



**LANGZEITEINFLUSS DER FRÜH-POSTNATALEN
ERNÄHRUNG AUF DEN KÖRPERFETTGEHALT
VON ADULTEN WILDTYP- UND HETEROZYGOTEN
ZUCKERRATTEN**



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

ANDREA MARIA FRITZ

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung

W.G. Kerckhoff-Institut Bad Nauheim

Betreuerin: Prof. Dr. I. Schmidt

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. R. Gerstberger

**Langzeiteinfluß der früh-postnatalen Ernährung
auf den Körperfettgehalt von adulten Wildtyp-
und heterozygoten Zuckerratten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Andrea Maria Fritz

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatterin: Frau Prof. Dr. I. Schmidt

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. R. Gerstberger

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Februar 2005

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen und Begriffe.....	V
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 DEFINITION UND MEDIZINISCHE RELEVANZ VON ADIPOSITAS	1
1.2 DAS HORMON LEPTIN ALS SIGNAL FÜR DEN KÖRPERFETTGEHALT	2
1.2.1 Funktion.....	2
1.2.2 Regulation des Plasmaleptinspiegels.....	2
1.3 VORSTELLUNG VON RELEVANTEN TIERMODELLEN	4
1.3.1 Effekte der frühpostnatalen Ernährung – Manipulation der Wurfgröße.....	5
1.3.1.1 <i>Einfluß auf Körpermasse und Entwicklung.....</i>	<i>5</i>
1.3.1.2 <i>Adipositasentwicklung und assoziierte physiologische Änderungen.....</i>	<i>6</i>
1.3.2 Die heterozygote Zuckerratte als Versuchsmodell	11
1.4 BESTIMMUNG DER KÖRPERZUSAMMENSETZUNG	12
1.4.1 Historie	12
1.4.2 FFM-Hydration und Bestimmung des Körperfettgehalts	13
1.5 ZIELE DER ARBEIT.....	14
2. MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN	16
2.2 PROTOKOLL DER VERSUCHSSERIEN	17
2.2.1 Versuchsserie I - Langzeiteinfluß der frühpostnatalen Ernährung	17
2.2.2 Versuchsserie II - Aufzucht mit Ammen eines anderen Stammes	19
2.3 PRÄPARATIONEN.....	20
2.3.1 Gewinnung von Plasma	20
2.3.2 Eviszeration zur Bestimmung der Körperzusammensetzung	20
2.4 ANALYSEVERFAHREN.....	21
2.4.1 Bestimmung der Körperzusammensetzung	21
2.4.1.1 <i>Physikalische Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels EM-Scan/TOBEC®</i>	<i>21</i>

2.4.1.2 Physikalische-chemische Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels Trocknung und Entfettung der Tierkörper	23
2.4.1.3 Berechnung der Körperzusammensetzung mittels FFM-Hydrationsfaktor	24
2.4.1.4 Abschätzung der Körperzusammensetzung im Alter von 150 Tagen	24
2.4.2 Molekularbiologische Genotypbestimmung.....	26
2.4.2.1 Isolierung der DNA aus Gewebe	26
2.4.2.2 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)	26
2.4.2.3 Restriktionsverdau	27
2.4.2.3 Elektrophorese.....	27
2.4.3 Radioimmunoassay (RIA)	27
2.4.3.1 Prinzip	27
2.4.3.2 RIA zur Bestimmung der Plasmaleptinkonzentration	28
2.4.3.3 RIA zur Bestimmung der Plasmainsulinkonzentration.....	30
2.5 STATISTIK.....	31
2.5.1 Allgemeine Angaben zur statistischen Auswertung	31
2.5.2 Varianzanalysen.....	31
2.5.3 Regressionsanalysen	31
3. ERGEBNISSE	33
3.1. AUSWIRKUNGEN DER FRÜHPSTNATALEN ERNÄHRUNG AUF DEN WACHSTUMSVER- LAUF VON ZUCKERRATTEN	33
3.2. VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER KÖRPER- ZUSAMMENSETZUNG ADULTER ZUCKERRATTEN.....	36
3.2.1. Bestimmung der Körperzusammensetzung mit Hilfe des EM-Scans/TOBEC®	36
3.2.2. Vergleich zwischen TOBEC®- Messung, Wägung und physikalisch-chemischer Bestimmung der Körperzusammensetzung	36
3.2.3. Berechnung der Körperzusammensetzung mittels FFM-Hydrations-faktor.....	39
3.2.3.1. Abhängigkeit des Körperfettgehaltes vom Körperwassergehalt.....	39
3.2.3.2. Abhängigkeit des FFM-Hydrationsfaktors vom Alter.....	40
3.2.3.3. Vergleich von berechneten und gemessenen Werten	42
3.3. AUSWIRKUNGEN DER FRÜHPSTNATALEN ERNÄHRUNG AUF KÖRPERMASSE, KÖR- PERZUSAMMENSETZUNG UND PLASMALEPTIN- BZW. PLASMAINSULINSPIEGEL	44
3.3.1. Körpermasse und Körperzusammensetzung.....	44
3.3.2. Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinspiegel.....	48
3.3.2.1. Korrelation mit dem Körperfettgehalt	48
3.3.2.2. Vergleich der Mittelwerte	50

3.4. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN ABSETZ-KÖRPERMASSE UND KÖRPERMASSE BZW. KÖRPERZUSAMMENSETZUNG DES ADULTEN TIERES	53
3.5. EINFLUß DER AUFZUCHT DURCH AMMEN EINES ANDEREN STAMMES	58
3.5.1. Aufzucht von Zuckerrattenwelpen durch Wistarratten-Ammen	58
3.5.2. Aufzucht von Wistarrattenwelpen durch Zuckerratten-Ammen	62
4. DISKUSSION	66
4.1 MANIPULATIONEN IN KRITISCHEN ENTWICKLUNGSPHASEN.....	66
4.1.1 Kritische Entwicklungsphase	66
4.1.2 Manipulation der früh-postnatalen Umwelt	67
4.2 BESTIMMUNG DER KÖRPERZUSAMMENSETZUNG.....	68
4.2.1 Finale Methoden zur Bestimmung der Körperzusammensetzung.....	69
4.2.1.1 <i>Fettextraktion als Kalibrierungsmethode.....</i>	69
4.2.1.2 <i>Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels FFM-Hydrationsfaktor</i>	70
4.2.2 Methoden zur Verlaufskontrolle der Körperzusammensetzung	71
4.2.2.1 <i>Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels Körpermasse.....</i>	71
4.2.2.2 <i>Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels TOBEC®.....</i>	72
4.3 LANGZEITEINFLUß DER AUFZUCHTART AUF DIE ENTWICKLUNG VON RATTEN BEI STANDARDERNÄHRUNG	73
4.3.1 Effekt der früh-postnatalen Überernährung auf die Körpermasse.....	73
4.3.2 Effekt der früh-postnatalen Überernährung auf die Körperzusammensetzung	75
4.3.3 Effekt der früh-postnatalen Unterernährung auf die Körpermasse.....	77
4.3.4 Effekt der früh-postnatalen Unterernährung auf die Körperzusammensetzung	78
4.3.5 Probleme bei der Interpretation der Folgen der Manipulation der früh-postnatalen Ernährung unter Laborbedingungen.....	79
4.3.5.1 <i>Was ist „Über“-, was „Normal“-Ernährung?.....</i>	79
4.3.5.2 <i>Besonderheiten der Thermoregulation im kleinen Nest</i>	81
4.3.5.3 <i>Bedeutung der Unterscheidung von Über- und Normalernährung.</i>	82
4.4 INTERAKTION ZWISCHEN DER FRÜH-POSTNATALEN ERNÄHRUNG UND EINER HOCHKALORISCHEN ZUSATZFÜTTERUNG DER ADULTEN TIERE.....	85
4.5 LANGZEITEINFLUß DER FRÜH-POSTNATALEN ERNÄHRUNG AUF DIE DIE KÖRPERFETTMENGE REFLEKTIERENDEN PLASMASPIEGEL VON LEPTIN UND INSULIN.....	88
4.5.1 Effekt der früh-postnatalen Über- und Unterernährung mit anschließender Standardfütterung auf den Plasmaleptinspiegel.....	88

4.5.2	Plasmaleptin nach einer hochkalorischen Zusatzfütterung im adulten Tier	90
4.5.3	Effekt der früh-postnatalen Über- und Unterernährung mit anschließender Standardfütterung auf Plasmainsulin	92
4.5.4	Plasmainsulin nach einer hochkalorischen Zusatzfütterung im adulten Tier	94
4.6	BEDEUTUNG DER REGRESSIONSANALYSEN FÜR DIE AUSWERTUNG DER LANGZEITFOLGEN DER FRÜH-POSTNATALEN ERNÄHRUNG	97
4.7	UNTERSCHIEDLICHER EINFLUß DES FA-ALLELS AUF DIE GESCHLECHTER	98
4.8	METHODENKRITIK UND AUSBLICK	100
4.9	EINFLUß DER AUFZUCHT DURCH AMMEN EINES ANDEREN STAMMES	102
4.9.1	Mögliche Ursachen für eine erhöhte Fettakkumulation der Welpen im kleinen Nest..	102
4.9.2	Verringerung des Heterozygoten-Unterschiedes durch Erreichen einer physiologischen Obergrenze in der Körpermasse	103
4.9.3	Selektive Steigerung des Körperfettgehalts durch Ammenaufzucht von Wistarratten durch Zuckerrattenmütter	104
4.10	FAZIT UND AUSBLICK	105
5.	ZUSAMMENFASSUNG	106
6.	SUMMARY	110
7.	LITERATURVERZEICHNIS	113
8.	DANKSAGUNG	125

Abkürzungen und Begriffe

+/ <i>fa</i> -Tier	heterozygoter Träger des <i>fa</i> -Gendefekts
+/ <i>+</i> -Tier	Wildtyp-Tier
Adiposität	ist in dieser Arbeit Ausdruck für den Füllungszustand der Fettspeicher inklusive der damit verbundenen Struktureigenschaften und zellulären Charakteristika
bp	Basenpaare
d	Tag (day)
<i>db</i>	„ <i>diabetic</i> “, Bezeichnung für defektes Allel des Maus-Leptinrezeptorgens (<i>Lepr^{db}</i>)
Dielektrika	Stoffe, die Elektrizität kaum oder nicht leiten, also einen hohen Widerstand besitzen
DIO	diät-induzierte Adipositas (diet-induced obesity)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP-Mix	Desoxyribo-Nukleotid-Triphosphat-Mix
E-Wert	absorbierte Energie des elektromagnetischen Feldes, hängt von Leitfähigkeit, dielektrischen Eigenschaften sowie der Geometrie des zu messenden Körpers ab
<i>fa</i>	„ <i>fatty</i> “, Bezeichnung für defektes Allel des Ratten-Leptinrezeptorgens (<i>Lepr^{fa}</i>)
Fettgehalt	prozentualer Anteil der Fettmasse an der Körpermasse
FFM	fettfreie Körpermasse
FFM-Hydration	Wasseranteil der fettfreien Körpermasse
FFDM	fettfreie Trockenmasse (fat free dry mass)
Gendosis	Anzahl der defekten Allele (0; 1; 2)
GKW	Gesamtkörperwasser
GN	Aufzucht im großen Nest, bewirkt Unterernährung der Welpen
Herauspartialisieren	statistischer Begriff, Bereinigen einer abhängigen Variablen von dem Einfluß einer Kovariaten
Hf	FFM-Hydrationsfaktor für eine bestimmte Altersstufe
KN	Aufzucht im kleinen Nest, bewirkt Überernährung der Welpen

Abkürzungen und Begriffe

KQ-Mittelwerte	kleinste Quadrat Mittelwerte
<i>Lepr</i>	Leptinrezeptorgen
LEPR	Leptinrezeptor
n	Anzahl
NN	Aufzucht im normalen Nest
<i>ob</i>	„ <i>obese</i> “, Bezeichnung für defektes Allel des Leptingens bei <i>ob</i> -Mäusen
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PIS	Plasmainsulinspiegel
PLS	Plasmaleptinspiegel
<i>p.n.</i>	nach der Geburt (<i>post natum</i>)
r	Korrelationskoeffizient
Rotation der Welpen	täglicher Austausch der Nester zwischen den Muttertieren innerhalb einer Gruppe, so daß die Mütter abwechselnd Nester unterschiedlicher Welpenzahl säugten
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
TOBEC [®]	elektrische Leitfähigkeit des Gesamtkörpers (<u>T</u> otal <u>B</u> ody <u>E</u> lectrical <u>C</u> onductivity)
U	Units
UN	Unterernährung im normalen Nest, bedingt durch Wechsel der Mütter, die täglich abwechselnd kleine und normale Nester säugten

1. Einleitung

1.1 Definition und medizinische Relevanz von Adipositas

Für die Aufrechterhaltung der verschiedenen Körperfunktionen bei Mensch und Tier wird Energie benötigt, die mit der Nahrung aufgenommen wird. Ist die aufgenommene Energie im Mittel gleich der abgegebenen Energie, besteht ein Energiegleichgewicht (Homöostase), welches erstaunlicherweise auch bei erheblichen Schwankungen von Masse, Art und Zusammensetzung der Nahrung eine langfristig konstante Körpermasse beim adulten Mensch und Tier erhält (Langhans & Scharrer 2000). Umweltbedingungen, genetische Veranlagungen und Gehirnschädigungen, vermittelt z.B. durch endokrinologische Störungen, psychologische und psychosoziale Faktoren, können eine Entgleisung der Homöostase verursachen (Barlow & Dietz 1998, Kopelman 2000). Aufgrund einer anhaltend positiven Energiebilanz (Energieaufnahme > Energieabgabe) wird überschüssige Energie, im adulten Organismus hauptsächlich im Fettgewebe, gespeichert. Proteine und Kohlenhydrate werden dagegen relativ wenig gespeichert (Jequier & Tappy 1999). Wenngleich diese Fähigkeit Energiereserven speichern zu können, bei Lebensumständen mit wechselnd üppigem und unzureichendem Nahrungsangebot durchaus von Vorteil ist (Ravussin et al. 1994), ist sie bei der heutigen oft überwiegend sitzenden Lebensweise mit gleichmäßigem Nahrungsangebot nicht mehr (über)lebensnotwendig. Jährlich sterben sogar ca. 2 Millionen Menschen sowohl in den Industriestaaten als auch in den Entwicklungsländern an den Folgen der Adipositas (WHO 2002).

Adipositas ist eine pandemische, chronische Störung, die Diabetes mellitus Typ II, Herz-Kreislauf- und respiratorische Erkrankungen, orthopädische Schädigungen sowie Krebs hervorrufen kann (Kopelmann 2000). Die Behandlung der Adipositas verursacht zwischen 2% und 7% der Gesundheitsausgaben in den Industrieländern (Lévy et al. 1995, Schneider 1996, Seidell 1995, Colditz 1999). Besonders erschreckend ist, daß die Zahl der betroffenen Kinder und Jugendlichen in den letzten Jahrzehnten stetig steigt. Zudem werden viele adipöse Kinder zu adipösen Erwachsenen. Die Dringlichkeit, Ursachen und Therapiemöglichkeiten besonders der kindlichen Adipositas zu untersuchen, zeigt sich bei Betrachtung der Sekundärerkrankungen wie Epiphysiolysis capitis femoralis, Schlafapnoe-Syndrom, Hypoventilations-Syndrom, Bluthochdruck und besonders bei den endokrinologischen Störungen wie dem polyzystischen Ovarialsyndrom und Diabetes mellitus Typ II (Barlow & Dietz 1998), die auch den adulten Organismus betreffen.

1.2 Das Hormon Leptin als Signal für den Körperfettgehalt

Bereits vor fünfzig Jahren postulierte Kennedy, daß der Hypothalamus die Energiehomöostase (Lipostase) erhalten kann, indem im Blut zirkulierende Faktoren ihm die Größe der Fettdepots signalisieren, und er entsprechend die Nahrungsaufnahme reguliert (Kennedy 1953). Zwanzig Jahre später schloß Coleman aus parabiotischen Versuchen an *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen, daß das *ob*-Gen einen im Blut zirkulierenden Faktor codiert, der den Ernährungsstatus reguliert. Das *db*-Gen wiederum sollte den Rezeptor für diesen Faktor codieren (Coleman 1973). Erst weitere zwanzig Jahre später gelang die Klonierung des *ob*-Gens und die Identifizierung des im weißen Fett gebildeten Botenstoffes, der später den Namen Leptin (gr. λεπτος = dünn) erhielt (Zhang et al. 1994, Halaas et al. 1995). Kurze Zeit später konnte auch das Gen des zugehörigen Rezeptors (*Lepr*) kloniert und die Aminosäure-Sequenzen des Leptinrezeptors (LEPR) entschlüsselt werden (Tartaglia et al. 1995).

1.2.1 Funktion

Das anfänglich nur als Sättigungsfaktor betrachtete Leptin beeinflusst, abgesehen von der Energieaufnahme, auch den Gesamtenergieverbrauch (Woods & Seeley 2000). Außerdem interagiert es mit verschiedenen hormonellen Systemen wie den hypothalamo-hypophysären Systemen zur Steuerung der Nebennieren, der Gonaden und der Schilddrüse, mit der Wachstums-Achse und mit Insulin. Für die sexuelle Reifung und Reproduktion ist Leptin ein wichtiger Faktor (Harris RB 2000, Ahima & Flier 2000). Ebenso stimuliert es die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (Gainsford et al. 1996) und die Angiogenese (Sierra-Honigmann et al. 1998).

1.2.2 Regulation des Plasmaleptinspiegels

In der Regel korrelieren Plasmaleptinspiegel und Körperfettgehalt¹ eng miteinander (Maffei et al. 1995a,b; Frederich et al. 1995, Considine & Caro 1997, Eiden et al. 2001). Allerdings konnte bis heute noch nicht vollständig geklärt werden, welche Kontrollmechanismen dies bewirken, und inwiefern die Konzentration von Triglyzeriden bzw. anderen Lipidmetaboliten oder gar mechanische Faktoren, die in Beziehung zur Fettzellgröße stehen, die Leptinexpression bestimmen (Ahima & Flier 2000, Zhang et al. 2001 und 2002). So erniedrigen z.B. freie

¹ Prozentualer Anteil der Fettmasse an der Körpermasse

Fettsäuren, wie Palmitinsäure, die Leptin-mRNA-Konzentration in Rattenadipozyten (Shintani et al. 2000).

Der Plasmaleptinspiegel bzw. die Leptinexpression im Fettgewebe reagiert jedoch auch unabhängig von Änderungen des Fettgehaltes mit metabolischen Stimuli. So schwankt der Plasmaleptinspiegel auch kurzfristig mit dem Ernährungszustand. Fasten über 24 h führt zu einem starken Abfall der Leptinkonzentration, ohne daß sich der Körperfettgehalt wesentlich ändert (Trayhurn et al. 1995). Umgekehrt wird ein Leptinmaximum bei Ratten ca. 8 h nach Beginn der Nahrungsaufnahme erreicht (Saladin et al. 1995). Durch eine Erhöhung der Konzentration von UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), ein Endprodukt des Hexosemonophosphat-Weges im oxidativen Abbau der Glukose, wird die Leptinexpression im Fettgewebe und in der Skelettmuskulatur sowie der Plasmaleptinspiegel stimuliert (Wang J 1998). Der Glukosestoffwechsel ist also ebenfalls ein wichtiger Regulator der Leptinexpression. Hyperlipidämie und –glykämie haben ebenso einen stimulierenden Einfluß auf die Leptinexpression.

Eine wichtige Einflußgröße für die Regulation des Plasmaleptinspiegels ist das sympathische Nervensystem, durch das die Leptinexpression im weißen und braunen Fettgewebe direkt gehemmt wird (Trayhurn et al. 1998, Zhang et al. 2001) und das zudem über die stimulierte Freisetzung von Katecholaminen aus den Nebennieren auch einen indirekten Einfluß auf die Leptinexpression ausüben soll (Moinat et al. 1995, Gettys et al. 1996, Trayhurn et al. 1998). Eine durch das sympathische Nervensystem vermittelte Wirkung von zentralen Leptinrezeptoren scheint auch an der negativen Rückkopplung des Leptins auf seine eigene Produktion beteiligt zu sein (Slieker et al. 1996, Zhang et al. 2001, Wang J et al. 1999). Daneben wird auch ein peripherer, autokriner Mechanismus durch Stimulation der Leptinrezeptoren auf den Fettzellen selbst in diesem Zusammenhang diskutiert (Wang J et al. 1999, Zhang et al. 1997).

Ratten und Mäuse mit einem genetischen Defekt im Leptinrezeptor (*Lepr^{fa}* und *Lepr^{db}*) wurden wiederholt zur Aufklärung der an der Regulation beteiligten Faktoren herangezogen. So wurde gezeigt, daß der Plasmaleptinspiegel dieser Tiere nicht proportional, sondern überproportional zu ihrem Körperfettgehalt erhöht ist (Zhang et al. 1997 und 2001, Chung et al. 1998). Ratten mit diesem Gendefekt zeigen bereits unmittelbar nach der Geburt, wenn noch keine Fettspeicher angelegt sind, einen erhöhten Plasmaleptinspiegel (Hufnagel et al. 1999). Auch dies weist daraufhin, daß Leptinrezeptoren an der Regulation des Plasmaleptinspiegels beteiligt sind. Da bei der Leptinexpression in juvenilen Ratten im Gegensatz zum adulten Tier das braune Fettgewebe die wesentliche Einflußgröße für die Höhe des Plasmaleptinspiegels

darstellt, ist die Untersuchung der Regulation der Leptinexpression im braunen Fettgewebe bei jungen Tieren von großem Interesse. Als vermutlicher Faktor für die negative Rückkopplung des Leptins auf seine eigene Expression im braunen Fettgewebe wird bei der 10 Tage alten Ratte die Stimulation zentralnervöser Leptinrezeptoren vermutet, die zu einer Veränderung des sympathischen Signalflusses zum braunen Fettgewebe führen (Zhang et al. 2001, Hufnagel 2001). Im Gegensatz dazu scheinen im gleichen Alter die Rückkopplungseffekte auf die Leptinexpression im weißen Fettgewebe überwiegend durch Veränderungen der zellulären Energieströme bewirkt zu werden (Zhang et al. 2001, Hufnagel 2001).

Nicht nur Leptin hat eine wichtige Funktion im Energiehaushalt, sondern auch das Insulin, das bedeutend für den Glukosestoffwechsel ist. So ist es nicht verwunderlich, daß die Regulation beider Hormone in enger Beziehung zueinander stehen (Boden et al. 1997, Wauters et al. 2000). *In vitro* stimuliert Insulin die Leptinexpression und -sekretion isolierter Ratten- und Human-Fettzellen (Hardie et al. 1996a, Kolaczynski et al. 1996, Rentsch & Chiesi 1996, Saladin et al. 1995, Wabitsch et al. 1996). Beim Nagetier induziert die Applikation von Insulin eine Erhöhung der Leptinexpression im Fettgewebe (Cusin et al. 1995, MacDougald et al. 1995, Saladin et al. 1995) und des Plasmaleptinspiegels (Hardie et al. 1996b, Patel et al. 1998, Sivitz et al. 1998). Ratten, die durch eine Streptozotizin-Behandlung insulindefizient wurden, zeigen signifikant niedrigere Leptinspiegel, durch Insulininjektion steigt die Leptinsekretion dagegen an (MacDougald et al. 1995, Patel et al. 1998, Sivitz et al. 1998). Auch bei diabetischen Ratten, deren Plasmaleptinspiegel erniedrigt ist, zeigt eine Insulinbehandlung den selben Effekt (Sivitz et al. 1998).

1.3 Vorstellung von relevanten Tiermodellen

Gerade Umwelteinflüsse, die neben den genetischen Einflüssen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der multifaktoriell bedingten Störung Adipositas spielen, sind bei den Untersuchungen am Menschen schwer zu standardisieren und deswegen schlecht vergleichbar. Zur Untersuchung der komplexen Störungen der Energiehomöostase eignen sich daher Versuchstiere, die unter Standardbedingungen gehalten und beobachtet werden können. Dabei werden unter anderem Tiere, die eine genetische Veranlagung zur Adipositas besitzen, wie z.B. *ob/ob*-, *db/db*-Mäuse und *fa/fa*-Zuckerratten, verwendet. Interessant sind aber nicht nur die extrem übergewichtigen Homozygoten, sondern vor allem heterozygote Tiere mit einem unter Standardbedingungen weitgehend normalen Phänotyp als Versuchsmodell für Umwelteinflüsse, die zur Entstehung einer Adipositas beitragen (Maher 1996, Schmidt et al. 2001). Weiter-

hin werden zur Untersuchung der Ursachen und Auswirkungen der Adipositas Tiere verwendet, die bei hochkalorischer Ernährung zu diät-induzierter Adipositas (DIO, diet-induced obesity) neigen, wie z.B. Wistarratten, Sprague-Dawley-Ratten, Osborne-Mendel-Ratten und C57BL/6J-Mäuse.

Als Versuchsmodelle für frühe Umwelteinflüsse auf die Entwicklung der Adipositas beim Erwachsenen spielen Tiere, bei denen die prä- und postnatale Ernährung manipuliert wurde, eine bedeutende Rolle. Die frühe Ernährung der Welpen wird in verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlich manipuliert. So wird durch Änderung der mütterlichen Diät sowohl die intrauterine Ernährung (Vickers et al. 2000) als auch die Ernährung während der Säugeperiode beeinflusst (Roberts & Coward 1985, Ozanne & Hales 1999). Ebenso kann die Ernährung während der Laktationsphase durch Trennung der Welpen von der Mutter für unterschiedliche Zeiträume (Stewart 1919, Howard & Granoff 1968), intragastrische Fütterung der Welpen (Dymsza et al. 1964) oder verschiedene Wurfgrößen (Widdowson & McCance 1960, Aubert et al. 1980, Fiorotto et al. 1991) beeinflusst werden.

1.3.1 Effekte der frühpostnatalen Ernährung – Manipulation der Wurfgröße

1.3.1.1 Einfluß auf Körpermasse und Entwicklung

Insbesondere der Einfluß einer Manipulation der Wurfgröße auf die postnatale Entwicklung der Welpen und auf den adulten Organismus wurde wiederholt bei Nagetieren untersucht. Der Einfluß auf Wachstum, physiologische Entwicklung und Verhalten wurde dabei meistens nur zwischen im kleinen und großen Nest aufgezogenen Tieren verglichen. So zeigten im kleinen Nest (3 Welpen) aufgezogene Ratten von der ersten Lebenswoche bis zum Alter von 160 Tagen eine höhere Körpermasse als im großen Nest (15 Welpen) aufgezogene Tiere (Widdowson & McCance 1960). Die physiologische Entwicklung, wie der Durchbruch der unteren Schneidezähne und das Öffnen der Lidspalte, wird zwar nur im geringen Maße durch die Körpermasse beeinflusst, dagegen wird aber der Zeitpunkt der sexuellen Reifung hauptsächlich durch Körpergröße bzw. Körpermasse bestimmt. Ebenso hängt die Reifegeschwindigkeit des Skeletts von der Wurfgröße ab. Zudem ist die geringe Körpergröße der als Welpen unterernährten Ratten mit einer geringeren Zellteilungsrate assoziiert (Widdowson & McCance 1960, Knittle & Hirsch 1968). Da das Nervensystem zum Zeitpunkt der Geburt bei Ratten, Katzen und anderen Säugetieren noch nicht voll entwickelt ist, prägen postnatale Erfahrungen seine Entwicklung. Eine Manipulation der Wurfgröße kann somit Änderungen

des Verhaltens zur Folge haben. So sind Ratten, die im kleinen Nest (3-4 Welpen) aufgezogen wurden, aktiver, neugieriger und lernfähiger als die im normalen (9 Welpen, Friesiello et al. 2002) oder großen Nest (15-20 Welpen) aufgezogenen Tiere (Lat et al. 1961). Außerdem übt die Wurfgröße einen erheblichen Einfluß auf die Entwicklung des sympathischen Nervensystems aus (Young 2002). Nicht zuletzt wird die Thermoregulation durch die Anzahl der Welpen im Nest beeinflusst.

1.3.1.2 Adipositasentwicklung und assoziierte physiologische Änderungen

Männliche Osborne-Mendel-Ratten, die im großen Nest (20 Welpen) aufgezogen wurden, zeigten im Vergleich mit Tieren, die im kleinen Nest (4 Welpen) aufgezogen wurden, im Alter von einem Jahr sowohl absolut als auch relativ zur Körpermasse weniger Körperfett und weniger Fettzellen (Faust et al. 1980). Jedoch war die durchschnittliche Adipozytengröße durch die frühe postnatale Ernährung nicht beeinflusst. Der Unterschied zwischen Aufzucht im kleinen Nest und Aufzucht im großen Nest bedingte außerdem den Anstieg der Körperfettmasse und der Anzahl der Adipozyten nach einer 5-monatigen fettreichen Diät. Unklar ist allerdings, ob diese persistierenden Unterschiede in der Körpermasse und im Fettgewebe, die beim Vergleich von Tieren aus kleinen und großen Nestern beobachtet werden, die Folge der frühen Überernährung oder der frühen Unterernährung widerspiegeln (Aubert et al. 1980, Hausberger & Volz 1984, Schmidt 2002). Um verlässlich zu klären, welche Einflüsse eine frühe postnatale Überernährung auf die Neigung zur Adipositasentwicklung im adulten Organismus hat, müssen Vergleiche zwischen im kleinen und im normalen Nest aufgezogenen Tieren angestellt werden. Bis jetzt existieren aber nur fünf Veröffentlichungen über Nagetiere, die speziell die Veränderungen des Fettgewebes aufgrund der Aufzucht im kleinen im Vergleich zum normalen Nest untersuchen, von denen nur eine Arbeit Daten über den Gesamtkörperfettgehalt darstellt. Eine Übersicht über die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeiten ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

1980 untersuchte Harris an männlichen pigmentierten Ratten und Wistarratten, welche Veränderungen des Fettgewebes durch die Manipulation der Wurfgröße (4, 9 oder 16 Welpen pro Nest) im adulten Tier hervorgerufen werden (Harris PM 1980a,b). Dabei zeigte sich bei pigmentierten Männchen, die vom Absetzen am Tag 21 bis Tag 224 Standardfutter *ad libitum* erhielten, daß die im kleinen Nest aufgezogenen Tiere, eine signifikant größere bzw. die im großen Nest aufgezogenen Tiere eine signifikant niedrigere Gesamtfettmenge in den abdominalen, scapulären, epididymalen und perirenal Fettdepots aufwiesen als die Tiere aus

einem normalen Nest (Harris PM 1980a). Der auf die Proteinmasse bezogene Fettgehalt dieser Depots (als Surrogatvariable für den Körperfettgehalt) unterschied sich jedoch am Versuchsende nicht deutlich zwischen den Tieren aus dem kleinen bzw. großen und normalen Nest, da die Proteinmasse der Tiere gleichsinnig verändert war. Angaben über die Signifikanzen fehlen. Die Adipozytengröße zeigte bei pigmentierten Männchen mit *ad libitum*-Fütterung nach dem Absetzen einen inversen Zusammenhang zur Wurfgröße. Die Fettzellen der Tiere waren am Versuchsende aus dem großen Nest immer noch deutlich kleiner als die der Tiere aus dem kleinen und normalen Nest, jedoch zeigten sich nur im scapulären und perirenal Fettdepot noch höhere Werte für die im kleinen Nest aufgezogenen Tiere im Vergleich zu den Tieren aus dem normalen Nest. Dagegen waren in der Anzahl der Adipozyten im Alter von 21 und 224 Tagen zwischen den einzelnen Gruppen weder signifikante noch tendenzielle Unterschiede festzustellen (Harris PM 1980a).

Zusätzlich wurde in der Studie von Harris untersucht, welche Auswirkungen eine Futterrestriktion nach dem Absetzen bis Tag 84 mit anschließender *ad libitum*-Fütterung bis zum Tag 224 auf Tiere aus einem normalen und großen Nest hat (Harris PM 1980a, s. Tabelle 1.1). Bei einem Vergleich der im normalen Nest aufgezogenen Tiere untereinander ergab sich zwar zwischen den *ad libitum* und restriktiv gefütterten Tieren im Alter von 224 Tagen kein Unterschied in der Gesamtfettmenge in den abdominalen, scapulären, epididymalen und perirenal Fettdepots, jedoch zeigten die Tiere nach der vorübergehenden Futterrestriktion einen höheren, auf die Proteinmasse bezogenen, prozentualen Fettgehalt dieser Depots als die kontinuierlich *ad libitum*-gefütterten Tiere. Bei den vorübergehend im Futter restriktierten Tieren aus dem großen Nest waren absoluter und prozentualer Fettgehalt niedriger als bei ihren kontinuierlich *ad libitum*-gefütterten Geschwistern. Angaben über die Signifikanz der Unterschiede im prozentualen Fettgehalt fehlen jedoch. Die Adipozyten der im normalen Nest aufgezogenen Tiere mit vorübergehender restriktierter Fütterung waren in allen untersuchten Fettdepots kleiner und ihre Zahl geringer als bei ihren kontinuierlich *ad libitum*-gefütterten Wurfgeschwistern. Bei den im großen Nest aufgezogenen Tieren war dagegen kein Unterschied in der Adipozytengröße festzustellen, jedoch hatten die vorübergehend im Futter restriktierten Tiere ebenfalls weniger Fettzellen als die kontinuierlich *ad libitum*-gefütterten Tiere. Bei dem absoluten und prozentualen Fettgehalt der vorübergehend im Futter restriktierten Tiere zeigten sich bei den im großen Nest aufgezogenen Tieren jeweils niedrigere Werte als bei den im normalen Nest aufgezogenen Tieren. In der Adipozytengröße und -anzahl unterschieden sich diese Tiere jedoch nicht.

Bei den Wistarratten zeigten sich bei den Untersuchungen von Harris von den Befunden der pigmentierten Ratten und von anderen Untersuchungen an Albinoratten (siehe unten) abweichende Befunde, deren Ursachen nicht erkenntlich sind (Harris PM 1980b). So zeigte sich erstaunlicherweise bei den männlichen Wistarratten, die vom Absetzen bis Versuchsende Futter *ad libitum* erhielten, daß die im kleinen Nest aufgezogenen Tiere am Versuchsende (im Alter von 168 Tagen) einen niedrigeren absoluten und auf die Proteinmasse bezogenen Fettgehalt (als Surrogatvariable für den Körperfettgehalt) in den oben genannten Fettdepots sowie kleinere Adipozyten, jedoch insgesamt mehr Adipozyten aufwiesen als im normalen Nest aufgezogene Tiere. Die im großen Nest aufgezogenen Tiere zeigten andererseits im absoluten und prozentualen Körperfettgehalt sowie in der Adipozytengröße und –anzahl ebenso wie die pigmentierten Ratten niedrigere Werte als Tiere, die im normalen Nest aufgezogen wurden.

Hausberger und Volz untersuchten inguinales und renal-parametriales Fettgewebe von weiblichen Sprague-Dawley-Ratten im ähnlichen Alter (300 Tage), die im kleinen (4 Welpen), normalen (9 Welpen) oder im großen Nest (24 Welpen) aufgezogen wurden, auf Veränderungen der Masse und der Adipozyten hinsichtlich Anzahl und Größe (Hausberger & Volz 1984, s. Tabelle 1.1). Die im kleinen Nest aufgezogenen Tiere dieser Arbeit, die bis zum Versuchsende ausschließlich Standardfutter *ad libitum* erhielten, unterschieden sich weder in der absoluten oder prozentualen Gesamtfettmenge in den verschiedenen Fettdepots noch in der Adipozytengröße und –anzahl signifikant von den im normalen Nest aufgezogenen Tieren, wengleich die im kleinen Nest aufgezogenen Tiere jeweils tendenziell höhere Werte zeigten. Die im großen Nest aufgezogenen Tiere zeigten jedoch signifikant niedrigere Werte in der absoluten oder prozentualen Gesamtfettmenge in den verschiedenen Fettdepots und tendenziell niedrigere Werte in der Adipozytengröße und –anzahl als die im normalen Nest aufgezogenen Tiere. Nach Erhalt von fettreichem Zusatzfutter in der Zeit von Tag 126 bis Versuchsende (300 Tage) verschwand jedoch die Signifikanz der Unterschiede in all diesen Parametern zwischen den einzelnen Aufzuchtarten (Hausberger & Volz 1984).

Eine weitere Arbeit beschäftigte sich zwar mit Veränderungen der Charakteristika von epididymalem bzw. parametrialem Fettgewebe durch Manipulation der Wurfgröße mit anschließender *ad libitum*-Fütterung, sagt jedoch nichts über die Signifikanzen von Unterschieden in der absoluten oder prozentualen Fettmenge im untersuchten Fettdepot im Alter von 80 Tagen aus (Bassett & Craig 1988). Bei Betrachtung der Werte für die Fettmenge und Körpermasse zeigte sich bei den Männchen und Weibchen, daß absoluter und prozentualer Fettgehalt von im kleinen Nest (4 Welpen) aufgezogenen Tieren höher waren als bei den im normalen (10

Welpen) und im großen Nest (15-18 Welpen) aufgezogenen Tieren. Auf die Größe der Adipozyten aus den untersuchten epididymalen bzw. parametrialen Fettdepots zeigte die Wurfgröße im Alter von 80 Tagen bei männlichen und weiblichen Wistarratten keinen signifikanten Einfluß. In der Anzahl der Fettzellen des untersuchten Fettdepots war bei den männlichen Wistarratten zwischen im kleinen und im normalen Nest aufgezogenen Tieren, nicht aber zwischen im großen und im normalen Nest aufgezogenen Tieren ein signifikanter Unterschied erkennbar (s. Tabelle 1.1). Auch die im kleinen Nest aufgezogenen Weibchen hatten deutlich mehr Fettzellen als die im normalen oder großen Nest aufgezogenen Tiere, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Außerdem untersuchten Bassett und Craig in dieser Studie den Einfluß einer Futterreduktion nach einer früh-postnatalen Überernährung, indem sie im Alter von 21 bis 55 Tagen einen Teil der im kleinen Nest aufgezogenen Männchen und Weibchen die durchschnittliche Futterration von im großen Nest aufgezogenen Tieren („*pair-feeding*“) und anschließend bis zum Tag 80 wieder Standardfutter *ad libitum* fütterten. Diese im kleinen Nest aufgezogenen *pair-feeding*-Männchen hatten zwar eine geringere Gesamtfettmenge, jedoch einen höheren prozentualen Fettgehalt als die im kleinen Nest aufgezogenen Männchen mit kontinuierlicher *ad libitum*-Fütterung. Bei den Weibchen dagegen war sowohl der absolute wie prozentuale Fettgehalt der im kleinen Nest aufgezogenen *pair-feeding*-Tiere höher als bei den im kleinen Nest aufgezogenen Weibchen mit kontinuierlicher *ad libitum*-Fütterung. Die Adipozyten des epididymalen und parametrialen Fettgewebes der im kleinen Nest aufgezogenen und danach temporär im Futter limitierten Tiere waren im Vergleich zu denen aller anderen Aufzuchtarten größer, jedoch war ein signifikanter Unterschied nur bei den *pair-feeding*-Weibchen aus dem kleinen Nest im Vergleich zu den im großen Nest aufgezogenen *ad libitum*-Tieren erkennbar. Die Anzahl der Adipozyten der im kleinen Nest aufgezogenen *pair-feeding*-Tiere war reduziert und entsprach in etwa der von im großen Nest aufgezogenen und danach *ad libitum*-gefütterten Männchen und Weibchen.

Im Gegensatz zu diesen Arbeiten an Ratten, die alle nur Veränderungen an bestimmten Fettdepots untersuchten, wurde an Mäusen auch die Veränderung des Gesamtkörperlipidgehaltes nach Manipulation der Wurfgröße untersucht. Bei männlichen und weiblichen Mäusen eines schweizerischen Stammes (Swiss Orl-Orléans la Source), die entweder im kleinen (4 Welpen), normalen (9 Welpen) oder im großen Nest (20 Welpen) aufgezogen wurden, war der Gesamtkörperlipidgehalt der im Alter von sechs Monaten im kleinen bzw. großen Nest aufgezogenen Tiere signifikant höher bzw. niedriger als der von im normalen Nest aufgezogenen Mäusen. Zudem zeigte sich bei den Weibchen in diesem Alter ein inverser Zusammenhang zwischen Wurfgröße und Adipozytengröße und -anzahl (Aubert et al. 1980).

Insgesamt (s. Tabelle 1.1) zeigen die an verschiedenen Zuchtlinien und mit verschiedenen Strategien der Futterversorgung durchgeführten Studien zum Einfluß der frühpostnatalen Ernährung, die durch Veränderungen der Wurfgröße während der Säugephase manipuliert wurden, zwar eine generelle Tendenz zur Vergrößerung der Fettspeicher mit abnehmender Wurfgröße, jedoch sind die Änderungen im Vergleich zur normalen Wurfgröße oft nicht signifikant und die Interaktionen der frühpostnatalen Ernährung mit späteren Änderungen in der Ernährung nicht einheitlich.

Zitat	Stamm	Sex	Futter nach dem Absetzen	Versuchsende [Monate]	Körpermasse	Fettmenge		Adipozyten	
						absolut	prozentual	Größe	Anzahl
Aubert (1980)	M	m	FF	6	KN > NN > GN	KN > NN > GN ^x	KN > NN > GN	–	–
		w	FF	6	KN > NN > GN	KN > NN > GN ^x	KN > NN > GN	KN > NN > GN	KN > NN > GN
Harris (1980a)	P	m	FF	7	KN > NN > GN	KN > NN > GN [*]	KN > NN > GN ^{**}	KN = NN > GN	KN = NN = GN
			FR		NN > GN	NN > GN [*]	NN > GN ^{**}	NN = GN	NN = GN
Harris (1980b)	W	m	FF	6	KN > NN > GN	KN < NN > GN [*]	KN < NN > GN ^{**}	KN < NN > GN	KN > NN > GN
			FR		NN > GN	NN > GN [*]	NN > GN ^{**}	NN > GN	NN > GN
Bassett & Craig (1988)	W	m	FF	3	KN > NN > GN	KN > NN = GN ^o	KN > NN = GN	KN = NN = GN	KN > NN = GN
		w	FF	3	KN = NN > GN	KN > NN = GN ^o	KN > NN = GN	KN = NN = GN	KN > NN = GN
Hausberger & Volz (1984)	SD	w	FF	10	KN = NN > GN	KN > NN > GN ⁺	KN > NN > GN	KN > GN	KN > GN
			HF		KN > GN	KN > NN > GN ⁺	KN = NN = GN	KN = NN = GN	KN = NN = GN

Tab. 1.1: Vergleich der wichtigsten Ergebnisse aus verschiedenen Arbeiten, in denen neben der Körpermasse auch der Fettgehalt adulter männlicher (m) und weiblicher (w) Tiere untersucht wurde, die im kleinen (KN), normalen (NN) und großen (GN) Nest aufgezogen wurden. M: Mäuse, P: pigmentierte Ratten, W: Wistarratten und SD: Sprague-Dawley-Ratten. >: signifikante Unterschiede; >: deutliche numerische Unterschiede, die das Signifikanzniveau nicht erreichen oder für die Signifikanzangaben fehlen. FF: freier Zugang zum Futter während des gesamten Versuchszeitraums, FR: Futterreduktion von d21 bis d84 mit anschließender ad libitum-Fütterung, HF: fettreiche Diät ab d126 bis Versuchsende. ^xGesamtkörperlipid ^{*}Summe des abdominalen, scapulären, epididymalen und perirenenal Fettgewebes; ^{**}Angaben sind prozentual auf Protein bezogen; ^oepididymales bzw. parametriales Fettgewebe; ⁺Summe des inguinalen und renal-parametriaalen Fettgewebes.

Zum Einfluß der Wurfgröße auf Parameter, die mit dem Körperfettgehalt assoziiert sind, liegen ebenfalls Untersuchungen vor. Wistarratten, die im kleinen Nest (4 Welpen) aufgezogen wurden, wiesen im Vergleich zu im normalen Nest (10-12 Welpen) aufgezogenen Tieren in der Säuglingsphase eine Leptinresistenz und beim Absetzen einen erhöhten Körperfettgehalt auf (Schölch 2001). Analog zum bekannten Zusammenhang zwischen Adipositas und Insulinresistenz zeigte sich bei als Welpen, durch Reduktion der Wurfgröße (4 Welpen), überernährten Wistarratten, eine frühe postnatale Hyperinsulinämie sowie eine verminderte Glukosetoleranz, die bis ins Erwachsenenalter erhalten blieben (You et al. 1990, Plagemann et al. 1992). Außerdem waren diese Tiere empfänglicher für einen streptozotozin-induzierten Diabetes mellitus im Erwachsenenalter. Eine frühe postnatale Unterernährung (19 Welpen pro Nest) senkte andererseits nicht das Risiko für streptozotozin-induzierten Diabetes mellitus bei den adulten Tieren (You et al. 1990). Weiterhin zeigten die im kleinen Nest (3-4 Welpen) aufgezogenen Wistarratten im Alter von 240 Tagen einen erhöhten systolischen Blutdruck und damit ein erhöhtes cardiovasculäres Risiko im Vergleich zu denen im normalen (12 Welpen) und großen Nest (20-24 Welpen) aufgezogenen Tieren (Plagemann et al. 1992).

1.3.2 Die heterozygote Zuckerratte als Versuchsmodell

Im Jahr 1961 wurde von Zucker und Zucker erstmals eine Mutation beschrieben, die bei Kreuzungstieren des Sherman Rattenstammes mit dem Merck Stamm M spontan aufgetreten war (Zucker & Zucker 1961). Der aus heterozygoten Tieren abgeleitete Rattenstamm wird heute als Merck Strain 13M oder nach den Erstbeschreibern als „Zuckerratten“ bezeichnet. Die *fatty*-Mutation ist eine Punktmutation, die dazu führt, daß in der extrazellulären Domäne, die allen bekannten Spliceformen LEPR gemeinsam ist (Ahima & Flier 2000, Wang J et al. 1998), die Aminosäure Glutamin gegen Prolin ausgetauscht wird. Die Mutation bedingt eine reduzierte Expression des *Lepr* (Crouse et al. 1998, da Silva et al. 1998), außerdem sinkt die hypothalamische Leptinbindung in Abhängigkeit von der Gendosis (Schmidt et al. 2000). Die Folge des Rezeptordefektes ist eine lebenslange exzessive Fettakkumulation, die beim adulten homozygoten Tier (*fa/fa*) zu extremer Adipositas und damit zu einer Vielzahl weiterer Stoffwechselstörungen führt (Zucker & Zucker 1961, Bray 1977).

Die heterozygoten Tiere (*+fa*) unterscheiden sich unter Standardbedingungen phänotypisch andererseits kaum von den Wildtyp-Tieren (*+/+*), so daß zunächst von einem rezessiven Erbgang dieser Mutation ausgegangen wurde (Zucker & Zucker 1961). Nachdem es gelang,

$+/+$ und $+fa$ Zuckerratten genotypisch zu unterscheiden (Smoller et al. 1993), war es erstmals möglich, zweifelsfrei zu zeigen, daß die Auswirkung des Leptinrezeptordefektes keinem rein rezessiven Erbgang folgt. So ist bei Vorhandensein nur eines *fa*-Allels in der ersten Lebenswoche ein kodominanter und in der dritten Lebenswoche ein partiell rezessiver Einfluß auf das Körperwachstum und den Körperfettgehalt nachweisbar (Truett et al. 1995, Schwarzer et al. 1997, Olbort 1998, Kraeft et al. 1999). Ein deutlicher Gendosis-Effekt ist auch in der Plasmaleptinkonzentration sowohl bei Neonaten wie bei adulten Weibchen erkennbar (Hufnagel et al. 1999, Zhang et al. 2001, Cleary & Phillips 1999a). Die heterozygote Zuckerratte ist aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Umwelteinflüssen ein nützliches Modell zur Betrachtung von Gen-Umwelt-Interaktionen bei der Entwicklung von Adipositas, wie sich z.B. bei einer Manipulation der Wurfgröße und damit der frühen postnatalen Ernährung zeigt (Schmidt et al. 2001). Im kleinen Nest (4 Welpen) aufgezogene Wildtyp- und heterozygote Zuckerratten zeigten gegenüber im normalen Nest (10-12 Welpen) aufgezogenen Tieren beim Absetzen eine gesteigerte Fettakkumulation, wobei diese bei den heterozygoten Tiere stärker ausgeprägt war. Bei den heterozygoten Tieren zeigte sich außerdem eine relative Hyperleptinämie, die mit einer Leptinresistenz assoziiert war, die zu einer nahezu vollständigen Insensitivität gegenüber exogen appliziertem Leptin führte (Schölch 2001). Bei jungen adulten Zuckerratten ist ein Heterozygoteneffekt auf die Körpermasse nur nach einer hochkalorischen Diät bei Männchen, nicht aber bei Weibchen erkennbar (Maher et al. 1996). Ein weiterer Heterozygotenunterschied zeigt sich in der genannten Studie nach einer gemeinsamen Auswertung der Daten des perirenal Fettgehalts von Männchen und Weibchen sowohl bei Standardfutter als auch nach einer hochkalorischen Diät.

1.4 Bestimmung der Körperzusammensetzung

1.4.1 Historie

Bereits 1857 erkannte v. Bezold, daß das Gesamtkörperwasser mit dem Älterwerden sinkt und speziesspezifische Unterschiede aufweist (v. Bezold 1857). Moulton untersuchte 1922 die Zusammensetzung der fettfreien Masse von der Frühembryonalphase bis zur Reife bei Rindern und Menschen. Dabei fand er, daß der Wassergehalt der fettfreien Körpermasse (FFM²) von

² In einigen Arbeiten entspricht die fettfreie Masse der lean body mass (LBM), manchmal wird auch zwischen FFM und LBM unterschieden, wobei die LBM noch essentielle Lipide z.B. Lecithin, Phospholipide enthält (Sheng & Huggins 1979).

der Konzeption bis zur Geburt rapide sinkt, um anschließend bis zum Erreichen einer konstanten Konzentration langsamer abzunehmen. Diesen Zustand der konstanten Konzentration von Wasser, Salz und Proteinen in fettfreien Zellen nannte Moulton chemische Zellreife (Moulton et al. 1922). Moulton beobachtete außerdem, daß der Gesamtwassergehalt bei der Geburt mit dem Grad der Entwicklung zum Zeitpunkt der Geburt korreliert. So zeigen Meerschweinchen, die relativ reif geboren werden, einen deutlich niedrigeren Gesamtwassergehalt als die relativ unreifen Ratten und Mäuse (76% statt 88%). Neugeborene Menschen, Schweine, Hunde und Katzen, deren Reife bei der Geburt zwischen diesen beiden Gruppen in der Entwicklung liegt, zeigen erwartungsgemäß auch einen mittleren Gesamtwassergehalt (Moulton 1923). Pace und Rathbun legten 1945 einen Meilenstein, als sie Daten ihres Versuchs (Meerschweinchen) und anderer Veröffentlichungen (Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen, Hunde und Affen) auswerteten und den Schluß zogen, daß im Gegensatz zu dem Gesamtwassergehalt, der Wassergehalt in Bezug auf die fettfreie Masse relativ konstant sei. Sie berechneten für die genannten Tierarten einen gemeinsamen Mittelwert für den Wassergehalt der fettfreien Körpermasse, der bei den adulten Tieren $73,2\% \pm 3,1$ betrug, der Wassergehalt der fettfreien Körpermasse bei Ratten betrug dabei 71,8-74,4%. Bei bekanntem Gesamtkörperwassergehalt (GKW) kann diese Konstante für die Berechnung des Fettgehalts verwendet werden. Da sich die Körpermasse aus den Anteilen Fett, fettfreie Körpermasse (FFDM) und GKW zusammensetzt, läßt sich die FFDM ebenso wie die Fettmasse und der prozentuale Fettgehalt bei Kenntnis des prozentualen Wassergehaltes berechnen. Für die genaue Bestimmung der Körperzusammensetzung muß jedoch bedacht werden, daß Pace und Rathbun einen Mittelwert von verschiedenen Tierarten gebildet haben, und daher für jedes Tierversuchsmodell eine individuelle Konstante ermittelt werden muß.

1.4.2 FFM-Hydration und Bestimmung des Körperfettgehalts

Die oben dargelegten Untersuchungen führten zu dem heutigen Kenntnisstand, der sich wie folgt zusammenfassen läßt. Der Organismus besteht bezogen auf die Körpermasse zu 45-75% aus Wasser (Boylan et al. 1970). Diese große Variabilität des Wassergehaltes beruht auf dem unterschiedlich großen Fettgehalt, da Fettgewebe relativ wenig Wasser enthält (Pitts 1963). Dagegen ist das Verhältnis des Körperwassergehalts zur fettfreien Körpermasse bei Erwachsenen und den meisten adulten Säugetieren konstant (Pace & Rathbun 1945). Wang nennt dieses Verhältnis auch FFM-Hydration (Wang Z et al. 1999). Da der GKW zwar abnimmt, aber die FFM-Hydration im Alter relativ konstant ist, muß die Änderung des GKW auf eine veränderte Körperfettmasse zurückzuführen sein (Schoeller 1989).

Die genaueste Methode die Körperzusammensetzung zu bestimmen ist die physikalisch-chemische, d. h., *post mortem*. Für die Messung an lebenden Tieren und Menschen muß auf indirekte Meßverfahren zurückgegriffen werden. Als relativ genaue Methoden gelten die Dual Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA), Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT). Bei der Bioelektrischen Impedanzanalyse (BIA) kann biologische Zellmasse, Fett- und Wassergehalt mittels eines im Körper zirkulierenden schwachen Stromflusses bestimmt werden. Der gemessene Widerstand, den der Körper dem Stromfluß entgegenbringt, gibt Aufschluß über die Zusammensetzung des Körpers. Dabei ist der Widerstand umso geringer, je höher der Wassergehalt und damit die Elektrolytenkonzentration ist. Allerdings müssen für reproduzierbare Ergebnisse die Meßbedingungen konstant sein. So können der Füllungszustand des Magen-Darm-Traktes und der Harnblase das Ergebnis verfälschen. Ähnlich der BIA ist das **Total Body Electrical Conductivity (TOBEC[®])**-Meßverfahren. Beim TOBEC[®]-Verfahren wird die Energieabsorption in einem elektromagnetischen Feld und nicht der Widerstand gemessen. Auch hier können der Füllungszustand des Magen-Darm-Traktes und der Harnblase die Messungen beeinflussen. Dieses Verfahren findet in der Forschung bei vielen Versuchstieren Verwendung (Bracco et al. 1983, Cunningham et al. 1986, Roby 1991).

1.5 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel dieser Untersuchung war es, die Langzeitwirkung von Manipulationen der Wurfgröße auf den Körperfettgehalt sowie den Plasmaleptin- und Plasmainsulinspiegel von Zuckerratten zu ermitteln. Nachdem in vielen vorhergehenden Studien nur Unterschiede zwischen der Adiposität³ von adulten Ratten beobachtet wurden, die in der Säuglingsphase über- bzw. unterernährt wurden, jedoch nicht zwischen über- und normalernährten Tieren, wurde in dieser Arbeit besonderer Wert auf den Vergleich mit unmanipulierten Tieren gelegt. Als Versuchstiere dienten Wildtyp- und heterozygote Zuckerratten, um ermitteln zu können, inwiefern genetische Unterschiede, die bei normalen Aufzuchtbedingungen nur zu subtilen phänotypischen Unterschieden führen, sich bei Veränderungen der frühpostnatalen Umwelteinflüssen stärker ausprägen.

³ Adiposität ist in dieser Arbeit als Ausdruck für den Füllungszustand der Fettspeicher inklusive der damit verbundenen Struktureigenschaften und zellulären Charakteristika zu verstehen.

Zudem wurde untersucht, inwieweit eine Überernährung im adulten Tier mit den frühpostnatalen Ernährungseinflüssen interagiert. Dafür wurde zunächst als Ausgangswert, die Körperzusammensetzung im Alter von 150 Tagen an lebenden Tieren mittels TOBEC[®] bestimmt sowie der Plasmaleptin- und Plasmainsulinspiegel gemessen. Anschließend bekamen die Tiere sechs Wochen lang eine hochkalorische Diät zusätzlich zum Standardfutter angeboten. Am Versuchsende wurde die Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels TOBEC[®] wiederholt und neben den Hormonspiegeln auch die Körperzusammensetzung durch Trocknung bis zur Gewichtskonstanz und anschließende Chloroform-Extraktion ermittelt. Dabei wurde die als genauestes Verfahren bekannte Bestimmung der Körperzusammensetzung durch die physikalisch-chemischen Methode verglichen mit a) der Zuverlässigkeit der TOBEC[®]-Messung, b) einer Abschätzung der Körperzusammensetzung aus der Körpermasse und c) einer rechnerischen Ermittlung des Körperfettgehalts mittels FFM-Hydrationsfaktor. Durch Korrelation der untersuchten Parameter mit der Körpermasse beim Absetzen wurde untersucht, welche Zusammenhänge sich zwischen diesen Größen ergaben. Ergänzend wurde die Auswirkung der Interaktion zwischen Reduktion der Wurfgröße und dem Brutpflegeverhalten des Muttertiers auf die Adiposität beim Absetzen durch Austausch von Zuckerratten- bzw. Wistarrattenmüttern mit Ammen des anderen Stammes ermittelt, um zu testen, inwieweit in späteren Untersuchungen größere initiale Unterschiede im Körperfettgehalt beim Absetzen erzeugt werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle in dieser Studie verwendeten Zucker- und Wistarratten stammten aus etablierten Zuchtkolonien des W.G.-Kerckhoff-Instituts in Bad Nauheim. Die eingesetzten Zuckerratten sind dabei Nachkommen einer Auszuchtlinie von reinerbigen Zuckerratten (13M), die 1985 von der University of California in Santa Barbara dem Institut gespendet wurden und die wiederum direkt von Zuckerrattenkolonien der University of California in Davis und dem Vassar College in Poughkeepsie, NY abstammten. Die Wistarratten stammten von einer Auszuchtlinie, die im Institut aus Inzucht-Wistarratten der Charles River Laboratories, Sulzfeld aufgebaut worden war, indem die aus der Verpaarung im Institut resultierenden Weibchen mit zugekauften Männchen (Charles River Laboratories, Sulzfeld) verpaart wurden.

Die Ratten wurden in einem fensterlosen Raum bei 22°C und einer relativen Luftfeuchte von 55-60 % gehalten. Die Versorgung der Tiere erfolgte in der Regel am Ende der Lichtphase (Hell- zu Dunkelphase: 12:12 Stunden). Adulte Ratten wurden in Gruppen bis zu vier Tieren in Makrolon-Käfigen (Größe M4, EBECO, Castrop-Rauxel) auf Holzgranulatreinstreu (ALTROMIN, Lage) gehalten. Trächtige Weibchen wurden ab Tag 16 der Gravidität einzeln in Käfige (Größe M3, EBECO, Castrop-Rauxel) gesetzt, in denen sie bis zum Ende der Laktation mit ihren Jungtieren verblieben. Sie erhielten eine pelletierte Zuchtdiät (Altromin 1314, ALTROMIN, Lage) sowie Wasser *ad libitum*. In einer Versuchsserie erhielten die Tiere ab einem Alter von fünf Monaten zusätzlich zu dem Standardfutter als hochkalorisches Futter kommerzielle Schokolade (Capriccio der Firma WISSOL, im wöchentlichen Wechsel Vollmilch, Erdbeersahne und Nuß, Mühlheim a. d. R.) *ad libitum*.

Bei der Zuckerrattenzucht wurden ausschließlich $+/+ \times +/fa$ Kreuzungen durchgeführt, so daß jeweils beide Genotypen in einem Wurf vorkamen. Die Zuckerratten-Weibchen haben einen viertägigen Zyklus, der durch tägliche Vaginalabstriche beurteilt wurde. Bei einem frühen Östrus wurden die Weibchen zu den Männchen gesetzt, und am nächsten Morgen konnte ein erfolgreicher Deckakt mit Spermien im Vaginalabstrich nachgewiesen werden. Ab dem 16. Gestationstag konnte visuell die Gravidität bestätigt werden. Für die Zucht der Wistarratten wurden die Weibchen zu je einem Männchen gesetzt und bis zur visuellen Bestätigung der Gravidität bei diesem belassen.

2.2 Protokoll der Versuchsserien

Die Aufzucht der Jungtiere erfolgte in unterschiedlichen Serien, bei denen die Ernährung vor und nach dem Absetzen variiert wurde.

2.2.1 Versuchsserie I - Langzeiteinfluß der frühpostnatalen Ernährung

In dieser Versuchsserie dienten Wildtyp- und heterozygote Zuckerratten als Versuchstiere, um ermitteln zu können, inwieweit genetische Unterschiede der Zuckerratten, die bei normalen Aufzuchtbedingungen nur zu subtilen phänotypischen Unterschieden bei adulten Tieren führen, sich bei Veränderungen der frühpostnatalen Umwelteinflüsse stärker ausprägen. Am ersten Tag *post natum* (*p.n.*) wurden alle Welpen durch eine subcutane Injektion in die Pfoten mit schwarzer Tusche (Scriptol, PELIKAN, Hannover) nach einem bestimmten Nummerncode markiert. Anschließend wurde ihnen zur Genotypisierung eine Schwanzbiopsie entnommen. Ab Tag 3 *p.n.* wurden, um über- bzw. unterernährte Welpen zu erhalten, Gruppen (1-4, Tabelle 2.1) gebildet, die jeweils aus ein bis zwei Nestern mit je



Abb. 2.1: Laktierende Zuckerrattenmutter mit normalen Wurf

3-4 Welpen und einem Nest mit 9-12 Welpen bestanden, die untereinander „rotiert“ wurden. D. h., die Nester wurden täglich zwischen den Müttern ausgetauscht, so daß jede Mutter abwechselnd an einem Tag ein normales Nest (9-12 Welpen) und an dem folgenden (bzw. den beiden folgenden) Tag(en) ein kleines Nest (3-4 Welpen) zu säugen hatte. Diese „Rotation“ der Nester gewährleistete, daß der Ernährungsstatus allein durch das Milchvolumen und nicht durch die unterschiedliche Milchezusammensetzung der verschiedenen

	Genotyp Männchen		Genotyp Weibchen	
	+/+	+/fa	+/+	+/fa
Gruppe 1				
KN 1	2	2	-	-
KN 2	-	-	2	2
UN	3	3	3	3
Gruppe 2				
KN			2	2
UN	2	4	4	2
Gruppe 3				
KN 1	2	-	2	-
KN 2	1	1	1	1
UN	-	3	4	2
Gruppe 4				
KN 1	1	1	1	-
KN 2	-	2	-	1
UN	1	3	2	4
Gruppe 5				
KN 1	2	2	-	-
KN 2	-	2	-	2
KN 3	1	1	1	1
Gruppe 6				
NN 1	4	2	5	1
NN 2	1	3	6	2
NN 3	4	1	5	1
NN 4	2	5	1	2
NN 5	4	5	2	1
NN 6	3	3	4	2

Tab. 2.1: Übersicht über die Verteilung der Genotypen von männlichen und weiblichen Zuckerratten der Versuchsserie I bei Versuchsbeginn. Die Wildtyp- (+/+) und heterozygoten (+/fa) Tiere wurden als Welpen über- (KN), unter- (UN) bzw. normal ernährt (NN).

Muttertiere entscheidend beeinflußt wurde. Bei der Reduzierung der Würfe wurde darauf geachtet, daß Genotyp und Geschlecht möglichst gleichmäßig verteilt waren (s. Tabelle 2.1). Um eine genügende Anzahl von Tieren der beiden Genotypen pro Geschlecht für die statistische Auswertung zu erhalten, wurden nachträglich drei kleine Nester gebildet, die nicht rotiert wurden (Gruppe 5). Da die Werte dieser Tiere bei den untersuchten Parametern jeweils im selben Bereich lagen wie die der als Welpen überernährten Tiere aus den Gruppen 1-4 konnten die Daten gemeinsam ausgewertet werden. Als Vergleich zu diesen über- bzw. unterernährten Welpen dienten als normal ernährte Gruppe sechs Nester mit 10-12 Welpen (siehe Abbildung 2.1), die alle während der gesamten Aufzucht bei einer Mutter blieben (Gruppe 6). Im Alter von 21 Tagen wurden die Welpen von den Müttern abgesetzt und ab einem Alter von 30 Tagen nach Geschlechtern getrennt aufgezogen. Im Alter von 150 Tagen wurde mittels TOBEC[®] ihre Körperzusammensetzung bestimmt, danach erhielten die Tiere zusätzlich zum Standardfutter als hochkalorisches Futter Schokolade *ad libitum*. Im Alter von 190 Tagen wurden die Tiere dekapitiert und ihre Körperzusammensetzung danach nochmals mittels TOBEC[®] bestimmt. Anschließend erfolgte die physikalisch-chemische Analyse der Körperzusammensetzung (s. 2.4.1.2).

2.2.2 Versuchsserie II - Aufzucht mit Ammen eines anderen Stammes

In dieser Versuchsserie wurden ab Tag 1 *p.n.* Zuckerrattenwelpen durch Wistarratten-Ammen und Wistarrattenwelpen durch Zuckerratten-Ammen im kleinen Nest (4 Welpen) aufgezogen. Außerdem wurden alle Welpen am ersten Tag *p.n.* mit schwarzer Tusche tätowiert und den Zuckerrattenwelpen zusätzlich eine Schwanzbiopsie zur Genotypisierung entnommen. Am Tag 3 *p.n.* wurden die Würfe auf vier Welpen so reduziert, daß jeweils 2 *+/+* und 2 *+/fa*-Tiere eines Geschlechts in einem Nest zusammen waren. Nur bei einem Nest mit Männchen zeigte sich, nach einer Nachbestimmung des Genotyps, daß es aus nur einem Wildtyp-Tier und drei heterozygoten Tiere zusammengesetzt war. Am Tag 21 *p.n.* wurden die Welpen, nachdem sie ca. 2 Stunden vor der Tötung (0-1,5 h nach Beginn der Dunkelphase) mit Futter und Wasser einzeln gesetzt wurden, für 30 Sekunden mit CO₂ narkotisiert und dekapitiert. Als Vergleich wurden zuvor erhobene Daten von Wistar- und Zuckerratten verwandt, die im kleinen bzw. normalen Nest von Müttern des gleichen Stammes aufgezogen worden waren (Schölch 2001). Anschließend erfolgte die physikalisch-chemische Analyse der Körperzusammensetzung (s. 2.4.1.2).

2.3 Präparationen

2.3.1 Gewinnung von Plasma

Im Alter von 150 Tagen wurde den Tieren der Versuchsserie I in der Mitte der Lichtphase retrobulbär Blut entnommen, um den Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinspiegel vor Beginn der Zusatzfütterung zu bestimmen. Nach einer leichten Betäubung (CO₂/O₂-Gasgemisch im Verhältnis 3:1) wurde mit einem Hämatokritröhrchen schräg in den medialen Augwinkel eingestochen und ca. 1 mL Blut (< 7% des Gesamtvolumens) aus dem retroorbitalen Venensinus in Heparin-Natrium (Liquemin 5000, HOFFMANN-LA ROCHE, Grenzach-Wyhlen) in einem Verhältnis von ungefähr 10:1 aufgefangen, gewogen und sofort eiskühlt. Das Blut wurde bei 4500 U/min und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Durch das Abpipettieren des Plasmas von den Blutzellen sowie das Wiegen der festen und flüssigen Bestandteile konnte die Verdünnung des Plasmas durch das Heparin bestimmt werden. Der resultierende Verdünnungsfaktor diente zur Korrektur der Meßwerte bei der späteren Bestimmung des Plasmaleptin- und Plasmainsulinspiegels. Bis zur Messung der Plasmaparameter wurde das Plasma in geeigneten Aliquots bei - 80°C gelagert. Mit dem am Tag 190 nach der Dekapitierung in der Mitte der Lichtphase aus dem Torso austretendem Blut wurde wie oben verfahren.

2.3.2 Eviszeration zur Bestimmung der Körperzusammensetzung

Die Eviszeration sollte ausschließen, daß die in Ingesta und Kot enthaltenen Stoffe die Bestimmung der Körperzusammensetzung beeinflussen. Für die Laparotomie lag der Tierkörper auf dem Rücken, um den Bauch entlang der *Linea alba* und des Rippenbogens eröffnen zu können. Die Milz wurde, der großen Magenkurvatur folgend, stumpf freipräpariert. Nach Durchtrennung des *Oesophagus* und des *Ligamentum hepatogastricum* wurden der Magen und der Dünndarm entnommen, wobei beachtet wurde, daß Milz, Gekröse und Bauchspeicheldrüse im Tierkörper verblieben. Der restliche Darm wurde vom Rectum ausgehend stumpf vom Gekröse getrennt und ebenfalls entfernt. Die Harnblase wurde eröffnet und der eventuelle Inhalt nach außen entleert. Zur schnelleren Trocknung des Tierkörpers wurde der Brustkorb in der Medianen aufgeschnitten und nach lateral geöffnet. Bei den adulten Tieren wurde der Tierkörper außerdem noch in zwei Teile zerteilt, um die Trocknung zu beschleunigen.

2.4 Analyseverfahren

2.4.1 Bestimmung der Körperzusammensetzung

2.4.1.1 *Physikalische Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels EM-Scan/ TOBEC®*

Die Bestimmung der Körperzusammensetzung mit Hilfe des TOBEC®s (EM-SCAN Inc., Springfield, IL., USA, Modell SA3057) ist ein etabliertes Verfahren. Dieses Verfahren wurde für die Tiere der Versuchsserie I angewandt. Das Prinzip dieser Bestimmung, die Messung eines Körpers in einem elektromagnetischen Feld, beruht auf dem Harkerschen Prinzip von 1973. Grundlage dieses Prinzips ist, daß ein leitfähiger Körper in einem elektromagnetischen Feld mit einer Frequenz im Radiowellenbereich (30 kHz-900 MHz) Energie absorbiert. Der Grad der Absorption hängt vom Widerstand bzw. von der temperaturabhängigen Leitfähigkeit des zu messenden Körpers ab. So ist die Energieabsorption in stark leitfähigen Metallen (hier durchdringt die Energie das Metall zu schnell um absorbiert zu werden) oder in Geweben mit hohem Widerstand (Luft, Fell, Körperfett, Kunststoffe, in die die Energie nur schlecht eindringen und damit absorbiert werden kann) sehr gering im Gegensatz zu der Absorption in gering bis mittelmäßig leitfähigen Materialien (z.B. hydriertes, fettarmes Gewebe). Die Leitfähigkeit wiederum hängt von Temperatur und Geometrie des zu messenden Körpers ab. Bei sinkender Temperatur nimmt die Leitfähigkeit ab, deshalb muß darauf geachtet werden, daß bei der Messung die Körpertemperatur nicht mehr als $\pm 2^{\circ}\text{C}$ von der Normaltemperatur abweicht. Die Geometrie des Körpers legt den Umfang der Interaktion zwischen Magnetfeld und leitfähigem Volumen fest. Im Körper beruht die Leitfähigkeit im wesentlichen auf den im Körperwasser gelösten Kalium-, Natrium- und Chloridionen. In der fettfreien Körpermasse liegen das extrazelluläre Natrium und das intrazelluläre Kalium in ähnlichen Konzentrationen vor, somit können Extra- und Intrazellulärer Raum als elektrisch äquivalent angesehen werden. Demnach produziert ein elektrisches Potential innerhalb eines Frequenzbereichs in einem definiertem Volumen sowohl im Extra- wie im Intrazellulären Raum einen ähnlichen Stromfluß. Im Gegensatz dazu fließt bei dem gleichen Potential durch das gleiche definierte Volumen Fett oder Knochen viel weniger Strom. Besonders deutlich unterscheidet sich die fettfreie Masse von dem wasserarmen Körperfett bei einer Frequenz von 10 MHz.

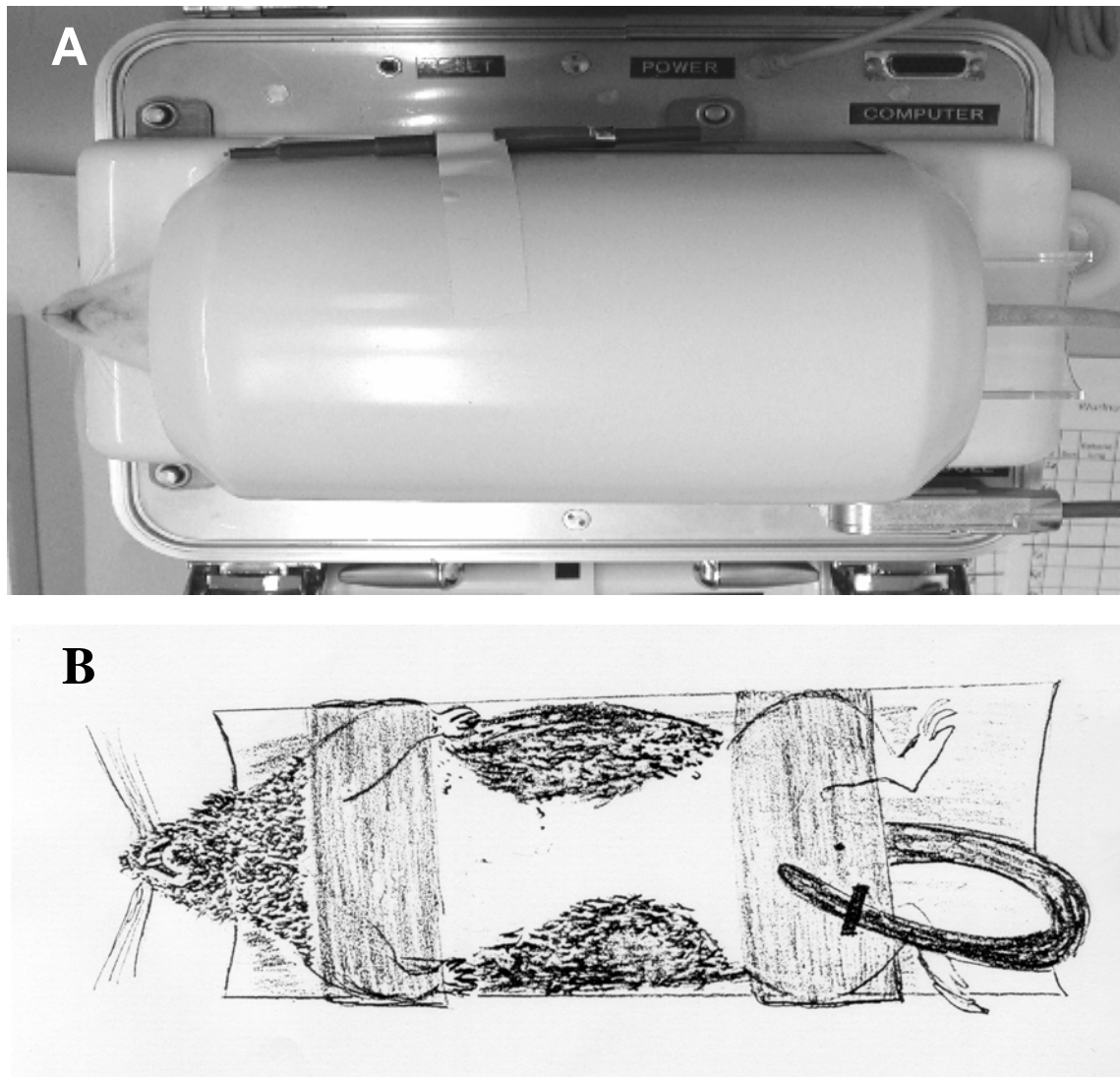


Abb. 2.2: *A: Messung einer Wistarratte im TOBEC[®]. B: Fixierung einer Zuckerratte auf dem Träger.*

Das TOBEC[®] besteht aus einer zylindrischen Spule, die zugleich als Transmitter und Receiver fungiert. Wird nun ein sinusförmiger Strom bei 10 MHz durch diese Spule geführt, entsteht ein alternierendes elektromagnetisches Feld. Befindet sich ein leitfähiger Gegenstand in diesem Feld, so werden in ihm, getreu der Lenzschen Regel, Wirbelströme induziert. Diese Wirbelströme sind mit der Energieabsorption gleichzusetzen und ihre Größe ist von der Magnetfeldstärke, der Leitfähigkeit des zu messenden Materials und der Geometrie des Stromweges abhängig. Der Energieverlust ist kumulativ und nimmt mit der Masse des zu messenden Körpers zu. Mit der folgenden Formel kann die absorbierte Energie (E) berechnet werden:

$$E = k \cdot A^2 \cdot B \cdot c$$

wobei k: Vereinigung von mehreren Konstanten

A: Fläche des gemessenen Stromabschnitts

B: Magnetfeldstärke

c: Leitfähigkeit dieses definierten Volumens bei dieser Frequenz ist.

Es wurde von den Tieren der Versuchsserie I im Alter von 150 und 190 Tagen nach der Blutentnahme die Körperzusammensetzung mit Hilfe des TOBEC[®] bestimmt. Um eine weitgehende Leerung des Magen-Darm-Trakts zu erreichen, bekamen die Tiere am Vortag ca. 1 Stunde vor dem Ausschalten des Lichts (Beginn der Aktivitätsphase) das Futter bzw. einen weiteren Tag davor die Schokolade (nur d190) entzogen. Dies ist wichtig, da auch die Ingesta elektrisch wirksam sind. Für die Messung war eine leichte Betäubung (CO₂/O₂-Gasgemisch im Verhältnis 3:1) nötig, weil die Tiere gestreckt in Rückenlage auf einen Träger mit Leuko-Fix[®] (BEIERSDORF AG, Hamburg) fixiert werden mußten (siehe Abbildung 2.2). Da die Meßgenauigkeit bei weitgehender Ausfüllung der Meßkammer größer ist (Geometrie des zu messenden Körpers) und aus Kostengründen nur eine Meßkammer verwendet werden konnte, wurde als Kompromiß eine Meßkammergröße verwendet, die für die Messung der Männchen etwas zu kurz und für die Weibchen etwas zu groß war. Da in verschiedenen Arbeitsgruppen die Körperzusammensetzung ohne den Kopf der Tiere bestimmt wird, wurden um die Messungen vergleichen zu können alle Tiere mit dem Kopf außerhalb der Röhre gemessen. Jedes Tier wurde fünfmal gemessen, wobei die Meßwerte (E) nicht mehr als drei Prozent voneinander abwichen.

2.4.1.2 Physikalische–chemische Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels Trocknung und Entfettung der Tierkörper

Nach der Eviszeration wurden die Tierkörper zur Ermittlung der Feuchtmasse gewogen, wobei auch das entnommene Blut berücksichtigt wurde. Die Feuchtmasse ist, da Variationen im Füllungszustandes von Magen und Darm wegfallen, eine sehr genaue Bezugsgröße für die Berechnung der weiteren Parameter der Körperzusammensetzung. Die Bestimmung der Körperzusammensetzung erfolgte nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Standardverfahren (Markewicz et al. 1993, Schölch 2001). Die Tierkörper wurden in einem Trockenschrank bei 75°C in Aluminiumschalen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wodurch Wassergehalt und Trockenmasse bestimmt wurden. Anschließend wurden die mumifizierten Tierkörper in stabilem, fettfreiem Filterpapier fest verpackt, durch stumpfen Druck zerkleinert und das Fett mit Chloroform in einer Apparatur nach Soxhlet solange

extrahiert, bis das Chloroform nach ca. 24 Stunden im Extraktionszylinder farblos war. Die vollständig entfetteten Körperfragmente wurden wieder ausgepackt und erneut in Aluminiumschalen getrocknet. Die Endmasse stellt die fettfreie Trockenmasse (FFDM = fat free dry mass) dar. Die Fettmasse wurde berechnet, indem die FFDM von der Trockenmasse subtrahiert wurde. Aus den Wägungen wurden Fett und FFDM sowohl als Absolutwert als auch in Prozent der Feuchtmasse berechnet.

2.4.1.3 Berechnung der Körperzusammensetzung mittels FFM-Hydrationsfaktor

Der Anteil des Körperwassers an der fettfreien Körpermasse ist bei Erwachsenen und den meisten adulten Säugetieren relativ konstant (Pace & Rathbun 1945, Wang Z et al. 1999), so daß bei bekannter Wassermasse die Fettmasse und FFDM berechnet werden können. Die Berechnung der Körperzusammensetzung aufgrund dieser Beziehung sollte in dieser Arbeit als Alternative zu der o. g. Bestimmung des Körperfettgehalts durch Chloroformextraktion untersucht werden. Dafür wurde bei den im Alter von 190 Tagen getöteten Tieren die Körperzusammensetzung, wie oben beschrieben, bestimmt. Der FFM-Hydrationsfaktor (Hf) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Hf} = \text{Wasser [g]} * (\text{Wasser [g]} + \text{FFDM [g]})^{-1}$$

Mit Hilfe des Mittelwertes der einzelnen FFM-Hydrationsfaktoren wurden Fettmasse ($\text{Fettmasse}_{\text{berechnet}} = \text{Feuchtmasse} - \text{Wassermasse} * \text{Hf}^{-1}$) und FFDM ($\text{FFDM}_{\text{berechnet}} = \text{Wasser [g]} * \text{Hf}^{-1} - \text{Wasser [g]}$) berechnet. Die Ergebnisse wurden dann mit den Werten der physikalisch-chemischen Methode verglichen. Zusätzlich wurden Daten von unterschiedlichen Altersstufen aus verschiedenen Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe (Schölch 2001, Hufnagel 2001, Schmidt unveröffentlicht) ausgewertet.

2.4.1.4 Abschätzung der Körperzusammensetzung im Alter von 150 Tagen

Obwohl die Bestimmung der Körperzusammensetzung mit Hilfe des TOBEC[®]s ein etabliertes Verfahren ist, müssen die TOBEC[®]-Meßwerte für jede Versuchsserie durch eine physikalisch-chemische Bestimmung der Körperzusammensetzung kalibriert werden. Voraussetzung für die Berechnung der FFDM und der Körperfettmasse bzw. des Körperfettgehaltes am Tag 150 ist die enge Korrelation dieser Parameter mit dem mittels TOBEC[®]-Verfahren ermittelten E-Wert der Männchen und Weibchen. Da dies in dieser Studie gegeben war (s. 3.2. 2), konnte die Körperzusammensetzung am Tag 150 für die

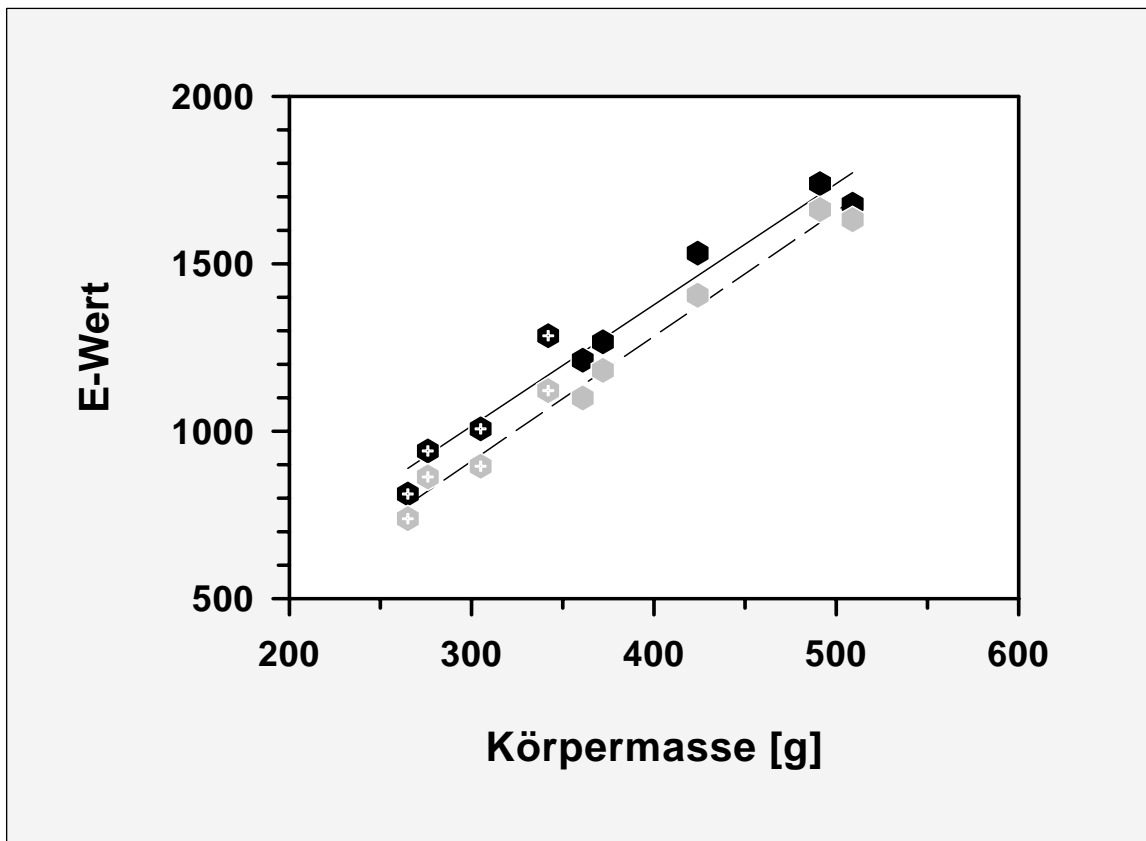


Abb. 2.3: Korrelation von Körpermasse und E-Wert männlicher und weiblicher Wistar-ratten unterschiedlicher Altersstufen. Der E-Wert wurde zunächst nach der Augenblut-entnahme (schwarze Symbole, durchgezogene Linie) und anschließend nach der Dekapi-tierung (graue Symbole, unterbrochene Linie) bestimmt. Korrelationskoeffizient jeweils 0,99.

Männchen und Weibchen der Versuchsserie I mit Hilfe der jeweiligen Regressionsge-
radengleichung für die einzelnen Parameter in Abhängigkeit von dem E-Wert im Alter von
190 Tagen abgeschätzt werden. Wie in einer parallel durchgeführten Diplomarbeit¹ gezeigt
werden konnte, verändert sich der Wassergehalt der fettfreien Körpermasse in dieser
Zeitspanne nur noch wenig, so daß Unterschiede im E-Wert auf Unterschiede im Fettgehalt
zurückgeführt werden können. Da der E-Wert im Alter von 190 Tagen nach der Dekapi-
tierung bestimmt wurde, mußte allerdings berücksichtigt werden, daß die Hydratation durch
die Entblutung beeinflusst wird. Wie eine Testserie an Wistar-ratten unterschiedlichen
Alters und in einem breiten Bereich von Körpermasse-Werten zeigte, sind die E-Wert-
Messungen nach der Dekapitierung mit geringer Variation ($r = 0,99$) parallel zu niedri-
geren Werten verschoben (Abbildung 2.3, Schmidt unveröffentlicht). Somit lassen sich die
Meßwerte nach der Entblutung verlässlich korrigieren, indem nur die Differenz im y-
Achsenabschnitt addiert wird, da die Steigung gleich war.

¹ Quelle: Diplomarbeit B. Petri, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, 2003

2.4.2 Molekularbiologische Genotypbestimmung²

2.4.2.1 Isolierung der DNA aus Gewebe

Aus dem Schwanzgewebe wurde die DNA mittels eines kommerziellen QIAmp Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) isoliert. Die Schwanzproben wurden mit einem Gemisch von jeweils 180 µL ATL-Puffer und 20 µL Proteinase K (Konzentration: 10 mg/mL *Aqua destillata*) versetzt und über Nacht bei 55°C so lange verdaut, bis von der Probe nur noch eine durchsichtige Hülle übrig geblieben war. Anschließend wurde dieser Ansatz mit 200 µL AL-Puffer versetzt, 10 Minuten bei 70°C inkubiert und mit 210 µL absolutem Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde auf eine Minisäule (spin column) pipettiert und bei Raumtemperatur zwei Minuten bei 8000 x g zentrifugiert. Bei diesen Vorgängen bindet die DNA an die Membran der Minisäulen. Dann wurde 500 µL AW1-Puffer auf die Säule gegeben und diese erneut eine Minute zentrifugiert. Nachdem die Minisäule auf ein neues Sammelgefäß gesetzt worden war, wurde dieser Schritt noch einmal mit 500 µL AW2-Puffer wiederholt. Wieder wurde die Minisäule auf ein neues Sammelgefäß gesetzt, mit 50 µL AE-Puffer versetzt und bei 60°C für 5 Minuten inkubiert. Abschließend erfolgte für 3 Minuten bei 8000 x g und Raumtemperatur eine Zentrifugation, bei der die DNA ins Sammelgefäß eluiert wurde.

2.4.2.2 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Jeweils 2 µL isolierte DNA pro Tier wurden mit 48 µL Mastermix versetzt, um einen PCR-Ansatz von 50 µL zu erhalten. Der Mastermix bestand aus 37,25 µL H₂O (Milipore steril), 5 µL PCR-Puffer 10x (PROMEGA, Mannheim), 4µL MgCl₂ (25 mM), 1µL dNTP-Mix (10 mM), 0,25 µL Primer MoBr 8 (100µM) und 0,25 µL Primer MoBr 11 (100 µM), so wie 0,25 µL Taq-Polymerase (1,25 U, Promega Taq).

Die Primer hatten folgende Frequenzen (Chua et al. 1996):

sense Primer MoBr 8: 5'-TAT GGA AGT CAC AGA TGA TGG-3'

antisense Primer MoBr 11: 5'-TCT TAC AAT TGT AGA ATT CTC-3'

Die PCR wurde im Thermocycler (Gene Amp R PCR System 2400, PERKIN ELMER, Weiterstadt) durchgeführt. Es wurden folgende PCR-Bedingungen eingestellt:

² wurde von Kollegen in der Arbeitsgruppe durchgeführt

- A) Denaturierung (melting): 5 min. 94°C
- B) Hybridisierung (annealing):
1. 30 sek. 94°C (60 Zyklen)
 2. 30 sek. 50°C (60 Zyklen)
 3. 30 sek. 72°C (60 Zyklen)
- C) Replikation (synthesis): 7 min. 72°C

Die PCR ergab ein Amplifikat von 112 bp.

2.4.2.3 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau ist notwendig, weil *Lepr^{fa}* eine Punktmutation darstellt, die zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin zu Prolin im Leptinrezeptor führt (Chua et al. 1996). Die daraus resultierende Nukleotidfolge wird durch die Restriktionsendonuklease MSP1 erkannt. Das ursprünglich 112 bp lange DNA-Stück des Amplifikats eines mutierten *fa*-Allels des *Lepr* kann durch MSP1 in kürzere Fragmente von 78 und 34 bp geschnitten werden. Für den Restriktionsverdau wurden 15 µL des durch die PCR erhaltenen Amplifikats mit 0,5 µL MSP1 (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.4.2.3 Elektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 7x8 cm große, vertikale 10%ige Polyacrylamid-Gele verwendet (Mini Protean II-Kammern, BIORAD, München). Es wurden zu jeder 10 µL Probe und 0,7 µL Ladepuffer (6-fach) (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot) gegeben und dann aufgetragen. Die Amplifikate wurden in der Elektrophorese bei 200 V in ca. 20 Minuten aufgetrennt. Dann wurden die Gele 10-15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (5 µL Ethidiumbromid auf 120 mL TBE 0,5-fach) gefärbt. Unter UV-Licht bei 366 nm erfolgte die Auswertung der Elektrophorese-Ergebnisse auf dem Transilluminator. Zur Dokumentation wurde das Gel mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

2.4.3 Radioimmunoassay (RIA)

2.4.3.1 Prinzip

Radioimmunoassays ermöglichen die quantitative Bestimmung von Hormonen in biologischen Flüssigkeiten wie etwa dem Blutplasma. Das Prinzip beruht auf einer kompetitiven Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei die Hormone die Antigene darstellen. Das zu messende Hormon konkurriert dabei mit einem radioaktiv markierten Antigen („Tracer“) um

die Bindung an einen spezifischen Antikörper. Nachdem alle Antikörper an Antigene gebunden sind, werden die freien Antigene entfernt. Die radioaktive Strahlung, deren Stärke abhängig von dem gebundenen Tracer ist, wird mit Hilfe eines γ -Counters gemessen. Da die eingesetzte Konzentration des Tracers bekannt ist, kann mit einer Eichkurve, die mit sieben jeweils doppelbestimmten radioaktiv markierten Standardproben ermittelt wird, die Konzentration des unmarkierten Plasmahormons bestimmt werden. Außerdem sind zur Bestimmung des Grades der Tracerradioaktivität drei Kontrollansätze (jeweils Doppelbestimmung) nötig:

- ❖ **1. Total (TO)** enthält nur das radioaktiv markierte Antigen, also 100% der eingesetzten Radioaktivität
- ❖ **2. Non specific binding (NSB)** radioaktives Antigen plus Puffer, als Indikator für unspezifische Bindungen an Puffer und Gefäßwandung
- ❖ **3. Leerprobe (B_0)** enthält zusätzlich den Antikörper, zeigt die maximale Bindungsfähigkeit des Tracers an den Antikörper und sollte nicht höher als 50 % sein.

Die Konzentration des zu bestimmenden Hormons sollte im linearen Bereich der Eichkurve liegen, da hier kleine Ungenauigkeiten, wie Pipettierfehler, keine so stark verzerrende Wirkung wie im nicht linearen Bereich der sigmoiden Kurve haben, die besonders oberhalb des linearen Bereichs ausgeprägt ist.

2.4.3.2 RIA zur Bestimmung der Plasmaleptinkonzentration

Die Plasmaleptinkonzentration wurde mit einem kommerziellen Maus-Leptin-RIA-Kit (LINCO Research, St. Charles, MO, USA) bestimmt³. Je nach zu erwartender Leptinkonzentration wurden 50–100 μ L des Plasmas eingesetzt, um einen Meßwert im linearen Bereich der sigmoiden Kurve zu erhalten. Die Plasmaproben sowie die Standardproben und Kontrollansätze wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Die einzelnen Proben wurden mit Assay-Puffer auf 200 μ L aufgefüllt und anschließend mit 100 μ L Antikörperlösung versetzt. Der Ansatz wurde durchmischt und bei 4°C 20-24 Stunden inkubiert. Während dieser ersten Inkubationsphase enthielt der NSB-Kontrollansatz 300 μ L Assay-Puffer und die Leerprobe 200 μ L des Puffers sowie 100 μ L Antikörper-Lösung. Nun wur-

³ wurde von Kollegen in der Arbeitsgruppe durchgeführt

den in jedes Röhrchen, auch in den noch leeren TO-Kontrollansatz, 100 μL ^{125}J -Maus-Leptin-Lösung pipettiert und für weitere 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Durch diese zeitversetzte Inkubation wurde eine Steigerung der Sensitivität des Tests erreicht (non-equilibrium-Methode, Chard 1982). Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Zugabe von 1 mL (auf 4°C gekühltes) "Precipitating Reagent" (außer TO) gefällt. Nach kurzer Durchmischung, 20-minütiger Inkubation bei 4°C und Zentrifugation für 20 Minuten bei 3000 x g (außer TO) wurde der Überstand und damit die darin befindlichen ungebundenen ^{125}J -Maus-Leptinmoleküle abgesaugt. Die radioaktive Strahlung des Präzipitats wurde mit einem γ -counter (Berthold Gamma-Probenwechsler LB 951G, Deutschland) quantitativ erfaßt.

In jedem RIA wurde eine Dreifachbestimmung der Leptinkonzentration des gleichen Plasmapools durchgeführt, die Aufschluß über die Variabilität innerhalb eines RIAs (Intraassay-Variabilität, in allen Fällen unter 5 %) sowie zwischen den verschiedenen RIAs geben sollte. Diese zusätzlichen Proben sowie die sieben verschiedenen Leptinstandards für die Erstellung der Eichkurve wurden auf die gleiche Weise wie die zu untersuchenden Plasmaproben behandelt. Die Interassay-Variabilität stellt die Variabilität der Messung einer Probe in verschiedenen Assays dar und wurde für jedes Tier anhand der Standardabweichung seiner in verschiedenen RIAs bestimmten Aliquots (Basis: 100 μL Rohwert) vom Mittelwert errechnet. Sie lag bei den Rohwerten im Mittel bei 8%. Die Abweichungen der Meßergebnisse der einzelnen RIAs wurden als Korrekturfaktoren bei den Berechnungen der Plasmakonzentrationen berücksichtigt. Durch die Heparinisierung des Blutes bei der Blutentnahme fand eine Verdünnung statt, die bei der Berechnung der endgültigen Leptinkonzentration berücksichtigt werden mußte. Dazu wurde der RIA-Meßwert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Nach diesen Korrekturen lag die Interassay-Variabilität im Mittel bei 6,5%.

Die Standardbezugsgröße zur Ermittlung der Plasmaleptinkonzentration in ng/mL war eine 100 μL Plasmaprobe. Wurde weniger als 100 μL der Plasmaprobe eingesetzt, mußten die Werte entsprechend korrigiert werden. Da das Rattenleptin mit einem Maus-Kit gemessen wurde, ist ein weiterer Korrekturfaktor erforderlich. Die Affinität des Rattenleptins gegenüber dem murinen Antikörper ist geringer als die des Mausleptins, deshalb wurde mit Hilfe von Kontrollmessungen eines Rattenstandards gegen den Mausleptin-Antikörper ein Faktor bestimmt, mit dem das Rattenleptin in die tatsächlichen Konzentrationen umgerechnet wurde.

2.4.3.3 RIA zur Bestimmung der Plasmainsulin-Konzentration

Die Insulinkonzentration der Plasmaproben wurde mit einem kommerziellen Human-Insulin-RIA-Kit (Biochem ImmunoSystem, Freiburg) bestimmt⁴. Da das Ratteninsulin an den humanen Antikörper viel schlechter bindet, mußte eine Standardkurve mit Ratten-Antigen (LINCO Research, St. Charles, MO, USA) erstellt werden.

Wie beim Leptin richtet sich die eingesetzte Plasmamenge (50 und 100 µL) nach der zu erwartenden Plasmakonzentration. Nach dem Auftauen wurden 100 µL Tracer und 100 µL Antikörper gleichzeitig zu den Kontrollansätzen und Proben dazugegeben und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte mittels Polyethylenglykol (PEG). Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 2500 x g wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Strahlung des Niederschlags wurde mittels eines γ -counters quantitativ erfaßt.

Die Intraassay-Variabilität wurde durch eine Dreifachbestimmung der Insulinkonzentration ermittelt und lag in allen Fällen unter 5%. Diese zusätzlichen Proben sowie die sieben verschiedenen Insulinstandards für die Erstellung der Eichkurve wurden auf die gleiche Weise wie die zu untersuchenden Plasmaproben behandelt. Da die Interassay-Variabilität auch nach Korrektur anhand eines mitgemessenen Pools bei den Insulin-RIAs sehr groß ist (13%), wurde darauf geachtet, daß alle Proben im einem Meßdurchlauf gemessen wurden. Das Blut wird durch Heparinisierung bei der Blutentnahme verdünnt, was bei der Berechnung der endgültigen Insulinkonzentration berücksichtigt werden muß. Dazu wurde der RIA-Meßwert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Wurde weniger als 100 µL der Plasmaprobe eingesetzt, wurde der Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert.

Für die statistische Auswertung des Plasmainsulinspiegels wurden Werte die $> 200 \mu\text{U}/\text{mL}$ (Bereich: 215-1426 $\mu\text{U}/\text{mL}$) gleich $200 \mu\text{U}/\text{mL}$ gesetzt. Dies betraf an d150 sechs von neunzehn als Welpen unterernährten Tieren (2 Männchen und 4 Weibchen) und an d190 ein weiteres von 22 als Welpen überernährten Tieren (1 Männchen). Dadurch sollte sichergestellt werden, daß zum einen diese hohen Werte in der Auswertung berücksichtigt werden, und zum anderen ihr ansonsten dominanter Einfluß auf statistische Parameter reduziert wird.

⁴ wurde von Kollegen in der Arbeitsgruppe durchgeführt

2.5 Statistik

2.5.1 Allgemeine Angaben zur statistischen Auswertung

Im Ergebnisteil wurden zum einen Regressionsgeradenvergleiche, die mittels eines haus-eigenen Programms berechnet wurden und zum anderen statistische Tests, die mit Hilfe des Programmes SigmaStat (SPSSInc., Chicago, USA), das ein minimales Signifikanz-niveau von $P < 0,05$ zu Grunde legt, dargestellt. Zudem wurden innerhalb des Diskussions-teils dieser Arbeit Kovarianzanalysen mit dem Programm Statistica (StatSoft GmbH, Ham-burg) durchgeführt. Männchen und Weibchen der Versuchsserien wurden jeweils getrennt ausgewertet.

2.5.2 Varianzanalysen

Zur statistischen Auswertung der Daten von Zuckerratten wurden zweifaktorielle Varianz-analysen (ANOVA) mit den Faktoren Aufzuchtart und Genotyp durchgeführt. SigmaStat führt dabei multiple Vergleiche anhand der kleinsten Quadrate (KQ) Mittelwerte aus. Die KQ-Mittelwerte mit ihren Streuungsmaßen (\pm SEM) werden auch in den graphischen Darstellungen verwendet. Als *post hoc*-Test wurde der Bonferroni-Test verwendet. Bei Wistarratten (Versuchsserie II) wurden die Unterschiede mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit dem Faktor Aufzuchtart statistisch untersucht. Eine Übersicht über Verteilung und Anzahl der Daten der Tiere ist in Tabelle 2.2 zusammengefaßt.

Eine Erweiterung der Varianzanalyse ist die Kovarianzanalyse (ANCOVA) mit deren Hilfe der Einfluß einer quantitativen Kovariate auf die abhängigen qualitativen Variablen her-auspartialisiert, d. h., neutralisiert wird (Bortz 1999). Diese Form der Analyse wurde in der Diskussion verwendet, um zu überprüfen, welchen Einfluß Aufzuchtart bzw. Genotyp un-abhängig von Unterschieden in der Fettmasse bzw. im Fettgehalt auf den Plasmaleptin-bzw. Plasmainsulinspiegel haben. In der graphischen Darstellung wurde die Summe der KQ-Mittelwerte mit ihren Streuungsmaßen (\pm SEM) verwendet. Für den *post hoc*-Test wurden die Kontraste der Summe bestimmt und nach Bonferroni mit der Anzahl der unter-suchten Kontraste (z.B. Anzahl der Aufzuchtarten) multipliziert.

2.5.3 Regressionsanalysen

Lineare Regressionen der beiden Versuchsserien wurden nach der Methode der kleinsten Fehler-Quadrate ausgewertet. Um die Signifikanz der Korrelationen zu testen, wurden die Korrelationskoeffizienten (r) auf die Verschiedenheit von Null anhand der t-Verteilung

nach Sachs (1997) überprüft. Die Regressionsgeraden wurden auf Parallelität und gegebenenfalls anschließend hinsichtlich ihrer Unterscheidung im y-Achsenabschnitte untersucht (Brownlee 1965).

Versuchsserie I:

d150	Geschlecht	UN		NN		KN	
		+/+	+/fa	+/+	+/fa	+/+	+/fa
Körperzusammensetzung	m	6	13	10	10	9	11
Leptin/Insulin		5	13	10	10	7	9
Körperzusammensetzung	w	12	10	9	9	8	8
Leptin/Insulin		9	10	9	9	6	7

d190	Geschlecht	UN		NN		KN	
		+/+	+/fa	+/+	+/fa	+/+	+/fa
Körperzusammensetzung	m	6	13	10	10	8	9
Leptin/Insulin		5	12	9	9	7	9
Körperzusammensetzung	w	12	10	9	9	8	10
Leptin/Insulin		12	10	8	9	8	10

Versuchsserie II:

d21	Geschlecht	Ammenaufzucht			KN			NN		
		+/+	+/fa	Wistar	+/+	+/fa	Wistar	+/+	+/fa	Wistar
Körperzusammensetzung	m	9	11	8	9	14	14	14	5	29
Körperzusammensetzung	w	10	10	8	10	16	8	15	15	23

Tab. 2.2: Anzahl der ausgewerteten Daten von männlichen (m) und weiblichen (w) Wildtyp- (+/+) und heterozygoten (+/fa) Zuckerratten und Wistarratten der Versuchsserie I und II. Die Zuckerratten der Versuchsserie I wurden als Welpen unter- (UN), normal (NN) bzw. überernährt (KN). Für die Versuchsserie II wurden Zuckerrattenwelpen von Wistarratten-Ammen bzw. Wistarrattenwelpen von Zuckerratten-Ammen im kleinen Nest aufgezogen. Als Vergleich dienten Daten von Wistar- bzw. Zuckerratten, die von den eigenen Müttern im kleinen (KN) oder normalen (NN) Nest aufgezogen wurden (Schölch 2001).

3. Ergebnisse

3.1. Auswirkungen der frühpostnatalen Ernährung auf den

Wachstumsverlauf von Zuckerratten

Der Wachstumsverlauf von Zuckerratten, die als Welpen normal, über- bzw. unterernährt und bis zu einem Alter von 190 Tagen aufgezogen wurden, ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Körpermasse nimmt bei Männchen wie Weibchen bis zum Alter von 90 Tagen stark, dann bis zum Tag 150 mäßig zu. In den anschließenden sechs Wochen, in denen die Tiere zusätzlich zum Standardfutter ein hochkalorisches Futter (Schokolade) erhielten, zeigte sich erneut eine etwas stärkere Zunahme in der Körpermasse. Die statistische Signifikanz der Unterschiede in der Körpermasse ist zur besseren Übersichtlichkeit in Tabelle 3.1 dargestellt. Im Alter von 21 Tagen unterscheiden sich die Körpermassen der als Welpen normal, über- oder unterernährten Tiere signifikant voneinander. Bereits im Alter von 30 Tagen nähert sich die Körpermasse der als Welpen überernährten Männchen wie Weibchen jener der als Welpen normal ernährten Tiere an, dabei zeigen nur noch die Weibchen am Tag 30 tendenziell einen signifikanten Unterschied ($P = 0,052$). Die Körpermasse der als Welpen unterernährten Männchen und Weibchen bleibt dagegen im Vergleich zu den Tieren der anderen Aufzuchtarten während des gesamten Wachstumsverlaufs signifikant niedriger ($P < 0,001$). Am Tag 21 und 30 sind die als Welpen unterernährten Tiere um ca. 30%, danach immer noch um ca. 10-15% leichter als die normal ernährten Tiere. Es ist keine sprunghafte Veränderung der Unterschiede zwischen den Aufzuchtarten durch die Zusatzfütterung zu erkennen.

Ein Genotyp-Effekt ist bis zum Alter von 60 Tagen weder bei Männchen noch bei Weibchen nachweisbar. Im späteren Verlauf zeigt sich ein Genotypunterschied nur bei den Weibchen. Er beginnt sich ab Tag 90 abzuzeichnen und wird ab einem Alter von 120 Tagen signifikant. Die hochkalorische Zusatznahrung ab Tag 150 hat bei beiden Geschlechtern keinen erkennbaren zusätzlichen Einfluß auf den Heterozygotenunterschied in der Körpermasse zur Folge. Interaktionen zwischen Aufzuchtart und Genotyp bestehen bei den Weibchen zu keiner Zeit. Bei den Männchen hingegen wird trotz der in der Abbildung sichtbaren Unterschiede das Signifikanzniveau nicht erreicht. Nur im Alter von 150 Tagen tritt eine Interaktion zwischen Aufzuchtart und Genotyp bei den Männchen auf. Es zeigt

sich dabei für die als Welpen unterernährten Männchen eine signifikant größere Körpermasse ($P < 0,05$, nicht dargestellt) der Heterozygoten gegenüber den Wildtyp-Tieren.

Fazit:

Die Körpermasse von Zuckerratten wird durch eine juvenile Unterernährung permanent reduziert, dagegen zeigt die juvenile Überernährung keinen Langzeiteffekt auf die Körpermasse. Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufzuchtarten oder Genotypen werden durch die hochkalorische Zusatzfütterung nicht beeinflusst. Generell erreichen die Männchen größere Körpermassen als die Weibchen.

Männchen:

Alter [d]	Aufzuchtart	post-hoc-Test			Genotyp +/+ vs. +/fa
		UN vs. NN	NN vs. KN	UN vs. KN	
21	***	***	***	***	ns
30	***	***	ns	***	ns
60	***	***	ns	***	ns
90	***	***	ns	***	ns
120	***	***	ns	***	ns
150	***	***	ns	***	ns
190	***	***	ns ⁺	***	ns

Weibchen:

Alter [d]	Aufzuchtart	post-hoc-Test			Genotyp +/+ vs. +/fa
		UN vs. NN	NN vs. KN	UN vs. KN	
21	***	***	***	***	ns
30	***	***	ns ⁺	***	ns
60	***	***	ns	***	ns
90	***	***	ns	***	ns ⁺
120	***	***	ns	***	*
150	***	***	ns	***	**
190	***	***	ns	***	*

Tab. 3.1: Mittels zweifaktorieller Varianzanalysen (mit den Faktoren Genotyp und Aufzuchtart) ermittelte Signifikanz der Unterschiede in der Körpermasse zwischen den einzelnen Aufzuchtarten und Genotypen im Alter von 21 bis 190 Tagen. Analysiert wurden die Daten von männlichen (oben) und weiblichen (unten) Zuckerratten, die als Welpen entweder unter- (UN), normal- (NN), oder überernährt (KN) wurden. *** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$; ns = $P \geq 0,05$; ns⁺ = $0,05 \leq P < 0,1$.

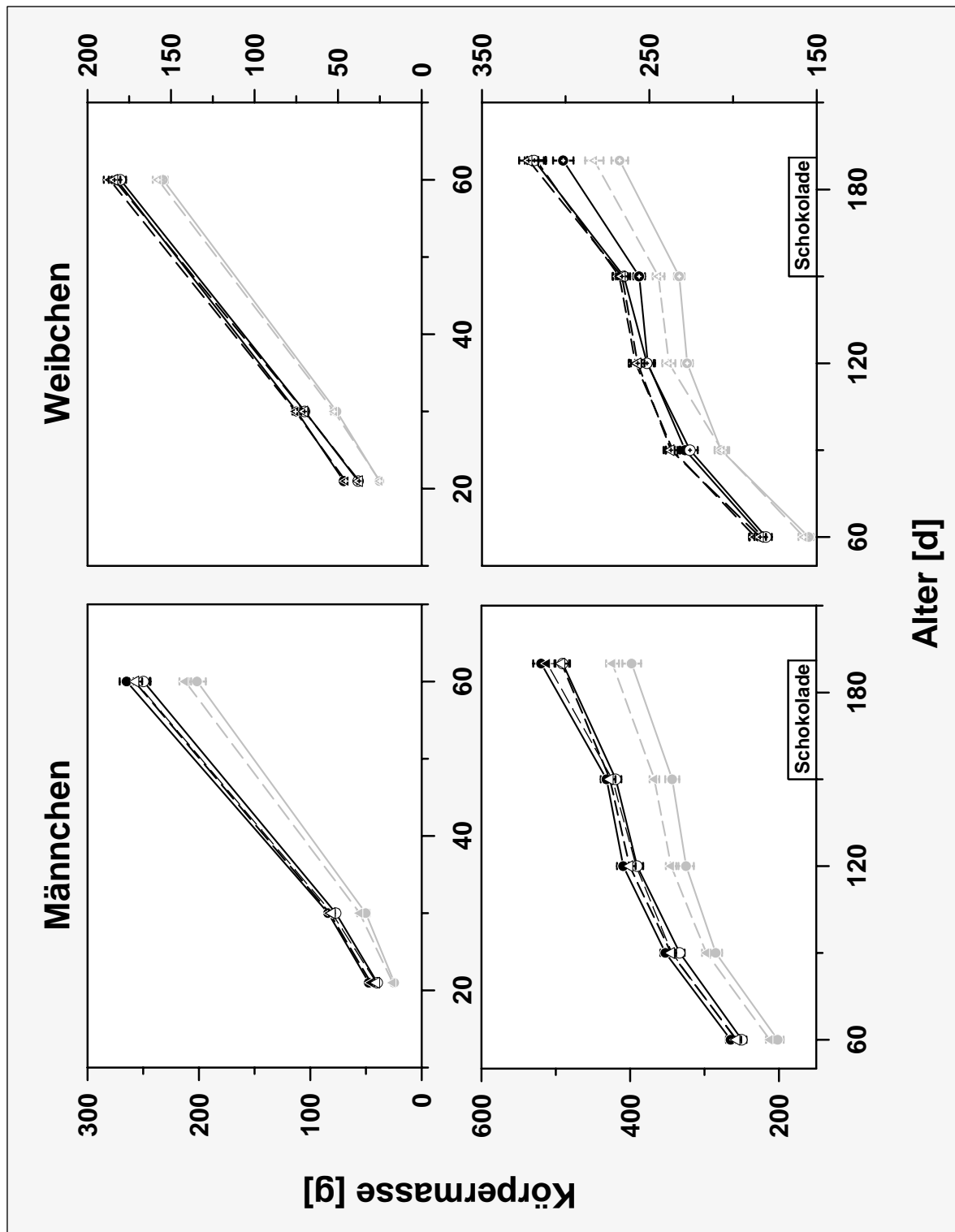


Abb. 3.1: Körpermasse (KQ-Mittelwerte \pm SEM) von männlichen (links) und weiblichen (rechts) Zuckerratten im Alter von 21 bis 60 Tagen (oben) bzw. im weiteren Verlauf von 60 bis 190 Tagen (unten). Als Welpen über- (schwarze Symbole), normal- (weiße Symbole) oder unterernährte (graue Symbole) $+/+$ Tiere (Kreise, durchgehende Linie) und $+/fa$ Tiere (Dreiecke, gestrichelte Linie). Zusätzlich zum pelletierten Futter erhielten die Tiere ab einem Alter von 150 Tagen ein sensorisch attraktives, hochkalorisches Futter (Schokolade) ad libitum. Die Signifikanz der Unterschiede ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Zu beachten sind die unterschiedliche Ordinaten für Männchen und Weibchen.

3.2. Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung der Körperzusammensetzung adulter Zuckerratten

3.2.1. Bestimmung der Körperzusammensetzung mit Hilfe des EM-Scans/TOBEC[®]

Alternativ zu der finalen Bestimmung des Körperfettgehalts durch Trocknung bis zur Gewichtskonstanz mit anschließender Chloroformextraktion, wurde in dieser Arbeit die Bestimmung der Körperzusammensetzung lebender Tiere mittels TOBEC[®] untersucht. Um eventuelle Veränderungen in der Körperzusammensetzung erkennen zu können, wurde zunächst bei Beginn der hochkalorischen Zusatzfütterung, im Alter von 150 Tagen, und erneut am Versuchsende, nach der sechswöchigen Zufütterung von Schokolade, die Körperzusammensetzung lebender Zuckerratten mit dem EM-Scan/TOBEC[®] bestimmt. Am Tag 150 ist der getrennt zwischen Männchen und Weibchen dargestellte, mit dem EM-Scan ermittelte dimensionslose E-Wert bei beiden Geschlechtern mit der Körpermasse der nüchternen Tiere eng korreliert (Abbildung 3.2). Männchen, die als Welpen unterernährt wurden und nur eine Körpermasse ≤ 400 g aufweisen, haben E-Werte, die mit < 1500 deutlich niedriger sind als die der als Welpen überernährten bzw. der normal ernährten Männchen, die nur zu 25% bzw. 33% in diesem niedrigen Bereich liegen. Auch bei den Weibchen liegen bei niedrigerer Körpermasse die E-Werte der als Welpen unterernährten Tiere deutlich unter den Werten der anderen Aufzuchtarten. Der Korrelationskoeffizient zwischen E-Wert und Körpermasse ist am Tag 190 bei Männchen wie Weibchen mit $r > 0,96$ noch größer (hier nicht gezeigt). Erwartungsgemäß ist mit der Körpermasse auch der E-Wert gestiegen.

3.2.2. Vergleich zwischen TOBEC[®]– Messung, Wägung und physikalisch-chemischer Bestimmung der Körperzusammensetzung

Für die Kalibrierung des TOBEC[®]s wurden die durch das physikalisch-chemische Standardverfahren ermittelten Werte für die fettfreie Trockenmasse (FFDM) und Fettmasse und die unmittelbar vor der Tötung im Alter von 190 Tagen ermittelten E-Werte zueinander in Beziehung gesetzt, wiederum getrennt für Männchen und Weibchen (Abbildung 3.3,

links). Nicht nur die FFDM sondern auch die Körperfettmasse sind bei Männchen wie Weibchen eng ($r > 0,8$) mit dem E-Wert korreliert.

Zum Vergleich wurde die Körpermasse der nüchternen Tieren als Prädiktor der Körperzusammensetzung untersucht (Abbildung 3.3, rechts). Bei den nüchternen Männchen wie Weibchen sind die Korrelationen zwischen Körpermasse und FFDM bzw. Fettmasse sogar noch enger als für die Korrelationen mit dem E-Wert ($0,88 \leq r \leq 0,97$ statt $0,83 \leq r \leq 0,94$). Sowohl für den E-Wert als auch für die Körpermasse ist die Korrelation mit der FFDM enger als die mit der Körperfettmasse.

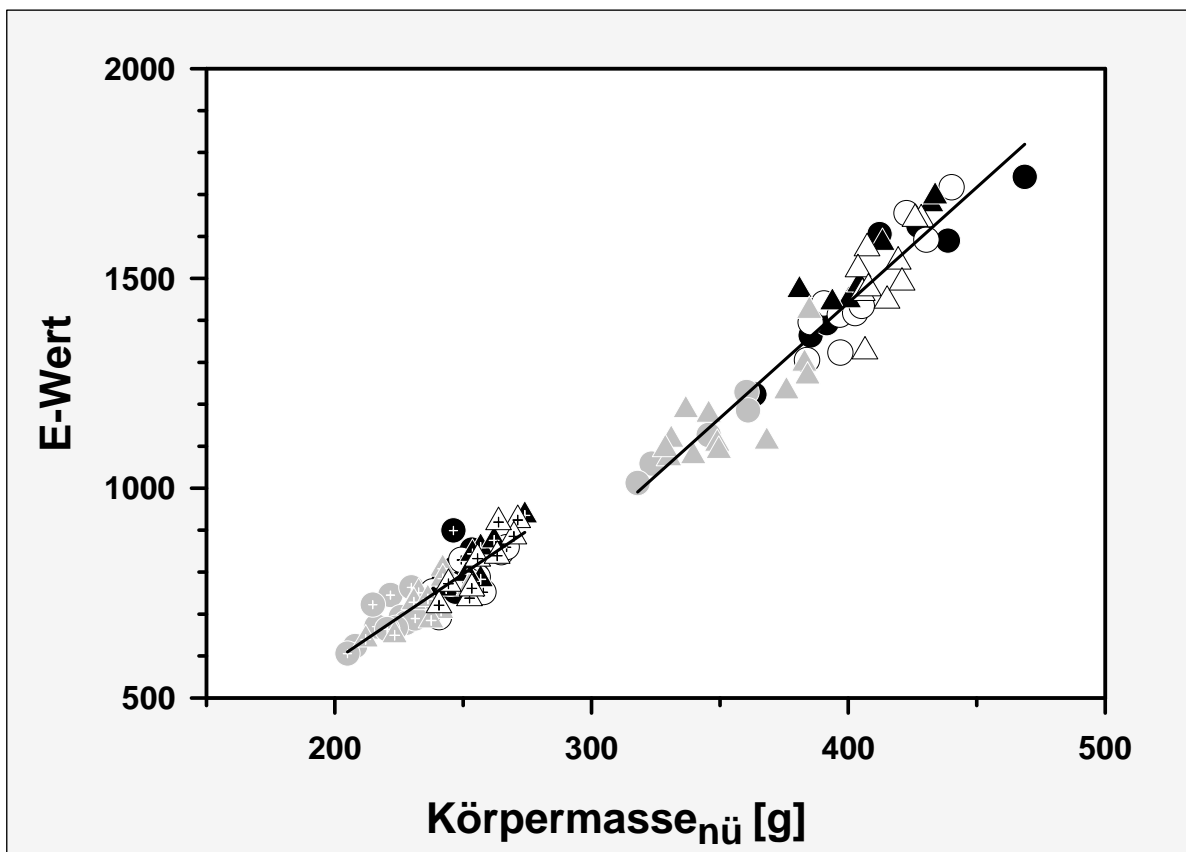


Abb. 3.2: Korrelation zwischen dem dimensionslosen TOBEC[®]-Meßwert (E) und der Körpermasse von 150 Tage alten nüchternen (nü) Zuckerratten getrennt für Männchen und Weibchen dargestellt. Als Welpen über- (schwarze Symbole), normal- (weiße Symbole) oder unterernährte (graue Symbole) $+/+$ Tiere (Kreise) und $+/-$ Tiere (Dreiecke). Daten weiblicher Tiere sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Korrelationskoeffizienten: $r = 0,95$ (Männchen) und $r = 0,87$ (Weibchen).

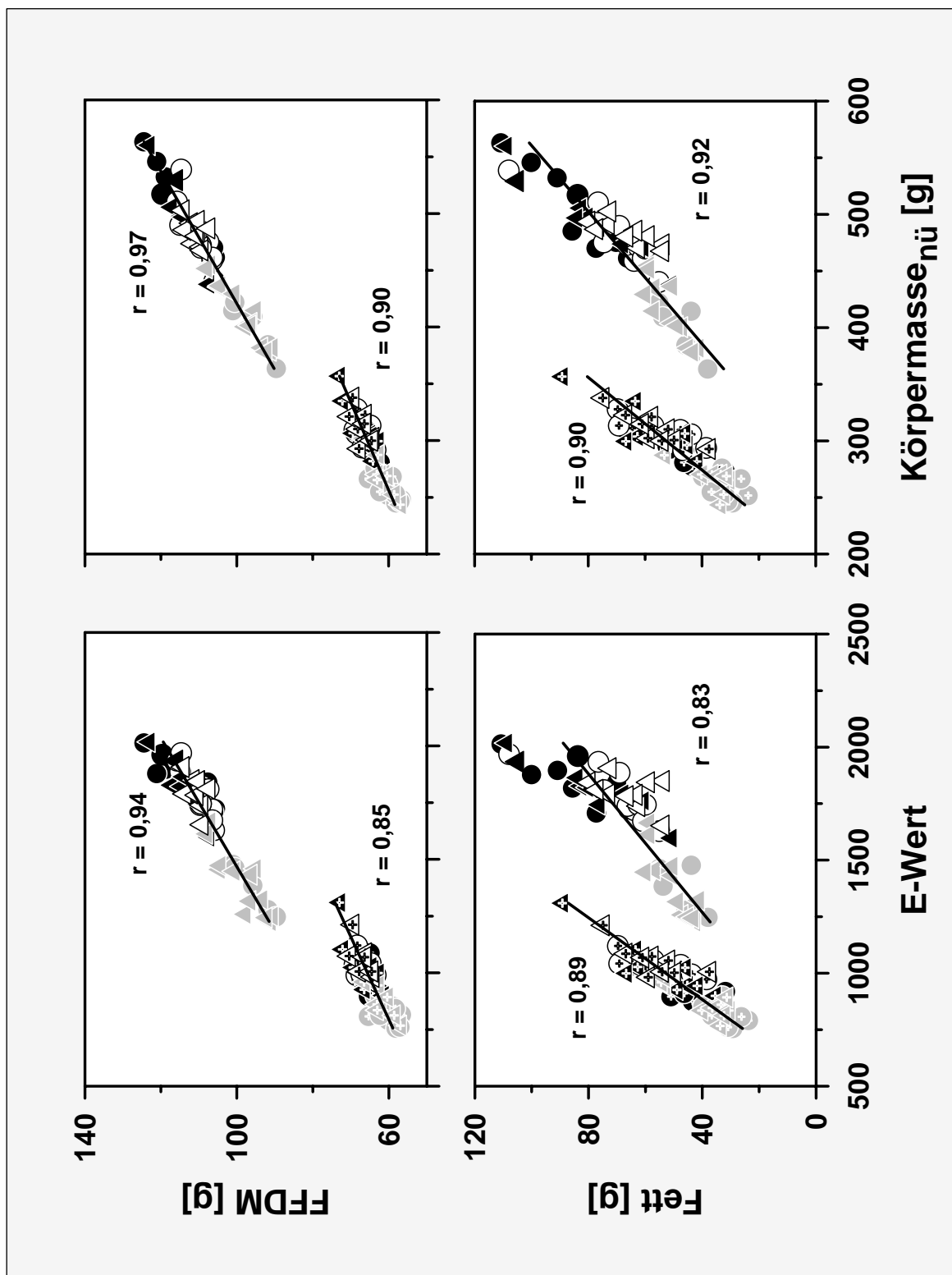


Abb. 3.3: Korrelation zwischen fettfreier Trockenmasse (FFDM, oben), sowie Körperfettmasse (unten) und dem dimensionslosen TOBEC[®]-Meßwert (E) (links) bzw. der Körpermasse (rechts) von nüchternen (nü) Zuckerratten am Versuchsende (d190). Als Welpen über- (schwarze Symbole), normal- (weiße Symbole) oder unterernährte (graue Symbole) +/- Tiere (Kreise) und +/-fa Tiere (Dreiecke). Daten der Weibchen sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.

3.2.3. Berechnung der Körperzusammensetzung mittels FFM-Hydrationsfaktor

3.2.3.1. Abhängigkeit des Körperfettgehaltes vom Körperwassergehalt

In Abbildung 3.4 sind als Beispiel für die enge Korrelation zwischen Wasser- und Fettgehalt die Werte von 190 Tage alten Zuckerratten, die als Welpen normal bzw. über- oder unterernährt wurden, dargestellt. Da diese Korrelation innerhalb der gleichen Versuchsgruppe immer sehr eng ist, können Abweichungen der Werte einzelner Tiere von der Regressionsgeraden Aufschluß über Methodikfehlern geben. Ein Regressionsgeradenvergleich zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen zeigt bei gleichem Wassergehalt einen geringfügig niedrigeren Fettgehalt der als Welpen unterernährten Tiere gegenüber den Tieren der beiden anderen Aufzuchtarten, dabei ist die Gerade der als Welpen unterernährten Tiere geringfügig aber signifikant parallel zu niedrigeren Werten verschoben ($P < 0,001$ für Unterschied im y-Achsenabschnitt).

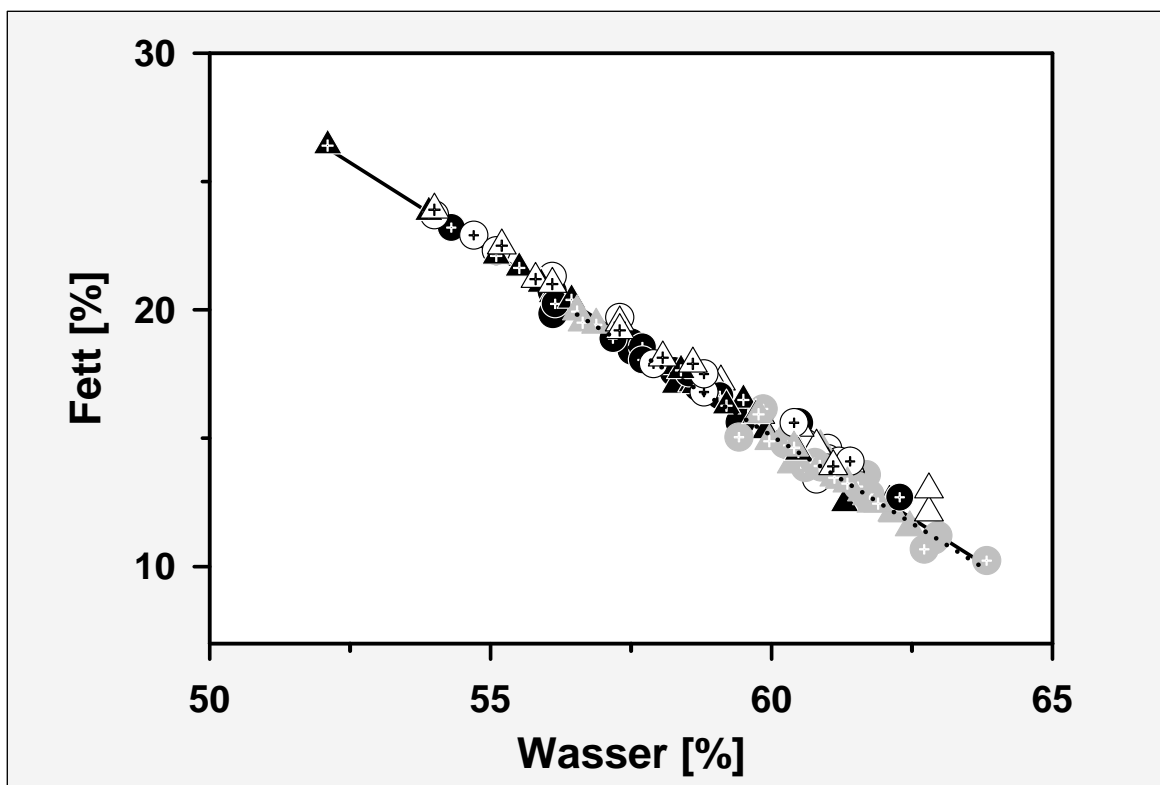


Abb. 3.4: Korrelation zwischen Körperfett- und Körperwassergehalt von Zuckerratten am Versuchsende (d190). Gemeinsame Regressionsgerade (durchgezogene Linie) für als Welpen über- (schwarze Symbole) und normal ernährte Tiere (weiße Symbole) bzw. Regressionsgerade (gepunktete Linie) für als Welpen unterernährte (graue Symbole) $+/+$ Tiere (Kreise) und $+/fa$ Tiere (Dreiecke). Daten der Weibchen sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Korrelationskoeffizienten r jeweils $-0,99$.

3.2.3.2. Abhängigkeit des FFM-Hydrationsfaktors vom Alter

Da Wasser- und Fettgehalt eng korrelieren, ist es möglich, bei bekanntem Wassergehalt, den Fettgehalt mit Hilfe eines Faktors zu berechnen. Dieser FFM-Hydrationsfaktor $H_f = \text{Wasser [g]} * (\text{Wasser [g]} + \text{FFDM [g]})^{-1}$ muß zunächst für einige Tiere jeder Altersstufe und Versuchsreihe bestimmt werden. In Tabelle 3.2 sind die in dieser Arbeit ermittelten FFM-Hydrationsfaktoren für Tag 190 und zusätzlich die FFM-Hydrationsfaktoren für unterschiedliche Altersstufen aus verschiedenen Versuchsreihen anderer Autoren (Hufnagel 2001, Schölch 2001, Schmidt unveröffentlicht) berechnet und in Abbildung 3.5 aufgetragen. Die Abnahme des FFM-Hydrationsfaktors verläuft exponentiell. Bei logarithmischer Darstellung des Alters (unten) zeigt sich entsprechend ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Alter und FFM-Hydrationsfaktor. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufzuchtarten sind vergleichsweise gering. Außerdem ergeben sich zwischen den Geschlechtern und Genotypen in einer Altersstufe keine systematischen Unterschiede. Somit ergibt sich die Möglichkeit, für verschiedene Altersgruppen gemeinsame FFM-Hydrationsfaktoren zur Bestimmung der Körperzusammensetzung zu ermitteln.

Alter [d]	Wurfgröße	Geschlecht	Anzahl(m/w)	Genotyp	Hf
6 / 7 †		m / w	43 (24/19)	+/+	0,839
8 †		m / w	23 (14/9)	+/+	0,831
10 †		m / w	16 (5/11)	+/+	0,821
12 †		m / w	8 (4/4)	+/+	0,811
16 †		m / w	34 (17/17)	+/+	0,791
21 ‡	klein	m / w	41 (14/17)	+/+	0,774
	klein	m	20	+/fa	0,773
	klein	w	24	+/fa	0,772
	normal	m	24	+/+	0,779
	normal	m	22	+/fa	0,777
	normal	w	31	+/+	0,775
	normal	w	25	+/fa	0,775
24 †		m / w	38 (20/18)	+/+	0,776
34 †		m / w	11 (6/5)	+/+	0,773
90 #	klein	m	16	+/+	0,715
	klein	w	18	+/+	0,717
	klein	m	9	+/fa	0,716
	klein	w	16	+/fa	0,717
	normal	m	7	+/+	0,717
	normal	m	11	+/fa	0,712
	normal	w	2	+/+	0,715
	normal	w	7	+/fa	0,715
190	klein	m / w	11 (4/7)	+/+	0,707
	klein	m / w	8 (3/5)	+/fa	0,707
	unterernährt	m / w	15 (5/10)	+/+	0,708
	unterernährt	m / w	17 (10/7)	+/fa	0,706
	normal	m / w	19 (10/9)	+/+	0,711
	normal	m / w	19 (10/9)	+/fa	0,713

Tab. 3.2 (vorhergehende Seite): FFM-Hydrationsfaktor (H_f) für männliche (m) und weibliche (w) Zuckerratten der verschiedenen Altersstufen, Aufzuchtarten und Genotypen. Zusätzlich zu den in dieser Studie erhobenen Werten für die 190 Tage alten Tiere sind Werte für 6 bis 34 Tage alte Tiere (†) von Hufnagel (2001) und für 21 Tage alte Tiere (‡) von Schölch (2001) gezeigt. Werte für 90 Tage alte Tiere (#) sind von Schmidt (unveröffentlicht).

($H_f = \text{Wasser [g]} * (\text{Wasser [g]} + \text{FFDM [g]})^{-1}$)

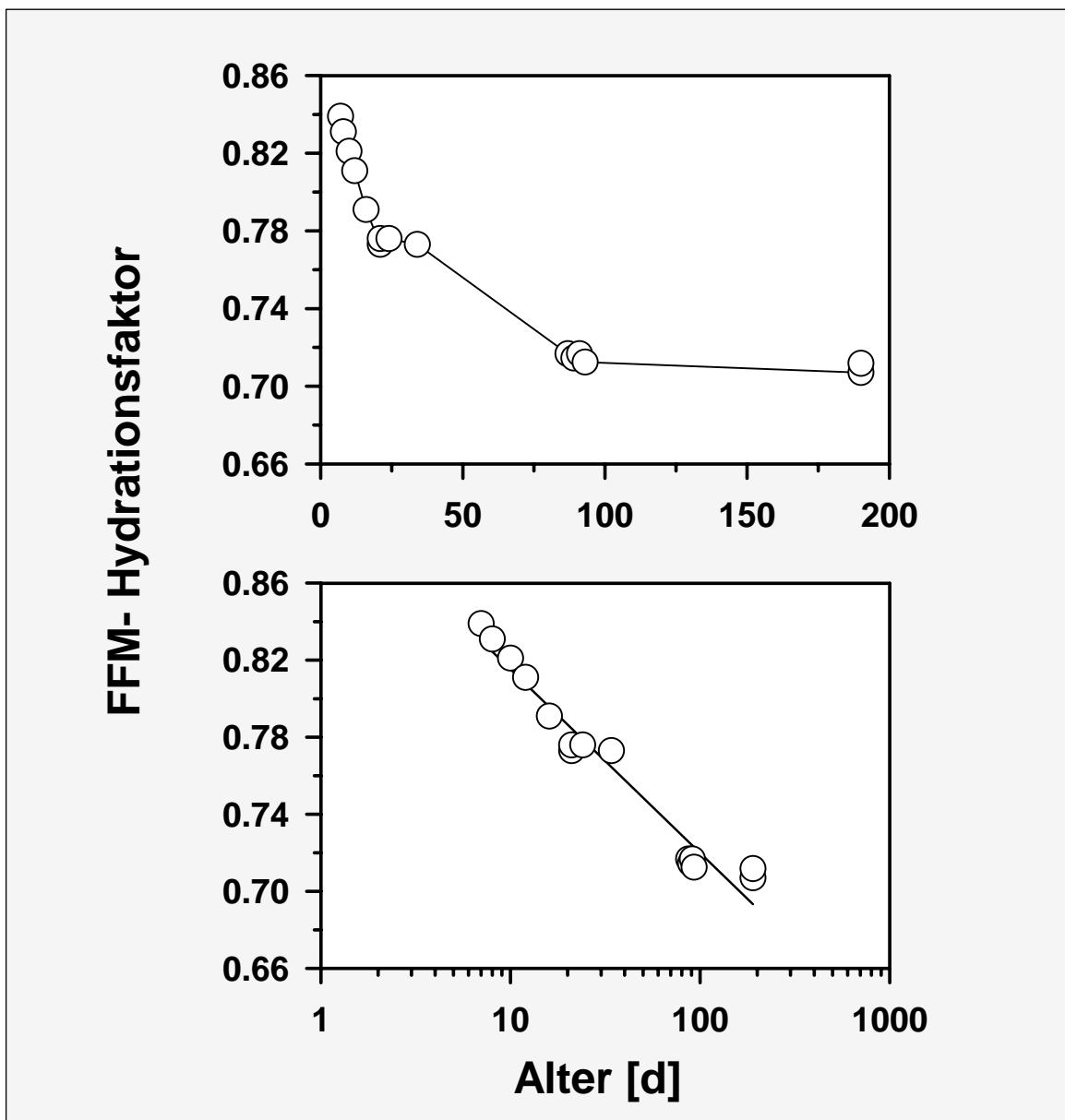


Abb. 3.5: Zusammenhang zwischen FFM-Hydrationsfaktor und Alter bei Zuckerratten aus unterschiedlichen Aufzuchtarten und Versuchsreihen. Bei logarithmischer Darstellung des Alters ergibt sich mit guter Näherung ein linearer Zusammenhang (unten, $r = -0,98$). Zusätzlich zu den in dieser Studie erhobenen Werten für 190 Tage alte Tiere sind Werte für 6 bis 34 Tage alte Tiere von Hufnagel, 2001 und Schölch, 2001 gezeigt. Werte für 90 Tage alte Tiere sind von Schmidt, unveröffentlicht.

3.2.3.3. Vergleich von berechneten und gemessenen Werten

Um die Genauigkeit der Berechnung der Körperzusammensetzung mit dem FFM-Hydrationsfaktor graphisch zu illustrieren, wurde von 190 Tage alten Zuckerratten der berechnete Wert für die Fettmasse ($\text{Fettmasse}_{\text{berechnet}} = \text{Feuchtmasse} - \text{Wasser [g]} * \text{Hf}^{-1}$) und FFDM ($\text{FFDM}_{\text{berechnet}} = \text{Wasser [g]} * \text{Hf}^{-1} - \text{Wasser [g]}$) gegen die tatsächlich ermittelten (s. 2.4.1.2.) Werte aufgetragen. Bei beiden Parametern korrelieren berechneter und gemessener Wert (Abbildung 3.6) eng miteinander. Die jeweiligen Regressionsgeraden liegen auf der Identitätslinie, d. h., die berechneten Werte für Fettmasse und FFDM entsprechen mit geringfügigen Abweichungen den gemessenen Werten. Es sind keine systematischen Abweichungen bei den unterschiedlichen Aufzuchtarten erkennbar.

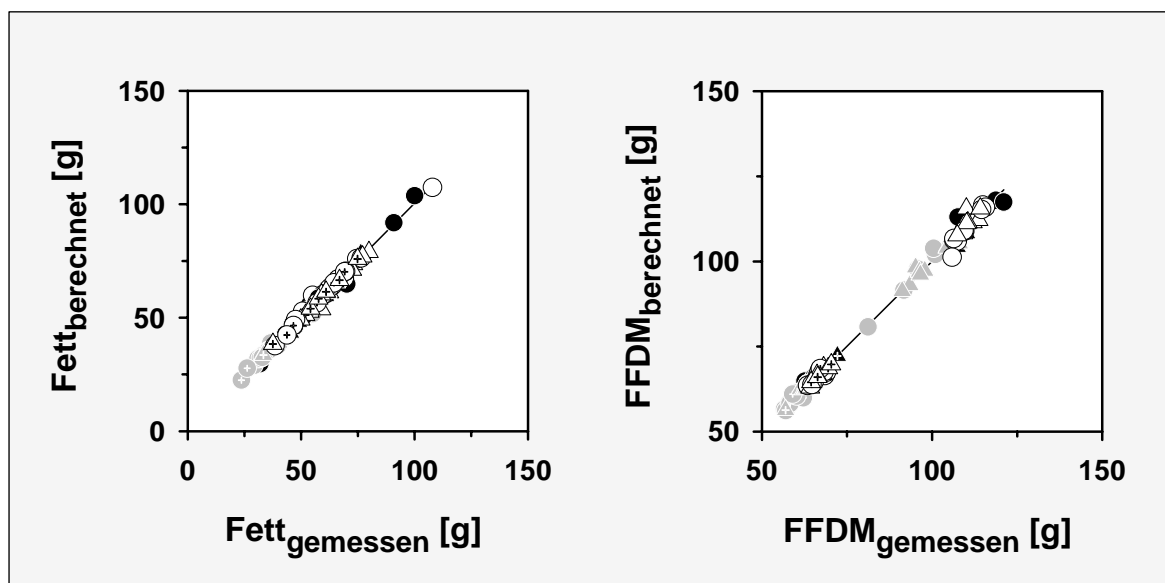


Abb. 3.6: Korrelation zwischen berechneter und gemessener Körperfettmasse bzw. fettfreier Trockenmasse (FFDM) von 190 Tage alten Zuckerratten, die als Welpen über- (schwarze Symbole), normal- (weiße Symbole) oder unterernährt (graue Symbole) wurden. ++ Tiere (Kreise), +/- Tiere (Dreiecke). Daten weiblicher Tiere sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Korrelationskoeffizienten r jeweils 0,99.

Für die Berechnung gilt:

$$\begin{aligned} \text{Fettmasse}_{\text{berechnet}} &= \text{Feuchtmasse} - \text{Wasser [g]} * \text{Hf}^{-1} \text{ und} \\ \text{FFDM}_{\text{berechnet}} &= \text{Wasser [g]} * \text{Hf}^{-1} - \text{Wasser [g]}. \end{aligned}$$

In Abbildung 3.7 wird dargestellt wie der berechnete Wert für die Fettmasse mit dem gemessenen Wert übereinstimmt, wenn für den FFM-Hydrationsfaktor Hf unterschiedlich genaue Werte eingesetzt werden. Bei dem FFM-Hydrationsfaktor $\text{Hf} = 0,71$ ist die größte Deckungsgleichheit zu sehen. Nur bei 16% der Weibchen und bei 19% der Männchen ergeben sich visuell erkennbare Differenzen zwischen den berechneten und gemessenen

Werten. Dagegen ist die Deckungsgleichheit zwischen berechneten und gemessenen Werten bei den anderen FFM-Hydrationsfaktoren geringer. Bei $H_f = 0,70$ differieren die berechneten Werte von 39% der Weibchen und 53% der Männchen und bei $H_f = 0,72$ sogar 47% bzw. 72% sichtbar von den gemessenen Werten. Im Mittel weichen die berechneten Werte bei $H_f = 0,71$ um $<1\%$, bei $H_f = 0,70$ um 4% und bei $H_f = 0,72$ um -4% von den gemessenen Werten der Fettmasse ab. Diese Darstellung verdeutlicht somit nochmals, daß die oben erwähnte enge Korrelation zwischen Körperwasser- und Körperfettgehalt tatsächlich mit sehr guter Näherung für die Berechnung von FFDM und Fettmasse ausgenutzt werden kann.

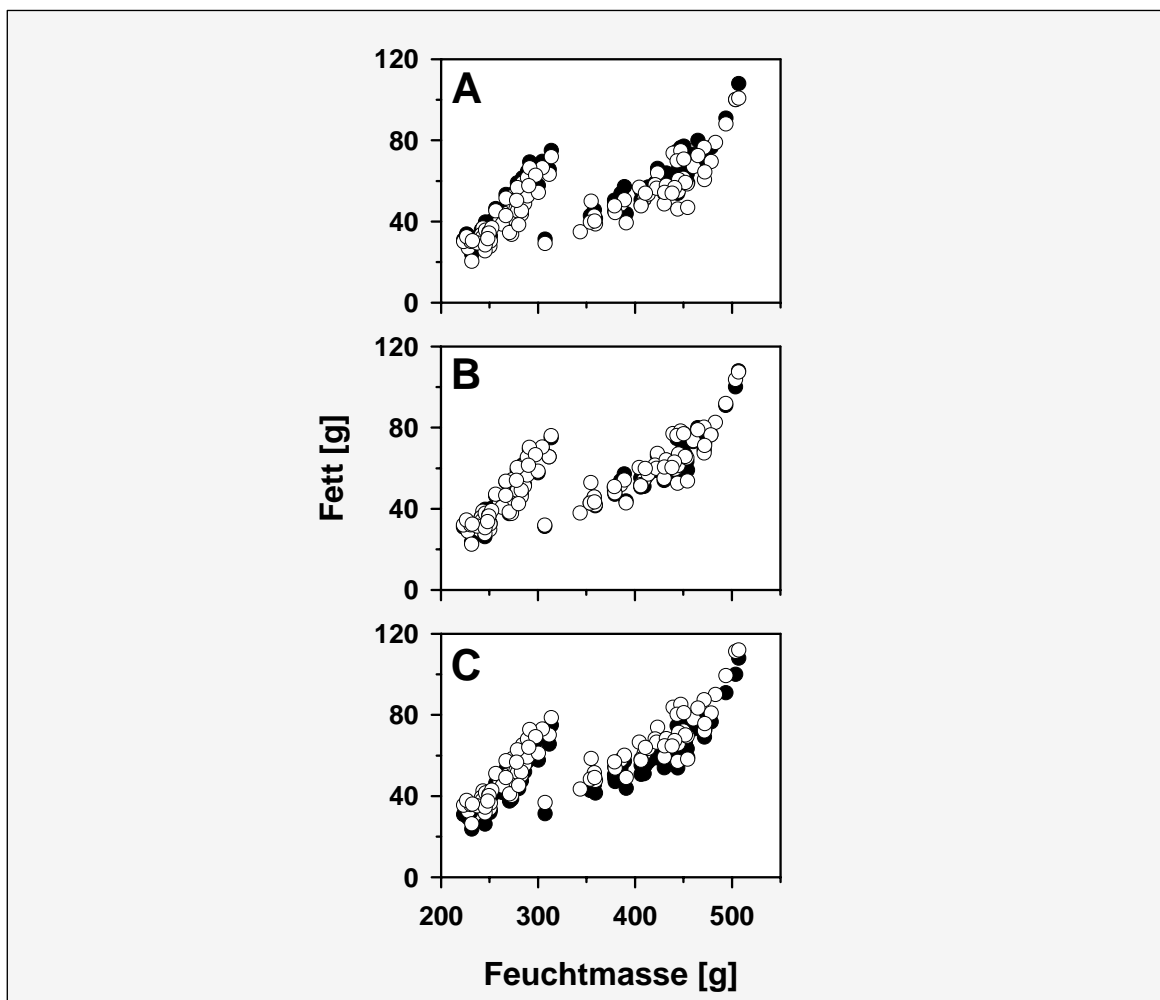


Abb. 3.7: Gegenüberstellung der gemessenen (schwarze Kreise) und der mit Hilfe des FFM-Hydrationsfaktors H_f berechneten (weiße Kreise) Körperfettmasse von 190 Tage alten Zuckerratten in Abhängigkeit von der Feuchtmasse. H_f in Teil A: $H_f = 0,70$; B: $H_f = 0,71$ und C: $H_f = 0,72$.

Fazit:

Bei adulten Zuckerratten ist sowohl mittels TOBEC[®]-Messung als auch durch Wägung aufgrund der engen Korrelationen die Körperzusammensetzung lebender Tiere eines Versuchskollektivs gut vorhersagbar. Jedoch ist zu bedenken, daß das Wiegen einfacher anzuwenden und für die Tiere, da sie nicht narkotisiert werden müssen, erheblich schonender ist. Nicht zuletzt birgt die TOBEC[®]-Messung aufgrund des sensiblen Meßverfahrens viele Fehlerquellen. Mit Hilfe des FFM-Hydrationsfaktors kann die finale physikalisch-chemische Bestimmung der Körperzusammensetzung erheblich vereinfacht werden. Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen, zwischen homo- und heterozygoten Tieren, sowie zwischen den verschiedenen Aufzuchtarten sind vernachlässigbar gering.

3.3. Auswirkungen der frühpostnatalen Ernährung auf Körpermasse, Körperzusammensetzung und Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinspiegel

3.3.1. Körpermasse und Körperzusammensetzung

Für die Körpermasse ergibt die statistische Analyse im Alter von 150 und 190 Tagen nach einer 16-stündigen Fastenperiode die gleiche Aussage wie für die gefütterten Tiere (s. Tabelle 3.1 und 3.3). Aufgrund der engen Korrelation zwischen E-Wert und den verschiedenen Komponenten des Körpers bei den 190 Tage alten Tiere kann für die 150 Tage alten Tiere die Körperzusammensetzung anhand ihres E-Wertes mittels der jeweiligen Regressionsgeradengleichung geschätzt werden (s. 2.4.1.4). In Abbildung 3.8 und Tabelle 3.3 sind die aus diesen Schätzwerten abgeleiteten KQ-Mittelwerte und die statistische Signifikanz ihrer Unterschiede für verschiedene Parameter der Körperzusammensetzung von 150 Tage alten Zuckerratten, die als Welpen normal, über- bzw. unterernährt wurden, dargestellt. Außerdem sind die entsprechenden Werte der 190 Tage alten Tiere dargestellt.

Im Alter von 150 Tagen (s. Abbildung 3.8 links und oberer Teil der Tabelle 3.3) zeigen Männchen wie Weibchen, die als Welpen überernährt wurden, ähnliche Werte für FFDM, Fettmasse und Fettgehalt wie die als Welpen normal ernährten Tiere (sämtliche Unterschiede nicht signifikant). Bei Männchen bzw. Weibchen, die als Welpen unterernährt wurden, ist in diesem Alter die FFDM um 12% bzw. 4% niedriger, die Fettmasse um 45%

bzw. 35% niedriger und der Körperfettgehalt um 30% bzw. 20% niedriger als bei den als Welpen normal ernährten Tieren ($P < 0,001$). Die Wildtyp-Weibchen zeigen signifikant niedrigere Werte in allen untersuchten Parametern als ihre heterozygoten Wurfgeschwister ($P < 0,05$). Bei den Männchen ist dagegen kein signifikanter Genotypunterschied zu beobachten. Interaktionen zwischen Aufzuchtart und Genotyp treten in diesem Alter bei keinem der untersuchten Parameter auf.

d150	Geschlecht	Aufzuchtart	post-hoc-Test			Genotyp +/+ vs. +/fa
			UN vs. NN	NN vs. KN	UN vs. KN	
Körpermasse (nüchtern)	m	***	***	ns	***	ns
FFDM		***	***	ns	***	ns
Fettmasse		***	***	ns	***	ns
Fettgehalt		***	***	ns	***	ns
Körpermasse (nüchtern)	w	***	***	ns	***	**
FFDM		***	***	ns	***	*
Fettmasse		***	***	ns	***	*
Fettgehalt		***	***	ns	***	*

d190	Geschlecht	Aufzuchtart	post-hoc-Test			Genotyp +/+ vs. +/fa
			UN vs. NN	NN vs. KN	UN vs. KN	
Körpermasse (nüchtern)	m	***	***	ns	***	ns
FFDM		***	***	ns	***	ns
Fettmasse		***	***	*	***	ns
Fettgehalt		**	**	**	***	ns
Körpermasse (nüchtern)	w	***	***	ns	***	*
FFDM		***	***	ns	***	ns ⁺
Fettmasse		***	***	ns	***	ns ⁺
Fettgehalt		***	***	ns	***	ns ⁺

Tab. 3.3: Am Tag 150 und Tag 190 mittels zweifaktorieller Varianzanalysen (mit den Faktoren Genotyp und Aufzuchtart) ermittelte Signifikanzen für die Unterschiede in der Körpermasse (nüchtern), der fettfreien Trockenmasse (FFDM), der Körperfettmasse und des Körperfettgehaltes von männlichen und weiblichen Zuckerratten, die als Welpen unter- (UN), normal- (NN), oder überernährt (KN) wurden. Die Werte für FFDM, Körperfettmasse und Körperfettgehalt der 150 Tage alten Tiere wurden mittels der jeweiligen im Alter von 190 Tagen ermittelten Geradengleichung für die Regression der untersuchten Parameter gegen die TOBEC[®]-Messwerte berechnet. *** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$; ns = $P \geq 0,05$; ns⁺ = $0,05 \leq P < 0,1$.

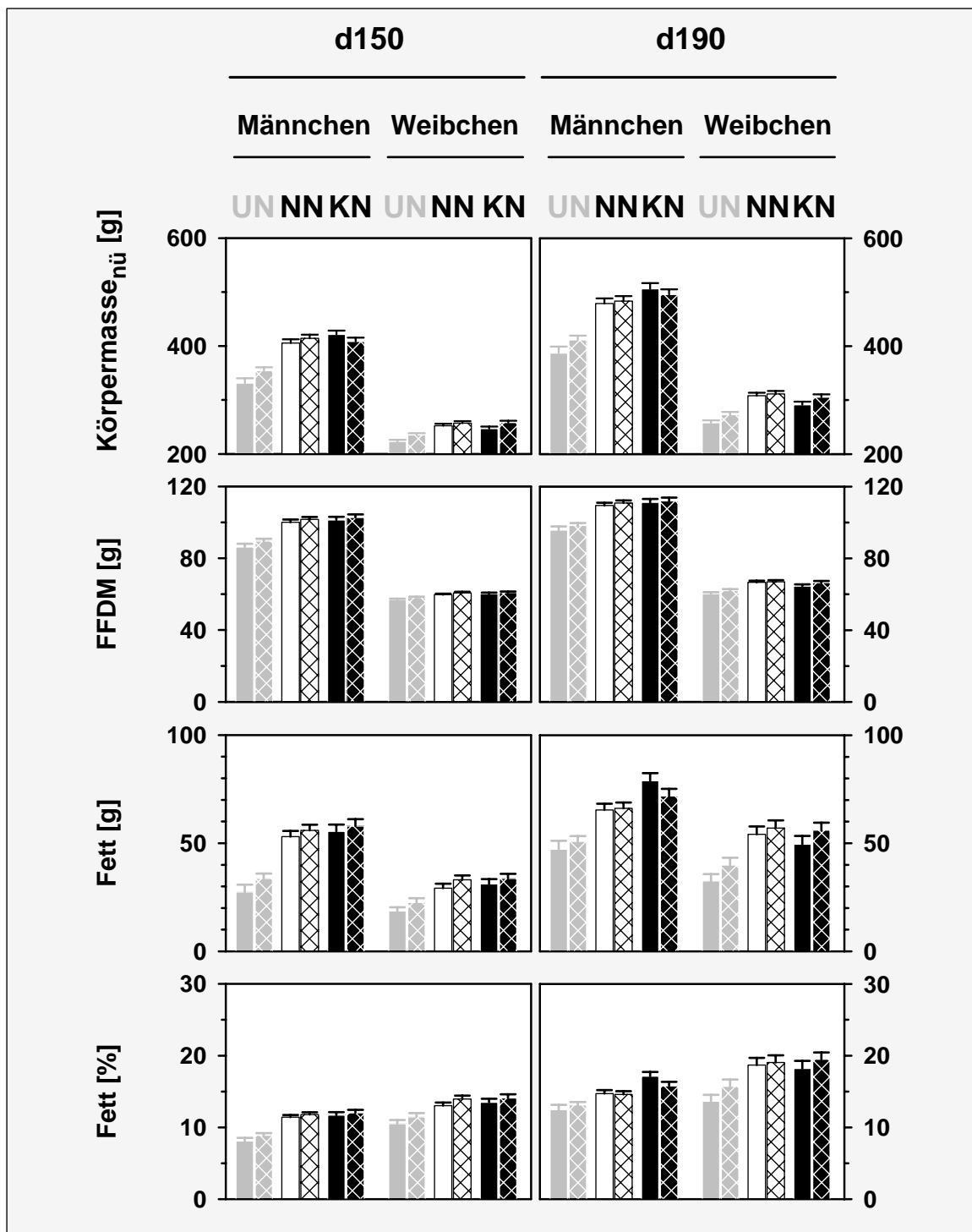


Abb. 3.8: Im Alter von 150 (links) und 190 (rechts) Tagen mittels zweifaktorieller Varianzanalysen (mit den Faktoren Genotyp und Aufzuchtart) ermittelte KQ-Mittelwerte \pm SEM der Körpermasse (nü = nüchtern), der fettfreien Trockenmasse (FFDM), der Körperfettmasse und des Körperfettgehaltes von männlichen und weiblichen Zuckerratten. Die Werte für FFDM, Körperfettmasse und Körperfettgehalt der 150 Tage alten Tiere wurden mittels der jeweiligen im Alter von 190 Tagen ermittelten Geradengleichung für die Regression der untersuchten Parameter gegen die TOBEC[®]-Messwerte berechnet. Die Tiere wurden entweder als Welpen unter- (UN, graue Balken), normal- (NN, weiße Balken), oder überernährt (KN, schwarze Balken). Unmarkierte Balken symbolisieren Wildtyp-Tiere, schraffierte Balken heterozygote Tiere. Die Signifikanz der Unterschiede ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

Im Alter von 190 Tagen, nach der sechswöchigen Fütterung einer hochkalorischen Zusatznahrung, zeigen Männchen, die als Welpen überernährt wurden, im Vergleich zu den als Welpen normal ernährten Männchen wiederum ähnliche Werte für die FFDM, jedoch 12% höhere Werte im Fettgehalt ($P < 0,01$). Weibchen, die als Welpen überernährt wurden, zeigen dagegen im Alter von 190 Tagen für die Körperzusammensetzung immer noch ähnliche Werte wie die als Welpen normal ernährten Tiere. Die als Welpen unterernährten Männchen zeigen ähnlich wie im Alter von 150 Tagen eine um 12% niedrigere FFDM aber einen nur noch um 13% niedrigeren Fettgehalt als die als Welpen normal ernährten Tiere ($P < 0,001$). Die als Welpen unterernährten Weibchen zeigen auch im Alter von 190 Tagen wieder für FFDM (ca. 10%) und Fettmasse (ca. 35%) signifikant niedrigere Werte als die als Welpen normal ernährten Weibchen. Diese Differenz ist bei beiden Parametern jedoch deutlich größer als im Alter von 150 Tagen. Somit ist der Fettgehalt bei den als Welpen unterernährten Weibchen um 25% niedriger im Vergleich zu den als Welpen normal ernährten Tieren ($P < 0,001$). Der im Alter von 150 Tagen auftretende Genotypunterschied ist bei allen untersuchten Parametern bei den 190 Tage alten Weibchen nur noch tendenziell vorhanden (s. Tabelle 3.3). Auch im Alter von 190 Tagen ist bei den Männchen der Genotypunterschied bei keinem Parameter signifikant. Eine Interaktion zwischen Aufzuchtart und Genotyp tritt bei keinem untersuchten Parameter auf.

Fazit:

Ein Einfluß der Aufzuchtart auf die Körperzusammensetzung zeigt sich vor allem bei Zuckerratten, die als Welpen unterernährt wurden. Außerdem vergrößert sich bei den Männchen zwischen Tag 150 und 190, also entweder durch die hochkalorischen Diät oder mit dem Alter, der Unterschied im Fettgehalt zwischen den als Welpen überernährten und normal ernährten Tieren so weit, daß er das Signifikanzniveau erreicht. Im Gegensatz dazu verkleinert sich der Unterschied im Fettgehalt zwischen den als Welpen unterernährten und normal ernährten Tiere im gleichen Zeitraum, obwohl der Unterschied signifikant bleibt. Ein Genotypunterschied ist bei den Männchen weder vor noch nach der hochkalorischen Zusatzfütterung vorhanden. Dagegen ist überraschenderweise bei den Weibchen der im Alter von 150 Tagen bei allen Parametern zu beobachtende Heterozygoteneffekt im Alter von 190 Tagen, bedingt durch das Alter oder die sechswöchige hochkalorische Zusatzfütterung, nur noch tendenziell erkennbar.

3.3.2. Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinspiegel

3.3.2.1. Korrelation mit dem Körperfettgehalt

In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß die **Plasmaleptinspiegel** sowohl juveniler als auch adulter Ratten eng mit der Körperfettmasse bzw. dem Fettgehalt korreliert sind (Zhang et al. 1997; Olbort 1998; Maffei et al.1995a). Dies zeigte sich auch in dieser Untersuchung sowohl bei 150 Tage als auch bei 190 Tage alten Zuckerratten. Die höheren Plasmaleptinspiegel der als Welpen überernährten Tiere gegenüber denen der als Welpen unterernährten Tiere reflektieren deren höheren Körperfettgehalt. Im vorliegenden Fall konnte für die Männchen und Weibchen jeweils eine gemeinsame Regressionsgerade für Tiere der unterschiedlichen Aufzuchtarten erstellt werden, da die Werte der einzelnen Gruppen sich zum Teil überschneiden und augenscheinlich auf einer Geraden liegen, wie Abbildung 3.9 beispielhaft für die 190 Tage alten Männchen zeigt. Die Korrelationskoeffizienten für diese Beziehungen sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt.

d150	Geschlecht	n	r	Signifikanz gegen Null
Leptin	m	50	0,49	***
Insulin		54	0,37	**
Insulin mit Leptin		47	0,44	**
Leptin	w	58	0,34	**
Insulin		50	0,16	ns
Insulin mit Leptin		50	0,42	**

d190	Geschlecht	n	r	Signifikanz gegen Null
Leptin	m	54	0,90	***
Insulin		54	0,61	***
Insulin mit Leptin		52	0,65	***
Leptin	w	57	0,81	***
Insulin		57	0,60	***
Insulin mit Leptin		57	0,67	***

Tab. 3.4: Übersicht über die Korrelationskoeffizienten (r) für die gemeinsame Beziehung zwischen Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinkonzentration und Körperfettgehalt (bei semilogarithmischer Darstellung) sowie der Korrelation von Plasmainsulin- mit Plasmaleptinspiegel (bei logarithmischer Darstellung) von 150 und 190 Tage alten, nüchternen Zuckerratten, die als Welpen über- (KN), normal- (NN) oder unterernährt (UNN) wurden. *** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; ns = nicht signifikant; n = Anzahl der ausgewerteten Daten.

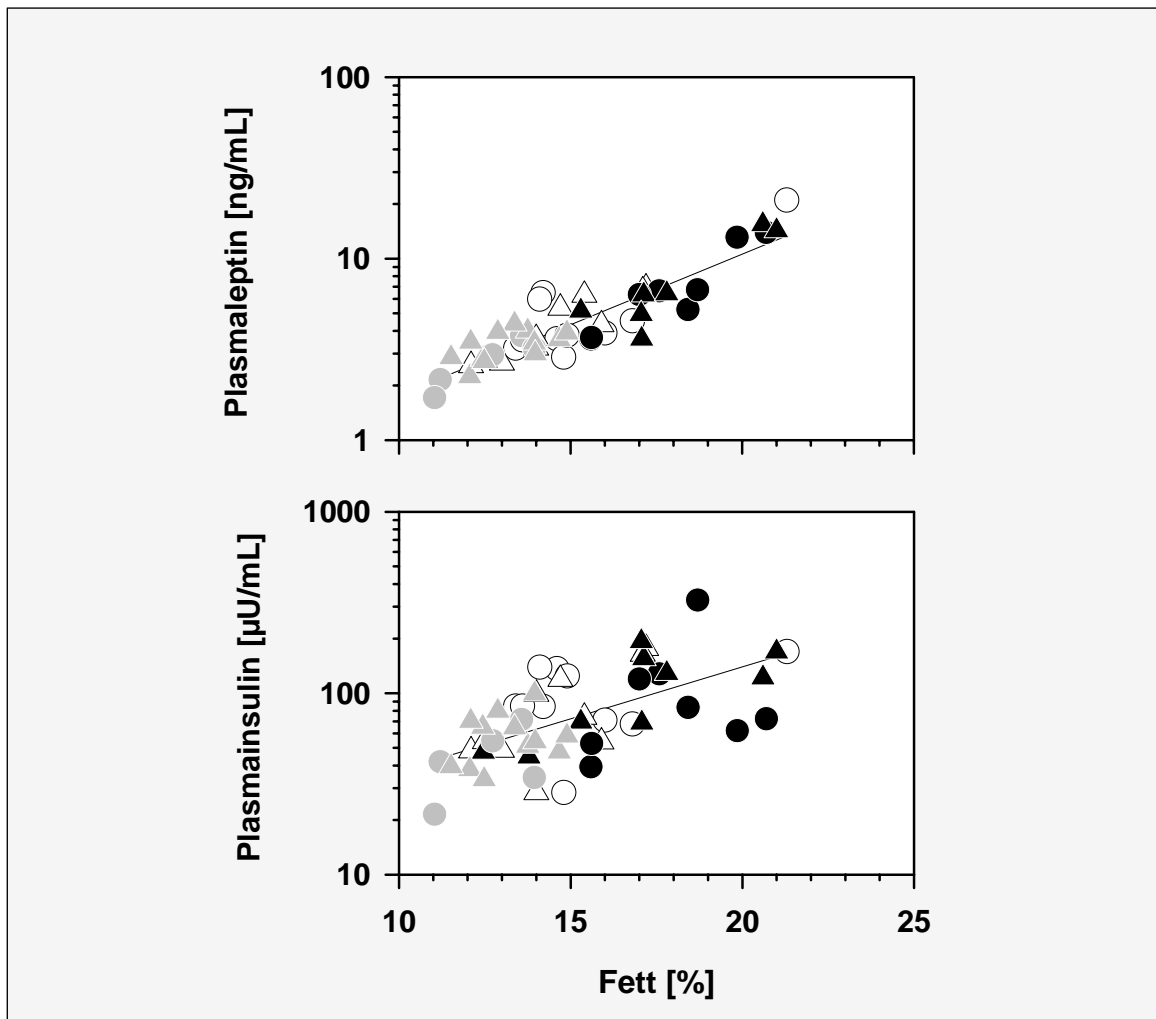


Abb. 3.9: Korrelation zwischen der Plasmaleptin- (oben, $r = 0,90$) bzw. Plasmainsulinkonzentration (unten, $r = 0,58$) und dem Körperfettgehalt von 190 Tage alten männlichen Zuckerratten. Als Welpen über- (schwarze Symbole), normal- (weiße Symbole) oder unterernährte (graue Symbole) $+/+$ Tiere (Kreise) und $+/-$ Tiere (Dreiecke). Die Darstellung ist semilogarithmisch.

Auch der **Plasmainsulinspiegel** der 150 und 190 Tage alten männlichen Zuckerratten korreliert mit dem Fettgehalt. Wenngleich die Korrelation weniger eng ist, ergeben sich für die Männchen signifikante Korrelationskoeffizienten (Tabelle 3.4). Im Alter von 150 Tagen zeigen die Weibchen keine Korrelation zwischen Fettgehalt und Plasmainsulinspiegel, aber nach der hochkalorischen Zusatzfütterung im Alter von 190 Tagen. Trotz der niedrigen Korrelationskoeffizienten (r) besteht eine signifikante Korrelation zwischen den gleichzeitig ermittelten Plasmaleptin- und Plasmainsulinspiegeln bei Männchen wie Weibchen (s. Tabelle 3.4).

3.3.2.2. Vergleich der Mittelwerte

Zur Untersuchung, ob und wie die zusätzliche Schokoladenfütterung die Plasmaleptin- und -insulinspiegel beeinflusst, wurden für Tag 150 bzw. 190 die KQ-Mittelwerte \pm SEM dieser Parameter bei nüchternen Tieren ermittelt (Abbildung 3.10, Tabelle 3.5). Am Tag 150 unterscheiden sich weder die Männchen (aber mit Tendenz, $P = 0,065$) noch die Weibchen aus den einzelnen Aufzuchtarten in der **Plasmaleptinkonzentration** signifikant voneinander. Doch zeigen die heterozygoten Männchen bzw. Weibchen einen um 35% bzw. 40% höheren Plasmaleptinspiegel als die Wildtyp-Tiere ($P < 0,05$). Es bestehen keine Interaktionen zwischen Aufzuchtart und Genotypen bei Männchen und Weibchen.

Erwartungsgemäß stieg bei den Männchen der Plasmaleptinspiegel nach der hochkalorischen Zusatzfütterung in allen Aufzuchtarten an. Auch bei den als Welpen normal und überernährten Weibchen stieg der Leptinspiegel an. Bei den als Welpen unterernährten Weibchen blieb dagegen der Plasmaleptinspiegel nahezu unverändert. Jedoch unterscheiden sich im Alter von 190 Tagen, auch nach der zusätzlichen 6-wöchigen hochkalorischen

d150	Geschlecht	Aufzuchtart	post-hoc-Test			Genotyp +/+ vs. +/-
			UN vs. NN	NN vs. KN	UN vs. KN	
Leptin	m	ns ⁺	ns ⁺	ns	ns	*
Insulin		**	ns	ns	**	ns
Leptin	w	ns	ns	ns	ns	**
Insulin		*	ns	ns ⁺	ns	ns

d190	Geschlecht	Aufzuchtart	post-hoc-Test			Genotyp +/+ vs. +/-
			UN vs. NN	NN vs. KN	UN vs. KN	
Leptin	m	***	**	ns	***	ns
Insulin		**	**	ns	*	ns
Leptin	w	***	***	ns	***	ns ⁺
Insulin		***	***	***	ns	ns

Tab. 3.5: An Tag 150 und 190 mittels zweifaktorieller Varianzanalysen (mit den Faktoren Genotyp und Aufzuchtart) ermittelte Signifikanz der Unterschiede im Plasmaleptin- und Plasmainsulinspiegel von männlichen (m) und weiblichen (w) Zuckerratten, die entweder als Welpen unter- (UN), normal- (NN), oder überernährt (KN) wurden. *** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$; ns = $P \geq 0,05$; ns⁺ = $0,05 \leq P < 0,1$.

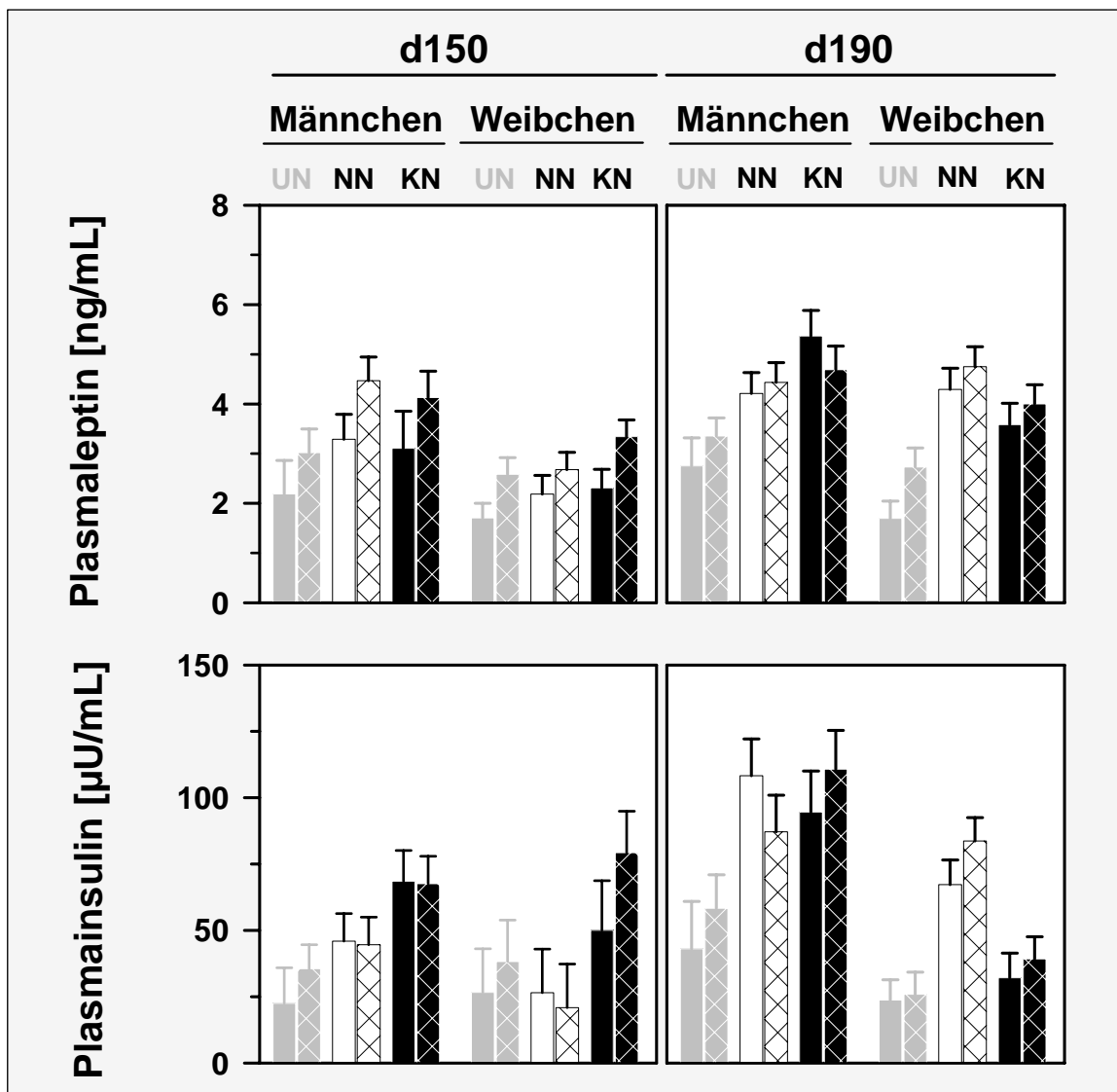


Abb. 3.10: Am Tag 150 (links) und Tag 190 (rechts) mittels zweifaktorieller Varianzanalysen (mit den Faktoren Genotyp und Aufzuchtart) ermittelte KQ-Mittelwerte \pm SEM der Plasmaleptin- und -insulinkonzentration von männlichen und weiblichen Zuckerratten. Die Tiere wurden entweder als Welpen unter- (UN, graue Balken), normal- (NN, weiße Balken) oder überernährt (KN, schwarze Balken). Unmarkierte Balken symbolisieren Wildtyp-Tiere, schraffierte Balken heterozygote Tiere. Die Signifikanz der Unterschiede ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

Zusatzdiät, die Plasmaleptinspiegel der als Welpen überernährten Männchen wie Weibchen nicht signifikant von denen der als Welpen normal ernährten Tieren. Dagegen zeigen die als Welpen unterernährten Männchen in diesem Alter um 30% niedrigere Werte als die als Welpen normal ernährten Tiere ($P < 0,01$). Bei den Weibchen beträgt dieser Unterschied sogar 50% ($P < 0,001$). Der im Alter von 150 Tagen vorhandene Genotypunterschied besteht nur noch tendenziell ($P = 0,055$) bei den Weibchen und ist bei den Männchen vollständig verschwunden. Wiederum bestehen keine Interaktionen zwischen Aufzuchtart und Genotyp.

Im Alter von 150 Tagen hat die Aufzuchtart sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen einen signifikanten Einfluß auf den **Plasmainsulinspiegel**, wobei sich weder die als Welpen unterernährten noch die überernährten Tiere signifikant von den als Welpen normal ernährten Tiere unterscheiden. Nur die als Welpen überernährten Weibchen zeigen tendenziell einen höheren Plasmainsulinspiegel als die normal ernährten Tiere ($P < 0,056$). Bei den Männchen zeigen die als Welpen unterernährten Männchen nur im Vergleich zu den als Welpen überernährten Tiere um 50% niedrigere Werte ($P < 0,01$). Bei den Männchen wie Weibchen besteht kein Genotypunterschied bzw. keine Interaktion zwischen Aufzuchtart und Genotyp.

Erwartungsgemäß sind die Plasmainsulinspiegel der Männchen nach der hochkalorischen Zusatzfütterung in allen Aufzuchtarten gestiegen. Aber auch am Tag 190 zeigt der Plasmainsulinspiegel der als Welpen überernährten Männchen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den als Welpen normal ernährten Tieren. Die als Welpen unterernährten Männchen zeigen in diesem Alter jedoch signifikant (50%) niedrigere Werte als die als Welpen normal ernährten Tiere. Der Plasmainsulinspiegel der als Welpen normal ernährten Weibchen verdreifachte sich sogar zwischen Tag 150 und Tag 190. Entgegen den Erwartungen war bei den als Welpen überernährten Weibchen der Plasmainsulinspiegel im Alter von 190 Tagen dagegen nur halb so hoch wie der der 150 Tage alten Tiere, so daß sie signifikant (30%) niedrigere Plasmainsulinspiegel haben als die als Welpen normal ernährten Tiere. Da auch nach Überprüfung der einzelnen Daten keine Fehlerquellen entdeckt wurden, und die Bedingungen für die Blutentnahme jedesmal gleich waren, ist für dieses überraschende Ergebnis kein Meßfehler zu erkennen. Die Plasmainsulinspiegel der als Welpen unterernährten Weibchen liegen erwartungsgemäß signifikant (70%) niedriger als die der als Welpen normal ernährten Tiere. Wiederum besteht im Alter von 190 Tagen bei Männchen bzw. Weibchen kein Genotypunterschied bzw. keine Interaktion zwischen Aufzuchtart und Genotyp.

Fazit:

Der **Plasmaleptinspiegel** ist bei Männchen und Weibchen am Tag 150 locker und nach der hochkalorischen Zusatzfütterung am Tag 190 eng mit dem Körperfettgehalt korreliert. Im Alter von 150 Tagen ist bei Männchen und Weibchen im Plasmaleptinspiegel ein signifikanter Genotypunterschied vorhanden, der jedoch nach der hochkalorischen Zusatzfütterung am Tag 190 bei den männlichen Tieren verschwindet und bei den Weibchen nur noch tendenziell besteht. Umgekehrt besteht noch kein signifikanter Einfluß der

Aufzuchtart auf den Plasmaleptinspiegel am Tag 150. Nach der hochkalorischen Zusatzfütterung hat sich im Alter von 190 Tagen bei den als Welpen unterernährten Männchen und Weibchen ein signifikanter Unterschied gegenüber den normal ernährten Tieren entwickelt, nicht jedoch bei den überernährten Tieren.

Auch der **Plasmainsulinspiegel** korreliert bei den Männchen im Alter von 150 und 190 Tagen mit dem Körperfettgehalt. Bei den Weibchen dagegen besteht nur am Tag 190 eine signifikante Korrelation des Plasmainsulinspiegels mit dem Körperfettgehalt. Die Korrelationen sind aber lockerer als die mit dem Plasmaleptinspiegel. Die Aufzuchtart hat im Alter von 150 und 190 Tagen sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen einen signifikanten Einfluß auf den Plasmainsulinspiegel.

3.4. Zusammenhang zwischen Absetz-Körpermasse und Körpermasse bzw. Körperzusammensetzung des adulten Tieres

Um zu klären inwieweit die Körpermasse, die Körperzusammensetzung sowie der Plasmaleptin- und Plasmainsulinspiegel beim adulten Tier durch die Körpermasse beim Absetzen (Tag 21) beeinflusst wird, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Die Betrachtung der für Tag 90 abgebildeten Einzelwerte zeigt bei Männchen und Weibchen deutlich, daß es zwischen den einzelnen Aufzuchtarten Überschneidungen gibt, und sich die Beziehungen für die verschiedenen Aufzuchtarten nicht auffällig unterscheiden, so daß jeweils gemeinsame Regressionsgeraden ermittelt werden können. Die Körpermasse der adulten Zuckerratten ist in allen drei untersuchten Altersstufen und bei beiden Geschlechtern, besonders bei den Männchen, eng mit der Körpermasse der Absetzlinge korreliert (Abbildung 3.11). Dabei besteht bei Männchen wie Weibchen am Tag 90 die engste Korrelation (s. Tabelle 3.6). Ein Vergleich der Geraden für die Männchen zeigt während der normalen Fütterung zwischen d90 und d150 eine signifikante Parallelverschiebung der Geraden zu einer höheren Körpermasse ($P < 0,001$ für den y-Achsenabschnitt). Nach Fütterung der hochkalorischen Diät bis zum Tag 190 zeigen Männchen, die im Alter von 21 Tagen eine hohe Körpermasse hatten eine stärkere Zunahme als Tiere, die am Tag 21 eine geringe Körpermasse aufwiesen. Dies spiegelt sich in der größeren Steigung ($P < 0,05$) der Regressionsgerade in diesem Alter im Vergleich zu den Regressionsgeraden für die anderen Tage wider.

Zwar ist auch bei den Weibchen die Steigung der Regressionsgeraden im Alter von 190 Tagen am höchsten, die Unterschiede in der Steigung sind jedoch nicht signifikant. Während der Schokoladenfütterung nehmen also Tiere, die im Alter von 21 Tagen eine geringe Körpermasse aufwiesen nicht signifikant stärker zu als Tiere, die im selben Alter eine höhere Körpermasse hatten.

Männchen:

Alter [d]	n	r	Signifikanz gegen Null	Steigung
90	57	0,90	***	2,9
150	57	0,86	***	3,5
190	56	0,85	***	4,6

Weibchen:

Alter [d]	n	r	Signifikanz gegen Null	Steigung
90	56	0,70	***	1,3
150	56	0,70	***	0,5
190	55	0,63	***	1,8

Tab. 3.6: Übersicht über die Korrelationskoeffizienten (r) und Steigungen der Beziehung zwischen den Körpermassen an Tag 90, 150 bzw. 190 von männlichen (m) und weiblichen (w) Zuckerratten und ihrer Körpermasse an Tag 21. *** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$; ns = $P \geq 0,05$; ns⁺ = $0,05 \leq P < 0,1$; n = Anzahl der ausgewerteten Daten.

Für die Korrelation des Fettgehalts bzw. der FFDM mit der Körpermasse am Tag 21 konnte für Männchen wie Weibchen jeweils eine gemeinsame Regressionsgerade für die Daten der unterschiedlichen Aufzuchtarten erstellt werden, da die Werte überlappen und sich die Beziehung in den einzelnen Gruppen nicht systematisch unterscheidet. Der als Maß für die Adipositas dienende Fettgehalt der adulten Männchen und Weibchen hängt sowohl im Alter von 150 Tagen als auch nach der hochkalorischen Zusatzfütterung am Versuchsende signifikant ($P < 0,001$) von der Körpermasse am Tag 21 ab, auch wenn die Korrelationskoeffizienten relativ niedrig sind (Tabelle 3.7, Abbildung 3.12). Die FFDM ist dagegen bei den Männchen an beiden Terminen eng ($r = 0,86$) mit der Körpermasse am Tag 21 korreliert (Tabelle 3.7, Abbildung 3.13). Bei den Weibchen ist der Korrelationskoeffizient zwar an beiden Tagen niedriger als bei den Männchen, doch ist er ebenfalls am Tag 190 höher als für den Körperfettgehalt. Demnach werden also nicht nur der Körperfettgehalt, sondern vor allem die FFDM der adulten Männchen und Weibchen durch die Körpermasse beim Absetzen beeinflusst.

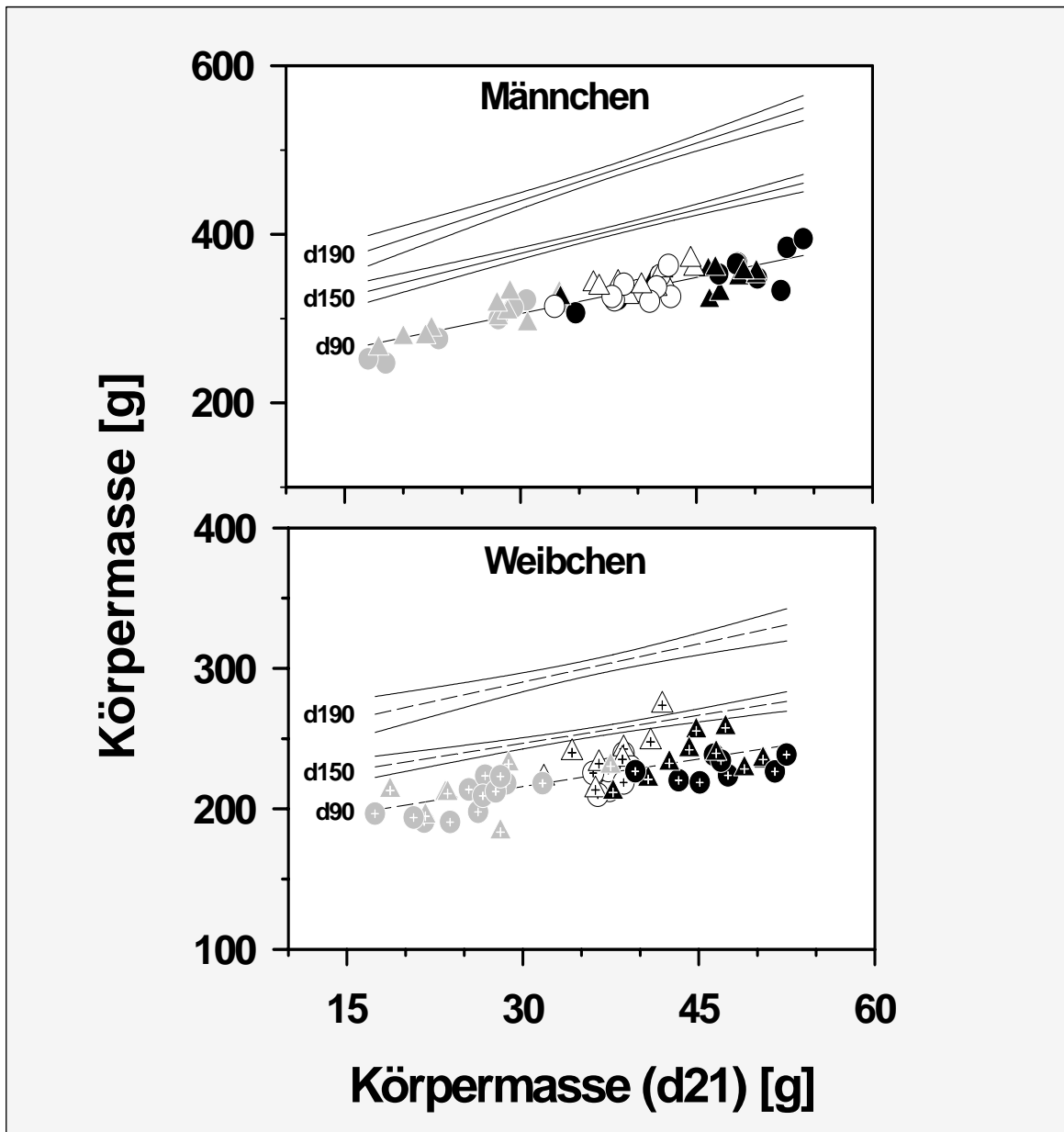


Abb. 3.11: Korrelation zwischen der Körpermasse am Tag 90, 150 sowie 190 und der Körpermasse am Tag 21 für männliche (oben) und weibliche (unten) Zuckerratten. Als Welpen über- (schwarze Symbole), normal (weiße Symbole) oder unterernährte (graue Symbole) $+/+$ Tiere (Kreise) und $+/fa$ Tiere (Dreiecke). Daten der Weibchen sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Für die Korrelationen am Tag 150 und 190 sind zugunsten der Übersichtlichkeit die 95% Konfidenzintervallen statt der Einzelwerte dargestellt. Korrelationskoeffizienten siehe Tabelle 3.6.

d150	Geschlecht	n	r	Signifikanz gegen Null	Steigung
Fett [%]	m	53	0,86	***	0,2
FFDM [g]		53	0,86	***	0,2
Fett [%]	w	57	0,66	***	0,1
FFDM [g]		57	0,66	***	0,1

d190	Geschlecht	n	r	Signifikanz gegen Null	Steigung
Fett [%]	m	56	0,63	***	0,2
FFDM [g]		56	0,86	***	0,8
Fett [%]	w	58	0,48	***	0,2
FFDM [g]		58	0,59	***	0,2

Tab. 3.7: Übersicht über die Korrelationskoeffizienten (r) und Steigungen der Beziehung zwischen Körperfettgehalt bzw. fettfreier Trockenmasse (FFDM) von männlichen (m) und weiblichen (w) Zuckerratten und ihrer Körpermasse an Tag 21 (bei semilogarithmischer Darstellung). Die Werte der 150 Tage alten Tiere wurden mittels der jeweiligen im Alter von 190 Tagen ermittelten Geradengleichung für die Regression der untersuchten Parameter gegen die TOBEC[®]-Meßwerte berechnet. *** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$; ns = $P \geq 0,05$; ns⁺ = $0,05 \leq P < 0,1$; n = Anzahl der ausgewerteten Daten.

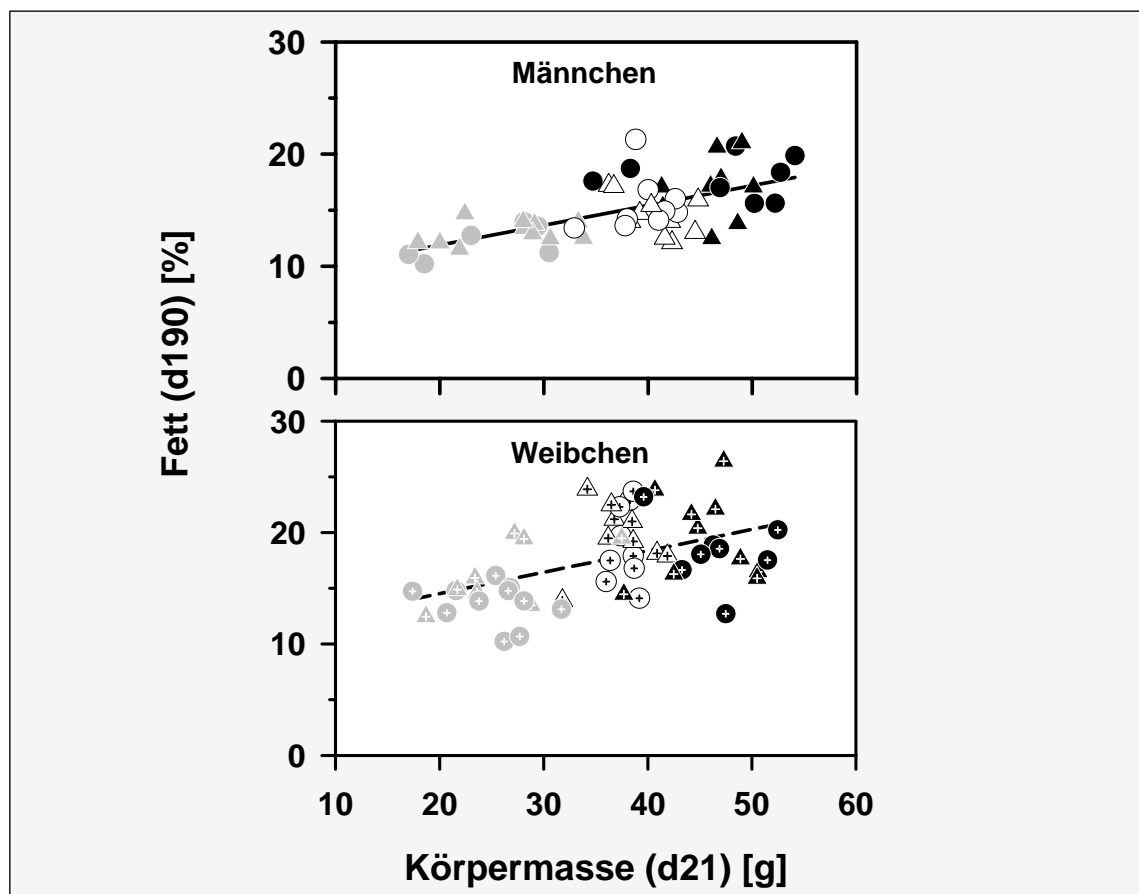


Abb. 3.12: Korrelation zwischen dem Körperfettgehalt am Tag 190 und der Körpermasse am Tag 21 von männlichen (oben, $r = 0,63$) und weiblichen (unten, $r = 0,48$) Zuckerratten. Als Welpen über- (schwarze Symbole), normal- (weiße Symbole) oder unterernährte (graue Symbole) +/- Tiere (Kreise) und +/-fa Tiere (Dreiecke). Daten der Weibchen sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.

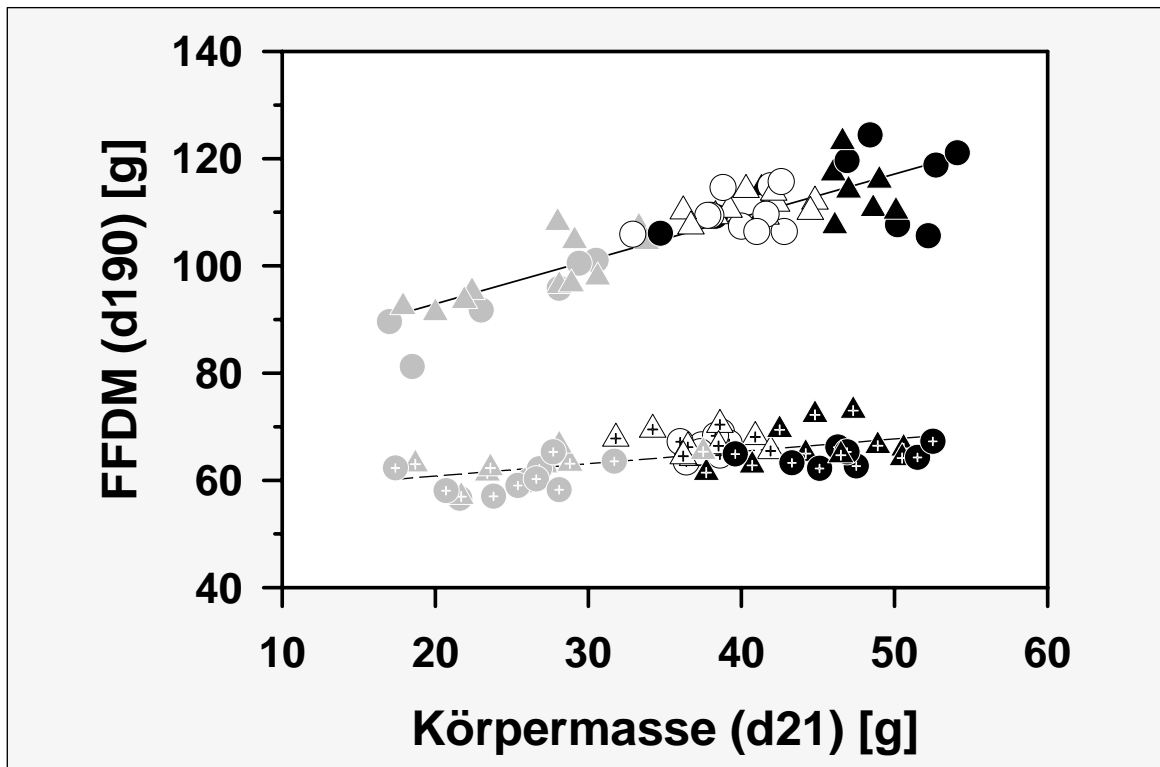


Abb. 3.13: Korrelation zwischen der fettfreien Trockenmasse (FFDM) am Tag 190 und der Körpermasse am Tag 21 von männlichen ($r = 0,86$) und weiblichen ($r = 0,59$) Zuckerratten. Als Welpen über- (schwarze Symbole), normal- (weiße Symbole) oder unterernährte (graue Symbole) +/- Tiere (Kreise) und +/-fa Tiere (Dreiecke). Daten der Weibchen sind mit einem Kreuz gekennzeichnet.

Für die Korrelationen von Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinspiegel mit der Körpermasse beim Absetzen kann für die Männchen und Weibchen jeweils eine gemeinsame Regressionsgerade für die unterschiedlichen Aufzuchtarten erstellt werden, da die Werte der einzelnen Gruppen sich zum Teil überschneiden und auf einer Geraden liegen (nicht dargestellt). Sowohl der Plasmaleptin- als auch der Plasmainsulinspiegel der Männchen zeigt eine lockere ($0,32 < r < 0,42$) aber aufgrund der großen Anzahl signifikante Korrelation mit der Körpermasse am Tag 21 ($0,01 < P < 0,05$; Tabelle 3.8) an. Dabei ist die Korrelation des Plasmaleptinspiegels mit der Körpermasse am Absetztag am Tag 190 enger als am Tag 150 während sich beim Plasmainsulinspiegel kein Unterschied zwischen diesen beiden Tagen ergibt. Bei den Weibchen besteht am Tag 150 nur tendenziell eine Korrelation des Plasmaleptinspiegels mit der Körpermasse am Tag 21, im Alter von 190 Tagen ist die Korrelation mit der Körpermasse am Tag 21 dagegen signifikant. Der Plasmainsulinspiegel der Weibchen zeigt weder am Tag 150 noch am Tag 190 eine signifikante Korrelation mit der Körpermasse am Tag 21.

d150	Geschlecht	n	r	Signifikanz gegen Null	Steigung
Leptin	m	50	0,32	*	0,1
Insulin		54	0,41	**	0,8
Leptin	w	58	0,23	ns ⁺	0,0
Insulin		52	-0,16	ns	-0,5

d190	Geschlecht	n	r	Signifikanz gegen Null	Steigung
Leptin	m	54	0,42	**	0,2
Insulin		53	0,36	**	1,7
Leptin	w	57	0,50	***	0,1
Insulin		57	0,18	ns	0,7

Tab. 3.8: Übersicht über die Korrelationskoeffizienten (r) und Steigungen der Beziehung zwischen Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinspiegel von männlichen (m) und weiblichen (w) Zuckerratten und ihrer Körpermasse an Tag 21 (bei semilogarithmischer Darstellung). *** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$; ns = $P \geq 0,05$; ns⁺ = $0,05 \leq P < 0,1$; n = Anzahl der ausgewerteten Daten.

Fazit:

Nicht nur die Körpermasse und der Körperfettgehalt der adulten Zuckerratten werden von der Körpermasse am Absetztag bzw. durch die ihr zugrunde liegenden Unterschiede in der frühpostnatalen Ernährung beeinflusst, sondern auch die FFDM hängt im besonderen Maße von ihr ab. Die hochkalorische Zusatzfütterung bzw. das höhere Alter bewirken beim Plasmaleptinspiegel, daß die Korrelation mit der Körpermasse am Tag 21 enger wird, dagegen üben sie auf den Zusammenhang mit dem Plasmainsulinspiegel keinen Einfluß aus.

3.5. Einfluß der Aufzucht durch Ammen eines anderen Stammes

3.5.1. Aufzucht von Zuckerrattenwelpen durch Wistarratten-Ammen

Die Körperfettmasse der Männchen, die von Wistarratten-Ammen aufgezogen wurden, sowie die der in einer Vergleichsstudie von Zuckerrattenmüttern aufgezogenen Tiere beiden Geschlechts (Schölch 2001) korreliert in allen Versuchsgruppen eng mit der Feuchtmasse (Abbildung 3.14). Die Körperfettmasse der von Wistarratten-Ammen aufgezogenen Weibchen zeigt zwar keine signifikante Korrelation mit der Feuchtmasse, doch beruht dies

vermutlich nur auf dem sehr engen Bereich (+/+ : 44,6 bis 47,9 g; +/fa: 45,2 bis 48,4 g), in dem die Werte für die Feuchtmasse liegen, da sowohl die Steigung wie die Streuung der Werte um die Regressionsgerade nicht auffallend größer ist als in den anderen Gruppen. Bei einem Vergleich von Zuckerrattenwelpen, die im kleinen Nest von Wistarratten-Ammen statt von Zuckerrattenmüttern (Schölch 2001) aufgezogen wurden, ist erkennbar, daß die von Wistarratten-Ammen aufgezogenen Tiere, bei z.T. gleicher Feuchtmasse, eine deutlich höhere Fettmasse haben. Außerdem fällt auf, daß 80% der Männchen und Weibchen der von Wistarratten-Ammen aufgezogenen Tiere eine Feuchtmasse von ≥ 45 g haben, während bei den durch Zuckerrattenmütter im kleinen Nest aufgezogenen Männchen 36% und bei den Weibchen 23% in diesem Bereich liegen. Bei Betrachtung des Genotypunterschiedes innerhalb der durch Wistarratten-Ammen aufgezogenen Tiere zeigt sich bei den Heterozygoten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eine signifikante ($P < 0,001$) Parallelverschiebung der Geraden zu höheren Fettwerten bei Männchen wie Weibchen. Für die FFDM ergeben sich sehr enge Korrelationen mit der Feuchtmasse für Männchen (+/+ : 0,93; +/fa: 0,95) und Weibchen (+/+ : 0,90; +/fa: 0,90). Innerhalb der durch Wistarratten-Ammen aufgezogenen Tiere ergibt sich für die Männchen kein Genotypunterschied für die Korrelation zwischen FFDM und Feuchtmasse, bei den Weibchen jedoch zeigen die Werte der Heterozygoten im Vergleich zu den Wildtypen eine signifikante Parallelverschiebung ($P < 0,05$) der Geraden zu höheren FFDM-Werten.

Die hier erhobenen Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse, mit den Faktoren Genotyp und Aufzuchtart, mit den Werten von Schölch (2001) verglichen. Die aus dieser Auswertung resultierenden KQ-Mittelwerte sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Zuckerrattenwelpen, die im kleinen Nest von Wistarratten-Ammen aufgezogen wurden, zeigen bei allen untersuchten Parametern am Tag 21 signifikant ($P < 0,001$) höhere Werte im Vergleich zu den Tieren, die von Zuckerrattenmüttern im kleinen und normalen Nest aufgezogen wurden. So ist die Körpermasse von durch Wistarratten-Ammen aufgezogenen Männchen und Weibchen gegenüber den von Zuckerrattenmüttern im kleinen Nest aufgezogenen Tieren um knapp 10% erhöht. Die FFDM zeigt sehr ähnliche Veränderungen. Eine deutlichere Zunahme erfolgt bei der Körperfettmasse. Bei den Männchen aus der Aufzucht mit einer Wistarratten-Amme nimmt die Fettmasse gegenüber im kleinen Nest von Zuckerrattenmüttern aufgezogenen Tieren des gleichen Genotyps bei den Wildtyp-Tieren um 60% bzw. bei den heterozygoten Tieren um 40% zu. Bei den Weibchen ist der Anstieg noch deutlicher. Hier liegt die Fettmasse bei den Tieren aus der Aufzucht mit Wistarratten-Ammen um 85% (+/+) bzw. 50% (+/fa)

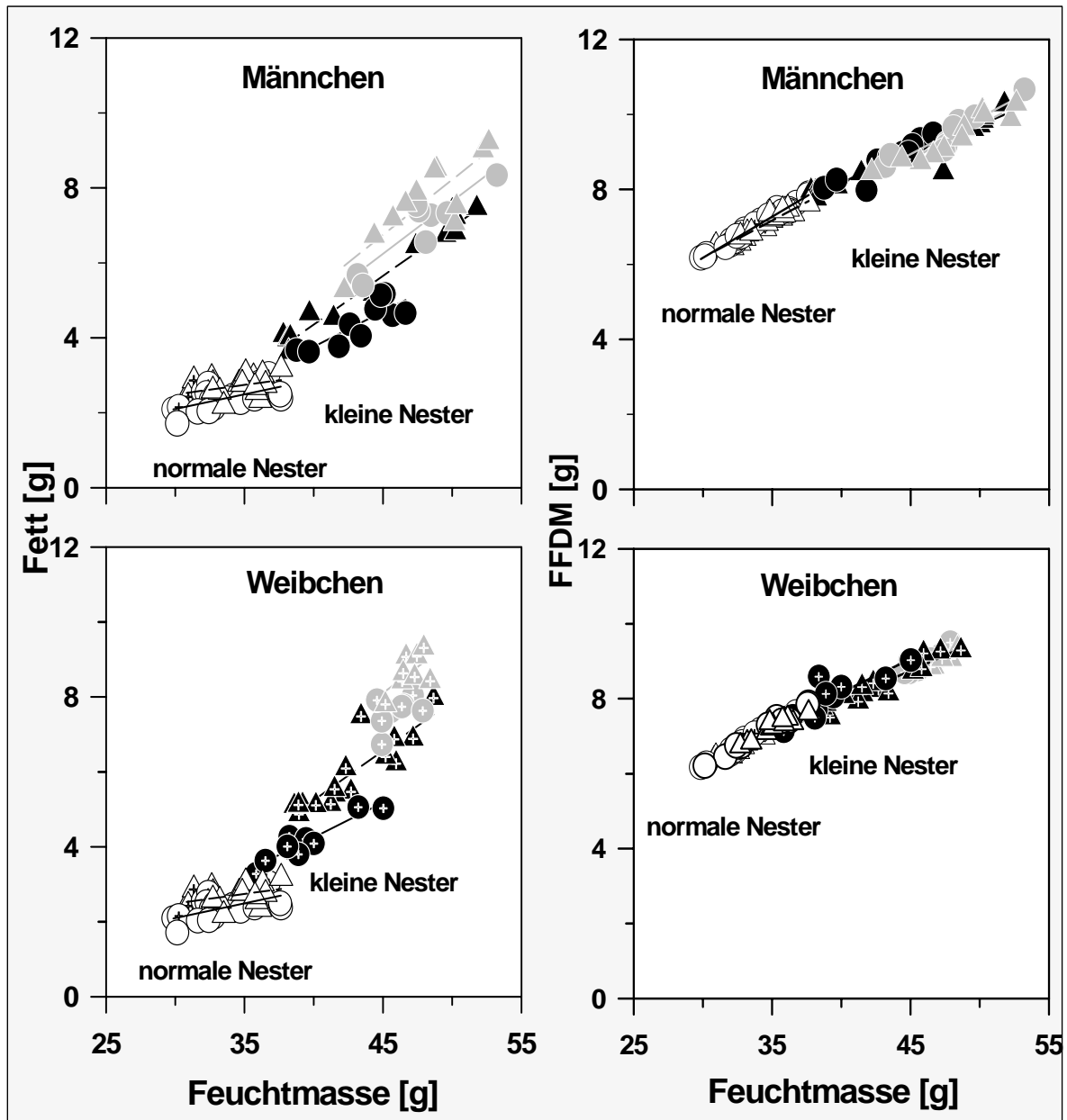


Abb. 3.14: Korrelation zwischen Körperfettmasse (links) bzw. fettfreier Trockenmasse (rechts) und Feuchtmasse 21 Tage alter männlicher (oben) und weiblicher (unten) Zuckerratten, die von Wistarratten-Ammen (graue Symbole) im kleinen Nest aufgezogen wurden. Als Vergleich sind von Zuckerrattenmüttern (schwarze Symbole; Schölch 2001) in einem kleinen Nest aufgezogene Tiere dargestellt. Als weitere Referenzwerte sind die für Männchen und Weibchen gemeinsam ermittelten Regressionsgeraden für im normalen Nest (weiße Symbole, Schölch 2001) aufgezogene Tiere in beiden Teilen der Zeichnung dargestellt. Daten weiblicher Tiere sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Kreis, durchgehende Linie: +/+, Dreieck, gestrichelte Linie: +/fa. Der Korrelationskoeffizient (r) für die hier erhobenen Daten aus der Aufzucht durch Wistarratten-Ammen ist für die Männchen $0,90 < r < 0,93$ (+/+) bzw. $0,84 < r < 0,95$ (+/fa) und für die Weibchen $0,43 < r < 0,88$ (+/+) bzw. $0,59 < r < 0,92$ (+/fa). Für die von Schölch erhobenen Werte ergeben sich Korrelationskoeffizienten im gleichen Bereich.

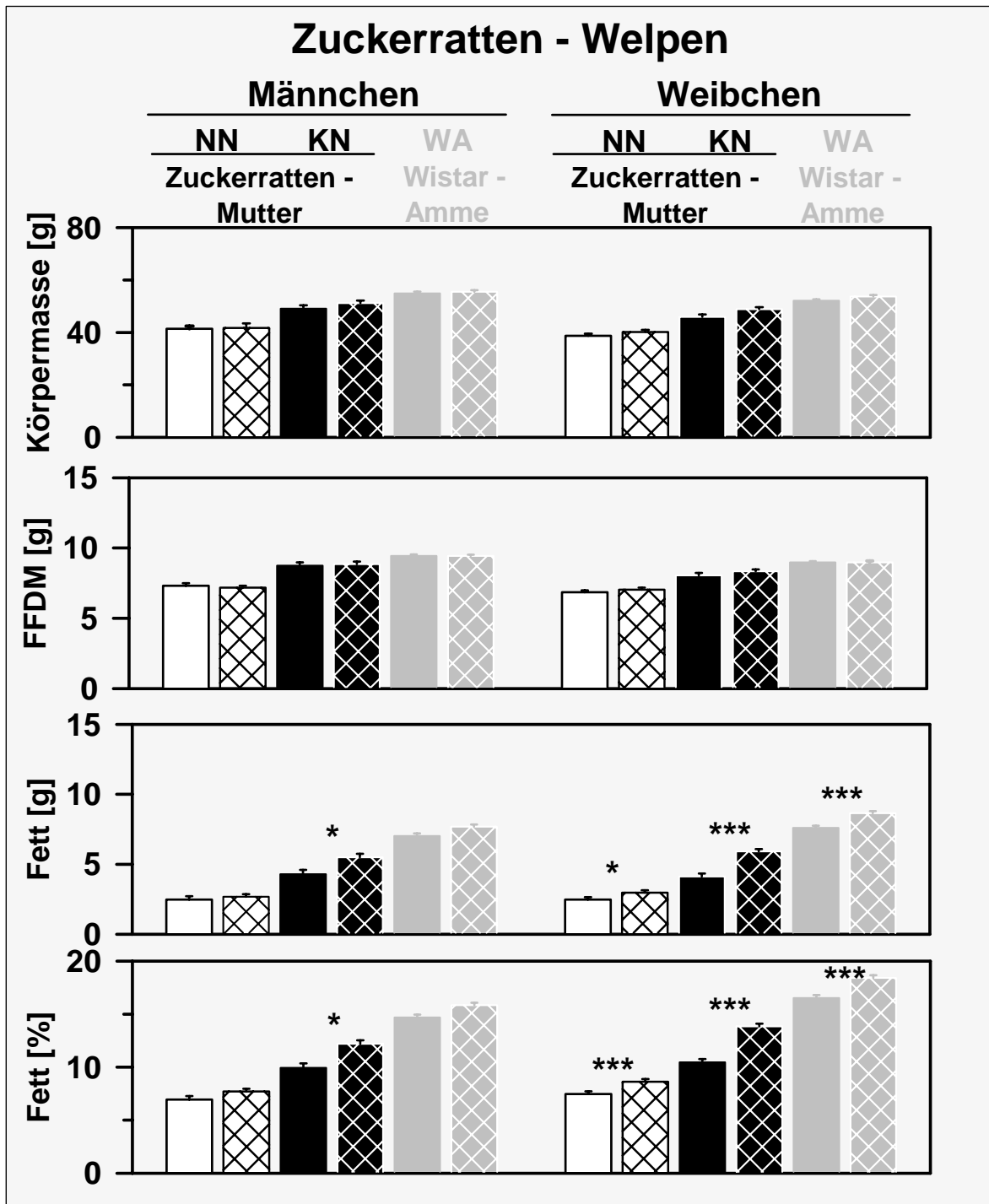


Abb. 3.15: Mittels zweifaktorieller Varianzanalysen (mit den Faktoren Genotyp und Aufzuchtart) ermittelte KQ -Mittelwerte (\pm SEM) der Körpermasse, der fettfreien Trockenmasse (FFDM), der Körperfettmasse und des Körperfettgehaltes von 21 Tage alten männlichen und weiblichen Zuckerratten, die von Wistarratten-Ammen (WA, graue Balken) im kleinen Nest aufgezogen wurden. Als Vergleich dienen Tiere, die von Zuckerrattenmüttern im normalen Nest (NN, weiße Balken) bzw. im kleinen Nest (KN, schwarze Balken) aufgezogen wurden (Schölch 2001). Unmarkierte Balken symbolisieren Wildtyp-Tiere, schraffierte Balken heterozygote Tiere. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Aufzuchtart sind mit *** = $P < 0,001$ und * = $P < 0,05$ gekennzeichnet. Ein Vergleich der einzelnen Aufzuchtarten untereinander zeigte für alle untersuchten Parameter sowohl bei den $+/+$ als auch den $+/fa$ -Tieren signifikante Unterschiede ($P < 0,001$), die deshalb in der Abbildung nicht im einzelnen markiert sind.

höher als bei den von Zuckerrattenmüttern im kleinen Nest aufgezogenen Tieren gleichen Genotyps. Da die Körpermasse nur um 10%, die Körperfettmasse aber um mindestens 40% ansteigt, ist der Körperfettgehalt entsprechend deutlich erhöht.

Fazit:

Die Aufzucht im kleinen Nest durch Wistarratten-Ammen führt zu einer Erhöhung aller untersuchten Parameter. Besonders die Körperfettmasse ist bei den von Wistarratten-Ammen aufgezogenen Welpen gegenüber den von Zuckerrattenmüttern im kleinen Nest aufgezogenen Tieren deutlich vermehrt. Bei einer Aufzucht durch Wistarratten-Ammen im kleinen Nest scheint der Effekt auf die Erhöhung der Feucht- und Fettmasse bei den Heterozygoten jedoch schwächer zu sein als bei den Wildtyp-Tieren. Die Betrachtung der Regressionen zeigt allerdings zum einen, daß alle Werte der Feuchtmasse bei den heterozygoten Tieren aus der Ammenaufzucht eng zusammengedrängt im obersten Bereich der Werte der von Zuckerrattenmütter aufgezogenen Heterozygoten liegen. Zum anderen rückt auch die Feuchtmasse der Wildtyp-Tiere, die bei Aufzucht durch Zuckerrattenmütter deutlich unter den Werten der heterozygoten Tiere liegen, durch die Ammenaufzucht ebenfalls in den gleichen schmalen Bereich ihrer heterozygoten Wurfgeschwister. Dies könnte darauf hindeuten, daß eine physiologische Obergrenze für diese Werte bei Absetzlingen erreicht worden ist, die den relativ schwachen Effekt der Ammenaufzucht auf die heterozygoten Tiere erklärt.

3.5.2. Aufzucht von Wistarrattenwelpen durch Zuckerratten-Ammen

Um den unterschiedlichen Einfluß, den eine Aufzucht durch Zucker- bzw. Wistarratten auf die Welpen hat, zu klären, wurden auch umgekehrt Wistarrattenwelpen im kleinen Nest von Zuckerratten-Ammen aufgezogen. In Abbildung 3.16 sind die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes den von Schölch (2001) erhobenen Werten gegenüber gestellt. In allen Versuchsgruppen und bei beiden Geschlechtern besteht wieder eine enge Korrelation der Körperfettmasse mit der Feuchtmasse. Dabei fällt deutlich auf, daß die im kleinen Nest von Zuckerratten-Ammen aufgezogenen Wistarrattenwelpen sowohl eine erheblich niedrigere Feucht- als auch Fettmasse zeigen als die von Wistarrattenmüttern im kleinen Nest aufgezogenen Tiere. Die Werte aller im kleinen Nest aufgezogenen Tiere liegen jedoch auf einer Geraden, d. h., die von Zuckerratten aufgezogenen Welpen zeigen zwar eine niedrigere Feuchtmasse, haben aber die bei dieser Feuchtmasse für im kleinen Nest aufgezogene Tiere zu erwartende Fettmasse. Die Feuchtmasse der von Zuckerratten-Ammen im kleinen

Nest aufgezogenen Welpen ist dabei so niedrig, daß sie in etwa der von Tieren, die im normalen Nest aufgezogen wurden, entspricht. Ihre Fettmasse ist dagegen höher als die von gleich schweren Tieren im normalen Nest. Zudem zeigt der Vergleich der Regressionsgeraden, daß die Steigung für die von Zuckerratten-Ammen im kleinen Nest aufgezogenen Tiere mit 0,29 deutlich steiler ist, als die für die im normalen Nest aufgezogenen Welpen mit 0,13 ($P < 0,01$).

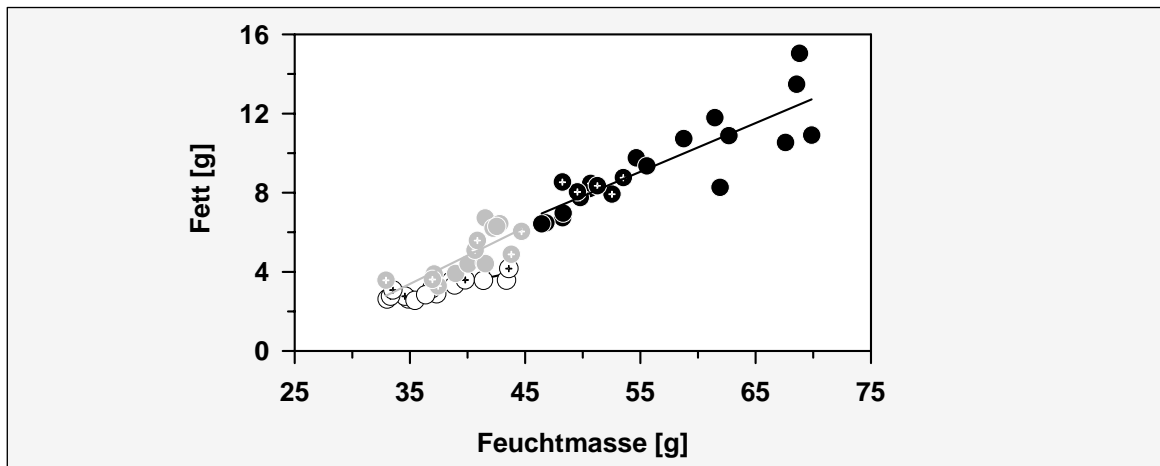


Abb. 3.16: Korrelation zwischen Körperfettmasse und Feuchtmasse 21 Tage alter Wistar-ratten, die im kleinen Nest von Zuckerratten-Ammen (graue Symbole) aufgezogen wurden. Als Vergleich dienen Tiere, die von Wistarrattenmüttern im normalen (weiße Symbole) bzw. im kleinen Nest (schwarze Symbole) aufgezogen wurden (Schölch 2001). Daten weiblicher Tiere sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Da keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern zu erkennen sind, wurden jeweils gemeinsame Regressionsgeraden berechnet. Die Korrelationskoeffizienten für die drei Aufzuchtarten sind $r = 0,75$ (Zuckerratten-Amme), $0,86$ (kleines Nest) und $0,89$ (normales Nest).

In Abbildung 3.17 sind die Mittelwerte \pm SEM der verschiedenen Parameter für die von Zuckerratten-Ammen im kleinen Nest aufgezogenen Wistarrattenwelpen im Vergleich zu den Mittelwerten von Tieren dargestellt, die von Wistarrattenmüttern im kleinen und normalen Nest aufgezogen wurden (Schölch 2001). Die statistischen Signifikanzen der Unterschiede wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse ermittelt. Es ist wiederum deutlich zu erkennen, daß die von Zuckerratten-Ammen aufgezogenen Wistarratten im Mittel eine ähnliche Körpermasse und FFDM haben wie Tiere, die im normalen Nest von Wistarrattenmüttern aufgezogen wurden. Dagegen ist bei der Fettmasse und dem Fettgehalt der von Zuckerratten-Ammen aufgezogenen Männchen eine Zunahme von jeweils 65% und bei den Weibchen eine Zunahme von jeweils 35% gegenüber den Werten von im normalen Nest aufgezogenen Tieren zu beobachten. Ein Vergleich der Tiere, die im kleinen Nest von

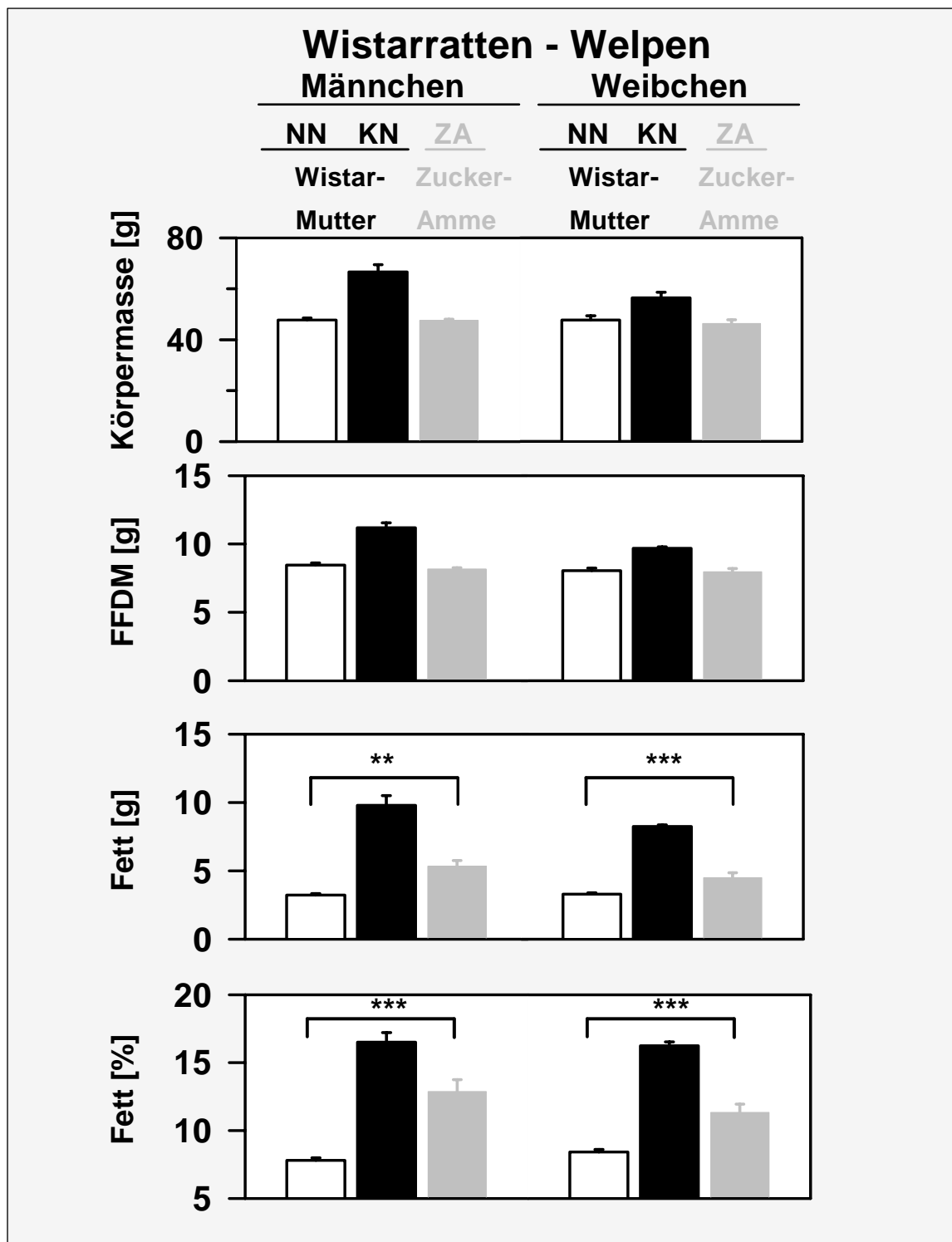


Abb. 3.17: Mittelwerte (\pm SEM) der Körpermasse, der fettfreien Trockenmasse (FFDM), der Körperfettmasse und des Körperfettgehaltes von 21 Tage alten männlichen und weiblichen Wistarratten, die im kleinen Nest von Zuckerratten-Ammen (ZA, graue Balken) aufgezogen wurden. Als Vergleich dienen Tiere, die von Wistarrattenmüttern im normalen Nest (NN, weiße Balken) bzw. im kleinen Nest (KN, schwarze Balken) aufgezogen wurden (Schölch 2001). Signifikante Unterschiede zwischen den von Zuckerratten-Ammen im kleinen Nest und von Wistarrattenmüttern im normalen Nest aufgezogenen Tieren sind markiert. (*** = $P < 0,001$ und ** = $P < 0,01$). Außerdem unterscheiden sich alle untersuchten Parameter der Tiere, die im kleinen Nest von Wistarrattenmüttern signifikant ($P < 0,001$) von denen, die von Zuckerratten-Ammen aufgezogen wurden.

Zuckerratten-Ammen aufgezogen wurden, mit denen, die von Wistarrattenmüttern aufgezogen wurden, zeigt signifikant niedrigere Werte für alle untersuchten Parameter. Bei den von Zuckerratten-Ammen aufgezogenen Männchen ergibt sich eine Körpermasse und FFDM, die rund 30%, eine Fettmasse, die 46% und ein Körperfettgehalt, der knapp 22% niedriger ist als die Werte für die von Wistarrattenmüttern ebenfalls im kleinen Nest aufzogener Tiere. Da bei den Weibchen die Körpermasse und FFDM nur um rund 20% niedriger ist, die Fettmasse aber um 46%, ist der Fettgehalt über 30% niedriger als bei den von Wistarrattenmüttern aufgezogenen Tieren.

Fazit:

Es ist wiederum sehr deutlich zu erkennen, welchen Einfluß die Aufzucht durch Ammen eines anderen Stammes auf die Entwicklung der Welpen hat. Zum einen zeigen die im kleinen Nest von Zuckerratten-Ammen aufgezogenen Tiere zwar die gleiche Korrelation zwischen Feucht- und Fettmasse, jedoch wesentlich niedrigere Werte, als die von Wistarrattenmüttern im kleinen Nest aufgezogenen Tiere. Zum anderen zeigen die im kleinen Nest von Zuckerratten-Ammen aufgezogenen Wistarratten zwar eine ähnliche Feuchtmasse wie die im normalen Nest von Wistarrattenmüttern aufgezogenen Tiere, gleichzeitig jedoch eine deutlich höhere Fettmasse. Die Aufzucht von Wistarrattenwelpen im kleinen Nest (frühpostnatale Überernährung) durch Zuckerratten-Ammen bewirkt somit einen selektiven Anstieg der Fettmasse, während die Aufzucht im kleinen Nest durch Wistarrattenmüttern zusätzlich zu einer deutlichen Erhöhung der FFDM im Vergleich zur Aufzucht im normalen Nest führt

4. Diskussion

4.1 Manipulationen in kritischen Entwicklungsphasen

4.1.1 Kritische Entwicklungsphase

Fundamentale Lebensprozesse wie Reproduktion, Metabolismus und Informationsverarbeitung werden von Rückkopplungs-Systemen reguliert. Dörner stellte die Hypothese auf, daß die Empfindlichkeit von zentralnervös gesteuerten Regelkreisen durch die Konzentrationen der an der Steuerung beteiligten Hormone, Metaboliten und Neurotransmitter während kritischer Entwicklungsphasen im Mutterleib und beim Neonaten „vorprogrammiert“ wird (Dörner 1974). Auf diese Weise sollen Konzentrationsstörungen, ausgelöst durch veränderte Umweltbedingungen, während kritischer Entwicklungsphasen zu lebenslangen Funktionsstörungen führen können und zwar sowohl in Verbindung mit, als auch unabhängig von genetischen Veranlagungen (Dörner 1976 und 1986, Ravelli et al. 1976). Das Modell des „Programmierens“ oder auch des „foetalen Ursprungs“ (fetal origin) wurde später auch von anderen Autoren verwendet (Barker 1990, Silverman et al. 1996, Srinivasan et al. 2003, Lucas 1998, Vickers et al. 2000). In Bezug auf den Zusammenhang zwischen der frühen Ernährungssituation und den späteren Folgen/Wirkungen, verursacht durch biologische Mechanismen, verwendeten Waterland & Garza (1999) den Begriff der metabolischen Prägung. Kennzeichen einer Prägung sind demnach, daß a) sie nur in einem engen Zeitfenster (kritische Entwicklungsphase) möglich ist, b) sie eine lebenslange Auswirkung hat, c) ihre Auswirkung spezifisch und meßbar ist und d) der Effekt dosisabhängig ist bzw. eine Schwellenwert-Beziehung zwischen Einwirkung und Folge besteht. Beispiele, bei denen das Konzept der kritischen Entwicklungsphase auch auf die Körpermassen- bzw. Adipositasentwicklung angewandt wurde, gibt es sowohl bei Menschen (Ravelli et al. 1976, Dietz 1994) als auch bei Ratten (Oscai & McGarr 1978). Levin vermutet, daß metabolische Prägungen, die aus einer positiven Energiebilanz resultieren, zusammen mit genetischen Prädispositionen Modifikationen des neuralen Systems für die Regulation der Energiehomöostase und somit eine Anhebung des Körpermassen-Sollwertes bewirken (Levin 2000). Zur Untersuchung der Frage inwieweit die Adipositasentwicklung im adulten Tier von den Umweltbedingungen in der früh-postnatalen Phase abhängt, kann z.B. die Milchverfügbarkeit durch unterschiedliche Wurfgrößen manipuliert werden.

4.1.2 Manipulation der früh-postnatalen Umwelt

Bereits in den 1920ern erkannte Parkes den Einfluß der Wurfgröße auf das Wachstum von Mäusen (Parkes 1926). Dabei basierten seine Beobachtungen allerdings auf der Untersuchung natürlicher Wurfgrößen und implizierten somit die Möglichkeit sowohl einer intrauterinen als auch einer postnatalen Über- bzw. Unterernährung. In späteren Arbeiten wurden die Wurfgrößen erst postnatal manipuliert (Widdowson & McCance 1960, Knittle & Hirsch 1968), um die postnatalen Einflüsse separat von den intrauterinen Einflüssen beurteilen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde ein vergleichbarer experimenteller Ansatz verfolgt. Mit der Wurfgröße steigt bzw. sinkt bei Nagetieren die Laktationsleistung der Muttertiere (Blaxter 1961, Fiorotto et al. 1991, Russell 1980). Da die Anzahl der Welpen in den ersten Tagen nach der Geburt entscheidend für die Milchleistung ist (Edwardson & Eayrs 1967), wurden in der vorliegenden Arbeit, um die Milchsekretion optimal zu stimulieren, die Würfe erst am Tag 3 *p.n.* reduziert. Danach wurden in der Versuchsserie I abwechselnd kleine und normale Würfe von 2-3 Muttertieren gesäugt (s. 2.2.1). Diese „Rotation“ der Welpen sollte zum einen die Überernährung der kleinen Würfe durch das größere verfügbare Milchvolumen verstärken, da wir die Einstellung einer mittleren Laktationsleistung (zwischen der für kleine und normale Würfe) erwarteten. Zum anderen wurde mit dieser Versuchsanordnung berücksichtigt, daß die verwendete Zuckerratte ein Auszuchtstamm ist, der individuelle Unterschiede im genetischen Hintergrund aufweist. Dadurch kann das Verhalten und die Milchezusammensetzung der Mutter beeinflusst sein, was durch die „Rotation“ weitgehend eliminiert wird. Unterschiede zwischen den Gruppen aufgrund der Anzahl (2 oder 3) der am Austausch beteiligten Muttertiere konnten nicht festgestellt werden, da für eine statistische Aussage zu wenige Gruppen untersucht wurden.

Neben der Milchmenge hat die Wurfgröße auch auf die Milchezusammensetzung einen signifikanten Einfluß, wie Fiorotto an Sprague-Dawley-Ratten zeigte (Fiorotto et al. 1991). So hatte ab Tag 6 die Milch von Muttertieren, die ausschließlich ein kleines Nest (4 Welpen) säugten, eine signifikant höhere Fettkonzentration und Milch von Muttertieren, die ein großes Nest (GN, 16 Welpen) versorgten, eine signifikant niedrigere Fettkonzentration als Milch von Muttertieren, die ein normales Nest (NN, 10 Welpen) versorgten. In dieser Arbeit wurde jedoch nicht untersucht, inwieweit der tägliche Wechsel zwischen den zu säugenden kleinen (KN) und normalen (UN = unterernährten normalen) Nestern Unterschiede in der Milchezusammensetzung der Muttertiere verringerte. Es ist allerdings davon

auszugehen, daß durch den täglichen Wechsel die KN- und UN-Tiere im wesentlichen Milch derselben Zusammensetzung erhielten, das Volumen pro Kopf jedoch variierte.

Das Ziel der verstärkten Überernährung durch die „Rotation“ der Welpen wurde nicht erreicht. Vielmehr sind die Körpermassen am Tag 21 von unseren alternativ im kleinen Nest gesäugten Welpen im Mittel etwas niedriger (Männchen ca. 4 g, Weibchen ca. 1,5 g) als von Absetzlingen aus kleinen Nestern aus einer anderen Arbeit (Schölch 2001), die aus derselben Zuchtkolonie stammen und von ihrer eigenen Mutter aufgezogen wurden. Prozentual war der Unterschied in der Körpermasse zwischen KN- und NN-Männchen in der vorliegenden Arbeit ebenfalls geringer als in der Schölch-Arbeit (+15% statt +20%), bei den Weibchen betrug der Unterschied in beiden Arbeiten jeweils ca. +20%. Außerdem resultierte aus der alternierenden Versorgung der normalen Würfe im Wechsel mit 1-2 kleinen Würfen eine unerwartet große Unterernährung, wie ein Vergleich des postnatalen Wachstums mit dem ohne Austausch aufzogener Würfe gleicher Größe zeigte. Ursache für diese überraschenden Ergebnisse könnte sein, daß einerseits die Milchleistung schneller/stärker herunterreguliert wurde, als erwartet, und andererseits der Milchfettgehalt weniger langsamer/weniger hochreguliert wurde als bei permanenter Reduktion der Welpenzahl. Zusätzlich könnte der tägliche Austausch der kleinen und normalen Nester eine Störung der Mutter-Wurf-Interaktion bewirken, und zwar deshalb, weil bei alternierender Versorgung die Welpen täglich von dem Muttertier neu akzeptiert werden mußten. Die Klärung der Frage, inwieweit die geringere Körpermasse der im kleinen Nest aufgezogenen Tiere in dieser Studie auf die durch den täglichen Wechsel der säugenden Mutter bedingte Störung des Mutter-Wurf-Verhältnisses zurückzuführen ist oder auf Unterschiede in der Milchmenge bzw. -zusammensetzung bei der Versorgung mit derselben bzw. mit wechselnden Müttern beruht, würde eine weitere Untersuchung erfordern, in der Muttertiere zwischen gleich großen Würfen ausgetauscht werden müßten. Dies wurde in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt, da die Unterernährung der rotierten normalen Nester nicht erwartet wurde.

4.2 Bestimmung der Körperzusammensetzung

Die in dieser Untersuchung angewendete direkte Analyse der Körperzusammensetzung erfordert die Aufarbeitung des Körpergewebes und ist deshalb nur einmal (final) anwendbar. Für die Kontrolle des Verlaufs von Änderungen in der Körperzusammensetzung müs-

sen deshalb indirekte Methoden angewendet werden, die zwangsläufig weniger genau sind, weil sie auf Vergleichsuntersuchungen basierende Eichungen voraussetzen. In der vorliegenden Arbeit wurden speziell Vergleiche direkter und indirekter Bestimmungen vor allem des Fettgehalts durchgeführt, um die Präzision der letzteren für das Untersuchungsmaterial dieser Arbeit abzuschätzen. Die in der vorliegenden Untersuchung durchgeführten Bestimmungen der Körperzusammensetzung mittels direkter und indirekter Methoden betrafen sowohl Wildtyp-Tiere als auch heterozygote Tiere unseres Zuckerratten-Auszuchtstammes. Da sie sich in Bezug auf Einflüsse sowohl der früh-postnatalen Ernährung als auch der spät postnatalen Zusatzfütterung auf die Körperzusammensetzung und der Höhe der Plasmaleptinspiegel nur gering voneinander unterschieden, werden nachfolgend die Ergebnisse für die beiden Genotypen gemeinsam diskutiert.

4.2.1 Finale Methoden zur Bestimmung der Körperzusammensetzung

4.2.1.1 Fettextraktion als Kalibrierungsmethode

Generell ist die Kombination von Gewebetrocknung und Fettextraktion die genaueste Methode zur Bestimmung von Fettmasse, Körperwasser und fettfreier Trockenmasse (FFDM) (Wang Z et al. 1999, Trocki et al. 1995). Ihre Ergebnisse sind für jedes untersuchte Individuum gleich präzise. In der vorliegenden Untersuchung wurden die mit dieser Methode erhobenen Befunde zur Eichung der übrigen hier angewendeten Methoden verwendet. Diese Methoden umfaßten als weitere finale, aber weniger aufwendige Methode die Bestimmung des sog. FFM¹-Hydrationsfaktors (siehe 4.2.1.2) sowie die zur Verlaufskontrolle eingesetzten Methoden der Körpermassenbestimmung (siehe 4.2.2.1) und der TOBEC[®]-Analyse (siehe 4.2.2.2).

Um etwaige Methodikfehler bei der Bestimmung der Körperzusammensetzung durch Fettextraktion erkennen zu können, wurde in dieser Arbeit die Korrelation zum einen zwischen Körper- und Feuchtmasse (nicht dargestellt) und zum anderen zwischen prozentualem Wasser- und Fettgehalt (s. Abbildung 3.4) analysiert. Aufgrund der direkten Bestimmung aller Komponenten bei jedem Individuum ergibt sich für die Analyse von Versuchsgrup-

¹ fettfreie Körpermasse, in einigen Arbeiten entspricht sie der lean body mass (LBM), manchmal wird auch zwischen FFM und LBM unterschieden, wobei die LBM noch essentielle Lipide z.B. Lecithin, Phospholipide enthält (Sheng & Huggins 1979). Diese Unterscheidung ist jedoch energetisch unwichtig.

pen (Stichproben), daß bereits kleinste Abweichungen von der prinzipiell äußerst engen Korrelation zwischen den direkt gemessenen Parametern auf Methodikfehler hinweisen. In entsprechenden Korrelationen der Meßwerte aus der vorliegenden Untersuchung zeigte nur ein als Welpen normal ernährtes Männchen aus einer Stichprobe von 114 Tieren, einen um 2 Prozentpunkte höheren Fettgehalt als bei dem Wassergehalt zu erwarten war. In diesem Fall war vermutlich die Trockenmasse nicht korrekt bestimmt worden. Aufgrund der geringen Abweichung wurden die Daten dieses Tieres jedoch mit ausgewertet. Die Meßergebnisse bestätigen aber insgesamt die hohe Präzision der direkten Bestimmung der Körperzusammensetzung, vor allem des in dieser Untersuchung speziell interessierenden Fettgehalts.

4.2.1.2 Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels FFM-Hydrationsfaktor

In dieser Arbeit ist die Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels des FFM-Hydrationsfaktors eine weitere finale Methode. Sie hat den Vorteil, daß auf die aufwendige Chloroformextraktion des Körperfetts verzichtet werden kann. Sie setzt aber eine entsprechende Kalibrierung voraus. Grundidee dieser Methode ist das Zwei-Kompartimente-Modell, bei dem der Körper in die Kompartimente fettfreie Körpermasse und Fettmasse eingeteilt wird (Sheng & Huggins 1979). Die Berechnung des Fettgehalts basiert darauf, daß der FFM-Hydrationsfaktor für eine bestimmte Alters- und Versuchsgruppe konstant ist (Pace & Rathbun 1945, Sheng & Huggins 1979, Wang Z et al. 1999). In den dazu durchgeführten Messungen an unseren Versuchstieren ist deutlich zu erkennen, daß der FFM-Hydrationsfaktor innerhalb der ersten Monate rapide und danach langsamer sinkt bis er sich, wie eine parallel durchgeführte Diplomarbeit² zeigte, einem konstanten vom Rattenstamm unabhängigen Wert ($H_f = 0,71$) nähert. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten sich wie bereits bei Pace & Rathbun (1945) und Baer et al. (1993) keine Geschlechtsunterschiede. Wie die parallel durchgeführte Diplomarbeit² ebenfalls zeigte, beeinflusst jedoch die Ernährung nach dem Absetzen bzw. die daraus resultierende veränderte Körperzusammensetzung den FFM-Hydrationsfaktor. Es müssen daher für jede Versuchsserie zunächst genügend Daten vorliegen, um den FFM-Hydrationsfaktor bestimmen zu können. Die Befunde dieser Arbeit belegen in Verbindung mit der parallel durchgeführten Diplomarbeit²,

² Quelle: Diplomarbeit B. Petri, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, 2003

daß 4 bis 5 vergleichende Bestimmungen von FFM-Hydrationsfaktor und Fettextraktion je Aufzuchtart und Diätform ausreichen, um für ein gegebenes Alter eine zuverlässige Kalibrierung zu erreichen. Bei dieser Methode ist von Vorteil, daß individuelle biologische Varianzen der Fettmasse erfaßt werden können, da ihrer Berechnung die individuelle Gesamtkörperwassermasse zugrunde liegt. Der Nachteil einer finalen Bestimmung gegenüber den Methoden zur Verlaufskontrolle liegt auf der Hand.

4.2.2 Methoden zur Verlaufskontrolle der Körperzusammensetzung

4.2.2.1 Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels Körpermasse

Auch hier wurde zur Kalibrierung die Körpermasse mit dem Ergebnis der Fettextraktion korreliert. Insgesamt korrelierten im Alter von 190 Tagen sowohl der Wassergehalt wie auch die fettfreie Trockenmasse (FFDM) und die Körperfettmasse eng mit der Körpermasse der nüchternen Männchen und Weibchen. Damit ist die Körpermasse als Prädiktor dieser zwei Parameter beim Vergleich ausreichend großer Stichproben gut geeignet. Dies gilt allerdings nur bei Versuchsgruppen, in denen eine große Spannweite der Werte bis in hohe Bereiche auftritt (z. B. bei Tieren mit genetisch oder diät-bedingter Adipositas), wie eine Diplomarbeit³ an Mäusen zeigte, in der mit Standardfutter ernährte normal gewichtige Tiere im Gegensatz zu hochkalorisch gefütterten Tieren mit diät-induzierter Adipositas keine Korrelation zwischen Fett- und Feuchtmasse aufwiesen. Zudem können auch hier, wie bei allen indirekten Methoden, die notwendigerweise Verallgemeinerungen voraussetzen, individuelle Abweichungen nicht erfaßt werden. Deutlich wird dieses Problem bei Betrachtung der Abbildung 3.3. Von den mittels der Chloroformextraktion ermittelten Daten der Korrelation zwischen Fett- und Körpermasse fallen fünf Männchen (vier wurden als Welpen über- und eins normal ernährt) auf, die eine deutlich höhere Fettmasse haben, als es für die Körpermasse zu erwarten wäre. Ein Methodikfehler bei der Bestimmung der Körperfettmasse scheint bei diesen fünf Tieren sehr unwahrscheinlich, da ihre Werte eine normale Lage auf der Regressionsgeraden zwischen Wasser- und Fettgehalt aufweisen (s. Abbildung 3.4). Es scheint also tatsächlich eine biologische Variation vorzuliegen. Für die vier KN-Männchen ergibt sich ein weiterer Hinweis auf eine biologische Variation insoweit, als alle vier von einer Mutter abstammen. Dabei wurden drei dieser Männchen später geboren

³ Quelle: Diplomarbeit C. Schubert, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, 2002

und in einem Nest (von insgesamt 3 Nestern) aufgezogen, das ständig bei derselben Mutter verblieb. Das vierte KN-Männchen dieser Mutter wurde früher geboren und dem üblichen Mutteraustausch unterzogen. Da noch zwei weitere als Welpen überernährte Männchen, je eins mit bzw. ohne Mutteraustausch, die von derselben Mutter abstammen, ebenfalls eine relativ hohe Fettmasse bezogen auf ihre Körpermasse zeigen, weist diese biologische Variation der relativ hohen Fettmasse auf einen genetischen bzw. epigenetischen Einfluß des Muttertieres hin. Bei der Berechnung der Körperfettmasse in Abhängigkeit von der Körpermasse mit Hilfe ihrer Regressionsgeradengleichung wäre diese Variation allerdings nicht sichtbar geworden.

Auf der anderen Seite zeigen von den als Welpen normal ernährten Tieren zwei Männchen, die von einer Mutter abstammen, eine deutlich niedrigere Fettmasse als nach ihrer Körpermasse zu erwarten wäre. Diese Abweichung ist im Gegensatz zu den eben erwähnten Tieren wahrscheinlich durch einen Methodikfehler (s. 4.2.1.1) bei der Bestimmung der Körperzusammensetzung verursacht worden, da zumindest von einem Männchen der Fettgehalt deutlich höher ist, als für den Wassergehalt zu erwarten wäre (s. Abbildung 3.4). Es erscheint zunächst paradox, daß die Fettmasse zu niedrig ist, während gleichzeitig der Fettgehalt scheinbar zu hoch ist. Vermutlich erfolgte während der Trocknung ein Substanzverlust in der Trockenmasse des Männchens. Das hatte zur Folge, daß die mit ihr berechneten Wassermasse zu hoch bzw. die Fettmasse zu niedrig waren und damit letztendlich die Diskrepanz im Verhältnis Wasser-/Fettgehalt auftrat (s. 2.4.1.2). Dieser Methodikfehler wäre bei der Berechnung der Körperfettmasse in Abhängigkeit von der Körpermasse mittels ihrer Regressionsgeradengleichung ausgeglichen worden.

4.2.2.2 Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels TOBEC®

Eine vielfach angewandte Methode zur Bestimmung der Körperzusammensetzung am lebenden Tier ist das auf der Absorption elektrischer Energie basierende TOBEC®-Verfahren (Bracco et al. 1983, Baer et al. 1993, Stenger & Bielajew 1995, Gosselin & Cabanac 1996). Die Zuverlässigkeit dieser indirekten Methode ist immer wieder hinterfragt worden (Baer et al. 1993, Stenger & Bielajew 1995, Robin et al. 2002), weil das Meßergebnis von weiteren Parametern abhängig ist. Beeinflußt wird der Meßwert (E) von der Temperatur (Robin et al. 2002), dem Alter und der Körpermasse der Tiere sowie von diätetischen Manipulationen (Trocki et al. 1995). Es empfiehlt sich daher für jede Versuchsserie eine Kalibrierung mittels direkter Bestimmung der Körperzusammensetzung wie sie in der

vorliegenden Arbeit durch Fettextraktion erfolgte. Dabei wurde gefunden, daß der sog. E-Wert aus der TOBEC[®]-Messung nicht nur mit der primär erfaßten FFM (da der Wasseranteil der FFM für eine gegebene Altersstufe konstant ist, gilt für sie die gleiche Korrelation wie für die in der Abbildung dargestellte FFDM), sondern auch mit der Körperfettmasse eng korrelierte (s. Abbildung 3.3). Deshalb ist dieses Verfahren beim Vergleich ausreichend großer Stichproben als Indikator der Körperzusammensetzung gut geeignet. Andererseits gilt auch hier, daß individuelle Abweichungen, in diesem Fall in der Relation von FFM zu Fettmasse, mit der TOBEC[®]-Methode nicht erfaßbar sind. Es ist zu bedenken, daß innerhalb einer Versuchsgruppe mit hochkalorischem Zusatzfutter die Körpermasse als Prädiktor genauso gut geeignet ist, jedoch das Wiegen einfacher anzuwenden und für die Tiere, da sie nicht narkotisiert werden müssen, erheblich schonender ist. Nicht zuletzt birgt die TOBEC[®]-Messung aufgrund des sensiblen Meßverfahrens viele Fehlerquellen.

4.3 Langzeiteinfluß der Aufzuchtart auf die Entwicklung von Ratten bei Standardernährung

4.3.1 Effekt der früh-postnatalen Überernährung auf die Körpermasse

Die Körpermasse der früh-postnatal überernährten (KN) Tiere der Versuchsserie I ist nur am Tag des Absetzens (d21) signifikant höher (Männchen um 15%, Weibchen um 20%) als die der als Welpen normal ernährten (NN) Tiere. Bereits im Alter von 60 Tagen gleicht sich die Körpermasse der beiden Gruppen einander an. Diese Angleichung der Körpermasse von KN- und NN-Tieren nach einem zunächst signifikanten Unterschied am Tag 21 wurde ebenfalls bei männlichen Wistarratten im Alter von 60 Tagen beobachtet, die im kleinen (n = 3 Welpen) bzw. normalen Nest (n = 10 Welpen) von ihrer eigenen Mutter aufgezogen wurden und anschließend *ad libitum*-Standardfütterung erhielten (You et al. 1990, s. Tabelle 4.1). Auch bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten war in einer Studie nach einer anfänglich höheren Körpermasse der KN-Tiere gegenüber den NN-Tieren im Alter von 4 bis 10 Monaten nur noch ein tendenzieller Unterschied erkennbar (Hausberger & Volz 1984, s. Tabelle 4.1). In anderen Studien hingegen bewirkt eine durch Manipulation der Milchverfügbarkeit erreichte Überernährung eine permanent höhere Körpermasse im Vergleich zu den normal ernährten Tieren. So war nach der früh-postnatalen Überernährung die Körpermasse von 5 Monate alten männlichen Wistarratten (Duff & Snell 1982, s.

Tabelle 4.1) sowie von 6 Monate alten männlichen und weiblichen Wistarratten (Plagemann et al. 1999a) mit anschließender *ad libitum*-Standardfütterung signifikant höher als die der NN-Tiere. Weitere Untersuchungen an Mäusen, männlichen pigmentierten Ratten und männlichen Wistarratten zeigten bei Standardfütterung nach dem Absetzen ebenfalls bis zu einem Alter von 6 Monaten deutliche Unterschiede zwischen früh-postnatal über- und normal ernährten Tieren (Aubert 1980, Harris PM 1980a,b; Bassett & Craig 1988, Plagemann et al. 1992, Petri², s. Tabelle 4.1 und 4.2). Als mögliche Ursache für dieses un-

Zitat	Körpermasse [g] beim Absetzen (d21)			Differenz [%] beim Absetzen		Geschlecht	Versuchsende [Monate]	Unterschiede in der Körpermasse bei Versuchsende	Welpen pro Nest		
	KN	NN	GN bzw. UN	KN vs. NN	GN bzw. UN vs. NN				KN	NN	GN bzw. UN
Harris PM (1980a)*	45	40	25	+12	-38	m	3	KN > NN > GN	3	9	16
Bassett & Craig (1988)*	45	27,5	22,5	+63	-19	m	3	KN > NN > GN	4	10	15-18
	45	27,5	22,5	+63	-19	w	3	KN = NN = GN			
Hausberger & Volz (1984)	65,2	53,3	26,6	+22	-50	w	10	KN = NN > GN	4	9	24
You et al. (1990)*	45	35		+29		m	8	KN = NN	3	10	
Duff & Snell (1982)*	54	42	29	+30	-30	m	5	KN > NN > GN	4	10	16
	54	42	29	+30	-30	w	5	KN > NN > GN	4	10	16
Plagemann (1992)*	52	38	29	+37	-24	m	8	KN > NN = GN	3-4	12	20-24
Petri ²	57,1	41,2	29,8	+40	-38	m	6	KN > NN > UN	4	10-11	10-12
							12	NN > UN			
eigene Daten	46,4	40,2	25,6	+15	-40	m	5	KN = NN > UN	3-4	10-12	9-12
	46,0	37,6	25,8	+20	-30	w	5	KN = NN > UN	3-4	10-12	9-12

Tab. 4.1: Vergleich von verschiedenen Arbeiten hinsichtlich der Entwicklung der Körpermasse von im kleinen (KN), normalen (NN) und großen (GN) bzw. unterernährt normalen (UN) Nest aufgezogenen Welpen. Dargestellt sind: die Körpermasse beim Absetzen (d21), die prozentualen Differenzen an d21 im Vergleich zu den NN, sowie statistische Unterschiede am Versuchsende nach Standardernährung. Untersucht wurden Wistarratten, außer bei Hausberger & Volz (Sprague-Dawley-Ratten) und der vorliegenden Arbeit (Zuckerratten). >: signifikante Unterschiede; >: deutliche numerische Unterschiede, die das Signifikanzniveau nicht erreichen oder für die Signifikanzangaben fehlen. m: Männchen, w: Weibchen, *: Werte vom Graph abgeschätzt.

einheitliche Bild der weiteren Entwicklung wurde die Größe der prozentualen Differenz in der Körpermasse zwischen den beiden Aufzuchtarten beim Absetzen untersucht (s. Tabelle 4.1). Der Vergleich der verschiedenen Arbeiten ergab jedoch keinen klaren Zusammenhang. Der Langzeiteffekt der früh-postnatalen Überernährung ist demnach wahrscheinlich nicht nur vom verwendeten Stamm und den speziellen Behandlungsmethoden, sondern auch von den Nachuntersuchungsbedingungen abhängig. Auffällig sind jedoch die Daten von Bassett & Craig (1988), da trotz einer um 63% höheren Körpermasse der KN-Tiere am d21 kein permanenter Unterschied in der Körpermasse zu den NN-Tieren erhalten bleibt. Hier weist jedoch die ungewöhnlich niedrige Körpermasse (27,5 g) der NN-Tiere beim Absetzen auf methodische Probleme hin (s. Tabelle 4.1).

4.3.2 Effekt der früh-postnatalen Überernährung auf die Körperzusammensetzung

Der Schwerpunkt dieser Studie lag in der Untersuchung des Langzeiteffektes der früh-postnatalen Ernährung auf den Körperfettgehalt als Maß für die Adiposität. Die hier diskutierten Schlußfolgerungen beruhen auf der Verlaufskontrolle des Körperfettgehalts mit dem TOBEC[®]-Verfahren. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit vorhergehenden Veröffentlichungen ist nur bedingt möglich. Der Grund ist zum einen, daß dort meist lediglich ausgewählte Fettdepots analysiert wurden und daraus auf den Grad der allgemeinen Adiposität geschlossen wurde, quantitative Angaben über den Gesamtkörperfettgehalt fehlen hingegen. Die einzige Ausnahme bilden Untersuchungen an Mäusen von Aubert et al. (1980) mit finaler Bestimmung des Lipidgehalts. Vor allem erschweren die Verwendung von unterschiedlichen Zuchtlinien, Untersuchungszeitpunkten sowie unterschiedlichen Formen der früh-postnatalen Manipulation der Milchverfügbarkeit eindeutige Vergleiche der vorliegenden Ergebnisse mit Literaturbefunden. Hinzu kommt, daß je nach den unterschiedlichen Bedingungen der früh-postnatalen Aufzucht, Über-, Normal- und Unterernährung unterschiedlich definiert sind.

In der vorliegenden Arbeit hatte die früh-postnatale Überernährung im Alter von 150 Tagen (5 Monate) unabhängig vom Geschlecht keine Unterschiede in Fettmasse, Fettgehalt und FFDM im Vergleich zu den NN-Tieren zur Folge. Das widerspricht deutlich den Befunden an Sprague-Dawley-Weibchen, Wistarratten und Mäusen beiderlei Geschlechts, die

Zitat	Stamm	Sex	Futter nach dem Absetzen	Versuchsende [Monate]	Körpermasse	Fettmenge	
						absolut	prozentual
Aubert et al. (1980)	M	m	FF	6	KN > NN > GN	KN > NN > GN ^x	KN > NN > GN
		w	FF	6	KN > NN > GN	KN > NN > GN ^x	KN > NN > GN
Harris PM (1980a)	P	m	FF	7	KN > NN > GN	KN > NN > GN [*]	KN > NN > GN ^{**}
			FR ¹		NN > GN	NN > GN [*]	NN > GN ^{**}
Harris PM (1980b)	W	m	FF	6	KN > NN > GN	KN < NN > GN [*]	KN < NN > GN ^{**}
			FR ¹		NN > GN	NN > GN [*]	NN > GN ^{**}
Bassett & Craig (1988)	W	m	FF	3	KN > NN > GN	KN > NN = GN ^o	KN > NN = GN
		w	FF	3	KN = NN = GN	KN > NN = GN ^o	KN > NN = GN
Hausberger & Volz (1984)	SD	w	FF	10	KN = NN > GN	KN > NN > GN ⁺	KN > NN > GN
			HF ¹		KN > GN	KN > NN > GN ⁺	KN = NN = GN
Petri ²	W	m	FF	6	KN > NN > UN	KN > NN > UN ^y	KN > NN > UN
			FF	12	NN > UN	NN < UN ^y	NN < UN
			FR ²	12	KN > NN > UN	KN > UN ^y	KN > UN
		w	HF ²	6	KN > NN = UN	KN > UN ^y	KN > UN
			HF ²	12	NN = UN	NN > UN ^y	NN > UN
			HFR	12	KN > NN = UN	KN > UN ^y	KN > UN
eigene Daten	Z	m	FF	5	KN = NN > UN	KN = NN > UN ^y	KN = NN > UN
			HF ³	6	KN > NN > UN	KN > NN > UN ^y	KN > NN > UN
		w	FF	5	KN = NN > UN	KN = NN > UN ^y	KN = NN > UN
			HF ³	6	KN = NN > UN	KN = NN > UN ^y	KN = NN > UN

Tab. 4.2: Vergleich der wichtigsten Ergebnisse aus verschiedenen Arbeiten, in denen neben der Körpermasse auch der Fettgehalt adulter männlicher (m) und weiblicher (w) Tiere untersucht wurde, die im kleinen (KN), normalen (NN) und großen (GN) bzw. unterernährten normalen (UN) Nest aufgezogen wurden. M: Mäuse, P: pigmentierte Ratten, W: Wistarratten, SD: Sprague-Dawley-Ratten, und Z: Zuckerratten. >: signifikante Unterschiede; >: deutliche numerische Unterschiede, die das Signifikanzniveau nicht erreichen oder für die Signifikanzangaben fehlen. FF: freier Zugang zum Futter während des gesamten Versuchszeitraums, FR¹: Futterreduktion von d21 bis d84 mit anschließender ad libitum-Fütterung, FR²: ab 7. Lebensmonat phasenweise Futterrestriktion, HFR: ab 7. Lebensmonat phasenweiser Entzug des hochkalorischen Zusatzfutters, HF¹: fettreiche Diät ab d126 bis Versuchsende, HF²: freier Zugang zum hochkalorischen Zusatzfutter ab d21 bis Versuchsende, HF³: hochkalorisches Zusatzfutter ab d150 bis Versuchsende. *Summe des abdominalen, scapularen, epididymalen und perirenenalen Fettgewebes; **Angaben sind prozentual auf Protein bezogen; ^yepididymales bzw. parametriales Fettgewebe; ⁺Summe des inguinalen und renal-parametriaalen Fettgewebes; ^xGesamtkörperlipid, ^yGesamtkörperfett

zumindest geringfügig (Hausberger & Volz 1984) oder meist signifikant höhere Werte von Körpermasse und Körperfett bei KN-Tieren gegenüber NN-Tieren zeigten (s. Tabelle 4.2). Diese uneinheitlichen Resultate können nicht allein an der Art der Überernährung mit Mutteraustausch liegen, da in einer parallel durchgeführten Diplomarbeit² bei gleichen Ernährungsprotokollen persistierende Unterschiede zwischen KN- und NN-Männchen bis zum Alter von 6 Monaten beobachtet wurden (s. Tabelle 4.2). Deshalb ist zusätzlich anzunehmen, daß der unterschiedliche genetische Hintergrund bzw. dadurch bedingte Unterschiede in der Laktation und/oder dem Verhalten von Mutter- und/oder Jungtieren zwischen den unterschiedlichen Zuchtstämmen eine Rolle gespielt haben. Die Schwierigkeiten Literaturbefunde einzubeziehen, wird besonders bei der Betrachtung einer Arbeit an sechs Monate alten männlichen Wistarratten deutlich (Harris PM 1980b). Dort wurden für KN-Tiere nicht nur gleiche sondern vielmehr tendenziell niedrigere Werte für die Fettmasse und für den auf die Proteinmasse bezogenen Fettgehalt als für die NN-Tiere gefunden. Dieses überraschende Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, daß nur jeweils zwei Würfe pro Nesttyp beurteilt wurden und damit individuelle Variabilitäten besonders im kleinen Nest eventuelle Unterschiede zwischen den beiden Aufzuchtarten verdeckt haben könnten. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Aufzucht im kleinen Nest eine Tendenz für einen lebenslang erhöhten Fettgehalt bewirkt, daß dieser Effekt aber nicht sehr robust ist und durch andere methodische Variationen leicht überdeckt werden kann.

4.3.3 Effekt der früh-postnatalen Unterernährung auf die Körpermasse

In der vorliegenden Arbeit bewirkt die früh-postnatale Unterernährung (UN-Tiere) mit anschließender Standardfütterung im Vergleich zu den NN-Tieren eine permanente Reduzierung der Körpermasse. Dabei ist die Körpermasse der als Welpen unterernährten Männchen bzw. Weibchen anfänglich um 40% bzw. 30% und ab einem Alter von 60 Tagen um 20% bzw. 10% geringer als die der NN-Tiere. Der Unterschied zwischen UN und NN ist also wesentlich größer als zwischen KN und NN (s. Tabelle 4.1). Die UN-Tiere in der parallel durchgeführten Diplomarbeit² zeigten anfänglich eine jeweils um ca. 30% verringerte Körpermasse im Vergleich zu den NN-Tieren. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit vergrößerte sich bei den nach dem Absetzen mit Standardfutter ernährten Männchen im Alter von 6 Monaten der Abstand zwischen den beiden Gruppen. Bei den Weibchen in derselben Arbeit², die nach dem Absetzen neben dem Standardfutter hochkalorisches Zusatzfutter erhielten, war ab Tag 60 bis zum Versuchsende im Alter von 12 Monaten kein Unterschied mehr zu beobachten. In anderen Untersuchungen zeigten im großen Nest (GN)

unterernährte im Vergleich zu NN-Mäusen (Aubert et al. 1980), pigmentierten Ratten (Harris PM 1980a), männlichen Wistarratten (Harris PM 1980b, Bassett & Craig 1988) und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (Hausberger & Volz 1984), die alle nach dem Absetzen freien Zugang zu Standardfutter hatten, entsprechende Unterschiede (s. Tabelle 4.1). Eine verminderte Körpermasse früh-postnatal unterernährter im Vergleich zu normal ernährten Nagern ist jedoch kein durchgängiger Befund. So zeigten weibliche GN-Wistarratten mit *ad libitum*-Standardfütterung nach dem Absetzen in einer anderen Studie ab einem Alter von 70 Tagen bis zu 5 Monaten keine signifikanten Unterschiede in der Körpermasse im Vergleich zu den NN-Tieren (Duff & Snell 1982, Tabelle 4.1 und 4.2). Ebenso unterschieden sich männliche GN-Wistarratten, die freien Zugang zum Standardfutter hatten, ab einem Alter von 30 Tagen bis zu 240 Tagen, in ihrer Körpermasse nicht von gleichaltrigen NN-Tieren desselben Zuchtstammes (Plagemann et. al. 1992, Tabelle 4.1). Auch weibliche UN-Wistarratten zeigten im Alter von 3 Monaten keinen Unterschied mehr zu den NN-Tieren (Bassett & Craig 1988). Bei der letztgenannten Arbeit muß jedoch die niedrige Körpermasse der NN-Tiere beim Absetzen beachtet werden, die die normale weitere Entwicklung dieser Tiere in Frage stellt. Eine vergleichende Analyse aller Befunde (Tabellen 4.1 und 4.2) ergibt keinen klaren Zusammenhang zwischen den prozentualen Unterschieden in der Körpermasse beim Absetzen und der Persistenz dieser Unterschiede. Neben potentiellen Unterschieden zwischen den verschiedenen Zuchtstämmen müssen auch hier vor allem Unterschiede im Versuchsprotokoll für die unterschiedlichen Langzeiteffekte in Betracht gezogen werden.

4.3.4 Effekt der früh-postnatalen Unterernährung auf die Körperzusammensetzung

Die im Alter von 5 Monate bei ausschließlicher Standarddiät signifikant niedrigere Körpermasse der Welpen aus der Gruppe der UN-Tiere dieser Studie im Vergleich zu den NN-Tieren, ist sowohl durch eine niedrigere Fettmasse (Männchen -45%, Weibchen -35%), als auch durch eine niedrigere FFDM (Männchen -12%, Weibchen -4%) bedingt. Wieder ist dieser Unterschied zwischen UN und NN demnach wesentlich größer als der zwischen KN und NN. Auch die 6 Monate alten männlichen Wistarratten in der parallel durchgeführten Diplomarbeit², die nach dem Aufzuchtprotokoll dieser Studie als Welpen unterernährt aufgezogen wurden, zeigten signifikant niedrigere Werte für Fettmasse und Fettgehalt als die NN-Tiere.

Untersuchungen an GN-Mäusen und Ratten zeigten ebenfalls niedrigere Werte für Fettmasse und Fettgehalt als NN-Tiere der jeweils gleichen Zuchtstämme (s. Tabelle 4.2). Die einzige Ausnahme bilden Befunde an weiblichen Wistarratten, die im großen Nest ($n = 15$ bis 18) aufgezogen wurden und nach dem Absetzen Standardfutter erhielten und dabei nach 3 Monaten keine Unterschiede in Fettmasse und Fettgehalt zu den NN-Tieren aufwiesen (Bassett & Craig 1988). Allerdings liegen der letztgenannten Arbeit nur kleine Stichproben zu Grunde (GN = 6, NN = 3), so daß eventuelle Unterschiede zwischen den Nesttypen durch die individuelle Variabilität verdeckt sein könnten. Zudem war die Absetzkörpermasse der NN-Tiere ungewöhnlich niedrig, so daß eine normale Entwicklung der Fettdepots zweifelhaft ist (s. Tabelle 4.1). Der Langzeiteffekt der früh-postnatalen Unterernährung erscheint also robuster zu sein, als der der früh-postnatalen Überernährung. Allerdings ist die Definition von „Über“- oder „Unter“-Ernährung relativ zur Normalernährung schwierig.

4.3.5 Probleme bei der Interpretation der Folgen der Manipulation der früh-postnatalen Ernährung unter Laborbedingungen

4.3.5.1 Was ist „Über“-, was „Normal“-Ernährung?

In verschiedenen Veröffentlichungen variiert die als normal betrachtete Wurfgröße bei Laborratten und -mäusen zwischen acht und zwölf Welpen (Harris PM 1980a,b; Basset & Craig 1988, Hausberger & Volz 1984, Plagemann et al. 1992, You et al. 1990). Jeder Autor definiert demnach die „normale“ Wurfgröße unterschiedlich. So kann die normale Wurfgröße der durchschnittlichen Wurfgröße in den verschiedenen Kolonien entsprechen (Aubert 1980) oder sich wie in der vorliegenden Arbeit nach der Anzahl der Zitzen richten. Laut Gilbert (1986) entspricht die natürliche Wurfgröße bei Wild-Nagetieren verschiedener Familien und Gattungen in etwa der Hälfte der Zitzen. Jedoch ist unter Laborbedingungen und nach Zuchtselektion die durchschnittliche Wurfgröße im allgemeinen angestiegen. Bei willkürlicher Manipulation der Anzahl der vom Muttertier postnatal zu versorgenden Welpen zeigt sich, daß nicht nur bei den eigenen Untersuchungen sondern auch bei anderen Untersuchungen (Harris PM 1980a,b; Duff & Snell 1982, Basset & Craig 1988, Hausberger & Volz 1984, Plagemann et al. 1992, You et al. 1990), mit Ausnahme von Wurtman & Miller (1976), die Körpermasse von KN-Tieren am Tag des Absetzens signifikant höher als die der NN-Tiere ist.

Trotz der relativ großen Würfe bei Laborratten stellt sich die Frage, ob die normalen Würfe hinsichtlich ihrer Ernährungsbedingungen unter den energetisch günstigen Laborbedingungen im Vergleich zu natürlichen Aufzuchtbedingungen nicht eher überernährt sind. Nach der gleichen Überlegung könnten die unter Laborbedingungen in großen Nestern ($n \geq 16$) in der Säugephase Ernährungsbedingungen haben, die unter natürlichen Bedingungen eher denen einer „normalen“ Ernährung entsprechen, sofern die Wurfgrößen nicht extrem vergrößert wurden (Hausberger & Volz 1984, Plagemann et al. 1992). Unter den Bedingungen der vorliegenden Arbeit könnte jedoch der bei der Ernährung normaler Würfe vorgenommene tägliche Wechsel der Muttertiere durch die damit verbundene Störung einer relativen Überernährung entgegengewirkt haben, so daß hier eine Bedingung bestand, die der normalen Ernährung unter natürlichen Bedingungen näher kam. Dies würde erklären, daß die als UN bezeichneten Welpen deutlich kleiner und leichter waren als diejenigen, die im normalen Nest von ihrer eigenen Mutter, das heißt, ohne täglichen Austausch der Muttertiere aufgezogen worden waren. Andererseits gibt es für die UN-Welpen keinen Hinweis auf eine Mangelernährung, denn Hungersymptome wie hervortretende Rippen, „Hungerbauch“ oder gestörtes Allgemeinbefinden waren nicht erkennbar.

Weiterhin muß betont werden, daß es keine Hinweise darauf gibt, daß die Streßbelastung unter Laborbedingungen einerseits durch die Aufzucht im großen Nest mit erhöhter Welpenzahl durch die eigene Mutter und andererseits durch den täglichen Austausch der Mütter bei Aufzucht im normalen Nest, wie dies in der vorliegenden Arbeit erfolgte, unterschiedlich stark ist. Auch bei Wildratten ist von einer Streßbelastung der Jungtiere durch die längere Abwesenheit des Muttertieres vom Nest zum Zweck der Futtersuche auszugehen. Insofern könnte die Streßbelastung der Aufzucht unter den genannten Laborbedingungen ähnlich der unter natürlichen Bedingungen durch die längere Abwesenheit des Muttertieres vom Nest sein. Mit der Abwesenheit der Mutter sind natürlich auch ein geringeres Milchangebot sowie veränderte thermische Bedingungen verbunden (Schmidt 2001). Ein theoretischer Vergleich der Streßbelastung durch die verschiedenen Aufzuchtbedingungen ist angesichts der Komplexität der Unterschiede nicht möglich. Hier könnten nur detaillierte vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Aufzuchtbedingungen Aufschluß geben. Die ausführlichsten Informationen liegen bisher zur Veränderung der thermischen Bedingungen in Abhängigkeit von der Wurfgröße vor (Leon et al. 1978, Schmidt 2001).

4.3.5.2 Besonderheiten der Thermoregulation im kleinen Nest

Eine besondere Strategie für die Kälteabwehr in den ersten Lebenstagen ist neben der zitterfreien Thermogenese (Johanson 1979, Nicholls & Locke 1984, Cannon & Nedergaard 1985) das soziale thermoregulatorische Verhalten („huddling“, Alberts 1978). Dabei streben kühlere Welpen, die am Rand des Wurfes liegen, mit großer Zielstrebigkeit in die Mitte ihrer Geschwister und verdrängen so die wärmeren und passiveren Tiere. Vorteil dieser Strategie ist, daß im Vergleich zu isoliert gehaltenen Tieren mit geringerer individueller Wärmeproduktion eine deutliche stabilere Kerntemperatur erreicht wird und weniger Energie für die Kälteabwehr nötig ist (Alberts 1978). Das soziale thermoregulatorische Verhalten befähigt die Welpen dazu, den Wärmeverlust soweit zu reduzieren, daß die begrenzte autonome Thermoregulation effizient eingesetzt werden kann, wenn das Muttertier ab dem dritten Tag *p.n.* für immer längere Phasen das Nest verläßt (Schmidt et al. 1987).

Ein mit der Abnahme der Wurfgröße theoretisch zu erwartender größerer individueller Wärmeverlust wird dadurch ausgeglichen, daß die Muttertiere mit abnehmender Wurfgröße längere Zeit im Nest verbringen (Leon et al. 1978, Grota 1973), wodurch nicht nur die thermoregulatorische Belastung verringert, sondern auch die Milchverfügbarkeit vergrößert wird. Besonders in den ersten Lebenstagen ist dieser Zusammenhang von Bedeutung, da die Rattenwelpen noch nackt sind und außerdem ein schlechtes Oberflächen-Volumen-Verhältnis haben und so anfälliger gegenüber Schwankungen der Umgebungstemperatur sind (Schmidt 2001). Im kleinen Nest wachsen die Welpen im weiteren Verlauf schneller als im normalen Nest, so daß sie früher zu einer erhöhten metabolischen Wärmeproduktion befähigt sind, und aufgrund eines besseren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses für sie ein geringerer Wärmeverlust entsteht (Schmidt et al. 1987).

Bezüglich des Vergleiches zwischen den natürlichen Aufzuchtbedingungen und denen im Labor muß berücksichtigt werden, daß die Muttertiere im Labor nicht gezwungen sind für sich und ihre Nachkommen auf Futtersuche zu gehen, sondern das Futter sozusagen „griffbereit“ haben, was eine geringere Dauer der Abwesenheit des Muttertieres vom Nest begünstigt. Insgesamt ist davon auszugehen, daß im Labor aufgezogene Welpen im Vergleich zu den Bedingungen in der Natur in einer thermisch weniger belastenden Umgebung aufwachsen. Dies dürfte generell die Verfügbarkeit von metabolischer Energie für das Körperwachstum begünstigen. In diesem Zusammenhang darf nicht vergessen werden, daß sowohl die maternale Ernährung als auch ausdauernde maternale Bewegung („exercise“,

Matsuno et al. 1999) Auswirkungen auf Milchezusammensetzung und -volumen haben (del Prado et al. 1997, Matsuno et al. 1999, Ronayne de Ferrer & Sambucetti 1993, Crnic & Chase 1980). Deshalb ist zu vermuten, daß die Aufzucht im normalen Nest unter Laborbedingungen im Vergleich zur Aufzucht von Wildtieren bei gleicher Wurfgröße eine erhebliche früh-postnatale Überernährung bedingt. Inwieweit sich die normalerweise geringere Wurfgröße von Wildnagern, die leichtere Futterverfügbarkeit für Labornager und die unterschiedlichen thermischen Bedingungen in ihrem Effekt auf die Energieverfügbarkeit für das Wachstum der Welpen gegeneinander aufheben, ist auf Grund der Komplexität der Unterschiede nicht zu sagen.

4.3.5.3 Bedeutung der Unterscheidung von Über- und Normalernährung.

Nach dem oben Gesagten, erscheint es problematisch, den Ausdruck „Normalernährung“ für die normale Aufzucht unter Laborbedingungen zu verwenden. Korrekter wäre, von einer „mittleren Ernährungslage“ im Bezug auf andere diätetische Manipulationsformen zu reden, die zu einer relativen Über- oder Unterernährung im Vergleich zur „mittleren“ Ernährungslage führen. Da aber in der Literatur üblicherweise von „Normalernährung“ gesprochen wird, findet dieser Ausdruck auch in dieser Arbeit Verwendung. Während diese Überlegungen zweitrangig sind, solange es durch die frühpostnatale Ernährung zu Langzeiteffekten kommt, bei der sich die Parameter proportional zur Absetz-Körpermasse verhalten, wird die Definition der Normalernährung kritisch, wenn es nicht zu quantitativen, sondern zu qualitativen Unterschieden zwischen den verschiedenen Aufzuchtbedingungen kommt. Insbesondere erlangen diese Überlegungen entscheidende Bedeutung, wenn es nicht nur um die Langzeitwirkung der früh-postnatalen Über- oder Unterernährung bei Ratten geht, sondern diese als Tiermodell für die Ernährungssituation beim Menschen betrachtet werden (Schmidt 2002).

Die häufige Verwendung von Ratten und Mäusen als Tiermodell für die Langzeitfolgen der früh-postnatalen Ernährung beruht auf ihrem kurzen Lebenszyklus und der einfachen Tierhaltung. Allerdings sind diese Tierarten hierfür eigentlich auf Grund des unreifen Zustandes der Neugeborenen im Vergleich zum Menschen wenig geeignet (Schmidt 2002). Zwar ergibt sich so die Möglichkeit, bequem die Ernährung in neuronalen Entwicklungsstadien manipulieren zu können, die beim Menschen und anderen Arten mit reiferen Neugeborenen bereits intrauterin ablaufen, andererseits unterscheidet sich die postnatale Ernährung so grundlegend von der plazentaren Ernährung, daß die vergleichende Interpreta-

tion der Befunde nicht leicht ist. Auf jeden Fall sind, ganz unabhängig von anderen Artunterschieden, auf Grund der stark unterschiedlichen neuronalen Entwicklung in der Säuglingsphase keine unmittelbaren Vergleiche der Folgen der früh-postnatalen Ernährung zwischen Ratten bzw. Mäusen und dem Menschen möglich. Ratten und Mäuse als Tiermodell können also verwendet werden, um das Auftreten von epigenetischen Beeinflussungen zweifelsfrei nachzuweisen, jedoch ist bei der Frage der speziellen Folgen von Über- bzw. Unterernährung zu bestimmten Zeiten der Entwicklung größte Vorsicht geboten (Schmidt 2002).

Mit den verschiedenen Versuchsprotokollen zur Manipulation der früh-postnatalen Ernährung von Ratten und Mäusen werden also graduelle Unterschiede in der Ernährung während der Säuglingszeit erzeugt, die in der Regel zu einer proportional veränderten Absetz-Körpermasse führen, die wiederum unter bestimmten Voraussetzungen zu Langzeitwirkungen auf die Körperzusammensetzung und andere physiologische Parameter der adulten Tiere führen kann. Weder hier noch in anderen Arbeiten wurde jedoch geklärt, ob ein solcher Langzeiteffekt auf die Veränderung der Absetz-Körpermasse oder die früh-postnatale Ernährung als solche zurückzuführen ist. Da die hier verwendeten Zuckerratten ein Auszuchtstamm sind, ist es zudem problematisch allein aus einem gegebenen Zusammenhang zwischen Absetz-Körpermasse und Unterschieden in physiologischen Parametern des adulten Tieres Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von epigenetischen Faktoren zu ziehen. Doch der Vergleich mit den Daten aus der parallel durchgeführten Diplomarbeit² zeigt bei dem Inzuchtstamm Wistarratten einen ähnlichen Zusammenhang zwischen Absetz-Körpermasse und der Körpermasse der adulten Tiere. Obwohl somit die Auswirkung epigenetischer Faktoren auf die Regulation der Energiebilanz im adulten Tier gesichert ist, sind die programmierenden Faktoren und der Zeitpunkt ihrer Wirksamkeit aus den vorliegenden Untersuchungen nicht zu ersehen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in der vorliegenden Arbeit die Aufzucht im kleinen Nest nur während der Säugephase und der frühen juvenilen Phase einen Einfluß auf Körpermasse und Körperzusammensetzung hat. Eine frühe Unterernährung (UN) mit anschließender Standardfütterung führte dagegen zu einer permanenten Reduzierung der Körpermasse und sowohl der fettfreien Körpersubstanz als auch der Fettspeicher gegenüber den normal ernährten Tiere. Auf Grund des nur sehr geringen Unterschieds in der Absetz-Körpermasse von Tieren aus normalen und kleinen Nestern in dieser Studie, ist allerdings fraglich, ob dies einen prinzipiellen Unterschied zwischen den Folgen der Über-

und Unterernährung darstellt oder ob der erzeugte Unterschied nur zu klein war, um sich in der zunehmenden Streuung durch andere Einflüsse im Laufe des Lebens noch nachweisen zu lassen. Dies gilt insbesondere, da in der parallel mit gleicher Methodik an Wistarratten durchgeführten Untersuchung, bei denen sich ein deutlich größerer Unterschied in der Absetz-Körpermasse zwischen NN- und KN-Tieren zeigte, Langzeitfolgen auch im Alter von 6 Monaten noch nachweisbar waren. Doch ergab auch eine vergleichende Analyse der Arbeiten, bei denen allein durch die Wurfgröße die Milchverfügbarkeit manipuliert wurde, keinen klaren Zusammenhang zwischen den prozentualen Unterschieden in der Körpermasse beim Absetzen und der Persistenz dieser Unterschiede (Tabellen 4.1 und 4.2).

Die Frage, inwieweit eine frühe Überernährung zu Langzeitfolgen führt, ist besonders unter dem Gesichtspunkt von Interesse, daß die besseren Lebensbedingungen in den Industrieländern sich ebenfalls im Sinne einer relativen früh-postnatalen Überernährung auswirken könnten. Dies könnte theoretisch gegenüber einer Normalernährung zu einer persistierenden Tendenz zu verstärktem Wachstum sowohl der fettfreien Körpermasse als auch der Fettmasse führen, d. h., die nachfolgende Generation würde unter diesen Lebensbedingungen nicht nur länger/größer sondern auch adipöser werden. Da Adipositas Sekundärerkrankungen wie Diabetes mellitus, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und orthopädische Schädigungen hervorrufen kann (Kopelman 2000), ist es wichtig, Möglichkeiten zu finden, die dieser Entwicklung entgegen steuern können. Es ist auch zu bedenken, daß diese Pathophysiologie des gestörten Energiehaushalts auch epigenetisch fixiert und so auf die Nachkommen übertragen werden könnte, so daß ein Schneeball-Effekt ausgelöst werden könnte (Levin 2000). Auf der anderen Seite führt eine prä-, peri- oder postnatale Unterernährung ebenfalls zu einer Pathophysiologie der Körpergewichtsregulation. Die vorübergehende Unterernährung des Foeten während bestimmter Schwangerschaftsphasen und/oder im Säuglingsalter, die sich zunächst in einer Reduzierung der Körpermasse und der Parameter der Körperzusammensetzung gegenüber einer normalen Ernährung auswirkt, kann im späteren postnatalen Verlauf unter der in den entwickelten Ländern verbreiteten relativen Überernährung ebenfalls zu einer verstärkten Adipositas-Neigung führen (Hales & Barker 1992). Bei dem beschriebenen Effekten ist also unklar, ob es die vorübergehende Unterernährung als solche oder die anschließende Aufholphase ist, die zu den beschriebenen Langzeitfolgen führt (Oscai & McGarr 1978). Da zudem die Grenzziehung zwischen „Normal-“ und „Über“- bzw. „Unter“-Ernährung beim Menschen noch problematischer ist als im Tiermodell, ergeben sich hier offensichtlich kritische Fragen. Dies gilt insbesondere im Zusammenhang mit der oben besprochenen Problematik der Definition von kritischen

Zeitpunkten in Anbetracht der stark unterschiedlichen Zeitverläufe der neuronalen Entwicklung beim Menschen und den üblichen Tiermodellen.

4.4 Interaktion zwischen der früh-postnatalen Ernährung und einer hochkalorischen Zusatzfütterung der adulten Tiere

In dieser Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob eine sechswöchige (d150 bis d190) hochkalorische Zusatzfütterung die Langzeitwirkungen der früh-postnatalen Ernährungseinflüsse modifiziert. Die hier besprochenen Ergebnisse der Körperzusammensetzung basieren auf der Chloroformextraktion bzw. auf Berechnungen mit dem FFM-Hydrationsfaktor. Nachfolgend werden die Wirkungen der Zusatzfütterung getrennt für Männchen und Weibchen besprochen.

Bei den Männchen stieg die FFDM bei allen drei Aufzuchtarten unter der hochkalorischen Zusatznahrung gleichmäßig um 10% an. Eine Akzentuierung der Unterschiede in der Fettmenge war nur bei den KN-Tieren zu beobachten, die im Vergleich zu den hochkalorisch ernährten NN-Tieren eine um 15% höhere Fettmasse bzw. einen um 12% höheren Fettgehalt entwickelten. Dagegen verringerte sich der Unterschied zwischen den hochkalorisch ernährten UN- und NN-Männchen hinsichtlich der Fettmasse und des Fettgehalts um fast die Hälfte (von 45% auf 25% und von 27% auf 13%) als Folge einer stärkeren Fetteinlagerung bei den UN-Tieren. Diese verstärkte Fettakkumulation könnte sowohl aus dem höheren Alter als auch aus der hochkalorischen Zusatzfütterung resultieren. Allerdings erscheint der Zeitraum zwischen einem Alter von 150 und 190 Tagen zu kurz, um die teilweise gravierenden Änderungen zu bedingen, die sich während der hochkalorischen Zusatzfütterung ergaben. Um dies verlässlich zu klären, müsste allerdings die Untersuchung mit einer Kontrollgruppe ohne hochkalorisches Zusatzfutter wiederholt werden.

Bei den Weibchen zeigten die KN- im Vergleich zu den NN-Tieren nach der sechswöchigen hochkalorischen Zusatzfütterung weiterhin keine Unterschiede in Körpermasse, FFDM, Körperfettmasse und Körperfettgehalt. Das deckt sich weitgehend mit einer anderen Studie, in der sogar eine sechsmonatige (5. bis 11. Lebensmonat) fettreiche Diät keine signifikanten Unterschiede zwischen früh-postnatal über- und normal ernährten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten in Körpermasse und Fettgehalt provozieren konnte, jedoch war

weiterhin eine leicht größere Fettmasse der KN-Tiere gegenüber den NN-Tieren erkennbar (Hausberger & Volz 1984, s. Tabelle 4.1). Ein persistierender Unterschied zwischen KN- und NN-Weibchen in Körpermasse und FFDM konnte dagegen in der parallel mit gleichem Aufzuchtprotokoll durchgeführten Diplomarbeit² beobachtet werden, wenn die Tiere unmittelbar nach dem Absetzen neben dem Standardfutter noch hochkalorisches Zusatzfutter *ad libitum* erhielten (s. Tabelle 4.1). Aufgrund der großen Streuung erreichte der Unterschied im Körperfettgehalt allerdings nicht das Signifikanzniveau, obwohl die KN-Tiere einen um 15% höheren Fettgehalt als die NN-Tiere hatten. Dies könnte bedeuten, daß nur bei einer nach dem Absetzen fortgesetzten Überernährung ein persistierender Unterschied zwischen KN- und NN-Weibchen zu erwarten ist, nicht aber bei einer erst im adulten Alter wieder einsetzenden Überernährung. Im Hinblick auf die Ernährungslage bei Kindern in Industrienationen, wäre die experimentelle Testung dieser Hypothese im Tiermodell von großem Interesse.

Die sechswöchige hochkalorische Zusatzfütterung bewirkte in der vorliegenden Arbeit, daß sich der Unterschied zwischen UN- und NN-Weibchen in der FFDM (von -4% auf -8%) vergrößerte, während der Unterschied in der Fettmasse unverändert bei -35% blieb. Daraus ergibt sich ein Anstieg des Unterschieds im Körperfettgehalt von -19% auf -24%. Dieser Befund unterscheidet sich sowohl von den eigenen Befunden bei den Männchen wie den Beobachtungen an Weibchen in anderen Untersuchungen. So verschwanden bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten nach einer sechsmonatigen (5. bis 11. Lebensmonat) fettreichen Zusatzfütterung die Unterschiede in Fettmasse bzw. Fettgehalt der untersuchten Fettgewebe zwischen GN- und NN-Tieren (Hausberger & Volz 1984, s. Tabelle 4.1). Auch die weiblichen Wistarratten in der parallel durchgeführten Diplomarbeit², die nach dem Absetzen hochkalorisches Zusatzfutter *ad libitum* erhielten, zeigten im Alter von sechs Monaten keine Unterschiede mehr zwischen UN- und NN-Tieren in Körpermasse und Körperzusammensetzung (s. Tabelle 4.1). Eine Ursache für die unterschiedlichen Befunde ist angesichts der Komplexität der Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsprotokollen nicht auszumachen. Wie oben (s. 4.3.1) in ähnlicher Form für die Unterschiede zwischen KN- und NN-Tieren diskutiert, könnte die Größe der beim Absetzen erzielten Unterschiede zwischen NN- und UN-Tieren ausschlaggebend sein. Diese waren in der vorliegenden Studie bei den Männchen relativ größer als bei den Weibchen und bei beiden Geschlechtern größer als die mit dem gleichen Versuchsprotokoll bei den Wistarratten erzielten Unterschiede.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß Männchen und Weibchen in dieser Arbeit auf die hochkalorische Zusatzfütterung unterschiedlich reagierten. Während weiterhin keine Unterschiede zwischen den KN- und NN-Weibchen in Körpermasse und Körperzusammensetzung bestanden, vergrößerten sich die Unterschiede zwischen KN- und NN-Männchen in Fettmasse und Fettgehalt durch die Zusatzfütterung. Zudem bewirkte die hochkalorische Zusatzfütterung, daß sich die Werte der UN- den NN-Männchen annäherten. Die verstärkte Fettakkumulation der UN-Männchen während der späteren Überernährungsperiode würde der „*Hales-Barker-Hypothese*“ entsprechen, die besagt, daß eine Mangel- oder Unterernährung in frühen Entwicklungsstadien, gefolgt von einer späteren Normal- oder Überernährung, das Auftreten von Adipositas und Diabetes mellitus Typ II begünstigt (Hales & Barker 1992). Obwohl es nicht auszuschließen ist, daß es bei einer längerfristigen Zusatzfütterung nicht nur zu einer Angleichung, sondern vielleicht sogar zu einem höheren Körperfettgehalt bei den UN-Männchen kommen könnte, muß jedoch betont werden, daß in der vorliegenden Arbeit auch im Alter von 190 Tagen die UN-Männchen immer noch einen signifikant niedrigeren Fettgehalt aufwiesen als die NN-Männchen. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß die Befunde beim Menschen, die auf ein späteres Übergewichts- und Diabetesrisiko der frühen Unterernährung hinwiesen, von pränatalen Ernährungsstörungen bzw. dem Geburtsgewicht ausgingen, während hier die postnatale Ernährung manipuliert wurde. Ein unmittelbarer Vergleich ist trotz der oben bereits diskutierten neuronalen Unreife der neugeborenen Ratte also sehr problematisch.

Unklar ist zudem, warum die fettfreie Körpersubstanz, bei den UN-Weibchen während der hochkalorischen Zusatzfütterung geringer ansteigt als bei den NN-Tieren, während der Unterschied in der Körperfettmasse unverändert ist. Um zu klären, ob dieser Befund reproduzierbar ist, und ob tatsächlich ein Geschlechtsunterschied vorliegt, müßten jedoch noch weitere Untersuchungen erfolgen.

4.5 Langzeiteinfluß der früh-postnatalen Ernährung auf die, die Körperfettmenge reflektierenden, Plasmaspiegel von Leptin und Insulin

4.5.1 Effekt der früh-postnatalen Über- und Unterernährung mit anschließender Standardfütterung auf den Plasmaleptinspiegel

Wie in anderen Studien (Frederich et al. 1995, Maffei et al. 1995a, Zhang et al. 1997, Olbort 1998) zeigte in der vorliegenden Arbeit eine Regressionsanalyse, daß im Alter von 150 Tagen der Plasmaleptinspiegel (PLS) den Körperfettgehalt reflektiert (vgl. Abbildung 3.9, Tabelle 3.4). Dieser Zusammenhang war in Bezug auf den prozentualen Fettgehalt zwar locker, jedoch für jedes Geschlecht signifikant (Männchen $r = 0,49$; $P < 0,001$; Weibchen $r = 0,34$; $P < 0,01$). Die zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, vgl. Tabelle 3.5) unter Berücksichtigung der Faktoren Genotyp (+/+; +/-fa) und Aufzuchtart ergab keinen Hinweis auf einen Einfluß, obwohl der Faktor Aufzuchtart Körperfettmasse und Körperfettgehalt in diesem Alter signifikant beeinflusste (vgl. Tabelle 3.3, oben). Um diesem Zusammenhang Rechnung zu tragen, wurden Kovarianzanalysen (ANCOVA) für wahlweise Fettmasse und prozentualen Fettgehalt als Kovariaten durchgeführt, um mögliche Einflüsse der Aufzuchtart unabhängig vom Einfluß des Körperfetts zu erfassen. Mit dieser Methode war es zudem möglich, einer von Packard & Boardman (1999) angesprochenen Problematik Rechnung zu tragen, die sich aus der Berechnung von Korrelationen auf der Grundlage von Prozentangaben ergibt, wenn die betreffenden Regressionsgeraden, wie in dieser Arbeit, nicht durch den Nullpunkt gehen. Sowohl bei Berücksichtigung der Fettmasse als auch des prozentualen Fettgehalts als Kovariaten ergab sich für den Faktor Aufzuchtart weder bei den Männchen noch bei den Weibchen ein signifikanter Einfluß auf den PLS (s. Tabelle 4.3, oben). Für den Genotyp ließ sich bei den Weibchen ein signifikanter Einfluß feststellen; er entspricht dem unter 4.7 diskutierten Heterozygoteneffekt im Sinne einer gestörten Regulation des PLS als Folge des Leptinrezeptordefektes. Dies entspricht den Befunden nach Herauspartialisierung⁴ des Einflusses der Körperfettmasse bei Wildtypen und Heterozygoten im Säuglingsalter, wo die +/-fa Tiere deutlich höhere Werte zeigen (Zhang et al. 2001).

⁴ statistischer Begriff, Bereinigen einer abhängigen Variablen vom Einfluß einer Kovariaten (Bortz 1999)

d150	Geschlecht	Kovariate Fett [g bzw. %]	Kategoriale Prädiktoren				
			Aufzuchtart	post-hoc-Test			Genotyp +/+ vs. +/fa
				UN vs. NN	NN vs. KN	UN vs. KN	
Leptin (Fett [g])	m	*	ns	ns	ns	ns	ns
Leptin (Fett [%])		*	ns	ns	ns	ns	ns
Insulin (Fett [g])		ns	*	ns	*	ns	ns
Insulin (Fett [%])		ns	*	ns	*	ns	ns
Leptin (Fett [g])	w	ns	ns	ns	ns	ns	*
Leptin (Fett [%])		ns	ns	ns	ns	ns	*
Insulin (Fett [g])		ns	*	ns	*	ns	ns
Insulin (Fett [%])		ns	*	ns	*	ns	ns

d190	Geschlecht	Kovariate Fett [g bzw. %]	Kategoriale Prädiktoren				
			Aufzuchtart	post-hoc-Test			Genotyp +/+ vs. +/fa
				UN vs. NN	NN vs. KN	UN vs. KN	
Leptin (Fett [g])	m	***	ns	ns	ns	ns	ns
Leptin (Fett [%])		***	ns	ns	ns	ns	ns
Insulin (Fett [g])		**	ns	ns	ns	ns	ns
Insulin (Fett [%])		***	ns	ns	ns	ns	ns
Leptin (Fett [g])	w	***	ns	ns	ns	ns	ns
Leptin (Fett [%])		***	*	*	ns	ns	ns
Insulin (Fett [g])		ns	***	***	***	ns	ns
Insulin (Fett [%])		ns	***	***	***	ns	ns

Tab. 4.3: Am Tag 150 und Tag 190 mittels zweifaktorieller Kovarianzanalysen (mit den kategorialen Prädiktoren Genotyp und Aufzuchtart und der Kovariaten Fett [g] bzw. Fett [%]) ermittelte Signifikanzen für die Unterschiede im Plasmaleptin- und Plasmainsulinspiegel von männlichen (m) und weiblichen (w) Zuckerratten, die als Welpen unter- (UN), normal (NN), oder überernährt (KN) wurden. Die Werte für Körperfettmasse und Körperfettgehalt der 150 Tage alten Tiere wurden mittels der jeweiligen im Alter von 190 Tagen ermittelten Geradengleichung für die Regression der untersuchten Parameter gegen die TOBEC-Meßwerte berechnet. *** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$; ns = $P \geq 0,05$; ns⁺ = $0,05 \leq P < 0,1$.

4.5.2 Plasmaleptin nach einer hochkalorischen Zusatzfütterung im adulten Tier

Um einen besseren Vergleich der Langzeitwirkung der hochkalorischen Zusatzfütterung und der Standardfütterung auf den Plasmaleptinspiegel zu ermöglichen, wurde die Schokolade bereits zwei Tage vor der Tötung entzogen. Nach der sechswöchigen hochkalorischen Zusatzfütterung ist bei der Regressionsanalyse der Einfluß des Körperfettgehalts auf den Plasmaleptinspiegel stärker ausgeprägt als im Alter von 150 Tagen (vgl. Tabelle 3.4, unten). Dies ist wahrscheinlich auf die wesentlich größere Variationsbreite der Werte unter diesen Bedingungen zurückzuführen. Zudem zeigte die zweifaktorielle ANOVA nach der hochkalorischen Zusatzfütterung eine Akzentuierung der Unterschiede zwischen den Nesttypen (vgl. Tabelle 3.5). Wie bei der Körperzusammensetzung zeigt sich auch hier ein unterschiedliches Verhalten von Männchen und Weibchen. Bei der ANOVA mit den Faktoren Genotyp und Aufzuchtart ergab sich bei den Männchen ein signifikanter Einfluß der Aufzuchtart. Aufgrund der großen Streuung wird im *post-hoc*-Vergleich das Signifikanzniveau nur für die Unterschiede zwischen den UN-Männchen einerseits und den NN- und KN-Männchen andererseits erreicht. (vgl. Tabelle 3.5 und Abbildung 3.10). Unter Berücksichtigung möglicher Einflüsse von Fettmasse bzw. Fettgehalt mittels ANCOVA verschwindet jedoch der Einfluß der früh-postnatalen Ernährung. D. h., die Unterschiede im PLS der Tiere aus den verschiedenen Nesttypen reflektieren nur die Unterschiede in den Fettspeichern (s. Tabelle 4.3, unten und Abbildung 4.1, oben rechts).

Auch bei den Weibchen ist bei der Regressionsanalyse der Einfluß des Körperfettgehalts auf den PLS nach hochkalorischer Zusatzfütterung ausgeprägter als unter der Standardernährung (vgl. Tabelle 3.3 und Abbildung 3.8). Die ANOVA bestätigt außerdem den Einfluß der Aufzuchtart, wobei wiederum UN-Tiere einerseits sich von den NN- und KN-Tieren andererseits signifikant unterscheiden (Tab. 3.5 und Abbildung 3.10). Auffällig ist der im Vergleich zu den KN-Tieren hohe PLS der NN-Weibchen. Auch nach Herauspartialisieren der Kovariaten Fettmasse bzw. Fettgehalt mittels ANCOVA ergibt sich für die NN-Tiere der höchste PLS, während sich die Werte von UN- und KN einander genähert haben, so daß der Einfluß der Aufzuchtart bei der Kovariaten Fettgehalt auf dem Unterschied zwischen UN- und NN- Tiere basiert (s. Tabelle 4.3, unten und Abbildung 4.1, oben rechts). Der ungewöhnlich hohe PLS der NN-Weibchen relativ zu UN und KN läßt sich weder durch erkennbare methodische Fehler noch durch naheliegende physiologische Vorgänge erklären. Der zuvor im Alter von 150 Tagen beobachtete Genotyp-Effekt bei den

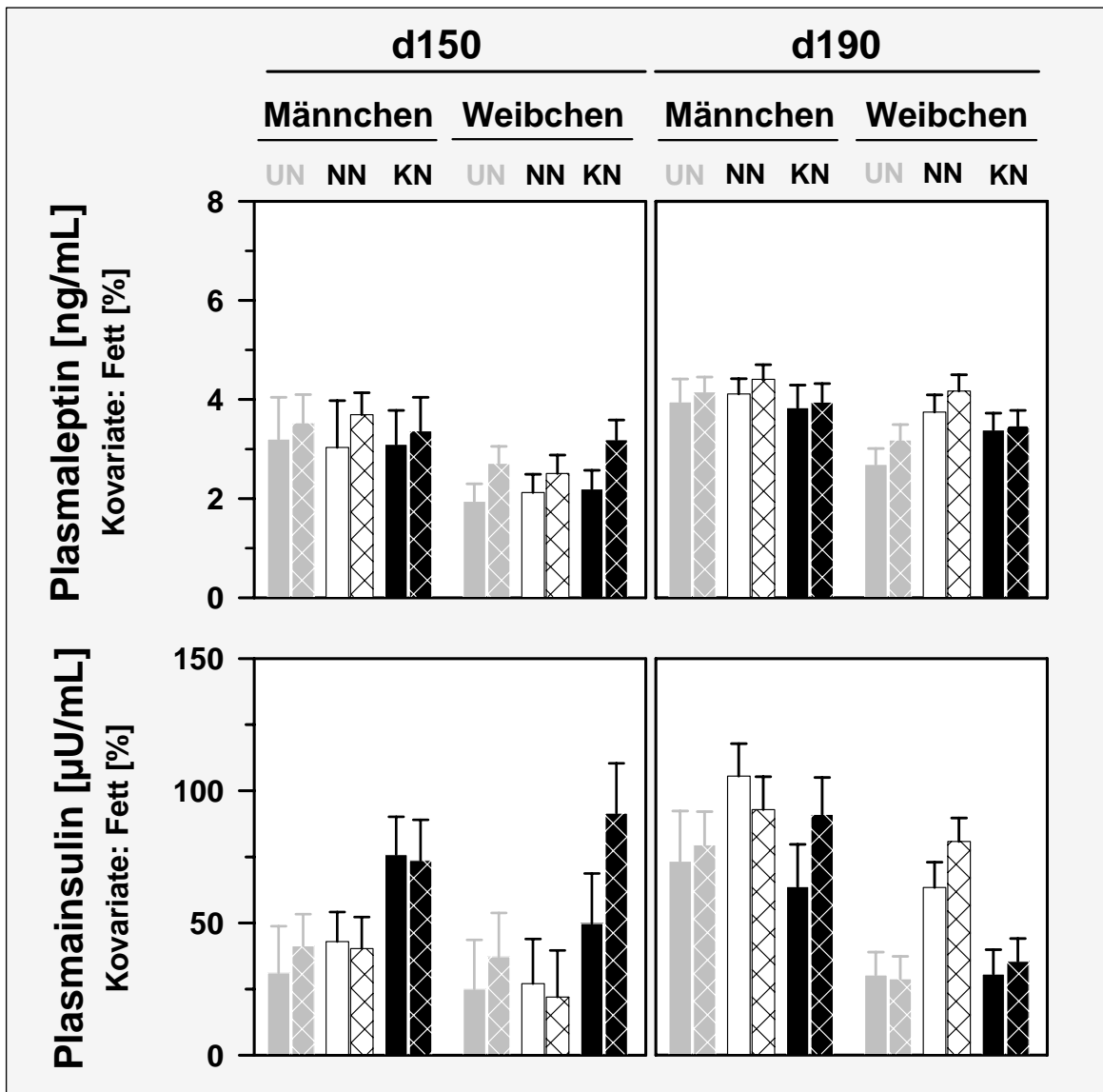


Abb. 4.1: Am Tag 150 (links) und Tag 190 (rechts) mittels zweifaktorieller Kovarianzanalysen (mit den kategorialen Prädiktoren Genotyp und Aufzuchtart und der Kovariate Fett [%]) ermittelte KQ-Mittelwerte \pm SEM der Plasmaleptin- und -insulinkonzentration von männlichen und weiblichen Zuckerratten. Die Werte für den Körperfettgehalt wurden mittels der im Alter von 190 Tagen ermittelten Geradengleichung für die Regression gegen die TOBEC-Meßwerte berechnet. Die Tiere wurden entweder als Welpen unter- (UN, graue Balken), normal (NN, weiße Balken) oder überernährt (KN, schwarze Balken). Unmarkierte Balken symbolisieren Wildtyp-Tiere, schraffierte Balken heterozygote Tiere.

Weibchen hat sich nach der hochkalorischen Zusatzfütterung entgegen den Erwartungen nicht verstärkt, sondern ist verschwunden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sowohl im Alter von 150 Tagen bei Normalernährung als auch nach der sechswöchigen Zusatzfütterung bei den Männchen und Weibchen der Körperfettgehalt den dominierenden Einfluß auf den PLS ausübt. Erstaunlicher-

weise geht der bei den Weibchen auf Normalfutter beobachtete Genotyp-Effekt auf den PLS nach der sechswöchigen hochkalorischen Ernährung verloren, statt stärker ausgeprägt zu werden, wie man zunächst erwartet hätte. Ebenso wie bei der Körperzusammensetzung ergibt sich also bei der Regulation des PLS kein Hinweis auf eine stärkere Empfindlichkeit der heterozygoten Tiere gegenüber den Einflüssen einer hochkalorischen Ernährung (vgl. 4.7).

4.5.3 Effekt der früh-postnatalen Über- und Unterernährung mit anschließender Standardfütterung auf Plasmainsulin

Wie Leptin sollte auch das Insulin das Körperfett reflektieren (Woods & Seeley 2000). In der vorliegenden Arbeit ist das im Alter von 150 Tagen nach Standardfütterung jedoch nur bei den Männchen der Fall, wobei zudem PIS und Fettgehalt nur relativ locker korrelieren ($r = 0,37$; $P < 0,01$). Bei Männchen und Weibchen ergab die zweifaktorielle ANOVA (vgl. Tabelle 3.5) einen signifikanten Einfluß der Aufzuchtart, jedoch keinen Hinweis auf einen Genotyp-Einfluß. Die ANCOVA unter Berücksichtigung von Fettmasse bzw. prozentualem Fettgehalt (s. Tabelle 4.3, oben) bestätigte den signifikanten Einfluß der Aufzuchtart bei Männchen und Weibchen. Wie die Tabellen und Abbildungen zeigen, ergab sich selbst nach Herauspartialisieren des Einflusses des Körperfetts sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen ein signifikant höherer Insulinspiegel der KN-Tiere im Vergleich zu den NN-Tieren – eine Tendenz, die auch in der ANOVA erkennbar war. Dieser Befund unterstreicht das Ergebnis früherer Studien, bei denen durch Wurfmanipulation überernährte Tiere im Vergleich zu normal ernährten Tieren im Säuglingsalter eine Hyperinsulinämie mit assoziierter verminderter Glukosetoleranz aufwiesen (You et al. 1990, Plagemann et al. 1992, 1999a,b), die bis zum Alter von 9 Monaten anhielt (You et al. 1990, Plagemann et al. 1999a). Die früh-postnatale Unterernährung bewirkte dagegen im Alter von fünf Monaten keine Hyperinsulinämie, wie sie vielleicht nach der „*Hales-Barker-Hypothese*“ (Hales & Barker 1992) erwartet werden könnte.

Andere Studien (Hardie et al. 1996b, Boden et al. 1997, Janssen et al. 1999, Wauters et al. 2000) zeigten, daß Leptin und Insulin in enger Beziehung zu einander stehen. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten PLS und PIS im Alter von 150 Tagen nach Standardfütterung eine allerdings lockere Beziehung zueinander (vgl. Tabelle 3.4). Wird mittels ANCOVA der Einfluß des PLS auf den PIS herauspartialisiert, erreicht der Einfluß der Kovariate PLS

Insulin [μ U/mL]	Geschlecht	Kovariante Leptin [ng/mL]	Kategoriale Prädiktoren				
			Aufzuchtart	post-hoc-Test			Genotyp +/+ vs. +/fa
				UN vs. NN	NN vs. KN	UN vs. KN	
d150	m	ns	**	ns	*	**	ns
d190		**	ns ⁺	ns ⁺	ns	ns	ns
d150	w	*	*	ns	*	ns	ns
d190		***	***	ns ⁺	***	ns	ns

Tab. 4.4: Am Tag 150 und Tag 190 mittels zweifaktorieller Kovarianzanalysen (mit den kategorialen Prädiktoren Genotyp und Aufzuchtart und der Kovarianten Plasmaleptin [ng/mL]) ermittelte Signifikanzen für die Unterschiede im Plasmainsulinspiegel von männlichen (m) und weiblichen (w) Zuckerratten, die als Welpen unter- (UN), normal (NN), oder überernährt (KN) wurden. *** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$; ns = $P \geq 0,05$; ns⁺ = $0,05 \leq P < 0,1$.

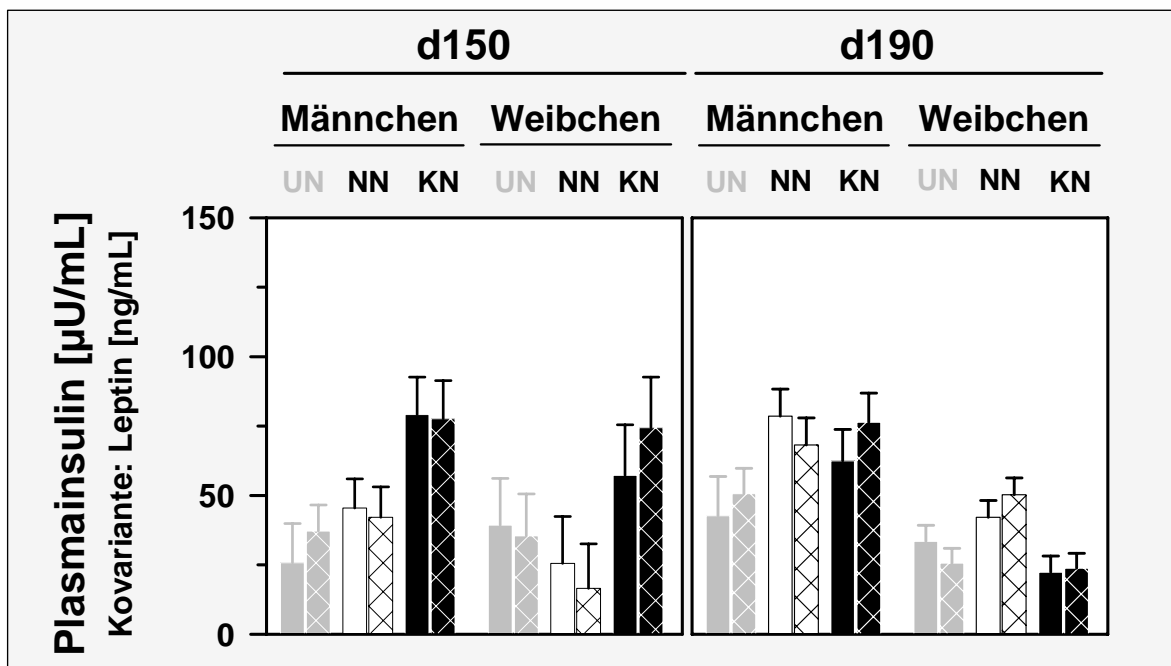


Abb. 4.2: Am Tag 150 (links) und Tag 190 (rechts) mittels zweifaktorieller Kovarianzanalysen (mit den kategorialen Prädiktoren Genotyp und Aufzuchtart und der Kovariante Leptin [ng/mL]) ermittelte KQ-Mittelwerte \pm SEM der Plasmainsulinkonzentration von männlichen und weiblichen Zuckerratten. Die Tiere wurden entweder als Welpen unter- (UN, graue Balken), normal (NN, weiße Balken) oder überernährt (KN, schwarze Balken). Unmarkierte Balken symbolisieren Wildtyp-Tiere, schraffierte Balken heterozygote Tiere.

bei den Männchen zwar nicht das Signifikanzniveau, aber der Einfluß der Aufzuchtart auf den PIS wird signifikant (s. Tabelle 4.4 und Abbildung 4.2). Bei den Weibchen gleichen Alters zeigt sich ein signifikanter Einfluß des PLS als Kovariate sowie der Aufzuchtart.

Die vergleichende Interpretation der Plasmainsulin-Messungen wird in der vorliegenden Untersuchung dadurch erschwert, daß aufgrund der Kombination mit den TOBEC[®]-Messungen für die Blutentnahmen keine für die Erfassung des Insulin-Status optimale Bedingungen eingehalten werden konnten. Weil die TOBEC[®]-Messung eine weitgehende Darmentleerung voraussetzt, wurden die Messungen nach 16- bis 24-stündigem Fasten durchgeführt. Dies entsprach wahrscheinlich einer Übergangsphase zwischen normalem Nüchternwert und ausgeprägtem Hungerstoffwechsel, der bei Ratten nach 24- bis 70-stündigem Fasten bei unverändertem Körperfettgehalt deutlich niedrigere Plasmaleptin- und Plasmainsulinspiegel bedingt (Ahima et al. 1999). Eine zusätzliche Unsicherheit ergibt sich aus möglichen Streß-Einflüssen im Zusammenhang mit der Blutentnahme aus dem Augenwinkel, bei der infolge einer Adrenalinausschüttung und dem damit verbundenen Anstieg des Glukosespiegels mit einem Anstieg des Plasmainsulins innerhalb weniger Minuten zu rechnen ist (Farias-Silva et al. 2002). Unabhängig von diesen einander entgegengesetzten Einflüssen ließen sich jedoch die oben beschriebenen Abhängigkeiten des Plasmainsulins von der Aufzuchtart und teilweise auch vom Fettgehalt nachweisen (s. Abb. 3.9). Erschwert wird allerdings der Vergleich mit Untersuchungen, bei denen andere Ernährungszustände und Methoden der Blutentnahme ausgewählt wurden.

4.5.4 Plasmainsulin nach einer hochkalorischen Zusatzfütterung im adulten Tier

Um einen besseren Vergleich der Langzeitwirkung der hochkalorischen Zusatzfütterung und der Standardfütterung auf den Plasmainsulinspiegel zu ermöglichen, wurde die Schokolade bereits zwei Tage vor der Tötung entzogen. Wie beim PLS zeigt die Regressionsanalyse nach der hochkalorischen Zusatzfütterung auch eine deutliche Beeinflussung des PIS durch den Körperfettgehalt von Männchen und Weibchen (vgl. Tabelle 3.4). Zwar zeigt die zweifaktorielle ANOVA bei den Männchen die gleiche Beeinflussung durch die früh-postnatale Ernährung im Vergleich zum Tag 150 und bei den Weibchen sogar einen stärkeren Einfluß (vgl. Tabelle 3.5), doch begründet sich die Signifikanz bei den Männchen allein auf den relativ niedrigen PIS der UN-Tiere und bei den Weibchen auf den hohen PIS der NN-Tiere (vgl. Abbildung 3.10). Die hohen PIS-Werte der 190 Tage alten

NN-Weibchen im Vergleich zu den KN-Tieren sind ein überraschendes Ergebnis. Es läßt sich nicht auf die bereits oben diskutierten methodischen Probleme zurückführen (s. 4.5.3), und auch bei der Überprüfung der einzelnen Daten wurden keine Fehlerquellen entdeckt, die diesen Befund in Frage stellen könnten.

Mittels ANCOVA werden folgende Ergebnisse deutlich: erstens zeigt sich bei den Männchen, daß der PIS primär vom Körperfettgehalt abhängt, bei den Weibchen dagegen von der früh-postnatalen Ernährung (s. Tabelle 4.3 und Abbildung 4.1). Zweitens ergeben sich – obwohl diese Tiere vor der Blutentnahme ca. 20 Stunden gefastet hatten und die Schokolade bereits zwei Tage zuvor entzogen wurde, so daß niedrige PIS zu erwarten wären (Ahima et al. 1999) – nach Herauspartialisieren des Fettgehalts sehr hohe PIS für die Männchen aus allen drei Nesttypen, wobei die Werte der KN-Tiere im Vergleich zum Tag 150 kaum verändert sind. Drittens zeigen sowohl NN-Männchen wie NN-Weibchen nach Herauspartialisieren des Einflusses des Körperfetts jeweils den höchsten PIS, während UN- und KN-Tiere ähnliche Werte aufweisen. Und viertens ergeben sich bei den UN-Männchen nach der hochkalorischen Ernährungsphase höhere PIS als für ihren noch relativ niedrigen Körperfettgehalt zu erwarten wäre, während die UN-Weibchen dagegen einen im Vergleich zu Tag 150 unverändert niedrigen PIS aufweisen. Sie scheinen also trotz der hochkalorischen Zusatzfütterung auf aktuelle Glukosespiegel reagieren zu können.

Es ist erstaunlich, daß sowohl bei der ANOVA als auch bei der ANCOVA der PIS der NN-Männchen und NN-Weibchen relativ hoch ist ($\approx 100 \mu\text{U}/\text{mL}$ und $\approx 80 \mu\text{U}/\text{mL}$). Wie beim PLS ist bei den NN-Weibchen der PIS deutlich höher als bei den KN-Weibchen und das sowohl bei der ANOVA wie ANCOVA. Hierfür lassen sich wie oben erläutert keine methodischen Fehler verantwortlich machen. Überraschend ist außerdem, daß der PIS der KN-Weibchen nach der hochkalorischen Zusatzfütterung besonders bei den Heterozygoten sowohl bei der ANOVA wie ANCOVA gesunken ist.

Wie die vorangegangenen Kapitel zeigen, ist die Wahl der statistischen Auswertung entscheidend für die Interpretation der Befunde. Mit der ANOVA werden die Meßwerte, hier die untersuchten Plasmahormonspiegel, auf die beeinflussenden Faktoren, in diesem Fall Aufzuchtart und Genotyp, untersucht. Die mittels ANOVA dargestellten Plasmaleptin- und Plasmainsulinkonzentrationen entsprechen demnach denen im Tier zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Andererseits beeinflußt die Körperfettmenge ebenfalls die Leptin- und Insulinspiegel. Bei der ANCOVA wird untersucht, ob die Aufzuchtart und der Genotyp einen

über den Einfluß auf die Fettmenge hinausgehenden direkten Einfluß auf den untersuchten Parameter haben, indem der Einfluß der Kovariate Fett bereinigt (herauspartialisiert) wird. Für diese Analyse wird der Korrelationskoeffizient zwischen Fettmenge und Hormonkonzentration berechnet und Varianzen, die nicht durch die Fettmenge (Varianzbeitrag) erklärt werden, der sog. Restvarianzbeitrag, bestimmt. Die so berechneten Mittelwerte können sich also von denen der ANOVA unterscheiden.

Die enge Beziehung zwischen Leptin und Insulin tritt nach der sechswöchigen hochkalorischen Zusatzfütterung bei Männchen und Weibchen sowohl bei der Regressionsanalyse (vgl. Tabelle 3.4) als auch bei der ANCOVA (s. Tabelle 4.4 und Abbildung 4.2) noch deutlicher hervor. Der Einfluß der Aufzuchtart ist dagegen bei der ANCOVA bei den Männchen nur noch tendenziell ($P = 0,056$) zu erkennen. Bei den Weibchen verstärkte er sich zwar, doch ist dies allein auf den relativ hohen PIS der NN-Weibchen zurückzuführen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß im Gegensatz zum PLS der Plasmainsulinspiegel im Alter von 150 Tagen noch deutlich von der Aufzuchtart beeinflusst wird. Eine frühpostnatale Überernährung mit anschließender Standardfütterung führt auch im adulten Tier zu einer relativen Hyperinsulinämie. Dagegen hat eine früh-postnatale Unterernährung im Vergleich zu einer normalen Ernährung keinen signifikanten Einfluß auf den PIS im Alter von 150 Tagen.

Nach der sechswöchigen hochkalorischen Zusatzfütterung wird der Einfluß des Körperfetts auf den PIS bei Männchen und Weibchen deutlicher, wobei bei den Männchen alle drei Nesttypen im Vergleich zum Tag 150 einen höheren PIS aufweisen. Bei den Weibchen dagegen ist der PIS nur bei den NN gestiegen, bei den KN-Tieren ist er jedoch gesunken. Die hochkalorische Zusatzfütterung scheint bei den NN-Männchen und -Weibchen eine relative Hyperinsulinämie provoziert zu haben, so daß bei den Weibchen ein signifikanter Einfluß der Aufzuchtart bei der ANCOVA entsteht. Während die UN-Weibchen scheinbar unbeeindruckt von der hochkalorischen Zusatzfütterung sind, stieg bei den UN-Männchen der PIS an. Auch wenn PLS und PIS im Alter von 150 Tagen primär von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst werden, ist ein Zusammenspiel, das nach der sechswöchigen hochkalorischen Zusatzfütterung noch deutlicher wird, erkennbar.

4.6 Bedeutung der Regressionsanalysen für die Auswertung der Langzeitfolgen der früh-postnatalen Ernährung

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen Mittelwertanalysen und zum anderen Regressionsanalysen zur Darstellung des Langzeiteinflusses der früh-postnatalen Ernährung verwandt. Die Vor- und Nachteile beider Methoden sollen hier nun dargestellt werden. Mittels der Mittelwertanalyse kann eine statistische Aussage getroffen werden, deren Trennschärfe bei einer zu hohen Streuung wie z.B. bei den Plasmahormonspiegeln dieser Arbeit jedoch beeinträchtigt werden kann (s. Abbildung 3.10). Außerdem wird bei Betrachtung der Mittelwerte zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht deutlich wie die gezeigten Unterschiede zwischen den Aufzuchtarten mit anderen Parametern, die als intervenierende Faktoren in Betracht kommen, z.B. der Absetz-Körpermasse, zusammenhängen. Dagegen ist bei der Regressionsanalyse dieser Zusammenhang zwischen Körperzusammensetzung und Absetz-Körpermasse erkennbar und kann zur Interpretation der Ergebnisse von „Ausreißern“ beitragen (s. Abbildung 3.11 bis 3.13). Es muß allerdings bedacht werden, daß nicht allein die Aufzuchtart die Körpermasse beim Absetzen beeinflusst. Besonders bei einem Auszuchtstamm, wie der Zuckerratte in der vorliegenden Arbeit, können genetische Unterschiede zusätzlich zur früh-postnatalen Ernährung die Absetz-Körpermasse und den späteren Wachstumsverlauf beeinflussen. In diesem Fall wäre die Korrelation mit der Absetz-Körpermasse nicht unbedingt nur eine Widerspiegelung des determinierenden Einflusses von epigenetischen Faktoren. Trotzdem erscheint es hier sinnvoll eine Regressionsanalyse anzuwenden, um einen Überblick über die Zusammenhänge zwischen der experimentell manipulierten Milchverfügbarkeit und der durch diese sowie durch andere unbekannte epigenetische oder genetische Faktoren beeinflusste Absetz-Körpermasse zu erhalten, wenn diese als intervenierende Variable für die Beurteilung der weiteren Entwicklung in Betracht gezogen wird.

Anhand dieser Auswertung wird deutlich, daß die Aufzuchtart über die Absetz-Körpermasse als der daraus resultierenden intervenierenden Variablen einen robusten Einfluß auf die Körpermasse insgesamt, sowie auf die fettfreie Körpersubstanz (FFM), hier durch die FFDM repräsentiert, ausübt (s. Tabelle 3.6 und 3.7). Dabei reflektiert die Größe der FFM bzw. FFDM u. a. das Längenwachstum der Tiere. Auch die Adiposität wird durch die experimentell manipulierte Milchverfügbarkeit beeinflusst. Allerdings bewirkt das Angebot des hochkalorischen Zusatzfutters oder das fortschreitende Alter, daß die individuellen Unterschiede in der FFDM und der Fettakkumulation der 190 Tage alten Tiere stärker zu Ta-

ge treten, da die Korrelationen im Alter von 150 Tagen enger waren als am Versuchsende (s. Tabelle 3.7). Der Plasmaleptinspiegel wird durch die hochkalorische Zusatzfütterung (bzw. das höhere Alter) stärker in der Korrelation zur Absetz-Körpermasse beeinflusst, während sich die Korrelationen des Plasmainsulinspiegels zur Körpermasse am Tag 21 in dieser Zeitspanne nicht verändert (s. Tabelle 3.8). Diese Art der Analyse liefert also einen guten Überblick über allgemeine Zusammenhänge zwischen Absetz-Körpermasse und Körperzusammensetzung, Körpermasse und Plasmahormonspiegeln im adulten Tier.

4.7 Unterschiedlicher Einfluß des *fa*-Allels auf die Geschlechter

Unter Standardbedingungen unterscheiden sich heterozygote (+/*fa*) Zuckerratten phänotypisch kaum von den Wildtyp-Tieren (+/+). Untersuchungen an Welpen zeigten, daß jedoch kein rein rezessiver Erbgang dieser Mutation vorliegt, wie zunächst angenommen (Zucker & Zucker 1961), sondern vielmehr in der ersten Lebenswoche ein kodominanter und in der dritten Lebenswoche ein partiell rezessiver Einfluß auf die Körpermasse und den Körperfettgehalt besteht (Truett et al. 1995, Schwarzer et al. 1997, Olbort 1998, Kraeft et al. 1999). Im Alter von 21 Tagen war bei den Zuckerratten der vorliegenden Arbeit (Versuchsserie I und II) ebenso wie in der Arbeit von Schölch (2001) kein Genotypunterschied in der Körpermasse erkennbar. Jedoch zeigte sich bei den von Wistarratten-Ammen aufgezogenen KN-Weibchen (Versuchsserie II) in der vorliegenden Arbeit sowie bei von Zuckerrattenmüttern aufgezogenen KN-Männchen und Weibchen (Schölch 2001) ein Heterozygoteneffekt im absoluten und prozentualen Fettgehalt. Ab einem Alter von 90 Tagen deutete sich bei den Weibchen der Versuchsserie I ein Heterozygoteneffekt in der Körpermasse an, der ab Tag 120 das Signifikanzniveau erreichte. Im Alter von 150 Tagen waren neben der Körpermasse auch die Werte für FFDM, Fettmasse und Fettgehalt sowie der Plasmaleptinspiegel, nicht aber der Plasmainsulinspiegel der heterozygoten Weibchen gegenüber den Werten der Wildtyp-Weibchen signifikant erhöht. Nach der sechswöchigen hochkalorischen Zusatzfütterung im Alter von 190 Tagen ist der Heterozygotenunterschied der Weibchen nur noch in der Körpermasse erhalten; in FFDM, Fettmasse und Plasmaleptinspiegel besteht noch ein tendenzieller Unterschied, und im Fettgehalt ist der Unterschied völlig verschwunden. Aufgrund des hochkalorischen Zusatzfutters oder des Alters scheint es zu einer Angleichung der Fettakkumulation zwischen den Genotypen zu kommen. Bei den Männchen zeigten sich nur im Alter von 150 Tagen beim Plasmaleptinspiegel für die heterozygoten Tiere höhere Werte als für die Wildtyp-Tiere.

Auch die Arbeitsgruppe um Cleary konnte einen Heterozygoteneffekt nach dem Absetzen nur bei Weibchen nachweisen. Zuckerratten-Weibchen mit Standardfutter nach dem Absetzen zeigten im Alter von 70 Tagen, wie die 150 Tage alten Weibchen der vorliegenden Studie, einen Heterozygoteneffekt in der Masse der entnommenen Fettdepots (inguinales sowie retroperitoneales mit parametrialen), im Fettgehalt und im Plasmaleptinspiegel aber ebenfalls nicht im Plasmainsulinspiegel (Cleary & Phillips 1999a). Die gleich alten Männchen zeigten weder bei fettarmer (Cleary & Phillips 1996) noch bei fettreicher Fütterung (Cleary et al. 1999b) Genotypunterschiede, wobei jedoch der Plasmaleptinspiegel nicht bestimmt wurde. Zu bedenken ist allerdings, daß die Geschlechter und die unterschiedlichen Fütterungsarten in verschiedenen Versuchsansätzen untersucht wurden. Zudem enthielten die Würfe entweder nur Wildtypen oder nur Heterozygoten, nie aber beide Genotypen. Es wäre jedoch wichtig Wurfgeschwister zu verwenden, da das Pflegeverhalten der Mutter einen wesentlichen Einflußfaktor auf die Entwicklung der Nachkommen darstellt (Schwarzer et al. 1997). Wie nötig es ist, Wurfgeschwister zu verwenden, zeigten Truett et al. (1995), bei deren Untersuchung eine Varianz von bis zu 70% bei verschiedenen Wachstumsdaten im Wurfefekt begründet war.

Möglicherweise ist die unterschiedliche Fetteinlagerung bei den Geschlechtern Ursache für das Vorhandensein des Genotypunterschieds bei den Weibchen. Geht man davon aus, daß die Fettverteilung bei Ratten wie beim Menschen ist, so befindet sich das Fett bei den Weibchen größtenteils in subcutanen und bei den Männchen überwiegend in viszeralen Bereichen. Da die Leptinexpression im subcutanen Fett größer ist als im viszeralen Fett und der PLS besser mit dem subcutanen Fett korreliert (Montague et al. 1997, Woods et al. 2003), könnten sich Unterschiede zwischen Wildtypen und Heterozygoten bei den Weibchen stärker ausprägen. Über die geschlechtsbedingte Verteilung des Fetts bei Ratten liegen zur Zeit jedoch keine Untersuchungen vor. Auch wenn Ratten nur mit wenig Fettgewebe geboren werden, beobachteten Truett et al. (1995) bereits bei 7 Tage alten Tieren Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen in Körpermasse und Inguinalfettmasse, wobei zumindest bei der Fettmasse eine Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht auftrat. In anderen Untersuchungen, bei denen die Gesamtkörperfettmenge bestimmt wurde, zeigte sich dagegen keine Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht, so daß beide Geschlechter gemeinsam ausgewertet wurden (Schwarzer et al. 1997, Olbort 1998, Kraeft et al. 1999).

Maher et al. (1996) verwandten für ihre Untersuchung der Genotypunterschiede wie in der vorliegenden Studie Wurfgeschwister. Aus der Veröffentlichung geht jedoch nicht klar hervor, ob bei 90 Tage alten Weibchen keine Genotypunterschiede vorhanden waren oder nicht untersucht wurden. Wie in der vorliegenden Studie zeigten 90 Tage alte Männchen nach einer siebenwöchigen (42 bis 90 Tage) fettarmen Fütterung keinen Genotypunterschied in der Körpermasse. Allerdings war ein Heterozygoteneffekt im Verhältnis der Körpermasse zum perirenal bzw. epididymalen Fett bei den fettarm gefütterten Männchen erkennbar. Die im selben Zeitraum fettreich gefütterten Männchen zeigten nicht nur im Gehalt der untersuchten Fettdepots einen Heterozygoteneffekt, sondern auch in der Körpermasse. Möglicherweise ist die Art der Ernährung bzw. der Zeitpunkt der diätetischen Manipulation für die Entstehung eines Genotypunterschieds bei den Männchen von Bedeutung. Während in der vorliegenden Studie die Tiere erst im Alter von 150 Tagen hochkalorisches Zusatzfutter erhielten, wurden die Tiere der Maher-Gruppe bereits im Alter von 42 Tagen ausschließlich fettreich ernährt (Maher et al. 1996). Um diese Fragen ausreichend klären zu können, müßten jedoch weitere Untersuchungen erfolgen.

4.8 Methodenkritik und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals mittels einer vollständigen Analyse der Körperzusammensetzung die Folgen einer früh-postnatalen Ernährungsmanipulation nicht nur auf adulte Wildtyp-Ratten sondern auch auf Tiere, die heterozygot für einen Leptinrezeptordefekt sind, dargestellt. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, tragen neben Stammesunterschieden auch Unterschiede in der Methode der Ernährungsmanipulation zur Variabilität in den Langzeiteffekten der früh-postnatalen Ernährung auf die Entwicklung von Ratten bei. Durch die angewendete „Rotation“ der Würfe sollten mögliche Unterschiede in der Milch (Volumen und Zusammensetzung) und im Verhalten der Muttertiere weitgehend ausgeglichen werden. Doch bedarf diese Methode weitere Untersuchungen, in denen geklärt werden muß, inwieweit durch die täglichen Störungen der Mutter-Wurf-Interaktion zusätzliche Langzeitwirkungen auf Körpermasse und –zusammensetzung sowie auf die Plasmaspiegel von Leptin und Insulin entstehen. So könnten die nach der hochkalorischen Zusatzfütterung relativ hohen PIS der adulten Tiere, die ohne Mutteraustausch im normalen Nest aufgezogen wurden, darauf zurückzuführen sein, daß die PIS der „rotierten“ KN- und UN-Tiere durch diese früh-postnatale Manipulation niedriger als normal sind. Dies müßte eine Folgeuntersuchung mit einem täglichen Austausch der Muttertiere

zwischen gleich großen Würfeln zeigen. Weiterhin sollten bei Folgeuntersuchungen geeignetere Zeitpunkte zur Blutentnahme für die Hormonanalysen gewählt werden (s. 4.5.3), als es hier durch die gleichzeitig durchgeführte TOBEC[®]-Messung möglich war. Überhaupt wäre es gerade im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen hilfreich eine Standardisierung der Versuchsbedingungen wie z.B. Wurfgröße, Anzahl der untersuchten Tiere, Einzel-/Gruppenhaltung nach dem Absetzen, etc. zu erreichen. Ungeachtet der methodischen Problematik konnte mit dem verwendeten Versuchsansatz klar gezeigt werden, daß sich bei hochkalorischer Zusatzfütterung der adulten Tiere der Heterozygotenunterschied nicht verstärkte.

Generell muß hervorgehoben werden, daß bei der gemeinsamen Betrachtung der eigenen Befunde und der anderer Autoren eine Langzeitwirkung der früh-postnatalen Ernährung bei anschließender Standardernährung auf die Körperzusammensetzung klar nachweisbar ist. Doch scheint besonders der Einfluß der früh-postnatalen Überernährung nicht sehr robust, so daß er leicht durch methodische Variationen überdeckt werden kann. Bei einer späteren Überernährung durch hochkalorisches Zusatzfutter scheint das Alter für die Persistenz der Effekte eine wichtige Rolle zu spielen. Während eine Überernährung in adulten Weibchen keine klaren Unterschiede zwischen KN und NN-Tiere hervortreten läßt (Hausberger & Volz 1984, eigene Befunde), konnte durch eine sofort nach dem Absetzen erfolgte Überernährung ein persistierender Unterschied zwischen diesen beiden Nesttypen erreicht werden (Petri²). Falls sich ein solcher Zusammenhang bestätigen ließe, wäre er besonders im Hinblick auf die Ernährungslage bei Kindern und Jugendlichen in Industrienationen von großem Interesse. Der Bedeutung der Ernährung nach dem Absetzen sollte daher in weiteren Untersuchungen Beachtung geschenkt werden. Weiterhin wäre es interessant eventuelle Geschlechtsunterschiede in der Reaktion zu untersuchen, da die vorliegende Arbeit darauf hinweist, daß adulte Männchen und Weibchen mit gleicher früh-postnataler Ernährung unterschiedlich auf eine hochkalorische Diät reagieren können. Da das Leben in den Industrienationen durch fehlende Kältebelastungen gekennzeichnet ist, wäre es zudem wünschenswert, dies in einem Tiermodell korrekt zu simulieren. Dabei ist es jedoch essentiell zu beachten, daß adulte Tiere – insbesondere laktierende Weibchen – bei Temperaturen, die für die Jungtiere in der Thermoneutralzone liegen, bereits eine Hitzebelastung erfahren. Wird dies nicht beachtet, können die Befunde durch die Hitzebelastung des Muttertieres, verfälscht werden (Schmidt 2001).

4.9 Einfluß der Aufzucht durch Ammen eines anderen Stammes

Durch die Aufzucht von Wistarratten- und Zuckerrattenwelpen im kleinen Nest von Ammen des anderen Stammes sollte getestet werden, inwieweit in späteren Untersuchungen größere initiale Unterschiede im Körperfettgehalt beim Absetzen erreicht werden können.

4.9.1 Mögliche Ursachen für eine erhöhte Fettakkumulation der Welpen im kleinen Nest

Ursächlich für eine erhöhte Fettakkumulation ist eine positive Energiebilanz, d. h. die Energieaufnahme ist größer als die Energieabgabe (Jequier & Tappy 1999). Die erhöhte Energieaufnahme von im kleinen Nest aufgezogenen Welpen resultiert sowohl aus einem größeren Milchvolumen als auch aus einer energiereicheren Milch (Fiorotto et al. 1991). Zudem hängt die Milchproduktion bei Ratten von der Wurfgröße der ersten Tage nach der Geburt ab (Edwardson & Eayrs 1967) und so erfolgte die Reduzierung der Wurfgröße in dieser Arbeit, um die Milchsekretion optimal zu stimulieren, erst am Tag 3 *p.n.* Ein weiterer Aspekt, der zu einer positiven Energiebilanz und damit letztendlich auch zu einer vermehrten Fetteinlagerung im kleinen Nest beitragen könnte, ist die Beobachtung, daß Rattenmütter um so mehr Zeit bei ihren Welpen verbringen, je kleiner der Wurf ist (Grotta 1973, Leon et al. 1978). Dies könnte sowohl Auswirkungen auf den Energiebedarf zur Thermoregulation (s. 4.3.5.2), wie den Energiebedarf beim Wettstreit der Welpen um das vorhandene Milchvolumen haben. Aus Untersuchungen an künstlich aufgezogenen Ratten ist bekannt, daß auch bei entsprechend reduzierter Milchmenge, eine Reduktion des thermoregulatorischen Aufwandes zu einer Zunahme des Körperfettgehaltes führt (Markewicz⁵). Dagegen führen vergrößerte Milchmengen, die Tieren mit hoher thermoregulatorischer Aktivität zugeführt werden, zu einem selektivem Zuwachs des Wachstums der FFDM bei niedrigem Körperfettgehalt (Meierfrankenfeld 1996). Allerdings wurde bei den genannten Untersuchungen nur das Milchvolumen und nicht die Milchzusammensetzung manipuliert.

In der vorliegenden Untersuchung wurde durch den Austausch der säugenden Mütter wahrscheinlich sowohl die Dauer der Anwesenheit auf dem Nest wie die Milchzusammensetzung und die pro Welpen verfügbare Milchmenge verändert. Eine Untersuchung an

⁵ Quelle: Diplomarbeit B. Markewicz, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, 1990

Wistarrattenwelpen, die im kleinen und im normalen Nest von Müttern des gleichen Stammes aufgezogen wurden, ergab am Tag 21 jeweils höhere Werte in Körpermasse, FFDM und Fettgehalt als für Zuckerratten (Schölch 2001). Dabei blieb jedoch offen, inwieweit dies auf genetisch bedingte Unterschiede in der Reaktion der Welpen oder der Muttertiere beruhte. Wie die vorliegende Untersuchung zeigt, führte die Aufzucht von Zuckerrattenwelpen durch Wistarratten-Ammen zu einem Anstieg aller untersuchten Parameter der Körperzusammensetzung gegenüber den von Zuckerrattenmüttern im kleinen und normalen Nest aufgezogenen Zuckerrattenwelpen. Ergänzend zeigen Beobachtungen in der Arbeitsgruppe, daß nach vierstündigen Trennungen Wistarratten die Welpen schneller und zielgerichteter wieder ins Nest holten, früher und ausdauernder säugten als Zuckerratten, die zudem anfälliger gegenüber Störungen waren und leichter das Säugen unterbrachen. Dadurch hatten innerhalb einer Stunde die von Wistarratten gesäugten Welpen mehr Milch aufgenommen als die von Zuckerratten gesäugten (Schmidt, unveröffentlicht). Dies weist deutlich darauf hin, daß bereits das Verhalten der Muttertiere und die dadurch bestimmte Verfügbarkeit von Milch eine wesentliche Rolle für die beobachteten Unterschiede in der Körperzusammensetzung (Schölch 2001) von ansonsten gleichbehandelten Absetzlingen der beiden Stämmen spielt. Unterschiede in der Laktationsleistung und Milchezusammensetzung zwischen den Stämmen müssen ebenfalls in Betracht gezogen werden. Arbeiten, die die Milchezusammensetzung der untersuchten Rattenstämme miteinander vergleichen, liegen jedoch nicht vor.

4.9.2 Verringerung des Heterozygoten-Unterschiedes durch Erreichen einer physiologischen Obergrenze in der Körpermasse

Bei einer Aufzucht im normalen Nest sind zum Zeitpunkt des Absetzens geringfügige Unterschiede im Körperfettgehalt zwischen den Wildtyp- und heterozygoten Zuckerratten zu beobachten (Olbort 1998), die durch eine früh-postnatale Überernährung deutlich verstärkt werden konnten (Schölch 2001). Die früh-postnatale Überernährung bedingte bei den weiblichen Heterozygoten sogar einen ähnlich hohen Körperfettgehalt wie bei den homozygoten Merkmalsträgern, die im normalen Nest aufgewachsen waren (Schölch 2001). Obwohl in der vorliegenden Arbeit durch die Ammenaufzucht die Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufzuchtformen zum Zeitpunkt des Absetzens in allen untersuchten Parametern der Körperzusammensetzung verstärkt werden konnten, verringerte sich der Heterozygoten-Unterschied bei Körperfettmasse und Körperfettgehalt soweit, daß bei den Männchen das Signifikanzniveau nicht mehr erreicht wurde. Während dieser Effekt bei

Betrachtung der Mittelwerte (Abb. 3.15) schwer verständlich erscheint, legt die Betrachtung der Korrelationen zwischen Körpermasse und FFDM bzw. Körperfett nahe, daß die Absetz-Körpermasse bei knapp 50 g für die Weibchen und 55 g für die Männchen eine physiologische Obergrenze erreicht hat, die nicht überschritten wird (vgl. Abbildung 3.14). Allerdings wäre innerhalb des physiologischen Bereiches von Absetz-Körpermassen durchaus noch eine weitere selektive Zunahme der Körperfettmasse möglich, wie die Betrachtung der Körperzusammensetzung von im kleinen Nest aufgezogenen *fa/fa*-Tieren zeigt (unveröffentlichte Ergebnisse, I. Schmidt). Im Gegensatz zur Reaktion der *fa/fa*-Tiere erfolgte jedoch die stärkere Zunahme der durchschnittlichen Körperfettmasse der Heterozygoten bei Aufzucht im kleinen Nest durch die eigene Mutter, sowohl bei Männchen wie Weibchen, zu einem wesentlichen Anteil proportional zu einem deutlichen Anstieg der Körpermasse (Schölch 2001), obwohl es auch zusätzlich zu einer Parallelverschiebung des Zusammenhanges zwischen Körperfettgehalt und Körpermasse kam. Inwieweit sich aus den unterschiedlichen Anteilen von proportionalem und überproportionalem Anstieg der Körperfettmasse bei den verschiedenen Aufzuchtformen bzw. Genotypen – analog zu den Befunden bei künstlicher Aufzucht (s. o.) – auf eine unterschiedliche starke Auswirkung von Veränderungen der thermischen und nutritiven Bedingungen schließen läßt, muß angesichts der oben diskutierten komplexen Veränderungen der Aufzuchtbedingungen im Nest offen bleiben.

4.9.3 Selektive Steigerung des Körperfettgehalts durch Ammenaufzucht von Wistarratten durch Zuckerrattenmütter

In der vorliegenden Arbeit führte die Aufzucht von Wistarrattenwelpen durch Zuckerratten-Ammen im kleinen Nest zu einer deutlichen Verminderung der Parameter der Körperzusammensetzung im Vergleich zu den von Wistarrattenmüttern im kleinen Nest aufgezogenen Tieren. Dies läßt sich teilweise bereits durch das unruhigere Verhalten der Zuckerrattenmütter erklären (s. o.), das vermutlich zu einer geringeren Milchverfügbarkeit im Vergleich zur Aufzucht durch Wistarrattenmütter im kleinen Nest führt. Auf der anderen Seite kommt es jedoch bei der Ammenaufzucht zu einem selektiven Anstieg des Körperfetts gegenüber den im normalen Nest von Wistarrattenmüttern aufgezogenen Wistarrattenwelpen mit gleicher Körpermasse. Unter Berücksichtigung der oben diskutierten Befunde an künstlich aufgezogenen Tieren könnte man spekulieren, daß dies darauf hinweist, daß sich die Milchverfügbarkeit im Vergleich zu den Welpen aus der normalen Aufzucht nicht erhöht hat, sondern eine reduzierte Kältebelastung aufgetreten ist. Allerdings ist nicht

auszuschließen, daß auch eine Erhöhung des Fettgehaltes der Milch zu einem selektiven Anstieg des Körperfettgehaltes führen könnte. Hinweise darauf, daß die Milchezusammensetzung von unterschiedlichen Rattenstämmen variiert, zeigen Arbeiten über Sprague-Dawley-Ratten (Fiorotto et al. 1991) und Zuckerratten (Godbole et al. 1981). Da jedoch auch die Veränderung der Nestgröße (normal gegen klein) zu berücksichtigen ist, sind die Verhältnisse wiederum viel zu komplex für eine Schlußfolgerung.

4.10 Fazit und Ausblick

Obwohl sich der Heterozygoten-Unterschied bei den Zuckerrattenwelpen durch die Ammenaufzucht mit Wistarrattenmüttern nicht vergrößert hat, bietet das gegenüber der Aufzucht im normalen Nest verdoppelte Körperfett einen guten Ansatzpunkt, um zu prüfen, ob sich stabilere Langzeitwirkungen der früh-postnatalen Ernährung bei einem vergrößerten initialem Unterschied im Körperfettgehalt ergeben. Vor allem aber bietet der bei der Aufzucht von Wistarrattenwelpen durch Zuckerrattenmütter beobachtete selektive Anstieg des Körperfettes einen besonders interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen über den Langzeiteinfluß der früh-postnatalen Adipositas. Gerade im Hinblick auf die Adipositasentwicklung beim Menschen wäre es außerdem wichtig zu klären, welche Faktoren zu dem selektiven Anstieg des Körperfettes unter diesen Bedingungen geführt haben. Zudem wäre generell eine analytische Klärung der unterschiedlichen Einflüsse wie der Änderung der thermischen Bedingungen, der Milchverfügbarkeit und der Milchezusammensetzung auf die Veränderungen in Körperfett und fettfreier Körpermasse wünschenswert. Eine solche Differenzierung wäre jedoch auf Grund der komplexen Situation im Nest nur in einem Modell mit künstlicher Aufzucht experimentell anzugehen.

5. Zusammenfassung

Die Langzeitwirkung von Manipulationen der Wurfgröße auf den Körperfettgehalt sowie den Plasmaleptin- (PLS) und Plasmainsulinspiegel (PIS) von Wildtyp- (+/+) und heterozygoten (+/fa) Zuckerratten zu ermitteln, war Hauptziel dieser Untersuchung. Hierfür erfolgte die Aufzucht der Welpen entweder im kleinen (KN, je 3-4 Welpen), im normalen (NN, je 10-12 Welpen) oder im normalen Nest, das sich als unterernährt herausstellte (UN, je 9-12 Welpen) bei täglicher „Rotation“ der Welpen, d. h., wenn jede Mutter abwechselnd an einem Tag ein NN und an ein bis zwei Tagen ein KN säugte. Zudem wurde untersucht, ob eine Überernährung der Adulten die Langzeitwirkungen der früh-postnatalen Ernährungseinflüsse akzentuiert. Nach dem Absetzen erhielten alle Tiere Standardfutter *ad libitum* und im Alter von 150 Tagen wurde die Körperzusammensetzung an lebenden Tieren mittels TOBEC[®] sowie der PLS und PIS bestimmt. Anschließend bekamen die Tiere sechs Wochen lang hochkalorisches Zusatzfutter neben dem Standardfutter angeboten. Am Versuchsende, im Alter von 190 Tagen, wurde die Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels TOBEC[®] wiederholt und neben den Hormonspiegeln auch die Körperzusammensetzung durch Trocknung bis Gewichtskonstanz und anschließender Chloroform-Extraktion ermittelt. Andererseits wurde das Körperfett mit dem individuell gemessenen Körperwasser und dem Hydrationsfaktor der durchschnittlichen fettfreien Körpermasse (FFM) berechnet. Nach Geschlechtern getrennt wurde neben der zweifaktoriellen ANOVA mit den Faktoren Aufzuchtart und Genotyp die Korrelation der untersuchten Parameter mit der Körpermasse beim Absetzen untersucht. Ergänzend wurde die Auswirkung der Interaktion zwischen Reduktion der Wurfgröße und dem Brutpflegeverhalten des Muttertiers auf die Adiposität beim Absetzen durch Austausch von Zuckerratten- bzw. Wistarrattenmüttern mit Ammen des anderen Stammes ermittelt, um zu testen, inwieweit in späteren Untersuchungen größere initiale Unterschiede im Körperfettgehalt beim Absetzen erzeugt werden können.

Überraschenderweise trat durch die „Rotation“ der Welpen keine verstärkte Überernährung der KN-Welpen auf. Dagegen resultierte aus der alternierenden Versorgung der normalen Würfe im Wechsel mit 1-2 kleinen Wurfen eine unerwartet große Unterernährung. Ursachen hierfür können sein, daß die Milch schneller als erwartet reduziert wurde, und der Milchfettgehalt nicht kompensatorisch angestiegen war. Weiterhin könnte die Mutter-Wurf-Interaktion durch die „Rotation“ gestört worden sein. Die signifikanten Unterschiede

in der Körpermasse von männlichen und weiblichen Zuckerratten aus verschiedenen Nesttypen am d21 (KN>NN>UN) waren bereits am d60 zwischen KN- und NN-Tieren verschwunden, so daß bis d150 KN=NN>UN. Ebenso zeigten Männchen und Weibchen am d150 signifikante Unterschiede in FFDM, Fettmasse und Fettgehalt zwischen NN- und UN-Tieren, nicht aber zwischen KN- und NN-Tieren. Ein Genotypunterschied (+/fa > +/+) zeigte sich bei den Weibchen ab d120 in der Körpermasse ebenso wie am d150 auch in FFDM, Fettmasse, Fettgehalt und PLS. Bei den Männchen galt nur am d150 PLS +/fa > +/+.

Nach der sechswöchigen hochkalorischen Zusatzfütterung bis zum Alter von 190 Tagen war bei den Weibchen der Unterschied zwischen den Aufzuchtarten in Körpermasse, FFDM, Fettmasse und Fettgehalt unverändert (KN=NN>UN), jedoch zeigte sich nun auch im PLS ein signifikanter Einfluß der Aufzuchtart (KN=NN>UN). Bei den Männchen ergab sich nach der hochkalorischen Zusatzfütterung zwar weiterhin in Körpermasse und FFDM KN=NN>UN, doch zeigte sich nun auch ein Unterschied zwischen KN und NN in Fettmasse und Fettgehalt, so daß KN>NN>UN.

Der bei den Weibchen an d150 vorhandene Genotypunterschied in der Körpermasse bestand nach der hochkalorischen Zusatzfütterung weiterhin, doch war er in FFDM, Fettmasse und PLS nur noch tendenziell und im Fettgehalt nicht mehr erkennbar. Auch bei den Männchen ergab sich an d190 kein Genotypunterschied mehr im PLS. PLS und PIS korrelierten bei beiden Geschlechtern sowohl am d150 wie d190 miteinander.

Regressionsanalysen zeigten, daß die Körpermasse beim Absetzen (d21) einen signifikanten Einfluß auf die Körpermasse des adulten Tieres hat. Während bei den Weibchen die hochkalorische Zusatzfütterung keinen Einfluß auf die Steilheit der Regressionsgeraden ausübte, bewirkte die Schokoladenfütterung bei den Männchen einen signifikant steileren Anstieg der Geraden ($P < 0,001$). Zudem korrelierte nicht nur der Körperfettgehalt der adulten Männchen und Weibchen mit dem Absetzgewicht, sondern im besonderen Maße auch die FFDM, wobei für die Männchen ($0,63 \leq r \leq 0,86$) die jeweilige Relation enger war als für die Weibchen ($0,48 \leq r \leq 0,59$).

Die Körperzusammensetzung war bei lebenden adulten Zuckerratten eines Versuchskollektivs sowohl mittels TOBEC[®]-Messung ($0,83 \leq r \leq 0,94$) als auch Wägung ($0,88 \leq r \leq 0,97$) gut vorhersagbar. Die finale physikalisch-chemische Bestimmung konnte mit Hilfe des

FFM-Hydrationsfaktors ($r = 0,99$ für den Zusammenhang der berechneten und gemessenen Körperzusammensetzungsparameter) erheblich vereinfacht werden. Dabei waren Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen, zwischen Wildtyp- und heterozygoten Tieren sowie zwischen den verschiedenen Aufzuchtarten vernachlässigbar gering.

Die Ammenaufzucht im KN durch Ammen des anderen Stammes hatte auf die Entwicklung der juvenilen Zucker- bzw. Wistarratten einen deutlichen Einfluß. So hatten von Wistarratten-Ammen aufgezogene Zuckerrattenwelpen eine signifikant höhere Körpermasse, FFDM und besonders Körperfettmasse im Vergleich zu Zuckerrattenwelpen, die von Zuckerrattenmüttern im KN aufgezogen wurden. Die von einer Zuckerratten-Amme im KN aufgezogenen Wistarrattenwelpen hatten dagegen niedrigere Werte für FFDM und Fettmasse, jedoch in gleicher Relation zur Feuchtmasse, wie die von Wistarrattenmüttern im kleinen Nest aufgezogenen Tiere. Bei ähnlicher Feuchtmasse zeigten sie aber eine fast doppelt so hohe Fettmasse im Vergleich zu den im NN von ihrer eigenen Mutter aufgezogenen Tieren.

Somit zeigt diese Arbeit, daß die frühpostnatale Ernährung sowohl Körpermasse, FFDM wie Fettgehalt von adulten männlichen und weiblichen Zuckerratten beeinflusst, der Einfluß der frühpostnatalen Überernährung im Laufe der Zeit jedoch nachläßt. Als Welpen überernährte Tiere unterscheiden sich im Alter von 150 Tagen in allen untersuchten Parametern nicht von den NN-Tieren, während eine frühpostnatale Unterernährung eine permanente Reduzierung aller untersuchten Parameter bewirkt. Weitere Untersuchungen sind wichtig um abzusichern, daß die Unterschiede in der Persistenz der Folgen einer frühpostnatalen Unter- bzw. Überernährung mit der Größe der bis zum Absetzen erzielten Unterschiede in Körpermasse und Körperfettgehalt zusammenhängen. Nach hochkalorischer Zusatzfütterung zeigten sich sechs Wochen später bei den Männchen wieder Unterschiede zwischen KN- und NN-Tieren in Fettmasse und Fettgehalt. Genotypunterschiede wurden nicht verstärkt, sondern verwischt. Versuche, die initialen Unterschiede im Körperfettgehalt der Absetzlinge aus kleinen und normalen Nestern durch Aufzucht von Ammen eines anderen Stammes zu vergrößern, waren vielversprechend.

Die gemeinsame Betrachtung der eigenen Befunde und der anderer Autoren zeigte klar eine Langzeitwirkung der früh-postnatalen Ernährung auf die Körperzusammensetzung, wenn die Tiere nach dem Absetzen die Standardnagetierdiät erhielten. Doch scheint besonders der Einfluß der früh-postnatalen Überernährung nicht sehr robust zu sein, so daß er

leicht durch methodische Variationen überdeckt werden kann. Folgeuntersuchungen müßten klären, inwieweit diese Befunde durch die verwendete Methodik des Welpenaustauschs beeinflußt wurden. Bei einer späteren Überernährung durch hochkalorisches Zusatzfutter scheint das Alter, in dem die Überernährung erfolgt, für die Persistenz der Effekte der früh-postnatalen Ernährung eine wichtige Rolle zu spielen. Bei Überernährung vom Absetzen an, nicht aber bei einer erst im adulten Tier beginnenden Überernährung bleiben die Folgen der früh-postnatalen Ernährung sichtbar oder verstärken sich sogar. Falls sich ein solcher Zusammenhang bestätigen ließe, wäre er besonders im Hinblick auf die Ernährungslage bei Kindern und Jugendlichen in Industrienationen von großem Interesse. Auch die Beobachtung, daß adulte Männchen und Weibchen mit gleicher früh-postnataler Ernährung unterschiedlich auf eine hochkalorische Diät reagieren, sollte in weiteren Untersuchungen aufgegriffen werden.

6. Summary

The primary objective of this study was to determine the long-term effects of manipulations of litter size on body fat content, as well as on plasma leptin concentration (PLC) and plasma insulin concentration (PIC) of wild-type (+/+) and heterozygous (+/fa) Zucker rats. For this purpose pups were reared in small litters (SL, 3-4 pups), normal litters (NL, 10-12 pups) or normal litters turning out to become undernourished (UL, 9-12 pups) under daily “rotation” of the pups, i. e. being nursed alternatingly by dams of normal litters on one day and small litters on one or two days. Furthermore, we investigated whether overnourishment of adult animals would amplify the effects of early postnatal nutrition. After weaning (d21) all animals were fed pellets *ad libitum* until the age of 150 days, when body composition of live rats was evaluated by Total Body Electrical Conductivity (TOBEC[®]), and PLC and PIC were also determined. In the following month animals had additionally access to high caloric food. At 190 days (end of investigation) the determination of body composition by TOBEC[®] was repeated, and after taking samples for plasma concentrations measurements of leptin and insulin, animals were sacrificed and body composition was evaluated by drying to constant mass, followed by whole body chloroform extraction in a Soxhlet apparatus. Alternately, we calculated body fat from individual measurements of body water by using the average fat-free mass (FFM) hydration factor, which had been determined from simultaneous analysis of both fat and water mass. The data were evaluated separately for each sex by two-way ANOVA with litter type and genotype as grouping factors. The relation between body mass on d21 and adult body composition was also analyzed by regression analysis. Additionally, we investigated the interactions between reduced litter size and maternal behavior in regard to body fat content on d21. Thus, we tested whether greater differences in body fat content at weaning could be attained as the basis for following studies by cross-fostering Zucker rat pups and Wistar rat pups to nurses of the other strain.

The daily “rotation” of normal and small litters, surprisingly, did not boost overnutrition in the SL pups. In contrast, it caused an unexpectedly strong undernutrition of the NL pups. The reasons for these results might be, that dams of small litters sooner reduced the amounts of milk more than expected, and did not increase fat content compensatorily. Further mother-pup-interaction may have been disturbed by “rotation”. Body masses of male and female Zucker rats from SL and NL differed significantly on d21, but this

difference vanished by d60, while the difference between NL and UL persisted, so that at d150 $SL=NL>UL$. There were also significant differences in fat-free dry mass (FFDM) between males and females from NL and UL, but not between SL and NL. Differences in body mass of d120-females and in FFDM, in fat mass, in fat content and in PLC of d150-females disclosed a heterozygous difference ($+/fa > +/+$), whereas males showed only a heterozygous difference in PLC at d150 ($+/fa > +/+$).

In d190-females, after animals had received the high-caloric supplement diet for 6 weeks, differences in body mass, in FFDM, in fat mass and in fat content persisted ($SL=NL>UL$). Additionally, a difference in PLC ($SL=NL>UL$) occurred. Significant differences in body mass and FFDM ($SL=NL>UL$) persisted in d190-males, but additionally, their fat mass and body fat content now also differed between SL and NL, so that $SL>NL>UL$.

The heterozygous difference, which was seen in d150-females persisted on the high-caloric diet for body mass, but tendencies for differences in FFDM and fat mass did not reach significance, and the differences in fat content had vanished. Similarly, the heterozygous difference in PLC for the d190-males vanished. PLC and PIC were correlated with each other in both genders on d150 and d190.

Regression analysis indicated that adult body mass was significantly correlated with body mass on d21. While the high-caloric supplement diet did not influence the slope of the regression line for the females, it had increased distinctly for that of the males ($P < 0,001$). In addition, not only body fat content but also FFDM were correlated with body mass on d21, each correlation being closer for males ($0.63 \leq r \leq 0.86$) than for females ($0.48 \leq r \leq 0.59$).

Within investigated cohorts, body composition of alive adult Zucker rats was predicted by TOBEC[®] ($0.83 \leq r \leq 0.94$) as well as by weighing ($0.88 \leq r \leq 0.97$). Final physical-chemical determination of body composition could be simplified by calculation using the FFM-hydration factor ($r = 0.99$ for correlations between evaluated and calculated parameters of body composition). Differences in the FFM-hydration factors of males and females, wild-type and heterozygous rats, as well as between different litter types were negligible.

Cross-fostering of SL Zucker rat pups and Wistar rat pups to nurses of the other strain had strong effects on weaning body composition. Cross-fostered SL Zucker rat pups showed significant increases in body mass, FFDM, and especially in fat mass compared to pups,

which were reared in SL by their own mothers. In contrast, cross-fostered SL Wistar rat pups had lower values for FFDM and fat mass, but the relation between these parameters and carcass mass was the same as for SL animals, which were reared by their own mothers. Moreover, they had almost twice the fat mass of pups with the same carcass mass, which were reared in NL by their own mothers.

The present study revealed early postnatal nutrition effects on body mass, FFDM, and fat content of adult male and female Zucker rats. The influence of overnutrition during suckling-age decreases however, over the course of time. By d150 SL and NL did not differ in any analyzed parameter. In contrast, early undernutrition caused a permanent reduction in all analyzed parameters. Further studies are necessary to ascertain the notion that the persistence of the differences caused by early postnatal overnutrition and undernutrition depends on the size of differences in body mass and body fat content obtained by d21. On d190, after 6 weeks with the high-caloric diet, fat mass and fat content of SL and NL males were again significantly different. Heterozygous differences did not increase, but rather vanished. Attempts to use nurses of a different strain to increase the initial differences between the body fat contents of weanlings from SL and NL were promising.

Taken together the present study and previously published data by others clearly demonstrate long-term effects of early postnatal nutrition on body composition, when the rats were maintained on standard rat chow after weaning. But especially the influence of early postnatal overnutrition does not seem to be very robust, and may be easily concealed by methodical variations. Further research is necessary to clarify to which extend these results depend on the particular method used here to manipulate early postnatal nutrition. The age in which post-weaning overnutrition occurs seems to be important for the persistence of effects of early postnatal nutrition. Overnutrition from weaning but not adult overnutrition, seems to favor persistence or even increases of differences in body composition resulting from early postnatal overnutrition. If this notion could be confirmed, it would be very important with regard to nutrition levels of children and teenagers in industrialized nations. Also, the observation that adult males and females with the same early postnatal nutrition react to adult overnutrition in different ways should be further investigated.

7. Literaturverzeichnis

Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK, Flier JS; Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology*, 140 (11): 4923-4931 (1999)

Ahima RS, Flier JS; Leptin. *Annu Rev Physiol*, 62: 413-437 (2000)

Alberts JR; Huddling by rat pups: group behavioral mechanisms of temperature regulation and energy conservation. *J Comp Physiol Psychol*, 92 (2): 231-245 (1978)

Aubert R, Suquet JP, Lemonnier D; Long-term morphological and metabolic effects of early under- and over-nutrition in mice. *J Nutr*, 110 (4): 649-661 (1980)

Baer DJ, Rumpler WV, Barnes RE, Kressler LL, Howe JC, Haines TE; Measurement of body composition of live rats by electromagnetic conductance. *Physiol Behav*, 53 (6): 1195-1199 (1993)

Barlow SE, Dietz WH; Obesity evaluation and treatment: Expert Committee recommendations. *Pediatrics*, 102 (3): e29 (1998)

Barker DJ; The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ*, 301 (6761): 1111 (1990)

Bassett DR, Craig BW; Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. *J Appl Physiol*, 64 (3): 1249-1256 (1988)

von Bezold A; Untersuchungen über die Vertheilung von Wasser, organischer Materie und anorganischen Verbindungen im Thierreiche. *Z. wissenschaft. Zoologie*, VIII: 487 (1857)

Blaxter KL; Lactation and the growth of the young. In: Kon SK, Cowie AT (Eds.): Milk: the mammary gland and its secretion. *Academic Press, New York*, Vol. 2: 305-361 (1961)

Boden G, Chen X, Kolaczynski JW, Polansky M; Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest*, 100 (5): 1107-1113 (1997)

Bortz J; Kovarianzanalyse. In: Statistik für Sozialwissenschaftler. 5. überarbeitete Auflage. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*, S. 350 (1999)

Boylan JW, Deetjen P, Kramer K; Salz- und Wasserhaushalt. In: Gauer OH, Kramer K, Jung R (Hrsg.): Physiologie des Menschen. *München-Berlin-Wien: Urban und Schwarzenberg*, Bd. 7, S: 111 (1970)

Bracco EF, Yang MU, Segal K, Hashim SA, Van Itallie TB; A new method for estimation of body composition in the live rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 174 (2): 143-146 (1983)

Bray GA; The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc*, 36 (2): 148-153 (1977)

Brownlee KA; Statistical theory and methodology. *John Wiley & Sons Inc*, New York, London, Sydney (1965)

Cannon B, Nedergaard J; Brown adipose tissue: Molecular mechanisms controlling activity and thermogenesis. In: Cryer A, and Van RLR (Eds.): *New Perspectives in Adipose Tissue: Structure, Function and Development. Butterworths, London*, 223-227 (1985)

Chard T; An introduction to radioimmunoassay and related techniques. In: Work TS, Work E (Eds.): *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Biochemical Press Amsterdam; Amsterdam, New York, Oxford*, Vol. 6, Part 2, (1982)

Chua SC Jr, White DW, Wu-Peng XS, Liu SM, Okada N, Kershaw EE, Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Tartaglia LA, Leibel RL; Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (*Lepr*). *Diabetes*, 45 (8): 1141-1143 (1996)

Chung WK, Belfi K, Chua M, Wiley J, MacKintosh R, Nicolson M, Boozer CN, Leibel RL; Heterozygosity for *Lep^{ob}* or *Lepr^{db}* affects body composition and leptin homeostasis in adult mice. *Am J Physiol (Regu Int Comp Physiol)*, 274: R985-R990 (1998)

Cleary MP, Phillips FC; Metabolic comparisons of 10-week-old obese (*fa/fa*) Zucker rats with both heterozygous (*FA/fa*) and homozygous (*FA/FA*) lean rats, *Nutr Res*, 16 (8): 1341-1352 (1996)

Cleary MP, Phillips FC; The presence of the “*fa*” gene in heterozygous (*FA/fa*) lean female rats: effects on body weight, body fat and serum leptin. *Obes Res*, 7 (3): 293-298 (1999a)

Cleary MP, Phillips FC, Morton RA; Genotype and diet effects in lean and obese Zucker rats fed either safflower or coconut oil diets. *Proc Soc Exp Biol Med*, 220 (3): 153-161 (1999b)

Colditz GA; Economic costs of obesity and inactivity. *Med Sci Sports Exerc*, 31 (11): S663-S667 (1999)

Coleman DL; Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*, 9 (4): 294-298 (1973)

Considine RV, Caro JF; Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol*, 29 (11): 1255-1272 (1997)

Crnic LS, Chase HP; Models of infantile undernutrition in rats: effects on brain lipids. *Dev Neurosci*, 3 (2): 49-58 (1980)

Crouse JA, Elliott GE, Burgess TL, Chiu L, Bennett L, Moore J, Nicolson M, Pacifici RE; Altered cell surface expression and signaling of leptin receptors containing the fatty mutation. *J Biol Chem*, 273 (29): 18365-18373 (1998)

- Cunningham JJ, Molnar JA, Meara PA, Bode HH;** In vivo total body electrical conductivity following perturbations of body fluid compartments in rats. *Metabolism*, 35 (6): 572-575 (1986)
- Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B;** The *ob* gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*, 44 (12): 1467-1470 (1995)
- Dietz WH;** Critical periods in childhood for the development of obesity. *Am J Clin Nutr*, 59: 955-959 (1994)
- Dörner G;** Environment - dependent brain differentiation and fundamental processes of life. *Acta biol med germ*, 33: 129-148 (1974)
- Dörner G;** Hormones and brain differentiation. *Elsevier*, Amsterdam, New York, Oxford (1976)
- Dörner G;** Hormone - dependent brain development and preventive medicine. *Monogr Neural Sci*, 12:17-27 (1986)
- Duff DA, Snell K;** Effect of altered neonatal nutrition on the development of enzymes of lipid and carbohydrate metabolism in the rat. *J Nutr*, 112 (6): 1057-1066 (1982)
- Dymsza HA, Czajka DM, Miller SA;** Influence of artificial diet on weight gain and body composition of the neonatal rat. *J Nutr*, 84: 100-106 (1964)
- Edwardson JA, Eayrs JT;** Neural factors in the maintenance of lactation in the rat. *J Endocrinology*, 38 (1): 51-59 (1967)
- Eiden S, Preibisch G, Schmidt I;** Leptin responsiveness of juvenile rats: proof of leptin function within the physiological range. *J Physiol*, 530 (1): 131-139 (2001)
- Farias-Silva E, Sampaio-Barros MM, Amaral ME, Carneiro EM, Boschero AC, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC;** Subsensitivity to insulin in adipocytes from rats submitted to foot-shock stress. *Can J Physiol Pharmacol*, 80 (8): 783-789 (2002)
- Faust IM, Johnson PR, Hirsch J;** Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. *J Nutr*, 110 (10): 2027-2034 (1980)
- Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ;** Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol (Regu Int Comp Physiol)*, 260 (29): R1104-R1113 (1991)
- Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS;** Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*, 1 (12): 1311-1314 (1995)

Fresiello A, Grammatikopoulos G, Pignatelli M, Sadile AG; Environmental factors during postnatal period modify activity and non-selective attention in the Naples High-Excitability rat. *Behav Brain Res*, 130: 111-115 (2002)

Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ; Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 14564-14568 (1996)

Gettys TW, Harkness PJ, Watson PM; The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology*, 137 (9): 4054-4057 (1996)

Gilbert AN; Mammary number and litter size in Rodentia: The "one-half rule". *Proc Natl Acad Sci USA*, 83 (13): 4828-4830 (1986)

Godbole VY, Grundleger ML, Pasquine TA, Thenen SW; Composition of rat milk from day 5 to 20 of lactation and milk intake of lean and preobese Zucker pups. *J Nutr*, 111 (3): 480-487 (1981)

Gosselin C, Cabanac M; Ever higher: constant rise of body weight set-point in growing Zucker rats. *Physiol Behav*, 60 (3): 817-821 (1996)

Grota LJ; Effects of litter size, age of young, and parity on foster mother behaviour in *Rattus norvegicus*. *Anim Behav*, 21 (1): 78-82 (1973)

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

Hales CN, Barker DJ; Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35 (7): 595-601 (1992)

Hardie LJ, Guilhot N, Trayhurn P; Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res*, 28 (12): 685-689 (1996a)

Hardie LJ, Rayner DV, Holmes S, Trayhurn P; 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 (3): 660-665 (1996b)

Harker WH; Method and apparatus for measuring fat content in animal tissue either in vivo or in slaughtered and prepared form. *US Patent 3735247, The EMME Company, Assignee U.S. Patent Office* (1973)

Harris PM; Changes in adipose tissue of the rat due to early undernutrition followed by rehabilitation 1. Body composition and adipose tissue cellularity. *Br J Nutr*, 43: 15-26 (1980a)

- Harris PM;** Changes in adipose tissue of the rat due to early undernutrition followed by rehabilitation 2. Strain differences and adipose tissue cellularity. *Br J Nutr*, 43: 27-31 (1980b)
- Harris RB;** Leptin – much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr* 20: 45-75 (2000)
- Hausberger FX, Volz JE;** Feeding in infancy, adipose tissue cellularity and obesity. *Physiol Behav*, 33 (1): 81-87 (1984)
- Howard E, Granoff DM;** Effect of neonatal food restriction in mice on brain growth, DNA and cholesterol, and on adult delayed response learning. *J Nutr*, 95: 111-121 (1968)
- Hufnagel C, Eiden S, Nuesslein-Hildesheim B, Zhang Y, Leibel R, Schmidt I;** Mutation in the leptin receptor (*Lepr^{fa}*) causes fat-storage-independent hyperleptinaemia in neonatal rats. *Pflügers Arch*, 438 (4): 570-572 (1999)
- Hufnagel C;** Ontogenetische Veränderungen des Plasmaleptinspiegels und seine Regulation bei 10 Tage alten Ratten. *Dissertation*, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen (2001)
- Janssen SW, Martens GJ, Sweep CG, Ross HA, Hermus AR;** In Zucker diabetic fatty rats plasma leptin levels are correlated with plasma insulin levels rather than with body weight. *Horm Metab Res*, 31 (11): 610-615 (1999)
- Jequier E, Tappy L;** Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev*, 79 (2): 451-480 (1999)
- Johanson IB;** Thermotaxis in neonatal rat pups. *Physiol Behav*, 23 (5): 871-874 (1979)
- Kennedy GC;** The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc Roy Soc London Ser B*, 140 (901): 578-592 (1953)
- Knittle JL, Hirsch J;** Effect of early nutrition on the rat development of rat epididymal fat pads: cellularity and metabolism. *J Clin Invest*, 47 (9): 2091-2098 (1968)
- Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, Mudaliar SR, Olefsky J, Caro JF;** Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies *in vivo* and *in vitro*. *Diabetes*, 45 (5): 699-701 (1996)
- Kopelman PG;** Obesity as a medical problem. *Nature*, 404: 635-643 (2000)
- Kraeft S, Schwarzer K, Eiden S, Nuesslein-Hildesheim B, Preibisch G, Schmidt I;** Leptin responsiveness and gene dosage for leptin receptor mutation (*fa*) in newborn rats. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)*, 276 (39): E836-E842 (1999)
- Langhans W, Scharrer E;** Regulation der Nahrungsaufnahme. In: v. Engelhardt W, Breves G (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart: 409 (2000)

Lat J, Widdowson EM, McCance RA; Some Effects of Accelerating Growth. III. Behaviour and Nervous Activity. *Proc Roy Soc London Ser B*, 153 (952): 347-356 (1961)

Leon M, Croskerry PG, Smith GK; Thermal control of mother-young contact in rats. *Physiol Behav*, 21 (5): 793-811 (1978)

Levin BE; The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits. *Obes Res*, 8(4): 342-347 (2000)

Lévy E, Lévy P, Le Pen C, Basdevant A; The economic cost of obesity: the French situation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 19 (11): 788-792 (1995)

Lucas A; Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr*, 128 (2 Suppl): 401S-406S (1998)

MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD; Regulated expression of the *obese* gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (20): 9034-9037 (1995)

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al.; Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*, 1 (11): 1155-1161 (1995a)

Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM; Increased expression in adipocytes of *ob* RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the *db* locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (15): 6957-6960 (1995b)

Maher M, Banz WJ, Truett GE, Zemel MB; Dietary fat and sex modify heterozygote effects of the rat fatty (*fa*) allele. *J Nutr*, 126 (10): 2487-2493 (1996)

Meierfrankenfeld B; Kontrolle des Energiestoffwechsels im Säuglingsalter: Vergleich genetisch fettsüchtiger und normaler Ratten. *Dissertation*, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin (1996)

Markewicz B, Kuhmichel G, Schmidt I; Onset of excess fat deposition in Zucker rats with and without decreased thermogenesis. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)*, 265: E478-E486 (1993)

Matsuno AY, Esrey KL, Perrault H, Koski KG; Low intensity exercise and varying proportions of dietary glucose and fat modify milk and mammary gland compositions and pup growth. *J Nutr*, 129 (6): 1167-1175 (1999)

Moinat M, Deng C, Muzzin P, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Dulloo AG, Giacobino JP; Modulation of *obese* gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Lett*, 373 (2): 131-134 (1995)

- Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O'Rahilly S;** Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*, 46 (3): 342-347 (1997)
- Moulton CR; Trowbridge PF, Haigh LD;** *Missouri Agric. Exp. Station Research Bull*, 55: 21 (1922)
- Moulton CR;** Age and Chemical Development in Mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 57: 79-97 (1923)
- Nicholls DG, Locke RM;** Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*, 64 (1): 1-64 (1984)
- Olbort M;** Auswirkungen von einer oder zwei Kopien des Leptinrezeptordefektes *fa (fatty)* auf die Körperzusammensetzung und den Plasma-Leptinspiegel von Ratten im Säuglingsalter. *Dissertation*, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen (1998)
- Oscai LB, McGarr JA;** Evidence that the amount of food consumed in early life fixes appetite in the rat. *Am J Physiol (Regu Int Comp Physiol)*, 235 (3): R141-144 (1978)
- Ozanne SE, Hales CN;** The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc*, 58 (3): 615-619 (1999)
- Pace N, Rathbun EN;** The body water and chemically combined nitrogen content in relation to fat content. *Journal of Biological Chemistry*, 158: 685-691 (1945)
- Packard GC, Boardman TJ;** The use of percentages and size-specific indices to normalize physiological data for variation in body size: wasted time, wasted effort? *Comp Biochem Physiol Part A*, 122: 37-44 (1999)
- Parkes AS;** The growth of young mice according to size of litter. *Ann Appl Biol*, 13: 374-394 (1926)
- Patel B, Koenig JI, Kaplan LM, Hooi SC;** Increase in plasma leptin and *Lep* mRNA concentrations by food intake is dependent on insulin. *Metabolism*, 47 (5): 603-607 (1998)
- Pitts RF;** Physiology of the kidney and body fluids. *Chicago, Year Book Medical Publishers*, 20-41 (1963)
- Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W, Dörner G;** Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol*, 99 (3): 154-158 (1992)
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, Dörner G;** Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galanergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res*, 836: 146-155 (1999a)

Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T, Rohde W, Dörner G; Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J Neuroendocrinol*, 11 (7): 541-546 (1999b)

del Prado M, Delgado G, Villalpando S; Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. *J Nutr*, 127 (3): 458-462 (1997)

Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW; Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*, 295: 349-353 (1976)

Ravussin E, Valencia ME, Esparza J, Bennett PH, Schulz LO; Effects of a traditional lifestyle on obesity in Pima Indians. *Diabetes Care*, 17 (9): 1067-1074 (1994)

Rentsch J, Chiesi M; Regulation of *ob* gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*, 379 (1): 55-59 (1996)

Roberts SB, Coward WA; Dietary supplementation increases milk output in the rat. *Br J Nutr*, 53 (1): 1-9 (1985)

Robin JP, Heitz A, Le Maho Y, Lignon J; Physical limitations of the TOBEC method: accuracy and long-term stability. *Physiol Behav*, 75: 105-118 (2002)

Roby DD; A comparison of two noninvasive techniques to measure total body lipid in live birds. *The Auk*, 108: 509-518 (1991)

Ronayne de Ferrer PA, Sambucetti ME; Casein to whey protein ratio in rat and human milks: effects of maternal protein intake. *J Dairy Sci*, 76 (6): 1645-1653 (1993)

Russell JA; Milk yield, suckling behaviour and milk ejection in the lactating rat nursing litters of different sizes. *J Physiol*, 303: 403-415 (1980)

Sachs L, Angewandte Statistik: Statistische Methoden und ihre Anwendung. 8. Auflage Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1997)

Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J; Transient increase in *obese* gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, 377 (6549): 527-529 (1995)

Schmidt I, Kaul R, Heldmaier G; Thermoregulation and diurnal rhythms in 1-week-old rat pups. *Can J Physiol Pharmacol.*, 65 (6): 1355-1364 (1987)

Schmidt I, Schölch C, Ziska T, Schneider D, Simon E, Plagemann A; Interaction of genetic and environmental programming of the leptin system and of obesity disposition. *Physiol. Genomics*, 3 (2): 113-120 (2000)

- Schmidt I, Fritz A, Schölch C, Schneider D, Simon E, Plagemann A;** The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25 (8): 1168-1174 (2001)
- Schmidt I;** The role of juvenile thermoregulatory thermogenesis in the development of normal energy balance or obesity. In: Kosaka M, Sugahara T, Schmidt KL, Simon E (Eds.): *Thermotherapy of neoplasia, inflammation and pain. Springer-Verlag Tokyo*, 215-225 (2001)
- Schmidt I;** Metabolic diseases: the environment determines the odds, even for genes. *News Physiol Sci*, 17: 115-121 (2002)
- Schneider R;** Relevanz und Kosten der Adipositas in Deutschland. *Ernährungsumschau*, 43: 369-374 (1996)
- Schölch C;** Untersuchungen des Leptin-Systems und des Stoffwechsels juveniler Ratten: Zwei Adipositas-Modelle. *Dissertation*, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen (2001)
- Schoeller DA;** Changes in total body water with age. *Am J Clin Nutr*, 50: 1176-1181 (1989)
- Schwarzer K, Döring H, Schmidt I;** Different physiological traits underlying increased body fat of fatty (*fa/fa*) and heterozygous (*+/fa*) rats. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)*, 272 (35): E100-E106 (1997)
- Seidell JC;** The impact of obesity on health status: some implications for health care costs. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 19 (6): S13-16 (1995)
- Sheng HP, Huggins RA;** A review of body composition studies with emphasis on total body water and fat. *Am J Clin Nutr*, 32 (3): 630-647 (1979)
- Shintani M, Nishimura H, Yonemitsu S, Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Nakao K;** Downregulation of leptin by free fatty acids in rat adipocytes: effects of triacsin C, palmitate, and 2-bromopalmitate. *Metabolism*, 49 (3): 326-330 (2000)
- Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR.** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, 281 (5383): 1683-1686 (1998)
- da Silva BA, Bjørnbæk C, Uotani S, Flier JS;** Functional properties of leptin receptor isoforms containing the *gln*→*pro* extracellular domain mutation of the fatty rat. *Endocrinology*, 139 (9): 3681-3690 (1998)
- Silverman BL, Purdy LP, Metzger BE;** The intrauterine environment: implications for the offspring of diabetic mothers. *Diabetes Reviews*, 4 (1): 21-35 (1996)

Sivitz WI, Walsh S, Morgan D, Donohoue P, Haynes W, Leibel RL; Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats. *Metabolism*, 47 (5): 584-591 (1998)

Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW; Regulation of expression of *ob* mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*, 271 (10): 5301-5304 (1996)

Smoller JW, Truett GE, Hirsch J, Leibel RL; A molecular genetic method for genotyping fatty (*fa/fa*) rats. *Am J Physiol (Regu Int Comp Physiol)*, 264 (33): R8-R11 (1993)

Srinivasan M, Laychock SG, Hill DJ, Patel MS; Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Exp Biol Med*, 228: 15-23 (2003)

Stenger J, Bielajew C; Comparison of TOBEC-derived total body fat with fat pad weights. *Physiol Behav*, 57 (2): 319-323 (1995)

Stewart CA; Changes in the weight of the various parts, systems and organs in albino rats kept at birth weight by underfeeding for various periods. *Am J Physiol*, 48: 67-78 (1919)

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, et al; Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83 (7): 1263-1271 (1995)

Trayhurn P, Thomas ME, Duncan JS, Rayner DV; Effects of fasting and refeeding on *ob* gene expression in white adipose tissue of lean and obese (*ob/ob*) mice. *FEBS Lett*, 24; 368 (3): 488-490 (1995)

Trayhurn P, Duncan JS, Hoggard N, Rayner DV; Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proc Nutr Soc*, 57 (3): 413-419 (1998)

Trocki O, Baer DJ, Castonguay TW; An evaluation of the use of total body electrical conductivity for the estimation of body composition in adult rats: effect of dietary obesity and adrenalectomy. *Physiol Behav*, 57 (4): 765-772 (1995)

Truett GE, Tempelman RJ, Walker JA; Codominant effects of the fatty (*fa*) gene during early development of obesity. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)*, 268 (31): E15-E20 (1995)

Vickers MH, Breier B, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD; Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)*, 279 (1): E83-E87 (2000)

Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, Rascher W, Teller W, Tornqvist H, Hauner H; Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*, 45 (10): 1435-1438 (1996)

Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L; A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*, 393 (6686): 684- 688 (1998)

- Wang J, Liu R, Liu L, Chowdhury R, Barzilai N, Tan J, Rossetti L;** The effect of Leptin on *Lep* expression is tissue-specific and nutritionally regulated. *Nat Med*, 5: 895-899 (1999)
- Wang Z, Deurenberg P, Wang W, Pietrobelli A, Baumgartner RN, Heymsfield SB;** Hydration of fat-free body mass: review and critique of a classic body-composition constant. *Am J Clin Nutr*, 69: 833-841 (1999)
- Waterland RA, Garza C;** Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*, 69: 179-197 (1999)
- Wauters M, Considine RV, van Gaal LF;** Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Europ J Endocrinol*, 143 (3): 293-311 (2000)
- WHO;** Physical inactivity a leading cause of disease and disability, Warns WHO; *Press Release WHO/23* (2002)
- Widdowson EM, McCance RA;** Some effects of accelerating growth. I. General somatic development. *Proc Roy Soc London Ser B*, 152 (947): 188-206 (1960)
- Woods SC, Seeley RJ;** Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition*, 16: 894-902 (2000)
- Woods SC, Gotoh K, Clegg DJ;** Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med*, 228 (10): 1175-1180 (2003)
- Wurtman JJ, Miller SA;** Effect of litter size on weight gain in rats. *J Nutr*, 106 (5): 697-701 (1976)
- You S, Götz F, Rohde W, Dörner G;** Early postnatal overfeeding and diabetes susceptibility. *Exp Clin Endocrinol*, 96 (3): 301-306 (1990)
- Young JB;** Effects of litter size on sympathetic activity in young adult rats. *Am J Physiol (Regu Int Comp Physiol)*, 282: R1113-R1121 (2002)
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM;** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432, (1994)
- Zhang Y, Olbort M, Schwarzer K, Nuesslein-Hildesheim B, Nicolson M, Murphy E, Kowalski TJ, Schmidt I, Leibel RL;** The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression, *Biochem Biophys Res Commun*, 240: 492-495 (1997)
- Zhang Y, Hufnagel C, Eiden S, Guo KY, Diaz PA, Leibel RL, Schmidt I;** Mechanisms for LEPR-mediated regulation of leptin expression in brown and white adipocytes in rat pups. *Physiol Genomics*, 4: 189-199 (2001)

Zhang Y, Guo KY, Diaz PA, Heo M, Leibel RL; Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am J Physiol (Regul Integr Comp Physiol)*, 282 (1): R226-R234 (2002)

Zucker LM, Zucker TF; Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered*, 52: 275-278 (1961)

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir mit Rat, Tat, Zuversicht und nicht zu letzt Humor über die lange Zeit des Schreibens der Arbeit beigestanden haben.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ingrid Schmidt für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können sowie für die ausgezeichnete Betreuung und ihren unermüdlichen Einsatz während der Anfertigung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Eckhart Simon danke ich für die Lösungen statistischer Probleme und für seine Anregungen zu dieser Arbeit. Für die Vertretung der Arbeit an der Justus-Liebig-Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger.

Helmuth Busch und Frank Voß waren bei Problemen mit Computer und Drucker immer schnell zur Stelle, dafür ein herzliches Dankeschön. Ebenso waren Klaus Burk und Wolfgang Schubert mit ihrem Werkstatt-Team stets bereit nach den Ursachen für Ausfälle der Apparaturen (natürlich meist kurz vor Feierabend) zu suchen und zu beheben. An dieser Stelle mein herzlicher Dank.

Ohne tatkräftige Unterstützung von Roswitha Bender und Diana Fuchs wäre die Durchführung der RIAs und anderen „kleinen“ Laborarbeiten nur schlecht möglich gewesen. Aleks, Annette, Birgit, Caro, Chris, Heiko, Janine, Michaela, Nicole und Sina danke ich für die vielen schönen Stunden. Sandra Eiden danke ich für die intensive Einarbeitung am Computer und in die Theorie meines Arbeitsgebiets. Cornelia Alt und Ute Albrecht haben mit unermüdlichem Einsatz und (Galgen-)Humor einen wesentlichen Beitrag zum praktischen Teil dieser Arbeit beigetragen. Ein herzliches Dankeschön für das gründliche Korrekturlesen an Karin Weide. Carmen Hufnagel und Björn Petri verdienen einen besonderen Dank, da sie sich nicht gescheut haben, die Auswirkungen einer hochkalorischen Zusatzernährung auf den adulten Organismus, gemeinsam mit mir im Selbstversuch zu testen.

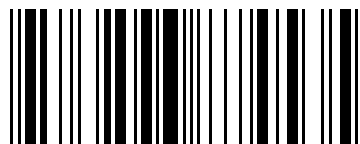
Last but not least, möchte ich meinen Eltern ganz herzlich danken.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-453-5



9 7 8 3 8 9 6 8 7 4 5 3 5