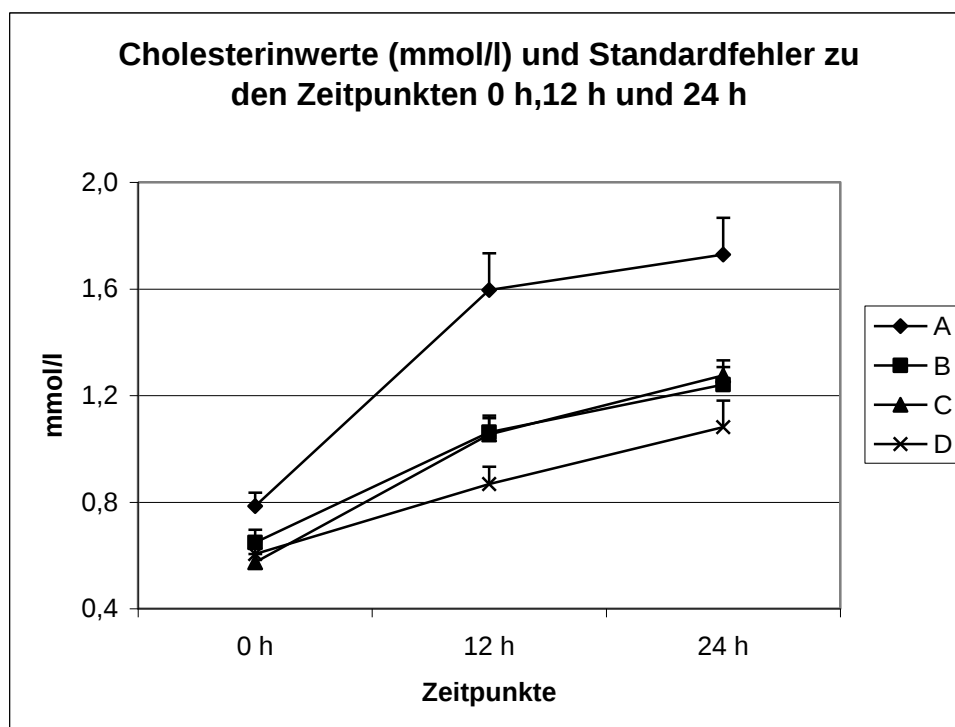


Abbildung IV.8.b) Mittelwerte der Cholesterinwerte in mmol/l der vier Gruppen A-D zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Die Logarithmen der Leptinwerte im Verhältnis zu den Cholesterinwerten waren in der Korrelationsanalyse zum Zeitpunkt der Geburt nicht signifikant ($p=0,183$). Das Signifikanzniveau stieg jedoch zum Zeitpunkt 12. Stunde pn. auf $p=0,001$ an, sank aber nach weiteren 12 Stunden wieder auf $p=0,037$ (s. Tab. IV.8.b). Zum Zeitpunkt 12 Stunden pn. wurde die Abhängigkeit der Parameter durch die Gleichung der Regressionslinie mit $y=1,28 + 0,297 \cdot x$ deutlich, zwecks Übersichtlichkeit sind wie im Kapitel IV.7. (Triglyceride) die arithmetischen Mittelwerte ($\pm$ Std.f. (lg Leptin)) der Gruppen ebenfalls mit aufgezeigt (s. Abbildung IV.8.c) und die Daten als Streudiagramm dargestellt (s. Abbildung IV.8.d).

Zeitpunkt	r =	p =	Signifikanzniveau
0	0,16	0,183	nicht signifikant
12	0,38	0,001	signifikant
24	0,25	0,037	schwach signifikant

Tabelle IV.8.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der lg Cholesterinwerte aller Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

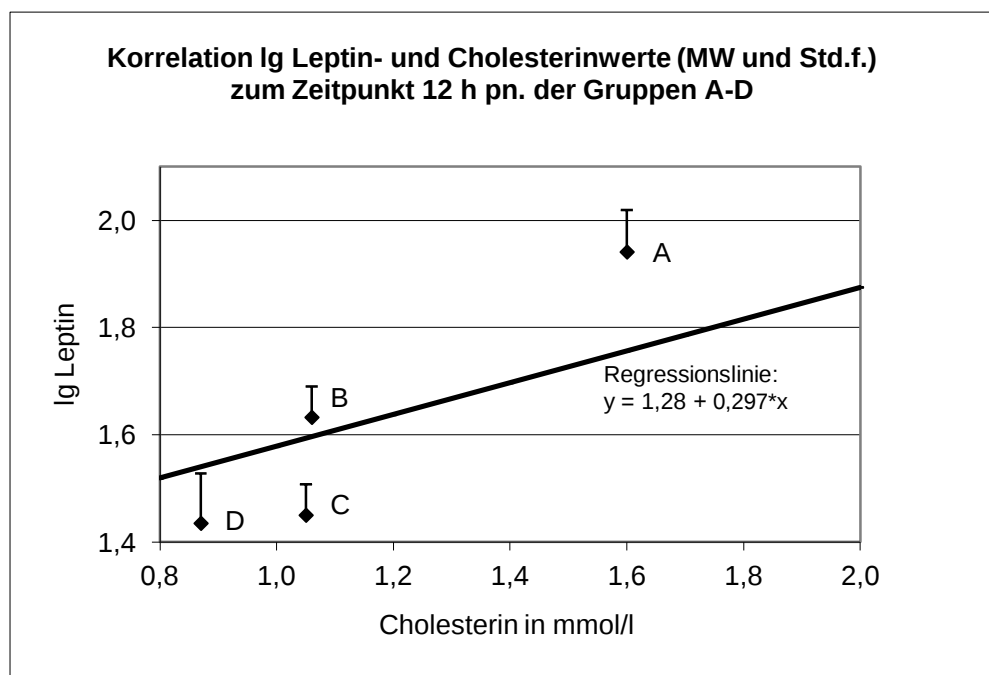


Abbildung IV.8.c) Korrelationsanalyse zwischen den Cholesterinwerten und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 12 h pn. und Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden

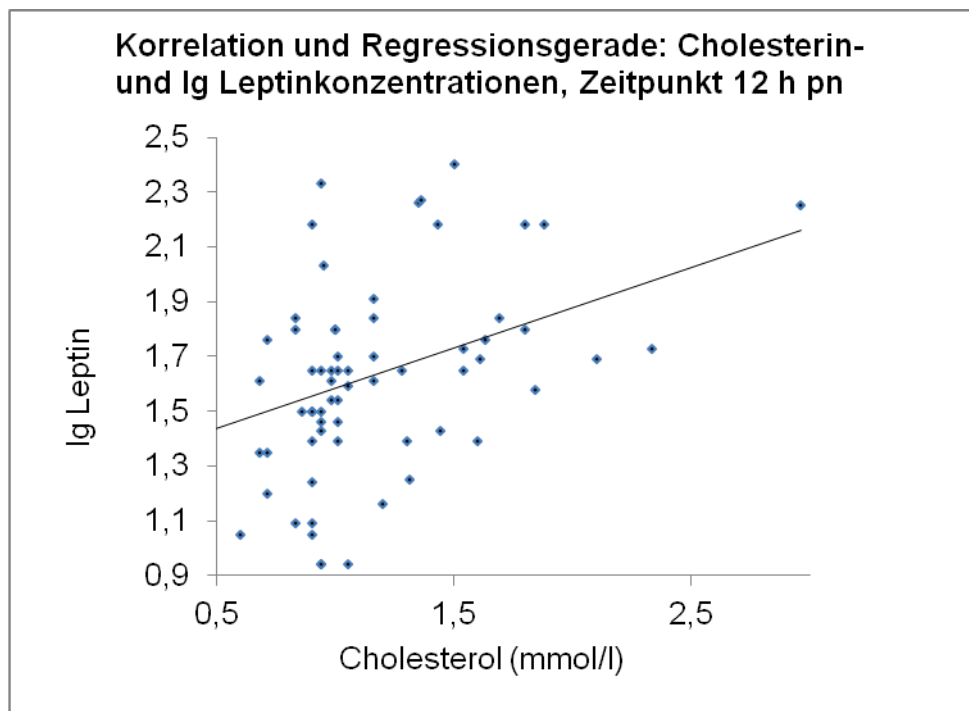


Abbildung IV.8.d) Darstellung der Korrelation und der Regressionsgerade zwischen den Cholesterinwerten und den lg Leptinkonzentrationen als Streudiagramm zum Zeitpunkt 12 h pn

9. Beziehung zwischen Blutzucker und Leptinkonzentration

Die Blutglucosekonzentration (in mmol/l) wurde zur Geburt (0 h) sowie zu 5 weiteren Zeitpunkten postnatal (1 h, 3 h, 6 h, 12 h und 24 h) bestimmt (s. Tabelle IV.9.a). Die durchschnittlichen Glucosewerte lagen zur Geburt bei allen Gruppen im hypoglykämischen Bereich (BZ < 3,4 mmol/l) mit 2,1 mmol/l, einem Minimum von 0,8 und einem Maximum von 4,0 mmol/l. Die Standardabweichung und der Standardfehler betrugen 0,7 bzw. 0,1. Zur 1. Stunde postnatal stieg der Mittelwert auf 2,7 mmol/l und war somit weiterhin im hypoglykämischen Bereich mit einem Minimum (min) von 0,7 und einem Maximum (max) von 6,3 mmol/l sowie einer Standardabweichung von 1,1 und einem Standardfehler von 0,1. Erst zur 3. Stunde postnatal war der Mittelwert mit 3,4 mmol/l außerhalb der Hypoglykämie (min: 1,0 mmol/l, max: 6,7 mmol/l). Die

Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (Std.f.) betrugen 1,1 mmol/l bzw. 0,1 mmol/l. Die Mittelwerte der folgenden Zeitpunkte stiegen stetig an mit einem Wert von 3,8 mmol/l zur 6. Stunde (SD 1,4; Std.f. 0,2) und dem höchsten maximalen Wert von 9,2 mmol/l, der niedrigste Wert betrug 1,3 mmol/l. In der 12. Stunde postnatal ist der Mittelwert 4,1 mmol/l (min 1,9 und max 8,0 mmol/l) mit der SD von 1,3 und dem Std. Fehler von 0,2. Der Blutzucker aller Gruppen erreichte den höchsten Mittelwert zur 24. Stunde pn. mit 4,9 mmol/l (SD 1,3 und Std. Fehler 0,2), einem Minimum von 2,0 und einem Maximum von 8,9 mmol/l (s. Abbildung IV.9.a). Der Anstieg der Blutzuckerwerte war über die Zeit hochsignifikant mit $p \leq 0,000$.

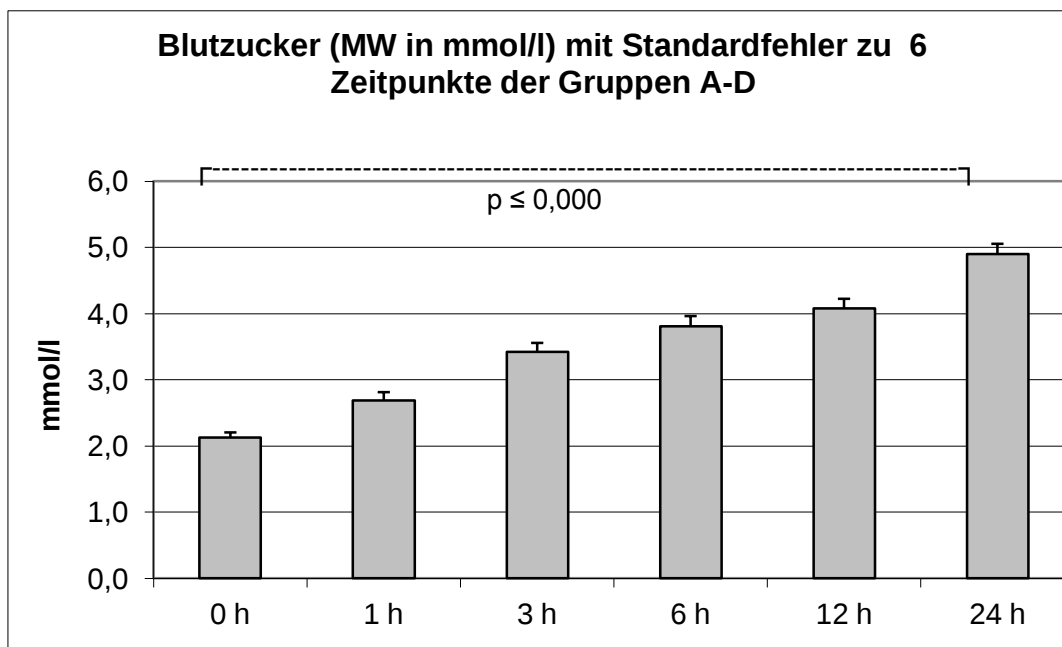


Abbildung IV.9.a) Mittelwerte der Blutzuckerwerte in mmol/l aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Die genauere Betrachtung der Daten der Tabelle IV.9.a) zeigte diesen Anstieg über die Zeit in jeder Gruppe, die Ausgangswerte der Blutzucker sind jedoch different. In der Gruppe A war der durchschnittliche Wert bei Geburt 2,2 mmol/l mit einer Standardabweichung (SD) von $\pm 0,6$ und einem Standardfehler (Std.f.) von 0,1 mit einem Minimum von 1,7 und einem Maximum von 3,6 mmol/l. Der durchschnittliche

Wert bei Geburt der Gruppe B war dazu im Vergleich sehr ähnlich mit 2,3 mmol/l, einer Standardabweichung (SD) von $\pm 0,7$ und einem Standardfehler (Std.f.) von 0,2 bei einem Minimum von 1,1 und einem Maximum von 4,0 mmol/l. Zum selben Zeitpunkt war der arithmetische Mittelwert der Gruppe C etwas niedriger mit 2,1 mmol/l (SD $\pm 0,7$; Std.f. 0,2; min 0,8 und max 3,7 mmol/l), die mittlere Blutzuckerkonzentration der Gruppe D war jedoch die niedrigste mit 1,7 mmol/l (SD $\pm 0,6$; Std.f. 0,2; min 0,8 und max 2,6 mmol/l). Dafür war in Gruppe D in der folgenden Stunde der Anstieg des mittleren Blutzuckerwerts mit 1,2 mmol/l in der ersten Stunden am höchsten und erreichte 2,9 mmol/l (SD $\pm 1,8$; Std.f. 0,5; min 0,7 und max 6,3 mmol/l). Gruppe C hatte eine höhere Anstiegsrate in der ersten Stunde als Gruppe B mit 0,3 mmol/l in der ersten Stunde auf 2,5 mmol/l (SD $\pm 0,7$; Std.f. 0,1; min 1,0 und max 4,0 mmol/l). Die Gruppe A erreichte in der 1. Stunde einen mittleren Blutzuckerwert von 3,0 mmol/l (SD $\pm 0,9$; Std.f. 0,2; min 1,7 und max 4,8 mmol/l) und Gruppe B zeigte den geringsten Anstieg auf den geringsten Mittelwert der 1. Stunde von 2,4 mmol/l (SD $\pm 0,9$; Std.f. 0,2; min 0,9 und max 4,2 mmol/l).

Im Laufe der ersten 24 Lebensstunden sind in der Gruppe A immer die höchsten mittleren Blutglucosekonzentrationen mit mittleren Werte von 4,1 mmol/l (3. Stunde) über 4,6 (6. Stunde) und 4,7 (12. Stunde) bis 5,1 mmol/l zur 24. Stunde (SD $\pm 1,4$; Std.f. 0,3; min 2,0 und max 8,1 mmol/l) gemessen worden. Dieser letzte Wert wurde in der Gruppe D jedoch überschritten mit 5,2 mmol/l, einem Minimum von 3,0 und einem Maximum von 8,9 (SD $\pm 1,8$; Std.f. 0,5). In Gruppe A kamen ebenfalls die höchsten absoluten Blutglucose-konzentrationen vor mit 9,2 mmol/l zur 6 Stunde pn. (Gruppe B: 6,2 mmol/l, Gruppe C: 5,3 mmol/l und Gruppe D: 4,5 mmol/l). Den höchsten Blutzuckerwert zur 3. Stunde postnatal war in Gruppe D zu messen mit 6,7 mmol/l (Gruppe A: 6,3 mmol/l, Gruppe B: 5,1 mmol/l und Gruppe C: 4,4 mmol/l). Die niedrigste Standardabweichung und Standardfehler lagen in der Gruppe A zur Geburt vor mit 0,6 bzw. 0,1. Die höchste Standardabweichung lag ebenfalls in Gruppe A vor mit 1,8 und den höchsten Standardfehler gab es in Gruppe D zur 24. Stunde postnatal mit 0,5 (SD:1,8) (s. Tabelle IV.9.a und Abbildung IV.9.b).

Gruppe	Zeitpunkt	MW (mmol/l)	SD	Std.f.	min	max
A-D	0 h	2,1	0,7	0,1	0,8	4,0
	1 h	2,7	1,1	0,1	0,7	6,3
	3 h	3,4	1,1	0,1	1,0	6,7
	6 h	3,8	1,4	0,2	1,3	9,2
	12 h	4,1	1,3	0,2	1,9	8,0
	24 h	4,9	1,3	0,2	2,0	8,9
A	0 h	2,2	0,6	0,1	1,2	3,6
	1 h	3,0	0,9	0,2	1,7	4,8
	3 h	4,1	1,2	0,3	2,0	6,3
	6 h	4,6	1,8	0,4	2,2	9,2
	12 h	4,7	1,6	0,4	1,9	8,0
	24 h	5,1	1,4	0,3	2,0	8,1
B	0 h	2,3	0,7	0,2	1,1	4,0
	1 h	2,4	0,9	0,2	0,9	4,2
	3 h	3,3	0,7	0,2	2,3	5,1
	6 h	3,7	0,9	0,2	2,4	6,2
	12 h	4,1	1,0	0,2	2,3	5,5
	24 h	5,0	1,1	0,2	2,5	6,4
C	0 h	2,1	0,7	0,2	0,8	3,7
	1 h	2,5	0,7	0,1	1,0	4,0
	3 h	3,2	0,7	0,2	1,5	4,4
	6 h	3,7	1,1	0,2	1,5	5,3
	12 h	3,9	1,2	0,3	2,0	5,7
	24 h	4,4	1,0	0,2	2,2	5,7
D	0 h	1,7	0,6	0,2	0,8	2,6
	1 h	2,9	1,8	0,5	0,7	6,3
	3 h	2,9	1,6	0,4	1,0	6,7
	6 h	3,2	1,0	0,3	1,3	4,5
	12 h	3,5	1,1	0,3	1,9	5,1
	24 h	5,2	1,8	0,5	3,0	8,9

Tabelle IV.9.a) Blutglucosewerte in mmol/l der vier Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

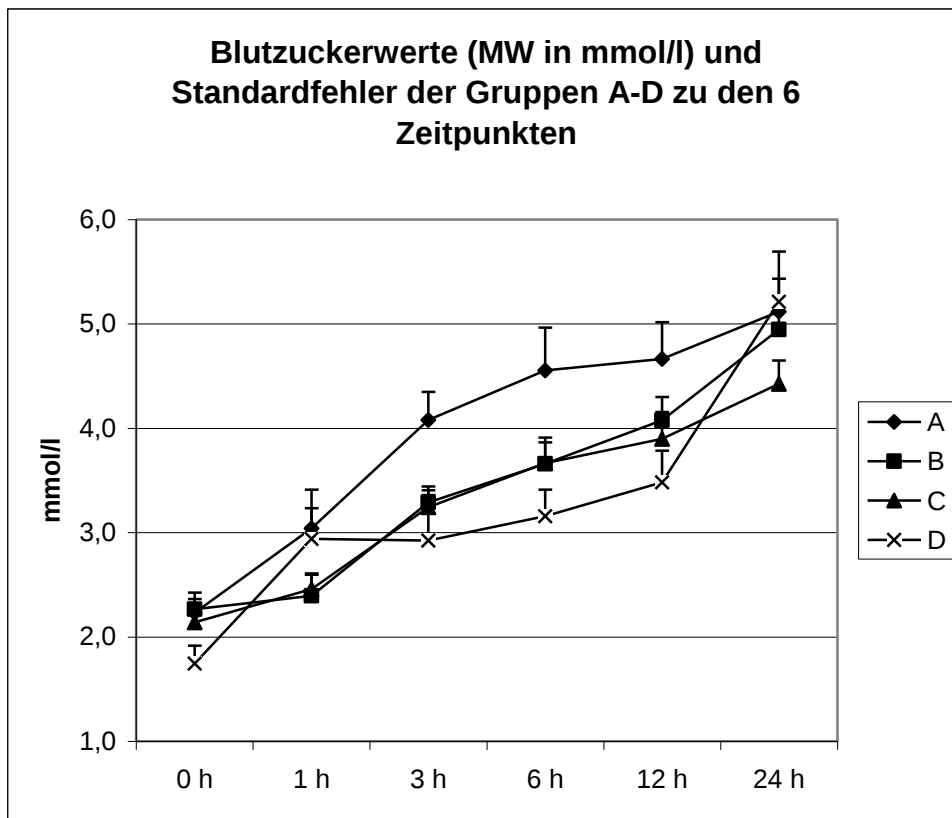


Abbildung IV.9.b) Mittelwerte der Blutglucosewerte in mmol/l der vier Gruppen A-D zu den 6 Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Die Korrelationsanalyse der Blutzuckerwerte und der Logarithmen der Leptinkonzentrationen (s. Tab IV.1.d) erreichte zur 6. Stunde ein deutliches Signifikanzniveau mit $p < 0,001$. Zu allen anderen Zeitpunkten war die Korrelation knapp nicht signifikant mit p-Werten zwischen 0,053 und 0,069 ($p \leq 0,05$ schwach signifikant, s. Tabelle IV.9.b). Die Korrelation zum Zeitpunkt der sechsten Stunde postnatal kann mit der Gleichung der Regressionslinie $y = 1,04 + 0,107 \cdot x$ beschrieben werden (s. Abbildung IV.9.c). Die Abbildung IV.9.d zeigt die Daten zusätzlich als Streudiagramm.

Zeitpunkt	r =	p=	Signifikanzniveau
0	-0,22	0,066	nicht signifikant
1	0,24	0,059	nicht signifikant
3	0,24	0,053	nicht signifikant
6	0,43	< 0,001	Signifikant
12	0,22	0,069	nicht signifikant
24	0,23	0,064	nicht signifikant

Tabelle IV.9.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der Blutzuckerwerte aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

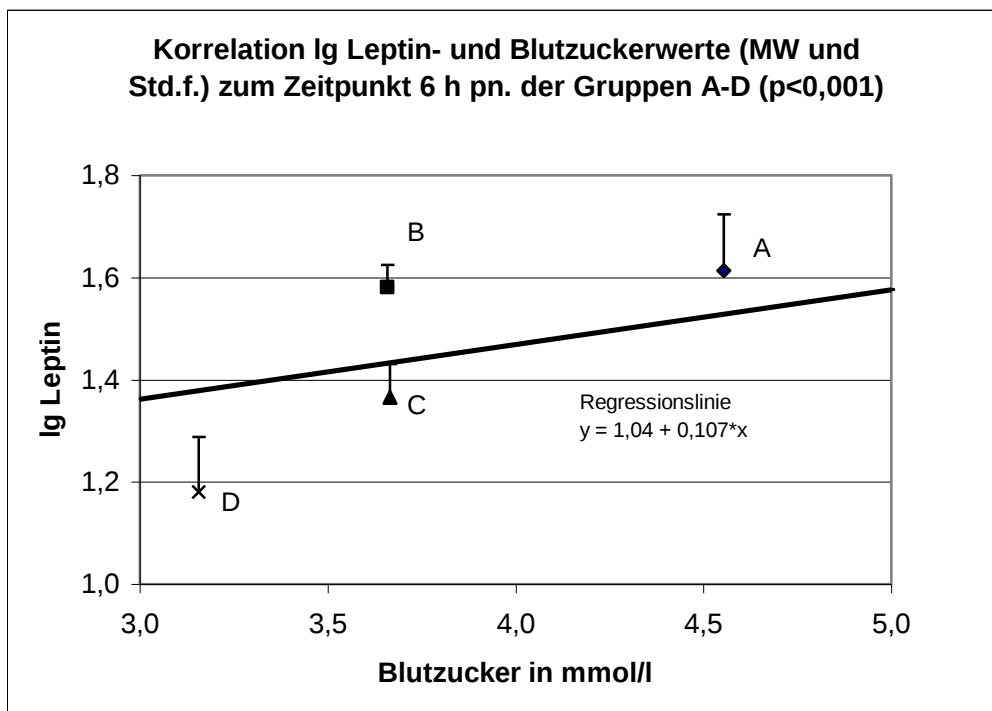


Abbildung IV.9.c) Korrelationsanalyse zwischen den Blutzuckerwerten und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 6 h pn. und der Gleichung der Regressionsgeraden

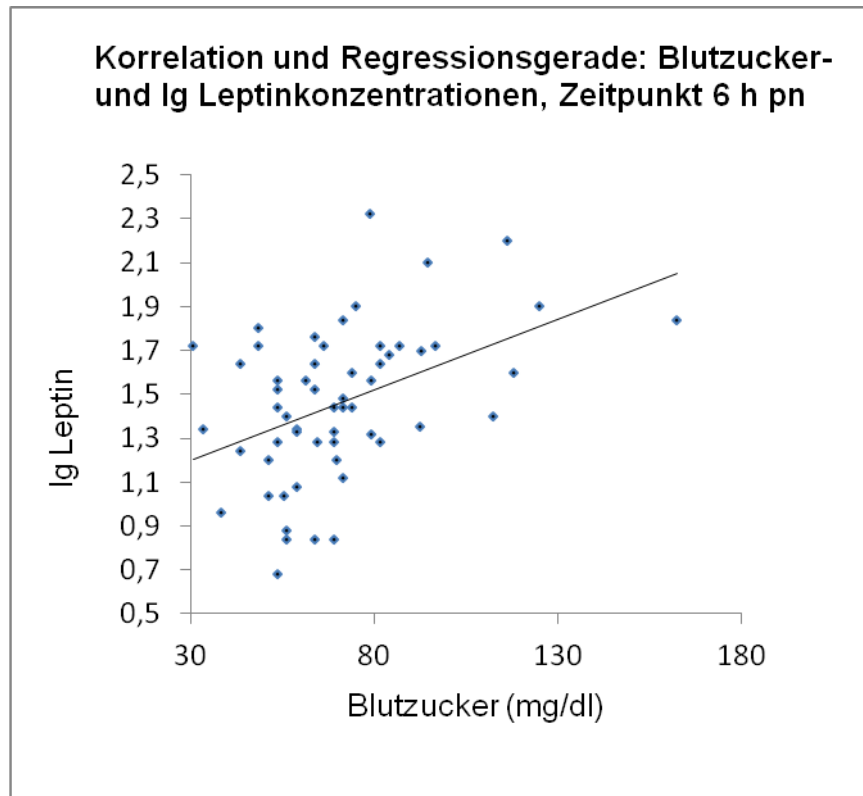


Abbildung IV.9.d) Darstellung der Korrelation und der Regressionsgerade zwischen den Blutzuckerwerten (mg/dl) und den lg Leptinkonzentrationen als Streudiagramm zum Zeitpunkt 6 h pn

10. Beziehung zwischen Plasma- β -Hydroxybutyrats und Leptinkonzentration

Die β -Hydroxybutyratkonzentrationen (mmol/l) wurden zur Geburt sowie zur 12. und 24. Stunde postnatal bestimmt. Die durchschnittlichen β -Hydroxybutyratkonzentrationen (MW) aller Gruppen lagen zur Geburt bei 0,1 mmol/l mit einem Minimum von 0,1 und einem Maximum von 0,2 mmol/l. Die Standardabweichung und der Standardfehler betrugen jeweils 0,0 mmol/l. Zur 12. Stunde postnatal stieg der Mittelwert auf 0,2 mmol/l mit einem Minimum (min) von 0,1 und einem Maximum (max) von 0,4 mmol/l und erreichte zur 24. Stunde den höchsten Mittelwert mit 0,2 mmol/l (min: 0,1 mmol/l, max: 0,5 mmol/l). Die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (Std.f.) betrugen zur 12. Stunde 0,1

bzw. 0,0 mmol/l und zur 24. h pn. 0,1 bzw. 0,0 mmol/l (s. Abbildung IV.10.a und Tabelle IV.10.a).

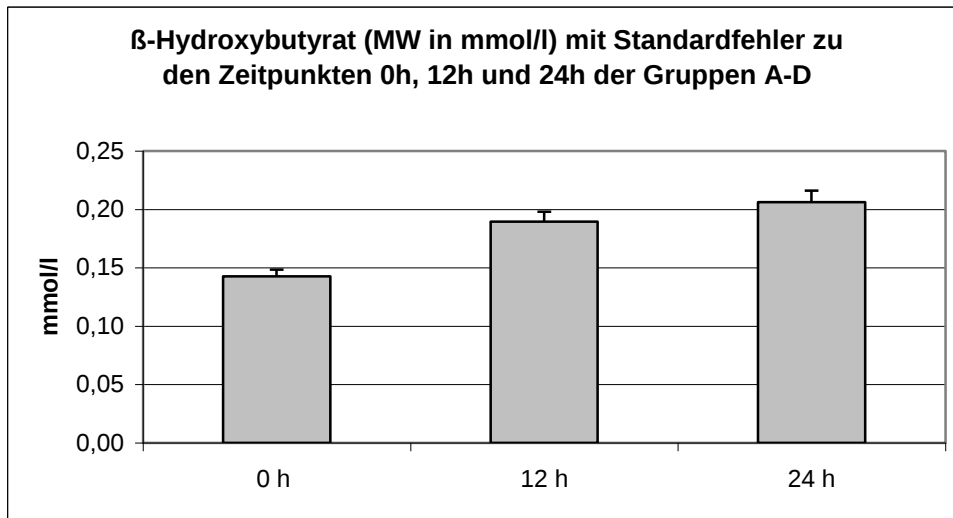


Abbildung IV.10.a) Mittelwerte der β -Hydroxybutyratkonzentrationen in mmol/l aller Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Dieser Anstieg über die Zeit war jedoch nicht in allen Gruppen gleichförmig. In der Gruppe A war die mittlere β -Hydroxybutyratkonzentration bei 0,1 mmol/l, sank zur 12. Stunde postnatal auf 0,1 mmol/l ab und erreichte 24 Stunden postnatal eine mittlere Konzentration von 0,1 mmol/l. Die niedrigsten Werte lagen bei allen Gruppen zu allen Zeitpunkten bei 0,1 mmol/l, die höchsten Werte (max) waren in der Gruppe A in der 12. und 24. Stunde bei 0,3 mmol/l. Die Standardabweichungen (SD) und die Standardfehler (Std.f.) sind in der Tabelle IV.10.a) aufgeführt. Der niedrigste Mittelwert der β -Hydroxybutyratkonzentrationen war in Gruppe B mit 0,1 mmol/l zur Geburt verzeichnet. Nach einem Konzentrationsanstieg von über 83 % lag der Mittelwert nach 12 Stunden aber schon bei 0,2 mmol/l und erreichte zusammen mit Gruppe C den Wert von 0,2 mmol/l 24 Stunden postnatal. In Gruppe D waren die mittleren β -Hydroxybutyratwerte zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu den anderen Gruppen A-C am höchsten und startete mit 0,2 mmol/l (0 h), stieg um knapp 26 % auf 0,2 mmol/l und erreichte nach 24 Stunden den höchsten Mittelwert von 0,2 mmol/l. In Gruppe D wurde

ebenfalls der höchste Absolutwert von 0,5 mmol/l erreicht (s. Tabelle IV.10.a und Abbildung IV.10.b).

Der Anstieg der β -Hydroxybutyratwerte über die Zeit war somit nur in Gruppe B-D signifikant ($p \leq 0,000$). In Gruppe A war der Anstieg der β -Hydroxybutyratwerte nicht signifikant. Die Unterschiede der Gruppen B-D im Vergleich zur Gruppe A waren ebenfalls hochsignifikant mit $p \leq 0,000$.

Gruppe	Zeitpunkt	MW (mmol/l)	SD	Std.f.	min	max
A-D	0 h	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2
	12 h	0,2	0,1	0,0	0,1	0,4
	24 h	0,2	0,1	0,0	0,1	0,5
A	0 h	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2
	12 h	0,1	0,1	0,0	0,1	0,3
	24 h	0,1	0,1	0,0	0,1	0,3
B	0 h	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2
	12 h	0,2	0,1	0,0	0,1	0,4
	24 h	0,2	0,1	0,0	0,1	0,4
C	0 h	0,2	0,0	0,0	0,1	0,2
	12 h	0,2	0,0	0,0	0,2	0,3
	24 h	0,2	0,1	0,0	0,1	0,3
D	0 h	0,2	0,0	0,0	0,1	0,2
	12 h	0,2	0,1	0,0	0,2	0,4
	24 h	0,2	0,1	0,0	0,2	0,5

Tabelle IV.10.a) β -Hydroxybutyratwerte in mmol/l der vier Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

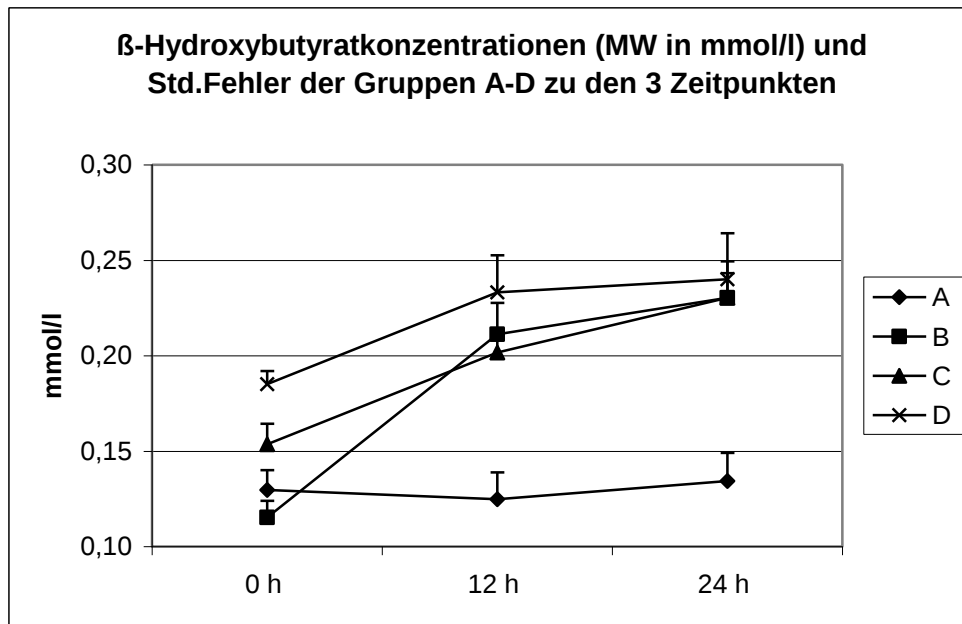


Abbildung: IV.10.b) Mittelwerte der β -Hydroxybutyratwerte in mmol/l der vier Gruppen A-D zu den 3 Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

In der Korrelationsanalyse waren die Logarithmen der Leptinwerte im Verhältnis zu den Logarithmen der β -Hydroxybutyratwerte zum Zeitpunkt der Geburt nicht signifikant ($p=0,264$). Das Signifikanzniveau stieg jedoch zum Zeitpunkt 12. Stunde pn. auf $p=0,003$ an und erreichte nach weiteren 12 Stunden einen Korrelationskoeffizienten $r = -0,501$ ($p<0,001$) (s. Tab. IV.10.b). Zum Zeitpunkt der 12. Stunde pn. wird die lineare Abhängigkeit der Parameter durch die Gleichung der Funktion $y=1,09 - 0,698 \cdot x$ beschrieben (s. Abbildung IV.10.c). Die lineare Abhängigkeit zwischen den lg Leptinkonzentrationen und den lg β -Hydroxybutyratwerten stieg in den folgenden 12 Stunden weiter an und konnte mit der linearen Regressionsfunktion $y= 1,04 - 0,988 \cdot x$ beschrieben werden (s. Abbildung IV.10.d. und Abbildung IV.10.e. (Streudiagramm)).

Zeitpunkt	r =	p =	Signifikanzniveau
0 h	-0,13	0,264	nicht signifikant
12 h	-0,35	0,003	signifikant
24 h	-0,50	< 0,001	signifikant

Tabelle IV.10.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der lg β -Hydroxybutyratwerte aller Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

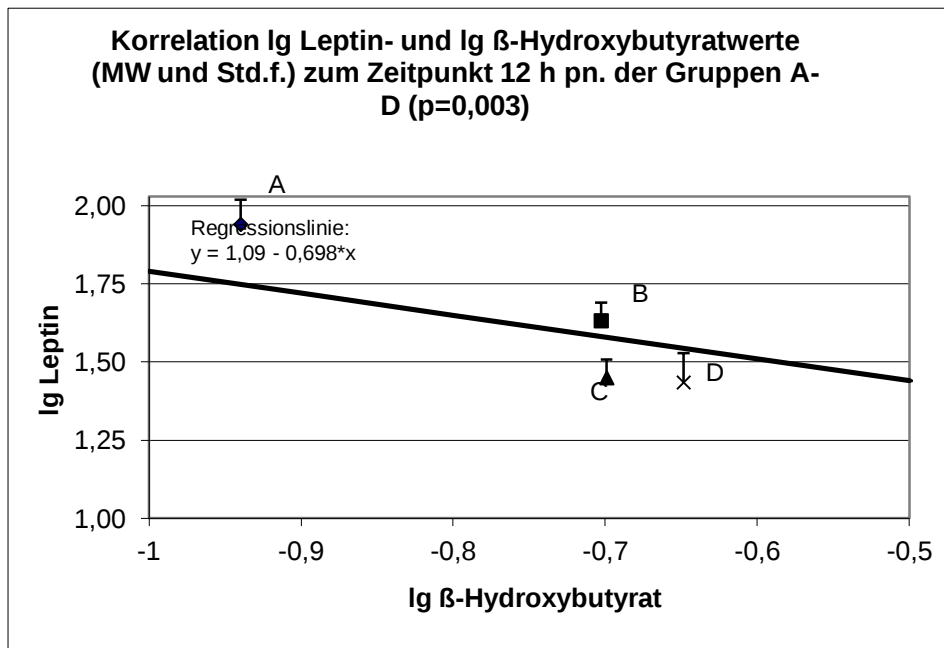


Abbildung IV.10.c) Korrelationsanalyse zwischen den lg β -Hydroxybutyratwerte und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 12 h pn. und der Gleichung der Regressionsgeraden

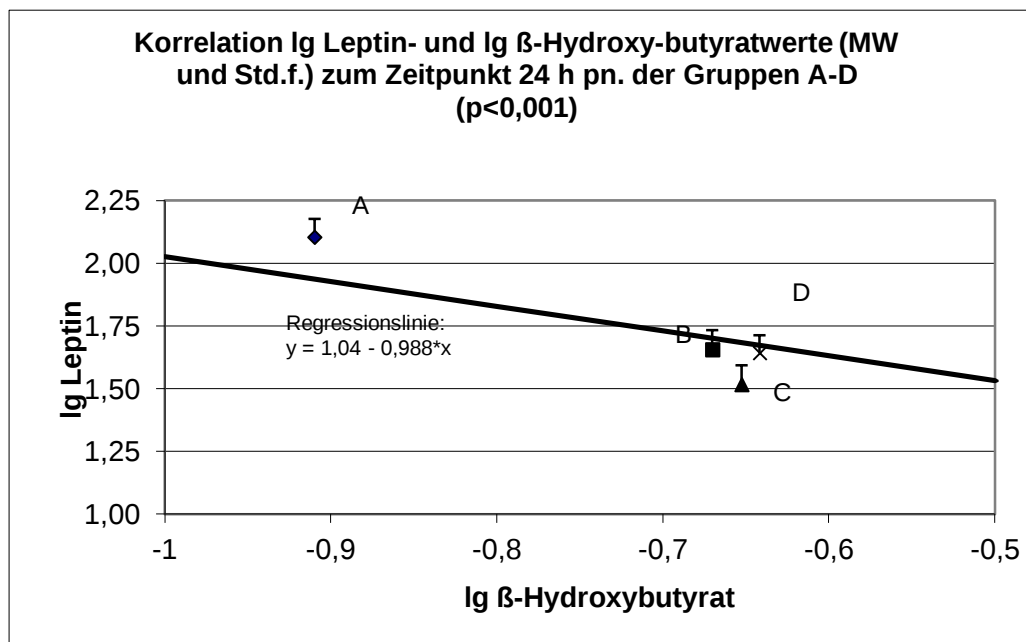


Abbildung IV.10.d) Korrelationsanalyse zwischen den lg β -Hydroxybutyratwerte und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 24 h pn. und der Gleichung der Regressionsgeraden

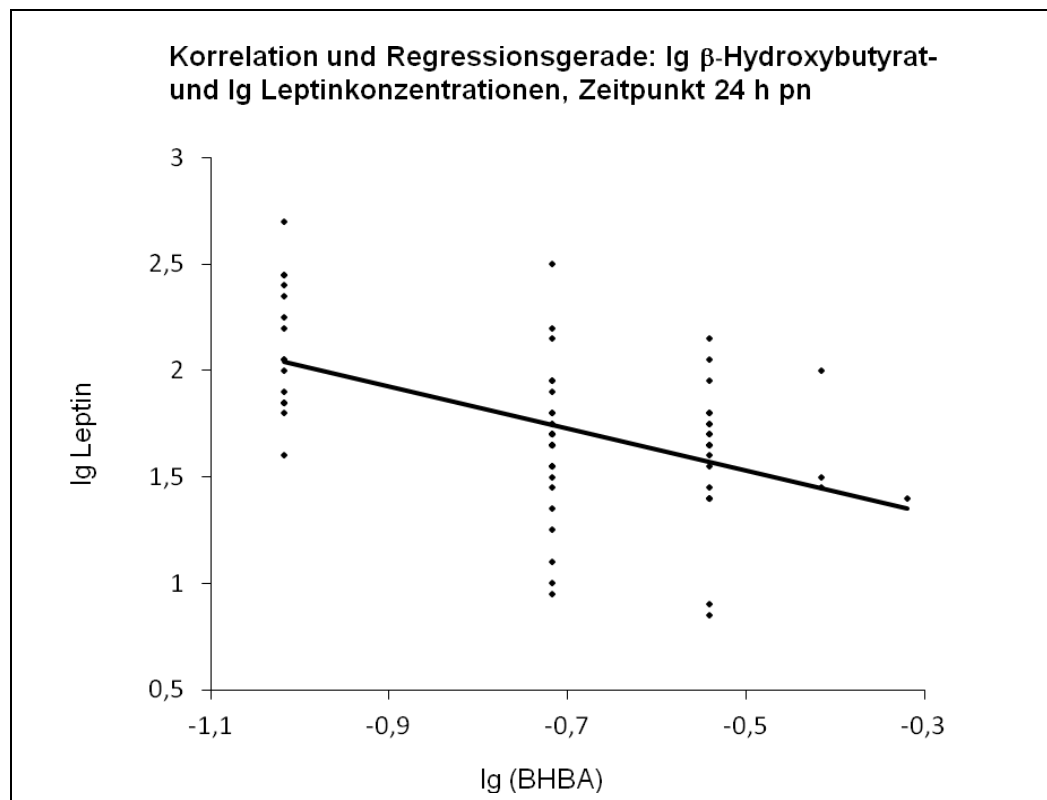


Abbildung IV.10.e) Darstellung der Korrelation und der Regressionsgerade zwischen den lg β -Hydroxybutyratwerte und den lg Leptinkonzentrationen als Streudiagramm zum Zeitpunkt 24 h pn

V. DISKUSSION

Die Entwicklung eines Assays zur Bestimmung der gesamten Leptinserumkonzentration und der quantitative Vergleich zu anderen Untersuchungen

Leptin, das Produkt des obese (ob) Gens (Zhang *et al.*, 1994) wird im Fettgewebe von den Adipozyten produziert und in die Zirkulation sezerniert (Jequier, 2002; Kiess *et al.*, 1998b). Leptin spielt für die Regulation des Körpergewichts bereits im neugeborenen Alter durch die Inhibierung der Futteraufnahme und Stimulation des Energieverbrauchs eine wichtige Rolle (Halaas *et al.*, 1995; Kiess *et al.*, 1998b; Kratzsch *et al.*, 2005). Leptin zirkuliert zum Teil gebunden im Blut. Um die Biologie der Leptinaktion zu verstehen, wurde die Anwesenheit des Leptins im Serum inklusive der gebundenen Fraktion untersucht. 1996 konnten Sinha *et al.* erstmals die Existenz der Leptinbindungsproteine mit einem Molekulargewicht von 90 bis 280 kDa mittels Chromatographie nachweisen (Sinha *et al.*, 1996b). Sie stellten fest, dass bei schlanken Probanden im Vergleich zu adipösen der Hauptteil des Leptins gebunden ist, und folgerten daraus, dass sich aus dem Bindungsverhalten des Leptins verschiedene Funktionen im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit ergeben (Sinha *et al.*, 1996b). In den bisher beschriebenen Radioimmunoassays bindet der gegen das Leptin gebildete Antikörper an die für sie frei liegenden Epitope. Diese gemessene Leptinkonzentration hat vielfache physiologische Bedeutungen. Möglicherweise gibt es darüber hinaus jedoch weitere Regulationsmechanismen, die durch die Kopplung an Bindungsproteine bedeutend sind. Die folgenden Studien untersuchten die Leptinbindungsproteine und -rezeptoren: Patel *et al.*, 1999; Birkenmeier *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1996; Tartaglia *et al.*, 1995; Herrid *et al.*, 2006. Eines der identifizierten Bindungsproteine ist ein löslicher Teil eines Leptinrezeptors (sOB-R) (Schubring *et al.*, 2000; Lammert *et al.*, 2001), der wie auch bei anderen Zytokinen und dem Wachstumshormon als löslicher Rezeptor im Serum als Bindungsprotein fungiert (Sehgal, 1996). Birkenmeier *et al.* und Patel *et al.* beschrieben zudem verschieden starke Bindungsvermögen anderer Leptinbindungsproteine in vitro (Birkenmeier *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 1999). Houseknecht *et al.* konnten mindestens drei Leptin bindende Makromoleküle (MW 85-240 kDa) nachweisen (Houseknecht *et al.*, 1996), und zusätzlich wurde von Diamond, Jr. *et al.* ein Leptinbindungskomplex mit einem Molekulargewicht von 450 kDa nachgewiesen (Diamond, Jr. *et al.*, 1997). Als einziges Bindungsprotein wurde bisher

der sOB-R in Bezug auf Stoffwechselfunktionen erforscht: Misra et al. und Skoczen et al. zeigten eine inverse Korrelation zwischen Leptin und sOB-R (Misra *et al.*, 2004; Skoczen *et al.*, 2011). Auch Kratzsch et al. konnten beim neugeborenen Menschen einen Anstieg des sOB-R bei einem Abfall des Leptinspiegels über die ersten 5 Lebenstage messen (Kratzsch *et al.*, 2005). Yannakoulia et al. konnten eine Verbindung zwischen dem Leptin, dem sOB-R, der Energieaufnahme und dem Körpergewicht feststellen (Yannakoulia *et al.*, 2003). Ogawa et al. berichteten über eine Korrelation zwischen den Plasmatriglyceriden sowie HDL-Cholesterin und sOB-R (Ogawa *et al.*, 2004) und Birkenmeier et al. vermuteten eine Beeinflussung der Bioverfügbarkeit des Leptins durch die Bindungsproteine (Birkenmeier *et al.*, 1998). Zudem kam es in den ersten Lebensjahren beim Menschen zu hohen sOB-R Konzentrationen (Kratzsch *et al.*, 2002) und Chan et al. wiesen eine zirkadiane Rhythmik des sOB-R nach (Chan *et al.*, 2002). Es hat den Anschein, dass das gebundene Leptin und seine Bindungsproteine sehr wohl eine eigene Funktion übernehmen. Eine weitere Studie bestärkte diesen Verdacht, da eine erhöhte Expression des sOB-R bei ob/ob-Mäusen zu einer vermehrten Gewichtsreduktion führte (Huang *et al.*, 2001). Ob alle diese Untersuchungen das gesamte gebundene und freie Leptin erfassen, kann nicht geklärt werden. Mehrere Autoren weisen darauf hin, dass bei der gebundenen Leptinfraktion ein mögliches Verdecken der für die Antikörperbindung relevanten Epitope vorliegen könnte; bei den Messungen würden sie somit nicht detektiert (Otto *et al.*, 1998; Peelman *et al.*, 2004) und lediglich unter reduzierenden Verhältnissen frei werden (Houseknecht *et al.*, 1996). Es könnten somit drei Kompartimente des Leptins vorliegen:

- a) das freie ungebundene Leptin,
- b) das gebundene Leptin mit freier Bindungsstelle für den Antikörper und
- c) das gebundene Leptin ohne eine freie Bindungsstelle (Otto *et al.*, 1998).

Murakami et al. konnten durch Denaturierung des Serums die Bindung an den sOB-R auflösen, jedoch betraf eine Denaturierung des Serums wohl auch die Tertiärstruktur des Leptins, und es konnten im RIA nur noch verminderte Leptinwerte gemessen werden (Murakami *et al.*, 2001). Auch eine durch den veränderten pH-Wert erfolgte Dissoziation des Leptins von seinem Bindungsprotein ergab eine Veränderung des Bindungsverhaltens des Antikörpers des Immunnachweises (Sinha *et al.*, 1996b). Zusätzlich beschrieben Murakami et al., dass Bindungsproteine (sOB-R) im RIA ähnlich dem Antikörper wirken und somit die Werte beeinflussen können. Es galt daher,

einen Test zu entwickeln, der das Leptin ohne den Einfluss aller möglichen Bindungsproteine misst, dabei jedoch die Bindungsfähigkeit des Antikörpers auf das Leptin nicht beeinträchtigt. Dieser Ansatz wurde mit dieser Methode, die auf der Denaturierung mit Spaltung der Disulfidbrücken der Proteine im Serum basiert, verfolgt. Das nun vorliegende Leptin konnte mittels eines Antikörpers, der nur gegen eine Partialsequenz des Leptins gerichtet ist, im eigens dafür entwickelten Radioimmunoassay quantitativ gemessen werden. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen fiel auf, dass die mit dieser Methode gemessenen Leptinwerte deutlich höher lagen. Der Median zum Zeitpunkt der Geburt bei dieser Untersuchung lag bei 20,9 µg/l. Bei anderen Untersuchungen von Nabelschnurblut bei Säugetieren war der Median durchschnittlich unter 10 µg/l (Asakuma *et al.*, 2003; Delavaud *et al.*, 2000; Ehrhardt *et al.*, 2000; Hytinen *et al.*, 1999; Kauter *et al.*, 2000; Schubring *et al.*, 1997; Shekhawat *et al.*, 1998). Jedoch lässt sich diese Diskrepanz durchaus damit begründen, dass in dem vorliegenden Test das gesamte denaturiert vorliegende Schafleptin gemessen wurde und es nicht zu Störungen durch die Bindungsproteine gekommen ist. Es drängt sich der Verdacht auf, dass unterschiedliche Methoden verschiedene Kompartimente des Leptins erfassen (siehe oben): a) freies Leptin, b) gebundenes Leptin mit Bindung an einen Antikörper und c) gebundenes Leptin ohne Bindung an einen Antikörper und somit ihre speziellen physiologischen Wirkungen aufzeigen. Deutlich werden auch die physiologischen Wechselwirkungen des gesamten Leptins auf den Stoffwechsel, die in den folgenden Abschnitten diskutiert werden. Es ließ sich bei dieser Methode nicht vermeiden, dass wiederum die Einflüsse der Bindungsproteine ausgeblendet wurden, obwohl diese möglicherweise auch zur physiologischen Wirkung des Leptins beitragen (Birkenmeier *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2002; Kratzsch *et al.*, 2002; Misra *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 1996b; Yannakoulia *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2001). Die Entwicklung eines Assays zur Bestimmung der gesamten Leptinkonzentration im Schafserum trägt somit zur Aufklärung eines Teils der komplexen Zusammenhänge des Stoffwechsels bei. Interessant wäre zu untersuchen, ob es auch bei anderen Tieren und beim Menschen relevante Zusammenhänge in Bezug auf das gesamte Leptin gibt, weitere Bindungsproteine zu identifizieren und ihre Funktion bezüglich der Bioverfügbarkeit des Leptins weiter zu erforschen.

Die Veränderung der gesamten Leptinserumkonzentration bei neugeborenen Lämmern innerhalb der ersten 24 Lebensstunden

Es zeigte sich, dass die Leptinspiegel der neugeborenen Lämmer innerhalb der ersten 24 Stunden signifikant anstiegen. McFadin et al. konnten ebenfalls bei Lämmern einen Anstieg der Leptinkonzentration sogar bis zum 5. Tag postnatal feststellen (McFadin *et al.*, 2002) und Herrera et al. und Cottrell et al. zeigten bei Ratten und Mäusen ebenfalls einen Anstieg der Leptinserumkonzentration (Cottrell *et al.*, 2010) innerhalb des ersten Lebenstages. In den folgenden Tagen zeigte sich jedoch wieder ein Absinken der Leptinkonzentration (Herrera *et al.*, 2000). Beim Menschen wurde ebenfalls ein Abfall der Leptinspiegel in den ersten Lebenstagen beschrieben (Ertl *et al.*, 1999; Bellone *et al.*, 2004; Kratzsch *et al.*, 2005). Jedoch wurde nur ein Vergleich des Leptinspiegels des Nabelschnurblutes und des Blutes bei Entnahme am 3. bzw. am 5. Tag pn. durchgeführt, so dass keine Aussage über den Verlauf der ersten 24 Stunden gemacht werden konnte (Ertl *et al.*, 1999; Bellone *et al.*, 2004; Hytinantti *et al.*, 1999). Kratzsch et al. wies einerseits einen Abfall des Leptinspiegels beim neugeborenen Menschen nach, aber es zeigte sich andererseits ein Anstieg des löslichen Leptinrezeptores (sOB-R) über die ersten 5 Tage (Kratzsch *et al.*, 2005). Hytinantti et al. konnte eine Senkung von freiem und gebundenen Leptin über die ersten 3 Lebenstage beim neugeborenen Menschen nachweisen (Hytinantti *et al.*, 2001). Die Untersuchung von Schubring et al. zeigte innerhalb der ersten postnatalen vier Stunden einen leichten Anstieg des Medians des Leptinspiegels bei gesunden humanen Neugeborenen (Schubring *et al.*, 1999).

Beziehung zwischen der Merkmale Geschlecht und Wurfgröße und dem Gesamt-Leptinserumspiegel

Eine Ursache für die Leptinspiegelmodifikationen könnte das Geschlecht der neugeborenen Lämmer sein, da sich bei Untersuchungen von Nabelschnurblut bei reifen humanen Neugeborenen niedrigere Leptinserumwerte bei den Jungen als bei den Mädchen fanden (Ertl *et al.*, 1999; Bellone *et al.*, 2004) und der Unterschied im Laufe der Pubertät noch stärker ausgeprägt war (Blum *et al.*, 1997a). Bei männlichen Lämmern war die Leptingenexpression im perirenenalen Fettgewebe im Vergleich zu den weiblichen Lämmern erniedrigt (Duffield *et al.*, 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten keinen geschlechtsspezifischen Unterschied hinsichtlich der

Leptinkonzentrationen. Auch Yuen et al. und McFadin et al. konnten diesbezüglich bei fetalen Lämmern keine Geschlechtsabhängigkeit feststellen (Yuen *et al.*, 2002; McFadin *et al.*, 2002), die sich auch nicht, im Gegensatz zu Ertl et al. und Bellone et al., in anderen Untersuchungen bei humanen Neugeborenen fanden (Schubring *et al.*, 1999; Cetin *et al.*, 2000; Shekhawat *et al.*, 1998; Hytinantti *et al.*, 1999).

Des Weiteren könnte auch die Wurfgröße einen Einfluss auf die Leptinwerte haben, da es durch die Mehrlingsgravidität zu einem limitierten plazentaren Nahrungsangebot für den einzelnen Fetus kommen kann. Die Serumleptinwerte von 24 Stunden alten menschlichen Zwillingen waren im Vergleich zu Einlingen niedriger (Onal *et al.*, 2003). Diese Untersuchungen zeigten jedoch weder zur Geburt noch zu einem späteren Zeitpunkt einen Einfluss der Wurfgröße auf die Leptinwerte. Grisaru-Granovsky et al. konnten bei Untersuchungen des Nabelschnurblutes von humanen Neugeborenen ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich der Leptinkonzentrationen feststellen (Grisaru-Granovsky *et al.*, 2003).

Beziehung zwischen dem Körpergewicht und dem Gesamt-Leptinserumspiegel

Für den Anstieg der Leptinkonzentrationen über die Zeit könnte die Körpergewichtszunahme mitverantwortlich sein, da Leptin hauptsächlich von den Adipozyten produziert und bei Säugetieren während einer unbeeinträchtigten Stoffwechsellaage proportional zur Fettmasse sezerniert wird (Blum *et al.*, 1997c; Klein *et al.*, 1996; Maffei *et al.*, 1995; Hamilton *et al.*, 1995; Blum *et al.*, 1997b). Dieser Zusammenhang konnte auch beim erwachsenen Schaf nachgewiesen werden, zusätzlich zeigten unterernährte Schafe eine deutliche Abnahme des Leptinwerts (Delavaud *et al.*, 2000). Selbst bei neugeborenen Ratten wurde die ob-Gen mRNA in der subkutanen Fettschicht und in der Zirkulation nachgewiesen, so dass von einer neonatalen Leptinproduktion ausgegangen werden kann (Rayner *et al.*, 1997). Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und dem Leptinspiegel konnte auch beim reifen neugeborenen Menschen hergestellt werden (Schubring *et al.*, 1999; Cetin *et al.*, 2000; Shekhawat *et al.*, 1998; Grisaru-Granovsky *et al.*, 2003; Bellone *et al.*, 2004; Schubring *et al.*, 1997; Ertl *et al.*, 1999; Hytinantti *et al.*, 1999; Stoll-Becker *et*

al., 2003; Tamura *et al.*, 1998). Diese Korrelation konnte am dritten postnatalen Tag jedoch nur noch bei den weiblichen Neugeborenen (Hytinantti *et al.*, 1999) und am 5. postnatalen Tag nicht mehr gezeigt werden (Bellone *et al.*, 2004). Der Veränderungen der Leptinspiegel zwischen der Geburt und dem 3. bzw. 5. Tag wurden jedoch nicht untersucht. Auch bei frühgeborenen Menschen, nicht jedoch bei Neugeborenen mit einem für ihr Gestationsalter zu niedrigem Gewicht und Größe („small for gestational age“= SGA), konnten Stoll-Becker *et al.* eine Korrelation hinsichtlich der Leptinkonzentration und des Körpergewichts zeigen (Stoll-Becker *et al.*, 2003). Die Untersuchungen von Grisaru-Granovsky *et al.* ergaben bei SGA-Neugeborenen keine Korrelation hinsichtlich des durch wenig Fett gekennzeichneten niedrigen Geburtsgewichts und der Leptinserumkonzentration, und es stellte sich die Frage, ob deren Leptinkonzentrationen eher durch die plazentare Leptinsekretion modifiziert sein könnte (Grisaru-Granovsky *et al.*, 2003). Ebenso zeigten Ehrhardt *et al.* beim Lamm, dass das Gewicht keinen Einfluss auf die Leptinkonzentration zur Geburt und zu späteren Zeitpunkten hatte (Ehrhardt *et al.*, 2003). Lämmer haben im Gegensatz zum gesunden humanen Neugeborenen eine deutlich geringere Fettmasse (1-3 % vs. ~ 16 %) (Bispham *et al.*, 2002; Alexander, 1978; Alexander, 1962b), so dass auch die nutzbaren Lipide und Energieträger beim humanen Säugling um das Zehnfache höher liegen als beim neugeborenen Lamm (5446 kJ/kg KG vs. 467 kJ/kg KG) (Mellor & Cockburn, 1986) und ein direkter Vergleich zwischen humanen und ovinen Neugeborenen nur unter Vorbehalt gezogen werden sollte. Diese Ergebnisse ließen ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen dem Körpergewicht und den Logarithmen der Leptinserumwerten innerhalb der ersten 24 Stunden erkennen. Die Leptinspiegel zeigten zudem starke Variationen bei den einzelnen Lämmern innerhalb der Gruppen und über die Zeit. Eine alleinige Abhängigkeit von der Fettmasse konnte diese Variationen nicht erklären, denn es wurde nur eine geringe Zunahme des Körpergewichts und somit der Fettmasse innerhalb der ersten 24 Stunden und diese auch nur in Gruppe A und B (6 % bzw. 2,6 %) beobachtet. Weitere Einflüsse, die auf die Leptinsekretion einwirken, sind daher wahrscheinlich.

Beziehung zwischen den Umgebungstemperaturen und den Gesamt-Leptinserumspiegeln

In den ersten Lebensstunden geschehen für die Lämmer wichtige Ereignisse, die durch den Beginn der Atmung, das erste Aufstehen, das die erste Nahrungsaufnahme ermöglicht, und die eigene Temperaturregulation geprägt sind. In Verlauf dieser ersten 24 Stunden stieg die Leptinkonzentration in dieser Untersuchung signifikant an ($p < 0,0001$). Ist das Leptin in diesem Konflikt Energieaufnahme und -speicherung versus Energieverbrauch, der nun wiederum Energieaufnahme erst ermöglicht, wesentlich beteiligt? Um dieser Fragestellung näher zu kommen, wurde die Umgebungstemperatur als wesentlicher Faktor der Einflussgröße „Energieverbrauch“ untersucht.

Die Lämmer der vier Gruppen wurden zu unterschiedlichen Außentemperaturbereichen geboren. Je niedriger die Außentemperatur ist, desto mehr verschiebt sich die Priorität der Energieverwendung in Richtung der Erhaltung der Körpertemperatur. Tatsächlich zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass allein die unterschiedlichen Umgebungstemperaturbereiche, welche die Gruppen definierten, einen signifikanten Einfluss auf das Leptin hatte ($p = 0,0044$) und die Gruppe in Wechselwirkung mit der Zeit als Wiederholungsfaktor ebenfalls die Leptinkonzentrationen sehr beeinflussten ($p = 0,0002$).

Die Körpertemperatur bei Säugetieren unterliegt einer hoch entwickelten Temperaturregulation. Interne und externe Einflüsse wirken auf die Körpertemperatur des homoiothermen Säugetieres ein, das daraufhin hemmende und stimulierende Aktivitäten in Bezug auf die Thermogenese und Wärmeabgabe zeigt. Somit bleiben bei konstanter Körpertemperatur die Wärmebildung durch Fettverbrennung und Muskelaktivität sowie die Wärmeabgabe durch Transpiration unter Einfluss der Umweltbedingungen (Umgebungstemperatur) über chemische und physikalische Mechanismen im Gleichgewicht. Daher hat eine Umgebungstemperatur (Stalltemperatur), die unterhalb der thermoneutralen Temperatur liegt, auf die Homoiothermie der neugeborenen Lämmer einen starken Einfluss. Bei allen Gruppen dieser Untersuchung lagen die Temperaturen unterhalb der Thermoneutralität, die bei Lämmern bei einer Umgebungstemperatur zwischen 28° bis 29°C herrscht (Alexander,

1962a; Eales & Small, 1980). Die thermoregulatorische Wärmebildung wird durch aktive Betätigung des Bewegungsapparats, durch unwillkürliche tonische oder rhythmische Muskelaktivität (Kältezittern) und Steigerung von Stoffwechselvorgängen (zitterfreie Wärmebildung) erreicht. Beim neugeborenen Säugetier ist die zitterfreie Wärmebildung wesentlich an der Thermogenese beteiligt. Das braune Fettgewebe (BAT = brown adipose tissue), das durch einen Reichtum von Mitochondrien und einer multiloculären Fettverteilung gekennzeichnet ist, stellt eine wesentliche Quelle der zitterfreien Wärmebildung dar (Cannon & Nedergaard, 2004). Dieses Gewebe liegt zum großen Teil zwischen den Scapulae und in der Axilla vor (Lindberg, 1970). Die zitterfreie Wärmebildung wird über das sympathische Nervensystem gesteuert. Eine pharmakologische Blockade des Sympathikus, aber auch adrenerge β -Blocker führen beim neugeborenen Meerschweinchen zur Aufhebung der zitterfreien Wärmebildung. Bei Kälte wird durch Noradrenalin (β -adrenerge Stimulation) die Lipolyse angeregt und ein intrazellulärer Anstieg der freien Fettsäuren bewirkt. Durch die β -Oxidation in den Mitochondrien wird dann die Wärmebildung angeregt. Die zitterfreie Wärmebildung wird auch hormonell z.B. durch Katecholamine, Schilddrüsenhormone und Kortison beeinflusst. Leptin dient auch als Indikator für die Menge der Energie-(Fett-)reserven und wird an verschiedenen Lokalisationen im ZNS unter Anderem im Hypothalamus an die Leptinrezeptoren gebunden. Dieses Signal wird an den Hirnstamm und an efferente Systeme z.B. an das sympathische und das parasympathische Nervensystem, wie German *et al.* zeigten (German *et al.*, 2009), weitergeleitet. In verschiedenen Studien steuerten diese zur Erhaltung der Energiebalance über die Regulation von Energieaufnahme und -verbrauch bei (Gautron & Elmquist, 2011; Jequier, 2002). Weitere Untersuchungen zeigten, dass über den Hypothalamus auch unter Beteiligung von Leptin die Gewichtszunahme ((Shi *et al.*, 2010; van de Wall *et al.*, 2008) und die dazugehörige Nahrungsaufnahme (Cottrell *et al.*, 2010) reguliert wurde. Eine erhöhte Thermogenese über die Mitochondrien konnte nach zentral appliziertem Leptin bei Schafen im Muskel sowie im Fettgewebe nachgewiesen werden (Henry *et al.*, 2011; Clarke & Henry, 2010; Henry *et al.*, 2008). Somit scheint eine Verringerung des Sättigungssignals Leptin mit der physiologischen Rolle des braunen Fettgewebes einher zu gehen, da sie anzeigt, dass eine vermehrte Futteraufnahme, aber auch eine Energiekonservierung bei vermehrter thermogenetischer Aktivität, erforderlich ist.

Es zeigte sich in dieser Untersuchung in allen Gruppen bei Geburt und nach 12 Stunden postnatal, dass die Stalltemperatur mit der Konzentration des Leptinserumwerts schwach signifikant positiv korrelierte. 24 Stunden postnatal zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,004$) zwischen Stalltemperatur und Leptin. Ebenfalls zeigte sich, dass ein hoher Temperaturunterschied zwischen der Körpertemperatur des Lammes und der Stalltemperatur niedrigere Leptinwerte zur Folge hatte (negative Korrelation) mit einer schwachen Signifikanz zur Stunde null und Stunde zwölf und einer Signifikanz 24 Stunden postnatal mit $p=0,005$.

Über die Rolle des Leptins im Konflikt zwischen Energiekonservierung und Thermogenese gibt es viele Untersuchungen, die zeigten, dass Leptin nicht nur im weißen, sondern auch im braunen Fettgewebe vorkam (Cinti *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 1997; Klingenspor *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1997d; Trayhurn *et al.*, 1997). Das braune Fettgewebe ist eine wichtige Quelle der zitterfreien Wärmebildung. Es zeigte sich bei Ratten und Mäusen, dass es bei kalten Außentemperaturen zu einer Suppression des Serumleptins und der ob-Gen mRNA im weißen und im braunen Fettgewebe im Vergleich zu einer thermoneutralen Umgebung kam (Moinat *et al.*, 1995; Puerta *et al.*, 2002; Hardie *et al.*, 1996; Trayhurn *et al.*, 1995a; Trayhurn *et al.*, 1995b; Zheng *et al.*, 1996). Diese Regulation bei Nagern war innerhalb von 2 bis 12 Stunden zu sehen (Hardie *et al.*, 1996; Trayhurn *et al.*, 1995a). Eine Suppression des Leptinspiegels um 22 % konnte beim erwachsenen Menschen bereits nach 60 bis 90 Minuten bei Wassertemperaturen von 18°C oder einer Lufttemperatur von 6°C nachgewiesen werden (Ricci *et al.*, 2000; Zeyl *et al.*, 2004). In vitro-Untersuchungen an humanen weißen Adipozyten konnten neben einer verminderten Leptinsekretion bei niedrigen Temperaturen jedoch keine Veränderung der ob-Gen mRNA Expression feststellen (Peino *et al.*, 2000). Asakuma *et al.* hatten auch bei erwachsenen Schafen unter Kälteexposition eine erniedrigte Sekretionsrate des Leptins nachgewiesen (Asakuma *et al.*, 2003), und bei neugeborenen Lämmern wurde eine Verminderung der Leptinspiegel innerhalb von 6 Stunden postnatal gefunden (Bispham *et al.*, 2002). Die vorliegenden Daten bestätigten den mutmaßlichen Zusammenhang zwischen der Stalltemperatur und den Leptinserumwerten bei neugeborenen Lämmern. Es zeigte sich sogar eine (schwach signifikante) Regulation bereits zur Geburt, was für eine sehr schnelle Inhibierung der Leptinsekretion spricht. Aber spätestens nach 24h darf man aufgrund der signifikanten

Korrelation davon ausgehen, dass das Leptin bei der Regulation der Wärmebildung bei Neugeborenen im ersten Lebenstag eine wichtige Rolle spielt.

Über die Ursachen und Folgen der Regulation des Leptins bei niedrigen Umgebungstemperaturen wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt: Mehrere Studien zeigten, dass Katecholamine und das sympathische Nervensystem (SNS) eine Suppression des Leptins bewirkten (Trayhurn *et al.*, 1995a; Scriba *et al.*, 2000). Garofalo *et al.* bewiesen, dass der Noradrenalinumsatz bei kalter Außentemperatur im weißen und im braunen Fettgewebe erhöht war und somit eine Aktivierung der sympathischen Aktivität stattfand (Garofalo *et al.*, 1996). Durch die Kälte (6°C über 24h) wurde wie auch nach Verabreichung von β 3-adrenergen Agonisten die mRNA des ob-Gens im braunen Fettgewebe vermindert (Moinat *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1997). Bei Frauen konnte nach einer Kälteexposition von 6°C über 90 min ein Anstieg der Norepinephrine um 500 % und eine Senkung des Leptinserumspiegels gemessen werden (Ricci *et al.*, 2000). Demgegenüber erhöhte Leptin seinerseits auch die sympathische Nervensystemaktivität in Bezug auf das BAT bei Nagern (Mark *et al.*, 2002). Diese Wirkung war wahrscheinlich zentralen Ursprungs, da es im Nucleus arcuatus und Nucleus ventromedialis des Hypothalamus unter Kälte bei Mäusen zu einer Induktion von Leptinrezeptoren mRNA kam (Mercer *et al.*, 1997). Leptininjektionen unter kalten Umgebungstemperaturen führten bei Ratten zu einer Verringerung des Fettgewebes. Unter thermoneutralen Temperaturen kam es trotz erhöhter Leptindosis zu keiner Erhöhung der metabolischen Rate. Das sprach dafür, dass Leptin eher den durch das SNS vermittelten Energieverbrauch desinhibierte als stimulierte (Harris *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1997). Interessanterweise führten nur Leptininjektionen bei Rattenneugeborenen unter Kälteexposition (23,5°C) zu einem erhöhten O₂ -Verbrauch und einem Anstieg der hypothermen Körpertemperatur (Blumberg *et al.*, 1999; Stehling *et al.*, 1997). Es schien daher, dass das Leptin beim neugeborenen Säugetier seinerseits das SNS aktivierte und damit die zitterfreie Wärmebildung durch das braune Fettgewebe stimulierte, die SNS-Aktivierung aber nun wiederum die Leptinexpression inhibierte. Daher übte Leptin eine retroregulatorische Inhibition seiner eigenen Expression über das SNS aus und trug zu einer konstanten Energiebalance bei (Schubring *et al.*, 2000). Blumberg *et al.* zeigten, dass auch das Leptin beim Neugeborenen bei niedrigen Außentemperaturen im Energiekonflikt

zwischen Energieverbrauch hinsichtlich der Thermogenese und der Energiekonservation und Körperisolation vermittelte (Blumberg *et al.*, 1999).

Beziehung zwischen den Körpertemperaturen und den Gesamt-Leptinserumspiegeln

Es konnte ein Einfluss der Außentemperatur auf den Leptinwert gezeigt werden, der die These der Funktion als Botschafter in Bezug auf die Energiebalance des Leptins unterstützt. Gibt es jedoch auch einen direkten Einfluss des Leptins auf die Körpertemperatur? Die Körpertemperatur wird bei homoiothermen Lebewesen konstant gehalten. Die Körpertemperatur war aber dann vom Sollwert different, wenn im Falle einer niedrigen Außentemperatur die Fettreserven entweder verbraucht waren oder zu Gunsten der Körperisolation und Energiekonservation eine Hypothermie in Kauf genommen wurde, wie verschiedene Untersuchungen belegten (Blumberg *et al.*, 1999; Stehling *et al.*, 1997). Unabhängig von der Außentemperatur konnte bei Nagetieren eine Erhöhung der Körpertemperatur durch eine Leptinsubstitution bereits nach einer Stunde gemessen werden (Luheshi *et al.*, 1999; Stehling *et al.*, 1996); bei Ratten stieg nach Gabe eines Antikörpers mit Leptin-agonistischen Eigenschaften die Körpertemperatur an (De Fanti *et al.*, 2002; Stehling *et al.*, 1996). Bei der ob/ob- Maus, der das bioaktive Leptin fehlt, ist die Körpertemperatur niedriger als bei der Wildtyp-Maus ohne Gendefekt, und es wurde nach einer Leptinsubstitution bei den ob/ob- Mäusen ein Körpertemperaturanstieg gemessen (Pellemounter *et al.*, 1995). Nach den vorliegenden Daten ergab sich eine signifikante Absenkung der Körpertemperatur nach der ersten Stunde postnatal und eine positive Korrelation mit dem Leptinwert ($p=0,031$). Danach ist die Beziehung zur Körpertemperatur nicht mehr signifikant und kehrt sich nach der 12. Stunde zu einer negativen Korrelation mit $p=0,015$ um. Zum Zeitpunkt 12 Stunden pn. liegt bei Gruppe A und B der Nadir der Körpertemperatur vor, während der Temperaturtiefpunkt in den anderen beiden Gruppen früher gewesen ist (1. und 6. Stunde). Die Körpertemperatur (rektal) eines Lamms liegt bei $38,5 - 40,5^{\circ}\text{C}$ und beim ausgewachsenen Schaf bei $38,5-39,5^{\circ}\text{C}$ (Behrens, 1987). Der signifikante postnatale Temperaturabfall auf mittlere $39,4$ bzw. $39,5^{\circ}\text{C}$ (Gruppe A-C) beim neonatalen Lamm lag somit im Normbereich. Trotzdem wurde ein Zusammenhang des Leptins mit den zirkadianen Temperaturschwankungen beim Menschen beschrieben (Simon *et al.*, 1998). Mit einer postnatalen Hypothermie war erst bei unterbleibender

Nahrungsaufnahme zu rechnen, die in der Untersuchung von Blumberg *et al.* durch eine Leptinsubstitution abgeschwächt werden konnte (Blumberg *et al.*, 1999). In diesen Untersuchungen fand die erste Nahrungsaufnahme durchschnittlich bereits eine Stunde nach Geburt statt. Die Leptinsubstitution unterstützte die erhöhte efferente sympathische Nervenaktivität zum braunen Fettgewebe und somit die erhöhte Thermogenese bei Ratten mit einer (künstlichen) Hypothermie von 30°C (Bispham *et al.*, 2002; Hausberg *et al.*, 2002; Friedman & Leibel, 1992). Mostyn *et al.* substituierten bei neugeborenen Lämmern den postnatal durch die möglicherweise fehlende plazentare Leptinsynthese abfallenden Leptinspiegel und fanden einen verminderten Körpertemperaturabfall bei Lämmern (Mostyn *et al.*, 2002). Die Ursachen des abfallenden Leptinspiegels standen im Zusammenhang mit der Außentemperatur unter der Geburt, die fehlende plazentare Leptinsynthese und die in der ersten Stunde fehlende Nahrungszufuhr. Die Wirkung des Leptins auf die Körpertemperatur konnte man mit einer regulatorischen Funktion in Hinsicht auf das sympathische Nervensystem so erklären, dass bei kälteren als thermoneutralen Temperaturen die Katecholamine zwar erhöht waren, dadurch jedoch die Leptinsynthese hemmte und es somit zu keiner weiteren Steigerung der zitterfreien Wärmeproduktion kam (Garofalo *et al.*, 1996; Mark *et al.*, 2002; Schubring *et al.*, 2000; Trayhurn *et al.*, 1995a). In der vorliegenden Untersuchung kam es nach den ersten Lebensstunden trotz weiterem Körpertemperaturrückgang zu einem Anstieg der Leptinsynthese, so ergab sich eine schwach signifikante negative Korrelation 12 Stunden postnatal zum Körpertemperaturtiefpunkt in Gruppe A und B. Die Körpertemperatur folgte somit nicht dem Leptin allein, es kamen andere Wirkmechanismen zum Zuge. Weitere Hormone, wie zum Beispiel die Schilddrüsenhormone, Kortison und Zytokine spielen in Bezug auf die Temperaturregulation im Zusammenhang mit den Katecholaminen eine Rolle (Clarke *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 1997; Greer *et al.*, 2009; O'Connor *et al.*, 2007). Zytokine (Interleukin-1, TNF- α), Katecholamine, Kortison und Schilddrüsenhormone wirkten ihrerseits in vielen Untersuchungen auf den Regulationskreislauf des Leptins ein (Miell *et al.*, 1996; Wabitsch *et al.*, 1996a; Yoshida *et al.*, 1997; Blum *et al.*, 1997b; Blum *et al.*, 1997c; Harris *et al.*, 1998; Trayhurn *et al.*, 1995a; Harris *et al.*, 1998). Zudem sind auch Faktoren ganz anderer Art denkbar: Unter der Geburt waren die Einflüsse des Futters und des Lichts kontrolliert, jedoch waren die Auswirkung der pränatalen Verhältnisse hinsichtlich des Weidegangs mit entsprechendem Nahrungsangebots sowie der jahreszeitlich spezifischen Sonnenstunden nicht

berücksichtigt. Clarke *et al.* konnte eine jahreszeitliche Veränderung hinsichtlich der Wirkung des Leptins bei ausgewachsenen Schafen feststellen (Clarke *et al.*, 2001). Bei Säugetieren mit einem Winterruhe- oder Winterschlafverhalten konnte sogar ein Zusammenhang zwischen den Sonnenstunden pro Tag und der Leptinserumkonzentration (Klingenspor *et al.*, 1996; Reidy & Weber, 2000), eine circadiane Leptinspiegelveränderung bei Schafen (Bertolucci *et al.*, 2005) und ein Zusammenhang zwischen Melatonin und Leptin festgestellt werden (Zieba *et al.*, 2007). Ob diese Art von Zusammenhang auch für neugeborene Lämmer gelten könnte, ist noch nicht berichtet worden. Möglicherweise ist der Anstieg der Leptinserumkonzentration auch durch eine positive Entwicklung von metabolischen Faktoren zu erklären, zu denen die hier untersuchten Blutfette Triglyceride und Cholesterin gehören.

Beziehung zwischen den Blutfett- und den Gesamt-Leptinserumkonzentrationen

Der Energieträger Triglycerid und das Cholesterin sind bei hohem Fettzellengehalt des Körpers und nach fettreichen Mahlzeiten im Blut erhöht. Die Leptinserumkonzentration ist proportional zum Index der Körpermasse (Bodymassindex = BMI) und somit ebenfalls von der Adipozytenanzahl abhängig. Die Korrelation zwischen erhöhten Blutfetten und einem erhöhten Leptinspiegel schien daher eher sekundärer Natur zu sein (Stamogiannou *et al.*, 1997; Piemonti *et al.*, 2003). Jedoch gab es in vitro-Untersuchungen, die auch den Verdacht einer direkten Wirkung des Leptins auf den Stoffwechsel der Blutfette (Triglyceride) zuließen (Auwerx & Staels, 1998; Tran *et al.*, 2003; Reidy & Weber, 2000; Ruige *et al.*, 1999). Zudem sank unter Leptingaben bei Mäusen der Cholesterin- und Triglyceridspiegel ab (Kalaivanisailaja *et al.*, 2003; Sarmiento *et al.*, 1997). Bisher gibt es keine Berichte über Untersuchungen zu den Blutfettwerten und ihre Konzentrationsveränderungen im Verhältnis zum gesamten Leptin bei neugeborenen Lämmern oder anderen neugeborenen Säugetieren. Leptin korrelierte bei Schafen postnatal positiv mit der Milchaufnahme und der Wachstumsgeschwindigkeit (Jaquiere *et al.*, 2011). Nach Kolostrumaufnahme stiegen die Plasmakonzentrationen der Triglyceride und parallel auch des Cholesterins bei Säugetieren stark an (Meyer & Kamphues, 1990; Haave & Innis, 1991). Das Kolostrum des Mutterschafs enthält im Vergleich zur reifen Schafmilch die doppelte Menge an Fett (Kolostrum: Fett 124 g/kg vs. reife Schafmilch: Fett 60 g/kg). Wie verhielt sich das

Leptin in diesem Zusammenhang in dieser Untersuchung? Die Blutfette Triglyceride und Gesamtcholesterin wurden zum Zeitpunkt der Geburt (0 h) und 12 h sowie 24 h postnatal bestimmt, wobei das totale und freie Cholesterin bei Lämmern identisch war (Carroll *et al.*, 1973). Die Korrelation zum Logarithmus des Leptins waren zur Geburt nicht signifikant mit $p > 0,5$. Es zeigten sich aber signifikante Entwicklungen zu den beiden späteren Zeitpunkten mit $p=0,029$ (12 h-Triglyceride) und $p<0,001$ (24 h-Triglyceride), sowie $p=0,001$ (12 h-Cholesterin) und $p=0,037$ (24 h-Cholesterin). Zusätzlich waren die Triglycerid- und Cholesterinwerte der Gruppe A insgesamt postnatal höher als die der Gruppe B und C (hoch signifikant mit $p<0,0001$). Somit war ein Zusammenhang zwischen den Gruppen, die durch die Umgebungstemperatur definiert sind, den Blutfettwerten und der Leptinwerte möglich. Die Kausalität der Leptinwertveränderungen ist nicht eindeutig geklärt. Einerseits hing die Leptinsekretionsrate und demzufolge auch die Serumkonzentration proportional von der totalen Adipozytenmasse ab (Reidy & Weber, 2000), wobei die Fettmasse bei neugeborenen Lämmer nur ca. 1.5 % (Alexander, 1978) ausmacht, andererseits ist Leptin auch dafür bekannt, den Lipidmetabolismus indirekt durch das ZNS und direkt am peripheren Gewebe zu regulieren. Leptin erhöhte die Lipolyse (Wang *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 1996; Siegrist-Kaiser *et al.*, 1997; Sarmiento *et al.*, 1997), die eine Auftrennung der Triglyceride des Speicherfetts in freie Fettsäuren mit einem verstärkten Fettsäurenabbau (β -Oxidation) zur Folge hatte. Weitere in vitro-Untersuchungen bestätigten eine verstärkte Lipolyse unter exogener Leptinsubstitution anhand von Zellen der ob/ob-Maus. Die Zellen der db/db-Maus, denen ein funktionsfähiger Leptinrezeptor fehlte, zeigten hingegen keine gesteigerte Lipolyse (Siegrist-Kaiser *et al.*, 1997; Fruhbeck *et al.*, 1997; Fruhbeck *et al.*, 1998), und es wurde daher auf die Existenz einer direkten Regulation auf zellulärer Ebene des Leptins auf den Lipidstoffwechsel ohne eine hypothalamische Wirkung geschlossen. Leptin hemmte die Expression der Acetyl-CoA-Carboxylase in Adipozyten (Bai *et al.*, 1996), daraus folgte eine verminderte Synthese langkettiger Fettsäuren und eine Abnahme der Konversion von Kohlenhydraten zu Fettsäuren mit einer verminderten Triglyceridspeicherung. Freie Fettsäuren, die durch die β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut wurden, hemmten ihrerseits die „Regelstelle“ der Fettsäuresynthese Acetyl-CoA-Carboxylase. Weitergehend konnte gezeigt werden, dass auch der nächste Schritt des Fettsäureaufbaus, die Expression der m-RNA des Multienzymkomplex Fettsäuresynthetase, durch Leptin gehemmt und die Synthese des Schlüsselenzyms der

Lipolyse durch Leptin gesteigert wurde (Wang *et al.*, 1999; Sarmiento *et al.*, 1997). Also stimulierte Leptin genauso wie die Katecholamine die Lipolyse, wobei die Katecholamine die ca. vierfache Wirkung zeigten (Siegrist-Kaiser *et al.*, 1997). Eine erhöhte Fettsäureoxidation mit einer Verminderung der Triglyceridgehalts intrazellulär konnte nach Leptingabe nachgewiesen werden (Auwerx & Staels, 1998; Tran *et al.*, 2003; Shimabukuro *et al.*, 1997). Zusätzlich fanden sich bei der Mausmutation *fa/fa* (Leptinrezeptormutation) eine 20-fach erhöhte Triglyceridkonzentration intrazellulär. Freie Fettsäuren hemmten intrazellulär wiederum die Leptin mRNA-Synthese (Deng *et al.*, 1997), so dass es zu einer negativen Rückkopplung bei einer durch Leptin ausgelösten Lipolyse kam. In vivo-Versuche über eine adenoviral induzierte Hyperleptinämie zeigten eine abnehmende Triglyceridkonzentration in Leber, Pankreas und Skelettmuskel (Shimabukuro *et al.*, 1997). Über die Wirkung des Leptins auf die Cholesterinbiosynthese wurden bisher keine in vitro-Untersuchungen durchgeführt. In vivo-Untersuchungen mit Leptinsubstitutionen ergaben bei Mäusen des Wildtyps und stark fetthaltiger Nahrung niedrigere Triglyceride und Cholesterin als ihre Kontrollgruppe. Dies sprach für eine gesteigerte Lipolyse und erhöhten Energieumsatz unter Leptinsubstitution (Kalaivanisailaja *et al.*, 2003), jedoch musste es auch zu einem unphysiologisch hohen Leptinserumspiegel bei einer Substitution von 230 µg/kg KG gekommen sein, die eine Beurteilung der Regulation unter physiologischen Bedingungen nur eingeschränkt zuließ. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass eine hohe physiologische Leptinkonzentration mit einem hohen Triglyceridspiegel und Cholesterinspiegel im Serum einhergeht. Eine Untersuchung bei hinsichtlich der BMIs vergleichbaren Gruppe von Frauen zeigte eine positive Korrelation zwischen Leptin, den Triglyceriden und dem Low Density Lipoprotein (LDL, Cholesterinanteil: 45 %) (Piemonti *et al.*, 2003). Eine Studie mit knapp 300 gesunden Schulkindern zeigte eine positive Korrelation zwischen Leptin und Triglyceriden und eine inverse Korrelation zwischen Leptin und High Density Lipoprotein (HDL, Cholesterinanteil: 18 %) (Kavazarakis *et al.*, 2001). Ostlund *et al.* konnten jedoch nach Anpassung an den Körperfettgehalt keine Korrelation zwischen Leptin und den Lipiden feststellen (Ostlund, Jr. *et al.*, 1996). Es ist daher nicht von einer verstärkten Lipolyse bei unsubstituiert hohen Leptinwerten in vivo auszugehen. Sobald jedoch im Falle einer katabolen Stoffwechselsituation (z.B. kalte Umgebungstemperaturen) eine erhöhte Lipolyse und β -Oxidation vorlag, kam es auch zu niedrigeren Triglyceridkonzentrationen und Leptinspiegeln (Klein *et al.*, 2000), denen niedrige

Insulinspiegel und erhöhte freie Fettsäuren vorausgingen (Dallman *et al.*, 1999). Der lipogenetische Effekt des Insulins wurde somit gemindert und Leptin steigerte diesen Effekt noch weiter durch eine Hemmung der Insulinbindung an die Adipozyten (Bai *et al.*, 1996; Bai *et al.*, 1996; Walder *et al.*, 1997). Durch eine verminderte Insulinkonzentration kam es jedoch zu einer negativen Rückkopplung auf die Leptinsekretion, und dieser Leptinabfall führte offensichtlich und sinnvollerweise nicht zu einer gehemmten Lipolyse und verminderten Fettsäureoxidation, ganz im Gegenteil. Inwiefern die Cholesterinkonzentration im Hinblick auf Katabolismus und erhöhte Lipolyse bei niedrigen Leptinwerten eine Rolle spielte, wurde nicht weiter untersucht. Bei leptinresistenten adipösen Mäusen kam es zwar zu signifikant höheren Plasmacholesterinwerten bei erhöhten Leptinserumwerten (Tran *et al.*, 2003), dieser Zusammenhang wurde jedoch als ein sekundärer Effekt bei einer vermehrten Fettmasse gewertet. Bei diesen Ergebnissen war jedoch nicht von einer angestiegenen Fettmasse der Lämmer nach bereits 12 Stunden auszugehen. Eine hohe Cholesterinaufnahme über das Kolostrum war natürlich gegeben, erklärte jedoch nicht die Gruppenunterschiede. Somit musste es noch weitere Hormone und Regulationsmechanismen geben, die bei neugeborenen Lämmern zu einer positiven Korrelation zwischen Triglyceriden, Cholesterin und Leptin führten und die in den Untersuchungen unter Leptinsubstitution und in vitro außer Acht gelassen wurden. Die bereits erwähnte Insulinregulation war ein solcher Mechanismus und hing direkt mit den Blutzuckerspiegeln zusammen.

Beziehung zwischen den Blutzucker- und den Gesamt-Leptinserumspiegeln

Hypoglykämien kommen beim neugeborenen Lamm wie auch bei anderen neugeborenen Tieren und Menschen häufig vor und können bei Progredienz zu starken Beeinträchtigungen des Organismus bis hin zum Tode führen. Die Glucosekonzentration im Blut ist die Folge konkurrierender Regulationsmechanismen, die das Dilemma zwischen Energiekonservierung und Energieverbrauch aufrechterhalten. Der Blutzuckerspiegel wird von diversen Hormonen, u.a. Insulin, Katecholamine, Glukagon und Glucokortikoide, reguliert und in mehreren Untersuchungen spielte Leptin in diesen Regulationskreisläufen eine wichtige Rolle (Barr *et al.*, 1997; Boden *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 2000; Wabitsch *et al.*, 1996b). Leptin wurde dabei für die Erhöhung des Energieverbrauchs verantwortlich

gemacht (Asakuma *et al.*, 2003; Houseknecht *et al.*, 1998). Zusätzlich wurde auch der direkte Zusammenhang zwischen Blutzucker und Leptin untersucht. Bei Mäusen bewirkten Glucoseinjektionen eine Erhöhung der Leptin mRNA (Mizuno *et al.*, 1996). Eine Inhibierung des Glucosetransports oder der Glycolyse in vitro ergab eine verminderte Leptinsekretion unabhängig von der Insulinkonzentration (Mueller *et al.*, 1998). Glucoseinjektionen bei Menschen bewirkten jedoch in der Untersuchung von Bauman *et al.* keine Leptinveränderungen im Serum (Bauman *et al.*, 1996) und auch bei humanen Neugeborenen konnte kein Zusammenhang zwischen den Blutzuckerwerten und dem Leptinserumspiegel gefunden werden (Schubring *et al.*, 1999). Bei Schafen wurden ebenfalls keine kurzfristigen Schwankungen des Leptinserumwerts nach Blutzuckerveränderungen innerhalb von zwei Stunden festgestellt, jedoch zeigten sich in diesen Untersuchungen auch keine Leptinveränderung nach Adrenalin- oder Insulininfusionen (Kauter *et al.*, 2000). Yuen *et al.* stellten hingegen (Yuen *et al.*, 2002) einen Zusammenhang zwischen dem Blutzucker trächtiger Mutterschafe und Leptin fest. Es konnte gezeigt werden, dass Leptin die hepatische Glucoseproduktion auch über zentrale Regulationsmechanismen modifizierte (Fujikawa *et al.*, 2010; German *et al.*, 2009; Kamohara *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010). Bei Mäusen mit der Mutation ob/ob kam es unter Leptingaben zu absinkenden Blutzucker- und Insulinkonzentrationen (Harris *et al.*, 1998) und bei Ratten vom Wildtyp wurde der Glucoseverbrauch unter Leptininfusionen im braunen Fettgewebe erhöht (Siegrist-Kaiser *et al.*, 1997), die Auswirkungen auf den Blutzucker wurden jedoch nicht untersucht. Während Kadokawa *et al.* postprandial vorübergehende erhöhte Leptinkonzentrationen maßen, die unter Glucoseinfusion auch nicht rückläufig waren (Kadokawa *et al.*, 2003), wiesen andere diesen Zusammenhang zwischen kohlenhydrathaltiger Ernährung und Leptin nicht nach (Ostlund, Jr. *et al.*, 1996) oder fanden gar eine negative Korrelation zwischen Nahrungsaufnahme und Leptinserumspiegeln (Sinha *et al.*, 1996a), wobei es hierzu widersprüchliche Untersuchungen gab (Altmann *et al.*, 2006). Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass durch zentral oder peripher appliziertes Leptin die Futteraufnahme reduziert war (Flynn *et al.*, 1998; Licinio *et al.*, 2007; Wetzler *et al.*, 2005). Bei Kindern mit unterschiedlichen Essverhalten konnten aber keine signifikanten Unterschiede der Leptinkonzentration gesehen werden (Wudy *et al.*, 2005). Bei Kindern mit Typ 1 Diabetes zeigten sich nach der Insulintherapie keine Korrelation zwischen Blutzucker und Leptin (Kiess *et al.*, 1998a). Nach Fasten mit konsekutiv niedrigen Blutzuckerspiegeln sanken jedoch auch die Leptinserumspiegel (Ostlund, Jr. *et al.*,

1996; Altmann *et al.*, 2006) und Yuen *et al.* zeigten, dass starke Hypoglykämien auch die Leptinsekretion supprimierten (Yuen *et al.*, 2002). In dieser Untersuchung wurden alle Lämmer der verschiedenen Gruppen mit einer Hypoglykämie geboren, ohne dass eine signifikante Korrelation zu dem unmittelbar postnatalen Leptinserumspiegel bestand. Es war also zu untersuchen, ob es Mechanismen gab, die den Blutzucker und das Leptin regulierten. Insulin wurde wie Glukagon bereits von fetalen Lämmern im dritten Trimester der Trächtigkeit produziert (Philipps *et al.*, 1985). Nach der Geburt kam es zu einem Abfall der Insulinkonzentration und zu einer starken Glukagonausschüttung (Slebodzinski, 1994). Eine direkte Reaktion des Glukagons auf die Leptinsekretion oder vice versa konnte bisher nicht gezeigt werden (Asakuma *et al.*, 2003; Kauter *et al.*, 2000; Fehmann & Göke, 1997; Yuen *et al.*, 2002). Die Wechselwirkungen von Insulin und Leptin wurden vielfach untersucht. Insulin stimulierte die Lipid-, Fettsäure- und Glykogensynthese, hemmte dagegen die Lipolyse, Gluconeogenese und Glykogenolyse und senkte den Blutzucker. Der Blutzucker regulierte seinerseits die Insulinsekretion. Insulin stimulierte die Leptinsekretion beim Schaf (Asakuma *et al.*, 2003), beim Nagetier (Saladin *et al.*, 1995) und beim Menschen (Clapham *et al.*, 1997; Malmstrom *et al.*, 1996). Somit konnte es durch steigende Blutzucker- und konsekutiv steigende Insulinspiegel zu einem erhöhten Leptinserumspiegel gekommen sein. Ein Zusammenhang zwischen Insulin- und Leptinserumspiegel beim neugeborenen Menschen in den ersten Lebensstunden konnte jedoch nicht gezeigt werden (Schubring *et al.*, 1999). Durch niedrige Insulinkonzentrationen sank Leptin, wobei Leptin seinerseits auch bei hohen Glucosekonzentrationen eine Hemmung der Insulinsekretion bewirkte (Fehmann & Göke, 1997; Ramsay *et al.*, 2004; Emilsson *et al.*, 1997). Eine Leptinsubstitution bei Schafen ergab ebenfalls eine Insulinsuppression (Celi *et al.*, 2003), die bei niedrigen Glucosekonzentrationen in vitro oder nach Fasten in vivo beim Schaf aufgehoben wurde (Fehmann & Göke, 1997). In dieser Untersuchung ergab sich eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen der Höhe des Blutzuckers und dem Logarithmus des Serumleptins 6 Stunden postnatal. Zu allen anderen Zeitpunkten war jedoch keine Signifikanz erkennbar. Somit kam es bei der beobachteten postnatalen Hypoglykämie nicht zu konsekutiv niedrigen Leptinspiegeln, sondern zu keiner direkten Regulation. Möglicherweise war beim neugeborenen Lamm die Wirkung des geringen Blutzuckers über das Insulin auf das Leptin entkoppelt. Zudem wurde die insulinogene Leptinsekretion durch subthermoneutrale Temperaturen, die bei den neugeborenen

Lämmern herrschten, gehemmt (Asakuma *et al.*, 2003), wobei nicht die Wirkung des Insulins auf das Leptin gestört wurde (Hardie *et al.*, 1996). Vielmehr kam es bei Kälte zu einem bis zu 65 % abfallenden Insulinspiegel (Eales & Small, 1986) und so zu einer Hemmung der Lipogenese mit steigendem Energieverbrauch und Wärmebildung. Zusätzlich steigerte Leptin die Inhibierung der Lipogenese noch durch eine Hemmung der Insulinbindung an den Adipozyten (Bai *et al.*, 1996; Bai *et al.*, 1996; Walder *et al.*, 1997). Andere Wissenschaftler fanden jedoch eine unter Kälte verstärkte Insulin-induzierte Glucoseverwertung (Sano *et al.*, 1992). Somit war ein direkter Zusammenhang zwischen Blutzucker und Leptin in einer hypoglykämischen Stoffwechselsituation noch dazu bei ungünstigen Umgebungstemperaturen unwahrscheinlich und nur unter Vorbehalt mit anderen Untersuchungen unter ausgeglichenen Verhältnissen zu vergleichen. Warum die hochsignifikante Korrelation des Blutzucker- und des Leptinserumspiegels zur 6. Stunde nicht auch zu den folgenden 6 bzw. 18 Stunden nachgewiesen werden konnte, lag möglicherweise an den vielfältigen Wechselwirkungen des hier isoliert betrachteten Zusammenhangs zwischen dem Blutzucker und dem Leptin in einem komplexen Organismus. Auch konnte eine möglicherweise vorliegende Latenzzeit eines Regulationsmechanismus' eine vorhandene Korrelation verschleiern.

Beziehung zwischen den β -Hydroxybutyrat- und den Gesamt-Leptinserumkonzentrationen

In Zeiten einer Energieknappheit und Hypoglykämien, die bei neugeborenen Lämmern vorliegen kann, kommt es zu einer alternativen Bereitstellung von Energie. Diese wird in Form von Ketonkörpern, zu denen das β -Hydroxybutyrat gehört, durch die β -Oxidation der Fettsäuren in den Lebermitochondrien gewonnen. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Konzentration des β -Hydroxybutyrats bei den Gruppen B-D signifikant über die Zeit anstieg, während sie bei der Gruppe A unverändert blieb. Da ein niedriger Leptinspiegel in Bezug auf den Energiehaushalt in verschiedenen Untersuchungen für eine Knappheit der Ressourcen sprach, war hier ein direkter negativer Zusammenhang möglich (Asakuma *et al.*, 2003; Houseknecht *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1994; Sinha, 1997; Campfield *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1995; Saladin *et al.*, 1995; Blum *et al.*, 1997c; Blum *et al.*, 1997b). Über neugeborene Säugetiere sind

bisher keine Untersuchungen in dieser Richtung publiziert worden. Diese Untersuchungen zeigten zum Zeitpunkt 12 Stunden postnatal eine signifikante negative Korrelation zwischen β -Hydroxybutyrat und lg Leptin mit $p=0,003$, die zur 24. Stunde postnatal sogar auf ein Signifikanzniveau von $p<0,001$ anstiegen. Zum Zeitpunkt der Geburt ergab sich kein signifikanter Zusammenhang. Unter Kälte konnte auch bei Ratten eine erhöhte hepatische mitochondriale oxidative Kapazität festgestellt werden, der ebenfalls mit einem Abfall des Serumleptinspiegels einherging (Iossa *et al.*, 2001). Auch Shimabukuro *et al.* zeigten einen Zusammenhang zwischen Leptin und β -Hydroxybutyrat, da unter Leptinsubstitution die β -Hydroxybutyratspiegel abnahmen (Shimabukuro *et al.*, 1997). Flück *et al.* konnten jedoch bei Kindern mit Manifestation eines Typ-1 Diabetes mit und ohne Ketoazidose keine Unterschiede der Leptinsekretion feststellen (Fluck *et al.*, 1999) und auch eine Ketonkörperinfusion *in vivo* ergab keine Leptinspiegelveränderungen (Kolaczynski *et al.*, 1996).

Dennoch schien erstmals bei neugeborenen Lämmern ein niedriger Leptinserumspiegel ein Zeichen dafür zu sein, dass der Organismus in einem Glucosemangelzustand war und seine Energie über Fettsäureoxidation gewinnen musste. Über die Regulation dieser Effekt wurde bisher nicht berichtet. Möglich wäre eine dem Insulin ähnliche Hemmung der Ketogenese.

Ausblick

In dieser Arbeit konnte die Funktion der Summe aus gebundenem und freiem Leptin beim neugeborenen Lamm beleuchtet werden und somit einen Teil zur Aufklärung der komplexen Zusammenhänge des Stoffwechsels beitragen. Inwiefern diese Ergebnisse auf den humanen Neugeborenen als Nesthocker übertragbar sind und in welcher Hinsicht die Differenz zwischen gebundenem und freiem Leptin beim neugeborenen Säugetier für die Funktion des Leptins eine Rolle spielt, bleibt derzeit ungeklärt. Wichtig wären weitere Untersuchungen der Leptinregulation besonders im Hinblick auf die erhöhte neonatale Sterblichkeit bei Lämmern in Folge einer Hypothermie und Hypoglykämie, die auch bei humanen Neugeborenen häufig sind und therapeutische Interventionen bedürfen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG *

Diese Untersuchung galt der Entwicklung eines spezifischen Radioimmunoassays (RIA) zur Bestimmung des (Gesamt)-Schafserumleptins und Betrachtung dessen physiologischen Zusammenhänge. Der verwendete Antikörper richtete sich gegen die Partialsequenz des Schafleptins der Aminosäuren 31-44. Der spezifische Tracer und die Standardreihe wurden durch rekombinantes Schafleptin hergestellt. Die Testdurchführung beinhaltete die Abtrennung von Bindungsproteinen und die Denaturierung des Serumleptins mit 0,04 mM DTT (Dithiothreitol), 0,001 % SDS (Natriumdodecylsulfat), 0,001 mM EDTA in einem Tris-HCl Puffer (pH 8) sowie die Erhitzung der Serumproben auf 90°C über 7 Minuten. Die Empfindlichkeit (Sensitivität) des RIAs lag bei 0,4 µg/l. Die Interassayvarianz konnte durchschnittlich mit 2,5% ermittelt werden, die Parallelitätsbestimmung (Intraassayvarianz) ergab eine mittlere Standardabweichung von 5,1 %. Die Spezifität lag bei 84%.

Leptin wurde bei neugeborenen Lämmern zu sechs verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von 24 Stunden bestimmt. Es ergaben sich deutlich höhere Leptinkonzentrationen im Vergleich zu den bisher berichteten Werten und innerhalb von 24 Stunden signifikant ansteigende Konzentrationen. Der Organismus des Lamms war somit in der frühen neonatalen Periode in der Lage, Leptin unabhängig von der Plazenta zu sezernieren und die Leptinserumkonzentration zu modifizieren. Desweiteren wurde neben Leptin auch folgenden Parameter erhoben und die Beziehung zum Leptin untersucht: Geschlecht, Wurfgröße, Körpergewicht, Umgebungs- und Körpertemperatur und die Stoffwechselfparameter: Triglycerid-, Cholesterin-, Blutzucker- und β -Hydroxybutyratkonzentrationen im Serum.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gemessenen Leptinspiegeldifferenzen nicht vom Körpergewicht bzw. von der Fettzunahme abhängig waren. Auch war eine Abhängigkeit weder in Bezug auf das Geschlecht noch auf die Wurfgröße zu belegen. Die 74 Lämmer konnten aufgrund der Außentemperatur in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden, deren Leptinserumspiegel sich signifikant voneinander unterschieden. Der Einfluss der Stalltemperatur ließ sich ebenfalls direkt am Leptinspiegel unabhängig

(*Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht unter: Schilling *et al.*, 2015, Ausdruck s. Anhang)

von der Gruppeneinteilung in der Korrelationsanalyse zeigen, und auch die Körpertemperatur als Konsequenz aus Umwelttemperatur und Thermogenese zeigte eine Korrelation zu den Serumleptinspiegeln. Daraus kann man auf eine Funktion des Leptins hinsichtlich der Thermoregulation bereits im frühen Neugeborenenalter schließen. Des Weiteren konnte diese Arbeit einen Zusammenhang zwischen den Leptinserumspiegeln und den Blutfetten Triglyceriden und Cholesterin aufzeigen, deren Konzentrationen ebenfalls eine Gruppenabhängigkeit aufwiesen. Erhöhte Serumtriglyceride stellen Energiespeicher dar, die erst durch einen hochregulierten (Gesamt)-Leptinspiegel für die β -Oxidation zur Energiegewinnung zur Verfügung stehen. Auch diese intakte Regulation konnte hiermit im frühen Alter bei neugeborenen Lämmern verdeutlicht werden. Ein weiterer lebenswichtiger Energieträger ist der Blutzucker. Eine direkte Regulation durch das Leptin ist durchaus denkbar, eine indirekte Regulation über Hormone wie das Insulin bereits bewiesen. Es zeigte sich beim Lamm eine signifikante positive Korrelation sechs Stunden postnatal. Wegen der Komplexität der Blutzuckerregulation konnte aber der Einfluss des Leptins zu allen anderen Zeitpunkten nicht verdeutlicht werden. Besonders die Stressregulation einer Hypoglykämie bei subthermoneutralen Temperaturen, die bei vielen der Lämmer postnatal vorlag, erfordert einen akuten nervös-hormonalen Synergismus mit einer höchstens modifizierenden Funktion des Leptins. Ein weiterer für die Notfallenergieversorgung wichtiger Träger ist das β -Hydroxybutyrat, das ein Zeichen für einen Energiemangel darstellt und proportional dazu ansteigt. Bisher wurden nur wenige Untersuchungen hinsichtlich eines Zusammenhangs zum Leptin durchgeführt, aber die Hypothese über eine negative Korrelation zwischen der Leptin- und der β -Hydroxybutyratkonzentration bestätigte sich zu den beiden gemessenen Zeitpunkten 12 und 24 Stunde postnatal.

ABSTRACT

In this study a specific leptin radioimmunoassay (RIA) was established and we investigated the changes of serum leptin in the newborn lamb and possible physiological associations. An antiserum (rabbit) produced against a partial sequence of ovine leptin (31-44) was used. A specific tracer and standards were prepared with recombinant ovine leptin (DSL-Sinsheim). Before measurement, serum samples were denatured in a Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.04 mM dithiothreitol (DTT), 0.001 mM EDTA, and 0.001 % sodium dodecylsulfate (SDS). To dissociate leptin from leptin-binding protein and to unfold it, samples were heated to 90°C for 7 minutes. The sensitivity of the assay was 0.4 µg/L, specificity was 84%, intra- and interassay coefficients of variation were 5.1 % and 2.5 % respectively.

Leptin was measured from 74 newborn lambs at six different times up to 24 hours postnatally. In comparison to other studies the measured values of leptin were higher. The change in log (leptin) during the first 24 h was highly significant ($p < 0.0001$). We conclude that total leptin is regulated already in the very early postnatal phase. Furthermore other parameters were measured using standard methods: the number of the litter, sex, bodyweight, environmental and body temperature, serum lipids, blood glucose and 3-β-hydroxy-butyric acid.

It was shown that leptin values did not depend on the bodyweight or the increase in weight. Neither was the sex or the number of the litter a determining factor concerning the leptin values. Due to the environmental temperature the 74 lambs were distributed into four different groups which showed significant differences in regard to the leptin values. The influence of the environmental temperature also without the grouping and the body temperature on the leptin values could be shown in the analysis of correlation. Consequently a function of leptin regarding the regulation of body temperature and therefore energy expenditure may be present even in the early neonatal period. Furthermore a relationship between leptin and serum lipids (triglycerides and cholesterol) was identified which showed that the regulation between triglycerides as an energy storage and leptin as a modulator of energy expenditure is present in newborn

lambs. Another important energy source is blood glucose. A regulation directly via leptin is possible, an indirect pathway involving insulin is already proved. In this study a significant correlation six hours after birth between blood glucose and leptin was shown. Due

to the complexity of the regulation of bloodglucose an influence of leptin on the blood glucose could not be illustrated at all the other points in time. Especcially the need of immediate regulation in case of hypoglycaemia at low temperatures requires acute nerval and hormonal interactions. Leptin probably only has at the most a modifying role in this circuit. Another important carrier of energy in case of emergency referring to an organism is 3- β -hydroxy-butyric acid. It indicates a lack of energy and rises proportional. So far only a few studies investigated it's relation to leptin but the hypothesis of a negativ correlation between them was confirmed in this study at 12 and 24 hours after birth.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.Ak	1. Antikörper
2.Ak	2. Antikörper
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
B0	totale Bindungskapazität
BAT	braunes Fettgewebe (<u>b</u> rown <u>a</u> dipose <u>t</u> issue)
Bq	Bequerel
BSA	Bovines Serumalbumin
Ci	Curie
cpm	counts per minute (Zähleinheiten pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
DSE	Denaturierungslösung (Kapitel III.3.1.)
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat
GG	Geburtsgewicht
IgG	Immunglobulin G
IU	Internationale Einheit
KG	Körpergewicht
kD	kilo Dalton
M	molar
MW	Mittelwert
NSB	unspezifische Bindung (<u>n</u> on <u>s</u> pecific <u>b</u> inding)
o-ob	ovines Leptin
p	Signifikanz (<u>p</u> robability)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung
pI	isoelektrischer Punkt
pn.	Postnatal
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur (20°C)
SDS	Natriumdodecylsulfat

SNS	sympathisches Nervensystem
ZNS	zentrales Nervensystem

Maßeinheiten

g	Gramm
k	kilo (1×10^3)
kg	kilogramm
l	Liter
M	mega (1×10^6)
m	milli (1×10^{-3})
n	nano (1×10^{-9})
μ	micro (1×10^{-6})
p	pico (1×10^{-12})

Abkürzungen d. Aminosäuren

Alanin	A	Serin	S
Arginin	R	Threonin	T
Asparagin	N	Tryptophan	W
Asparaginsäure	D	Tyrosin	Y
Cystein	C	Valin	V
Glutamin	Q		
Glutaminsäure	E		
Glycin	G		
Histidin	H		
Isoleucin	I		
Leucin	L		
Lysin	K		
Methionin	M		
Phenylalanin	F		
Prolin	P		

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS (chronologisch)

Abbildung I.1. links: Maus mit Mutation ob/ob, rechts: Wildtyp Maus

Mit dem fünffachen Gewicht im Vergleich zur Schwester (rechts) fehlt der adipösen Maus (links) das Gen für das Protein Leptin (ob)

aus: www.hhmi.org/genesweshare/d130.html, Bilder mit freundlicher Genehmigung von Kay Chernush

Abbildung I.2. Modell der 3-D (Tertiär-)Struktur des Leptins; das rote Band stellt die Aminosäuresequenz dar mit Bildung der Sekundär- und Tertiärstruktur. Die hellbraunen Stäbchen verdeutlichen die vier α -Helices der Sekundärstruktur; Eigens erstelltes Modell in Anlehnung an Zhang et al. (Zhang *et al.*, 1997) und The National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Tabelle I.4. positive und negative Einflüsse auf die Konzentration des Serumleptins

Abbildung III.3.2.a) Austestung des 1.Ak B1: 61., 90. und 120.Tag

Abbildung III.3.2.b) Tracerverdrängung durch die Standards (40 ng/ml-0,313 ng/ml, B/B0) bei der Testung des 1.Ak A1, 120.Tag, Verdünnung 1:3000

Abbildung III.3.2.c) Tracerverdrängung durch die Standards (40 ng/ml-0,313 ng/ml, B/B0) bei der Testung des 1.Ak B1, 90.Tag, Verdünnung 1:1000

Abbildung III.3.2.d) Bestimmung des pH Optimums des 1. Antikörper B1 90. Tag, Verdünnung 1:1000 (+150 μ g Kaninchen- γ -Globulin/ml)

Abbildung III.3.2.e) Optimierung der Inkubationszeiten und der Inkubationstemperatur bei gleichem Auftragungszeitpunkt des 1.Antikörpers und des Tracers

Abbildung III.3.2.f) Kalte Vorinkubation (KV) bei 20°C über 24 h, Tracerinkubationszeit 2-4 h bei 4°C und 20°C.

Abbildung III.3.2.g) Vergleich der Sensitivität bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und -temperaturen des Tracers nach einer kalten Vorinkubation des 1.Ak von 24 h bei 20°C

Abbildung III.4.3. Western-Blot: Proben von links nach rechts: Marker, Hammelserum (10 µl, c=40 ng/ml), Lösung aus Hammelserum und oob-Standard (1:2), oob-Standard (5 µl, c=10 µg/ml), Lösung aus Marker und Hammelserum (5 µl)

Abbildung III.4.4. 50 ng/5 µl oob Standard mit Bildung mehrerer Banden (unterste und erste Bande 16 kD, zweite Bande von unten ca. 32 kD, dritte Bande von unten ca. 48 kD, weitere Banden zwischen 60 und 80 kD)

Abbildung III.4.5. Darstellung der Verschiebung der Banden (Shift Effekt) nach Zugabe der Hammelserumprobe (Ausschnitt aus der Abb. III.4.3)

Tabelle IV.1.a) Anzahl der Leptinbestimmungen zu den sechs Zeitpunkten

Tabelle IV.1.b) Leptinkonzentrationen in µg/l aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min), Maximum (max), Median, unteres und oberes Quartil (Q .25; Q .75)

Abbildung IV.1.a) Mediane und Quartile zur Darstellung des Streuungsmaßes der Leptinkonzentrationen in µg/l aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten

Tabelle IV.1.c) Logarithmen der Leptinkonzentrationen aller Bestimmungen zu den sechs Zeitpunkten Leptinkonzentrationen mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

Abbildung IV.1.b) Mittelwerte der lg Leptinkonzentrationen mit Standardfehler (Std.f.) zu den sechs Zeitpunkten

Tabelle IV.1.d) Logarithmen der Leptinkonzentrationen der vier Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max), zur Veranschaulichung wurde der entlogarithmierte Mittelwert der Leptinkonzentration hinzugefügt (entlogMW)

Abbildung IV.1.c) Mittelwert und Standardfehler der lg Leptinkonzentrationen der vier Gruppen zu den sechs Zeitpunkten

Tabelle IV.2.a) Verteilung der Geschlechter in den vier Gruppen (A bis D)

Tabelle IV.2.b) Verteilung der Rassenzugehörigkeit in den vier Gruppen

Tabelle IV.3.a) Körpergewicht der Lämmer zu den Zeitpunkten 0, 12 und 24 Stunden postnatal mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

Tabelle IV.3.b) Lg Leptinkonzentrationen der Lämmer zu den Zeitpunkten 0, 12 und 24 Stunden postnatal mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

Abbildung IV.3.a) Mittelwerte und Standardfehler (Std.f.) der lg Leptinkonzentrationen im Verhältnis zu den Mittelwerten des Körpergewichts aller Lämmer zu den drei Zeitpunkten

Tabelle IV.3.c) Mittelwerte der Körpergewichte und Lg Leptinkonzentrationen mit Angabe der Standardabweichungen (SD) und Standardfehler (Std.f.)

Abbildung IV.3.b) Mittelwerte der Körpergewichte (KG) und lg Leptinkonzentrationen der vier Gruppen zu jeweils 3 Zeitpunkten (s. Tabelle IV.3.c)

Tabelle IV.4.a) Umgebungstemperatur der Lämmer zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (T min) und Maximum (T max)

Tabelle IV.4.b) Analyse der Korrelation der Umgebungstemperaturen mit den lg Leptinspiegeln aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

Abbildung IV.4.a) Darstellung der Korrelation zwischen der Umgebungstemperatur (Stalltemperatur) und den lg Leptinkonzentrationen sowie der Mittelwerte und Standardfehler (Lg Leptin) zum Zeitpunkt 24 h pn und Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden

Abbildung IV.4.b) Darstellung der Korrelation und der Regressionsgerade zwischen der Umgebungstemperatur (Stalltemperatur) und den lg Leptinkonzentrationen als Streudiagramm zum Zeitpunkt 24 h pn

Tabelle IV.5.a) Körpertemperatur der Lämmer der vier Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (T min) und Maximum (T max)

Abbildung IV.5.a) Mittelwert der Körpertemperatur aller Lämmer zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Abbildung IV.5.a) Mittelwert der Körpertemperatur aller Lämmer zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Abbildung IV.5.c) Darstellung der Korrelation zwischen der Körpertemperatur und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 12h pn mit Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden

Tabelle IV.5.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der Körpertemperaturen aller Gruppen zu den 6 Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

Tabelle IV.6.a) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der Differenz aus Körper- und Umgebungstemperatur aller Gruppen zu den 6 Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

Tabelle IV.6.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der Differenz aus Körper- und Umgebungstemperatur aller Gruppen mit Angabe der Gleichungen der Regressionslinien der sechs Zeitpunkte

Abbildung IV.6.a) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der Differenz aus Körper- und Umgebungstemperatur aller Gruppen mit Darstellung der Geraden der Regressionsgleichungen der sechs Zeitpunkte

Abbildung IV.7.a) Mittelwerte der Triglyceridwerte in mmol/l aller Lämmer zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Tabelle IV.7.a) Triglyceridwerte in mmol/l der vier Gruppen zu drei Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

Abbildung IV.7.b) Mittelwerte der Triglyceridwerte in mmol/l der vier Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Tabelle IV.7.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der lg Triglyceridwerte aller Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

Abbildung IV.7.c) Korrelationsanalyse zwischen den lg Triglyceridwerten und den lg Leptinkonzentrationen unter Angabe der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 24 h pn. und der Gleichung der Regressionsgeraden

Abbildung IV.7.d) Darstellung der Korrelation und der Regressionsgerade zwischen den lg Triglyceridwerten und den lg Leptinkonzentrationen als Streudiagramm zum Zeitpunkt 24 h pn

Abbildung IV.8.a) Mittelwerte der Cholesterinwerte in mmol/l aller Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Tabelle IV.8.a) Cholesterinwerte in mmol/l der vier Gruppen zu drei Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

Abbildung IV.8.b) Mittelwerte der Cholesterinwerte in mmol/l der vier Gruppen A-D zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Tabelle IV.8.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der lg Cholesterinwerte aller Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

Abbildung IV.8.c) Korrelationsanalyse zwischen den Cholesterinwerten und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 12 h pn. und Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden

Abbildung IV.8.d) Darstellung der Korrelation und der Regressionsgerade zwischen den Cholesterinwerten und den lg Leptinkonzentrationen als Streudiagramm zum Zeitpunkt 12 h pn

Abbildung IV.9.a) Mittelwerte der Blutzuckerwerte in mmol/l aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Tabelle IV.9.a) Blutglucosewerte in mmol/l der vier Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

Abbildung IV.9.b) Mittelwerte der Blutglucosewerte in mmol/l der vier Gruppen A-D zu den 6 Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Tabelle IV.9.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der Blutzuckerwerte aller Gruppen zu den sechs Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

Abbildung IV.9.c) Korrelationsanalyse zwischen den Blutzuckerwerten und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 6 h pn. und der Gleichung der Regressionsgeraden

Abbildung IV.9.d) Darstellung der Korrelation und der Regressionsgerade zwischen den Blutzuckerwerten (mg/dl) und den lg Leptinkonzentrationen als Streudiagramm zum Zeitpunkt 6 h pn

Abbildung IV.10.a) Mittelwerte der β -Hydroxybutyratkonzentrationen in mmol/l aller Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Tabelle IV.10.a) β -Hydroxybutyratwerte in mmol/l der vier Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (Std.f.), Minimum (min) und Maximum (max)

Abbildung: IV.10.b) Mittelwerte der β -Hydroxybutyratwerte in mmol/l der vier Gruppen A-D zu den 3 Zeitpunkten mit Angabe des Standardfehlers

Tabelle IV.10.b) Korrelationsanalyse der lg Leptinspiegel und der lg β -Hydroxybutyratwerte aller Gruppen zu den drei Zeitpunkten mit Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p)

Abbildung IV.10.c) Korrelationsanalyse zwischen den lg β -Hydroxybutyratwerte und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 12 h pn. und der Gleichung der Regressionsgeraden

Abbildung IV.10.d) Korrelationsanalyse zwischen den lg β -Hydroxybutyratwerte und den lg Leptinkonzentrationen mit Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler (lg Leptin) zum Zeitpunkt 24 h pn. und der Gleichung der Regressionsgeraden

Abbildung IV.10.e) Darstellung der Korrelation und der Regressionsgerade zwischen den lg β -Hydroxybutyratwerte und den lg Leptinkonzentrationen als Streudiagramm zum Zeitpunkt 24 h pn

LITERATURVERZEICHNIS

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* **382**: 250-252.

Alexander G. Temperature regulation in the newborn lamb III. Australian Journal of Agricultural Research 12, 1152-1174. 1962a.
Ref Type: Journal (Full)

Alexander G. Temperature regulation in the newborn lamb IV. Australian Journal of Agricultural Research 13, 82-99. 1962b.
Ref Type: Journal (Full)

Alexander G. 1978. Quantitative development of adipose tissue in foetal sheep. *Aust.J.Biol.Sci.* **31**: 489-503.

Altmann M, Sauerwein H, von Borell E. 2006. The relationships between leptin concentrations and body fat reserves in lambs are reduced by short-term fasting. *J.Anim Physiol Anim Nutr.(Berl)* **90**: 407-413.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.

Asakuma S, Morishita H, Sugino T, Kurose Y, Kobayashi S, Terashima Y. 2003. Circulating leptin response to feeding and exogenous infusion of insulin in sheep exposed to thermoneutral and cold environments. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* **134**: 329-335.

Auwerx J, Staels B. 1998. Leptin. *Lancet* **351**: 737-742.

Bai Y, Zhang S, Kim KS, Lee JK, Kim KH. 1996. Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J.Biol.Chem.* **271**: 13939-13942.

Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW. 1997. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* **138**: 4463-4472.

Bauman WA, Spungen AM, Zhong YG, Mobbs CV. 1996. Plasma leptin is directly related to body adiposity in subjects with spinal cord injury. *Horm.Metab Res.* **28**: 732-736.

Behrens H. 1987. *Lehrbuch der Schafkrankheiten*. In: Behrens H (ed). Berlin und Hamburg: Parey, 3. Auflage (1987)

Bellone S, Rapa A, Petri A, Zavallone A, Strigini L, Chiorboli E, Ciardi L, Aguzzi A, Bona G. 2004. Leptin levels as function of age, gender, auxological and hormonal parameters in 202 healthy neonates at birth and during the first month of life. *J.Endocrinol.Invest* **27**: 18-23.

- Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. 1996.** A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr.Biol.* **6**: 1170-1180.
- Bertolucci C, Caola G, Foa A, Piccione G. 2005.** Daily rhythms of serum leptin in ewes: effects of feeding, pregnancy and lactation. *Chronobiol.Int.* **22**: 817-827.
- Birkenmeier G, Kampfer I, Kratzsch J, Schellenberger W. 1998.** Human leptin forms complexes with alpha 2-macroglobulin which are recognized by the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. *Eur.J.Endocrinol.* **139**: 224-230.
- Bispham J, Budge H, Mostyn A, Dandrea J, Clarke L, Keisler DH, Symonds ME, Stephenson T. 2002.** Ambient temperature, maternal dexamethasone, and postnatal ontogeny of leptin in the neonatal lamb. *Pediatr.Res.* **52**: 85-90.
- Blache D, Tellam RL, Chagas LM, Blackberry MA, Vercoe PE, Martin GB. 2000.** Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *J.Endocrinol.* **165**: 625-637
- Blum WF, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel NT, Muller J, Skakkebaek NE, Heiman ML, Birkett M, Attanasio AM, Kiess W, Rascher W. 1997a.** Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**: 2904-2910.
- Blum WF, Englaro P, Heiman M, Juul A, Attanasio A, Kiess W, Rascher W. 1997b.** Clinical Studies of Serum Leptin. In: Blum WF, Kiess W, Rascher W, eds. *Leptin The Voice of Adipose Tissue*. Heidelberg, Leipzig: J.A. Barth Verlag, 202-218.
- Blumberg MS, Deaver K, Kirby RF. 1999.** Leptin disinhibits nonshivering thermogenesis in infants after maternal separation. *Am.J.Physiol* **276**: R606-R610.
- Boden G, Chen X, Kolaczynski JW, Polansky M. 1997.** Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J.Clin.Invest* **100**: 1107-1113.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995.** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* **269**: 546-549.
- Cannon B, Nedergaard J. 2004.** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* **84**: 277-359.
- Carroll KK, Hamilton RM, Macleod GK. 1973.** Plasma cholesterol levels in suckling and weaned calves, lambs, pigs, and colts. *Lipids* **8**: 635-640.
- Celi P, Martin GB, Blache D, Vercoe PE, Blackberry M, Tellam RL. 2003.** Effect of food deprivation on blood concentration of metabolic hormones in Merino rams: the role of leptin. *Vet.Res.Comm.* **27 Suppl 1**: 219-220.
- Cetin I, Morpurgo PS, Radaelli T, Taricco E, Cortelazzi D, Bellotti M, Pardi G, Beck-Peccoz P. 2000.** Fetal plasma leptin concentrations: relationship with different intrauterine growth patterns from 19 weeks to term. *Pediatr.Res.* **48**: 646-651.

- Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS. 2002.** Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes* **51**: 2105-2112.
- Cheng JT, Liu IM, Chi TC, Shinozuka K, Lu FH, Wu TJ, Chang CJ. 2000.** Role of adenosine in insulin-stimulated release of leptin from isolated white adipocytes of Wistar rats. *Diabetes* **49**: 20-24.
- Cinti S, Frederich RC, Zingaretti MC, De Matteis R, Flier JS, Lowell BB. 1997.** Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology* **138**: 797-804.
- Clapham JC, Smith SA, Moore GB, Hughes MG, Azam H, Scott A, Jung RT. 1997.** Plasma leptin concentrations and OB gene expression in subcutaneous adipose tissue are not regulated acutely by physiological hyperinsulinaemia in lean and obese humans. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **21**: 179-183.
- Clarke IJ, Henry BA. 2010.** Targeting energy expenditure in muscle as a means of combating obesity. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **37**: 121-124.
- Clarke IJ, Tilbrook AJ, Turner AI, Doughton BW, Goding JW. 2001.** Sex, fat and the tilt of the earth: effects of sex and season on the feeding response to centrally administered leptin in sheep. *Endocrinology* **142**: 2725-2728.
- Clarke L, Darby CJ, Lomax MA, Symonds ME. 1994.** Effect of ambient temperature during 1st day of life on thermoregulation in lambs delivered by cesarean section. *J.Appl.Physiol* **76**: 1481-1488.
- Clarke L, Heasman L, Firth K, Symonds ME. 1997.** Influence of route of delivery and ambient temperature on thermoregulation in newborn lambs. *Am.J.Physiol* **272**: R1931-R1939.
- Cottrell EC, Mercer JG, Ozanne SE. 2010.** Postnatal development of hypothalamic leptin receptors). *Vitam Horm.* 201-217.
- Dallman MF, Akana SF, Bhatnagar S, Bell ME, Choi S, Chu A, Horsley C, Levin N, Meijer O, Soriano LR, Strack AM, Viau V. 1999.** Starvation: early signals, sensors, and sequelae. *Endocrinology* **140**: 4015-4023.
- De Fanti BA, Milagro FI, Lamas O, Martinez-Anso E, Martinez JA. 2002.** Immunomanipulation of appetite and body temperature through the functional mimicry of leptin. *Obes.Res.* **10**: 833-837.
- Delavaud C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G. 2000.** Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J.Endocrinol.* **165**: 519-526.
- Deng C, Moinat M, Curtis L, Nadakal A, Preitner F, Boss O, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Giacobino JP. 1997.** Effects of beta-adrenoceptor subtype

stimulation on obese gene messenger ribonucleic acid and on leptin secretion in mouse brown adipocytes differentiated in culture. *Endocrinology* **138**: 548-552.

Diamond FB, Jr., Eichler DC, Duckett G, Jorgensen EV, Shulman D, Root AW. 1997. Demonstration of a leptin binding factor in human serum. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **233**: 818-822.

Dixon WJ. 1993. *BMDP Statistical Software manual*. Berkley, Los Angeles, London: University of Callifornia Press.

Duffield JA, Vuocolo T, Tellam R, McFarlane JR, Kauter KG, Muhlhausler BS, McMillen IC. 2009. Intrauterine growth restriction and the sex specific programming of leptin and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mRNA expression in visceral fat in the lamb. *Pediatr.Res.* **66**: 59-65.

Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL, Keisler DH. 1997. cDNA cloning and tissue-specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor and NPY-Y2 receptor. *Domest. Anim. Endocrinol.* **14**: 1295-303.

Eales FA, Small J. 1980. Determinants of heat production in newborn lambs. *Int.J.Biometeorol.* **24**: 157-166.

Eales FA, Small J. 1986. Plasma hormone concentrations in newborn Scottish blackface lambs during basal and summit metabolism. *Res.Vet.Sci.* **40**: 339-343.

Ehrhardt RA, Greenwood PL, Bell AW, Boisclair YR. 2003. Plasma leptin is regulated predominantly by nutrition in preruminant lambs. *J.Nutr.* **133**: 4196-4201.

Ehrhardt RA, Slepatis RM, Siegal-Willott J, Van Amburgh ME, Bell AW, Boisclair YR. 2000. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *J.Endocrinol.* **166**: 519-528.

Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M. 1997. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* **46**: 313-316.

Ertl T, Funke S, Sarkany I, Szabo I, Rascher W, Blum WF, Sulyok E. 1999. Postnatal changes of leptin levels in full-term and preterm neonates: their relation to intrauterine growth, gender and testosterone. *Biol.Neonate* **75**: 167-176.

Everett-Hincks JM, Dodds KG. 2008. Management of maternal-offspring behavior to improve lamb survival in easy care sheep systems. *J.Anim Sci.* **86**: E259-E270.

Fehmann H-C, Göke B. 1997. Leptin: A Metabolic Hormone. In: Blum W, Kiess W, Rascher W, eds. *Leptin the voice of adipose tissue*. Heidelberg, Leipzig: J.A.Barth Verlag, 164-170.

Fluck CE, Kuhlmann BV, Mullis PE. 1999. Insulin increases serum leptin concentrations in children and adolescents with newly diagnosed type I diabetes mellitus with and without ketoacidosis. *Diabetologia* **42**: 1067-1070.

Flynn MC, Scott TR, Pritchard TC, Plata-Salaman CR. 1998. Mode of action of OB protein (leptin) on feeding. *Am.J.Physiol* **275**: R174-R179.

Friedman JM, Leibel RL. 1992. Tackling a weighty problem. *Cell* **69**: 217-220.

Fruhbeck G, Aguado M, Gomez-Ambrosi J, Martinez JA. 1998. Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **250**: 99-102.

Fruhbeck G, Aguado M, Martinez JA. 1997. In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **240**: 590-594.

Fujikawa T, Chuang JC, Sakata I, Ramadori G, Coppari R. 2010. Leptin therapy improves insulin-deficient type 1 diabetes by CNS-dependent mechanisms in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**: 17391-17396.

Garofalo MA, Kettelhut IC, Roselino JE, Migliorini RH. 1996. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. *J.Auton.Nerv.Syst.* **60**: 206-208.

Gautron L, Elmquist JK. 2011. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J.Clin.Invest* **121**: 2087-2093.

German J, Kim F, Schwartz GJ, Havel PJ, Rhodes CJ, Schwartz MW, Morton GJ. 2009. Hypothalamic leptin signaling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. *Endocrinology* **150**: 4502-4511.

Gertler A, Simmons J, Keisler DH. 1998. Large-scale preparation of biologically active recombinant ovine obese protein (leptin). *FEBS Lett.* **422**: 137-140.

Greer AW, Boisclair YR, Stankiewicz M, McAnulty RW, Jay NP, Sykes AR. 2009. Leptin concentrations and the immune-mediated reduction of feed intake in sheep infected with the nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Br.J.Nutr.* **102**: 954-957.

Grisaru-Granovsky S, Eitan R, Algur N, Schimmel MS, Diamant YZ, Samueloff A. 2003. Maternal and umbilical cord serum leptin concentrations in small-for-gestational-age and in appropriate-for-gestational-age neonates: a maternal, fetal, or placental contribution? *Biol.Neonate* **84**: 67-72.

Haave NC, Innis SM. 1991. Perinatal development of hepatic cholesterol synthesis in the rat. *Biochim.Biophys.Acta* **1085**: 35-44.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**: 543-546.

Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M. 1995. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat.Med.* **1**: 953-956.

- Hardie LJ, Rayner DV, Holmes S, Trayhurn P. 1996.** Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **223:** 660-665.
- Harris RB, Zhou J, Redmann SM, Jr., Smagin GN, Smith SR, Rodgers E, Zachwieja JJ. 1998.** A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. *Endocrinology* **139:** 8-19.
- Hausberg M, Morgan DA, Mitchell JL, Sivitz WI, Mark AL, Haynes WG. 2002.** Leptin potentiates thermogenic sympathetic responses to hypothermia: a receptor-mediated effect. *Diabetes* **51:** 2434-2440.
- Henry BA, Andrews ZB, Rao A, Clarke IJ. 2011.** Central leptin activates mitochondrial function and increases heat production in skeletal muscle. *Endocrinology* **152:** 2609-2618.
- Henry BA, Dunshea FR, Gould M, Clarke IJ. 2008.** Profiling postprandial thermogenesis in muscle and fat of sheep and the central effect of leptin administration. *Endocrinology* **149:** 2019-2026.
- Herrera E, Lasuncion MA, Huerta L, Martin-Hidalgo A. 2000.** Plasma leptin levels in rat mother and offspring during pregnancy and lactation. *Biol.Neonate* **78:** 315-320.
- Herrid M, Nguyen VL, Hinch G, McFarlane JR. 2006.** Leptin has concentration and stage-dependent effects on embryonic development in vitro. *Reproduction.* **132:** 247-256.
- Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME. 1998.** The biology of leptin: a review. *J.Anim Sci.* **76:** 1405-1420.
- Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS, Kahn BB. 1996.** Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes* **45:** 1638-1643.
- Huang L, Wang Z, Li C. 2001.** Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J.Biol.Chem.* **276:** 6343-6349.
- Hunter WM, Greenwood FC. 1962.** Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194:** 495-496.
- Hunter WM, Greenwood FC. 1964.** A radio-immunoelectrophoretic assay for human growth hormone. *Biochem.J.* **91:** 43-56.
- Hytinantti T, Koistinen HA, Koivisto VA, Karonen SL, Andersson S. 1999.** Changes in leptin concentration during the early postnatal period: adjustment to extrauterine life? *Pediatr.Res.* **45:** 197-201.
- Hytinantti TK, Juntunen M, Koistinen HA, Koivisto VA, Karonen SL, Andersson S. 2001.** Postnatal changes in concentrations of free and bound leptin. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* **F123-F126.**

- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Barletta A, Liverini G. 2001.** Effect of cold exposure on energy balance and liver respiratory capacity in post-weaning rats fed a high-fat diet. *Br.J.Nutr.* **85**: 89-96.
- Jaquiere AL, Oliver MH, Bloomfield FH, Harding JE. 2011.** Periconceptual events perturb postnatal growth regulation in sheep. *Pediatr.Res.*
- Jequier E. 2002.** Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **967**: 379-388.
- Kadokawa H, Briegel JR, Blackberry MA, Blache D, Martin GB, Adams NR. 2003.** Relationships between plasma concentrations of leptin and other metabolic hormones in GH-transgenic sheep infused with glucose. *Domest.Anim Endocrinol.* **24**: 219-229.
- Kalaivanisailaja J, Manju V, Nalini N. 2003.** Lipid profile in mice fed a high-fat diet after exogenous leptin administration. *Pol.J.Pharmacol.* **55**: 763-769.
- Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. 1997.** Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* **389**: 374-377.
- Kauter K, Ball M, Kearney P, Tellam R, McFarlane JR. 2000.** Adrenaline, insulin and glucagon do not have acute effects on plasma leptin levels in sheep: development and characterisation of an ovine leptin ELISA. *J.Endocrinol.* **166**: 127-135.
- Kavazarakis E, Moustaki M, Gourgiotis D, Drakatos A, Bossios A, Zeis PM, Xatzidimoula A, Karpachios T. 2001.** Relation of serum leptin levels to lipid profile in healthy children. *Metabolism* **50**: 1091-1094.
- Kaya G. 2001.** *Untersuchungen über die Auswirkungen unterschiedlicher Umwelttemperaturen beim neugeborenen Lamm in den ersten 72 Lebensstunden.*, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Kiess W, Anil M, Blum WF, Englaro P, Juul A, Attanasio A, Dotsch J, Rascher W. 1998a.** Serum leptin levels in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus in relation to metabolic control and body mass index. *Eur.J.Endocrinol.* **138**: 501-509.
- Kiess W, Siebler T, Englaro P, Kratzsch J, Deutscher J, Meyer K, Gallaher B, Blum WF. 1998b.** Leptin as a metabolic regulator during fetal and neonatal life and in childhood and adolescence. *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* **11**: 483-496.
- Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M. 1996.** Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* **45**: 984-987.
- Klein S, Horowitz JF, Landt M, Goodrick SJ, Mohamed-Ali V, Coppack SW. 2000.** Leptin production during early starvation in lean and obese women. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **278**: E280-E284.
- Klingenspor M, Dickopp A, Heldmaier G, Klaus S. 1996.** Short photoperiod reduces leptin gene expression in white and brown adipose tissue of Djungarian hamsters. *FEBS Lett.* **399**: 290-294.

Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, Nyce MR, Myint M, Caro JF. 1996. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* **45**: 1511-1515.

Konturek PC, Brzozowski T, Sulekova Z, Meixner H, Hahn EG, Konturek SJ. 1999. Enhanced expression of leptin following acute gastric injury in rat. *J.Physiol Pharmacol.* **50**: 587-595.

Kratzsch J, Lammert A, Bottner A, Seidel B, Mueller G, Thiery J, Hebebrand J, Kiess W. 2002. Circulating soluble leptin receptor and free leptin index during childhood, puberty, and adolescence. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87**: 4587-4594.

Kratzsch J, Schubring C, Stitzel B, Böttner A, Berthold A, Thiery J, Kiess W. 2005. Inverse changes in the serum levels of the soluble leptin receptor and leptin in neonates: relations to anthropometric data. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2212-2217.

Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J. 2001. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **283**: 982-988.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**: 632-635.

Levy JR, Gyarmati J, Lesko JM, Adler RA, Stevens W. 2000. Dual regulation of leptin secretion: intracellular energy and calcium dependence of regulated pathway. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **278**: E892-E901.

Licinio J, Ribeiro L, Busnello JV, Delibasi T, Thakur S, Elashoff RM, Sharma A, Jardack PM, Depaoli AM, Wong ML. 2007. Effects of leptin replacement on macro- and micronutrient preferences. *Int.J.Obes.(Lond)* **31**: 1859-1863.

Lindberg O. 1970. *Brown Adipose Tissue*. Amer. Elsevier Publ., New York.

Luheshi GN, Gardner JD, Rushforth DA, Loudon AS, Rothwell NJ. 1999. Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 7047-7052.

Madej T, Boguski MS, Bryant SH. 1995. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett.* **373**: 13-18.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, . 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat.Med.* **1**: 1155-1161.

Malmstrom R, Taskinen MR, Karonen SL, Yki-Jarvinen H. 1996. Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia* **39**: 993-996.

Mark AL, Correia ML, Rahmouni K, Haynes WG. 2002. Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications. *J.Hypertens.* **20:** 1245-1250.

McFadin EL, Morrison CD, Buff PR, Whitley NC, Keisler DH. 2002. Leptin concentrations in periparturient ewes and their subsequent offspring. *J.Anim Sci.* **80:** 738-743.

Mellor DJ, Cockburn F. 1986. A comparison of energy metabolism in the new-born infant, piglet and lamb. *Q.J.Exp.Physiol* **71:** 361-379.

Mercer JG, Moar KM, Rayner DV, Trayhurn P, Hoggard N. 1997. Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (ob/ob) and cold-exposed lean mice. *FEBS Lett.* **402:** 185-188.

Meyer H, Kamphues J. 1990. Grundlagen der Ernährung von Neugeborenen. In: Walser K, Bostedt H, eds. *Neugeborenen und Säuglingskunde der Tiere*. Ferdinand Enke Verlag, 55-71.

Miell JP, Englaro P, Blum WF. 1996. Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm.Metab Res.* **28:** 704-707.

Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Aggarwal A, Herzog DB, Neubauer G, Breu J, Klibanski A. 2004. Hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin, and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **89:** 3486-3495.

Mizuno T, Bergen H, Kleopoulos S, Bauman WA, Mobbs CV. 1996. Effects of nutritional status and aging on leptin gene expression in mice: importance of glucose. *Horm.Metab Res.* **28:** 679-684.

Moinat M, Deng C, Muzzin P, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Dulloo AG, Giacobino JP. 1995. Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Lett.* **373:** 131-134.

Mostyn A, Bispham J, Pearce S, Evens Y, Raver N, Keisler DH, Webb R, Stephenson T, Symonds ME. 2002. Differential effects of leptin on thermoregulation and uncoupling protein abundance in the neonatal lamb. *FASEB J.* **16:** 1438-1440.

Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, Stern JS, Havel PJ. 1998. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* **139:** 551-558.

Murakami T, Otani S, Honjoh T, Doi T, Shima K. 2001. Influence of the presence of OB-Re on leptin radioimmunoassay. *J.Endocrinol.* **168:** 79-86.

O'Connor DM, Blache D, Hoggard N, Brookes E, Wooding FB, Fowden AL, Forhead AJ. 2007. Developmental control of plasma leptin and adipose leptin messenger ribonucleic acid in the ovine fetus during late gestation: role of glucocorticoids and thyroid hormones. *Endocrinology* **148:** 3750-3757.

Ogawa T, Hirose H, Yamamoto Y, Nishikai K, Miyashita K, Nakamura H, Saito I, Saruta T. 2004. Relationships between serum soluble leptin receptor level and serum leptin and adiponectin levels, insulin resistance index, lipid profile, and leptin receptor gene polymorphisms in the Japanese population. *Metabolism* **53**: 879-885.

Onal EE, Uysal FK, Cinaz P, Bideci A, Dilmen U. 2003. Serum leptin levels in twins and singleton newborns. *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* **16**: 733-739.

Ostlund RE, Jr., Yang JW, Klein S, Gingerich R. 1996. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **81**: 3909-3913.

Otto A, Bar J, Birkenmeier G. 1998. Prostate-specific antigen forms complexes with human alpha 2-macroglobulin and binds to the alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein. *J.Urol.* **159**: 297-303.

Patel N, Brinkman-Van der Linden EC, Altmann SW, Gish K, Balasubramanian S, Timans JC, Peterson D, Bell MP, Bazan JF, Varki A, Kastelein RA. 1999. OB-BP1/Siglec-6, a leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily. *J.Biol.Chem.* **274**: 22729-22738.

Peelman F, Van Beneden K, Zabeau L, Iserentant H, Ulrichs P, Defeau D, Verhee A, Catteeuw D, Elewaut D, Tavernier J. 2004. Mapping of the leptin binding sites and design of a leptin antagonist. *J.Biol.Chem.* **279**: 41038-41046

Peino R, Pineiro V, Gualillo O, Menendez C, Brenlla J, Casabiell X, Dieguez C, Casanueva FF. 2000. Cold exposure inhibits leptin secretion in vitro by a direct and non-specific action on adipose tissue. *Eur.J.Endocrinol.* **142**: 195-199.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **269**: 540-543.

Philipps AF, Porte PW, Raye JR. 1985. Relationship between resting glucose consumption and insulin secretion in the ovine fetus. *Biol.Neonate* **48**: 85-89.

Piemonti L, Calori G, Mercalli A, Lattuada G, Monti P, Garancini MP, Costantino F, Ruotolo G, Luzi L, Perseghin G. 2003. Fasting plasma leptin, tumor necrosis factor-alpha receptor 2, and monocyte chemoattracting protein 1 concentration in a population of glucose-tolerant and glucose-intolerant women: impact on cardiovascular mortality. *Diabetes Care* **26**: 2883-2889.

Puerta M, Abelenda M, Rocha M, Trayhurn P. 2002. Effect of acute cold exposure on the expression of the adiponectin, resistin and leptin genes in rat white and brown adipose tissues. *Horm.Metab Res.* **34**: 629-634.

Purvis GM, Kirby FD, Ostler DC, Baxter J, Bishop J. 1985. Causes of lamb mortality in a commercial lowland sheep flock. *Vet.Rec.* **116**: 293-294.

Ramsay TG, Bush JA, McMurtry JP, Thivierge MC, Davis TA. 2004. Peripheral leptin administration alters hormone and metabolite levels in the young pig. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* **138**: 17-25.

Rayner DV, Dalglish GD, Duncan JS, Hardie LJ, Hoggard N, Trayhurn P. 1997. Postnatal development of the ob gene system: elevated leptin levels in suckling fa/fa rats. *Am.J.Physiol* **273**: R446-R450.

Reidy SP, Weber J. 2000. Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* **125**: 285-298.

Ricci MR, Fried SK, Mittleman KD. 2000. Acute cold exposure decreases plasma leptin in women. *Metabolism* **49**: 421-423.

Rodbard D, Bridson W, Rayford PL. 1969. *J.Lab.Clin.Med.* **74**: 770.

Ruige JB, Dekker JM, Blum WF, Stehouwer CD, Nijpels G, Mooy J, Kostense PJ, Bouter LM, Heine RJ. 1999. Leptin and variables of body adiposity, energy balance, and insulin resistance in a population-based study. The Hoorn Study. *Diabetes Care* **22**: 1097-1104.

Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. 1995. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* **377**: 527-529.

Sano H, Matsunobu S, Abe T, Terashima Y. 1992. Combined effects of diet and cold exposure on insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin in sheep. *J.Anim Sci.* **70**: 3514-3520.

Sarmiento U, Benson B, Kaufman S, Ross L, Qi M, Scully S, DiPalma C. 1997. Morphologic and molecular changes induced by recombinant human leptin in the white and brown adipose tissues of C57BL/6 mice. *Lab Invest* **77**: 243-256.

Schilling J, Hospes R, Kaya G, Failing K, Gortner L, Wudy SA, Blum WF. 2015. Serum Leptin in Neonatal Lambs is Associated with Temperature, Plasma Lipids and Metabolites. *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes* (2015 May 26 Epub ahead of print, PMID: 26011174).

Schmidt FA. 1973. Enzymatische Teste zur Schnelldiagnose. In:3. *Internationales Donau-Symposium über Diabetes mellitus*. Wien, München,Bern: Verlag W. Maudrick.

Schmidt I, Döring H, Stehling O, Nuesslein-Hildesheim B, Steinlechner S, Schwarzer K. 1997. Leptin disinhibits rather than stimulates sympathetically mediated energy expenditure. In: Blum W, Kiess W, Rascher W, eds. *Leptin the voice of adipose tissue*. Heidelberg, Leipzig: J.A.Barth Verlag, 133-139.

Schubring C, Blum WF, Kratzsch J, Deutscher J, Kiess W. 2000. Leptin, the ob gene product, in female health and disease. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* **88**: 121-127.

Schubring C, Kiess W, Englaro P, Rascher W, Dotsch J, Hanitsch S, Attanasio A, Blum WF. 1997. Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**: 1480-1483.

Schubring C, Siebler T, Kratzsch J, Englaro P, Blum WF, Triep K, Kiess W. 1999. Leptin serum concentrations in healthy neonates within the first week of life: relation to insulin and growth hormone levels, skinfold thickness, body mass index and weight. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **51**: 199-204.

Scriba D, Aprath-Husmann I, Blum WF, Hauner H. 2000. Catecholamines suppress leptin release from in vitro differentiated subcutaneous human adipocytes in primary culture via beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Eur.J.Endocrinol.* **143**: 439-445.

Sehgal PB. 1996. Interleukin-6-type cytokines in vivo: regulated bioavailability. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **213**: 238-247.

Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. 1997. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* **138**: 4501-4504.

Shekhawat PS, Garland JS, Shivpuri C, Mick GJ, Sasidharan P, Pelz CJ, McCormick KL. 1998. Neonatal cord blood leptin: its relationship to birth weight, body mass index, maternal diabetes, and steroids. *Pediatr.Res.* **43**: 338-343.

Shi H, Sorrell JE, Clegg DJ, Woods SC, Seeley RJ. 2010. The roles of leptin receptors on POMC neurons in the regulation of sex-specific energy homeostasis. *Physiol Behav.* **100**: 165-172.

Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH. 1997. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**: 4637-4641.

Siedel HS, Schlumberger S, Klose J, Wahlefeld AW. 1981. Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* **19**: 838-839.

Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J, Meier CA. 1997. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J.Clin.Invest* **100**: 2858-2864.

Simon C, Gronfier C, Schlienger JL, Brandenberger G. 1998. Circadian and ultradian variations of leptin in normal man under continuous enteral nutrition: relationship to sleep and body temperature. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **83**: 1893-1899.

Sinha MK. 1997. Human leptin: the hormone of adipose tissue. *Eur.J.Endocrinol.* **136**: 461-464.

Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, Marco C, Caro JF. 1996a. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J.Clin.Invest* **97**: 1344-1347.

Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF. 1996b. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J.Clin.Invest* **98**: 1277-1282.

Skoczen S, Tomasik PJ, Bik-Multanowski M, Surmiak M, Balwierz W, Pietrzyk JJ, Sztelfko K, Gozdzik J, Galicka-Latala D, Strojny W. 2011. Plasma levels of leptin and soluble leptin receptor and polymorphisms of leptin gene -18G > A and leptin receptor genes K109R and Q223R, in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J.Exp.Clin.Cancer Res.* **30**: 64.

Slebodzinski A. 1994. Endokrinologie des Neugeborenen. In: Döcke F, ed. *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, 594-606.

Sokolowski G, Wood WG. 1981. *Radioimmunoassay in Theorie und Praxis*. Konstanz: Schnetztor-Verlag.

Stamogiannou L, Vlachopapadopoulou E, Tsoka E, Maravelias K, Bartsocas S, Koutselinis A. 1997. Preliminary Leptin Data for Greek Obese Children. In: Blum W, Kiess W, Rascher W, eds. *Leptin the voice of adipose tissue*. Heidelberg, Leipzig: J.A.Barth Verlag, 300-305.

Stehling O, Doring H, Ertl J, Preibisch G, Schmidt I. 1996. Leptin reduces juvenile fat stores by altering the circadian cycle of energy expenditure. *Am.J.Physiol* **271**: R1770-R1774.

Stehling O, Doring H, Nuesslein-Hildesheim B, Olbort M, Schmidt I. 1997. Leptin does not reduce body fat content but augments cold defense abilities in thermoneutrally reared rat pups. *Pflugers Arch.* **434**: 694-697.

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, . 1995. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* **377**: 530-532.

Stoll-Becker S, Kreuder J, Reiss I, Etspuler J, Blum WF, Gortner L. 2003. Influence of gestational age and intrauterine growth on leptin concentrations in venous cord blood of human newborns. *Klin.Padiatr.* **215**: 3-8.

Tamura T, Goldenberg RL, Johnston KE, Cliver SP. 1998. Serum leptin concentrations during pregnancy and their relationship to fetal growth. *Obstet.Gynecol.* **91**: 389-395.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, . 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**: 1263-1271.

Tran KQ, Graewin SJ, Swartz-Basile DA, Nakeeb A, Svatek CL, Pitt HA. 2003. Leptin-resistant obese mice have paradoxically low biliary cholesterol saturation. *Surgery* **134**: 372-377.

Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV. 1995a. Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem.J.* **311 (Pt 3)**: 729-733.

Trayhurn P, Hardie LJ, Hoggard N, Rayner DV. 1997. Regulation of Leptin Production. In: Blum WF, Kiess W, Rascher W, eds. *Leptin The Voice of Adipose Tissue*. Heidelberg Leipzig: Johann Ambrosius Barth Verlag, 69-77.

Trayhurn P, Thomas ME, Duncan JS, Rayner DV. 1995b. Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett.* **368**: 488-490.

van de Wall E, Leshan R, Xu AW, Balthasar N, Coppari R, Liu SM, Jo YH, MacKenzie RG, Allison DB, Dun NJ, Elmquist J, Lowell BB, Barsh GS, de Luca C, Myers MG, Jr., Schwartz GJ, Chua SC, Jr. 2008. Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* **149**: 1773-1785.

Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, Rascher W, Teller W, Tornqvist H, Hauner H. 1996b. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* **45**: 1435-1438.

Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, Rascher W, Teller W, Tornqvist H, Hauner H. 1996a. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* **45**: 1435-1438.

Wahlefeld AW. 1974. Triglycerid-Bestimmung nach enzymatischer Verseifung. In: Bergmeyer HU (ed). *Methoden der enzymatischen Analyse*. Weinheim: Verlag Chemie, 3.Auflage, 1974: 1871-1878.

Walder K, Filippis A, Clark S, Zimmet P, Collier GR. 1997. Leptin inhibits insulin binding in isolated rat adipocytes. *J.Endocrinol.* **155**: R5-R7.

Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. 1998. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* **393**: 684-688.

Wang MY, Chen L, Clark GO, Lee Y, Stevens RD, Ilkayeva OR, Wenner BR, Bain JR, Charron MJ, Newgard CB, Unger RH. 2010. Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**: 4813-4819.

Wang MY, Lee Y, Unger RH. 1999. Novel form of lipolysis induced by leptin. *J.Biol.Chem.* **274**: 17541-17544.

Wetzler S, Jean-Joseph G, Even P, Tome D, Larue-Achagiotis C. 2005. Acute third ventricular administration of leptin decreases protein and fat in self-selecting rats. *Behav.Brain Res.* **159**: 119-125.

Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA. 1962. Enzymic determination of D(-)-beta-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem.J.* **82**: 90-96.

Wudy SA, Hagemann S, Dempfle A, Ringler G, Blum WF, Berthold LD, Alzen G, Gortner L, Hebebrand J. 2005. Children with idiopathic short stature are poor eaters and have decreased body mass index. *Pediatrics* e52-e57.

Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. 2003. Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **88**: 1730-1736.

- Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. 1997.** Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **232**: 822-826.
- Yuen BS, Owens PC, McFarlane JR, Symonds ME, Edwards LJ, Kauter KG, McMillen IC. 2002.** Circulating leptin concentrations are positively related to leptin messenger RNA expression in the adipose tissue of fetal sheep in the pregnant ewe fed at or below maintenance energy requirements during late gestation. *Biol.Reprod.* **67**: 911-916.
- Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorch LP, Bhat GK, Brann DW. 1997.** Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* **65**: 223-228.
- Zeyl A, Stocks JM, Taylor NA, Jenkins AB. 2004.** Interactions between temperature and human leptin physiology in vivo and in vitro. *Eur.J.Appl.Physiol.*
- Zhang F, Basinski MB. 1997.** Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* **387**: 206-209.
- Zhang XY, Li YL, Wang DH. 2008.** Large litter size increases maternal energy intake but has no effect on UCP1 content and serum-leptin concentrations in lactating Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). *J.Comp Physiol B* **178**: 637-645.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432.
- Zheng D, Wooter MH, Zhou Q, Dohm GL. 1996.** The effect of exercise on ob gene expression. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **225**: 747-750.
- Zhou H, Hickford JG, Gong H. 2009.** Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. *Mol.Biotechnol.* **41**: 22-25.
- Zieba DA, Klocek B, Williams GL, Romanowicz K, Boliglowska L, Wozniak M. 2007.** In vitro evidence that leptin suppresses melatonin secretion during long days and stimulates its secretion during short days in seasonal breeding ewes. *Domest.Anim Endocrinol.* **33**: 358-365.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Schilling J, Hospes R, Kaya G, Failing K, Gortner L, Wudy SA, Blum WF. 2015. Serum Leptin in Neonatal Lambs is Associated with Temperature, Plasma Lipids and Metabolites. *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes* (2015 May 26 Epub ahead of print, PMID: 26011174).

Landmann E, Geller F, Schilling J, Rudloff S, Foeller-Gaudier E, Gortner L. 2006. Absence of the wild-type allele (192 base pairs) of a polymorphism in the promoter region of the IGF-I gene but not a polymorphism in the insulin gene variable number of tandem repeat locus is associated with accelerated weight gain in infancy. *Pediatrics* **118(6):**2374-9.

ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. L. Gortner als damaliger Direktor der Kinderklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, Abteilung für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die freundliche Übernahme der Betreuung, Unterstützung im Labor und Korrektur der Arbeit danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. S.A. Wudy als Leiter des Steroid- und Peptidhormonlabors der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. W.F. P. Blum (Senior Scientific Consultant des Peptidhormonlabors der Justus-Liebig-Universität Gießen) für die stets freundliche Hilfsbereitschaft, gewährende Unterstützung und Motivation bei der Forschung und für die Korrektur der Arbeit.

Für die Bereitstellung der Schafseren und der Ergebnisse danke ich sehr Herrn PD Dr. R. Hospes, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Ganz besonderer Dank gilt den (auch ehemaligen) Mitarbeiterinnen des Peptidhormonlabors (IGF-Labor), Genlabors und Steroidlabors (alphabetisch geordnet): Simone Gränz, Carmen Gregor, Larissa Hamann, Dr. Michaela Hartmann, Birgit Hospes, Anja Platt, Maike Schäfer, Simone Schwalm und Sabine Wenderhold-Reeb.

Herrn Dr. K. Failing, Leiter der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Instituts für Veterinärphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich für die hilfreiche statistische Auswertung der Ergebnisse.

Für die freundliche Genehmigung zur Verwendung des Bildes Abb.I.1.danke ich Kay Chernush.

Großer Dank geht an meine Mutter und meinen Mann für die andauernde Begleitung und Unterstützung, sowie für die Geduld meiner Kinder.